

Kerstin Schmidt
Dr. med.

Funktionelle und molekulare Effekte des Transfers von Anti-Angiogenesegenen in Rattenhepatomen

Geboren am 20.10.1978 in Mannheim
Staatsexamen am 02.06.2005 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach : Nuklearmedizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. Uwe Haberkorn

Das Wachstum maligner Tumoren ist maßgeblich von einer ausreichenden Blutversorgung abhängig. Deshalb scheint die Hemmung der Tumorangiogenese eine viel versprechende Option in der Behandlung maligner Tumorerkrankungen als auch in der Prävention von lokalen Rezidiven und der Metastasierung zu sein. Die Vorteile einer gefäßspezifischen Therapie von Tumoren sind das geringe Risiko einer Resistenzentwicklung und die hohe Spezifität der Therapie, die eine Anwendung bei verschiedenen Tumorarten ermöglicht.

Die Angiogenese wird streng durch die Balance von positiven und negativen Mediatoren kontrolliert. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) gehört zu den wichtigsten Induktoren der Angiogenese, indem er das Wachstum von Endothelzellen stimuliert und deren Gefäßpermeabilität erhöht. Eine Hemmung von VEGF durch den Gentransfer des löslichen VEGF-Rezeptors (sFlt) führt zur Wachstumsminderung und Tumorregression. Auch andere endogene Hemmstoffe wie Angiostatin (hANG), ein Spaltprodukt von Plasminogen, oder das aus Knorpel isolierte Troponin I (hTnI) zeigen starke inhibitorische Aktivität. Die Verlaufsbeobachtung dieser anti-angiogenen Therapieansätze mit funktionellen Bildgebungsverfahren und anschließenden histomorphologischen und Genexpressionsanalysen ermöglicht die Evaluation von physiologischen und biologischen Effekten, die durch diese neuen Therapiemodalitäten verursacht werden.

Um die funktionellen Änderungen im Angiogeneseprozess zu messen und nichtinvasive Bildgebungsverfahren zu entwickeln wurden stabile Morris Hepatom (MH 3924A)-Zelllinien hergestellt, welche den humanen löslichen VEGF-Rezeptor sFlt, hANG oder hTnI überexprimierten. Die Wirkung des Gentransfers auf die Proliferation und Apoptose von humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) wurde in Ko-Kulturexperimenten oder durch Kultur mit konditioniertem Medium von transfizierten Tumorzellen *in vitro* untersucht. Dabei wurde die Hemmung der Proliferation mittels ³H-Thymidin-Einbaus in die Endothelzellen gemessen. Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgte mittels YO-PRO-1[®] Färbung der Endothelzellen. In *in vivo* Experimenten wurden Tumorzellsuspensionen subkutan in den Oberschenkel von ACI- und RNU-Ratten injiziert und das Tumorstadium gemessen. Um Änderungen der Tumorphusion zu erfassen, wurden Positronenemissionstomographien (PET) mit dem frei diffusiblen Gewebepfusionsmarker H₂¹⁵O und dem Blutpoolmarker ⁶⁸Gallium-DOTA-Albumin durchgeführt. Zusätzlich wurde die Perfusion mit der dynamischen kontrastmittelverstärkten MRT (DCE-MRT) und der kontrastmittelverstärkten Power-Doppler-Sonographie gemessen. Anschließend wurden die Tumoren mittels Immunhistochemie auf Mikrogefäßdichte, Proliferation, Apoptose und Nekrose untersucht und Genexpressionsanalysen durchgeführt.

In den Ko-Kulturexperimenten als auch in den Experimenten mit konditioniertem Medium konnte eine Hemmung der Proliferation und eine Induktion der Apoptose in den Endothelzellen beobachtet werden. Ferner war das Wachstum in den genetisch modifizierten Tumoren im Vergleich zu den WT-Tumoren vermindert. Die Tumorgewebepfusion

hingegen, welche mit der $H_2^{15}O$ PET gemessen wurde, war in den hANG-überexprimierenden Tumoren erhöht, während die hTnI- und sFlt-überexprimierenden Tumoren eine verminderte Gewebepfusion zeigten. Dabei korrelierte die Gewebepfusion mit den immunhistomorphometrischen Messungen der Mikrogefäßdichte. Zusätzliche PET-Messungen mit ^{68}Ga -DOTA-Albumin ergaben keine signifikanten Änderungen in der Perfusion des intravaskulären Raumes der transfizierten Tumoren. Auch in der DCE-MRT und der kontrastmittelverstärkten Power-Doppler-Sonographie wurden Perfusionsunterschiede in den anti-angiogen transfizierten Tumoren gemessen. Die immunhistologischen Untersuchungen ergaben eine verminderte Proliferation bei gleichzeitig erhöhter Apoptoserate in den transfizierten Tumoren, während der Nekroseanteil abhängig vom anti-angiogenen Gentransfer für hANG vermindert, für hTnI erhöht und für sFlt unverändert blieb. Die Genexpressionanalysen zeigten vor allem Änderungen in Genen, die mit der Matrix, Signaltransduktion, Apoptose und dem Metabolismus assoziiert waren. Da die Änderungen der Genexpression vor allem im Tumorgewebe und nicht *in vitro* zu finden waren, repräsentiert dies Reaktionen der Tumorzellen auf ihre veränderte Mikroumgebung. Die Ergebnisse dieses Projekts zeigen, daß die Reaktion des verwendeten Tumormodells auf die Expression von Anti-Angiogenesegeenen komplexer Natur sind und neben den Änderungen von Gefäßdichte und Perfusion auch noch andere Prozesse eine Rolle spielen.

Der Gentransfer als auch die Verabreichung anti-angiogener Faktoren ist ein viel versprechender Therapieansatz, der ein Verständnis des Wirkmechanismus und eine geeignete Therapieüberwachung erfordert. Dabei könnten sowohl PET, MRT und Power-Doppler-Sonographie als Einzeluntersuchung oder in Form von Hybridtechnologien einen wichtigen Platz in der anti-angiogenen Therapieüberwachung finden. Als mögliche Ansatzpunkte der Bildgebung können dabei nicht nur Messungen der Perfusion, sondern auch von Proliferation und Apoptose dienen.