

**Aus der Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik
Tübingen**

Abteilung Radioonkologie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Bamberg

**In vivo Untersuchungen zur Wirksamkeit des
agonistischen TRAIL-Rezeptorantikörpers HGS-ETR-2
(Lexatumumab) in Kombination mit ionisierender
Strahlung im Nacktmausmodell mit einem
Coloncarcinom-Xenograftsysteem**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Dirk Andreas Albrecht Schiller

aus

Leonberg

2010

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. C. Belka

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Salih

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Zelltodmechanismen	1
1.1.1	<i>Apoptose vs. Nekrose</i>	1
1.1.2	<i>Apoptose durch extrinsischen und intrinsischen Signalweg</i>	3
1.2	Strahlentherapie	6
1.3	Die Familie der Zelltodrezeptoren und ihre Liganden	7
1.3.1	<i>Die Entdeckung der Zelltodrezeptorliganden</i>	7
1.3.2	<i>TRAIL</i>	9
1.3.3	<i>Die Zelltodrezeptoren</i>	11
1.4	HGS-ETR-2 / Lexatumumab	13
1.5	Resistenzmechanismen gegen den extrinsischen Signalweg und die Spezifität der TRAIL-Rezeptor vermittelten Apoptose	15
1.6	Kombinationsbehandlung mit Strahlentherapie und TRAIL-Rezeptorstimulation	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Tiermodell	19
2.2	Xenograftmodell	20
2.3	Geräte und verwendete Substanzen	21
2.3.1	<i>Verwendete Substanzen</i>	21
2.3.2	<i>Bestrahlungssystem</i>	22
2.4	Therapie	23
2.4.1	<i>Fraktionierte Bestrahlung</i>	23
2.4.2	<i>Applikation des Antikörpers HGS-ETR-2/Lexatumumab</i>	23
2.5	Studienaufbau	24
2.5.1	<i>Randomisation</i>	24
2.5.2	<i>Versuchsaufbau</i>	25
2.5.3	<i>Nachbeobachtung</i>	26
2.6	Auswertung	27
2.6.1	<i>Ausschlusskriterien</i>	27
2.6.2	<i>Zensierte Daten</i>	28
2.6.3	<i>Wachstumsverhalten</i>	28
2.6.4	<i>Toxizität der Therapie</i>	29
3	ERGEBNISSE.....	30
3.1	Dosisabhängigkeit der Effektivität von HGS-ETR-2 /Lexatumumab	30
3.2	Effektivität der Kombinationsbehandlung	32

INHALTSVERZEICHNIS

3.3	Vergleich der Tumorverdoppelungszeiten der verschiedenen Behandlungsstrategien	35
3.4	Kaplan-Meier-Darstellungen	40
3.5	Toxizität der Therapie	44
3.6	Exemplarischer Behandlungsverlauf eines Xenograft-Tumors	45
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	48
4	DISKUSSION.....	51
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	62
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	63
7	ANHANG.....	73

1 EINLEITUNG

Die drei Säulen der klassischen onkologischen Therapie sind Chirurgie, Chemotherapie und Radiotherapie. Nur der gemeinsame, interdisziplinäre Einsatz dieser drei grundlegenden Prinzipien kann die Basis für eine optimale und chancenreiche Behandlungsstrategie gegen viele bösartige Tumorerkrankungen bieten.

In den vergangenen Jahren rückten maligne Neoplasien aufgrund ihrer steigenden Prävalenz und der hohen Mortalität in den Mittelpunkt des medizinisch-wissenschaftlichen Interesses. So stehen in der Todesursachenstatistik der BRD die Krebserkrankungen gleich hinter den kardiovaskulären Erkrankungen (Statistisches Bundesamt). Das in dieser Arbeit untersuchte kolorektale Karzinom stellt dabei die dritthäufigste Tumorerkrankung in westlichen Industrieländern dar. Der Umstand, dass nur 30-70% der Patienten mit lokal fortgeschrittenen Tumoren geheilt werden, demonstriert die Notwendigkeit verbesserter Behandlungskonzepte.

Vor allem die Strahlentherapie stellt aufgrund ihrer jüngeren Geschichte, im Vergleich zu anderen Disziplinen, eine Therapiemöglichkeit dar, dessen Potential erst im Beginn steht ausgeschöpft zu werden und deren Kombination mit anderen, molekular zielgerichteten Therapieansätzen außerordentlich vielversprechend ist.

In den folgenden Kapiteln werden sowohl die zugrundeliegenden Mechanismen der Strahlentherapie als auch die Möglichkeiten einer erfolgversprechenden Kombinationstherapie mit zielgerichteten Therapieansätzen erläutert.

1.1 Zelltodmechanismen

1.1.1 Apoptose vs. Nekrose

Ziel der Strahlentherapie ist die Vernichtung klonogener Tumorzellen. Die Induktion des Zelltods kann über zwei grundlegend verschiedene Wege erfolgen (s. Abb. 1): Bei der Nekrose wird die Zelle so stark durch die Noxe

geschädigt, dass sie abstirbt. Typische Merkmale dieses „unphysiologischen Zelltods“ sind Zellschwellung, Organellzerstörung, Chromatinverlust und verspäteter DNA-Abbau. Der unkontrollierte Zelluntergang führt zu der Freisetzung von Zellbestandteilen und Mediatoren und einer daraus resultierenden Entzündung des betroffenen Gewebes (Gerschenson et al., 1992).

Dem gegenüber steht der sogenannte programmierte Zelltod oder Apoptose. Der Begriff der Apoptose, 1972 erstmals von *Kerr* verwendet (Kerr et al., 1972), bezeichnet die nach einem programmierten Schema ablaufende Selbstzerstörung einer Zelle. Diese unterscheidet sich dabei von der Nekrose in einigen morphologischen und biochemischen Gesichtspunkten. So führt dieser Vorgang zu einer Zellschrumpfung und einer anschließenden Auflösung in apoptotische Körper (apoptotic bodies). Das Chromatin kondensiert und DNA wird fragmentiert. Da dabei der Zellinhalt nicht in das umgebende Gewebe gelangt, sondern die entstandenen Vesikel durch Phagozytose abgeräumt werden, bleibt eine Entzündungsreaktion aus (Gerschenson et al., 1992; Lauber et al., 2003). Abgeräumt werden die apoptotischen Vesikel durch Monocyten und primäre Makrophagen. Diese werden durch freigesetztes Lysophosphatidylcholin und Phosphatidylserin angelockt, die nach Aktivierung der Caspase 3 sowie der Phospholipase A auf die Vesikeloberfläche gelangen. Aufgrund ihrer Aufgabe Zellen anzulocken und apoptotic bodies phagocytieren zu lassen, erhielten sie die Namen *attract-me-* und *eat-me factors* (Lauber et al., 2003).

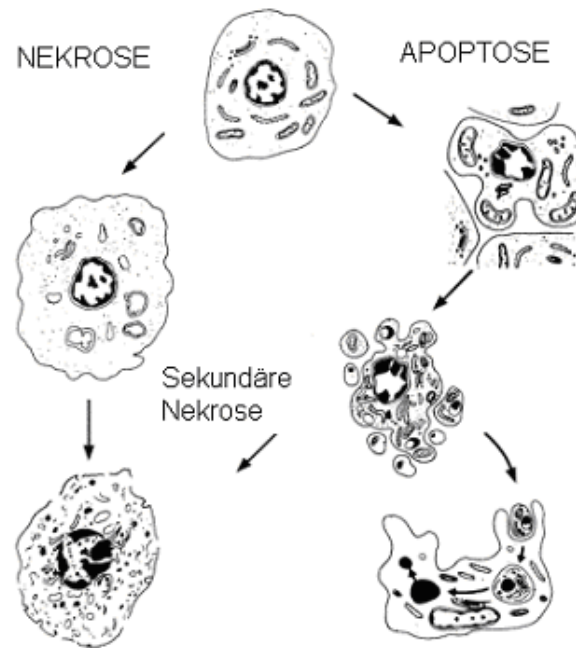


Abb. 1: Zellmorphologie bei ablaufender Nekrose, sekundärer Nekrose und programmiertem Zelltod (Apoptose) einer Zelle. (aus: Blom, 2000)

Aufgrund des geordneten und physiologischen Zelluntergangs nimmt die Apoptose eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts der Zellhomöostase in einem Gewebe ein (Ellis et al., 1991). Bei sich ständig regenerierenden Zellen muss das Abräumen gealterter und geschädigter Zellen gewährleistet sein. Ein Beispiel für diese apoptotische Gewebemöostase ist die Eliminierung von autoreaktiven Lymphozyten im lymphatischen System (Denis et al., 1998). Ebenso können geschädigte Zellen, wenn sie als solche erkannt werden, mit Hilfe apoptotischer Programme ihre eigene Zerstörung einleiten. Auch kann sie von außen induziert werden, bevor diese Zellen als Trägerinnen einer Mutation zum Ausgangspunkt eines Tumors werden (O'Reilly et al., 1999).

1.1.2 Apoptose durch extrinsischen und intrinsischen Signalweg

Es gibt zwei Mechanismen der Apoptoseinduktion. Einer dieser beiden Prozesse wird durch das Binden eines Liganden aus der Familie der Zelltodrezeptorliganden an seinen spezifischen Zelltodrezeptor aktiviert. Die Bedeutung der Zelltodrezeptorfamilien wird in Kapitel 1.3. näher erläutert.

Ausgangspunkt dieser sogenannten extrinsischen Signaltransduktion ist die aus 68 Aminosäuren bestehende, zytoplasmatische Todesdomäne (DD) des Zelltodrezeptors, die durch das Binden des Liganden aktiviert wird (Itoh und Nagata, 1993).

Dem Adapterprotein *Fas-associated death domain* (FADD) ist es nun möglich, an diese Domäne zu binden (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995; Chaudhary et al., 1997). Das Adapterprotein FADD ist ein zytoplasmatisches Protein mit einer Größe von 26 kDa, das sowohl eine C-terminale DD sowie eine Effektor-Todesdomäne (*death effector domain* / DED) enthält. Das Binden von FADD an die aktivierte DD des Rezeptors resultiert in der Rekrutierung der Procaspase 8 an FADD. Zusammen bilden sie den *death-inducing signalling complex* (DISC). Durch Autoaktivierung geht die Procaspase als aktivierte Caspase 8 hervor (Kischkel et al., 1995; Kischkel et al., 2000; Sprick et al., 2000; Bodmer et al., 2000). Ebenso wird eine Aktivierung von Procaspase 10 diskutiert, die die gleiche, extrinsische Signalkaskade in Gang setzt. Die Beteiligung der aktivierten Caspase 10 am extrinsischen Signalweg konnte lange nicht endgültig belegt und die Notwendigkeit ihrer Aktivierung nicht bewiesen werden. Neuere Untersuchungen zeigten allerdings eine regelmäßige Aktivierung dieser Caspase bei Formierung des DISC durch Ligandenbindung an die Zelltodrezeptoren.

Es scheint, dass Caspase 10 die Fähigkeit hat, die Signalkaskade weiterzuführen, eine obligate Beteiligung scheint aber unwahrscheinlich (Kischkel et al., 2001; Wang et al., 2001; Marini et al., 2003).

Caspase 8 spaltet Procaspase 3 direkt zur Effektorcaspase 3 (Suliman et al., 2000). Ebenso werden die Caspasen 6 und 7 aktiviert (Ashkenazi, 2002; Dempsey et al., 2003). Diese Effektorcaspasen sind für die proteolytische Spaltung vieler zellulärer Substrate verantwortlich und führen letzten Endes über Aktivierung verschiedener Enzyme zur endgültigen Fragmentierung der DNA, die den apoptotischen Prozess abschließt (Dempsey et al., 2003).

Entscheidend für den vorliegenden Versuch ist allerdings die Fähigkeit von Caspase 8 auch einen verstärkenden Prozess dieses Vorgangs zu aktivieren. Es handelt sich dabei um eine Quervernetzung der beiden Apoptosewege über

das BH-3-only Protein Bid. Dieses schlägt, aktiviert durch Caspase 8 zu tBid (truncated Bid) die Brücke zum Mitochondrium. tBid aktiviert die mitochondriale, sogenannte intrinsische Signalkaskade der Apoptose (Li et al., 1998). Bid ist, was seine Aminosäuresequenz angeht, ein Verwandter der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine die aus drei homologen Bcl-2 Domänen (bcl-2-homologous domain, BH 1-3) bestehen. BH-3-only Proteine, wie Bid, weisen nur die dritte BH-Domäne auf (Cory, Adam, 2002).

Die verstärkende Quervernetzung dieser beiden Signalwege ist abhängig von der Funktion des Mitochondriums und den Faktoren, welche dieses im Prozess der Zellapoptose freisetzt (Ashkenazi, 2002). Aus dem Mitochondrium freiwerdendes Cytochrom c führt zu einer Oligomerisation von *apoptotic protease activating factor-1* (APAF-1) (Zou et al., 1997). Hierin liegt der Ausgangspunkt für die Bildung des Apoptosoms. Apaf-1 interagiert ATP-abhängig mit einer homologen Domäne der Procaspase 9 (Shiozaki et al., 2002). Das aus den vier Faktoren entstandene Apoptosom spaltet und aktiviert die Effektorcaspasen 3, 6 und 7. Somit endet dieser intrinsische Signalweg der Apoptose mit der Aktivierung der gleichen exekutiven Faktoren wie die direkte, extrinsische Signalkaskade (Dempsey et al., 2003).

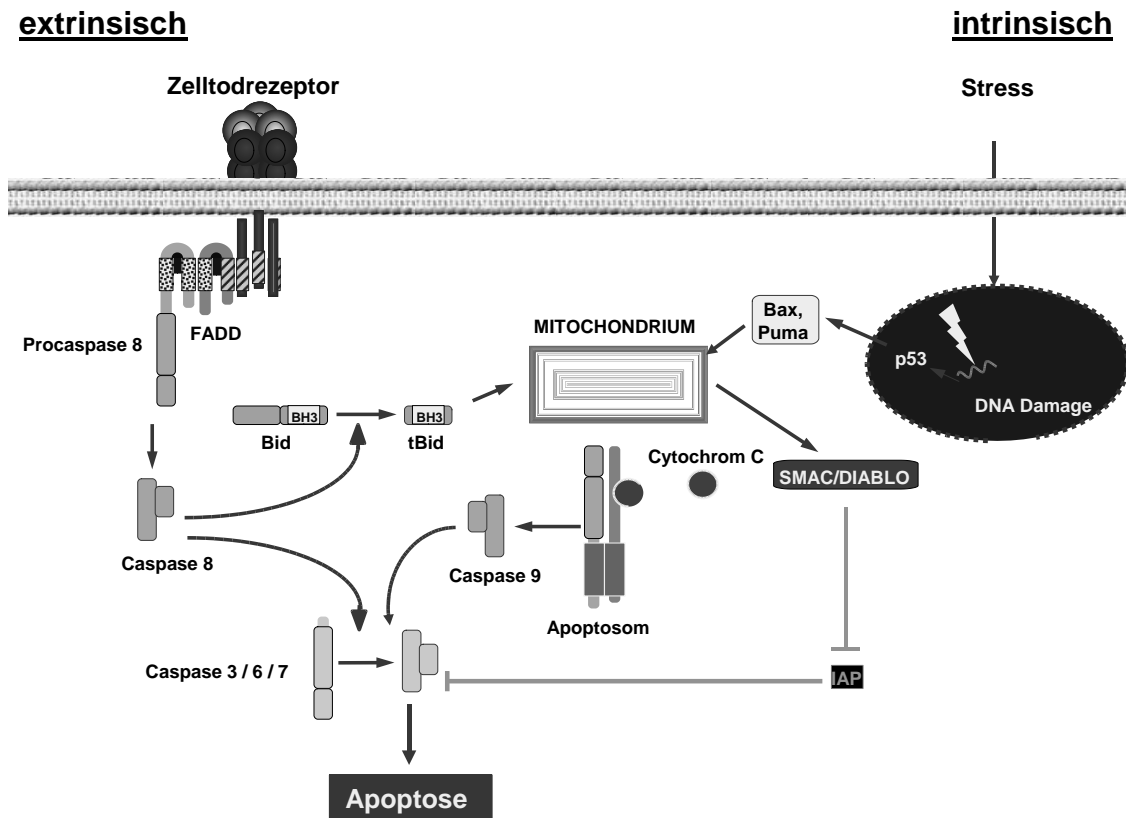


Abb. 2: **Intrinsischer und extrinsischer Signalweg der Apoptose.** Beide Wege resultieren in der Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7. Der extrinsische Weg wird über die Bindung des Liganden ausgelöst und erfolgt über die Fas-associated death domain (FADD) und die Initiatorcaspase 8. Durch DNA-Schaden wird der p53-abhängige intrinsische, mitochondriale Weg ausgelöst, der über die Bildung des Apoptosoms und der Aktivierung der Initiatorcaspase 9 ebenfalls die Aktivierung der Effektorcaspasen zur Folge hat. Die Aktivierung von Bid ermöglicht eine Quervernetzung der beiden Signalwege. (mit freundlicher Genehmigung von Prof. S. Wesselborg, Tübingen)

1.2 Strahlentherapie

Die Strahlentherapie stellt, im Gegensatz zur Chemotherapie, eine lokal applizierte und lokal wirkende, nicht-invasive Therapieform dar. Dabei werden durch gezielte Bestrahlung Tumorzellen geschädigt und das Normalgewebe möglichst geschont. Die ionisierende, energiereiche Strahlung wird genutzt, um Valenzelektronen der Atome aus ihrer Hülle zu entfernen oder Elektronen auf ein höheres Energieniveau zu bringen. Verschiedene Strahlenarten werden unterschieden. Die Teilchenstrahlung besteht aus verschiedenen subatomaren, größtenteils geladenen Teilchen. Dazu zählen Elektronen -, Protonen -,

Neutronenstrahlung sowie α - und β - Strahlung. Photonenstrahlung besteht aus Strahlen unterschiedlicher Wellenlänge und Energiegehalt, wie Photonen- und Röntgenstrahlung (Steel, 1993). In der Zelle bewirkt die Strahlung vielfältige Effekte an verschiedenen Strukturen. Eine davon ist die DNA, an der sich folgende Schäden nachweisen lassen (Steel, 1993):

- Doppelstrangbrüche
- Einzelstrangbrüche
- Basenfehlpaarungen und Basendefekte
- DNA-Protein-Crosslinks

Dass DNA wirklich Ziel der Bestrahlung ist, wurde Anfang der neunziger Jahre das erste Mal in Experimenten von *Warters et al.* und später von *Radford et al.* gezeigt (Warters, 1992; Radford, 1994). So bewirkt die Bestrahlung mit einem Gray die Entstehung von ca. 1000 Einzelstrangbrüchen und ca. 40 Doppelstrangbrüchen (Steel, 1993). Die Zelle verfügt über zahlreiche Mechanismen diese Schäden an ihrem Erbgut zu reparieren. Werden aber nicht alle Läsionen, die ihr in großer Anzahl zugeführt werden, behoben, kann dies zum Zelltod einer Tumorzelle oder aber auch zur malignen Transformation einer gesunden Zelle führen.

Das Dosiskonzept der Bestrahlung stellt meist einen Kompromiss zwischen dem gewünschten Absterben der Tumorzellen auf der einen, und dem Untergang von gesundem Gewebe auf der anderen Seite dar. Durch diesen Kompromiss wird sowohl Normalgewebe als auch den entarteten Zellen die Möglichkeit gegeben, diesen Schaden wieder in gewissen Umfang zu reparieren.

1.3 Die Familie der Zelltodrezeptoren und ihre Liganden

1.3.1 Die Entdeckung der Zelltodrezeptorliganden

Seit den späten fünfziger Jahren waren die beiden Hauptstrategien in der Behandlung von Tumoren neben der Chirurgie die Chemo- und Strahlentherapie. Die beiden letzteren Therapieansätze haben aber immer mit

zwei Kernproblemen zu kämpfen: Die unselektive Schädigung von Zellen, sowie Resistenzmechanismen, die Tumorzellen unempfindlich gegenüber der ihnen zugeführten Noxe machen.

Wie bereits erwähnt, ist die primäre Zielstruktur der Radio- aber auch der Chemotherapie die DNA, die durch die jeweilige Therapieform geschädigt werden soll (Ashkenazi, 2002). Da von dieser Schädigung aber Tumorzellen nicht selektiv geschädigt werden, sondern gesunde Zellen ebenfalls betroffen sind, limitiert sich die Dosis der Therapie selbst. Mechanismen, die Zellen resistent gegen die Wirkung dieser zellschädigenden Substanzen machen, entkoppeln den vorangegangenen Zellschaden von der resultierenden Apoptose und lassen somit die entartete Zelle überleben. Ein Beispiel dafür ist die Mutation des Tumorsuppressorgens TP53. Wird dadurch ein fehlerhaftes p53 translatiert, kann es seine wichtige Überwachungsfunktion nicht mehr ausführen und seine zentrale Aufgabe im Apoptosesignalweg nicht mehr erfüllen (Ashkenazi et al. 1999).

Ein neuer Ansatz zur Lösung dieser Resistenzprobleme ist die sog. *targeted therapy*. Dabei handelt es sich um eine Therapiestrategie, die selektiv auf zellspezifische Moleküle zielt. Diese Therapieform hat sich in den letzten Jahren bei der Behandlung ausgewählter Erkrankungen bewährt und etabliert. Einer der derzeit prominentesten Vertreter ist *Imatinib* (Glivec[®]), ein Tyrosinkinaseinhibitor zur Behandlung der chronisch-myeloischen Leukämie. Der EGF-Rezeptorblocker *Cetuximab* (Erbix[®]) ist in Kombination mit Strahlentherapie inzwischen als Erstlinientherapie bei der Behandlung von HNO-Tumoren (Bonner et al., 2006) als auch in der Zweitlinientherapie des kolorektalen Karzinoms zugelassen. Ein weiteres Beispiel ist der Angiogenese-Hemmer *Bevacizumab* (Avastin[®]). Dieser ist ebenfalls als Zweitlinientherapie des kolorektalen Karzinoms zugelassen und wird regelmäßig als günstige „off label“-Therapie bei der feuchten Form der Altersbedingten Makuladegeneration (AMD) eingesetzt.

Eine weitere Form der *targeted therapy* stellen Zytokine dar, die unabhängig von der mitochondrialen Apoptosekaskade, also auch unabhängig von p53, in der Lage sind, selektiv in Tumorzellen den Zelltod auszulösen (Ashkenazi,

2002). Grundlegende Beobachtungen hierfür gehen bis in das 19. Jhdt. zurück, in dem *Brunes* 1868 dokumentierte, dass bei einigen seiner Krebspatienten der Tumor nach einer akuten bakteriellen Infektion an Größe verlor. 1944 isolierte *Shear* das Lipopolysaccharid (LPS) von gramnegativen Bakterien und beobachtete nach Injektion von LPS in tumortragende Mäuse eine hämorrhagische Nekrose des Tumors. 1975 formten *Carswell* und *Old* den Begriff *tumor-necrosis factor* (TNF) und nannten so den Serumfaktor, der durch LPS induziert wurde. In den darauffolgenden Jahren wurden aufgrund von Sequenzhomologien eine ganze Reihe ähnlicher Zytokine und ihrer entsprechenden Rezeptoren entdeckt, u.a. auch der Rezeptor Fas/APO1/CD95 sowie sein Ligand FasL/APO1L. Sie alle bilden die Familie der Todesrezeptoren und ihrer Liganden (Ashkenazi, 2002). 1995 wurde ein weiterer, sehr vielversprechender Ligand entdeckt und charakterisiert, der APO2-Ligand bzw. *TNF-related apoptosis inducing ligand* (APO2L/TRAIL). Bis heute sind 18 Liganden und 29 Rezeptoren dieser Familie bekannt (Ashkenazi, 2002; Dempsey et al., 2003).

1992 beobachtete *Tartaglia* eine starke inflammatorische Reaktion mit septischem Schock nach TNF-Applikation. *Nagata* stellte fünf Jahre später nach Gabe eines anti-Fas-Antikörpers eine massive leberschädigende Wirkung jenes Antikörpers fest, der durch eine hohe Fas-Expression auf Hepatozyten erklärt wurde (Tartaglia et al., 1992, Nagata, 1997). Trotzdem war man weiter auf der Suche nach weniger toxischen Vertretern dieser so potenten antitumorösen Substanzen.

1.3.2 TRAIL

Mit der Entdeckung von TRAIL, erhielt die Zelltodrezeptorligandenfamilie einen bedeutenden Repräsentanten für die moderne Krebstherapie. Die hohe Tumorzellspezifität, verbunden mit einer geringen oder fehlenden Toxizität für normales Gewebe ließ APO2L/TRAIL in den Mittelpunkt des Interesses rücken. Die konstitutive Expression der APO2L-mRNA in vielen Geweben (Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995) rief die Hoffnung hervor, dass physiologische

Mechanismen existieren, die normale Zellen vor der Apoptoseinduktion durch APO2L schützen (Ashkenazi et al., 1999). Dies bestätigte sich mit der Entdeckung der *decoy*-Rezeptoren (*decoy* = Köder, engl.) DcR1, DcR2 und OPG, die kompetitiv mit TRAIL um die beiden zugehörigen Zelltodrezeptoren TRAIL-R1/DR4 und TRAIL-R2/DR5 konkurrieren, aber durch eine fehlende funktionelle intrazelluläre Todesdomäne nicht in der Lage sind, das Signal in das Innere der Zelle weiterzuleiten und damit die Zelle vor der Apoptose zu schützen (Pan et al., 1997; Degli-Esposti et al., 1997).

Ebenso wurde *in vitro* festgestellt, dass ein großer Anteil an getesteten Tumorgeweben sehr empfindlich gegenüber dem zytotoxischen Effekt von Apo2L/TRAIL ist (Wiley et al., 1995; Griffith et al., 1998). Mehrere rekombinante Versionen von TRAIL wurden entwickelt, die alle eine stärkere Wirkung erzielen sollten als der native Ligand TRAIL selbst (Ashkenazi, 2002). Es zeigte sich bei den meisten Versionen, dass TRAIL besser wirkt, wenn er durch einen monoklonalen Antikörper quervernetzt wird und als Oligomer vorliegt. Denn eine Trimerisierung des Liganden ist die Voraussetzung für die Wirkung am Rezeptor (Wiley et al., 1995). Zum Beispiel entwickelten *Walczak et al.* eine *leucine-zipper*-Form von TRAIL (*LZ-TRAIL*). Dabei wurde die für die Bindung an den Rezeptor verantwortliche Aminosäuresequenz (95-281) mit einer repetitiven Leucinstruktur fusioniert. Die Bindung an diesen *leucin-zipper* erleichtert und stabilisiert die Bildung von TRAIL-Trimeren und hat die bereits oben beschriebene Wirkungsverstärkung des Liganden zur Folge (Walczak et al., 1999). *Ashkenazi* generierte eine weitere biochemische TRAIL-Präparation ohne exogene Sequenz (*TRAIL.0*). Dabei wurde nur die Aminosäuresequenz 114-281 von TRAIL verwendet. Dabei koordiniert der Cysteinrest in Position 230 mit Zink in einem fest definierten Verhältnis von 0,92 Mol Zink-Ionen pro Mol Trimer. Dadurch liegt TRAIL.0 zu 99% als stabiles, wirksameres Trimer vor. (Ashkenazi et al., 1999; Bodmer et al., 2000 ; Lawrence et al., 2001).

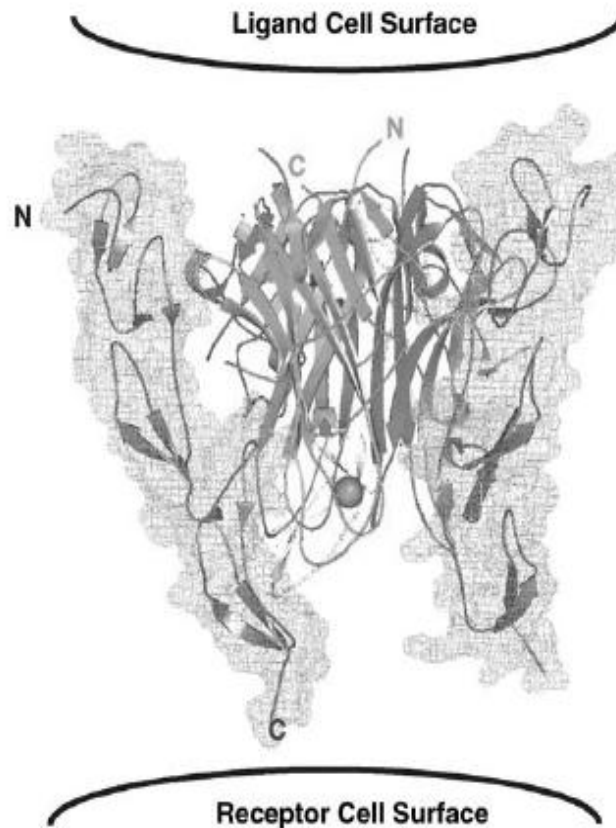


Abb. 2: **Struktur von TRAIL.** Es bindet am Rezeptor als Trimer aus drei Einzelmolekülen. Ein Zink-Ion ist für die stabile Trimerbildung Voraussetzung. (aus: LeBlanc, 2003)

Alle rekombinanten Präparationen besitzen eine starke zelltodinduzierende Wirkung gegen ein breites Spektrum unterschiedlicher, solider Tumoren (Ashkenazi, 2002). Zytotoxische Effekte gegenüber gesunden Zellen wurden zunächst nicht beobachtet (Ashkenazi et al., 1999). Diese Eigenschaften machten TRAIL zu einem vielversprechenden Kandidaten im Einsatz gegen Krebs (MacFarlane et al., 2002).

1.3.3 Die Zelltodrezeptoren

Für TRAIL wurden bisher fünf verschiedene Rezeptorproteine beschrieben. Diese gehören der TNF-Familie an. Rezeptormoleküle der TNF-Familie lassen sich aufgrund ihres zytoplasmatischen, C-terminalen Anteils und dem daraus

resultierenden Signalweg in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe, der auch TRAIL-R1/DR4- und TRAIL-R2/DR5 angehören, an die APO2L/TRAIL bindet, besteht aus Rezeptoren die an ihrem zytoplasmatischem Ende eine funktionelle Todesdomäne (death domain, DD) haben. Die Aktivierung dieser Todesdomäne führt zur Rekrutierung der Adapterproteine FADD oder TRADD, über die das apoptotische Signal weitergegeben wird.

Tab.1: Einteilung der Zelltodrezeptoren. DD = death domain, TIM = TRAF-interacting motifs. (modifiziert nach: Dempsey et al., 2003)

Rezeptoren mit intrazellulärer Todesdomäne	Rezeptoren mit Adapterprotein TIM	Rezeptoren ohne funktionelle zytoplasmatische Domäne
FAS TNF-R1 DR3 TRAIL-R1/DR4 TRAIL-R2/DR5 DR6	TNF-R2 CD40 CD30 CD27 LTβR OX40 4-1BB BAFF-R BCMA TACI RANK p75NGFR HVEM TNFRSF18 tROY EDAR XEDAR RELT Fn14	TRAIL-R3 / Dc-R1 TRAIL-R4 /Dc-R2 Dc-R3 OPG

Die zweite Gruppe enthält an der zytoplasmatischen Seite eine andere funktionelle Domäne, das TRAF-interacting motif (TIM). Die Aktivierung dieser Domäne führt zur Bindung eines Proteins der TRAF-Familie (tumor-necrosis-factor-receptor associated factor) und Aktivierung verschiedener Signalwege

wie z.B. über NF- κ B oder die Jun N-terminalen Kinase (JNK). Die dritte Gruppe hat im Gegensatz zu diesen Rezeptoren keine funktionelle zytoplasmatische Domäne. Das Binden eines Liganden an Rezeptoren dieser Klasse löst keine Signaltransduktion aus. Somit wirken diese Rezeptoren kompetitiv hemmend auf die Ligandenwirkung (Dempsey et al., 2003). Dieser Umstand verlieh ihnen den Namen *decoy*-Rezeptor (*decoy* = Köder, engl.). Dieser Familie gehören auch die schon im vorangegangenen Kapitel beschriebenen *decoy*-Rezeptoren DcR1, DcR2 und OPG an.

DNA-Sequenzanalysen durch *Pan et al.* führten 1997 zu der Entdeckung des ersten Rezeptors von APO2L/TRAIL, DR4 (Pan et al., 1997) und noch im selben Jahr entdeckten *Chaudhary et al.* den zweiten Rezeptor DR5, durch Sequenzanalysen von Cystein-reichen Pseudorepeats, die ein Markenzeichen dieser Rezeptorfamilie sind (Chaudhary et al., 1997). Während das extrazytoplasmatische N-terminale Ende aller Zelltodrezeptoren spezifischer Bindungsort für den jeweiligen Liganden ist, ist das C-terminale Ende der Zelltodrezeptoren FAS, TNF-R1, DR3, DR4, DR5 und DR6 Sitz der intrazytoplasmatischen Todesdomäne (death domain, DD) (Dempsey et al., 2003).

1.4 HGS-ETR-2 / Lexatumumab

Die Überzeugung, dass TRAIL keine toxischen Nebenwirkungen besitzt und somit auch zukünftig am Menschen einsetzbar wäre, wurde durch eine Untersuchung von Jo et al. ins Wanken gebracht (Jo et al., 2001).

2000 führte diese Arbeitsgruppe eine Untersuchung zur Wirkung von TRAIL auf humane Hepatozyten durch. Für die Versuche wurde *TRAIL.His* verwendet, eine TRAIL-Präparation die eine repetitive Histidin-Sequenz beinhaltet. Sie zeigten, dass rekombinantes TRAIL in menschlichem Lebergewebe massive Apoptose auslösen kann. Diese massive Hepatotoxizität schien das Aus für die TRAIL-Forschung zu sein (Jo et al., 2001; Özören et al., 2000). Die Arbeitsgruppe um *Lawrence* ging diesen Ergebnissen nach und zeigte, dass diese starke Apoptoseinduktion bei *TRAIL.0* nicht zu beobachten war. Der

Schluss lag nahe, dass die Hepatotoxizität von der vorliegenden TRAIL-Präparation abhängig ist. Dies hängt möglicherweise mit der Eigenschaft der verschiedenen Präparationen zusammen, entweder in hohem Maße stabile Trimere zu bilden, wie es bei *TRAIL.0* der Fall ist, oder aber teilweise, wie *TRAIL.His*, zu großen, polymeren TRAIL-Komplexen zu aggregieren, die leberschädigend wirken (Lawrence et al., 2001). Um aber jeglicher Gefahr einer leberschädigenden Wirkung aus dem Weg zu gehen, wurde nach alternativen Möglichkeiten gesucht, den erwünschten apoptoseinduzierenden Effekt an den Rezeptoren DR4 und DR5 von Tumorzellen zu nutzen, ohne gesundem Normalgewebe zu schaden. Eine Lösung für dieses Problem wurde durch die Entwicklung eines Antikörpers gegen die TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 gefunden. *Human Genome Sciences, Inc.* entwickelte monoklonale, agonistische Antikörper sowohl gegen den DR4-Rezeptor (HGS-ETR-1/Mapatumumab) wie auch gegen den DR5-Rezeptor (HGS-TR2J, HGS-ETR-2/Lexatumumab), letzterer wurde in dieser vorliegenden Arbeit untersucht.

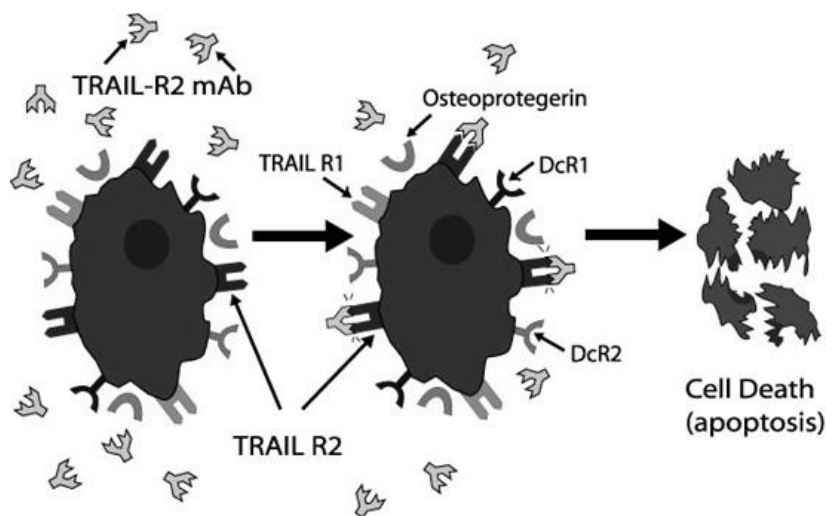


Abb. 3: TRAIL-R2 mAb (HGS-ETR-2) bindet an TRAIL-R2 (DR5). Das Binden des monoklonalen, agonistischen Antikörpers TRAIL-R2 mAb (HGS-ETR-2/Lexatumumab) an seinen Rezeptor DR5 führt über intrazelluläre Signalwege zur Apoptose. Des Weiteren ist TRAIL-R1 (DR4) dargestellt, an den HGS-ETR-1 bindet (nicht dargestellt). DcR1, DcR2 und Osteoprotegerin sind decoy-Rezeptoren. (aus: *Human Genome Sciences Homepage*, www.hgsi.com)

1.5 Resistenzmechanismen gegen den extrinsischen Signalweg und die Spezifität der TRAIL-Rezeptor vermittelten Apoptose

Die durch Todesrezeptorliganden ausgelöste Apoptose beinhaltet teilweise gut definierte Zwischenschritte bis der Prozess der Apoptose endgültig abgeschlossen ist. Dieser Prozess ist anfällig für Störungen, die die Entwicklung von zellulären Resistenzen ermöglichen. Daneben existieren in der Zelle eine Reihe von Regulationsmechanismen, die inhibierend auf die ligandeninduzierte Apoptose wirken und damit für das Gleichgewicht zwischen programmierten Zelltod und dem Überleben der Zelle verantwortlich sind (Marini und Belka, 2003). Obwohl der genaue Grund für die Tumorzellspezifität von TRAIL bis heute nicht hinreichend geklärt ist, werden die im Folgenden geschilderten Mechanismen für eine spezifische Wirkung gegen Tumorzellen verantwortlich gemacht.

Die unterschiedlich dichte Expression der TRAIL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche ist eine einfache und auch plausible Erklärung für die unterschiedliche apoptotische Potenz von TRAIL gegenüber verschiedenen Zelltypen. Demnach hätte eine auf TRAIL sensible reagierende Zelle eine hohe Dichte an beiden Rezeptoren ausgeprägt. Das gleiche Prinzip ist denkbar für die kompetitiv wirkenden *decoy*-Rezeptoren DcR1 (TRAIL-R3) und DcR2 (TRAIL-R4) sowie den löslichen Rezeptor OPG. Diese konkurrieren mit den exekutiven Faktoren DR4 und DR5 (Leverkus et al., 2000).

Diesem Gedanken wurde in mehreren Studien nachgegangen. In einem Modell wurde versucht, primär TRAIL resistente Zellen durch Hochregulation der agonistischen DR-Rezeptoren eine höhere Sensibilität gegenüber TRAIL zu erzielen. Erfolg dabei hatte eine vorausgehende Behandlung mit den Zytostatika Paclitaxel, Vincristin, Vinblastin, Etoposid, Camptothecin und Adriamycin. Nach erfolgter Hochregulation der Rezeptoren zeigte sich eine bessere Ansprechrate gegenüber TRAIL (Singh et al., 2003; Gibson et al., 2000). Die Hypothese einer Korrelation zwischen Rezeptorexpression und TRAIL induzierter Apoptose als alleinige Ursache einer TRAIL Resistenz konnte

von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (Marini et al., 2006; Leverkus et al., 2000; Griffith et al., 1998). Diese Beobachtungen lassen auf andere Mechanismen der Regulation schließen (Marini und Belka, 2003). Übrig bleiben sehr komplexe intrazelluläre Prozesse, die sich auf jeder Ebene der apoptotischen Regulierung abspielen.

Einer dieser Faktoren ist das FLICE-inhibitory protein (FLIP), bei dem es sich um einen der Procaspase 8 verwandten Faktor handelt. Es besteht im Gegensatz zur Procaspase nur aus zwei Wiederholungen der Todesdomäne und einer Caspase 8-ähnlichen Domäne (c-Flip_L), entbehrt aber die Caspase-Aktivität (Irmeler et al., 1997). So kommt es bei der frühen Signaltransduktion zu einer Konkurrenz zwischen FLIP und Caspase 8 am Adapterprotein FADD. Studien zu einem Zusammenhang zwischen der Expression von FLIP und der Sensibilität der Zelle gegenüber TRAIL bestätigen diese Theorie und lassen eine negative Korrelation zwischen FLIP-Expression und Ansprechen auf TRAIL erkennen (Leverkus et al., 2000; Griffith et al., 1998; MacFarlane et al., 2002). Dabei scheint FLIP aber nicht nur eine Rolle als unmittelbarer Gegenspieler der Caspase 8-Aktivierung zu spielen, sondern auch als Inhibitor des durch Rezeptorliganden aktivierten Transkriptionsfaktors NFκB (Wajant et al., 2000).

Als zentrale Schaltstelle der gesamten Apoptoseregulierung und als Ort, an dem die meisten pro- und antiapoptotischen Signale zusammengeführt werden, kommt dem Mitochondrium ein besonderer Stellenwert im Apoptosezyklus zu. Wie bereits beschrieben trifft hier der p53-abhängige Signalweg der intrinsischen Aktivierung auf den Teil des von außen eingeleiteten Prozesses, der über Bid das Mitochondrium erreicht. Somit steht das Mitochondrium nicht nur im Mittelpunkt der intrinsischen Apoptose, da auch der von Todesrezeptoren vermittelte Prozess auf ein intaktes mitochondriales System angewiesen ist. Trotz seiner zentralen Rolle liegt der genaue Mechanismus, der letztendlich die apoptotischen Faktoren Cytochrom c, Endonuclease G und Smac/Diablo freisetzt, im Dunkeln (Shankar, Srivastava, 2004). Dabei werden das Vorhandensein eines speziellen Kanalproteinkomplex für Cytochrom c und weitere Proteine in der äußeren Membran (permeability transition pore, PTP)

diskutiert sowie auch das Schwellen und Reißen der äußeren Mitochondrienmembran (Green, Reed, 1998). Außer Frage steht jedoch, dass eine ganze Anzahl sich dabei gegenseitig kontrollierender Faktoren beteiligt sind. Dabei sind die Proteine der BH-Gruppe (Bcl-2 homologous domain) von besonderer Wichtigkeit. Es stehen sich dabei die antiapoptotischen Faktoren Bcl-2 und Bcl-X_L und die proapoptotischen Proteine Bax und Bak sowie Bid, Bim, Puma und Noxa, welche zu den *BH-3-only Proteinen* gehören, gegenüber. Diese Proteine weisen nur eine von drei BH-Domänen auf (Green, Kroemer, 2004). Die antiapoptotische Aufgabe von Bcl-2 und Bcl-X_L ist die Stabilisierung der mitochondrialen Membran. Ob eine Überexpression dieser Proteine, die durch TRAIL aktivierte Apoptose aufhalten kann, ist abhängig von der Zellreihe und der damit verbundenen unterschiedlichen Ausstattung der Zelle. Dabei ist die Rolle von Bcl-2 sehr different. So liegen Daten vor, die zeigen, dass trotz hoher Bcl-2 Expression die Apoptose in malignen lymphatischen Zellen ausgelöst wurde (Kim et al., 2001). Es zeigte sich aber auch, dass das Vorliegen von antiapoptotischen Bcl-2 Lungen- und Prostatakrebszellen vor TRAIL schützt (Kandasamy, Srivastava, 2002). *Ballestrero et al.* wiesen in diesem Zusammenhang einen Vorteil von TRAIL gegenüber einer Reihe von Chemotherapeutika nach. Sie beobachteten einen synergistischen Effekt in Bcl-2-exprimierenden Jurkatzellen, die primär resistent gegenüber Chemotherapeutika waren. Eine kombinierte Behandlung mit TRAIL erreichte auch bei diesen Zellen ein apoptotisches Ansprechen auf die Therapie (Ballestrero et al., 2004). Interessanterweise lies sich dieser Effekt in Bcl-2 überexprimierenden Jurkat-Zellen auch in der Kombination mit ionisierender Strahlung beobachten (Belka, 2001). Diese Beobachtungen führten zur Konzeption der Versuchsvorlage für die vorliegende Arbeit.

1.6 Kombinationsbehandlung mit Strahlentherapie und TRAIL-Rezeptorstimulation

Die Kombination aus Strahlen- und moderner Antikörpertherapie stellt einen neuen, spezifischeren Ansatz dar als die herkömmliche Kombinationstherapie aus Bestrahlung und Chemotherapie. Die Rationale dafür ist folgende:

Das gemeinsame Ziel vieler Chemotherapeutika sowie der Radiotherapie ist es, durch eine Schädigung des Erbguts den Zelltod einer Tumorzelle auszulösen. Es bestehen klassische Therapieschemata aus einer Kombination von Chemo- und Strahlentherapie. Idealerweise übt deren gemeinsame Wirkung einen gesteigerten zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen aus und kann somit erworbene Resistenzmechanismen der Zellen überwinden, dennoch ist der molekulare Angriffspunkt beider Modalitäten, die DNA, derselbe.

Im Gegensatz dazu steht die Kombination von Radiotherapie und der Gabe eines Antikörpers aus der Familie der Todesrezeptorliganden. Hier scheint es wahrscheinlich, dass die Vorteile über die oben genannten hinausgehen. Aufgrund ihrer verschiedenen Angriffspunkte sind beide Apoptose-induzierenden Signalwege von verschiedenen Faktoren abhängig. So könnte ein Antikörper wie HGS-ETR-2/Lexatumumab die Apoptose in einer Zelle auslösen, die gegen ionisierende Strahlung unempfindlich wäre, andererseits könnte die Radiotherapie bestehende Resistenzmöglichkeiten gegen den extrinsischen Weg der Apoptose überwinden. Ein weiterer positiver Faktor ist die Verstärkerfunktion durch die Quervernetzung beider Signalwege über tBid (Yin et al., 1999; Li et al., 1998; Belka et al., 2001).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effektivität einer Kombinationstherapie aus Strahlentherapie mit dem agonistischen anti-DR5 Antikörper HGS-ETR-2/Lexatumumab *in vivo* in einem kolorektalen Xenograftsystem am Nacktmausmodell zu überprüfen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tiermodell

Die für unser Tiermodell verwendete Maus ist eine für Versuchszwecke gezüchtete Form der Hausmaus. 1962 wurde diese Form das erste Mal von *Isaacson* und *Cattanach* beschrieben, das autosomal-rezessive Vererbungsschema des Merkmals *nu* wurde 1966 von *Flanagan* entdeckt (Isaacson, Cattanach, 1962; Flanagan, 1966). Schließlich stellte *Pantelouris* 1968 fest, dass mit dem *nu*-Gen nicht nur das fehlende Haarkleid, sondern auch ein Fehlen des Thymus assoziiert ist (Pantelouris, 1968). Dadurch können auch artfremde (xenogene) Tumorzellen transplantiert und deren Wachstum am Tier direkt besser beobachtet werden.

Für die vorliegende Arbeit wurde eine Züchtungslinie mit dem Genotyp *nu/nu* verwendet, die *NMRI(nu/nu)*-Maus. Aufgrund der Thymusaplasie hat sie ein weitgehend defektes T-Zell-System. Für die Immunabwehr stehen ihr nur das B-Zell-System und eine Subpopulation der T-Zellen, die NK-Zellen zur Verfügung (Budach, 1995). Das Fehlen des T-Zell-Systems macht diese Labormaus besonders geeignet für die Tumor-Xenotransplantation, da die Abstoßungsreaktion auf den Tumor stark vermindert ist. Unter normalen Bedingungen, bei konventioneller Haltung, läge die Lebenserwartung der Tiere bei zwei bis drei Wochen (Rygaard, 1978), die besondere, überwiegend keimfreie Haltung macht aber ein Überleben von etwa 12 Monaten möglich (Budach, 1995).

In allen Experimenten verwendeten wir männliche und weibliche *NMRI (nu/nu)*-Mäuse. Sie wurden im zentralen Tierlabor der Universitätsklinik Essen unter definierten, pathogenfreien Bedingungen gezüchtet.

Die Umgebungsbedingungen wurden den besonderen Bedürfnissen der Tiere angepasst. Die Haltung erfolgte bei einer Raumtemperatur von 22 °C und 50% Luftfeuchtigkeit. Die Käfige (Makrolon I[®]) hatten eine Größe von 18 x 24 cm. Es wurden, nach den Geschlechtern getrennt, 3-5 Tiere in einem Käfig gehalten.

Eine pathogenarme Umgebung wurde durch Luftfilter, mit dem jeder Käfig ausgestattet war, sowie durch eine *laminar-air-flow* Anlage, die den Stall mit Atemluft versorgt, gewährleistet. Eine Zeitschaltuhr sorgte für einen Tag/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden. Der Käfig wurde zweimal pro Woche gereinigt und die Tiere erhielten dabei frisches Trinkwasser (0,8 mg/l H₂O Kaliumsorbat, 56 mg/l H₂O Tetrazyklin (Friesomycin[®]) mit Zusatz von 37% HCl bis zum Erreichen eines pH von 2,5 - 3), Nahrung (sterile, hochkalorische Trockennahrung (Pellets, Altromin[®])) sowie sterile Einstreu (Weichholzgranulat, Altromin[®]). Die Kennzeichnung und Identifizierung erfolgte durch Tätowierung eines Ohres (Hauptner Heberholz[®] Tätowierfarbe, Ebno[®] Tätowierzange).

Die Erlaubnis zur Durchführung des Tierexperiments wurde durch das Regierungspräsidium Tübingen erteilt.

2.2 Xenograftmodell

Zur Erzeugung der Xenografttransplantate wurde die Tumorzelllinie Colo205 verwendet. Colo205 ist eine Zelllinie des humanen Adenokarzinoms des Dickdarms. Es besitzt ein aneuploides Genom und ist Wildtyp-p53 negativ bzw. besitzt eine Mutation des p53-Gens. Die Tumorzellen wachsen als solides Xenotransplantat auf Nacktmäusen ohne Metastasen zu bilden.

Zur Erzeugung von Quelltumoren für das vorliegende Experiment wurden einer Maus in beide Milchleisten ca. 2 Mio. Tumorzellen in einem Volumen von 200 – 400 µl injiziert. Nach Anwachsen der Tumoren und Erreichen einer Tumorgöße von 10 x 10 mm wurden den Tieren die Tumoren entnommen und 2 x 2 mm messende Tumorstücke auf die beiden Hinterflanken eines zweiten Passagetiers transplantiert. Die Transplantation erfolgte unter keimarmen Bedingungen mit einer Pinzette unter einer *laminar-air-flow-bench* (Heraeus-Instruments, Hanau). Eine weitere Volumenzunahme auf 10 x 10 mm wurde abgewartet, die 2 Tumoren entnommen und diese zweite Passage auf die Versuchstiere transplantiert. Dies erfolgte durch einen Hautschnitt über dem rechten Hinterlauf der in Ethernarkose liegenden Maus und Bildung einer subkutanen Tasche mit anschließendem Einbringen der ca. 2 x 2 mm²

Tumorstücke. Die Wundheilung erfolgte auch ohne Hautnaht komplikationslos. Die erfolgreiche Transplantation ist abhängig von der Art des zu transplantierenden Tumors (maligne, schnell wachsende Zelllinien zeigen hohe Angehraten), der Transplantationstechnik, der Menge der transplantierten Zellen und der Abwehrlage des Empfängers (Silobrcic et al., 1990).

2.3 Geräte und verwendete Substanzen

2.3.1 Verwendete Substanzen

Tab. 2: Liste der verwendeten Substanzen

Substanz oder Gerät	Markenname	Firma
Anti-DR5 monoklonaler Antikörper, IgG1	HGS-ETR-2 [®] / Lexatumumab	Human Genome Sciences
Enfluran	Ethrane [®]	Abbott GmbH, Wiesbaden
Tetrazyklin	Friesomycin [®]	Essex Tierarznei, München
Ether	Aether zur Narkose [®]	Riedel de Haen GmbH, Seelze
NaCl-Lösung 0,9%	Isotone NaCl-Lösung [®]	Delta-Pharma GmbH, Pfullingen
Weichholzgranulat	Altromin [®]	Altromin, Lage
Trockennahrung	Altromin Pellets [®]	Altromin, Lage
HCL 37%		Merck Kga, Darmstadt
Kaliumsorbat		Merck Kga, Darmstadt
laminar-air-flow-bench	Hera safe [®]	Heraeus-Instruments, Hanau

2.3.2 Bestrahlungssystem

Die Versuchstiere wurden an einem Linearbeschleuniger mit 6 MV Photonen (Linac, Elekta[®] Typ SL15) in der Radioonkologischen Klinik der Eberhard-Karls-Universität bestrahlt. Die Bestrahlung wurde mit Hilfe einer in Essen entwickelten (Stüben et al., 1994) und in der Abteilung für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Tübingen hergestellten Bestrahlungsvorrichtung (s.u.) durchgeführt.

Das gesamte Bestrahlungsfeld war insgesamt 30 x 30 cm² groß, das Isozentrum befand sich in einer Distanz von 100 cm von der Strahlungsquelle. Durch einen 10 cm dicken Bleiblock, der an der Gantry des Linearbeschleunigers angebracht war, wurde das Bestrahlungsfeld in zehn effektive, 3 x 2 cm² große Bestrahlungsfelder aufgeteilt, durch die die Bestrahlung der tumortragenden Hinterläufe ermöglicht wurde. Durch manuell zu justierende Bleiblöcke wurde jeder Mäusekörper zusätzlich abgeschirmt (auf Abbildung 5 und 6 nicht dargestellt) und somit die Gesamtkörperdosis der Mäuse von ursprünglich 8% auf 2% der vom Tumor bzw. vom Hinterlauf absorbierten Dosis herabgesetzt (Welz, 2002).

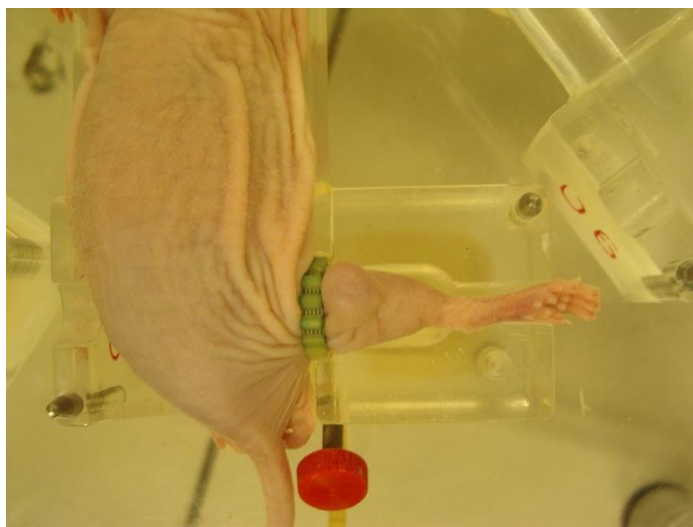


Abb. 5: Narkotisierte Maus in Beinhaltung. Der tumortragende rechte Hinterlauf ist abgespreizt und durch ein Gummiband fixiert. Die Plexiglasvorrichtung ermöglicht eine reproduzierbare Lage.

Eine Plexiglasvorrichtung, in der die Tiere während der Bestrahlung fixiert wurden, machte die exakte, reproduzierbare Lagerung möglich. Der rechte

Hinterlauf wurde dabei mit Hilfe einer Kunststoffschlinge in der nötigen abgespreizten Position gehalten und mit einem, der Anatomie des Hinterlaufs angepassten Plexiglasdeckel abgedeckt (siehe Abbildung 5). Die Dicke des Deckels von 2 cm erzeugt einen Dosisaufbaueffekt, der erlaubt, die maximale Dosis auf den Tumor zu applizieren. Die Feldhomogenität innerhalb der Bestrahlungsfelder wurde in einem vorausgegangenen Versuch überprüft und ergab eine Dosisvariation von 4% auf einer Länge von 6 mm (Welz, 2002).

Zur Bestrahlung wurden die Mäuse in einer separaten Plexiglasbox mit Enfluran (Ethrane[®], 5,0 l/min., Pressluft als Trägergas) betäubt und anschließend in ihren Halterungen fixiert. Das Bestrahlungssystem mit den zehn effektiven Feldern ermöglichte eine simultane Bestrahlung von zehn Mäusen, die rund um einen zentralen Narkosegasverteiler mit der Schnauze voraus in den vorgesehenen Halterungen platziert wurden (siehe Abbildung 6). In Enflurannarkose erfolgte die Bestrahlung (2,0 l/min., mit Pressluft als Trägergas).

Durch eine abschließende Feldkontrolle wurde die korrekte Lage der Tumoren im Bestrahlungsfeld überprüft. Die richtige Lage der gesamten Plexiglasapparatur wurde mittels Positionslaser erzielt und gewährleistete identische Bestrahlungsverhältnisse.

2.4 Therapie

2.4.1 Fraktionierte Bestrahlung

Bei einem Tumolvolumen von $132 \text{ mm}^3 \pm 88,2 \text{ mm}^3$ wurde die fraktionierte Bestrahlung begonnen (Tag 1). Die Bestrahlung erfolgte unter normoxischen, Bedingungen über fünf Bestrahlungstage mit einer Dosis von 3 Gy pro Tag (Bestrahlungsschema: siehe 2.5.).

2.4.2 Applikation des Antikörpers HGS-ETR-2/Lexatumumab

An Tag 1, Tag 4 und Tag 8 des Experiments erhielten die Tiere mit alleiniger Antikörpertherapie oder kombinierter Strahlen- und Antikörpertherapie eine

intraperitoneale Injektion HGS-ETR-2 in drei verschiedenen Dosierungen (0,1; 1,0; 10,0 mg/kg KG) entsprechend den Versuchsarmen (Behandlungsschema und Randomisation: siehe 2.5). Die Dosierungsempfehlungen des Herstellers *Human Genome Sciences* resultierten aus Vorversuchen des Unternehmens. Da *Pukac et al.* bereits gezeigt hatten, dass die Pharmakokinetik sich nach intraperitonealer oder intravenöser Applikation nicht signifikant unterscheidet, wurde die zeitsparend durchführbare intraperitoneale Applikation gewählt (*Pukac et al.*, 2005). Zur Injektion wurde die konzentriert vorliegende Antikörperlösung mit RPMI-Zellmedium verdünnt und den zuvor gewogenen Tieren in Abhängigkeit ihres Körpergewichts verabreicht. Die Konzentration wurde dabei so gewählt, dass 0,1 ml pro 10 g Körpergewicht injiziert werden konnte. Tiere im Experimentalarm ohne Antikörperinjektion erhielten eine Injektion mit dem äquivalenten Volumen RPMI-Zellmedium.

2.5 Studienaufbau

2.5.1 Randomisation

Nach der Transplantation wurde die TumorgroÙe und das Gewicht dreimal pro Woche gemessen und das Tumolvolumen errechnet (siehe 2.5.3). Vor Beginn des Experiments wurden die Mäuse unter Verwendung von Zufallszahlen (Microsoft Excel®) abhängig von ihrem Gewicht in acht Versuchsarme randomisiert. Diese acht Arme setzen sich dabei aus sechs Gruppen mit Antikörperbehandlung sowie einer Kontroll- und einer Bestrahlungsgruppe zusammen. Die initiale GruppengroÙe betrug sieben - neun Tiere.

Tab. 3: **Versuchsarme.** Acht Versuchsarme mit Kontrolle (nur Applikation Medium RPMI), nur Bestrahlung, und sechs Behandlungsarmen mit Antikörperapplikation. Anzahl der Tiere in einem Versuchsarm zu Beginn der Behandlung. Gesamtzahl der Tiere = 67. fRT = fraktionierte Bestrahlung mit 5x3 Gy

Versuchsarm	Anzahl Tiere
Kontrolle	8
nur fRT	7
0,1 mg/kg HGS-ETR-2	9
1,0 mg/kg HGS-ETR-2	9
10,0 mg/kg HGS-ETR-2	9
0,1 mg/kg HGS-ETR-2 + fRT	8
1,0 mg/kg HGS-ETR-2 + fRT	9
10,0 mg/kg HGS-ETR-2 + fRT	8

2.5.2 Versuchsaufbau

Die Versuchstiere wurden mit HGS-ETR-2/Lexatumumab als Monotherapie sowie in Kombination mit fraktionierter Radiotherapie behandelt.

- **Antikörpertherapie**

Drei Gaben von HGS-ETR-2/Lexatumumab jeweils an Tag 1, Tag 4 und Tag 8 der Behandlung in den drei Konzentrationen 0,1 mg/kg, 1,0 mg/kg und 10,0 mg/kg Körpergewicht.

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8
Injektion	X			X				X

Abb. 7: **Schema der Antikörpergabe.** Die Applikation erfolgte an Tag 1, 4 und 8 nach Eintritt des Tieres in den Versuch.

- **Fraktionierte Bestrahlung**

Bestrahlung an den Tagen 1 bis 5 der Behandlung mit jeweils 5 Gray.

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8
fRT	X	X	X	X	X			

Abb. 8: Schema der fraktionierten Bestrahlung (fRT). Die Bestrahlung erfolgte an den Tagen 1-5 nach Eintritt des Tieres in den Versuch.

- **Kombinationstherapie**

Drei Gaben von HGS-ETR-2/Lexatumumab jeweils an Tag 1, Tag 4 und Tag 8 der Behandlung in den drei Konzentrationen 0,1 mg/kg, 1,0 mg/kg und 10,0 mg/kg Körpergewicht und Bestrahlung mit 5 Fraktionen mit jeweils 3 Gy an den ersten 5 Behandlungstagen.

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8
Injektion	X			X				X
fRT	X	X	X	X	X			

Abb. 9: Schema der kombinierten Therapie mit Antikörper und fraktionierter Bestrahlung (fRT). Die Injektion des Antikörpers erfolgt an Tag 1, 4 und 8, die Bestrahlung an den Tagen 1-5 nach Eintritt des Tieres in den Versuch.

Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten ebenfalls an den Tagen eins, vier und acht des Versuchs eine gewichtsadaptierte Injektion des Zellmediums RPMI ohne Antikörper, um einen Effekt des Mediums auf die Mäuse und das Tumorwachstum auszuschließen. Primärer Endpunkt der Behandlung war die Wachstumsverzögerung der Xenograft Tumore.

2.5.3 Nachbeobachtung

Die Nachbeobachtung der Tiere erfolgte über 90 Tage nach Beginn der Behandlung durch Messen der Tumorgöße und des Gewichts. Tiere, deren Tumor eine Größe des achtfachen Ausgangsvolumens überschritten, sowie Tiere die krank wurden, rapide an Gewicht verloren oder durch die Größe des Tumors stark beeinträchtigt waren, wurden abgetötet

- **Tumolvolumenbestimmung**

Die Messung des Tumors wurde mit einer Schieblehre (Inox[®], 0,05 mm) durchgeführt. Dabei wurde die größte Ausdehnung (a) und die Ausdehnung im rechten Winkel davon (b) gemessen. Die Volumina wurden nach folgender Formel berechnet:

$$V = \frac{a \cdot b^2}{2}$$

Die nach dieser Formel berechneten Volumina entsprechen dem Feuchtgewicht exzidierten Tumoren (Osieka et al., 1985). Die Tumorgöße wurde zweimal wöchentlich 84 bis 90 Tage lang oder bis zum Erreichen des achtfachen Volumens gemessen.

- **Gewichtsbestimmung**

Die Tiere wurden zweimal wöchentlich gewogen (Soehnle[®], 2000 g Waage). Die Tumorausdehnung (a) und (b) in [mm], das Gewicht der Versuchstiere in [g] sowie der Allgemeinzustand der Mäuse wurden regelmäßig protokolliert.

2.6 Auswertung

Alle in Kapitel 3 dargestellten Histogramme wurden mit Hilfe von Microsoft Excel[®] und Adobe Illustrator[®] angefertigt. Signifikanzanalysen wurden mit Graph Pad Prism[®] berechnet. Zur Signifikanzanalyse wurde der student t-test oder ANOVA eingesetzt. Wir wählten als Signifikanzniveau 5% und ließen damit einen Fehler 1. Art mit einer Wahrscheinlichkeit von 5% zu. Demnach erachteten wir Ergebnisse mit einem p-Wert unter 0,05 als signifikant.

2.6.1 Ausschlusskriterien

Die Tiere, die nach der Transplantation bis zum Versuchsbeginn kein Tumorwachstum aufwiesen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Bis zu Versuchsbeginn trugen 67 Tiere einen Tumor von entsprechender Größe. Es erhielten 52 Tiere eine Behandlung mit HGS-ETR-2/Lexatumumab in den verschiedenen Behandlungsarmen. Dazu wurden acht Tiere in der Kontrollgruppe und sieben Tiere in der Bestrahlungsgruppe beobachtet (siehe Tabelle 3).

2.6.2 Zensierte Daten

Versuchsdaten gingen als zensierte Daten in die Auswertung ein, wenn die Tiere vor Erreichen des Beobachtungsendes verstarben und das achtfache Ausgangsvolumen bis zu diesem Zeitpunkt nicht erreicht hatten. Diese Daten wurden unter Verwendung der Kaplan-Meier Methode berücksichtigt (Kaplan, Meier, 1958).

2.6.3 Wachstumsverhalten

Das Wachstumsverhalten der Tumoren wurde zum einen durch die Berechnung der relativen Tumorumfänge sowie durch die Tumorverdoppelungszeiten der einzelnen Versuchsarme untersucht. Die lokale Tumorkontrolle, bei uns definiert als Unterschreiten des achtfachen Tumorumfanges des Ausgangswertes wurde in Abhängigkeit der Zeit in Kaplan-Meier Darstellungen aufgezeigt.

Bei der Darstellung der relativen Tumorumfänge über die Beobachtungszeit wurden an jedem Versuchstag die Tumorumfänge aller Versuchstiere als Mittelwerte in den Versuchsgruppen zusammengefasst und der Ausgangswert an Tag 1 des Versuches als Bezug von 100% genommen.

Versuchstiere, deren Tumoren sich in der Behandlung spalteten und im Folgenden als Doppeltumoren vorlagen wurden von dieser Darstellung ausgeschlossen.

Es wurde die Zeit zum Erreichen der einzelnen Tumorverdoppelungen von ein- auf zweifaches, von zwei- auf vierfaches und vier- auf achtfaches Volumen als Median der jeweiligen Dosisgruppe nach dem von *Stuschke et al.* modifizierten

Kaplan-Meier Verfahren bestimmt (Kaplan, Meier, 1958; Stuschke et al., 1990). Zensierte Daten konnten so bis zu ihrem Ausschluss berücksichtigt werden.

2.6.4 Toxizität der Therapie

Mit Hilfe der Bestimmung des medialen maximalen Gewichtsverlusts in den ersten 20 Behandlungstagen wurde die Toxizität der einzelnen Behandlungsarme evaluiert. Zur Dokumentation evtl. Strahlenfolgen wurden aufgetretene Hautveränderungen, wie z.B. Ulzera an den Hinterflanken, beobachtet und protokolliert.

3 ERGEBNISSE

Um die Effektivität der Therapie mit HGS-ETR-2/Lexatumumab im Vergleich mit und ohne fraktionierter Bestrahlung zu beurteilen und evtl. additive Effekte zu dokumentieren, wurden acht Versuchsgruppen gebildet (siehe Tab. 3, Kapitel 2.5.1), die unterschiedlich behandelt wurden. Die Schaubilder in Kapitel 3.2., 3.3. und 3.4. vergleichen diese acht Behandlungsarme. Es handelt sich um die Kontrollgruppe ohne effektive Behandlung (alleinige i.p. Applikation von Zellkulturmedium), den Therapiearm mit alleiniger fraktionierter Bestrahlung (5x3 Gy), sowie die Therapie mit HGS-ETR-2/Lexatumumab als Monotherapie (i.p.) oder in Kombination mit fraktionierter Bestrahlung in jeweils drei unterschiedlichen Dosierungen zu 0,1; 1,0; 10,0 mg/kg Körpergewicht.

3.1 Dosisabhängigkeit der Effektivität von HGS-ETR-2 /Lexatumumab

Die Abhängigkeit der Effektivität des Antikörpers von der verwendeten Dosis wurde für drei Antikörperdosierungen (0,1; 1,0; 10,0 mg/kg KG) mit jeweils acht bis neun Tieren pro Behandlungsarm untersucht. Im Folgenden werden die Verläufe der absoluten Tumorumfänge unter alleiniger Antikörpertherapie in den drei Dosierungen direkt miteinander verglichen.

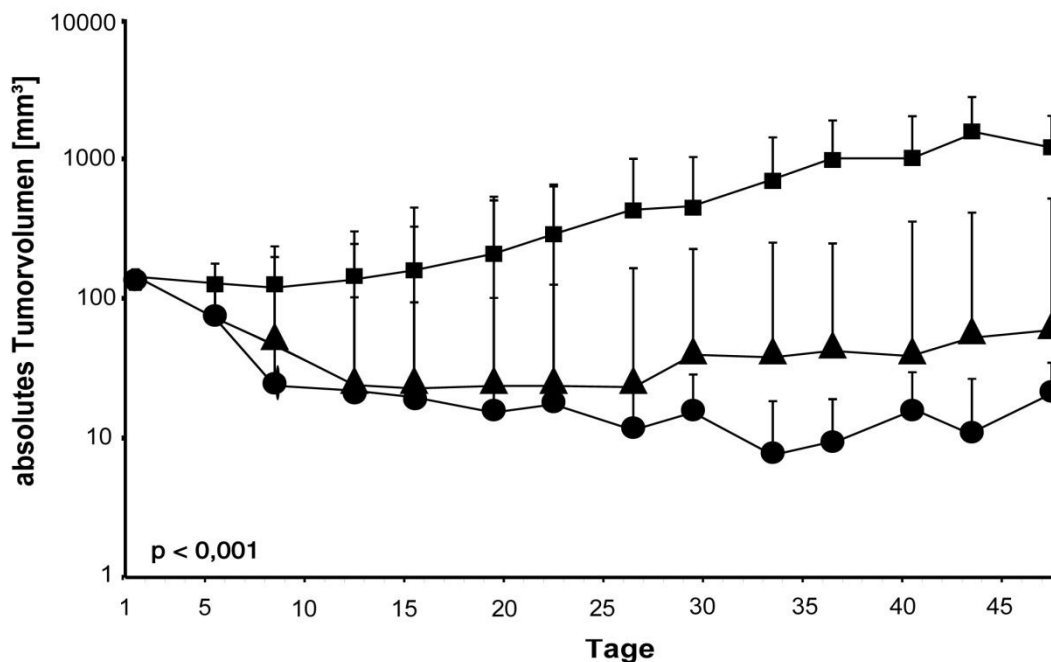


Abb. 10: **Abhängigkeit des Tumorwachstums von der Dosierung des Antikörpers HGS-ETR-2/Lexatumumab.** Darstellung der drei verwendeten Dosierungen 0,1 mg/kg (■), 1,0 mg/kg (▲) und 10,0 mg/kg (●). Balken (—) bezeichnen die Standardabweichung. ($p < 0,001$, [ANOVA]).

Es zeigt sich, dass das Tumorwachstum deutlich von der Dosierung des Antikörpers abhängt ($p < 0,001$, [ANOVA]). Während es bei Antikörperkonzentration von 0,1 mg/kg auch nach Beginn der Behandlung zu einem stetigen Tumorwachstum kommt und um den 40. bis 45. Beobachtungstag das Zehnfache des Ausgangsvolumens erreicht wird, nimmt das Tumolvolumen bei Behandlung mit den höheren Konzentrationen am Beginn der Therapie stark ab und es kommt bei der HGS-ETR-2-Dosierung von 1,0 mg/kg um den 25. Versuchstag wieder zu einem Wachstum. Bei der höchsten Dosierung mit 10,0 mg/kg nimmt das Tumolvolumen erst um den 35. Nachbeobachtungstag wieder stetig zu. Das mittlere Ausgangsvolumen von 132 mm^3 ($\pm 88,2 \text{ mm}^3$) wird in diesen beiden Versuchsarmen bis zum 50. Nachbeobachtungstag nicht wieder erreicht. Der Unterschied zwischen der Dosierung von 1,0 und 10,0 mg/kg wird ab Tag 25 deutlich sichtbar. Das Tumolvolumen wächst bei der Konzentration von 10,0 mg/kg langsamer wieder an. Die Tumoren erreichen bis Tag 50 der Nachbeobachtung nicht mehr das

initiale Tumorzellen. Die genauen Tumorzellenverdoppelungszeiten werden detailliert in Kapitel 3.3. beschrieben.

3.2 Effektivität der Kombinationsbehandlung

Die Effektivität der alleinigen Behandlungen mit Strahlen- oder Antikörpertherapie sowie ein evtl. auftretender verstärkter Effekt durch ihre Kombination wurde beurteilt, in dem die Versuchstiere dieser drei Behandlungsarme sowie der Kontrollgruppe beobachtet und das Tumorzellenvolumen, wie in Kapitel 2.5.3. beschrieben, bestimmt wurde.

Abbildung 11 zeigt den Vergleich der Therapiearme nach Behandlung mit HGS-ETR-2/Lexatumumab 0,1 mg/kg. Die Verläufe der Kontrollgruppe sowie der Gruppe mit alleiniger fraktionierter Radiotherapie brechen um Tag 37 bzw. 42 der Beobachtung ab, da die Tumoren zu diesem Zeitpunkt ihr Endvolumen, d.h. das Achtfache des Ausgangsvolumens bzw. 1,5 ml, erreicht haben. Der Vergleich der Kurvenverläufe der alleinigen fraktionierten Bestrahlung und der alleinigen Therapie mit 0,1 mg/kg HGS-ETR-2/Lexatumumab zeigt, dass die solitäre Applikation des Antikörpers zu einer nahezu identischen Wachstumsverzögerung wie unter alleiniger Bestrahlung führt. Dies zeigt, dass diese Therapien zumindest in dieser Beobachtungszeit ähnlich effektiv wirken.

Bei der kombinierten Behandlung mit HGS-ETR-2/Lexatumumab und fraktionierter Bestrahlung lässt sich ab Tag 15 gegenüber der Monotherapie mit HGS-ETR-2/Lexatumumab eine Wachstumsverzögerung beobachten ($p < 0,025$; [student t-test]). Auch hier wächst das Tumorzellenvolumen stetig an, es liegt allerdings bis über den 40. Beobachtungstag hinaus ein deutlich langsames Wachstum der Tumore vor. So liegt um den 22. Tag bei kombinierter Therapie ein verdoppelter Ausgangstumor vor, während zu diesem Zeitpunkt bei beiden Monotherapien schon eine Vervielfachung der Ausgangsvolumina zu verzeichnen ist.

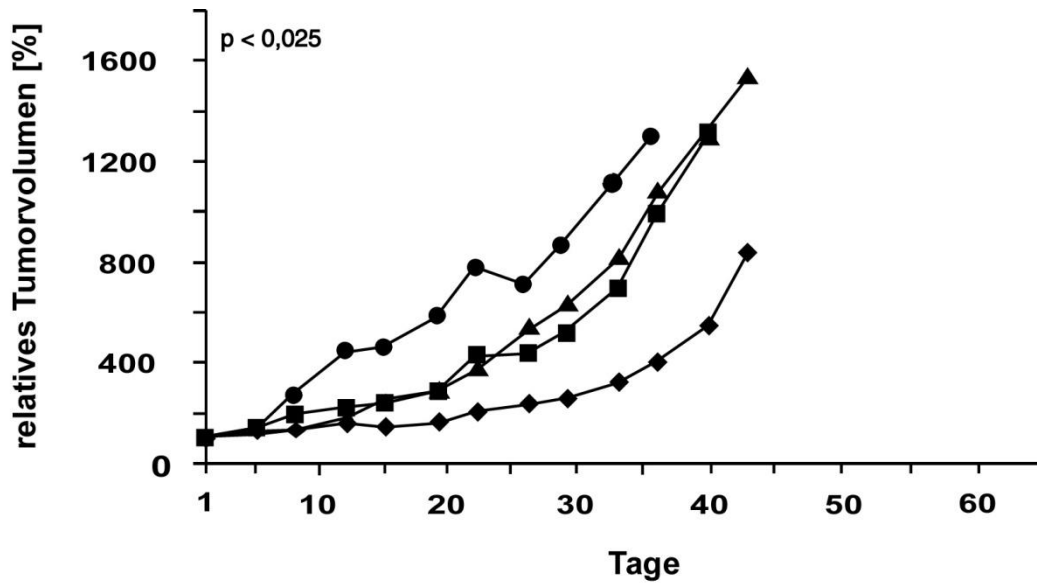


Abb. 11: **Relatives Tumorstadium nach Behandlung mit HGS-ETR-2/Lexatumumab 0,1 mg/kg.** Tumorstadien relativ zum Ausgangsvolumen an Tag 1 (100%). Vergleich Kontrolle (●), nur Bestrahlung (■), sowie Antikörperbehandlung mit (◆) und ohne Bestrahlung (▲). ($p < 0,025$; [student t-test], Vergleich kombinierte Therapie und Antikörpermonotherapie)

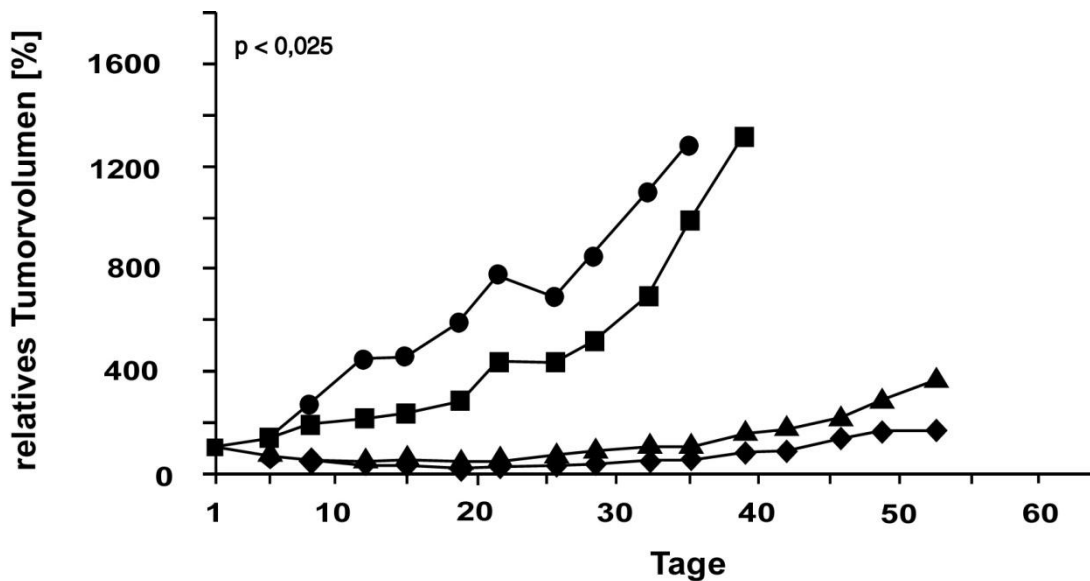


Abb. 12: **Relatives Tumorstadium nach Behandlung mit HGS-ETR-2/Lexatumumab 1,0 mg/kg.** Tumorstadien relativ zum Ausgangsvolumen an Tag 1 (100%). Vergleich Kontrolle (●), nur Bestrahlung (■), sowie Antikörperbehandlung mit (◆) und ohne Bestrahlung (▲). ($p < 0,025$; [student t-test], Vergleich kombinierte Therapie und Antikörpermonotherapie)

Bei der höheren Dosierung von 1,0 mg/kg, in Abbildung 12 dargestellt, nähert sich die Monotherapie mit HGS-ETR-2/Lexatumumab der kombinierten Behandlung an, lediglich im späteren Verlauf um den 25. Tag der

Nachbeobachtung ist ein deutlicher Unterschied in der Wachstumsverzögerung zwischen der HGS-ETR-2-Monotherapie und der kombinierten Therapie erkennbar ($p < 0,025$; [student t-test]). In beiden Behandlungsarmen ist bis zum 20. Tag ein Rückgang des Tumorzumens auf ca. die Hälfte des Ausgangswertes zu beobachten. Erst an Tag 30 wird das Ausgangsvolumen bei alleiniger Antikörperapplikation wieder erreicht, bei kombinierter Behandlung sogar erst um Tag 45. Der Unterschied wird ab Tag 50 deutlicher. Das Tumorzumens der Tumoren unter Monotherapie nimmt schneller zu, während die Kurve der kombinierten Behandlung weiter flacher verläuft, das Volumen also langsamer wächst. Die kombinierte Therapie scheint demnach in dieser Konzentration, v.a. im fortgeschrittenen Verlauf bei der Kontrolle des Tumorzumens einen Vorteil zu bieten.

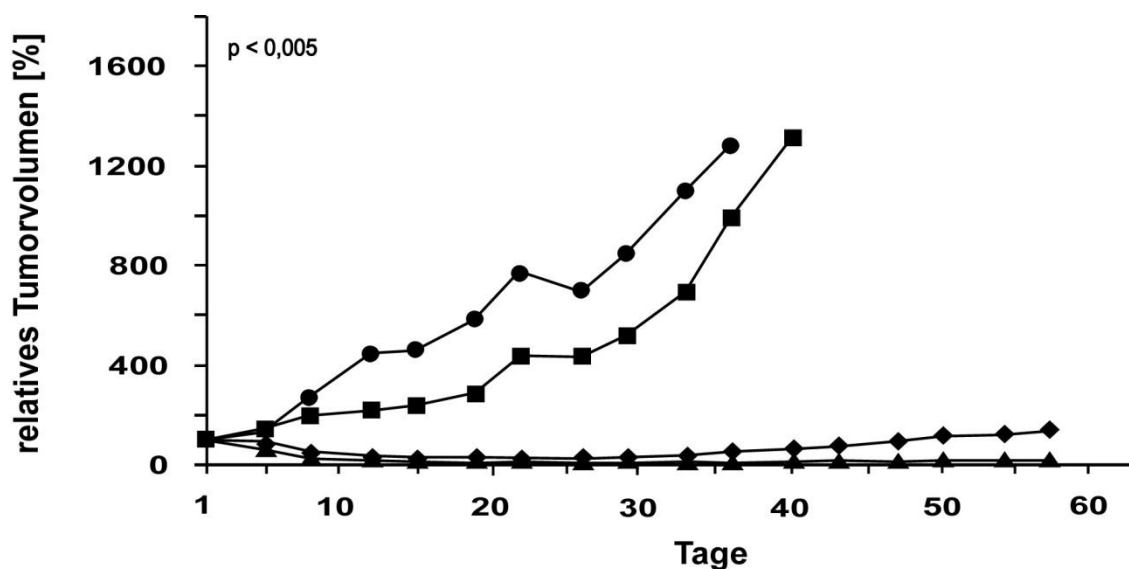


Abb. 13: Relatives Tumorzumens nach Behandlung mit HGS-ETR-2/Lexatumumab 10,0 mg/kg. Tumorzumens relativ zum Ausgangsvolumen an Tag 1 (100%). Vergleich Kontrolle (●), nur Bestrahlung (■), sowie Antikörperbehandlung mit (◆) und ohne Bestrahlung (▲). ($p < 0,005$; [student t-test], Vergleich kombinierte Therapie und Antikörpermonotherapie)

Bei der in Abbildung 13 dargestellten, maximal dosierten Therapie von 10,0 mg/kg ist schließlich in den ersten 30 Tagen der Beobachtung kein Unterschied mehr in der Wachstumsverzögerung zu erkennen. Beide Versuchsgruppen erzielen fast identische Kurvenverläufe. Nach erfolgter Therapie nehmen die Tumorzumens in beiden Versuchsarmen, Antikörpermonotherapie und

kombinierter Therapie, stetig ab, bis um Tag 15 der Beobachtung ein minimales Volumen erreicht ist. Erst ab Tag 35 bis 40 lassen sich die beiden Behandlungsarme wieder differenzieren. Ab diesem Zeitpunkt wächst sogar, entgegen der Annahme, das Volumen der kombinierten Therapie schneller an als jenes der Antikörpermonotherapie ($p < 0,005$, [student t-test]).

Der Vergleich von Mono- sowie Kombinationstherapie in diesen Darstellungen, besonders deutlich in Abbildung 11 und 12, lässt ein Vorteil der kombinierten Behandlung gegenüber alleiniger Applikation des Antikörpers v.a. in niedriger Dosierung erkennen. Weitere Analysen hinsichtlich der Effektivität der Therapien werden in den folgenden Kapiteln 3.3. und 3.4. besprochen.

3.3 Vergleich der Tumorverdoppelungszeiten der verschiedenen Behandlungsstrategien

Um die Wachstumsverzögerung genauer zu beschreiben und zwischen den einzelnen Behandlungsansätzen vergleichbar zu machen, wurden die Versuchstiere in den dargestellten Behandlungsarmen untersucht und in den Histogrammen von Abbildung 14 – 16 das Erreichen einer Vervielfachung des Tumolvolumens in Abhängigkeit der benötigten Zeit verglichen (Tumorverdoppelungszeit, TVZ). Dargestellt ist die Vervielfachung des Tumolvolumens auf das doppelte, vier- und achtfache des Ausgangsvolumens von Kontrollgruppe, alleiniger Radiotherapie, Antikörpermonotherapie mit HGS-ETR-2/Lexatumumab und kombinierter Therapie.

Abbildung 14 zeigt, dass die kombinierte Therapie gegenüber der Monotherapie mit Bestrahlung oder Antikörpergabe eine verzögernde Wirkung hinsichtlich der Tumorverdoppelungszeit besitzt. Anfangs hat die Antikörpermonotherapie noch eine verzögernde Wachstumswirkung gegenüber der Therapie mit alleiniger Bestrahlung, das achtfache Volumen wird aber bei beiden Therapien nahezu zum gleichen Zeitpunkt an Tag 33 bzw. 34 erreicht. Zu Beginn der Beobachtung ist bei der Antikörpermonotherapie eine deutliche Verzögerung, v.a. auf das doppelte Volumen zu beobachten. Die Vervielfachung bzw. Verachtfachung

des Ausgangsvolumens an Tag 25 bzw. 34 wird allerdings fast ebenso schnell erreicht wie bei alleiniger Radiotherapie. Die stärkste Wachstumsverzögerung zeigt die Kombinationstherapie ebenfalls am Anfang der Beobachtung, die Verdoppelung des Ausgangsvolumens wird erst an Tag 18 erreicht. Der verzögernde Effekt ist aber auch bei Anwachsen vom vierfachen auf das achtfache des Ausgangsvolumens noch deutlicher als bei alleiniger Antikörpertherapie. Erst an Tag 38 der Nachbeobachtung wird das achtfache Zielvolumen erreicht. Der statistische Vergleich der Wachstumsverzögerung von Antikörpermonotherapie mit HGS-ETR-2/Lexatumumab und Kombinationstherapie ist nicht signifikant (student t-test).

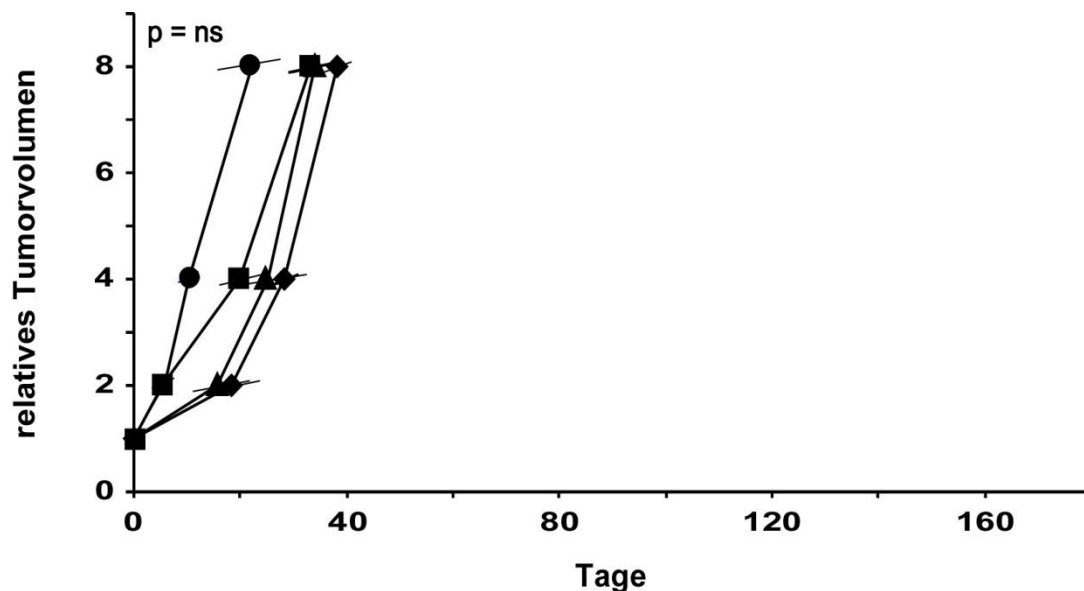


Abb. 14: Tumorverdoppelungszeiten (TVZ) auf das zwei-, vier-, und achtfache Volumen des Ausgangswertes (1) nach Behandlung mit HGS-ETR-2/Lexatumumab 0,1 mg/kg. Kontrolle (●), nur Bestrahlung (■), sowie Antikörpertherapie mit (◆) und ohne Bestrahlung (▲). Querbalken (-) bezeichnen das 95%-Konfidenzintervall. (p = ns, nicht signifikant; [student t-test], Vergleich kombinierte Therapie und Antikörpermonotherapie)

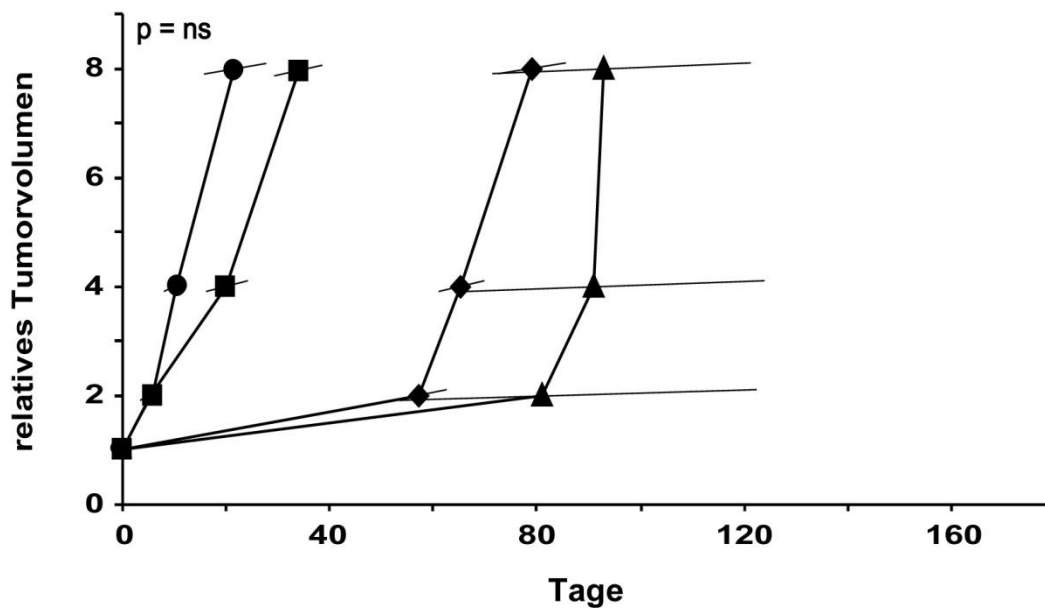


Abb. 15: Tumorverdoppelungszeiten (TVZ) auf das zwei-, vier-, und achtfache Volumen des Ausgangswertes (1) nach Behandlung mit HGS-ETR-2/Lexatumumab 1,0 mg/kg. Kontrolle (●), nur Bestrahlung (■), sowie Antikörpertherapie mit (◆) und ohne Bestrahlung (▲). Querbalken (-) bezeichnen das 95%-Konfidenzintervall. (p = nicht signifikant; [student t-test], Vergleich kombinierte Therapie und Antikörpermonotherapie).

Abbildung 15 zeigt unerwartet einen deutlichen Vorteil der Monotherapie mit 1,0 mg/kg HGS-ETR-2/Lexatumumab gegenüber der kombinierten Therapie.

Sowohl im Behandlungsarm mit alleiniger Antikörpergabe, wie auch bei der Kombinationsbehandlung gab es jeweils ein Tier, das kurzzeitig, d.h. für 3–10 Tage tumorfrei war und danach wieder Tumorwachstum entwickelte. Auch hier zeigt der Vergleich der HGS-ETR-2-Monotherapie und die Kombinationstherapie keine Signifikanz im student t-test.

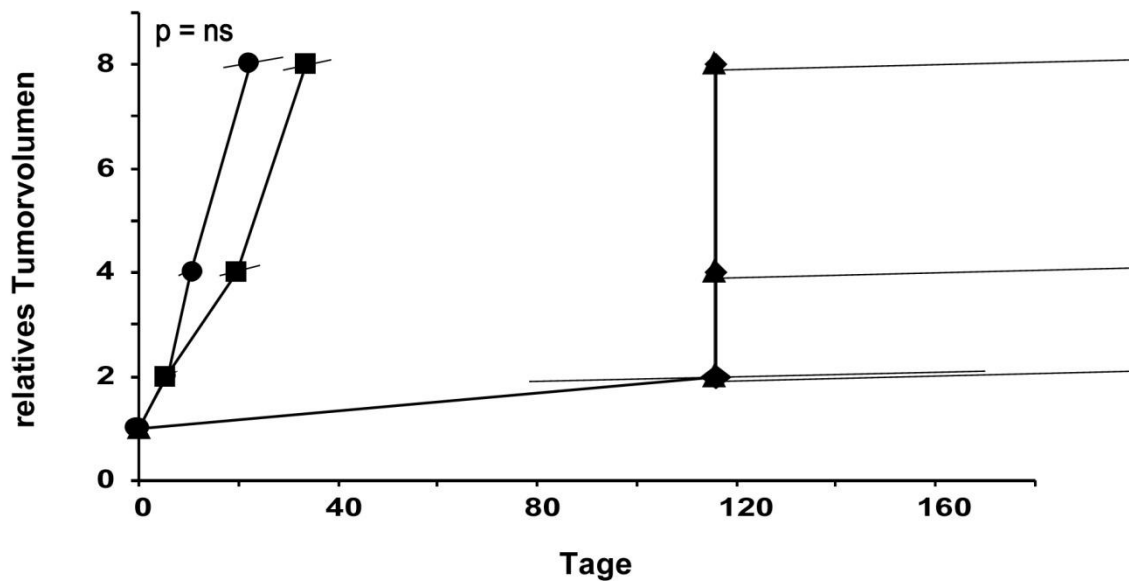


Abb. 16: Tumorverdoppelungszeiten (TVZ) auf das zwei-, vier-, und achtfache Volumen des Ausgangswertes (1) nach Behandlung mit HGS-ETR-2/Lexatumumab 10,0 mg/kg. Kontrolle (●), nur Bestrahlung (■), sowie Antikörpertherapie mit (◆) und ohne Bestrahlung (▲). Querbalken (-) bezeichnen das 95%-Konfidenzintervall. ($p =$ nicht signifikant; [student t-test], Vergleich kombinierte Therapie und Antikörpermonotherapie)

Die hohe Dosierung von 10,0 mg/kg (siehe Abb. 16) lässt keine Differenzierung der Effektivität der Therapien sowie keine Beurteilung eines Nutzens der kombinierten Therapie zu. Die Wirkung des Antikörpers in dieser hohen Dosierung ist zu stark, so dass mit alleiniger Antikörpergabe schon ein maximaler Effekt erzielt wird. Hier ist aufgrund der fehlenden Verdopplung des Ausgangsvolumens eine Darstellung der TVZ nicht aussagekräftig, sie verdeutlicht nur die massive Wirkung dieser hohen Antikörperkonzentration.

Bei der Monotherapie mit der maximal gewählten Konzentration von 10,0 mg/kg gab es im Versuchsarm mit neun Tieren ein Versuchstier mit einer kompletten Remission für den Zeitraum der Nachbeobachtung von 90 Tagen. Im Versuchsarm der kombinierten Therapie (acht Tiere) waren es hingegen drei Tiere, die über den kompletten Beobachtungszeitraum tumorfrei blieben.

Tab. 4: Zusammenfassung der Tumorverdoppelungszeiten. TVZ = Tumorverdoppelungszeiten, d = Tage, KI = Konfidenzintervall, V_0 = Ausgangsvolumen, $2V_0$ = doppeltes, $4V_0$ = vierfaches, $8V_0$ = achtfaches Volumen.

Therapie	TVZ [d] $2V_0$	95% KI	TVZ [d] $4V_0$	95% KI	TVZ [d] $8V_0$	p-Wert	95% KI
Kontrolle	5,6	4,4 - 7,1	10,4	8,6 - 12,6	22,3	---	17,2 - 18,9
nur Bestrahlung	5,3	3,7 - 7,9	19,8	16,2 - 24,3	33,4	---	29,0 - 38,5
HGS-ETR-2 0,1 mg/kg	15,5	11,1 - 21,7	25,3	19,8 - 32,4	34,0	ns	29,7 - 39,0
HGS-ETR-2 0,1 mg/kg + 5x3Gy	18,2	14,1 - 23,6	28,5	26,1 - 31,1	38,1		35,5 - 40,8
HGS-ETR-2 1,0 mg/kg	81,0	53,5 - 123,5	90,8	66,6 - 123,8	93,1	ns	71,4 - 121,2
HGS-ETR-2 1,0 mg/kg + 5x3Gy	57,3	52,3 - 62,7	65,3	60,9 - 69,9	79,0		72,7 - 85,8
HGS-ETR-2 10,0 mg/kg	115,4	78,3 - 170,1	115,4	115,4 - 200	115,4	ns	115,4 - 200
HGS-ETR-2 10,0 mg/kg + 5x3Gy	116,0	116 - 200	116	116 - 200	116,0		116 - 200

Die zusätzliche Bestrahlung führt bei niedriger Konzentration von 0,1 mg/kg zu einer Verlängerung der TVZ vom Ausgangswert auf das doppelte Volumen von 15,5 auf 18,2 Tage, was 2,7 Tagen entspricht. Das vierfache Volumen wird mit einer Verzögerung von 3,2 Tagen (25,3 auf 28,5 Tage) und das achtfache schließlich mit einer Verzögerung von 4,1 Tagen (34,0 auf 38,1 Tage) erreicht. Umgekehrt verhalten sich die Werte der Versuchsgruppen mit 1,0 mg/kg. Die Verdoppelung auf das doppelte Volumen ist bei Antikörpermonotherapie gegenüber der kombinierten Therapie um 23,7 Tage (57,3 auf 81 Tage) verzögert. Die Verdoppelung auf das vier- und achtfache Volumen verzögert sich um 25,5 ($4V_0$) bzw. 14,1 ($8V_0$) Tage.

Der Vergleich von Monotherapie und kombinierter Therapie führte bei allen drei verwendeten Dosierungen zu einem unsignifikanten Ergebnis. Eine verlässliche Interpretation dieser Darstellungen ist daher nicht möglich. Da das doppelte Tumolvolumen bei den verwendeten 10,0 mg/kg nicht erreicht wurde, sind die angegebenen Daten dieses Behandlungsarms aus Tabelle 4 nicht aussagekräftig.

3.4 Kaplan-Meier-Darstellungen

Während der Behandlung und Nachbeobachtung verstorbene Tiere, sowie Tiere, bei denen der Tumor nach Regression nicht mehr auftrat und als geheilt eingestuft wurden, verändern die Daten der Tumorverdoppelung und Wachstumsverzögerung. Die hier verwendete Kaplan-Meier Methode, bei denen die Tumorkontrolle in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen ist, korrigiert den entstandenen Fehler.

Die folgenden Darstellungen zeigen den prozentualen Anteil der Tiere im jeweiligen Versuchsarm unter lokaler Tumorkontrolle. Dies sind Tiere, die Tumoren tragen, die sich unter dem achtfachen des Ausgangsvolumens befinden. Während bei Darstellung der Tumorverdoppelungszeiten in Kapitel 3.3. nur die Verzögerung demonstriert wird, mit welcher die Tumoren ihr Volumen verdoppeln, stellen diese Abbildungen direkt den Anteil der Mäuse dar, deren Tumore durch die Behandlung lokal kontrolliert wird. Dies bringt den Vorteil, in diesem Fall nicht nur zu sehen, wie viel Zeit vergehen muss, die diese Tumoren benötigen um ein bestimmtes Volumen zu erreichen, sondern konkret darstellen zu können, wie lange und effektiv die Therapie es schafft die Tumoren der Tiere unter der Grenze dieses achtfachen Volumens zu halten. Dies ist eine Darstellung, die der klinisch-onkologischen Betrachtungsweise näher kommt.

Die Abbildungen 17-19 zeigen den zeitlichen Verlauf behandelte Tiere unter Antikörpermonotherapie und kombinierter Therapie in den drei verwendeten Dosierungen im Vergleich, sowie Kontrollgruppe und die Versuchsgruppe unter Monotherapie mit fraktionierter Bestrahlung.

In Abbildung 17 wird der zeitliche Verlauf der lokalen Tumorkontrolle nach Verwendung der 0,1 mg/kg Dosierung dargestellt. 50% der Tumoren der Kontrollgruppe sind schon an Tag 25 nicht mehr unter der Grenze des achtfachen Tumolvolumens, um den Tag 40 gibt es keinen Tumor mehr, der dieses Kriterium erfüllt. Tumoren, die mit fraktionierter Bestrahlung behandelt wurden, sind bis Tag 25 hingegen noch alle unter dem geforderten Volumen,

erst an Tag 58 gibt es keinen Tumor mehr, der das Achtfache des Ausgangswerts unterschreitet.

Der Vergleich der beiden Monotherapien, Bestrahlung und Antikörpertherapie zeigt, dass bis Tag 35, kein großer Unterschied in der lokalen Tumorkontrolle zu verzeichnen ist. Erst im weiteren Verlauf bietet die HGS-ETR-2-Antikörpergabe einen Vorteil. Über den gesamten Beobachtungszeitraum von 90 Tagen, verbleiben 11% der Tumoren unter lokaler Tumorkontrolle. Dies entspricht einer Maus von neun untersuchten Tieren der Versuchsgruppe.

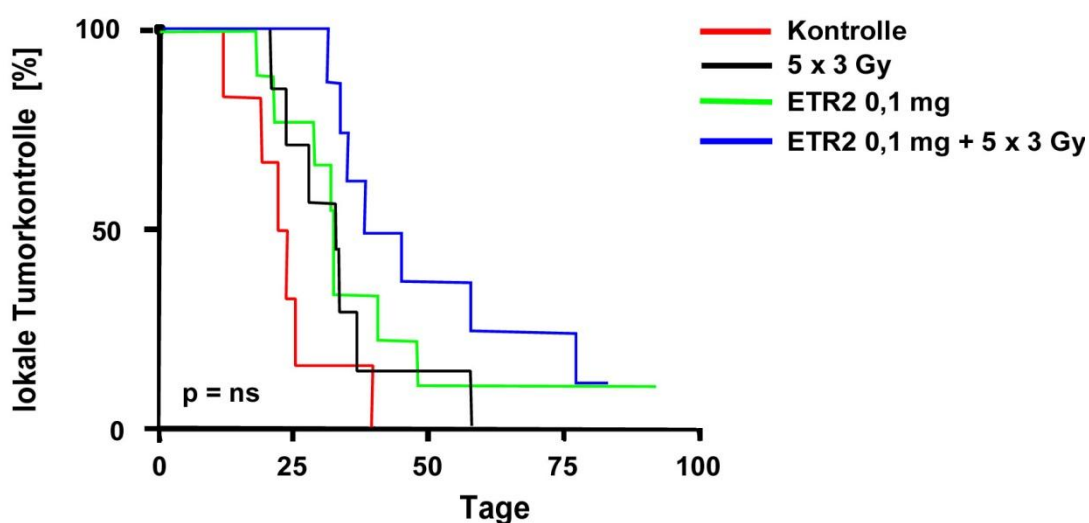


Abb. 17: Kaplan-Meier Darstellungen der Versuchsarme mit einer Antikörperdosierung von 0,1 mg/kg HGS-ETR2/ Lexatumumab (ETR2) mit oder ohne fraktionierter Bestrahlung. Die lokale Tumorkontrolle [%] ist dabei der prozentuale Anteil der Tiere, bei denen das gemessene Tumolvolumen unter dem achtfachen Volumen des Ausgangswerts liegt. ($p = ns$, nicht signifikant, Vergleich von Radiomonotherapie und kombinierter Therapie).

Die Behandlungskombination zeigt gegenüber den beiden Monotherapien einen deutlichen Vorteil. Erst an Tag 40 haben 50% der Tumoren das nötige Volumen überschritten. An Tag 58 sind noch 2 von 8 Mäusen der Behandlungsgruppe unter lokaler Tumorkontrolle, dies entspricht 25%. Ab Tag 78 sind es noch 12,5% die über den gesamten Beobachtungszeitraum das geforderte Volumen unterschreiten.

In Abbildung 18 sind die vier Versuchsarme unter der Verwendung der Dosierung von 1,0 mg/kg dargestellt. Die höhere Dosierung von HGS-ETR-2/Lexatumumab zeigt im Vergleich zur alleinigen fraktionierten Bestrahlung

einen deutlich stärkeren Effekt auch schon zu Beginn der Beobachtung, im Gegensatz zum Verhalten unter niedrigerer Dosierung mit 0,1 mg/kg (Abbildung. 17).

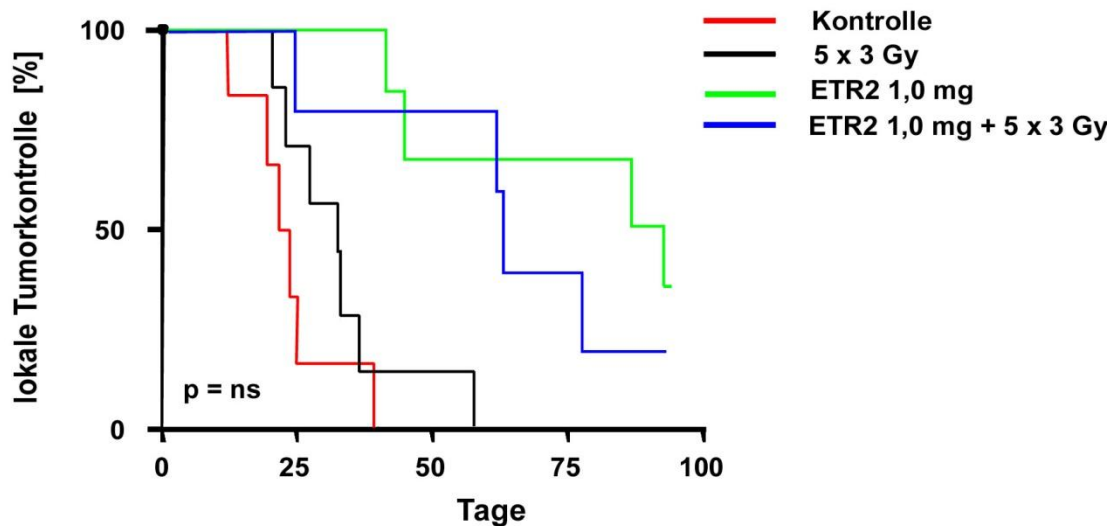


Abb. 18: Kaplan-Meier Darstellungen der Versuchsarme mit einer Antikörperdosierung von 1,0 mg/kg HGS-ETR2/ Lexatumumab (ETR2) mit oder ohne fraktionierter Bestrahlung. Die lokale Tumorkontrolle [%] ist dabei der prozentuale Anteil der Tiere, bei denen das gemessene Tumolvolumen unter dem achtfachen Volumen des Ausgangswertes liegt. ($p = ns$, nicht signifikant, Vergleich von Radiomonotherapie und kombinierter Therapie).

In Abbildung 18 sind die vier Versuchsarme unter der Verwendung der Dosierung von 1,0 mg/kg dargestellt. Die höhere Dosierung von HGS-ETR-2/Lexatumumab zeigt im Vergleich zur alleinigen fraktionierten Bestrahlung einen deutlich stärkeren Effekt auch schon zu Beginn der Beobachtung, im Gegensatz zum Verhalten unter niedrigerer Dosierung mit 0,1 mg/kg (siehe Abbildung. 17). Bei Verwendung der Monotherapie des Antikörpers unterschreiten über 50% der Tumoren bis Tag 85 der Beobachtung das Achtfache des Ausgangsvolumens, an Tag 90, dem Ende der Beobachtungszeit, befindet sich ein Drittel der Tumoren unter lokaler Kontrolle. Die widersprüchliche Aussage der in Abbildung 15 (Kapitel 3.3.) dargestellten Daten spiegeln sich in diesem Histogramm der entsprechenden Konzentration wider. Die Kombinationstherapie scheint hier schlechtere Ergebnisse zu erzielen als eine Antikörpermonotherapie.

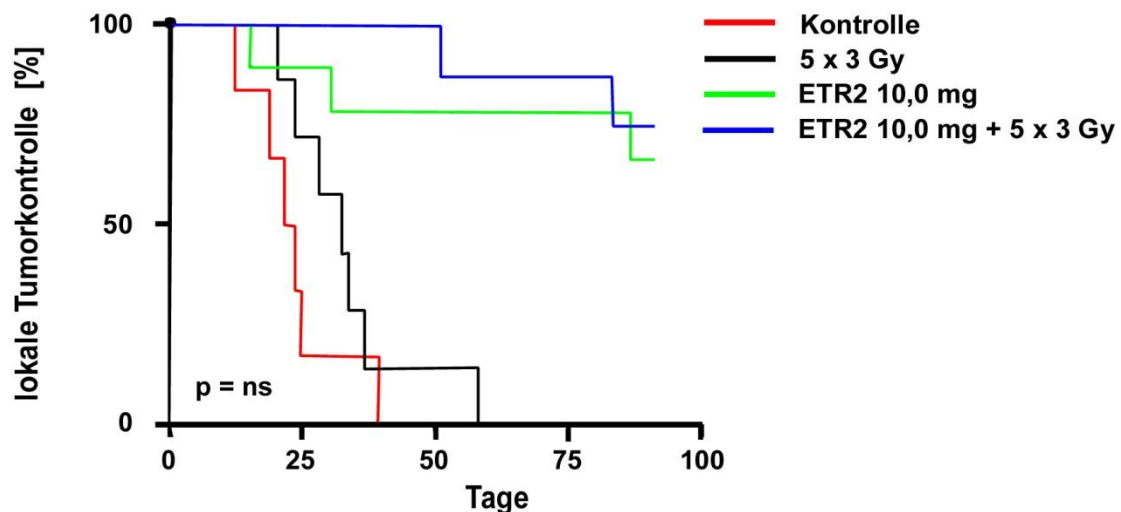


Abb. 19: Kaplan-Meier Darstellungen der Versuchsarme mit einer Antikörperdosierung von 10,0 mg/kg HGS-ETR2/ Lexatumumab (ETR2) mit oder ohne fraktionierter Bestrahlung. Die lokale Tumorkontrolle [%] ist dabei der prozentuale Anteil der Tiere, bei denen das gemessene Tumolvolumen unter dem achtfachen Volumen des Ausgangswertes liegt. ($p = ns$, nicht signifikant, Vergleich von Radiomonotherapie und kombinierter Therapie).

Die Verwendung der höchsten verwendeten Konzentration von 10,0 mg/kg wird in Abbildung 19 dargestellt und verglichen. Sofort wird der durchschlagende Effekt der hohen Dosierung des Antikörpers deutlich. Gegenüber Abbildung 15 in Kapitel 3.3. bietet diese Darstellung den Vorteil, den Effekt von Antikörpermonotherapie und kombinierter Behandlung differenzieren zu können. Dies liegt daran, dass das mittlere Tumorendvolumen der beiden Behandlungsgruppen über den gesamten Behandlungszeitraum nie das achtfache Tumolvolumen überschritten hat. Einzelne Versuchstiere hingegen habe diese Marke erreicht und kommen in dieser Darstellung einzeln zur Geltung.

Bei alleiniger Behandlung mit HGS-ETR-2/Lexatumumab erreicht der erste Tumor das achtfache Volumen des Ausgangswertes an Tag 19, bei kombinierter Therapie ist das erst an Tag 50 der Fall, zwei Drittel der beobachteten Tiere, was sechs von neun Mäusen entspricht, unterschreiten das achtfache Tumolvolumen. Im Behandlungsarm der kombinierten Therapie befanden sich acht Tiere, sieben unterschritten das Volumen bis Tag 50, was 87,5 % entspricht. Eine weitere Maus überschritt das Volumen der lokalen

Tumorkontrolle im Beobachtungszeitraum, so dass 75% der Tumoren im Beobachtungszeitraum unter dem geforderten achtfachen Volumen blieben. Ein Trend zum Vorteil der kombinierten Therapie ist auch bei dieser hohen Dosierung erkennbar, wenn auch nicht signifikant.

Obwohl die Unterschiede der Therapieverläufe nicht signifikant sind, unterstreichen die Darstellungen in Kapitel 3.3. und 3.4. die Ergebnisse aus Kapitel 3.2. Der Vorteil der kombinierten Therapie gegenüber der alleinigen Applikation von HGS-ETR-2/Lexatumumab selbst in hohen Konzentrationen zeigt sich auch bei dieser gewählten Darstellung. Welche Qualität der Wirkungsverstärkung hier vorliegt, d.h. ob es sich um einen additiven oder synergistischen Effekt handelt, geht aus den erhobenen Daten nicht hervor und muss Ziel weiterer Untersuchungen sein. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit von einer additiven Wirkungsverstärkung der fraktionierten Radiotherapie und HGS-ETR-2-Applikation ausgegangen.

3.5 Toxizität der Therapie

Durch Berechnung des medialen maximalen Gewichtsverlust innerhalb der ersten 20 Tage der Therapie wurde auf die Toxizität der Therapie geschlossen. Dabei wurde der maximale Gewichtsverlust in Bezug zu dem Ausgangsgewicht an Tag 1 der Behandlung gesetzt.

Von insgesamt 67 behandelten Tieren verstarben zwei Mäuse vorzeitig und ohne Assoziation zur Tumorgroße. Dabei wurde einzig ein erheblicher Gewichtsverlust in den Tagen vor dem Exitus beobachtet. In beiden Fällen lag die intraperitoneale Applikation des Antikörpers schon Wochen zurück, eine früh-toxischer Effekt der Behandlung scheidet somit aus.

Die Übertragung des Gewichtsverlusts einer Maus auf die Toxizität des Antikörpers lässt keine feinere Differenzierung zu. Da wir keine feingewebliche Untersuchung verschiedener Organgewebe durchführten, können wir somit keine Aussage über eine spezielle Organschädigung treffen. Ebenso lässt diese Betrachtung keine Rückschlüsse auf das potentiell toxische Verhalten im menschlichen Organismus zu.

Die Kontrollgruppe zeigt, dass über einen Beobachtungszeitraum von 20 Tagen der Gewichtsverlust auch ohne Therapie fast 8% betragen kann. Die Tiere aus allen Versuchsarmen mit Behandlung liegen sogar noch unter diesem Wert. Somit haben wir bei dieser Betrachtung keinen Anhalt für eine toxische Wirkung.

Tab. 5: maximaler Gewichtsverlust bezogen auf das Ausgangsgewicht an Tag 1 der Behandlung.

Therapie	max. Gewichtsverlust [%]	Gesamtzahl der Tiere
Kontrolle	7,6	8
nur Bestrahlung (RT, 5x3 Gy)	5,6	7
HGS-ETR-2 0,1 mg/kg	0	9
HGS-ETR-2 0,1 mg/kg + RT	4,3	8
HGS-ETR-2 1,0 mg/kg	2,7	9
HGS-ETR-2 1,0 mg/kg + RT	3,0	9
HGS-ETR-2 10,0 mg/kg	3,0	9
HGS-ETR-2 10,0 mg/kg + RT	1,5	8

3.6 Exemplarischer Behandlungsverlauf eines Xenograft-Tumors

Am Beispiel einer Maus, die mit 1,0 mg/kg und 5 x 3 Gy kombiniert therapiert wurde, soll hier der Therapieverlauf exemplarisch gezeigt werden. Hier zeigt sich der ideale Verlauf mit anfänglicher Tumorregression und anschließendem Wachstum des Xenograft-Tumors.

Dieser beispielhafte Verlauf zeigt nach Behandlungsbeginn an Tag 1 einen sichtbaren Rückgang der Tumorgöße. Schon an Tag 5 ist die

Volumenreduktion klar erkennbar und schreitet bis zum 18. Beobachtungstag fort, an welchem der Tumor dann sein minimales Volumen erreicht. Im Folgenden wächst der Tumor wieder, bis er sein Ausgangsvolumen schließlich überschreitet und an Tag 81 das maximale dokumentierte Volumen erreicht ist.

An Tag 1 und 81 treten die Tumoren durch die starke Vaskularisation und Angioproliferation deutlich gerötet in Erscheinung. Im dazwischen liegenden Zeitraum von Behandlung und Nachbeobachtung ist allerdings keine Rötung mehr zu sehen, die Tumorregression läuft ohne makroskopische Anzeichen einer Entzündung ab. Dies spricht gegen das Vorliegen eines nekrotischen Prozesses und für das Absterben von Tumorzellen durch Apoptose.

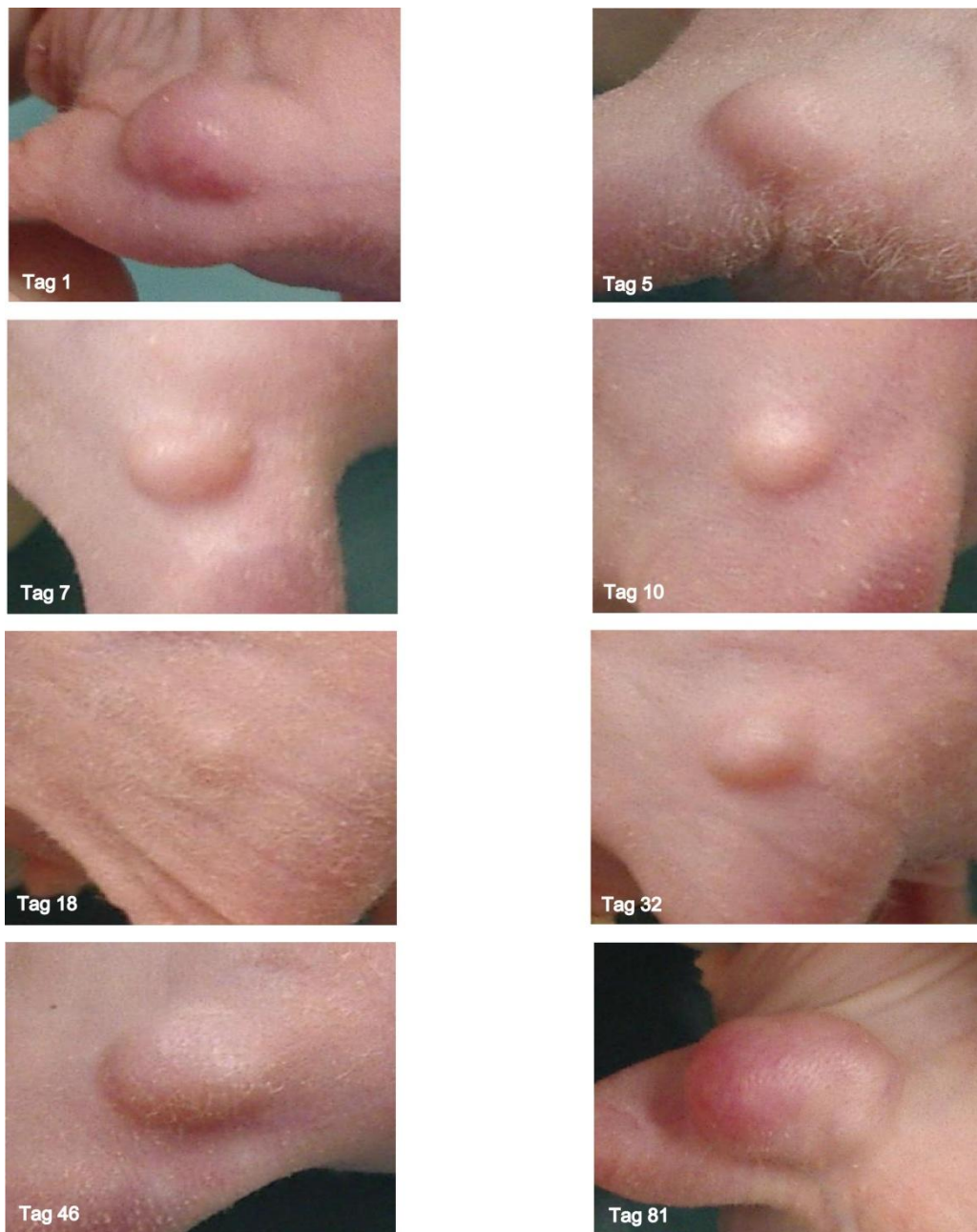


Abb. 20: Verlaufsbeobachtung der Tumorgröße bei einer NMRI nu/nu Nacktmaus mit einem Colo205-Xenograft unter einer Therapie mit HGS-ETR-2/Lexatumumab 1,0 mg/kg und fraktionierter Bestrahlung (5x3Gy). Ausgangsvolumen 103 mm³, Beobachtungszeitraum Tag 1 – 81.

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war, im Nacktmausmodell zu klären, ob sich die vielversprechenden Ergebnisse aus unserem Labor und aus Arbeiten anderer Autoren mit dem Antikörper HGS-ETR-2/Lexatumumab bestätigen und auf ein *in vivo*-Modell übertragen lassen (Marini et al., 2006, Georgakis et al., 2005; de Bono et al., 2004). Das Außergewöhnliche dieser Arbeit ist, dass der humane monoklonale Antikörper HGS-ETR-2/Lexatumumab erstmalig in Kombination mit ionisierender Strahlung im Tiermodell eingesetzt wurde und somit das erste Mal Informationen über die Qualität der Wirksamkeit dieser Kombination gewonnen werden konnten. Dieser *in vivo*-Ansatz ergänzt die parallel hierzu durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen mit den Zellreihen Colo205, HCT15 und HCT116 (Stefanie Denzinger, Promotionsschrift). Ergebnisse dieser Arbeiten sind bereits 2006 publiziert worden (Marini et al., 2006). Im Vordergrund der Untersuchung steht der Vergleich der Monotherapie mit fraktionierter Bestrahlung oder alleiniger Antikörperapplikation und der kombinierten Therapie mit HGS-ETR-2/Lexatumumab und Bestrahlung. Hierbei sollen mögliche additive Effekte beider Therapieansätze untersucht werden.

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.1. bestätigten, dass die Wirkung des Antikörpers eine Dosisabhängigkeit aufweist. Die Verwendung der niedrigsten Dosis von 0,1 mg/kg erzielte bei den Tumoren eine Wachstumsverzögerung, das stetige Wachstum ließ sich aber nicht aufhalten. Hingegen erzielten beide höhere Konzentrationen, 1,0 und 10,0 mg/kg, eine vorübergehende Tumorverkleinerung, wobei die höhere Konzentration eine stärker ausgeprägte Wirkung zeigt. Die Untersuchung der Dosiswirkungsbeziehung ist dabei im Kontext einer Dosisfindung zu sehen, welche für die an diesen Versuch anknüpfenden Langzeituntersuchungen von Bedeutung sind.

Der Vergleich der relativen Tumorumfänge über den Behandlungs- und Beobachtungszeitraum von Mäusen nach alleiniger Bestrahlung versus Tieren nach alleiniger Applikation des Antikörpers lässt erkennen, dass HGS-ETR-2 gegenüber den hier eingesetzten Colo 205 Tumorzellen sehr effektiv wirksam ist. Die verwendeten Konzentrationen 1,0 und 10,0 mg/kg erzielten eine sehr viel stärkere Wirkung als die fraktionierte Bestrahlung mit 5 x 3 Gy.

Für die Auswertung stellte sich die starke Wirkung des Antikörpers alleine in hoher Dosierung als problematisch heraus. Hoch konzentriert (10mg/kg KG) hat HGS-ETR-2/Lexatumumab einen so starken Effekt, dass eine Beurteilung und Differenzierung des Wirkungszusammenhangs kaum möglich ist. Einzig die Kaplan-Meier-Darstellung der 10 mg/kg Dosierung lässt noch die Wirkungen der Antikörpermonotherapie und der Kombinationsbehandlung differenzieren und zeigt die leichte Überlegenheit der kombinierten Therapie auch in dieser hohen Konzentration. Besser darstellbar ist der zumindest additive Zusammenhang anhand der Verläufe mit niedriger Dosierung. Bei deren Auswertung zeigt sich eine stärkere Wirkung der Kombinationstherapie im Vergleich zur HGS-ETR-2-Monotherapie in allen dargestellten Abbildungen (Abbildung 11, 14, 17).

Deutlich überlegen ist die kombinierte Therapie bei Betrachtung der relativen Tumorumfänge (Abbildung 11). Die Tumorverdoppelungszeit bei Verwendung dieser Konzentration zeigt eine Verzögerung im Wachstum auf das Achtfache des Ausgangsvolumens von 4,1 Tagen (Abbildung 14). Abbildung 17, die entsprechende Kaplan-Meier Darstellung, demonstriert die stärkere Wirkung der kombinierten Therapie. Erst am Beobachtungstag 40 überschreiten mehr als 50% der Tumoren das Achtfache des Ausgangsvolumens, dem Volumen, das als Grenze für die lokale Tumorkontrolle festgelegt wurde. Die Antikörpermonotherapie überschreitet diese Grenze schon am 30. Nachbeobachtungstag. Nicht nur der starke Effekt des Antikörpers lässt sich erkennen, auch der Vorteil der Therapiekombination geht aus diesen Daten hervor.

Welcher Effekt hier vorliegt, d.h. ob es sich hierbei um eine rein additive oder aber eine, im Zellkulturversuch bereits nachgewiesene, synergistische Wirkung handelt, ist aus diesen Ergebnissen nicht zu folgern.

Die Toxizität des Antikörpers wurde anhand des maximalen medialen Gewichtsverlusts beurteilt. Die hier verwendete Methode der Gewichtsmessung liefert allerdings nur einen Anhaltspunkt auf eine mögliche Unverträglichkeit der

Therapie und ersetzt keine histologische Untersuchung. Ein Hinweis auf eine potentielle Toxizität konnte bei uns nicht festgestellt werden.

Die makroskopische Beurteilung der Tumoren, repräsentativ dargestellt in Kapitel 3.6., zeigt eine entzündungsarme Wirkung am Tumor. Diese Beobachtung stützt die Ergebnisse aus der Zellkultur, dass die Hauptwirkung auf die Tumorzellen auf apoptotische Vorgänge zurückzuführen ist (Marini et al., 2006; Doktorarbeit Stefanie Denzinger).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass HGS-ETR-2/Lexatumumab alleine eine hohe Wirksamkeit und in Kombination mit ionisierender Strahlung eine zumindest additive Wirkung im kolorektalen Nacktmaus-Xenograft-Modell aufweist.

4 DISKUSSION

Die durchschlagende Wirkung von HGS-ETR-2/Lexatumumab im Tierversuch macht den Antikörper zu einem großen Hoffnungsträger der künftigen Krebstherapie, besonders als Partner in einer Kombinationstherapie, z.B. mit einem Zytostatikum oder aber, wie in dieser Arbeit dargestellt, mit ionisierender Strahlung.

Dabei werden die Aspekte Wirksamkeit und vor allem auch die Sicherheit des Antikörpers weiterhin untersucht werden müssen. Da TRAIL nach anfänglicher Euphorie aufgrund einer potentiell leberschädigenden Wirkung etwas aus dem Fokus klinischer Forschung geriet (Jo et al., 2001, siehe Kapitel 1.4), wird den weniger toxischen, agonistischen TRAIL-Rezeptorantikörpern besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Die vorliegenden Versuche weisen auf eine unbedenkliche Nebenwirkungsrate von HGS-ETR-2/Lexatumumab hin, allerdings bleibt bei Versuchen im Nacktmausmodell zu bedenken, dass Lexatumumab ein humanisierten Antikörper ist und direkte Rückschlüsse auf die Wirkung bei Menschen nur eingeschränkt zu ziehen sind (Grosse-Wilde, Promotionsschrift, 2001). Hier zeigen aber erste klinische Studien zufriedenstellende Ergebnisse und bestätigen bisher die Unbedenklichkeit des Einsatzes des Antikörpers auch am Menschen (de Bono, 2005; Plummer et al., 2007; Sikic et al., 2007; siehe Kapitel 4.6).

Neben den hier vorliegenden Ergebnissen wurden im Verlauf der letzten Jahre eine ganze Reihe von Untersuchungen mit HGS-ETR-2/Lexatumumab durchgeführt, die alle auf eine durchschlagende Wirkung hinweisen. Bisher ist allerdings keine Arbeit zur Kombination von HGS-ETR-2/Lexatumumab und ionisierender Strahlung publiziert worden. Im Folgenden sollen die bereits gewonnene Erkenntnisse diskutiert werden.

2001 untersuchten *Ichikawa et al.* die Effekte des ebenfalls homologen Anti-DR5-Antikörpers TRA-8 auf eine Reihe leukämischer T- und B-Zellen sowie auf

einige solide Tumore des Gehirns. Als Kontrollen diente dabei das entsprechende Normalgewebe.

TRA-8 ist ein IgG1- κ Antikörper, der im Gegensatz zu HGS-ETR-2/Lexatumumab nicht humanisiert vorliegt und damit auch nicht am Menschen untersucht und verwendet werden kann. *Daiichi Sankyo* entwickelten daraus die humanisierte Form CS 1008. Dieser Antikörper ist zurzeit Mittelpunkt von Untersuchungen der Phase 1, ein Versuch der Phase 2 ist geplant. Klinische Untersuchungen in Kombination mit einer Radiatio wurden allerdings mit diesem Antikörper noch nicht durchgeführt.

Um eine mögliche Abhängigkeit der Antikörperwirkung von der Oberflächenexpression des Ziel-Rezeptors zu überprüfen, wurde die Rezeptorendichte mit der effektiven Apoptosewirkung auf die Zelle korreliert. Es zeigte sich, dass die jeweiligen gesunden Zellen keine detektierbare Dichte an DR5-Rezeptoren an der Zelloberfläche aufweisen, hingegen aber die jeweiligen Krebszellen diese Rezeptoren exprimieren. Obwohl bei Jurkat-Zellen und der Zellreihe CEM-6, zwei leukämischen Zellenreihen, nur ein geringes Maß an Rezeptoren auf der Oberfläche gemessen wurde, zeigten diese Zellen eine hohe Apoptoserate nach TRA-8-Applikation. Auch bei den beobachteten Astrozytomen korrelierte die Rezeptorexpression nicht mit der Wirkung des Antikörpers auf den Zellen (Ichikawa et al., 2001). Demnach liegt der Schluss nahe, dass die Rezeptorendichte zumindest nicht der einzige bestimmende Faktor ist, der die DR5-Wirkung auf Tumorzellen determiniert. Ähnliche Resultate wurden auch in unserem Labor bei Untersuchung der kolorektalen Zellreihen Colo205, HCT15 und HCT116 beobachtet. Obwohl alle drei kolorektale Tumorzellreihen eine hohe Rezeptorendichte an ihrer Oberfläche aufweisen, ist die Wirkung des Antikörpers HGS-ETR-2 bei Behandlung von Colo205-Zellen am durchschlagendsten (Marini et al., 2006). *Ichikawa et al.* demonstrierten die Wirkung des Antikörpers auf Jurkat sowie Astrozytom-Zellen im Tierversuch an Mäusen. Allerdings wurde dabei ein anderer Versuchsaufbau verwendet, als in der vorliegenden Arbeit. Nicht die Wirkung auf den manifesten Tumor wurde untersucht, sondern in beiden Fällen folgte die Antikörperapplikation nach Tumorzellinjektion bzw. Tumortransplantation sofort

oder nach einer Woche post injectionem, also bevor sich Tumorzellen organisieren und im Organismus verbreiten oder einen meßbaren Tumor bilden konnten (Ichikawa et al., 2001). Die guten Ergebnisse von *Ichikawa und Mitarbeitern* geben also einen Hinweis auf die Eigenschaft des Antikörpers, bei frühem Einsatz ein Anwachsen bzw. eine Ausbreitung im Organismus zu vermeiden, also im Sinne einer Krebsprophylaxe. Unser Versuchsaufbau orientiert sich dagegen an der klinischen, onkologischen Routinesituation, in der ein manifester Tumor behandelt werden muß und ist damit geeigneter, Prognosen über die klinische Relevanz zu treffen. Der mit HGS-ETR-2 behandelte Tumor hatte im vorliegenden Versuchsaufbau Gelegenheit, sich in seinem neuen Wirt zu organisieren, Anschluss an das Gefäßsystem zu finden und zu wachsen.

Georgakis et al. verwendeten HGS-ETR-2/Lexatumumab in Kombination mit dem Anthrazyclin Doxorubicin und dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib. Diese Kombination, wenn auch nicht am soliden Tumor sondern an humanen Lymphom-Zellen durchgeführt, gibt uns Hinweise über die Verknüpfung von extrinsischem und intrinsischem Signalweg, kann Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede der Wirkung aufzeigen. Durch die genannten Chemotherapeutika wird dabei der intrinsische Signalweg der Apoptose ausgelöst, in dessen Zentrum das aus dem Mitochondrium frei gewordene Cytochrom C steht. Dieser Weg interagiert mit einem durch HGS-ETR-2/Lexatumumab extrinsisch ausgelösten Prozess und besitzt als Bindeglied das Protein Bid (siehe Kapitel 1.1.2.). Fast alle der 27 durch *Georgakis und Mitarbeitern* untersuchten Lymphom-Zellreihen waren sensibel für HGS-ETR-2/Lexatumumab und zeigten eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Wachstumsverzögerung der Lymphome. HGS-ETR-2 scheint also nicht nur ein wirkungsvoller Apoptoseauslöser in soliden Tumoren zu sein. Interessanterweise erzielte die kombinierte Therapie mit HGS-ETR-2 und Doxorubicin einen starken, synergistischen Effekt auf Jurkatzellen, hingegen zeigte die Applikation von HGS-ETR-2 zusammen mit Bortezomib zwar einen starken, aber nur additiven Effekt (Georgakis et al., 2005). Dabei wurde in einer vorausgegangenen Studie mit dieser Therapiekombination in Hodgkin-Lymphom Zellen eine

synergistische Wirkung erzielt (Zheng et al., 2004). Demnach scheint jede zytostatische Substanz sowie jede verwendete Zellreihe in einer mit HGS-ETR-2/Lexatumumab kombinierten Therapie einzeln beurteilt werden zu müssen. Dies spricht dafür, dass die regulierenden und verknüpfenden Mechanismen der beiden Signalwege sehr fein differenziert sind und generelle Voraussagen bis zum endgültigen Verstehen dieser Zusammenhänge schwierig machen.

Die Wirkung von TRA-8 wurde ebenfalls in Kombination mit Strahlentherapie getestet. Untersucht und dokumentiert wurde von *Buchsbaum et al.* die Wirkung des Antikörpers *in vitro* und *in vivo* (Buchsbaum et al., 2003). Der Effekt der Antikörpermonotherapie wurde dabei mit der kombinierten Behandlung mit zusätzlicher Chemotherapie sowie Strahlentherapie verglichen.

Die Kombination mit Paclitaxel zeigte bei allen untersuchten Zellreihen nur einen additiven Effekt. Hingegen demonstrierte die Kombinationstherapie mit Adriamycin in vier der neun Zellreihen eine synergistische Verstärkung der Therapien. Die Verwendung dieser Therapien im Mausmodell zeigte die gleichen Effekte der kombinierten Therapie mit den verwendeten Chemotherapeutika. Paclitaxel und TRA-8 wirkten stark, aber nur additiv, Adriamycin in Verwendung mit TRA-8 zeigt durch seinen Synergismus eine sehr starke Wirksamkeit (Buchsbaum et al., 2003). Diese Resultate stützen die schon angeführte These, dass die Qualität der Effektivität der Kombinationstherapie mit einem DR5-Rezeptorantikörper sowohl vom Kombinationspartner als auch von der untersuchten Zellreihe abhängen kann.

Die ebenfalls von *Buchsbaum und Mitarbeitern* kombinierte Antikörper-Strahlentherapie, für uns von besonderem Interesse, lieferte erste Erkenntnisse dieser Therapie mit ionisierender Strahlung. Einen Synergismus zeigte sowohl die Doppeltherapie von TRA-8 und Bestrahlung wie auch die dreifache Therapie mit zusätzlich appliziertem Adriamycin, welche eine durchschlagende Wirkung erzielte. Allerdings wurden an sechs Zeitpunkten in den ersten 24 Tagen des Versuchs der Antikörper appliziert. Diese oftmaligen Dosisapplikationen könnte für die starke Wirkung verantwortlich sein. In der hier vorliegenden Dissertation wurde HGS-ETR-2 nur an drei Tagen appliziert, wir bestrahlten allerdings dreimal häufiger mit 3 Gy als im beschriebenen Modell

von *Buchsbaum* (Buchsbaum et al., 2003). Unser Therapieschema legte dementsprechend mehr Wert auf die Komponente der Radiotherapie und gewichtet ihre Wirkung stärker. Dass die Therapie bestehend aus Antikörper, Radiotherapie mit 2 x 3 Gy und Adriamycin die stärkste Wirkung erzielte, überrascht bei dieser Therapiekombination aus drei Modalitäten nicht.

Weitere Resultate zeigt eine Untersuchung von TRA-8 an Zervixkarzinom-Zellen, die mit Cisplatin, Topotecan, aber auch fraktionierter Bestrahlung behandelt wurden. *Straughn et al.* demonstrierten die unterschiedlich starke Oberflächenexpression des DR5-Rezeptors verschiedener Zellreihen. Auch hier war im *in vitro*-Versuch ein synergistischer Effekt der Kombination mit beiden Chemotherapeutika, aber auch mit der Bestrahlung mit 3 x 3 Gy, zu beobachten. Der für uns interessante *in vivo*-Versuch, der Vergleiche mit unseren Ergebnissen zulässt, zeigt eine deutliche Wachstumshemmung für Cisplatin und auch für die durchgeführte TRA-8 Antikörpertherapie. Ein Synergismus aus intrinsischem und extrinsischen Signalweg war dabei allerdings nicht sicher zu erkennen (Straughn et al., 2006).

Die oben beschriebenen Beobachtungen für TRA-8 und Lexatumumab lassen einige Schlüsse zu. Eine antiapoptotische Wirkung sowie die Steigerung der Effektivität in Kombination mit DNA-schädigenden Modalitäten sind mehrfach bestätigt worden. Für uns ist aber die Qualität dieser Verstärkung wichtig. Liegt eine synergistische oder nur eine additive, unterstützende Wirkung beider Therapiemodalitäten vor? Nur der Synergismus zweier unterschiedlicher Therapieoptionen ist für die onkologische Therapie ein wirklicher Durchbruch und besäße die Möglichkeit, die Dosierungen der einzelnen Modalitäten zu reduzieren und damit potentielle Nebenwirkungen zu verringern.

Bisher lassen sich keine klaren Kriterien erkennen, an denen das Wirken einer kombinierten Therapie vorhersagbar gemacht wird. Der Effekt einer Kombinationstherapie scheint sehr abhängig von der spezifischen Zellreihe, wie auch von der zweiten Therapiemodalität zu sein. Auch die Oberflächenexpression des Rezeptors scheint über Wirkungsstärke und Verstärkungsmodus keine Prognose zuzulassen. Welchen Einfluss die *decoy*-

Rezeptoren TRAIL-R3 und TRAIL-R4 auf die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber einer solchen Therapie haben, ist noch unklar.

Wie oben beschrieben, wurde die HGS-ETR-2-Wirkung in Kombination mit zytostatischen Substanzen ebenfalls untersucht. Diese Ergebnisse sind mit TRA-8 vergleichbar, d.h. es wurden synergistische wie additive Effekte beschrieben. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals die Kombination mit fraktionierter Bestrahlung *in vivo* untersucht und Ergebnisse teilweise bereits publiziert (Marini et al. 2006). In dieser Publikation wurden parallel dazu auch *in vitro* Ergebnisse zur Kombinationstherapie an drei verschiedenen kolorektalen Karzinom-Zellreihen (Colo205, HCT15, HCT116) gezeigt. Die einmalige Bestrahlung mit 10 Gy und die HGS-ETR-2 Antikörperapplikation erzielte bei Colo205 die stärkste Wirkung. Die kombinierte Therapie war den beiden Monotherapien deutlich überlegen.

Gleichzeitig sind dies die ersten Untersuchungen zur Wirkung auf ein kolorektales Karzinom. Bisher lagen Studien zu einer ganzen Bandbreite leukämischer und solider Tumoren vor (Georgakis et al., 2005; Zeng et al., 2006; Younes et al, 2006; Shimada et al., 2007; Belyanskaya, et al., 2007). Da das kolorektale Karzinom zu den häufigsten Malignomen der westlichen Industriestaaten gehört, sind neue, wirksame Therapiemöglichkeiten gegen diese Tumorentität aus epidemiologischer Sicht von besonderem Interesse.

Mechanismen auf zellulärer Ebene, die für einen synergistischen oder auch nur additiven Effekt einer Kombinationstherapie verantwortlich sind, bilden den entscheidenden Hintergrund dieser Arbeit. Einer der wichtigen koordinierenden Faktoren ist das aus der Bcl-2-Familie stammende pro-apoptotische Protein Bax (von Haefen et al., 2004; Wendt et al., 2005). Dieses ist ein im Zytosol gesunder Zellen vorliegendes Monomer. In apoptotischen Zellen oligomerisiert aktiviertes Bax und wird in die äußere mitochondriale Membran integriert, die dadurch durchlässig für Apoptose regulierende Proteine wird (Antonsson et al., 2001). Als Protein das an der mitochondrialen Membran wirkt, kommt Bax eine entscheidende Rolle bei der Frage zu, ob die Rezeptoraktivierung fähig ist, letztendlich eine Apoptose auszulösen. *LeBlanc et al.* zeigten an

Kolonkarzinomzellen, dass Bax für die TRAIL-induzierte Apoptose obligater Bestandteil ist: Zellen ohne Bax waren resistent gegenüber TRAIL, wohingegen Bax-exprimierende Zellen nach TRAIL-Behandlung in die Apoptose gingen (LeBlanc et al., 2002). An dem Punkt ansetzend, wo beide Wege der Signalkaskaden zusammenlaufen, ist dieses Protein von Bedeutung für einen synergistischen Effekt. Von Haefen et al. konnten an Prostatakarzinomzellen zeigen, dass die Expression von Bax wichtiger Bestandteil des synergistischen Mechanismus von TRAIL und dem Chemotherapeutikum 5-FU ist, die Arbeitsgruppe um Wendt zeigte die gleiche Abhängigkeit für die Kombination TRAIL und Radiotherapie (von Haefen et al., 2004; Wendt et al., 2005).

Anhand der Tatsache, dass die Aktivierung von Bax und Bak direkte Folge der tBid-Aktivität ist, erklärt sich die herausragende Rolle dieses Proteins (Wang et al., 1996). Die Annahme, es lägen bei der durch Rezeptoren ausgelösten Apoptose zwei Wege vor, die klar voneinander zu trennen sind, hat sich nicht bestätigt. Vielmehr scheinen sich beide Mechanismen, die direkte Effektorcaspasen-Aktivierung und der „Umweg“ über das Mitochondrium, gegenseitig zu unterstützen. Es ist noch nicht endgültig geklärt, ob die direkte, unmittelbare Aktivierung der Effektorcaspasen über Caspase 8 durch Rezeptoraktivierung überhaupt ausreicht, die Apoptose auszuführen. Hinweise liegen vor, dass erst die Verstärkung des Prozesses durch mitochondriale Faktoren dazu führt, dass genug aktivierte Caspase 8 bereit gestellt wird um die apoptotische Wirkung zu erzielen (Scaffidi et al., 1998). Aus diesen Gründen liegt es nahe, an einen Mechanismus zu denken, bei dem DNA-schädigende Prozesse über die zusätzliche Wirkung am Mitochondrium die Schwelle für eine erfolgreiche Apoptose durch extrazelluläre Rezeptoraktivierung überhaupt erst möglich machen. Bei dieser Betrachtung stellt sich die Frage, ob das massive Vorliegen aktivierter Caspase 8 gar nicht die Ursache sondern die Konsequenz der tBid vermittelten Prozesse ist und sich dieser Signalweg so selbst verstärkt (Broaddus et al., 2005).

An einem Beispiel mit HGS-ETR-2/Lexatumumab haben dies Georgakis et al. an einer Reihe hämatologischer Malignome gezeigt. Sie untersuchten die Wirkung des Antikörpers und demonstrierten neben der guten Wirksamkeit,

auch in Kombination mit Chemotherapeutika, eine Korrelation der Ligandenwirkung mit der Höhe der vorliegenden Bid-Expression der jeweiligen Zellreihe. Ein Fehlen von Bid resultierte in einer Resistenz gegenüber HGS-ETR-2 (Georgakis et al., 2005).

Es ist die Verknüpfung des extrinsischen und intrinsischen Apoptosesystems über tBid welche die Möglichkeit einer synergistischen Wirkung wahrscheinlich werden lässt. Somit ist dieser verknüpfende Mechanismus der zentraler Prozess für unseren Versuchsaufbau auf den die durchschlagende, Resistenzen überwindende Wirkung der kombinierten Therapie basiert.

HGS-ETR-1/Mapatumumab, ein Antikörper gegen den DR4-Rezeptor von *Human Genome Sciences*, wurde zeitgleich mit HGS-ETR-2/Lexatumumab untersucht. Dank des identischen Versuchsaufbau lassen die Daten einen direkten Vergleich zu.

Die Hypothese, dass die Wirkung von HGS-ETR-2/Lexatumumab stärker als die von HGS-ETR-1/Mapatumumab ist, konnte bestätigt werden. Die Ergebnisse der Promotionsschrift von Stefanie Denzinger (Marini et al, 2006) zeigen die durchschlagenden Ergebnisse einer *in vitro*-Behandlung von Colo205-Zellen und bestätigte die große Potenz von HGS-ETR-2/Lexatumumab. HGS-ETR-1/Mapatumumab führte nach 48h zu einer Apoptoserate von 40-50%, auf HGS-ETR-2/Lexatumumab reagierten die Zellen zu über 80% apoptotisch. Auf eine kombinierte Therapie zeigten die Zellen allerdings sowohl auf HGS-ETR-1 und auf HGS-ETR-2 mit einer Apoptoserate von ca. 90% nach 48h die gleiche Reaktion. Die Wirkung scheint bei Colo205 nahezu ausgeglichen. Bei HCT15-Zellen, ebenfalls einer kolorektalen Tumorzellreihe, war bei HGS-ETR-2/Lexatumumab wieder ein Wirkungsvorteil zu beobachten. Die Beobachtungen *in vivo* unterstreichen diese Ergebnisse noch. So führte die Monotherapie mit beiden Antikörpern in äquivalenter Dosis von 1,0 mg/kg zu einer Tumorverdoppelungszeit von 24 Tagen bei HGS-ETR-1 und 81 Tagen bei HGS-ETR-2, im Gegensatz zu den unbehandelten Tieren, bei denen sich der Tumor innerhalb 5,6 Tage verdoppelte (Marini et al., 2006).

Eine Studie, die ebenfalls den Vergleich der beider Antikörper ermöglicht, liegt von *Georgakis et al.* vor. An einer Reihe verschiedener Lymphomzellen getestet, zeigte sich, dass die meisten von ihnen, darunter Jurkat- und Non-Hodgkin-Zellen, sensitiv gegenüber beider Antikörper sind. Es ergab sich hier nur ein geringer Unterschied in der Wirkungsstärke beider Liganden. Die Kombination mit den Chemotherapeutika Bortezomib und Doxorubicin zeigten an diesen Zellen eine Wirkungsverstärkung (Georgakis et al., 2005).

Die im vorangegangenen beschriebenen, aber auch weitere Untersuchungen verdeutlichen, dass auch mit HGS-ETR-1/Mapatumumab eine effektive Therapie möglich erscheint (Zeng et al., 2006; Humphreys et al., 2005), wenngleich auch HGS-ETR-2/Lexatumumab das größere apoptotische Potential aufweist. Naheliegender wäre eine Kombination beider Antikörper. Diese hätten möglicherweise gemeinsam das Potential, eine Apoptose auszulösen. Wenn man allerdings bedenkt, dass beide Signalwege in einer Caspase 8-Aktivierung enden, ist wohl nur eine additive Verstärkung der Wirkung zu erwarten. Die Untersuchung von *Marini et al.* bestätigt dieses Verhalten (Marini et al., 2006).

Die vorliegende Arbeit zeigte zum ersten Mal Ergebnisse zur Therapiekombination von HGS-ETR-2/Lexatumumab mit fraktionierter Strahlentherapie. Bisher lagen nur Ergebnisse anderer Antikörper, wie TRA-8 oder die kombinierte Therapie von HGS-ETR-2/Lexatumumab mit verschiedenen Zytostatika, vor. Die meisten Studien betrachten vor allem die Wirkung auf leukämische Tumorzellen oder auf Tumoren des ZNS oder der Mamma. Die Studienlage zum epidemiologisch bedeutsamen kolorektalen Karzinom ist sehr dünn.

Nachdem der agonistische anti-DR5 Antikörper HGS-ETR-2/Lexatumumab und auch der agonistische anti-DR4 Antikörper HGS-ETR-1/Mapatumumab auf Wirksamkeit und Sicherheit *in vitro* und *in vivo* in einigen Studien getestet wurden, sind diese beiden voll humanisierten Antikörper mittlerweile Gegenstand klinischer Forschung in Phase 1 und 2 (deBono, 2005; Plummer et al., 2007; Hotte et al., 2005; Kanzler et al., 2005). Mit TRA-8 ist dies erst

möglich, seit die Entwicklung der humanisierten Form dieses Antikörpers, CS 1008, abgeschlossen wurde. Erste klinische Studien sind im Prozess der Phase 1 (Pressemitteilung *Daichii Sankyo*). Klinische Studien mit Mapatumumab bestätigen bisher die Sicherheit dieses Antikörpers und lassen sein großes vorhandenes therapeutische Potential erkennen (Hotte et al., 2005; Kanzler, 2005).

HGS-ETR-2/Lexatumumab wurde in niedrigen Dosierungen bisher gut vertragen (deBono, 2005; Plummer et al., 2007, Patanaik et al., 2007). In zwei Studien wurde ein Anstieg der Serumamylase bei Verwendung einer hohen Konzentration beobachtet. Dies könnte als erstes Anzeichen einer Unverträglichkeit gedeutet werden (deBono, 2005; Plummer et al., 2007) und es wird nötig sein, sich diesem Problem in Zukunft zu widmen.

Obwohl in oben genannten Untersuchungen konstant erste Erfolge zu verzeichnen waren und abhängig von der verwendeten Dosis ein vorübergehendes Aufhalten der Tumorprogression beobachtet wurde, blieb der durchschlagende Erfolg bisher aus. Zu bedenken ist dabei, dass HGS-ETR-2 meist als Monotherapie eingesetzt wurde, sein Potential als Partner in einem kombinierten Therapieansatz somit noch nicht zum Tragen kam. *Sikic et al.* verwendeten in ihrer klinischen Studie der Phase 1b erstmalig HGS-ETR-2 in Kombination mit den Zytostatika Gemcitabine, Pemetrexed, Doxorubicin und in einem FOLFIRI-Therapieschema (Folinsäure, 5-FU, Irinotecan). Der Antikörper wurde auch unter Kombinationstherapie gut vertragen und über oben geschilderte Ergebnisse heraus wurde zum Teil eine vorübergehende Tumorregression beobachtet (Sikic et al., 2007). Die frühe klinische Erforschung von HGS-ETR-2/Lexatumumab bestätigt unsere gewonnene Erkenntnis, dass dieser Antikörper vor allem eine Therapieoption darstellt, die in Kombination mit anderen Medikamenten sein volles Potential entfaltet und deren Synergismus in der Lage ist, Resistenzen einer Tumorzelle zu überwinden. Erst klinische Studien werden zeigen, ob die große Rolle der Strahlentherapie in einem kombinierten Therapieansatz, wie sie diese Arbeit am Tiermodell belegt, für die Krebstherapie therapeutische Relevanz haben wird.

Die vorliegenden Ergebnisse zur Therapie mit den Antikörpern alleine, wie auch in Kombination mit Chemo- oder Strahlentherapie im präklinischen und klinischen Versuch an einer großen Bandbreite solider wie auch hämatologischer Malignome geben Hoffnung für die weiterführenden klinischen Untersuchungen und eine mögliche zukünftige Nutzung in der modernen Tumorthherapie. Wichtig erscheint, in künftigen Versuchen nicht nur die Wirkung der Antikörper alleine zu untersuchen, sondern die Möglichkeit einer synergistischen Wirkung in Kombination mit verschiedensten Chemotherapeutika und der Strahlentherapie gezielt zu untersuchen, um resultierenden Vorteile klinisch nutzen zu können.

Durch seine durchschlagende Wirkung und sein hohes therapeutisches Potential in der Kombinationstherapie ist HGS-ETR-2 ein vielversprechender Kandidat für die moderne Krebstherapie.

.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund der wachsenden Bedeutung neoplastischer Erkrankungen als zweithäufigste Todesursache in westlichen Industrieländern, kommt der Erforschung und Entwicklung neuer Strategien in der Krebstherapie eine immer größer werdende Bedeutung zu. Die Nutzung der Strahlentherapie in den vergangenen Jahrzehnten hat dabei Möglichkeiten geschaffen, mit multimodalen Therapieschemata eine Vielzahl von Tumoren effektiv zu behandeln. Allerdings sind der Wirkung der Strahlentherapie, wie auch der Chemotherapie, durch zahlreiche Resistenzmechanismen entarteter Zellen Grenzen gesetzt. Die Erforschung molekular zielgerichteten Therapieformen (*targeted therapy*) wie z.B. die Behandlung mit Zelltodliganden, die durch Rezeptorenaktivierung in der maligne transformierten Zelle den programmierten Zelltod auslösen können, hat in den letzten Jahren an Bedeutung zugenommen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung des monoklonalen, am DR5-Rezeptor agonistisch wirkenden Antikörpers HGS-ETR-2/Lexatumumab. Im Mausmodell an einem Colocarcinom-Xenograft-System wurde die Auswirkung der kombinierten Behandlung mit dem Antikörper und fraktionierter Strahlentherapie untersucht.

Durch den Vergleich der verschiedenen Versuchsarme konnte eine dosisabhängige Wirkung des Antikörpers festgestellt werden. Die Kombination von Antikörper und fraktionierter Bestrahlung ließ erkennen, dass diese wirksamer war als jede Behandlungsmodalität alleine. Die Applikation von Antikörper und Bestrahlung hatte eine signifikante Wirkungsverstärkung ohne messbare Toxizität im Tiermodell zur Folge.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die kombinierte Therapie agonistischer Antikörper als molekular zielgerichtete Therapie mit klassischer Strahlentherapie durch ihre sich potenzierende Wirkung einen neuen, im präklinischen Versuch hoffnungsvollen Therapieansatz darstellt, Resistenzen von Tumorzellen zu überwinden. Die tatsächliche Effektivität und Verträglichkeit für den Menschen soll in zukünftigen klinischen Studien geklärt werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC. 2001. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem.* 276:11615-11623.
2. Ashkenazi A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer.* 2:420-430.
3. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokhi Z, Schwall RH. 1999. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest.* 104:155-162.
4. Ballestrero A, Nencioni A, Boy D, Rocco I, Garuti A, Mela GS, Van Parijs L, Brossart P, Wesselborg S, Patrone F. 2004. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand cooperates with anticancer drugs to overcome chemoresistance in antiapoptotic Bcl-2 family members expressing jurkat cells. *Clin Cancer Res.* 10:1463-1470.
5. Belka C, Schmid B, Marini P, Durand E, Rudner J, Faltin H, Bamberg M, Schulze-Osthoff K, Budach W. 2001. Sensitization of resistant lymphoma cells to irradiation-induced apoptosis by the death ligand TRAIL. *Oncogene.* 20:2190-2196.
6. Belyanskaya LL, Marti TM, Hopkins-Donaldson S, Kurtz S, Felley-Bosco E, Stahel RA. 2007. Human agonistic TRAIL receptor antibodies Mapatumumab and Lexatumumab induce apoptosis in malignant mesothelioma and act synergistically with cisplatin. *Mol Cancer.* 6:66.
7. Blom WM. 2000. Cell death in rat hepatocytes: Apoptosis-inducing and -protective mechanisms. Division of Toxicology, Leiden-Amsterdam Center for Drug-Research (LACDR).
8. Bodmer JL, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, Juo P, Blenis J, Tschopp J. 2000. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol.* 2:241-243.
9. Bodmer JL, Meier P, Tschopp J, Schneider P. 2000. Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem.* 275:20632-20637.

10. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Yousoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK. 2006. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Eng J Med.* 354:567-578.
11. Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. 1997. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem.* 270:7795-7798.
12. Broaddus VC, Dansen TB, Abayasiriwardana KS, Wilson SM, Finch AJ, Swigart LB, Hunt AE, Evan GI. 2005. Bid mediates apoptotic synergy between tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and DNA damage. *J Biol Chem.* 280:12486-12493.
13. Buchsbaum DJ, Zhou T, Grizzle WE, Oliver PG, Hammond CJ, Zhang S, Carpenter M, LoBuglio AF. 2003. Antitumor efficacy of TRA-8 anti-DR5 monoclonal antibody alone or in combination with chemotherapy and/or radiation therapy in a human breast cancer model. *Clin Cancer Res.* 9:3731-3741.
14. Budach W. 1995. Wachstumsverzögerung und Tumorheilung nach Bestrahlung experimenteller Tumoren: Einfluss des Tumorstromas, genetischer Faktoren sowie strahlen- und chemotherapeutischer Vorbehandlungen. *Habilitationsschrift.*
15. Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. 1997. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity.* 7:821-830.
16. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell.* 81:505-512.
17. Cohen-Jonathan E, Bernhard EJ, McKenna WG. 1999. How does radiation kill cells? *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:77-83.
18. Cory S, Adams JM. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2:647-656.
19. de Bono JS, Attard G, Pacey S, Greystoke A, Plummer R, Bale C, Fox N, Corey A, Calvert H. 2004. A phase 1 safety and pharmacokinetic (PK) study of an agonistic, fully human monoclonal antibody, HGS-ETR2, to the TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2 (TRAIL R2) in patients with advanced cancer. *EJC SUPPL 2004.* 2 8 Abs 197.

20. Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. 1997. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity*. 7:813-820.
21. Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. 2003. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*. 14:193-209.
22. Denis F, Rheaume E, Aouad SM, Alam A, Sekaly RP, Cohen LY. 1998. The role of caspases in T cell development and the control of immune responses. *Cell Mol.Life Sci*. 54:1005-1019.
23. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. 1991. Mechanisms and functions of cell death. *Annu.Rev.Cell Biol*. 7:663-698.
24. Flanagan SP.1966. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res*. 8:295-309.
25. Georgakis GV, Li Y, Humphreys R, Andreeff M, O'Brien S, Younes M, Carbone A, Albert V, Younes A. 2005. Activity of selective fully human agonistic antibodies to the TRAIL death receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in primary and cultured lymphoma cells: induction of apoptosis and enhancement of doxorubicin- and bortezomib-induced cell death. *Br J Haematol*. 130:501-510.
26. Gerschenson LE, Rotello RJ. 1992. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J*. 6: 2450-2455.
27. Gibson SB, Oyer R, Spalding AC, Anderson SM, Johnson GL. 2000. Increased expression of death receptors 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL. *Mol Cell Biol*. 20:205-212.
28. Green DR, Kroemer G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 305:626-629.
29. Green DR, Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 281:1309-1312.
30. Griffith TS, Chin WA, Jackson GC, Lynch DH, Kubin MZ. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. 1998. *J Immunol*. 161:2833-2840.
31. Grosse-Wilde A. 2001, Identifizierung, molekulare Charakterisierung und konditionale Inaktivierung eines murinen Todesrezeptors für TRAIL. *Promotionsschrift*.

32. Grosse-Wilde A, Voloshanenko O, Bailey SL, Longton GM, Schaefer U, Csernok AI, Schütz G, Greiner EF, Kemp CJ, Walczak H. 2008. TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development. *J Clin Invest.* 118:100-110.
33. Guo Y, Chen C, Zheng Y, Zhang J, Tao X, Liu S, Zheng D, Liu Y. 2005. A novel anti-human DR5 monoclonal antibody with tumoricidal activity induces caspase-dependent and caspase-independent cell death. *J Biol Chem.* 280:41940-41952.
34. Hotte SJ, Oza AM, Le LH, MacLean M, Iacobucci A, Corey A, Fox NL, Hirte HW. 2004. Phase 1 study of a fully human monoclonal antibody to the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 in subjects with advanced solid malignancies and non-hodgkin's lymphoma. *EORTC 16.* Abs 208.
35. Humphreys R, Shepard L, Poortman C, Shields E, Johnson R, Gilotte D, Huang X, Albert V. 2004. HGS-TR2J, a human, agonistic, TRAIL receptor 2 monoclonal antibody, induces apoptosis, tumor regression and growth inhibition as a single agent in diverse human solid tumor cell lines. *EJC SUPPL 2004.* 2 8 Abs 204.
36. Ichikawa K, Liu W, Zhao L, Wang Z, Liu D, Ohtsuka T, Zhang H, Mountz JD, Koopman WJ, Kimberly RP, Zhou T. 2001. Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat Med.* 7:954-960.
37. Irmiler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schröter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* 388:123, 125-126.
38. Isaacson JH, Cattanach, BM. 1962. Report. *Mouse News Letter.* 27:31-31.
39. Itoh N, Nagata S. 1993. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem.* 268:10932-10937.
40. Jo M, Kim TH, Seol DW, Esplen JE, Dorko K, Billiar TR, Strom SC. 2000. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med.* 6:564-567.
41. Kandasamy K, Srivastava RK. 2002. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 62:4929-4937.

42. Kanzler S, Trarbach T, Heinemann V, Köhne CH, Sneller V, Bieber F, Kumm E, Galle P, Seeber S. 2005. Results of a phase 2 trial of HGS-ETR1 (agonistic human monoclonal antibody to TRAIL receptor1) in subjects with relapsed or refractory colorectal cancer (CRC). *ECCO 13*. Abs 630.
43. Kaplan EL, Meier E. 1958. New parametric estimation from incomplete observation. *J.Amer.Stat.Ass.* 53:457-481.
44. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer.* 26: 239-257.
45. Kim EJ, Suliman A, Lam A, Srivastava RK. 2001. Failure of Bcl-2 to block mitochondrial dysfunction during TRAIL-induced apoptosis. Tumor necrosis-related apoptosis-inducing ligand. *Int J Oncol.* 18:187-194.
46. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Kramer PH, Peter ME. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14:5579-5588.
47. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. 2000. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity.* 12:611-620.
48. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H6, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A. 2001. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem.* 276:46639-46646.
49. Kroemer G. 1998. The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ.* 5:547.
50. Lauber K, Bohn E, Kröber SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G, Wesselborg S. 2003. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell.* 113:717-730.
51. Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, Hillan K, Totpal K, DeForge L, Schow P, Hooley J, Sherwood S, Pai R, Leung S, Khan L, Gliniak B, Bussiere J, Smith CA, Strom SS, Kelley S, Fox JA, Thomas D, Ashkenazi A. 2001. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med.* 7:383-385.

52. LeBlanc H, Lawrence D, Varfolomeev E, Totpal K, Morlan J, Schow P, Fong S, Schwall R, Sinicropi D, Ashkenazi A. 2002. Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat Med.* 8:274-281.
53. Leverkus M, Neumann M, Mengling T, Rauch CT, Brocker EB, Krammer PH, Walczak H. 2000. Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes. *Cancer Res.* 60:553-559.
54. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 94:491-501.
55. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 94:481-490.
56. MacFarlane M. 2003. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett.* 139:89-97.
57. MacFarlane M, Harper N, Snowden RT, Dyer MJ, Barnett GA, Pringle JH, Cohen GM. 2002. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene.* 21:6809-6818.
58. Marini P, Belka C. 2003. Death receptor ligands: new strategies for combined treatment with ionizing radiation. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 3:334-342.
59. Marini P, Denzinger S, Schiller D, Kauder S, Welz S, Humphreys R, Daniel PT, Jendrossek V, Budach W, Belka C. 2006. Combined treatment of colorectal tumours with agonistic TRAIL receptor antibodies HGS-ETR1 and HGS-ETR2 and radiotherapy: enhanced effects in vitro and dose-dependent growth delay in vivo. *Oncogene.* 25:5145-5154.
60. Marini P, Jendrossek V, Durand E, Gruber C, Budach W, Belka C. 2003. Molecular requirements for the combined effects of TRAIL and ionising radiation. *Radiother Oncol.* 68:189-198.
61. Nagata S. Apoptosis by death factor. 1997. *Cell.* 88:355-365.
62. Osieka R, Bamberg M, Pfeiffer R, Glatte P, Scherer E, Schmidt CG. 1985. Effect of antineoplastic agents and ionizing radiation on a human testicular cancer heterograft. *Strahlentherapie.* 161:35-46.

63. Özören N, Kim K, Burns TF, Dicker DT, Moscioni AD, El-Deiry WS. 2000. The caspase 9 inhibitor Z-LEHD-FMK protects human liver cells while permitting death of cancer cells exposed to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res.* 60:6259-6265.
64. Pan G, Ni J, Wie YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science.* 277:815-818.
65. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM. 1997. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science.* 276:111-113.
66. Pantelouris EM. 1968. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature.* 217:370-371.
67. Patanaik A. HGS-ETR2 – A fully monoclonal antibody to TRAIL-R2: Results of a phase 1 trial in patients with advanced solid tumors.
68. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem.* 271:12687-12690.
69. Plummer R, Attard G, Pacey S, Li L, Razak A, Perrett R, Barrett M, Judson I, Kaye S, Fox NL, Halpern W, Corey A, Calvert H, de Bono J. 2007. Phase 1 and pharmacokinetic study of lexatumumab in patients with advanced cancers. *Clin Cancer Res.* 13:6187-6194.
70. Pukac L, Kanakaraj P, Humphreys R, Alderson R, Bloom M, Sung C, Riccobene T, Johnson R, Fiscella M, Mahoney A, Carrell J, Boyd E, Yao XT, Zhang L, Zhong L, von Kerczek A, Shepard L, Vaughan T, Edwards B, Dobson C, Salcedo T, Albert V. 2005. HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo. *Br J Cancer.* 92:1430-1441.
71. Radford IR. 1994. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part I. Sensitivity to killing by ionizing radiation, rate of loss of viability, and cell type of origin. *Int J Radiat Biol.* 65:203-215.
72. Rygaard J. 1978. The nude mouse – Mouse or test tube. In: Houchens DP, Ovejera AA: The use of athymic (nude) mice in cancer research. Fischer, Stuttgart.
73. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17:1675-1687.

74. Shankar S, Srivastava RK. 2004. Enhancement of therapeutic potential of TRAIL by cancer chemotherapy and irradiation: mechanisms and clinical implications. *Drug Resist Updat.* 7:139-156.
75. Shimada O, Wu X, Jin X, Nouh MA, Fiscella M, Albert V, Matsuda T, Kakehi Y. 2007. Human agonistic antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2 induces cytotoxicity and apoptosis in prostate cancer and bladder cancer cells. *Urology.* 69:395-401.
76. Shiozaki EN, Chai J, Shi Y. 2002. Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:4197-4202.
77. Sikic BI, Wakalee M, von Nehren M, Lewis N, Calvert HI, Plummer ER, Fox NL, Howard T, Jones SF, Burris HA. 2007. A phase Ib study to assess the safety of Lexatumumab, a human monoclonal antibody that activates TRAIL-R2, in combination with gemcitabine, pemetrexed, doxorubicin, or FOLFIRI. *Journal of clinical oncology.* ASCO annual Meeting Proceeding Proceedings Part I. Vol 25, No 18S: 14006
78. Silobrcic V, Zietman AL, Ramsay JR, Suit HD, Sedlacek RS. 1990. Residual immunity of athymic NCr/Sed nude mice and the xenotransplantation of human tumors. *Int J Cancer.* 45:325-33.
79. Singh TR, Shankar S, Chen X, Asim M, Srivastava RK. 2000. Synergistic interactions of chemotherapeutic drugs and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand on apoptosis and on regression of breast carcinoma in vivo. *Cancer Res.* 63:5390-5400.
80. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H. 2000. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity.* 12:599-609.
81. Statistisches Bundesamt. www.destatis.de
82. Steel GG. 1993. Introduction: The significance of radiobiology for radiotherapy. In: *Basic clinical Radiobiology*, pp. 1-7. Edward Arnold, Boston
83. Steel GG, McMillan TJ. 1993. Molecular aspects of radiation biology. In: *Steel GG: Basic clinical Radiobiology*, pp. 211-233. Edward Arnold, Boston.

84. Straughn JM Jr, Oliver PG, Zhou T, Wang W, Alvarez RD, Grizzle WE, Buchsbaum DJ. 2006. Anti-tumor activity of TRA-8 anti-death receptor 5 (DR5) monoclonal antibody in combination with chemotherapy and radiation therapy in a cervical cancer model. *Gynecol Oncol.* 101:46
85. Stüben G, Budach W, Schick KH, Stuschke M, Stapper N, Müller S, Feldmann HJ. 1994. A time-saving system for irradiations of experimental tumors. *Strahlenther Onkol.* 170:36-41.
86. Stuschke M, Budach V, Bamberg M, Budach W. 1990. Methods for analysis of censored tumor growth delay data. *Radiat Res.* 122: 172-180.
87. Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. 2001. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene.* 20:2122-2133.
88. Tartaglia LA, Goeddel DV. 1992. Two TNF receptors. *Immunol Today.* 13:151-153.
89. von Haefen C, Gillissen B, Hemmati PG, Wendt J, Guner D, Mrozek A, Belka C, Dorken B, Daniel PT. 2004. Multidomain Bcl-2 homolog Bax but not Bak mediates synergistic induction of apoptosis by TRAIL and 5-FU through the mitochondrial apoptosis pathway. *Oncogene.* 23:8320-8332.
90. Wajant H, Haas E, Schwenzler R, Muhlenbeck F, Kreuz S, Schubert G, Grell M, Smith C, Scheurich P. 2000. Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J Biol Chem.* 275:24357-24366.
91. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH. 1999. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med.* 5:157-163.
92. Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. 2001. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:13884-13888.
93. Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. 1996. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev.* 10:2859-2869.
94. Warters RL. 1992. Radiation-induced apoptosis in a murine T-cell hybridoma. *Cancer Res.* 52:883-890.
95. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ. 2000. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* 14:2060-2071.

96. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 292:727-30.
97. Welz S, 2002. Repopulierung des humanen xenotransplantierten Plattenepithelkarzinoms FaDu_{DD} nach Behandlung mit fraktionierter Bestrahlung sowie fraktionierter Bestrahlung und Mitomycin C. *Promotionsschrift*.
98. Wendt J, von Haefen C, Hemmati P, Belka C, Dorken B, Daniel PT. 2005. TRAIL sensitizes for ionizing irradiation-induced apoptosis through an entirely Bax-dependent mitochondrial cell death pathway. *Oncogene*. 24:4052-4064.
99. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 3:673-682.
100. Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA, Korsmeyer SJ. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. 1999. *Nature*. 400:886-91.
101. Younes M, Georgakis GV, Rahmani M, Beer D, Younes A. 2006. Functional expression of TRAIL receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in esophageal adenocarcinoma. *Eur J Cancer*. 42:542-547.
102. Zeng Y, Wu XX, Fiscella M, Shimada O, Humphreys R, Albert V, Kakehi Y. 2006. Monoclonal antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2 (TRAIL-R2) induces apoptosis in primary renal cell carcinoma cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Int J Oncol*. 28:421-430.
103. Zheng B, Georgakis GV, Li Y, Bharti A, McConkey D, Aggarwal BB, Younes A. 2004. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by the proteasome inhibitor PS-341 in Hodgkin disease cell lines is independent of inhibitor of nuclear factor-kappaB mutations or activation of the CD30, CD40, and RANK receptors. *Clin Cancer Res*. 10:3207-3215.
104. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 90:405-413

7 ANHANG

Danksagung

Mein Dank gilt **Herrn Prof. Dr. Claus Belka** für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Durchsicht der Manuskripte.

Besonders bedanke ich mich bei **Frau Dr. Dr. Marini**, meiner Betreuerin bei dieser Arbeit. Ohne ihre Geduld während Einarbeiten, Durchführen und Schreiben wäre diese Dissertation in dieser Form nicht möglich gewesen.

Für das gute Zusammenarbeiten und die netten Gespräche während der Arbeit, die viele Arbeitsstunden deutlich angenehmer machten, sowie die Unterstützung bedanke ich mich sehr herzlich bei **Sebastian Kauder**.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe der Radioonkologischen Klinik, vor allem bei **Frau Prof. Dr. Verena Jendrossek**. Bei **Frau Katrin Stasch** bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung des Tierversuchs.

Ich danke **Hajo Herzog** für die vielen anregenden Gespräche, guten Gedanken und praktischen Tipps, die in Freundschaft oft über den fachlichen Austausch hinausgingen.

Mein großer Dank geht an **Nele**, die neben ihrer andauernden Unterstützung das Wichtige vollbringt, oftmals ein wenig Medizin aus und dafür mehr Farbe und Spaß in mein Leben zu lassen.

Meinen Eltern bin ich sehr dankbar für ihre andauernde Unterstützung jeglicher Art und das Ermöglichen dieser Ausbildung, die mir erst die Voraussetzungen für diese Arbeit gab.

Lebenslauf

Name:	Dirk Schiller
Geburtsort:	Leonberg
Geburtstag:	4. März 1982
1988 – 1992	Besuch der Grundschule, Leonberg
1992 – 2001	Besuch des Albert-Schweitzer Gymnasiums, Leonberg
Juni 2001	Abitur
Juli 2001 – März 2002	Offiziersausbildung zum Sanitätsoffizier im Sanitätsdienst der Deutschen Bundeswehr
April 2002	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
01.04.2004	Ärztliche Vorprüfung
August 2004 – Januar 2010	Doktorand in der Radioonkologischen Klinik des Universitätsklinikums, Tübingen
Februar 2007 – Januar 2008	Praktisches Jahr im Klinikum am Steinenberg, Reutlingen
06.05.2008	Ärztliche Prüfung (2. Staatsexamen)
seit Juli 2008	Assistenzarzt mit Weiterbildung Innere Medizin, Bundeswehrkrankenhaus Berlin