

**Untersuchungen zur antiproliferativen Wirkung  
von Thalidomid bei Gliomen  
am Beispiel des F98 Transplantationstumors der Ratte**

Inaugural – Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von  
**Morgane Legendre**

**Unter Anleitung von Fr. PD Dr. med. Martina Messing-Jünger  
aus der Neurochirurgischen Klinik / Düsseldorf**

Düsseldorf  
2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Dekan

Referentin: PD Dr. med. Martina Messing-Jünger

Korreferentin: PD Dr. med. Hildegard Pape

Für meine Familie

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand in der neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikum Düsseldorf unter Anleitung von Frau PD Dr. med. Messing im Rahmen des Förderprojektes „Untersuchung zur anti-angiogenetischen und immunmodulatorischen Wirkung von Thalidomid im Gehirn und im malignen Transplantationstumor F98 der Ratte“ von der Forschungskommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität. An dieser Stelle möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung bedanken.

Desweiteren danke ich:

Frau PD Dr. med. Messing-Jünger für ihr Engagement und Interesse am Fortgang meiner Arbeit sowie die zahlreichen fachlichen und nicht-fachlichen Diskussionen und ihre Unterstützung für meine Ideen.

Herrn Prof. Dr. med. Bock und seinem Nachfolger Prof. Dr. med. Steiger sowie PD Dr. Sabel für die Möglichkeit, meine Arbeit im neuroonkologischen Labor der neurochirurgischen Klinik durchführen zu können.

Fr. PD Dr. med. Pape für die Übernahme des Korreferates

Frau Samira Seghrouchni danke ich ganz besonders für die gute technisch routinierte Arbeit als MTA, die zahlreichen Tipps und Ideen, die gute Stimmung sowie für die langen Gespräche über Neuroonkologie und die Welt.

Frau Beyer für ihre Unterstützung bei EDV-Anliegen.

Prof. Dr. med. Reifenberger für die Unterstützung bei neuropathologischen Fragen und Bereitschaft zur Zusammenarbeit seines gesamten Teams - Herrn Dr. med. Felsberg, Herrn Dipl. biol. Van den Boom, Frau Dr. rer. nat. Wolter, Herrn Prof. Dr. med. vet. Bilzer und Herrn PD Dr. med. Korth aus dem Institut für Neuropathologie.

Herrn Dr. Hemmerling aus der pharmazeutischen Chemie für seine Unterstützung bei der HPLC.

Herrn Dr. rer. nat. Giebel aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika für die Einführung in die Fotobearbeitung.

Herrn Dr. Willers aus dem Rechenzentrum für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern sowie meinem Bruder bedanken, die mich während dieser Arbeit sowie meinem ganzen Studium in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Der größte Dank gilt meinem Mann Hikmet, der mich mit seinem Pragmatismus sowie Optimismus trotz Frustrationen immer wieder auf den richtigen Weg gebracht hat.

Abschließend sei den vielen Unerwähnten – darunter vielen Freunden - gedankt, die mir ihre Unterstützung entgegengebracht haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einführung und Aufgabenstellung</b>	<b>8</b>
<b>2.</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>9</b>
2.1	Glioblastoma multiforme	9
2.1.1	Epidemiologie	9
2.1.2	Lokalisation, Symptomatik und Histopathologie	9
2.1.3	Immunologie	10
2.1.4	Dignitätskriterien	10
2.1.5	Diagnostik	12
2.1.6	Therapie	12
2.1.7	Prognose	13
2.2	Das F98 Tumormodell	13
2.3	Angiogenese	14
2.3.1	Stand der Forschung auf dem Gebiet der Angiogenese	14
2.3.1.1	Wachstumsfaktoren	17
2.3.1.2	Immunologische Faktoren	19
2.3.1.3	Gefäßdichte	21
2.3.2	Relevanz der Angiogenese in der Neuroonkologie: antiangiogenetische Therapie	23
2.4	Blut-Hirn-Schranke	24
2.5	Thalidomid	26
2.5.1	Geschichte	26
2.5.2	Eigenschaften von Thalidomid	27
2.5.3	Experimentelle und klinische Erfahrung mit Thalidomid	31
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>33</b>
3.1	Versuchsbedingungen	33
3.1.1	Transplantationstumor F98	33
3.1.2	Versuchstierbehandlung	33
3.1.2.1	Versuchstiere	33
3.1.2.2	Versuchstierhaltung	33
3.1.2.3	Versuchsreihen	33
3.1.2.4	Zellimplantation	34
3.1.2.5	Ablauf der Behandlung mit Thalidomid	35
3.1.2.6	Einschläfern und Präparation der Tiere	36
3.2	Verwendete Material und Geräte	37
3.2.1	Laborgeräte	37
3.2.2	Eingesetzte Chemikalien	38
3.2.3	Plastikwaren und sonstige Einwegartikel	39
3.2.4	Antikörper	39
3.2.5	Molekularbiologische Kits	41
3.2.6	Primer	41
3.3	Zellbiologische Arbeiten	42
3.3.1	Zelllinien	42
3.3.2	Zellkulturmedien	42
3.3.3	Anzucht der Zellen	42
3.3.4	Proliferationstest bei F98er Zellen	42
3.4	Herstellung der Gewebeschnitte	43
3.5	Färbungen	43
3.5.1	Hämalaun-Eosin Färbung zur Histologie	43
3.5.2	Berliner Blau Färbung zum Eisen Nachweis	44
3.6	Onkometrie	44
3.7	Immunhistochemie	45
3.8	Molekularbiologische Methoden	47
3.8.1	ELISA zum TNF- $\alpha$ Nachweis	47
3.8.2	<i>In situ</i> Hybridisierung zum Apoptose-Nachweis	47
3.8.2.1	Neuro TACS © Kit zum Apoptose-Nachweis	48
3.8.2.2	<i>In situ</i> cell death detection © Kit POD zum Apoptose-Nachweis	50
3.8.3	TRAIL / Apo 2L ELISA zum Apoptose-Nachweis	50
3.8.4	Real Time Transcriptase PCR bei VEGF, FGF2, IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$	50
3.8.5	Western-Blot zum Nachweis TNF- $\alpha$ , VEGF und IFN- $\gamma$	55
3.9	RP-HPLC zum Nachweis Thalidomids in Serum und Hirn	56

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
4.1	Protokolle der Tierversuche	60
4.2	Histologie	63
4.2.1	Histologie durch HE-Färbung	63
4.2.2	Eisennachweis	64
4.2.3	Gewebetypisierung (GFAP, S100, Vimentin)	65
4.3	Apoptose	70
4.3.1	Immunhistochemischer Nachweis der Apoptose durch Apo-1	70
4.3.2	ELISA zum Apoptose-Nachweis durch TRAIL/ Apo 2L	70
4.3.3	<i>In situ</i> Hybridisierung zum Apoptose-Nachweis	70
4.3.3.1	Neuro TACS © Kit	70
4.3.3.2	<i>In situ</i> cell death detection © Kit POD	71
4.4	Thalidomideffekte	72
4.4.1	Sedative Wirkung	72
4.4.1.1	Beobachtung der Tiere	72
4.4.1.2	HPLC zum Nachweis Thalidomids im Serum und Hirn	73
4.4.2	Antiproliferativer Effekt	76
4.4.2.1	Proliferationstest der F98er Zellen	76
4.4.2.2	Immunhistochemischer Nachweis von Proliferationsmarker	78
4.4.2.3	Onkometrie	81
4.4.3	Immunmodulatorischer und antioangiogenetischer Effekte	84
4.4.3.1	TNF- $\alpha$ Nachweis	84
4.4.3.1.1	TNF- $\alpha$ Nachweis <i>in situ</i> und bei F98er Zellen durch ELISA	84
4.4.3.1.2	TNF- $\alpha$ Nachweis <i>in situ</i> durch Immunhistochemie	85
4.4.3.1.3	TNF- $\alpha$ Nachweis <i>in situ</i> durch Western-Blot	85
4.4.3.1.4	TNF- $\alpha$ Nachweis <i>in situ</i> und bei F98er Zellen durch RT-PCR	85
4.4.3.2	IFN- $\gamma$ Nachweis	87
4.4.3.2.1	IFN- $\gamma$ Nachweis durch Immunhistochemie	87
4.4.3.2.2	IFN- $\gamma$ Nachweis durch Western-Blot	87
4.4.3.2.3	IFN- $\gamma$ Nachweis durch RT-PCR	87
4.4.3.3	CD4, CD8 und CD68 Nachweis durch Immunhistochemie	88
4.4.3.4	VEGF und FGF2 Nachweis	88
4.4.3.4.1	VEGF und FGF2 Nachweis durch Immunhistochemie	88
4.4.3.4.2	VEGF Nachweis durch Western Blot	88
4.4.3.4.3	VEGF und FGF2 Nachweis durch RT-PCR	88
4.4.3.5	Gefäßuntersuchungen	94
4.4.3.5.1	Gefäßmarker (CD31, RCA, CD51/61, CD54, OX43, EBA und vWF)	94
4.4.3.5.2	Gefäßdichte	99
4.4.3.5.3	Gefäßmorphometrie	103
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>104</b>
5.1	Histologie der Transplantationstumoren F98	104
5.2	Apoptotischer Effekt von Thalidomid	104
5.3	Sedierender Effekt von Thalidomid	105
5.4	Anti-proliferativer Effekt von Thalidomid	105
5.5	Immunmodulatorischer Effekt von Thalidomid	106
5.6	Antiangiogenetischer Effekt von Thalidomid	107
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>110</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>112</b>

## Abkürzungen

APC	Antigen präsentierende Zellen
CD	Cluster of Differentiation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBA	Endothelial Barrier Antigen
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drugs Administration
FGF2 / bFGF	(basic) Fibroblast Growth Factor
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony- Stimulating Factor
HE	Hämalaun Eosin
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
LFA	Lymphozyten-Funktion-Antigen
MAC	Membran Attac Complex
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	Tetrazoliumsalsz 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NK	Natural Killer Cell
NO	Nitric oxide
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesions Molecule
RCA	<i>Ricinus communis</i> Antigen
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
Th1/2	T(Thymus)-Helfer Lymphozyten 1/2
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
tPA	Tissue Plasminogen Activator
uPA	Urokinase Plasminogen Activator
uPAR	Urokinase Plasminogen Activator Receptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	von Willebrand Faktor
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentralnervensystem

## 1. Einleitung und Aufgabenstellung

Die ursprünglich aufgrund ihrer hypnotischen und antiemetischen Eigenschaften eingesetzte Substanz Thalidomid wurde in letzter Zeit vermehrt aufgrund neu entdeckter Wirkungen im Hinblick auf Proliferation, Immunologie und Angiogenese bei immunologischen wie neoplastischen Erkrankungen eingesetzt. Hierbei sind jedoch die tatsächlichen Wirkmechanismen nicht vollständig geklärt.

Trotz erfolgter klinischer Studien über die Wirkung von Thalidomid bei Patienten mit *Glioblastoma multiforme*, wurde im Vorfeld keine Studie *in vivo* am orthotopen Glioblastommodell durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Wirkung von Thalidomid auf die Proliferation des syngen malignen Implantationsgliommodell F98 der CD Fischer Ratte. Als Voraussetzung für die Tumorpheriferation wird die antiangiogenetische Wirkung speziell untersucht.

Neben der Histologie, der Apoptose und der Verteilung von Thalidomid im Gewebe und Serum (HPLC) wurden hierfür bei F98er Zellen sowie *in situ* einzelne Schlüsselfaktoren der Angiogenese wie *Tumor Necrosis Alpha* (TNF- $\alpha$ ), *Fibroblastic Growth Factor 2* (FGF2) sowie *Vascular Endothelial Growth Factor*(VEGF) direkt (Immunhistochemie, Western-Blot) oder indirekt – durch ihre Expression (RT-PCR) – untersucht.

## **2. Theoretische Grundlagen**

### **2.1 Glioblastoma multiforme**

#### **2.1.1 Epidemiologie**

Mit einem Anteil von 15% ist das Glioblastoma multiforme (GBM) der häufigste hirneigene Tumor im Erwachsenenalter. Gemäß WHO-Klassifikation handelt es sich um einen astrozytären Tumor des IV. Grades. Er wird den neuroektodermalen Tumoren zugeordnet. Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 40. und dem 60. Lebensjahr, wobei Männer fast doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen.

#### **2.1.2 Lokalisation, Symptomatik und Histopathologie**

Bevorzugt in den Großhirnhemisphären infiltrierend wachsend, bietet das Glioblastom histologisch ein vielgestaltiges Bild mit Zellpolymorphie, mehrkernigen Riesenzellen, Nekrosen (durch mangelhafte Versorgung), Blutungen und zystischen Tumorzerfallshöhlen. Zusätzlich findet man ein peritumoröses Ödem. Durch das rasche Wachstum bilden sich pathologische Gefäße mit arteriovenösen Anastomosen.

Klinische Zeichen sind Kopfschmerzen und Hirndruckzeichen. Anfälle sind selten. Lähmungen treten wegen der großen Ausdehnung von Tumor und Hirnödem häufiger auf. Insultartige Verschlechterungen sind nicht selten.

Die extradurale Metastasierung ist - wie bei anderen Hirntumoren - extrem selten.

#### ***Marker zur Gewebetypisierung***

**GFAP** (Glial Fibrillary Acidic Protein), ein 55 kDa großes intermediäres Proteinfilament des Zytoskeletts, ist unter anderem im zentralen Nervensystem nachweisbar. Es lässt sich in Gliazellen, z.B. Astrozyten, in interstitiellen Zellen in der Glandula pinealis und Pituizyten bzw. follikulostellären Zellen der Hypophyse nachweisen. In manchen Strukturen ist es nur vorübergehend während der Ontogenese nachweisbar und negativ im adulten ZNS, wie in Oligodendrozyten, Ependymzellen (wobei sie in den hypothalamischen Tanyzyten im adulten ZNS positiv verbleiben) und im Plexus choroideus.

**S100**, ein 21 kDa großes Protein, gehört zu den Kalzium-bindenden Proteinen und existiert als lösliche zytoplasmatische Form und als Membran-gebundene Form. Es befindet sich im Zellkern und wird im neuroektodermalem Gewebe exprimiert (u.a. in Neuronen, Schwann'schen Zellen, Melanozyten, Langerhanszellen der Haut und in Retikulumzellen im Parakortex und in Lymphknoten).

Das 57 kDa große Intermediärfilament **Vimentin** kommt in einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen aller Keimblätter, entweder als alleiniges Intermediärfilamentprotein oder in Koexpression mit einem oder mehreren anderen Intermediärfilamentproteinen vor. Insbesondere *in vitro* exprimieren nahezu alle Zelltypen und Zelllinien Vimentin.

### 2.1.3 Immunologie

Im Wirtsorganismus führen Gliome zur Immunsuppression, vor allem durch den von Tumorzellen sezernierte *Transforming Growth Factor beta* (TGF- $\beta$ ), was T-Zelllinien zum Wachstumsstillstand bis hin zur Apoptose führt. (Weller und Fontana 1995). Glioblastome exprimieren außerdem *Basic Fibroblast Growth Factor* (FGF2) und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), die beide zusammen mit TNF- $\alpha$  die Angiogeneese stimulieren.

### 2.1.4 Dignitätskriterien

Als wesentliche histopathologische Parameter fließen die Differenzierungsmerkmale der Tumorzellen, die Zelldichte, die zelluläre und nukleäre Polymorphie, die mitotische Aktivität, die pathologische Endothelproliferation und Tumorgewebsnekrosen sowie Apoptose in die Bewertung ein.

#### ***Proliferation***

Einerseits ist die Bestimmung der Tumorzellproliferation in der Zellkultur möglich, andererseits ermöglichen Proliferationsmarker die Quantifizierung der Proliferationsrate *in situ* (s. Abbildung 1). Die Tumorumetrie gibt Auskunft über die erreichte Tumorgöße *in situ* zu einem bestimmten Zeitpunkt. Die Proliferationsrate wurde hinsichtlich der Prognose relevanter beschrieben als die Tumorgöße oder die Mitoserate (Conns et al. 1997).

In Kapitel 2.3 wird die Angiogeneese als Voraussetzung der Proliferation näher dargestellt.

*Immunhistochemische Proliferationsmarker in situ*

Der Anti-**Mib5**-Antikörper, ein Klon des Anti-Ki-67-Antikörpers bei der Ratte, markiert ein 250 kDa großes nukleäres, nicht zu den Histonen gehörendes Nuklearprotein im Nukleolus der Phasen G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M. In G<sub>0</sub> und in der frühen G<sub>1</sub>-Phase ist es nicht nachweisbar.

Ki67 ist dafür bekannt, eine starke Korrelation zwischen dessen Markierungsrate und histologischen und klinischen Malignitätskriterien aufzuweisen, und somit prognostische Relevanz bezüglich der Überlebenszeit zu haben. Damit ist der Proliferationsindex bei Glioblastom höher als bei niedrig malignen Tumoren. Ki-67 übt möglicherweise eine Funktion bei der strukturellen Organisation von Meta- und Anaphasenchromosomen aus. Bei Glioblastomen findet sich ein durchschnittlicher Proliferationsindex mit Werten von 7 %. Dieser Wert liegt unter dem Proliferationsindex einiger anaplastischer Gliome WHO-Grad III. Die Ki-67 Expression zeigt bei Glioblastomen eine enorme intra- und intertumoröse Variabilität (< 1% - 22,1%) was Ausdruck der beim Glioblastom typischerweise ausgeprägten Heterogenität in Differenzierung und Anaplasie ist.

Das *Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)*, ein 36 kDa großes Kernprotein, wirkt als Cofaktor der Polymerase delta. Die PCNA-Synthese korreliert damit direkt mit der DNA-Replikation und somit der Zellproliferation. Die Expression steigt in der späten G<sub>1</sub>-Phase und erreicht ihren Höhepunkt in der S<sub>1</sub>-Phase, wobei es einen Komplex mit dem p21 Inhibitor bildet, um danach wieder abzufallen. In den anderen Zyklusphasen ist PCNA fast nicht nachweisbar. Im Gegensatz zu Mib bzw. Ki67 ist die Verlässlichkeit der PCNA-Expression als Maß für die Proliferationsaktivität umstritten.

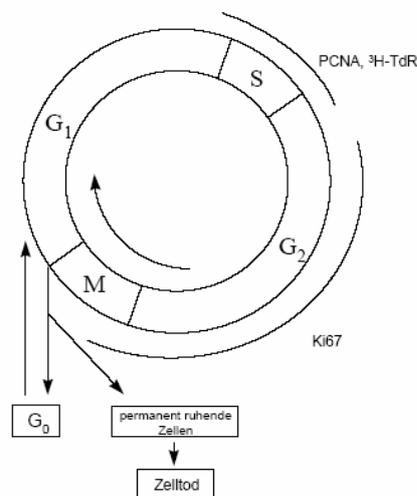


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Phasen des Zellzyklus und korrespondierender charakteristischer Markerproteine (nach Boehringer Mannheim)

### ***Apoptose***

Als wesentlicher Mediator des programmierten Zelltodes, der sogenannte Apoptose, gilt der Faktor **Fas (APO-1 /CD95)**. Das 48 kDa große glykosylierte membrangebundene Protein gehört zur TNF/NGF-Rezeptor-Superfamilie. Es wird auf eine Reihe von B- und T-Zelllinien auf verschiedenen Tumorzellen und auf mehreren normalen menschlichen Gewebetypen exprimiert. Das Andocken einer seiner Liganden (Fas L / CD95 L / Apo1L) oder eines adäquaten Antikörpers gegen APO-1 (z.B. BMS 138 oder 142) löst die schnelle Induktion der Apoptose in empfänglichen Zellen aus, was über die Caspaseaktivierung vermittelt wird. Astrozyten exprimieren FasL konstitutiv und regulieren es im geschädigten Hirn hoch.

Der **Apo2-Ligand** (Apo2L/TRAIL = TNF-related apoptosis-inducing ligand) interagiert mit verschiedenen agonistischen (DR4, DR5) und antagonistischen (DcR1, DcR2) Rezeptoren. Über antagonistische Rezeptoren blockiert Apo2L die Propagation des Todessignals.

### **2.1.5 Diagnostik**

Diagnostisch hilfreich sind neben der Anamnese und der klinischen Untersuchung die Computer Tomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT). Die Angiographie lässt in 60-70% der Fälle eine Kontrastmittelanreicherung mit pathologischen Gefäßen erkennen.

### **2.1.6 Therapie**

Die multimodale Therapie des Glioblastoms umfasst neben einer möglichst radikalen operativen Tumoresektion, die Bestrahlung, die Chemotherapie (mit direkt alkylierend wirkenden Nitrosoharnstoffen wie Bischolethyl Nitrosoharnstoff (BCNU) oder 1-(2-Chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-Nitrosoharnstoff (CCNU) und dem oral wirksamen Alkylans Temozolomide (*Bower et al, 1997*)) und die antiödematöse Therapie mit Glukokortikoiden.

Die operative Resektion bleibt häufig durch die Lokalisation und das stark invasive Verhalten des Tumorwachstums subtotal.

### **Stand der experimentellen Therapie**

In der klinischen Forschung wurden Substanzen mit immunmodulatorischer (Fujimiya et al. 1997, Knupfer et al. 2000, Kominsky et al. 1998, Wang et al. 1999) oder anti-angiogenetischer Wirkung (endogene Faktoren wie Endostatin und Angiostatin (Kunkel et al. 2001, Ma et al. 2002, Peroulis et al. 2002) sowie exogene Faktoren wie Anti-VEGF

Antikörper (Kirsch et al. 1998, Wang et al. 1999, Wesseling et al. 1997) eingesetzt. Eine Reihe von gentherapeutischen Strategien führte bislang zu keiner signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit (Culver et al. 1992, Sasaki und Plate, 1998). In letzter Zeit zeichnet sich ein erneutes Interesse am Einsatz von Nanopartikeln ab, beispielsweise bei der Glioblastomtherapie als Carrier für chemotherapeutische Substanzen wie Doxorubicin zur Überwindung von zellulären Resistenzmechanismen und der Blut-Hirn-Schranke (Gulyaev et al. 1999). Parallel dazu werden lokale Applikationsformen von Chemotherapeutika (Brem et al. 1995) weiterhin untersucht.

### **2.1.7 Prognose**

Trotz der verbesserten interdisziplinären Behandlung liegt die mittlere Überlebenszeit von Patienten zwischen 6 und 12 Monaten, die 5-Jahre-Überlebensrate bei nahezu 0%.

## **2.2 Das F98 Tumormodell**

Erstmals 1980 beschrieben Ko et al 1980 die Erzeugung eines Nitrosoharnstoff-induzierten glialen Hirntumors der CD Fischer Ratte, aus dem die Zelllinie F98 hervorging. Histologisch entspricht dieser stark proliferierende, hochmaligne syngene Implantationstumor der Ratte am ehesten einem kleinzelligen Glioblastom.

Im Hinblick auf die Übertragbarkeit auf das humane Glioblastom limitieren allerdings die unzureichende Größe und die einfache Struktur des Rattenhirns die Bedeutung dieses Modells. Das typische Bild eines großen, fingerförmig das Marklager infiltrierenden Glioblastoms kann häufig nicht reproduziert werden.

Laut Barth scheint das F98 Modell schwach bzw. nicht immunogen zu sein. Dieser Tumor zeigte sich refraktär gegenüber verschiedenen therapeutischen Modalitäten. Sein invasives Wachstumsverhalten macht ihn dagegen attraktiv (Barth 1998).

Bezüglich der Lokalisation der Implantation zeigten Arosarena et al. 1994 in einer Studie zum Vergleich von intrazerebral versus subkutan implantierten F98 Gliomen, dass das peritumorale Umfeld die endotheliale Differenzierung innerhalb des glialen Tumors beeinflusst. Die intrazerebrale Implantation ist deshalb für die Hirntumorforschung eine wesentliche Voraussetzung.

## 2.3 Angiogenese

Bei der Vaskulogenese entstehen Blutgefäße, indem Angioblasten-Vorläuferzellen sich in Kolonnen organisieren, die sich dann in Gefäße mit Lumen differenzieren. Die Angiogenese hingegen bedingt das Aussprossen von neuen Gefäßen aus breiteren, vorbestehenden Blutgefäßen (Riseau, 1995). Bei anderen Autoren ist die Arteriogenese mit der Erweiterung von präexistenten Gefäßen definiert. Die Angiogenese hingegen ist als Ausbildung neuer Gefäße definiert. Da die Definition je nach Literaturquelle variiert, wird hier immer präzisiert, worum es sich im Einzelfall handelt.

Das Wachstum neuer Blutgefäße ist für eine Vielzahl physiologischer Prozesse von der embryonalen Entwicklung über die Wundheilung (Battegay 1995, Or et al. 1998), dem Reproduktionszyklus der Frau (Phillips et al. 1990; Kamat et al. 1995) bis hin zur Entzündung eine wesentliche Voraussetzung. Es findet ansonsten im normalen Gewebe bei Erwachsenen keine Angiogenese mehr statt (Ausprunk et al. 1975).

Im Gegensatz zu nicht-hirneigenen ZNS-Tumoren, wächst das Glioblastom diffus in das gesunde Gewebe und erreicht mit seinen Tumorausläufer präexistente Hirngefäße, aus denen es sich versorgt (Wesseling et al. 1997). Ab einer bestimmten Tumorgöße, laut Folkman  $1\text{mm}^3$ , ist jedoch die Versorgung von der Bildung eigener ernährender Gefäße abhängig (Folkman 1971, Gimbrone et al. 1972).

Die Angiogenese ist somit eine Mitvoraussetzung für das Entstehen eines Tumors (Folkman et al. 1989).

### 2.3.1 Stand der Forschung auf dem Gebiet der Angiogenese

Die Pathogenese der Angiogenese bei Tumoren wird auf das Einschalten eines „angiogenetischen Schalters“ zurückgeführt, der von positiven und negativen Faktoren reguliert wird, die von Tumorzellen, Endothelzellen, peritumoralen Entzündungszellen und Immunzellen stammen (Hanahan and Folkman 1996): Es wird einerseits durch *Tumor necrosis factor alpha* (TNF  $\alpha$ ) (u.a. aus Makrophagen und Tumorzellen), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF2) (aus Tumorzellen) und Interleukin-8 unter anderen stimuliert, andererseits von *Granulocyte-*

*Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) (aus Makrophagen), Interferon, Thrombospondin-1, Angiostatin und anderen Faktoren inhibiert (s. Abbildung 2).

Man nimmt an, dass die Inhibitoren der Angiogenese in der „Aus“-Position überwiegen, bis die Aktivatoren durch einen Stimulus - z.B. Hypoxie in den Tumorzellen – überwiegen und der Schalter in die „Ein“-Position gerät.

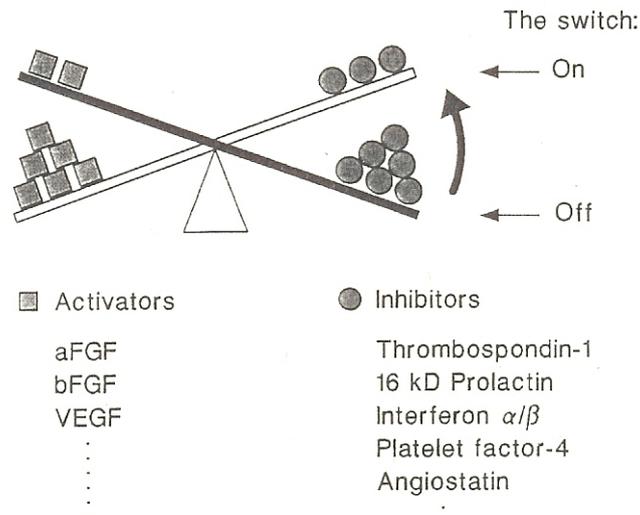


Abbildung 2: Die Hypothese der Waage als Modell des angiogenetischen Schalters  
 nach D.Hanahan und J.Folkman , Cell Vol. 86, 353-364, 1996.

Nach Pepper et al. 1996 wird die Angiogenese in zwei Phasen mit Zwischenschritten unterteilt:

- 1. Phase: Aktivierung mit a) Degradation der Basalmembran, b) Migration und Invasion der Endothelzellen in die extrazelluläre Matrix (Chemotaxis), wo sie proteolytische Enzyme, sogenannte Matrixmetalloproteasen (MMP) und Urokinase-ähnlichen Plasminogenaktivator (uPA) produzieren c) Proliferation der Endothelzellen, d) Ausbildung eines Lumens aus Vakuolen
- 2. Phase: Reifung mit a) Einstellen der Migration, b) Hemmung der Proliferation der Endothelzellen, c) Rekonstruktion der Basalmembran, d) Reifung der Zell- Zell und Zell- Matrix Verbindungen

Die Schlüsselfaktoren der Angiogenese und deren Wechselwirkung werden in der folgenden Abbildung dargestellt (s. Abbildung 3).

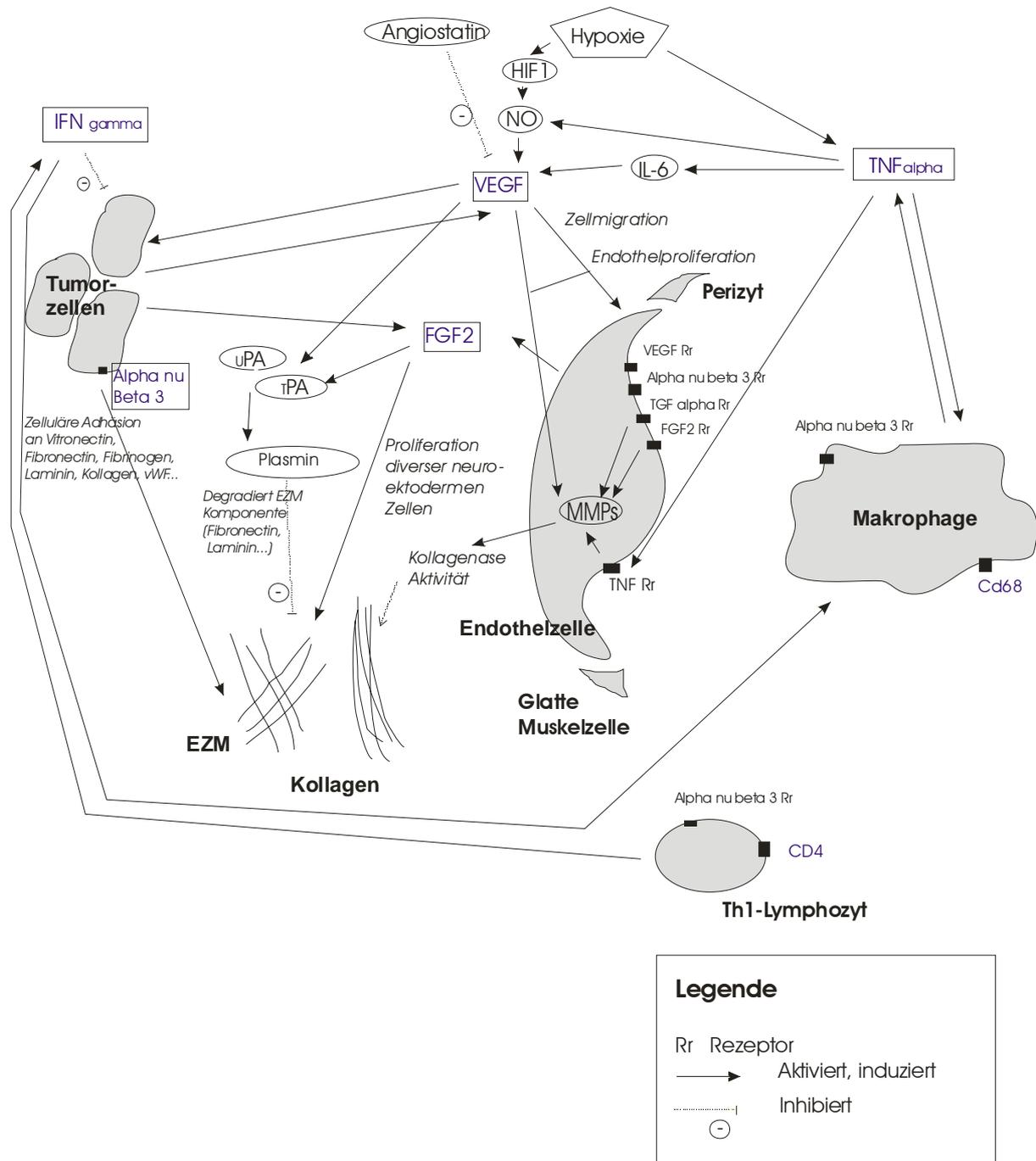


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Angiogenese bei Tumoren

### **2.3.1.1 Wachstumsfaktoren**

**VEGF**, Vascular Endothelial Growth Factor, ein dimerisches 34-45 kDa großes Glycoprotein, ist unter vier verschiedenen Formen bekannt, die jeweils aus 121, 165, 189 und 206 Aminosäuren bestehen, wobei die Hauptform 165 als frei diffusionsfähiges Protein vorkommt, während z.B. die Form 189 membrangebunden ist. Es wird von Epithelzellen und Myozyten ausgeschieden (nicht jedoch von Endothelzellen). Während es im humanen Fetus ubiquitär nachgewiesen werden kann, wird im erwachsenen Organismus die Expression von VEGF-mRNA auch bei Abwesenheit einer Neoangiogenese in verschiedenen Organen, (insbesondere in Niere, Nebenniere, Lunge und Herz) gefunden. In Tumoren mit einem großen Nekrose-Anteil (wie beim Glioblastom) wird ebenfalls eine starke VEGF-Expression gefunden, insbesondere in Zellsäumen an der Grenze zwischen vitalem und nekrotischem Tumorgewebe, also in relativ ischämischen Arealen.

VEGF wird unter besonderen Bedingungen - wie bei Hypoxie - und durch verschiedene Zytokine u.a. IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ , and Prostaglandin E2 and E1 hochreguliert (Li et al. 1995). NO induziert ebenfalls VEGF über die Regulation von HIF-1 (Hypoxia Inductible Factor). VEGF induziert die Proliferation der Endothelien. Es ist mitogen und ödeminduzierend (Machein et al. 1999). Dazu reguliert es die Expression von uPA, tPA und PAI-1 hoch und kann die Freisetzung von vWF und die Aktivität des humanen endotheliales Thromboplasmin sowie die Expression interstitieller Kollagenasen und Gewebefaktoren induzieren. VEGF zeigt ausserdem mit FGF eine synergistische Wirkung. Dazu bewirkt VEGF (wahrscheinlich durch Fenestrierung der Endothelien) eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität (Senger et al. 1986), so dass Plasmabestandteile und Proteine, darunter Fibrinogen, austreten können. Daher wurde für VEGF auch das Synonym VPF für *Vascular Permeability Factor* vergeben.

Kirsch et al. haben 1998 gezeigt, dass die Inhibition von VEGF-mRNA bei Gliomimplantationstumoren bei der Maus mit Angiostatin, einem endogenen Plasminogen-Derivat, zu einer Reduktion der Gefäßproliferation um 38% führte und den Apoptose-Index um das 6-fache erhöhte. Die VEGF-Expression korreliert mit der Tumorgroße, der Gefäßdichte und dem Malignitätsgrad des Tumors (Yoshimura et al. 1998, Kleihues et al. 2002, Kleihues et Sobin 2000).

Drei Rezeptoren von VEGF sind bisher bekannt: VEGF-R1, -R2 und -R3. Im normalen menschlichen Gehirn kommen sie beim Erwachsenen nur im Endothelium des Plexus

choroideus vor. VEGF-R1 (*flt-1*, *fms like tyrosine kinase*) gilt als funktioneller Rezeptor für Chemotaxis und Zellaktivierung von Monozyten. VEGF-R2 (KDR, *Kinase Domain Region / flk-1*, *fetal liver kinase*) wirkt hauptsächlich über Endothelzellen und beeinflusst Gefäßwachstum und -permeabilität (Kunkel et al. 2001). Plate et al. haben 1994 gezeigt, dass sowohl VEGF-R1 als auch -R2 bei hochmalignen Gliomen hochreguliert werden, während VEGF-R1 allein bei niedrigmalignen Gliomen hochreguliert wird.

Das 18 kDa große **bFGF** *basic fibroblast growth factor* (FGF2) ist in der Basalmembran und in der extrazellulären Matrix vieler Gewebetypen lokalisiert, aber auch in Endothelzellen von einigen, aber nicht allen Blutgefäßen. Im Zytoplasma ist bFGF homogen verteilt. Der Nukleus ist hingegen bFGF-negativ. In der Regel exprimieren die großen Zellen („gemistotic astrocytes“ und „polymorphic giant cells“) bFGF, während kleine Zellen mit spärlichem Zytoplasma eher bFG-negativ sind. Es wird ebenfalls von Fibroblasten, Gliazellen und glatten Myozyten synthetisiert, aber auch von Tumorzellen und TAM (Tumor Associated Macrophages) wobei der Sekretionsmechanismus heutzutage nicht bekannt ist. Unter den Hirntumoren zeigen die Glioblastome die größte Expression von bFGF, wobei es sich hier in der perivaskulären Matrix befindet, was beim normalen Gehirn nicht der Fall ist. Ansonsten findet man FGF in Muskelschichten von größeren Gefäßen und in Purkinje Zellen (David et al 1991).

Da FGF keine nachweisbare Signalsequenz hat, kann es nicht über das endoplasmatische Retikulum freigesetzt werden. Es wird vermutet, dass FGF den extrazellulären Raum durch Zellnekrose erreicht. Infolgedessen könnten große Mengen von bFGF dadurch die Proliferation benachbarter Endothelzellen und Tumorzellen induzieren und zur Bildung der gesteigerten perinekrotische Gefäßdichte beitragen („pseudopalisading“ in Gliomen). Da FGF die Proliferation von diversen neuroektodermalen Zellen wie Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuroblasten induziert, könnte man FGF für die heterogene zelluläre Zusammensetzung bei Glioblastomen verantwortlich machen (Paulus et al. 1990).

An zwei Tyrosin Kinase Rezeptoren - FGF1 (*flg*) und FGF2 (*bek*) - bindet FGF mit großer Affinität, an Heparansulfat-Proteoglykane mit niedriger Affinität. Es wirkt direkt auf die Endothelzelle (im Gegensatz zu anderen Faktoren, die die Angiogenese indirekt stimulieren). bFGF wirkt ebenfalls mitogen auf mesodermale Zellen. Ferner verzögert es die Seneszenz von Zellen, moduliert die Freisetzung von Hormonen (z.B. Steroiden), spielt eine wichtige Rolle bei der Wundheilung und Geweberegeneration und ist in der Embryonalentwicklung an der Ausbildung des Mesoderms beteiligt. Es gehört zu den Schlüsselfaktoren der

proteolytischen Antwort auf Endothelzellen während der Zerstörung der perivaskulären Matrix. Zudem reguliert bFGF die Expression von uPAR (Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor) in Endothelzellen hoch. Bekannt ist, dass FGF eine synergistische Wirkung mit VEGF aufweist. Fraglich ist dagegen, ob FGF die Synthese von VEGF in Tumorzellen stimuliert (Tsai et al. 1995).

### **2.3.1.2 Immunologische Faktoren**

**TNF- $\alpha$**  (Tumor Nekrosefaktor alpha), ebenfalls Cachektin genannt (ein trimeres Protein von 52 kD) wird überwiegend von Zellen des mononukleären Phagozytensystems, Monozyten und Makrophagen, aber auch von TH1-Zellen, Mikrogliazellen und Astrozyten sowie Fibroblasten, Neutrophilen, Natural Killer Zellen (NK) und Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK cells) sezerniert.

Rezeptoren von TNF- $\alpha$  sind zum einen ein löslicher 60 kDa großer Rezeptor, zum anderen ein membrangebundener 80 kDa großer Rezeptor, der sich auf neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Fibroblasten, Osteoklasten, Endothelzellen, Muskelzellen, Adipozyten, und B-Lymphozyten befindet.

TNF stellt ein multipotentes Zytokin mit einer ganzen Reihe physiologischer Effekte einschließlich zytotoxischer Wirkung gegen viele maligne Zellen *in vitro* und *vivo* dar. Es ist pyrogen über Freisetzung von PGE2 und IL-1, aktiviert Makrophagen und zytotoxische Zellen; bei eosinophilen Granulozyten stimuliert es die zytotoxische Aktivität, bei neutrophilen Granulozyten steigert es die Phagozytose, die Antikörper-Zellvermittelte Zytotoxizität und die Adhärenz an Endothelzellen. Es verstärkt die Expression von MHC-Klasse-I Moleküle auf Fibroblasten und Endothelzellen und von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1) auf Fibroblasten der Synovia. In niedrigen Konzentrationen wirkt TNF- $\alpha$  angiogenetisch. In hohen Konzentrationen wirkt es dagegen antiangiogenetisch (Fajardo et al. 1992). Mit IL-1 induziert TNF- $\alpha$  die Makrophagenaktivierung. Wie IL-1 reduziert es die Expression von Thrombomodulin auf Endothelzellen Protein C wird dann vermindert und verstärkt die Produktion und Freisetzung von Prokoagulantfaktoren, was auch zur Thrombosebildung in Tumorgefäßen in Rahmen einer Verbrauchskoagulopathie führt. Es führt darüber hinaus zu hämorrhagischen Nekrosen. Es wirkt synergistisch mit IFN- $\gamma$ , z.B. bei der Aktivierung von Makrophagen und bei der Expression von MHC-I- Molekülen. Es induziert die NO-Synthase und wirkt darüber zelltoxisch. Auf Astrozyten wirkt TNF- $\alpha$  mitogen und führt zur Astrogliose.

**CD4** und **CD8** sind Oberflächenmoleküle von T-Helfer-Lymphozyten bzw. zytotoxischen T-Lymphozyten.

Mit TCR (*T cells receptor*) als Korezeptor und einer weiteren Oberflächenmolekülklasse CD3 sind sie für die Interaktion zwischen diesen Zellen und antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC Zellen) über deren Oberflächenmolekül MHC II bzw. MHC I (*major histocompatibility complex*) zuständig. Die spezifische Interaktion hängt vom Antigentyp ab und führt bei exogenem Antigen (z.B. Bakterien, Zellwürmer) über CD4-MHCII zur Aktivierung von B-Lymphozyten mit Differenzierung zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen bzw. bei endogenem Antigen, Selbstantigen und Viren über CD8-MHCI zum direktem Abtöten der Zelle.

1992 zeigten Ménage et al. den Mangel an CD4<sup>+</sup> Lymphozyten im peripheren Blut von Patienten mit Glioblastoma multiforme auf (Ménage et al. 1992).

**CD68**, ein transmembranes Glykoprotein von 110 kDa (auch Macrosialin) genannt, kommt bei Zellen der Monozyten-Makrophagenreihe vor (Kupffer-Zellen, Makrophagen in der roten Milzpulpa, in der Lamina propria des Darmes, in den Alveolen der Lunge und im Knochenmark, Monozyten, dendritische Zellen, neutrophile und basophile Granulozyten, Mastzellen, myeloide Zellen und aktivierte T-Zellen). Im Gehirn wird CD68 von aktivierten Mikrogliazellen exprimiert.

Über die Funktion des Proteins sowie das Substrat ist nichts Näheres bekannt.

Das Zytokin **IFN- $\gamma$**  (Interferon gamma), ein 40-70 kDa großes Protein, wird von TH1-Lymphozyten und NK-Zellen sekretiert.

Makrophagen, NK-Zellen und zytotoxische Zellen werden von IFN- $\gamma$  aktiviert. Es löst die Freisetzung von TNF- $\alpha$  aus, was ihm eine antivirale und antitumorale (antiproliferative) Aktivität verleiht. Es potenziert außerdem die antiviralen und antitumoralen Effekte von IFN- $\alpha$  und - $\beta$ . Dazu fördert es die Differenzierung von B-Zellen und induziert die Expression von MCH-I- und MCH-II-Molekülen auf Antigen präsentierende Zellen (APC), Mikrogliazellen und Astrozyten. Es führt zu vermehrter Expression von Adhäsionsmolekülen, u.a. an den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke. Außerdem wurde gezeigt, dass es in Anwesenheit von MDP (Muramyl Dipetid) die NO Produktion bei Mikrogliazellen und Makrophagen verstärkt.

### 2.3.1.3 Gefäßdichte

Laut Folkman basiert der Angiogeneseegrad auf drei Parametern der endothelialen Regeneration: Der Gefäßproliferation, der Hyperplasie der Endothelzellen und der endotheliale Zytologie (Folkman et al 1972). 1972 schlug Folkman die Ermittlung der Gefäßdichte über das MAGS *microscopic angiogenesis grading system* vor. In diesem bewertete er genau diese drei Parameter.

Seitdem dienen verschiedene Marker zur Ermittlung der Gefäßdichte: Während Forschungsgruppen die Immunhistochemie von CD31 benutzen (Lund et al. und Drevs et al. 2000), wurde von anderen die Gefäßdichte mittels Färbung durch Faktor VIII (Peoc'h et al. und Nathan et al. 1999), CD34 (Kitadai et al. 1998), Basalmembran (Kollagen IV, Laminin-1, Perlecan) (Hagedorn et al. 2000), von Willebrand Faktor vWF (Coomber et al. 1998) und Ulex Lektin (Gould 1988) ermittelt.

Das *Platelet Endothelial Cell Adhesions Molecule* (**PECAM**) oder **CD 31**, ein 120 – 130 kD großes Kalzium-unabhängiges Membranglykoprotein, gehört zu den Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie und wird an der Oberfläche von Thrombozyten, Monozyten, Granulozyten, B-Lymphozyten und endothelialen intrazellulären Junctions, CD8<sup>+</sup> - T-Lymphozyten, Zellen der myeloiden und megakaryozytischen Zelllinien sowie Solidtumorzellen exprimiert. Es bindet unter anderen an CD51/61 (s.u.).

Die intrazelluläre Domäne von CD31 vermittelt die endotheliale Zell-Zell-Adhäsion. Es spielt eine Rolle bei dem Kontakt mit Endothelzellen und kann darüber hinaus die endotheliale Einzelschicht stabilisieren. Damit ist CD31 in interaktiven Prozessen wie Angiogenese, Thrombose und Wundheilung involviert. Es wird als früher und sensitiver Marker der durch tumor-induzierten Angiogenese beschrieben (Berger et al. 1993).

Das Integrin  **$\alpha v \beta 3$**  (**CD51/61**) wird minimal bei endothelialen, intestinalen und uterinen Myozyten der glatten Muskulatur exprimiert. Diese Expression wird bei Granulationsgewebe und bei bestimmten invasiven Tumoren signifikant hochreguliert (u.a. bei Gliomen im späten Stadium) wo es möglicherweise eine Rolle bei der Regulierung der Tumorproliferation und Metastasierung spielt (Gladson and Cheresch 1991, Brooks et al. 1994). Bei Glioblastomen wird das Integrin CD51/61 sowohl in Endothelzellen als auch in benachbarten Mesenchymalzellen in hyperplastischen kleinen Blutgefäßen exprimiert (Candece et al. 1996).

Takano et al. haben gezeigt, dass Osteopontin und  $\alpha\beta 3$  in den Mikrogefäße bei Gliomen von VEGF induziert werden. Rezeptoren von CD51/61 sind auf bestimmten aktivierten Leukozyten, Makrophagen und Osteoklasten zu finden (Takano et al. 2000). CD31 bindet an CD51/61.

Brooks et al. haben gezeigt, daß  $\alpha\beta 3$ -Antagonisten nicht nur das Wachstum neuer Gefäße verhindern, sondern auch die Tumorregression und die Apoptose von Endothelzellen induzieren (Brooks et al. 1994).

Es sind zwei verschiedene Wege beschrieben, die zur Angiogenese führen. Der erste läuft über  $\alpha\beta 3$ , TNF  $\alpha$  und bFGF. Der zweite führt über das Integrin  $\alpha\beta 5$ , VEGF, TGF $\alpha$  und Phorbolster (Friedlander et al. 1995).

**ICAM-1** (*Intercellular Adhesion Molecule-1*) (**CD54**), ein integrales membranöses Glykoprotein von 90-150 kDa, gehört wie PECAM-1 (CD31) zu den Kalzium-unabhängigen Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie. Es wird auf Monozyten und Endothelzellen exprimiert. Es kann aber auch bei anderen Zellen wie B- und T-Lymphozyten, Thymozyten, Fibroblasten, Keratinozyten und Epithelzellen induziert oder hochreguliert werden.

Über die Rezeptoren LFA-1 (Lymphozyten-Funktion-Antigen), Mac-1 und CD43 vermittelt CD54 die Adhäsion von T-Zellen mit Antigen-präsentierende Zellen und ist in T-Zell /T-Zell und T-Zell / B-Zell Interaktionen involviert. Es spielt dadurch eine wichtige Rolle in der Immunantwort und bei Entzündungen.

Auf Fibroblasten und Endothelzellen kann es durch inflammatorische Mediatoren wie IL-1, TNF und IFN-Gamma induziert oder hochreguliert werden (Pober et al. 1986).

**OX-43**, ein 90 kDa großes Polypepid, befindet sich auf Endothelzellen größerer Hirngefäße, auf Makrophagen und auf Erythrozyten der Ratte (Robinson et al. 1986).

**EBA**, Endothelial Barrier Antigen, also ein Antigen der Blut-Hirn Schranke, (auch SMI71 genannt, rattenspezifisch) ist in Bereichen der Blut-Hirn oder Blut-Neuronen Schranke sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem zu finden. Der Anti-EBA Antikörper reagiert dagegen nicht mit Endothelien periventrikulärer Organe (auch nicht mit fenestrierten Endothelien (Area postrema, Plexus choroideus)) (Kaya et al. 1996). In der Milz zeigt sich sehr unregelmäßig eine positive Reaktion an der luminalen Seite mancher Blutgefäße. In der

Epidermis der Haut reagiert der Anti-EBA-Antikörper mit Langerhanszellen und spezifischen Makrophagen (Sternberger et al. 1987).

Die Reaktivität mit dem Antikörper entwickelt sich bei neugeborenen Ratten mit dem Reifungsprozess der Blut-Hirn Schranke und verschwindet in Läsionen bei experimentellem allergischer Enzephalomyelitis, wenn Mikrogefäße von Entzündungszellen umgeben sind (Sternberger et al. 1989).

Das EBA-Antigen scheint an der lokalen Immunantwort teilzunehmen. Es ist durchaus möglich, dass die EBA Proteine Bestandteile von tight junction (Zonula occludens) der Mikrogefäße sind. Immunhistochemisch dient damit EBA der Markierung der intakten Blut-Hirn-Schranke.

Das Lektin **RCA I** (*Ricinus communis* Antigen) bindet spezifisch an Mikrogliazellen und Endothelzellen. Seitz et al. haben 1988 gezeigt, dass RCA I ein sehr sensibler histochemischer Endothelmarker bei der Ratte in Paraffin- sowie Kryoschnitten von F98-Transplantationstumoren ist (Seitz et al. 1988).

Der in Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisierte von Willebrand Faktor (**vWF**) kommt als heterogene Gruppe von großen Polymeren (1000-15000 kDa) vor, die mit dem Blutgerinnungsfaktor VIII einen Komplex bilden.

Darüber hinaus spielt er eine wichtige Rolle bei der Adhäsion der Blutplättchen und ihrer Aggregation. Integrin CD51/61 vermittelt die zelluläre Adhäsion von vWF.

### **2.3.2 Relevanz der Angiogenese in der Neuroonkologie: Antiangiogenetische Therapie**

Die Angiogenese bei Tumoren mit endothelialer Hyperproliferation in hypoxischen und nekrotischen Arealen ist ein Differenzierungsmerkmal bei der pathologischen Klassifikation von malignen Astrozytomen (anaplastisches Astrozytom, Glioblastom multiforme) (Kleihues et al. 1995).

Damit stellt die Hemmung der tumorzellinduzierten Neoangiogenese beim Glioblastom und bei anderen Erkrankungen mit starker Gefäßneubildung (z.B. Erythema nodosum leprosum bei Lepra, diabetische Retinopathie, Kaposi Sarkom) einen geeigneten Angriffspunkt für eine rationale Tumorthherapie dar.

Theoretisch bietet die angiogenetische Therapie gegenüber konventionellen Ansätzen folgende Vorteile: einen besseren Zugang zu Tumoren, das experimentell bestätigte Fehlen von Resistenzen (durch die geringere Mutationsrate der nicht-tumorösen Zellen), die fehlende Entwicklung von Zweitneoplasie bei rein angiostatischen Substanzen (bei fehlender Toxizität gegenüber des Genoms der Endothelzelle), einen antimetastatischen Effekt, die Anwendbarkeit bei verschiedenen Tumortypen durch die geringere Spezifität gegenüber dem jeweiligen Tumor.

Zu den Nachteilen der antiangiogenetischen Therapie zählen u.a. die erforderliche langfristige Anwendung, die Beeinträchtigung der physiologischen Angiogenese (v.a. in der Pädiatrie) und die mögliche Unwirksamkeit einer Monotherapie.

Zur antiangiogenetischen Therapie sind unterschiedliche Strategien denkbar:

- der Einsatz endogener und natürlich vorkommender Inhibitoren der Angiogenese wie beispielsweise Angiostatin, Endostatin, Interferone, der Interleukine 1 Alpha/Beta und 12, Retinolsäure, Vasostatin u. a,
- die Blockierung angiogenesestimulierender Faktoren wie VEGF, bFGF, oder deren Rezeptoren (z.B. durch Thalidomid, Suramin, Antikörper Anti-VEGF, und Anti-bFGF)
- die Blockierung von Adhäsionsmolekülen wie Integrin  $\alpha\beta3$  (CD51/61), die die Adhäsion von Endothelzellen mit anderen Zellen ermöglichen (z.B. mit Antikörper Anti-  $\alpha\beta3$ )
- die spezifische Inaktivierung proliferierender Endothelzellen, also der Zellen, die neue Gefäße bilden (durch TNP 470, Thalidomid, IL-12 u.a.)
- die Blockade von Molekülen wie Metalloproteinasen (MMP), die das Eindringen neuer Gefäße in umgebendes Gewebe ermöglichen
- die Blockade der Expression verschiedener Faktoren wie beispielsweise VEGF durch gentherapeutische Verfahren wie sog. „Antisense“-Konstrukte
- die Inhibierung von Faktoren involvierter Signaltransduktionsketten (ras farnesyltransferase inhibitors (ras FTI's), Blockierung des Tyrosin Kinase Rezeptors (ErbB2/neu) z.B. durch Herceptin)
- die Nutzung des EPR Effektes (Enhanced Permeability and Retention effect) des Tumors mit makromolekularen antitumorösen Substanzen

## 2.4 Blut-Hirn-Schranke

Durch die Blut-Hirn-Schranke ist das Gehirn bei Gesunden sehr effektiv vom restlichen Organismus abgeschottet. Sie wird von den Kapillarendothelien gebildet, an deren Basalmembran sich die Fußfortsätze der Astrozyten (sog. Glia limitans) in einer lückenlosen zelluläre Schicht anschließen (s. Abbildung 4). Endothelzellen des gesunden Gehirns unterscheiden sich von Endothelzellen anderer Gewebe dadurch, dass sie durch kontinuierliche tight-junctions (Zonula occludens) verknüpft sind und - mit Ausnahme bestimmter Regionen wie Area postrema und Plexus choroideus - sehr wenig Vesikel besitzen. Der Durchgang erfolgt also aktiv durch Öffnung zwischen den Zellen für kleine Moleküle - unter 2 nm - bzw. Pinozytose für größere Moleküle.

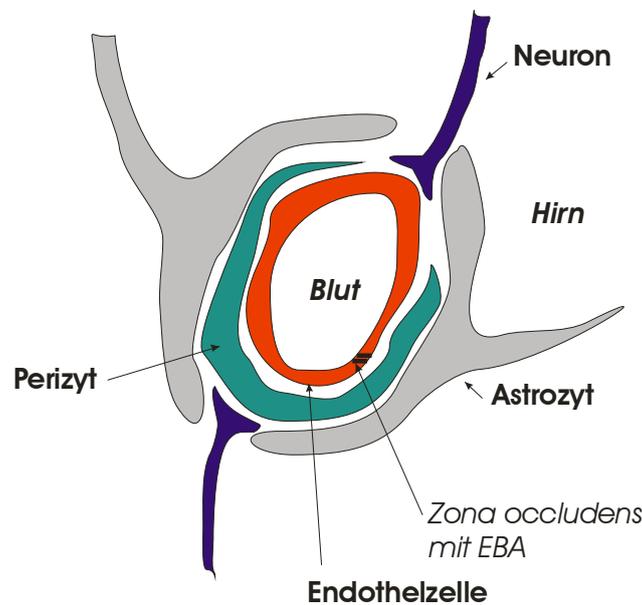


Abbildung 4: Schematische Darstellung der intakten Blut-Hirn-Schranke

Veränderungen der Blut-Hirn Schranke z.B. bei Entzündung, durch das Öffnen der tight-junctions oder bei der Zunahme des endothelialen und Vesikel-Transports, ermöglichen den Durchgang von Serumproteinen und Immunzellen, was zu einem vasogenen perifokalen Ödem mit nachfolgender Hirndruckerhöhung führt.

Bei Tumoren ist die Blut-Hirn Schranke ebenfalls verändert, wobei verschiedene Studien je nach Tumormodell widersprüchliche Ergebnisse erbracht haben.

So wurden breite sinusoidartige Gefäße, unreife regenerierende Gefäße, Fenestrationen, und eine Vielfalt an pinozytischen Vesikeln und anormalen Junctionen beschrieben (Bigner et al. 1981, Reinhold et al. 1983, Cox et al. 1976, Deane et al. 1981, Waggener et al. 1976, Hirano et al. 1974 und 1975, Nishio et al. 1983). Im Hinblick auf die Gefäßgröße (Durchmesser erst ab 12 µm erfasst), fanden sich häufiger großvolumige Gefäße im Tumorgewebe (Stewart et al. 1985).

Weiterhin wurde in Tumoren ein inhomogenes Gefäßnetz beschrieben, wobei der Tumorrand meist besser durchblutet war als das Tumorzentrum. Die Gefäßkaliberschwankung wurde einerseits durch die starke Ausweitung aufgrund des Tumorwachstums, andererseits durch die durch erhöhten Gewebedruck entstandene Kompression erklärt. Dazu wurde eine vermehrte Gefäßrichtungsänderung festgestellt, im Gegensatz zu der üblichen dichotomen Aufzweigung des Gefäßbaumes. Letztlich wurden vermehrte Gefäßabbrüche in Folge von Nekrosen und arteriovenösen Kurzschlüssen gezählt, was zu Strömungsumkehr und Hämostase führt.

Die endotheliale Nitric Oxide Synthase (eNOS) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutflusses im Tumor und der Gefäßpermeabilität. Die Steigerung des Blutflusses führt wiederum zur Erweiterung der Gefäße (Nasu et al. 1999).

### ***Blut-Hirn-Schranke-Marker***

Wie unter 2.3.1 beschrieben, ist **EBA** (Endothelial Barrier Antigen) ausschließlich bei intakter Blut-Hirn-Schranke nachzuweisen.

## **2.5 Thalidomid**

### **2.5.1 Geschichte**

1953 wurde erstmals das Glutaminsäurederivat Thalidomid ( $\alpha$ -Phthalimidoglutaramid) synthetisiert. Zuerst wurde das Medikament rezeptfrei unter dem Handelsnamen Contergan® als Schlafmittel und Antiemetikum in der Schwangerschaft ab 1956 eingesetzt, bis es Ende 1961 aufgrund seiner schweren teratogenen Nebenwirkungen (u.a. Phokomelie) in Deutschland aus dem Handel gezogen wurde. 36 Jahre später hat die amerikanische Zulassungsbehörde FDA Thalidomid für den Einsatz bei Lepra zugelassen.

### 2.5.2 Eigenschaften von Thalidomid

Thalidomid (*N*-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-phthalimide), ist ein chirales Molekül. Es existieren zwei Enantiomere: Das R-(+)-(5'-Hydroxythalidomid)- und das S-(-)-Enantiomer (5-Hydroxy-thalidomid) bilden *in vitro* sowie *in vivo* aufgrund ihrer Instabilität ein Racemat (s. Abbildung 5).

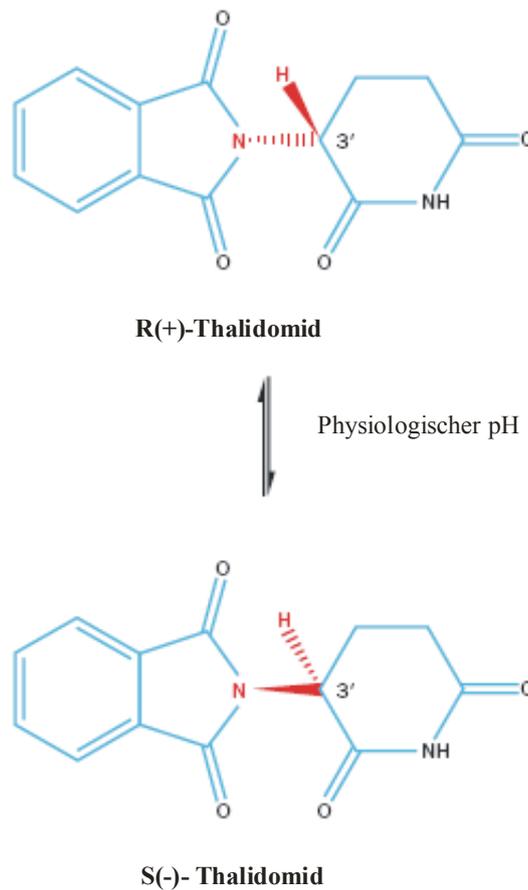


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Enantiomere Thalidomids

### Pharmakokinetik von Thalidomid

Die Absorption und Verteilung des schwach wasserlöslichen Thalidomid ( $50\mu\text{g/ml}$  bei  $\text{pH}=7$ ) sind abhängig vom gesundheitlichen Zustand und von der jeweiligen Krankheit. Die Plasmaproteinbindung von Thalidomid ist unbekannt.

### ***Metabolismus***

Untersuchungen mit Mikrosomen belegen, dass die Metabolisierung von Thalidomid bei der Ratte sowie beim Menschen zu 5- und 5'-Hydroxythalidomid über Cytochrom P450 (CYP) hepatisch erfolgt. Dies geschieht ohne Interaktion mit anderen Medikamenten (Teo et al. 2000).

Dieser Vorgang erfolgt jedoch spezies-abhängig, was wiederum die Unterschiede der Thalidomid-Wirkungen bei den jeweiligen Spezies erklärt. Während die 5- und 5'-Hydroxylationen beim Menschen durch das Enzym CYP2C19 erfolgt, spielen die Enzyme CYP2C6 und CYP2C11 bei der Ratte eine Rolle was zu einer deutlich höheren erforderlichen Thalidomiddosis bei der Ratte führt als beim Mensch (Ando et al. 2002).

Zum großen Teil wird Thalidomid nicht-enzymatisch bei einem pH-Wert  $\geq 6$  hydrolysiert und über die Niere ausgeschieden.

### **Thalidomidwirkungen**

#### ***Sedative Wirkungen***

Thalidomid ist eines der wenigen Hypnotika, die für eine verlängernde Wirkung des REM-Schlafs bekannt sind. Dieser Effekt ist jedoch relativ unklar. In mehreren widersprüchlichen Studien werden spezies-abhängige Unterschiede beschrieben. Einerseits wird berichtet, dass die sedative Wirkung von Thalidomid beim Menschen ausgeprägt ist, bei Mäusen und Ratten jedoch nicht beobachtet werden konnte (Eriksson et al. 1999, Teo et al. 2000). Eine andere Studie belegt, dass Spezies wie Ratten, Mäuse und das Meerschweinchen erst bei hohen Dosen Thalidomid sediert werden, während Kaninchen dagegen resistent sein sollen (Fabro et al. 1965).

#### ***Immunmodulatorische und antientzündliche Wirkungen***

Es wurde bewiesen, dass Thalidomid selektiv die Ausscheidung bestimmter Zytokine supprimiert und parallel die zytotoxische T-Zellen stimuliert sowie die Phagozytose unterdrückt. Bei den Subtypen der T-Helfer Zellen induziert Thalidomid einerseits die Bildung von T-Helferzellen des Typs 2 (die selber IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 produzieren), während es andererseits den Subtyp 1 inhibiert (die v.a. IFN-Gamma, IL-12 und IL-2 produzieren).

Darüber hinaus reguliert Thalidomid die Expression der Oberflächenadhäsionsmoleküle (Integrine) und Antigene des Major Histocompatibility Complex (MHC) auf endotheliale und epitheliale Zellen, wodurch die Zelladhärenz der Leukozyten eingeschränkt wird (Neubert et al. 1993).

Thalidomid inhibiert die TNF- $\alpha$  Produktion durch Degradierung seiner mRNA unter bestimmten Faktoren. Über diesen Effekt wirkt Thalidomid analgetisch. Diese Ergebnisse werden jedoch von einer Studie widerlegt (Ishikawa 1998).

### ***Antiangiogenetische Wirkung***

D'Amato und Folkman zeigten 1994 die potente antiangiogenetische Wirkung Thalidomids (D'Amato et al. 1994). Dies erfolgt über die direkte sowie indirekte Inhibition der vom FGF2, TNF- $\alpha$ , VEGF,  $\alpha\beta 3$  und (über die Cyclooxygenase-2) Prostaglandine E2 vermittelten Angiogenese durch seine Metaboliten einerseits und die Aktivierung von IFN- $\gamma$  andererseits (Li et al. 2003, Stephens et al. 2000, Fujita et al. 2001, Yamada et al. 1999, Daniel et al. 1999).

Hierbei wurde die Spezies-Abhängigkeit dieser Wirkung gezeigt. Der Metabolit, der für die antiangiogenetische Wirkung Thalidomids verantwortlich ist, entsteht zwar bei Mensch und Kaninchen, jedoch nicht bei kleinen Nagern (Bauer et al. 1998). Durch die intraperitoneale Applikation von Thalidomid kann bei ihnen jedoch eine antiangiogenetische Wirkung erzielt werden.

Die verschiedenen antiangiogenetische Effekte Thalidomids werden in Abbildung 6 dargestellt.



Die früher angenommene stereospezifische Teratogenität, wobei das S-Enantiomer als teratogen beschrieben wurde, hat Petersen widerlegt (Petersen 2000).

Hierbei werden ebenfalls spezies-abhängige Unterschiede beschrieben. Das teratotoxische Metabolit wurde nicht bei hepatischen Mikrosomen der Ratte produziert, im Gegensatz zu Mikrosomen bei Kaninchen, Affen und Menschen (Gordon et al. 1981).

Der Feststellung der Teratogenität von Thalidomid folgte der Rückruf des Medikamentes aus dem Markt. Seit der erneuten Zulassung sind bei Frauen ein Schwangerschaftstest zu Beginn sowie ein Konzeptionsschutz während der Einnahme Thalidomids erforderlich. Da Thalidomid im Sperma nachgewiesen wurde, gilt der Konzeptionsschutz ebenfalls für Männer.

### ***Weitere Nebenwirkungen***

Zu den häufigsten Nebenwirkungen Thalidomids zählen Müdigkeit, periphere Neuropathie, Schwindel, Obstipation, Hautreaktionen und Leukopenie.

Deshalb sind regelmäßige klinische Untersuchungen sowie Laborkontrollen nötig.

### **2.5.3 Experimentelle und klinische Erfahrungen mit Thalidomid**

Der ersten tierexperimentellen Studie, die antiangiogenetische sowie antitumoröse Effekte von Thalidomid bei Prostata-Karzinom belegte, folgten weitere Untersuchungen bei malignem Melanom, Kolon- und Lewis-Lungenkarzinom.

Experimentelle Voruntersuchungen zu Thalidomidwirkungen bei Hirntumoren wurden vor Einleitung der klinischen Studien nicht veröffentlicht. Erst vor kurzem wurde die antitumoröse Wirkung von Thalidomid bei subkutan implantierten C6 Gliomen bei Ratten gezeigt (Arrieta et al. 2002).

Klinisch wurde Thalidomid erfolgreich bei tiefen Geschwüren in Mund und Speiseröhre beim AIDS-bedingten Wasting Syndrome (Marasmus), bei anderen Autoimmunerkrankungen und bestimmten Krebsarten (Prostata, Gehirn, Multiples Myelom, bei dem Thalidomid die größte Wirksamkeit zeigt, fortgeschrittenem Mamma- und Nierenkarzinom, Pankreaskarzinom und Kaposi Sarkom) getestet. Gleichzeitig werden aber auch Indikationen diskutiert, bei denen es

seit langem sicherere und gefahrlosere Alternativen gibt, wie z.B. bei rheumatoider Arthritis oder einigen Hauterkrankungen.

Nach einem ersten Erfolg bei Patienten mit fortgeschrittenem Glioblastom, wobei die Ergebnisse nicht wissenschaftlich publiziert wurden, setzte man Thalidomid bei weiteren klinischen Studien ein. Im Gegensatz zu diesem ersten Versuch, wo die Ansprechrate 50% betrug, fiel diese auf 5 bzw. 6% bei weiteren Phase II Studien (Fine et al. 2000, Marx et al. 2001, Short et al. 2001). Dabei könnte jedoch der Mißerfolg durch die adjuvante Bestrahlung der Tumore erklärt werden. In einigen Fällen konnte die antiproliferative Wirkung von Thalidomid nachgewiesen werden.

Um die teratogene Wirkung Thalidomids zu umgehen wurden parallel Studien mit Thalidomidanalogen durchgeführt.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Versuchsbedingungen**

#### **3.1.1 Transplantationstumor F98**

Zur Tumorzellimplantation wurden monoklonale F98 Zellen vom Wildtyp (Herkunft: Max-Dellbrück-Centrum, Berlin) eingesetzt (Zellkultur s.u.).

#### **3.1.2 Versuchstierbehandlung**

##### ***3.1.2.1 Versuchstiere***

Genehmigt wurden die Experimente von der Tierschutzkommission der Bezirksregierung Düsseldorf. Es wurden drei Versuchsreihen durchgeführt (jeweils mit gleichgeschlechtlichen CD Fischer Ratten mit vergleichbarem Körpergewicht). Während des gesamten Versuchsablaufs befanden sich die Versuchstiere unter Aufsicht der Tierschutzbeauftragten der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf. Dabei mussten gemäß Tierversuchsantrag Tiere mit neurologischen Symptomen, beispielweise Hemiparese, und anderen schwerwiegenden Krankheitszeichen aus dem Versuch genommen werden.

##### ***3.1.2.2 Versuchstierhaltung***

Die Tiere wurden mit einer maximalen Belegung von fünf Tieren pro Käfig gehalten. Bei dem durchschnittlichen Körpergewicht von ca. 180 g lag die maximale Auslastung bei 1 g/cm<sup>2</sup>. Im Käfig war grobes und entstaubtes Weichholzgranulat eingestreut, die relative Luftfeuchtigkeit lag bei 55%, die Außentemperatur bei 22°C. Von 7-19 Uhr war Kunstlicht eingeschaltet, seine Stärke betrug in der Mitte des Raumes 100 cm über dem Boden 300 Lux. Das Futter bestand aus einer pelletierten Alleindiät (Altromin 1314 ad libitum). Die umsetzbare Energie dieser Diät betrug 13600 KJ/kg. Die Nährstoffe waren zu 47,5% aus N-freien Extraktstoffen und zu 23% aus Rohprotein zusammengesetzt. Alle essentiellen Mineralstoffe, Vitamine sowie Spurenelemente wurden zugesetzt.

##### ***3.1.2.3 Versuchsreihen***

Vor Beginn der Experimente wurden die Tiere zur Eingewöhnung mehrere Tage in der Tierversuchsanlage unter den oben genannten Bedingungen gehalten.

Es wurden drei Versuchsreihen nacheinander durchgeführt.

Versuch I: 14 männliche CD Fischer Ratten (RCC)

Dieser erste Versuch diente im Vordergrund zur Ermittlung der optimalen Zellzahl für den Transplantationstumor zum Erreichen einer gewissen Tumorgroße und der für das Wachstum notwendigen Zeitspanne. An diesen Hirntumorpräparaten wurden die Tumorcharakterisierung mittels Histologie und Immunhistochemie vorgenommen und die Bioverfügbarkeit des intraperitoneal verabreichten Thalidomids untersucht.

Versuch II: 12 weibliche CD Fischer Ratten (M&B)

Neben der Tumorzellvolumetrie wurden bei den Präparaten dieses Versuches sämtliche immunhistochemischen Untersuchungen sowie *in situ* Hybridisierung, RT-PCR und HPLC durchgeführt.

Versuch III: 16 männliche CD Fischer Ratten (M&B)

An den Präparaten dieser Versuchsreihe wurden weitere immunhistochemische Untersuchungen sowie eine *in situ* Hybridisierung, RT-PCR und HPLC durchgeführt.

#### **3.1.2.4 Zellimplantation**

##### ***Herstellung der Tumorzellsuspension***

Die Zellen wurden unter Zellkulturbedingungen bis zu 70-80%igen Konfluenz in Kulturflaschen kultiviert (250 ml/ 75 cm<sup>2</sup>). Eine mit der angegebenen Konfluenz bewachsene Kulturflasche kann 1:5 bis 1:10 eingeteilt werden. Nach einmaligem Abwaschen der Einzelschicht mit PBS, wurden die adhärenen Zellen durch Behandlung mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung suspendiert. Hiernach wurden sie mit FCS-haltigem Medium gespült. Die Zellsuspension wurde in sterile Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt und die Röhrchen mit PBS aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Pelletierung durch 10-minütige Zentrifugation mit

120x g bei 4°C. Nach 3-maligem Waschen mit PBS-Puffer erfolgte die Zellzahlbestimmung. Dabei wurden die Zellen mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (Zellzahl in 16 Quadranten x Verdünnungsfaktor x 10.000 = Zellzahl/ml). Abschließend wurde die Zelldichte in PBS-Puffer auf die gewünschte Zellzahl zur Verwendung im Tierexperiment eingestellt.

### ***Stereotaktische Tumorzellimplantation***

Alle Eingriffe wurden unter hygienischen Operationsbedingungen im neurochirurgischen Tier-Operationsraum der Zentralen Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt.

In Allgemeinanästhesie durch intramuskuläre Injektion von 0,2 ml Hypnorm und 0,05 ml Diazepam und zusätzlicher Lokalanästhesie der Kopfhaut mit 1 % Lidocain erfolgte nach Rasur des Schädels das Setzen einer medianen Hautinzision. Nach Abschieben des Periostes bis zur Lateralleiste links erfolgte das Anlegen eines 1.5 mm großen Bohrloches über der Koronarnaht, 2 mm median der Lateralleiste mittels eines elektrischen Handbohrers. Die Lagerung der Ratte wurde in einem speziell für Kleintiere entwickelten stereotaktischen Kopfraumen (DAVID KOPF Instruments, Tujunga, U.S.A.) standardisiert vorgenommen. Die stereotaktisch geführte Tumorimplantation (Koordinaten: Seitenwinkel + 20°, Höhenwinkel 0°, Tiefenanschlag 6 mm, berechnet von der *Tabula externa* des Schädels) verlief wie folgt: Es wurden  $5 \times 10^4$  bzw.  $5 \times 10^5$  Tumorzellen in 10 µl der Suspension in einer sterilisierten Mikrospritze (HAMILTON, Basel, Schweiz) aufgezogen. Anschließend wurde eine Kanüle aufgesetzt und diese entsprechend der stereotaktischen Koordinaten transdural 5 mm in das Hirnparenchym vorgeschoben. Die Injektion der suspendierten Tumorzellen erfolgte über einen Zeitraum von 2 Minuten. Anschließend wurden die Tiere bis zum Aufwachen aus der Narkose beobachtet und bis zum folgenden Tag im Wärmeschrank belassen. Daraufhin wurden die Tiere täglich untersucht.

#### ***3.1.2.5 Ablauf der Behandlung mit Thalidomid***

##### *Thalidomidzubereitung*

40 mg steriles Thalidomidpulver wurden in 1 ml DMSO suspendiert und bei -20°C gelagert. Für die täglichen Thalidomidgaben wurde mit PBS auf die errechneten Konzentrationen verdünnt. Anschließend wurde die Suspension permanent geschüttelt und innerhalb von 30 Minuten verabreicht.

### *Thalidomidbehandlung*

Gemäß Protokoll wurden ab dem 6. Tag nach Tumorzellenimplantation einmal pro Tag die jeweiligen Thalidomidgaben sowie die Kontrollen (DMSO/PBS in entsprechendem Verhältnis) per intraperitonealer Injektion verabreicht. Nach jeder Injektionsbehandlung wurden die Tiere 30 Minuten beobachtet.

#### ***3.1.2.6 Einschläfern und Präparation der Tiere***

Gemäß Vorgabe des von der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigten Versuchsplanes sollten die Tiere während des gesamten Versuches ohne neurologische oder andere schwerwiegende Symptome bleiben, beim Auftreten derartiger Krankheitszeichen musste das betroffene Tier vorzeitig getötet werden. Deshalb wurden alle restlichen Versuchstiere ohne solche Zeichen nach 19 bzw. 21 Tagen wie geplant aus dem Versuch genommen.

Dazu wurden sie in tiefe Äthernarkose versetzt und dekapitiert. Im Anschluss daran wurde jeweils die Eröffnung der Schädelkalotte mit einer kleinen Knochenzange nach LUER vorgenommen und das Rattenhirn vorsichtig mit einem Dissektor herausgelöst. Die Kleinhirne wurden dann scharf abgetrennt und die Großhirne mit der Schnittfläche auf beschriftete Korkplättchen geklebt (Tissucol<sup>®</sup>). Die Hirnpräparate wurden dann umgehend in Isopentan im Stickstoffbehälter schockgefroren und bei -20°C zwischengelagert. Bei den Versuchsreihen II und III wurden einige Tiere in tiefer Äthernarkose laparotomiert und durch intraaortaler Blutaspiration getötet. Die Blutproben wurden sofort zentrifugiert und das Serum zur Thalidomidbestimmung (HPLC) bei -20°C tiefgefroren. Die Kleinhirne dieser Tiere wurden ebenfalls für eine spätere Gewebe-HPLC zur Thalidomidbestimmung eingefroren.

## 3.2 Verwendete Material und Geräte

### 3.2.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller / Bezeichnung
Blot Gerät	Bio Rad , Trans Blot SD Semi Dry transfer cell
CO <sub>2</sub> -begaster Brutschrank	Heraeus (Hanau), CO <sub>2</sub> -Auto-Zero
ELISA Photometer	Lab system (Finland), Multiskan M
Eppendorf-Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg), Centrifuge 5403 und 5417
Gelkammern	AGS Heidelberg
HPLC Gerät	WATERS, Dioden Array Detektor (DAD SS6, 2695)
HPLC Säule	MERCK, Lichrospher 100
Stereotaktischer Kopfrahen	David Kopf Instruments, Tujunga, Californien/USA
Kryostat	Leica, 1720 Digital
Multiwellplatten	Greiner
Mikroskop	Leica
Mikroskop-Kamera-System	Fa. CARL ZEISS, Jena, AxioCam MR
Mörser	JANKE & KUNKEL, Staufen, Ultra Turrax T25
Netzgeräte	Pharmacia (Uppsala, Schweden), GPS 200/400
Photometer	Perkin-Elmer Wellesly, USA, Spektralphotometer Lambda 5
Pipetten	Labsystem
Pipettenhilfe	Hirschmann, Pipetus Akku
RT-PCR Gerät	APPLIED BIOSYSTEMS, (Darmstadt), ABI PRISM 5700 <i>sequence detection system</i>
Schüttler	Biometra, Mini rocking Platform WT16
Sterilbank	Heraeus, Lamin Air HA2448
Thermocycler	Biometra (Göttingen), UNO Thermoblock
Vortex	Janke Kunkel, Modell VF2
Wasserbad	Klees
Zentrifuge	Eppendorf

Tab. 1: Laborgeräte

## 3.2.2 Eingesetzte Chemikalien

Chemikalie	Hersteller / Bezeichnung
Acetonitril	Merck
Acrylamid 40%	GIBCO BRL, Cat. No. 35722-016
Albumin	Boehringer
APS Ammonium Persulfate	MERCK
Aqua H <sub>2</sub> O (DNase frei)	Braun
Bio-Rad protein assay	Bio-Rad Laboratories GmbH
BSA	PHARMACIA, Freiburg
100 % Chloroform	MERCK, Darmstadt
Compound-Kleber	Sakura (Niederland), Tissue-Tek®
Coomassie blue	MERCK
DAB (3,3 Diaminobenzidin)	Sigma
Essigsäure	Merck
Fixierungslösung Dade Diff-Quick® Fix	Dade Diagnostika GmbH
DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser	SIGMA, München
DMSO (Dimethylsulfoxid)	MERCK
dNTP-Mix (25mM)	GIBCO BRL, Eggenstein
DTT	SIGMA, München
EDTA	MERCK
Eosin G	MERCK
Ethanol	Riedel-de-Häen
Schnelleindeckmittel Entellan ®	MERCK
5%iges FCS-DMEM/HAM'S	PAA, F12
FCS	PAA Laboratories, A15-043
GeneAmp® 5700 sequence detection system	APPLIED BIOSYSTEMS, Darmstadt,
Glycin	MERCK , 4094 87%
Wasserstoffperoxid H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	MERCK
Hämalaun	MERCK, Hämalaun MAYER Microscopy
HCl	MERCK
Horse serum	vector laboratories, Normal horse serum S 2000
5x H-RT-Puffer (4°C)	GIBCO BRL, Eggenstein
100% Isopropanol	MERCK, Darmstadt
Kernechtrot	MERCK
Milchpulver	Oxoid
MTT Salz	Sigma
PBS	Serag-Wiessner
qPCR™Core Kit for Sybr™ Green I	EUROGENTECH, Seraing, Belgien, Cat. No. RT-SN73-05
Random Hexamer Primer pd (N) <sub>6</sub> (1,5µg/ml)	PHARMACIA, Freiburg
RNasin	PROMEGA, Mannheim
Schlittenbahnöl	Leica, Nr. 601
SDS	MERCK , 822050
Standard für Western Blot	Bio Rad, Cat. 161-0324
TEMED ; N, N, N', N', Tetramethylethylendiamine	Bio Rad
Thalidomid	Grünenthal
TRI REAGENT (Trizol)	SIGMA, München, Sigma T9424
TRIS	Paesel, 26-128-3094
Trypsin EDTA	PAA
Tween 20	Sigma
Vaseline Spray	Hettich Zentrifugation
(Vectastain ® ABC Kit peroxidase	Vector laboratories, Inc., Standard PK-4000
Xylol	MERCK

Tab. 2: eingesetzte Chemikalien

### 3.2.3 Plastikwaren und sonstige Einwegartikel

Waren	Hersteller / Bezeichnung
Deckgläser	Menzel-Gläser (Germany)
Einmalspitzen	Polylab
Filter	Sartorius, Minisart ® 1,20 µm 17593
Kammer für Immunhistochemie	SHANDON ®, Coverplate TM disposable immunostaining chambers Cat. No. 7211013
Kanüle	Terumo, Microlance
Korkplättchen	Slee Technik GmbH (Mainz)
Nitrozellulose Membrane	Gerbermembrane GmbH / Whatman Group
Objektträger für Kryoschnitte	Mariensfeld superior, Histobond®, kat. Nr. 901236
Petrischalen	Falkon
Pipette	Corning Inc., Costar ® Stripette ® verschiedener Größe
Plastikpipetten	Greiner
Röhrchen	Greiner, Greiner Bio one Cellstar ® PP test tubes steril 15 mL cat. No. 188.271 und 50 mL No. 227.261
Spritze	Braun Melsungen AG, Omnifix ® 10 mL und 1 mL
Reaktionsgefäße	Eppendorf, 0,5-2 mL
Wathman Papier	Biometra
96er well plates	Cat. No. RT-PL-9601B, EUROGENTECH, Seraing, Belgien
Zellkulturflaschen	Greiner, 75 cm <sup>3</sup>
Zellschaber	Greiner (Nürtingen)

Tab. 3: Plastikwaren und Einwegartikel

### 3.2.4 Antikörper

2. Antikörper	Konzentration		Inkubationsdauer	Temperatur °C*	Anti**	Hersteller/Ref.
	Für Immunhistochemie	Für Western Blot und ELISA				
Peroxidase-conjugated Affini Pure Rabbit Anti Mouse	1:100	1:5000	30 min	Z	M	JACKSON Immunoresearch Laboratories Inc. Nr. 315-035-045
Peroxidase-conjugated Affini Pure Mouse Anti Goat	1:100	1:5000	30 min	Z	G	JACKSON Immunoresearch Laboratories Inc. Nr. 315-035-108

Tabelle 4: Liste der 2. Antikörper mit den entsprechenden Reaktionsbedingungen für die immunhistochemische Färbung

\* Z= Zimmertemperatur      \*\* M=Maus, G= Ziege

### 3. Material und Methoden

Antigen des 1. Antikörpers	Klon	Konzentration		Inkubationsdauer ( h )	Temperatur °C	Anti**	Hersteller
		Für Immunhistochemie	Für Western Blot du ELISA				
<b>CD4</b>	MRC OX-35	1:100		36	Z	R	SEROTEC, Düsseldorf
<b>CD8</b>	MRC OX-8	1:100		36	Z	R	SEROTEC, Düsseldorf
<b>CD31 (PECAM1)</b>	TLD-3A12	1:50		12	Z	R	SEROTEC, Düsseldorf
<b>CD51/61 (avβ3)</b>	23C6	1:25		36	Z	H	SEROTEC, Düsseldorf
<b>CD54 (ICAM1)</b>	TLD-4C9	1:100		12	Z	R	SEROTEC, Düsseldorf
<b>CD95/Apo 1 /Fas</b>	Clone Apo1-1	1:25		36	+4	R	DAKO, Glostrup, Denmark
<b>EBA</b>	SMI 71	1:1000		24	Z	R	STERNBERGER monoclonals Lutherville, U.S.A.
<b>FGF</b>	Clone 6	1:25	1:250	36	+4	H R M	TRANSDUCTION LAB Lexington, U.S.A.
<b>GFAP</b>	G-A-5	1:50		12	Z	H R	BOEHRINGER, Mannheim 814369
		1:50					Chemical credential 69110
<b>IFN gamma</b>	DB-1	1:25		36	+4	M R	SEROTEC, Düsseldorf
<b>Ki 67</b>	MIB-5	1:25		36	+4	R	DAKO, Glostrup, Denmark
<b>CD34</b>	OX 43	1:50		12	+4	R	BMA, Woburn, U.S.A.
<b>PCNA</b>	Clone 24	1:50		12	Z		BD Transduction Laboratories Lexington, U.S.A.
<b>RCA</b>	RCA 120	1:50		12	+4	H R	VECTOR Laboratories, Burlingame, U.S.A.
<b>S100</b>	DAK-S100B/2	1:50		36	+4	H	CYMBUS biotechnology, Chandlers Ford, U.K.
<b>TNF alpha</b>	E.coli-rrTNF-a	1:50	1:500	36	+4	R ****	R&D Systems, Wiesbaden
<b>VEGF</b>	Ab-5	1:50		12	Z	H M R	ONCOGENE research products, San Diego, U.S.A.
<b>Vimentin</b>	V4	1:50		12	Z	H R	BOEHRINGER, Mannheim

Tab. 5: Liste der Antigene und Antikörper mit den entsprechenden Reaktionsbedingungen für die immunhistochemische Färbung \* Z= Zimmertemperatur \*\* H=Mensch, R=Ratte, M=Maus, G= Ziege \*\*\*\* TNF alpha: anti goat 2. Antikörper s. Tabelle 4

### 3.2.5 Molekularbiologische Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller / Bezeichnung</b>
ELISA Quantikinine	R & D systems, Rat TNF-alpha immunoassay Cat. Nr. RTA00
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit	Roche, Cat. No. 1 684 817
Neuro TACS II <i>In situ</i> Apoptosis Detection Kit	R & D systems, Cat. Nr. TA900
Soluble TRAIL /Apo 2 ELISA Kit	Diaclone Research
Tumor TACS II <i>In situ</i> Apoptosis Detection Kit	R & D systems, Cat. Nr. TA5411

Tab. 6: Molekularbiologische Kits

### 3.2.6 Primers

**Oligonucleotide** (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Germany):

<b>Name</b>	<b>Sequenz 5,⇒ 3</b>	<b>Position im jeweiligen Gen</b>
ARF1 For	5'- CAA TGA CAG AGA GCG TGT GAA C - 3'	356 - 377
ARF1 Rev	5'- GTG ATT TCG GCC GCA TTC ATG - 3'	473 - 493
TNFα For	5'- CTC ACA CTC AGA TCA TCT TCT - 3'	232 -252
TNFα Rev	5'- GTC TTT GAG ATC CTA GCC ATT - 3'	352 - 372
VEGF For	5'- CTC ACC AAA GCC AGC ACA TA - 3'	329 - 348
VEGF Rev	5'- AAA TGC TTT CTC CGC TCT GA - 3'	508 - 527
FGF For	5'- TTG GTT GTG ACC CAG TGA AA - 3'	8 - 23
FGF Rev	5'- AGC TCT ACC ACA GGG GAC TG - 3'	112 - 131
IFN For	5'- CCA AGG CAC ACT CAT TGA AA - 3'	75 - 95
IFN Rev	5'- CTG ATG GCC TGG TTG TCT TT - 3'	256 - 275

Tab. 7: Sequenz der eingesetzten Primers

### **3.3 Zellbiologische Arbeiten**

#### **3.3.1 Zelllinien**

Alle Untersuchungen wurden ausschließlich unter Verwendung von Zellen der Glioblastomzelllinie (Ratte) F98 durchgeführt, die vom Max-Dellbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin (Dr. W. Walther) zur Verfügung gestellt wurden (F98-Wildtyp).

#### **3.3.2 Zellkulturmedien**

Die Zellen wurden in 10% Medium in 75 cm<sup>3</sup> Kulturflaschen unter Standardbedingungen (10% CO<sub>2</sub>, 37°C, wassergesättigte Atmosphäre) kultiviert und nach der Ernte in gewünschter Verdünnung neu ausgesät.

#### **3.3.3 Anzucht der Zellen**

Die Zelllinie F98-WildTyp wurde aus der Kultur übernommen. Das alte Medium wurde entfernt, die Zellschicht mit einer kleinen Menge PBS einmal gespült. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Trypsin-EDTA-Lösung im Kulturgefäß. Die Einwirkzeit betrug circa 3 Minuten, maximal 10 Minuten bei 4°C, bis sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst hatten (Mikroskopkontrolle). Darauf folgte die Überführung der Zellen in eine mit frischem FCS-haltigem Medium gefüllte Kulturflasche. Durch die Zugabe von FCS wurde die Enzymaktivität des Trypsins gestoppt.

#### **3.3.4 Proliferationstest bei F 98 Zellen**

Beim MTT-Proliferationstest kann die Zahl der lebenden Zellen indirekt durch photometrische Bestimmung der mitochondrialen metabolischen Aktivität der Zellen gemessen werden: die Zellen nehmen das gelbe Tetrazoliumsalz *3-(4,5-Dimethylthiazole-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide (MTT)* auf und reduzieren es durch die mitochondriale Succinat-Deshydrogenase zum blauen, unlöslichen MTT-Formazan (Mosmann 1983).

Nach abgeschlossener Zellzählung wurden die F98-Zellen in einer Zelltitration von 100, 500, 1000, 5000 und 10000 Zellen pro Plattenvertiefung (Sechsfachbestimmung) in einem Gesamtvolumen von 100 µl in 96-Lochplatten (Mikrotiterplatten) auspipettiert. Dazu wurde

50  $\mu\text{L}$  des Gemisches DMSO/PBS 1:10 und 1:1000 in Medium (5%iges FCS-DMEM/HAM'S F12 von PAA) als Kontrolle genommen, dann wurde Thalidomid in DMSO/PBS mit einer Thalidomid-Endkonzentration in Medium von 25, 50 und 500 ng/mL gelöst.

Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde das Medium abgenommen und jeweils 100  $\mu\text{l}$  MTT-Salz-Verdünnung (1,5 mg MTT in 1 mL Medium) in jede Plattenvertiefung gegeben. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C wurde der Überstand abgenommen, die Reaktion durch Zugabe von jeweils 100  $\mu\text{l}$  DMSO gestoppt und das eingebaute MTT-Salz aus den Zellen gelöst. Der so entstandene blau-violette Farbkomplex wurde anschließend photometrisch durch Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von  $\lambda=750$  nm bestimmt. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz verhält sich die Zellkonzentration proportional zur optischen Dichte (OD).

Die beschriebene Versuchsreihe wurde zweimal durchgeführt.

### **3.4 Herstellung der Gewebeschnitten**

Durch das Schneiden der gefrorenen Tierhirne mit einem Mikrotom (Kryostat 1720 Digital, Leica) wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  Innenraumtemperatur 8 $\mu\text{m}$  dicke Gewebeschnitte hergestellt und auf speziell beschichtete Objektträger (Histobond®, Marienfeld superior) aufgetragen.

Die Lagerung der Schnitte erfolgte kurzfristig bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und langfristig bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.5 Färbungen**

#### **3.5.1 Hämalaun-Eosin Färbung zur Histologie**

Die auf speziell beschichtete Objektträger aufgezogenen Gefrierschnitte wurden zuerst 30 s mit der Diff-Quick Fixierungslösung fixiert, dann für 3 min in ein Farbbad mit Hämalaun Fertiglösung nach Mayer gegeben. Anschließend wurden die Schnitte für 1 Minute unter fließendem Wasser und für eine weitere Minute in Aqua dest. gespült. Danach erfolgte die Kernfärbung mit 1%igem Eosin (in 30%igem Alkohol) für 20 Sekunden. Anschließend folgte eine erneute Spülung für 1 Minute in Aqua dest. und abschließend die Entwässerung der Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) und Xylol bevor die Objektträger in Entellan® eingedeckt wurden.

Durch die HE-Färbung färben sich Zellkerne, Knorpel und verkalkte Teile blau, das Zytoplasma rosa, Erythrozyten orange und die Muskulatur rot.

### 3.5.2 Berliner-Blau Färbung zum Eisennachweis

Das Prinzip der Färbung besteht in der blauen Auffärbung von dreiwertigem Eisen mit dem aus zweiwertigen Eisen bestehenden Komplex Kaliumhexacyanoferrat.

Die Kryoschnitte wurden fixiert, dann mit destilliertem Wasser gespült. Es folgte die 20-minütige Inkubation in einer Eisen Lösung im Verhältnis 1:1. Die Lösung I ist eine 2%-ige HCl Lösung, die Lösung II eine 2%-ige Hexacyanoferrat II Lösung.

Nach erneuter Spülung in destilliertem Wasser wurden die Schnitte 10 Minuten gekocht und in filtrierter Kernechtrotlösung (2% Aluminiumsulfat und 0,1% Kernechtrot) inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Danach folgte eine erneute Spülung für 1 Minute in Aqua dest. und abschließend die Entwässerung der Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) und Xylol bevor die Objektträger in Entellan® eingedeckt wurden.

Hierdurch färbt sich das Eisen blau, die Kerne rot und das Zytoplasma rosa.

### 3.6 Onkometrie

Das Tumolvolumen wurde berechnet als die Summe aller Schnittflächen, multipliziert mit dem äquidistanten Abstand zwischen den Flächen. Diese Formel erhält man, indem man das Volumen als Integral über die Schnittflächen darstellt und numerisch nach der Trapezregel bestimmt. Hierbei wird am Anfang und am Ende des Tumors jeweils ein Schnitt mit der Fläche Null ergänzt (Bronstein I. N.1980, Seite 244).

Hierfür wurde jeder zehnte 8 µm dicke Gefrierschnitt vom jeweiligen Rattenhirntumor der Versuchsreihe II hoch auflösend mit einer Millimeterskala eingescannt, die Tumorgrenzen (*Region of interest ROI*) wurden markiert (s. Abbildung 7 als Beispiel) und die jeweilige eingekreiste Tumorfläche mit dem Bildverarbeitungsprogramm OSIRIS (Commonwealth of Australia 2001, DEWR) berechnet.

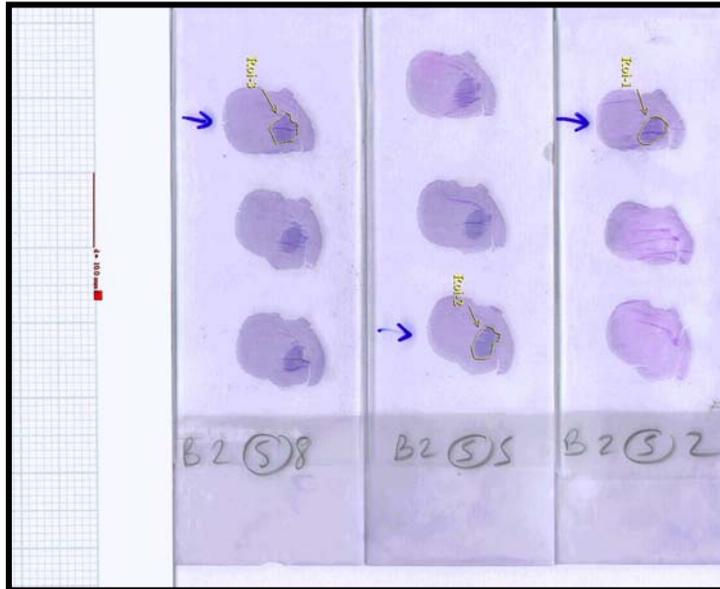


Abbildung 7: Drei eingescannte Objektträger mit Markierung des jeweiligen Tumorrandes (*Region of interest ROI*) der zu berechneten Flächen (jeder zehnte Hirnschnitt) als Beispiel mit Millimeterpapier als Größenreferenz [Tumor II B2 aus der Kontrollgruppe]

#### *Statistische Auswertung*

Für den Vergleich zweier Serien von unabhängigen Messwerten (Tumorgröße der Verumgruppe=R versus Kontrollgruppe=B) des Tierversuches II wurde der zweiseitige STUDENT-Test eingesetzt (Bronstein, I.N. 1980, Seite 719)

### **3.7 Immunhistochemie**

Die Bestimmung erfolgte an Kryoschnitten, die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wurden.

Nach einer Fixierung (Dade Diff-Quick® Fix, DADE Diagnostika GmbH, Marburg) über 30 Sekunden wurden die Schnitte in spezielle Kammern für die immunhistochemische Bearbeitung (SHANDON Coverplate™) gestellt.

Es folgte für 10 Minuten eine Blockierung der endogenen Peroxidase mit 1%-iger Wasserstoffperoxidlösung (Fa. MERCK, Darmstadt) in PBS. Anschließend wurden die Schnitte kurz mit einer Lösung aus PBS und einer geringen Menge *Fetal Calf Serum Albumin* (PAA Laboratories, Cölbe) gewaschen. Danach erfolgte eine Präinkubation mit *Horse Serum* (Normal Horse Serum S 2000, VECTOR Laboratories Inc., Burlingame, U.S.A.) in PBS (1:50) für 60 Minuten. Als nächster Schritt folgte die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper bei Zimmertemperatur (Konzentration und Dauer s. Tabelle 5). Nach Spülung in PBS (10 Minuten) wurden die Schnitte mit dem sekundären Antikörper (Konzentration und Dauer s. Tabelle 4) in PBS verdünnt (1:100) und für 30

Minuten bei Zimmertemperatur beschichtet. Im Anschluss daran erfolgt nach 10-minütiger Spülung mit PBS die Inkubation mit frisch hergestellter Avidin-Biotinin-Peroxidase (Vectastain® ABC Kit peroxidase Standard PK-4000, VECTOR Laboratories Inc.) in einer Verdünnung von 1:50 für 30 Minuten. Die Objektträger wurden anschließend aus den Immunhistochemie-Kammern entfernt und ohne Deckel in normalen Kammern mit PBS gespült.

Die Objektträger wurden dann horizontal gelagert und mit einer frisch sterilfiltrierten Substratlösung (3,3-Diaminobenzidin SIGMA + 0,5mg/mL in PBS + 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für 10 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz beschichtet.

Nach mehrmaligem Spülen in PBS und destilliertem Wasser erfolgte eine Gegenfärbung nach Mayer (Hämalaun MAYER Microscopy, Fa. MERCK) für 3 Sekunden. Im Anschluß daran erfolgte die Entwässerung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70%, 80%, 90%, 100%) und Xylol und das abschließende Eindecken mit einem Schnelleindeckmittel (Entellan® , Fa. MERCK).

#### ***Proliferationsrate***

Die Ermittlung der Proliferationsrate erfolgte durch Auszählen des positivgefärbten Zellenanteils von fünf repräsentativen Gesichtsfeldern bei einer 40-fachen Vergrößerung (*high power fields*, HPFs) manuell mit Hilfe eines Zellrasters. Die von zwei unabhängigen Untersuchenden stammenden Ergebnisse wurden gemittelt. Hiermit wurden Präparate mit bedeckter Beschriftung von Schnitten der Versuche II und III, jeweils bei Kontroll- und Verumgruppe, ausgewertet.

#### ***Gefäßdichte***

Zunächst wurden die für CD31, EBA und RCA gefärbten Schnitte der Versuchsreihen II und III jeweils bei Verum- sowie Kontrollgruppe bei 10-facher Vergrößerung mit einem Mikroskop-Kamera-System (AxioCam MR, Fa. CARL ZEISS, Jena) fotografiert. Mit Hilfe eines standardisierten Auszählrasters von 90000 µm<sup>2</sup> wurden die Gefäße im jeweils gefäßdichtesten Areal zum einen im Tumor und im peritumoralen Gewebe und zum anderen auf der kontralateralen Seite zum Vergleich von zwei unabhängigen Untersuchenden verblindet ausgezählt und gemittelt.

### 3.8 Molekularbiologische Arbeiten

#### 3.8.1 ELISA zum TNF-alpha-Nachweis

Zur quantitativen TNF- $\alpha$  Bestimmung sowohl der Kontroll- als auch der Verumgruppe des Versuchs II und F98er Zellen, mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) im Hirntumorgewebe, wurden die Proben zunächst vorbereitet. Um jeweils 10  $\mu\text{g}$  aus jeder Probe zu gewinnen, wurde eine Standardkurve mit Albumingradienten ab 1mg/ml bis 800 mg/ml erstellt. Dazu erfolgte die dreifache Bestimmung und Kontrolle mit dem Reagenz in NaCl. Nach dreifachen Auftauen und Einfrieren der Gewebeproben wurden diese entsprechend in NaCl verdünnt (10  $\mu\text{l}$  Probe + 90  $\mu\text{l}$  NaCl 0,9%).

Anschließend wurde das Reagenz Bio-Rad *protein assay* (BIO-RAD Laboratories GmbH, München) 1:5 in 0,9%-igem NaCl verdünnt und mit Proben und Standard (100  $\mu\text{l}$  + 100  $\mu\text{l}$  Bio-Rad Reagenz) im Verhältnis 1:1 im ELISA Photometer (Labsystems MULTISKAN MS, Helsinki, Finnland,  $\lambda = 590 \text{ nm}$ ) untersucht.

Danach wurden die Proben auf TNF- $\alpha$  gemäß Anleitung des *ELISA-Kits Quantikine M Murine rat TNF alpha* (R&D SYSTEMS, Wiesbaden, Cat. Nr. RTA00) untersucht. Es handelt sich hierbei um einen Festphasen-ELISA Test nach dem Sandwich Prinzip. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler muriner Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper. Der Sekundärantikörper war peroxidasegekoppelt. Die peroxidasekatalysierte Farbreaktion wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 540 \text{ nm}$  gemessen. Die Proben wurden alle doppelt angesetzt und die Ergebnisse gemittelt. Die Farbintensität verhält sich proportional zu der ursprünglichen TNF- $\alpha$  Konzentration, die mittels TNF-Standardkurve umgerechnet wird.

#### 3.8.2 *In situ* Hybridisierung zur Apoptose-Nachweis

Der Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte anhand von zwei Verfahren zur *in situ* Hybridisierung. Die zuvor mit dem Tumor TACS *in situ Apoptosis Detection Kit* (R&D SYSTEMS, Wiesbaden, Cat. Nr. TA5411) durchgeführte Untersuchung zeigte falsch negative Ergebnisse (nicht dargestellt).

### 3.8.2.1 Neuro TACS © Kit zum Apoptose-Nachweis

Die Bestimmung erfolgte an Kryoschnitten, die bei -80°C aufbewahrt wurden.

Der Apoptosenachweis erfolgte gemäß des Standard-Protokolls des Neuro TACS II

*In situ* Apoptosis Detection Kit der Firma R&D systems (Cat. Nr. TA900).

Es wurden parallel eine Positivkontrolle und drei Negativkontrollen wie folgt bearbeitet:

Schritt	Bezeichnung	Geprüfte Schnitte	Kontrolle			
			K1	K2	K3	K4
			Nuclease generated positive control	Unlabeled sample negative control	Experimental negative control	Counter-staining negative control
1	Permeabilisierung mit Neuropore	+	+	+	+	+
2	TACS nuclease puffer	-	+(1)	-	-	-
3	Quenching Lösung	+	+	+	+	+
4	TdT Labelling Puffer	+	+	-	+	-
5	Labelling reaction Mix	+	+	(2)	+	-
6	TdT Stop Puffer	+	+	+	+	-
7	Streptavidin HRP Working Lösung	+	+	+	+	-
8	DAB	+	+	+	+	-
9	Counterstaining	+	+	+	+	+

Tab. 8: Übersicht der Kontrollschnitten

Gefrorenes Gewebe wurde über Nacht bei Zimmertemperatur (18-24°C) reäquilibriert, dann wie folgt rehydriert: 5 Minuten in 100%-igem Ethanol, 5 Minuten in 95%-igem Ethanol, 5 Minuten in 70 %-igem Ethanol, 5 Minuten in frischem PBS (zweimal).

Es folgte die Fixierung in 50 mL 3,7% Formaldehyd Lösung für 10 Minuten bei 18-24°C (5 mL 37 % Formaldehyd, 5 mL 10x PBS, 40 mL DNase-freies Wasser). Die Objektträger wurden dann zweimal in frischem PBS je 5 Minuten gewaschen.

Zur Permeabilisierung wurden 50 µL von Neuropore auf jede Probe pipettiert, die Schnitte mit Parafilm abgedeckt und 30 min bei 18-24°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend zweimal in DNase-freiem Wasser für je 2 Minuten gewaschen.

Danach wurde die Nuclease-Positivkontrolle vorbereitet: 50 µL von TACS Working Lösung auf dem Sample(1)(1 µL TACS Nuclease, 50 µL TACS Nuclease Puffer), mit Parafilm abgedeckt und 30 Minuten inkubiert.

Die anderen Proben wurden mit 50  $\mu\text{L}$  TACS Nuclease Puffer bedeckt und 30 Minuten parallel zu der Positivkontrolle inkubiert. Die Proben wurden anschließend zweimal für je 2 Minuten in DNase-freiem Wasser gewaschen.

Anschließend wurden alle Proben mit der Quenching Lösung (5 mL 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 45 mL Methanol) 5 min bei 18-24°C bedeckt. Danach wurden die Proben für 1 Minute in 1x PBS bei 18-24°C gewaschen.

Die Samples wurden dann für 5 min mit 1xTdT Labelling Puffer (5 mL 10x Labelling Puffer, 45 mL DNase-freies Wasser) und dann Parafilm bei 18-24°C bedeckt.

Danach wurden die Samples für 1 Stunde im 37°C-Kammer mit je 50  $\mu\text{L}$  (außer K4 Kontrolle) Labelling reaction Mix und Parafilm inkubiert.

Pro Sample:

TdT dNTP Mix	1 $\mu\text{L}$
TdT Enzyme	1 $\mu\text{L}$
50x $\text{Mn}^{2+}$	1 $\mu\text{L}$
1x TdT Labelling Puffer	50 $\mu\text{L}$

Tab. 9: Eingesetzte Chemikalien pro Probe

TdT dNTP Mix	1 $\mu\text{L}$
50x $\text{Mn}^{2+}$	1 $\mu\text{L}$
1x TdT Labelling Puffer	50 $\mu\text{L}$

Tab. 10: Eingesetzte Chemikalie für Kontrolle K2 (2)

Die Reaktion wurde dann mit 1xTdT Stop Puffer (5 mL 10x TdT Stop Puffer, 45 mL DNase-freies Wasser) gestoppt und die Schnitte zweimal mit frischem PBS je 2 Minuten gewaschen. Es wurde um die Proben herum getrocknet, ohne die Samples selber trocknen zu lassen.

Die Proben wurden anschließend mit je 50  $\mu\text{L}$  Streptavidin-HRP Lösung (1  $\mu\text{L}$  Streptavidin-HRP, 50  $\mu\text{L}$  1x PBS) und Parafilm bedeckt und 10 Minuten bei 18-24°C inkubiert. Danach wurden sie zweimal in PBS für je 2 Minuten gewaschen.

Dann wurden die Proben für 10 Minuten mit DAB-Lösung (50  $\mu\text{L}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 250  $\mu\text{L}$  DAB, 50 mL 1x PBS) inkubiert und zweimal in dH<sub>2</sub>O für je 2 Minuten bei 18-24°C gewaschen.

Für die Gegenfärbung wurden die Proben 3 Minuten in Blue Counterstain inkubiert, kurz in Leitungswasser gewaschen, dann in Ammonium-Wasser (0,25 mL 30% Ammonium-Hydroxid Lösung, 500 mL Leitungswasser) gespült bis ein Farbumschlag von Lila zu Blau erfolgte.

Anschließend wurden die Proben kurz in Leitungswasser gewaschen, dann kurz in 70%-igem, 95%-igem, 100%-igem Ethanol, dann Xylol gebadet und anschließend mit Entellan und einem Deckglas bedeckt.

### **3.8.2.2 *In situ* cell death detection © Kit POD zum Apoptose-Nachweis**

Die Bestimmung erfolgte an Kryoschnitten, die bei -80°C aufbewahrt wurden.

Das Protokoll folgt der Vorgabe von „*In situ* cell death detection kit, POD“ von Roche (Cat. Nr. 1 684 817).

Die Schnitte wurden zuerst mit einer frischen Fixierungslösung (4% Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4) 20 Minuten bei Raumtemperatur (15-25°C) fixiert und anschließend mit PBS mehrmals gewaschen. Es folgte die Blockierung der eigenen Peroxidase mit einer Blockierungslösung (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol 10 Minuten bei Raumtemperatur). Dann wurden sie erneut mit PBS gewaschen. Die Permeabilisation erfolgte mit einer Permeabilisationslösung (0,1% Triton X-100 und 0,1% sodium citrate in PBS) für 2 Minuten auf Eis (bei 2-8°C). Es wurde anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Zu den Proben wurden je 50 µL der „TUNEL reaction mixture“ (je 5 µL Enzyme Solution und 45 µL Label Solution, im Kit vorhanden) addiert (für die 2 Negativkontrollen nur 50 µL der Label Solution). Die Schnitte wurden alle mit Parafilm bedeckt. Nach einer 60-minütiger Inkubation bei 37°C im feuchten und dunklen Brutschrank wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Als nächstes wurden je 50 µL „Converter-POD“ (im Kit vorhanden) auf die Schnitte gegeben, die Objektträger mit Parafilm bedeckt und 30 Minuten bei 37°C im feuchten Brutschrank inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde das Substrat DAB (20 mg DAB Pulver, 12 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf 40 mL PBS) auf die Schnitte verteilt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen (einmal mit PBS, zwei mal mit destilliertem Wasser) erfolgte über 3 Sekunden eine Gegenfärbung mit Hämalaun. Im Anschluß erfolgte die Entwässerung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 100%) und Xylol und das abschließende Eindecken (Schnelleindeckmittel Entellan®).

### **3.8.3 TRAIL/ Apo 2 L ELISA zum Apoptose-Nachweis**

Zur Gewinnung der Kulturüberstände wurden 10<sup>6</sup> Zellen in 1 ml Medium auf 24-Lochplatten ausgesät und für 24 Stunden bzw. 48 Stunden inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1000 rpm wurde einmal der Überstand abpipettiert und bei -80°C bis zur Verwendung eingefroren. Zum Pellet wurden 200 µL destilliertes Wasser zugegeben, das Gemisch wurde dreimal nacheinander eingefroren und aufgetaut.

Der Apoptosenachweis erfolgte dann gemäß Standard-Protokoll des „Soluble TRAIL /Apo 2 ELISA“ Kits der Firma Diaclone Research.

### 3.8.4 Real time Reverse Transcriptase PCR zum Nachweis von VEGF, FGF2, IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$

#### *Prinzip der real time RT - PCR (Real-Time Reverse -Transkriptase PCR)*

Die PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ermöglicht die Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Mit der „*Real time reverse transcription PCR*“ kann das Amplikon semiquantitativ durch Interkalierung eines Markers (z.B. SYBR-green) nachgewiesen werden, was jedoch nur in doppelsträngiger DNA möglich ist. Dadurch kann das Produkt in „*real time*“ über eine kontinuierliche photometrische Messung des fluoreszierenden Markers visualisiert werden. Die Transkriptmenge jedes Gens wird anhand eines Referenzgens (*ADP Ribosylation Factor 1, ARF1*) normalisiert.

Als Referenzgewebe diente eine gesunde, nicht neoplastische Rattenhirnprobe.

Die für die PCR benötigte doppelsträngige cDNA wird aus der isolierten RNA der untersuchten Faktoren mittels Reverse-Transkriptase gewonnen.

Für die Durchführung der *real-time* Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zum Nachweis der VEGF-, TNF- $\alpha$ -, FGF2- und IFN- $\gamma$ -Expression wurden folgende Materialien eingesetzt:

Mörser	Ultra Turrax T25, JANKE & KUNKEL, Staufen
Spektralphotometer	Lamda 5, PERKIN-ELMER, Wellesly, U.S.A.
Vortex	Modell VF2, JANKE & KUNKEL, Staufen
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417, EPPENDORF, Hamburg
TRI REAGENT (Trizol)	Sigma T9424, SIGMA, München
100 % Chloroform	MERCK, Darmstadt
100% Isopropanol	MERCK, Darmstadt
Ethanol	RIEDEL-DE-HÄEN, Seelze

Tab. 11: Eingesetzte Materialien und Chemikalien für die RNA-Extraktion

DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser	SIGMA, München
5x H-RT-Puffer (4°C)	GIBCO BRL, Eggenstein
Random Hexamer Primer pd (N) <sub>6</sub> (1,5 $\mu$ g/ml)	PHARMACIA, Freiburg
dNTP-Mix (25mM)	GIBCO BRL, Eggenstein
BSA	PHARMACIA, Freiburg
RNAsin	PROMEGA, Mannheim
DTT	SIGMA, München
Super Script Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ l)	GIBCO BRL, Eggenstein

Tab. 12: Eingesetzte Chemikalien für die cDNA-Synthese

Name	Sequenz 5,⇒ 3	Position im jeweiligen Gen
ARF1 For	5'- CAA TGA CAG AGA GCG TGT GAA C - 3'	356 - 377
ARF1 Rev	5'- GTG ATT TCG GCC GCA TTC ATG - 3'	473 - 493
TNF $\alpha$ For	5'- CTC ACA CTC AGA TCA TCT TCT - 3'	232 -252
TNF $\alpha$ Rev	5'- GTC TTT GAG ATC CTA GCC ATT - 3'	352 - 372
VEGF For	5'- CTC ACC AAA GCC AGC ACA TA - 3'	329 - 348
VEGF Rev	5'- AAA TGC TTT CTC CGC TCT GA - 3'	508 - 527
FGF For	5'- TTG GTT GTG ACC CAG TGA AA - 3'	8 - 23
FGF Rev	5'- AGC TCT ACC ACA GGG GAC TG - 3'	112 - 131
IFN For	5'- CCA AGG CAC ACT CAT TGA AA - 3'	75 - 95
IFN Rev	5'- CTG ATG GCC TGG TTG TCT TT - 3'	256 - 275

Tab. 13: Sequenzen der eingesetzten Oligonukleotiden (Primers) (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Germany)

GeneAmp® 5700 sequence detection system	APPLIED BIOSYSTEMS, Darmstadt,
qPCR™Core Kit for Sybr™ Green I	Cat. No. RT-SN73-05, EUROGENTECH, Seraing, Belgien
96er well plates	Cat. No. RT-PL-9601B, EUROGENTECH, Seraing, Belgien

Tab. 14: Eingesetztes Material für die RT-PCR

### ***Probengewinnung***

Das zu untersuchende Gewebe wurde mit einem Skalpell von den Objektträgern abgetragen. Anschließend wurden 200  $\mu$ l Aqua dest hinzu gegeben. Die Proben wurden dann nach der Einfrier- und Auftau-Methode (dreifaches Einfrieren in Flüssigstickstoff mit nachfolgendem Wiederauftauen im Wasserbad) homogenisiert.

### ***Optimierung der Ansätze (Primerverhältnisse)***

Nach Durchführung der PCR mit einer Reihe von Kombinationen verschiedener Primerverhältnisse wurden durch Vergleich der jeweiligen Rate der akkumulierten Produkte die optimalen Primerkonzentrationen determiniert.

Primer	Konzentrationen [nM]
ARF for/rev	50/50
TNF - $\alpha$ for/rev	300/300
FGF for/rev	300/300
VEGF for/rev	300/50
IFN - $\gamma$ for/rev	300/300

Tab. 15: Konzentrationen der eingesetzten Primers.

**RNA – Isolierung**

Etwa 100 mg Gewebe wurde mit 1 ml Trizol mit einem Mörser homogenisiert und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurden jeweils 200 µl Chloroform (absolut) hinzugegeben und die Röhren 15 Sekunden heftig geschüttelt, danach 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert.

Die obere, helle RNA-haltige Phase, wurde jeweils in neue Röhren überführt. Die untere, rote DNA enthaltende Phase wurde verworfen. Pro Röhren wurden dann 500µl Isopropanol (100%) hinzugegeben, nachfolgend gemischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde in jedes Röhren 1 ml 75% EtOH (in DEPC Wasser) auf das Sediment gegeben, dann gewaschen und mit dem Vortex gemischt. Danach wurde erneut zentrifugiert (5 Minuten bei 4°C <10250 rpm) und jeweils der Überstand abgenommen. Anschließend ließ man die Proben kurz antrocknen. Sie wurden dann in je 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und schließlich 5-10 Minuten bei 55-60°C in Lösung gebracht. Die RNA-Menge und -Reinheit wurden photometrisch gemessen und rechnerisch ermittelt.

**cDNA- Synthese**

Zur Synthese von cDNA wurden aus jeder Probe 3 µg RNA mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 6 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde zur Denaturierung der Sekundärstrukturen 3 Minuten auf 70°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Nach Abkühlung wurde folgendes Reagenziengemisch (42 µl) zugegeben:

<b>Reagenz</b>	<b>pro Probe (µl)</b>
DEPC-H <sub>2</sub> O	23,4
5x H-RT-Puffer	10,0*
pd (N) <sub>6</sub> (1,5γg/ml)	3,0
dNTP-Mix (25 mM)	2,5
BSA (2,64mg/ml)	1,7
RNAsin	1,0
DTT (0,1M)	0,4

Tab. 16: Eingesetzte Chemikalien pro Sample für die cDNA-Synthese

RNAsin diente zur Blockierung der endogenen RNase. Der Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 48 µl wurde auf 42 °C erwärmt. Je Probe wurde 1 µl 200 U *Super Script* Reverse Transkriptase hinzugegeben. Die cDNA-Synthese fand während der nachfolgenden 120-minütigen Inkubation bei 42 °C statt. Die so gewonnene cDNA wurde bei –20°C eingefroren.

**Durchführung der RT-PCR**

Alle Reaktionen wurden in einem dreifachen Ansatz in einer 96er-Spitzlochplatte (EUROGENTEC, Teltow, Cat. No. RT-PL-9601B) mit dem *qPCR™Core Kit for Sybr™ Green I* (EUROGENTEC, Teltow, Cat. No. RT-SN73-05) durchgeführt. Ein erstes Reaktionsgemisch (Mix 1) wurde für alle Ansätze frisch vorbereitet. Dieses wurde dann entweder dem Reaktionsgemisch für die Primer des Zielgens (Mix 2a), das aufgrund unterschiedlicher Primerverhältnisse auf ein Endvolumen von 20 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt wurde, bzw. Mix 2b (Kontrollgen ARF1) hinzugegeben (s. Tabelle 17). Beide Mischungen wurden je auf einer Hälfte der 96-Spitzlochplatte aufgetragen:

Mix 1 [µl]		
1 x		100
10 x Puffer	2,5	250
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,75	175
2,5 mM dNTP	1	100
Enzym	0,125	12,5
SYBR Green (4°C)	0,75	75
Summe	6,125	612,5

a)

Mix 2b [µl]		
1 x		50
ARF1-f	1,5	75
ARF1-r3	1,5	75
Mix 1	6,125	306,25
H <sub>2</sub> O	10,875	543,75
Summe	20	1000

b)

Tab. 17: Reagenziengemische für die Durchführung der *real-time* RT-PCR. a) Mix 1. b) Mix 2b.

Alle Reaktionen fanden in einem ABI PRISM 5700 *sequence detection system* (APPLIED BIOSYSTEMS, Darmstadt) unter gleichen Bedingungen statt (s. Tabelle 18).

Schritt	Zeit	Temperatur
1	2 min	50°C
2	10 min	95°C
3	15 sec	95°C
4	1 min	60°C
3+4	40-45 Zyklen	

Tab. 18: *Real-time* RT-PCR Bedingungen**Auswertung der RT-PCR**

Die Ergebnisse wurden mit der Software des Geräteherstellers (GeneAmpSDS) analysiert. Die Werte des jeweiligen Schwellenzykluses (Ct-Wert) wurden für jedes Proben-Triplet gemittelt (m). Als Schwellenzyklus dient ein willkürlich gelegter Wert, der bei allen Kurven durch den logarithmischen Bereich geht. Er wird zuvor durch einen internen Standard festgelegt. Es folgte die Subtraktion des Kontrollgenwertes vom Zielgenwert ( $\Delta$  Ct), danach die Subtraktion des Normalhirn-Wertes (Referenz) von jedem einzelnen Gewebewert ( $\Delta\Delta$  Ct) und anschließend die inverse Potenzierung des  $\Delta\Delta$  Ct-Wertes ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

Da es sich um eine semiquantitative Auswertung handelt und Schwankungen von Genexpressionen im Normalgewebe anzunehmen sind, gilt ein Wert um 1 als Normalexpression (bei dem gesunden Kontrollhirn ohne Tumor). Werte  $> 2$  weisen auf eine erhöhte Expression, Werte  $< 0,5$  auf eine erniedrigte Genexpression im Vergleich zum Referenzgewebe hin.

$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Genexpression
$<0,5$	herunterreguliert
$>2$	heraufreguliert
$\approx 1$	Normalexpression

Tab. 19: Auswertung der Genexpression

### 3.8.5 Western Blot zum Nachweis von TNF- $\alpha$ , VEGF und IFN- $\gamma$

Für den Western Blot dienten als Proben F98 Zellen und Hirnproben der Versuchsreihe II, die aus den Gefrierschnitten durch dreimalige Auftauen und Einfrieren gewonnen wurden.

Als Referenz diente das Protein TNF-  $\alpha$  pur und als Positivkontrolle für TNF-  $\alpha$  HeLa-Zellen.

#### *Proteinbestimmung*

Zunächst wurde eine Standardkurve mit einem Albumingradient ab 1mg/ml in dreifacher Bestimmung hergestellt. Hierbei diente NaCl als Kontrolle, die Proben wurden ebenfalls mit 0,9%-iger NaCl-Lösung 1:10 verdünnt. Das Reagenz Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories GmbH) wurde 1:5 in 0,9%-iger NaCl-Lösung verdünnt, dann 1+1 Proben und Standard (100  $\mu$ L + 100  $\mu$ L Bio-Rad Reagenz) zugefügt. Die Ermittlung der Konzentration erfolgte photometrisch mittels ELISA Photometer: Labsystems Multiskan MS  $\lambda = 590$  nm.

Proben	C (mg/mL)	
<b>F98 Zellen</b>	0,2211	
<b>Hela Zellen</b>	0,33	
<b>Kontroll- gruppe</b>	<b>B1</b>	0,133
	<b>B2</b>	0,0413
	<b>B3</b>	0,2371
	<b>B4</b>	0,2672
	<b>B5</b>	0,2679
	<b>B6</b>	0,336
<b>Verum- gruppe</b>	<b>R1</b>	0,3033
	<b>R2</b>	0,2932
	<b>R3</b>	0,4316
	<b>R4</b>	0,3010
	<b>R5</b>	0,4811
	<b>R6</b>	0,4049

Tab. 20: Proteinkonzentration der Proben

### ***Gel und Elektrophorese***

Nach Waschen zweier Glasplatten zuerst mit Seife und destilliertem Wasser anschliessend mit Ethanol wurden diesen mit Vaseline eingeriebenen Gummidichtungen aufgelegt und mit Klammern befestigt.

Das 15%ige Trenngel (Tabelle 21) wurde angesetzt und zwischen den beiden Glasplatten bis zur Markierung (ca. 1,5-2 cm unterhalb des Glasrandes) eingegossen.

#### *(1) Trenngel 15% 15 mL*

<i>H<sub>2</sub>O</i>	<i>3,4 mL</i>
<i>30% Acrylamid</i>	<i>7,5 mL</i>
<i>1,5 M TRIS pH 8,8</i>	<i>3,8 mL</i>
<i>10% SDS</i>	<i>0,15 mL</i>
<i>10% APS</i>	<i>0,15 mL</i>
<i>TEMED</i>	<i>0,006 mL</i>

Tab. 21: Komposition des 15%-igen 15 mL Trenngels

Es wurde anschliessend von einer ca. 6 mm breite Schicht 0,1% SDS mit einer Pasteurpipette überschichtet.

Nach Polymerisation des Trenngels (ca. 40 Minuten), wurde das Sammelgel (Tabelle 22) angesetzt und über die SDS-Schicht eingegossen.

	<i>Sammelgel 3,75%</i>
<i>H<sub>2</sub>O</i>	<i>3,7 mL</i>
<i>40% Acrylamid</i>	<i>560 µL</i>
<i>Trenngelpuffer(3)</i>	<i>1,5 mL</i>
<i>20%SDS</i>	<i>30 µL</i>
<i>10% APS</i>	<i>30 µL</i>
<i>TEMED</i>	<i>6 µL</i>

Tab. 22: Komposition des 3,75%-igen 6 mL Sammelgels

#### *Trenngelpuffer*

*1,5 M TRIS HCl pH 8,8*

*(181,5 g TRIS + ca. 800 mL H<sub>2</sub>O dann auf 1000mL, entgasen, lagern bei 4°C*

Der Kamm wurde anschliessend eingesetzt.

Die Proben wurden 1+1 mit Probenpuffer (Bromphenolblau) mit Mercaptoethanol in der Aufschlusslösung angesetzt. Die Menge der jeweiligen Proben wurde so ausgewählt, dass sie ca. 10µg Protein in NaCl verdünnt entsprachen.

Als Auftragspuffer wurde folgendes angesetzt: Es wurde zunächst eine Lösung „D“ eingesetzt (0,5 M TRIS-HCl pH 6,8 Rp wie folgt: 60g TRIS, mit H<sub>2</sub>O auf 800 mL, dann mit HCl 12 M auf pH 6,8 und auf 1000 mL mit Wasser, anschliessend Entgasen). Hiermit wurde der Auftragspuffer vorbereitet (2g SDS , 75 ml der Lösung „D“, 25 ml 50%-igen Glycerin/H<sub>2</sub>O, 100 mg Bromphenylblau. Zu 95 ml dieser neuen Lösung wurden 5 ml β-Mercaptoethanol hinzugefügt.)

Die Proberöhrchen mit Schraubdeckel wurden (mit Ausschluss von Hela Zellen und TNF pur) 10 Minuten bei 100°C gekocht und anschliessend 5 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert.

Der Standard wurde beim ersten Gebrauch 1 Minuten bei 40°C erwärmt.

Das Dichtungsgummi sowie der Kamm wurden entfernt. Die Kammer wurde mit Running Puffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycine, 0,1% SDS, pH nicht einstellen) gefüllt. 5 µL von jeder Probe sowie vom Standard wurden mit einer Hamiltonspritze eingesetzt. Damit wurden TNF-α, bFGF und IFN-γ bei F98 Zellen sowie alle Hirnproben der Versuchsreihe II getestet. Die Gelelektrophorese wurde für eine Laufzeit von ca. 75 Minuten bei 120 mA gestartet, bis der Blaumarker an den unteren Rand des Gels gelaufen war.

#### **Blotten**

Nach Ausschalten der Elektrophorese, wurde das Gel aus den Glasplatten mit einem Skalpell herausgenommen, das Sammelgel und die Ränder abgeschnitten, das Gel in gekühlten Transferpuffer (0,606g TRIS 0,025 M, 2,252g Glycin 0,15 M, 20 mL 10%igen Methanol auf 200 mL) gebadet.

Es wurden 2 x 4 Blatt Whatman-Papier in Gelgröße ausgeschnitten und in gekühlten Transferpuffer gebadet. Dazu wurde eine Nitrozellulose-Membran (Gerbermembrane GmbH /Whatman Group) in Gelgröße ausgeschnitten. Anschließend wurden Papier und Membran in Transferpuffer in der Blotkammer ohne Luftblasen wie folgt geschichtet. Von unten nach oben: 4 Blätter Wathman-Papier - Gel - Membran - 4 Blätter Wathman-Papier.

Für 45 Minuten wurde ein Strom von 5 mA/cm<sup>2</sup> angelegt.

Anschließend wurde der Rand ohne Protein abgeschnitten, die restliche Membran in TBST (200mM TRIS 24,228g/l, 1,27 NaCl 74,2188, 10 ml/l 1%igen Tween 20, pH 7,6 mit HCl eingestellt) einmal zum Entfärben eingelegt.

Eine Färbung des Gels mittels Coomassie Blue zeigte eine Proteinmasse.

### ***Antikörperreaktion***

Die Membran wurde zunächst zweimal kurz in frischem PBS gewaschen, dann in dünne Streifen geschnitten. Der primäre Antikörper (TNF 1:500, bFGF und IFN 1:250 angesetzt) wurde über Nacht bei Raumtemperatur in 10 mL 5% Milchpulver in einer Petri-Schale auf einem Schüttler (mini Rocking Platform) inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS jeweils ca. 5 Minuten, wurde der sekundäre Antikörper (Peroxidase konjugierter Anti Goat 1:2500 bei TNF, nicht Peroxidase konjugiert Mouse anti Mouse 1:1250) in 5% Milchpulver 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, wieder dreimal mit PBS jeweils 5 Minuten gewaschen. DAB (5 mg für 10 mL PBS + 3 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) wurde hinzugefügt und im Dunkeln 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mehrfach im destillierten Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

### **3.9 RP-HPLC zum Nachweis Thalidomids in Serum und Hirn**

Zum Thalidomidnachweis in Serum und Hirngewebe wurde jeweils eine RP-HPLC (Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography) mit Serum und Hirn-/Tumorgewebesuspension durchgeführt.

Die Chromatographie dient zur Trennung von Stoffgemischen nach Polarität der einzelnen Stoffe. Im Gegenteil zu der klassischen HPLC ist die stationäre Phase bei der RP-HPLC (reversed phase) weniger polar als die mobile.

Die Untersuchungen wurden mit einem Dioden Array Detektor (DAD SS6, WATERS 2695) vorgenommen. Als Säule wurde Lichrospher 100 (Fa. MERCK, Darmstadt) verwendet (Reversed Phase Rp8; 12,5 cm Länge, Flow: 0,5 ml/Minute).

Die mobile Phase bestand aus 23% Acetonitril (Dipolarität: polar, 3,5 Debyes) 27% Essigsäure (0,1%), 50% H<sub>2</sub>O (Wasserstoffsbindungskapazität und Dipolarität: sehr polar, 1,5 Debyes). Das Injektionsvolumen betrug 8 µl bei einer Laufzeit von 30 Minuten (für die Gewebeuntersuchung 25 Minuten).

Die Proben wurden von Tieren der Versuchsreihen II und III gewonnen. Den Ratten wurde 20 Minuten vor ihrer Tötung eine letzte intraperitoneale Injektion von 200 mg Thalidomid / kg Körpergewicht in PBS/DMSO verabreicht. Danach wurden die Tiere in eine tiefe

Äthernarkose versetzt, dekapitiert und laparotomiert, wobei 2 ml Blut aus der *Aorta ascendens* punktiert wurden (s. Kapitel 3.1.2.3).

Das Serum wurde aus dem Blut durch 10-minütige Zentrifugation bei 5000 rpm gewonnen. Die Gewebhomogenisierung der Tierhirne erfolgte durch dreimaliges Einfrieren und Wiederauftauen von Gefrierschnitten.

Als Referenz diente eine Thalidomid Lösung aus 4 mg Thalidomid /mL in DMSO.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Protokolle der Tierversuche

#### Versuchsreihe I

14 männliche CD Fischer Ratten (RCC), Durchschnittsgewicht 300 g

<b>Tag 1</b>	Implantation von $5 \times 10^4$ F98 in 10 $\mu$ l in die linken Stammganglien
<b>Tag 2-5</b>	alle Tiere unauffällig
<b>Tag 6</b>	Behandlungsbeginn Thalidomid i.p. (200 mg Thalidomid/KgKG/die in 1,4 ml DMSO + 0,6 ml PBS)
<b>Tag 7</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 8</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 9</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid)
<b>Tag 10</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid)
<b>Tag 11</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), S 1 stirbt 5 Min nach Injektion
<b>Tag 12</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid)
<b>Tag 13</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid)
<b>Tag 14</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid)
<b>Tag 15</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid)
<b>Tag 16</b>	Keine Kontrolle, keine Therapie
<b>Tag 17</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid)
<b>Tag 18</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid)
<b>Tag 19</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid)
<b>Tag 20</b>	Tötung aller Tiere*, S 2, S 3, S 4 ***, zuvor i.p. Thalidomid; S 4 zeigt V. a. Darmperforation

Tab. 23: Verumgruppe Tier 1-7 schwarz (S1-S7)

<b>Tag 1</b>	Implantation von $5 \times 10^4$ F98 in 10 $\mu$ l in die linken Stammganglien, R7 stirbt 5 Stunden nach dem Eingriff
<b>Tag 2-5</b>	alle Tiere unauffällig
<b>Tag 6</b>	Behandlungsbeginn 1,4 ml DMSO+0,6 ml PBS i.p., nach Behandlung teilweise aggressiv
<b>Tag 7</b>	i.p. DMSO/PBS; R 1-6 nach Behandlung sehr aggressiv; übrige Tiere unauffällig
<b>Tag 8</b>	i.p. DMSO/PBS; R 6 entwickeln Diarrhoe, Bäuche weich; übrige Tiere unauffällig
<b>Tag 9</b>	i.p. DMSO/PBS; R 1-4 Diarrhoe; R 3 sehr aggressiv, wird separiert; übrige Tiere unauffällig
<b>Tag 10</b>	i.p. DMSO/PBS; R 1-4 Diarrhoe; R 5 sehr aggressiv, wird separiert; übrige Tiere unauffällig
<b>Tag 11</b>	i.p. DMSO/PBS; R 1-4 Diarrhoe; übrige Tiere unauffällig
<b>Tag 12</b>	i.p. DMSO/PBS; R 1-4 Diarrhoe; übrige Tiere unauffällig
<b>Tag 13</b>	i.p. DMSO/PBS; R 1-4 Diarrhoe; übrige Tiere unauffällig
<b>Tag 14</b>	i.p. DMSO/PBS; R 1-4 Diarrhoe; übrige Tiere unauffällig
<b>Tag 15</b>	i.p. DMSO/PBS; R 1-4 Diarrhoe; übrige Tiere unauffällig
<b>Tag 16</b>	Keine Kontrolle, keine Therapie
<b>Tag 17</b>	i.p. DMSO/PBS; R 1-4 Diarrhoe; übrige Tiere unauffällig
<b>Tag 18</b>	i.p. DMSO/PBS; R 1-4 Diarrhoe, alle Tiere ruhiger als Verumgruppe
<b>Tag 19</b>	i.p. DMSO/PBS; R 1-4 Diarrhoe; übrige Tiere unauffällig
<b>Tag 20</b>	Tötung aller Tiere*

Tab. 24: Kontrollgruppe Tier 1-7 rot(R1-R7)

## Versuchsreihe II

12 weibliche CD Fischer Ratten (M&B), Durchschnittsgewicht 170 g

<b>Tag 1</b>	Implantation von $5 \times 10^5$ F98 in 10 $\mu$ l in die linken Stammganglien
<b>Tag 2-6</b>	alle Tiere unauffällig
<b>Tag 7</b>	Behandlungsbeginn Thalidomid i.p. (200mg/kgKG/die in 0,8 ml DMSO + 0,2 ml PBS) alle Tiere unauffällig, nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet, R 3 Nystagmus und Fallneigung nach rechts
<b>Tag 8</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 9</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 10</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 11</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 12</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet, R 2 entwickelt Diarrhoe
<b>Tag 13</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet, R 1 entwickelt Diarrhoe
<b>Tag 14</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 15</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 16</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 17</b>	Keine Kontrolle, keine Therapie
<b>Tag 18</b>	Keine Kontrolle, keine Therapie
<b>Tag 19</b>	R 1, R 2 und R6***, zuvor i.p. Thalidomid; Tötung aller Tiere*

Tab. 25: Verumgruppe Tier 1-6 rot (R1-6)

<b>Tag 1</b>	Implantation von $5 \times 10^5$ F98 in 10 $\mu$ l in die linken Stammganglien
<b>Tag 2-6</b>	alle Tiere unauffällig
<b>Tag 7</b>	Behandlungsbeginn 0,8 ml DMSO + 0,2 ml PBS alle Tiere unauffällig
<b>Tag 8</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS)
<b>Tag 9</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS), B 2 etwas schläfrig nach Injektion
<b>Tag 10</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS)
<b>Tag 11</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS), B 4 entwickelt Diarrhoe
<b>Tag 12</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS)
<b>Tag 13</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS)
<b>Tag 14</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS)
<b>Tag 15</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS)
<b>Tag 16</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS)
<b>Tag 17</b>	Keine Kontrolle, keine Therapie
<b>Tag 18</b>	Keine Kontrolle, keine Therapie
<b>Tag 19</b>	Tötung aller Tiere *

Tab. 26: Kontrollgruppe Tier 1-6 blau (B1-B6)

## Versuchsreihe III

10 männliche CD Fischer Ratten (M&B), Durchschnittsgewicht 245 g

<b>Tag 1</b>	Implantation von $5 \times 10^5$ F98 in 10 $\mu$ l in die linken Stammganglien
<b>Tag 2-7</b>	alle Tiere unauffällig
<b>Tag 8</b>	Behandlungsbeginn Thalidomid i.p. (200mg/kgKG/die in 1 ml DMSO + 0,4ml PBS) alle Tiere unauffällig, nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 9</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 10</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 11</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 12</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 13</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 14</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 15</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 16</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 17</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. Thalidomid), nach Thalidomidgabe sedierende Wirkung beobachtet
<b>Tag 18</b>	alle Tiere (i.p. Thalidomid); R5 verlangsamt, Fallneigung nach rechts; R1-4 unauffällig
<b>Tag 19</b>	Tötung R5***, R1-4 (i.p. Thalidomid) unauffällig
<b>Tag 20</b>	R1-4 (i.p. Thalidomid) unauffällig
<b>Tag 21</b>	R1-4 (i.p. Thalidomid) unauffällig, Tötung R1 und R4*, R2 und R3***

Tab. 27: Verumgruppe Tier 1-5 rot (R1-5)

<b>Tag 1</b>	Implantation von $5 \times 10^5$ F98 in 10 $\mu$ l in die linken Stammganglien
<b>Tag 2-7</b>	alle Tiere unauffällig
<b>Tag 8</b>	Behandlungsbeginn 1 ml DMSO+0,4ml PBS alle Tiere unauffällig
<b>Tag 9</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS)
<b>Tag 10</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS)
<b>Tag 11</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS)
<b>Tag 12</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS)
<b>Tag 13</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS)
<b>Tag 14</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS)
<b>Tag 15</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS)
<b>Tag 16</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS); S3, S4 knotige Verhärtungen der Bauchwand
<b>Tag 17</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS), S3, S4 knotige Verhärtungen der Bauchwand
<b>Tag 18</b>	alle Tiere unauffällig (i.p. DMSO/PBS), S3, S4 knotige Verhärtungen der Bauchwand
<b>Tag 19</b>	S2-5 unauffällig (i.p. DMSO/PBS), S3, S4 knotige Verhärtungen der Bauchwand, S1 verlangsamt und Fallneigung nach rechts, Tötung S1*
<b>Tag 20</b>	S2-5 (i.p. DMSO/PBS); S2, S3, S4 verlangsamt; S3, S4 knotige Verhärtungen der Bauchwand
<b>Tag 21</b>	S2-5 (i.p. DMSO/PBS); S2, S3, S4 verlangsamt; S3, S4 knotige Verhärtungen der Bauchwand, Tötung S2-5*

Tab. 28: Kontrollgruppe Tier 1-5 schwarz (S1-5)

\* Gehirnentnahme und – präparation,

\*\* ohne Gehirnentnahme

\*\*\* offene Blutaspiration aus Aorta ascendens zum Thalidomidnachweis (HPLC), Abnahme erfolgt in heparinisierten Röhrchen, anschließend wird die Probe 8 Min bei 4° C mit 9760 rpm zentrifugiert und bei -20° C eingefroren, anschließende Perfusion (nur Versuch I)

---

Zusammenfassend konnte man bei der Kontrollgruppe bei mehreren Tieren Diarrhoe, bei anderen knotigen Verhärtungen der Bauchwand feststellen. Die Behandlung mit Thalidomid führte in der Verumgruppe zur Sedierung. (s.u. Kapitel 4.4.1)

## 4.2 Histologie

### 4.2.1 Histologie durch HE-Färbung

Im Gehirn wurden die Tumore der jeweiligen Tiere im Marklager und in den Stammganglien lokalisiert. In Einzelfällen war ein Tumorwachstum bis in die Kortexstrukturen und sogar extrazerebral zu beobachten. Es zeigten sich zahlreiche Tumorausläufer, entlang des Punktionskanals wie auch spontan, insbesondere entlang von teilweise pathologisch stark erweiterten Gefäße (s. Abbildungen 8 und 9), zum Teil auch weit entfernt vom Haupttumor. Am Tumorrand infiltrierten viele Tumorzellen das Parenchym (s. Abbildung 10). Ein beim Glioblastom typisches Marklagerödem war nicht zu sehen.

Bei 40-facher Vergrößerung am Mikroskop zeigten die Tumore ein nahezu isophormes Bild, die kleine Tumorzellen wiesen die typische verschobene Kern-Plasma Relation zugunsten der Zellkerne auf.



Abbildung 8: Tumor mit zahlreichen Satelliten im Parenchym und um kaliberstarken Gefäßen (HE-Färbung)

[Tumor II Verumgruppe R1]



Abbildung 9: Perivaskuläres Tumorwachstum (HE-Färbung)  
[Tumor II Verumgruppe R1]

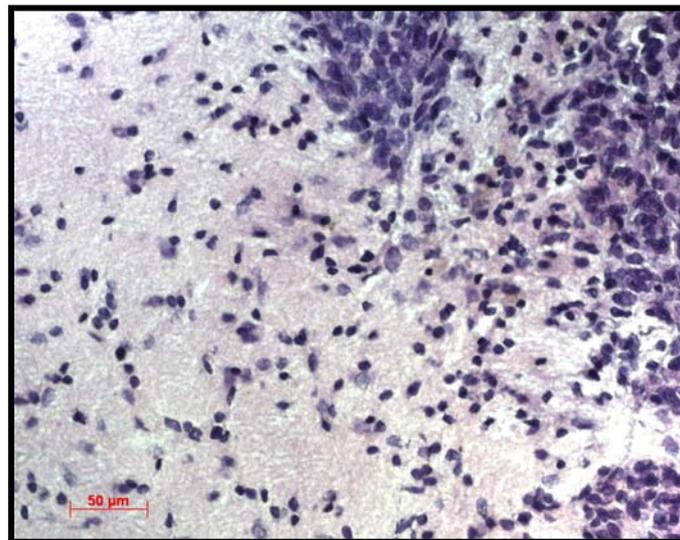


Abbildung 10: Infiltrationszone am Tumorrand (HE-Färbung)  
[Tumor II Verumgruppe R1]

#### 4.2.2 Eisennachweis

Durch die Berliner-Blau Färbung konnten bei manchen Präparate Eisen-Ablagerungen dargestellt werden (s. Abbildung 11).

Diese Färbung wurde zur Differenzierung von unklaren Ablagerungen peritumoral vorgenommen.

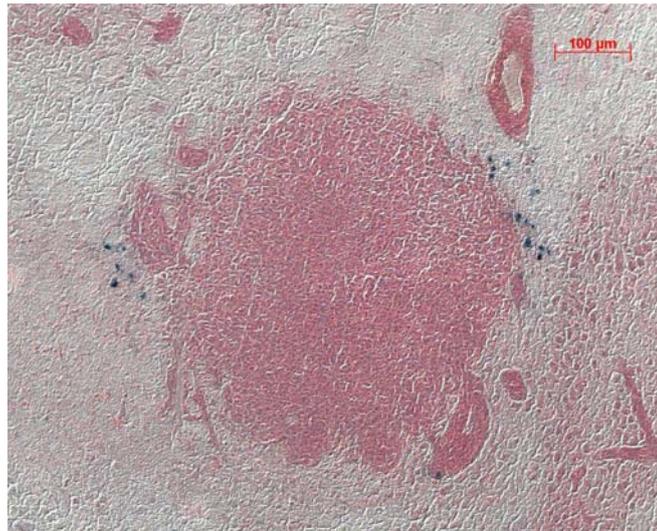


Abbildung 11: Eisen-Nachweis peritumoral (Berliner-Blau Färbung)  
[Tumor II Verumgruppe R1]

#### 4.2.3 Gewebetypisierung (GFAP, S100, Vimentin)

Das von Gliazellen gebildeten intermediäre Proteinfilament **GFAP** des Zytoskeletts wurde im Zytoplasma von Tumorzellen aller getesteten Versuchsreihen (I, II und III) beider Behandlungsgruppen nachgewiesen. (s. Tabelle 29, 30, 31 und Abbildung 12). Die positiven Zellen befanden sich vor allem am Tumorrand und in Satelliten des Primärtumors.

Hiermit wurde der astrogliale Ursprung des Implantationstumors nachgewiesen.

Das unter zwei Formen - löslich und membrangebunden - existierende Protein **S100** (von Gliazellen exprimiert) konnte ebenfalls in Tumoren der Kontroll- sowie der Verumgruppe gefunden werden (s. Tabelle 29, 30, 31, 32 und Abbildung 13).

Das Intermediärfilament **Vimentin** ließ sich sowohl in Tumorzellen als auch in Gefäßen aller Tumore nachweisen. (s. Tabelle 29, 31,32 und Abbildung 14).

	<b>GFAP</b>	<b>S100</b>	<b>Vimentin</b>
<b>F98 Negativkontrolle</b>	-	-	-
<b>F98 er Zellen</b>	?	+	<i>Nicht getestet</i>

Tab. 29: Gewebetypisierung der F98er Zellen

Präparat		GFAP		S100	
<b>Negativkontrolle</b>	<b>8S</b>	Unspez. Ablagerung	-	Unspezifische Ablagerung	
<b>Kontrollgruppe</b>	<b>K</b>			Nahe Tumor	
<b>Negativkontrolle</b>	<b>6R</b>	Keine Ablagerung	-	Keine Ablagerung	
<b>Verumgruppe</b>	<b>K</b>				

<b>Kontrollgruppe</b>	<b>2S</b>	Keine Ablag.		Tumor fraglich positiv	?
	<b>3S</b>	Kein Tumor (quer)			
	<b>4S</b>	Ablag. Nähe Tumor	+	Tumor negativ (unspezifische Ablagerung im Tumor)	
	<b>5S</b>	Ablag. Nähe Tumor	+	Tumor negativ	
	<b>6S</b>	Ablag. Nähe Tumor	+	Spezifische und unspezifische Ablagerung im Tumor ?	?
	<b>7S</b>	Ablag. Nähe Tumor	+	Tumor negativ	
	<b>8S</b>	Ablag. Nähe Tumor	+	Tumor negativ (unspezifische Ablagerung im Tumor)	
	<b>9S</b>	Ablag. Nähe Tumor	+	Tumor positiv?	?
	<b>10S</b>	Ablag. Nähe Tumor	+	Tumor positiv?	?
	<b>11S</b>	Ablag. Nähe Tumor	+	Tumor negativ	
	<b>12S</b>	Ablag. Nähe Tumor	+	Tumor negativ (Tumor = Loch)	
	<b>13S</b>	Ablag. Nähe Tumor	+	Unspezifische Ablagerung im Tumor?	?
	<b>14S</b>	Ablag. Nähe Tumor	+	Unspezifische Ablagerung im Tumor?	?
	<b>Verumgruppe</b>	<b>1R</b>	Kein Tumor		Kein Tumor
<b>2R</b>		Ablag. Nähe Tumor	+	Positiv, v.a. am Rand des Tumors	+
<b>3R</b>		Ablag. Nähe Tumor	+	Tumor negativ ?	?
<b>4R</b>		Ablag. Nähe Tumor	+	Unspezifische Ablagerung Nahe Tumor	
<b>5R</b>		Ablag. Nähe Tumor	+	Spezifische Ablagerung im Tumor?	?
<b>6R</b>		Ablag. Nähe Tumor	+	Tumor fraglich positiv	?
<b>7R</b>		Wenig Ablag. Nähe Tumor	+	Spezifische und unspezifische Ablagerung im Tumor ?	?
<b>8R</b>		Ablag. Nähe Tumor	+	Tumor negativ	
<b>9R</b>		Ablag. Nähe Tumor	+	Tumor negativ	
<b>10R</b>		Ablag. Nähe Tumor	+	Tumor positiv?	?
<b>12R</b>		Ablag. Nähe Tumor	+	Tumor negativ	?
<b>13R</b>		Ablag. Nähe Tumor	+	Tumor negativ	?
<b>14R</b>		Ablag. Nähe Tumor	+	Nicht zu bewerten (kein Tumor mehr)	

Tab. 30: Gewebetypisierung im Versuch I

Präparat		Bemerkung	GFAP				S100		Vimentin			
			Im Tumor		Mittellinie	Restl. Gewebe	Bemerkung		Im Tumor		Mittellinie	Restl. Gewebe
			Mitte	Rand					Mitte	Rand		
Negativkontrolle Kontrollgruppe	K B6 (3)1	Negativ	-	-	-	-		-	-	-	-	-
	K R5(4)6	Hämosiderin Pigmente am Rand des Tumors aber Gewebe negativ	-	-	-	-		-	-	-	-	-
Kontrollgruppe	B1	Schlechtes Gewebe; positiv v.a. Rand des Tumors und etwas im Gewebe	-	+	-	+		-	-	-	-	-
	B2	Einige positive Zellen im Tumor?, Zellen positiv in Mitte (Gefäße positiv?)	?	-	+	+		-	-	+	+	?
	B3	Positiv am Rand des Tumors und Gewebe	-	-	++	++	im Tumor	?	-	+	+	+
	B4	Tumor negativ; Gewebe und Gefäße positiv v.a. 1. Schnitt	-	-	++	++		-	-	+	+	+
	B5	Gewebe schwach positiv; Tumor negativ außer Rand	-	+	+	+		-	-	+	+	+
	B6	Tumor negativ; Färbung schwach?	-	-	+	+		-	-	+	+	+
Verumgruppe	R1	Positiv im Tumor Periph und Gewebe	-	-	+	+		-	-	+	+	+
	R2	Schlechtes Gewebe; nur einzige Zellen positiv; Tumor negativ	-	-	+	+		-	-	+	+	+
	R3	Positiv am Rand des Tumors und Gewebe (geschädigt beim Eindecken > wiederholen)	-	-	+	+		-	-	+	+	+
	R4	Negativ; schlechtes Gewebe	-	-	-	-		-	-	+	+	+
	R5	Falsch positive Zellen im Tumor, richtig positiv im Gewebe	-	-	+	+	im Tumor	+	-	+	+	+
	R6	Gewebe schlecht; nicht zu beurteilen						-				

Tab. 31: Gewebetypisierung im Versuch II

Präparat		S100		Vimentin				
		Bemerkung		Bemerkung	Im Tumor		Mittel-linie	Restl. Gewebe
					Mitte	Rand		
Negativ-kontrolle Kontroll-gruppe	K S2		-		-	-	-	-
	K R5		-		-	-	-	-
Kontroll-gruppe	S1		-	Nicht alle großen Gefäße der Mittellinie gefärbt	++	++	++	++
	S2		-		-	++	++	++
	S3		-	Dazu positive Gefäße in Tumorversprengungen	-	+	+	+
	S4		-	Dazu positive Gefäße in Tumorversprengungen	-	+	+	+
Verum-gruppe	R2		-	Dazu positive Gefäße in Tumorversprengungen	-	+	+	+
	R3		-	Schlechtes Gewebe	-	?	+	+
	R4		-		-	-	+	+
	R5		-	Sehr schwache Färbung	-	-	+	+

Tab. 32: Gewebetypisierung im Versuch III

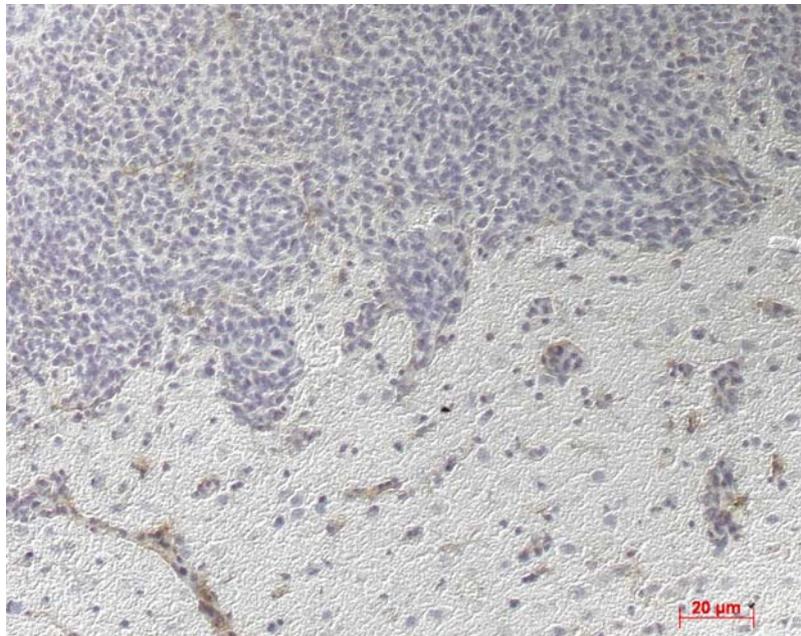


Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis vom Zytoskelettfilament GFAP (braun) am Tumorrand und bei Tumorausläufern (Hämalaun Gegenfärbung, 20-fach Vergrößerung) [ Tumor II R1 aus der Verumgruppe]

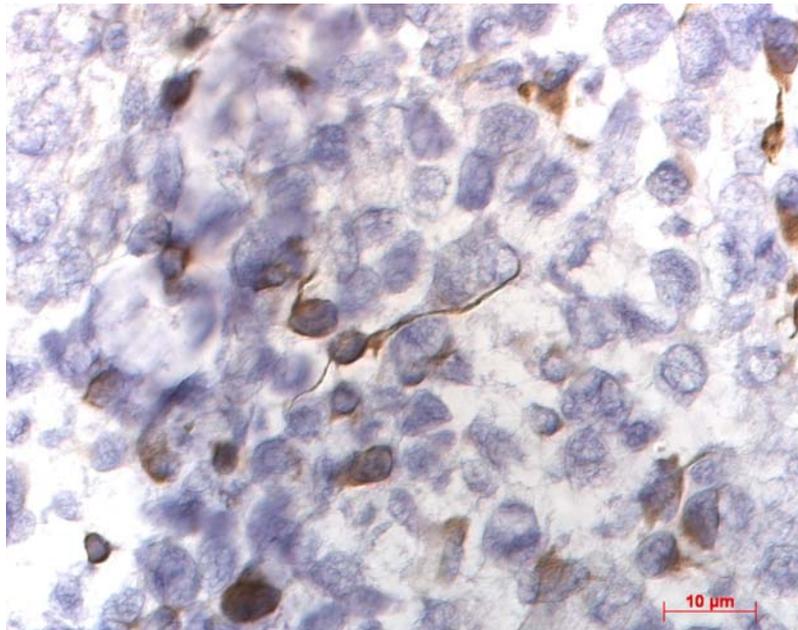


Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis von dem Protein S100 (braun) im Tumor  
(Hämalaun Gegenfärbung, 100-fach Vergrößerung)  
[Tumor I R2 aus der Verumgruppe]

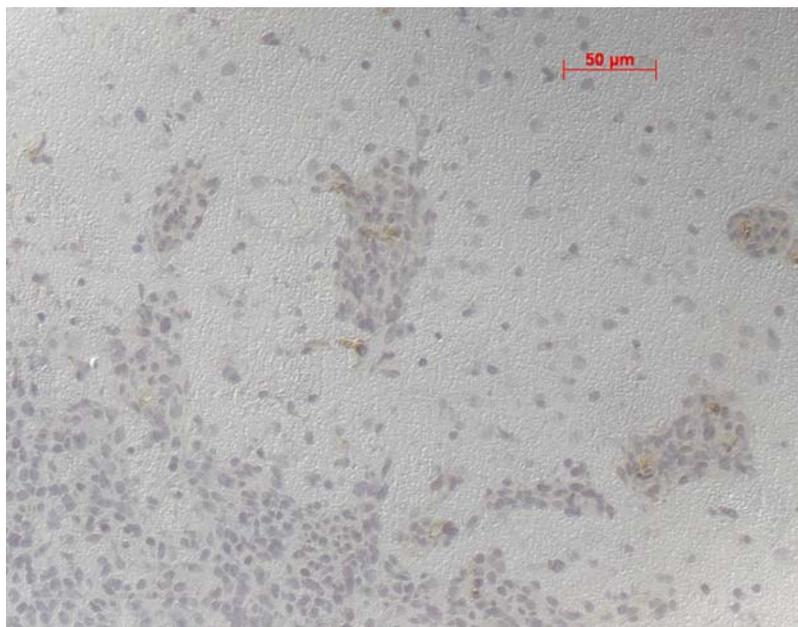


Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis vom Intermediärfilament Vimentin (braun)  
am Tumorrand und bei Tumorausläufern  
(Hämalaun Gegenfärbung, 20-fach Vergrößerung)  
[ Tumor II B5 aus der Kontrollgruppe]

### 4.3 Apoptose

#### 4.3.1 Immunhistochemischer Nachweis der Apoptose durch Apo-1

Die Immunhistochemie bei dem wesentlichen Mediator der Apoptose **Fas (APO-1 / CD95)** zeigte sich bei allen Versuche sowohl in der Kontroll- als in der Verumgruppe negativ.

#### 4.3.2 ELISA zum Apoptose-Nachweis durch Apo 2 L/TRAIL

Trotz positiver Positivkontrolle blieben alle Proben negativ. Es konnte bei den F98 er Zellen keine Apoptose nachgewiesen werden. (einzelne Ergebnisse nicht dargestellt)

#### 4.3.3 In situ Hybridisierung zum Apoptose-Nachweis

Da neben apoptischen Zellen methodenbedingt nekrotische Zellen und möglicherweise reaktive Mikroglialzellen durch Anfärbung miterfasst wurden, wurde auf eine Quantifizierung der apoptischer Zellen verzichtet.

##### 4.3.3.1 Neuro TACS Kit

In fast allen Präparaten der Kontroll- sowie Verumgruppe der beiden untersuchten Serien (II und III) wurden mittels *Neuro-TACS© Kit* apoptische Zellen nachgewiesen (s. Abbildung 15). Diese waren nicht nur vereinzelt im Tumorzentrum, reichlicher am Tumorrand, in den Infiltrationszonen und satellitenähnlichen Tumorausläufer zu finden, sondern auch im restlichen Gewebe zum Beispiel in der kontralateralen Hemisphäre.

Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Verumgruppe bezüglich der Apoptose (s. Tabelle 33).

Schnitt			Tumor	Tumor Rand	Infiltrationen	Tumor-periph. Gewebe	Sonstiges Gewebe		
Kontrolle	Ratte	K1 (+)	+	+	+	+	+		
		K2	-	-	-	-	-		
		K4	-	-	-	-	-		
Test	Ratte	Kontrollgruppe	B1	+++	++	++	+	+	
			B2	+++	++	++	+	+	
			B3	+++	++	++	+	+	
			B4	+++	++	++	+	+	
			B5	+++	++	++	+	+	
			B6	+++	++	++	+	+	
			Verumgruppe	R1	+++	++	++	+	+
				R2	++	+	+	+	+
				R3	+++	++	++	+	+
				R4	++	+	+	+	+
				R5	+	+	+	+	+
				R6	+	+	+	+	+

Tab. 33: Apoptosenachweis mit *Neuro TACS Kit* © im Versuch II

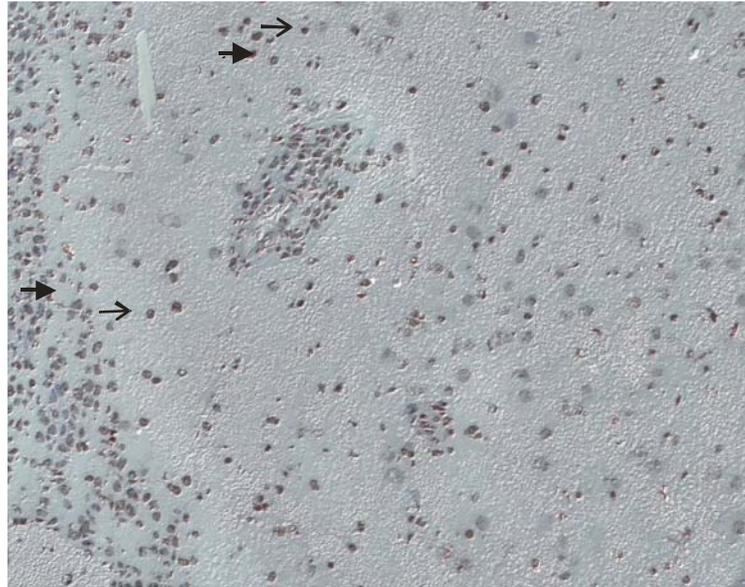


Abbildung 15: Apoptische Zellen (►) Nachweis mittels *Neuro TACS Kit* © am Tumorrand sowie im umliegenden Gewebe. Unspezifische Färbung nicht apoptischer Zellen (→)  
[Tumor II B5 aus der Kontrollgruppe]

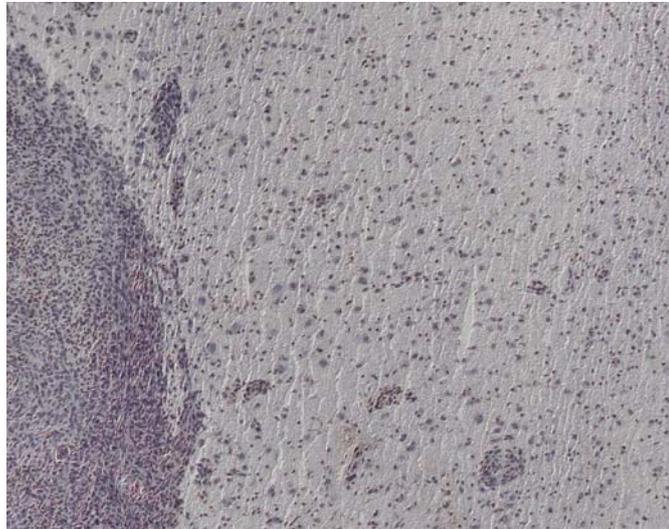
#### 4.3.3.2 *In situ* cell death detection Kit POD

Mit dieser zweiten Methode zum Apoptose Nachweis mittels *in situ cell death detection* © *Kit POD* konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden wie mit dem *Neuro-TACS* © *Kit*. Die Markierung apoptischer Zellen zeigte sich im Tumor (v.a. am Tumorrand) sowie im restlichen Hirngewebe bei nahezu allen Präparaten (s. Tabelle 34, 35 und Abbildung 16).

		Tumor	Tumor Rand	Infiltrationen	Tumor-periph. Gewebe	Sonstiges Gewebe	Bemerkung
Kontrolle	+R3*	+?	+?	+?	+?	+?	Sehr schwach positiv?
	-R3	-	-	-	-	-	
	-R3	-	-	-	-	-	
Kontrollgruppe	B1	-	-	+	+	-	Schlechtes Gewebe
	B2	+	+	+	+	+	
	B3	-	+	+	+	-	
	B4	-	+	++	++	+++	
	B5	-	+	+	+	-	
	B6	-	+	+	+	-	
Verumgruppe	R1	-	-	-	-	-	
	R2	-	+	+	+	-	
	R3	++	++	++	++	-	
	R4	-	-	++	++	+	
	R5	-	-	(+)	+	-	
	R6	+	+	+	+	-	

Tab. 34: Apoptosenachweis mit *in situ cell death detection* © *Kit* bei Versuch II

		Tumor	Tumor Rand	Infiltrationen	Tumor-periph. Gewebe	Sonstiges Gewebe
Kontrolle	+R4*	+	+	+	+	+
	-R4	-	-	-	-	-
	-R4	-	-	-	-	-
Kontrollgruppe	S1	+	(+)	++	-	-
	S2	-	-	++	-	-
	S3	-	+	+	+	-
	S4	-	-	-	-	-
Verumgruppe	R2	-	-	+	(+)	-
	R3	-	-	-	-	-
	R4	-	+	+	+	-
	R5	-	+	+	+	+

Tab. 35: Apoptosenachweis mit *in situ cell death detection* © Kit bei Versuch IIIAbbildung 16: Apoptische Zellen Nachweis mittels *in situ cell death detection* Kit © POD am Tumorrand sowie im umliegenden Gewebe.  
[Tumor II B5 aus der Kontrollgruppe]

## 4.4 Thalidomideffekte

### 4.4.1 Sedative Wirkung

#### 4.4.1.1 Beobachtung der Tiere

Bei den mit 200 mg Thalidomid/kgKG/die behandelten Tieren aller Versuchsreihen zeigte sich ein eindeutiger Sedierungseffekt, der kurz nach der intraperitonealen Injektion auftrat und 30-60 Minuten andauerte. Über den gesamten Versuchszeitraum zeigten sich die mit

Thalidomid behandelten Tiere ruhiger und weniger aggressiv als die Tiere der Kontrollgruppe.

Diese Beobachtung widerspricht Studien, bei denen die sedative Wirkung bei Ratten im Gegensatz zum Menschen nicht zu beobachten war (Eriksson et al. 1998). Dagegen bestätigt es eine andere Studie, bei der erst bei hohen Dosen von Thalidomid Ratten ebenfalls sediert wurden (Fabro et al. 1965).

#### 4.4.1.2 HPLC zum Nachweis Thalidomids in Serum und Hirn

##### *Thalidomidnachweis im Serum*

Die gemessenen Retentionszeiten im Serum ergaben einen Referenzpeak für Thalidomid bei 12,285 Minuten. Für die Proben lag der Thalidomidpeak zwischen 12,172 und 12,479 Minuten (s. Abbildungen 17 und 18 als Beispiele und Tabelle 36). Weitere Peaks wurden durch Serumbestandteile verursacht.

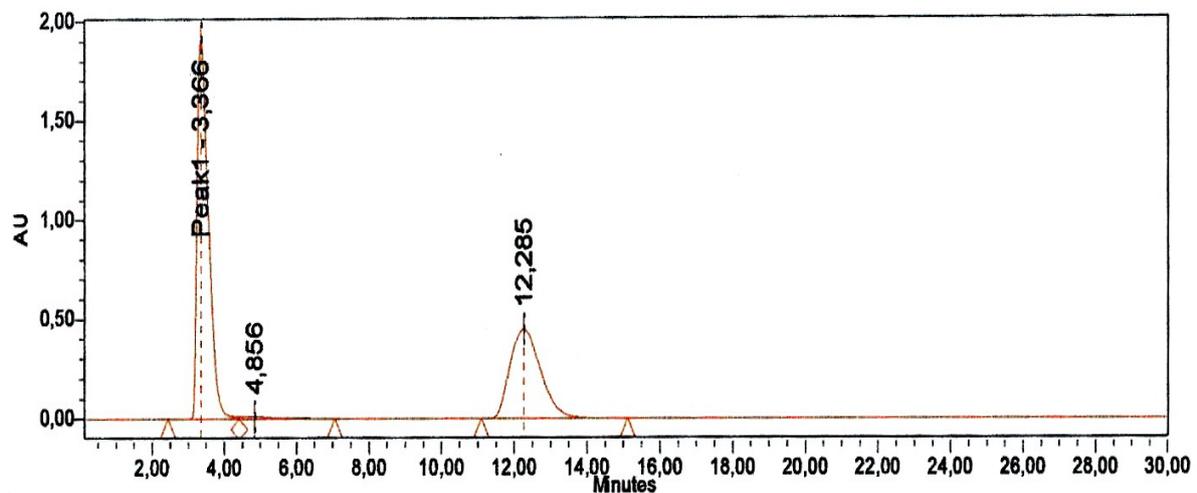


Abbildung 17: HPLC Referenz Thalidomid Serum

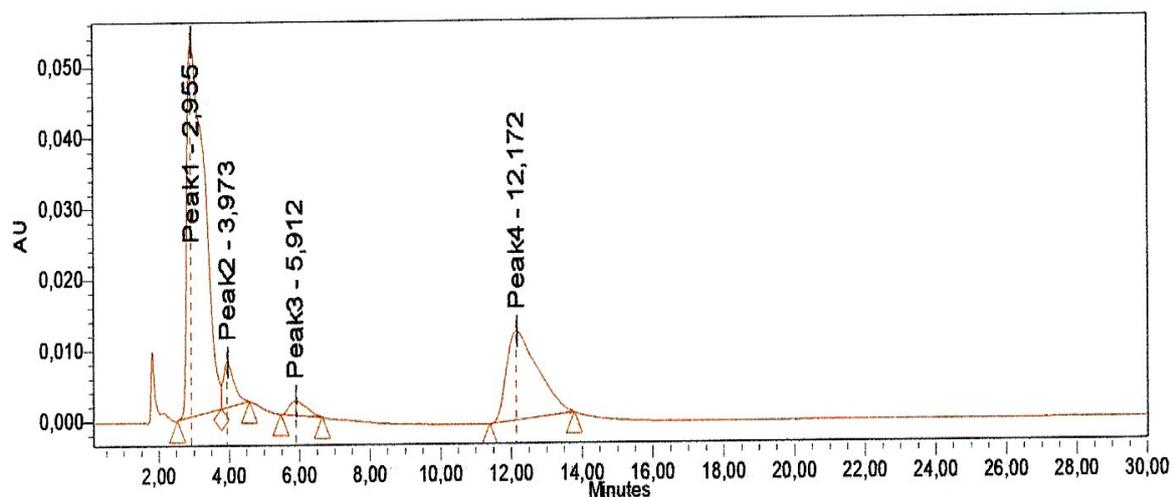


Abbildung 18: HPLC Thalidomid Serum Tier IIR5

Probe	Peak	Area	Retentionszeit (RT)	Bemerkung
Referenz	1	41457555	3,366	Lösungsmittel DMSO
	2	755973	4,856	
	3	26327083	12,285	<b>Thalidomid</b>
Serumprobe 1 II R1	1a	1899084	3,051	Lösungsmittel DMSO
	1b	1309366	1,765	Serumbestandteile?
	2b	1973574	2,874	Lösungsmittel DMSO
	3b	76805	4,277	Lösungsmittel DMSO
	4b	100315	5,878	Serumbestandteile?
	5b	20190	9,525	Serumbestandteile?
	6b	13925	12,266	<b>Thalidomid</b>
Serumprobe 2 II R2	1	1572783	3,327	Lösungsmittel DMSO
	2	43816	1,833	Serumbestandteile?
	3	2033020	2,934	Lösungsmittel DMSO
	4	242005	4,367	Lösungsmittel DMSO
	5	6699	9,583	Serumbestandteile?
	6	10011	12,254	<b>Thalidomid</b>
Serumprobe 3 III R2	1	2556178	3,053	Lösungsmittel DMSO
	2	272941	5,994	Serumbestandteile?
	3	766671	12,479	<b>Thalidomid</b>
Serumprobe 4 III R3	1	2089285	2,994	Lösungsmittel DMSO
	2	127391	4,332	Serumbestandteile?
	3	127238	5,960	Serumbestandteile?
	4	767556	12,355	<b>Thalidomid</b>
Serumprobe 5 III R5	1	1822331	2,995	Lösungsmittel DMSO
	2	136759	3,973	Serumbestandteile?
	3	69912	5,912	Serumbestandteile?
	4	770587	12,172	<b>Thalidomid</b>

Tab. 36: Ergebnisse der HPLC zur Thalidomidbestimmung in Serumproben der Verumgruppe

Thalidomid war damit in allen Serumproben der Verumgruppe nachzuweisen.

Bei den Tieren der II. Serie kann man die sehr kleine Menge an Thalidomid damit erklären, dass die Tiere 60 Minuten nach der letzten Behandlung mit Thalidomid seziiert wurden, und das Blut dann erst entnommen wurde, während die Zeit zwischen Behandlung und Narkose

ca. 8 Minuten und zwischen Behandlung und Blutentnahme ca. 25 Minuten bei den Tieren der III. Serie betragen haben. Das Thalidomid hatte sich im Versuch II vor der Blutabnahme bereits mehr im Körper verteilt.

### ***Thalidomidnachweis im Gehirn***

Für die Untersuchung des homogenisierten Kleinhirngewebes wurde zuvor ein Referenzwert für Thalidomid von 13,486 Minuten ermittelt. Die untersuchten Proben zeigten sehr kleine *Peaks* nach 13,143 bis 13,930 Minuten (s. Abbildungen 19 und 20 und Tabelle 37).

Damit war Thalidomid nur in einem Gehirn sicher nachweisbar (II R1), in zwei weiteren (II R 6 und III R4) waren nur Spuren zu finden. In den restlichen war kein Thalidomid nachweisbar.

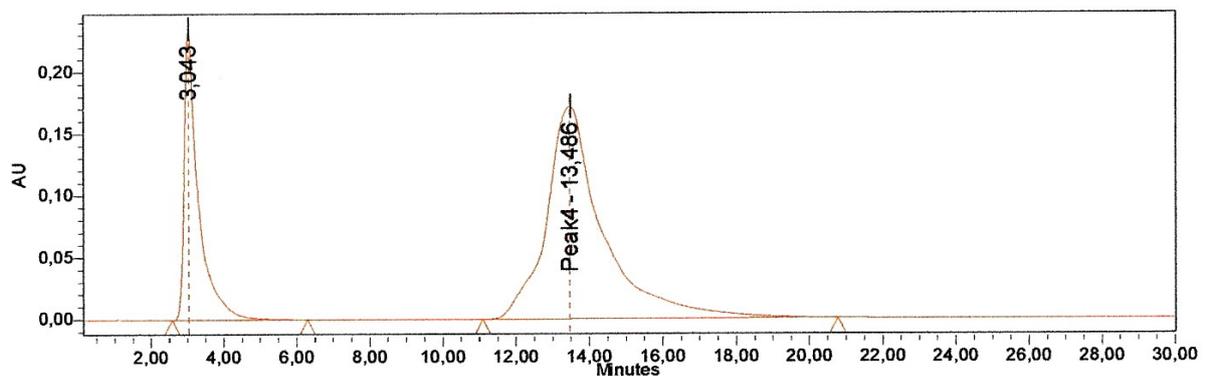


Abbildung 19: HPLC Referenz Thalidomid Gehirn

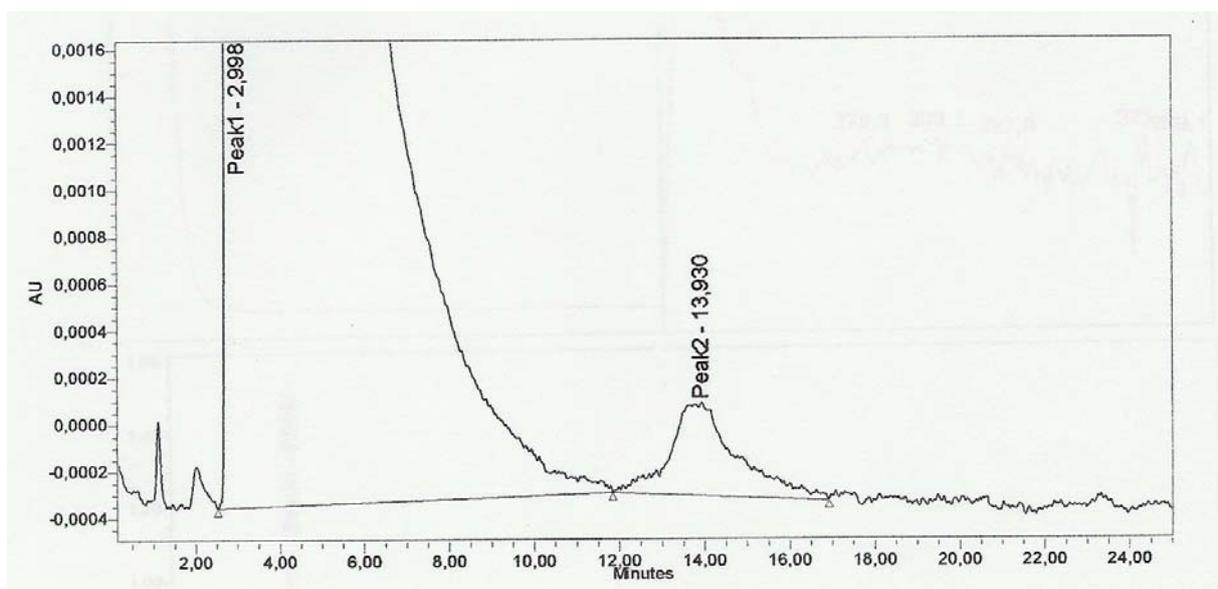


Abbildung 20: HPLC Referenz Thalidomid Gehirn II R1

Hirnprobe	Peak	Area	Retentionszeit (RT)	Bemerkung
Referenz	1	6311412	3,043	Lösungsmittel DMSO
	2	18268956	13,486	<b>Thalidomid</b>
II B1	1	4401469	2,995	Lösungsmittel DMSO
II B2	1	49227278	2,997	Lösungsmittel DMSO
II R1	1	48097799	2,998	Lösungsmittel DMSO
	2	42468	13,930	<b>Thalidomid</b>
II R2	1	50660057	2,996	Lösungsmittel DMSO
II R3	1	49111786	2,994	Lösungsmittel DMSO
II R4	1	49381974	2,996	Lösungsmittel DMSO
II R5	1	50085786	2,992	Lösungsmittel DMSO
II R6	1	?	?	Lösungsmittel DMSO
	2	2464	13,619	<b>Spuren von Thalidomid</b>
III R2	1	50091532	2,998	Lösungsmittel DMSO
III R3	1	49992034	2,978	Lösungsmittel DMSO
III R4	1	50778567	2,982	Lösungsmittel DMSO
	2	685	13,143	<b>Spuren von Thalidomid</b>
III R5	1	50348270	2,983	Lösungsmittel DMSO

Tab. 37: Ergebnisse der HPLC zur Thalidomidbestimmung in Hirngewebeproben der Verumgruppe

#### 4.4.2 Antiproliferativer Effekt

##### 4.4.2.1 Proliferationstest der 98 Zellen

Im Proliferationstest der F98 Zellen konnte unter Hinzugabe unterschiedlicher Thalidomidkonzentrationen (100, 500, 1000, 5000 und 10000 Zellen pro Plattenvertiefung) sowie ohne Hinzugabe von Thalidomid eine nahezu parallel verlaufende, exponentielle Wachstumskurve für alle Ansätze beobachtet werden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Ein Thalidomideffekt auf die Proliferation in Kultur befindlicher F98 Zellen war nicht feststellbar. Abbildung 21 stellt beispielweise die Messung bei zwei Ansätzen dar.

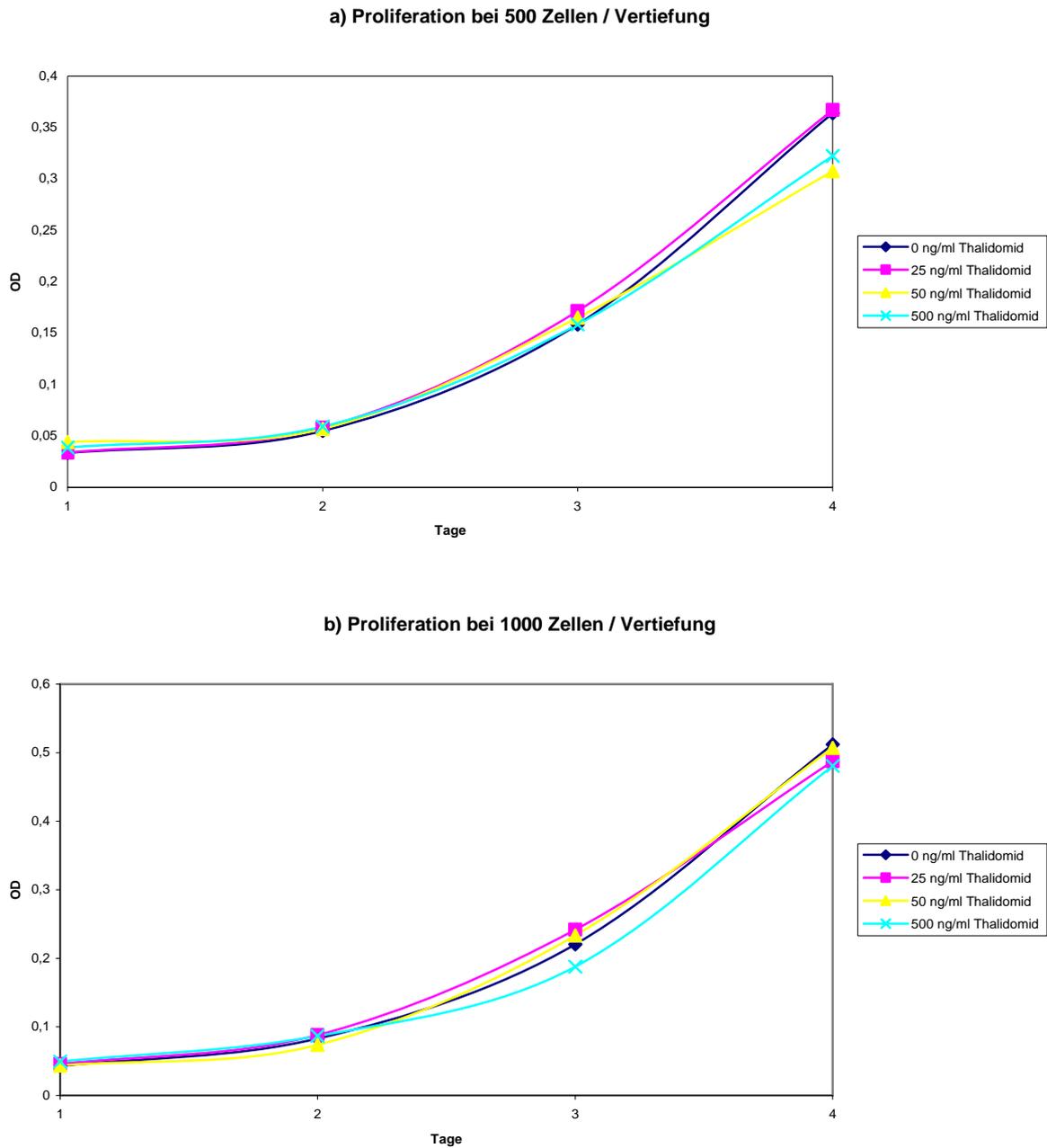


Abbildung 21: Optische Dichte bei  $\lambda=750$  nm zur Proliferationsbestimmung der F98 Zellen über 4 Tage ohne Thalidomidzusatz und nach Hinzugabe unterschiedlicher Thalidomidkonzentrationen (25, 50 und 500 ng/ml) für einen Ansatz mit a) 500 und b) 1000 Zellen pro Vertiefung

#### 4.4.2.2 Immunhistochemischer Nachweis von Proliferationsmarker

##### *Mib 5*

Bei der Immunhistochemie mit dem **Mib-5** Antikörper gegen einen Klon des proliferationsabhängigen Antigen **Ki67** zeigten sich positive Hirntumorzellen in unterschiedlicher Dichte im Tumor und peritumoral bei fehlender Anfärbung in der gesunden kontralateralen Hirnhemisphäre.

Während die mit Thalidomid behandelten Verumtumoren in Versuch II eine höhere Proliferationsrate als die Kontrollgruppe aufwiesen, zeigte sich in Versuch III das umgekehrte Verhältnis. Der Proliferationsindex bei Versuch II betrug in der Kontrollgruppe bei den Tieren B2 und B5 8,68 bzw. 5,9 % und in der Verumgruppe bei R1 und R5 15 bzw. 14,4%. Im Versuch III betrug der Proliferationsindex in der Kontrollgruppe bei den Tiere S1, S3 und S4 jeweils 15,08 %, 3,19 und 17,80%, in der Verumgruppe bei R2, R3 und R5 jeweils 5,37 %, 7,10 und 3,3 %.

Die Lokalisation der positiven proliferativen Zellen war unterschiedlich, meisten in der Mitte des Tumors sowie am Tumorrand, zum Teil eher in der Mitte, zum Teil eher am Tumorrand. (s. Tabellen 38, 39 und Abbildungen 22, 23 und 24)

Präparat		Gesichtsfeld	Positive Zellen	Negative Zellen	Summe	Positive Zellen (%)	Lokalisation
Kontrollgruppe Versuch II	B2	1	70	410	480	14,58	Sehr positiv in der Tumorperipherie
		2	60	450	510	11,76	
		3	30	380	410	7,32	
		4	20	420	440	4,54	
		5	30	550	580	5,17	
	<b>Summe</b>	210	2210	2420	<b>8,68</b>		
	B5	1	32	560	592	5,4	
		2	39	452	491	7,9	
		3	22	664	686	3,2	
		4	31	368	399	7,7	
5		50	501	551	9,0		
<b>Summe</b>	252	4036	4288	<b>5,9</b>			
Verumgruppe Versuch II	R1	1	62	601	663	10	Positiv im gesamten Tumor
		2	87	530	617	14	
		3	99	449	548	18	
		4	103	467	570	18	
		5	95	466	561	17	
	<b>Summe</b>	446	2513	2959	<b>15</b>		
	R5	1	80	480	560	14,29	
		2	110	390	500	22	
		3	50	410	460	10,87	
		4	40	460	500	8	
5		50	280	330	15,15		
<b>Summe</b>	330	2020	2350	<b>14,04</b>			

Tab. 38: Proliferationsrate bei Versuch II anhand Mib-5

Präparat		Gesichtsfeld	Positive Zellen	Negative Zellen	Summe	Positive Zellen (%)	Lokalisation
Kontrollgruppe Versuch III	S1	1	391	1634	2025	19,31	Positiv in Tumormitte sowie Tumorrand
		2	436	1461	1897	22,98	
		3	185	1434	1619	11,43	
		4	289	1329	1618	17,86	
		5	82	1930	2012	7,08	
		Summe	1383	7788	9171	15,08	
	S3	1	223	1670	1893	11,78	Positiv in Tumormitte sowie Tumorrand
		2	101	1420	1521	6,64	
		3	96	1510	1606	5,98	
		4	87	1380	1467	5,93	
		5	22	1610	1632	0,84	
		Summe	529	7590	8119	3,19	
	S4	1	349	1090	1439	24,26	Positiv in Tumormitte sowie Tumorrand
		2	157	1480	1637	9,59	
		3	234	1880	2114	11,07	
		4	372	1480	1852	20,09	
		5	140	1280	1420	9,86	
		Summe	1252	7210	8462	17,80	
Verumgruppe Versuch III	R2	1	192	1520	1712	11,21	Positiv in Tumormitte sowie Tumorrand
		2	47	1780	1827	2,64	
		3	51	1700	1751	2,91	
		4	153	1870	2023	7,56	
		5	46	1740	1786	0,26	
		Summe	489	8610	9099	5,37	
	R3	1	197	1680	1877	10,49	Positiv vor allem in der Tumormitte, weniger am Tumorrand
		2	37	1660	1697	2,18	
		3	107	1570	1677	6,38	
		4	148	1430	1578	9,38	
		5	97	1330	1427	6,80	
		Summe	586	7670	8256	7,10	
	R5	1	60	1760	1820	3,30	
		2	48	1470	1518	0,03	
		3	?	?	?	?	
		4	?	?	?	?	
		5	?	?	?	?	
		Summe	?	?	?	3,3	

Tab. 39: Proliferationsrate bei Versuch III anhand Mib-5

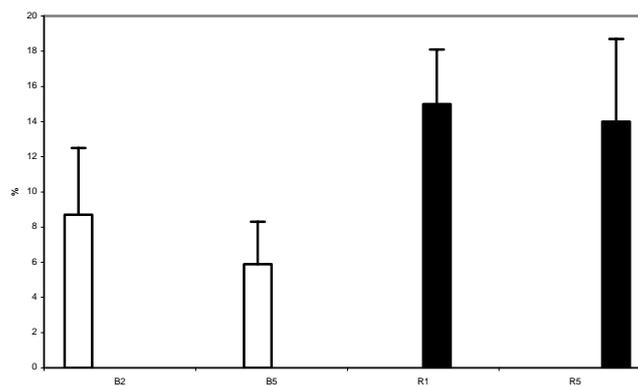


Abbildung 22: Proliferationsindex nach der relativen Anzahl Mib-5 - positiver Tumorzellen in Versuch II. B2 und B5 = Kontrolltumoren, R1 und R5 = Verumtumoren [ Balkendiagramme mit Standardabweichung].

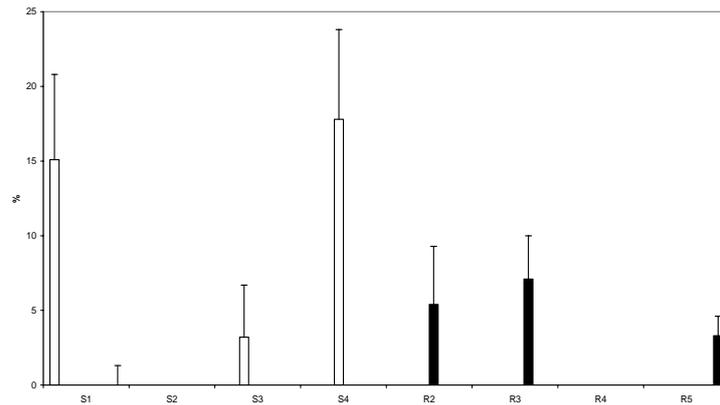


Abbildung 23: Proliferationsindex nach der relativen Anzahl Mib-5 - positiver Tumorzellen in Versuch III. S1 bis 4 = Kontrolltumoren, R2 bis R5 = Verumtumoren [ Balkendiagramme mit Standardabweichung].

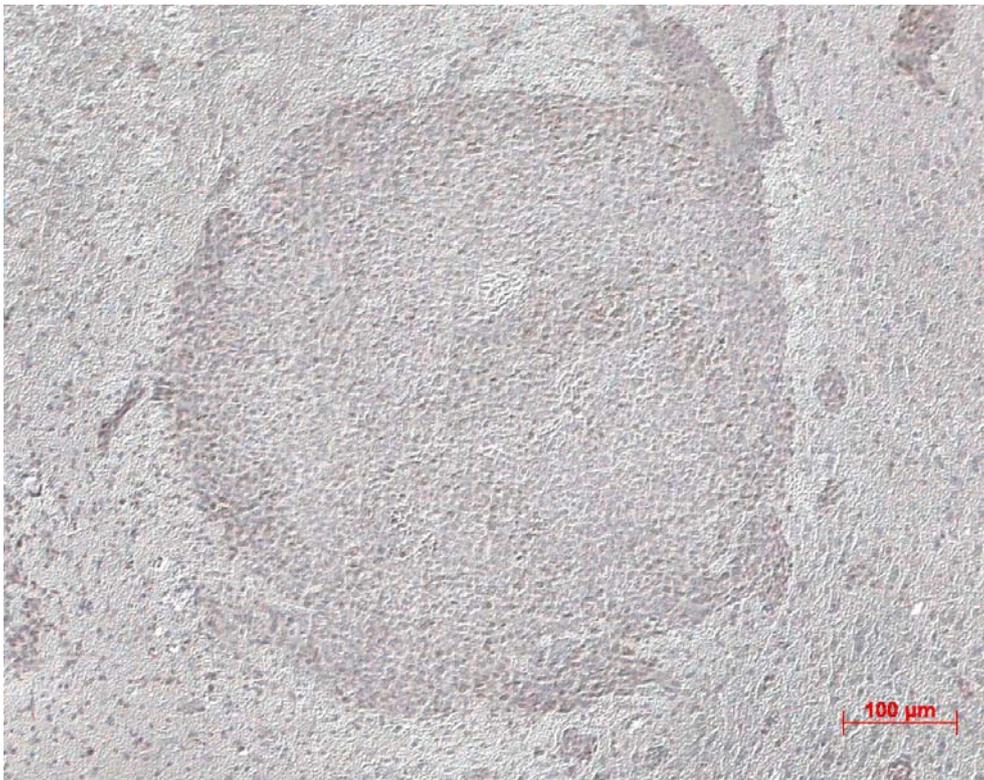


Abbildung 24: Immunhistochemischer Nachweis von Mib-5 (braun) in Tumor und Tumorausläufern (Hemalaun Gegenfärbung, 10-fache Vergrößerung) [ Tumor II R1 aus der Verumgruppe]

Der ebenfalls getestete Mib-1 Antikörper, ein anderer Klon von Ki67, der bei Menschen positiv ist, wurde immunhistochemisch bei den untersuchten Ratten nicht nachgewiesen.

**PCNA**

Die Immunhistochemie zum Nachweis des Proliferationsmarkers *Proliferating cell nuclear antigen* PCNA war sowohl in der Kontroll- als auch in der Verumgruppe in beiden Versuche II und III negativ.

**4.4.2.3 Onkometrie**

Nach Scannen jedes zehnten HE-gefärbten 8  $\mu\text{m}$  dicken Tumorschnittes wurden die Tumorgrenzen markiert und die eingekreiste Tumorfläche mit dem Bildverarbeitungsprogramm OSIRIS© erfasst und berechnet.

Die Tumorfläche verteilte sich im Tumor des jeweiligen Rattenhirnes nach einer Gauss'schen Kurve. Abbildung 25 zeigt beispielhaft die Verteilung der gemessenen Flächen des Tumors R3.

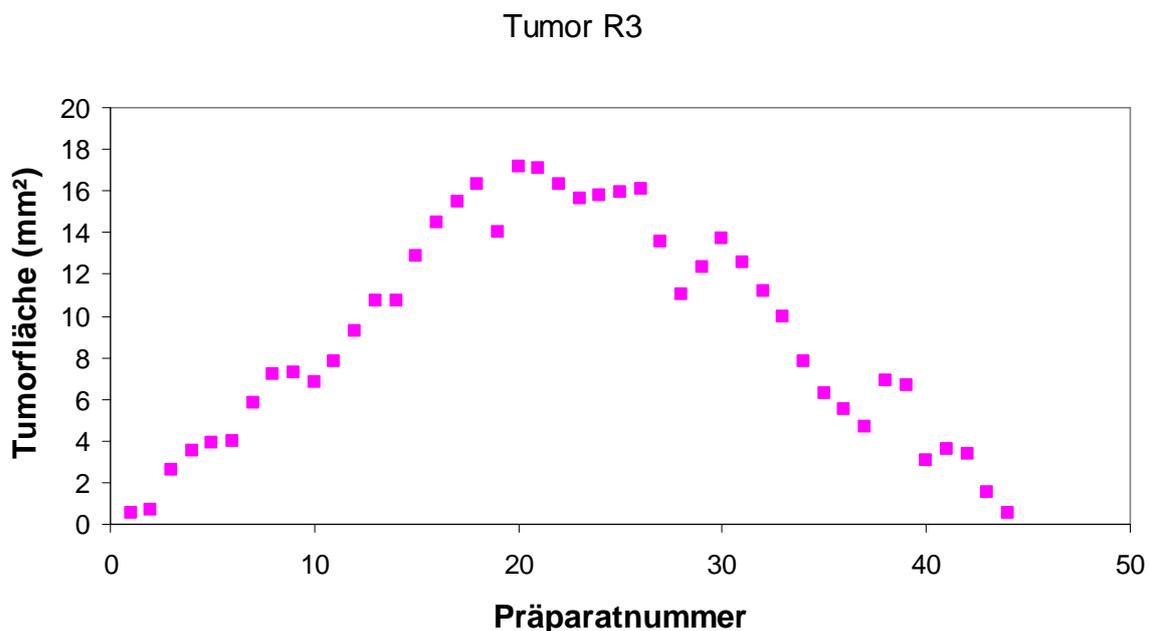


Abbildung 25: Tumorflächen der aufeinander folgenden Hirnschnitten  
[Tumor R3 aus der Verumgruppe Versuch II]

Die jeweiligen Tumolvolumina der Kontroll- und Verumgruppe im Versuch II wurden nach der Tapezeformel aus der Gesamtfläche - als Summe der einzelnen ermittelten Flächen - und der Anzahl der Schnitte berechnet.

Tumor	Gesamtfläche [mm <sup>2</sup> ]	(Anzahl der Schnitte)-1	Volumen [cm <sup>3</sup> ]
B1	125,515	40	0,402
B2	405,25	52	1,686
B3	442,75	61	2,701
B4	156,3	48	0,6
B5	547,4	64	2,803
B6	327,2	49	1,283
R1	138,15	45	0,497
R2	66,32	36	0,191
R3	403,85	45	1,454
R4	38	33	0,1
R5	151,6	40	0,485
R6	nicht bestimmbar	-	-

Tabelle 40: Ermittelte Gesamtumorflächen und daraus errechnete Tumorumina nach der Trapezformel bei Versuch II

Die Logarithmierung der Tumorumina ergab folgendes (Tabelle 41):

B	n Schnitte	Volumen [cm <sup>3</sup> ]	lgVol
1	40	0.402	-0.396
2	52	1.686	0.227
3	61	2.701	0.431
4	48	0.600	-0.222
5	64	2.803	0.448
6	49	1.283	0.108
N = 6			
Mittelwert der Volumina = 1,579			

R	n Schnitte	Volumen [cm <sup>3</sup> ]	lgVol
1	45	0.497	-0.303
2	36	0.191	-0.719
3	45	1.454	0.163
4	33	0.100	-0.999
5	40	0.485	-0.314
6	-	-	-
N = 5			
Mittelwert der Volumina = 0,545			

Tab. 41 : Logarithmierte Tumorumina der a) Kontrollgruppe B und er b) Verumgruppe R des Versuchs II

Die statistische Auswertung der logarithmierten Tumorumina beider Gruppen mit dem zweiseitigen STUDENT-Test zeigte einen deutlichen Größenunterschied zu Gunsten der Kontrollgruppe, Thalidomid würde also die Tumorpheriferation unterdrücken. Der Mittelwert der errechneten Tumorumina betrug bei der Kontrollgruppe 1,579 cm<sup>3</sup> gegen 0,545 cm<sup>3</sup> in der Verumgruppe. Hierbei wurde jedoch die Hypothese eines statistisch signifikanten Unterschiedes zwischen den zwei Behandlungsgruppen bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  mit 0,0511 aufgrund der geringen Gruppengröße knapp verfehlt (s. Abbildung 26).

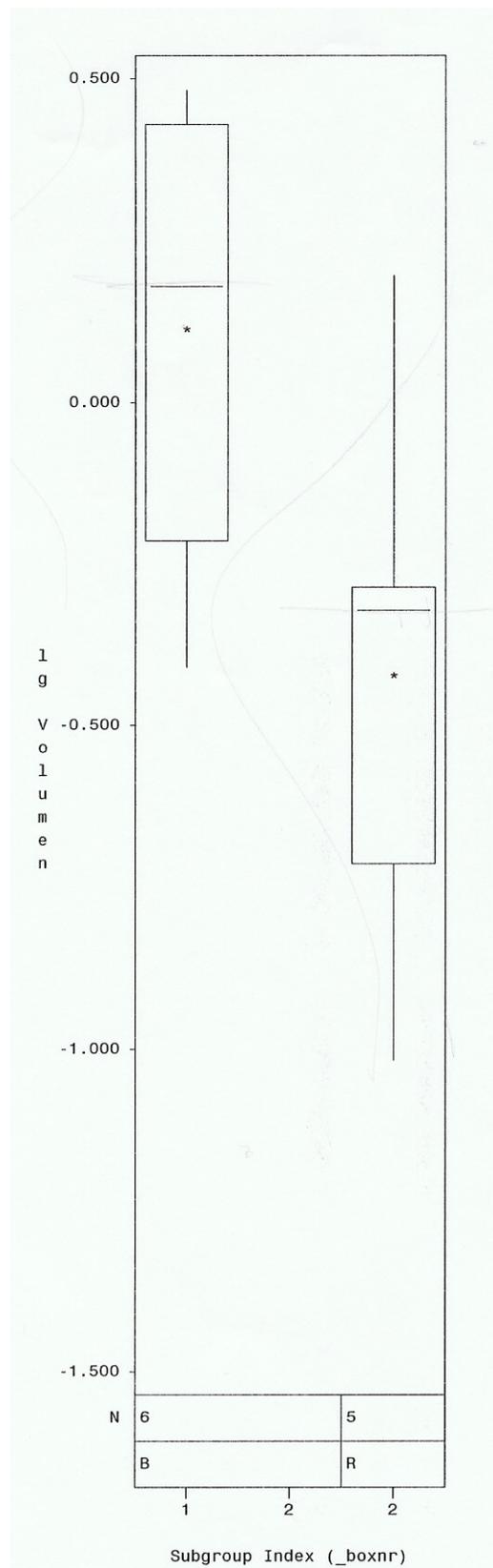


Abbildung 26: Grafische Darstellung der logarithmierte Tumolvolumina aus Versuch II (Box-Plots). Links: Kontrollgruppe B. Rechts: Verumgruppe R. Die Box-Plots zeigen Werteumfang, Mittelwert, Median und Standardabweichung.

### 4.4.3 Immunmodulatorischer und antiangiogenetischer Effekte

#### 4.4.3.1 TNF- $\alpha$ Nachweis

##### 4.4.3.1.1 TNF- $\alpha$ Nachweis *in situ* und bei F98er Zellen durch ELISA

Nach Herstellung einer Albumin-Standardkurve und Zusatz von BioRad Proteinreagenz erfolgte die Vorbereitung der Proben, so dass jede 10  $\mu$ g Protein entsprach.

Anschliessend wurde die Standardkurve mit dem TNF $\alpha$ -Gradient ab 1 mg/ml bis 800 mg/ml erstellt (s. Abbildung 27).

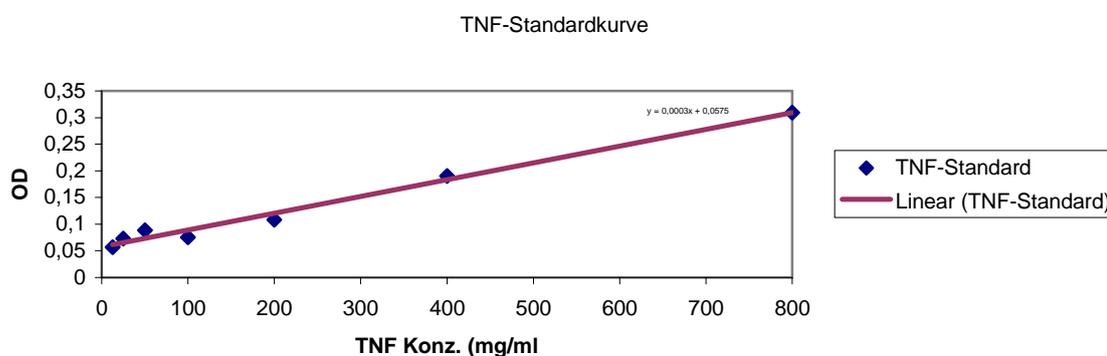


Abbildung 27: Standardkurve zur photometrischen Bestimmung von TNF- $\alpha$  ( $\lambda=540$  nm)

Die jeweilige optische Dichte wurde photometrisch erfasst und die entsprechende TNF- $\alpha$ -Konzentration anhand der Standardkurve ermittelt.

Probe	OD1	OD2	Mittelwert OD	OD Mit. – Leerwert (0,047)	TNF Konzentration (mg/ml)
B1	0,043	0,049	0,046	-0,001	0
B2	0,063	0,046	0,0545	0,0075	0
B3	0,053	0,048	0,0505	0,0035	0
B4	0,066	0,043	0,0545	0,0075	0
B5	0,055	0,066	0,0605	0,0135	0
B6	0,074	0,046	0,06	0,013	0
R1	0,047	0,049	0,048	0,001	0
R2	0,044	0,045	0,0445	-0,0025	0
R3	0,043	0,05	0,0465	-0,0005	0
R4	0,043	0,044	0,0435	-0,0035	0
R5	0,058	0,055	0,0565	0,0095	0
R6	0,059	0,057	0,058	0,011	0
F98	0,05	0,047	0,0485	0,0015	0

Tabelle 42: TNF- $\alpha$  Konzentrationen bei F98er Zellen und Proben aus der Versuchsreihe II

Damit konnte in sämtlichen Proben (F98 Zellen und Hirngewebe) TNF- $\alpha$  mittels ELISA nicht nachgewiesen werden. Die TNF- $\alpha$  Konzentration befindet sich unter der Nachweisgrenze von 5 pg/mL.

#### 4.4.3.1.2 TNF- $\alpha$ Nachweis in situ durch Immunhistochemie

Das Zytokin TNF- $\alpha$  war immunhistochemisch in keinem der untersuchten Hirn- oder Tumorabschnitt aller Versuchsreihen nachweisbar.

#### 4.4.3.1.3 TNF- $\alpha$ Nachweis in situ durch Western-Blot

TNF- $\alpha$  konnte nicht im Western-Blot nachgewiesen werden (einzelne Ergebnisse nicht dargestellt).

#### 4.4.3.1.4 TNF- $\alpha$ Nachweis in situ und bei F98 Zellen durch RT-PCR

In beiden Versuchen (II und III) lag die TNF- $\alpha$ -Expression in den Tumorchirnen im Vergleich zum gesunden Kontrollhirn insgesamt deutlich niedriger. Die meisten Tumorchirne waren sogar TNF- $\alpha$ -negativ. Nur einzelne Werte zeigten eine deutliche Überexpression. Aus der Kontrollgruppe: B6 Versuch II:  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 10,77$  gegen 1 (tumorfreies Gehirn als Referenz). Aus der Verumgruppe: R4:  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 15,87$  gegen 1 (tumorfreies Gehirn als Referenz). (Versuch II: Kontrolle: Median: 0 SD:4,356. Verum: Median: 0,815 SD:6,260; s. Abbildung 28. Versuch III: Kontrolle: Median: 0 SD:0,03. Verum: Median: 0 SD:0,045 s. Abbildung 29) (s. Tabelle 43 und 44). Im Durchschnitt lag die TNF- $\alpha$ -Expression der Verumgruppe jeweils höher als die der Kontrollgruppe (mit Tumor, ohne Thalidomid). Dies ist aufgrund der hohen Standardabweichung jedoch statistisch nicht signifikant.

Die zweimalige Untersuchung von F98-Zellen ergab einen fehlenden TNF- $\alpha$ -Nachweis.

Tumor		$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Kontroll- gruppe	B1	0,58	5,675	0	4,356
	B2	0			
	B3	0			
	B4	0			
	B5	0			
	B6	10,77			
Verum- gruppe	R1	1,63	6,4	0,815	6,260
	R2	0			
	R3	0			
	R4	15,87			
	R5	1,7			
	R6	0			
Zellen	F98	0			

Tab. 43: TNF- $\alpha$  Expression bei Versuch II

Tumor		$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Kontroll- gruppe	S1	0,06	0,015	0	0,03
	S2	0			
	S3	0			
	S4	0			
Verum- gruppe	R1	0,09	0,0225	0	0,045
	R2	0			
	R3	0			
	R4	0			

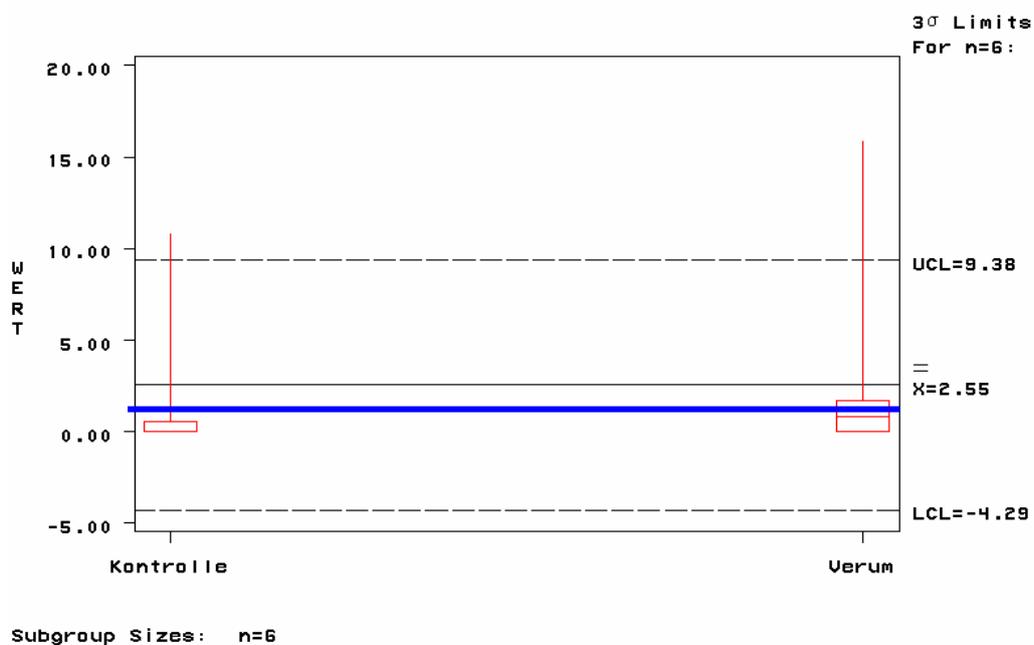
Tab. 44: TNF- $\alpha$  Expression bei Versuch III

Abbildung 28: Box-Plot Darstellung der Werte für die TNF- $\alpha$ -Expression für Versuch II (anhand RT-PCR) Links: Kontrolltumoren, rechts: Verumtumoren. Referenz: Expression eines gesunden Hirns mit dem Wert 1 (blaue Linie). UCL = oberes Konfidenzlevel, LCL = unteres Konfidenzlevel.

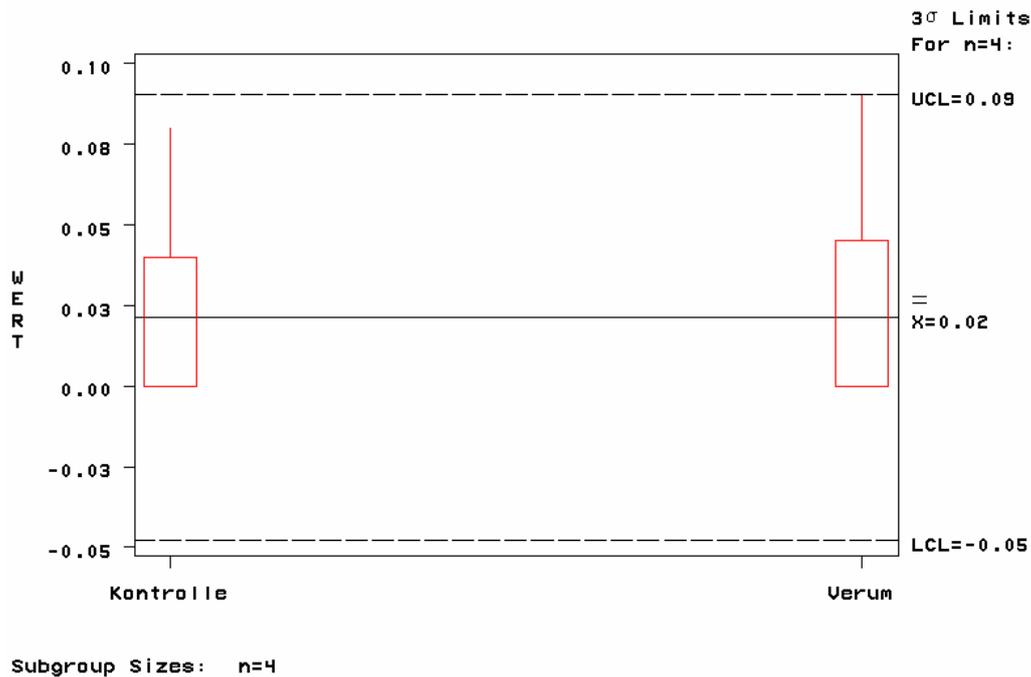


Abbildung 29: Box-Plot Darstellung der Werte für die TNF- $\alpha$ -Expression für Versuch III (anhand RT-PCR) Links: Kontrolltumoren, rechts: Verumtumoren. Referenz: Expression eines gesunden Hirns mit dem Wert 1. UCL = oberes Konfidenzlevel, LCL = unteres Konfidenzlevel.

#### 4.4.3.2 IFN- $\gamma$ Nachweis

##### 4.4.3.2.1 Immunhistochemischer Nachweis von IFN- $\gamma$

Das von Th1-Lymphozytenzellen und NK-Zellen exprimierte Zytokin **IFN-gamma** konnte immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden.

##### 4.4.3.2.2 IFN- $\gamma$ Nachweis durch Western-Blot

IFN-gamma konnte nicht im Western-Blot nachgewiesen werden (einzelne Ergebnisse nicht dargestellt).

##### 4.4.3.2.3 IFN- $\gamma$ Nachweis durch RT-PCR

Das Gen-Produkt für INF- $\gamma$  wurde in mehrfach angesetzten RT-PCR Untersuchungen nicht nachgewiesen. Allein das Kontrollgen *ARF1* konnte dargestellt werden.

---

#### 4.4.3.3 Immunhistochemischer Nachweis von CD4, CD8 und CD68

Die Lymphozytenoberflächenmoleküle **CD4** und **CD8** von T-Helfer- bzw. zytotoxischen-Zellen konnten in keiner der drei Versuchsreihen immunhistochemisch nachgewiesen werden, während die Kontrollfärbung an Milzgewebe der Tiere positiv auffiel.

Der Monozyten-Makrophagen-Marker **CD68** konnte ebenfalls immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden.

#### 4.3.3.4 VEGF- und FGF2- Nachweis

##### 4.3.3.4.1 Immunhistochemischer Nachweis von VEGF und FGF2

Immunhistochemisch konnte der Wachstumsfaktor **VEGF** in keinem Präparat aller Gruppen und Serien inklusive F98 Zellen nachgewiesen werden.

**FGF2** wurde ebenfalls immunhistochemisch nicht nachgewiesen.

##### 4.3.3.4.2 VEGF-Nachweis durch Western-Blot

VEGF konnte im Western-Blot nicht nachgewiesen werden (einzelne Ergebnisse nicht dargestellt).

##### 4.3.3.4.3 VEGF- und FGF2-Nachweis durch RT-PCR

###### **VEGF**

Im Vergleich zu gesundem Hirngewebe einer Ratte vergleichbaren Alters kam es mit einer Ausnahme (Verumtier R3, Versuch II) bei allen untersuchten Tumorchirnen der Versuche II und III nicht zu einer Hochregulierung der VEGF-Expression: die VEGF-Expression war ansonsten herunterreguliert oder nicht nachweisbar.

In Versuch II zeigten die Tumorchirne eine höhere VEGF-Expression in der mit Thalidomid behandelten Verumgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe. (Kontrolle: Median: 0,135 Standardabweichung SD: 0,197. Verum: Median: 0,69 SD: 0,952). In Versuch III lag die VEGF-Expression in der Kontrollgruppe zum Teil höher (Kontrolle: Median: 0,115 SD:0,346 .Verum: Median: 0 SD: 0,25)(s. Tabellen 45 und 46 und Abbildungen 30 und 31).

Die Abbildungen 32 und 33 zeigen exemplarisch die Amplifikationskurven der Tumoren B2 und R1 für VEGF und die entsprechenden Amplifikationskurven des Referenzgens *ARF1*.

Tumor		$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Kontroll- gruppe	B1	0,05	0,145	0,135	0,197
	B2	0,02			
	B3	0,45			
	B4	0			
	B5	0,01			
	B6	0,34			
Verum- gruppe	R1	0,43	0,83	0,69	0,952
	R2	0			
	R3	2,54			
	R4	0			
	R5	1,06			
	R6	0,95			

Tab. 45: VEGF-Expression bei Versuch II

Tumor		$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Kontroll- gruppe	S1	0,76	0,2475	0,115	0,346
	S2	0,12			
	S3	0,11			
	S4	0			
Verum- gruppe	R1	0,5	0,125	0	0,25
	R2	0			
	R3	0			
	R4	0			

Tab. 46: VEGF-Expression bei Versuch III

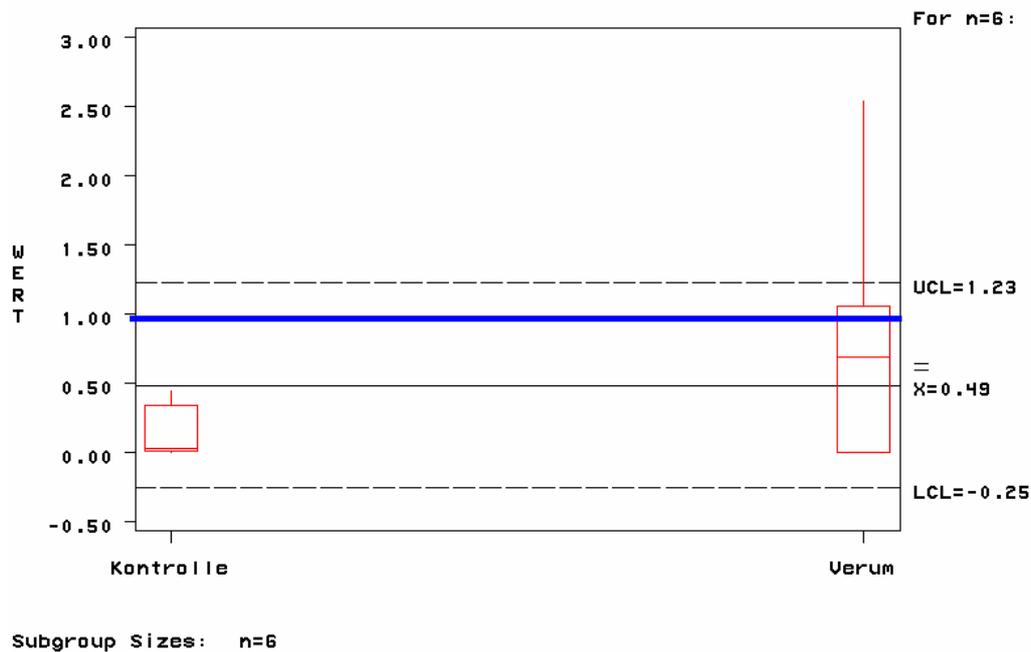


Abbildung 30: Box-Plot Darstellung der Werte für die VEGF-Expression für Versuch II (anhand RT-PCR) Links: Kontrolltumoren, rechts: Verumtumoren. Referenz: Expression eines gesunden Hirns mit dem Wert 1 (blaue Linie). UCL = oberes Konfidenzlevel, LCL = unteres Konfidenzlevel.

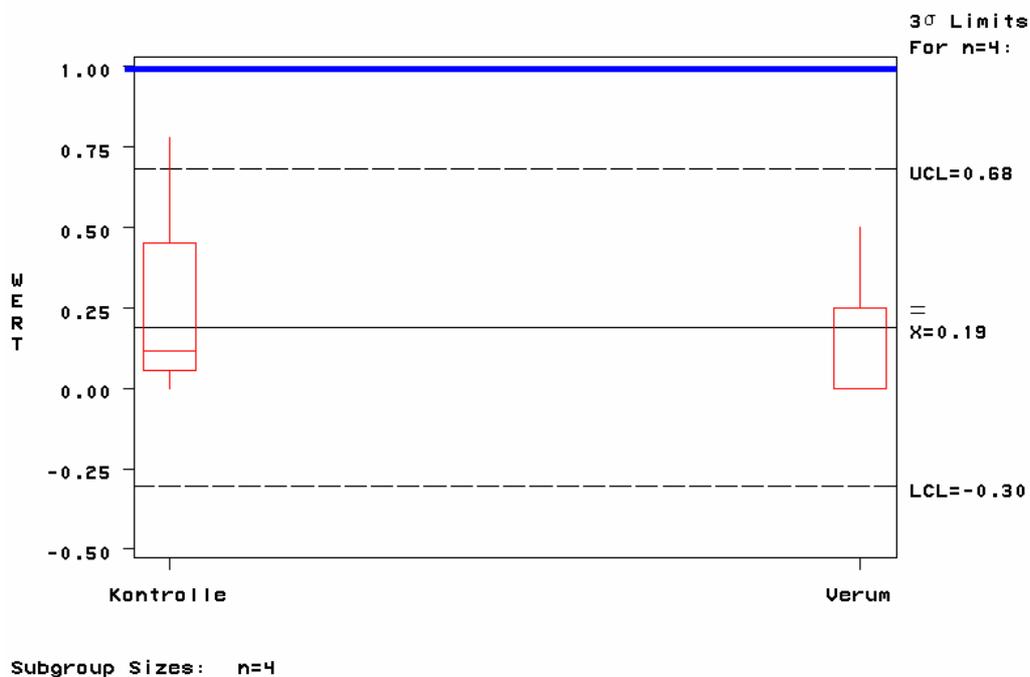


Abbildung 31: Box-Plot Darstellung der Werte für die VEGF-Expression für Versuch III (anhand RT-PCR) Links: Kontrolltumoren, rechts: Verumtumoren. Referenz: Expression eines gesunden Hirns mit dem Wert 1 (blaue Linie). UCL = oberes Konfidenzlevel, LCL = unteres Konfidenzlevel.

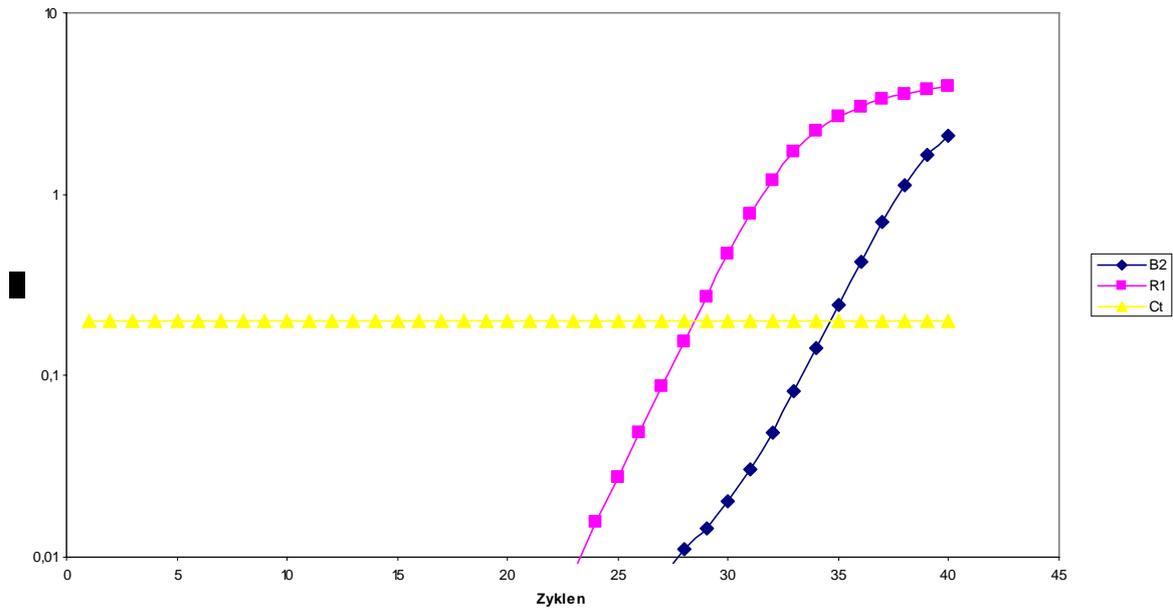


Abbildung 32: Darstellung der VEGF-Expression mittels *real-time* Reverse-Transkriptase PCR für die Tumoren B2 und R1 aus Versuch II. R1 exprimiert geringfügig mehr VEGF als B2.

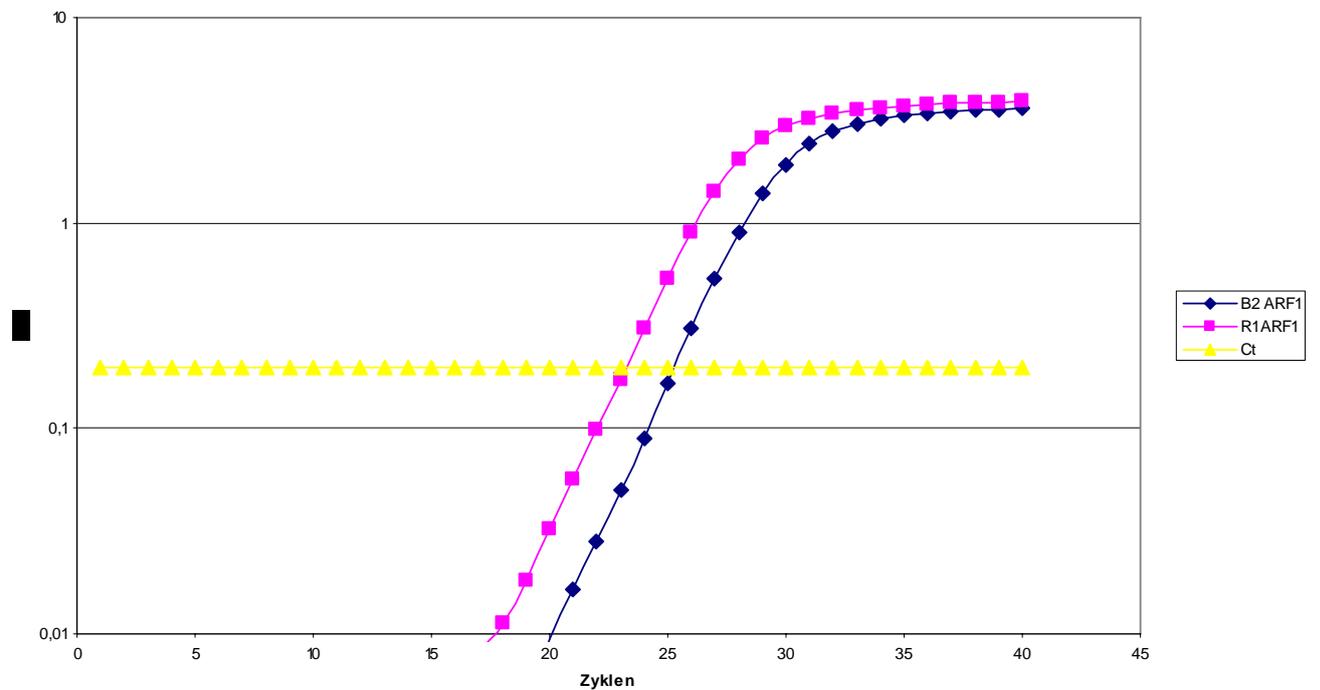


Abbildung 33: Darstellung der Expression des Kontrollgen ARF1 mittels *real-time* Reverse-Transkriptase PCR für die Tumoren B2 und R1 aus Versuch II. Die Kurven zeigen einen ähnlichen Verlauf.

**FGF2**

Verglichen mit einem nicht tumorhaltigen, gesunden Kontrollhirn ist die FGF2-Expression in den meisten Tumorchirnen der Versuche II und III zum Teil deutlich erhöht (Versuch II: Kontrolle: Median: 16,69 SD: 26,433. Verum: Median: 18,045 SD: 43,966. s. Abbildung 34) (Versuch III: Kontrolle: Median: 4,83 SD: 3,587. Verum: Median: 0 SD: 1,845. s. Abbildung 35) (s. Tabellen 47 und 48). Bei beiden Versuchen zeigen die Tumorchirne der Verumgruppe statistisch eine gegenüber der Kontrollgruppe verringerte FGF2-Expression. 3 von 4 Tumorchirnen der Verumgruppe in Versuch III zeigten keine FGF2-Expression. Dies ist aufgrund der hohen Standardabweichung jedoch statistisch nicht signifikant.

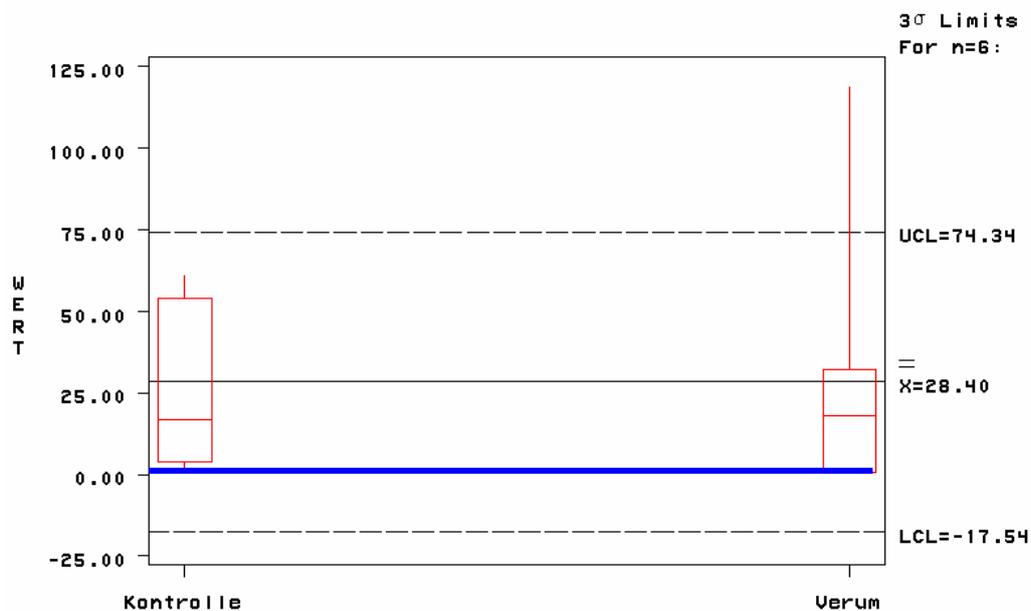
F98 Zellen alleine zeigten eine niedrigere FGF2-Expression als das gesunde Kontrollhirn.

Tumor		$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Kontroll- gruppe	B1	0,64	25,317	16,69	26,433
	B2	5,78			
	B3	53,82			
	B4	60,27			
	B5	3,79			
	B6	27,6			
Verum- gruppe	R1	0,55	31,05	18,045	43,966
	R2	0,68			
	R3	116,68			
	R4	32,3			
	R5	9,67			
	R6	26,42			
F98er Zellen		0,24			

Tab. 47: FGF2-Expression bei Versuch II

Tumor		$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Kontroll- gruppe	S1	1,97	5,48	4,83	3,587
	S2	5,9			
	S3	3,76			
	S4	10,29			
Verum- gruppe	R1	3,69	0,922	0	1,845
	R2	0			
	R3	0			
	R4	0			
F98er Zellen		0,36			

Tab. 48: FGF2-Expression bei Versuch III



Subgroup Sizes: n=6

Abbildung 34: Box-Plot Darstellung der Werte für die FGF2-Expression für Versuch II (anhand RT-PCR) Links: Kontrolltumoren, rechts: Verumtumoren. Referenz: Expression eines gesunden Hirns mit dem Wert 1 (blaue Linie). UCL = oberes Konfidenzlevel, LCL = unteres Konfidenzlevel.

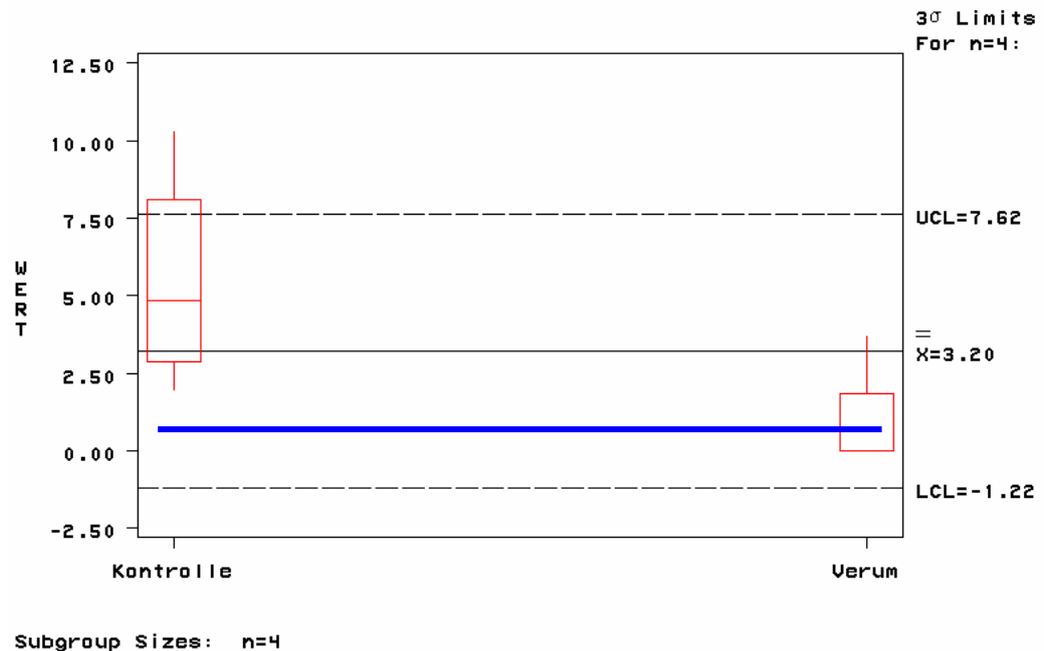


Abbildung 35: Box-Plot Darstellung der Werte für die FGF2-Expression für Versuch III (anhand RT-PCR) Links: Kontrolltumoren, rechts: Verumtumoren. Referenz: Expression eines gesunden Hirns mit dem Wert 1 (blaue Linie). UCL = oberes Konfidenzlevel, LCL = unteres Konfidenzlevel.

#### 4.4.3.5 Gefäßuntersuchungen

##### 4.4.3.5.1 Gefäßmarker (CD31, RCA, CD51/61, CD54, OX43, EBA und vWF)

Das Adhäsionsmolekül **PECAM / CD31** konnte immunhistochemisch in Hirn- und Arachnoidalgefäßen sowohl im Tumor als auch in der kontralateralen Hemisphäre nachgewiesen werden. Die meisten angefärbten Gefäße waren mittelgroß oder größer, dagegen blieben Kapillare negativ (s. Abbildungen 36 und 37 und Tabellen 49, 50, 51, 52).

Die mit Lektin **RCA I** markierten Gefäße und Kapillaren zeigten sich im Hirngewebe und in geringerer Ausprägung im Tumorrinneren im Vergleich zum Tumorrand oder zur Infiltrationszone (s. Abbildungen 38 und 39 und Tabelle 49, 51, 52).

Immunhistochemisch wurde das Integrin  **$\alpha v \beta 3$  (CD51/61)** in allen Gruppen und Versuchsreihen weder im Tumor noch im gesunden Hirngewebe nachgewiesen (s. Tabellen 49, 51, 52). Das Adhäsionsmolekül **ICAM-I / CD54** wurde nur vereinzelt von arachnoidalen Gefäßen der Verumgruppe exprimiert, während Tumor und Hirnparenchym negativ blieben (s. Tabellen 49, 50, 51, 52).

Das rattenspezifische Endothelmolekül **OX43**, das ausschließlich große Gefäße und keine Kapillaren anfärbt, konnte sich vereinzelt fraglich nachweisen lassen (s. Tabellen 49 und 51).

Der Marker der intakten Blut-Hirn-Schranke **Anti-EBA / SMI71** konnte immunhistochemisch in Tumorrandbezirken und Tumorausläufern beider Behandlungsgruppen sowie in der kontralateralen Hemisphäre und Arachnoidea nachgewiesen werden (s. Abbildungen 40 und 41 und Tabellen 49, 51, 52).

Der **vWF** Faktor konnte in sämtlichen Tumorchirnen nicht nachgewiesen werden (s. Tabellen 49, 51, 52).

	CD31	RCA	CD51/61	CD54	OX43	EBA	vWF
F98 Negativkontrolle							
F98 er Zellen							

Tab. 49: Gefäßmarker bei F98 Zellen

Präparat		CD31				CD54			
		Im Tumor		Mittel- linie	Restl. Gewebe	Im Tumor		Mittel- linie	Restl. Gewebe
		Mitte	Rand			Mitte	Rand		
Negativ- kontrolle Kontroll- gruppe	8S K	-	-	-	-	-	-	-	-
	8R K	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontroll- gruppe	2S	-	+	+	-	-	-	-	-
	3S								
	4S	-	+	+	+	-	-	-	-
	5S	-	-	-	-	-	-	-	-
	6S	-	-	+	+	-	-	-	-
	7S	-	-	+	-	-	-	-	-
	8S	-	-	+	+	-	-	-	-
	9S	-	-	+	+	-	-	-	-
	10S	-	-	?	-	-	-	-	-
	11S	-	-	-	-	-	-	-	-
Verum- gruppe	1R			+	+	-	-	-	-
	2R	-	+	+	+	-	-	+	+
	3R	-	+	+	+	-	-	-	-
	4R	-	-	+	+	-	-	-	-
	5R	-	-	+	+	-	-	-	-
	6R			+	+	-	-	-	-
	7R	-	-	+	-	-	-	-	-
	8R	-	-	+	-	-	-	-	-
	9R	+	+	+	+	-	-	-	-
	10R			+	+	-	-	-	-
	12R	-	-	-	-	-	-	-	-
	13R	-	-	+	-	-	-	-	-
	14R	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 50: Gefäßmarker bei Versuch I

4. Ergebnisse

Präp.	CD31				RCA				CD 51/ 61	CD54			OX43	EBA			vWF			
	1		2	3	1		4	2		3	1			2	3					
	1a	1b			1a	1b					1a	1b								
NK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
NV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
K	B1	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	?	-	-	-	+	+	+	
	B2	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	B3	+	+	+	+	-	-	+	+	?	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
	B4	+	+	+	+	-	-	+	++	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
	B5	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
	B6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	
V	R1	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
	R2	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	
	R3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	?	-	-	-	+	+	
	R4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	?	?	-	-	-	+	+	+
	R5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
	R6					-	-	-	+	?	-					-				

TAB. 51: Gefäßmarker bei Versuch II

NK: Negativkontrolle Kontrollgruppe

NV: Negativkontrolle Verumgruppe

K: Kontrollgruppe

V: Verumgruppe

1: Im Tumor

1a: Mitte

1b: Rand

2: Mittellinie

3: restliche Gewebe

4: Infiltrationszone

Präp.	CD31				RCA				CD 51/ 61	CD 54	EBA			vWF				
	1		2	3	1		4	2			3	1			2	3		
	1a	1b			1a	1b						1a	1b					
NK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	S1	-	-	?	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	++	+	-	-
	S2	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	++	++	-	-
	S3	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	++	++	++	++	-	-
	S4	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
V	R2	-	?	?	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	R3	+	+	?	+	+	+	+	+	?	-	-	-	-	?	+	-	-
	R4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	++	+	+	-	-
	R5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	++	+	+	-	-

Tab. 52: Gefäßmarker bei Versuch III

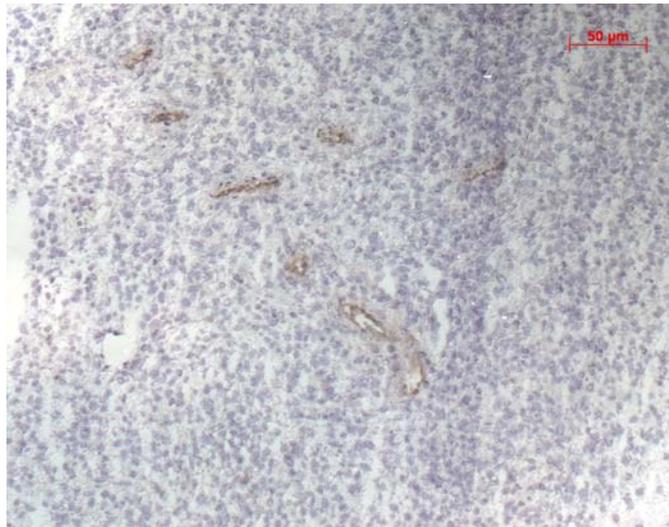


Abbildung 36.: Immunhistochemischer Nachweis des Adhäsionsmoleküls CD31 / PECAM (braun) in Tumor (Hämalaun Gegenfärbung, 20-fach Vergrößerung)  
[ Tumor II B3 aus der Kontrollgruppe]

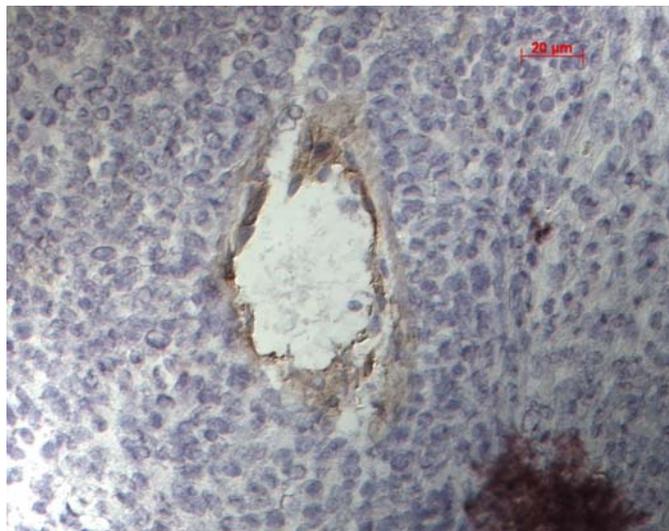


Abbildung 37.: Immunhistochemischer Nachweis des Adhäsionsmoleküls CD31 / PECAM (braun) in Tumor (Hämalaun Gegenfärbung, 40-fach Vergrößerung)  
[ Tumor II R5 aus der Verumgruppe]

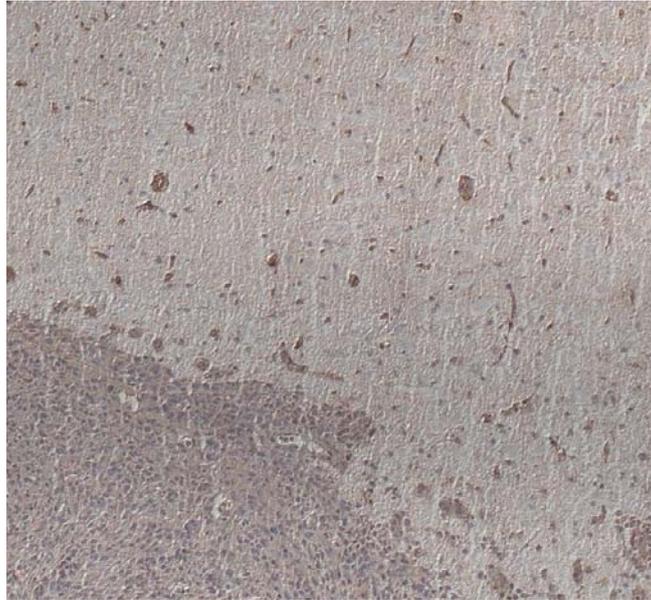


Abbildung 38: Immunhistochemischer Nachweis von Lektin RCA (braun) in Tumor und Tumorausläufern  
(Hämalaun Gegenfärbung)  
[ Tumor II R3 aus der Verumgruppe]



Abbildung 39: Immunhistochemischer Nachweis von Lektin RCA (braun) in peritumoralem Parenchym  
(Hämalaun Gegenfärbung)  
[ Tumor II R5 aus der Verumgruppe]

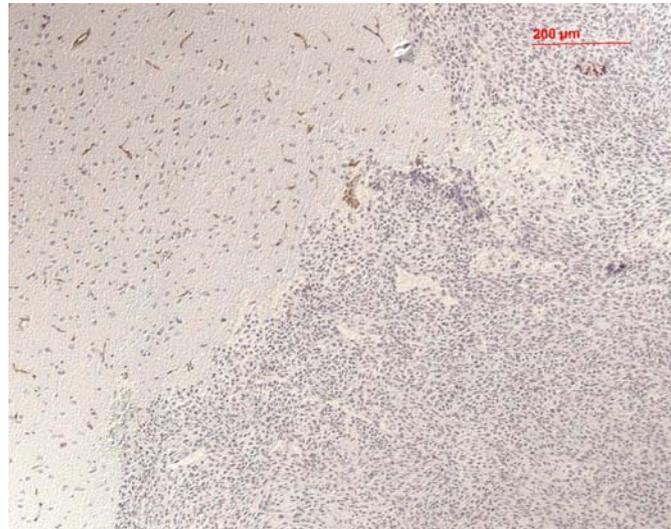


Abbildung 40: Immunhistochemischer Nachweis von EBA (braun) im Tumor und am Tumorrand  
(Hämalaun Gegenfärbung)  
[ Tumor der Versuchsreihe III]



Abbildung 41: Immunhistochemischer Nachweis von EBA (braun) in peritumoralem Parenchym  
(Hämalaun Gegenfärbung)  
[ Tumor II B5 aus der Kontrollgruppe]

#### 4.4.3.5.2 Gefäßdichte

Zur semiquantitativen Bestimmung der Gefäßdichte ergab die Auszählung im Raster (s. Abbildung 42) bei der **RCA**-Markierung im Versuch II eine geringfügig gesteigerte Gefäßdichte in der Verumgruppe sowohl im Tumorgewebe (56,4 gegen 54,5 Gefäße / Raster) als auch im gesunden Hirnparenchym (56,6 gegen 55,3 Gefäße/ Raster) jeweils gegenüber der

Kontrollgruppe. Dagegen zeigte sich im Versuch III eine deutlich geringere Gefäßdichte im Tumorgewebe (32,1 gegen 47,5 Gefäße /Raster) sowie im gesunden Hirnparenchym (33,5 gegen 60,6 Gefäße / Raster) der Verumgruppe (s. Abbildungen 43 und 44).

Bei der immunhistochemischen Markierung mit Anti-**EBA** zeigte sich im Versuch II eine deutliche Reduzierung der Gefäßdichte sowohl im Tumorgewebe (4,8 gegen 7 Gefäße /Raster) als auch im Hirnparenchym (2,7 gegen 3,4 Gefäße / Raster) jeweils gegenüber der Kontrollgruppe. Im Versuch III war die Gefäßdichte im Tumorgewebe erhöht (23,3 gegen 16,2 Gefäße / Raster), dagegen im Hirnparenchym erniedrigt (21,5 gegen 29,2 Gefäße / Raster). (s. Abbildungen 45 und 46).

Schließlich bei der Markierung mit **CD31 (PECAM)** zeigte sich im Versuch II eine deutliche Reduzierung der Gefäßdichte sowohl im Tumorgewebe (8 gegen 11,9 Gefäße /Raster) als auch im Hirnparenchym (7,6 gegen 10,5 Gefäße / Raster) jeweils gegenüber der Kontrollgruppe. Dagegen zeigte die Verumgruppe im Versuch III eine deutlich erhöhte Gefäßdichte im Tumorgewebe (7,5 gegen 4,4 Gefäße / Raster) sowie im Parenchym (7,5 gegen 1,4 Gefäße / Raster) (s. Abbildungen 47 und 48).

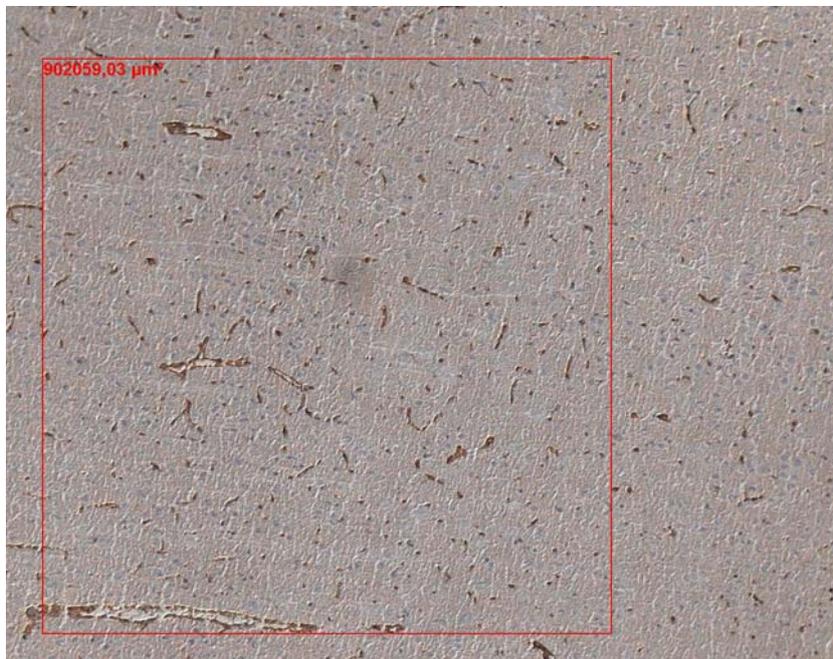


Abbildung 42: Immunhistochemische Markierung von RCA und standardisiertes Zellraster zur semiquantitativen Bestimmung der Gefäßdichte [ Tumor II R5 aus der Verumgruppe ]

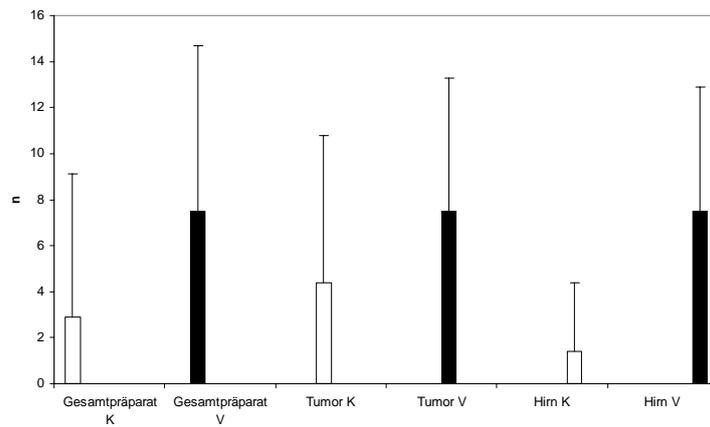


Abbildung 43: Relative Gefäßdichte RCA-positiver Gefäße der Präparate aus Versuch II [K=Kontrolle, V=Verum]

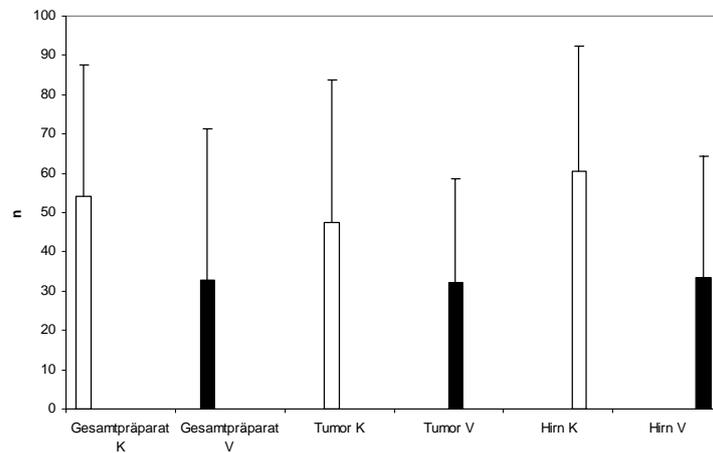


Abbildung 44: Relative Gefäßdichte RCA-positiver Gefäße der Präparate aus Versuch III [K=Kontrolle, V=Verum]

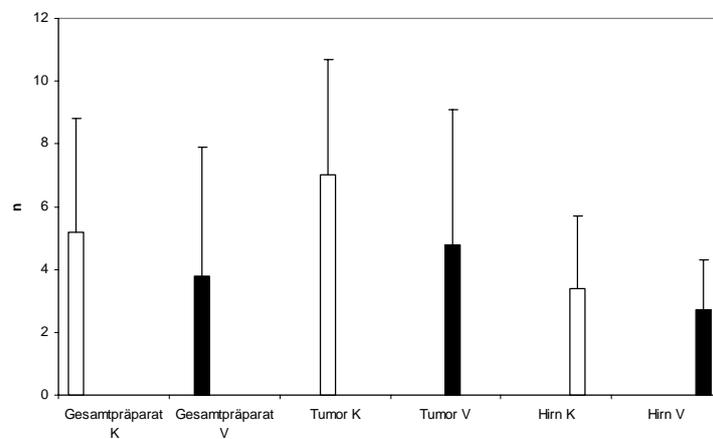


Abbildung 45: Relative Gefäßdichte EBA-positiver Gefäße der Präparate aus Versuch II [K=Kontrolle, V=Verum]

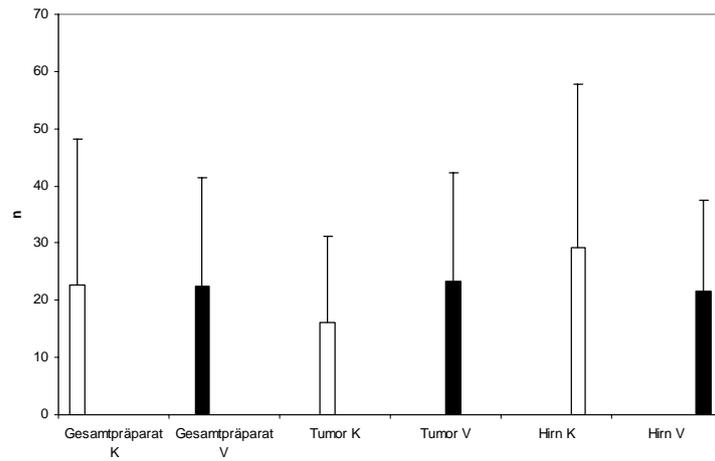


Abbildung 46: Relative Gefäßdichte EBA-positiver Gefäße der Präparate aus Versuch III [K=Kontrolle, V=Verum]

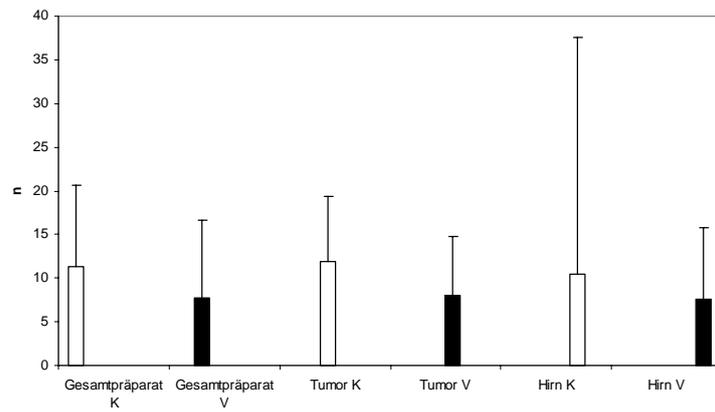


Abbildung 47: Relative Gefäßdichte CD31-positiver Gefäße der Präparate aus Versuch II [K=Kontrolle, V=Verum]

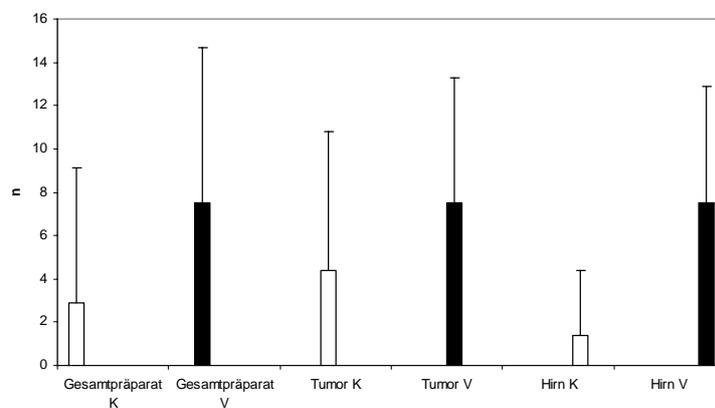


Abbildung 48: Relative Gefäßdichte CD31-positiver Gefäße der Präparate aus Versuch III [K=Kontrolle, V=Verum]

Insgesamt fallen uneinheitliche Ergebnisse zwischen den verschiedenen immunhistochemischen Markierungen sowie zwischen den Versuchsreihen auf. (s. Tabelle 53)

a) Versuch II

	RCA	EBA	CD31
Tumor	↑	↓↓↓	↓↓
Hirnparenchym	↑	↓↓↓	↓↓

b) Versuch III

	RCA	EBA	CD31
Tumor	↓↓↓	↑↑	↑↑
Hirnparenchym	↓↓↓	↓↓	↑↑↑

Tab. 53: Relative Gefäßdichte im Tumorgewebe und Hirnparenchym bei RCA-, EBA-, und CD31-Markierungen bei der Verumgruppe gegenüber der Kontrollgruppe bei dem a) Versuch II und b) Versuch III.

#### 4.4.3.5.3 Gefäßmorphometrie

Die rein qualitative Untersuchung der Gefäßmorphometrie zeigte zum Teil stark erweiterte Hirngefäße vor allem im Zentrum von Tumorausläufern.

## 5. Diskussion

### 5.1 Histologie der Transplantationstumoren F98

Histologisch wiesen die Implantationstumore Infiltrationszonen auf. Diese waren weniger ausgeprägt als beim typischen Glioblastom. Es fanden sich stark aufgeweitete Gefäße im Zentrum der Tumorausläufer. Das isomorphe Bild entspricht am ehesten dem eines kleinzelligen Glioblastoms. Diesem wird ein aggressiveres Proliferationsverhalten zugeschrieben.

Gegen ein typisches Glioblastom sprachen das Fehlen von Marklagerödem und einer sogenannten Buntfläche. Weder Nekrosen noch häufige Gefäßproliferate waren im Inneren des Tumors zu finden.

Die Tumorcharakterisierung anhand der immunhistochemischen Marker GFAP, S100 und Vimentin entsprach den Ergebnissen von Reifenberger et al., was die Stabilität des F98-Tumors belegt und für die Eignung als Modell eines humanen malignen Glioms spricht (Reifenberger et al. 1989). Die nebeneinander festgestellte Expression von GFAP und Vimentin zeigte das gleichzeitige typische Vorkommen von Zellen verschiedener Stadien, da Vimentin unreife und GFAP reife astrogliale Phänotypen charakterisiert.

### 5.2 Apoptotischer Effekt von Thalidomid

Bei einem disseminierten Nachweis der Apoptose *in situ* - im Tumor sowie in der Peripherie - konnte Thalidomid kein Effekt auf den programmierten Zelltod zugeschrieben werden.

Dies bestätigte frühere Ergebnisse bei einer Untersuchung von Thalidomideffekt auf CTLL-Zellen (eine murine zytotoxische Zelllinie), T-Zellen und neutrophile Granulozyten (Aseffa et al. 1997).

Dies spricht hingegen gegen neuere Ergebnisse. Liu et al. haben gezeigt, dass s-Thalidomid bei der U266 MM Zelllinie, einer multiplen Myelom Zelllinie, über eine Erhöhung von I-Kappa-B Protein und eine Abnahme der NF-Kappa-B-Aktivität sowie über Erhöhung des Bax:Bcl-2 Quotient die Apoptose fördert (Liu et al. 2004).

### **5.3 Sedierender Effekt von Thalidomid**

Die beobachtete Sedierung weist darauf hin, dass Thalidomid die Blut-Hirn Schranke passiert, sei es wegen seines Transportes oder durch Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke mit Verlust des Barriereeffektes. Die immunhistochemische Färbung mit EBA spricht für eine Blut-Hirn-Schrankenstörung im Tumorzentrum und das Erhalten der Schranke am Tumorrand und in der Peripherie (s.u. 4.4.3.3.5.1 Gefäßmarkierung).

Die mit der HPLC für Thalidomid positiven Hirnproben geben keinen Hinweis auf die Lokalisation des untersuchten Stoffes. Diese Hirnproben bestehen aus Parenchym und Gefäßen. Da wir aber einen sicheren Sedierungseffekt bei den Tieren nachweisen konnten, wirkt Thalidomid im Hirnparenchym.

Zusammenfassend muss davon ausgegangen werden, dass Thalidomid in das Hirnparenchym über die intakte Blut-Hirn-Schranke gelangt und bei Ratten sedierend wirkt.

Hiermit werden frühere Ergebnisse bestätigt, die die sedierende Wirkung auch bei Ratten ab einer bestimmten Dosis zeigten (Fabro et al. 1965).

### **5.4 Anti-proliferativer Effekt von Thalidomid**

In der Kultur der F98 Zellen wies der MTT- Proliferationstest keinen signifikanten Effekt von Thalidomid auf.

Die immunhistochemisch untersuchte Proliferationsrate der Tumorzellen vor allem mit Anti-Mib5 (Ki67)-Antikörpern zeigte unterschiedliche Ergebnisse (je nach Versuchsreihe), so dass kein eindeutiger Effekt von Thalidomid festgestellt werden konnte. Mit Werten von 3,3 bis 17,80 % im Durchschnitt entsprachen sie dagegen typischen Werten für das Glioblastoma multiforme und sind hinsichtlich der Prognose aussagekräftiger als die Tumorgroße (Coons et al. 1997). Die typischerweise vorliegende enorme intra- und intertumoröse Variabilität der Ki67-Expression wird durch die ausgeprägte Heterogenität in Differenzierung und Anaplasie des Glioblastoms erklärt.

Trotz fehlender statistischer Signifikanz zeigte die Onkometrie einen deutlichen Unterschied zwischen der Tumorgroße beider Gruppen zu Gunsten der Kontrollgruppe. Thalidomid könnte die Proliferation des Tumors unterdrücken.

Dies erfolgt möglicherweise über den antiangiogenetischen Effekt von Thalidomid.

## 5.5 Immunmodulatorischer Effekt Thalidomids

Allein durch RT-PCR wurde die TNF- $\alpha$  Expression *in situ* nachgewiesen. Hierbei konnte man bei sehr inhomogenen nicht-signifikanten Ergebnissen Thalidomid keinen immunsuppressiven Effekt zuschreiben. Die Inhomogenität der Ergebnisse könnte durch die zu geringe Anzahl der untersuchten Tiere bedingt sein. Die Tatsache, dass TNF- $\alpha$  weder immunhistochemisch noch durch ELISA (trotz niedriger Nachweisgrenze), oder durch Western-Blots nachzuweisen war, spricht für sehr kleine Mengen von TNF- $\alpha$  *in situ*.

Da TNF- $\alpha$  in zwei verschiedenen Formen – löslich und membrangebunden – vorkommt, ist der Nachweis dieses Zytokins nur eingeschränkt zu bewerten. Die Messungen erfassen häufig nur die detektierbare rezeptorbindungsfähige zirkulierende Form, die unter Umständen gar nicht die aktive TNF- $\alpha$  Form darstellt.

Das von Th1-Lymphozyten und NK-Zellen sezernierte IFN- $\gamma$  Zytokin konnte weder immunhistochemisch, noch durch Western-Blots oder durch RT-PCR nachgewiesen werden. Entweder kam IFN- $\gamma$  unter der Nachweisgrenze dieser Verfahren vor oder war nicht vorhanden.

Immunhistochemisch konnten weder CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten noch CD68-tragende Makrophagen nachgewiesen werden. Hiermit wird die Studie von Ménage et al. bestätigt, die den Mangel an CD4<sup>+</sup> Lymphozyten bei Patienten mit Glioblastom nachwies (Ménage et al. 1992).

Das Fehlen von Lymphozyten und Makrophagen könnte das Fehlen der IFN- $\gamma$  Sekretion nach sich ziehen, was wiederum die kleine nachgewiesene Menge von TNF- $\alpha$  erklären könnte, da IFN- $\gamma$  die Freisetzung von TNF- $\alpha$  auslöst.

Zusammenfassend konnten die immunologischen Mechanismen an dem untersuchten Modell sowie der immunologische Effekt Thalidomids aufgrund des fehlenden Nachweises wichtiger Faktoren nicht hinreichend untersucht werden.

Während das humane Glioblastom immunologisch aktiv ist, ist das F98 Transplantationsmodell wahrscheinlich immunologisch inaktiv.

---

## 5.6 Antiangiogenetischer Effekt Thalidomids

Während VEGF weder immunhistochemisch noch durch Western-Blots nachgewiesen wurde, zeigte die RT-PCR im Durchschnitt eine herunterregulierte VEGF-Expression bei Tumorhirnen gegenüber dem gesunden Hirn unabhängig vom Einsatz Thalidomids.

Zusammenfassend scheint das Tumorwachstum nicht von einer gesteigerten VEGF-Expression abhängig zu sein, was wiederum mit der fehlenden Nekrosen und der dadurch fehlenden Vaskularisierung korreliert. Die erniedrigte VEGF-Expression bei Tumorhirnen gegenüber gesunden Hirnen konnte nicht hinreichend erklärt werden.

Die VEGF-Expression wird durch Hypoxie aber auch TNF- $\alpha$  über IL-6 induziert. Die hier gefundene niedrige TNF- $\alpha$ -Expression könnte also die niedrige VEGF-Expression erklären.

Während die Immunhistochemie keinen Nachweis von FGF2 erbrachte, zeigte die RT-PCR eine deutlich erhöhte FGF2-Expression in allen Versuchen in Tumorhirnen gegenüber gesunden Hirnen. Bei dem Versuch II lag die FGF2-Expression der Verumgruppe deutlich über der der Kontrollgruppe (jedoch mit einer extrem hohen Standardabweichung).

Es wird vermutet, dass FGF durch Zellnekrose den extrazellulären Raum erreicht. Dass FGF nicht direkt als lösliches Produkt immunhistochemisch nachzuweisen war, dagegen seine Expression durch die RT-PCR eindeutig war, könnte darauf hinweisen, dass wenig Zellen der Matrix oder Endothelzellen nekrotisch waren. Dies korreliert mit dem histologischen Befund der untersuchten Tumore.

Die niedrige VEGF-Expression neben der hohen FGF2-Expression passt nicht zu der bekannten Synergie beider Wachstumsfaktoren, wobei FGF2 die Synthese von VEGF in Tumorzellen fraglich induziert.

Während das Integrin  $\alpha\beta 3$  (CD51/61), vWF sowie das rattenspezifische Endothelmolekül OX43 nicht oder nicht eindeutig nachgewiesen wurden, konnten immunhistochemisch die Gefäßmarker CD31 (PECAM), RCA, EBA und in geringerem Umfang CD54 (ICAM)

eindeutig nachgewiesen werden. Im Tumor waren Gefäße vor allem am Tumorrand lokalisiert.

Der Nachweis von EBA spricht für eine intakte Blut-Hirn-Schranke am Tumorrand und bei Tumorausläufern, dagegen für eine Blut-Hirn-Schrankenstörung im Tumorzentrum. Hiermit eignet sich das F98 Tumorumplantationsmodell allgemein für pharmakologische Studien.

Auf Fibroblasten und Endothelzellen kann CD54 durch IL-1, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  induziert und hochreguliert werden. Die niedrige TNF- $\alpha$ -Expression sowie der fehlende Nachweis von IFN- $\gamma$  könnten die spärliche CD54 Markierung erklären.

Die Expression von  $\alpha v \beta 3$  wird bei invasiven Tumoren unter anderen von VEGF hochreguliert. Die hier gefundene niedrige VEGF-Expression könnte den fehlenden Nachweis von  $\alpha v \beta 3$  erklären.

Zwei bekannte Wege führen zur Angiogenese. Der erste läuft über  $\alpha v \beta 3$ , TNF  $\alpha$  und bFGF; der Zweite über das Integrin  $\alpha \beta 5$ , VEGF, TGF $\alpha$  und Phorbolster. Da FGF2 hochreguliert war, könnte es in dieser Studie auf den ersten Weg hinweisen, wobei  $\alpha v \beta 3$  nicht nachzuweisen war.

Der fehlende Nachweis von vWF könnte durch das Fehlen von  $\alpha v \beta 3$  erklärt werden, da  $\alpha v \beta 3$  die zelluläre Adhäsion von vWF vermittelt.

Dass OX43 nicht eindeutig nachgewiesen wurde ist wahrscheinlich damit zu erklären, dass es nur große Gefäße markiert und sich hier nur kleine Kapillare fanden.

Die semiquantitative Gefäßdichteerfassung anhand der Marker RCA, EBA und CD31 zeigte sehr unterschiedliche Ergebnisse je nach Versuchsreihe und Marker. Im Versuch II waren mehr mit RCA markierte Gefäße im Tumor der Verumgruppe gegenüber der Kontrollgruppe und weniger mit EBA und CD31 markierte Gefäße. Im Versuch III fielen die Ergebnisse umgekehrt aus.

Wie bei anderen Untersuchungen, ist möglicherweise die Anzahl der Tiere nicht ausreichend, um signifikante Ergebnisse zu bekommen.

Im Tumor befand sich die größte Gefäßdichte am Tumorrand und nicht im Zentrum. Dies widerspricht trotz vergleichbarer Versuchsdauer von 21 Tage bei insgesamt deutlichen Gefäßen dem Ergebnis von Seitz et al. 1988, die keinen Unterschied feststellten. Dagegen belegt es trotz kürzerer Versuchsdauer das Ergebnis von Deane und Lantos 1981.

Wir konnten hingegen die Ergebnisse von Seitz et al. 1988 bezüglich der Gefäßmorphometrie bestätigen. Erweiterte Gefäße konnten vor allem im Zentrum von Tumorausläufer nachgewiesen werden, was eine Anpassung an die Tumorversorgung darstellt. Dies kommt ebenfalls durch angiogenetische Mechanismen zustande.

Paraffinschnitte wären für eine Untersuchung der Gefäßmorphometrie jedoch besser geeignet als Kryoschnitten.

Mit den erweiterten Gefäßen am Tumorrand und in der Peripherie ist die Blutversorgung des Tumors zum größten Teil gewährleistet. Es haben sich dann beim Überschreiten einer bestimmten Größe bei einigen Tumoren Gefäße im Tumorzentrum ausgebildet. Dies entspricht der oben genannten Theorie von Wesseling et al. 1997. Dagegen widerspricht es dem Postulat von Folkman (1971), wonach Tumore die Ausbildung eigener Gefäße durch Angiogenese ab einer Größe von 1 mm<sup>3</sup> induzieren. Während bei der durchgeführten Untersuchung alle Tumore des Versuches II mehr als 1 mm<sup>3</sup> Volumen hatten (s. u. 4.4.2.3 Onkometrie), wurden anhand CD31 immunhistochemisch Gefäße im Tumorzentrum nur bei 4 der 6 Tumoren der Kontrollgruppe und 3 der 5 Tumoren der Verumgruppe nachgewiesen. Diese Gefäße konnte man jedoch nicht mit EBA färben, was für eine Blut-Hirn-Schrankenstörung im Tumorzentrum spricht.

Fraglich bleibt, ob diese neu gebildeten Gefäße eine ausreichende Versorgung gewährleisten, da sie sich in der Nachbarschaft einer Nekrose befinden (Wesseling et al. 1997). Möglich ist es wiederum, dass diese beobachteten Nekrosen zuerst vorkommen, eine gewisse Zeit weiter bestehen, und durch Hypoxie die Angiogenese induzieren. In unseren Tumoren waren dagegen kleine Tumorgefäße ohne Nekrose zu finden.

## 6. Zusammenfassung

Bei der Untersuchung der antiproliferativen Wirkung Thalidomids bei Gliomen am Beispiel des F98 Transplantationstumors der Ratte zeigte das Modell eher das histologische Bild eines infiltrativen kleinzelligen Glioblastoms. Die Histotypisierung bestätigte jedoch seine Eignung als Modell eines malignen humanen Glioblastoms. Die Ki67 (Mib5)-Proliferationsrate zwischen 3,3 und 17,80% entsprach derjenigen eines typischen Glioblastoms.

Während apoptische Zellen im Tumor wie in der Peripherie nachzuweisen waren, konnte Thalidomid kein Effekt auf die Apoptose zugeschrieben werden.

Es konnte im Gegensatz zu vorherigen Erkenntnissen gezeigt werden, dass Thalidomid bei Nagern in das Hirnparenchym über eine am Tumorrand und bei Tumorausläufer intakte Blut-Hirn-Schranke gelangt und bei den Tieren eine sedierende Wirkung hervorruft.

Eindeutig, aber nicht signifikant, wirkt Thalidomid antiproliferativ, was sich nicht direkt anhand des Proliferationsindex zeigte, sondern über eine Verminderung der Tumorgröße.

Möglich immunologische Mechanismen sowie der immunologische Effekt von Thalidomid konnten mit dem hier vorliegenden Transplantationstumor aufgrund des fehlenden Nachweises wichtiger Faktoren nicht hinreichend untersucht werden. Das Fehlen von Lymphozyten und Makrophagen könnte das Fehlen von IFN- $\gamma$  erklären, was wiederum die geringen Mengen an TNF- $\alpha$  nach sich zieht. Es konnte kein eindeutiger Effekt Thalidomids auf TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden.

Entgegen Folkmans Postulat wurde keine sichere Angiogenese trotz Überschreitung der Tumorgröße von 1 mm<sup>3</sup> induziert. Das Tumorstadium war unabhängig von der VEGF-Expression, was den fehlenden Nachweis von  $\alpha v \beta 3$  erklärt. Einzelnen Gefäße im Tumorzentrum zeigten eine defekte Blut-Hirn-Schranke.

Viel mehr wurde die Blutversorgung über erweiterte Gefäße am Tumorrand und im Zentrum der Tumorausläufer gewährleistet, deren Blut-Hirn-Schranke intakt war.

Das Fehlen von Nekrosen könnte trotz Hochregulierung der FGF2-Expression den fehlenden Nachweis von löslichem FGF2 erklären. Die geringe Gefäßdichte schränkt die Eignung des

Modells im Hinblick auf die tumor-assoziierte Angiogenese ein. Ein signifikanter Einfluss von Thalidomid auf VEGF, FGF2 sowie auf die Gefäßdichte konnte nicht festgestellt werden.

Im Hinblick auf die Angiogenese könnten Paraffinschnitte weitere Einzelheiten bezüglich der Gefäßmorphometrie liefern.

Was die Untersuchung der Thalidomidwirkungen angeht, könnte eine größere Anzahl von Tieren signifikante Ergebnisse ermöglichen.

---

## 7. Literaturverzeichnis

Ando Y., E. Fuse, W.D. Figg. Thalidomide metabolism by the CYP2C subfamily. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*; 2002; VOL: 8 (6); p. 1964-73 /200206/.

Arosarena O., C. Guerin, H. Brem, and J. Laterra. Endothelial differentiation in intracerebral and subcutaneous experimental gliomas. *Brain Res* 1994 mar 21; 640(1-2): 98-104.

Arrieta O., P. Guevara, J. Tamariz, D. Rembao, E. Rivera, and J. Sotelo. Antiproliferative effect of thalidomide alone and combined with carmustine against C6 rat glioma. *Int J Exp Pathol* 2002; 83: 99-104.

Aseffa A., M.A. Dietrich, E.J. Shannon. Effect of Thalidomid on apoptosis of lymphocytes and neutrophils. *Immunopharmacology and immuntoxicology*. 1997; 19(3): 313-326.

Ausprunk D.H., D.R. Knighton, J. Folkman. Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. Role of host and pre-existing graft blood vessels. *Am. J. Pathol.* 1975; 79: 597-628.

Battagay E. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases and therapeutic prospects. *J Mol Med* 1995; 7: 333-46.

Barth R.F. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol* 1998; 36: 91-102.

Bauer K.S., S.C. Dixon, W.D. Figg. Inhibition of angiogenesis by thalidomide requires metabolic activation, which is species-dependent. *Biochemical pharmacology* 1998; VOL: 55 (11); p. 1827-34.

Berger R., S.M. Abelda, D. Berd, M. Ioffreda, D. Whitaker, G.F. Murphy. Expression on platelet endothelial cell adhesion molecule -1 (PECAM-1) during melanoma- induced angiogenesis in vivo. *Journal of cutaneous Pathology*. 1993; 20, 399-406.

Bigner D.D., C. Shold, S.H. Bigner, D.E. Bullard, C. Wirkstrand. How heterogeneous are gliomas? *Cancer treat Rep* 1981(supp. 2) 65: 45-49.

Brem H., S. Piantadosi, P.C.. Burger, M. Walker, R. selker, N.A. Vick, K. Black, M. Sisti, S. Brem, G. mohr, and et al. Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain treatment Group. *Lancet* 1995, 345: 1008-12.

Brooks P.C., A.M. Montgomery, M. Rosenfeld, R.A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier, D.A. Cheresh.. Integrin  $\alpha\beta 3$  antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*. 1994; 79, 1157-64.

Candece L., M.D. Gladson. Expression of integrin  $\alpha\beta 3$  in small blood vessels of Glioblastoma tumors. *Journal of Neuropathology and experimental neurology* Vol.55, No. 11, Nov. 1996 ; pp. 1143-1149.

---

Coomber B.L., J. Denton, A. Sylvestre, S. Kruth. Blood vessel density in canine osteosarcoma. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1998 Jul; 62; 3; 199-204.

Coons S.W., P.C. Johnson, D.K. Pearl. The prognostic of Ki-67 labeling indices for oligodendrogliomas. *Neurosurgery* 1997 Oct; 41(4): 878-84; discussion 884-5.

Cox D.J., G.J. Pilkington, P.L. Lantos. The fine structure of blood vessels in ethylnitrosourea-induced tumours of the rat nervous system. With special reference to the breakdown of the blood-brain barrier. *Br J Exp Pathol* 1976; 57:419-430.

Culver K.W., Z. Ram, S. Wallbridge, H. Ishii, E.H. Oldfield, and R.M. Blaese. *In vivo* gene transfert with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 1992, 256: 1550-2.

D'Amato R.J., M.S. Loughnan, E. Flynn, J. Folkman. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:4082-1.

Daniel T.O., H. Liu, J.D. Morrow, B.C. Crews, L.J. Marnett. Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res* 1999; 59: 4574-77.

David F. Stefanik, Laila R. Rizkalla, Anuradha Soi, Sidney A. Goldblatt, and Waheeb M. Rizkalla. Acidic and Basic Fibroblast Growth Factors are present in Glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 1991 Oct 15; 51: 5760-65.

Deane B.R., P.R. Lantos. The vasculature of experimental brain tumours. Part 1: a sequential light and electron microscope study of angiogenesis. *J Neurol Sci* 1981; 49:55-66.

Dreys J., I. Hofman, H. Hugenschmidt, C. Wittig, H. Madjar, M. Mueller, J. Wood, G. Martiny-Baron, C. Unger, D. Marme. Effects of PTK787/ZK222584, a specific inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase, on primary tumor, metastasis, vessel density, and blood flow in a murine renal cell carcinoma model. *Cancer Res* 2000 Sep 1; 60; 17; 4819-24.

Eriksson T., S. Bjorkman, B. Roth, H. Bjork, and P. Hoglund. Hydroxylated metabolites of thalidomide: formation *in vitro* and *in vivo* in man. *J Pharm Pharmacol* 1998; 50: 1409-16.

Fabro S., H. Schumacher, R.L. Smith, R.B.L. Stagg, R.T. Williams. The metabolism of thalidomide: Some biological effects of thalidomide and its metabolites. *Br J Pharmacol* 1965; 25:352-62.

Fajardo L.F. et al. Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *American Journal of Pathology* 1992; 140(3): 539-42.

Fine H.A., W.D. Figg, K. Jaeckle, P.Y. Wen, A.P. Kyrisitis, J.S. Loeffler, V.A. Levin, P.M. Black, R. Kaplan, J.M. Pluda, and W.K. Yung. Phase II trial of the angiogenic agent thalidomide in patients with recurrent high-grade gliomas. *J Clin Oncol* 2000; 18: 708-15.

- 
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285 (21): 1182-1186.
- Folkman J., K. Watson, D. Ingber, and D. Hanahan. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989; 339: 58-61.
- Friedlander M., P. Brooks, R. Shaffer, C. Kincaid, J. Varner, D. Cheresch. Two pathways of angiogenesis defined by homologous alpha v integrins. *Science* 1995; 270:1500-1502.
- Fujimiya Y., Y. Suzuki, R. Katakura, T. Miyagi, T. Yamaguchi, T. Yoshimoto, and T. Ebina. *In vitro* interleukin 12 activation of peripheral blood CD3(+) CD56(+) and CD3(+) CD56(-) gamma delta T cells from glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 633-43.
- Fujita J., J.R. Mestre, J.B. Zeldis, K. Subbaramaiah, A.J. Dannenberg. Thalidomide and its analogues inhibit lipopolysaccharide-mediated Induction of cyclooxygenase-2. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3349-55.
- Gimbrone M.A., S. Leapman, R.S. Cotran, J. Folkman. Tumor dormancy *in vivo* by prevention of neovascularization. *Journal of Experimental Medicine* 1972; 136 (2): 261-276.
- Gladson C.L. and Cheresch D.A. Glioblastoma expression of Vitronectin and the  $\alpha\beta 3$  Integrin: Adhesion Mechanism for Transformed Glial Cells. *J Clin Invest* 1991;88:1924-1932.
- Gordon G.B., S.P. Spielberg, D.A. Blake, V. Balasubramanian. Thalidomide teratogenesis: evidence for a toxic arene oxide metabolite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; VOL 78, ISS 4, P2545-8.
- Gould S.J., S. Howard. An immunocytochemical study of the germinal layer vasculature in the developing fetal brain using Ulex europeus 1 lectin. *Journal of Pathology* 1988 Oct; 156; 2; 129-35.
- Gulyaev A.E., S.E. Gelperina, I.N. Skidan, A.S. Antropov, G.Y. Kivman, L. Kreuter. *Pharmaceutical Research* 1999 Oct, 16; 10: 1564-9.
- Hagedorn H.G., A.G. Nerlich. Microvessel density and endothelial basement membrane composition in laryngeal squamous cell carcinomas. *Acta Oto-Laryngologica* 2000 Oct; 120; 7; 891-8.
- Hanahan Douglas and J. Folkman. Pattern and emerging mechanisms of the angiogenic switch during angiogenesis. *Cell*, 1996 August 9; Vol. 86, 353-364.
- Hirano A., N.R. Ghatak, N.H. Becker, H.M. Zimmerman. A comparison of the fine structure of small blood vessels in intracranial and retroperitoneal malignant lymphomas. *Acta neuropathol (Berl)* 1974; 27:93-104.
- Hirano A., T. Matsui. Vascular structures in brain tumors . *Human Pathol* 1975; 6:611-621.
- Ishikawa M. Thalidomide promotes the release of TNF alpha and lethality by LPS in mice. *Bio Pharm Bull* 1998 Jun 21 (6) 638-40.

- 
- Kamat, B.R., L.F. Brown, E.J. Manseau et al. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. *Am. J. Pathol.* 1995; 146, 157–165.
- Kaya M., L. Chang, A. Truong, M.W. Brightman. Chemical induction of fenestrae in vessels of the blood-brain barrier. *Exp Neurol* 1996; 142:6.
- Kirsch M., J. Strasser, R. Allende, L. Bello, J. Zhang, and P.M. Black. Angiostatin suppresses malignant glioma growth *in vivo*. *Cancer Res* 1998, 58: 4654-9.
- Kitadai Y., K. Haruma, T. Tokutomi, S. Tanaka, K. Sumii, M. Carvalho, M. Kuwabara, K. Yoshida, T. Hirai, G. Kajiyama, E. Tahara. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas. *Clinical Cancer Research* 1998 Sep; 4; 9; 2195-200.
- Kleihues P, F. Soylemezoglu, B. Schaeuble, B.W. Scheithauer, P.C. Burger. Histopathology, classification, and grading of gliomas. *Glia* 1995 Nov; 15; 3; 211-21.
- Kleihues P., and L.H. Sobin. WHO classification of tumors. *Cancer* 2000; 88: 2887.
- Kleihues P., D.N. Louis, B.W. Scheithauer, L.B. Rorke, G. Reifenberger, P.C. Burger, and W.K. Cavenee. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61: 215-25; discussion 226-9.
- Knupfer M.M., H. Knupfer, S. Van Gool, M. Domula, and J.E. Wolff. Interferon gamma inhibits proliferation and hyaluronic acid adhesion of human malignant glioma cells *in vitro*. *Cytokine* 2000, 12:409-12.
- Ko L., Koestner A. and Wechsler. Morphological characterization of nitrosourea-induced glioma cell lines and clones. *Acta neuropathol (Berl)* 1980; 51: 23-31.
- Kominsky S., H.M. Johnson, G. Bryan, T. Tanabe, A.C. Hobeika, P.S. Subramaniam, and B. Torres. IFN $\gamma$  inhibition of cell growth in glioblastoma correlates with increased levels of the cyclin dependant kinase inhibitor p21WAF1/C1P1. *Oncogene* 1998, 17: 2973-9.
- Kunkel P., U. Ulbricht, P. Bohlen, M.A. Brockman, R. Fillbrandt, D. Stavrou, M. Westphal, and K. Lamszus. Inhibition of glioma angiogenesis and growth *in vivo* by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2. *Cancer Res* 2001, 61: 6624-8.
- Li J., M. Perrella, J.C. Tsai, C.M. Hsieh, M. Yoshizumi, C. Patterson, W.O. Endege, F. Zhou and M.E. Lee. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 in rat aortic smooth muscle cells. *J. Bio. Chem.* 1995; 270:308-312
- Li X., X. Liu, J. Wang, Z. Wang, W. Jiang, E. Reed, Y. Zhang, Y. Liu, and Q.Q. Li. Thalidomide down-regulates the expression of VEGF and bFGF in cisplatin-resistant human lung carcinoma cells. *Anticancer research* 2003 May-Jun; VOL: 23 (3B); p. 2481-7.

---

Liu W.M., S.J. Strauss, T. Chaplin, S. Shahin, D.J. Propper, B.D. Young, S.P. Joel, J.S. Malpas. S-Thalidomide has a greater effect on apoptosis than angiogenesis in a multiple myeloma cell line. *Hematol J.* 2004; 5(3): 247-54.

Lund E.L., C. Thorsen, M.W. Pedersen, N. Junker, Kristjansen P.E. Relationship between vessel density and expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in small cell lung cancer in vivo and in vitro. *Clinical Cancer Research* 2000 Nov; 6; 11; 4287-91.

Ma H.I., P. Guo, J. Li, S.Z. Lin, Y. H. Chiang, X. Xiao, and S.Y. Cheng. Suppression of intracranial human glioma growth after intramuscular administration of an adeno-associated viral vector expressing angiostatin. *Cancer Res* 2002, 62: 756-63.

Machein M.R., J. Kullmer, V. Ronicke, U. Machein, M. Krieg, A. Damert, G. Breier, W. Risau, and K.H. Plate. Differential downregulation of vascular endothelial growth factor by dexamethasone in normoxic and hypoxic rat glioma cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1999; 25: 104-12.

Marx G.M., N. Pavlakis, S. McCowatt, F.M. Boyle, J.A. Levi, D.R. Bell, R. Cook, M. Biggs, N. Little, and H.R. Wheeler. Phase II study of thalidomide in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2001; 54: 31-8.

Ménage P., G. Thibault, Y. Lebranchu, M. Jan, P. Bardos. Deficiency of CD4+CD45RA+ Lymphocytes in patients with glioblastoma multiforme. *EJM* Oct. 1992; 362-364.

Nasu R., H. Kimura, K. Akagi, T. Murata, Y. Tanaka. Blood flow influences vascular growth during tumour angiogenesis. *Br J Cancer* 1999 Feb;79(5-6):780-6.

Nathan C.A., S. Franklin, F.W. Abreo, R. Nassar, A. de Benedetti, J. Williams, F.J. Stucker. Expression of eIF4E during head and neck tumorigenesis: possible role in angiogenesis. *Laryngoscope* 1999 Aug; 109; 8; 1253-8.

Neubert R., A.C. Nogueira, D. Neubert. Thalidomide derivatives and the immune system. Changes in the pattern of integrin receptors and other surface markers on T lymphocyte populations of marmoset blood. *Arch Toxicol* 1993;67:1-17.

Nishio S., M. Otha, M. Abe, K. Kitamura. Microvascular abnormalities in ethylnitrosorea (ENU)-induced-rat brain tumors: Structural basis for altered blood-brain barrier function. *Acta Neuropathol (Berl)* 1983; 59:1-10.

Or R., R. Referman and S Shoshan. Thalidomide reduces vascular density in granulation tissue of subcutaneously implanted polyvinyl alcohol sponges in guinea pigs. *Exp Hematol* 1998; 26: 217-21.

Paulus W., C. Grothe, M. Sensenbrenner et al. Localization of bFGF, a mitogen and angiogenic factor, in human brain tumors. *Acta neuropathologica* 1990; 79: 418-423.

Peoc'h M., G. Le Duc, A. Trayaud, R. Farion, J.F. Le Bas, B. Pasquier, C. Remy. Quantification and distribution of neovascularization following microinjection of C6 glioma cells in rat brain. *Anticancer research* 1999 jul-Aug; 19; 4B; 3025-30.

- 
- Pepper M.S., S.J. Mandriota, J.-D. Vassalli, L. Orci, R. Montesano. Angiogenesis-regulating cytokines: activities and interactions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996; 213: 31-67.
- Peroulis I., N. Jonas, and M. Saleh. Antiangiogenic activity of endostin inhibits C6 glioma growth. *Int J Cancer* 2002, 97: 839-45.
- Petersen K.U. Händige Pharmaka: Chiral Switch-Auf der Suche nach optischen Isomeren. *Deutsches Ärzteblatt* 2000; 97:A-3089.
- Phillips, H.S., J. Hains, D.W. Leung, et al. Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology* 1990; 127, 965–967.
- Plate K.H., G. Breier, H.A. Weich, H.D. Mennel, W. Risau. Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. *Int J Cancer.* 1994 Nov 15;59(4):520-9.
- Pober J.S., M.A. Gimbrone, L.A. Lapierre, D.L. Mendrick, W. Fiers, R. Rothlein, T.A. Springer. Overlapping patterns of activations of human endothelial cells by IL-1, TNF and immune IFN. *J. immunol.* 1986; 137, 1893-96.
- Poeck K., W. Hacke. Neurologie . *Springer-Verlag.* 11. Auflage. 2001.
- Reifenberger G., T. Bilzer, R.J. Seitz and W. Wechsler. Expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in ethylnitrosurea-induced rat gliomas and glioma cell lines. *Acta neuropathol (Berl)* 1989; 78:270-82.
- Reinhold H.S., A. van den Berg Blok. Vascularization of experimental brain tumors. In: Nugent J, O'Connor M., (eds) Development of the vascular system. *Ciba Foundation Symposium 100. Pitman Books*, London 1983; pp100-119.
- Riseau W. Differentiation of endothelium. *FASEB J.* 1995; 9: 926-33.
- Robinson A.P., T.M. White, D.W. Mason. MRC OX-43: a monoclonal antibody which reacts with vascular endothelium in the rat except that of brain capillaries. *Immunology* 1986; 57:231 – 247.
- Saski M., and K.H. Plate. Gene therapy of malignant glioma: recent advances in experimental and clinical studies. *Ann Oncol* 1998, 9: 1155-66.
- Seitz, R. J., M. Deckert and W. Wechsler. Vaskularization of syngenic intracerebral RG2 and F98 rat transplantation tumors. A histochemical and morphometric study by use of ricinus communis agglutinin I. *Acta neuropathol (Berl)* 1988; 76: 599-605.
- Senger D.R., C.A. Perruzzi, J. Feder, H.F. Dvorak. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res.* 1986; 46: 5629-5632.
- Short S.C., D. Traish, A. Dowe, F. Hines, M. Gore, and M. Brada. Thalidomide as an anti-angiogenic agent in relapsed gliomas. *J Neurooncol* 2001; 51: 41-5.

---

Stephens T.D., C.J. Bunde, B.J. Fillmore. Mechanism of action in thalidomide teratogenesis. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 1489–99.

Sternberger N.H., L.A. Sternberger: Blood-brain barrier protein recognized by monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:8169.

Sternberger N.H., L.A. Sternberger, M.W. Kies, C.R. Shear. Cell surface endothelial proteins altered in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 21:241, 1989.

Stewart P.A., K. Hayakawa, E. Hayakawa, C.L. Farrell and R.F. Del Maestro. A quantitative study of Blood-brain barrier permeability Ultrastructure in a new rat glioma model. *Acta neuropathl (Berl)* 1985; 67:96-102.

Takano S, K. Tsuboi, Y. Tomono; Y. Mitsui, T. Nose. Tissue factor, osteopontin, alphavbeta3 integrin expression in microvasculature of gliomas associated with vascular endothelial growth factor expression.. *British journal of Cancer* 2000 Jun; 82; 12; 1967-73.

Teo S.K., P.J. Sabourin, K O'Brien, K.A. Kook, S.D. Thomas. Metabolism of thalidomide in human microsomes, cloned human cytochrome P-450 isozymes, and Hansen's disease patients. *J Biochem Mol Toxicol*; VOL 14, ISS 3, 2000, P140-7.

Tsai J.C., C.K. Goldman, and G.Y. Gillespie. Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF-BB, and bFGF. *J Neurosurg* 1995;82(5): 864-73.

Waggener J.D., J.L. Beggs. Vasculature of neural neoplasms. *Adv Neurol* 1976; 15:27-49.

Wang C., M.E. Quevodo, B.J. Lannutti, K.B. Gordon, D. Guo, W. Sun, and A.S. Paller. *In vivo* gene therapy with interleukin-12 inhibits primary vascular tumor growth and induces apoptosis in a mouse model. *J invest Dermatol* 1999, 112: 775-81.

Wesseling P., D. J. Ruiter, P.C. Burger. Angiogenesis in brain tumors; pathobiological and clinical aspects. *J Neurooncol* 1997, 32 (3): 253-65.

Yamada M., M. Kawai, Y. Kawai, Y. Mashima. The effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on corneal angiogenesis in the rat. *Curr Eye Res* 1999; 19: 300–04.

Yoshimura F., T. Kaidoh, T. Inokuchi, and M. Shigemori. Changes in VEGF expression and in the vasculature during the growth of early-stage ethylnitrosourea-induced malignant astrocytomas in rats. *Virchows Arch* 1998; 433: 457-63.

# Lebenslauf

Morgane Legendre  
Himmelgeisterstrasse 111  
40225 Düsseldorf

Geburtsdatum 10.08.1976  
Geburtsort Saint-Nazaire (Frankreich)  
Staatsangehörigkeit Französisch  
Familienstand verheiratet

**Bildungsweg** Seit 06/2004 ÄIP /Assistenzärztin Neurologie Franziskuskrankenhaus - Mönchengladbach  
11/2000 - 2005 Experimentelle Doktorarbeit in dem neuro-onkologischem Labor der Neurochirurgie bei PD Fr. Dr. med. Messing-Jünger : „Untersuchungen zur antiproliferativen Wirkung von Thalidomid bei Gliomen am Beispiel des F98 Transplantationstumors der Ratte“  
04 / 2003 – Praktisches Jahr Marienhospital Düsseldorf  
04 / 2004 (Wahlfach Neurologie)  
1998 -2004 Medizinstudium (Heinrich Heine Universität Düsseldorf); Physikum 03/2000; 1. Staatsexam 03/2001; 2. Staatsexam 03/2003; 03. Staatsexam 04/2004  
1997-1998 „Licence“ in Biochemie – Heinrich Heine Universität Düsseldorf (5. und 6. Semester, Hauptstudium) (Erasmus Austausch)  
1996-1997 Grundstudium mit Abschluß Vordiplom in Biologie - Universität Nantes (Frankreich)  
1994-1996 Medizinstudium - Universität Nantes (Frankreich)  
1992-1994 Gymnasium Oberstufe „Lycée Galilée“ in Guérande (Frankreich)  
Abschluß: Abitur Schwerpunkt Naturwissenschaften  
1987-1992 Gymnasium Unterstufe „Collège J.Brel“ in Guérande (Frankreich)  
1982-1987 Grundschule „Le Pradonnais“ in Guérande (Frankreich)

## Bisherige Tätigkeiten

### Praktika / Famulaturen

10 / 2002 Famulatur in der Neurologie - Uni -Klinik Düsseldorf  
09 / 2002 Praktikum in einer Praxis für Allgemeinmedizin - Düsseldorf  
08 / 2002 Famulatur in der Orthopädie (Ambulanz) - Uni -Klinik Düsseldorf  
02-03 / 2002 Famulatur Pädiatrie inkl. Neuropädiatrie (Ambulanz) - Uni –Klinik Düsseldorf  
08 / 2001 Famulatur in der Neurochirurgie - Uni-Klinik Düsseldorf  
08-09 / 2000 Auslandsfamulatur in der Pädiatrie und Gynäkologie - Mali / Afrika  
07 / 2000 Famulatur in der inneren Medizin - Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf  
10 / 1999 Praktikum „Immunmarkierung“ - Uni-Klinik Düsseldorf  
09 / 1999 Kurs über Methoden der Humangenetik – HHU Düsseldorf  
03 / 1999 Krankenpflegepraktikum in der Pädiatrie - Uni-Klinik Düsseldorf  
08 / 1998 Krankenpflegepraktikum in der Neurologie - Uni-Klinik Düsseldorf  
06-07 / 1997 Freiwilliges zweimonatiges Praktikum im Labor für Virologie (Uni-Klinik Nantes):  
Aufgabe: „Vergleich zweier Detektionstechniken der Antigenität des Cytomegalovirus CMV“

## Qualifikationen

- Sonographie- und Computer Tomographie (CT)- Scheine (HHU Düsseldorf)
- Sprachkenntnisse: französisch (Muttersprache), deutsch, englisch, arabisch
- Computerkenntnisse (MS-Office, SPSS)

## Sozialengagement

Seit 1999 Aktive Mitgliedern des Vereins „Konna e.V. , Verein zur Förderung der Gesundheit in Mali“(Afrika)  
04 – 10 / 2002 Ehrenamtliche Mitarbeiterin bei dem Verein „Medizinische Hilfe für Wohnungslose Düsseldorf e.V.“

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die Promotion mit dem Thema

„ Untersuchung zur antiproliferativen Wirkung von Thalidomid bei Gliomen am Beispiel der F98 Transplantationstumor der Ratte“

an der neurochirurgischen Klinik der Uni-Klinik Düsseldorf unter der Betreuung von Fr. Dr. med. PD Messing-Jünger eingeständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner Institution eingereicht habe.

Es existiert keine vorherigen Promotionsversuche.

Düsseldorf, den 14.08.2005

# Untersuchungen zur antiproliferativen Wirkung von Thalidomid bei Gliomen am Beispiel des F98 Transplantationstumors der Ratte

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von Morgane Legendre

---

## Abstract

**Einleitung:** Trotz unklarem Mechanismus wurde Thalidomid in letzter Zeit bei immunologischen wie neoplastischen Erkrankungen vermehrt bei Patienten eingesetzt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Wirkung von Thalidomid auf die Proliferation des syngenen, malignen Implantationsgliommodells F98 der CD Fischer Ratte.

**Methoden:** 3 Versuchsreihen (14, 12 und 16 Tiere): am Tag 1 Implantation (4 bzw.  $5 \times 10^5$  F98 Zellen in linke Stammganglienregion); ab Tag 7 Thalidomid intraperitoneal 200mg/kg Körpergewicht/d in DMSO versus Kontrollgruppe DMSO 14 Tage lang; am Tag 21 Tötung der Tiere.

Histologie, Proliferationstest mit MTT, Onkometrie, RP-HPLC, Immunhistochemie, *in situ* Hybridisierung, ELISA, Western Blot, RT-PCR.

**Ergebnisse:** Histologisch zeigte sich das Bild eines infiltrativen kleinzelligen Glioblastoms. Die Histotypisierung (GFAP, S100 und Vimentin) und die Ki67 (Mib5)-Proliferationsrate zwischen 3,3 und 17,80% bestätigen jedoch seine Eignung als Modell eines malignen humanen Glioblastoms.

Aufgrund des Fehlens von Nekrosen, Ödemen und Einblutungen, sowie der eingeschränkten immunologischen Reagibilität und Angiogeneese ist dieses Tumormodell nicht für alle Fragestellungen optimal geeignet.

Im Gegensatz zu vorherigen Erkenntnissen gelangt Thalidomid über eine am Tumorrand und bei Tumorausläufern intakte Blut-Hirn-Schranke in das Hirnparenchym und ruft bei den Nagern eine sedierende Wirkung hervor. Eindeutig (aber nicht signifikant) wirkt Thalidomid antiproliferativ (Verminderung des Tumolvolumens). Im Tumor waren VEGF und TNF $\alpha$  herunterreguliert. FGF2 war hochreguliert. Thalidomid führt zu einer verringerten FGF2 Expression.

**Schlussfolgerungen:** Der F98 Transplantationstumor ist als Glioblastommodell geeignet. Statt über neu gebildete Gefäße erfolgt die Blutversorgung des Tumors im Modell über Erweiterungen präexistenter Gefäße, was ebenfalls angiogenetischen Mechanismen unterliegt. Thalidomid wirkt über eine intakte Blut-Hirn-Schranke sedierend bei Ratten und - möglicherweise über FGF2-Inhibition - antiproliferativ.