

Aus der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie  
Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. med. Detlef K. Bartsch  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Titel der Dissertation:

**In vivo Evaluation antiproliferativ-antiangiogener  
Therapiestrategien beim anaplastischen  
Schilddrüsenkarzinom**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Dennis Josephs aus Dortmund

Marburg, 2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Stand der Forschung</b>	<b>S. 6</b>
1.1. Einleitung	S. 6
1.1.1. Epidemiologie	S. 6
1.1.2. Histologische Klassifikation	S. 7
1.1.3. Klinische Prognose	S. 7
1.1.4. Klinische Stadieneinteilung	S. 8
1.1.5. Diagnostischer Pfad	S. 10
1.1.6. Therapie	S. 11
1.1.6.1. Papilläres und follikuläres Schilddrüsenkarzinom	S. 11
1.1.6.2. Medulläres Schilddrüsenkarzinom	S. 12
1.1.6.3. Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	S. 12
1.2. Stand der Forschung	S. 14
1.2.1. Pathophysiologie	S. 14
1.2.2. Medikamentenfunktionsweise	S. 18
1.2.2.1. Cetuximab	S. 19
1.2.2.2. AEE788	S. 20
1.2.2.3. Gefitinib	S. 20
1.2.2.4. Vandetanib	S. 21

<b>2. Material und Methoden</b>	<b>S. 23</b>
2.1. Material	S. 23
2.1.1. Zellkultur und Zellpräparation	S. 23
2.1.1.1. Reagenzien	S. 23
2.1.1.2. Materialien	S. 23
2.1.2. Einbettung und Aufbereitung der Schnitte	S. 24
2.1.2.1. Reagenzien	S. 24
2.1.2.2. Materialien	S. 24
2.1.3. Immunhistochemie	S. 24
2.1.3.1. Reagenzien	S. 24
2.1.3.2. Materialien	S. 25
2.1.3.3. Antikörper	S. 26
2.2. Methoden	S. 27
2.2.1. Allgemein	S. 27
2.2.2. Versuchstiere	S. 27
2.2.3. Zelllinie	S. 29
2.2.4. Zellkultur und Zellpräparation	S. 29
2.2.5. Einbettung und Aufbereitung der Schnitte	S. 31
2.2.6. Immunhistochemie	S. 32
2.2.6.1. Hämatoxylin/Eosin-Färbung	S. 32
2.2.6.2. Bromuridin-Färbung (BrdU)	S. 33

2.2.6.3. CD-31-Färbung	S. 34
2.2.7. Technische Auswertung der histologischen Bilder	S. 36
2.2.7.1. Auswertung der BrdU-Färbung	S. 36
2.2.7.2. Auswertung der CD-31-Färbung	S. 37
2.2.7.3. Datenerfassung	S. 40
2.2.7.3.1. BrdU-Färbung	S. 40
2.2.7.3.2. CD-31-Färbung	S. 40
2.2.7.4. Statistische Auswertung	S. 41
<b>3. Ergebnissteil</b>	<b>S. 42</b>
3.1. Allgemein	S. 42
3.2. Ergebnisse der Proliferation in der Bromuridinfärbung	S. 42
3.3. Ergebnisse der Neoangiogenese in der CD-31-Färbung	S. 45
3.4. Ergebnisse zur Volumenentwicklung der Tumore	S. 52
3.5. Ergebnisse zum Tumorgewicht	S. 56

<b>4. Diskussion</b>	<b>S. 59</b>
4.1. Einführung	S. 59
4.2. Zusammenfassung der Ergebnisse	S. 61
4.2.1. Proliferation	S. 61
4.2.2. Angiogenese	S. 63
4.3. Anmerkungen zum Auswertungsverfahren	S. 65
4.3.1. Allgemeines	S. 65
4.4. Fazit und Ausblick	S. 66
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>S. 68</b>

# **1. Einleitung und Stand der Forschung**

## **1.1. Einleitung**

### **1.1.1. Epidemiologie**

Das Schilddrüsenkarzinom ist die häufigste endokrine Tumorentität mit einem Anteil von 1,9% bei Frauen und 0,7% bei Männern an allen Krebsneuerkrankungen. Schilddrüsenkarzinome haben eine Inzidenz von 4,3 / 100.000 Erkrankungen pro Jahr bei Männern und 9,9 / 100.000 bei Frauen (Stand 2012). Dabei erkranken Frauen 2,3 fach häufiger an dieser Krebserkrankung als Männer. Die Mortalitätsrate ist relativ niedrig. 2008 starben insgesamt 708 Menschen, wobei der Anteil der Männer wesentlich niedriger war (39%) als der der Frauen (61%). Der prozentuale Anteil an allen Krebssterbefällen in der Bundesrepublik Deutschland im Jahre 2008 lag bei 0,5% (Männer) bzw. 0,5% (Frauen). Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Frauen bei 52 und für Männer bei 56 Jahren. Im Verhältnis zu anderen Tumorarten liegt das Erkrankungsalter der Schilddrüsenkarzinome damit deutlich niedriger (Robert-Koch-Institut 2012).

Gerade in den letzten Jahrzehnten ist eine steigende Inzidenz der papillären Schilddrüsenkarzinome weltweit zu verzeichnen (Luster 2010). Dieser Anstieg resultiert vor allem auf dem Anstieg von kleineren (<2 cm) Tumoren und jüngeren Patienten. Dies führt zu einer Veränderung der jüngeren Altersstruktur und einer insgesamt besseren Prognose.

### **1.1.2. Histologische Klassifikation**

Die Klassifikation der Schilddrüsenkarzinome lässt sich nach ihrer Herkunft ableiten. Die erste Unterteilung ist in Karzinome der Thyreozyten und Karzinome der C-Zellen (medulläres Karzinom). Bei den Thyreozyten kann man zwischen differenzierten und undifferenzierten (anaplastischen) Karzinomen unterscheiden. Die differenzierten Karzinome werden weiter unterteilt in eine papilläre und eine follikuläre Variante. Wie in anderen Tumorentitäten gibt es auch bei der Schilddrüse verschiedenste Mischformen. Man teilt das Karzinom dann der Gruppe zu, die den Hauptanteil am Gesamttumor stellt.

Das papilläre Karzinom weist die höchste Inzidenz von 60% - 70% auf. Gefolgt vom follikulären Karzinom mit 20% - 30%, dem medullären Karzinom mit 5% - 10% und der seltenen anaplastischen Variante (ca. 5%). Neben diesen Karzinomen, die die weitaus häufigste Gruppe darstellen, gibt es noch sehr seltene Varianten. Zu diesen zählen die Sarkome (Fibrosarkom, andere Sarkome), verschiedenartige Malignome (Karzinom-Sarkome, malignes Hämangioendotheliom, malignes Lymphom, malignes Teratom), nicht klassifizierbare maligne Tumore und Metastasen extrathyreoidaler Tumore. (Wittekind 2002)

### **1.1.3. Klinische Prognose**

Abhängig von dem jeweiligen Tumortyp ist die Zehn-Jahres-Überlebensrate sehr unterschiedlich. Die besten Werte ergeben sich für die häufigen papillären Formen (über 90%) und die follikulären Formen (75%). Bei den medullären Formen sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit auf 40%. Das anaplastische Schilddrüsenkarzinom wird nur bei ca. 5% aller Schilddrüsentumoren diagnostiziert, ist aber eines der aggressivsten Malignome. Nach Diagnosestellung liegt das mediane Überleben bei ca. 5 Monaten. Weniger als 20% überleben das erste Jahr nach Diagnosestellung (Nagaiah 2011). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass einige Tumore unter bestimmten Bedingungen durchaus einer spezifischen Therapie zugänglich sind. Allerdings bedarf dies einer genauen Analyse (Sugitani 2012).

### 1.1.4. Klinische Stadieneinteilung

Um das Stadium der Erkrankung festzulegen, bedient man sich der TNM-Klassifikation (UICC 2002). Die papillären, follikulären und medullären Schilddrüsenkarzinome werden zusammen eingeteilt. Ausnahme bildet das anaplastische Schilddrüsenkarzinom mit einer gesonderten Einteilung. Die folgende Tabelle verdeutlicht die Einteilung:

T1	<2 cm, begrenzt auf die Schilddrüse
T2	>2-4 cm, begrenzt auf die Schilddrüse
T3	>4 cm oder minimale Ausbreitung jenseits der Schilddrüse
T4a	Ausbreitung in Subcutis, Larynx, Trachea, Ösophagus, N. recurrens
T4b	Prävertebrale Faszie, mediastinale Gefäße, A. carotis

T-Klassifikation für das papilläre, follikuläre und medulläre Schilddrüsenkarzinom

T4	In allen Fällen
----	-----------------

T-Klassifikation für das anaplastische Schilddrüsenkarzinom

N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
N1a	Lymphknotenbefall zentral (Level VI n. Robbins)
N1b	Lymphknotenbefall lateral, mediastinal

N-Klassifikation aller Schilddrüsenkarzinomtypen

M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

M-Klassifikation aller Schilddrüsenkarzinomtypen

Tabelle 1: TNM-Klassifikation

Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3 T1, T2, T3	N0 N1	M0
Stadium IVA	T1, T2, T3 T4a	N1b N0, N1	M0
Stadium IVB	T4b	Jedes N	M0
Stadium IVC	Jedes T	Jedes N	M1

UICC-Einteilung beim papillärem, follikulärem und medullärem Schilddrüsenkarzinom

Stadium IV	Alle Fälle
------------	------------

UICC-Einteilung beim anaplastischen Schilddrüsenkarzinom

Tabelle 2: UICC-Stadien

### 1.1.5. Diagnostischer Pfad

Das diagnostische Vorgehen bei Verdacht auf einen Schilddrüsentumor beginnt mit der Beobachtung eines Knotens oder einer rasch wachsenden Struma (Reinwein 1989). Dieser Beobachtung schließt sich eine Palpation und eine Sonographie der Schilddrüse an. Adenome bzw. Karzinome stellen sich meist als echoarmer oder komplexer Knoten dar. In der Regel zeigen sich mikrofollikuläre Gewebestrukturen. Bei funktionellen Störungen wird

die Diagnostik durch eine Szintigraphie erweitert. Während man bei der Sonographie hochauflösend die Gewebestruktur bewertet, schaut man sich bei der Szintigraphie den Funktionsstatus des Organs an. Dieses bildgebende Verfahren beruht darauf, dass aktive Schilddrüsenzellen Jod aufnehmen. Hierbei nimmt die Zelle an der basalen Zellmembran aktiv über einen  $\text{Na}^+$ -Jodid-Transporter Jod aus dem Blutkreislauf auf. Dieser Mechanismus wird bei der Szintigraphie mit dem Radionuklid Technetium-99m ausgenutzt. Ein heißer Knoten spricht für ein autonomes Adenom. Ein kalter Knoten muss weiter überprüft werden. Am wegweisendsten für die Indikationsstellung Schilddrüsenkarzinom ist die Feinnadelbiopsie (Rüschoff 1997). Allerdings kann man erst nach einer Operation und pathologischer Auswertung den endgültigen Beweis erbringen.

Tumormarker werden in der allgemeinen Schilddrüsendiagnostik nicht routinemäßig (Ausnahme Calcitonin!!) eingesetzt. Hierbei dient das Thyreoglobulin bei papillären und follikulären Karzinomen eher als Verlaufsparemeter nach einer ablativen Therapie. Die Sensitivität und die Spezifität der Thyreoglobulin-Bestimmung liegt je nach Messmethode zwischen 85-95% (Hüfner 1986).

Beim medullären Karzinom dient die Calcitonin-Bestimmung als diagnostisches Verfahren und als Verlaufsparemeter im Rahmen der Nachsorge. Nach Gabe von Pentagastrin kommt es beim Vorliegen eines medullären Schilddrüsenkarzinoms zu einem pathologisch weit erhöhten Anstieg des Calcitonins. Besondere Beachtung findet das Calcitonin in der Diagnostik noch nicht manifester Krankheitsträger einer „Multiplen Endokrinen Neoplasie“ (Frilling 1997).

Die Behandlung ist von histologischen Typ und der Ausbreitung abhängig (Farahati 1996).

Klinisch imponiert das anaplastische Schilddrüsenkarzinom durch rasch progredientes Tumorwachstum im anterioren Halsbereich mit begleitender Dyspnoe, Schluckstörungen und Heiserkeit bedingt durch eine Stimmbandlähmung. Fatale Komplikationen sind bedingt durch Invasion in Trachea oder Ösophagus sowie durch die Entstehung von Fernmetastasen, die in 20 – 50% der Patienten diagnostiziert werden und häufig pulmonal lokalisiert sind (Pierie 2002). Prognostisch sind Alter, Geschlecht, und Fernmetastasierung sowie lokale Invasivität von Bedeutung. Aufgrund des aggressiven Wachstums und einem häufig lokal weit fortgeschrittenem Tumorstadium schon bei Diagnosestellung ist eine chirurgische

Eradikation nicht selten ohne Erfolg. In einer kleineren Fallstudie der Mayo Klinik in Rochester, Minnesota, konnte das Überleben durch eine aggressive Therapie mittels Chirurgie, Radiotherapie und Chemotherapie (4 Zyklen Docetaxel und Doxorubicin) in den Stadien IVA und IVB erhöht werden (Foote 2011).

## **1.1.6. Therapie**

### **1.1.6.1. Papilläres und follikuläres Schilddrüsenkarzinom**

Beim differenzierten Schilddrüsenkarzinom (papillär und follikulär) kommt im Regelfall die chirurgische Intervention als primäre Maßnahme in Betracht. Die Therapie der ersten Wahl ist in der Regel eine radikale Thyreoidektomie. Bei kleinen papillären Karzinomen (Stadium T1a) kann eine Lobektomie ausreichend sein (Witte 1997). Im Anschluss an die operative Behandlung folgt bei fortgeschrittenen Tumoren die Radiojodtherapie. Hierbei wird das Radionuklid Iod-131 verwendet. Diese Behandlung hat eine prophylaktische Ablation von postoperativen Geweberesten und Zellverbänden, sowie eine Therapie von Lymphknoten- und Fernmetastasen zum Ziel (Mazzaferri 1994). Die perkutane Strahlentherapie kommt nur bei einem Stadium pT4 mit Resektionsresten (R1 oder R2) und schlechter Differenzierung in Betracht (Sautter-Bihl 1997). Dieses Vorgehen wurde auch in der neuen AWMF-Leitlinie „Operative Therapie maligner Schilddrüsenerkrankungen“ von 2012 übernommen.

Nach abgeschlossener Primärtherapie ist eine Levothyroxingabe indiziert. Diese Hormontherapie bezweckt neben einer Hormonersatztherapie auch eine TSH-Suppression. TSH ist als Wachstumsfaktor für differenzierte Schilddrüsenkarzinome bekannt (Pujol 1996). Sollten die erwähnten Therapiemöglichkeiten keine Tumoreradikation erzielen, kommt in seltenen Ausnahmefällen bei Dedifferenzierung des Tumors eine Chemotherapie mit Cisplatin oder Adriamycin zur Anwendung (Raue 1997).

### **1.1.6.2. Medulläres Schilddrüsenkarzinom**

Beim medullären Schilddrüsenkarzinom ist die effektivste Therapie die operative Resektion. Ebenfalls ist auf eine sorgfältige Lymphknotenresektion zu achten, da bei tastbarem Befund meistens die regionären Lymphknoten schon befallen sind (Grimm 1997). Da medulläre Schilddrüsenkarzinome kein Jod speichern, hat die Radiojodtherapie bei dieser Tumorentität keine Bedeutung. Bei Rezidiven oder nicht vollständig entfernten Tumoren kann im Einzelfall eine perkutane Strahlentherapie erwogen werden. Eine Hormonbehandlung mit Levothyroxin kommt ebenfalls nicht in Betracht. Ist allerdings nach Thyreoidektomie als Hormonersatz notwendig. Bei Progression ist die Chemotherapie eine Option (Raue 1997). Hierzu wurde von der FDA im November 2011 und von der EMA im Februar 2012 die Zulassung für Vandetanib erteilt. Es ist für das fortgeschrittene metastasierte medulläre Schilddrüsenkarzinom zugelassen.

### **1.1.6.3. Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom (ASC)**

Das anaplastische Schilddrüsenkarzinom spricht üblicherweise nicht auf eine standardisierte Therapie mit Operation, Radiojod und L-Thyroxin an, dennoch sprechen neuere Erkenntnisse über die genetische Disposition der Patienten und über die molekulare Pathogenese für eine mögliche gezielte Therapie dieser Erkrankung. Zurzeit werden mehrere klinische Studien mit kleinemolekularen Tyrosinkinaseinhibitoren, Substanzen die u.a. die Apoptose fördern, die Proliferation und die Angiogenese hemmen, sowie gefäßzerstörenden Agenzien zur Therapie dieser Tumorerkrankung durchgeführt. (Verweis auf Abschnitt 1.2.2.)

Das anaplastische Schilddrüsenkarzinom nimmt seinen Ursprung aus Follikelzellen und entsteht entweder aus vorbestehenden differenzierten oder gering differenzierten Neoplasmen oder de novo. Histologisch unterscheidet man epitheloide Zellen und spindelzellige Varianten. In der Literatur werden aber auch osteoklastische Formen mit Bildung von Riesenzellen beschrieben. Es werden zusätzlich auch paucizelluläre Varianten,

lymphoepitheliomähnliche und karzinosarkomartige Morphologien erwähnt. Insgesamt zeichnet sich das anaplastische Schilddrüsenkarzinom durch eine große histologische Bandbreite mit einer inhomogenen Zellpopulation aus. Immunhistochemisch ist beim anaplastischen Schilddrüsenkarzinom häufig kein Thyreoglobulin nachweisbar.

Pathogenetisch wird das ASC u.a. durch eine Aktivierung maximaler Signaltransduktion verursacht durch das Tumorsuppressorgen p53 ausgelöst. Immunhistochemisch lassen sich dann bestimmte Charakteristika nachweisen (z. B. Erhöhung von TTF1, Verlust von NIS, etc.). Es werden multiple Tyrosinkinasekaskaden aktiviert, deren Schlüsselrolle dem PI3 K/AKT Signalweg zugeschrieben wird. Ricarte-Filho et al. konnten zeigen, dass in ASC aktivierende Mutationen in BRAF, RAS und PIK3CA vorkommen (Ricarte-Filho 2009). Mit immer neuer Erkenntnis über die molekularen Pathomechanismen eröffnet sich eine neue Bandbreite an möglichen Therapieoptionen. Verschiedenste Substanzen wurden erfolgreich in in-vitro und in Tierversuchen untersucht und befinden sich in der klinischen Studienphase (Smallridge 2009).

Mittels miRNA-Expressionsanalyse kann das ASC von differenzierten Schilddrüsenkarzinomen unterschieden werden (Schmid 2010).

Die totale Thyreoidektomie mit kompletter Lymphadenektomie des zentralen Lymphknotenhalbskompartiments stellt, sofern dies noch möglich ist, aktuell das Standardverfahren dar. Ziel der erweiterten Resektion ist das Erreichen einer R0- Situation. Multiviscerale Resektionen sind in der Regel nicht indiziert und das Debulking zur Vorbereitung einer multimodalen Behandlung wird kontrovers diskutiert.

Die Resektion sollte schnellst möglich und in toto erfolgen, da gezeigt werden konnte, dass gerade Lokalrezidive zu einer verkürzten Überlebensprognose und einer verminderten Lebensqualität führen (De Crevoisier 2004). Sollte sich intraoperativ zeigen, dass die zervikolateralen Lymphknoten ebenfalls suspekt erscheinen, sollte die Operation mit einer lateralen Kompartimentresektion erweitert werden.

Lokal-palliative Resektionen sollten beim ASC nicht durchgeführt werden, da die Aggressivität des Lokalrezidivs bei diesem histologischen Typ zu keiner Prognoseverbesserung führt. Bei Infiltration der Gefäßnervenscheide oder der Trachea ist

der Tumor irresektabel und kann onkologisch nicht korrekt operiert werden. Zur Verbesserung der Lebensqualität stehen palliative Maßnahmen wie Trachealstent oder Laserablation zur Verfügung.

Sobald die Wundverhältnisse es zulassen sollte der Patient nach einer R0-Resektion unmittelbar der perkutanen Strahlentherapie zugeführt werden (Brierley 2011). Dies dient der Lokalrezidivminimierung und soll die möglicherweise in situ verbliebenen Mikrometastasen in ihrem Wachstum kontrollieren. Hierbei werden Einzeldosen von 1,3 – 1,5 Gy täglich bis zu einer Gesamtdosis von 50 – 60Gy appliziert. Patienten die eine Gesamtdosis von mehr als 30 Gy erhalten haben, haben statistisch eine deutlich bessere Prognose (Kobayashi 1996).

Adjuvante Chemotherapie mit Adriamycin, Carboplatin, Cisplatin, Cyclophosphamid, Doxorubicin oder auch Etoposid zeigten in zahlreichen Studien eine komplette Therapieresistenz. Adjuvante Polychemotherapien mit befriedigenden Ansprechraten zeigten in älteren Studien keinerlei Vorteil im Gesamtüberleben (Tallroth 1987). Eine neuere Arbeit von Foote konnte in einem multimodalen Therapieansatz in einer kleinen Gruppe von Patienten das Gesamtüberleben deutlich erhöhen (Foote 2011).

## **1.2. Stand der Forschung**

### **1.2.1. Pathophysiologie**

Das zunehmende Wissen über die Genexpression in der Pathophysiologie des Schilddrüsenkarzinoms führte in den vergangenen Jahren zu einem besseren Verständnis der Tumorbiologie. Aufgrund von zahlreichen microarray-basierten Studien ergibt sich ein besseres Verständnis über die intrazellulären Signaltransduktionswege und damit neue medikamentöse Angriffspunkte in der Karzinomtherapie (Rusinek 2011; Handkiewicz-Junak 2010).

Eine zentrale Rolle bei der Entstehung des ASC (aber auch bei anderen Schilddrüsenkarzinomen) spielt der nuclear factor kappa B (nFkB). nFkB fördert die Karzinomentstehung durch die Regulation unterschiedlicher Gene, die die Onkogenese fördern. Nach Hanahan und Weinberg 2000 werden Tumorzellen durch sechs Veränderungen in der Zellphysiologie charakterisiert. Diese liegen in der Fähigkeit zu eigenständigem Wachstum, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Auslösung von Zelluntergang (Apoptose), unbegrenzter Replikation von Zellen, Potenzierung der Angiogenese sowie Gewebeinvasion und Metastasierung. Die Gene, die diese Effekte modulieren unterliegen der Transkriptionskontrolle von nFkB.

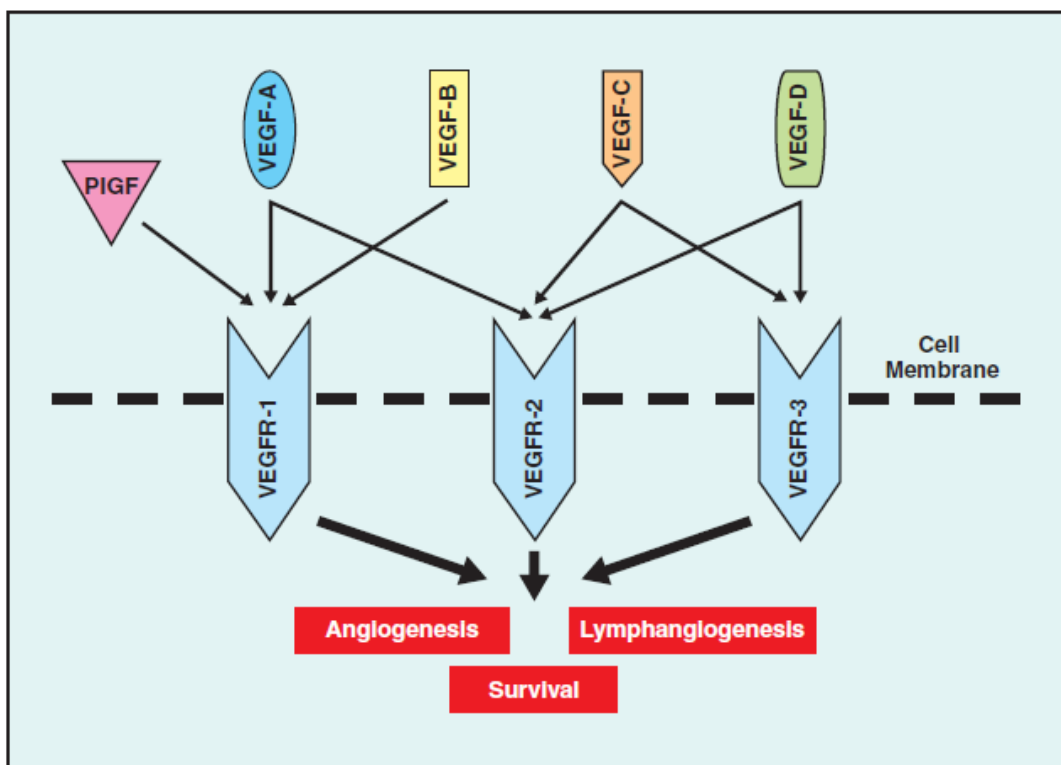
nFkB gehört zur Familie der Transkriptionsfaktoren, die Apoptose, Inflammation und Immunabwehr beeinflussen (Ghosh 1998), aber auch die Entstehung von VEGF und EGF.

nFkB reguliert unter anderem die Transkription von VEGF und EGF. Durch die autokrine Aktivierung von EGF wird die Entstehung maligner Zellen im Schilddrüsengewebe begünstigt sowie die Ausschüttung von VEGF getriggert, wodurch die Tumorangiogenese einsetzen kann. Die dadurch entstehende Gefäßproliferation ist für die Entstehung maligner Schilddrüsentumore entscheidend (Ramsden 2000). Die Regulation von VEGF unterliegt aber nicht alleine dem Faktor EGF, sondern auch dem Thyroidea stimulierenden Hormon (TSH) (Hoffmann 2004). Die Überexpression von VEGF führt bei den meisten Tumoren so wie auch in der Schilddrüse zu einer linearen Verschlechterung der Prognose (Jain 2006).

VEGF wurde in den frühen 1970er Jahren von Folkmann et al (Folkman 1971) als mitogener Faktor bei kapillären Endothelzellen in Tumoren entdeckt und obwohl bereits Mitte der 1970er Jahre gezeigt werden konnte, dass die Prävention der Neovaskularisierung Tumorwachstum inhibiert gelang erst in den 1990er Jahren der Nachweis, dass zwischen der Expression und Angiogenese durch VEGF und Tumorwachstum ein direkter Zusammenhang besteht. (Brem 1975; Ferrara 1993). VEGF reguliert jedoch nicht nur die Proliferation, sondern auch die Angiogenese mit der Proliferation und Permeabilität von Gefäßen in normalem Gewebe und beeinflusst die Neovaskularisierung antiapoptotisch. Die Ausschüttung von VEGF erfolgt wie bereits erwähnt durch TSH und EGF. Zusätzlich wird der Faktor aber auch durch Hypoxie, Onkogene und Cytokine stimuliert. Ergänzt wird die Wirkung von VEGF durch den so genannten platelet derived growth factor, (PDGF), basic

fibroblast growth factor, (bFGf), transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), und Angiopoietine. Der PDGF Rezeptor induziert die Transkription und Sekretion von VEGF und damit die Angiogenese. Da die Rolle von PDGF noch nicht vollständig geklärt ist, steht als Target VEGF im Zentrum des therapeutischen Ansatzes.

Die biologische Funktion von VEGF beinhaltet die Bindung an Tyrosinkinaserzeptoren, die mit VEGF-R 1, VEGF-R 2 und VEGF-R 3 bezeichnet werden. Jeder Rezeptorsubtyp steht für eine eigene Molekülstruktur und löst durch Bindung von VEGF-A und VEGF-C unterschiedliche Signaltransduktionswege an der Zellmembran aus. VEGF-R 2 ist der zentrale Rezeptor für die Angiogenese, er aktiviert sowohl den Phosphatidylinositol 3 Kinase/Akt Transduktionsweg wie auch die Ras –Kaskade, die über die Aktivierung der MAP-Kinasen läuft (Homsí 2007).



Grafik 1: VEGF – Liganden und Rezeptorinteraktionen (Quelle: Homsí 2007)

Seit einigen Jahren stehen multiple Substanzen zur Verfügung, die durch Hemmung von VEGF das Tumorwachstum entscheidend verringern.

Als zweiter Angriffspunkt für einen medikamentösen Therapieansatz steht der epidermal growth factor (EGF) mit seinem Rezeptor (EGF-R) im Focus. EGF gehört zu einer großen Familie von Peptiden und beeinflusst maßgeblich die Embryogenese, sowie das Zellwachstum. Mutationen in der Kinasedomäne des Rezeptors für EGF sind verantwortlich für die Aktivierung von Signaltransduktion, Motilität, Zelladhäsion und Antiapoptose. Zusätzlich wirkt EGF als ein starkes Mitogen bei follikulären Schilddrüsenzellen, wobei es die Resistenz der Zellen auf Wachstumsinhibitoren steigert und die unlimitierte Replikation und Metastasierung induziert (Mincione 2011). Potenziert wird dieser mitogene Effekt durch EGF-induziert gesteigerte autokrine Sekretion von VEGF, vor allem bei gleichzeitiger Dysfunktion des TSH-Rezeptors (Hoffmann 2004). In unserer eigenen Arbeitsgruppe führten wir ein Screening auf Proteine in ASC durch, welche einen möglichen Ansatzpunkt zur VEGF-Hemmung ergeben könnten. Dabei zeigte sich eine deutlich erhöhte Konzentration von VEGF, aber auch von FGF-2 und Endostatin (Hoffmann 2006).

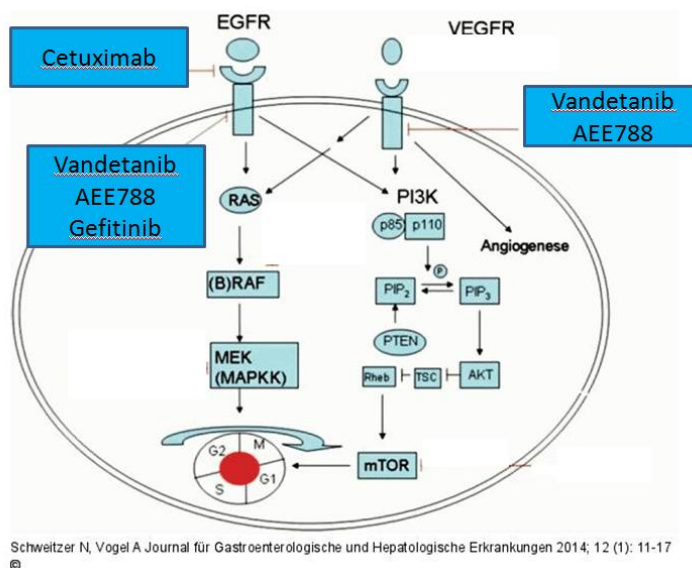
Bei der Entstehung von anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen ist im Wesentlichen die vermehrte Expression von EGF-R-1 Protein beteiligt. Besonders in Abwesenheit eines funktionell aktiven TSH-Rezeptors entsteht eine überproportionale Menge an EGFR, die auch mit der schlechten Prognose des Tumorleidens assoziiert ist (Akslen 1993; Schiff 2004). Die Aktivierung des EGF-R führt über Phosphorylierungsprozesse zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege unter anderem der mitogen aktivierten Proteinkinase (Ras/Raf-MAPK) und Akt (Akt-PI3K) Signalwege, die die Zellproliferation und das Überleben von Zellen begünstigen (Summy 2005; Santarpia 2008; Xing 2010). In vitro konnte nachgewiesen werden, dass der Einsatz von anti EGF-R und anti TGF $\alpha$  Antikörpern die Proliferation von Tumorzellen hemmt (Gabler 1997).

Als Promotoren der Angiogenese und der Zellproliferation stehen VEGF-R und EGF-R als wichtige Angriffspunkte einer innovativen medikamentösen Therapie des ATC im Mittelpunkt. Dabei spielen die Tyrosinkinase eine Schlüsselrolle und eine Vielzahl von Tyrosinkinaseinhibitoren und ihre Wirkung auf die Tumorgenese/-proliferation sind Gegenstand klinischer und in vitro Untersuchungen. In der vorliegenden Arbeit kamen AEE788, ZD1839 und ZD6474, sowie deren Kombinationen zum Einsatz. Allen gemeinsam ist die Hemmung der Tyrosinkinase, die wie bereits oben erwähnt durch ihre Bindung an VEGF-R Signaltransduktionswege auslöst, die die Angiogenese begünstigen. Zusätzlich hemmen

diese Substanzen die Aktivität der Tyrosinkinase am EGF-R. Weiterhin wurde die Wirkung des EGF-Antikörpers Cetuximab auf die Tumorproliferation und Angiogenese untersucht, sowie die Kombination zwischen Antikörper und Tyrosinkinaseinhibitor.

### 1.2.2. Medikamentenfunktionsweise

Die nachfolgende Graphik soll einen initialen Überblick über die verwendeten Medikamente und deren Funktionsweise im Zellzyklus geben. Während Vandetanib und AEE788 als Tyrosinkinaseinhibitoren den epidermal growth factor-Rezeptor (EGF-R) und den vascular epidermal growth factor- Rezeptor (VEGF-R) gleichermaßen blockieren, blockiert Gefitinib intrazellulär nur den EGF-R und Cetuximab als monoklonaler Antikörper den EGF-R extrazellulär. Beide Rezeptoren spielen eine zentrale Rolle bei der Zellproliferation und der Angiogenese.



Grafik 2: Wirkungsorte der verwendeten Medikamente

### 1.2.2.1 Cetuximab (Erbix®)

Cetuximab (Erbix®) bindet als chimärer monoklonaler Antikörper vom Typ IgG1 an den EGF-Rezeptor und inhibiert dadurch den nachfolgenden Signaltransduktionsweg. Außerdem potenziert Cetuximab die Radiosensitivität von Tumoren, hemmt die Zellproliferation sowie die Zellreparation nach der Bestrahlung und die Angiogenese (Kim 2001).

Wiseman et al. konnten in ihren Microarray-Untersuchungen zeigen, dass auf anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen die EGF-Rezeptoren um bis zu 84% überexprimiert sind (Wiseman 2007).

Weiterhin konnte in unserer eigenen Arbeitsgruppe in in-vitro-Versuchen gezeigt werden, dass Cetuximab eine Absenkung der VEGF-Sekretion bei Schilddrüsenkarzinomzellen von ca. 15% bewirkt (Hoffmann 2007).

Kim S. et al. zeigten 2006 in in-vivo Versuchen, dass mittels Cetuximab eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums erreicht werden konnte. In der Einzeltherapie mit Cetuximab und Irinotecan konnte eine Tumorwachstumshemmung von 73% beziehungsweise 79% nachgewiesen werden (Kim 2006).

Die Substanz wurde 2004 in der EU zur Behandlung von Colonkarzinomen zugelassen und zur Zeit sind bei vielversprechenden Erfolgen in experimentellen Untersuchungen 4 weltweit gemeldete klinische Studien für den Einsatz bei anaplastischen Kopf-Hals-Tumoren gemeldet (clinical trials.gov). Seit 2006 ist Cetuximab in Kombination mit Chemotherapie von der FDA zur Behandlung von squamösen Kopf-Hals-Tumoren zugelassen. In Europa trugen die positiven Ergebnisse der EXTREME –Studie dazu bei, dass Cetuximab als first line Therapie bei der Therapie von squamösen Kopf-Halstumoren eingesetzt wird (Licitra 2011).

#### **1.2.2.2. AEE788**

AEE788 hemmt als dualer spezifischer Tyrosinkinaseinhibitor sowohl EGF-R als auch VEGF-R. Dabei wird die Phosphorylierung des growth factor induzierten EGF-R gehemmt, wodurch die Hemmung auf das Tumorwachstum resultiert. Die Substanz ist ein Pyrimidinderivat (C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>) und ihre antiproliferative Wirkung wurde bereits mehrfach bei Brust-, Lungen- und Blasenkarzinomen sowie bei squamösen Tumoren des Kopf-Halsbereiches beschrieben. (Traxler 2004; Yigitbasi 2004). So konnten die Arbeiten von Traxler et al. eine 57% signifikante Tumorregression aufzeigen. In squamösen Kopf-Hals-Tumoren konnte die Gruppe um Yigitbasi et al. eine Apoptoseerhöhung um 50% nachweisen. Aber auch bei follikulären Schilddrüsenkarzinomen kam AEE788 erfolgreich zum Einsatz (Younes 2005). Zurzeit sind beim NIH 4 Studien mit AEE788 gemeldet, dabei handelt es sich aber vorwiegend um Untersuchungen an Glioblastoma multiforme (Clinical trials.gov). AEE788 hemmt über seine inhibitorische Wirkung an VEGF-R auch die Tumorangiogenese. Dies konnte ebenfalls in der Arbeit von Hoffmann et al. 2007 gezeigt werden. Die in-vitro-Versuche an ATC-Zellen zeigten eine Reduktion von VEGF von 55% und eine Zellproliferationsverringering von bis zu 75% (Hoffmann 2007).

Anhand der Effekte, die AE788 auf die Proliferation anderer Tumoren gezeigt hat, könnte die Substanz einen vielversprechenden Erfolg bei der Therapie gering differenzierter und anaplastischer Schilddrüsenkarzinome haben, klinische Studien dazu sind bisher nicht durchgeführt worden.

#### **1.2.2.3. Gefitinib (ZD1839; Iressa®)**

Gefitinib, Iressa® oder ZD1839 ist ein selektiver Tyrosinkinaseinhibitor, der den Signaltransduktionsweg über EGFR inhibiert. Gefitinib hemmt EGFR über die Bindung an der ATP-Bindungsstelle. Die Substanz ist daher nur bei Tumoren mit erhöhter oder mutierter EGFR Aktivität wirksam. In den Arbeiten von Tamura et al konnte in in-vitro Versuchen

bewiesen werden, dass Gefitinib die Apoptose in Neuroblastomzellen signifikant erhöht (Tamura 2007). Ebenfalls konnte eine reduzierte Proliferationsrate in squamösen Tumoren des Kopf-Halsbereichs gezeigt werden (Lee 2007).

Seit 2009 ist Gefitinib zur Behandlung nicht kleinzelliger Bronchialkarzinome zugelassen. Aktuell sind 4 große Studien beim NIH gemeldet von denen eine sich mit dem Einsatz von Gefitinib bei Schilddrüsenkarzinomen beschäftigt, in den anderen Studien wird die Wirksamkeit der Substanz auf ZNS-Tumore und nicht kleinzellige Lungenkarzinome untersucht (clinical trials.gov). Aktuell existieren keine klinischen Studien zur Behandlung anaplastischer Schilddrüsenkarzinome mit Gefitinib. Aufgrund der hohen Effektivität als Monotherapie bei nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen wäre die klinische Evaluation bei ATC jedoch wünschenswert.

#### **1.2.2.4. Vandetanib (Caprelsa®)**

Vandetanib, Caprelsa® oder ZD6474 ist ebenfalls ein Tyrosinkinaseinhibitor, der EGFR und VEGFR gleichermaßen blockiert. Es konnte im Vorfeld dieser Arbeit an mehreren anderen Tumorentitäten zum Beispiel beim hepatozellulären Karzinom gezeigt werden, dass Vandetanib einen regulatorischen Effekt auf die Hypervascularität, die Neoangiogenese und die Apoptose hat (Gianelli 2006). Drevs zeigte in seinen in-vivo-Versuchen an Nierenzellkarzinomzellreihen, dass die Behandlung mit Vandetanib eine Tumorreduktion von 79% im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 21 Tagen erbrachte. Weiterhin konnte die Anzahl der Lungenmetastasen um ebenfalls 79% gesenkt werden (Drevs 2004).

Vandetanib wurde 2011 von der FDA zur Behandlung inoperabler medullärer Schilddrüsenkarzinome zugelassen. Die meisten klinischen Untersuchungen bisher wurden jedoch an Patienten mit nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen durchgeführt. Beim NIH sind 88 Studien mit Vandetanib gemeldet, davon werden 10 bei Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen durchgeführt. Mehrheitlich wird die Substanz in diesen Studien bei

medullären Schilddrüsenkarzinomen eingesetzt, die klinische Erprobung bei anaplastischen Tumoren steht noch aus ([clinical trials.gov](http://clinicaltrials.gov)).

Aufgrund der aktuellen Studienlage ist der Einsatz der beschriebenen Tyrosinkinaseinhibitoren zwar in experimentellen Untersuchungen beschrieben, der klinische Einsatz bei Schilddrüsenkarzinomen insbesondere beim anaplastischen Schilddrüsenkarzinom ist jedoch nicht ausreichend untersucht.

In der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, dass der Einsatz von monoklonalen anti-EGF-Antikörpern zu einer Wachstumshemmung von anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen führt. Nach den vorliegenden Daten beruht dieser Effekt auf einer signifikanten Reduktion der Proliferation auf der einen Seite und einer reduzierten Angiogenese auf der anderen Seite. Im Fokus stehen die EGF- und VEGF-Rezeptoren als Schlüsselbausteine. Die Hemmung der EGF- und VEGF-Rezeptoren soll weiterhin mit Tyrosinkinaseinhibitoren getestet werden. Es wird der Frage nachgegangen, ob die Kombination von Tyrosinkinaseinhibitoren und Antikörpern einen synergistischen Effekt bezüglich der Reduktion der Proliferation und der Angiogenese hat.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Zellkultur und Zellpräparation

##### 2.1.1.1. Reagenzien:

DMEM/HAMS F-12 (1:1) (FGM)	Art.-Nr.: F-4815; Biochrom AG, Deutschland
Fetales Rinderserum (FCS)	Art.-Nr.: 563-EE; Biochrom AG, Deutschland
H5-Medium (DMEM/HAMS F-12 mit Glutamin)	Art.-Nr.: FG-4815; Biochrom AG, Deutschland
Matrigel (1mg/ml)	Becton Dickinson, USA
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Art.-Nr.: L-1825; Biochrom AG, Deutschland
Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraacetat; 0,05%/0,02%)	Art.-Nr.: L-2145; Biochrom AG, Deutschland
Trypanblau 0,1%	Hausapotheke der Philipps-Universität Marburg

##### 2.1.1.2. Materialien:

Küvetten (verschiedene Größen)	Reference Eppendorf AG, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	
Pipetten (verschiedene Volumina)	Reference Eppendorf AG, Deutschland
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Reference Eppendorf AG, Deutschland
Wärmeschrank	Typ: T5042E; Heraeus Instruments GmbH, Deutschland
Zellkulturflaschen (flasks; 550ml)	Greiner Biochemika GmbH, Deutschland

## 2.1.2. Einbettung und Aufbereitung der Schnitte

### 2.1.2.1. Reagenzien:

Ethanol (70, 80, 96, 100%)	Art.-Nr.: 32205; Riedel-de Haen GmbH, Deutschland
Methylbenzoat	Art.-Nr.: 1.06059; Merck KGaA, Deutschland
Paraffin	Art.-Nr.: V0-5-1001; Vogel; Deutschland
Xylol	Art.-Nr.: 1.08681; Merck KGaA, Deutschland

### 2.1.2.2. Materialien:

Deckgläser	Menzel Gläser GmbH & Co KG, Deutschland
Diametermesser	Absolut Digimatic, Mitutoyo Systems, Japan
Diverse Glasgefäße und Messzylinder	
Kühlschrank	Typ: Duofrost; Linde AG, Deutschland)
Mikroskop	Typ: DMLB; Leica Microsystems AG, Deutschland
Mikrotommesser	Typ: Stainless Steel S35; Feather Safety Razor Co, LTD., Japan
Objektträger	SuperFrostPlus; Menzel Gläser GmbH & Co KG, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Service-Nr: 30008278; Heraeus Instruments GmbH, Deutschland
Wärmeschrank	

## 2.1.3. Immunhistochemie

### 2.1.3.1. Reagenzien:

ABC-Komplex	
BSA	
DAB-Chromogen (3,3´Diaminobenzidin- Tetrahydrochlorid)	Art.-Nr.: S3000; DakoCytomation GmbH, Deutschland
Citratpuffer (10mM, pH 6,0)	Eigenherstellung

Eindeckelmedium permanent	Roti Histokitt; Art.-Nr.: 6638.1; Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Eosin (0,5% alkoholisch)	Art.-Nr.: HAT110-1-32; Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Ethanol (70, 80, 96, 100%)	Art.-Nr.: 32205; Riedel-de Haen GmbH, Deutschland
Hämalaun nach Meyer	Art.-Nr.: 1.09249; Merck KGaA, Deutschland
Methanol	Art.-Nr.: UN 1230; Riedel-de Haen GmbH, Deutschland
Natronlauge (2N)	Art.-Nr.: 1.09136; Merck KGaA, Deutschland
Pferde-Normalserum	
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Art.-Nr.: L-1825; Biochrom AG, Deutschland
Streptavidin-HRP	Art.-Nr.: 554066; BD Biosciences Pharmingen, Deutschland
TRIS-Base (Trishydroxymethylaminomethan)	Art.-Nr.: 4855.2; Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Wasserstoffperoxid (30%)	Art.-Nr.: 1.08597; Merck KGaA, Deutschland
Xylol	Art.-Nr.: 1.08681; Merck KGaA, Deutschland

### 2.1.3.2. Materialien

Feuchte Kammer (f. Inkubation)	Klinikeigenbau der Feinmechanik
Küvetten (verschiedene Größen)	Reference Eppendorf AG, Deutschland
Mikroskop	Typ: DMLB; Leica Microsystems AG, Deutschland
Mikrowelle	
Objektträger	SuperFrost Plus; Menzel Gläser GmbH & Co. KG, Deutschland
PAP-Pen	
Pipetten (verschiedene Volumina)	Reference Eppendorf AG, Deutschland
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Reference Eppendorf AG, Deutschland
Präparatekästen	Jäckel, Deutschland
Wärmeschrank	Typ: T5042E; Heraeus Instruments GmbH, Deutschland

### 2.1.3.3. Antikörper

#### BrdU-Färbung

Primärantikörper: Anti-Bromodeoxyuridine,  
Monoclonal Mouse, Clone Bu20a, IgG1 kappa

Art.-Nr.: M 0744; DakoCytomation GmbH,  
Deutschland

Sekundärantikörper: VECTA-stain

#### CD31-Färbung

Primärantikörper: PECAM1 (M20), goat polyclonal  
IgG

Art.-Nr.: sc-1506; SantaCruz Biotechnology, Inc.,  
USA

Sekundärantikörper: donkey anti-goat IgG, biotin  
conjugated

Art.-Nr.: sc-2042; SantaCruz Biotechnology, Inc.,  
USA

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Allgemein**

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei anaplastische Zellkulturlinien (C643, KAT 4) in Nu/Nu –Nacktmäuse xenotransplantiert und das Tumorwachstum mittels eines monoklonalen EGF-Rezeptor Antikörpers und dreier Tyrosinkinaseinhibitoren gehemmt. Die Untersuchung wurde nach Vorlage der Erlaubnis der örtlichen Tierschutzbehörde durchgeführt.

### **2.2.2. Versuchstiere**

Pro Versuchsreihe wurden 10 pathogenfreien fünf bis sechs Wochen alten Nu/Nu-Nacktmäusen Tumorzelllinien subkutan injiziert. Bei den Tieren handelt es sich um Knockout Mäuse beide Geschlechter aus eigener Zucht, bei denen das Gen FOXP1 entfernt wurde. Phänotypisch zeichnen sie sich durch eine Thymusaplasie und dadurch bedingte T-Zell-Defizienz aus. Das durch die fehlende T-Zellfunktion veränderte Immunsystem gewährleistet das Wachstum von xenotransplantierten Geweben und Zelllinien.

Die Tiere wurden artgerecht in eigens dafür vorgesehenen sterilen Käfigen auf laminar air flow unter Einbehaltung eines 12-Stunden Tag/Nachtrhythmus gehalten. Die Fütterung erfolgte mittels autoklavierten Standardfutters (LAS vendi®, Harlem Winkelmann) und Trinkwasser. Vor Beginn der Versuche wurden die Tiere mindestens sieben Tage an ihre neue Umgebung adaptiert. Das Versuchsvorhaben wurde von der örtlichen Ethikkommission genehmigt und bei der zuständigen Tierschutzbehörde in Gießen gemeldet. Wegen der gegebenen Infrastruktur konnten nicht alle Versuche parallel durchgeführt werden. Daher erfolgte die Testung in je 2 Versuchsreihen zu je 2 Substanzen.

Zu Versuchsbeginn wurden jeweils  $3 \times 10^6$  Karzinomzellen (Konzentration:  $1,5 \times 10^6$  Zellen /100 $\mu$ l) pro Versuchstier subkutan in die rechte Flanke injiziert (siehe Abschnitt „Zellkultur und Zellpräparation“). Um das Anwachsen der Tumorzelllinien zu erleichtern wurden die Zellen in einer Suspension bestehend aus Zelllinie und einer Basalmembranmatrix (Matrigel; 300 $\mu$ g/ml) unter die Unterhaut eingebracht.

Nach 7 Tagen wurde die Tumorgenese evaluiert, hierzu wurden nur Tiere mit in die Versuchsreihe aufgenommen, welche einen messbaren Tumordurchmesser von mind. 5mm aufwiesen. Anschließend wurden die Tiere den unterschiedlichen Behandlungsgruppen randomisiert zugeteilt. Die Mäuse erhielten als Chemotherapie entweder die Tyrosinkinaseinhibitoren AEE788 (Novartis Deutschland), Vandetanib (ZD6474, Zactima<sup>®</sup>; Astra Zeneca), oder Gefitinib (ZD1839, Iressa<sup>®</sup>; Astra Zeneca) sowie Cetuximab (Erbix<sup>®</sup>; Merck) einen monoklonalen Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF).

In der ersten Versuchsreihe wurde der monoklonale anti-EGF-Antikörper Cetuximab und der duale spezifische Tyrosinkinaseinhibitor AEE788 jeweils einzeln und in Kombination getestet. In der zweiten Versuchsreihe wurde der selektive Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib, der den Signaltransduktionsweg über EGFR inhibiert, und der duale Tyrosinkinaseinhibitor Vandetanib einzeln und in Kombination verglichen.

AEE788 (50mg/kg Körpergewicht), Vandetanib (50mg/kg Körpergewicht) und Gefitinib (50mg/kg Körpergewicht) wurden oral über eine vorher eingelegte Magensonde appliziert, die Gabe von Cetuximab (50mg/kg Körpergewicht) erfolgte per intraperitonealer Injektion. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten die jeweilige Trägersubstanz/Lösung oral als phosphatgepufferte Kochsalzlösung in Kombination mit dem Lösungsmittel Polysorbat 20 oder Polyethylenglykol mit Methylpyrolidinon. Die Kontrolltiere der Cetuximabgruppe erhielten intraperitoneal PBS.

Im wöchentlichen Abstand wurden die Tumore mittels Schieblehre vermessen, das Gewicht der Versuchstiere kontrolliert und auf eventuelle Nebenwirkungen wie Kannibalismus, Tumorulzerationen oder neurologische Defizite überprüft. Bedingt durch diese Nebenwirkungen verringerten sich die Versuchstiergruppen um 2 – 4 Tiere.

In Abhängigkeit vom Tumorwachstum wurden die Mäuse zwei bis drei Wochen nach Tumorzellimplantation mittels CO<sub>2</sub>-Narkose euthanasiert, der Tumor chirurgisch entfernt, vermessen, gewogen und anschließend in 4% Formalin aufbewahrt. Eine Stunde vor der Tötung der Tiere wird allen intraperitoneal 1 mg Bromuridin intraperitoneal injiziert um die anschließende Anfärbung der teilungsaktiven Tumorzellkerne zu ermöglichen. Die weitere Verarbeitung zu Gewebsschnitten erfolgte nach einem standardisierten Protokoll. (s. Abschnitt 2.2.5.)

### **2.2.3. Zelllinie**

In unseren Versuchen verwendeten wir eine anaplastische Schilddrüsenkarzinomzelllinie, welche aus einem humanen chirurgischen Präparat gewonnen wurde (Kat-4). Die Zellen werden in unserer Zelldatenbank verwaltet und in Stickstoff bei -194°C aufbewahrt.

### **2.2.4. Zellkultur und Zellpräparation**

Die oben beschriebenen Zellen wurden in serumhaltigem Standardmedium (FGM = DMEM/HAM'S F-12 (1:1) ohne Glutamin Fa Biochrom F4815, supplementiert mit 10% FCS) unter Standardbedingungen (37°C und 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert und in 550ml Kulturflaschen angezogen.

Während der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (0,025%/1M) aus den Kulturflaschen gelöst, mit PBS gewaschen und anschließend in FGM resuspendiert. Die Überprüfung einer Einzelzellsuspension wurde mittels Lichtmikroskopie durchgeführt. Die Vitalität der kultivierten Zellen wurde mit dem Tryphanblau-Assay überwacht.

Bei der Zellpräparation zur Injektion in die Tiere wurde als erstes das Medium abgezogen und die Kulturflaschen mit je 10ml PBS gewaschen. Im Inkubator erfolgte dann das Ablösen der Zellen mit kaltem 5 ml Trypsin/EDTA. Danach wurden die Zellen erneut in 15 ml FGM

aufgenommen und mit 1000rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 2ml FGM resuspendiert. Nun erfolgte die Zellzahlbestimmung mittels einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden 100µl Zellsuspensionsaliquot in 900µl Lösung bestehend aus 800µl PBS und 100µl Trypanblau (1:5 vorverdünnt) vermischt. Mit der folgenden Berechnung wurde die Zellzahl bestimmt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{gezählte Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor (10)}$$

( $10^4$  = Konstanter Faktor, der sich aus der Größe der Zellkammer ergibt)

Zellzahl gesamt: Zellzahl/ml x Volumen in dem die Zellen aufgenommen wurden

Nach erfolgter Bestimmung der vorliegenden Zellzahl wurden die Zellen weiter für die Injektion vorbereitet. Die Zellsuspension wurde erneut bei 1000rpm für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend das Medium abgezogen. Das Pellet wurde in H5-Medium aufgenommen. Hierzu 2/3 des gewünschten Volumens mit H5-Medium aufgefüllt und 1/3 des Gesamtvolumens Matrixgel (1mg/ml) hinzugegeben. Somit ergab sich bei zum Beispiel sechs Tieren und 200µl pro Tier ein Endvolumen von 1,2ml, dass heißt das Pellet wurde mit 0,8ml H5-Medium aufgenommen und mit 0,4ml Matrixgel (1mg/ml) versetzt. H5-Medium beinhaltet Insulin (10µg/ml), Transferrin (5µg/ml), Somatostatin (10ng/ml), G-H-L-Acetat (2ng/ml), Hydrocortison (0,36ng/ml) und Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM).



Nu/Nu Nackmäuse mit Flankentumor

### 2.2.5. Einbettung und Aufbereitung der Schnitte

Nach Entnahme der Tumore aus den Mäusen erfolgte die chirurgische Aufbereitung mit Säuberung und Entfernung des umliegenden Fettgewebes, sowie das Wiegen und Vermessen.

Vor der Einbettung des Gewebes wurden die Proben mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Dazu wurden die Tumorstücke mit 70%igem Alkohol gewaschen und anschließend für zwei Stunden darin inkubiert. Während dieser Zeit wurde der Alkohol insgesamt drei Mal erneuert um die Konzentration aufrecht zu erhalten. Anschließend erfolgte die Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80, 96, und 100 %) für jeweils zwei Stunden. Danach wurde das Gewebe für 12 Stunden in konzentriertem Methylbenzoat konserviert welches mittels 15 minütiger Spülung mit Xylol wieder entfernt wurde. Die Tumorproben wurden dann in mit Eiweißglycerin beschichtete Förmchen positioniert. Diese wurden zur Hälfte mit geschmolzenem Paraffinwachs gefüllt und anschließen im Kühlschrank bei 7 Grad zum Abkühlen aufbewahrt. Nach erfolgter Aushärtung wurden die Blöcke mittels Mikrotom in 4 $\mu$ m messende Scheiben geschnitten und diese mittels Inkubation in Xylol für 5

- 6 Minuten und anschließender Waschung mit absteigender Alkoholkonzentration (100, 80, 70%) für jeweils 5 Minuten entparaffiniert. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit Aqua destillata gespült, auf Objektträgern fixiert und anschließend mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt um die Tumormorphologie zu identifizieren. Anhand der Ergebnisse wurde entschieden welche Schnitte den weiteren Färbungsmethoden zugeführt wurden.

## **2.2.6. Immunhistochemie**

### **2.2.6.1. Hämatoxylin/Eosin-Färbung**

Diese Färbungsmethode beruht auf der Tatsache, dass die beiden Farbstoffe Hämatoxylin und Eosin jeweils entweder basische oder saure Zellbestandteile anfärben. Dadurch erscheint z.B. der Zellkern durch die Anreicherung mit Hämatoxylin in der bekannten bläulichen Farbe, da er Desoxyribonukleinsäure enthält, während basische Bestandteile wie z.B. Zellplasmaproteine durch Eosin in rötlicher Farbe dargestellt werden.

Bei der praktischen Durchführung dieser Färbungsmethode wurden die Objektträger mit den Schnitten für 7 – 10 Minuten in Hämalaun inkubiert, mit Aqua destillata gespült und für 15 Minuten in Leitungswasser zum Bläuen konserviert. Das Wasser wurde während dieser Zeit 1 – 2 Mal gewechselt. Danach wurden die Objektträger für ½ bis 1 Minute in Eosin in 0,5% alkoholischer Lösung, die 1 – 2 Tropfen Eisessig getaucht und wiederholt in Aqua destillata getaucht bis die Lösung sich entfärbt zeigte. In aufsteigender Alkoholreihe (70, 80 und 100%) wurden die Schnitte für 2 x 5, 5 und noch einmal 2 x 5 Minuten inkubiert und anschließend mit 4 x 5 Minuten in Xylol fixiert. Zum Eindecken der Objektträger wurde das Deckblättchen mit Eukitt befestigt.

### 2.2.6.2. Bromuridin-Färbung (BrdU)

Den Mäusen wurde eine Stunde vor der Euthanasie 1mg Bromuridin intraperitoneal gespritzt. Hierzu wurden 5mg Bromuridin in 1ml PBS gelöst und anschließend jedem Tier 0,2ml injiziert. In dieser Stunde wurde das Thymidinanalogon Bromdesoxyuridin (BrdU) bei in Zellteilung befindlichen Zellen in die Desoxyribonukleinsäure (DNS) eingebaut. Da sich das BrdU somit nur in proliferierenden Zellen einlagert, ist eine Aussage über die Zellteilung im Tumor möglich.

Vor der eigentlichen Färbung wurden die ausgewählten Schnitte entparaffiniert. Hierzu erfolgte die Abschmelzung der Schnitte bei 60° für eine Stunde im Wärmeschrank. Anschließend wurden die Schnitte vier Mal in Xylol für fünf Minuten gewaschen und in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 80% und 70%) rehydriert. In der Vorbehandlung wurde die DNS demarkiert, dazu erfolgte in einem ersten Schritt das Erhitzen der Präparate für 30 Minuten in 10mM Citratpuffer mit einem pH von 6,0 bei 600W in der Mikrowelle. Nach 20minütigen Abkühlen erfolgte die DNS-Denaturierung mittels 2N HCL bei 37 °C im Wärmeschrank. Die Denaturierung ist notwendig, da die DNS einzelsträngig vorliegen muss, um das in die DNS eingebaute BrdU mit Hilfe von Antikörpern nachweisen zu können. Anschließend wurde mit PBS 5 Minuten gewaschen und die endogene Peroxidaseaktivität mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über 30 Minuten geblockt. Es wurde erneut zweimal mit PBS gewaschen und die Präparate mit einem Fettstift (PAP-Pen) auf dem Objektträger eingekreist. Um eine Eintrocknung der Präparate zu verhindern wurden die kommenden Schritte in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Die eigentliche Färbung begann mit dem Inkubieren der Präparate mit Blockserum. Hierbei wurden unspezifische Bindungsstellen geblockt, welche zu falsch positiven Ergebnissen geführt hätten. Hierzu wurde 250 µl aus einer Lösung von 9ml PBS mit 1ml BSA und 150µl Pferdeserum für 30 Minuten auf jeden Objektträger gegeben. Danach erfolgte ohne vorherige Waschung die Inkubation für 45 Minuten bei Raumtemperatur mit 250µl eines monoklonalen anti-BrdU Primärantikörper (mouse, DAKO, MO744). Der Primärantikörper wurde im Verhältnis 1:200 mit PBS/BSA verdünnt. Nach der ersten Inkubation wurden die Objektträger zweimal zu je fünf Minuten mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation für 30

Minuten bei Raumtemperatur mit 250µl einem biotinyliertem Sekundärantikörper (VECTA-stain), ebenfalls in einer 1:200 Verdünnung mit PBS. Anschließend wurden erneut zwei Waschungen für jeweils fünf Minuten mit PBS durchgeführt. Die vierte Inkubation erfolgte mit 250µl eines ABC-Komplexes (100µl A + 100µl B in 10ml PBS) für weitere 30 Minuten. Dieser Komplex sorgte für eine verstärkte Präsentation der an das Biotin gebundenen Horse Raddish Peroxidase (HRP). Nach zweimaliger fünfminütiger Waschung mit PBS wurde mit 250µl Diaminobenzidin-(DAB)-Chromogen inkubiert. Vorher wurden 10mg DAB-Chromogen in 10ml Tris-Puffer gelöst. Davon wiederum wurden 2ml mit 120µl 3%igem Wasserstoffperoxid gemischt und für die fünfte Inkubation verwendet. Die Einwirkdauer betrug 12 Minuten und erfolgte in der Dunkelkammer. In dieser Zeit sorgte die gebundene Peroxidase mittels dem DAB-Chromogen für den typischen bräunlichen Farbumschlag in den proliferierenden Zellkernen. Anschließend wurden die Schnitte mit Aqua destillata gewaschen. Es folgte die Gegenfärbung mit 250 µl Hämalun bei einer Verdünnung von 1:5 mit Aqua destillata für 10 Sekunden. Unter fließendem Wasser kam es für 15 Minuten zum Bläuen. In aufsteigender Ethanolreihe (70%, 85%, 100%, 100%) wurden die Präparate jeweils für fünf Minuten dehydriert. Im letzten Schritt erfolgte noch eine viermalige Waschung mit Xylol für ebenfalls fünf Minuten und das abschließende Eindeckeln mit Eukitt.

### **2.2.6.3. CD-31-Färbung**

Diese Färbung zielte auf das PECA-Molekül-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) auf den Endothelzellen. Endothelien sind die einzigen menschlichen Zellen welche CD31 oder auch PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule) genannt auf ihren Zelloberflächen exprimieren. Daher dient diese Färbung zur Darstellung von Gefäßen.

Die ersten Schritte dieser Färbung erfolgten analog zur Bromuridinfärbung. Vor der eigentlichen Färbung wurden die ausgewählten Schnitte entparaffiniert. Hierzu erfolgte die Abschmelzung der Schnitte bei 60° für eine Stunde im Wärmeschrank. Anschließend wurden die Schnitte vier Mal in Xylol für fünf Minuten gewaschen und in einer absteigenden

Alkoholreihe (100%, 100%, 80% und 70%) rehydriert. In der Vorbehandlung erfolgte die Markierung, dazu wurden in einem ersten Schritt die Präparate für 30 Minuten in 10mM Citratpuffer mit einem pH von 6,0 bei 600W in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde dreimal mit PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen und die endogene Peroxidaseaktivität mit 3% H<sub>2</sub>H<sub>3</sub> über 30 Minuten geblockt. Es wurde erneut mit PBS gewaschen und die Präparate mit einem Fettstift (PAP-Pen) auf dem Objektträger eingekreist. Um eine Eintrocknung der Präparate zu verhindern wurden die kommenden Schritte in einer feuchten Kammer durchgeführt.

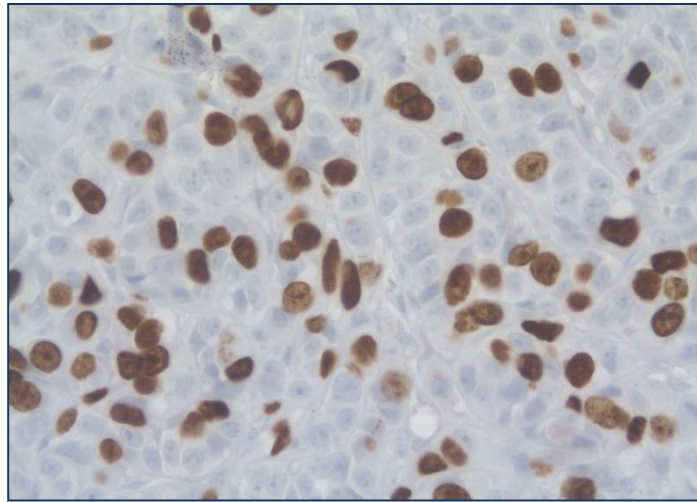
Es folgte das Inkubieren mit Blockserum (Pferde-Serum 1:20 in PBS/BSA1%) für 30 Minuten um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Ohne Waschung wurde auf die Präparate 250µl Primärantikörper (PECAM-1(M-20): sc 1506; goat polycl.) 1:1000 verdünnt bei 4 °C für 12 Stunden appliziert. Am darauffolgenden Tag wurden die Objektträger jeweils dreimal für 5 Minuten gewaschen. Anschließend erfolgte bei Raumtemperatur mit 250µl biotinyliertem Sekundärantikörper (donkey anti-goat, sc-2042) 1:200 verdünnt in PBS für 30 Minuten die dritte Inkubation. Nach dreimaligem fünfminütigem Waschen erfolgte die nächste Inkubation bei Raumtemperatur mit 250 µl Streptavidin (Streptavidin-HRP, Cat.-Nr.: 554066, BD Pharmingen)1:100 verdünnt in PBS. Dieser Schritt dient durch Anlagerung von mehr Peroxidase an einem Antigen der deutlicheren farblichen Markierung. Nach erneuter Waschung mit zweimal PBS für je 5 Minuten wurde mit 250µl Diaminobenzidin-(DAB)-Chromogen inkubiert. Vorher wurden 10mg DAB-Chromogen in 10ml Tris-Puffer gelöst. Davon wiederum wurden 2ml mit 12µl 3%igem Wasserstoffperoxid gemischt und für die fünfte Inkubation verwendet.

Anschließend wurden die Schnitte mit Aqua destillata gewaschen. Es folgte die Gegenfärbung mit 250µl Hämalun bei einer Verdünnung von 1:5 mit Aqua destillata für 10 Sekunden. Unter fließendem Wasser kam es für 15 Minuten zum Bläuen. In aufsteigender Ethanolreihe (70%, 85%, 100%, 100%) wurden die Präparate jeweils für fünf Minuten dehydriert. Im letzten Schritt erfolgte noch eine viermalige Waschung mit Xylol für ebenfalls fünf Minuten und das abschließende Eindeckeln mit Eukitt.

## **2.2.7. Technische Auswertung der histologischen Bilder**

### **2.2.7.1. Auswertung der BrdU-Färbungen**

Die Auswertung der histologischen Bilder wurde mittels LEICA QWin, einer Bildverarbeitungs- und Bildanalyse-Software, durchgeführt. Diese Software bietet die Möglichkeit sowohl die Bilder aufzunehmen, wie auch sie zu bearbeiten. Mittels einer an das Mikroskop (Mikroskop LEICA DMLB) gekoppelten Videokamera werden die Bilder in bestimmten Größen und Farbkodierungen nach einem zuvor ausgetesteten und festgelegten Standard in den Rechner eingelesen. Für unsere Untersuchungen wurden die unterschiedlichen Farben und Farbschattierungen detektiert, markiert und ausgewertet. Die Farberkennung wurde jeweils entsprechenden Strukturen zugeordnet, da dadurch die Gewebeeigenschaften in den Präparaten besser charakterisiert werden konnten. So wurden z.B. für alle Chromogen gefärbten Areale braune, antigenbesetzte Stellen im Zellkern erkannt und als binäres Bild per Mausclick markiert und gespeichert. Bei der Bildbearbeitung wurden die markierten Areale pro Quadratmillimeter im Verhältnis zu den nicht markierten gesetzt und als Prozentsatz angegeben. Pro Präparat wurden bei jeder Färbung 10 repräsentative Bildausschnitte ausgewertet. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes bestand ein festgelegtes Protokoll mit immer konstanter Einstellung. Weiterhin wurden alle Untersuchungen von der gleichen Person durchgeführt um den interindividuellen Bias möglichst klein zu halten.



Präparat nach Bromuridin-färbung

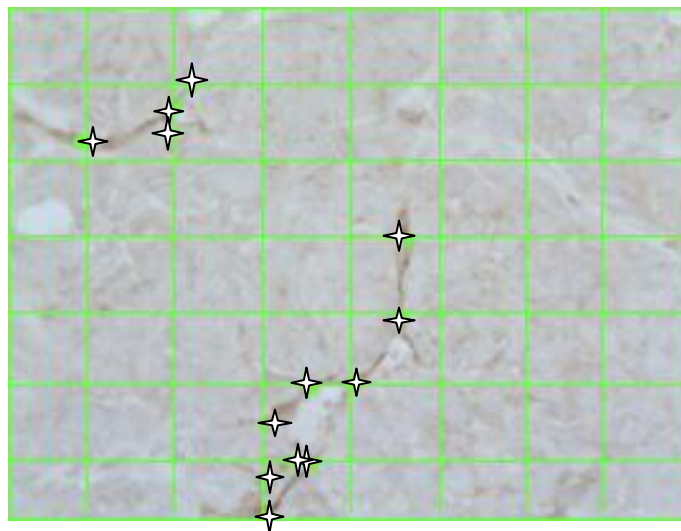
#### 2.2.7.2. Auswertung der CD-31-Färbung

Für die Auswertung der Gefäßarchitektur zur Beurteilung der Neoangiognese wurde ebenfalls die Qwin-Software eingesetzt. Bei dieser Anwendung wurde bei 400-facher Mikroskopvergrößerung und einem Vergrößerungswechsler von 0,63 ein Raster mit Kantenlängen von 246 und 183 $\mu\text{m}$ , das später auf Quadratamillimeter umgerechnet wurde auf den Bildausschnitt projiziert. Der Bildausschnitt entsprach dabei einer Fläche von 45018 $\mu\text{m}^2$ , respektive 0,045  $\text{mm}^2$ . Das zu messende Areal wurde manuell festgelegt um vitale Tumoreale zu treffen und damit avitale/nekrotische Areale von der Auswertung auszuschließen.



Präparat nach CD-31-Färbung

Danach wurde per Mausklick die Anzahl der Schnittpunkte der gefärbten Gefäßwandareale mit 6 x 6 Linien des Gitternetzes markiert. Dabei wurden 36 Gitterkreuzungspunkte und eine Gesamtlänge der Linien von 2574 $\mu$ m festgelegt.



Präparat mit Gitternetz

Aufgrund der Tumormorphologie stand nicht immer der gesamte Bildausschnitt zur Auswertung zur Verfügung. Daher wurde der tatsächliche Tumorgewebeanteil ( $V_{v(\text{str})}$ ) nicht mittels einer digitalen Flächenmessung errechnet, sondern mittels der folgenden Gleichung, in die die über dem Tumorgewebe liegenden Gitterkreuzpunkte ( $I_{\text{str}}$ ,

Intersections of Stroma) eingehen.

Gleichung zur Berechnung des Tumorgewebeanteils:

$$V_{v(\text{str})} = I_{\text{str}} / 36$$

Wie bereits erwähnt wurden die Schnittstellen (number of intersections,  $I_n$ ) des sowohl tangential wie auch quer angeschnittenen Gefäßendothels mit der Gitternetzlinie markiert. Bei jedem Präparat wurden stichprobenartig 10 Bildausschnitte bei konstanter Vergrößerung ausgewählt und bewertet. Zur weiteren Bearbeitung wurden die Anzahl der Schnittstellen sowie die Fläche des Tumorgewebeanteils in einer Tabelle mittels Excel-Software gespeichert. Die Gefäßoberflächendichte (vascular surface density, VSD, Barth et al 1996) wurde unter Zuhilfenahme folgender Formel, die sich unter Einbeziehung der Division der Schnittstellenanzahl ( $\sum I_n$ ) mit der Gesamtlänge der Linien ( $L_R$ ), die mit dem Tumorgewebeanteil multipliziert wurde, errechnet.

Gleichung zur Berechnung der VSD:

$$VSD = (\sum I_n * 2) / (L_R \times V_{v(\text{str})})$$

Als abschließende Dimension für die VSD wird die Gefäßoberfläche pro Tumolvolumen ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ ) angegeben.

Zusätzlich zur Gefäßdichte wurde auch die Anzahl der sichtbaren Gefäße (number of vessels per  $\text{mm}^2$  stroma, NVES, Barth et al 1996), beziehungsweise Endothelien pro Bildausschnitt, per Hand gezählt ( $N$  = gezählte Gefäße) und in der Ergebnistabelle ergänzt. Unter Berücksichtigung des Tumoranteils wurden die NVES mittels folgender Gleichung ermittelt:

Gleichung zur Berechnung der NVES

$$NVES = N / V_{v(\text{str})}$$

### **2.2.7.3. Datenerfassung**

#### **2.2.7.3.1. BrdU-Färbung**

Für die Ermittlung der Proliferationsrate mittels BrdU-Färbung wurden von jedem Tumor zehn Bildausschnitte ausgewertet. Der Mittelwert wurde daraufhin in einer Exeltabelle dem jeweiligen Versuchstier zugeordnet. Nach erfolgter Auswertung aller Versuchstiere einer Gruppe wurde wiederum der Mittelwert mit der Standardabweichung für einen Behandlungsarm berechnet. Diese Vorgehensweise wurde bei allen Versuchsgruppen gleich angewendet und zusammengefasst in einer zusätzlichen Exeltabelle verwaltet. (s. 3. Ergebnisse)

#### **2.2.7.3.2. CD-31-Färbung**

Nach dem unter Punkt 2.2.7.2. beschriebenen Verfahren wurden die Daten generiert. Hierzu wurden 20 repräsentative Bildausschnitte des Tumors ausgewertet. Das verwendete Programm addierte alle manuell gesetzten Markierungen und gab diese in einer Auswertungstabelle wieder. Gleichzeitig wurde der Mittelwert berechnet und ebenfalls angegeben. Der Tumorgewebeanteil, die Länge der Rasterlinien und die Messfeldgröße waren in allen Bildausschnitten gleich. Manuell wurde die Gefäßanzahl gezählt und anschließend in die Tabelle eingefügt werden. Mit Hilfe einer Funktion von Excel konnten dann die benötigten Daten (VSD und NVES) berechnet werden. Die erstellten Tabellen mit den Mittelwerten und Standardabweichungen der einzelnen Tiere wurden dann in einer

weiteren Tabelle für die gesamte Versuchsgruppe zusammen gefasst. (s. 3. Ergebnisse)

#### **2.2.7.4. Statistische Auswertung**

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der ermittelten Werte bedienen wir uns des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests (Synonyme: Wilcoxon-Rangsummentest, U-Test). Dieser Test ist ein parameterfreier Test und dient als Homogenitätstest der Überprüfung der Signifikanz auf Übereinstimmung zwischen zwei Verteilungen.

Ursprünglich geht der Test auf den Deutschen Pädagogen Gustav Deuchler zurück. Internationale Beachtung und damit auch Verwendung fand der Test nach den Veröffentlichungen 1945 von Frank Wilcoxon und Henry Mann (Wilcoxon 1945 und Mann 1947).

Aufgrund der zum Teil kleinen Versuchsgruppen mit großer Standardabweichung wurde in Kooperation mit der Medizinischen Biometrie ein  $p$ -Wert  $< 0,01$  als signifikanter Unterschied festgesetzt.

### **3. Ergebnissteil**

#### **3.1. Allgemein**

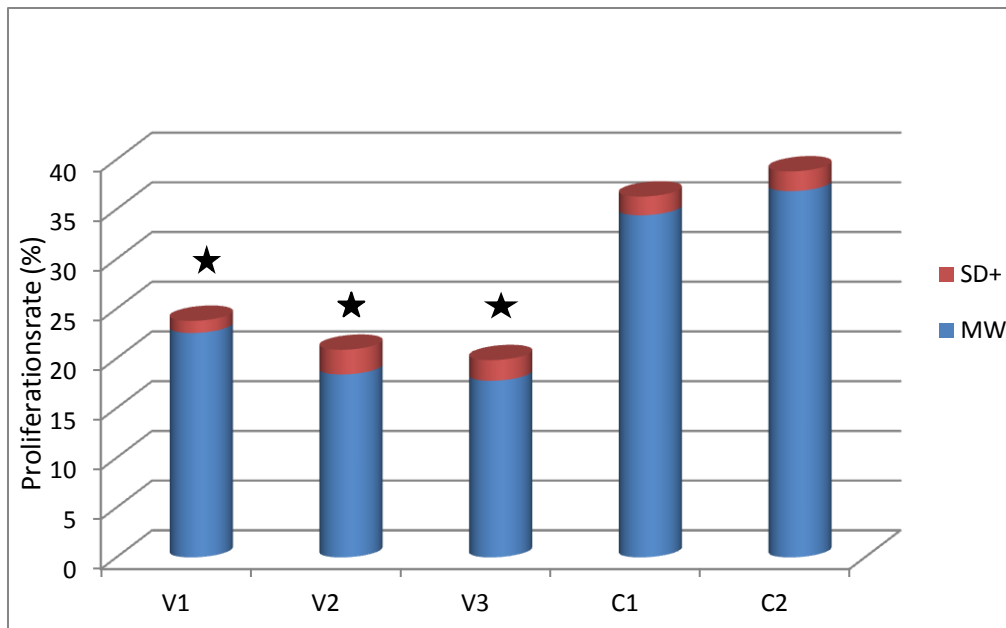
In der vorliegenden Untersuchung wurde das Tumorwachstum und die Neoangiogenese beim anaplastischen Schilddrüsenkarzinom in Nu/Nu Nacktmäusen unter Einwirkung von Cetuximab, AEE788, Gefitinib und Vandetanib, sowie deren Kombinationen verglichen. Als Kontrollgruppen wurden Mäuse mit den Trägersubstanzen (PBS = Kontrollgruppe zu Cetuximab), PEG + NMP (Kontrollgruppe zu AEE788), PBS + Tween (Kontrollgruppe zu Gefitinib und Vandetanib) und Tiere ohne Behandlung verwendet. Tween und NMP wurden in den Kontrollgruppen zu PBS zugefügt, um die Einflüsse dieser Substanzen auf das Tumorwachstum auszuschließen. Die jeweiligen Messergebnisse werden als Mittelwert (MW) und der dazugehörigen Standardabweichung (SD; standard deviation) angegeben.

#### **3.2. Ergebnisse der Proliferation in der Bromuridinfärbung**

	V1	V2	V3	C1	C2
MW	22,57	18,40	17,77	34,41	36,84
SD	1,22	2,48	2,07	1,88	1,98

Tabelle 3: Anteil proliferierender Zellen unter Cetuximab und AEE788 in Prozent (%)

Legende: V1 = Cetuximab; V2 = AEE788; V3 = Cetuximab + AEE788; C1 = PBS; C2 = PEG + NMP



Grafik 3: Anteil proliferierender Zellen unter Cetuximab und AEE788 in Prozent (%)

Legende: V1 = Cetuximab; V2 = AEE788; V3 = Cetuximab + AEE788; C1 = PBS; C2 = PEG + NMP; ★ =  $p < 0,01$  zur Kontrollgruppe

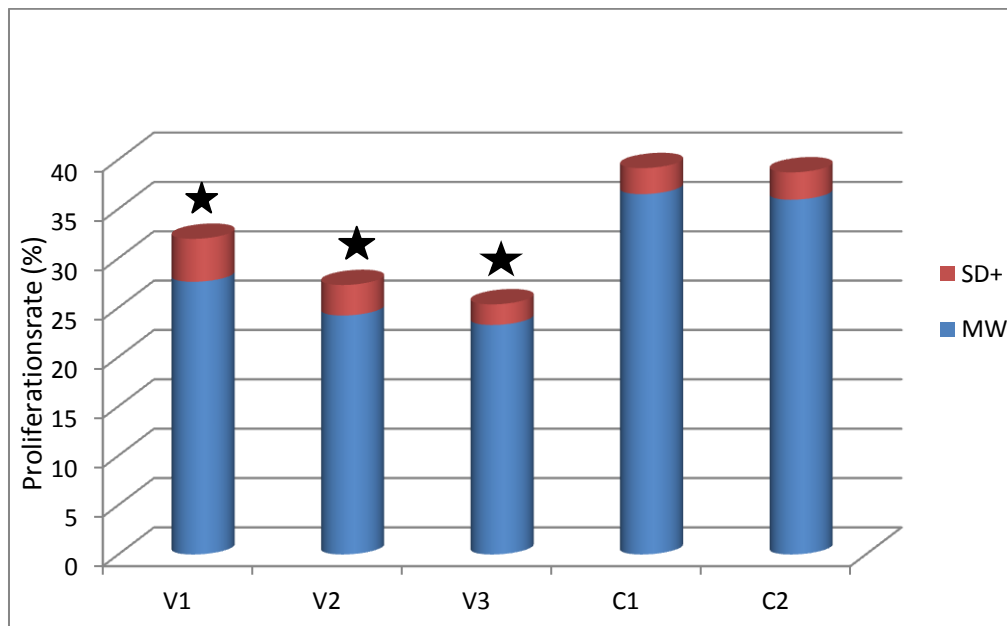
Wie in Tabelle 3 beschrieben wird unter Cetuximab bei Nu/Nu Nacktmäusen eine Proliferationsrate von 22,57% (SD 1,22, n=8) beobachtet. Im Vergleich dazu war in der entsprechenden Kontrollgruppe (C1) eine Proliferation von 34,41% (SD 1,88, n = 7) zu verzeichnen. Unter Applikation von AEE788 betrug die Tumorphiliferationsrate 18,4% (SD 2,48, n=6), während in der korrelierenden Vergleichsgruppe (C2) die Tumorstumsrate 36,84% betrug (SD 1,98, n=5). Die Kombination des monoklonalen Antikörpers Cetuximab und des Tyrosinkinaseinhibitors AEE788 zeigte eine Zellproliferation von 17,77% (SD 2,07, n=6). Das Wachstum in der korrespondierenden Kontrollgruppe (C2) betrug 36,84% (SD 1,98, n=5). Mit Cetuximab erreicht man eine Reduktion der Proliferationsrate von 34%, bei AEE788 50% und in Kombination beider Substanzen 52%. Damit zeigte sich keine weitere Hemmung der Kombination zu AEE788 alleine.

Im anschließend durchgeführten Wilcoxon-Test konnte sowohl ein signifikanter Proliferationsunterschied zwischen den Einzelsubstanzen, als auch der Kombination zu den jeweiligen Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Die Kontrollgruppen waren untereinander nicht signifikant unterschiedlich. Als Signifikanzniveau wurde  $p = 0,01$  festgelegt.

	V1	V2	V3	C1	C2
MW	27,63	24,21	23,25	36,51	35,94
SD	4,35	3,09	2,09	2,63	2,77

Tabelle 4 : Anteil proliferierender Zellen unter Gefitinib und Vandetanib in Prozent (%)

Legende: V1 = Gefitinib; V2 = Vandetanib; V3 = Gefitinib + Vandetanib; C1 = PBS + Tween; C2 = ohne Behandlung



Grafik 4: Anteil proliferierender Zellen unter Gefitinib und Vandetanib in Prozent (%)

Legende: V1 = Gefitinib; V2 = Vandetanib; V3 = Gefitinib + Vandetanib; C1 = PBS + Tween; C2 = ohne Behandlung

★ =  $p < 0,01$  zu den Kontrollgruppen

Unter dem Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors Gefitinib war eine Tumorproliferation von 27,63% (SD 4,35, n=9) zu verzeichnen. Die entsprechende Kontrollgruppe hingegen zeigte ein Tumorwachstum vom 36,51% (SD 2,63; n=9). Die Versuchsgruppe der Tiere, die mit einem anderen Tyrosinkinaseinhibitor, Vandetanib behandelt wurden, reagierten mit einem Tumorwachstum von 24,21% (SD 3,09; n=8). Im Vergleich zu der bereits erwähnten Kontrollgruppe wurde auch durch diese Substanz das Tumorwachstum reduziert. Damit ergab sich eine Proliferationsratenreduktion von 24% bei Gefitinib und von 34% bei Vandetanib.

Die Kombination des Tyrosinkinaseinhibitoren Gefitinib und Vandetanib führt zu einer vergleichbaren Proliferationshemmung wie die Applikation der Einzelsubstanzen, wie die Proliferationsrate von 23,25% (SD 2,09; n=6) belegt. Auch diese Gruppe wurde mit der oben beschriebenen Kontrollgruppe verglichen. Die Kombination beider Substanzen hat im Vergleich zu den Einzelsubstanzen keinen wesentlichen Vorteil (Reduktion der Proliferationsrate von 36%). Somit zeigen sich keine Synergien.

Um auszuschließen, dass PBS oder das Detergens Tween einen Einfluss auf das Wachstum von Tumoren haben, wurde eine Gruppe von Tieren ohne Behandlung mit diesen Substanzen mit anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen injiziert. Im Vergleich zur PBS + Tween-Gruppe mit einem Tumorwachstum von 36,51% (SD 2,63; n = 9) zeigte sich in dieser Gruppe eine Proliferation von 35,94% (SD 2,77; n = 9). Der Einfluss von PBS und Tween auf die Proliferation ist damit vernachlässigbar.

Mit Hilfe des Wilcoxon-Tests konnte in dieser Versuchsreihe ebenfalls ein signifikanter Unterschied (Signifikanzniveau unter  $p = 0,01$ ) in der Proliferationsrate zwischen den drei Versuchsaugen mit Behandlung und den beiden Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Dabei war es statistisch unerheblich, ob die Kontrollgruppe mit PBS + Tween behandelt oder ohne Behandlung blieb.

### **3.3. Ergebnisse der Neoangiogenese in der CD-31-Färbung**

Nachdem das Tumorwachstum auch immer in direkter Abhängigkeit mit der Angiogenese zu sehen ist, wurde in den Tumoren die korrespondierende Gefäßentwicklung mittels Immunhistochemie (CD-31-Färbung) evaluiert.

Anhand des im Material und Methoden beschriebenen Modells zur Messung der Gefäßoberflächendichte (Abschnitt 2.2.6.3.) wurde dieses für die Beschreibung der Tumolvaskularisierung, der mit Cetuximab, AEE788, Gefitinib, Vandetanib oder der mit den Kombinationen der Substanzen (Cetuximab + AEE788 und Gefitinib + Vandetanib) behandelten Tieren, eingesetzt. Als Kontrollgruppen wurden Tiere, die mit PBS, PBS + Tween, PEG + NMP und Tiere ohne Behandlung gewertet.

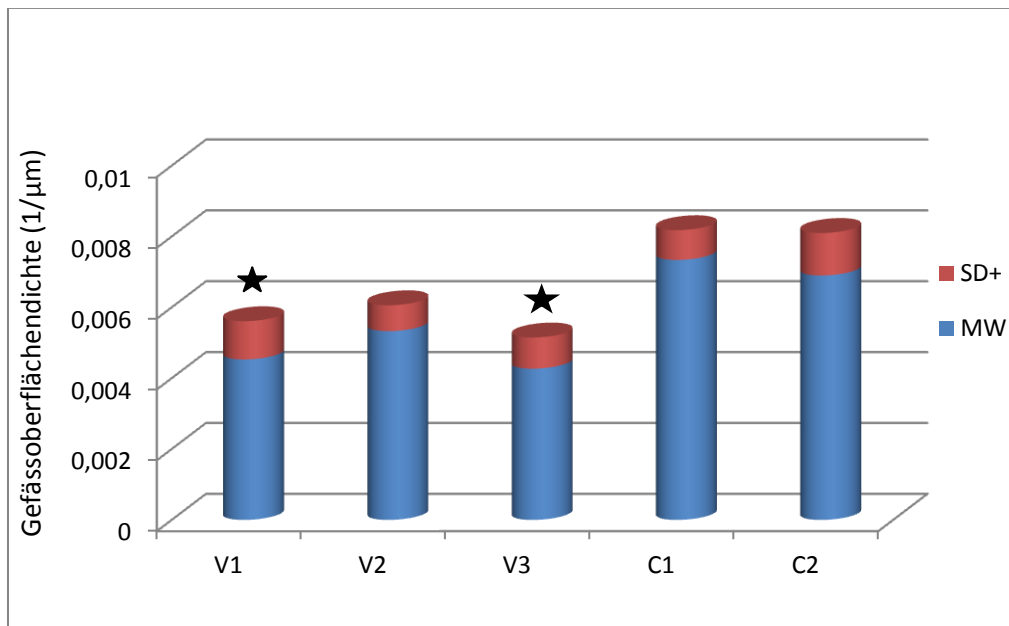
		MW V1	MW V2	MW V3	MW C1	MW C2
Ges.anzahl Schnittp. Gefäße :		122,50	143,33	115,00	197,50	185,67
Mittelwert Schnittpunkte Gefäß:		6,09	7,17	5,75	9,88	9,28
Mittelwert Tumorgewebeanteil :		1	1	1	1	1
LR	2690,30					
<b>VSD</b>		<b>0,00453</b>	<b>0,00533</b>	<b>0,00427</b>	<b>0,00734</b>	<b>0,00690</b>
Meßfeldgröße in $\mu\text{m}^2$	49215,88					
Gefäßanzahl (gezählt)		3,72	4,67	4,07	6,87	6,33
<b>NVES pro <math>\text{mm}^2</math></b>		<b>75,66</b>	<b>94,82</b>	<b>82,76</b>	<b>139,56</b>	<b>128,52</b>

		SD V1	SD V2	SD V3	SD C1	SD C2
Ges.anzahl Schnittp. Gefäße :		28,59	19,68	23,66	22,64	32,15
Mittelwert Schnittpunkte Gefäß:		1,45	0,98	1,18	1,13	1,61
Mittelwert Tumorgewebeanteil :		0	0	0	0	0
LR	2690,30					
<b>VSD</b>		<b>0,00108</b>	<b>0,00073</b>	<b>0,00088</b>	<b>0,00084</b>	<b>0,00120</b>
Meßfeldgröße in $\mu\text{m}^2$	49215,88					
Gefäßanzahl (gezählt)		1,00	1,02	0,35	0,31	0,66
<b>NVES pro <math>\text{mm}^2</math></b>		<b>20,42</b>	<b>20,75</b>	<b>7,02</b>	<b>6,33</b>	<b>13,34</b>

Tabelle 5: Vaskularisierung unter Cetuximab und AEE788

Legende: V1 = Cetuximab; V2 = AEE88; V3 = Cetuximab + AEE788; C1 = PBS; C2 = PEG + NMP;

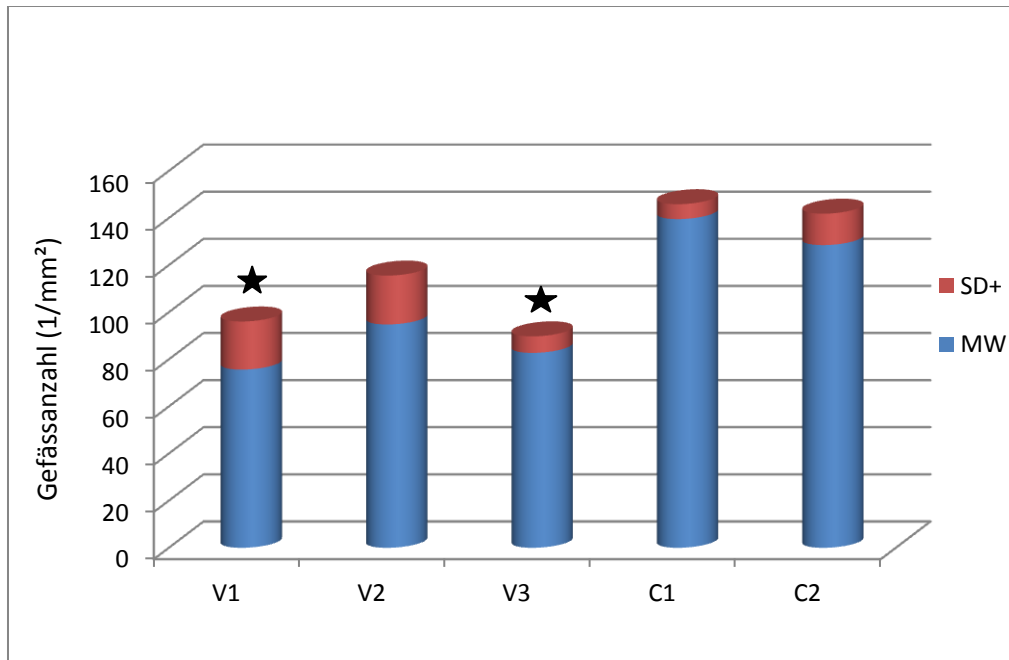
VSD = Gefäßoberflächendichte; NVES = Gefäßanzahl; LR = Gesamtlinielänge



Grafik 5: Gefäßoberflächendichte ( $1/\mu\text{m}$ ) unter Cetuximab und AEE788

Legende: V1 = Cetuximab; V2 = AEE88; V3 = Cetuximab + AEE788; C1 = PBS; C2 = PEG + NMP;

VSD = Gefäßoberflächendichte; ★ =  $p < 0,01$  zu den Kontrollgruppen



Grafik 6: Gefäßanzahl ( $1/\text{mm}^2$ ) unter Cetuximab und AEE788

Legende: V1 = Cetuximab; V2 = AEE88; V3 = Cetuximab + AEE788; C1 = PBS; C2 = PEG + NMP;

NVES = Gefäßanzahl; ★ =  $p < 0,01$  zu den Kontrollgruppen

Unter dem Einfluss von Cetuximab wurden im Durchschnitt 122,5 (SD 28,59) Gefäßschnittpunkte gezählt, dabei betrug der Mittelwert der Schnittpunkte pro Gefäß 6,09 (SD 1,45). Die ermittelte Gefäßoberflächendichte (VSD, vascular surface density) war 0,00453  $1/\mu\text{m}$  (SD 0,00108). Bei einer Messfeldgröße von  $49215,88 \mu\text{m}^2$  wurden 3,72 Gefäße im Durchschnitt gezählt. Daraus ergibt sich eine durchschnittliche Anzahl von 75,66 (SD 20,42) Gefäßen pro Quadratmillimeter (NVES, number of vessels per  $\text{mm}^2$  stroma). (s. Tabelle 5, Grafik 5 und Grafik 6)

In der entsprechenden Kontrollgruppe wurde die Anzahl der Schnittpunkte pro Gefäß mit 197,5 (SD 22,64) ermittelt. Die Schnittpunkte pro Gefäß betrug im Mittel 9,88 (SD 1,13). Die Gefäßoberflächendichte ergab einen Wert von 0,00734  $1/\mu\text{m}$  (SD 0,00084). Bei der Auszählung wurden 6,87 Gefäße pro Messfeldgröße ermittelt, woraus sich eine Anzahl von 139,56 (SD 6,33) Gefäßen pro  $\text{mm}^2$  nachweisen ließ. (s. Tabelle 5, Grafik 5 und Grafik 6)

Aus diesen Werten ergab sich eine Reduktion der Gefäßoberflächendichte von 38,3% und eine Reduktion der durchschnittlichen Gefäße pro Quadratmillimeter von 45,8% unter Cetuximab.

Der Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors AEE788 wurde analog zu den Versuchen mit Cetuximab untersucht. Die Auszählung der Schnittpunkte pro Gefäß war 143,33 (SD 19,68), dabei ergab sich ein Mittelwert für die Schnittpunkte pro Gefäß von 7,17 (SD 0,98) und eine Gefäßoberflächendichte von 0,00533  $1/\mu\text{m}$  (SD 0,00073). Es ließen sich 4,69 (SD 1,02) Gefäße pro Messfeldgröße auszählen und wir konnten einen Wert von 94,82 (SD 20,75) Gefäßen pro Quadratmillimeter bestimmen. (s. Tabelle 5, Grafik 5 und Grafik 6)

In der Kontrolltruppe von AEE788 ergab die Anzahl der Schnittpunkte pro Gefäß 185,67 (SD 32,15) und einen Mittelwert der Schnittpunkte pro Gefäß von 9,28 (SD 1,61). Wir konnten eine Gefäßoberflächendichte von 0,0069 (SD 0,0012) bestimmen. Die Anzahl der Gefäße pro Messfeld ergab 6,33 (SD 0,66) und der daraus ermittelte NVES-Wert betrug 128,52/ $\text{mm}^2$  (SD 13,34). (s. Tabelle 5, Grafik 5 und Grafik 6)

Im Vergleich von AEE788 zu der Kontrollgruppe wurde eine geringere Gefäßoberflächendichte von -22,8% und eine geringere Gefäßanzahl pro  $\text{mm}^2$  von -26,2% gefunden. (s. Tabelle 5, Grafik 5 und Grafik 6)

Um einen synergistischen Effekt beider Substanzen zu erfassen erhielt die dritte Versuchsgruppe die Kombination. Es zeigte sich eine Anzahl der Schnittpunkte pro Gefäß von 115 (SD 23,66) mit einem Mittelwert von 5,75 (SD 1,18) Schnittpunkten pro Gefäß. Es wurde eine Gefäßoberflächendichte von 0,00427  $1/\mu\text{m}$  (SD 0,00088) berechnet. Die Bestimmung der Gefäßanzahl im Messfeld ergab 4,07 (SD 0,35) mit einer NVES von 82,76 (SD 7,02) / $\text{mm}^2$ . Somit zeigten sich im Vergleich der Kombinationstherapie mit der Kontrollgruppe eine Reduktion von 38,1% bei der Gefäßoberflächendichte und eine Reduktion von 35,6% bei der Gefäßanzahl pro  $\text{mm}^2$ .

Bei der Prüfung auf statistische Signifikanz (Signifikanzniveau bei  $p = 0,01$ ) zeigten sich die Versuchsarme mit Cetuximab, sowohl alleine als auch in Kombination mit AEE788, bezogen auf die Kontrollgruppe C1 (Behandlung mit PBS) signifikant unterschiedlich. Alle anderen Kombinationen waren nicht signifikant unterschiedlich. (s. Grafik 5 und Grafik 5)

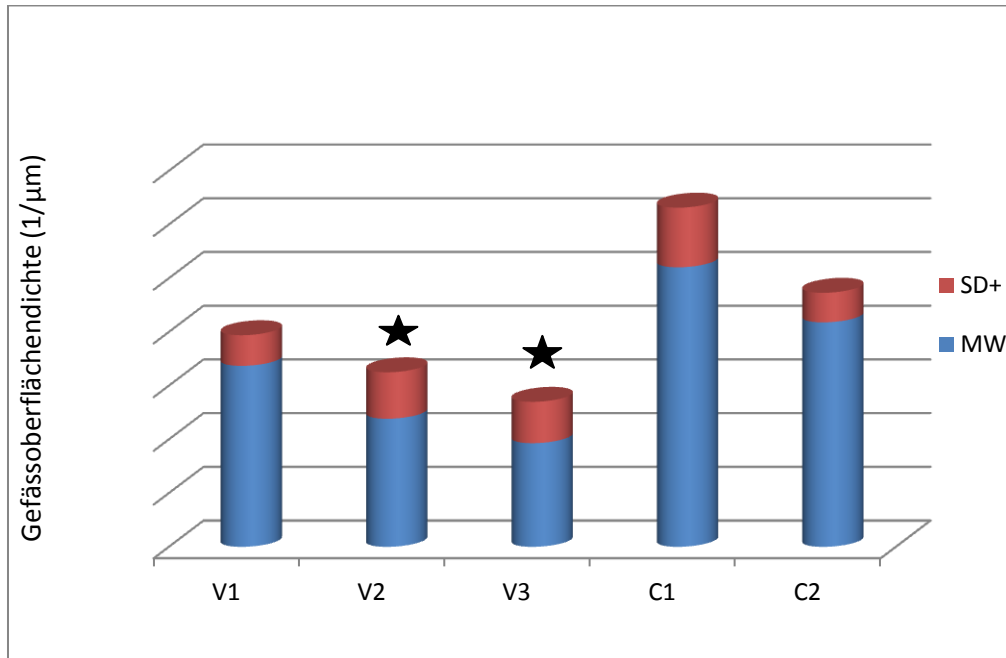
		MW V1	MW V2	MW V3	MW C1	MW C2
Ges.anzahl Schnittp. Gefäße :		178,56	104,78	85,00	280,00	224,78
Mittelwert Schnittpunkte Gefäß:		9,07	6,42	5,19	14,00	11,24
Mittelwert Tumorgewebeanteil :		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
LR	2690,30					
<b>VSD</b>		<b>0,00674</b>	<b>0,00477</b>	<b>0,00386</b>	<b>0,01041</b>	<b>0,00836</b>
Meßfeldgröße in $\mu\text{m}^2$	49215,88					
Gefäßanzahl (gezählt)		5,54	4,33	3,53	10,43	7,18
<b>NVES pro <math>\text{mm}^2</math></b>		<b>112,57</b>	<b>87,97</b>	<b>71,75</b>	<b>211,82</b>	<b>145,84</b>

		SD V1	SD V2	SD V3	SD C1	SD C2
Ges.anzahl Schnittp. Gefäße :		33,81	41,86	20,00	59,74	29,68
Mittelwert Schnittpunkte Gefäß:		1,53	2,33	2,07	2,99	1,48
Mittelwert Tumorgewebeanteil :		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
LR	2690,30					
<b>VSD</b>		<b>0,00114</b>	<b>0,00173</b>	<b>0,00154</b>	<b>0,00222</b>	<b>0,00110</b>
Meßfeldgröße in $\mu\text{m}^2$	49215,88					
Gefäßanzahl (gezählt)		0,63	1,36	1,14	2,15	0,65
<b>NVES pro <math>\text{mm}^2</math></b>		<b>12,73</b>	<b>27,71</b>	<b>23,21</b>	<b>43,60</b>	<b>13,17</b>

Tabelle 6: Vaskularisierung unter Gefitinib und Vandetanib

Legende: V1 = Gefitinib; V2 = Vandetanib; V3 = Gefitinib + Vandetanib; C1 = PBS + Tween; C2 = ohne Behandlung;

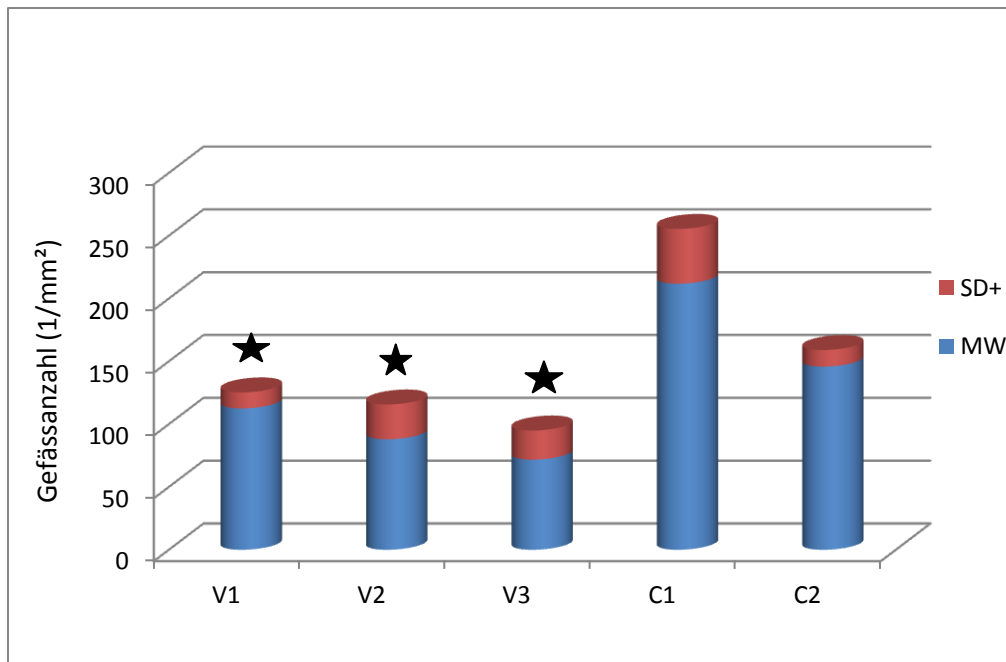
VSD = Gefäßoberflächendichte; NVES = Gefäßanzahl; LR = Gesamtlängenlänge



Grafik 7: Gefäßoberflächendichte ( $1/\mu\text{m}$ ) unter Gefitinib und Vandetanib

Legende: V1 = Gefitinib; V2 = Vandetanib; V3 = Gefitinib + Vandetanib; C1 = PBS + Tween; C2 = ohne Behandlung;

VSD = Gefäßoberflächendichte; ★ =  $p < 0,01$  zu den Kontrollgruppen



Grafik 8: Gefäßanzahl (1/mm<sup>2</sup>) unter Gefitinib und Vandetanib

Legende: V1 = Gefitinib; V2 = Vandetanib; V3 = Gefitinib + Vandetanib; C1 = PBS + Tween; C2 = ohne Behandlung;

NVES = Gefäßanzahl; ★ =  $p < 0,01$  zu den Kontrollgruppen

Der Effekt der Tyrosinkinaseinhibitoren Gefitinib und Vandetanib auf die Neoangiogenese wurde in einem zweiten Experiment untersucht. Wir ermittelten für Gefitinib eine Gesamtanzahl der Gefäßschnittpunkte von 178,56 (SD 33,81) mit einem Mittelwert pro Gefäß von 9,07 (SD 1,53). Die Gefäßoberflächendichte wurde mit 0,00674 (SD 0,00114) bestimmt. Es wurden 5,54 (SD 0,63) Gefäße pro Messfeld gezählt, woraus sich eine durchschnittliche Gefäßanzahl von 112,57 /mm<sup>2</sup> (SD 12,73) berechnen ließ. (s. Tabelle 6, Grafik 7 und Grafik 8)

Unter der Applikation von Vandetanib betrug die Gesamtanzahl der Gefäßschnittpunkte 104,78 (SD 41,86) bei einem Mittelwert von 6,42 (SD 2,33) Schnittpunkten pro Gefäß. Die VSD wurde mit 0,00477 (SD 0,00173) berechnet. Die Anzahl der Gefäße im Messfeldraster ergab 4,33 (SD 1,36) und die daraus ermittelte NVES war 87,97 /mm<sup>2</sup> (SD 27,71). (s. Tabelle 6, Grafik 7 und Grafik 8)

Die Kombination der Substanzen wurde in einer dritten Versuchsgruppe untersucht. Dabei zeigte sich eine Gesamtanzahl der Gefäßschnittpunkte von 85 (SD 20) und ein Mittelwert der

Schnittpunkte pro Gefäß von 5,19 (SD 2,07). Wir konnten eine Gefäßoberflächendichte von 0,00386 /mm<sup>2</sup> (SD 0,00154) ermitteln. Die durchschnittlich ausgezählten Gefäße in dieser Gruppe ergaben 3,53 (SD 1,14) und eine daraus resultierende NVES von 71,75 /mm<sup>2</sup> (SD 23,21). (s. Tabelle 6, Grafik 7 und Grafik 8)

In der Kontrollgruppe zu Gefitinib und Vandetanib, die mit PBS und Tween behandelt worden war, konnte eine Gesamtanzahl der Gefäßschnittpunkte von 280 (SD 58,74) und ein Mittelwert von 14 (SD 2,99) errechnet werden. Mit 0,01041 (SD 0,00222) war die Oberflächendichte der Gefäße deutlich höher als in der Gefitinib-Gruppe. Wir zählten 10,43 (SD 2,15) Gefäße pro Messfeld und ermittelten eine NVES von 211,82 pro mm<sup>2</sup> (SD 43,6). (s. Tabelle 6, Grafik 7 und Grafik 8)

In einer weiteren Kontrollgruppe, die keinerlei Substanzen erhalten hatte, wurde die Gesamtanzahl der Gefäßschnittpunkte mit 224,78 (SD 29,68) ermittelt. Der Mittelwert der Schnittpunkte pro Gefäß ergab 11,24 (SD 1,48) und die Gefäßoberflächendichte wurde mit 0,00836 (SD 0,0011) berechnet. Die Bestimmung der Gefäßanzahl im Messfeld ergab 7,18 (SD 0,65) mit einer NVES von 145,84 /mm<sup>2</sup> (SD 13,17). (s. Tabelle 6, Grafik 7 und Grafik 8)

In Zusammenschau der Werte zeigte sich bei der Behandlung mit Gefitinib eine Reduktion der Gefäßoberflächendichte von 35,3% und eine Reduktion von 46,9% bei der Gefäßanzahl pro Quadratmillimeter. Bei der Behandlung mit Vandetanib konnte eine Minimierung der Gefäßoberflächendichte von 54,2% und der Gefäßanzahl (1/mm<sup>2</sup>) von 58,5 erzielt werden. Die Kombinationstherapie von Gefitinib und Vandetanib erbrachte dann nur noch eine geringfügig höhere Reduktion im Vergleich zu den Einzelgruppen. (Oberflächendichtereduktion von 62,9% und Reduktion der Gefäßanzahl von 66,1%)

Einen signifikanten Unterschied in der Gefäßanzahl (NVES) zeigte sowohl die Behandlungsgruppe V2 (ZD6474) zu den beiden Kontrollgruppen als auch die Kombinationsgruppe V3 (Gefitinib + Vandetanib) zu den beiden Kontrollgruppen. Ebenfalls statistisch signifikant war der Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen V1 (Gefitinib) und V3 (Gefitinib + Vandetanib), das heißt es ergab sich ein additiver Effekt in Kombination der Substanzen.

Bei der statistischen Auswertung der Gefäßoberflächendichte konnte im Wilcoxon-Test ähnlich wie bei der Gefäßanzahl ein signifikanter Unterschied zwischen der Einzelsubstanz Vandetanib (V2) als auch zwischen der Kombinationstherapie Gefitinib + Vandetanib (V3) zu den beiden Kontrollgruppen berechnet werden. Die Versuchsgruppe V1 zeigte zudem einen signifikanten Unterschied zu der Kontrollgruppe C1, aber nicht zu der Kontrollgruppe C2. Alle anderen Kombinationen waren signifikant nicht unterschiedlich. (Signifikanzniveau  $p = 0,01$ )

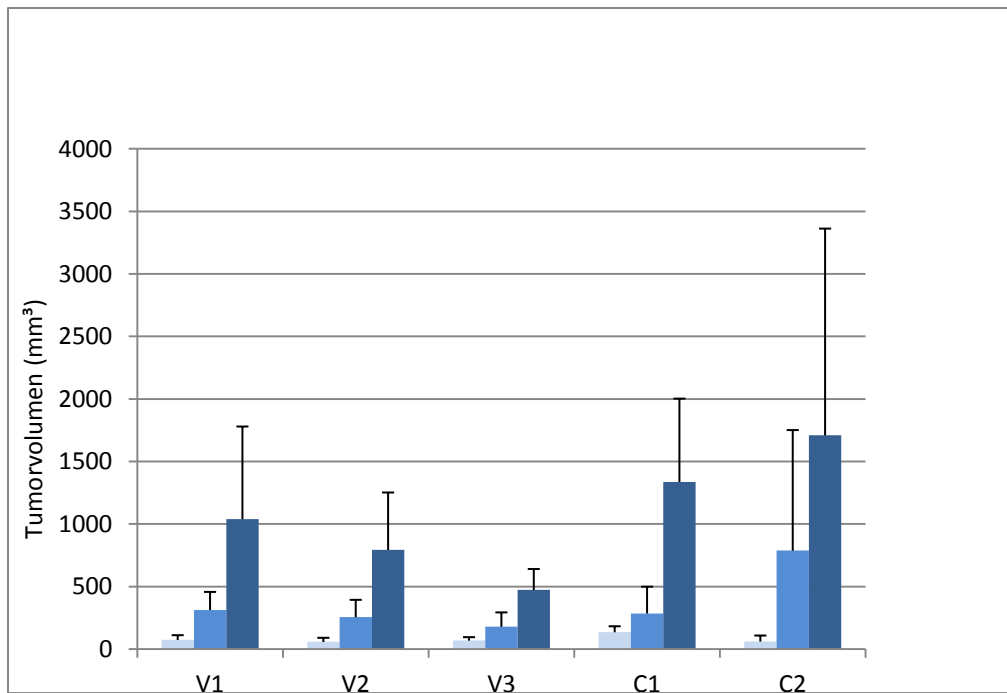
### 3.4. Ergebnisse zur Volumenentwicklung der Tumore

Neben der mikroskopischen Aufarbeitung der Präparate erfolgte ebenso die Erfassung von makroskopischen Werten, wie Volumen und Gewicht.

		V1	V2	V3	C1	C2
Tag 7	MW	74	58	69	136	62
	SD	39	33	28	48	48
Tag 14	MW	314	256	180	286	788
	SD	145	140	115	215	965
Tag 21	MW	1040	794	474	1337	1710
	SD	741	459	168	667	1654

Tabelle 7: Tumolvolumen unter Cetuximab und AEE788 in Kubikmillimeter ( $\text{mm}^3$ )

Legende: V1 = Cetuximab; V2 = AEE88; V3 = Cetuximab + AEE788; C1 = PBS; C2 = PEG + NMP



Grafik 9: Tumolvolumen unter Cetuximab und AEE788 in Kubikmillimeter (mm<sup>3</sup>)

Legende: V1 = Cetuximab; V2 = AEE88; V3 = Cetuximab + AEE788; C1 = PBS; C2 = PEG + NMP

Farben: helles Blau: Tag 7; mittleres Blau: Tag 14; dunkles Blau: Tag 21

Die Versuchstiere in der Cetuximab-Gruppe zeigten ein Tumorwachstum auf durchschnittlich 74 mm<sup>3</sup> (SD 39; Tag 7), nach der zweiten Woche auf 314 mm<sup>3</sup> (SD 145; Tag 14) und am Tag der Explantation, d.h. 3 Wochen nach Behandlungsbeginn, auf 1040 mm<sup>3</sup> (SD 741; Tag 21). In der dazugehörigen Kontrollgruppe (C1) wurde ein Mittelwert von 136 mm<sup>3</sup> (SD 48; Tag 7) nach der ersten Woche und im weiteren Verlauf Werte von 286 mm<sup>3</sup> (SD 215; Tag 14) und 1337 mm<sup>3</sup> (SD 667; Tag 21) ermittelt.

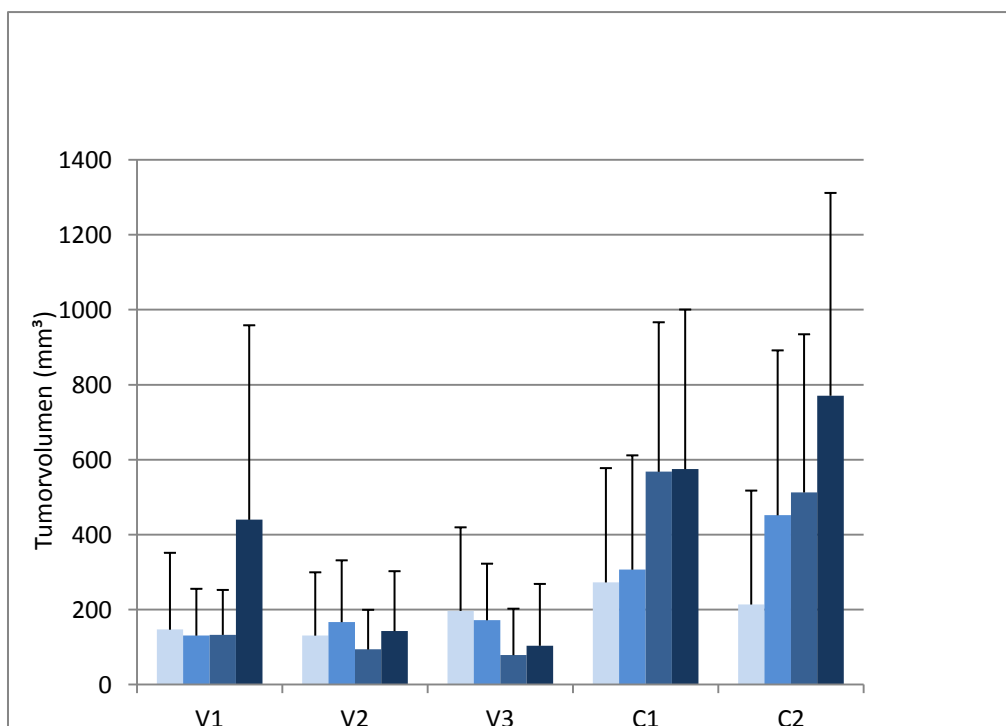
Ein ähnliches Wachstum wurde in der zweiten Versuchsgruppe mit der AEE788-Behandlung beobachtet. (Tag 7: 58 mm<sup>3</sup> (SD 39); Tag 14: 256 mm<sup>3</sup> (SD 145); Tag 21: 794 mm<sup>3</sup> (SD 459)). Unter der Kombinationstherapie mit Cetuximab und AEE788 ließ sich die geringste Wachstumstendenz verzeichnen. Hierbei hatten die Tiere nach der ersten Woche ein durchschnittliches Volumen von 69 mm<sup>3</sup> (SD 48; Tag 7). Nach der zweiten Woche betrug der Mittelwert 180 mm<sup>3</sup> (SD 115; Tag 14) und am Ende der Behandlung 474 mm<sup>3</sup> (SD 168; Tag 21). Die Kontrollgruppe (C2) zeigte die deutlichste Wachstumstendenz. An Tag 7 maßen die Tumore durchschnittlich 62 mm<sup>3</sup> (SD 48), dann gab es einen Anstieg auf 788 mm<sup>3</sup> (SD 965) an Tag 14 und zum Schluss ein durchschnittliches Volumen von 1710 mm<sup>3</sup> (SD 1654) an Tag 21. Dies ist im Verhältnis zu V3 ein 3,6fach erhöhtes Wachstum.

Die ermittelten Tumorzvolumen in dieser Versuchsreihe waren alle nicht signifikant unterschiedlich. Am ehesten ist dies auf die sehr breite Streuung zurück zu führen.

		V1	V2	V3	C1	C2
Tag 7	MW	147	131	197	273	214
	SD	205	169	223	305	304
Tag 14	MW	131	167	172	307	452
	SD	125	165	151	305	440
Tag 21	MW	133	94	79	568	513
	SD	120	106	124	399	422
Tag 28	MW	440	143	104	575	771
	SD	519	160	165	426	541

Tabelle 8: Tumorzvolumen unter Gefitinib und Vandetanib in Kubikmillimeter (mm<sup>3</sup>)

Legende: V1 = Gefitinib; V2 = Vandetanib; V3 = Gefitinib + Vandetanib; C1 = PBS + Tween; C2 = ohne Behandlung



Grafik 10: Tumorzvolumen unter Gefitinib und Vandetanib in Kubikmillimeter (mm<sup>3</sup>)

Legende: V1 = Gefitinib; V2 = Vandetanib; V3 = Gefitinib + Vandetanib; C1 = PBS + Tween; C2 = ohne Behandlung

Analog zum oben beschriebenen Vorgehen wurde auch das Tumorzvolumen im zweiten Versuchszweig mit Gefitinib und Vandetanib ermittelt.

Hierbei zeigte sich bei den Tieren mit einer Behandlung mit Gefitinib ein durchschnittliches Tumorzvolumen nach der ersten Woche von 147 mm<sup>3</sup> (SD 205; Tag 7), nach der zweiten Woche von 131 mm<sup>3</sup> (SD 125; Tag 14), nach der dritten Woche von 133 mm<sup>3</sup> (SD 120; Tag 21) und am Tag der Explantation von 440 mm<sup>3</sup> (SD 519; Tag 28). Die Kontrollgruppe C1 mit der PBS und Tween Applikation verzeichnete an Tag 7 einen Mittelwert von 273 mm<sup>3</sup> (SD 305), an Tag 14 von 307 (SD 305), an Tag 21 von 568 (SD 399) und an Tag 28 von 575 mm<sup>3</sup> (SD 426).

In der zweiten Versuchszweig wurden die Tiere mit Vandetanib behandelt. Hierbei zeigte sich eine Wachstumshemmung im Vergleich zur Kontrolle (Tag 7: 131 mm<sup>3</sup> (SD 169); Tag 14: 167 mm<sup>3</sup> (SD 165); Tag 21: 94 mm<sup>3</sup> (SD 106); Tag 28: 143 mm<sup>3</sup> (SD 160)). In der dritten Gruppe mit der Kombinationstherapie sah es ähnlich aus. Wir verzeichneten nach der ersten Woche ein durchschnittliches Volumen von 197 mm<sup>3</sup> (SD 223; Tag 7), in der folgenden Woche von 172 mm<sup>3</sup> (SD 151; Tag 14), in der vorletzten Woche von 79 mm<sup>3</sup> (SD 124; Tag 21) und am Tag der Explantation einen Mittelwert von 104 mm<sup>3</sup> (SD 165; Tag 28). Die dazugehörige Kontrollgruppe verhielt sich anders. Wir konnten ein kontinuierliches Wachstum verzeichnen. Es zeigte sich an Tag 7 ein Tumorzvolumen im Mittel von 214 mm<sup>3</sup> (SD 304), an Tag 14 ein Mittelwert von 452 mm<sup>3</sup> (SD 440), in der darauffolgenden Woche 513 mm<sup>3</sup> (SD 422) und am Explantationstag 771 mm<sup>3</sup> (SD 541).

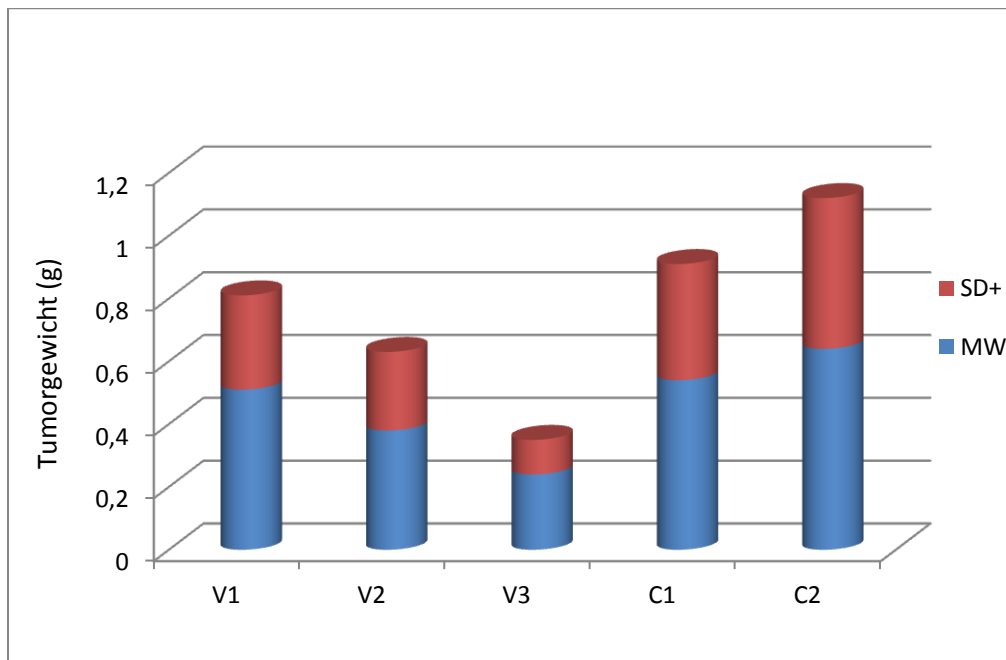
Die in diesem Tierversuch eingesetzten Medikamente zeigten keine signifikanten Tumorzvolumen Unterschiede untereinander im Wilcoxon-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p = 0,01$  festgelegt. Allerdings lässt sich deutlich eine Wachstumshemmung im Vergleich der Mittelwerte beobachten. So ist die C2-Gruppe im Mittelwert 7,4fach größer als die V3-Gruppe. Dieser Effekt ist aufgrund der kleinen Versuchszweigen und hohen Standardabweichungen trotzdem nicht statistisch signifikant.

### 3.5. Ergebnisse zum Tumorgewicht

	V1	V2	V3	C1	C2
MW	0,51	0,38	0,24	0,54	0,64
SD	0,30	0,25	0,11	0,37	0,48

Tabelle 9: Tumorgewicht unter Cetuximab und AEE788 in Gramm (g)

Legende: V1 = Cetuximab; V2 = AEE88; V3 = Cetuximab + AEE788; C1 = PBS; C2 = PEG + NMP



Grafik 11: Tumorgewicht unter Cetuximab und AEE788 in Gramm (g)

Legende: V1 = Cetuximab; V2 = AEE88; V3 = Cetuximab + AEE788; C1 = PBS; C2 = PEG +

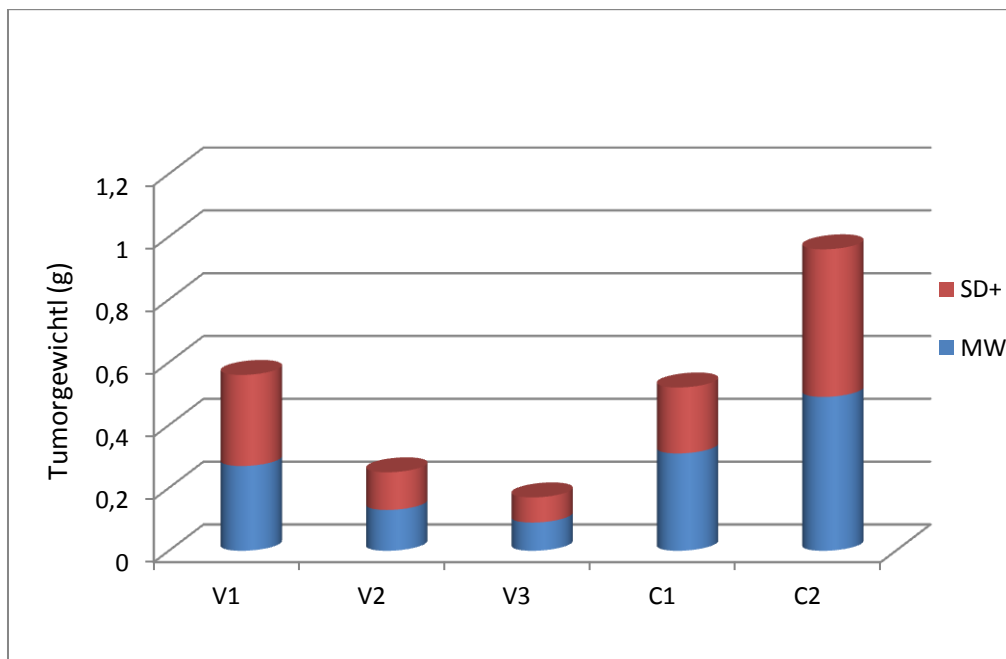
Als weiteren Parameter in unseren Versuchsreihen wurde nach der Tumorexplantation das Tumorgewicht mittels Waage erhoben. Hierbei zeigte sich in der Cetuximab Versuchsgruppe (V1) ein durchschnittliches Tumorgewicht von 0,51g (SD 0,30) und im Vergleich in der dazugehörigen Kontrollgruppe (C1) ein Gewicht von 0,54g (SD 0,37). In der AEE788 Versuchsgruppe wurde ein mittleres Tumorgewicht von 0,38g (SD 0,25) ermittelt. Das geringste Tumorgewicht wurde allerdings in der Gruppe mit der Kombinationstherapie von Cetuximab und AEE788 (Mittelwert 0,24g; SD 0,11) gemessen. Die Kontrollgruppe (C2) zur AEE788 und Kombinationstherapie wies ein Tumorgewicht im Mittel von 0,64g (SD 0,48) auf. Somit liegt im Mittel ein ca. 2,6fach höheres Gewicht in der Kontrollgruppe C2 als im Versuchsarm der Kombinationstherapie V3 vor.

Die ermittelten Tumorgewichte in den einzelnen Versuchsarmen waren untereinander nicht signifikant unterschiedlich. Auch hier ist wie beim Tumorzvolumen die hohe Streuung der Einzelwerte für die nicht signifikanten Werte am ehesten für verantwortlich.

	V1	V2	V3	C1	C2
MW	0,27	0,13	0,09	0,31	0,49
SD	0,29	0,12	0,08	0,21	0,47

Tabelle 10: Tumorgewicht unter Gefitinib und Vandetanib in Gramm (g)

Legende: V1 = Gefitinib; V2 = Vandetanib; V3 = Gefitinib + Vandetanib; C1 = PBS + Tween; C2 = ohne Behandlung



Grafik 12: Tumorgewicht unter Gefitinib und Vandetanib in Gramm (g)

Legende: V1 = Gefitinib; V2 = Vandetanib; V3 = Gefitinib + Vandetanib; C1 = PBS + Tween; C2 = ohne Behandlung

Analog zur vorherig beschriebenen Versuchsreihe wurde auch in diesem Versuch das Tumorgewicht nach Explantation ermittelt.

Es zeigte sich bei der Behandlung mit Gefitinib (V1) ein mittleres Tumorgewicht von 0,27g (SD 0,29), bei der Vandetanib-Gruppe (V2) von 0,13g (SD 0,12) und bei der Kombinationstherapie (V3) von 0,09g (SD 0,08). In den Kontrollgruppen wurde nach der Applikation von PBS mit Tween (C1) ein Mittelwert des Tumorgewichts von 0,31g (SD 0,21)

und in der Gruppe ohne Behandlung ein durchschnittliches Gewicht von 0,49g (SD 0,47) gemessen.

Der Wilcoxon-Test zeigte parallel zum vorausgegangenen Tierversuch keine signifikanten Unterschiede beim Tumorgewicht. So ist zum Beispiel das Tumorgewicht im Mittel in der C2-Gruppe 5,4fach höher als in der Versuchsgruppe V3. Trotz des eigentlich offensichtlichen Ergebnisses, werde die Werte durch die extrem hohen Standartabweichungen zu nicht signifikanten Ergebnissen.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Einführung**

Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern und Tyrosinkinaseinhibitoren führt in anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen zu einer signifikanten Reduktion sowohl der Proliferation als auch der Angiogenese und impliziert somit eine klinische Evaluation.

Proliferierende maligne Zellen können nur in einem relativ kleinen Zellverband von den schon bestehenden Gefäßen versorgt werden. Überschreitet der Zellverband eine kritische Größe, die im Bereich weniger Millimeter liegt, sind zum weiteren Wachstum neue Gefäße nötig. Dieser Vorgang wird Angiogenese genannt.

Angiogenese beinhaltet die Entstehung von neuen Gefäßen aus bereits existierendem Gefäßendothel. Um diesen Vorgang in Tumorgewebe zu initiieren bedarf es intrinsischer Faktoren. So konnte nachgewiesen werden, dass der „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF) einer der Hauptfaktoren der Angiogenese bei Schilddrüsenzellen ist (Folkman 1990). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Hochregulation von VEGF in menschlichen Schilddrüsenkarzinomzellen mit einer Erhöhung der Malignität und Verschlechterung der Prognose verbunden ist (Lennard 2001; Klein 2001).

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigte sich in einer früheren Arbeit mit der Regulation von VEGF durch das Hauptenzym der Schilddrüse dem „Thyrotropin“ (TSH) im Schilddrüsenkarzinom. Hierbei zeigte sich zwar eine deutliche Stimulation von VEGF durch TSH, es stellte sich aber heraus, dass der stärkste Modulator der „epidermal growth factor“ (EGF) ist (Hoffmann 2004).

Ein Zeichen für die Dedifferenzierung von Schilddrüsentumorzellen ist der Verlust von TSH-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. In der oben erwähnten Gruppe konnte weiterhin gezeigt werden, dass EGF gerade in den Zellen ohne TSH-Rezeptor als Modulator der Angiogenese eine bedeutende Rolle spielt (Hoffmann 2006).

Schon in den 1970er Jahren veröffentlichte Folkman seine Hypothese, dass mit einer gezielten Hemmung der Angiogenese das Tumorwachstum in Karzinomzellen gehemmt werden könnte (Folkman 1971). Allerdings wurde diese Hypothese erst wieder in den letzten Jahren aufgegriffen und weiterentwickelt. Die erste Substanz die in diesem Kontext die klinische Zulassung in Europa erhielt war Bevacizumab. Dieser monoklonale Antikörper gegen VEGF ist in Deutschland mittlerweile für folgende fünf Karzinomarten zugelassen: Brust-, Darm-, Lungen-, Nieren- und Ovarial-Karzinom. In zahlreichen weiteren klinischen Studien konnte die Wirksamkeit bewiesen werden.

Der duale Thyrosinkinaseinhibitor Vandetanib wurde unter dem Handelsnamen Caprelsa 2011 von der FDA und im Februar 2012 von der EMA für die Behandlung des fortgeschrittenen medullären Schilddrüsenkarzinoms zugelassen. Es konnte in einer Phase-III-Studie gezeigt werden, dass es eine über 50% Ansprechrate und ein signifikant erhöhtes progressionsfreies Überleben im Vergleich zur Placebogruppe gab (Wells 2011).

Somit ist bekannt, dass VEGF einer der Hauptstimulatoren für die Angiogenese ist. Weiterhin ist bewiesen, dass EGF einen positiven Effekt auf die VEGF Produktion hat. Daraufhin sollte ein neuer Therapieansatz beim undifferenzierten anaplastischen Schilddrüsenkarzinom untersucht werden, welcher beide Faktoren hemmt. Es wurden die beiden Tyrosinkinaseinhibitoren Vandetanib und Gefitinib in in-vitro-Versuchen an undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen getestet. Wie oben schon beschrieben blockiert Vandetanib sowohl den EGF-Rezeptor als auch den VEGF-Rezeptor. Gefitinib hingegen hemmt den EGF-Rezeptor über die Bindung an der ATP-Bindungsstelle. In der Arbeit von Hoffmann et al. (Hoffmann 2006) zeigte sich erneut das große Potenzial des EGF/EGF-Rezeptor-Systems bezüglich der VEGF-Stimulation in allen untersuchten undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen. Weiterhin konnte die direkte Wirkung der Thyrosinkinaseinhibitoren Vandetanib und Gefitinib auf die Rezeptoren von EGF und VEGF und damit die reduzierte Zellproliferation in-vitro nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Effekte und den im oberen Abschnitt beschriebenen klinisch positiven Effekten der anderen verwendeten Substanzen (s. 1.2. Stand der Forschung) auf andere Tumorentitäten, waren die in vivo-Versuche der nächste Schritt.

## 4.2. Zusammenfassung der Ergebnisse

### 4.2.1. Proliferation

In allen unseren Versuchsgruppen konnte eine signifikante Proliferationshemmung der verwendeten Substanzen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Am deutlichsten wurde dieser Effekt bei AEE788 und Cetuximab. Wir konnten eine Reduktion der Proliferationsrate von 34% (Cetuximab) und 50% (AEE788) zeigen. Interessanterweise ist die Kombinationstherapie des Antikörpers mit einem dualen Tyrosinkinaseinhibitor der jeweiligen Einzeltherapie nicht überlegen. Hierbei zeigte sich ebenfalls nur eine Proliferationsratenreduktion von 52%. Dies war im Vergleich zu den Einzeltherapien nicht signifikant unterschiedlich. Ähnliche Ergebnisse erbrachte die zweite Versuchsreihe mit Gefitinib (Reduktion der Proliferationsrate 24%) und mit Vandetanib (34%). Die Kombinationstherapie von Gefitinib und Vandetanib ergab eine statistisch nicht signifikante Reduktion von 36% im Vergleich zu den Einzeltherapien.

Die Arbeitsgruppe um Shigeta konnte bei kolorektalen Karzinomen eine ähnliche Reduktion durch Cetuximab nachweisen. Die Arbeitsgruppe unterteilte ihre Versuchsgruppen in den EGF-Rezeptor stark exprimierende und niedrigexprimierende Zelllinien. Bei den hochexprimierten Zelllinien konnte eine Reduktion von 30% erreicht werden und bei den niedrigexprimierten Zelllinien eine Reduktion von 10 – 20% (Shigeta 2013). Dies entspricht auch unseren Zahlen beim anaplastischen Schilddrüsenkarzinom.

Eine weitere Arbeitsgruppe verglich analog zu unseren Versuchen die Einzeltherapie Cetuximab und Gefitinib mit der Kombinationstherapie bei Kolonkarzinomzellen.

Die Kombinationstherapie mit Cetuximab und Gefitinib ergab einen synergistischen und ausgeprägten wachstumshemmenden Effekt auf die Zellproliferation, sowie eine erhöhte Induktion der Apoptose als die Einzeltherapien (Yuan 2012).

Somit kommt diese Arbeitsgruppe zu einer anderen Aussage bezüglich der Kombinationstherapie von monoklonalen Antikörpern und Tyrosinkinaseinhibitoren. Zu bedenken ist in diesem Zusammenhang, dass es sich um eine andere Karzinomzelllinie handelt und Gefitinib ein selektiver EGF-Rezeptor-Inhibitor ist. Eine weiterführende Versuchsreihe beim anaplastischen Schilddrüsenkarzinom könnte diesbezüglich eine neue Therapieoption darstellen.

Meco et al. konnten beim Medulloblastom unter der Therapie von AEE788 eine Inhibition des Tumorwachstums von 45% - 72% nachweisen (Meco 2010). Diese Inhibition ist mit unseren nachgewiesenen 50% vergleichbar.

Bei den makroskopisch erhobenen Daten zeigt sich auf den ersten Blick ein ganz anderes Bild. Die mit dem Wilcoxon-Test durchgeführte Signifikanzprüfung ergab keinerlei signifikante Unterschiede bezüglich des Tumolvolumens. Mit Blick auf die Mittelwerte ergibt sich ein anderer Eindruck. Die Kombinationstherapie mit AEE788 und Cetuximab erzielte einen Mittelwert von 474 mm<sup>3</sup> im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 1710 mm<sup>3</sup>.

In der zweiten Versuchsreihe zeigte sich ein mittleres Tumolvolumen nach 28d Gefitinibgabe von 440mm<sup>3</sup> zu 575mm<sup>3</sup> in der Kontrollgruppe. Unter der Therapie von Vandetanib lag das Tumolvolumen bei 143mm<sup>3</sup> im Vergleich zu der gleichen Kontrollgruppe.

Um einen Effekt bezüglich der Volumenreduktion unter Gefitinib nachzuweisen, verwendete die Arbeitsgruppe um Nilsson Placentazellen. Placentazellen weisen eine sehr hohe Expressionsrate vom EGF-Rezeptor auf. In dieser Arbeit wurde der Effekt von Gefitinib und Metotrexat überprüft. In der Einzelbehandlung konnten Tumolvolumen von 821mm<sup>3</sup> (Gefitinib) und von 901mm<sup>3</sup> gemessen werden. In der Kombinationstherapie kam es dann zu einem synergistischen Effekt mit einem Volumen von 345mm<sup>3</sup>. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (Nilsson 2013).

In Zusammenschau unserer Ergebnisse mit denen von Nilsson ergibt sich bezüglich einer effektiven Reduktion der Tumorlast beim anaplastischen Schilddrüsenkarzinom die Überlegung einer experimentellen Überprüfung dieser Kombination.

Analog zu unserer Versuchsserie zeigte sich bei Inoue et al. in Leberzellkarzinomversuchen eine deutlich geringere Tumolvolumenzunahme unter Vandetanib (773,4 mm<sup>3</sup>) als in der

Kontrollgruppe (2205,4 mm<sup>3</sup>). Die Behandlung der Tiere in Bezug auf Dauer und Medikamentengabe waren identisch. In dieser Arbeit konnte eine statistische Signifikanz erbracht werden (Inoue 2012). Im Vergleich zu unseren Ergebnissen kam eine ähnliche Reduktion des Tumolvolumens vom 3 – 4 fachen heraus. Die nicht erzielte Signifikanz in unserer Arbeit ist auf zwei Faktoren zurück zu führen. Erstens waren die Tumore untereinander vom histologischen Aufbau sehr heterogen, z. B. sehr große Zysten, und zweitens waren die Einzelgruppen teilweise recht klein. Diese beiden Faktoren führten zu einer großen Standardabweichung und der daraus resultierenden fehlenden Signifikanz.

Ähnliche Ergebnisse wie bei der Tumolvolumenuntersuchung wurden bei der Tumorgewichtsuntersuchung erzielt. Hierbei zeigten die jeweiligen Kombinationsversuchsarme den deutlichsten Unterschied. Die Kombination von AEE788 mit Cetuximab erzielte einen Mittelwert von 0,24 g im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 0,64 g. Im anderen Versuchsarm ergab die Kombination von Gefitinib und Vandetanib ein mittleres Gewicht von 0,09 g im Vergleich zur Kontrolle von 0,49 g. Allerdings ergaben sich auch hier aufgrund der hohen Standardabweichungen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur mit immer mehr europäischen Zulassungen für den nachgewiesenen Effekt der Proliferationshemmung bei malignen Tumoren, lässt sich eine proliferationshemmende Wirkung gerade von der Kombination verschiedener Tyrosinkinaseinhibitoren und Antikörpern postulieren.

#### **4.2.2. Angiogenese**

Zur genaueren Untersuchung der Angiogenese wurde die Gefäßoberflächendichte (VSD) und die Gefäßanzahl (NVES) pro Quadratmillimeter ermittelt. Der monoklonale Antikörper Cetuximab zeigte sowohl in der Monotherapie als auch in der Kombinationstherapie mit dem dualen Tyrosinkinaseinhibitor AEE788 eine signifikante Reduktion der Angiogenese. So konnte die Gefäßanzahl in der Monotherapie Cetuximab von 139,56/mm<sup>2</sup> in der Kontrollgruppe auf 75,66/mm<sup>2</sup> in der Behandlungsgruppe reduziert werden. Dies entspricht

einem Anteil von ca. 46%. Nicht ganz so ausgeprägt war der Effekt bei der Gefäßoberflächendichte von 0,00453 1/ $\mu\text{m}$  unter Cetuximab und 0,00734 1/ $\mu\text{m}$  in der Kontrollgruppe. Dies entspricht einer Reduktion von 38%. Beide Parameter waren statistisch signifikant verändert.

Bei AEE788 zeigten sich bezüglich der Gefäßanzahl eine Reduktion von 26% gegenüber der Kontrollgruppe und eine weitere Reduktion der Gefäßoberflächendichte von 23%. Diese Werte waren nicht statistisch signifikant.

In der Kombinationstherapie (Cetuximab + AEE788) konnte ein ähnliches Ergebnis wie bei der Cetuximab-Einzeltherapie erzielt werden. Die Gefäßanzahl wurde von 139,56 auf 82,76 gesenkt. Dies entspricht ca. 41%. Bezogen auf die Gefäßoberflächendichte zeigte sich eine Reduktion von 0,0069 1/ $\mu\text{m}$  auf 0,00427 1/ $\mu\text{m}$  im Vergleich zur Kontrollgruppe. Daraus resultiert wie in der Einzeltherapie eine Reduktion von 38%.

Nach unseren Ergebnissen hat die duale Therapie mit einem monoklonalen Antikörper und einem dualen Tyrosinkinaseinhibitor keinen synergistischen Effekt auf die Neoangiogenese. Allerdings ist eine Monotherapie mit Cetuximab bezogen auf die Angiogenese eine Therapieoption mit hoch signifikanten Werten.

Im zweiten Versuchsarm zeigte sich ebenfalls eine signifikante Reduktion der Gefäßoberflächendichte und der Gefäßanzahl bei der Therapie mit Vandetanib und in der Kombination Vandetanib mit Gefitinib gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe. In dem Versuchsarm mit Vandetanib wurde eine Reduktion der Gefäßanzahl von 211,82/mm<sup>2</sup> in der Kontrollgruppe auf 87,97/mm<sup>2</sup> erreicht. Dies entspricht 58% und ist statistisch signifikant. In der Einzeltherapie mit Gefitinib wurde eine Reduktion der Gefäßoberflächendichte von 35% und eine Reduktion von 47% bei der Gefäßanzahl/mm<sup>2</sup> erreicht. Allerdings stellte sich dies als nicht statistisch signifikant heraus. Die Kombinationstherapie von Gefitinib und Vandetanib erbrachte eine weitere Reduktion im Vergleich zu den Einzelgruppen (Oberflächendichtereduktion von 63% und Reduktion der Gefäßanzahl von 66%). Dies war statistisch signifikant.

Inoue et al. konnten in ihren Forschungsergebnissen an Leberzellkarzinomen eine ähnliche Reduktion der Gefäßanzahl nachweisen. In deren Versuchsreihen reduzierte sich die

Gefäßanzahl von 15,6/µm auf 9,3/µm. Dies entspricht ca. 40% Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe.

In der Arbeitsgruppe um Zhou et al. konnte bei oralen Karzinomen eine Reduktion der Gefäßdichte von 265 in der Kontrollgruppe zu 106 in der Behandlungsgruppe mit Vandetanib bezogen auf einen definierten Bereich nachgewiesen werden (Zhou 2010).

Unterstützt werden unsere Ergebnisse durch die großen Phase-III-Studien zur Zulassung von Cetuximab beim kolorektalem Karzinom, sowie dem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich und bei Vandetanib beim medullären Schilddrüsenkarzinom.

### **4.3. Anmerkungen zum Auswertungsverfahren**

#### **4.3.1. Allgemeines**

Während der Durchführung der Versuche zeigten sich jedoch einige Probleme bei der Kultivierung der Tumore in unseren Nu/Nu-Nacktmäusen. Trotz sorgfältiger Beachtung der standardisierten Implantation der Tumorzellen in das Subkutangewebe, zeigten sich zum Teil sehr unterschiedliche Tumordynamiken. Einige Versuchstiere mussten aufgrund ulzerierender großer Tumore frühzeitig euthanasiert werden. Diese fielen dann für die Auswertung heraus. Auf die Verkleinerung der Versuchsgruppen wurde dann in der statistischen Berechnung auf Signifikanz Rücksicht genommen und ein p-Wert kleiner 0,01 festgesetzt. Dies geschah in ausführlicher Absprache mit unseren medizinischen Biometrikern.

Ein weiteres Problem stellten die zum Teil erheblich unterschiedlichen Tumormorphologien dar. Einige Tumore waren komplett solide und andere wiederum zystisch aufgebaut. Diese Tatsache erschwerte es das Tumorgewebe nach Eröffnung der zystischen Areale für die Paraffineinbettung adäquat aufzubereiten. Es gelang, wie im Ergebnisteil bei einem 100%igem Gewebsanteil zu erkennen ist, dies durchzuführen, aber es zeigt auch die zum Teil erheblichen interindividuellen Tumorunterschiede bei gleicher Zelllinie.

## 4.4. Fazit und Ausblick

Die positiven Ergebnisse bezüglich der Umwandlung der zellulären Struktur (Proliferation, Gefäßanzahl und Gefäßoberflächendichte) zeigen eine deutliche Wirkung der Tyrosinkinaseinhibitoren und Antikörper bei entsprechend vorhandenen Zelloberflächenmolekülen bei Karzinomen. Es müssen weitere in-vivo-Versuche unternommen werden um die Wirkung von Tyrosinkinaseinhibitoren und Antikörpern auf das anaplastische Schilddrüsenkarzinom zu untersuchen und den Patienten mit einem anaplastischen Schilddrüsenkarzinom eine neue Therapieform anzubieten.

Ein weiterer Tyrosinkinaseinhibitor das Sorafenib wurde in einer Phase-II-Studie getestet (Savvides 2013). Hierbei konnte ein positiver Effekt auf den Krankheitsverlauf gezeigt werden. 10% der behandelten Patienten (2xtäglich 400mg Sorafenib) zeigten einen Rückgang der Erkrankung und 25% einen stabilen Krankheitsverlauf. Allerdings blieben die Ergebnisse hinter den Erwartung der Autoren zurück.

Einen anderen Therapieansatz nutzen die Aurorakinase-Inhibitoren. Der menschliche Organismus synthetisiert sich drei Aurorakinasen. Diese sind an zahlreichen biologischen Zellprozessen beteiligt, so unter anderem auch an der Zellteilung. In den letzten Jahren wurden zahlreiche in-vitro Versuche unternommen um einen geeigneten Inhibitor für die Zellteilung zu finden. Baldini et al. zeigte, dass SNS-314 als möglicher Therapieansatz beim anaplastischen Schilddrüsenkarzinom effizient das Zellwachstum hemmen kann (Baldini 2012). Aktuell stehen noch klinische Studien zu den Aurorakinasen aus.

Proteasomen dienen in der Zelle dem Abbau von Proteinen und greifen damit aktiv in den Zellzyklus und dem damit verbundenen Zellwachstum ein. Der erste Proteasomen-Inhibitor Bortezomib ist für das Multiple Myelom klinisch zugelassen. Weitere Indikationen, z. B. hämatologische Krebsformen, befinden sich in der klinischen Erprobung. (Osawa 2014)

Für die weitere Entwicklung neuer Therapieformen beim anaplastischen Schilddrüsenkarzinom werden vor allem die Kombinationen aus den verschiedenen Therapieansätzen wichtig sein. Dieser Ansatz ist besonders wichtig, wenn man bedenkt, dass

in-vitro und in-vivo Monotherapieversuche meistens nicht den gleichen Effekt in klinischen Studien zeigen.

In der Marburger Arbeitsgruppe konnte von Wunderlich et al. ein synergistischer Effekt von dem Proteasomen-Inhibitor Bortezomib und dem Aurorakinase-Inhibitor MLN8054 bei anaplastischen Zelllinien bezüglich des Zellwachstums gezeigt werden (Wunderlich, 2012).

Interkalation bedeutet die Interaktion zwischen Kleinstmolekülen und der DNS. Mit dieser Methode konnte Terenzi et al. eine Proliferationshemmung bei Schilddrüsenkarzinomen erreichen. (Terenzi 2012)

In Zusammenschau all dieser verschiedenen Ansätze und den Ergebnissen dieser Arbeit stehen weitere in-vitro und in-vivo-Versuche an, um die Synergie der einzelnen Substanzen zu erforschen und sie dann in klinischen Studien zu überprüfen. Der Patient kann so in Zukunft von einem multimodalem Therapieansatz profitieren.

## 5. Literaturverzeichnis

- Akslen LA, Myking AO, Salvesen H, Varhaug JE. *Prognostic impact of EGF-receptor in papillary thyroid carcinoma*. In: British Journal of Cancer. 1993 Oct;68(4):808-12
- Baldini E, Sorrenti S, D'Armiento E, Guaitoli E, Morrone S, D'Andrea V, Gnessi L, Moretti C, Antonelli A, Catania A, De Antoni E, Ulisse S. *Effects of the Aurora kinases pan-inhibitor SNS-314 mesylate on anaplastic thyroid cancer derived cell lines*. In: La Clinica Terapeutica. 2012;163(5):e307-13.
- Brem H, Folkman J. *Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage*. In: Journal of Experimental Medicine. 1975 Feb 1;141(2):427-39
- Brierley JD. *Update on external beam radiation therapy in thyroid cancer*. In: Journal of Clinical Endocrinology Metabolism. 2011 Aug;96(8):2289-95
- De Crevoisier R, Baudin E, Bachelot A, Leboulleux S, Travagli JP, Caillou B, Schlumberger M. *Combined treatment of anaplastic thyroid carcinoma with surgery, chemotherapy and hyperfractionated accelerated external radiotherapy*. In: International Journal of Radiation Oncology-Biology-Physics. 2004; 60:1137-43
- Dreys J, Konerding MA, Wolloscheck T, Wedge SR, Ryan AJ, Ogilvie DJ, Esser N. *The VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, ZD6474, inhibits angiogenesis and affects microvascular architecture within an orthotopically implanted renal cell carcinoma*. In: Angiogenesis. 2004;7(4):347-54. Epub 2005 May 9.
- Farahati J, Reiners C, Stuschke M, Müller SP, Stüben G, Sauerwein W, Sack H. *Differentiated thyroid cancer. Impact of adjuvant external radiotherapy in patients with perithyroidal tumor infiltration (stage pT4)*. In: Cancer. 1996 Jan 1;77(1):172-80
- Ferrara N, Winer J, Burton T, Rowland A, Siegel M, Phillips HS, Terrell T, Keller GA, Levinson AD. *Expression of vascular endothelial growth factor does not promote transformation but confers a growth advantage in vivo to Chinese hamster ovary cells*. In: Journal of Clinical Investigation. 1993 Jan;91(1):160-70
- Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. *Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis*. In: Journal of Experimental Medicine. 1971 Feb 1;133(2):275-88
- Folkman J. *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. In: New England Journal of Medicine. 1971 Nov 18;285(21):1182-6
- Folkman J. *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* In: Journal of the National Cancer Institute. 1990 Jan 3;82(1):4-6
- Foote RL, Molina JR, Kasperbauer JL, Lloyd RV, McIver B, Morris JC, Grant CS, Thompson GB, Richards ML, Hay ID, Smallridge RC, Bible KC. *Enhanced survival in locoregionally confined anaplastic thyroid carcinoma: a single-institution experience using aggressive multimodal therapy*. In: Thyroid. 2011 Jan;21(1):25-30
- Frilling A, Bockhorn M, Kalinin V, Liedke M, Kaun M, Broelsch CE. *Somatic ret proto-oncogene mutations in sporadic C-cell carcinoma of the thyroid gland*. In: Der Chirurg. 1997 Aug;68(8):789-93
- Gabler B, Aicher T, Heiss P, Senekowitsch-Schmidtke R. *Growth inhibition of human papillary thyroid carcinoma cells and multicellular spheroids by anti-EGF-receptor antibody*. In: Anticancer Research. 1997 Jul-Aug;17(4B):3157-9
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. In: Annual Review of Immunology. 1998;16:225-60

- Giannelli G, Azzariti A, Sgarra C, Porcelli L, Antonaci S, Paradiso A. *ZD6474 inhibits proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells*. In: *Biochemical Pharmacology*. 2006 Feb 14;71(4):479-85
- Grimm O, Dralle H. *Diagnostik und Therapie sporadischer und familiärer medullärer Schilddrüsenkarzinome*. In: *Onkologie*. 1997; 3:32-37
- Hanahan D, Weinberg RA. *The hallmarks of cancer*. In: *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70
- Handkiewicz-Junak D, Czarniecka A & Jarzab B. *Molecular prognostic markers in papillary and follicular thyroid cancer: current status and future directions*. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 2010 322 8–28
- Hoffmann S, Hofbauer LC, Scharrenbach V, Wunderlich A, Hassan I, Lingelbach S, Zielke A. *Thyrotropin (TSH)-induced production of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cells in vitro: evaluation of TSH signal transduction and of angiogenesis-stimulating growth factors*. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2004 Dec;89(12):6139-45
- Hoffmann S, Wunderlich A, Celik I, Maschuw K, Hassan I, Hofbauer LC, Zielke A. *Paneling human thyroid cancer cell lines for candidate proteins for targeted anti-angiogenic therapy*. In: *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006 Jul 1;98(4):954-65
- Hoffmann S, Maschuw K, Hassan I, Wunderlich A, Lingelbach S, Ramaswamy A, Hofbauer LC, Zielke A. *Functional thyrotropin receptor attenuates malignant phenotype of follicular thyroid cancer cells*. In: *Endocrine*. 2006 Aug;30(1):129-38
- Hoffmann S, Gläser S, Wunderlich A, Lingelbach S, Dietrich C, Burchert A, Müller H, Rothmund M, Zielke A. *Targeting the EGF/VEGF-R system by tyrosine-kinase inhibitors--a novel antiproliferative/antiangiogenic strategy in thyroid cancer*. In: *Langenbecks Archives Surgery*. 2006 Nov;391(6):589-96
- Hoffmann S, Burchert A, Wunderlich A, Wang Y, Lingelbach S, Hofbauer LC, Rothmund M, Zielke A. *Differential effects of cetuximab and AEE 788 on epidermal growth factor receptor (EGF-R) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGF-R) in thyroid cancer cell lines*. In: *Endocrine*. 2007 Apr;31(2):105-13.
- Homsí J, Daud AI. *Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors*. In: *Cancer Control*. 2007 Jul;14(3):285-94
- Hüfner M, Reiners C. *Follow-up care for differentiated thyroid cancer*. In: *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 1986 Nov 7;111(45):1732-4
- Inoue K, Torimura T, Nakamura T, Iwamoto H, Masuda H, Abe M, Hashimoto O, Koga H, Ueno T, Yano H, Sata M. *Vandetanib, an inhibitor of VEGF receptor-2 and EGF receptor, suppresses tumor development and improves prognosis of liver cancer in mice*. In: *Clinical Cancer Research*. 2012 Jul 15;18(14):3924-33
- Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. *Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer*. In: *Nature Clinical Practice Oncology*. 2006 Jan;3(1):24-40
- Kim ES, Khuri FR, Herbst RS. *Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225)*. In: *Current Opinion in Oncology*. 2001 Nov;13(6):506-13
- Kim S, Prichard CN, Younes MN, Yazici YD, Jasser SA, Bekele BN, Myers JN. *Cetuximab and irinotecan interact synergistically to inhibit the growth of orthotopic anaplastic thyroid carcinoma xenografts in nude mice*. In: *Clinical Cancer Research*. 2006 Jan; 15;12(2):600-7.

- Klein M, Vignaud JM, Hennequin V, Toussaint B, Bresler L, Plénat F, Leclère J, Duprez A, Weryha G. *Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma.* In: Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2001 Feb;86(2):656-8
- Kobayashi T, Asakawa H, Umeshita K, Takeda T, Maruyama H, Matsuzuka F, Monden M. *Treatment of 37 patients with anaplastic carcinoma of the thyroid.* In: Head neck. 1996; 18:36-41
- Lee EJ, Whang JH, Jeon NK, Kim J. *The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) suppresses proliferation and invasion of human oral squamous carcinoma cells via p53 independent and MMP, uPAR dependent mechanism.* In: Annals of the New York Academy of Science. 2007 Jan;1095:113-28.
- Lennard CM, Patel A, Wilson J, Reinhardt B, Tuman C, Fenton C, Blair E, Francis GL, Tuttle RM. *Intensity of vascular endothelial growth factor expression is associated with increased risk of recurrence and decreased disease-free survival in papillary thyroid cancer.* In: Surgery. 2001 May;129(5):552-8
- Licitra L, Mesia R, Rivera F, Remenár E, Hitt R, Erfán J, Rottey S, Kawecki A, Zabolotnyy D, Benasso M, Störkel S, Senger S, Stroh C, Vermorken JB. *Evaluation of EGFR gene copy number as a predictive biomarker for the efficacy of cetuximab in combination with chemotherapy in the first-line treatment of recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: EXTREME study.* In: Annals of Oncology. 2011 May;22(5):1078-87
- Luster M. *Welche Konsequenz hat die zunehmende Inzidenz von Schilddrüsenkarzinomen?* In: H. Dralle (Hrsg.) *Schilddrüse 2009. Qualitätsstandards in der Schilddrüsenmedizin.* Berlin 2010 ISBN 978-3-86541-386-4
- Mann H, Whitney D. *On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other.* In: Annals of mathematical Statistics 1947; 18: 50-60
- Mazzaferri EL, Jhiang SM. *Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer.* In: American Journal of Medicine. 1994 Nov;97(5):418-28
- Meco D<sup>1</sup>, Servidei T, Zannoni GF, Martinelli E, Prisco MG, de Waure C, Riccardi R. *Dual Inhibitor AEE788 Reduces Tumor Growth in Preclinical Models of Medulloblastoma.* In: Translational Oncology. 2010 Oct 1;3(5):326-35.
- Mincione G, Di Marcantonio MC, Tarantelli C, D'Inzeo S, Nicolussi A, Nardi F, Donini CF, Coppa A. *EGF and TGF-β1 Effects on Thyroid Function.* In: Journal of Thyroid Research. 2011;2011:431718
- Nagaiah G, Hossain A, Mooney CJ, Parmentier J, Remick SC. *Anaplastic Thyroid Cancer: A Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Treatment.* In: Journal of Oncology. Volume 2011 (2011), Article ID 542358, 13 pages; Review Article
- Nilsson UW, Johns TG, Wilmann T, Kaitu'u-Lino T, Whitehead C, Dimitriadis E, Menkhorst E, Saglam B, Gao Y, Greenall SA, Horne AW, Tong S. *Effects of gefitinib, an epidermal growth factor receptor inhibitor, on human placental cell growth.* In: Obstetrics and Gynecology. 2013 Oct;122(4):737-44
- Osawa T, Naito T, Kaneko T, Mino Y, Ohnishi K, Yamada H, Kawakami J. *Blood distribution of bortezomib and its kinetics in multiple myeloma patients.* In: Clinical Biochemistry. 2014 Oct;47(15):54-9

- Pierie JP, Muzikansky A, Gaz RD, Faquin WC, Ott MJ. *The effect of surgery and radiotherapy on outcome of anaplastic thyroid carcinoma*. In: Annals of Surgical Oncology. 2002 Jan-Feb;9(1):57-64
- Pujol P, Daures JP, Nsakala N, Baldet L, Bringer J, Jaffiol C. *Degree of thyrotropin suppression as a prognostic determinant in differentiated thyroid cancer*. In: Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1996 Dec;81(12):4318-23
- Ramsden JD. *Angiogenesis in the thyroid gland*. In: Journal of Endocrinology. 2000 Sep;166(3):475-80
- Raue F. *Chemotherapie bei Schilddrüsenkarzinomen. Indikationen und Ergebnisse*. In: Onkologie 1997 3;55-58
- Reinwein D, Benker G, Windeck R, Eigler FW, Leder LD, Mlynek ML, Creutzig H, Reiners C. *Initial symptoms of malignant thyroid tumors: the effect of age and sex in an iodine-deficient region. Experiences with 1116 patients*. In: Deutsche Medizinische Wochenschrift. 1989 May 19;114(20):775-82
- Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M, Janakiraman M, Solit D, Knauf JA, Tuttle RM, Ghossein RA, Fagin JA. *Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1*. In: Cancer Research. 2009 Jun 1;69(11):4885-93
- Robert Koch Institut. *Schilddrüse C73*. In: Krebs in Deutschland 2007/2008 Hamburg 2012
- Rüschoff J, Dietmaier W, Lüttges J, Seitz G, Bocker T, Zirngibl H, Schlegel J, Schackert HK, Jauch KW, Hofstaedter F. *Poorly differentiated colonic adenocarcinoma, medullary type: clinical, phenotypic, and molecular characteristics*. In: American Journal of Pathology. 1997 May;150(5):1815-25
- Rusinek D, Szpak-Ulczo S, Jarzab B. *Gene expression profile of human thyroid cancer in relation to its mutational status*. In: Journal of Molecular Endocrinology. 2011 Nov 2;47(3):R91-103.
- Santarpia L, El-Naggar AK, Cote GJ, Myers JN, Sherman SI. *Phosphatidylinositol 3-kinase/akt and ras/raf-mitogen-activated protein kinase pathway mutations in anaplastic thyroid cancer*. In: Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2008 Jan;93(1):278-84
- Sautter-Bihl ML. *Hat die perkutane Strahlentherapie einen Stellenwert in der Behandlung des Schilddrüsenkarzinoms?* In: Onkologie 1997; 3: 48 – 54
- Savvides P, Nagaiah G, Lavertu P, Fu P, Wright JJ, Chapman R, Wasman J, Dowlati A, Remick SC. *Phase II trial of sorafenib in patients with advanced anaplastic carcinoma of the thyroid*. In: Thyroid. 2013 May;23(5):600-4.
- Schiff BA, McMurphy AB, Jasser SA, Younes MN, Doan D, Yigitbasi OG, Kim S, Zhou G, Mandal M, Bekele BN, Holsinger FC, Sherman SI, Yeung SC, El-Naggar AK, Myers JN. *Epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in anaplastic thyroid cancer, and the EGFR inhibitor gefitinib inhibits the growth of anaplastic thyroid cancer*. In: Clinical Cancer Research. 2004 Dec 15;10(24):8594-602
- Schmid KW. *Molecular pathology of thyroid tumors*. In: Pathologie. 2010 Oct;31 Suppl 2:229-33

- Schweppe RE, Klopper JP, Korch C, Pugazhenth U, Benezra M, Knauf JA, Fagin JA, Marlow LA, Copland JA, Smallridge RC, Haugen BR. *Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification*. In: Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2008 Nov;93(11):4331-41
- Shigeta K, Hayashida T, Hoshino Y, Okabayashi K, Endo T, Ishii Y, Hasegawa H, Kitagawa Y. *Expression of Epidermal Growth Factor Receptor Detected by Cetuximab Indicates Its Efficacy to Inhibit In Vitro and In Vivo Proliferation of Colorectal Cancer Cells*. In: PLoS One. 2013 Jun 18;8(6):e66302. Print 2013.
- Smallridge RC, Marlow LA, Copland JA. *Anaplastic thyroid cancer: molecular pathogenesis and emerging therapies*. In: Endocrine-related Cancer 2009 Mar; 16(1):17-44
- Sugitani I, Miyauchi A, Sugino K, Okamoto T, Yoshida A, Suzuki S. *Prognostic factors and treatment outcomes for anaplastic thyroid carcinoma: ATC Research Consortium of Japan cohort study of 677 patients*. In: World Journal of Surgery. 2012 Jun; 36(6): 1247-54
- Summy JM, Trevino JG, Baker CH, Gallick GE. *c-Src regulates constitutive and EGF-mediated VEGF expression in pancreatic tumor cells through activation of phosphatidylinositol-3 kinase and p38 MAPK*. In: Pancreas. 2005 Oct;31(3):263-74
- Tallroth E, Wallin G, Lundell G, Löwhagen T, Einhorn J. *Multimodality treatment in anaplastic giant cell thyroid carcinoma*. In: Cancer 1987; 60:1428-31
- Tamura S, Hosoi H, Kuwahara Y, Kikuchi K, Otabe O, Izumi M, Tsuchiya K, Iehara T, Gotoh T, Sugimoto T. *Induction of apoptosis by an inhibitor of EGFR in neuroblastoma cells*. In: Biochemical and Biophysical Research Communication. 2007 Jun 22;358(1):226-32
- Terenzi A, Tomasello L, Spinello A, Bruno G, Giordano C, Barone G.
- *(Dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine)(glycinato)copper(II) perchlorate: a novel DNA-intercalator with anti-proliferative activity against thyroid cancer cell lines*. In: Journal of inorganic Biochemistry. 2012 Dec;117:103-10
- Traxler P, Allegrini PR, Brandt R, Brueggen J, Cozens R, Fabbro D, Grosios K, Lane HA, McSheehy P, Mestan J, Meyer T, Tang C, Wartmann M, Wood J, Caravatti G. *AEE788: a dual family epidermal growth factor receptor/ErbB2 and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity*. In: Cancer Research. 2004 Jul 15;64(14):4931-41.
- Wells SA Jr, Robinson BG, Gagel RF, Dralle H, Fagin JA, Santoro M, Baudin E, Elisei R, Jarzab B, Vasselli JR, Read J, Langmuir P, Ryan AJ, Schlumberger MJ. *Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial*. In: Journal of Clinical Oncology. 2012 Jan 10;30(2):134-41.
- Wilcoxon F. *Individual Comparisons by Ranking Methods*. In: Biometrics Bulletin 1945; 1: 80–83

- Wiseman SM<sup>1</sup>, Masoudi H, Niblock P, Turbin D, Rajput A, Hay J, Bugis S, Filipenko D, Huntsman D, Gilks B. *Anaplastic thyroid carcinoma: expression profile of targets for therapy offers new insights for disease treatment*. In: *Annals of Surgical Oncology*. 2007 Feb;14(2):719-29. Epub 2006 Nov 10.
- Witte J, Goretzki PE, Röher HD. *Surgery for Graves disease in childhood and adolescence*. In: *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 1997;105 Suppl 4:58-60. Review.
- Wittekind C, Compton CC, Greene FL, Sobin LH. *TNM residual tumor classification revisited*. In: *Cancer*. 2002 May 1;94(9):2511-6
- Xing M. *Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer*. In: *Thyroid*. 2010 Jul;20(7):697-706
- Yigitbasi OG, Younes MN, Doan D, Jasser SA, Schiff BA, Bucana CD, Bekele BN, Fidler IJ, Myers JN. *Tumor cell and endothelial cell therapy of oral cancer by dual tyrosine kinase receptor blockade*. In: *Cancer Research*. 2004 Nov 1;64(21):7977-84
- Younes MN, Yigitbasi OG, Park YW, Kim SJ, Jasser SA, Hawthorne VS, Yazici YD, Mandal M, Bekele BN, Bucana CD, Fidler IJ, Myers JN. *Antivascular therapy of human follicular thyroid cancer experimental bone metastasis by blockade of epidermal growth factor receptor and vascular growth factor receptor phosphorylation*. In: *Cancer Res*. 2005 Jun 1;65(11):4716-27
- Yuan HH<sup>1</sup>, Han Y, Bian WX, Liu L, Bai YX. *The effect of monoclonal antibody cetuximab (C225) in combination with tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839) on colon cancer cell lines*. In: *Pathology*. 2012 Oct;44(6):547-51.
- Zhou G, Hasina R, Wroblewski K, Mankame TP, Doçi CL, Lingen MW. *Dual inhibition of vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor is an effective chemopreventive strategy in the mouse 4-NQO model of oral carcinogenesis*. In: *Cancer Prevention Research (Phila)*. 2010 Nov;3(11):1493-502.

# Curriculum Vitae

## Dennis Josephs

### Persönliche Angaben

---

Geburtsdatum und -ort                      19.01.1983 in Dortmund

Adresse    Anne Frank Str. 4D; 35037 Marburg  
Tel.: 06421-487693; Mobil: 0177-7522930  
Email: josephs@med.uni-marburg.de

Familienstand                                verheiratet, keine Kinder

Konfession                                     evangelisch

Nationalität                                  deutsch

### Schulbildung

---

1989 – 1993                                    Grundschule Dortmund-Eichlinghofen

1993 – 2002                                    Helene-Lange-Gymnasium Dortmund

2002    Abitur

2002 – 2003                                    Zivildienst im Klinikum Dortmund  
  
(interdisziplinäre Notaufnahme und chirurgische Intensivstation)

## Hochschulstudium

---

2003 – 2009	Studium der Humanmedizin Philipps-Universität Marburg
2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2006	Zweimonatiges Praktikum an der Philipps-Universität Marburg im Institut für Virologie (Methodenlehre)
2006 + 2008	Famulaturen in München (Chirurgie), Hamburg (Anästhesie), Würzburg (Tropenmedizin), Hammersbach (Allgemeinmedizin)
2008 – 2009	Praktisches Jahr: <ul style="list-style-type: none"><li>- Universitätsklinikum Marburg, Klinik für Herz- und thorakale Gefäßchirurgie</li><li>- Auguste-Viktoria-Klinikum Berlin, Klinik für Innere Medizin / Infektiologie und Gastroenterologie</li><li>- Universitätsklinikum Marburg, Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie</li></ul>
2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit 2010	Assistenzarzt in der Klinik für VTG-Chirurgie am Universitätsklinikum Marburg

## Sprachen

---

Deutsch, Englisch, Latein

## Engagement

---

1998 + 1999	Gesamtorganisation und Durchführung eines ev. Wohltätigkeitsfestes in Dortmund zugunsten der Partnergemeinde im Kongo, Bolenge
1999 + 2004	Mitarbeit bei „Habitat for Humanity“ in New Jersey
1999 – 2004	Kassenwart Sportverein TuS Eichlinghofen Dortmund
2004 – 2009	Finanzvorstand Sportverein TuS Eichlinghofen Dortmund
2003 – 2007	Finanzvorstand des Ehemaligenvereins „Connectiva“ des Helene-Lange-Gymnasiums Dortmund
2007 – 2008	Parlamentarier im Allgemeinen Studierenden Ausschuss der Philipps-Universität Marburg
1999 – heute	aktives Mitglied der CDU
2007 – heute	Mitglied im Marburger Universitätsbund e. V.
2008 – heute	Mitglied im Marburger Kunstverein

## Sportliche Aktivitäten

---

Golf, Jogging, Fechten

Marburg, 08.05.2015

## Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Arnold, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Bause, Boudriot, Cordes, Czubayko, Daut, Dettmeyer, Engenhardt-Cabillic, Fendrich, Görg, Gudermann, Grundmann, Grzeschik, Herrmann-Lingen, Hertl, Hilt, Höffken, Hofmann, Hoyer, Junclas, Kalinowski, Kann, Klenk, Klose, Köster, Kim-Berger, Koolmann, Krieg, Kroll, Langer, Lenz, Lill, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Martin, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Plant, Renz, Richter, Rothmund, Röper, Schäfer, Schäfer, Schmidt, Schmidt, Schmitt, Schnabel, Schofer, Schrader, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Waldmann, Werner, Westermann, Wulf

In Berlin: Arasteh

In Hamburg: Bause

In Hammersbach: Götz

In München: Waldner

In Würzburg: Stich

## Danksagungen

Nach vielen Jahren der intensiven Arbeit an dieser Dissertation, ist sie nun fertig. Es ist die Zeit gekommen all denen zu danken die mich begleitet und unterstützt haben. Ganz vorne zu nennen ist Frau Dr. Wunderlich und Herr Prof Dr. Hoffmann die mich während der experimentellen Phase stets mit Rat und Tat unterstützt haben. Aber auch in der Zeit der Niederschrift konnte ich mich auf den fachlichen und kollegialen Rat immer verlassen. Natürlich gehört dem gesamten Team vom Forschungslabor der Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie mein ganz besonderer Dank.

Herzlich bedanken möchte ich mich ebenfalls bei meiner Frau und meinen Eltern für die Hilfe, aber auch den Ansporn in der einen oder anderen Phase die Dissertation erfolgreich zu beenden. Ihr ward mir eine sehr große Unterstützung. Vielen lieben Dank!!!!

## Ehrenwörtliche Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Dissertation

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „In vivo Evaluation antiproliferativ-antiangiogener Therapiestrategien beim anaplastischen Schilddrüsenkarzinom“ in der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. D. K. Bartsch mit Unterstützung durch Prof Dr. Hoffmann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 08.05.2015

---

(Dennis Josephs)

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

08.05.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Schäfer

Referent: Prof. Dr. Hoffmann

1. Korreferent: PD Dr. Meißner