

Aus der Abteilung für Hämatologie und Onkologie
der II. Medizinischen Klinik
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. C. Bokemeyer

**MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSE
DER WIRKUNG DES ANGIOGENESEINHIBITORS SU6668
ALS SECOND-LINE THERAPIE IM RAHMEN EINER STUDIE
BEI PATIENTEN MIT MULTIPLEM MYELOM**

Dissertation

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

Melanie Bruweleit aus Gifhorn

Hamburg 2006

INHALTSVERZEICHNIS

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	4
2. EINLEITUNG	5
2.1 DAS MULTIPLE MYELOM	5
2.1.1 Das „Knochenmark-Mikroenvironment“	8
2.1.2 Interleukin-6	10
2.1.3 Andere wichtige Zytokine	12
2.1.4 Apoptose und Multiples Myelom	13
2.2 ANGIOGENESE	15
2.2.1 Tumorangiogenese	16
2.2.2 Multiples Myelom (MM) und Angiogenese	17
2.2.3 Rezeptortyrosinkinasen, ihre Signalmoleküle und ihre Rolle in der Angiogenese	21
2.2.3.1 VEGF und seine Rezeptoren	21
2.2.3.2 FGF und PDGF und ihre Rezeptoren	24
2.3 ANTIANGIOGENETISCHE WIRKSTOFFE	27
2.4 DER WIRKSTOFF SU6668	28
3. MATERIAL UND METHODEN	33
3.1 STUDIENDESIGN	33
3.2 PATIENTENPROBEN	35
3.3 ISOLIERUNG VON MONONUKLEÄREN ZELLEN AUS DEM KNOCHENMARK	36
3.4 AUFREINIGUNG DER CD138+-ZELLEN	36
3.5 ISOLIERUNG VON RNA UND SYNTHESE VON KOMPLEMENTÄREER DNA	37
3.6 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR	39
3.6.1 Durchführung der RT-PCR	43
3.6.2 Ablauf der PCR-Reaktion	44
3.7 ELISA	45
3.8 STATISTISCHE ANALYSE DER DATEN	47
4. ERGEBNISSE	48
4.1 DESKRIPTIVE ANALYSE	48
4.1.1 Patientendaten	48
4.1.2 VEGF 121 und VEGF 165	49
4.1.3 Interleukin-6 PCR- und Elisa Daten	50
4.1.4 BAX und BCL-2	51

4.2 VERGLEICH DER DATEN IM VERLAUF ZU DEN VERSCHIEDENEN MESSZEITPUNKTEN .	52
4.2.1 Relative Genexpression von VEGF 121 und VEGF 165 in den CD 138-positiven Zellen (Myelomzellen)	52
4.3.2 Interleukin-6 Genexpression in den CD 138 – negativen Zellen des Knochenmarks.....	55
4.3.3 Interleukin-6 Serumspiegel (Elisa).....	56
4.3.4 Relative Genexpression von BAX in den CD 138-positiven Zellen.....	57
4.3.5 Relative Genexpression von BCL-2 in den CD 138-positiven Zellen.....	58
4.3.6 Quotient BAX / BCL-2.....	59
4.4 ANSPRECHEN AUF DIE THERAPIE.....	60
4.4.1 Relative Genexpression von VEGF 121 und VEGF 165 der CD 138 positiven Zellen im Knochenmark.....	60
4.4.2 Relative Genexpression von IL-6 in den CD 138 negativen Zellen des Knochenmarks und IL-6 Serumspiegel.....	61
4.4.3 Relative Genexpression von BAX und BCL-2 der CD 138 positiven Zellen im Knochenmark, sowie Betrachtung des Quotienten BAX/BCL-2.....	63
4.5 ERREICHEN EINER PLATEAUPHASE	65
4.5.1 Relative Genexpression von VEGF 121 und VEGF 165 in den CD 138 positiven Zellen des Knochenmarks	66
4.5.2 Relative IL-6 Genexpression in den CD 138 negativen Zellen des Knochenmarks und IL-6 Serumspiegel.....	67
4.5.3 Relative Genexpression von BAX und BCL-2 in den CD 138 positiven Zellen des Knochenmarks sowie Quotient BAX/BCL-2	69
4.6 KORRELATIONSANALYSE	71
5. DISKUSSION	74
7. LITERATURVERZEICHNIS	88
8. DANKSAGUNG	98
9. LEBENS LAUF	99
10. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	100

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Das Multiple Myelom (MM) gehört zu den häufigsten bösartigen hämatologischen Erkrankungen und ist aufgrund des rezidivierenden Verlaufs und der Resistenzentwicklung gegenüber konventioneller Chemotherapie bis heute nur in wenigen Fällen heilbar.

Durch bedeutende Fortschritte in der Erforschung der pathobiologischen Zusammenhänge, die zu Entwicklung und Progression der Erkrankung führen, wurden neue Möglichkeiten für eine gezielte Therapie des MM eröffnet. Dabei spielen das sog. Mikroenvironment des Knochenmarks und die vielfältigen Wechselwirkungen zwischen Myelomzellen und den sie umgebenden Knochenmarkstromazellen eine wesentliche Rolle. Diese Wechselwirkungen werden zum größten Teil durch Signalmoleküle und ihren Rezeptoren, die unter anderem zu einer Zunahme der Vaskularisierung des Knochenmarks durch Angiogenese sowie Wachstum, Überleben, Proliferation und Migration der Myelomzellen führen, vermittelt. Unter diesem Aspekt wurden in den letzten Jahren pharmakologische Substanzen entdeckt und gezielt entwickelt, deren therapeutische Wirkung auf der Hemmung der Angiogenese und/oder für Wachstum und Überleben der Myelomzellen essentieller Signalwege beruht.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung einer neuen antiangiogenetischen Substanz (SU6668) in der Behandlung von Patienten mit Multiplem Myelom untersucht. Mittels RT-PCR und ELISA wurde dabei der Verlauf des für die Pathogenese des Multiplen Myeloms bedeutsamen Zytokins, Interleukin-6, der angiogenetischen Moleküle, VEGF 165 und VEGF 121, sowie der apoptotischen Marker, BAX und BCL-2 unter Therapie beobachtet.

2. EINLEITUNG

2.1 DAS MULTIPLE MYELOM

Das Multiple Myelom ist eine maligne lymphoproliferative B-Zell-Erkrankung, die durch Vermehrung von monoklonalen Plasmazellen gekennzeichnet ist. Ein maligne entarteter Plasmazellklon akkumuliert und siedelt sich bevorzugt im Knochenmark an, wo er die normale Hämatopoese verdrängt und zu Knochendestruktionen führt. Dabei werden von den reifen B-Zellen monoklonale Immunglobuline sezerniert, die den Klassen IgG, IgA, IgM, IgD und IgE zugeordnet werden können und im Serum nachweisbar sind (Goldschmidt H, 2002).

Das Multiple Myelom (MM) ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters. Die mittlere jährliche altersspezifische Inzidenzrate steigt stark mit dem Alter an, und erreicht die höchsten Werte in der 8. Lebensdekade. In Mitteleuropa liegt das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zwischen 60 und 70 Jahren. Die relative Häufigkeit des Multiplen Myeloms wird für Europa und Nordamerika mit ca. 1% aller malignen Neoplasien angegeben. In Industriestaaten beträgt die Inzidenz des MM ca. 4 pro 1000000 Einwohner. Mit ca. 10% stellt das Multiple Myelom die häufigste B-Zell-Erkrankung innerhalb der bösartigen hämatologischen Erkrankungen dar (Hideshima et al., 2004).

Dabei müssen die „Monoklonale Gammopathie unbekannter Signifikanz“ (MGUS) sowie das „smouldering myeloma“ vom Multiplen Myelom abgegrenzt werden.

Die „Monoklonale Gammopathie unbekannter Signifikanz“ ist durch das Vorliegen von monoklonalem Immunglobulin im Serum und dem Fehlen sonstiger für das Multiple Myelom typischer Diagnosekriterien charakterisiert. Diese Erkrankung ist mit einer Prävalenz von 3,4% der Bevölkerung der über 50-Jährigen in den USA außergewöhnlich häufig (Hideshima et al., 2004).

Obwohl das MGUS in der Mehrzahl der Fälle gutartig verläuft, gilt es als prämalignes Stadium und geht in etwa 16% der Fälle nach 10 Jahren in ein Multiples Myelom über. Nach 20 Jahren beträgt die Häufigkeit der „malignen Transformation“ 33% und nach 25 Jahren 40% (Kyle, 1993).

Das sog. „smouldering myeloma“ wurde 1992 von Kyle beschrieben und umfasst eine kleine Untergruppe von MM-Patienten im frühen Stadium mit asymptomatischer Erkrankung, die über Jahre stabil bleiben kann. Die Plasmazellen können

Malignitätskriterien aufweisen, haben jedoch immer einen niedrigen Proliferationsindex.

Die Diagnose eines Multiplen Myeloms wird wegen uncharakteristischer Symptome oft erst nach Monaten gestellt. Leitsymptome der Erkrankung sind Knochenschmerzen bis hin zu pathologischen Frakturen, Anämiesymptome, bakterielle Infektionen, zentralnervöse Symptome und periphere Polyneuropathien. Die Komplikationen der Plasmazellerkrankung können tödliche Konsequenzen haben. Als Folge der exzessiven Bildung eines monoklonalen Immunglobulins, besonders der Leichtketten, kann eine Nierenschädigung auftreten, die bis zur Niereninsuffizienz fortschreiten kann. Außerdem kann die Proteinüberproduktion eine Amyloidose verursachen. Die Infiltration des Knochenmarks durch Myelomzellen führt gekoppelt mit dem Einfluss verschiedener Zytokine zur Hemmung der Blutzellbildung, was in einer normozytären normochromen Anämie resultiert. Ebenfalls erfolgt über eine Aktivierung der Osteoklasten eine Knochendestruktion, die durch Knochenschmerzen sowie Hyperkalzämie symptomatisch wird. Die oben genannte Nierenschädigung trägt dann ihrerseits zu pathologischen Veränderungen des Skeletts im Sinne einer „renalen Osteopathie“ bei. Viele Patienten haben somit bereits vor Diagnosestellung pathologische Frakturen erlitten. Über eine Interaktion zwischen dem monoklonalen Protein und den Thrombozyten bzw. den Gerinnungsfaktoren kommt es zu einer Verlängerung der Blutungszeit. Zusätzlich kann es durch den sekundären Mangel an polyklonalen Immunglobulinen gehäuft zu bakteriellen und viralen Infektionen kommen (Bataille and Harousseau, 1997).

Die Prognose der Erkrankung ist ungünstig - etwa 80 % der Patienten versterben in den ersten 5 Jahren nach Diagnose. Hinsichtlich des Überlebens von Patienten mit malignen Plasmazellerkrankungen gibt es jedoch eine breite interindividuelle Variabilität. Wichtige prognostische Faktoren ergeben sich aus der Tumormasse, der Krankheitsaktivität, dem Ansprechen auf Chemotherapie sowie chromosomalen Veränderungen und dem β_2 -Mikroglobulin.

Vor Einführung der Alkylantien Melphalan und Cyclophosphamid wurden für die Patienten mit Multiplem Myelom mittlere Überlebenszeiten von 6-12 Monaten beschrieben (Osgood, 1960). Prospektive Studien zeigten unter konventioneller

Chemotherapie mediane Überlebenszeiten zwischen 19 und 50 Monaten (Gregory et al., 1992). Intensivierung der Therapie durch Erhöhung der Melphalandosin oder Kombination mit anderen Zytostatika erhöht die Remissionsrate, verlängert aber nicht die Überlebenszeit der Patienten (Alexanian and Dimopoulos, 1994; Gregory et al., 1992; Peest et al., 1996). Etwa 30 % der Patienten sprechen auf die initiale Induktionsbehandlung nicht oder nur unzureichend an, sog. Non-Responder.

Es gibt Hinweise dafür, dass eine Hochdosis-Chemotherapie mit autologem Knochenmark oder Stammzellersatz die Überlebenszeit im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie verlängert (Attal et al., 1996). Der Vorteil einer allogenen Knochenmarktransplantation im Langzeitüberleben wurde jedoch bisher mit einer sehr hohen Frühletalität (ca. 40%) bedingt durch GvHD und deren Komplikationen belastet (Bjorkstrand et al., 1996). Somit wird eine Hochdosischemotherapie oft aufgrund des hohen Alters der betroffenen Patienten und häufig bestehenden Begleiterkrankungen nicht als Therapie der ersten Wahl durchgeführt.

Trotz Verbesserung der Behandlungsergebnisse und Erhaltungstherapie erleidet ein Großteil der Patienten nach initialer Chemotherapie einen Progress. Nur noch 20 % der Patienten befinden sich 5 Jahre nach initialer Chemotherapie in Remission (Attal et al., 1996). Auch nach erfolgreicher Hochdosischemotherapie, wird eine stringent definierte komplette Remission (CR) nur von 20-40% der Patienten erreicht, von denen die meisten im weiteren Verlauf einen Relaps erleiden (Cavo et al., 2000; Lemoli et al., 2000; Martinelli et al., 2000).

Die Ansprechrate auf Chemotherapie oder Kortikosteroide nach dem ersten Rezidiv bzw. bei einem progressiven Krankheitsverlauf liegt bei 30-50%, wobei die Dauer der Remission häufig weniger als ein Jahr beträgt und das mediane Überleben mit 6-17 Monaten beschrieben wird (Barlogie et al., 1984; Giles et al., 2000; Mineur et al., 1998; Parameswaran et al., 2000). Zusätzlich verkürzt sich die Remissionsdauer nach wiederholter Therapiegabe, infolge der Entwicklung von Resistenzmechanismen der Myelomzellen während der Erkrankung zunehmend.

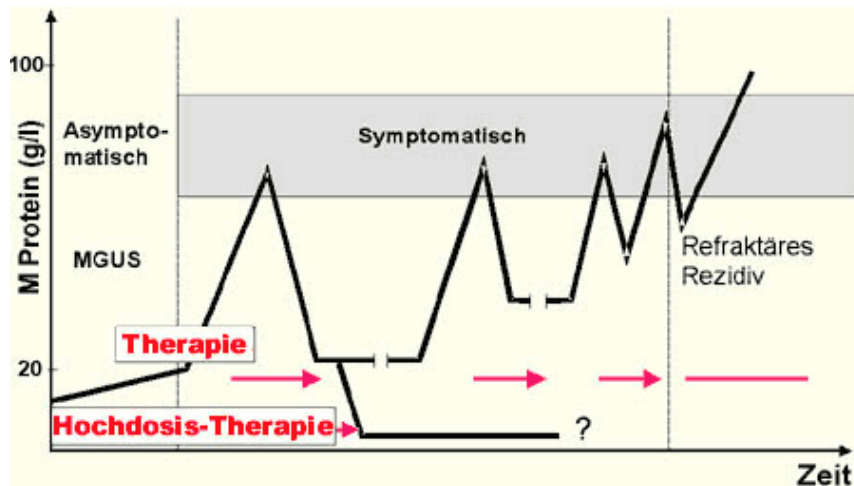


Abbildung 1: Typischer Krankheitsverlauf eines MM (modifiziert n. (Durie, 1993).

Eine komplette Heilung der Erkrankung lässt sich derzeit nicht erreichen, so dass weiter an therapeutischen Optionen geforscht wird, die das Behandlungsergebnis verbessern.

In den letzten Jahren konnten tiefere Erkenntnisse in die Pathogenese des Multiplen Myeloms gewonnen werden, aus denen sich neue Behandlungsmöglichkeiten ableiten ließen, deren Vorteil in der selektiv an den Tumorzellen bzw. den spezifischen pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung angreifende Wirkungsweise liegt. Dabei spielen die spezifischen Bedingungen des Knochenmarkstromas, die Sekretion von Zytokinen, die als Wachstumsfaktoren Überleben und Proliferation der Myelomzellen fördern, und die durch angiogene Faktoren induzierte Neoangiogenese im Knochenmark der Myelompatienten eine erhebliche Rolle.

2.1.1 Das „Knochenmark-Mikroenvironment“

Interzelluläre Kommunikation ist eine wesentliche Voraussetzung physiologischer und pathologischer Prozesse in multizellulären Organismen. Dieses ist auch für die Pathogenese maligner Erkrankungen erwiesen, bei denen, trotz vielfacher Mutationen, die das unbegrenzte Zellwachstum der Tumorzellen verursachen und aufrechterhalten, ein enges Zusammenspiel über diverse Mechanismen gegeben sein muss, um das Wachstum überhaupt zu ermöglichen.

Tumoren bedienen sich dabei der Mikroumgebung ihres Wirtsgewebes und kommunizieren über Wachstumsfaktoren und Oberflächenrezeptoren. Ohne diese

Möglichkeit, in eine koordinierte Interaktion mit dem Wirtsgewebe zu treten, käme es zu einem Sistieren des Wachstums und eine Metastasierung der Erkrankung wäre nicht möglich.

Ähnlich der Wechselwirkungen, die bei der physiologischen Ansiedlung der normalen Plasmazelle im Knochenmark bestehen, sind auch die Zellen eines MGUS und MM stark von der gegenseitigen Wechselbeziehung zu den Stromazellen und extrazellulären Komponenten des Knochenmarks abhängig.

Dabei binden die Tumorzellen mittels exprimierter Adhäsionsmoleküle wie z.B. Syndecan-1 und VLA-4 an extrazelluläre Matrixproteine über Typ-I Kollagen und Fibronectin, sowie an Knochenmarkstromazellen via VLA-4 seitens der Myelomzellen und dem „vascular cell adhesion molecule 1“ (VCAM-1, CD 106) auf den Stromazellen. Dieses führt nicht nur zur Ansiedlung der Tumorzellen im Knochenmark, sondern hat auch eine wichtige klinische und pathophysiologische Funktion.

Insgesamt besteht eine fein regulierte Wechselwirkung von Hemmung und Stimulierung zwischen den Stromazellen des Knochenmarks und den Myelomzellen, die durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und korrespondierender Rezeptoren auf der Zelloberfläche reguliert wird. Dabei beeinflussen die Zytokine entscheidend Wachstum (IL-6, IGF-1, VEGF), Überleben (IL-6, IGF-1), Therapieresistenz (IL-6, IGF-1, VEGF) und Zellmigration (IGF-1, VEGF, SDF-1 α) der Myelomzellen und führen zu Neoangiogenese im Knochenmark (VEGF) (Hideshima et al., 2004).

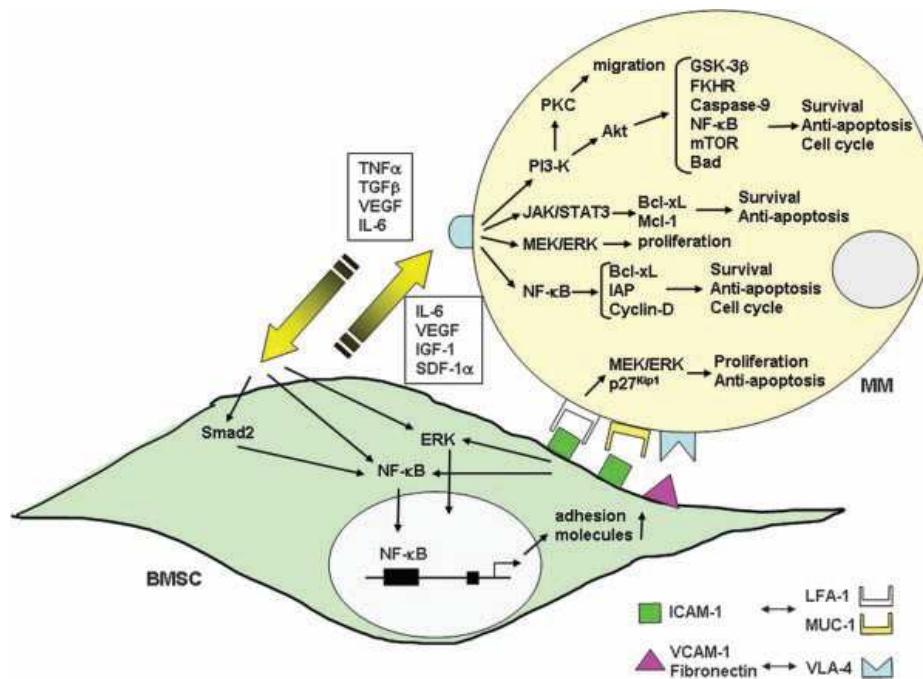


Abbildung 2: Wechselwirkungen zwischen dem Knochenmark und Myelomzellen (Hideshima et al., 2004)

2.1.2 Interleukin-6

In den letzten Jahren konnte mit Interleukin-6 (IL-6) ein Zytokin charakterisiert werden, welches für die Vorgänge der Differenzierung und Wachstum sowohl normaler als auch maligner Myelomzellen von essentieller Bedeutung ist (Kawano et al., 1988; Klein et al., 1995; Zhang et al., 1989). Interleukin-6 vermittelt die Proliferation von normalen Plasmablasten und induziert die Differenzierung von reifen B-Zellen zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen (Zhang et al., 1989). Ebenso fungiert IL-6 als Wachstumsfaktor für Myelomzellen – es verhindert die Apoptose und ist ein wichtiger Proliferationsfaktor (Ohta et al., 1996). Die Bedeutung des IL-6 für die Entwicklung des Multiplen Myeloms wird durch Folgendes verdeutlicht: Transgene Mäuse, die humanes IL-6 überexprimieren, entwickeln Plasmozytome (Suematsu et al., 1992), wohingegen es nicht möglich ist, bei homozygoten IL-6-Knock-out-Mäusen Plasmozytome zu induzieren oder diese über bereits etablierte Plasmozytomzelllinien zu propagieren (Hilbert et al., 1995). Dieses wird durch weitere Forschungsergebnisse unterstützt: Es konnte nachgewiesen werden, dass die Serumspiegel von IL-6 und IL-6R mit der Krankheitsaktivität des Multiplen Myeloms korrelieren. Durch Therapie mit einem Anti-IL-6 monoklonalen Antikörper konnten Krankheitssymptome und Manifestationen der Erkrankung bei

Myelompatienten zurückgedrängt werden und monoklonale Antikörper gegen IL-6 oder seinen Rezeptor zeigten eine proliferationshemmende Wirkung auf Myelomzellen in vitro (Frassanito et al., 2001). IL-6 unterdrückt die spontane, therapie-induzierte und Fas-induzierte Apoptose und greift dadurch positiv in das Zellwachstum und –überleben des Multiplen Myeloms ein (Frassanito et al., 2001). Obwohl einige Myelomzelllinien IL-6 sezernieren und über diesen autokrinen Mechanismus proliferieren, wird IL-6 im Knochenmark vordergründig durch die Stromazellen produziert, und das Wachstum dort über die parakrine Sekretion gefördert. Dabei wird IL-6 Ausschüttung über die Adhäsion von Myelomzellen an Knochenmarkstromazellen oder durch Zytokine (wie z.B. TNF α , VEGF, IL-1 β) hochreguliert (Hideshima et al., 2004).

Die extrazelluläre Bindung von IL-6 an die alpha-Kette (gp80) des IL-6 Rezeptors induziert die Bildung eines transmembranen Rezeptorkomplexes, der aus je zwei Molekülen IL-6, gp80 und signaltransduzierender β -Kette (gp130) besteht (41). Phosphorylierung des gp130 aktiviert wiederum die Ras/Raf/Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Kinase (MEK)/Extracellular Signal-Related Kinase (ERK), Janus Kinase (JAK)/ Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) und Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3-K)/Akt (PKB) und deren nachgeschaltete Signalwege, die Wachstum, Überleben und Resistenz gegenüber Chemotherapie in Myelomzellen regulieren (Hideshima et al., 2004). Mittels des JAK2/STAT3- sowie des PI3-K/Akt-Signalweges wird das Überleben und die Resistenzentwicklung der Tumorzellen z.B. durch Expression von antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie, Bcl-xL und Mcl-1, gefördert. Der Ras-MAPK-Signalweg führt über die Aktivierung einer Kinasenkaskade zur Transkription von sog. IL-6 Targetgenen, welche die Zellteilung und das Überleben von MM-Zellen regulieren.

Neben dieser oben aufgeführten Wirkungsweise des Zytokins IL-6, induziert es die Proliferation der MM-Zellen durch Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (pRB), dessen Funktion über den Status der Phosphorylierung bestimmt wird. Während dephosphoryliertes pRB E2F bindet und so Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus verharren lässt, treibt phosphoryliertes pRB die Zellteilung voran. IL-6 dezimiert die pRB-E2F Komplexe in den Myelomzellen, indem es die Produktion von

dephosphoryliertem Retinoblastom-Protein herunterreguliert und unterstützt so die Myelomzellproliferation (Frassanito et al., 2001).

Desweiteren beeinflusst IL-6 auch Expression und Sekretion von VEGF in Tumorzellen von Plasmozytompatienten (Dankbar et al., 2000) und hemmt die Antigenpräsentation von dendritischen Zellen, indem es die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen blockiert (Ratta et al., 2002). Auf diesem Weg trägt IL-6 ebenfalls zu der für Myelompatienten symptomatischen Immunabwehrschwäche sowie zur Steigerung der Vaskularisierung des Knochenmarks bei.

2.1.3 Andere wichtige Zytokine

IGF-1 wurde bereits im oberen Abschnitt kurz erwähnt. Mittels der durch IGF-1 induzierten Signalwege (MEK/ERK und PI3K/Akt) trägt das Zytokin ebenfalls als Auslöser für das Tumorzellwachstum und die Resistenzentwicklung zum Fortschreiten des Multiplen Myeloms bei (Hideshima et al., 2004).

Außerdem produzieren Myelomzellen und im Knochenmarkstroma angesiedelte mononukleäre Zellen TNF α m-RNA und das entsprechende Protein. TNF α induziert einerseits die Apoptose von Tumorzellen über den Fas-assoziierten „Death Domain/Caspase-8“ Signalweg, wie andererseits das Überleben der Myelomzellen mittels Aktivierung von NF- κ B und der Hochregulation von antiapoptotischen Proteinen (wie z.B. Bcl-xL). Obwohl das von Myelomzellen sezernierte TNF α nicht direkt Proliferation, Überleben und Therapieresistenz des Tumors fördert, ist seine Ausschüttung ein potenter Trigger für die IL-6 Transkription und Sekretion der Knochenmarkstromazellen (Hideshima et al., 2004). Außerdem führt es zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen auf Myelom- und Knochenmarkstromazellen und somit zu einer höheren Bindungskapazität auf beiden Seiten, was wiederum auf diesem Weg die Ausschüttung von Zytokinen wie IL-6, IGF-1 und VEGF fördert (Hideshima et al., 2001a).

Das angiogene Zytokin VEGF wird von MM-Zellen und Knochenmarkstromazellen sezerniert und spielt eine wichtige Rolle für die gesteigerte Angiogenese, die im Knochenmark von Myelompatienten nachgewiesen werden kann. Die genauen Mechanismen der Neoangiogenese und die Funktion des VEGFs werden in den folgenden Abschnitten eingehend erläutert. Darüber hinaus löst VEGF die

Phosphorylierung von Flt-1 und darüber die Aktivierung der MEK/ERK- und PI3-K/PKC α -Signalkaskaden in Myelomzelllinien sowie in Patientenzellen aus, welches zu einer moderaten Erhöhung der Proliferationsrate und zu Migration der Zellen führt (Hideshima et al., 2004).

2.1.4 Apoptose und Multiples Myelom

Wie bereits oben beschrieben, beeinflussen viele dieser Zytokine die Mechanismen der Apoptose von Myelomzellen. Unter Apoptose versteht man den regulierten Prozess der zum physiologischen Zelltod führt. Dabei wird in den Zellen die Aktivierung intrazellulärer Proteine ausgelöst, die ein Absterben der Zelle einleiten. Es handelt sich um einen Vorgang, der für die Erhaltung der Homöostase von Geweben der Hämatopoese und der Lymphopoese bedeutsam ist. Die Apoptose resultiert aus der Wirkung intrazellulärer Cystein-Proteasen, den sogenannten Caspasen. Sie werden nach Aufspaltung der DNA aktiviert und führen zu einer Verdauung der DNA durch Endonukleasen und zum Zerfall des zellulären Skelettes. Diese Vorgänge werden durch Signaltransduktion über Rezeptoren auf der Zellmembran durch FAS oder Tumor-Nekrose-Faktor ausgelöst oder bedingen die Freisetzung von Cytochrom C durch die Mitochondrien. Beide Wege aktivieren Caspasen. So können durch z.B. Chemotherapeutika verursachte DNA-Schäden Apoptose auslösen (Chauhan and Anderson, 2001). Das Protein p53 spielt bei der Erkennung von DNA-Schäden eine wichtige Rolle. Es aktiviert die Apoptose durch Erhöhung des intrazellulären BAX-Spiegels, der dann die Freisetzung von Cytochrom C erhöht und blockiert den Zellzyklus, so dass sich die geschädigten Zellen nicht mehr teilen können (Kerr et al., 1994).

Die BCL-2-Protein-Familie zu der u.a. die Proteine BAX, BCL-2 und Bcl-xL gehören, reguliert die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytosol. Einige Proteine dieser Familie hemmen die Apoptose (BCL-2, Bcl-xL, Bcl-W, Bfl-1/A1, Mcl-1) während andere sie fördern, z.B. BAX, Bak, Bid, Bcl-XS, Bad, Bik, Bim, Hrk. Somit trägt das intrazelluläre Verhältnis der pro- und antiapoptotischen Proteine der BCL-2-Familie zu der relativen Empfänglichkeit der Zellen für Apoptose bei und könnte durch Regulation der Cytochrom C-Freisetzung wirksam werden (Cory et al., 2003; Gross et al., 1999).

In MM-Zellen wird Caspase-8 als Antwort auf extrazelluläre apoptose-induzierende Liganden, wie z.B. TNF α und TRAIL, und über zytoplasmatische „Death-Domains“, wie z.B. die Fas-assoziierte Death Domain (FADD) aktiviert. Auf der anderen Seite erfolgt eine Aktivierung der Caspase-9 über Faktoren, die zu einer Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien führen (Hideshima et al., 2004).

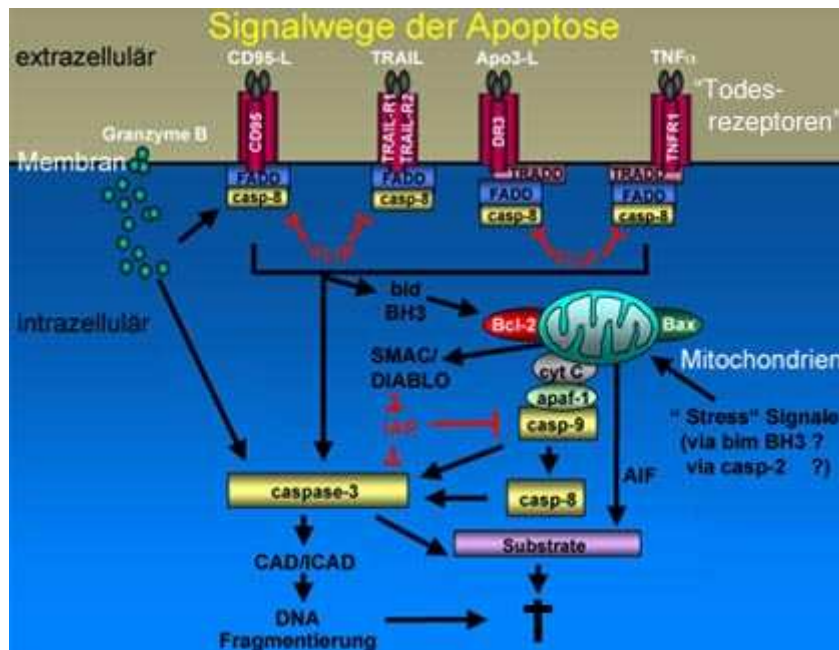


Abbildung 3: Signalwege der Apoptose

(http://www.uni-ulm.de/aktuelles/aktuelles_thema/aktuell0308/cast/abb05.jpg; 25.05.06)

Während der Tumorgenese des Multiplen Myeloms wird dieses Gleichgewicht, wie in obigen Kapiteln bereits angedeutet wurde, durch molekulargenetische und zytokingetriggerte Mechanismen gestört. Bcl-2 spielt eine wichtige Rolle in der physiologischen Entwicklung von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen, indem es das Überleben der Zellen durch Unterdrückung der Apoptose sichert. In vitro Versuche mit Maus- und humanen Leukämiezelllinien zeigten, dass hohe Bcl-2-Protein Spiegel die Apoptose der Zellen in Gegenwart von Glukokortikoiden und verschiedenen Chemotherapeutika verhindern konnten, bzw. interleukinabhängige hämatopoetische Zelllinien trotz Entzug von Wachstumsfaktoren mittels Zugabe von Bcl-2 länger überlebten (Campos et al., 1993; Catlett-Falcone et al., 1999).

In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit MGUS und Multiplem Myelom eine signifikant höhere Anzahl an Bcl-2-positiven Plasmazellen

aufwiesen und dieses Protein im Vergleich zu Patienten mit reaktiven Plasmazellen/nicht-klonalen Plasmazellerkrankungen „überexprimiert“ wurde (Miguel-Garcia et al., 1998). Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Dysregulation der Bcl-2-Protein Transkription bedeutsam für die Onkogenese und das Ansprechen des Patienten auf eine Therapie sein könnte.

2.2 ANGIOGENESE

Als Angiogenese oder Neovaskularisation wird die Neubildung von Gefäßen bezeichnet, die unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen im menschlichen Körper stattfindet. Dabei beschreibt der Begriff Vaskulogenese die Bildung von Blutgefäßen durch endotheliale Vorläuferzellen, wogegen sich der Begriff Angiogenese auf die Aussprossung bereits bestehender Blutgefäße und folgende Stabilisierung durch Bindegewebszellen bezieht (Carmeliet, 2003).

Während der embryonalen Entwicklung des Menschen ist der Prozess der Angiogenese notwendig, um das Kapillarnetz und Blutgefäße des Kreislaufsystems ausbilden zu können. Im erwachsenen menschlichen Organismus findet Angiogenese nur noch während des weiblichen Menstruationszyklus, in der Schwangerschaft und der Wundheilung statt oder wann immer die Sauerstoffversorgung eines Gewebes stark herabgesetzt ist (Folkman, 1971; Folkman, 1995). Eine durch lokale Ischämie induzierte Angiogenese tritt bei Erkrankungen des Auges wie diabetischer Retinopathie und altersabhängiger Makuladegeneration, vaskulär bedingten Erkrankungen im Sinne von ischämischer Herzkrankheit und Arteriosklerose, bei chronisch entzündlichen Erkrankungen (Psoriasis, rheumatoide Arthritis) und letztendlich auch bei neoplastischen Erkrankungen in Erscheinung (Folkman, 1971; Folkman, 1995; Mangi and Newland, 2000).

Zu den Prozessen, die zur Gefäßneubildung führen, gehören die Migration und Proliferation von Endothelzellen, die Expression proteolytischer Enzyme, der Umbau der extrazellulären Matrix und schließlich der morphologische Prozeß der tubulären Anordnung der Endothelzellen und die Formierung eines neuen Gefäßes. In Übereinstimmung mit der allgemein anerkannten „Angiogenic switch hypothesis“ hängt die Angiogenese wesentlich von dem Gleichgewicht zwischen Aktivatoren und

Hemmfaktoren der Angiogenese ab (Parangi et al., 1995). Zahlreiche angiogenetisch wirksame Moleküle sind an diesem Prozess beteiligt; vornehmlich Moleküle aus der Gruppe der Zytokine und Wachstumsfaktoren, aber auch niedermolekulare Substanzen wie Stickstoffmonoxid besitzen indirekt angiogenetische Potenz.

Ausgewählte proangiogenetische Faktoren	Ausgewählte antiangiogenetische Faktoren
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Endostatin
VEGF-B	Angiostatin
VEGF-C	γ - und α -Interferon
VEGF-D	Thrombospondin
Placental growth factor (PIGF)	Fibronectin
Basic/acidic fibroblast growth factor (FGF)	Platelet factor 4 fragment
Angiogenin	Epidermal growth factor fragment
Angiopoitin-1	Tissue inhibitor of metalloproteinases
Angiopoitin-2	Retinoic acid
Platelet-derived growth factor (PDGF)	Thalidomide
Platelet-derived epidermal growth factor	Interleukin (IL)-1
Hepatocyte growth factor (HGF)	Interleukin (IL)-12
Epidermal growth factor (EGF)	Anti-VEGF
Insulin-like growth factor (IGF-1)	
Tumour necrosis factor α (TNF α)	
Transforming growth factor (TGF- α und β)	
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	
Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)	
Interleukin (IL)-2	
Interleukin (IL)-6	
Interleukin (IL)-8	

Tabelle 1: Aktivatoren und Hemmstoffe der Angiogenese (frei nach (Mangi and Newland, 2000)).

2.2.1 Tumorangiogenese

Angiogenese stellt eine wesentliche Voraussetzung für das Wachstum und die Ausbreitung maligner Tumoren dar (Folkman, 1974; Holmgren et al., 1995). Ohne Ausbildung neuer Blutgefäße würden entartete Zellen schnell einen Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen erleiden, der Zellmetabolismus und Zellproliferation zum Erliegen brächte. Es konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung neuer Blutgefäße eine essentielle Bedingung für das Wachstum eines Tumors über 2 mm³ darstellt (Folkman, 1995).

In diesem Zusammenhang wurde eine Vielzahl an Faktoren entdeckt, die eine angiogene Potenz aufweisen. Dazu gehören die Zytokine VEGF, PDGF, basic FGF (FGF2) sowie auch die Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 (Folkman and Klagsbrun, 1987). VEGF und bFGF stellen wesentliche Faktoren der Initiierung der Blutgefäßneubildung dar. Metalloproteinasen bauen dabei als proteolytische Enzyme verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix ab und um. Reifung und

Stabilisierung der Gefäßwand werden von Angiopoietin-1 (Ang-1) reguliert, welches vornehmlich an den auf Endothelzellen exprimierten Tie2-Rezeptor bindet. Im Gegenteil dazu antagonisiert Ang-2 die Bindung von Ang-1 an Tie2 und führt somit zu einer Instabilisierung der Blutgefäße, aus der heraus eine Aussprossung der Gefäße resultieren kann (Mangi and Newland, 2000). VEGF, bFGF, Ang-1 und „hepatocyte growth factor“ (HGF) stimulieren darüber hinaus Proliferation, Überleben und Migration von Endothelzellen (Giuliani et al., 2003).

Eine erhöhte Sekretion von VEGF konnte in vielen humanen Tumoren nachgewiesen werden (Ohta et al., 1996), wobei eine Korrelation zwischen der Höhe des VEGF-Spiegels und der Progression der Erkrankung im Tiermodell besteht (Larcher et al., 1996). Gleichermaßen steht die Vaskularisierung des Tumorgewebes in enger Beziehung zu der Invasivität und seiner Bereitschaft zur Metastasierung (Fontanini et al., 1995; Weidner et al., 1991).

Obwohl die meisten der anfänglichen Untersuchungen über Angiogenese an soliden Tumoren erfolgten, gibt es Ergebnisse und Daten, die die Bedeutung der Angiogenese als zentrales pathophysiologisches Prinzip auch für hämatologische Erkrankungen beweisen.

Für einzelne angiogenetische Faktoren konnte bereits gezeigt werden, dass sie bei Patienten mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen erhöht sind. Viele hämatopoetische Tumorzelllinien so wie auch frisch isolierte hämatologische Tumorzellen produzieren und sezernieren VEGF entsprechend eines autokrinen VEGF-Signalwegs (Bellamy et al., 1999; Dankbar et al., 2000; Fiedler et al., 1997). In klinischen Studien wurden hohe FGF-Spiegel im Serum und Urin von ALL- und CLL-Patienten nachgewiesen (Mangi and Newland, 2000). Außerdem zeigten verschiedene Untersuchungen, dass bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen wie Leukämien, Lymphomen und MDS, eine erhöhte Vaskularisierung des Knochenmarks vorhanden war beziehungsweise in Lymphknotenbiopsien eine Zunahme der Kapillardichte sichtbar wurde (Mangi and Newland, 2000).

2.2.2 Multiples Myelom (MM) und Angiogenese

Angiogenese stellt ein wesentliches Kennzeichen der Entwicklung und Progression des MM dar. Die Pathophysiologie der myelom-induzierten Angiogenese ist komplex und verbunden mit der direkten Sekretion von angiogenetischen Zytokinen durch Plasmazellen selbst, sowie der Induktion durch parakrine Wechselwirkungen mit

anderen Zellen des Knochenmarks (Knochenmarkstromazellen, Endothelzellen, Osteoklasten) (Vacca and Ribatti, 2006).

In einem Tiermodell für das Multiple Myelom wurde in Bereichen des infiltrierten Knochenmarks angiogenetische Aktivität nachgewiesen (Yaccoby et al., 1998). Des weiteren scheint der Grad der Blutgefäßneubildung ein Maß für die Aggressivität der Plasmazellneoplasie zu sein, denn die Dichte der Vaskularisierung ist bei Patienten, die an einem Multiplen Myelom erkrankt sind, wesentlich höher als bei Patienten mit monoklonaler Gammopathie unsicherer Signifikanz (MGUS) (Vacca et al., 1994).

In von hämatologischen Neoplasien abgeleiteten Zelllinien wurde die Bildung verschiedenster angiogenetischer Faktoren analysiert. Das Vorhandensein von VEGF mRNA konnte in 12/12 Zelllinien gezeigt werden, wogegen FGF-2 mRNA nur in 6/12 der Zelllinien zu finden war. Außerdem wurde VEGF in 12/16 Knochenmarksbiopsien von Patienten, die an einem aktiven Multiplen Myelom erkrankt waren, nachgewiesen (Bellamy et al., 1999). Diesen Untersuchungen zufolge wird die Angiogenese durch unterschiedliche Kombinationen von angiogenetischen Faktoren moduliert und gesteuert.

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich in den Veröffentlichungen von Vacca et al. (Vacca et al., 1999). Die Arbeitsgruppe bestätigte und vertiefte ihre Annahme, dass eine enge Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität des Multiplen Myeloms und der mikrovaskulären Dichte im Knochenmark besteht und stellten fest, dass bei der aktiven Form der Erkrankung im Unterschied zu der inaktiven Form eine fünffach erhöhte Vaskularisierung vorlag. In weiteren Untersuchungen arbeitet die Gruppe an der Analyse eines von aus Patientenproben hergestellten aufgereinigten, primären Plasmazellkulturen gewonnenen Überstandes. Mit Hilfe eines in vivo Angiogenese-Assays konnte auch unter diesen Bedingungen eine gesteigerte angiogenetische Aktivität in den Patientenproben, der an einem aktiven Multiplen Myelom erkrankten Patienten, aufgezeigt werden, wogegen die Aktivität bei Proben von Patienten mit einem inaktiven Multiplen Myelom bzw. mit einem MGUS nicht erhöht war. Zusätzlich enthielten die Zellkulturüberstände von Patienten mit einer aktiven Erkrankung signifikant höhere Konzentrationen an FGF-2 und MMP-2. Eine Zunahme von VEGF oder MMP-9 war nicht identifizierbar. Schließlich ließ sich feststellen, dass eine Hinzugabe von Anti-FGF-2 die angiogenetische Aktivität, d.h. die Anzahl der

Faktoren deutlich reduzierte. Zusammengefasst lässt sich anhand dieser Ergebnisse annehmen, dass der Krankheitsprogress beim Multiplen Myelom von einer Zunahme der vaskulären Dichte begleitet wird und dass sowohl FGF-2 als auch MMP-2 eine wesentliche Rolle in diesem Prozess spielen.

Die Arbeitsgruppe von Yaccoby et al. konnte in ihren Studien nachweisen, dass die Sekretion von VEGF im Knochenmark von SCID (severe combined immunodeficiency) – Mäusen, die Zellen von Multiplen Myelom Patienten erhalten hatten, zu verstärkter Angiogenese führte (Yaccoby et al., 1998). Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse, dass hoch proliferative Plasmazellen, ähnlich wie solide Tumorzellen, über die Sekretion von proangiogenen Zytokinen Angiogenese induzieren können. So wie das Voranschreiten solider Tumorerkrankungen von in situ Tumoren zu invasivem Wachstum und Metastasierung von dem Wechsel aus einer avaskulären in eine vaskuläre Phase begleitet wird, deuten sie darauf hin, dass das aktive Multiple Myelom für die vaskuläre Phase der Plasmazelltumoren steht und das inaktive MM bzw. MGUS repräsentiert die avaskuläre Phase. Die zunehmende Angiogenese des Knochenmarks mag somit die Progression von einer inaktiven Plasmazellerkrankung/MGUS zu einem aktiven MM begünstigen (Vacca and Ribatti, 2006).

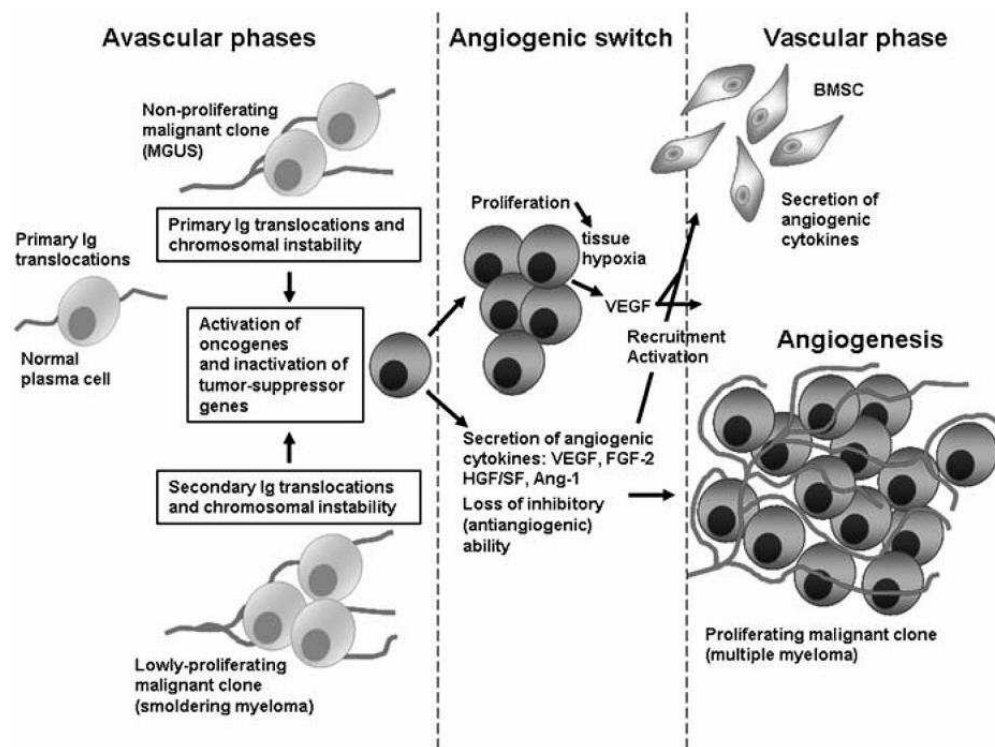


Abbildung 4: "Angiogenic Switch" beim Multiplen Myelom (Hypothese) (Vacca and Ribatti, 2006)

In mehreren aktuellen Studien wurde gezeigt, dass Myelomzellen einerseits direkt VEGF produzieren und sezernieren sowie auf der anderen Seite auch die VEGF-Sekretion in Knochenmarkstromazellen anregen konnten (Giuliani et al., 2003). Plasmazellen des Knochenmarks von Myelompatienten sezernierten VEGF und die Expression von Rezeptoren des angiogenetischen Zytokins, VEGF-1 und VEGF-2, war wesentlich erhöht, so dass ein parakriner Signalweg, der durch die durch VEGF aktivierten Stromazellen des Knochenmarks vermittelt wird, anzunehmen ist. Dabei sezernieren die Knochenmarkstromazellen ihrerseits IL-6, welches wiederum das Wachstum der Myelomzellen fördert (Vacca and Ribatti, 2006). Die Arbeitsgruppe von Vacca et al. stellte im Knochenmark von Patienten mit aktivem MM die Sekretion von VEGF-A Isoformen durch Plasmazellen fest. Ebenso wurde eine Überexpression von VEGFR-2 auf Endothelzellen der Blutgefäße des Knochenmarks sowie auf isolierten Endothelzellen und von VEGFR-1 auf anderen Knochenmarkstromazellen nachgewiesen. Desweiteren wurde die Sekretion von VEGF-C und VEGF-D durch Knochenmarkstromazellen und Expression des entsprechenden Rezeptors VEGFR-3 auf Plasmazellen belegt, was eine weitere parakrine Schleife zwischen Myelomzellen und Knochenmarkmikroenvironment, die zu Angiogenese und Tumorwachstum bei Myelompatienten führt, annehmen lässt (Vacca et al., 2003). In Studien der Arbeitsgruppe um Kumar et al. wurde ebenfalls eine Sekretion von VEGF durch verschiedene Myelomzelllinien und Plasmazellen, die aus dem Knochenmark von Myelompatienten gewonnen wurden, festgestellt. Desweiteren konnte die Expression von VEGFR-1 und VEGFR-2 in diesen Zellen nachgewiesen werden, was die Annahme von multiplen VEGF-vermittelten autokrinen Signalwegen, die zu Tumorwachstum des MM beitragen, sowie parakriner Stimulation der Angiogenese durch Myelomzellen bestätigen konnte (Rajkumar et al., 2000).

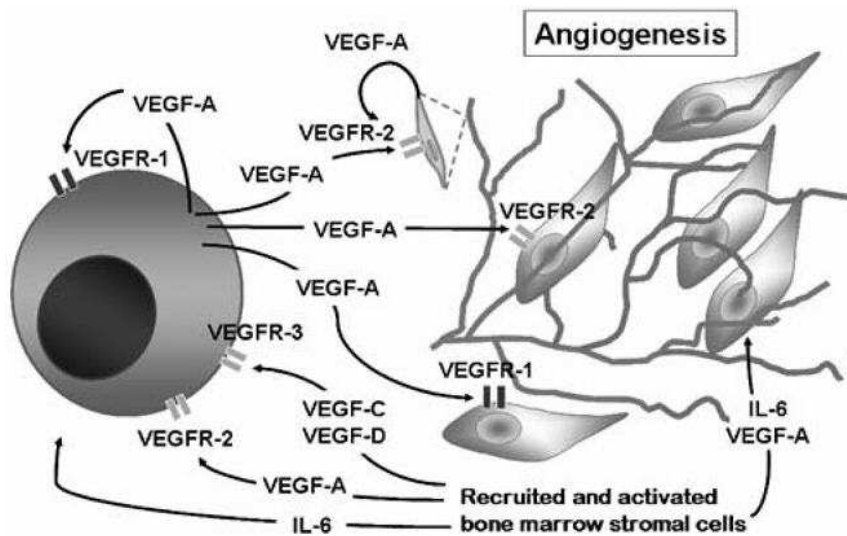


Abbildung 5: Tumorwachstum und Angiogenese im Multiplen Myelom: Autokrine und parakrine VEGF-Signalwege (Vacca and Ribatti, 2006)

2.2.3 Rezeptortyrosinkinasen, ihre Signalmoleküle und ihre Rolle in der Angiogenese

Rezeptortyrosinkinasen sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt. Diese Moleküle besitzen eine extrazelluläre „Ligandenbindungsdomäne“, die sich aus einer transmembranösen Domäne und einer intrazellulären Tyrosinkinasendomäne zusammensetzt. Durch die Bindung eines Liganden, dimerisieren diese Rezeptoren und durchlaufen eine Transphosphorylierung, die zu der Aktivierung des Rezeptors führt (Folkman and Klagsbrun, 1987). Die Enzymkaskade, die durch die Aktivierung initialisiert wird, reguliert zelluläre Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung und Morphogenese.

VEGF-, PDGF- und FGF-Rezeptoren spielen als Rezeptortyrosinkinasen nachweislich eine wichtige Rolle in der autokrinen Stimulation der Tumorzellen und der interzellulären Kommunikation dieser mit dem Wirtsgewebe.

Auch in der Entwicklung neuer therapeutischer Substanzen, deren Wirkmechanismus an der Angiogenese ansetzt, stehen folgende Rezeptoren im Fokus der Untersuchungen.

2.2.3.1 VEGF und seine Rezeptoren

VEGF-A stellt einen wesentlichen Initiator der Angiogenese dar. Das Protein ist strukturell mit PlGF („placenta growth factor“), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und Orf-Virus-derived VEGF (auch als VEGF-E bezeichnet) verwandt. Über mRNA Splicing

entstehen fünf verschiedene Isoformen des Proteins: VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF 189 und VEGF 206. Bis heute wurden zwei Rezeptortyrosinkinasen, die VEGF-A binden, entdeckt; VEGFR-1, auch Fms-like tyrosine kinase, Flt-1 genannt, und VEGFR-2 (Kinase Domain Region, KDR). VEGFR-3 (FLT-4) ist eine Rezeptortyrosinkinase, die Lymphangiogenese vermittelt, wobei VEGF-C und VEGF-D als Liganden dieses Rezeptors fungieren (Molina and Rajkumar, 2003).

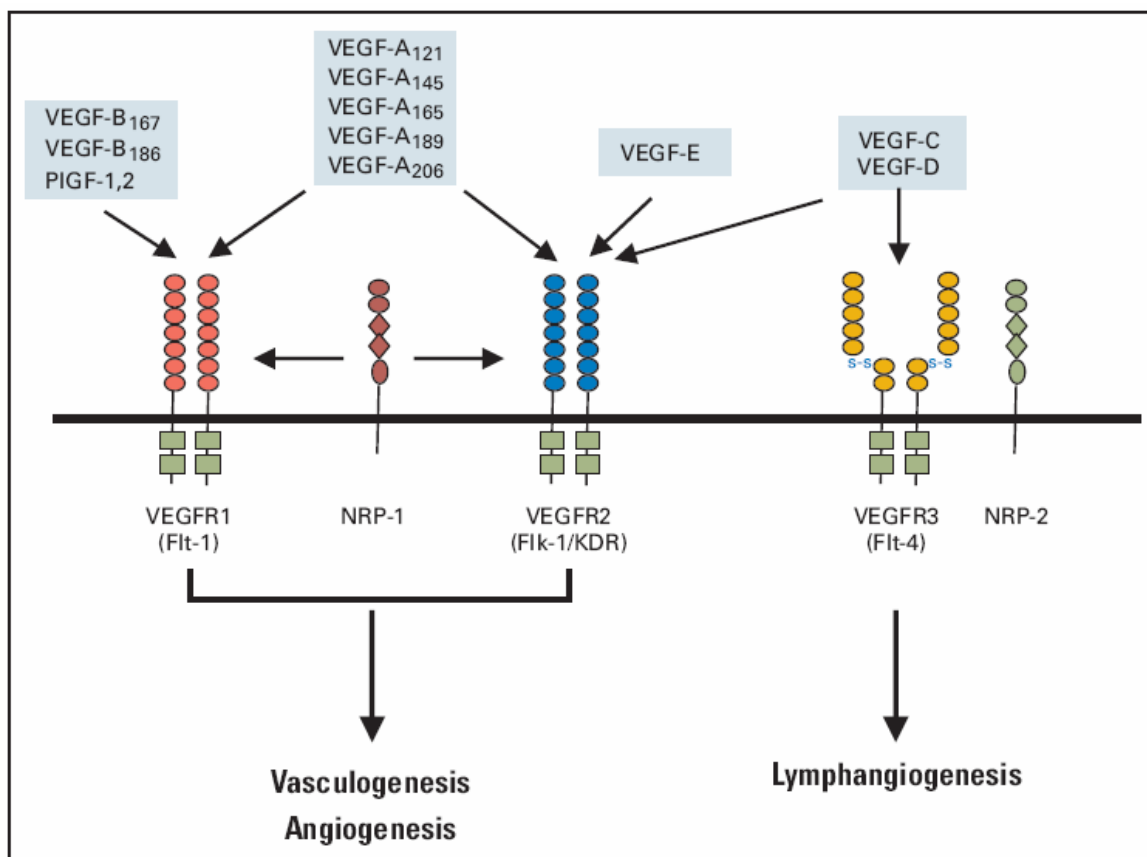


Abbildung 6: VEGF Rezeptoren und ihre Signalmoleküle (Hicklin and Ellis, 2005).

VEGF und seine Rezeptoren spielen eine wesentliche Rolle in der physiologischen und pathologischen Angiogenese. Die Aktivierung der VEGF/VEGF-Rezeptor-(VEGFR)-Achse führt über verschiedene Signalwege zu Überleben, Mitogenese, Migration und Differenzierung von Endothelzellen, sowie zu Veränderung der vaskulären Permeabilität und Mobilisierung von Endothelvorläuferzellen (EPCs) aus dem Knochenmark in die periphere Zirkulation. Die Rezeptoren VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (KDR), die die Wirkung von VEGF-A vermitteln, wurden erstmalig auf Endothelzellen identifiziert. In aktuellen Studien konnte ebenfalls eine Expression

dieser Rezeptoren auf diversen hämatopoetischen Zelllinien und verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen werden (Hicklin and Ellis, 2005).

Das zeitliche und räumliche Muster der VEGF-Expression und ihrer Rezeptoren, KDR und Flt-1, bestätigen dabei die zentrale Rolle dieses Proteins in der Angiogenese (Laird et al., 2000). In Mäusen führte die homozygote oder heterozygote Deletion des VEGF-Gens zum Absterben der Embryonen bedingt durch defizitäre Vaskulogenese und kardiovaskuläre Abnormalitäten (Hicklin and Ellis, 2005).

Die Überexpression von VEGF ist eng mit der Progression von Tumoren und einer schlechten Prognose verknüpft. Dieses konnte in einer Vielzahl von humanen Tumoren wie kolorektalen Karzinomen, Magentumoren, Pankreaskarzinomen, Mammakarzinomen, Prostatakarzinomen, Bronchialkarzinomen und Melanomen festgestellt werden (Hicklin and Ellis, 2005).

Die Bedeutung von VEGF für die Tumorangio-genese durch Stimulation der auf Endothelzellen des Tumorgewebes exprimierten VEGF-R wurde mehrfach bewiesen. Es gibt jedoch immer mehr Hinweise, dass VEGF auch hinsichtlich einer Aktivierung von VEGFR auf Tumorzellen eine endothelzell-unabhängige Rolle in Krebserkrankungen spielt. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass liquide und solide Tumorzellen VEGFR ausbilden; dies galt beispielsweise für das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom, Prostatakarzinom, Leukämien, Mesotheliome und Mammakarzinome. Auch wenn diese Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden müssen, könnte hypothetisch angenommen werden, dass VEGF-Liganden das Tumorwachstum nicht nur durch Steigerung der Angiogenese unterstützen, sondern auch direkt mit Rezeptoren auf der Oberfläche von Tumorzellen interagieren. Dieses wurde in aktuellen Studien über Leukämiezellen bestätigt, bei denen VEGF-Rezeptoren durch autokrine VEGF/VEGF-R Schleifen eine wesentliche Rolle für das Wachstum der Tumorzellen spielen, da die Unterbrechung dieses Mechanismus zum Sistieren des Tumorzellwachstums und Apoptose führte (Hicklin and Ellis, 2005). Auch in Myelomzelllinien, die den VEGFR-1 exprimieren, konnte ein autokriner Signalweg aufgezeigt werden, der in Zunahme des Tumorwachstums resultierte (Vacca and Ribatti, 2006).

Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse eindeutig für die wichtige Rolle, die der VEGF-basierte Signalweg in der Angiogenese des soliden Tumorwachstums

sowie in der Entwicklung von hämatopoetischen Neoplasien spielt. Diese Daten lassen vermuten, dass ein effektiver Hemmstoff der VEGF-Rezeptoren einen positiven therapeutischen Effekt auf Tumorerkrankungen haben kann.

2.2.3.2 FGF und PDGF und ihre Rezeptoren

Aufgrund der häufig beobachteten Redundanz mit der Signaltransduktionswege im Körper aufgebaut sind, ist es unwahrscheinlich, dass VEGF-Rezeptoren die einzigen Rezeptortyrosinkinasen darstellen, die an der Neoangiogenese beteiligt sind. Für PDGF, „Platelet-derived Growth Factor“ und „Fibroblast Growth Factor“ (FGF), wie auch für ihre Rezeptoren, konnte ein Zusammenhang mit der Tumorangio-genese bewiesen werden. PDGF- sowie auch FGF-Rezeptoren regulieren die Interaktionen zwischen Tumor- und Stromazelle und das über autokrine Mechanismen positiv beeinflusste Wachstum des Tumorgewebes und agieren dabei zum Teil synergistisch mit VEGF.

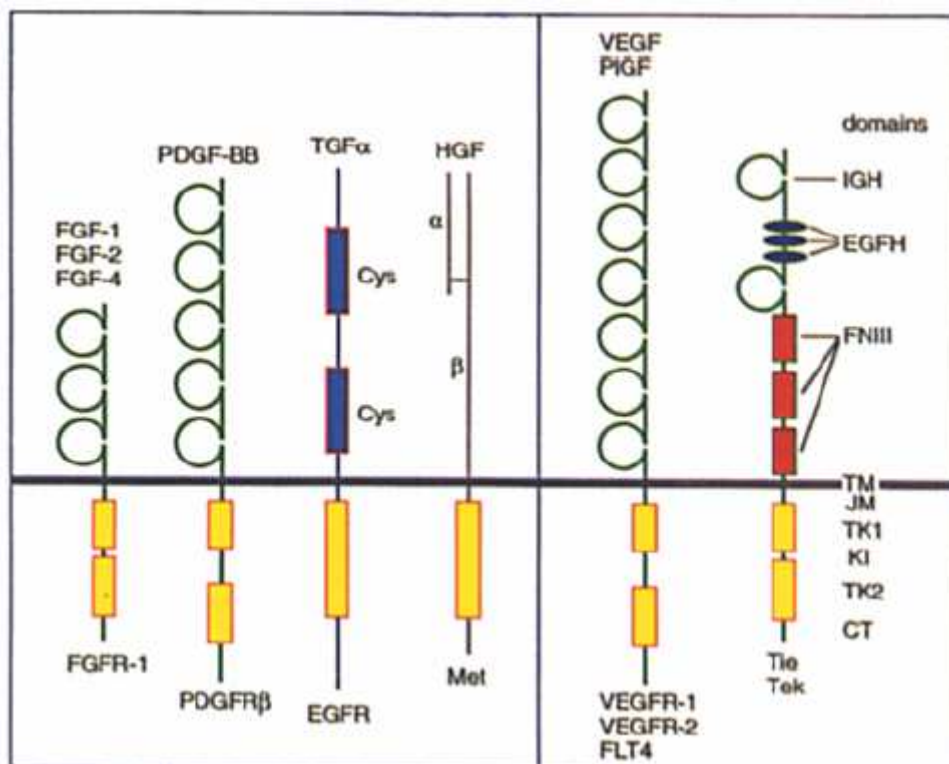


Abbildung 7: Abbildung wesentlicher an Vaskulogenese und Angiogenese beteiligter Rezeptortyrosinkinasen und Wachstumsfaktoren (Mustonen and Alitalo, 1995)

PDGF ist ein pleiotroper Faktor, der entweder als Homo- oder Heterodimer von zwei Polypeptiden, A- und B-Kette genannt, vorliegt. PDGF-Liganden treten mit zwei Rezeptorsubtypen in Wechselwirkung, dem PDGF- α -Rezeptor (PDGFR α) und dem PDGF- β -Rezeptor (PDGFR β). Dabei konnten PDGF und seine Rezeptoren in verschiedenen humanen Tumoren wie Gliomen, Dermatofibrosarkomen, Neurofibromen, myelomonozytärer Leukämie und Osteosarkomen sowie Osteoblastomen nachgewiesen werden (Yu et al., 2003).

PDGF-Rezeptoren werden von Tumorzellen exprimiert und mit dem Fortschreiten der Tumorerkrankung kontinuierlich hochreguliert. Verstärkte Expression von PDGF konnte mittels immunohistochemischer Analysen in Weichteiltumoren und fortgeschrittenen Mammakarzinomen nachgewiesen werden (Bronzert et al., 1987; Palman et al., 1992; Seymour et al., 1993).

In vielen Artikeln wurde belegt, dass Tumorzellen nicht nur den PDGF-R exprimieren sondern auch PDGF sezernieren. In klinischen Studien war eine Korrelation zwischen Vaskularisierung und der Expressionsstärke von VEGF und PDGF bei Mammakarzinomen nachweisbar (Anan et al., 1996).

Aus Tumorzellen freigesetztes PDGF induziert die Migration von Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen und fördert außerdem deren Proliferation, wodurch eine direkte Beeinflussung des angiogenetischen Prozess durch PDGF deutlich wird (Yu et al., 2003).

Somit wird auf verschiedenen Wegen das Wachstum maligner Zellen mittels auto- und parakriner Mechanismen durch PDGF und seine Rezeptoren beeinflusst.

Die dritte Familie von TRKs, die eine Rolle in der Tumorangioese spielt, ist die Familie der „fibroblast growth factor“- (FGF-) Rezeptoren. Humane FGF-R, mit einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase-Domäne, werden auf vier verschiedenen Genen verschlüsselt (Dionne et al., 1990; Isacchi et al., 1990; Keegan et al., 1991; Partanen et al., 1990). Durch Transkription dieser vier humanen FGF-R-Gene entstehen jeweils verschiedene alternative Splice-Varianten, die zu einer Vielfalt an Übertragungswegen führen. Während einige nicht innerhalb der Membran lokalisiert sind, fehlt anderen die Domäne für die Kinase (Givol and Yayon, 1992; Green et al., 1996; Jaye et al., 1992). Bis zu zwanzig verschiedene FGF-Moleküle konnten bislang identifiziert werden (Johnson and Williams, 1993). FGF-1 (acid FGF) und FGF-2

(basic FGF) gehörten dabei mit zu den ersten Wachstumsfaktoren, bei denen eine proangiogenetische Wirkung nachgewiesen werden konnte (Jaye et al., 1992).

In vitro ließ sich eine mutagene und chemotaktische Wirkung von FGF auf Endothelzellen beobachten. Desweiteren wurde die Produktion von Proteasen wie Kollagenasen und Plasminogenaktivatoren stimuliert, welches die Bildung von primären Kapillarschläuchen durch Endothelzellen induzierte (Sato et al., 1991). Kultivierte Endothelzellen exprimierten FGFR-1, wohingegen keine signifikanten Konzentrationen von höher-affinen FGF-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten (Green et al., 1996). Interessanterweise zeigten Analysen mit in-situ Hybridisierung nur geringe oder keine FGFR-Expression in Endothelien von Mausembryonen oder humanen Melanomzellen. Somit werden die angiogenetischen Effekte dieses Proteins zumindestens zum Teil auf indirektem Weg vermittelt (Mustonen and Alitalo, 1995).

FGF-1 und FGF-2 werden von vielen verschiedenen Zelltypen sezerniert und binden an alle FGF-Rezeptoren. Diese Proteine üben eine chemotaktische und mitogene Wirkung auf Endothelzellen, Fibroblasten und andere Zellen aus (Li et al., 1994). FGF induziert die Angiogenese in der Chorioantalloismembran in vivo (Mignatti et al., 1989). Überraschenderweise entwickelten weder FGF-1 noch FGF-1/FGF-2 Knockout-Mäuse Gefäßabnormalitäten und die Wundheilung in FGF-1 Knockout-Mäusen verlief physiologisch. Andererseits kam es zu einer zeitlich verzögerten Wundheilung in FGF-2 und FGF-1/FGF-2 Knockout-Mäusen, was auf eine Regulation der Aussprossung von neuen Gefäßen im Rahmen der Gewebsreparation durch FGF-2 hindeutet (Distler et al., 2003).

Expression von FGFs sowie ihren Rezeptoren konnten in einer Vielfalt von humanen Tumoren nachgewiesen werden. Dazu zählen z.B. urologische Tumoren (Cronauer et al., 2003), Mammakarzinome (Smith et al., 1999), Pankreaskarzinome (Kornmann et al., 1998), Melanome (Easty and Bennett, 2000) und Prostatakarzinome (Kwabi-Addo et al., 2004). Ebenfalls wiesen mehrere Arbeiten die Expression und Sekretion von FGF-2 in verschiedenen Myelomzelllinien sowie durch aufgereinigte von MM-Patienten gewonnenen Myelomzellen nach (Bellamy et al., 1999; Vacca et al., 1999). Zusätzlich bestand in Untersuchungen von Knochenmarkspiraten und peripherem Blut von Patienten mit Multiplem Myelom eine positive Korrelation zwischen FGF-2 Konzentration und der Aktivität der Erkrankung (Di Raimondo et al., 2000; Sato et al.,

2002; Sezer et al., 2001). Bisping et al. konnten in ihren Studien den Nachweis für eine parakrine Wechselwirkung zwischen FGF-2 und Interleukin-6 erbringen. Sie zeigten, dass die Stimulation von Stromazellen des Knochenmarks von MM-Patienten mit FGF-2 zu einer zeit- und dosisabhängigen Steigerung der IL-6 Sekretion führt, die durch Hinzugabe von FGF-2-Antikörpern komplett aufgehoben werden konnte (Bisping et al., 2003). FGF-2 spielt somit auch in der Pathogenese des Multiplen Myeloms eine wesentliche Rolle.

2.3 ANTIANGIOGENETISCHE WIRKSTOFFE

Aufgrund der entscheidenden Rolle der Angiogenese in der Entwicklung und dem Fortschreiten neoplastischer Erkrankungen, forscht man bereits seit einiger Zeit nach Therapien, deren Wirkmechanismus an der Neovaskularisierung des Gewebes ansetzt (Kerbel, 1997).

VEGF-Antikörper bewirkten im Tiermodell eine Unterdrückung des Tumorwachstums (Kim et al., 1993). In aktuellen klinischen Studien konnte die Wirksamkeit von VEGF-Antikörpern in Kombination mit konventioneller Chemotherapie bei verschiedenen soliden humanen Tumoren wie z.B. kolorektalen Karzinomen, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen und Mammakarzinomen belegt werden. Der VEGF-Antikörper Bevacizumab, der die Bindung aller VEGF-Isoformen an alle VEGF-Rezeptortypen unterbindet, wurde bereits für die kombinierte Chemotherapie mit 5-FU/Folinsäure und Irinotecan als Erstlinientherapie beim metastasierten kolorektalen Karzinom zugelassen (Rosen, 2005).

Der Wirkstoff Thalidomide zeigt eine sehr potente antiangiogenetische Aktivität (D'Amato et al., 1994) und weist eine gute Wirksamkeit bei Patienten mit fortgeschrittenem Multiplem Myelom auf (Singhal et al., 1999). In der dazugehörigen Studie wurde bei 84 Patienten mit refraktärem Multiplem Myelom einer Behandlung mit Thalidomid bei einer Dosierung von 200-800 mg/die durchgeführt. Die Mehrzahl der eingeschlossenen Patienten waren vor Beginn der Studie bereits intensiv vorbehandelt, die meisten hatten sogar bereits mindestens eine Hochdosistherapie mit Stammzelltransplantation hinter sich. Die durchschnittliche Remissionsrate lag bei 32 % und die Patienten wiesen dabei eine Abnahme der Plasmazellinfiltration des Knochenmarks sowie gesteigerte Hämoglobinwerte auf. Interessanterweise

konnte in dieser Studie kein Zusammenhang zwischen dem Ansprechen und einer Reduktion der Vaskularisierung des Knochenmarks nachgewiesen werden.

Zusammenfassend stellt somit die weitere Arbeit mit Hemmstoffen der Angiogenese beim Multiplen Myelom sowie die tiefergehende Erforschung der Zusammenhänge zwischen bösartigen hämatologischen Erkrankungen und Neoangiogenese einen wichtigen Schritt auf dem Weg zu einem besseren Verständnis der Tumorphathogenese und zu wirksamen neuen Therapieoptionen dar.

2.4 DER WIRKSTOFF SU6668

SU6668 ist ein kleines Molekül mit der chemischen Formel C₁₈H₁₈N₂O₃. Das Molekulargewicht liegt bei 310.36. Die durch den Wirkstoff induzierte Hemmung des Tumorwachstums basiert auf einer Interaktion mit den Tyrosinrezeptorkinasen des VEGFR-2 (Flk-1/KDR), PDGFR und FGFR.

Dabei handelt es sich um einen direkten Effekt des Wirkstoffes auf die Endothelzellteilung, direkte Wirkung auf die Tumorzellteilungsrate und einem direktem Effekt auf die Stromazellen, die in der Interaktion für das Wachstum des Tumors eine wichtige Rolle spielen.

SU6668 ist ein wirksamer Tyrosinkinasehemmstoff, der den PDGF-, Flk-1/KDR sowie den FGF- Rezeptor blockiert und als neuartiges antiangiogenetisches Agens wirkt. SU6668 ist ein oral verfügbares, kleines synthetisches, lipophiles, stark protein-gebundenes Molekül, welches die Autophosphorylation der oben genannten Tyrosinrezeptorkinasen inhibiert (Kuenen et al., 2005). Außerdem wird die VEGF- und FGF-stimulierte Zellproliferation von humanen Endothelzellen durch SU6668 wirkungsvoll gehemmt.

In vivo konnte eine gute antitumoröse Aktivität der Substanz in zahlreichen in Mäusen implantierten Tumoxenografts nachgewiesen werden. Dabei wurden A431 (human epidermoid), Colo205 (human colon), H460 (human non-small cell lung carcinoma), SF767T (human glioma), C6 (rat glioma) und A375 (human melanoma) Tumorzellen verwendet (Laird et al., 2002). SU6668 führt zu einem Wachstumsstillstand oder einer Größenabnahme bereits länger bestehender Tumoren und konnte eine Streuung des Tumors verhindern.

Intravitale mikroskopische Videoaufnahmen von C6-Xenografts und immunhistochemische Ansätze wurden angewandt, um den Nachweis zu erbringen, dass eine Behandlung mit SU6668 mit einer Hemmung der Tumervaskularisierung und der Tumorzellproliferation einhergeht. Im Vergleich mit einer Kontrollgruppe konnte gezeigt werden, dass die Tumervaskularisierung in den behandelten Tumoren um 65-95% abnahm (Laird et al., 2000).

Die Fähigkeit der Substanz SU6668 die Tyrosinkinaseaktivität verschiedener RTKs effektiv zu verringern, wurde in biochemischen Assays mit aufgereinigtem Enzym analysiert. Dort zeigte sich der Wirkstoff als potenter Inhibitor (die ATP-Bindung berücksichtigend) des PDGFR β mit einer Hemmkonstante (K_i) von 0,008 μ M, schätzungsweise 300-mal geringer als die K_M der Kinase für ATP ($K_M = 2,2 \mu$ M). Somit kann SU6668 als ein effektiver Hemmstoff dieses Enzyms betrachtet werden. Über den Mechanismus der kompetitiven Hemmung (bezüglich der ATP-Bindung) hemmt SU6668 ebenfalls die Flk-1-Tyrosinkinase und die FGFR-1-Tyrosinkinase. Eine Hemmung des „epidermal growth factors“ (EGF-R)-Rezeptors konnte bei den getesteten Konzentrationen des Wirkstoffes jedoch nicht nachgewiesen werden ($IC_{50} > 100 \mu$ M) (26-28).

Die Kinetik der Hemmung durch SU6668 wurde mittels biochemischer trans- und autophosphorylisations Assays bestimmt. Die Werte wurden dabei in μ M angegeben.

Flk-1		FGFR1		PDGFR β		EGFR
Transphosphorylierung		Transphosphorylierung		Autophosphorylierung		
K_i	K_m (ATP)	K_i	K_m (ATP)	K_i	K_m (ATP)	IC_{50}
2,1	0,53	1,2	4,61	0,008	2,21	> 100

Tabelle 2: Kinetik der Hemmung durch SU6668 (Laird, 1999a; Laird, 1999b; Laird et al., 2000).

Die Proliferation von Endothelzellen ist wesentlich für den angiogenetischen Prozess und wird primär durch VEGF und FGF vermittelt. „Humane umbilical vein endothelial cells“ (HUVECs) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von SU6668 vorbehandelt und dann mit einer proliferationsfördernden Dosis von VEGF oder FGF

stimuliert. Nach 48 Stunden wurde die Zellteilungsrate über die Bestimmung der eingebauten Bromodeoxyridine in der zellulären DNA ermittelt.

Der Wirkstoff SU6668 konnte die VEGF-vermittelte Steigerung der Zellteilung in HUVECs dosisabhängig hemmen. Dabei lag die mittlere IC_{50} bei $0,34 \mu\text{M}$. Bei einer mittleren IC_{50} von $9,6 \mu\text{M}$ der Substanz wurde auch die FGF-abhängige Proliferation der Zellen blockiert. Diese Ergebnisse zeigten, dass SU6668 ein potenter Hemmstoff des durch diese physiologischen Liganden gesteigerten Endothelzellwachstums ist (Laird, 1999a; Laird, 1999b; Laird et al., 2000).

In weiteren Studien wurde die Fähigkeit des Wirkstoffes SU6668, das Wachstum von Tumorzellen unter Zellkulturbedingungen durch direkte Hemmung zu unterbinden, untersucht. Bestandteil dieser Experimente waren menschliche Tumorzelllinien wie A431 (Epidermoid), Colo205 (Kolon) und NCIH460 (Lunge). SU6668 hemmte das Wachstum der Kulturen dieser Zelllinien bei IC_{50} -Werten von $23 \mu\text{M}$ (oder mehr). Diese Dosis stellt sich im Vergleich zu der von zytotoxischen Chemotherapeutika, die eine IC_{50} von generell $< 1 \mu\text{M}$ unter ähnlichen Bedingungen aufweisen, als relativ hoch dar.

Diese Feststellung, gekoppelt mit den Ergebnissen aus den HUVEC-Daten, führt zu der Annahme, dass der hauptsächliche Ansatzpunkt der Wirkung an den Endothelzellen des Gewebes liegt, anstatt dass er seine Wirkung direkt an den Tumorzellen entfaltet.

Die in-vivo-Aktivität von SU6668 wurde anhand von menschlichen Tumorzellen verschiedenen Ursprungs erforscht, die dafür immundefizienten Mäusen subkutan implantiert wurden. Am Tag 1 nach der Tumorimplantation wurde mit einer ab diesem Zeitpunkt täglichen, oralen Gabe von SU6668 begonnen. In allen getesteten Zelllinien wurde eine effektive Hemmung des Wachstums der Tumorzellen beobachtet.

Ähnliche Ergebnisse wurden in Versuchen erzielt, bei denen Mäuse nach Implantation mehrerer subkutaner Tumoren SU6668 mit einer Dosis von 75-100 mg/kg/Tag intraperitoneal verabreicht wurde. Auch hier wurde das Wachstum der Tumoren deutlich gehemmt (Laird, 1999a; Laird, 1999b; Laird et al., 2000). In diesen

Studien konnte die Fähigkeit der Substanz, das Wachstum von Tumoren bei täglicher Gabe zu vermindern bzw. zu blockieren, belegt werden.

Zusätzlich zu diesen Untersuchungen, die bei der Firma SUGEN durchgeführt wurden, konnte die in vivo-Aktivität des Wirkstoffes in Versuchen mit Mäusen auch bei menschlichen Magentumoren, Mamma- und Kolonkarzinomen nachgewiesen werden (Yonekura, 2000).

Die Hemmung des Wachstums von bereits länger bestehender subkutan implantierter Tumorenografts in athymischen Mäusen wurde mittels des „A431 humanen epidermoid carcinoma“ Modells evaluiert. Dabei wurde eine therapeutische Anwendung der Substanz SU6668 in drei Gruppen mit jeweils unterschiedlichen Tumorgrößen begonnen, welche zu einer dramatischen und einheitlich nachweisbaren Regression der Tumoren, unabhängig von der Ausgangsgröße, führte. Bei ungefähr 50% der untersuchten Tiere kam es zu einer kompletten Remission.

Nach den positiven Ergebnissen, die in experimentellen Studien mit der Substanz SU6668 erzielt werden konnten, wären im nächsten Schritt die pharmakodynamischen Effekte der antiangiogenetischen Substanz SU6668 bei der therapeutischen Behandlung von Patienten mit Multiplem Myelom, einer Erkrankung in deren Pathogenese die Angiogenese des Knochenmarks nachweislich eine wesentliche Rolle spielt, im Rahmen von klinischen Studien zu untersuchen.

Ausgangspunkt für diese Arbeit stellt eine klinische Studie mit SU6668 als Secondlinetherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem Multiplen Myelom dar. Um die pharmakodynamische Wirksamkeit der Substanz zu messen und den Krankheitsverlauf zu monitorieren, wurden im Rahmen der Studie verschiedene, für die Pathogenese des Myeloms wesentliche Zytokine, apoptotische Marker und angiogenetische Proteine bestimmt.

Interleukin-6 (IL-6), ein wesentlicher Wachstumsfaktor des Multiplen Myeloms, wurde im Serum mittels ELISA und in den Stromazellen des Knochenmarks (CD 138-negative Zellen), durch RT-PCR vor und unter Studienmedikation analysiert. IL-6 stellt einen prognostischen Faktor für den Krankheitsverlauf des Multiplen Myeloms dar, so dass eine Abnahme der Serumkonzentration dieses Zytokins für eine positive Entwicklung der Erkrankung sprechen könnte. Um einen Anhalt über die

Apoptosebereitschaft der Myelomzellen und somit einen Parameter für die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Therapie im Verlauf der Studie zu erlangen, wurde die Höhe der BAX (proapoptotisch) und BCL-2 (antiapoptotisch) Expression in den CD 138-positiven Myelomzellen des Knochenmarks ermittelt. Unter dem Gesichtspunkt, dass Angiogenese eine wesentliche pathophysiologische Rolle in der Entwicklung und Progression des Multiplen Myeloms spielt, wurde anhand der Bestimmung der VEGF mRNA (Isoformen VEGF 121 und VEGF 165) in Myelomzellen des Knochenmarks, der Verlauf dieser stark proangiogenetisch wirksamen Proteine unter Einfluss der Therapie betrachtet.

Neben der Analyse der biologischen Aktivität der antiangiogenetischen Substanz wurde die Rate des Ansprechens auf die Therapie mit SU6668 anhand verschiedener klinischer Kriterien ermittelt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 STUDIENDESIGN

Die antiangiogenetische Substanz SU6668 wurde im Rahmen einer offenen, nicht randomisierten Phase I / II – Studie untersucht.

Innerhalb Deutschlands wurden 20 Myelompatienten in die Studie eingeschlossen und nach einem standardisierten Protokoll behandelt. Voraussetzung für den Einschluss war, dass der Patient auf eine bereits erfolgte Chemotherapie nicht angesprochen hatte, sich in einem Progress befand, ein Rezidiv zeigte oder eine Chemotherapie aus medizinischen Gründen nicht tolerierte. Desweiteren sollte eine Chemotherapie inklusive einer alpha-Interferon-Therapie sowie die Behandlung mit Kortikosteroiden mindestens vier Wochen zurückliegen und es durfte keine Teilnahme an einer klinischen Studie mit neuen Wirkstoffen wie Thalidomid oder SU6668 vorausgegangen sein. Die Sekretion von Paraproteinen musste im Serum oder im Blut nachweisbar sein. Um zu gewährleisten, dass der Patient die allgemeinen Belastung der Studie gut toleriert, wurde ein Karnofsky-Index von > 60% festgelegt. Frauen sollten sich in der Menopause befinden oder Kontrazeption gewährleisten, um einer möglichen Teratogenität der Prüfsubstanz vorzubeugen. Es war erforderlich, dass die renale, hepatische und kardiale Funktion adäquat war und ein psychiatrischer Normalbefund vorlag. Für das Blutbild wurden Mindestwerte von Hämoglobin > 8 g/dl, Neutrophile (ANC) > $1,0 \times 10^9/L$ und Thrombozyten > $75 \times 10^9/L$ festgelegt. Ein insulinpflichtiger Diabetes mellitus oder weitere maligne Erkrankungen, bis auf ein Basaliom oder ein Carcinoma in situ der Cervix, mussten ausgeschlossen werden. Alle Patienten wurden ärztlich aufgeklärt und erteilten ihre schriftliche Einwilligung, an der Studie teilzunehmen und ihre Proben für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung zu stellen. Die Studie wurde gemäß den aktuellen Richtlinien des Arzneimittelgesetz (AMG) durchgeführt und von der Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer genehmigt.

Als primäres Ziel der Studie wurde die objektive Rate des Ansprechens (Response) auf die Therapie mit SU6668 festgelegt. Die sekundären Endpunkte waren die Evaluation der Sicherheit und Toxizität von SU6668, die Analyse der biologischen

Aktivität des Wirkstoffes mit Hilfe von biologischen Markern sowie die Bestimmung der Dauer bis zum Progress und des Gesamtüberlebens.

Die Response des Patienten wurde unterteilt in komplette (CR), partielle (PR) oder geringfügige (MR) Remissionen, stabile Erkrankung (SD) und Progress (PD).

Dabei wurde eine komplette Remission (CR) folgend definiert: kein nachweisbares Paraprotein im Serum oder Urin für die Dauer von mindestens sechs Wochen, < 5% Plasmazellen im Knochenmark, keine neuen knöchernen Läsionen am Skelett und die komplette Ausheilung eines Weichteilplasmozytoms.

Eine partielle Remission (PR) war festgelegt als: >50% Senkung des Paraproteins im Serum für mindestens sechs Wochen, >90% Reduktion der 24h-Leichtkettenproduktion oder Senkung <0,2g/24h über einen Zeitraum von mindestens sechs Wochen, keine neuen Skelettläsionen und die Reduktion eines Weichteilplasmozytoms um > 50%.

Der Patient befand sich in einer geringfügige Remission (MR = Minor Remission), wenn: 25-49% weniger Paraprotein im Serum nachgewiesen wurde, eine 50-89% Senkung der 24h-Leichtkettenproduktion über den Zeitraum von mindestens sechs Wochen auftrat, kein Zuwachs in der Anzahl oder Größe der lytischen Skelettläsionen und der Weichteilplasmozytome stattfand. Eine stabile Krankheitslage (SD = Stable Disease) war gegeben, wenn keine der obigen Kriterien erfüllt wurden und kein Progress (PD) vorlag, der wie folgt definiert wurde: Erhöhung des Serumparaproteins sowie der 24h-Leichtkettenproduktion um >25%, Anstieg der Plasmazellkonzentration im Knochenmark um >25% wie auch der absoluten Plasmazellkonzentration im Blut um mindestens 10%, Zunahme in der Anzahl oder Vergrößerung der Knochenläsionen am Skelett sowie der Weichteilplasmozytome und Hyperkalzämie.

Die Plateauphase wurde nicht als eigenständiges Response-Kriterium gesehen und im Zusammenhang mit CR, PR, MR oder Stable Disease betrachtet. Sie ist dadurch charakterisiert, dass Serum und/oder Plasmaparaproteinwerte unabhängig von ihrer Konzentration für mindestens drei Monate stabil bleiben, die Patienten keine oder nur geringe Symptome des Myeloms zeigen und ihre Hämoglobinwerte ohne Transfusion stabil bleiben.

Zu Beginn der Therapie wurde allen Patienten 100 mg/m^2 SU6668 zweimal täglich als Kapsel in oraler Form verabreicht. Basierend auf momentan laufenden Studien wird angenommen, dass die maximale tolerierte Dosis (MTD) im Bereich von 300 mg/m^2 liegt.

Da pharmakokinetische Studien nach einer kontinuierlichen Verabreichung von 28 Tagen bei allen Dosierungen eine Reduktion der Plasma-Drug-Exposure um ca. 50% zeigten, wurde eine Dosissteigerung festgelegt. Sofern keine medikament-spezifischen Nebenwirkungen auftraten, wurde die Dosis nach 28 Tagen auf 200 mg/m^2 angehoben und erhöhte sich nach 56 Tagen auf 300 mg/m^2 . Die Patienten erhielten orales SU6668 für den Zeitraum von drei Monaten, vorausgesetzt, dass keine unakzeptablen Toxizität oder Progression festgestellt wurde. Bei klinischem Ansprechen konnte die Behandlung bis zu einem Jahr fortgesetzt werden.

Zu den in klinischen Dosisescalationsstudien aufgetretenen Nebenwirkungen von SU6668 zählen: leichte Übelkeit und Kopfschmerzen, Müdigkeit, brüchige Fingernägel, milde Oberbauchbeschwerden gelegentlich verbunden mit Durchfall oder Verstopfungen sowie die orange-gelbliche Verfärbung von Urin und Stuhlgang. Die dosislimitierende Toxizität lag bei 800 mg/m^2 bei zweimaliger Gabe täglich.

3.2 PATIENTENPROBEN

Vor der ersten Dosisgabe sowie auch an Tag 29 und nach drei Monaten wurden Knochenmarksaspirate zur Untersuchung der Tumorzellapoptose über die Analyse der BCL-2 und BAX mRNA-Konzentrationen, der IL-6 mRNA-Spiegel und anderer angiogenesespezifischer Faktoren gewonnen. Die RNA-Untersuchung wird im Gesamtknochenmark, der Plasmazellfraktion und der plasmazellfreien Fraktion (nach vorheriger immunomagnetischer Isolierung) durchgeführt.

Zur Bestimmung von Plasma-TNF- α und IL6-Spiegel mittels ELISA wurden je 10 ml Plasma vor sowie vier Stunden nach Einnahme der ersten Dosis (Tag 1), nach 2, 4, 8 und 12 Wochen abgenommen.

Knochenmarksstanzen werden vor Studienbeginn, nach drei Monaten und einem Jahr entnommen und für Messungen der Kapillardichte und für Apoptosestudien genutzt.

3.3 ISOLIERUNG VON MONONUKLEÄREN ZELLEN AUS DEM KNOCHENMARK

Den Patienten wurde ungefähr 7-8 ml Knochenmark in Heparinröhrchen (Becton-Dickinson, San Jose, Kalifornien) entnommen. Nach 1:3 Verdünnung des Aspirates mit PBS (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien) wurde die Isolierung von Mononukleären Zellen mit Hilfe von Ficoll (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) vorgenommen. Dafür wurden 20 ml steriles Ficoll in ein 50 ml Falcon gefüllt, langsam mit dem verdünnten Knochenmark überschichtet und bei 4° C 20 Minuten lang mit 2000 rpm zentrifugiert. Die Auftrennung der Zellen erfolgt mittels eines Dichtegradienten. Nach Zentrifugation lag den mononukleären Zellen (MNCs) nur noch zellfreies Plasma auf, so dass diese Schicht der MNCs vorsichtig mit einer sterilen Pipette abgenommen und gewaschen werden konnte. Das Waschen erfolgte nach Zugabe von PBS in einem Verhältnis von 1:2 und anschließender fünfminütiger Zentrifugation bei 4 °C mit 1200 rpm. Danach wurde das überständige PBS vorsichtig von dem sich gebildeten Zellpellet abgesaugt. Um zu vermeiden, dass sich noch restliche Erythrozyten in der Probe befinden, die die weitere Auftrennung stören könnten, wurden die Zellen in 5 ml Ery-Lysepuffer aufgenommen, für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend erneut wie oben beschrieben mit PBS gewaschen.

3.4 AUFREINIGUNG DER CD138+-ZELLEN

Die CD138+ Zellen wurden mittels eines immunomagnetischen Selektionsverfahrens aus den mononukleären Zellen isoliert. Zur Separation der CD138+-Zellen wurde mit CD138 Microbeads und dem VarioMACS (beides Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) gearbeitet. Dieses Selektionsprinzip basiert darauf, dass sich die magnetischen Beads an entsprechende antigentragende Zellen haften und diese über eine im magnetischen Feld des VarioMACS befindliche Säule separiert werden können. Die markierten Zellen werden auch nach mehrfachen Waschschritten in der Säule gehalten und erst nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld eluiert. CD 138 wird nur von physiologischen und malignen Plasmazellen exprimiert, nicht dagegen von zirkulierenden B-Zellen, T-Zellen oder Monozyten (Referenzen siehe Macs-Beschreibung). Somit stellt es einen adäquaten Marker für die Isolierung der Plasmazellfraktion dar.

Zur Aufreinigung der CD138+-Zellen wurde MACS-Puffer verwendet, der aus 485 ml sterilem PBS, 12,5 ml 0,5% Humanem Serum Albumin (DRK Blutspendedienst Niedersachsen, Springe, Deutschland) und 3 ml steril filtriertem 0,6% ACD-A (Fresenius, Emmer, Niederlande) angesetzt wurde. Die mononukleären Zellen wurden nach dem letzten Waschschrift je nach Größe des Zellpellets in 1-5 ml MACS-Puffer aufgenommen und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Ein Zytospin wurde angefertigt, um zu überprüfen, ob die Morphologie der isolierten Zellen Plasmazellen entsprach und einen Anhalt über die Infiltration des Knochenmarks zu gewinnen.

Jeweils 5×10^6 mononukleäre Zellen wurden in 90 μ l MACS-Puffer aufgenommen (für weniger als 5×10^6 Zellen wurde ein Minimum von 90 μ l MACS-Puffer verwendet), nach Zugabe von 10 μ l CD138-Microbeads durchmischt und im Kühlschrank 15 Minuten inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen in 500 μ l MACS-Puffer resuspendiert und auf die bereits mit 3 ml MACS-Puffer angefeuchtete VS+-Säule des VarioMACS gegeben. Die CD138-negativen Zellen, die auch im Magnetfeld des VarioMACS mit dem Puffer die Säule sofort durchlaufen, wurden aufgefangen. Um zu gewährleisten, dass sich keine Rückstände von CD138-negativen Zellen auf der Säule befinden, wurde die Säule in fünf Schritten mit je 3 ml MACS-Puffer gewaschen, der ebenfalls in dem Röhrchen der Negativfraktion aufgefangen wurde. Die VS+-Säule wurde dann aus dem Magnetfeld des VarioMACS herausgenommen und die CD138-positiven Zellen mit 5 ml MACS-Puffer aus der Säule eluiert.

Die Zellen der Positiv- und Negativfraktion wurden gewaschen, gezählt und der Zellzahl entsprechend mit 2000 rpm pelletiert (Biofuge, Eppendorf, Hamburg). Die Zellpellets wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.5 ISOLIERUNG VON RNA UND SYNTHESE VON KOMPLEMENTÄRER DNA

Die Gesamt-RNA der CD138-positiven und -negativen Patientenzellen wurde mit dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert.

Die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Zellpellets wurden in 350 μ l RLT-Puffer (Lyse Puffer) resuspendiert und auf eine Quashredder-Säule gegeben. Zur Homogenisierung wurden die Zellen bei 14000 rpm zwei Minuten über die Säule zentrifugiert. Danach

wurde der Durchlauf mit 350 µl 70 % DEPC-Ethanol zur Fällung der Nucleinsäuren durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gut vermischt. Anschließend wurde die Lösung auf eine RNeasy-Mini-Säule übertragen und 15 Sekunden bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, wodurch die RNA auf einer Membran in der Säule haften bleibt und der Durchlauf verworfen werden kann. Dann wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Säule pipettiert und bei 10000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurde die Membran der Säule vorsichtig mit den vorher in 70 µl RDD-Puffer pipettierten 10 µl DNase-Stock-Lösung (Qiagen, Hilden, Deutschland) ausfüllend befeuchtet und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch Reste von genomischer DNA entfernt wurden. Auf die Säule wurden dann wieder 350 µl RW1-Puffer pipettiert und bei 10000 rpm 15 Sekunden lang zentrifugiert. Danach wurden zweimal jeweils 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und beim ersten Mal 15 Sekunden bei 10000 rpm und anschließend 2 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Zur Elution der RNA wurden 35 µl Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC) direkt auf die Membran der Säule pipettiert. Nach einer einminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde eine Minute bei 10000 rpm zentrifugiert und die Lösung dann sofort auf Eis gekühlt.

Mittels einer spektrophotometrischen Messung (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) wurde die Konzentration und Qualität der isolierten RNA ermittelt.

Bei der folgenden cDNA-Synthese mit dem You-Prime-First-Strand cDNA-Synthese Kit (Amersham, Picataway, New Jersey) wurden je 3 µg Gesamt RNA mit DEPC-Wasser auf ein Endvolumen von 32,5 µl gebracht. Um die RNA zu denaturieren wurde sie in einem Heizblock (Trio Thermo Block Biometra, Tampa, Florida) 10 Minuten lang bei 65 °C erhitzt und danach 2 Minuten auf Eis wieder abgekühlt. Anschließend wurde die RNA-Lösung in ein Reaktionsgefäß, welches zwei First-Strand Kugeln enthielt, pipettiert und solange auf- und abpipettiert, bis sich die Kugeln ganz gelöst hatten. Nach Hinzugabe von 0,2 µg Random Primers (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien) wurde sie 60 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Die cDNA wurde bei -20 °C eingefroren und gelagert.

3.6 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR

Die Bestimmung der Expression folgender Gene VEGF 121, BAX, BCL-2 und IL-6 erfolgte mittels der hergestellten cDNA. Die Analyse der Proben wurde in Form einer Real-Time PCR an dem ABI Prism™ 7700 Sequence Detector System (ABI/PE Biosystems Forster City California, USA) durchgeführt.

Die Real-Time Quantitative PCR oder auch quantitative Echtzeit-PCR stellt eine Weiterentwicklung der Mitte der achtziger Jahre von K.B. Mullis entwickelten Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) dar (Mullis and Faloona, 1987). Die PCR ist eine sehr schnelle und sensitive Methode zur in-vitro-Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte und ermöglicht somit die Detektion kleinster DNA-Mengen. Dabei basiert das Prinzip der PCR-Reaktion auf der enzymatischen Vermehrung eines bestimmten DNA-Abschnittes, der zwischen zwei Startersequenzen, den sogenannten Primern, liegt. Die Basenabfolge beider Primer muss komplementär zur amplifizierenden DNA-Sequenz sein. Binden die Primer an die komplementären DNA-Abschnitte, katalysiert das Enzym DNA-Polymerase die in-vitro DNA-Synthese. Dies erfolgt im wesentlichen in drei Schritten: einem Denaturierungsschritt bei 95°, um die beiden DNA-Stränge voneinander zu trennen, einem Hybridisierungsschritt, in dem die beiden Primer an den jeweils komplementären Strang binden und einem Syntheseschritt, währenddessen der zwischen den Primern liegende DNA-Abschnitt mithilfe der DNA-Polymerase und der im Reaktionsmix vorhandenen Desoxyribonucleotide selektiv synthetisiert wird (Erlich et al., 1991).

Die Methode der Real-Time Quantitative PCR am ABI Prism™ 7700 Sequence Detector System läuft dabei voll automatisch ab, ist reproduzierbar und gestattet es, gleichzeitig 96 Proben zu analysieren.

Die speziellen Taqman™ Reagenzien arbeiten dabei mit Sonden. Dies sind synthetische, mit fluoreszierenden Farbstoffen markierte Oligonukleotide, welche spezifisch an die gesuchte Zielsequenz der cDNA binden. Ihr Bindungsort liegt dabei zwischen dem Vorwärts- und dem Rückwärts-Primer. Sie enthalten zwei Farbstoffmoleküle, Reporter und Quencher. Der energiereichere Farbstoff, Reporter, liegt am 5' Ende und ein energieärmeres Molekül, welches als Quencher bezeichnet wird, befindet sich am 3' Ende der Sonde. Solange die Farbstoffmoleküle aneinander gebunden vorliegen, findet ein Energietransfer von dem energiereicheren zum

energieärmeren Molekül statt, der auch „Forster-Type Energy Transfer“ genannt wird. Das Fluoreszenzsignal des Reporter-Moleküls wird durch die räumliche Anordnung vom Quencher-Molekül unterdrückt. Erst wenn die Sonde durch die Aktivität der 5' Nuclease des Primers von der cDNA hydrolysiert wird, endet der Energiefluss zwischen den Molekülen und die Fluoreszenzemission des Reporters steigt, während die des Quenchers abnimmt.

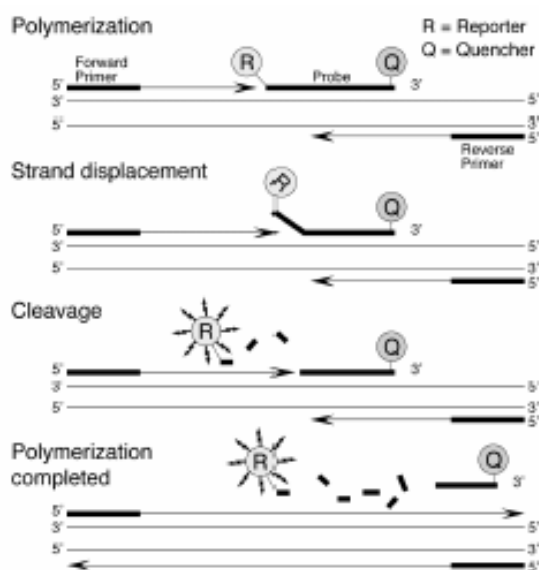


Abbildung 8: Ablauf der TaqMan® - PCR (TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit – Protocol; © Copyright 2002, Applied Biosystems)

Das proportional zur Produktzahl zunehmende Reportersignal wird im Sequence Detection System des Taqmans erfasst und von der Software in Form einer Amplifikationskurve dargestellt.

Diese Kurve spiegelt den typischen Verlauf einer PCR-Reaktion wider, die in drei Phasen eingeteilt werden kann.

Zuerst erfolgt eine exponentielle Phase (Phase 1), in der sich in jedem Zyklus die Anzahl der Produkte verdoppelt, das erzeugte Fluoreszenzsignal kann jedoch physikalisch noch nicht gemessen werden (Gesamtssignal < Rauschen). Nach Überschreitung eines Schwellwertes geht die exponentielle Vervielfältigung weiter und ist in jedem Zyklus durch ansteigende Fluoreszenzintensität messbar. Dann werden die verschiedenen Komponenten der Reaktion langsam verbraucht, was zu einer linearen Phase führt (Phase 2).

Zum Schluss erreicht die Reaktion eine Plateau Phase (Phase 3), in der die Produktzahl konstant bleibt, da keine Reagenzien mehr für die Amplifikation vorliegen.

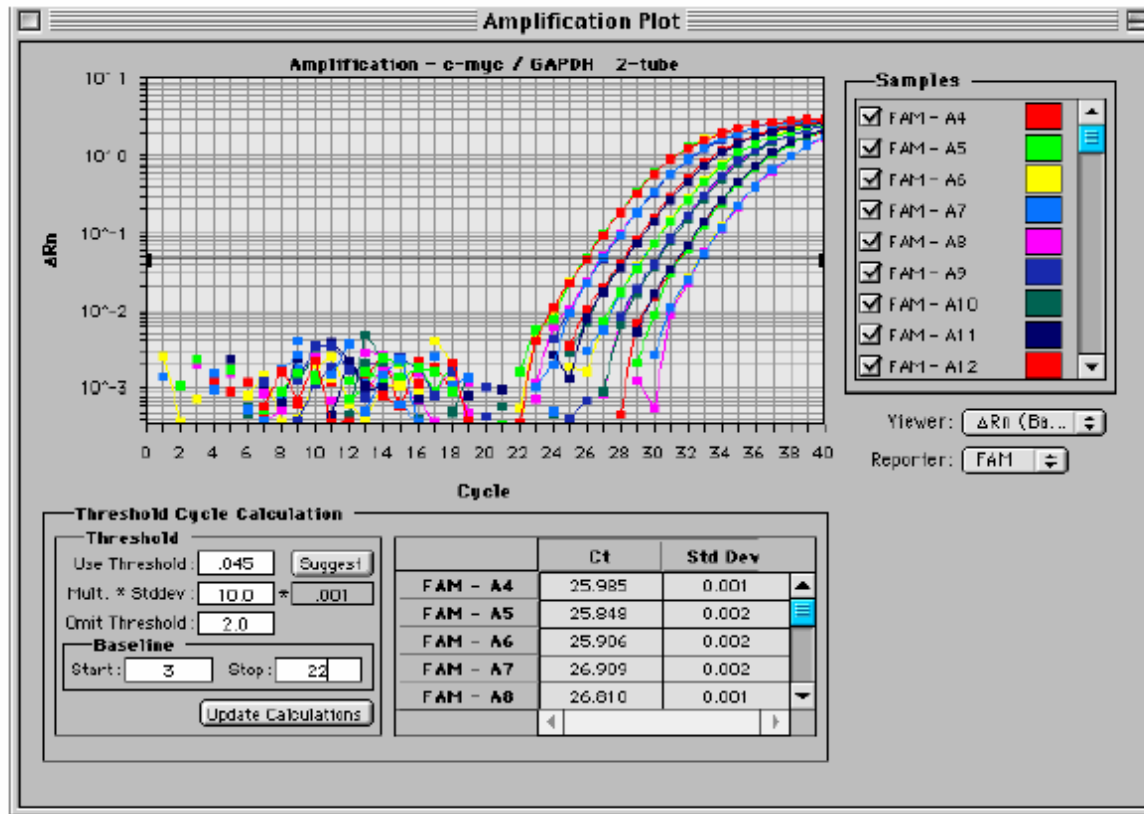


Abbildung 9: Darstellung der Amplifikationskurven einer TaqMan® - PCR (User Bulletin #2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, © Copyright 2002, Applied Biosystems)

Bei der quantitativen Messung der amplifizierten RNA wird von der Software eine sogenannte „Threshold“-Linie als Schwellenwert gesetzt, ab der eine Reaktion eine Fluoreszenzintensität erreicht, die vom generellen „Signalrauschen“ signifikant abgrenzbar und somit auswertbar ist. Diese Linie liegt in der exponentiellen Phase der Amplifikationskurve, welches eine hohe Präzision der Messung ermöglicht, da in dieser Phase der PCR-Reaktion keine limitierenden Faktoren, wie Primer oder Nucleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibition der PCR-Reaktion durch Generation bestimmter Produkte, bestehen. Der PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal einen gewissen Schwellenwert überschreitet und die fiktive „Threshold-Linie“ kreuzt, wird als „Cycle Threshold C_t “ oder Crossing Point (CP) bezeichnet und stellt einen zentralen Faktor der folgenden quantitativen Berechnung

dar. Diese Zykluszahl, C_t , korreliert mit der Menge der durch die Amplifikation entstandenen RNA. Je größer die Menge des Zielgens, die am Ausgangspunkt der Real-Time PCR vorliegt, desto früher wird ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzsignale von System detektiert, d.h. mit steigender Konzentration der zu messenden Substanz in der Probe, nimmt der C_t - Wert ab. Basierend auf diesem Prinzip ist eine quantitative Bestimmung möglich.

Eine Verdopplung der Ausgangskopienzahl findet sich in der Abnahme des C_t um einen Zyklus wieder, somit würde in einer perfekten Standardkurve eine Zunahme der Menge um einen Logarithmus durch die Abnahme des C_t -Wertes um 3,3 Zyklen deutlich werden.

In einer sogenannten Multiplex-PCR wird mit mehr als einem Primer-Paar in einem Well gearbeitet, wodurch zwei cDNA-Abschnitte simultan amplifiziert werden. Für die separate Detektion der produzierten Kopien ist es wichtig, dass man mit unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen arbeitet, deren Emissionsmaximum möglichst weit auseinanderliegen sollte, um Interferenzen zu vermeiden.

Die in der Multiplex-PCR verwendeten Reporter-Farbstoffe FAM (6-Carboxyfluorescein) und VIC können klar voneinander differenziert werden. Die höchste Emission erzielt FAM bei 518 nm, VIC dagegen bei 555 nm Wellenlänge. Der Universal PCR Master Mix enthält zusätzlich mit ROX (6-Carboxy-X-Rhodamine) ein passives Referenzfluorochrom, welches dazu beiträgt Volumenunregelmäßigkeiten beim Pipettieren auszugleichen.

Die Software des ABI Prism 7700 Sequence Detection System (AppliedBiosystems, Forster City California, USA) arbeitet bei der Multiplex-PCR mit einem speziellen Prozess, der „Multicomponenting“ genannt wird. „Multicomponenting“ ist ein mathematischer Algorithmus, der anhand der reinen Farb-Referenzspektren den Anteil jeder einzelnen Fluoreszenz an dem komplexen experimentellen Spektrum errechnet, welches von dem Quencher TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin) ($\lambda_{\max} = 582$ nm), dem passiven Referenzfarbstoff ROX ($\lambda_{\max} = 610$ nm) sowie den Reporter-Molekülen FAM und VIC gebildet wird.

3.6.1 Durchführung der RT-PCR

Die Durchführung der PCR erfolgte in Triplikaten, wobei ein jeder Primer/Sonden-Mix durch eine Negativkontrolle, die statt Probenmaterial nur Wasser enthielt, auf Kontamination überprüft wurde. Als positive Kontrolle wurde eine aus der Tumorzelllinie U266 gewonnene cDNA verwendet.

GAPDH, welches als Haushaltsgen eine hohe Expression in allen Zellen aufweist, wurde als endogenes Referenzgen verwendet. Die Quantifizierung einer gesuchten m-RNA kann durch das Referenzgen normalisiert werden, da durch sie ein Bezug zu der Gesamt-RNA der Zelle gesetzt wird. Die Analyse erfolgt simultan in Form einer Multiplex-PCR.

Auf diese Weise wurde in der cDNA jeder einzelnen wie oben beschrieben aufgearbeiteten Positiv-Plasmazellfraktion VEGF 121, BAX und BCL-2 simultan mit GAPDH in einem well bestimmt. Analog dazu erfolgte die IL-6 Messung in der negativ-selektionierten also der Nicht-Plasmazellfraktion.

Für die PCR-Analyse wurden als Trägermaterial MircroAmp R Optical 96-well Plates (Applied Biosystems, Forster City California, USA) verwendet.

3.6.1.1 IL-6 und BAX

Für die Quantifizierung der genetischen Expression von IL-6 und BAX wurde mit Pre-Developed-Kits und einem dazu kompatiblen Pre-Developed-Kit für GAPDH (beides: Applied Biosystems, Forster City California, USA) gearbeitet. Dabei enthalten die Pre-Developed-Kits der Zielgene IL-6 / BAX den Fluoreszenzfarbstoff FAM als Reporter, wogegen GAPDH VIC als Reporterfarbstoff beinhaltet. Allen Pre-Developed-Kits ist es gemeinsam, dass MGB als Quencher der Sonde verwendet wird.

Der in der PCR-Reaktion verwendete Amplifikations-Mix betrug 25 µl pro well und enthielt 12,5 µl des TaqMan TM Universal PCR Master Mix, 1,25 µl der jeweiligen Pre-Developed Mix für das Zielgen, 1,25 µl des Pre-Developed Mix für GAPDH, 5,0 µl aufgereinigtes Wasser und 5,0 µl der zu analysierenden cDNA-Probe.

Der Universal PCR Master Mix enthält zusätzlich mit ROX (6-Carboxy-X-Rhodamine) ein passives Referenzfluorochrom, welches dazu beiträgt Volumenunregelmäßigkeiten beim Pipettieren auszugleichen.

3.6.1.2 VEGF 121 und BCL-2

Die Primer und Sonden für die Messung von VEGF 121 und BCL-2 wurden mit der Primer Express Software (PE Biosystems) entwickelt. Die Sonden umfassen ein Intron, um eine potentielle Vervielfachung geringer genomischer DNA zu vermeiden, wie es bei einer Kontamination der cDNA möglich wäre. Dabei wurde von den folgenden Sequenzen ausgegangen:

VEGF 121

Sense: 5'-AGC TTC CTA CAG CAC AAC AAA TGT

Antisense: 5'-CGC CTC GGC TTG TCA CA

Sonde: 5'FAM- TGC AGA CCA AAG AAA GAT AGA GCA AGA CAA GAA A- 3'TAMRA

(VEGF-A isoforms. Van Trappen et al.)

BCL-2

Sense: 5'-CCT GTG GAT GAC TGA GTA CCT GA

Antisense: 5'-AGT TCC ACA AAG GCA TCC CA

Sonde: 5'FAM-CGG GAC CTG CAC ACC TGG ATC C-3'TAMRA

Zur Verwendung im PCR-Amplifikations-Mix wurden die Primer (Forward/Reverse) in, in Testläufen optimierten, Konzentrationen, 300 nM für VEGF 121 und 900 nM für BCL-2, vorverdünnt. Ebenso wurden die Sonden in jeweils 100 nM- Lösungen vorbereitet.

Die Zusammensetzung des Reaktionsmixes bestand aus 12,5 µl des TaqMan™ Universal PCR Master Mix, 2,5 µl der jeweiligen Vorwärts- und Rückwärtsprimer des Zielgens, 1,25 µl der Sondenverdünnung für das Zielgen, 1,25 µl des Pre-Developed Mix für GAPDH, 2,5 µl aufgereinigtes Wasser und 5,0 µl der zu analysierenden cDNA-Probe.

3.6.2 Ablauf der PCR-Reaktion

Nachdem die PCR-Reaktion auf den Mikrotiterplatten vorbereitet wurde, wird sie im TaqMan vollautomatisch durchgeführt. Die im ABI Prism™ 7700 Sequence-Detektor System ablaufenden thermischen Zyklen sind flexibel einstellbar und wurden für die Bestimmung der oben genannten Zytokine wie folgt festgelegt: zwei Minuten bei 50 °C, zehn Minuten bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen bei 95 °C, jeweils fünfzehn Sekunden lang, und eine Minute bei 65 °C.

Die anfallenden Daten wurden mittels der im System enthaltenen Software erfasst und ausgedruckt. Nach Eingabe der Rohdaten in Excel, erfolgte die quantitative Berechnung mit Hilfe der Delta-Ct Methode.

Die Expression des zu untersuchenden Gens wird dabei mittels eines zweiten, ubiquitär und homogen exprimierten Gens normalisiert. Diese relative Expression des zu untersuchenden Gens in den behandelten experimentellen Proben wird dann noch auf ein Kontrollprobenmaterial bezogen. Bei der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$). Nach dieser Normierung wird vom ΔCt -Wert der experimentell behandelten Proben der ΔCt -Wert einer Kontrolle abgezogen; man kommt so zum sog. „delta-delta CT“ Berechnungsmodell. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen (GAPDH)}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct Behandlung} - \Delta\text{Ct Kontrolle (U266)}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

3.7 ELISA

Zur Bestimmung der IL-6-Spiegel im peripheren Blut wurde ein Quantikine® HS Human IL-6 Immunoassay (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) durchgeführt.

Dieses Analyseverfahren bedient sich der quantitativen Sandwich Enzyme Immunoassay – Technik. Dabei wird eine Mikroplatte mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen z.B. IL-6 beschichtet. Standardlösungen und Proben werden in die Wells pipettiert und jegliches in der Probe vorhandenes IL-6-Molekül bindet an die fixierten Antikörper. Ungebundene Antikörper-Enzyme-Reagenzien werden durch einen Waschschrift entfernt, und ein enzymgebundener (enzyme-linked) polyklonaler Antikörper, der ebenfalls spezifisch an IL-6 bindet, wird hinzugegeben. Wieder erfolgt ein Waschschrift und eine Substratlösung wird jedem Well zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit wird eine „Verstärkerlösung“ (amplifier solution) hinzugegeben. Die im Well enthaltene Reaktionsflüssigkeit färbt sich

proportional zu der anfangs im ersten Schritt gebundenen IL-6 Menge an. Die Farbreaktion wird gestoppt und die Intensität der Färbung gemessen.

Das Quantikine HS Immunoassay Kit nutzt einen Verstärkermechanismus, in welchem die Alkalische-Phosphatase-Reaktion einen Kofaktor bereitstellt, der zur Bildung eines farbigen Produktes führt. Dabei dephosphoryliert die alkalische Phosphatase die reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, NADPH, zu dem reduzierten Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, NADH. Dieses wirkt im Folgenden als spezifischer Kofaktor, der eine Redoxreaktion aktiviert, welche über die Enzyme Alkoholdehydrogenase und Diaphorase, die in der Verstärkerlösung enthalten sind, abläuft. In dieser Reaktion, die von der Diaphorase katalysiert wird, wird durch die NADH-vermittelte Reduktion eines Tetraazoliumsalses (INT-Violett oder Iodonitrotetrazolium-Violett) ein intensiv färbender Formazan-Farbstoff sowie auch NAD^+ gebildet. Aus NAD^+ wird wiederum mittels einer Alkoholdehydrogenase-vermittelten Reaktion durch Ethanol erneut NADH hergestellt, welches dann als Kofaktor wieder in den Redoxzyklus eintritt. Die Reduktionsrate des Tetraazoliumsalses und somit auch die Menge des gebildeten Farbstoffes verhalten sich direkt proportional zu der IL-6-Menge, die im ersten Schritt des ELISAs an die Mikrotiterplatte gebunden wurde.

Zur Vorbereitung der Reagenzien wurde der Waschpuffer 1:9 verdünnt (100 ml Waschpuffer konzentrat in 1000 ml deionisiertem/destilliertem Wasser), die lyophilisierte Substrat- und Verstärkungslösung wurden gelöst und die IL-6-Standard wurde vorbereitet. Dazu wurde der IL-6 Standard mit 5,0 ml des passenden Calibrator Diluent RD6-11 vermischt, so dass die Stocklösung (Stammlösung) eine Konzentration von 10 pg/mL enthielt. In der Standardverdünnungsreihe wurden dann Lösungen gewonnen, deren Konzentrationen von 5 , 2,5 , 1,25 , 0,625 , 0,312 , 0,156 pg/mL abnahmen, indem man zu je 500 μl Kalibrationsflüssigkeit 500 μl der Stammlösung bzw. der nächsthöheren Verdünnung hinzugab.

Zu Beginn werden 100 μl eines Assay Diluent RD1-75 in jedes Well der Mikrotiterplatte gegeben, welche dann mit jeweils 100 μl der Standardreihe oder der Patientenprobe aufgefüllt wurden. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde die Flüssigkeit von der Platte entfernt und jedes Well wurde in sechs Waschschrinen mit 400 μl Waschpuffer von den Überständen gereinigt.

Danach erfolgte die Zugabe von 200 μ l der IL-6 Konjugatlösung, die die enzymgebundenen Antikörper enthält, und die Inkubation der Lösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Die Überstände wurden entfernt und die Mikrotiterplatte wurde erneut über sechs Waschschriffe gesäubert. Im folgenden Schritt wurden 50 μ l der Substratlösung in jedes Well gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hinzugabe von 50 μ l der Verstärkerlösung und einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Reaktion mit 50 μ l der Stopperlösung angehalten.

Die Bestimmung der optischen Dichte und somit die Berechnung der enthaltenen IL-6 Konzentration eines jeden Wells wurde mit Hilfe eines spektrophotometrischen, auf 490 nm eingestellten Mikroplatten-Meßgeräts durchgeführt.

3.8 STATISTISCHE ANALYSE DER DATEN

Die Daten wurden mit Hilfe des Standard Statistikprogramms SPSS 11 zusammengefaßt und deskriptiv ausgewertet. Nicht-parametrische Testverfahren wie der Wilcoxon-Signed Rank-Test und Mann-Whitney-U-Test wurden zur Analyse der im Verlauf der Untersuchung erhobenen Parameter der biologischen Aktivität des Studienmedikaments SU6668 (IL-6, VEGF-Isoformen, apoptotische Marker) durchgeführt. Außerdem wurde eine Korrelationsanalyse (Spearman-Rho) durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1 DESKRIPTIVE ANALYSE

Von 20 Patienten, die in Deutschland in die Studie eingeschlossen wurden, waren insgesamt 18 Fälle auswertbar. Da das Probenmaterial an einigen Messzeitpunkten nicht auswertbar war bzw. Patienten vorzeitig aus der Studie ausschieden, wurde die Analyse, um Vergleichbarkeit zu gewährleisten, zum Teil nur mit den Fällen durchgeführt, deren Verlaufparameter zu jedem Zeitpunkt bestimmbar waren.

4.1.1 Patientendaten

Das Multiple Myelom ist eine typische Erkrankung des höheren Alters. Dies wurde auch an der Altersverteilung der Studienpopulation deutlich, deren Werte zwischen einem Minimum von 43 Jahren und einem Maximum von 81 Jahren lagen. Im Mittel betrug das Alter 61 Jahre mit einer Standardabweichung von 8,7 Jahren.

Insgesamt wurden in Deutschland 12 Frauen und 8 Männer in die Studie eingeschlossen. Im Verlauf der Studie schieden zwei Patienten vorzeitig aus – ein Patient erlitt eine akute Verschlechterung des Krankheitsbildes und ein weiterer zog seine Einwilligung zurück. Acht der 18 verbleibenden Patienten erreichten eine Stabilisierung der Erkrankung (Stable Disease). Dazu gehörten die Patienten mit den Initialen: A-F, F-N, G-S, H-S, H-W, K-B, M-S und P-J. Zwei dieser acht Patienten beendeten aufgrund eines unerwünschten Ereignisses die Studie vorzeitig, zwei zeigten einen Progress und ein Patient beendete aufgrund einer geplanten Operation kurz vor Abschluss die Studie vorzeitig. Drei Studienteilnehmer schlossen die Studie in diesem stabilen Zustand ab. Die Dauer der erreichten stabilen Phase lag bei einem Patienten um zwei Wochen und bei den anderen sieben rangierte sie zwischen 12 und 19 Wochen. Der Mittelwert der sechs Patienten lag bei 12 Wochen. Ein progressiver Krankheitsverlauf wurde bei insgesamt zwölf Patienten beobachtet (Initialen dieser Patienten: A-H, A-P, B-L, F-N, H-J-P, H-K, I-G, I-K, M-S, U-S, U-W, W-M).

In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Daten wie Geschlecht, Alter, Ansprechen und Erreichen einer Plateauphase der Patienten zusammengefasst. Im Verlauf der Studie durchliefen zwei Patienten eine Plateau-Phase, in der die Serum

und/oder Plasmaproteinwerte unabhängig von ihrer Konzentration mindestens drei Monate stabil blieben.

Die in der folgenden Tabelle dargestellten klinischen Daten wurden freundlicherweise von Pfizer Pharma GmbH zur Auswertung zur Verfügung gestellt.

Patienten-Initialen	Geschlecht	Alter	Plateau	Bestes Ansprechen (Abschluss)
„Drop-Outs“ (N=2)				
I-S-B	weiblich	81	Nein	Rücknahme der Einwilligung
R-M	weiblich	61	Nein	Unerwünschtes Ereignis
Progress (N=10)				
A-H	weiblich	70	Nein	Progress
A-P	weiblich	69	Nein	
B-L	männlich	54	Nein	
H-J-P	männlich	70	Nein	
H-K	weiblich	59	Nein	
I-G	weiblich	66	Nein	
I-K	weiblich	43	Nein	
U-S	männlich	60	Nein	
U-W	weiblich	67	Nein	
W-M	weiblich	57	Nein	
Stabile Erkrankung (N=6)				
A-F	weiblich	54	Ja	Dauer: 18 Wochen (Operation)
G-S	männlich	58	Ja	Dauer: 12 Wochen
H-S	männlich	57	Nein	Dauer: 15 Wochen
H-W	männlich	70	Nein	Dauer: 2 Wochen (Adverse Event)
K-B	weiblich	63	Nein	Dauer: 13 Wochen
P-J	männlich	47	Nein	Dauer: 12 Wochen (Adverse Event)
Stabile Erkrankung (im Verlauf: Progress) (N=2)				
M-S	weiblich	66	Nein	Dauer: 19 Wochen (Progress)
F-N	männlich	59	Nein	Dauer: 14 Wochen (Progress)

Tabelle 3: Zusammenfassung der Patientendaten

4.1.2 VEGF 121 und VEGF 165

Die Expression der Gene VEGF 121 und VEGF 165 wurde mittels einer Real-Time PCR in den CD 138 positiven Zellen aus Knochenmarksaspiraten zu drei verschiedenen Zeitpunkten der Studie bestimmt. Entnahme und Messung der Proben erfolgte vor Gabe der Studienmedikation sowie vier (Zyklus 1) und zwölf Wochen (Zyklus 3) nach der ersten Einnahme.

Dabei betrug die Expression im Median 0,013 (VEGF 121) und 0,655 (VEGF 165). Das mittlere 50% Intervall lag zwischen 0,003 und 0,065 (VEGF 121) bzw. zwischen 0,097 und 1,636 (VEGF 165). Die Werte stellen dabei die relative Expression dieser Gene bezogen auf ein Haushaltsgen (GAPDH) dar.

Eine im Vergleich zu allen anderen Studienpatienten hohe VEGF 121 Expression wurde bei zwei Patienten gemessen. Der Patient G-S zeigte im gesamten Verlauf der Studie erhöhte Werte (Prestudy = 879,17, Zyklus 1 = 382,68, Zyklus 3 = 76,11), wie auch der Patient ISB, von dem aber nur ein Wert vorlag (Prestudy = 16,34). Die mRNA Expression aller anderen Patienten lag zwischen 0,00004 (W-M, Prestudy) und 0,1560 (P-J, Zyklus 3), so dass Insgesamt eher niedrige Expressionraten ermittelt wurden.

Die Spannweite der relativen Genexpression von VEGF 165 variierte zwischen 0,0003 und 23,75, war also nicht so ausgeprägt wie bei VEGF 121. Auch die intraindividuelle Schwankungsbreite im Verlauf stellte sich geringer dar. Patienten mit eher hohen mRNA Werten blieben im Verlauf innerhalb einer Zehnerpotenz konstant.

4.1.3 Interleukin-6 PCR- und Elisa Daten

Die Expression des IL-6 Gens wurde mittels einer quantitativen Real-Time PCR in den CD 138 negativen Zellen aus Knochenmarksaspiraten bestimmt. Knochenmarksentnahmen erfolgten vor der ersten Einnahme der Studiensubstanz (C0; Prestudy), nach vier Wochen (C1; Zyklus 1) und nach zwölf Wochen (C3; Zyklus 3).

Die Analyse der IL-6 Spiegel im Blut erfolgte durch einen Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) der Serumproben, die vor (C0; Prestudy), sowie vier Stunden nach Gabe der ersten Dosis (4 h), nach zwei (Tag 15), vier (C1; Zyklus 1), acht (C2; Zyklus 2) und zwölf Wochen (C3; Zyklus 3) entnommen worden waren.

Die Expression von IL-6, die anhand der quantitativen RT-PCR bestimmt wurde, betrug im Median 2,03, wobei die mittleren 50% der Daten zwischen 0,55 und 22,63 lagen. Insgesamt zeigten die Daten große interindividuelle Unterschiede. Bei Patient G-S lagen die Werte zu allen Zeitpunkten weit unter Eins (Prestudy = 0,0157, Zyklus 1 = 0,0304, Zyklus 3 = 0,0786), wogegen sie bei anderen Patienten bis an die Tausendergrenze stiegen, wie bei dem Patient A-H (Prestudy = 23,69 und Zyklus 1 = 652,58) oder H-S, dessen Werte im Verlauf 1,95, 49,18 bis zu 2336,28 betrugten.

Auch intraindividuell bestand eine große Schwankungsbreite: z.T. fiel der Wert innerhalb eines Zyklus von 26 auf 0,31 (Patient W-M) oder er stieg extrem stark an wie bei dem oben beschriebenen Patienten H-S.

Dem entsprechend waren die erhobenen Daten zur relativen Genexpression von IL-6 nicht normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov $p = 0,00$, d.h. kleiner als $p = 0,05$).

Dagegen zeigten sich die Daten der Interleukin-6-Spiegel im Serum homogener als die der Genexpression im Knochenmark. Sie betragen im Median 1,55 pg/ml (Perzentile: 25%: 0,10 pg/ml, 75%: 5,20 pg/ml). Größere intraindividuelle Schwankungen gab es nur bei einem Fall P-J (Prestudy = 0 pg/ml, Zyklus 1 = 0,3 pg/ml, Zyklus 3 = 49,8 pg/ml). Dennoch waren auch diese Daten nicht normalverteilt, wie mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test in SPSS nachgewiesen wurde ($p = 0,00$).

4.1.4 BAX und BCL-2

Die Expression der Gene BAX und BCL-2 wurde aus mRNA aus den CD138 positiven Knochenmarkszellen in einer quantitativen Real-Time PCR vor der ersten Einnahme der Studienmedikation (Prestudy), nach vier Wochen (Zyklus 1) und nach zwölf Wochen (Zyklus 3) bestimmt. Der Quotient BAX/BCL-2 ist ein guter Marker für die Bereitschaft zum apoptotischen Zelltod der Zellen. Er wurde in Excel aus den in der PCR-Analyse gewonnenen Daten berechnet.

Insgesamt lagen 31 Einzelwerte der apoptotischen Parameter BAX und BCL-2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor.

Der Median der BAX-Werte lag bei 72,0 (mittleres 50% Intervall: 28,84 – 146,02). Die Spannweite der BAX-Daten begründete sich eher auf einer extremen Erhöhung der Genexpression innerhalb des Verlaufs bei drei Patienten (A-F, M-S, I-K), als dass große interindividuelle Unterschiede vorlag. Die Daten waren nicht normalverteilt.

Die BCL-2 Expression betrug im Median von 0,02, wobei das mittlere 50% Intervall zwischen 0,002 und 0,12 lag. Im Vergleich einzelner Patienten wurde deutlich, dass diese bis auf bei zwei Patienten, die eine sehr hohe Expression des BCL-2-Gens aufwiesen, alle weit unterhalb dem Wert von 1,0 lagen. Bei den Patienten I-S-B (Prestudy = 263,20, keine weiteren Messzeitpunkte auswertbar) und G-S (Prestudy = 290,02, Zyklus 1 = 249,00, Zyklus 3 = 415,87) zeigte sich eine extrem hohe Expressionsrate des Gens. Wie mittels des Kolmogorov-Smirnov-Test bestimmt wurde, waren die Daten nicht normalverteilt ($p = 0,00$).

4.2 VERGLEICH DER DATEN IM VERLAUF ZU DEN VERSCHIEDENEN MESSZEITPUNKTEN

Die Entwicklung der relativen Genexpression der Zytokine sowie auch der IL-6 Serumspiegel unter Therapie mit SU6668 wird im Folgenden beschrieben und in Box-Plot-Diagrammen dargestellt. Um Vergleichbarkeit zu gewährleisten, bezieht sich die Auswertung vor allem auf diejenigen Studienpatienten, deren Daten über den gesamten Verlauf der Studie auswertbar waren.

4.2.1 Relative Genexpression von VEGF 121 und VEGF 165 in den CD 138-positiven Zellen (Myelomzellen)

Für beide VEGF Splicevarianten zeigte sich innerhalb der ersten vier Wochen unter Studienmedikation ein Absinken der relativen VEGF Genexpression. Innerhalb der nächsten acht Wochen kam es wieder zu einem Anstieg der VEGF mRNA, so dass die gemessene Expression von VEGF zwölf Wochen nach erster Gabe von SU6668 höher lag, als zu Beginn der Studie.

In dem Diagramm ist der Verlauf der relativen Genexpression von VEGF 121 in den CD 138 positiven Myelomzellen des Knochenmarks dargestellt. Dabei wurden fünf Patienten ausgewählt, deren Verlauf über alle Messzeitpunkte zu beobachten war.

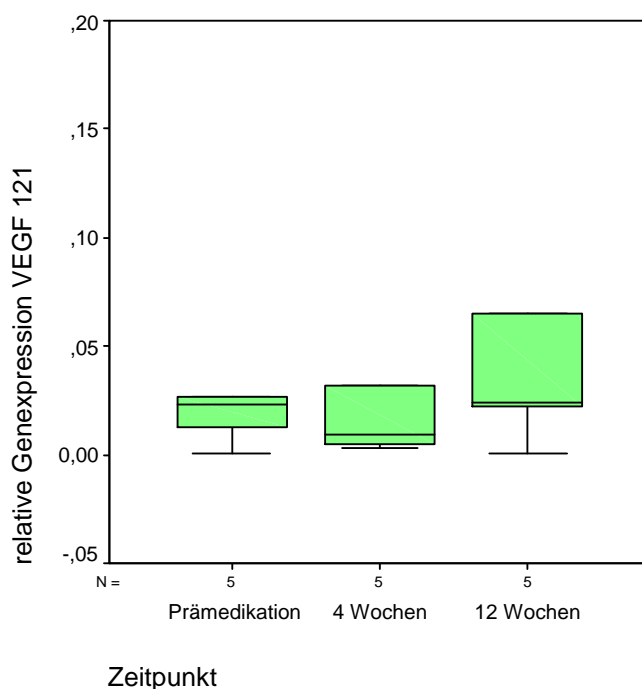


Abbildung 10: Mediane der relativen Genexpression von VEGF 121 der Patienten A-F, G-S, H-S, I-G, M-S im Verlauf der Studie zu den Messzeitpunkten: vor der ersten Gabe von SU6668 (c0), vier Wochen (c1) und zwölf Wochen (c3) nach der ersten Gabe von SU6668 (N = 5); Extremwerte sind ausgeblendet

Die Expression der VEGF 121 mRNA fiel innerhalb der ersten vier Wochen von 0,0233 (mittlere 50%: 0,00672 – 439,599) auf 0,0092 (mittlere 50%: 0,0039 – 191,3567) und erhöhte sich nach weiteren acht Wochen wieder auf 0,0241.

Die Unterschiede zu den Messzeitpunkten waren nicht statistisch signifikant (Wilcoxon Test : Prestudy – Zyklus 1 $p < 0,345$, Zyklus 1 – Zyklus 3 $p < 0,893$, Prestudy – Zyklus 3 $p < 0,893$).

Die Entwicklung der relativen Genexpression von VEGF 165 verlief bei den fünf gesondert betrachteten Patienten A-F, G-S, H-S, I-G, M-S parallel zu den VEGF 121-Daten. In dem folgenden Boxplotdiagramm ist der Verlauf der VEGF 165 mRNA Expression vor und unter Studienmedikation dargestellt.

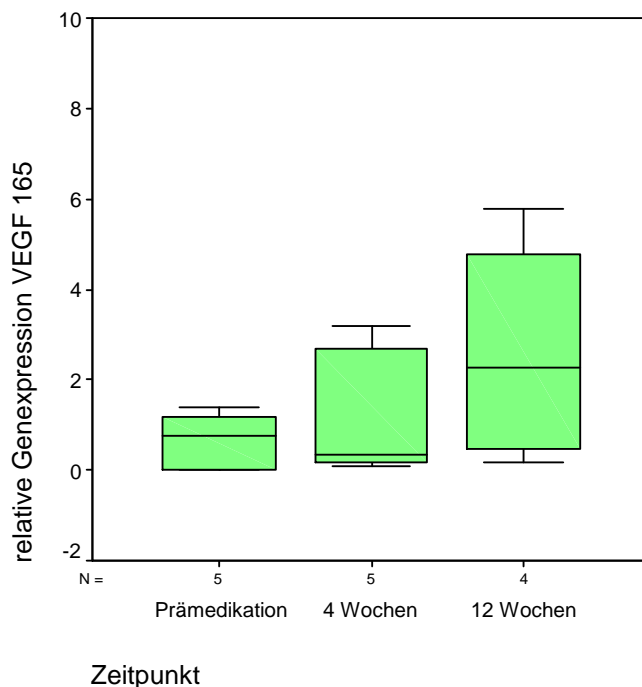


Abbildung 11: Mediane der relativen Genexpression von VEGF 165 der Patienten A-F, G-S, H-S, I-G, M-S im Verlauf der Studie zu den Messzeitpunkten: vor der ersten Gabe von SU6668 (c0), vier Wochen (c1) und zwölf Wochen (c3) nach der ersten Gabe von SU6668 (N = 5); Extremwerte sind ausgeblendet

Vor erster Einnahme des Medikaments lag der Wert der VEGF 165 mRNA bei im Median 0,7684 (Intervall der mittleren 50%: 0,008 – 1,2797) und halbierte sich in den ersten vier Wochen unter Therapie auf 0,3463 (Intervall der mittleren 50%: 0,14505 – 2,9494). In den folgenden acht Wochen zeigte sich dann eine ungefähr siebenfache

Steigerung der Expressionsrate auf 2,2662 (Intervall der mittleren 50%: 0,3255 – 5,2844).

Die in den Grafiken sichtbaren Unterschiede der Daten zu den einzelnen Messzeitpunkten, waren nicht statistisch signifikant (Wilcoxon-Test: Prämedikation – vier Wochen: $p < 0,225$, vier – zwölf Wochen: $p < 0,068$, Prämedikation – zwölf Wochen: $p < 0,144$).

Insgesamt fiel im Vergleich der mRNA Verlaufsdaten von VEGF 121 und VEGF 165 eine große Übereinstimmung bezüglich der relativen Höhe der individuellen Expression im Verlauf auf.

Patienten, deren Mediane im unteren Bereich der Expressionsbreite von VEGF 121 lagen, zeigten auch für das andere Gen eine niedrige Expressionsrate. Innerhalb des Patientenkollektivs waren bei A-H, H-J-P, M-S, U-S, W-M nur sehr niedrige Werte messbar. Eine hohe Übereinstimmung fand sich auch bei den Patienten mit den größten individuellen Medianen (VEGF 121: G-S, I-K, ISB, P-J und VEGF 165: G-S, H-S, I-K, ISB, K-B).

Die mRNA Expression von VEGF 121 und VEGF 165 im Verlauf der Studie ist im folgenden Balkendiagramm veranschaulicht.

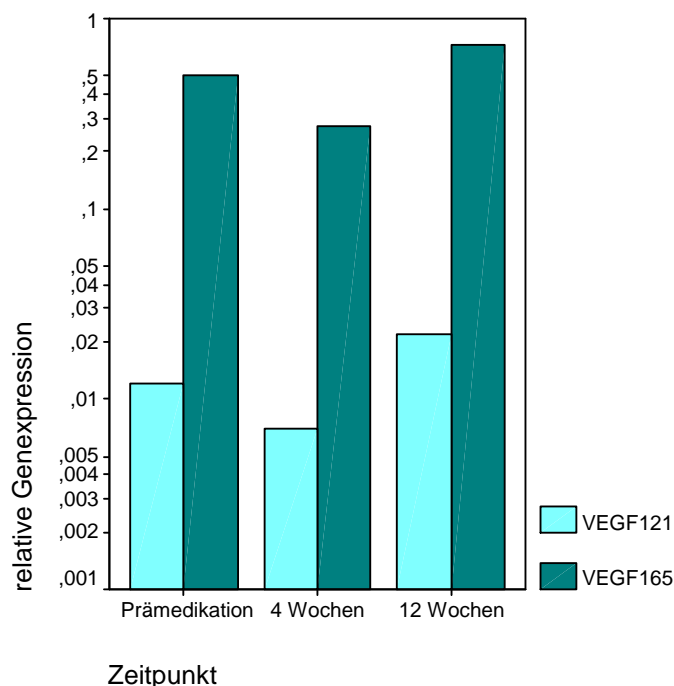


Abbildung 12: Verlauf der VEGF mRNA Daten (VEGF 121 und VEGF 165) im Vergleich (logarithmische Darstellung)

4.3.2 Interleukin-6 Genexpression in den CD 138 – negativen Zellen des Knochenmarks

Alle Daten der Interleukin-6 Genexpression, die zu einem Messzeitpunkt der Studie erhoben werden konnten, einbezogen, wurde insgesamt eine Steigerung der Expressionsrate im Verlauf der Studie deutlich. Dieses ist auch im folgenden Box-Plot-Diagramm dargestellt.

Im Verlauf der Studie kam es zu einem Anstieg der IL-6 Genexpression in den CD 138 negativen Zellen des Knochenmarks. Nach den ersten vier Wochen unter Therapie mit SU6668 zeigte sich eine mehrfache Erhöhung der IL-6 mRNA, die sich in den folgenden Wochen nivellierte und am Endpunkt der Studie ungefähr beim dreifachen Ausgangswert lag.

Bei fünf Patienten war die Bestimmung der IL-6 mRNA zu allen Zeitpunkten im Verlauf möglich (A-F, F-N, G-S, I-G, H-K, H-S, M-S). Die Werte dieser Patienten sind im folgenden Diagramm aufgetragen.

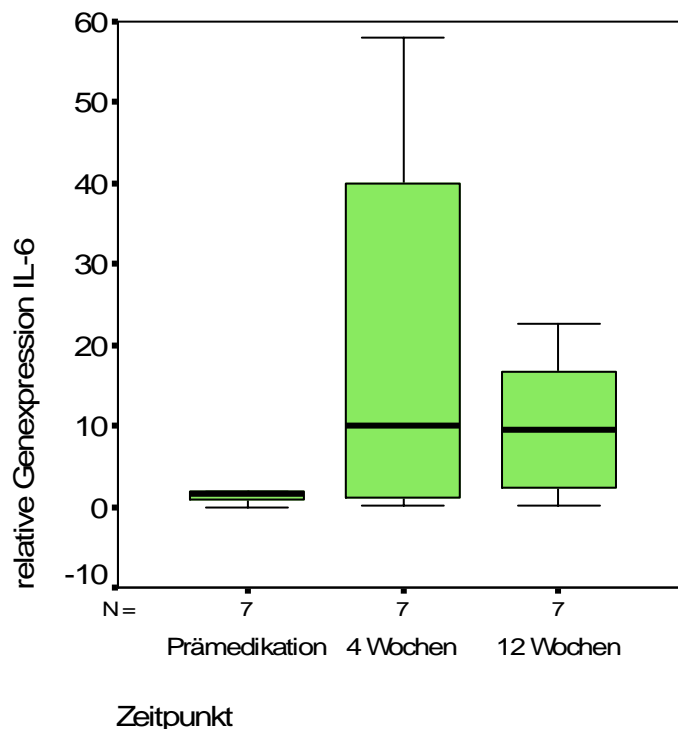


Abbildung 13: Mediane der Patienten A-F, G-S, H-K, H-S, I-G, M-S, P-J im Verlauf der Studie zu den Messzeitpunkten vor der ersten Gabe von SU6668 (c0), vier Wochen (c1) und zwölf Wochen (c3) nach der ersten Gabe von SU6668 (N = 7)

Vor erster Gabe der Studienmedikation lag der Median der relativen Genexpression von IL-6 bei 1,72 (mittlere 50%: 0,300 – 1,95). Vier Wochen nach Einnahme der

ersten Dosis war der Median auf den fünffachen Wert von 9,99 (mittlere 50%: 0,81 – 49,18) gestiegen und sank etwas auf 9,58 (mittlere 50%: 0,55 – 22,63) ab. Anhand eines Wilcoxon-Tests zum Vergleich der einzelnen Wertpaare, ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,018$) für die Zeitpunkte vor (Prämedikation) und zwölf Wochen nach erster Einnahme der Medikation (Zyklus 3). Es lag ein signifikanter Anstieg der Werte vor (Vorzeichen-Test: $p < 0,016$).

4.3.3 Interleukin-6 Serumspiegel (Elisa)

Im Verlauf der Studie kam es zu erheblichen Schwankungen des IL-6 Serumspiegels, der sich dann am letzten Messzeitpunkt wieder im Bereich des Ausgangswertes befand.

Bei zwölf Patienten war ein direkter Vergleich zwischen den Daten möglich. Der Verlauf der Interleukin-6 Serumspiegel ist in dem folgenden Diagramm in Form von Box-Plots dargestellt.

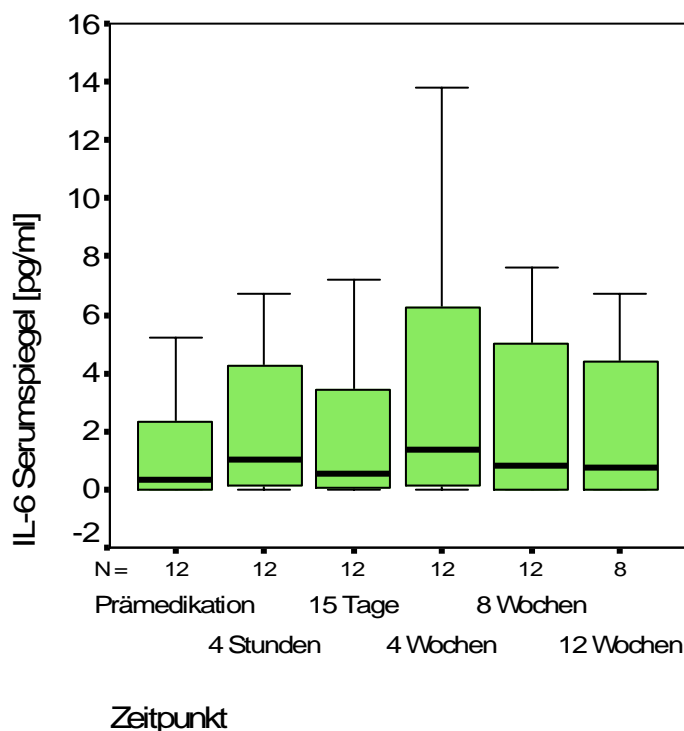


Abbildung 14: Mediane der Patienten A-F, A-P, B-L, F-N, G-S, H-J-P, H-S, I-G, K-B, M-S, P-J im Verlauf der Studie zu den Messzeitpunkten vor der ersten Gabe von SU6668 (Prämedikation), vier Stunden nach der ersten Gabe (4 Stunden), zwei Wochen (15 Tage), vier Wochen (4 Wochen, Zyklus 1), acht Wochen (8 Wochen, Zyklus 2) und zwölf Wochen (12 Wochen, Zyklus 3) nach der ersten Gabe von SU6668 (N = 12 (8))

Vergleicht man diese zwölf Patienten, so stiegen die Werte anfangs an, um dann wieder abzufallen. (Prämedikation: 0,35 pg/ml (50%-Intervall: 0,0 -2,85), 4 Stunden:

1,05 pg/ml (50%-Intervall: 0,125 -4,325), 15 Tage: 0,55 pg/ml (50%-Intervall: 0,025 - 3,97), Zyklus 1: 1,4 pg/ml (50%-Intervall: 0,075 -8,075), Zyklus 2: 0,8 pg/ml (50%-Intervall: 0,0 -6,3), Zyklus 3: 0,75 pg/ml (50%-Intervall: 0,0 -5,55)).

Bereits vier Stunden nach Applikation des Studienmedikaments SU6668 wurde ein starker Anstieg des Serumspiegels auf den dreifachen Wert nachgewiesen, der bis zum Messwert zwei Wochen nach Erstgabe wieder deutlich absank. Zwei weitere Wochen später (Zeitpunkt: 4 Wochen) hatte der Spiegel erneut zugenommen und fiel dann bis zum letzten Messzeitpunkt der Studie kontinuierlich ab. Insgesamt kam es zu einem leichten Anstieg der Serumkonzentration von Interleukin-6 auf ungefähr das Doppelte des Wertes vor Beginn der Therapie mit SU6668.

4.3.4 Relative Genexpression von BAX in den CD 138-positiven Zellen

Betrachtet man die BAX Genexpression zu den verschiedenen Messzeitpunkten, so wurde eine Zunahme der Werte im Verlauf deutlich, wie in dem folgenden Diagramm dargestellt wird.

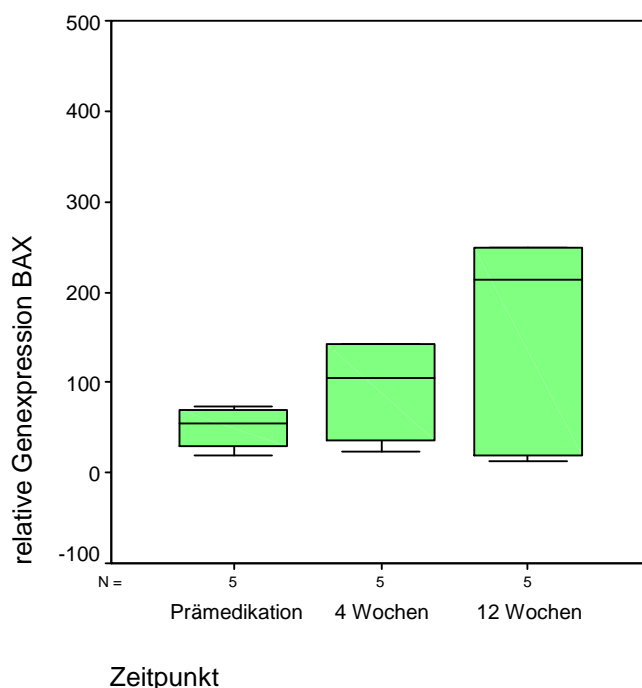


Abbildung 15: Mediane der Patienten A-F, G-S, H-S, I-G, M-S im Verlauf der Studie zu den Messzeitpunkten: vor der ersten Gabe von SU6668 (c0), vier Wochen (c1) und zwölf Wochen (c3) nach der ersten Gabe von SU6668 (N = 5)

Der Wert der relativen BAX Genexpression nahm dabei stetig bis auf das Vierfache des Ausgangswertes vor Beginn der Therapie mit SU6668 zu (Mediane: Prestudy =

55,72 (50%-Intervall: 24,81 – 71,79), Zyklus 1 = 104,69 (50%-Intervall: 29,59 – 597,9), Zyklus 3 = 213,78 (50%-Intervall: 15,735 – 3001,265).

Insgesamt ergab sich jedoch keine signifikante Veränderung der relativen BAX Genexpression im Verlauf (Wilcoxon-Test: Prestudy – Zyklus 1 ($p < 0,225$), Zyklus 1 – Zyklus 2 ($p < 0,5$) und Prestudy – Zyklus 3 ($p < 0,225$)).

4.3.5 Relative Genexpression von BCL-2 in den CD 138-positiven Zellen

Insgesamt wurde ein ähnlicher Verlauf der BCL-2 mRNA Daten, wie bei der relativen Genexpression von BAX beobachtet, deutlich. Diese stiegen in der Gesamtstudienpopulation, wie auch bei den fünf Patienten, die zu allen drei Messzeitpunkten auswertbare Daten aufweisen, während der zwölf Wochen stetig an.

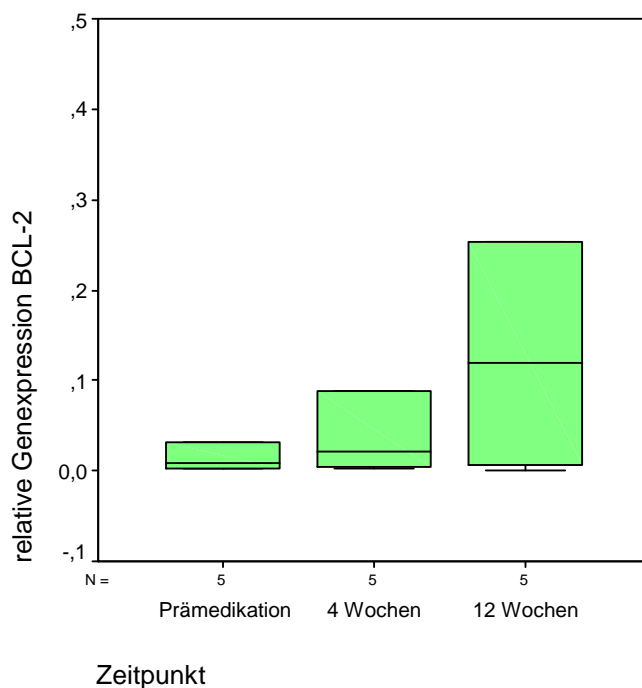


Abbildung 16: Mediane der Patienten A-F, G-S, H-S, I-G, M-S im Verlauf der Studie zu den Messzeitpunkten: vor der ersten Gabe von SU6668 (c0), vier Wochen (c1) und zwölf Wochen (c3) nach der ersten Gabe von SU6668 (N = 5)

Die Mediane der gemessenen BCL-2 mRNA der bereits oben beschriebenen fünf Patienten zeigten einen Anstieg der Genexpression. Dabei wurden für die fünf Patienten folgende Werte in der RT-PCR ermittelt: Prämedikation: 0,0078 (mittlere 50%: 0,002 – 145,025), Zyklus 1 (vier Wochen nach erster Gabe): 0,0208 (mittlere 50%: 0,0028 – 124,544), Zyklus3 (zwölf Wochen nach erster Gabe): 0,1199 (mittlere

50%: 0,0041 – 208,063). Somit lag der Wert der BCL-2 Genexpression am Endpunkt der Studie 11-fach höher als vor Therapie mit SU6668.

Im Wilcoxon-Test lag dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den Wertepaaren zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor (Prämedikation – Zyklus 1: $p < 0,893$, Zyklus 1 – Zyklus 3: $p < 0,138$, Prämedikation – Zyklus 3: $p < 0,08$).

4.3.6 Quotient BAX / BCL-2

Bei Analyse der Daten der fünf Patienten (A-F, G-S, H-S, I-G und M-S) zeigte sich wie bei der relativen Genexpression von BAX und BCL-2 auch für das Verhältnis von BAX/BCL-2 ein kontinuierlicher Anstieg der Werte im Verlauf (Mediane: 7142,97 (50%-Intervall: 1.104,37 – 21.535,69) – 13.779,65 (50%-Intervall: 592,535 – 44.124,90) – 16.358,00 (50%-Intervall: 492,85 – 38.434,20). Insgesamt kam es zu einer Verdopplung im Vergleich zum Ausgangswert.

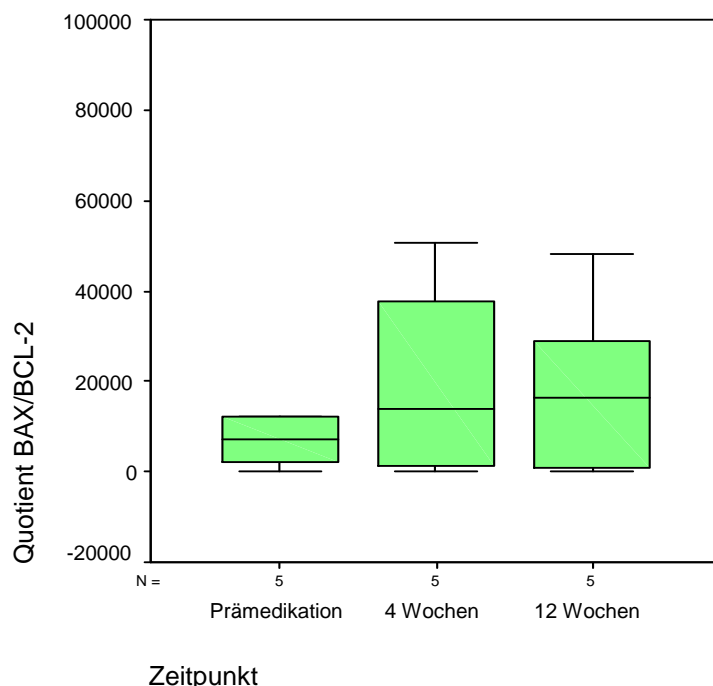


Abbildung 17: Mediane der Patienten A-F, G-S, H-S, I-G, M-S im Verlauf der Studie zu den Messzeitpunkten: vor der ersten Gabe von SU6668 (c0), vier Wochen (c1) und zwölf Wochen (c3) nach der ersten Gabe von SU6668 (N = 5)

Im Wilcoxon-Test ergab sich allerdings keine signifikante Veränderung der Daten im Verlauf (Wilcoxon-Test: Prestudy – Zyklus 1 ($p < 0,5$), Zyklus 1 – Zyklus 3 ($p < 0,893$) und Prestudy – Zyklus 3 ($p < 0,686$)).

4.4 ANSPRECHEN AUF DIE THERAPIE

Das Ansprechen der Patienten auf die Therapie mit SU6668 wurde nach jedem Zyklus beurteilt und dokumentiert. Dabei erreichten acht Patienten eine „Stabile Erkrankung“, von denen fünf die Studie auch in diesem Stadium abschlossen. Zwölf Patienten erlitten einen Progress.

4.4.1 Relative Genexpression von VEGF 121 und VEGF 165 der CD 138 positiven Zellen im Knochenmark

Wie in den folgenden Box-Plots dargestellt, sprachen gerade die Patienten mit einer initial höheren Expressionsrate an VEGF 121 und VEGF 165 auf die Therapie an. Dabei lag der Unterschied der relativen Genexpression von VEGF 121 bei einer dreifach erniedrigten Expression mit einem Median von 0,0037 in der Gruppe der Patienten mit progressiver Erkrankung im Vergleich zu einem Median von 0,0125 in der Gruppe der Patienten, deren Erkrankung sich im Verlauf stabilisiert hatte.

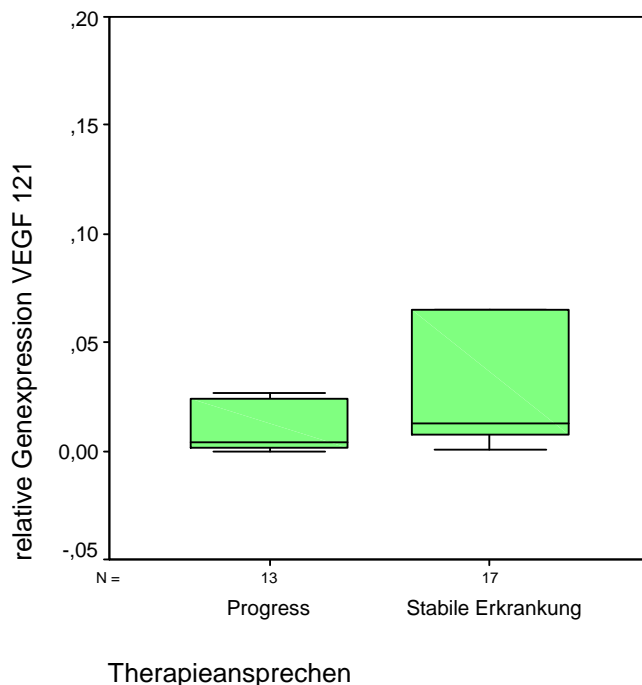


Abbildung 18: Mediane der VEGF 121 mRNA Expression aufgeteilt nach dem besten Therapieansprechen der Patienten (N = 30)

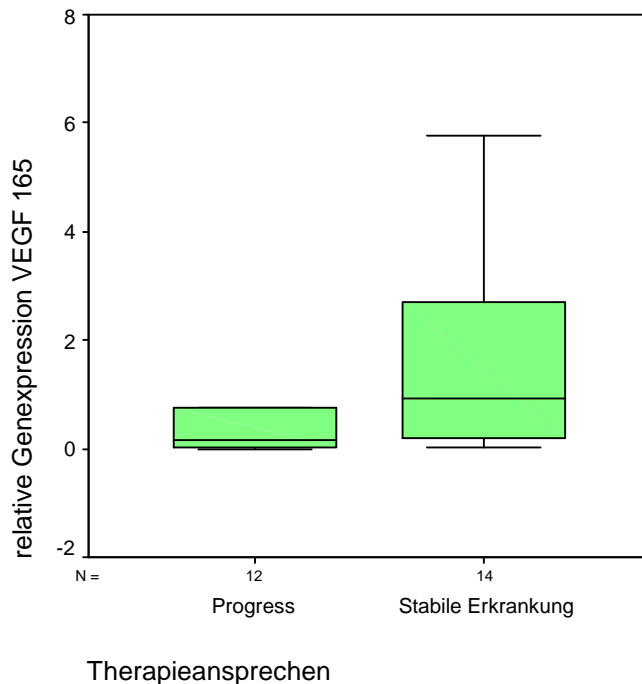


Abbildung 19: Mediane der VEGF 165 mRNA Expression aufgeteilt nach dem besten Therapieansprechen der Patienten (N = 26)

Die Werte der Expression von VEGF 165 mRNA lagen bei den Patienten mit einem Progress mit 0,1656 um ein Sechsfaches unter dem Median der Patienten, die eine Stabile Erkrankung zeigten (0,9434).

In der statistischen Testung konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Patientengruppen und der Expressionsstärke von VEGF festgestellt werden (Mann-Whitney-U-Test: VEGF 121 $p < 0,170$, VEGF 165 $p < 0,145$).

4.4.2 Relative Genexpression von IL-6 in den CD 138 negativen Zellen des Knochenmarks und IL-6 Serumspiegel

Bezüglich dem Ansprechen auf die Therapie wurde deutlich, dass bei Patienten, die mit einem Sistieren der Krankheit auf die Therapie mit SU6668 reagierten, deutlich weniger Interleukin-6 mRNA im Knochenmark nachweisbar war. Der Median der Gruppe der Patienten, die einen progressiven Krankheitsverlauf zeigten, lag mit 7,6 4-fach höher als in der Vergleichsgruppe aller Werte der Patienten, deren Erkrankung stabil blieb (Median: 1,83). Allerdings zeigte der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen keine statistische Signifikanz (Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,176$).

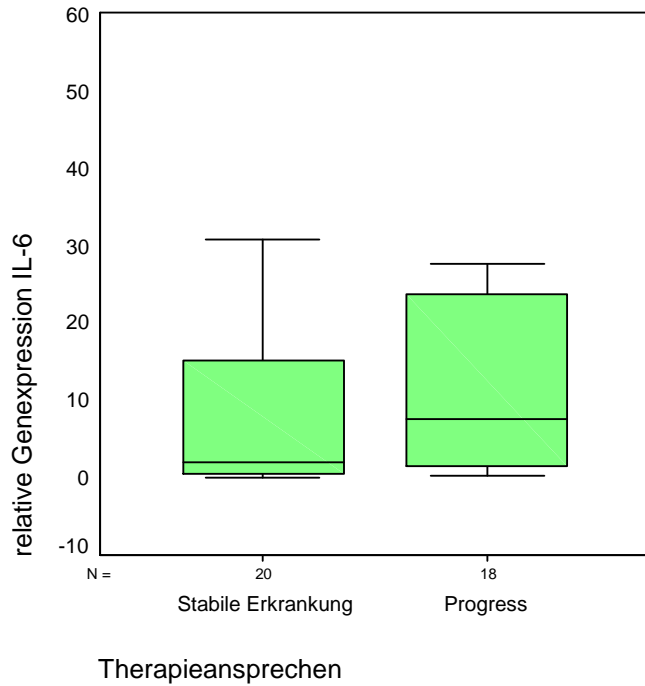


Abbildung 20: Mediane der IL-6 mRNA Expression aufgeteilt nach dem besten Therapieansprechen der Patienten (N = 38)

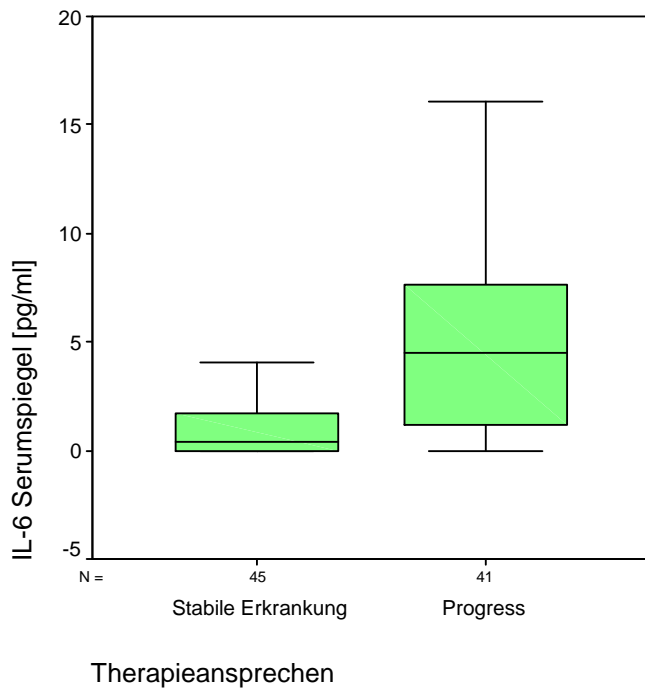


Abbildung 21: Höhe der Interleukin-6 Serumspiegel in Bezug auf das beste Therapieansprechen der Patienten (Mediane), Gesamtdaten (N=16)

Der Serumspiegel der Gruppe von Patienten, deren Erkrankung unter Therapie fortschritt, lag im Median 11 - fach höher als in der Vergleichsgruppe, deren bestes Ansprechen auf die Therapie mit SU6668 eine stabile Erkrankung war. Der Median lag in Gruppe der Patienten mit einem Progress bei 4,5 pg/ml im Vergleich zu 0,4 pg/ml in der Gruppe der Patienten mit einer Stablen Erkrankung. Dieser Unterschied zeigte sich im Mann-Whitney-U-Test als statistisch hoch signifikant ($p < 0,000$).

4.4.3 Relative Genexpression von BAX und BCL-2 der CD 138 positiven Zellen im Knochenmark, sowie Betrachtung des Quotienten BAX/BCL-2

Das Verhalten der relativen BAX- und BCL-2-Genexpression, sowie des Quotienten BAX/BCL-2 bezüglich des Therapieansprechens, ist in den folgenden Grafiken veranschaulicht.

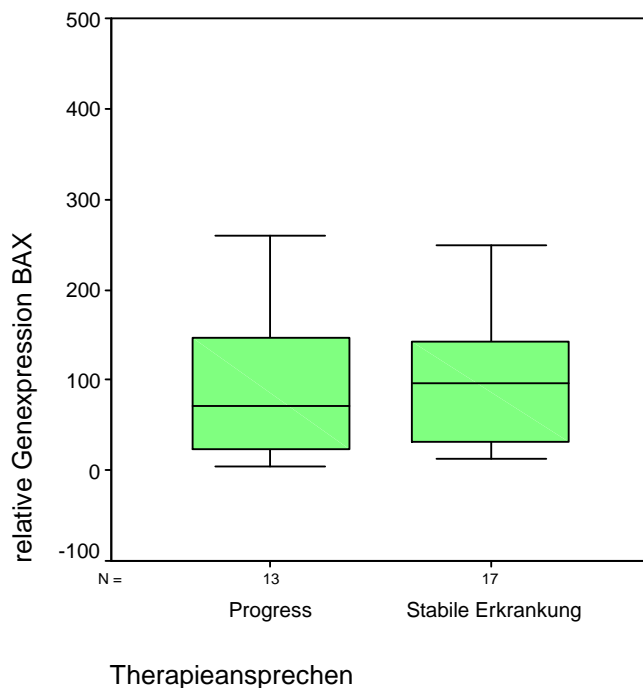


Abbildung 22: Mediane der BAX mRNA Expression aufgeteilt nach dem besten Therapieansprechen der Patienten (N = 30)

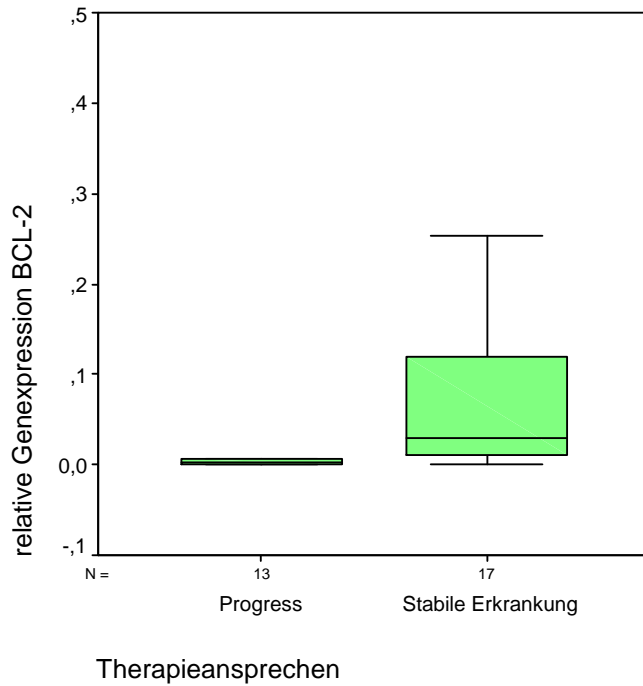


Abbildung 23: Mediane der BCL-2 mRNA Expression aufgeteilt nach dem besten Therapieansprechen der Patienten (N = 30)

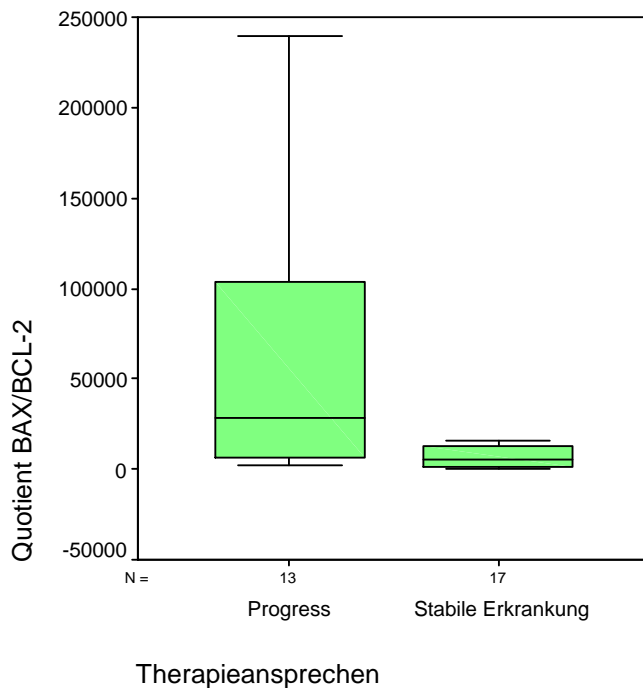


Abbildung 24: Mediane des Verhältnisses der BAX/BCL-2 mRNA Expression aufgeteilt nach dem besten Therapieansprechen der Patienten (N = 30)

Betrachtete man die BAX- und BCL-2-Genexpression der CD 138 positiven Zellen des Knochenmarks in den zwei verschiedenen Gruppen, so war festzuhalten, dass die relative Genexpression von BAX sowie auch von BCL-2 in der Gruppe von Patienten mit einer stabilen Erkrankung gegenüber der anderen Gruppe (Progress) erhöht war. Dabei betrug die gemessene BAX mRNA in der Gruppe, deren Erkrankungsparameter stabil blieben im Median 97,0 und in der Gruppe, deren Krankheit fortschritt 72,0. Für BCL-2 lagen die Mediane der beiden Gruppen bei 0,0298 (Stabile Erkrankung) und 0,0017 (Progress).

Während der Unterschied in der Expression von BAX-mRNA nicht signifikant war (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,536$), konnte für die BCL-2 Genexpression in diesem Zusammenhang ein statistisch signifikanter Unterschied in den beiden Gruppen festgestellt werden (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,005$).

Auch für den errechneten Quotienten BAX/BCL-2, der in der Gruppe mit stabiler Erkrankung niedriger lag (Median: 5.288,14), als bei den Patienten, die im Verlauf einen Progress erlitten (Median: 28.889,53) lag ein statistisch signifikanter Unterschied vor ($p < 0,01$, Mann-Whitney-U-Test).

4.5 ERREICHEN EINER PLATEAUPHASE

Als zusätzlicher Parameter zur Beurteilung des Ansprechens auf die Therapie mit SU6668 wurde in der Studie das Erreichen einer Plateauphase gewählt. Eine Plateauphase war definiert als Zeitraum von mindestens drei Monaten, über den die Serum- oder Plasmaproteinwerte des Patienten unabhängig vom Ausgangswert stabil blieben.

Insgesamt erreichten zwei Patienten aus der Studienpopulation eine Plateauphase (A-F und G-S).

4.5.1 Relative Genexpression von VEGF 121 und VEGF 165 in den CD 138 positiven Zellen des Knochenmarks

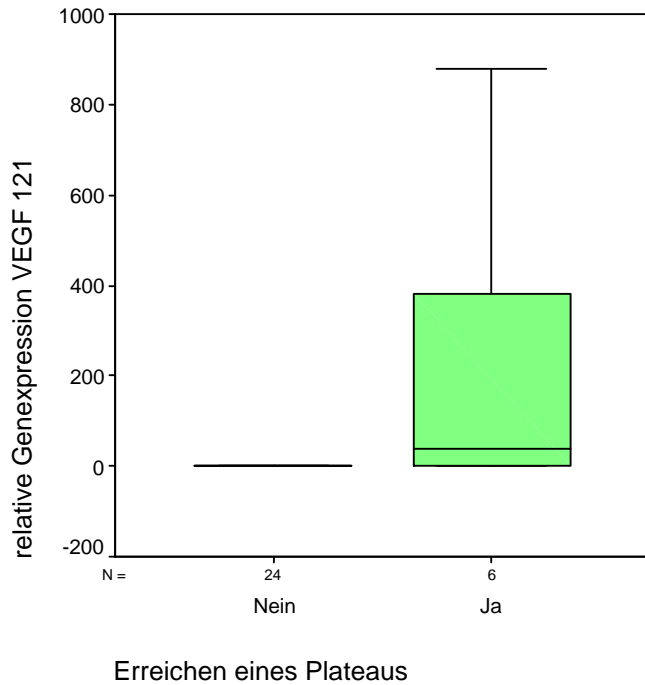


Abbildung 25: Mediane der relativen Genexpression von VEGF 121, aufgeteilt nach dem Erreichen einer Plateauphase, Gesamtdaten (N = 30)

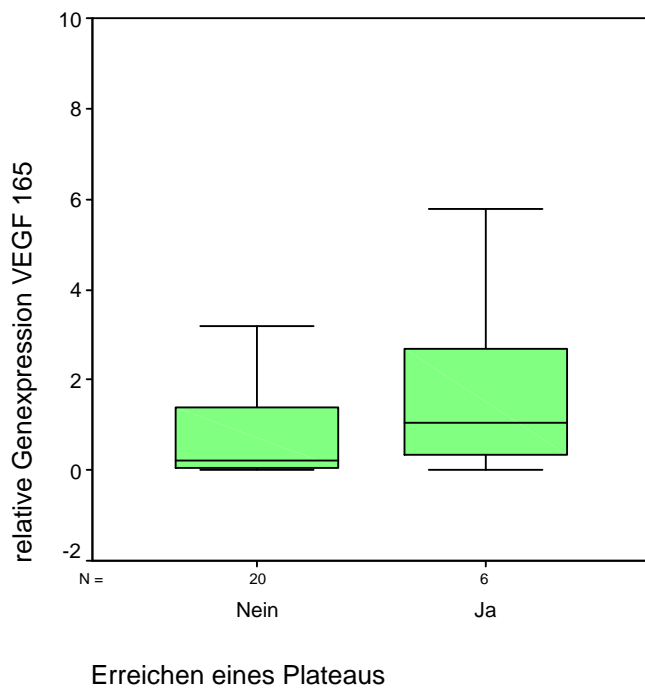


Abbildung 26: Mediane der relativen Genexpression von VEGF 165, aufgeteilt nach dem Erreichen einer Plateauphase, Gesamtdaten (N = 26)

Verglich man die VEGF 121 und VEGF 165 mRNA Expression der Patienten, die ein Plateau erreichen konnten, mit dem restlichen Patientenkollektiv, so wurde für beide Splicevarianten deutlich, dass die Genexpression dieser Faktoren wesentlich höher lag als bei den Patienten, die keine stabile Phase über drei Monate erreichen konnten.

Die relative VEGF 121 Genexpression lag dabei bei den Patienten G-S und H-S sogar 3600-fach höher als in der Vergleichsgruppe (Mediane: Plateau = 38,087 und kein Plateau = 0,0104). Dieser Unterschied erwies sich auch im Mann-Whitney-U-Test als signifikant ($p < 0,011$).

Der Unterschied der Genexpression von VEGF 165 mRNA war in den beiden Gruppen nicht ganz so stark ausgeprägt und es lag keine statistische Signifikanz vor (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,387$). Trotzdem belief sich der Median der relativen VEGF 165 Genexpression mit 1,0584 auf das Fünffache des Wertes der Gruppe von Patienten, die kein Plateau erreichen konnten (Median: 0,2134).

4.5.2 Relative IL-6 Genexpression in den CD 138 negativen Zellen des Knochenmarks und IL-6 Serumspiegel

Im folgenden Box-Plot-Diagramm sind die Werte der IL-6 mRNA im Knochenmark der Patienten A-F und G-S, die ein Plateau erreichen konnten, im Vergleich zu den anderen Patienten aus der Studie aufgetragen.

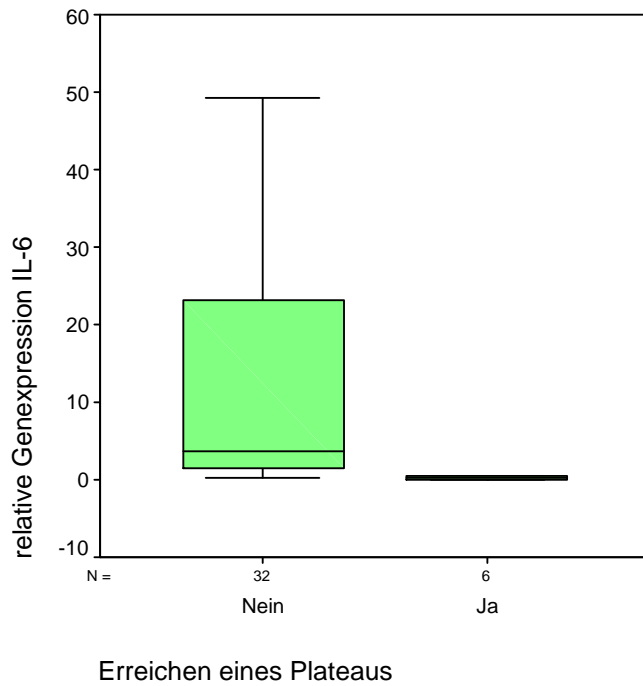


Abbildung 27: Mediane der IL-6 Genexpression aufgeteilt nach dem Erreichen einer Plateauphase, Gesamtdaten (N = 38)

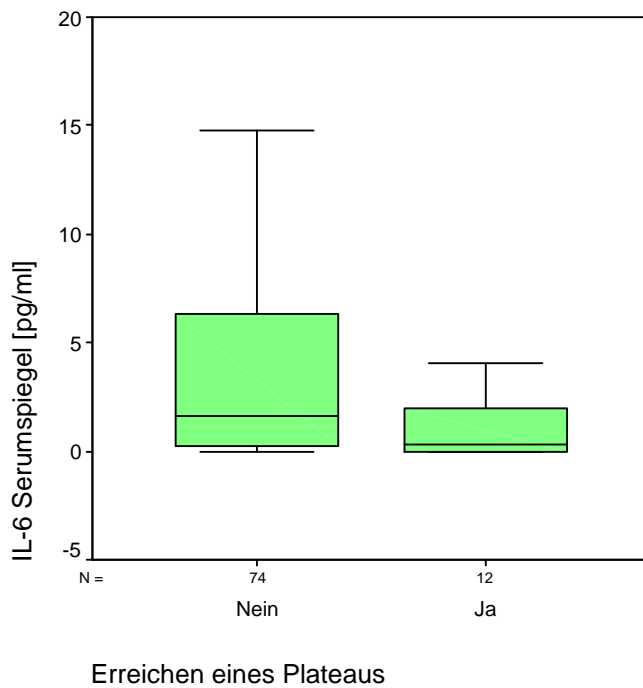


Abbildung 28: Mediane der IL-6 Serumspiegel, aufgeteilt nach dem Erreichen einer Plateauphase, Gesamtdaten (N = 86)

Vergleich man die Daten der Patienten, die im Verlauf der Studie ein Plateau erreichen konnten mit denen, deren Werte nicht über drei Monate konstant blieben,

so ergab sich ein deutlicher Unterschied in der Genexpression von IL-6 der CD 138 – negativen Zellen. Die Expression von IL-6 mRNA lag in der Gruppe von Patienten, die kein Plateau erreicht haben, mit einem Median von 3,75 signifikant höher als in der Vergleichsgruppe, deren Median 0,19 betrug (Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,010$).

Auch in den Serumwerten des Interleukin-6 zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Patienten A-F und G-S und der restlichen Studienpopulation.

Die Konzentration von Interleukin-6 im Serum war bei den Patienten, die eine Plateauphase erreichen konnten, wesentlich niedriger als in der Vergleichsgruppe. Dabei lag der Median bei den Patienten ohne Plateauphase mit 1,65 pg/ml fast fünfmal so hoch wie bei A-F und G-S, deren gemeinsamer Median sich auf 0,35 pg/ml belief. Dieser Unterschied war in der statistischen Testung signifikant (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,050$).

4.5.3 Relative Genexpression von BAX und BCL-2 in den CD 138 positiven Zellen des Knochenmarks sowie Quotient BAX/BCL-2

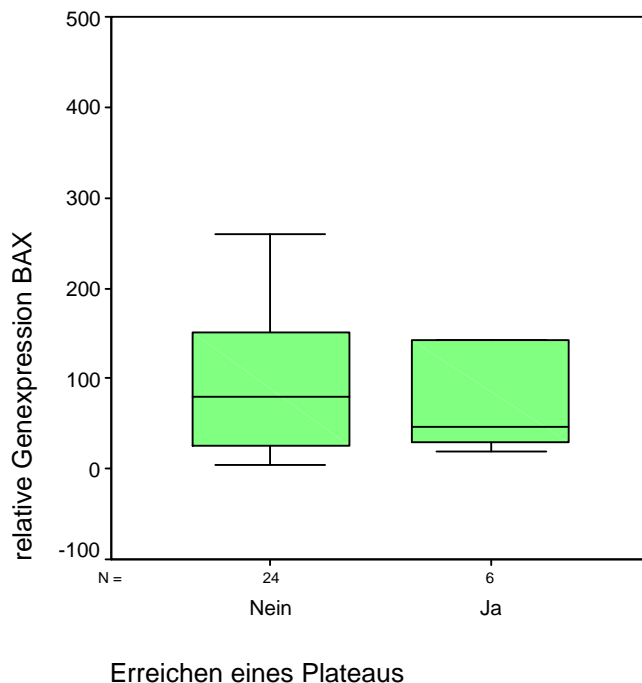


Abbildung 29: Mediane der relativen Genexpression von BAX, aufgeteilt nach dem Erreichen einer Plateauphase, Gesamtdaten (N = 30)

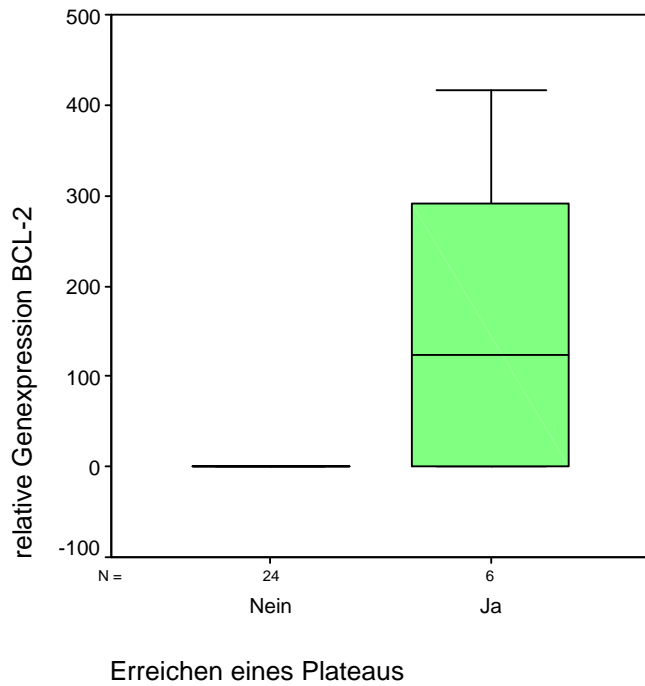


Abbildung 30: Mediane der relativen Genexpression von BCL-2, aufgeteilt nach dem Erreichen einer Plateauphase, Gesamtdaten (N = 30)

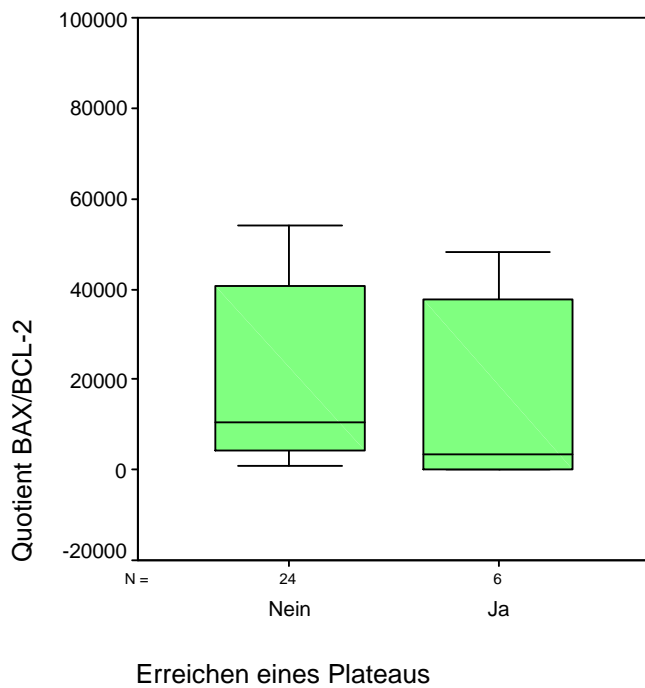


Abbildung 31: Mediane des Quotienten der relativen Genexpression von BAX/BCL-2, aufgeteilt nach dem Erreichen einer Plateauphase, Gesamtdaten (N = 30)

Die relative Genexpression von BAX lag für die Patienten, die im Verlauf der Studie ein Plateau erreicht haben, mit einem Median von 45,73 niedriger als in der Gruppe, die keine stabile Phase über drei Monate aufwies (Median: 80,73). Der Unterschied war nicht statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,9$).

Dagegen lag im Vergleich der Patienten bezüglich des Erreichens eines Plateaus für die Expression von BCL-2 mRNA ein statistisch signifikanter Unterschied vor. Im Mann-Whitney-U-Test betrug $p < 0,025$. In der folgenden Abbildung wird deutlich, dass die relative Genexpression von BCL-2 bei den beiden Patienten, die ein Plateau erreichen konnten, 14000-fach höher lag (124,56 gegenüber 0,0088).

Im Vergleich dazu, betrug der Quotient von BAX/BCL-2 bei diesen zwei Patienten im Median 3.571,56 gegenüber 10.484,75 und lag somit deutlich niedriger. Der Unterschied war dabei nicht statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,21$).

4.6 KORRELATIONSANALYSE

Um Beziehungen zwischen den einzelnen Variablen zu messen, wurde eine nichtparametrische Korrelation durchgeführt, in der der Korrelationskoeffizient Spearman-Rho mit dem jeweiligen Signifikanzniveau errechnet wurden. Dabei ergab sich eine positive Korrelation zwischen beiden, in dieser Studie bestimmten Splicevarianten des VEGF und BCL-2 zum Zeitpunkt vor Beginn der Therapie mit SU6668 sowie am Endpunkt der Studie, nach 12 Wochen unter Studienmedikation. Eine negative Korrelation zeigte sich bei der Auswertung des Zusammenhangs zwischen dem Quotienten von BAX/BCL-2 und den VEGF-Werten vor erster Einnahme des Medikaments. Andere Zusammenhänge liessen sich anhand der in dieser Studie gesammelten Daten nicht nachweisen.

		VEGF 121 (Prämedikation)	VEGF121 (Zyklus 3)	VEGF 165 (Prämedikation)	VEGF165 (Zyklus 3)
BCL-2 (Prämedikation)	Korrelations- koeffizient	,872(**)	,543	,781(**)	,900(*)
	Sig. (2-seitig)	,000	,266	,003	,037
	N	12	6	12	5
BCL-2 (Zyklus 3)	Korrelations- koeffizient	,600	,700(*)	,371	1,000(**)
	Sig. (2-seitig)	,208	,036	,468	.
	N	6	9	6	5
BAX/BCL-2 (Prämedikation)	Korrelations- koeffizient	-,811(**)	-,371	-,706(*)	-,900(*)
	Sig. (2-seitig)	,001	,468	,010	,037
	N	12	6	12	5

** Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

* Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

Abbildung 32: Tabellarische Darstellung der Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho und deren Signifikanzniveau für VEGF-Splicevarianten, BCL-2 und BAX/BCL-2

Um die Korrelation zu überprüfen, wurden die Daten der oben genannten Parameter in Streudiagrammen gegeneinander aufgetragen. Die folgenden Abbildungen verdeutlichen und verifizieren die oben bereits beschriebenen Zusammenhänge. Je höher die relative VEGF-Expression der untersuchten Patienten lag, desto stärker wurde auch BCL-2 von diesen Zellen exprimiert. Einen umgekehrten Zusammenhang ergaben die Diagramme, in denen der Quotient BAX/BCL-2 mit VEGF korreliert wurde. Hier zeigte sich, dass eine hohe VEGF Genexpression in den Myelomzellen des Knochenmarks mit einem niedrigeren Quotienten BAX/BCL-2 korreliert.

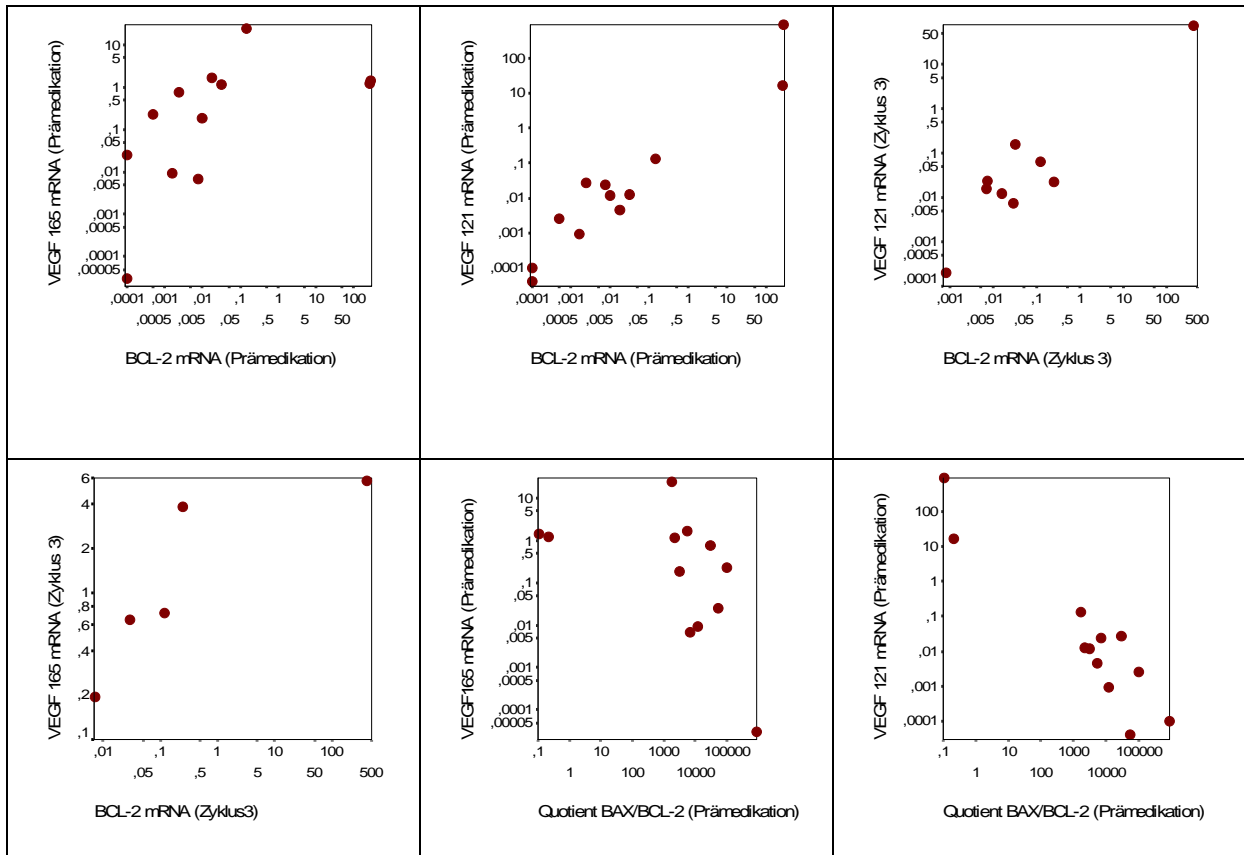


Abbildung 33: Streudiagramme VEGF Splicevarianten, BCL-2 und BAX/BCL-2

5. DISKUSSION

Der Angiogeneseinhibitor SU6668 greift durch Hemmung der Rezeptortyrosinkinasen VEGFR-2 (Flk-1), PDGFR- β , FGFR-1 in die vielfachen Wechselwirkungen zwischen Myelomzellen und dem Knochenmarkmikroenvironment ein. Inwiefern die einzelnen Faktoren sich unter der Therapie verändern und welche pathophysiologische Relevanz dieses haben könnte, soll im Folgenden diskutiert werden.

Um die pharmakodynamischen Effekte des Angiogeneseinhibitors SU6668 bei Patienten mit fortgeschrittenem Multiplem Myelom zu untersuchen, wurde die Genexpression von IL-6, apoptotischen Markern (BCL-2, BAX) und Signalmolekülen der Angiogenese (VEGF-Splicevarianten) im Knochenmark der Studienpatienten bestimmt. Dieses wurde mittels einer standardisierten, quantitativen Real-Time PCR am TaqMan durchgeführt. Zusätzlich zu der im Knochenmark bestimmten IL-6 Aktivität, wurde die IL-6-Konzentration im Serum der Studienpatienten mittels eines ELISAs gemessen.

Die Neoangiogenese ist im Knochenmark von Myelompatienten erhöht und steht für eine aktive Erkrankung mit schlechten Therapieergebnissen. In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass angiogene Zytokine wie VEGF und bFGF, die beide von Myelomzellen exprimiert und sezerniert werden, in engem Zusammenhang mit dem Fortschreiten der Erkrankung stehen (Bisping et al., 2003).

In der Literatur wurde nicht nur die Sekretion von VEGF sondern auch die Expression von VEGF-Rezeptoren durch Myelomzellen beschrieben. In Studien, die diese Rezeptoren mittels RT-PCR und Immunopräzipitation bei Patienten mit Multiplem Myelom sowie in Myelomzelllinien nachweisen konnten, war im Vergleich zu VEGFR-2 die Expression von VEGFR-1 weiter verbreitet (Podar and Anderson, 2005). Durch den Nachweis der Ko-Expression von VEGF und VEGFR beim Multiplem Myelom in Verbindung mit den direkten Effekten des Zytokins auf Überleben, Migration und Proliferation wurde die wesentliche Rolle autokriner VEGF-Schleifen für die Pathogenese dieser Erkrankung in aktuellen Studien bestätigt (Podar and Anderson, 2005).

Neben der Stimulation der Proliferation und Migration der Myelomzellen auf autokrinem Weg durch VEGF wurde die Bedeutung parakriner Schleifen mehrfach belegt. VEGF steigert die Sekretion von IL-6 durch Knochenmarkstromazellen (Dankbar et al., 2000), welches einen wesentlichen Wachstumsfaktor für Myelomzellen darstellt.

Ria et al. zeigten, dass VEGF, welches von Myelomzellen im Knochenmark sezerniert wird, die Proliferation und Chemotaxis von Endothelzellen (VEGF-R2 Signalweg) und Knochenmarkstromazellen (VEGF-R1 Signalweg) stimuliert. Die Knochenmarkstromazellen schütten dann VEGF-C und -D aus, die wiederum mit den Myelomzellen (VEGF-R3 Signalweg) interagieren (Ria et al., 2003).

Der parakrine Zusammenhang zwischen VEGF Splicevarianten (121 und 165) und IL-6 konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden. VEGF 165 und VEGF121 werden von Myelomzellen exprimiert und sezerniert. Beide Isoformen stimulieren die Expression von IL-6 in MVECs (Mikrovascular Endothelial Cells) und Stromazellen des Knochenmarks (BMSCs). Im Gegenzug wird die Expression beider Splicevarianten des VEGFs in den Myelomzellen durch IL-6 angeregt (Dankbar et al., 2000).

In den ersten vier Wochen unter Therapie mit SU6668 konnte eine Herunterregulation der VEGF mRNA beobachtet werden. Dabei halbierte sich die Expression der VEGF 121 sowie der VEGF 165 mRNA.

In der Literatur finden sich etwas widersprüchliche Angaben über die Entwicklung des angiogenen Faktors VEGF unter Therapie mit Angiogeneseinhibitoren.

Eine starke Abnahme der VEGF-A Expression in blastären AML-Zellen unter Therapie mit einem verwandten Angiogeneseinhibitor, SU5416, konnte in einer Arbeit der Gruppe um W. Fiedler und S. Loges nachgewiesen werden. SU5416 ist ein Tyrosinkinaseinhibitor, der die Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2, FLT3 und c-kit hemmt. (Arbeit eingereicht). In einer anderen aktuellen Veröffentlichung wurde ebenfalls eine Herunterregulation der VEGF mRNA in Ovarialkarzinomzellen unter Behandlung mit SU5416 festgestellt (Zhong et al., 2004). Im Gegensatz dazu kam es in klinischen Studien mit Angiogeneseinhibitoren in der Behandlung von Melanomen sowie bei der AML zu einer Zunahme der VEGF Plasmaspiegel im Verlauf (Fiedler et al., 2005; Peterson et al., 2004).

Ein Anstieg der VEGF-Transkripte unter Therapie mit SU6668 konnte ebenfalls in verschiedenen Tumormodellen in Mäusen mit Tumorxenografts von A431-, Colo205-H460-, SF767T-Zellen beobachtet werden (Laird et al., 2002) und eine Studie mit SU11248, einem Inhibitor der VEGF-Rezeptoren 1-3, PDGFR α und PDGFR β , zeigte eine kontinuierliche Zunahme der Plasmakonzentration von VEGF-A während der Behandlung von Patienten mit Nierenzellkarzinomen (Motzer et al., 2006).

Nach anfänglicher Abnahme des Expressionsniveaus konnte während der zwölf Wochen unter Therapie mit SU6668 auch in unserer Studie ein erneuter Anstieg der relativen Genexpression von VEGF (VEGF 121 und VEGF 165) in den CD 138 positiven Zellen des Knochenmarks der Patienten beobachtet werden.

Warum die VEGF Expression in den ersten Wochen sank und erst später deutlich anstieg ist nicht eindeutig erklärbar. Aufgrund der Redundanz, den vielen Querverbindungen und der auto- und parakrinen Kreise ist die Findung einer monokausalen Erklärung schwierig.

Eine mögliche Ursache der in unserer Studie beobachteten Zunahme der VEGF Expression in Myelomzellen könnte die kompensatorische Steigerung der Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren durch BMSCs (z.B. bFGF, VEGF) und Osteoklasten (IL-6) sein, die innerhalb der parakrinen Interaktion wiederum in einer verstärkten Ausschüttung von VEGF durch die Myelomzellen führt, um die durch Su6668 verursachte Rezeptorblockade auszugleichen. Unter Umständen greift die Kompensation durch parakrine Kreise erst zeitlich verzögert ein, was die anfängliche Abnahme der VEGF mRNA unter Therapie erklären könnte.

Einen anderen wesentlichen Faktor in der Regulation der VEGF-Expression stellt Hypoxie dar. Dabei läuft die Induktion über den hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)/von Hippel-Lindau tumor suppressor gene (VHL) Signalweg und in der Umgebung nekrotischer Areale ist die VEGF-Expression stark hochreguliert (Podar and Anderson, 2005).

Somit könnte eine Abnahme der Sauerstoffversorgung im Knochenmark durch die antiangiogenetische Therapie außerdem zu einer hypoxie-getriggerten Zunahme der VEGF-Expression geführt haben, die ebenfalls ihren Teil zu der Zunahme der VEGF mRNA in den Myelomzellen beigetragen haben könnte. Durch die Therapie verursachte, strukturelle Umbauvorgänge der Gefäßversorgung des Knochenmarks,

die beim MM pathologisch erhöht ist, könnten die Ursache einer erst verzögert eintretenden hypoxiebedingten Steigerung der VEGF-Sekretion durch MM-Zellen sein.

Als Hypothese könnte ebenfalls eine Resistenzentwicklung der Zellen diskutiert werden. Resistenzentwicklung wird eine wesentliche Herausforderung hinsichtlich der Entwicklung und Anwendung von Tyrosinkinaseinhibitoren bleiben. Die Resistenzen gegenüber Imatinib mesylate, die mehr und mehr bei CML-Patienten entdeckt werden, dienen als Warnzeichen für andere pharmakologische Substanzen, die sich noch in der Entwicklung befinden (Wadleigh et al., 2005). Die Entwicklung von Mutationen der Rezeptorkomplexe wie bei der Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib, wären aufgrund des niedrigen Proliferationsindex von Myelomzellen eher ungewöhnlich. Allerdings besteht eine direkte Korrelation zwischen dem Ausmaß der Angiogenese und dem Plasmazell Labeling Index (Podar and Anderson, 2005).

In einigen präklinischen Studien zeigte sich unter dauerhafter VEGF/VEGF-Rezeptorblockade ein erneutes Tumorwachstum, obwohl es zu Beginn der Behandlung zu einem Stillstand bzw. zu einer Regression der Erkrankung gekommen war (Hicklin and Ellis, 2005). Als mögliche Ursache dieser Beobachtung wurde in der Veröffentlichung die kompensatorische Steigerung anderer proangiogenetischer Faktoren (bzw. die Unterdrückung angiogenesehemmender Faktoren) durch Tumor- oder Stromazellen diskutiert, die zu einem Umbau und sogar zu erhöhter Effizienz der Gefäßversorgung des Tumors führte, so dass eine Resistenzentwicklung unter diesen Gesichtspunkten durchaus thematisiert werden muss. Während des Tumorzellwachstums werden eine breite Anzahl von angiogenetischen Molekülen freigesetzt. Dieses könnte zumindestens z.T. der Grund sein, aus dem eine monotherapeutische Behandlung, die VEGF hemmt, nur für eine gewisse Zeit gute Wirkung erzielt und warum womöglich ein „Cocktail“ verschiedener Angiogeneseinhibitoren benötigt werden wird, um eine Tumorerkrankung wie das Multiple Myelom effizient und dauerhaft zu stoppen (Podar and Anderson, 2005).

Ein weiterer Aspekt, der eventuell eine Rolle in der anfänglichen Ab- und folgenden Zunahme der VEGF mRNA spielen könnte, ist die spezielle Pharmakokinetik des Studienmedikaments SU6668. In einer Phase I Studie zur detaillierteren Analyse der pharmakokinetischen Eigenschaften dieser Substanz wurde eine signifikante Reduktion der C_{max} und AUC nach wiederholter Gabe von SU6668 deutlich. Die

Plasmakonzentration von SU6668 nahm im Verlauf von Tag 1 über Tag 28 und Tag 56 kontinuierlich ab. Die Clearance stieg im Verlauf an. Insgesamt muss man von einer Induktion von metabolischen Enzymen ausgehen, die zu einer immer rascher ablaufenden Elimination der Substanz aus dem Körper führten (Kuenen et al., 2005). Im Zusammenhang mit der Entwicklung der VEGF-Expression unter SU6668 bestünde somit auch die Möglichkeit, dass zu Beginn der Behandlung mit dem Studienmedikament noch ausreichende Wirkspiegel erreicht werden konnten, um eine Herunterregulation der VEGF-Expression zu erzielen. Im Verlauf der Studie könnte dann auch die durch die Pharmokinetik bedingte, abnehmende Plasmakonzentration zu einer erneuten Zunahme der VEGF mRNA geführt haben.

Ein anderes Zytokin, dessen mRNA sowie Serumkonzentration im Verlauf der klinischen Studie mit SU6668 bestimmt wurde, stellt das IL-6 dar. IL-6 steht in enger Verbindung zu der Pathogenese des Multiplen Myeloms und stellt den wichtigsten Wachstumsfaktor für Myelomzellen dar. Dabei konnte in aktuellen Studien gezeigt werden, dass es als antiapoptotischer Faktor dem spontanen, medikament-induzierten und Fas-induzierten Zelltod vorbeugt und somit Wachstum und Überleben der Myelomzellen reguliert (Frassanito et al., 2001).

Es existieren zwei wesentliche Mechanismen, die zur Ausschüttung von IL-6 führen: zum Teil wird es im Sinne einer autokrinen Stimulation durch die Myelomzellen selbst produziert, der überwiegende Teil von IL-6 wird jedoch mittels eines parakrinen Mechanismus durch Stromazellen des Knochenmarks (BMSCs) freigesetzt, die gemeinsam mit den Osteoklasten nach Adhäsion von Myelomzellen oder durch andere Zytokine, wie z.B. VEGF, TNFalpha, IL-1beta, zur IL-6 Transkription und Sekretion angeregt werden (Hideshima et al., 2004).

Es konnte nachgewiesen werden, dass IL-6 einen signifikanten prognostischen Faktor für MM-Patienten darstellt. In Ergebnissen einer Studie der Arbeitsgruppe von V.M. Lauta wurde aufgezeigt, dass sich die Überlebenszeiten der Patienten in Abhängigkeit vom IL-6 Spiegel signifikant unterscheiden. Patienten, deren IL-6 Spiegel zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei < 7 pg/ml lag, hatten eine 50% Überlebensrate von 53,7 den Monaten im Vergleich zu den Patienten mit IL-6 Werten von über 7 pg/ml, die lediglich eine 50% Überlebensrate von 27 Monaten erreichten. Allerdings gab es im Gegensatz zu der Mehrheit der Studien auch Untersuchungen, die diesen

Zusammenhang nicht so klar darstellen konnten. Diese Unterschiede könnten durch die Verwendung verschiedener Methoden zustande gekommen sein. Auf der anderen Seite wurde in einigen Studien, die den prognostischen Wert des IL-6 untersuchten, auch wesentliche Tagesschwankungen des IL-6 Serumspiegels beobachtet, die ebenfalls als Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse in Betracht gezogen werden sollten (Lauta, 2003). Die in dieser Studie gemessenen IL-6-Serumspiegel lagen zumeist wesentlich unter den oben beschriebenen 7 pg/ml, obwohl sich die Erkrankung der Patienten bereits in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium befand. Vielleicht stellen auch die in der oben genannten Arbeit beschriebenen Tagesschwankungen in den Interleukin-Spiegeln oder die unterschiedlichen Methoden, mittels derer das Zytokin bestimmt wurde, Erklärungen für die Differenz in den Werten dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interleukin-6 Genexpression in den CD138 negativen Knochenmarkzellen sowie die Plasmakonzentration im peripheren Blut der Patienten bestimmt. Die IL-6 Genexpression der CD138 negativen Zellen des Knochenmarks nahm im Verlauf der Studie insgesamt auf das Dreifache des Ausgangswertes zu. Dabei stieg der gemessene Wert zu Beginn der Therapie stärker an (vier Wochen nach Studienbeginn achtfache Erhöhung gegenüber dem Ausgangswert) und sank dann innerhalb der folgenden acht Wochen wieder um mehr als die Hälfte ab. Zusammengefasst kam es jedoch zu einer Erhöhung der IL-6 Genexpression im Verlauf der Studie.

Es erscheint so, als würde durch den Eingriff in das Zytokinnetzwerk durch SU6668 eine erhöhte Produktion von IL-6 als reaktive Gegenregulation durch die BMSC hervorgerufen werden. Dadurch dass zu Beginn der Therapie die relative VEGF-Genexpression abnahm, liegt nahe, dass IL-6 kompensatorisch über die multiplen Wechselwirkungen zwischen Knochenmarkstromazellen und Myelomzellen heraufreguliert wurde. Nach einer gewissen Phase, in der vielleicht weitere Zytokine den Eingriff des Medikaments in die Homöostase der Signalmoleküle kompensieren konnten, sank IL-6 dann wieder etwas ab.

Denkbar wäre auch, dass das zu Beginn der Behandlung mit SU6668 beobachtete Absinken der VEGF mRNA in den Myelomzellen anfangs im Rahmen der Interaktion zwischen beiden Zytokinen zu einer Zunahme der IL-6 Produktion führte, die dann,

nachdem die relative Genexpression von VEGF im weiteren Verlauf der Studie wieder anstieg, zur „normalen Sekretion“ zurückkehrte.

Diese frühe Gegenregulation entspräche der Eigenschaft des IL-6 als Akute-Phase-Protein – und lässt die Annahme zu, dass es verschiedene Regulationsmechanismen gibt, die zur Sicherung des Überlebens der Myelomzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten wirken und greifen.

Betrachtet man das im Serum gemessene IL-6, so zeigte sich insgesamt im Vergleich mit den Werten im Knochenmark ein ähnlicher Verlauf.

Es wurde ein starker Anstieg der IL-6 Konzentration besonders vier Stunden nach Einnahme des Medikaments deutlich. Interessanterweise fiel daraufhin der durchschnittliche Wert auf den tiefsten gemessenen Punkt ab (Tag 15, nach zwei Wochen), als hätte es eine reaktive Ausschüttung aus einem anderen Reservoir, nicht dem KM entsprechend gegeben, welche die Sekretion durch die BMSC und MM-Zellen herunterreguliert. Ein Aspekt, der wieder einer schnellen Notfallfunktion des Zytokins für die Aufrechterhaltung der Tumorzellhomöostase entspräche. Die Serumkonzentration des IL-6 lag allerdings am letzten Messzeitpunkt der Studie, nach zwölfwöchiger Therapie mit SU6668, wieder im Bereich des Ausgangswertes. Eine andere Begründung für den plötzlichen Anstieg des Seruminterleukins zu Beginn der Therapie liefert eine Studie von Kuenen et al. Dort konnte eine AkutePhase Reaktion, die wahrscheinlich über IL-6 vermittelt wurde im Rahmen einer Dosisfindungsstudie mit SU6668 beobachtet werden (Kuenen et al., 2005). Somit muss bei der Steigerung der IL-6 Konzentration im Verlauf der klinischen Studie mit SU6668, die insgesamt zu beobachten war, auch eine durch die Substanz hervorgerufenen Nebenwirkung mit in die Betrachtung der Ergebnisse einbezogen werden, die vielleicht gerade bei erstmaligem Kontakt zu der Substanz zu einer heftigen Gegenregulation i.S. einer Akute Phase Reaktion führte.

Es konnte in einigen Studien bewiesen werden, dass IL-6, welches einen Überlebensfaktor der Myelomzellen darstellt, die Proteine Mcl-1 und Bcl-x nicht aber BCL-2 in Myelomzellen hochreguliert. Für Bcl-x konnte auch ein direkter Zusammenhang mit dem Ansprechen auf Chemotherapie (Melphalan und Prednison, Adriamycin, Vincristin) nachgewiesen werden. Je höher die Expression des Gens,

desto schlechter war das Ansprechen auf die verabreichte Chemotherapie (Hideshima et al., 2001b). Somit spielen apoptose-regulierende Moleküle aus der B-Cell Lymphoma-2 Gruppe (BCL-2) eine wesentliche Rolle in dem durch IL-6 und andere Zytokine getriggerten Zellüberleben der Myelomzellen.

In dieser hier beschriebenen Studie wurden die Moleküle BAX (proapoptotisch) und BCL-2 (antiapoptotisch) gewählt, um einen beispielhaften Anhalt über die Apoptosebereitschaft der Myelomzellen im Verlauf der Studie zu gewinnen.

Generell konnte in frisch isolierten MM-Zellen eine sehr variable BCL-2 Expression festgestellt werden, wie es auch in unseren Messungen bestätigt wurde (Miguel-Garcia et al., 1998). In einer Veröffentlichung in *Haematologica* wurde die BCL-2 Expression in Plasmazellen untersucht. Dabei konnte bei Patienten mit MGUS oder einem Multiplen Myelom eine signifikant höhere Zahl an BCL-2 positiven Zellen bestimmt werden, die auch mit Fortschreiten der Erkrankung zunahm (Miguel-Garcia et al., 1998). In den von uns untersuchten CD 138 positiven Myelomzellen aus dem Knochenmark wurde ein ungefähr dreifacher Anstieg der BAX-Expression im Verlauf ermittelt. Auch die mediane mRNA Expression von BCL-2 stieg in den 12 Wochen unter SU6668 Therapie kontinuierlich, um ungefähr das Zehnfache, an. Der Quotient von BAX/BCL-2 verdoppelte sich allerdings ebenfalls unter Therapie mit SU6668, so dass insgesamt die Balance der apoptotischen Faktoren zugunsten der proapoptotischen Seite (BAX) verschoben wurde.

Der Anstieg des Quotienten BAX/BCL-2 unter Therapie mit SU6668 könnte für die Induktion einer höheren Apoptoserate in den untersuchten Myelomzellpopulationen sprechen.

In einer Arbeit von Chauhan und Anderson konnte gezeigt werden, dass Überexpression von BCL-2 in ARP-1 MM-Zellen diese vor einer durch Dexamethason induzierten Apoptose schützte, was direkt mit einer Steigerung von NF-kappaB korrelierte. In diesem Zusammenhang konnte auch in einigen Studien gezeigt werden, dass durch Therapien, die BCL-2 Spiegel senken konnten, Myelomzellen wieder besser auf Dexamethason und andere Chemotherapeutika ansprachen (Hideshima et al., 2001b).

Somit gibt die in unserer Studie beobachtete Zunahme der Apoptosebereitschaft der Myelomzellen durch die Therapie mit SU6668 Anlass zu der Überlegung, ob eine Kombination dieses Studienmedikaments mit konventioneller Chemotherapie, ein

Ansatz der bereits bei verschiedenen Tumorentitäten (z.B. kolorektale Karzinome, Bronchialkarzinome, Kopf-Hals-Tumoren, Magenkarzinome) erfolgreich durchgeführt wurde, auch für die Behandlung des Multiplen Myeloms erfolgreich sein könnte.

Die prognostische Bedeutung der BCL-2-Expression für das Multiple Myelom ist bislang aber noch nicht eindeutig geklärt. Verschiedene Studien zeigten, dass Bcl-2 keinen wesentlichen Faktor darstellte, der das Therapieansprechen oder das Überleben der Patienten beeinflusste. Außerdem ergab sich auch kein Zusammenhang zwischen BCL-2 und anderen prognostischen Faktoren des MM wie z.B. CRP und beta-2 Mikroglobulin (van de Donk et al., 2005).

Allerdings lag die Prozentzahl und Konzentration von Bcl-2 in Plasmazellen der Patienten mit neoplastischen Erkrankungen wesentlich höher als bei Patienten mit einer reaktiven Plasmozytose. Außerdem stieg die Konzentration proportional zum Krankheitsstadium an (Miguel-Garcia et al., 1998).

Somit spielt BCL-2 in der Pathogenese des MM eine Rolle, indem es das Überleben der Myelomzellen durch einen Schutz vor Apoptose verlängert und die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung und Weitergabe eines genetischen Defektes erhöht. Allerdings lässt sich aus der in unserer Studie beobachteten Heraufregulation der BCL-2 Expression unter antiangiogenetischer Therapie kein eindeutiger Schluss ziehen.

Interessant sind jedoch die Ergebnisse einer aktuellen Studie, in der molekulare Signalwege, die durch VEGF in VEGFR+ Leukämiezellen aktiviert waren und zu einem Überlebensvorteil führten, unter besonderer Berücksichtigung des BCL-2 untersucht wurden. In diesem Kontext konnte nachgewiesen werden, dass VEGF das Überleben von in „Hungerserum“ kultivierten Endothelzellen gewährleistete, indem es zu einer Überexpression von BCL-2 führte. Die exakten Signalwege der Induktion von BCL-2 durch VEGF blieben dabei jedoch noch ungeklärt. Die Induktion von BCL-2 konnte auch in VEGFR-positiven primären Leukämiezellen sowie Zelllinien nachgewiesen werden. Neben BCL-2 wurde auch die Expression von BAX untersucht, wobei diese im Gegensatz zu BCL-2 nur geringfügig zunahm. Dieser Vorgang stand dabei in Verbindung zu der verstärkten Expression von Hsp90 (heat shock protein) durch VEGF, welches BCL-2 und APAF-1 (apoptotic protease-activating factor-1) band und dann die Apoptose in diesen Zellen hemmte. Es konnte eine dosisabhängige Steigerung der BCL-2 Expression in HL60 bewiesen werden (Dias et

al., 2002). In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass VEGF durch Induktion von Mcl-1 Leukämiezellen und andere hämatopoetische Zellen vor chemotherapieinduzierter Apoptose schützt (Dias et al., 2002).

Die kontinuierliche Heraufregulation der BCL-2 m-RNA Expression in Myelomzellen, welche in unserer Studie nachgewiesen wurde, deutet darauf hin, dass der oben beschriebene Zusammenhang zwischen VEGF und BCL-2 auch in Myelomzellen bestehen könnte, gerade da auch die Expression von VEGF mRNA in den Myelomzellen im Verlauf der Studie zunahm und außerdem eine positive Korrelation zwischen BCL-2- und VEGF-Expression in den Myelomzellen in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte.

Als primärer Endpunkt der klinischen Studie mit SU6668 wurde das objektive Ansprechen auf die Therapie gewählt.

Insgesamt konnten in der Studie acht der zwanzig eingeschlossenen Patienten eine stabile Erkrankung erreichen. Zwölf Patienten zeigten eine progrediente Erkrankung.

Patienten, die eine hohe VEGF-Expression in den CD 138 positiven Zellen des Knochenmarks aufwiesen, sprachen besser auf die Therapie mit SU6668 an. Dieses konnte bereits in verschiedenen anderen Studien mit Angiogeneseinhibitoren beobachtet werden. In einer großen europäischen Studie, die die Wirkung von SU514 bei c-KIT+ AML Patienten untersuchte, wurde die VEGF-A Expression der blastären Zellen (dabei wurde VEGF mRNA mittels PCR bestimmt) unter der Therapie gemessen. Ein Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass vor allem Patienten positiv auf die Therapie ansprachen, die hohe Konzentrationen an VEGF-A mRNA vor Beginn der Studie aufwiesen. Die abnehmende Gefäßdichte der Patienten korrelierte dabei mit der VEGF Expression. Allerdings ist noch unklar, ob die nachgewiesene klinische Aktivität der Substanz der VEGF oder c-kit oder FLT-3 Inhibition zuzuschreiben ist oder der gesamte Effekt nur eine Begleiterscheinung darstellt (Wadleigh et al., 2005).

Bezüglich der IL-6 Serumkonzentration war der Unterschied der Patientengruppen, deren Erkrankung unter Therapie stabil war (Stable Disease) und derjenigen, die einen Progress zeigten, statistisch signifikant. Die IL-6 Konzentration lag in der Gruppe der Patienten mit gutem Ansprechen auf die Therapie 11-fach niedriger und bestätigte die prognostische Relevanz des IL-6 für das Multiple Myelom. Auch bei Analyse der relativen Genexpression von IL-6 in den CD 138 negativen Zellen des

Knochenmarks, lag der Wert der Patienten, deren Erkrankung stabil blieb bei einem Viertel des Wertes der Patienten, die nicht auf die Behandlung ansprachen.

In der Zusammenfassung der Ergebnisse wurde außerdem deutlich, dass gerade die Patienten, die insgesamt eher eine hohe Expression von BCL-2 und einen niedrigen Quotienten BAX/BCL-2 aufwiesen, gut auf die Therapie mit SU6668 ansprachen. Die Patienten, die durch Therapie mit SU6668 eine stabile Erkrankung erreichten, zeigten im Median eine 15-fach erhöhte BCL-2 Konzentration im Knochenmark und einen 5-fach erniedrigten BAX/BCL-2 Quotienten.

In der Literatur finden sich eher Hinweise für eine Korrelation von schlechtem Ansprechen auf die Chemotherapie und hoher Expression von BCL-2 bei AML-Patienten (Hideshima et al., 2001b). Hierbei sollte man aber berücksichtigen, dass sich die in die vorliegende Studie eingeschlossenen Patienten im Vorwege bereits refraktär auf Chemotherapie gezeigt hatten, so dass es sich vielleicht um ein Phänomen der Überexpression von BCL-2 durch eine während der Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika entstandene selektionierte Myelomzellpopulation handelte, die allerdings noch eine gewisse Sensibilität gegenüber der zielgerichteten Therapie mit dem Angiogeneseinhibitor SU6668 aufwies. Außerdem deuten, wie bereits oben zitiert, verschiedene Studien darauf hin, dass BCL-2 keinen prognostischen Wert für das Überleben der Myelompatienten darstellt.

Da vor allem Patienten mit hoher Expression von VEGF gut auf die SU6668-Therapie ansprachen, könnte der bereits oben beschriebene Zusammenhang zwischen BCL-2 und VEGF Expression eine wesentliche Rolle spielen, so dass dieses Ergebnis als konsekutive Erhöhung der BCL-2 mRNA im Rahmen der hohen VEGF-Expression in dieser Patientengruppe zu werten wäre. Diese Hypothese wird zusätzlich durch den Nachweis einer signifikanten positiven Korrelation zwischen der in unsere Studie ermittelten Expression der VEGF-Splicevarianten VEGF 121 und 165 sowie dem Protein BCL-2 (Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho) vor erster Gabe der Studienmedikation und nach zwölf Wochen unter Therapie mit SU6668 unterstützt.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie die Aktivität der Studiensubstanz SU6668 durch die anfängliche Reduktion der VEGF-Expression sowie die Zunahme der Apoptosebereitschaft der Myelomzellen bewiesen werden. Bei acht Patienten der

zwanzig eingeschlossenen Patienten mit Multiplem Myelom kam es zu einer Stabilisierung der Erkrankung, die zwischen zwei und neunzehn Wochen anhielt.

Insgesamt betrachtet stellt die direkte und indirekte Hemmung des VEGFs und seiner Rezeptoren immer noch einen vielversprechenden neuen therapeutischen Ansatz, um das Ansprechen und Überleben von Patienten mit Multiplem Myelom zu verbessern, dar. Die Komplexität der durch VEGF vermittelten Wirkungen wird von einer Vielzahl von Zielzellen bestimmt. Neben der Funktion des Zytokins als essentieller Regulator der physiologischen und pathologischen Angiogenese, wurde auch die Rolle des Moleküls für Wachstum, Überleben und Migration von Myelomzellen via parakriner und autokriner Signalwege nachgewiesen. VEGF-Serumspiegel und erhöhte Vaskularisierung sind eng mit dem klinischen Krankheitsverlauf des Multiplen Myeloms korreliert. Zusätzlich tragen wahrscheinlich Effekte, die VEGF auf andere Zellen als Endothelzellen ausübt zu der Krankheitsentwicklung und –manifestation bei (Podar and Anderson, 2005).

Jedoch wurde in dieser Studie wie insgesamt innerhalb der Forschung auf dem Gebiet der Angiogenese deutlich (Hicklin and Ellis, 2005), dass unterschiedliche Wachstumsfaktoren und Zytokine die Expression proangiogenetischer Faktoren in Tumorzelllinien beeinflussen und dadurch Angiogenese indirekt induziert werden kann. Das ganze System stellt ein komplexes Netzwerk dar, in dem vielfältige Wechselwirkungen bestehen, was die Interpretation einzelner Werte und Daten schwierig werden lässt.

Man muss berücksichtigen, dass für jeden sezernierten, angiogenetischen Faktor, VEGF eingeschlossen, multiple regulatorische Faktoren und intrazelluläre Signalwege existieren. Wird ein Signalweg gehemmt, so führt dieses unter Umständen nicht zu einer kompletten Inhibition der Angiogenese oder von VEGF, da immer noch viele andere Signalwege aktiviert sein könnten (Bergsland, 2006). Neben VEGF (VEGF-A) existieren noch weitere verschiedene Moleküle der VEGF-Protein-Familie und die Interaktionen zwischen den einzelnen Liganden und ihren Rezeptoren sind komplex und überschneiden sich zum Teil. Die Rolle andere VEGF-Familien-Mitglieder in der Pathogenese maligner Erkrankungen sollte und muss noch weiter erforscht werden. Ausgehend von der Vielfältigkeit dieses Signalnetzwerks, muss in Betracht gezogen werden, dass der prädiktive Wert der VEGF-Expression verbessert werden könnte,

wenn man diese in den Gesamtzusammenhang der anderen Determinanten der Signalwege und deren Aktivität stellen könnte (Bergsland, 2006).

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des Angiogeneseinhibitors SU6668 im Rahmen der Behandlung von Patienten mit Multiplem Myelom (MM) untersucht.

Das Multiple Myelom ist eine maligne lymphoproliferative B-Zell-Erkrankung, deren Pathogenese durch eine fein regulierte Wechselwirkung von Hemmung und Stimulierung zwischen Stromazellen des Knochenmarks und den Myelomzellen mitbestimmt wird. Die daran beteiligten Zytokine beeinflussen Wachstum (z.B. IL-6, VEGF), Überleben (z.B. IL-6) und Therapieresistenz (z.B. IL-6, VEGF) der Myelomzellen und führen zu einer Neoangiogenese im Knochenmark (VEGF).

Um die Effekte der Substanz auf diese Signalwege zu analysieren, wurden die Interleukin-6 Expression der CD 138 negativen Knochenmarkstromazellen, die Expression von VEGF-Splicevarianten VEGF 121 und VEGF 165 sowie die Expression von apoptotischen Proteinen (BAX und BCL-2) der CD 138 positiven Myelomzellen bestimmt. Außerdem wurde die Serumkonzentration des Interleukin-6 im Verlauf gemessen.

Unter Therapie mit SU6668 kam es anfänglich zu einer Herunterregulation der VEGF-Splicevarianten und einer Zunahme des apoptotischen Quotienten BAX/BCL-2, was für eine erhöhte Apoptosebereitschaft der Myelomzellen unter Therapie sprach.

Insgesamt erreichten acht der zwanzig Patienten eine stabile Erkrankung.

Die mit einer stabilen Erkrankung auf die Therapie ansprechenden Patienten zeigten deutliche höhere VEGF mRNA, so dass die Höhe der VEGF-Expression einen günstigen prognostischen Faktor für das Ansprechen auf die Therapie darstellen könnte. Die IL-6 Genexpression war bei diesen Patienten niedrig, was den prognostischen Wert des IL-6 für das MM bestätigte.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Behandlung von Myelompatienten mit zielgerichteter Therapie, insbesondere Angiogeneseinhibitoren, einen vielversprechenden Ansatz darstellt, aber die vielfältigen Interaktionen zwischen den einzelnen Liganden und Rezeptoren mit Redundanzen, Querverbindungen, auto- und parakrinen Kreisen noch weitere Erforschung und eventuell klinische Untersuchungen mit komplexen kombinierten Therapieschemata erfordern, um die Signalwege dauerhaft zu hemmen und einen klinischen Therapieerfolg für die Myelompatienten zu erzielen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Alexanian, R., and Dimopoulos, M. (1994). The treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 330, 484-489.

Anan, K., Morisaki, T., Katano, M., Ikubo, A., Kitsuki, H., Uchiyama, A., Kuroki, S., Tanaka, M., and Torisu, M. (1996). Vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor are potential angiogenic and metastatic factors in human breast cancer. *Surgery* 119, 333-339.

Attal, M., Harousseau, J. L., Stoppa, A. M., Sotto, J. J., Fuzibet, J. G., Rossi, J. F., Casassus, P., Maisonneuve, H., Facon, T., Ifrah, N., *et al.* (1996). A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med* 335, 91-97.

Barlogie, B., Smith, L., and Alexanian, R. (1984). Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents. *N Engl J Med* 310, 1353-1356.

Bataille, R., and Harousseau, J. L. (1997). Multiple myeloma. *N Engl J Med* 336, 1657-1664.

Bellamy, W. T., Richter, L., Frutiger, Y., and Grogan, T. M. (1999). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 59, 728-733.

Bergsland, E. K. (2006). When does the presence of the target predict response to the targeted agent? *J Clin Oncol* 24, 213-216.

Bisping, G., Leo, R., Wenning, D., Dankbar, B., Padro, T., Kropff, M., Scheffold, C., Kroger, M., Mesters, R. M., Berdel, W. E., and Kienast, J. (2003). Paracrine interactions of basic fibroblast growth factor and interleukin-6 in multiple myeloma. *Blood* 101, 2775-2783.

Bjorkstrand, B. B., Ljungman, P., Svensson, H., Hermans, J., Alegre, A., Apperley, J., Blade, J., Carlson, K., Cavo, M., Ferrant, A., *et al.* (1996). Allogeneic bone marrow transplantation versus autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a retrospective case-matched study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 88, 4711-4718.

Bronzert, D. A., Pantazis, P., Antoniades, H. N., Kasid, A., Davidson, N., Dickson, R. B., and Lippman, M. E. (1987). Synthesis and secretion of platelet-derived growth factor by human breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5763-5767.

Campos, L., Rouault, J. P., Sabido, O., Oriol, P., Roubi, N., Vasselon, C., Archimbaud, E., Magaud, J. P., and Guyotat, D. (1993). High expression of bcl-2

protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* 81, 3091-3096.

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

Catlett-Falcone, R., Landowski, T. H., Oshiro, M. M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J. L., Nunez, G., *et al.* (1999). Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10, 105-115.

Cavo, M., Terragna, C., Martinelli, G., Ronconi, S., Zamagni, E., Tosi, P., Lemoli, R. M., Benni, M., Pagliani, G., Bandini, G., and Tura, S. (2000). Molecular monitoring of minimal residual disease in patients in long-term complete remission after allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Blood* 96, 355-357.

Chauhan, D., and Anderson, K. C. (2001). Apoptosis in multiple myeloma: therapeutic implications. *Apoptosis* 6, 47-55.

Cory, S., Huang, D. C., and Adams, J. M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607.

Cronauer, M. V., Schulz, W. A., Seifert, H. H., Ackermann, R., and Burchardt, M. (2003). Fibroblast growth factors and their receptors in urological cancers: basic research and clinical implications. *Eur Urol* 43, 309-319.

D'Amato, R. J., Loughnan, M. S., Flynn, E., and Folkman, J. (1994). Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4082-4085.

Dankbar, B., Padro, T., Leo, R., Feldmann, B., Kropff, M., Mesters, R. M., Serve, H., Berdel, W. E., and Kienast, J. (2000). Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 95, 2630-2636.

Di Raimondo, F., Azzaro, M. P., Palumbo, G., Bagnato, S., Giustolisi, G., Florida, P., Sortino, G., and Giustolisi, R. (2000). Angiogenic factors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood. *Haematologica* 85, 800-805.

Dias, S., Shmelkov, S. V., Lam, G., and Rafii, S. (2002). VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition. *Blood* 99, 2532-2540.

Dionne, C. A., Crumley, G., Bellot, F., Kaplow, J. M., Searfoss, G., Ruta, M., Burgess, W. H., Jaye, M., and Schlessinger, J. (1990). Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. *Embo J* 9, 2685-2692.

Distler, J. H., Hirth, A., Kurowska-Stolarska, M., Gay, R. E., Gay, S., and Distler, O. (2003). Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 47, 149-161.

Durie, B. G. M. (1993). Multiple Myeloma: A concise review of the disease and treatment options (booklet). (Los Angeles, CA: International Myeloma Foundation).

Easty, D. J., and Bennett, D. C. (2000). Protein tyrosine kinases in malignant melanoma. *Melanoma Res* 10, 401-411.

Erlich, H. A., Gelfand, D., and Sninsky, J. J. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252, 1643-1651.

Fiedler, W., Graeven, U., Ergun, S., Verago, S., Kilic, N., Stockschlader, M., and Hossfeld, D. K. (1997). Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood* 89, 1870-1875.

Fiedler, W., Serve, H., Dohner, H., Schwittay, M., Ottmann, O. G., O'Farrell, A. M., Bello, C. L., Allred, R., Manning, W. C., Cherrington, J. M., *et al.* (2005). A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood* 105, 986-993.

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

Folkman, J. (1974). Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 19, 331-358.

Folkman, J. (1995). Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 333, 1757-1763.

Folkman, J., and Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science* 235, 442-447.

Fontanini, G., Bigini, D., Vignati, S., Basolo, F., Mussi, A., Lucchi, M., Chine, S., Angeletti, C. A., Harris, A. L., and Bevilacqua, G. (1995). Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 177, 57-63.

Frassanito, M. A., Cusmai, A., Iodice, G., and Dammacco, F. (2001). Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood* 97, 483-489.

Giles, F. J., Wickham, N. R., Rapoport, B. L., Somlo, G., Lim, S. W., Shan, J., and Lynott, A. M. (2000). Cyclophosphamide, etoposide, vincristine, adriamycin, and dexamethasone (CEVAD) regimen in refractory multiple myeloma: an International Oncology Study Group (IOSG) phase II protocol. *Am J Hematol* 63, 125-130.

Giuliani, N., Colla, S., Lazzaretti, M., Sala, R., Roti, G., Mancini, C., Bonomini, S., Lunghi, P., Hojden, M., Genestreti, G., *et al.* (2003). Proangiogenic properties of human myeloma cells: production of angiopoietin-1 and its potential relationship to myeloma-induced angiogenesis. *Blood* 102, 638-645.

Givol, D., and Yayon, A. (1992). Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *Faseb J* 6, 3362-3369.

Goldschmidt H, C. F. (2002). Das Multiple Myelom (Plasmozytom) - Diagnose und Therapie., Vol 1. Auflage (Bremen: UNI-MED).

Green, P. J., Walsh, F. S., and Doherty, P. (1996). Promiscuity of fibroblast growth factor receptors. *Bioessays* 18, 639-646.

Gregory, W. M., Richards, M. A., and Malpas, J. S. (1992). Combination chemotherapy versus melphalan and prednisolone in the treatment of multiple myeloma: an overview of published trials. *J Clin Oncol* 10, 334-342.

Gross, A., McDonnell, J. M., and Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-1911.

Hicklin, D. J., and Ellis, L. M. (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 23, 1011-1027.

Hideshima, T., Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M., and Anderson, K. C. (2004). Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 104, 607-618.

Hideshima, T., Chauhan, D., Schlossman, R., Richardson, P., and Anderson, K. C. (2001a). The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene* 20, 4519-4527.

Hideshima, T., Nakamura, N., Chauhan, D., and Anderson, K. C. (2001b). Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene* 20, 5991-6000.

Hilbert, D. M., Kopf, M., Mock, B. A., Kohler, G., and Rudikoff, S. (1995). Interleukin 6 is essential for in vivo development of B lineage neoplasms. *J Exp Med* 182, 243-248.

Holmgren, L., O'Reilly, M. S., and Folkman, J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1, 149-153.

Isacchi, A., Bergonzoni, L., and Sarmientos, P. (1990). Complete sequence of a human receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Nucleic Acids Res* 18, 1906.

Jaye, M., Schlessinger, J., and Dionne, C. A. (1992). Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1135, 185-199.

Johnson, D. E., and Williams, L. T. (1993). Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 60, 1-41.

Kawano, M., Hirano, T., Matsuda, T., Taga, T., Horii, Y., Iwato, K., Asaoku, H., Tang, B., Tanabe, O., Tanaka, H., and et al. (1988). Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 332, 83-85.

Keegan, K., Johnson, D. E., Williams, L. T., and Hayman, M. J. (1991). Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1095-1099.

Kerbel, R. S. (1997). A cancer therapy resistant to resistance. *Nature* 390, 335-336.

Kerr, J. F., Winterford, C. M., and Harmon, B. V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73, 2013-2026.

Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S., and Ferrara, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362, 841-844.

Klein, B., Zhang, X. G., Lu, Z. Y., and Bataille, R. (1995). Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood* 85, 863-872.

Kornmann, M., Beger, H. G., and Korc, M. (1998). Role of fibroblast growth factors and their receptors in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Pancreas* 17, 169-175.

Kuenen, B. C., Giaccone, G., Ruijter, R., Kok, A., Schalkwijk, C., Hoekman, K., and Pinedo, H. M. (2005). Dose-finding study of the multitargeted tyrosine kinase inhibitor SU6668 in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 11, 6240-6246.

Kwabi-Addo, B., Ozen, M., and Ittmann, M. (2004). The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 11, 709-724.

Kyle, R. A. (1993). "Benign" monoclonal gammopathy--after 20 to 35 years of follow-up. *Mayo Clin Proc* 68, 26-36.

Laird, A. D., Christensen, J. G., Li, G., Carver, J., Smith, K., Xin, X., Moss, K. G., Louie, S. G., Mendel, D. B., and Cherrington, J. M. (2002). SU6668 inhibits Flk-1/KDR and PDGFRbeta in vivo, resulting in rapid apoptosis of tumor vasculature and tumor regression in mice. *Faseb J* 16, 681-690.

Laird, A. D., Shawver, L.K., Sukbuntherng, J. et al. (1999a). Su006668, a broad spectrum angiogenesis inhibitor exhibits potent anti-tumor activity in xenograft models, including regression of established tumors. *Biological Basis for Anti-Angiogenic Therapy*, Milan, Italy, 1999.

Laird, A. D., Sukbuntherg, J., Antonian, L. et al. (1999b). SU006668 a broad spectrum angiogenesis inhibitor, exhibits potent anti-tumor activity in xenograft models, including regression of established tumors. *Clin Cancer Res*.

Laird, A. D., Vajkoczy, P., Shawver, L. K., Thurnher, A., Liang, C., Mohammadi, M., Schlessinger, J., Ullrich, A., Hubbard, S. R., Blake, R. A., et al. (2000). SU6668 is a potent antiangiogenic and antitumor agent that induces regression of established tumors. *Cancer Res* 60, 4152-4160.

Larcher, F., Robles, A. I., Duran, H., Murillas, R., Quintanilla, M., Cano, A., Conti, C. J., and Jorcano, J. L. (1996). Up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse skin carcinogenesis correlates with malignant progression state and activated H-ras expression levels. *Cancer Res* 56, 5391-5396.

Lauta, V. M. (2003). A review of the cytokine network in multiple myeloma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer* 97, 2440-2452.

Lemoli, R. M., Martinelli, G., Zamagni, E., Motta, M. R., Rizzi, S., Terragna, C., Rondelli, R., Ronconi, S., Curti, A., Bonifazi, F., et al. (2000). Engraftment, clinical, and molecular follow-up of patients with multiple myeloma who were reinfused with highly purified CD34+ cells to support single or tandem high-dose chemotherapy. *Blood* 95, 2234-2239.

Li, L. Y., Safran, M., Aviezer, D., Bohlen, P., Seddon, A. P., and Yayon, A. (1994). Diminished heparin binding of a basic fibroblast growth factor mutant is associated with reduced receptor binding, mitogenesis, plasminogen activator induction, and in vitro angiogenesis. *Biochemistry* 33, 10999-11007.

Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

Mangi, M. H., and Newland, A. C. (2000). Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. *Br J Haematol* 111, 43-51.

Martinelli, G., Terragna, C., Zamagni, E., Ronconi, S., Tosi, P., Lemoli, R. M., Bandini, G., Motta, M. R., Testoni, N., Amabile, M., et al. (2000). Molecular remission after allogeneic or autologous transplantation of hematopoietic stem cells for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 18, 2273-2281.

Mignatti, P., Tsuboi, R., Robbins, E., and Rifkin, D. B. (1989). In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. *J Cell Biol* 108, 671-682.

Miguel-Garcia, A., Orero, T., Matutes, E., Carbonell, F., Miguel-Sosa, A., Linares, M., Tarin, F., Herrera, M., Garcia-Talavera, J., and Carbonell-Ramon, F. (1998). bcl-2 expression in plasma cells from neoplastic gammopathies and reactive plasmacytosis: a comparative study. *Haematologica* 83, 298-304.

Mineur, P., Menard, J. F., Le Loet, X., Bernard, J. F., Grosbois, B., Pollet, J. P., Azais, I., Laporte, J. P., Doyen, C., De Gramont, A., *et al.* (1998). VAD or VMBCP in multiple myeloma refractory to or relapsing after cyclophosphamide-prednisone therapy (protocol MY 85). *Br J Haematol* 103, 512-517.

Molina, J. R., and Rajkumar, S. V. (2003). Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma: closing in on the loop. *Haematologica* 88, 122-124.

Motzer, R. J., Michaelson, M. D., Redman, B. G., Hudes, G. R., Wilding, G., Figlin, R. A., Ginsberg, M. S., Kim, S. T., Baum, C. M., DePrimo, S. E., *et al.* (2006). Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24, 16-24.

Mullis, K. B., and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.

Mustonen, T., and Alitalo, K. (1995). Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol* 129, 895-898.

Ohta, Y., Endo, Y., Tanaka, M., Shimizu, J., Oda, M., Hayashi, Y., Watanabe, Y., and Sasaki, T. (1996). Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 2, 1411-1416.

Osgood, E. E. (1960). The survival time of patients with plasmocytic myeloma. *Cancer Chemother Rep* 9, 1-10.

Palman, C., Bowen-Pope, D. F., and Brooks, J. J. (1992). Platelet-derived growth factor receptor (beta-subunit) immunoreactivity in soft tissue tumors. *Lab Invest* 66, 108-115.

Parameswaran, R., Giles, C., Boots, M., Littlewood, T. J., Mills, M. J., Kelsey, S. M., and Samson, D. (2000). CCNU (lomustine), idarubicin and dexamethasone (CIDEX): an effective oral regimen for the treatment of refractory or relapsed myeloma. *Br J Haematol* 109, 571-575.

Parangi, S., Dietrich, W., Christofori, G., Lander, E. S., and Hanahan, D. (1995). Tumor suppressor loci on mouse chromosomes 9 and 16 are lost at distinct stages of tumorigenesis in a transgenic model of islet cell carcinoma. *Cancer Res* 55, 6071-6076.

Partanen, J., Makela, T. P., Alitalo, R., Lehvaslaiho, H., and Alitalo, K. (1990). Putative tyrosine kinases expressed in K-562 human leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8913-8917.

Peest, D., Deicher, H., Fett, W., Harms, P., Braun, H. J., Planker, M., Kindler, U., Klinkenstein, C., Schafer, E., Schumacher, K., and Siecke, H. (1996). Pyridinium cross-links in multiple myeloma: correlation with clinical parameters and use for monitoring of intravenous clodronate therapy--a pilot study of the German Myeloma Treatment Group (GMTG). *Eur J Cancer* 32A, 2053-2057.

Peterson, A. C., Swiger, S., Stadler, W. M., Medved, M., Karczmar, G., and Gajewski, T. F. (2004). Phase II study of the Flk-1 tyrosine kinase inhibitor SU5416 in advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 10, 4048-4054.

Podar, K., and Anderson, K. C. (2005). The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood* 105, 1383-1395.

Rajkumar, S. V., Fonseca, R., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Lust, J. A., Witzig, T. E., Kyle, R. A., Gertz, M. A., and Greipp, P. R. (2000). Thalidomide in the treatment of relapsed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 75, 897-901.

Ratta, M., Fagnoni, F., Curti, A., Vescovini, R., Sansoni, P., Oliviero, B., Fogli, M., Ferri, E., Della Cuna, G. R., Tura, S., *et al.* (2002). Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood* 100, 230-237.

Ria, R., Roccaro, A. M., Merchionne, F., Vacca, A., Dammacco, F., and Ribatti, D. (2003). Vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma. *Leukemia* 17, 1961-1966.

Rosen, L. S. (2005). VEGF-targeted therapy: therapeutic potential and recent advances. *Oncologist* 10, 382-391.

Sato, N., Hattori, Y., Wenlin, D., Yamada, T., Kamata, T., Kakimoto, T., Okamoto, S., Kawamura, C., Kizaki, M., Shimada, N., *et al.* (2002). Elevated level of plasma basic fibroblast growth factor in multiple myeloma correlates with increased disease activity. *Jpn J Cancer Res* 93, 459-466.

Sato, Y., Shimada, T., and Takaki, R. (1991). Autocrinological role of basic fibroblast growth factor on tube formation of vascular endothelial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 180, 1098-1102.

Seymour, L., Dajee, D., and Bezwoda, W. R. (1993). Tissue platelet derived-growth factor (PDGF) predicts for shortened survival and treatment failure in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 26, 247-252.

Sezer, O., Jakob, C., Eucker, J., Niemoller, K., Gatz, F., Wernecke, K., and Possinger, K. (2001). Serum levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 66, 83-88.

Singhal, S., Mehta, J., Desikan, R., Ayers, D., Roberson, P., Eddlemon, P., Munshi, N., Anaissie, E., Wilson, C., Dhodapkar, M., *et al.* (1999). Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 341, 1565-1571.

Smith, K., Fox, S. B., Whitehouse, R., Taylor, M., Greenall, M., Clarke, J., and Harris, A. L. (1999). Upregulation of basic fibroblast growth factor in breast carcinoma and its relationship to vascular density, oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and survival. *Ann Oncol* 10, 707-713.

Suematsu, S., Matsusaka, T., Matsuda, T., Ohno, S., Miyazaki, J., Yamamura, K., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1992). Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 232-235.

Vacca, A., Ria, R., Ribatti, D., Semeraro, F., Djonov, V., Di Raimondo, F., and Dammacco, F. (2003). A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma. *Haematologica* 88, 176-185.

Vacca, A., and Ribatti, D. (2006). Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia* 20, 193-199.

Vacca, A., Ribatti, D., Presta, M., Minischetti, M., Iurlaro, M., Ria, R., Albin, A., Bussolino, F., and Dammacco, F. (1999). Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood* 93, 3064-3073.

Vacca, A., Ribatti, D., Roncali, L., Ranieri, G., Serio, G., Silvestris, F., and Dammacco, F. (1994). Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol* 87, 503-508.

van de Donk, N. W., Lokhorst, H. M., and Bloem, A. C. (2005). Growth factors and antiapoptotic signaling pathways in multiple myeloma. *Leukemia* 19, 2177-2185.

Wadleigh, M., DeAngelo, D. J., Griffin, J. D., and Stone, R. M. (2005). After chronic myelogenous leukemia: tyrosine kinase inhibitors in other hematologic malignancies. *Blood* 105, 22-30.

Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R., and Folkman, J. (1991). Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324, 1-8.

Yaccoby, S., Barlogie, B., and Epstein, J. (1998). Primary myeloma cells growing in SCID-hu mice: a model for studying the biology and treatment of myeloma and its manifestations. *Blood* 92, 2908-2913.

Yonekura, K. M., K., Aoyagi, K. et al. (2000). A novel angiogenesis inhibitor, SU006668, strongly exhibiting in vivo anticancer activity. *Proc Am Soc Cancer Res* 41, 566.

Yu, J., Ustach, C., and Kim, H. R. (2003). Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *J Biochem Mol Biol* 36, 49-59.

Zhang, X. G., Klein, B., and Bataille, R. (1989). Interleukin-6 is a potent myeloma-cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma. *Blood* 74, 11-13.

Zhong, X. S., Zheng, J. Z., Reed, E., and Jiang, B. H. (2004). SU5416 inhibited VEGF and HIF-1alpha expression through the PI3K/AKT/p70S6K1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 471-480.

8. DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. W. Fiedler möchte für die gute wissenschaftliche und konzeptionelle Betreuung bei der praktischen Durchführung und schriftlichen Ausarbeitung der Doktorarbeit ausdrücklich danken.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an Frau Dr. Dr. S. Loges, die mich während der gesamten Arbeit im Labor und bei der Zusammenstellung meiner schriftlichen Arbeit mitbetreut hat und mir neben allen wissenschaftlichen Fragen auch freundschaftlich immer zur Seite stand.

Ich möchte ebenfalls Frau G. Vohwinkel und K. Bartels danken, die mich im Labor eingearbeitet haben und für Fragen und Probleme immer ein offenes Ohr hatten.

Der Abteilung Hämatologie/Onkologie und im speziellen Herrn Prof. Dr. D. K. Hossfeld sowie Herrn Prof. Dr. C. Bokemeyer möchte ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in dieser Abteilung durchführen und erstellen zu können an dieser Stelle danken.

Meiner Familie, Ursula, Horst und Malte Bruweleit, und Herrn Achim Klemm danke ich für ihren immerwährenden Beistand und all die liebevollen Aufmunterungen, die mich durch die Zeit der Fertigstellung dieser Arbeit getragen haben.

9. LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Melanie Bruweleit
Geburtsdatum: 17.04.1972
Geburtsort: Gifhorn
Familienstand: geschieden
Abitur: 1992 Otto-Hahn-Gymnasium, Gifhorn

HOCHSCHULAUSBILDUNG

1993 – 1998 Studium der „Biowissenschaftlichen Dokumentation“ mit dem Abschluss als Diplom-Dokumentarin (FH)
1998 – 2000 Vorklinischer Studienabschnitt an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH)
Ärztliche Vorprüfung 2000 (Medizinische Hochschule Hannover)
2000 – 2001 1. Klinischer Studienabschnitt an der Universität Hamburg
1. Staatsexamen 2001
2001 – 2004 2. Klinischer Studienabschnitt
2. Staatsexamen 2004
2004 – 2005 3. Klinischer Studienabschnitt (Praktisches Jahr)
3. Staatsexamen 2005; Approbation

FORSCHUNGSSCHWERPUNKTE

2001 – heute Medizinische Dissertation in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Eppendorf unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Fiedler

10. 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.

Hamburg, den 19.07.2006

Melanie Bruweleit