

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE  
DIREKTOR: PROFESSOR DR. HANS JÜRGEN SCHLITT  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**RAPAMYCIN VS. CYCLOSPORIN A :  
AUSWIRKUNGEN AUF TRANSPLANTATABSTOSSUNG UND  
TUMORWACHSTUM IM TIERMODELL**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Sebastian Richter**

2009

Dekan:	Professor Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Professor Dr. Edward Geissler
2. Berichterstatter:	Professor Dr. Bernhard Banas
Tag der mündlichen Prüfung:	18. August 2009

**Meinen Eltern gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>4</b>
1.1	<b>Organtransplantation und Tumore</b>	4
1.2	<b>Morbidität und Mortalität bei Transplantationspatienten</b>	5
1.3	<b>Therapiemöglichkeiten nach Tumorentstehung</b>	7
1.4	<b>Sind alle Immunsuppressiva onkogen? Cyclosporin A, Azathioprine, MMF und Kortikosteroide</b>	7
1.5	<b>Rapamycin: Entdeckung und Charakteristika</b>	11
1.5.1	Wirkmechanismus von Rapamycin	12
1.6	<b>Studiendesign und –ziel</b>	16
<b>2</b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	<b>18</b>
2.1	<b>Geräte- und Chemikalienliste</b>	18
2.2	<b>Versuchsaufbau</b>	18
2.3	<b>Zellkultur</b>	19
2.4	<b>Versuchstiere</b>	20
2.5	<b>Operatives Vorgehen</b>	20
2.5.1	Anästhesie	20
2.5.2	Tumorzellimplantation	22
2.5.3	Earheart-Transplantation	22
2.5.4	Vermessen der Tumore	24
2.6	<b>Dosierung und Injektion der Medikamente</b>	25
2.7	<b>Erheben der Daten</b>	26
2.7.1	Überprüfung des Transplantatüberlebens	26

	2.7.2 Messen des Tumolvolumens	27
	2.8 Verfahren am Versuchsende	27
<b>3</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b>29</b>
	3.1 Versuchsgruppen	29
	3.2 Ergebnisse der Herztransplantationen (Gruppe I bis IV)	30
	3.3 Ergebnisse des Tumorwachstums (Gruppe V bis VII)	31
	3.4 Ergebnisse Kombination Tumor/Herztransplantation (Gruppe VIII bis X)	33
	3.5 Verspäteter Kontraktionsbeginn unter Rapamycin	36
<b>4</b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b>38</b>
	4.1 Klinische Problematik	38
	4.2 Vergleich der Versuchsergebnisse von Cyclosporin A und Rapamycin	40
	4.3 Antiproliferative Wirkungen von Rapamycin	42
	4.3.1 Direkter antiproliferativer Effekt	42
	4.3.2 Hemmung der Angiogenese	43
	4.4 Die Rolle des Immunsystems im Wirkmechanismus von Rapamycin	45
	4.5 Verlängerung des Transplantatüberlebens in Anwesenheit eines Tumors	46
	4.6 Schlussfolgerung	48
<b>5</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b>51</b>

## ***Abkürzungen***

<i>CsA:</i>	Cyclosporin
<i>EBV:</i>	Eppstein-Barr Virus
<i>EhTx:</i>	Ear-heart Transplantation
<i>FDA</i>	Food and Drug Administration
<i>HIF1<math>\alpha</math>:</i>	hypoxia-induced factor $\alpha$
<i>HPV:</i>	humanes Papillomvirus
<i>MMF:</i>	Mycophenolat Mofetil
<i>mTOR:</i>	mammalian Target of Rapamycin
<i>NMSC:</i>	non-melanoma skin cancer
<i>PI3-Kinase:</i>	Phosphatidylinositol-3-Kinase
<i>PIP3:</i>	Phosphatidylinositol (3,4,5)-Triphosphat
<i>PTEN:</i>	Phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10
<i>PTLD:</i>	posttransplant lymphoproliferative disorders
<i>PUVA:</i>	psoralen and ultraviolet-A light
<i>Rapa:</i>	Rapamycin
<i>Raptor:</i>	regulatory associated protein of mTOR
<i>TCSII</i>	tuberoses sclerosis complex II
<i>TGF-<math>\beta</math>:</i>	transforming growth factor $\beta$
<i>SCID:</i>	severe combined imunodeficy (mouse)
<i>UNOS:</i>	United Network of Organ Sharing
<i>VEGF:</i>	vascular endothelial growth factor

# 1 Einleitung

## 1.1 Organtransplantation und Tumore

Eines der größten Probleme, dem die moderne Transplantationsmedizin gegenüber steht, ist das erhöhte Risiko maligner Neoplasie und das vermehrte Auftreten von Tumorrezidiven bei immunsuppressiver Therapie nach Organtransplantationen. Verglichen mit der Normalbevölkerung besteht bei Empfängern von Organtransplantaten nach Penn et al. ein 3 - 4-fach erhöhtes Risiko an einem Tumor zu erkranken [1], in anderen Studien sind nach Herztransplantationen sogar 6 - 15,6 % aller Patienten davon betroffen [2]. Von Mayer und Garver wurden Rezidivraten von 51% (nach Cholangiokarzinomen) und 57% (nach bronchioloalveolären Karzinomen) nach kurativen Transplantationen beschrieben [3,4]. In weiteren Studien waren Tumore zu 26% (10 Jahre nach Nierentransplantation), 24% (1 Jahr nach Lebertransplantation) und 21% (2 Jahre nach Herztransplantationen) für den Tod der Patienten verantwortlich [5,6,7]. Weitere Risikofaktoren sind die chronische Antigenstimulation des Körpers durch das Transplantat, rezidivierende Infekte sowie die Gabe von Blut und Blutprodukten, wodurch das supprimierte Immunsystem überstimuliert werden kann, was zu Proliferationen des Lymphgewebes (PTLD) führen kann. Besonders Kinder sind von letzterer Komplikation betroffen, da sie noch vermehrt lymphoides Gewebe besitzen, das sich unter den passenden Stimuli maligne verändern kann [8, 21]. Bei bestimmten Neubildungen wie Hauttumoren, Lymphomen und Lymphoproliferationen (PTLD), Kaposi-Sarkomen, Vulva- und Analkarzinomen, hepatozellulären Karzinomen sowie Uteruskarzinomen ist das Risiko sogar 14-500fach erhöht [1]. Der häufigste Tumor ist das Plattenepithelkarzinom (cutaneous squamous cell carcinoma (SCC)) [10]. In der australischen und neuseeländischen Bevölkerung liegt die Inzidenz eines nicht-melanomen Hauttumors

(NMSC) nach einer immunsuppressiven Therapie für mehr als 20 Jahre bei 82% [11]. Nun ist es nicht verwunderlich, dort eine so hohe Hautkrebsinzidenz zu beobachten, angesichts der bekannten Korrelation zwischen hoher Sonnenstrahlung und Hautkrebs. Eine Studie aus Großbritannien kam jedoch zu einer ebenfalls hohen Hautkrebsinzidenz (61%) 20 Jahre nach Nierentransplantation [12], was darauf hinweist, dass diese Tumore auch in Gegenden mit moderater Sonnenstrahlung ein ernstzunehmendes Risiko für Transplantatpatienten sein können. Aber auch andere Tumorarten scheinen eine geographische Prävalenz zu besitzen [13,14,15]. So tritt das Kaposisarkom bei Transplantationspatienten in westlichen Ländern relativ häufig auf, während es in Japan nahezu unbekannt ist. Dort treten wiederum Epstein-Barr-Virus- (EBV) und T-Zell-Lymphozyten Typ 1- assoziierte Tumoren bei nierentransplantierten Patienten häufiger auf. Durch diese hohe Inzidenz sind Tumore neben (akuten) Abstoßungsreaktionen und kardiovaskulären Erkrankungen eine Hauptursache der Morbidität und Mortalität von Transplantationspatienten geworden.

## ***1.2 Morbidität und Mortalität bei Transplantationspatienten***

Die Gründe für diese erhöhte Tumorzinzidenz und Mortalität sind vielschichtig. Zum einen nimmt die Tumorzinzidenz bei immunsupprimierten Transplantationspatienten mit fortschreitender Überlebensdauer zu [1,16,17], zum anderen bestehen signifikante Co-Morbiditäten wie z.B. Hypertonie, Diabetes, Hyperlipidämie oder Osteoporose, die durch die Langzeitimmunsuppression noch verstärkt werden [18]. Durch die verbesserten Therapien und Techniken werden zudem die Transplantationsprogramme auf ein immer älteres Patientengut ausgeweitet (z.B. Old-For-Old-Transplantationen), wodurch das durchschnittliche Alter der Empfänger während der letzten Dekade um 10 Jahre nach oben



verschoben wurde [19]. Mittlerweile sind de-novo Tumore und Rezidive die zweithäufigste Todesursache nach altersbedingten kardiovaskulären Komplikationen bei Lebertransplantationspatienten [8], wobei einige Forscher davon ausgehen, dass die Mortalität durch Tumore in den nächsten 20 Jahren global die der kardiovaskulären Erkrankungen nach Transplantationen von Platz 1 verdrängen wird (in Australien schon geschehen) [9]. Dabei handelt es sich meist nicht um Tumorarten, die in der Normalbevölkerung typisch sind, sondern um eher seltenere Tumore, die noch dazu ein aggressiveres Verhalten zeigen [1,59]. In einigen besonderen Fällen, z.B. bei hepatozellulären Karzinomen, kann eine Transplantation die kurative Therapie sein. In der Regel ist aber eine positive Tumoranamnese aufgrund der Gefahr von Rezidiven und der schlechten Therapieoptionen der immunsupprimierten Patienten ein Ausschlusskriterium für Transplantation. [20]. In manchen Kliniken wird – besonders in den ersten Monaten nach der Transplantation, in denen die höchsten Dosen an Immunsuppressiva verwendet werden - u. a. zur Verringerung der Tumorinzidenz eine Virusprophylaxe gegeben. Der Grund dafür ist, daß onkogene Viren gerade bei den bei Transplantationspatienten häufigen Tumorarten ursächlich sind. Beispiele hierfür sind Epstein-Barr-Viren für Lymphome und Lymphoproliferationen (‘posttransplant lymphoproliferative disorders’ (PTLD)), Papillomviren für Hautkrebs (NMSC) und Karzinome der weiblichen Fortpflanzungsorgane, Hepatitis B und C Viren für hepatozelluläre Karzinome sowie Herpesviren für Kaposi-Sarkome [1]. Nicht zu vernachlässigen ist, dass die Patienten durch das supprimierte Immunsystem anfälliger für Infektionen sind und den Nebenwirkungen der Medikamente wie z.B. Wundheilungsstörungen, Nephro-, Neuro- und Hepatotoxizität ausgesetzt sind, also weiteren Ursachen für eine erhöhte Morbidität und Mortalität [22,23,24].

### ***1.3 Therapiemöglichkeiten nach Tumorentstehung***

Während sich mit der Inzidenz der Tumorneuentstehung mittlerweile einige klinische Studien beschäftigt haben, ist die Datenlage über die Behandlungsstrategie bei bereits existenten Tumoren noch sehr dünn. Für Patienten, bei denen nach einer erfolgreichen Transplantation ein Tumor diagnostiziert wird, sei es durch Neuentstehung, ein Rezidiv oder evtl. auch nach falsch negativem Befund im Screening vor Transplantation, stehen wichtige Entscheidungen an. Kann man die Neoplasie chirurgisch oder chemo- bzw. strahlentherapeutisch bekämpfen? Reduziert man die Immunsuppression und nimmt dafür das Risiko einer Abstoßung in Kauf? Oder kann man an der medikamentösen Therapie etwas verändern, z.B. durch Umstellung auf ein Immunsuppressivum mit einem anderen Wirkprofil und Ansetzen eines antiproliferativ wirksamen Medikamentes? Mit letzterem Ansatz hat sich diese Studie beschäftigt.

### ***1.4 Sind alle Immunsuppressiva onkogen? Cyclosporin A, Azathioprine, MMF und Kortikosteroide***

Ist ein intaktes Immunsystem notwendig um unseren Körper vor bösartigen Neubildungen zu schützen? Diese Frage wird schon seit vielen Jahren kontrovers diskutiert [25]. Versuche an Mäusen mit defekter T-Zell-Funktion zeigen, dass es zu einer vermehrten Tumorbildung kommt, allerdings erst mit fortgeschrittener Überlebensdauer – ähnlich den Beobachtungen bei Transplantationspatienten [26].

Mehrere Studien geben dem etablierten Cyclosporin A (CsA) zumindest eine Mitschuld an der erhöhten Tumorinzidenz nach Transplantationen [27,28,29]. Cyclosporin A ist ein aus Pilzen gewonnenes, zyklisches Peptid, das schon seit vielen Jahren mit gutem

Erfolg in der Transplantationsmedizin angewendet wird. Es wirkt immunsuppressiv, indem es die Proteinphosphatase Calcineurin hemmt und damit die Transkription von Zytokinen inhibiert. Die Freisetzung von Interleukin-2 und die Bildung seiner Rezeptoren sistieren, wodurch die Proliferation von T-Lymphozyten selektiv vermindert und die zelluläre Immunantwort unterdrückt wird.

Freise et al. konnten eine vermehrte Tumorrezidivrate und Metastasierung nach Lebertransplantationen bei Ratten nachweisen, die mit Cyclosporin A behandelt wurden [28]. Aber nicht nur nach einem Organersatz, sondern auch nach Behandlungen mit PUVA (UV-A-Strahlung) von Patienten, die unter Psoriasis leiden und bestrahlt werden, ist bei gleichzeitiger Therapie mit Cyclosporin A das Risiko an Hautkrebs zu erkranken erhöht [30]. Obwohl der Mechanismus, der zur proliferativen Wirkung von Cyclosporin A führt, noch nicht endgültig geklärt ist, reduziert Cyclosporin A dosisabhängig die DNA-Reparaturfähigkeit [27] und regt autonome Zellmechanismen wie die Produktion von „transforming growth factor  $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ) an, wodurch es zur Förderung der Tumorbildung kommt [29]. Klinische Beobachtungen zeigen, dass manche Tumoren zurückgehen, wenn Cyclosporin A reduziert oder abgesetzt wird. [31,32,33]. Dantal et al. zufolge führt ein low-dose CsA-Regime zu weniger malignen Neubildungen, allerdings kommt es zu häufigeren Transplantatabstoßungen [24]. Die Frage bleibt jedoch, ob diese erhöhte Tumorrare auf der Suppression des Immunsystems allgemein oder auf direkten Medikamentenwirkungen auf das Tumorwachstum basiert. Ein Grund, warum die Suppression des Immunsystems die Entstehung von Tumoren unterstützt, ist das erhöhte Risiko von viralen Infektionen. Diese Erkenntnisse werden untermauert durch die Beobachtungen, dass eine Reduktion oder Unterbrechung der Cyclosporintherapie bei einigen Patienten zu einer Verminderung der Symptome von PTLD führte [34]. Hierzu benötigt es aber noch weiterer Forschungen, um die Vorgänge detaillierter zu verstehen.

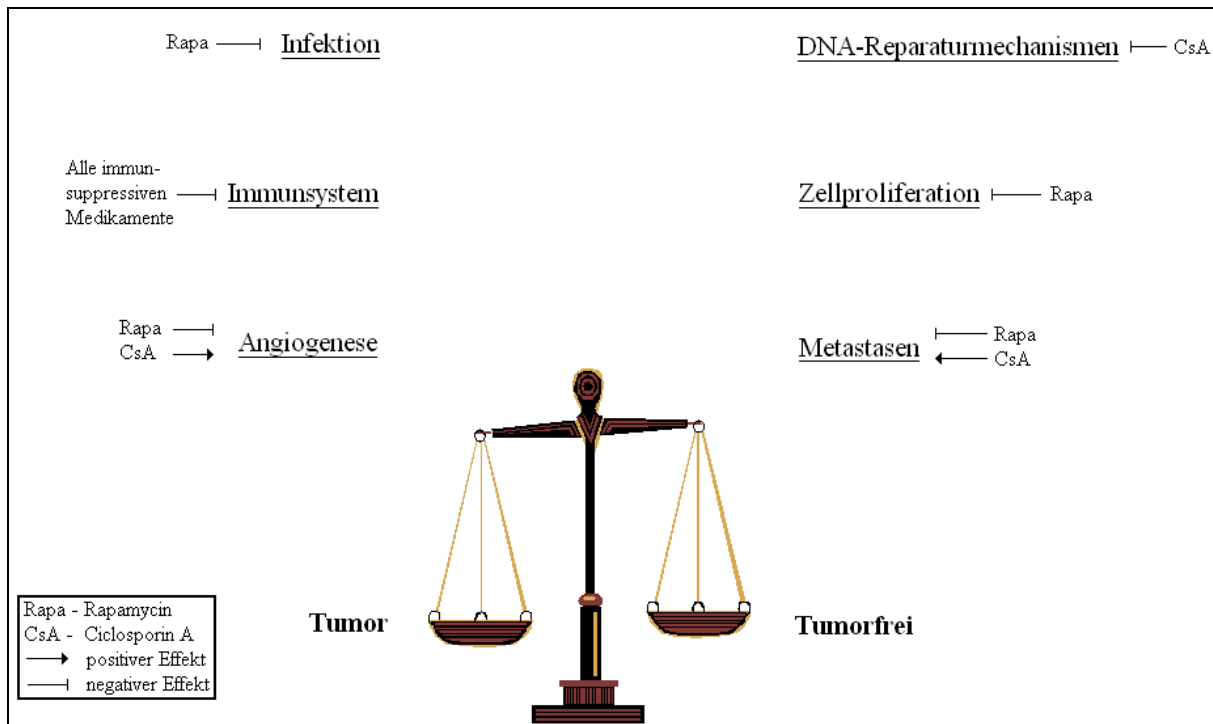
Azathioprin, welches besonders vor der Cyclosporin-Ära, aber auch heute noch in einigen Kombinationstherapien zum Einsatz kommt, wurde durch seine Inhibition der DNA-Synthese, Verminderung der Reparaturfähigkeiten und vermehrter Transkriptionsfehler [35] oftmals in Zusammenhang mit gesteigerter Neoplasierate in Verbindung gebracht. Frühe Daten brachten es vor allem mit erhöhter Inzidenz von Lymphomen [36], Plattenepithelkarzinomen [37,38], Blasenkrebs [39], Brustkrebs [40] und Hirntumoren [41] in Verbindung. McGeown et al. kamen allerdings in einer follow-up Studie von 1000 Nierentransplantationspatienten zu dem Schluss, dass Patienten unter Azathioprintherapie eine kleinere kumulative Tumorinzidenz hatten als Patienten mit Cyclosporin A [42].

Ein weiteres Medikament, welches in der Transplantationschirurgie Anwendung findet, ist Mycophenolat Mofetil (MMF). Neben seinen bekannten immunsuppressiven Effekten wie Störungen der Lymphozytenproliferation durch die Blockade der Purinsynthese besitzt es möglicherweise auch antineoplastische Wirkungen, was allerdings immer noch kontrovers diskutiert wird. Einer Studie von 20 großen Transplantationszentren der USA und einer weiteren basierend auf Daten des 'United Network of Organ Sharing' (UNOS) und der 'Europe Collaborative Transplant Study' zufolge ist das Risiko für Patienten, die MMF erhielten, an PTLD zu erkranken nicht signifikant erhöht [43,44]. Nach einer Analyse der Literatur kamen Guba et al. 2004 zu dem Schluss, dass es bei Patienten unter MMF-Therapie zu kleinen, aber signifikanten Rückgängen in der Entstehung von Tumoren kommt [45]. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass diese Beobachtungen auf die Unterbrechung der Calcineurin-Inhibitoren-Therapie zurückzuführen ist [46]. Koehl et al. beobachteten in ihrer experimentellen Studie, dass MMF in vitro das Tumorzellwachstum und die Angiogenese in einem 'aortic-ring assay' hemmt, es in vivo bei Mäusen aber nur zu einer geringen Reduktion des Tumorwachstums kommt. Der Grund dafür wurde in einer zu niedrigen

Plasmakonzentration bedingt durch zu raschen Metabolismus gesehen [81]. Für MMF deutet sich also die Möglichkeit einer antineoplastischen Therapie an, es bedarf jedoch noch weiterer Forschung, um die exakten Effekte zu verstehen und nutzbar zu machen.

Kortikosteroide werden in der Transplantationsmedizin additiv mit anderen Immunsuppressiva verwendet. Obwohl sie durchaus die Potenz haben, manche Arten von Tumoren anzugreifen (z.B. Lymphome), wurden auch sie immer wieder mit dem Auftreten von Tumoren in Verbindung gebracht [47]. Von speziellem Interesse für die Transplantationsmedizin sei hier das erhöhte Auftreten von Kaposi-Sarkomen [48], Hautkrebs und Non-Hodgkin-Lymphomen [49] nach Langzeit-Steroidbehandlung genannt. Interessanterweise werden Steroide, wie oben schon erwähnt, eingesetzt, eben um Lymphome bekämpfen. Da sie in der Regel in Kombination mit anderen immunsuppressiven Medikamenten gegeben werden sind die Effekte von Kortikosteroiden auf die Tumorentstehung aber nur schwer zu eruieren.

Nichtsdestotrotz kam man in den letzten Jahren zu der Erkenntnis, dass nicht alle Immunsuppressiva ein vermehrtes Tumorwachstum bedingen, sondern einzelne antineoplastische Fähigkeiten besitzen können. Dies zeigten Guba et al. und auch andere Arbeitsgruppen, dass das relativ neue Immunsuppressivum Rapamycin neben der immunsuppressiven auch antiproliferative und antiangiogenetische Wirkungen aufweist, die sich in einem verminderten Tumorwachstum bis hin zu einer Tumorregression bemerkbar machen [50,51].



**Abbildung 1:** Einfluss von immunosuppressiven Medikamenten auf Tumore (nach: EK Geissler, HJ Schlitt: The relation between immunosuppressive agents and malignancy. *Current Opinion in Organ Transplantation* 9; 394-399; 2004)

### 1.5 Rapamycin: Entdeckung und Charakteristika

Die Klasse der 'mammalian target of rapamycin-Inhibitoren' (mTOR-I) umfasst Rapamycin (Rapamune/Sirolimus, Wyeth) und seine Derivate CCI779 (Wyeth), RAD 001/Everolimus (Novartis) und das Analogon AP23573 (ARIAD Pharmaceuticals). Rapamycin ist ein Makrolid, das 1975 aus Bodenproben auf den Osterinseln (Rapa Nui) isoliert wurde und von dem Pilz *Streptomyces hygroscopicus* gebildet wird. Zunächst wurden Untersuchungen wegen seiner antimykotischen und antiproliferativen Wirkungen eingeleitet, die aber wegen der beobachteten Lymphozytopenie in Versuchstieren wieder eingestellt wurden. 20 Jahre später, als die molekulare Ähnlichkeit zu Tacrolimus (FK506) auffiel,

wurde seine immunsuppressive Wirkung weiter untersucht [52-55], was schließlich 1999 zur Markteinführung als Immunsuppressivum in den USA und 2001 auch in Deutschland führte. Da Rapamycin im Gegensatz zu Cyclosporin nicht nephrotoxisch ist und nur geringe kardiovaskuläre Nebenwirkungen hat, wird es hauptsächlich zur Behandlung von Patienten nach Nierentransplantationen eingesetzt, aber erste Studien lassen vermuten, dass auch Empfänger von Herz- und Lebertransplantaten von Rapamycin profitieren könnten [54].

#### *1.5.1 Wirkmechanismus von Rapamycin*

Rapamycin bindet ähnlich wie FK506 (Tacrolimus) an das intrazelluläre FK binding protein 12 (FKBP12). Im Gegensatz zum Tacrolimus/FKBP12-Komplex, der mit Calcineurin interagiert und somit einen ähnlichen immunsuppressiven Wirkmechanismus wie Cyclosporin A aufweist, greift der Rapamycin/FKBP12-Komplex am „mammalian target of Rapamycin (mTOR)“ an. Diese Interaktion bedingt die Dephosphorylierung und damit Inaktivierung der p70S6-Kinase, die die Biosynthese von ribosomalen Komponenten stimuliert und somit wichtig für Zellproliferationen und Zellzyklus ist. Dieser wird im Übergang von der G1- in die S-Phase arretiert und dadurch z. B. die Interleukin-2-vermittelte Stimulation der Lymphozytenproliferation blockiert [23,45,53,56]. Desweiteren sprechen diverse andere Zelltypen wie glatte Muskelzellen [57,58], Endothelzellen [50,58] und Tumorzellen in Anwesenheit von Rapamycin nur sehr schwach auf Zytokine und Wachstumsfaktoren an [59]. Dieser Effekt auf verschiedene Zelltypen führte zu einer Reihe von möglichen Anwendungsgebieten, insbesondere in der Transplantations- und Tumorthherapie sowie bei Gefäßstents (drug eluted coronary stents). Aber dieses breite Wirkspektrum verursacht auch viele unerwünschte Nebenwirkungen, was dazu führte, dass Rapamycin einige Schwankungen in der Popularität hinnehmen musste.

Rapamycin wirkt über die Blockade des PI3K/AKT- Signaltransduktionsweges. Im Detail aktivieren Wachstumsfaktoren und Cytokine wie IL-2 und VEGF über Rezeptortyrosinkinasen die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase). Dies führt über die Produktion von Phosphatidylinositol (3,4,5)-P3 (PIP3) zur Aktivierung von AKT [82]. PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10) kann durch den Abbau von PIP3 den PI3-Kinase/AKT-Pfad unterbrechen [83], in vielen Tumoren kommt es aber zu einem Wirkverlust von PTEN und damit zu einer gesteigerten AKT-Aktivität, was die Tumorzellen zwar sensibel auf mTOR-Inhibitoren, aber resistent gegen Apoptose macht [84]. AKT wiederum phosphoryliert TSCII (tuberoses sclerosis complex II) und inaktiviert dadurch den TSCI/TSCII-Komplex, der mTOR inaktiv hält [59]. Um den „downstream“ von mTOR zu ermöglichen, muss Raptor (regulatory associated protein of mTOR), das als Andockstation für 4E-BP1 und p70S6K fungiert, an mTOR gebunden sein [85]. Rapamycin zerstört diesen mTOR/raptor-Komplex und führt dadurch zu einer Inaktivierung von mTOR.



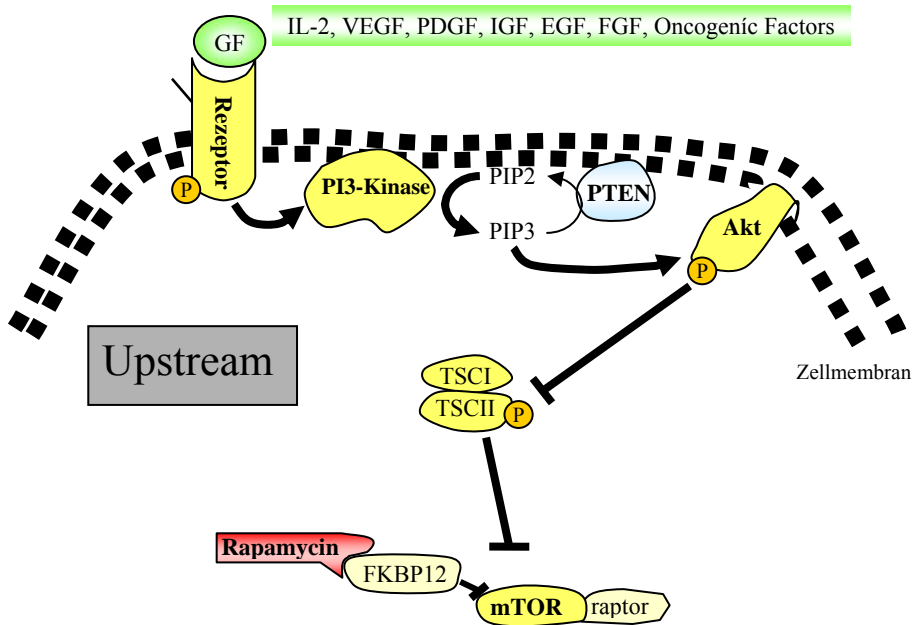
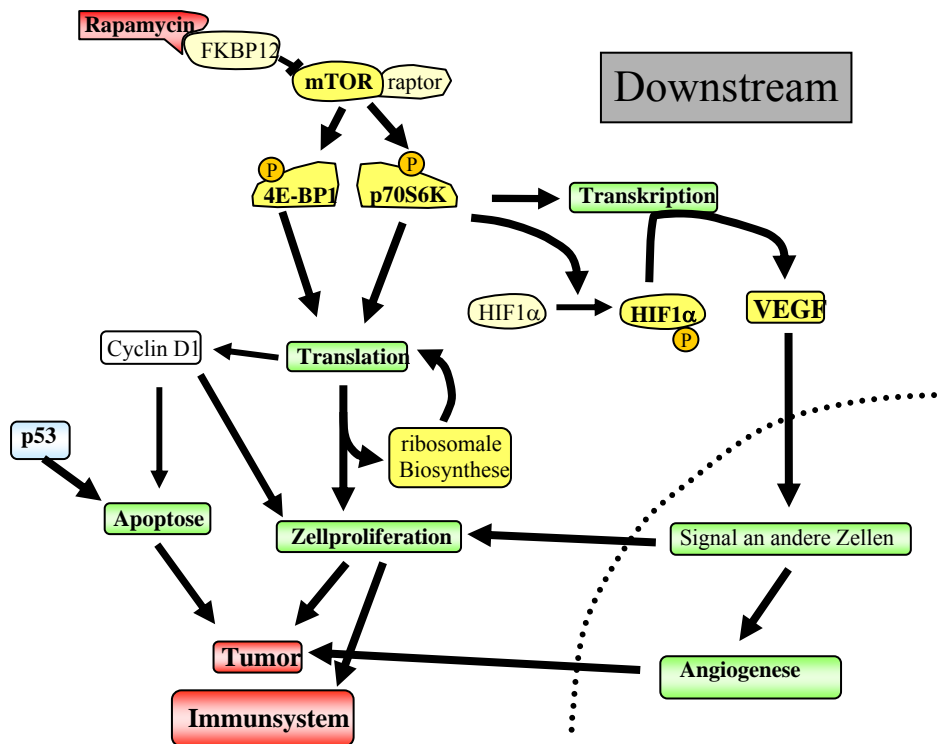


Abbildung 2 + 3: „Upstream“- und „Downstream“-Pfad von mTOR (aus: Koehl GE et al.

Rapamycin and tumor growth: mechanisms behind its anticancer activity. *Transplantation Reviews* 19; 20-31; 2005)



Über die Phosphorylierung von 4E-BP1 und p70S6K ist mTOR an der Regulation der Translation von mRNA beteiligt. [55,85,86]. Die Unterbrechung des mTOR-Weges führt in vielen Zellarten zu einer 15-20%igen Reduzierung der Proteinsynthese und zum Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase [55,84].

Eine mTOR-getriggerte Aktivierung von p70S6K führt besonders in Tumoren, die z.B. aufgrund ihrer Größe und einer insuffizienten Blutversorgung hypoxisch sind und daher 'hypoxia-induced factor 1 $\alpha$ ' (HIF1 $\alpha$ ) exprimieren, zu einer vermehrten Expression von 'vascular endothelial growth factor' (VEGF), das über eine Stimulation der Endothelzellen eine verstärkte Tumorangiogenese bewirkt [87].

In diesem Zusammenhang wurden von Bruns et al [76] und Guba et al. [60] auch extensive und selektive Mikrothrombosen der Tumormikrovaskularisation bei tumortragenden Mäusen, die mit Rapamycin behandelt wurden, beschrieben, möglicherweise induziert durch eine verstärkte Sekretion von VEGF in vielen Tumoren, was die hohe Selektivität der Thrombosen der Tumorgefäße erklären würde [60]. Nichtsdestotrotz sind die supprimierte Angiogenese, die u. a. zu Wundheilungsstörungen führt und die Thromboseneigung auch in den größeren Gefäßen - insbesondere tiefe Beinvenenthrombosen - [61-65] schwerwiegende Komplikationen, sodass die amerikanische „Food and Drug Administration“ (FDA) bisher nur eine Zulassung für Nierentransplantationen erteilt hat, wobei die Rapamycin-Analoga CCI779 und RAD001 mittlerweile in onkologischen Phase 1 und 2 Studien getestet werden [59]. Diese antiproliferativen und antiangiogenen Wirkungen von Rapamycin, über den mTOR/raptor-Komplex, sind der Grund für die Hoffnung von vielen Fachleuten, endlich ein Immunsuppressivum gefunden zu haben, das dem großen Problem der Tumorerkrankungen in der Transplantationschirurgie entgegenwirken kann.

### ***1.6 Studiendesign und -ziel***

Eine sorgfältige Auswahl der immunsuppressiven Therapie von Patienten mit einem Transplantat, die zudem an einem Tumor erkrankt sind oder ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Neoplasie zeigen, könnte eine beachtliche Auswirkung auf die Langzeitprognose haben. Ziel dieser Studie war es die Vermutung zu bestätigen, dass das relativ neue und vielversprechende Medikament Rapamycin in einer immunsuppressiven Dosierung die Transplantatabstossung verhindern und gleichzeitig das Tumorwachstum verlangsamen kann. Rapamycin wurde deshalb in einem neu entwickelten kombinierten Tumor-Transplantationsmodell mit dem in der Transplantationsmedizin etablierten Cyclosporin A verglichen. Als Transplantationsmodell wurde eine schon beschriebene Methode der Transplantation von Herzgewebe in eine Tasche zwischen Ohrknorpel und Haut (Earheart-Transplantation) gewählt [66] und in unserem Labor etabliert, sowie als Tumormodell die subkutane Injektion von Tumorzellen. Der Vorteil dieser Modelle besteht darin, dass die Earheart-Transplantation eine relativ einfache und leicht zu erlernende Operationsform darstellt und durch die prominente Lage dicht unter der Haut die Vitalfunktion des Transplantates (hier die Kontraktion) leicht und sicher zu kontrollieren ist. Dasselbe gilt für das subkutane Tumorwachstum. Neben einer unkomplizierten Möglichkeit der Tumordinjektion lässt sich der subkutane Tumor ohne großen technischen Aufwand mit einer Schieblehre im Versuchsverlauf genau vermessen. Die Wahl der Empfänger-Tiere fiel auf Balb/c-Mäuse weil in diesem Albinostamm die Kontrolle der Vitalität des Transplantats unter der transparenten Haut gut möglich ist und zudem ihr unkompliziertes Verhalten es ermöglicht, die tägliche Kontrolle ohne Narkose durchzuführen.

Die Injektion des Tumors erfolgte mit CT26-Adenokarzinomzellen, einem eher untypischen Tumor bei Transplantationspatienten. Der Vorteil dieser Tumorart ist jedoch,

dass diese Tumorzellen für Balb/c-Mäuse syngene sind und die Charakteristiken des Tumors wie z.B. das Wachstums- und Angiogeneseverhalten bekannt sind. Zudem ist dieser Tumor in früheren Versuchen schon als Rapamycin-sensitiv beschrieben worden.

Diese Studie, die die klinische Situation nachbilden soll, in der ein Träger eines Organtransplantates mit einem Tumorleiden in die Klinik kommt, soll nun die Effekte von Cyclosporin A und Rapamycin in immunsuppressiver Dosierung auf Transplantatabstoßung und Tumorwachstum gleichzeitig untersuchen und als Baustein weiterer Forschungen bezüglich des Problems der Neoplasien nach erfolgreichen Organtransplantationen fungieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte- und Chemikalienliste

<i>Operationsbesteck:</i>	Fa. Aesculap
<i>Petrischalen:</i>	Fa. Sarstedt
<i>Mikroskop</i>	Leica M651
<i>EKG</i>	Sirecust 404-1, Siemens AG
<i>Isofluran</i>	Forene <sup>®</sup> , Abbot GmbH Wiesbaden
<i>Atropin</i>	Atropinsulfat 0,05%, Braun Melsungen AG Melsungen
<i>Xylazin</i>	Xylazin 2%, Bayer Vital Leverkusen
<i>Ketamin</i>	Ketamin 10%, WDT Garbsen
<i>NaCl</i>	NaCl 0,9%, Braun Melsungen AG Melsungen
<i>Äther</i>	Chemikalienausgabe Universität Regensburg
<i>Rapamycin</i>	Rapamune <sup>®</sup> , Wyeth Pharma GmbH Münster
<i>Cyclosporin A</i>	Sandimmune <sup>®</sup> , Novartis Basel
<i>Bepanthesalbe</i>	Bepanthen Roche, Hoffmann - La Roche AG Grenzach-Wyhlen
<i>Enthaarungscreme</i>	Pilcamed <sup>®</sup> , ASID BONZ GmbH Böblingen

### 2.2 Versuchsaufbau

Um gleichzeitig die Effekte der Immunsuppressiva auf das Tumorwachstum und die Abstoßung eines Transplantats zu untersuchen wurde ein neues Kombinations-Modell

entwickelt, dass sich aus einem Tumor- und einem Transplantationsmodell zusammensetzt. Dabei werden syngene CT26-Kolonkarzinomzellen subkutan an der Flanke injiziert und mit der von Fey et al. entwickelten allogenen Earheart-Transplantation kombiniert [66]. Dabei wird einer Empfängermaus Herzgewebe in eine neu geschaffene Tasche zwischen Ohrknorpel und Haut transplantiert. Der Vorteil dieses Kombinationsmodells besteht darin, dass das Tumolvolumen mittels einer Schieblehre leicht zu vermessen und die Vitalität des Transplantats durch die Kontraktionen (visuell) bzw. durch die elektrische Aktivität (EKG) meist eindeutig zu evaluieren ist. Zudem ist im Vergleich zu einer vaskularisierten Transplantationstechnik das Erlernen der Methode einfacher und die Belastung der Tiere (Hauteingriff vs. Laparotomie, OP-Zeit) deutlich geringer.

Um das klinische Problem der bereits existenten Tumore nach Transplantation zu simulieren, konnte der Tumor bis Tag 7 ungestört wachsen, bevor die Herztransplantation durchgeführt und mit der immunsuppressiven Therapie begonnen wurde. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tumoren mit einer durchschnittlichen Größe von  $76,6 \pm 43,4 \text{ mm}^3$  bereits gut etabliert sowie sicht- und vermessbar. Anhand des Gewichtes der Mäuse und der Größe des Tumors wurden die Tiere in verschiedene Versuchsgruppen randomisiert, die mit oder ohne Immunsuppressivum bzw. mit Tumor und/oder Herztransplantation behandelt wurden.

### ***2.3 Zellkultur***

Die in dieser Studie verwendeten CT26-Zellen stammen aus einem murinen Balb/c-Colon-Adenokarzinom [67]. Sie werden mit Standard-Zellkulturtechniken in RPMI-Medium (mit 10% FCS) angezüchtet und für diesen in vivo Versuch in syngene Mäuse injiziert.

## ***2.4 Versuchstiere***

Die Herztransplantate stammen aus C3H-Mäusebabies, die innerhalb der ersten 24 Lebensstunden explantiert wurden, um ein möglichst gesundes und belastbares Herzgewebe zu erhalten. Die Zuchtkäfige bestanden aus jeweils 2 Weibchen und einem Männchen, die von Harlan (Harlan Winkelmann GmbH, Borchon) bezogen wurden. Als Empfänger für die Herztransplantationen dienten männliche Balb/c-Mäuse, die ebenfalls von Harlan Winkelmann GmbH mit einem Gewicht von 22 - 24 g bezogen und in Käfigen von jeweils 10 Tieren gehalten wurden. Um die Versuchsbedingungen nicht durch stressinduzierte Effekte zu verfälschen wurden die Experimente mit den Tieren erst nach einer Woche Eingewöhnung begonnen. Nach der Operation wurden 1-3 Tieren pro Käfig gehalten. Alle Tiere wurden mit dem Standardmäusefutter und Wasser, beides ad libitum, versorgt und unter Standardhaltungsbedingungen (12 Std. Tag/Nachtrhythmus, 40-70% Luftfeuchtigkeit, 20facher Luftwechsel pro Stunde) gehalten. Die Lufttemperatur wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit mit früheren Versuchen mit Rapamycin und CT26-Tumoren und um ein aufgrund der exponierten Lage des Transplantates Auskühlen der Ohren zu verhindern bei ~26°C gehalten. Die Tierversuche wurden von der Regierung der Oberpfalz (Deutschland) genehmigt.

## ***2.5 Operatives Vorgehen***

### *2.5.1 Anästhesie*

Die Empfängermäuse werden zuerst mit Atropin vorbehandelt, um kardiovaskulären Komplikationen wie z.B. Bradykardie/Asystolie und Hypersalivation vorzubeugen, und anschließend mit Ketamin/Xylazin in Narkose versetzt. Dabei verwendet man adaptiert an das

Körpergewicht, je 0,08-0,1 ml einer Mischung aus 0,1 ml Atropin (Atropinsulfat 0,5mg/ml, Braun Melsungen AG, Melsungen) und 0,9 ml NaCl 0,9% (Braun Melsungen AG, Melsungen) sowie je 0,08-0,1 ml einer Mischung aus 0,1 ml Xylazin (Xylazin 2%, BayerVital, Leverkusen), 0,4 ml Ketamin (Ketamin 10%, WDT, Garbsen) und 0,5 ml 0,9% NaCl, welche intraperitoneal durch die Linea alba mit einer 27G Kanüle appliziert werden. Die Narkose hält zwischen 60 und 90 Minuten an. Die Augen werden durch eine Augen- und Nasensalbe (Bepanthen Roche, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach- Wyhlen) vor dem Austrocknen geschützt. Die Tiere werden während der Operation und der Aufwachphase überwacht und auf einer Wärmeplatte gelagert, um einer Auskühlung vorzubeugen.

Mischung <i>Atropin</i> (0,08-0,1ml pro Maus)	0,1 ml <i>Atropin</i> 0,05% 0,9 ml <i>NaCl</i> 0,9%
Mischung <i>Narkotikum</i> (0,08-0,1ml pro Maus)	0,1 ml <i>Xylazin</i> 2% 0,4 ml <i>Ketamin</i> 10% 0,5 ml <i>NaCl</i> 0,9%

**Tabelle 1: Herstellung der Narkosemedikation**

C3H-Mäusebabies, die als Spender dienen, werden mit einer gebogenen Pinzette am Genick gehalten und für ca. eine Minute in einer durch Eiswasser gekühlten 0,9%igen Kochsalzlösung gebadet, um die Nervenleitung zu verzögern, und anschließend dekapitiert.



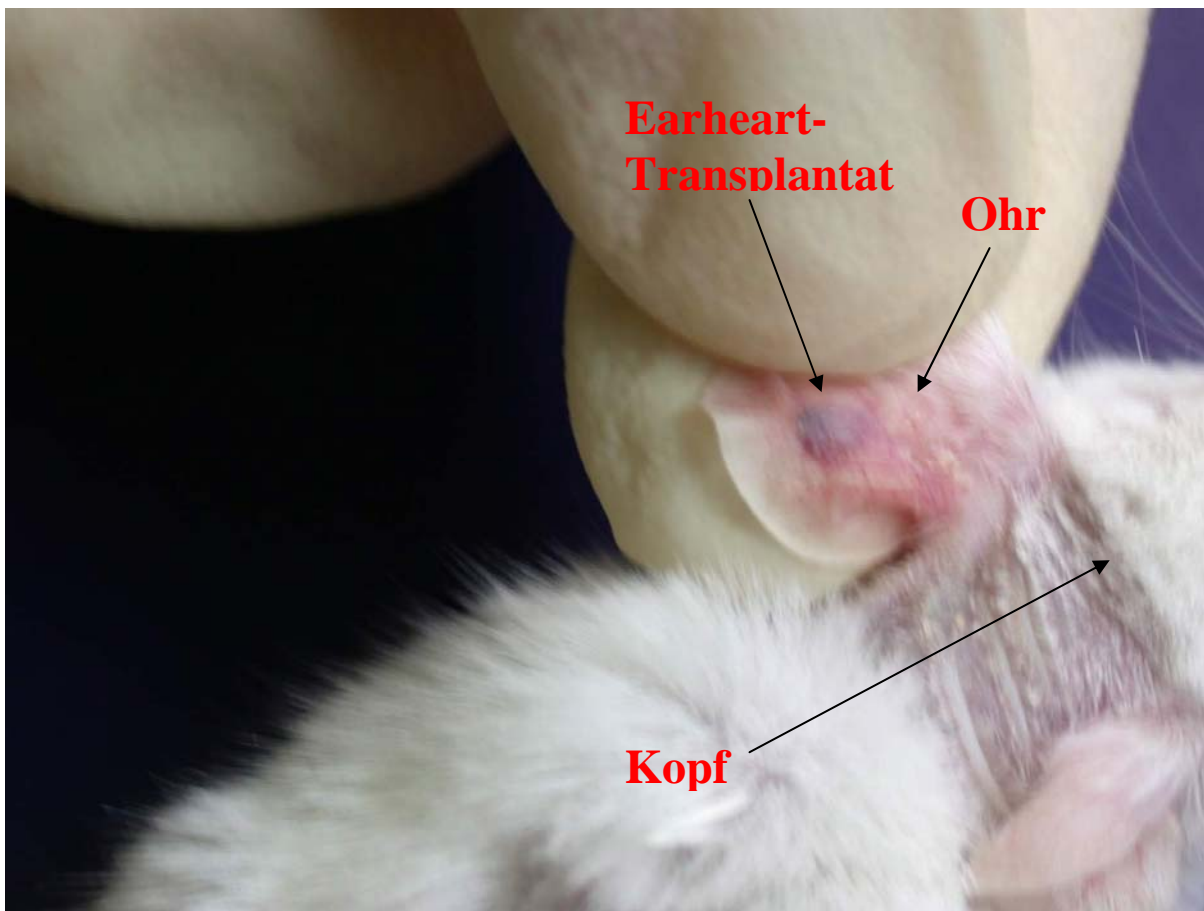
### 2.5.2 Tumorzellimplantation

Die narkotisierten Balb/c-Mäuse werden mit einem elektrischen Rasierer auf dem unteren rechten Quadranten des Rückens vom Rippenbogen bis zum Schwanzansatz rasiert und mit einer Enthaarungscreme (Pilcamed, ASID BONZ GmbH, Böblingen) ca. 3 Minuten behandelt. Die Creme mit den mittlerweile gelösten Haaren entfernt man grob mit einem Spatel und wäscht sie unter handwarmen Wasser wieder völlig ab, sodass eine haarlose Hautpartie entsteht, in die subkutan mit einer 27G Kanüle  $1 \times 10^6$  CT26-Adenokarzinomzellen [67] injiziert werden. In der Aufwachphase werden die Mäuse auf einer Wärmeplatte gelagert und beobachtet. Die Tiere werden anschließend im Wärmerraum bei 26 °C mit 5-10 Tieren pro Käfig gehalten. Nach 5-6 Tagen werden die Tumore makroskopisch sichtbar.

### 2.5.3 Earheart-Transplantation

Der Empfängermaus werden die Haare mit einem elektrischen Rasierer um das linke Ohr rasiert. Das gesamte Operationsbesteck wird vor jeder OP mit 70%igem Alkohol desinfiziert und anschließend mit 0,9%igem NaCl gespült, um Reizungen zu vermeiden. Mit einer spitzen Schere wird an der Ohrbasis ein feiner Schnitt angelegt und mit einer Metallkanüle (16G, Johnson & Johnson), die vorher stumpfgeschliffen wurde, in einem flachen Winkel ein etwa 15 mm langer Kanal zwischen Haut und Ohrknorpel entlang der großen Gefäße bis ca. 2 mm zum Ohrrand gebohrt. Das Durchstoßen der Haut ist ein Ausschlußkriterium, da daraus gehäuft Infektionen und Entzündungen rund um das Transplantat resultieren und nur in seltenen Fällen noch eine Kontraktion beobachtet wird. Um die Ischämiezeit des Transplantats zu minimieren werden zwei Empfängermause vorbereitet, bevor mit der Explantation eines Spenderherzens begonnen wird.

Nach der Dekapitation der Spendermaus fixiert man den Körper mit Nadeln durch Pfoten und Schwanz an der Unterlage. Eine spitze Schere wird mit einer Schneide unter dem Xiphoid angesetzt, bis zum Hals vorgeschoben und dann geschlossen. Durch den geöffneten Thorax kann nun das Herz mit einer kleinen gebogenen Pinzette am Hilus gepackt und durch leichtes Ziehen entnommen werden. Dabei ist der schonende Umgang mit den Ventrikeln wichtig, während die Vorhöfe abgetrennt werden. Das Explantat wird dann in eine 60mm-Petrischale (Falcon Nr. 3004, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) mit kalter 0,9%iger NaCl-Lösung gelegt und unter einem Mikroskop (Leica M651, 16-fache Vergrößerung) mit einer Schere längs in zwei etwa gleichgroße Stücke zerteilt.



**Abbildung 4:** Ear-heart-Transplantat im Ohr einer Balb/c-Maus

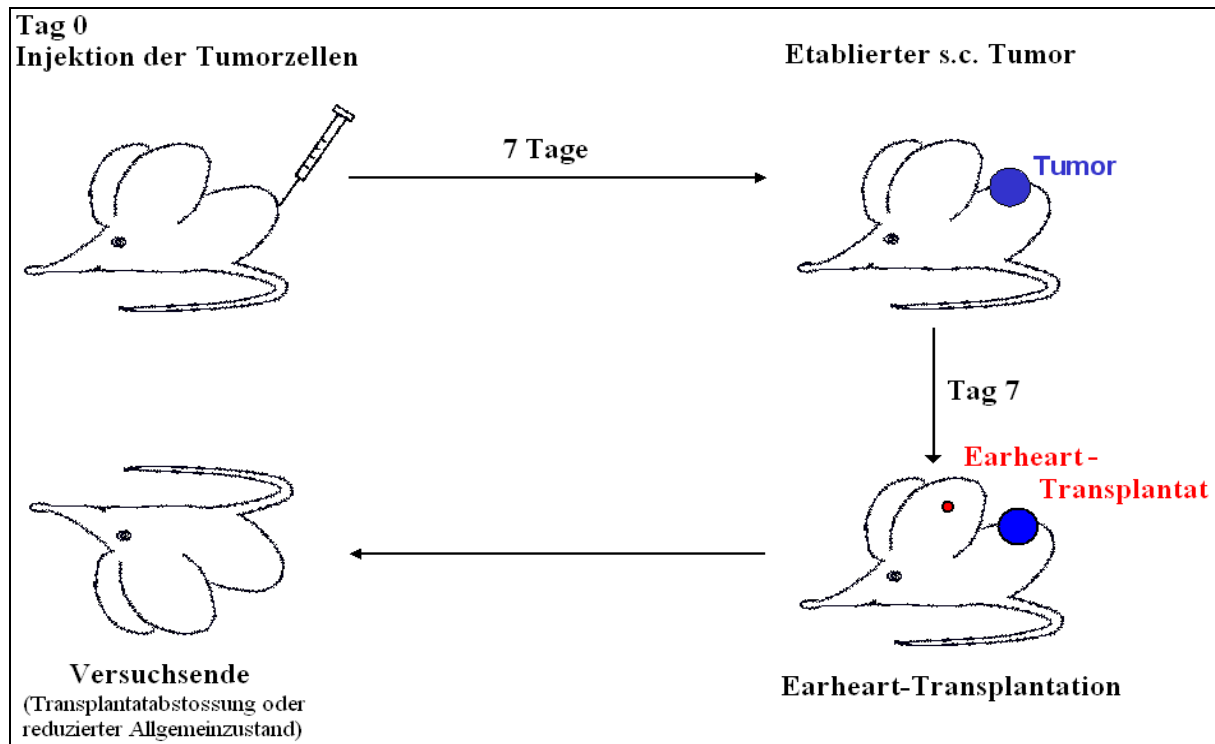
Anschließend zieht man mit einer 1ml Spritze sowie einer Venenverweilkanüle (16G, Johnson & Johnson) das halbe Herzstück mit reichlich NaCl auf und platziert es durch den Kanal im Ohr der Empfängermaus gefäßnah ca. 3 mm vom Rand des Ohres. Durch leichten Druck mit einem Wattestäbchen versucht man, möglichst viel Luft bzw. Flüssigkeit aus dem Kanal auszustreichen. Der Schnitt an der Ohrbasis heilt von selbst wieder zu, es sind weder Nähte, Klammern, Bandagen noch lokale bzw. systemische Antibiotikagaben notwendig. Anschließend werden die Mäuse in verschiedene Gruppen je nach Behandlungsart randomisiert und in Käfigen zu je 1-3 Mäusen in oben genanntem Wärmerraum bei 26 °C gehalten.

#### 2.5.4 Vermessen der Tumore

Am Tag 7 erfolgt erstmals die Vermessung der Tumore mit einer Schieblehre in der Quer- und Längsachse anhand der Formel

$$V = a^2 * b * \pi / 6$$

( $V$  = Volumen,  $a$  entspricht der kurzen,  $b$  der langen Achse) und die Randomisierung in verschiedene Behandlungsgruppen entsprechend der Größe der Tumore (Mittelwert 76,6 mm<sup>3</sup> ± 43,4 mm<sup>3</sup> an Tag 7) und dem Tiergewicht. Die Tiere, die zusätzlich zum Tumor noch einer Ear-heart-Transplantation unterzogen werden sollen, werden am Tag 7 wie unter 2.3.2 beschrieben operiert.



**Abbildung 5:** Zeitschema des Versuchsablaufes

## 2.6 Dosierung und Injektion der Medikamente

Rapamycin wird vom Hersteller (Wyeth Pharma GmbH, Münster) mit einem Lösungsvermittler in einer Dosierung von 5,0 mg/ml geliefert und vor Injektion jeweils frisch mit Aqua ad inj. zu einer milchigen Emulsion mit einer Endkonzentration von 1,5 µg/10µl (entspr. 150 µg/ml) verdünnt. Diese Mischung wird dann der Maus gewichtsadaptiert (10µl/g KG) mit einer Dosierung von 1,5 µg/g KG/d (= 1,5 mg/kg KG/d) injiziert, was je nach Maus zu einer Injektionsmenge von 0,2 – 0,3 ml führt. Neben der Dosierung von 1,5 mg/kg KG/d, die den klinischen Konzentrationen in der Anwendung am Menschen nachempfunden ist [56], wurde auch eine höhere Konzentration (4,5 mg/kgKG/d) getestet, die jedoch keine Verbesserung des Transplantatüberlebens bzw. Reduktion des Tumorumfanges im Vergleich

zur niedrigeren Dosierung erbrachte, so dass diese Versuche eingestellt wurden (Daten nicht aufgeführt).

Cyclosporin A (Sandimmune®, Novartis, Basel, Schweiz) wird aus der käuflichen Ausgangskonzentration von 50 mg/ml mit 0,9% Kochsalzlösung zu einer Endkonzentration von 4 mg/ml verdünnt. Der Maus werden wiederum 10µl/g KG/d verabreicht, was einer Dosierung von 40 mg/kg KG/d entspricht.

Die Tiere in der Kontrollgruppe werden mit 10 µl/g KG/d einer 0,9%igen Kochsalzlösung behandelt.

Zur Verabreichung der Medikamente wird die Maus mit Daumen und Zeigefinger am Nacken gehalten und ein Bein zwischen den Fingern fixiert, um einen freien Zugang zur Bauchregion zu erhalten und die Maus möglichst ruhig zu halten. Mit einer 1ml-Spritze und einer dünnen 27G Nadel wird nun das entsprechende Medikament durch die Linea alba in die freie Bauchhöhle injiziert (i.p.-Injektion).

## ***2.7 Erheben der Daten***

### *2.7.1 Überprüfung des Transplantatüberlebens*

In nicht narkotisiertem Zustand hält man die Mäuse mit Daumen und Zeigefinger am Genick fest und untersucht mithilfe eines Wattestäbchens das Transplantat unter einem Mikroskop (Leica M651) bei 16- bzw. 40-facher Vergrößerung auf sichtbare Kontraktionen. Bei zweifelhaftem Herzschlag bzw. bei nicht mehr sichtbaren Kontraktionen wird die Maus mit Isofluran (Forene®, Abbot GmbH, Wiesbaden) in Narkose versetzt und mit einem EKG-Gerät auf noch vorhandene elektrische Aktivitäten untersucht. Dazu platziert man drei Nadeln

rund um das Herztransplantat ins Ohr und verbindet diese mit den Elektroden. Die entstandenen Löcher im Ohr verheilen in der Regel problemlos ohne erkennbare Beeinträchtigungen des Transplantats oder der Maus. Sind weder sichtbare Kontraktionen noch elektrische Aktivitäten zu beobachten wird das Herz als abgestoßen angesehen.

### *2.7.2 Messen des Tumorummens*

Mit einer Schieblehre wird der Tumor der Maus, die auf der Hand sitzt während man den Schwanz festhält, im Quer- und Längsdurchmesser gemessen sowie eine eventuelle Nekrose ebenfalls vermessen und vom Volumen subtrahiert. Durch die Haut und durch die Bewegungen der Maus können leichte Meßungenauigkeiten auftreten, die bei gleichem Prüfer jedoch minimiert werden. Die Tiere werden täglich bezüglich des Tumorummens und ihrer Gesamtkonstitution (Gewicht, Aktivität, Fellpflege) beobachtet und vermessen.

Die statistische Auswertung des Transplantatüberlebens erfolgte nach der Kaplan-Meier-Methode mit Logranktest, das Tumorummen nach Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

## ***2.8 Verfahren am Versuchsende***

Sobald sich Zeichen eines reduzierten Allgemeinzustandes, Tumorkachexie, Antriebslosigkeit oder eine zu große Tumorlast zeigte, wurde der Versuch abgebrochen und die Tiere euthanasiert. Versuchsendpunkt war Tag 35 nach Setzen des Tumors, was Tag 28 nach Herztransplantation entspricht. Tumornekrosen wurden toleriert und engmaschig kontrolliert, solange sie nicht aufgebrochen waren, da sie einen Teil des Therapieerfolges bei Rapamycin darstellten.

*Abbruchkriterien:*

- Tag 35 nach Setzen des Tumors (= Tag 28 nach EhTx)
- Schlechter Allgemeinzustand
- Antriebslosigkeit
- Gewichtsverlust (Tumorkachexie)
- Große Tumorlast
- Aufbrechen der Tumornekrosen

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Versuchsgruppen

Um die Effekte von Rapamycin und Cyclosporin A zu vergleichen wurden die Tiere in 10 Versuchsgruppen eingeteilt (siehe *Tabelle 2*). Im ersten Abschnitt wurden die Tiere einer Earheart-Transplantation unterzogen und mit Rapamycin, Cyclosporin A oder als Kontrollgruppe mit NaCl 0,9% behandelt. Danach wurden im zweiten Abschnitt die medikamentösen Wirkungen auf das Tumorwachstum hin untersucht. Das eigentliche Studienziel, d.h. der Einfluss von Rapamycin und Cyclosporin A auf Transplantaterhalt und Wachstum eines etablierten Tumors, wurde schließlich im dritten Abschnitt untersucht, in dem die Versuchstiere nach Injektion und Etablierung eines subkutanen Tumors einer Earheart-Transplantation unterzogen wurden.

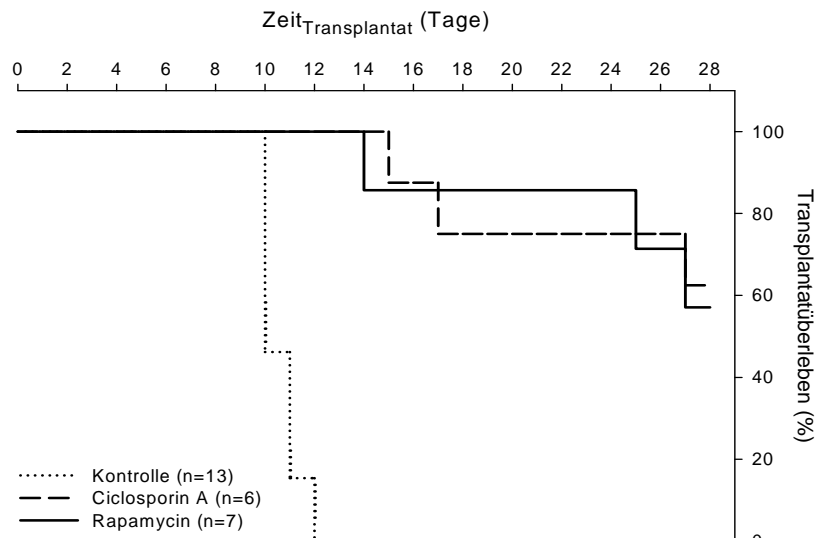
Gruppe	Earheart-Transplantat	Subkutaner Tumor	Medikament	Anzahl (n)
<b>I</b>	X		NaCl 0,9%	13
<b>II</b>	X		Cyclosporin A 10mg/kg/d	8
<b>III</b>	X		Cyclosporin A 40mg/kg/d	6
<b>IV</b>	X		Rapamycin 1,5 mg/kg/d	7
<b>V</b>		X	NaCl 0,9%	8
<b>VI</b>		X	Cyclosporin A 40mg/kg/d	6
<b>VII</b>		X	Rapamycin 1,5 mg/kg/d	6
<b>VIII</b>	X	X	NaCl 0,9%	7
<b>IX</b>	X	X	Cyclosporin A 40mg/kg/d	7
<b>X</b>	X	X	Rapamycin 1,5 mg/kg/d	6

**Tabelle 2: Aufteilung der Versuchsgruppen**



### ***3.2 Ergebnisse der Herztransplantationen (Gruppe I bis IV)***

Die Earheart-Transplantationen wurden wie oben beschrieben in der Stammkombination C3H -> Balb/c durchgeführt. Es zeigte sich, dass in der Kontrollgruppe (Gruppe I), d.h. ohne immunsuppressive Therapie, alle Transplantate bis zum Tag 12 abgestoßen wurden. Die Behandlung mit Cyclosporin A mit einer Dosierung von 10 mg/kg KG/Tag (Gruppe II) erwies sich als nur gering überlebensverlängernd für das Transplantat verglichen mit der Kontrollgruppe, aber nicht ausreichend, um für die benötigte Überwachungszeit der Tumore einen suffizienten Schutz des Transplantats vor Abstoßung zu gewährleisten und somit eine klare Aussage machen zu können, weswegen die weiteren Experimente mit dieser Dosierung abgebrochen wurden (Daten nicht gezeigt). Bei Dosiserhöhung von 40 mg/kg KG/Tag (Gruppe III) konnte ein gutes Transplantatüberleben (62,5%) bis Tag 28 beobachtet werden ( $p < 0,0001$  vs. Kontrolle). Mit Rapamycin (1,5 mg/kg KG/Tag) (Gruppe IV) konnte im Verlauf und am Versuchsende (Tag 28) ebenfalls ein gutes Transplantatüberleben (57,1%) festgestellt werden ( $p < 0,0001$  vs. Kontrolle). Beide Immunsuppressiva zeigten in der verwendeten Dosierung also ein vergleichbares Transplantatüberleben, das einen ausreichenden Schutz des Transplantates bis zum anvisierten Versuchsendpunkt gewährleistet (Abbildung 6).



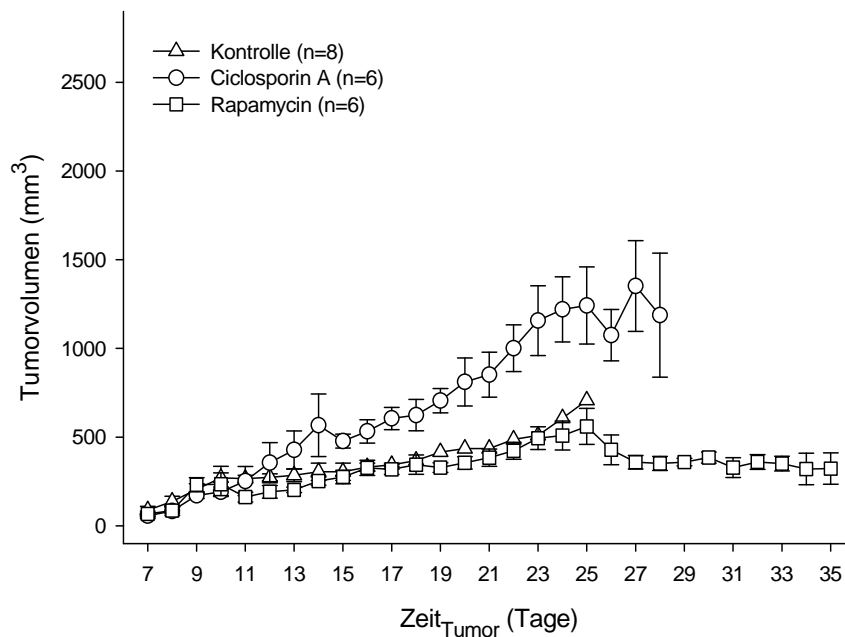
**Abbildung 6:** Überleben der Earheart-Transplantate in Tagen bei Balb/c-Mäusen ohne Tumor

### 3.3 Ergebnisse des Tumorwachstums (Gruppe V bis VII)

In den Gruppen V bis VII wurde den Tieren an Tag 0 ein subkutaner Tumor injiziert, der sich bis Tag 7 etablieren konnte, um die klinische Situation des bestehenden Tumors bei Transplantationspatienten simulieren zu können. Danach wurde mit der immunsuppressiven Therapie begonnen. In den ersten 3 Tagen nach Beginn der Therapie (entspricht Tag 10 nach Setzen des Tumors) zeigte sich in allen drei Untergruppen V bis VII (Kontrolle, Cyclosporin A, Rapamycin) eine ähnliche Größenzunahme des Tumors (Kontrolle  $270 \pm 145 \text{ mm}^3$ , CsA  $191 \pm 61 \text{ mm}^3$ , Rapa  $234 \pm 91 \text{ mm}^3$ ; siehe Abbildung 7), danach setzten bereits die Effekte der Immunsuppressiva ein. Die Kontrollgruppe (Gruppe V) zeigte ein langsames aber stetiges Tumorwachstum, wobei die Versuche nicht wegen der Tumorgröße, sondern aufgrund der zunehmenden Tumorkachexie der Tiere meist wenige Tage nach „Therapiebeginn“, spätestens jedoch an Tag 25 nach Setzen des Tumors, beendet werden mussten (durchschnittliches Überleben  $13,1 \pm 5,2$  Tage). Im Vergleich dazu kam es in Gruppe VI ab

Tag 13 zu einem stärkeren Wachstum der mit Cyclosporin A behandelten Mäuse (CsA  $427 \pm 240 \text{ mm}^3$  versus Kontr.  $284 \pm 51 \text{ mm}^3$ ). Bis zum Tag 25 musste bereits bei 50% der Tiere aufgrund einer zu groß gewordenen Tumorlast der Versuch beendet werden. Die übrigen Mäuse wurden nur noch wenige Tage weiterbehandelt und zeigten auch weiterhin ein stetiges Tumorwachstum, bis spätestens an Tag 28 auch bei ihnen die Tumorlast zu gravierend und der Versuch beendet wurde. Allerdings waren unter Cyclosporinbehandlung die Tumore zwar größer als in der Kontrollgruppe, die Komplikationen durch den Tumor (Kachexie/Ernährungszustand, Antrieb) fielen aber geringer aus und das Allgemeinbefinden war deutlich besser. In direktem Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse der Rapamycin-Gruppe (Gruppe VII). Sie zeigte bis Tag 25 ein deutlich geringeres Tumorwachstum verglichen mit der Cyclosporin-A-Gruppe ( $560 \pm 177 \text{ mm}^3$  versus  $1242 \pm 435 \text{ mm}^3$ ). Ab diesem Zeitpunkt konnte, bedingt durch die Größe des Tumors und der daraus folgenden Abhängigkeit von der Gefäßversorgung, sogar ein Rückgang des Tumolvolumens verzeichnet werden, der durch Nekrosen der Tumormasse begründet ist, die vom Volumen subtrahiert wurden. Der Durchmesser des Tumors änderte sich dabei jedoch nicht, d.h. es kam zu keinem Schrumpfen des Tumors.

Zusammenfassend zeigte sich in diesen Versuchsgruppen ein stärkeres (CsA) bzw. dezent schwächeres Tumorwachstum (Rapa) verglichen mit der Kontrollgruppe, das Allgemeinbefinden und mittlere Überleben (zumindest unter Rapamycin) war durch die Behandlung mit den Immunsuppressiva jedoch deutlich besser.



**Abbildung 7:** Wachstum der CT26-Karzinome bei Balb/c-Mäusen ohne Earheart-Transplantat

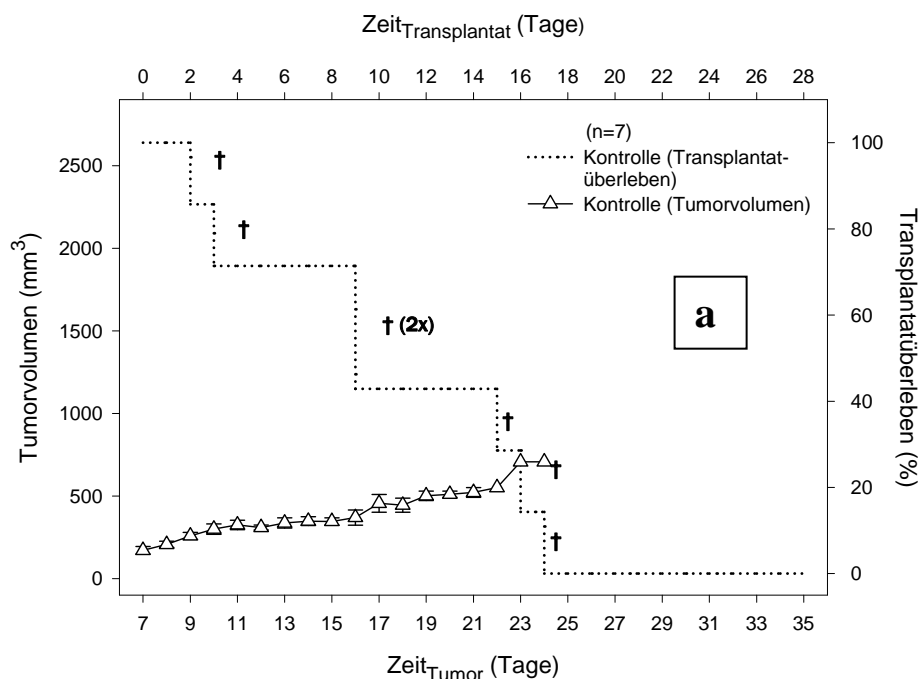
### 3.4 Ergebnisse Kombination Tumor/Herztransplantation (Gruppe VIII bis X)

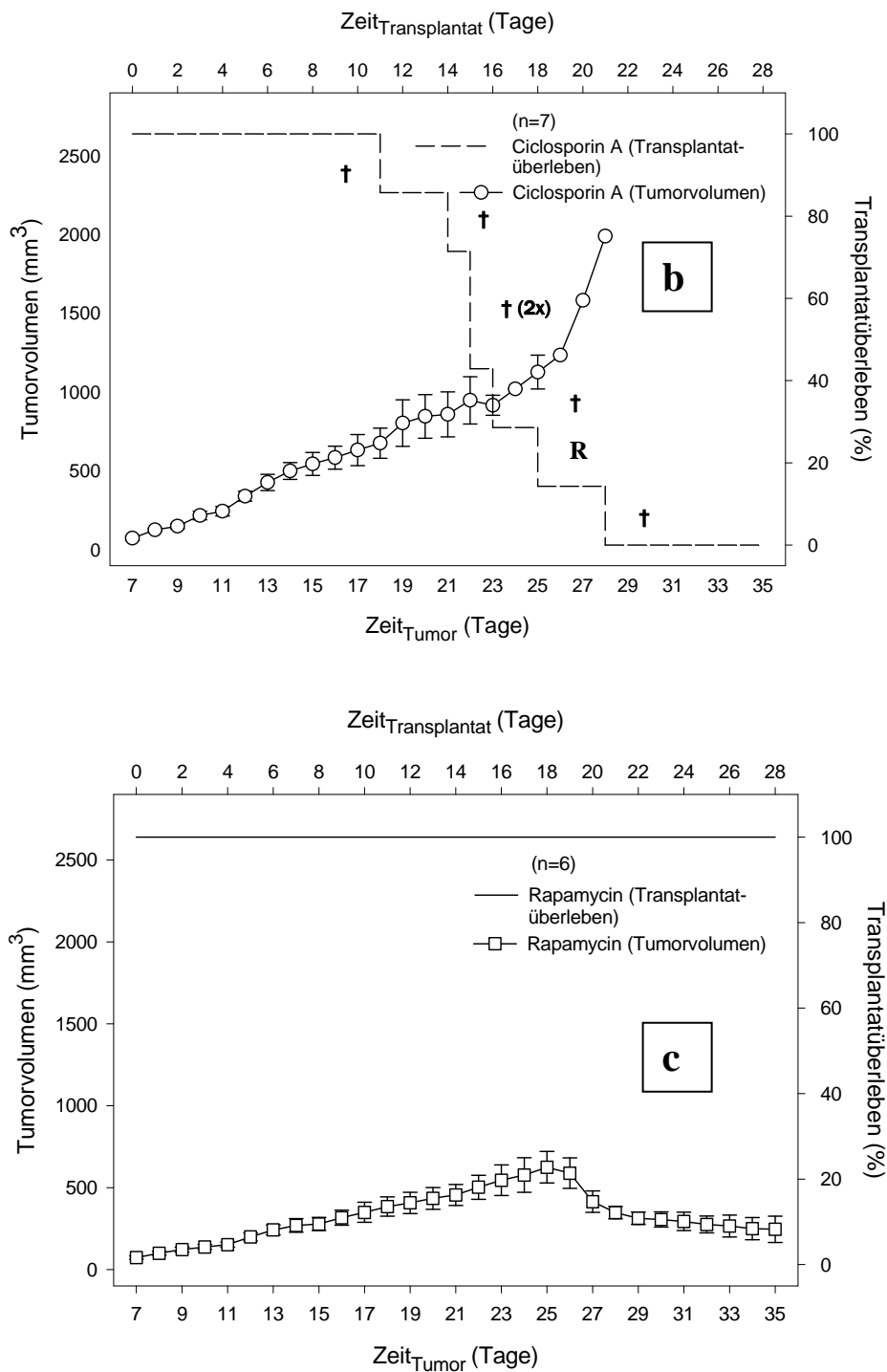
In der letzten Versuchsreihe wurden nun die Effekte von Cyclosporin und Rapamycin in einem Kombinationsmodell aus Earheart-Transplantat und Tumor auf Transplantatabstoßung und Tumorwachstum untersucht. Für die Kontrollgruppe mit NaCl 0,9% (Gruppe VIII) war der Tumor der limitierende Faktor, da alle Tiere bei noch schlagendem Herzen bis zum Tag 24 (bzw. 17 Tage nach Herztransplantation) wegen Tumorkachexie und reduziertem Allgemeinzustand aus dem Versuch genommen werden mussten. Es zeigte sich jedoch ein verlängertes Transplantatüberleben verglichen mit der Kontrollgruppe ohne Tumor (Gruppe I) ( $16,3 \pm 4,8$  Tage versus  $9,6 \pm 0,7$  Tage, siehe Abbildung 8, a und c), d.h. die Existenz eines Tumors wirkte sich verlängernd auf das Transplantatüberleben aus.

Ähnlich verhielt es sich in der Cyclosporin A-Gruppe (Gruppe IX). Auch hier waren das starke Tumorwachstum der Tiere der Grund für den Versuchsabbruch bis spätestens Tag

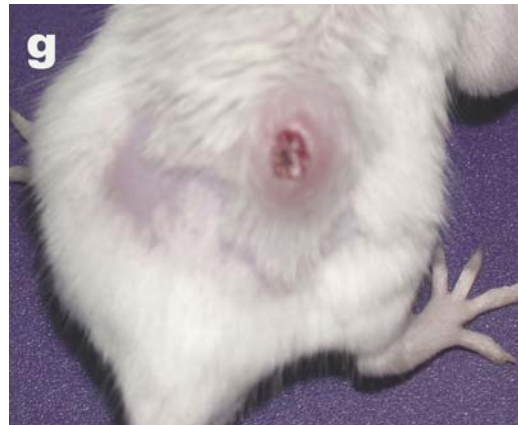
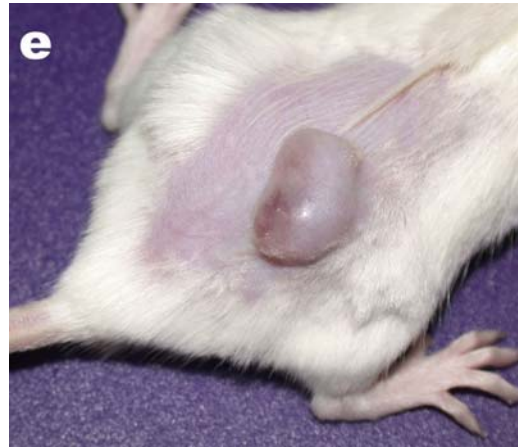
28, bei fast allen Tieren (6 von 7) mit noch schlagendem Herzen. Es zeigte sich unter Cyclosporinbehandlung zwar wie in den Gruppen III (EhTx/CsA) und VI (Tumor/CsA) ein verlängertes Transplantatüberleben verglichen mit der Kontrollgruppe VIII ( $22,9 \pm 2,8$  Tage versus  $16,3 \pm 4,8$  Tage), allerdings auch wieder eine größere Tumormasse ( $545 \pm 193$  mm<sup>3</sup> versus  $348 \pm 46$  mm<sup>3</sup>, Tag 15).

Gänzlich anders verhielt es sich dagegen in der Rapamycingruppe (Gruppe X). Während der Tumor wiederum nur eine langsamere Zunahme des Volumens ( $277 \pm 107$  mm<sup>3</sup> versus  $545 \pm 193$  mm<sup>3</sup> vgl. mit der CsA-Gruppe VIII an Tag 15) mit anschließender Abnahme ab Tag 25 durch deutliche Nekrosen zeigte ( $624 \pm 236$  mm<sup>3</sup> (Tag 25) versus  $246 \pm 160$  mm<sup>3</sup> (Tag 35)), blieben der Herzschlag des Transplantats und der gute Allgemeinzustand bei allen Tieren bis zum Versuchsendpunkt an Tag 35 erhalten ( $p=0,0004$  vs. Kontrolle VIII). Auch hier zeigte sich wiederum das schon in der Kontrollgruppe VIII beobachtete verlängerte Transplantatüberleben bei Existenz eines Tumors verglichen mit tumorfreien Tieren ( $28 \pm 0$  Tage versus  $25,0 \pm 5,1$  Tage, siehe Abbildung 8, a und c).





**Abbildung 8:** Transplantatüberleben und Tumorwachstum bei Balb/c-Mäusen, die entweder mit NaCl (A), CsA 40 mg/kg KG/d (B) oder Rapa 1,5 mg/kg KG/d (C) behandelt wurden. Das Transplantatüberleben pro Zeit wird in der rechten und oberen Achse gezeigt, der Verlauf des Tumorwachstums in der linken und unteren Achse. Das Fehlen von Fehlerbalken bedeutet, dass nur noch ein Tier in der Versuchsgruppe verblieb. In den Abbildungen A-C bedeutet ein Kreuz, dass das Tier bei noch vitalem Transplantat bedingt durch die Tumorlast aus dem Versuch genommen wurde, ein R zeigt die Abstoßung des Transplantats an. Die Photographien zeigen das Tumorwachstum von repräsentativen Tieren mit Ear-heart-Transplantaten an Tag 14 unter Behandlung mit NaCl (d), Cyclosporin A (e) oder Rapamycin (f). Bild g zeigt das Auftreten von Nekrosen unter Rapamycinbehandlung an Tag 28.



### ***3.5 Verspäteter Kontraktionsbeginn unter Rapamycin***

Erwähnenswert ist zudem die Beobachtung, dass im Vergleich zu den Kontroll- oder mit Cyclosporin A behandelten Tieren die Kontraktionen des transplantierten Herzens unter Rapamycinbehandlung erst einige Tage später auftraten (13,8 Tage vs. 5,7 Tage bzw. 5,9 Tage,  $p = 0,0016$ ; vgl. *Tabelle 3*). Bei einem Versuchstier wurden überraschenderweise erst an Tag 27 Kontraktionen des Transplantates beobachtet. Diese Maus wurde bis zum Tag 50 weiterbehandelt, wobei sich hierbei ein unverändert starker Herzschlag mit nur leichten Veränderungen der Tumorgröße zeigte.

**Tabelle 3: Effekte der Immunsuppression auf den Kontraktionsbeginn von Earheart-Transplantaten bei Balb/c-Mäusen mit einem CT26-Tumor. (SA: Standardabweichung)**

Behandlung	Kontraktionsbeginn [Tage]	Mittelwert $\pm$ SA	Statistik (log-rank)
Kontrolle (NaCl)	3,4,5,6,6,8,8	5,7 $\pm$ 1,9	
CsA (40 mg/kg/d)	3,4,4,4,6,10,10	5,9 $\pm$ 3,0	p=0,66
Rapa (1,5 mg/kg/d)	8,11,11,12,14,27	13,8 $\pm$ 6,7	p=0,0016



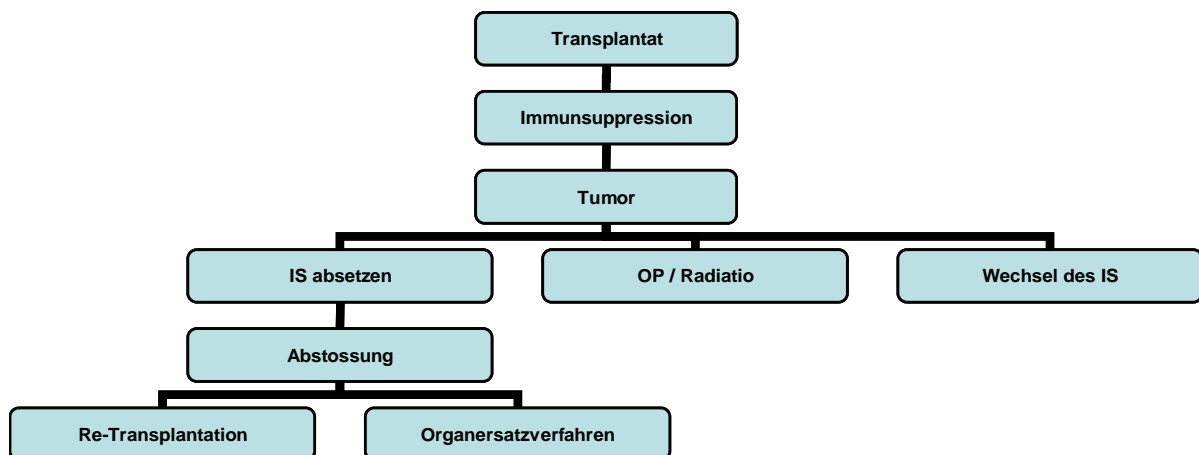
## 4 Diskussion

### 4.1 Klinische Problematik

Das Problem der Tumorerkrankungen in der Transplantationschirurgie tritt in den letzten Jahre immer mehr in den Vordergrund und wird in immer mehr klinischen Studien beschrieben, bis heute ist aber noch keine zufriedenstellende Strategie zur Verhinderung einer Neubildung sowie zur Vermeidung eines Rezidivs gefunden worden. Heute muss notwendigerweise nach einer Organtransplantation das Immunsystem medikamentös supprimiert werden, um die Abstoßung des Transplantats zu verhindern. Kommt es unter Immunsuppression nun zu einem Wachstum eines neuen oder bisher unentdeckten Tumors oder zu einem Rezidiv eines kurativ behandelten Tumors, müssen wichtige Entscheidungen getroffen werden (Abbildung 9). Eine Möglichkeit bei der Tumorthherapie ist es, die Immunsuppression zu verringern oder ganz zu stoppen, wodurch jedoch das Risiko der Transplantatabstoßung in Kauf genommen wird. Kann man nach der Abstoßung eines Nierentransplantats wieder auf die Dialyse zurückgreifen, so sind doch die kompensatorischen Möglichkeiten bei Verlust anderer transplantierte Organe wie Herz, Lunge oder Leber alles andere als einfach und haben oft das Ableben des Patienten zur Folge, wenn unter Tumorthherapie ein Wiederansetzen der Immunsuppression nicht möglich ist. Auch die Beibehaltung des Therapieregimes und zusätzliche Einleitung einer spezifischen Therapie zur Eradikation des Tumors wie z.B. die operative Entfernung oder die Strahlentherapie ist bei vielen Patienten aufgrund des reduzierten Allgemeinzustandes, der anatomischen Lage, Ausdehnung und Aggressivität des Tumors oder der Metastasierung oft nicht möglich. Als Ausweg bleibt noch der Wechsel des Therapieregimes hin zu einem Medikament, welches nicht nur die Transplantatabstoßung verhindert, sondern gleichzeitig

das Tumorwachstum eindämmt bzw. den Tumor direkt bekämpft. Die Wirkung auf das Tumorwachstum von Cyclosporin A (positiv) und Rapamycin (negativ) sind schon bekannt, das Ziel der vorliegenden Studie ist nun, diese Wirkung in einem Kombinationsmodell mit einer Organtransplantation zu untersuchen.

Hier konnte nun gezeigt werden, dass zwei heutzutage in der Transplantationschirurgie verwendete Medikamente in einer therapeutischen Dosierung, die die Abstoßung von transplantierten Organen bei Mäusen hemmt, gleichzeitig ein verlängertes Transplantatüberleben, als auch einen positiven (Rapa) bzw. negativen Effekt (CsA) auf das Tumorwachstum haben.



**Abbildung 9:** Therapieoptionen bei Auftreten eines Tumors nach Organtransplantation

## ***4.2 Vergleich der Versuchsergebnisse von Cyclosporin A und Rapamycin***

Die Wahl der zu untersuchenden Medikamente fiel zum einen auf den Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A, dem schon in mehreren Studien ein ungünstiger Effekt auf das Tumorwachstum bzw. ein gesteigertes Risiko für bösartige Neubildungen und Tumorrezidive bescheinigt wurde [24,28,29,68]. Auch in dieser Versuchsreihe zeigte sich unter immunsuppressiver Dosis ein verstärktes Wachstum des subkutanen Kolonadenokarzinoms verglichen mit der Kontrollgruppe. In einem zweiten Modell mit der Kombination von Tumor und vaskularisiertem Herztransplantat zeigte sich ein vergleichbares Wachstum auch bei subkutanen B16-Melanomen, so dass die Vermutung nahe liegt, dass es unter Cyclosporin A-Medikation zu einem unselektiven Wachstum von Tumorzellen kommt [50,69]. Die große Tumorlast verbunden mit dem stetig zunehmenden moribunden Zustandes war auch der Grund für die vorzeitige Euthanasie der Versuchstiere zwischen Tag 25 und Tag 28 in dieser Studie bei noch vitalem Transplantat, was das elementare Problem in der Klinik widerspiegelt.

Diese Ergebnisse des seit langem etablierten Cyclosporin A wurden nun mit denen von Rapamycin verglichen, einem relativ neuen Immunsuppressivum mit antiangiogenetischen Eigenschaften [50], welches insbesondere bei Nierentransplantationen eingesetzt wird. Hierbei zeigte sich nicht nur wie erwartet ein mit Cyclosporin A vergleichbares verlängertes Transplantatüberleben, sondern zudem ein deutlich verringertes Tumorwachstum. Zusätzlich fiel nach einer 3- bis 4-wöchigen Phase der langsamen Tumorgrößenzunahme eine Verringerung der vitalen Tumormasse bedingt durch Nekrosen im Tumorzentrum auf. Eine mögliche Erklärung liegt in der schon bekannten antiangiogenetischen Wirkung von Rapamycin, indem es die suffiziente Vaskularisierung des Tumors verhindert und somit nach dem Prinzip der letzten Wiese zur Nekrose des

Tumorzentrums führt [50] bzw. in der von Bruns et al. und Guba et al. beschriebenen lokalen Mikrothrombosierung der Tumorgefäße [60, 76]. Es bleibt aber fraglich, ob damit auch tatsächlich ein Vorteil für das Überleben im Allgemeinen und für die Funktion des Umgebungsgewebes verbunden ist, da die Raumforderung des Tumors nicht zwangsläufig nachlassen muss, wenn er im Inneren zerfällt, und der Organismus mit den Tumorzerfallsprodukten belastet wird.

Ein wichtiger Aspekt für die Anwendung in der Klinik ist der, dass es insbesondere in Dosierungen, die im Menschen für eine Immunsuppression verwendet werden, unter Erhaltung der Transplantatfunktion zu diesem verminderten Tumorwachstum und Nekrosenbildung kam. In weiteren Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte für Cyclosporin A in einer niedrigeren Dosierung als der hier verwendeten (10 vs. 40 mg/kgKG/d) in einem Modell mit subkutanen B16-Melanomen eine ebenso starke Tumorprogression für beide Dosierungen beobachtet worden [69]. Weiterhin wurde eine Kombination von Rapamycin und Cyclosporin A mit C57BL/6-Mäusen getestet. Die Tiere trugen ein subkutanes B16-Melanom und eine Gruppe wurde zusätzlich einer heterotopen, vaskularisierten Herztransplantation unterzogen [69]. In beiden Gruppen zeigte sich ein deutlich verlangsamtes Tumorwachstum ähnlich einer Gruppe, die nur eine Rapamycin-Monotherapie erhielt. Der antiproliferative Effekt von Rapamycin scheint also über das verstärkte Tumorwachstum unter Cyclosporin A zu dominieren, ein zusätzlicher Benefit zur alleinigen Behandlung mit Rapamycin zeigte sich in dieser Kombination jedoch nicht.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Cyclosporin A wie erwartet zwar einen transplantatprotektiven Effekt aufweist, es aber zu einem verstärkten Tumorwachstum und einem damit verbundenem moribunden Zustand der Versuchstiere kommt. In direktem

Gegensatz dazu verhindert Rapamycin in diesem Kombinationsmodell nicht nur die Transplantatabstoßung und hemmt das Tumorwachstum, es kommt sogar zur Entstehung einer zentralen Nekrose und somit einer Reduktion der Tumormasse.

### ***4.3 Antiproliferative Wirkungen von Rapamycin***

In dieser wie auch in anderen Studien zeigte sich unter Immunsuppression mit Cyclosporin A ein deutlich erhöhtes Tumorwachstum. Unter Behandlung mit Rapamycin zeigte sich dagegen ein deutlich geringeres Wachstum, was die Frage nach dessen Wirkmechanismus auf Tumorzellen aufwirft.

#### *4.3.1 Direkter antiproliferativer Effekt*

Neben einer gehemmten Angiogenese wurde bereits in mehreren Studien ein direkter antiproliferativer Effekt von Rapamycin auf Tumorzellen beschrieben [73], der sowohl auf die in dieser Studie verwendeten CT-26-Kolonkarzinomzellen [74] als auch auf B16-Melanom-, P388-Leukämiezellen [75] und in geringerer Masse auch auf L3.6pl-Pankreaskarzinomzellen [76] wirksam ist. Über den Angriffspunkt von Rapamycin, das „mammalian target of Rapamycin (mTOR)“, das ein wichtiger Regulator für Zellproliferation und Wachstum ist, kann zusätzlich zum Zellzyklusarrest in verschiedenen Tumorzelllinien eine Apoptose ausgelöst werden. So ist das Wachstum von malignen Zellen aus Rhabdomyosarkomen, kleinzelligen Lungenkarzinomen, Pankreas-, Brust- und Prostatakrebs und einigen weiteren Tumorzellen inhibiert [55]. Neben der soeben beschriebenen Hemmung von Tumorzellproliferation und Angiogenese wird in einigen Maus-Tumormodellen auch die Metastasierung inhibiert [51, 76]. Ein möglicher Mechanismus dafür ist eine erhöhte Expression von E-cadherin unter Rapamycin-Behandlung. E-cadherin ist ein hauptsächlich

von Epithelzellen exprimiertes Adhäsionsmolekül, dessen Fehlen mit erhöhter Motilität und damit Invasivität von Tumorzellen in Verbindung gebracht wird [51]. Durch den erhöhten E-cadherin-Spiegel nach Rapamycin-Behandlung konnte eine Konversion von einem malignen und invasiven Phänotyp hin zu einem nichtinvasiven und benignen Phänotyp beobachtet werden [51].

#### 4.3.2 Hemmung der Angiogenese

Die potenteste Wirkung von Rapamycin auf das Tumorstadium resultiert wahrscheinlich aus einer Hemmung der Angiogenese und damit einer insuffizienten Neovaskularisation des wachsenden Tumors. In einem *in vitro* Modell unserer Arbeitsgruppe, in dem die Aussprossung von Gefäßzellen im ‚aortic ring assay‘ (ex vivo Kultur von Ringen aus Rattenaorta auf Matrigel) untersucht wurde, zeigte sich unter Rapamycin im Gegensatz zu Cyclosporin A eine verminderte Neubildung [69]. Während andere Immunsuppressiva hauptsächlich Wirkungen auf Lymphozyten aufweisen, inhibiert Rapamycin wachstumsfaktor-vermittelte Proliferationen auch von anderen Zelltypen, wie Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen, sehr stark [70]. Einer dieser Wachstumsfaktoren ist der ‚vascular endothelial growth factor‘ (VEGF), ein zentraler Regulator der Gefäßneubildung, der von einigen Tumorzellarten – unter anderem auch dem in dieser Studie verwendeten CT26-Kolonkarzinom - stark exprimiert wird [88, 89]. Rapamycin führt sowohl zu einer reduzierten Produktion von VEGF als auch zu einem verminderten Ansprechen der Endothelzellen auf diesen Stimulator [50], was die für das Tumorstadium notwendige Gefäßneubildung erschwert. Die erhöhte VEGF-Produktion in Tumoren könnte auch die Selektivität der Thrombosierung von Tumorgefäßen unter Rapamycintherapie erklären [60]. Zusammen führt das im Verlauf zu dem in dieser Studie beschriebenen langsameren Wachstum und zur Nekrosebildung in der Tumormasse. Sind die Tumorzellen und

Mikrotumore durch Diffusion noch suffizient mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, so wird er mit zunehmender Größe (ab ca. 1-2 mm) immer mehr von einer Neueinsprossung von Kapillaren abhängig, was bei gehemmter Proliferationsrate zu vermindertem Wachstum und nach dem Prinzip der letzten Wiese zu einer Nekrose im Zentrum der Tumormasse führt. Koehl et al. sahen zudem ein verändertes Wachstumsverhalten der Gefäße mit wenigen Aussprossungen und gestörtem Blutfluss unter Rapamycin-Behandlung [71].

Dieser antiangiogene Effekt von Rapamycin kann auch der Grund dafür sein, warum unter Rapamycinbehandlung die Kontraktionen des transplantierten Herzens erst einige Tage später auftraten als im Vergleich zu den Kontroll- oder mit Cyclosporin A - behandelten Tieren (13,8 Tage vs. 5,7 bzw. 5,9 Tage,  $p = 0,0016$ ; vgl. *Tabelle 3*). Das Transplantat, welches in eine künstlich geschaffene Tasche zwischen Ohrknorpel und Haut platziert wird, muss Anschluss an das Kapillarsystem finden. Dieser Vorgang benötigt üblicherweise 4-6 Tage [77], ein Zeitintervall, welches mit dem Beginn der Kontraktionen der nicht mit Rapamycin behandelten Ear-heart-Transplantate in dieser Studie übereinstimmt. Durch eine gehemmte Angiogenese, z.B. durch Rapamycin, findet eine für die Kontraktion nötige suffiziente Versorgung des Transplantats erst später statt, jedoch wird das Transplantat durch Diffusion ausreichend versorgt, um bis zur später einsetzenden Kapillaraussprossung zu überleben.

Der antiangiogene Effekt erklärt neben dem geringeren Tumorwachstum ebenso die beschriebenen Nebenwirkungen von Rapamycin, wie z.B. Wundheilungsstörungen, Anastomoseninsuffizienz [70] und verzögerte Frakturheilung [72]. Insofern muss dieser unerwünschte Effekt neben der positiven antiproliferativen Wirkung auf Tumore in der Entscheidungsfindung der richtigen medikamentösen Therapie unbedingt mit in Betracht

gezogen werden, insbesondere wenn Patienten - zum Beispiel nach größeren Operationen - einem erhöhten Risiko ausgesetzt sind.

Da der Hauptwirkmechanismus von Rapamycin die antiangiogenen Effekte sind, sind, wie prinzipiell bei allen antiangiogenen Therapieansätzen, die kurativen Möglichkeiten von Rapamycin als Monotherapeutikum in der ‚reinen‘ Onkologie begrenzt, da sich auch für die Rapamycinbehandlung gezeigt hat, dass einzelne Tumorzellen und Mikrometastasen persistieren können. Trotzdem könnte Rapamycin einen entscheidenden Fortschritt in der Behandlung von Tumoren in der Transplantationsmedizin darstellen, da wegen der lebenslangen Notwendigkeit der Immunsuppression das Risiko der Tumorprogression durch Absetzen von Rapamycin nicht gegeben ist.

Durch dauerhafte Rapa-Therapie könnte eine „stable disease“-Situation erreicht werden, das heißt die Neoplasie ist in einen inaktiven Zustand versetzt worden, bei dem es zu keiner Verschlechterung des klinischen Zustands des Patienten kommt. Allerdings ist in experimentellen Modellen eine synergistische Wirkung von Rapa mit anderen Chemotherapeutika wie 5-Fluorouracil [74] oder Gemcitabine [76] beobachtet worden, so dass durch den gezielten Einsatz von Rapamycin in Kombinationstherapien durchaus ein kurativer Effekt bei bisher schwer behandelbaren Tumorarten möglich erscheint.

#### ***4.4 Die Rolle des Immunsystems im Wirkmechanismus von Rapamycin***

Eine Suppression des Immunsystems, welches normalerweise entartete Zellen erkennt und eradiziert, führt im Allgemeinen zu einer erhöhten Tumorinzidenz und verstärktem Wachstum. Um zu testen, ob der antiproliferative Effekt von Rapamycin von einem intakten



Immunsystem abhängig ist, wurden auch das Tumorwachstum eines subkutanen CT26-Adenokarzinoms unter Rapamycinbehandlung bei „severe combined immunodeficient (SCID)“-Balb/c-Mäusen, also immuninkompetenten Tieren, getestet [69]. Es zeigte sich ein ähnliches Tumorwachstum verglichen mit früheren Resultaten von immunkompetenten Mäusen, weshalb die antiproliferative Wirkung von Rapamycin unabhängig von einem funktionierenden Immunsystem zu sein scheint bzw. die proneoplastischen Wirkungen der Immunsuppression überlagert.

#### ***4.5 Verlängerung des Transplantatüberlebens in Anwesenheit eines Tumors***

Zudem hat es den Anschein, als dass sich die Existenz eines Tumors positiv, d.h. überlebensverlängernd auf das Herztransplantat auswirkt. Die Tiere der Kontrollgruppe zeigten ein Transplantatüberleben bis zu Tag 16 nach Operation (verglichen mit maximal Tag 11 ohne Tumor), wobei alle bei noch schlagendem Herzen aufgrund der Komplikationen des Tumorwachstums euthanasiert wurden. Ähnlich verhielt es sich mit den Tieren der Cyclosporin-A-Gruppe, bei denen nur bei einem Versuchstier die Abstoßung des Transplantates das Versuchsende bedeutete. Unter Behandlung mit Rapamycin zeigte sich sogar ein 100%iges Transplantatüberleben bis zum geplanten Ende des Versuchs.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine tumorspezifische Suppression des Immunsystems durch bestimmte Merkmale oder Botenstoffe der Tumorzellen. Durch die Präsentation von Antigenen an den Tumorzellen könnte ein Milieu geschaffen werden, das eine Toleranz gegenüber Transplantat-Antigenen zur Folge hat und die T-Zell-Antwort verhindert [78]. Einige Tumorzellen sind dafür bekannt, dass sie Cytokine wie z.B. Interleukin-10 (IL-10) produzieren, das im Verdacht steht, eine direkte Stimulation der

Zellproliferation, verstärkte Angiogenese und besonders eine Suppression des Immunsystems zu induzieren [79]. Zusätzlich zur gestörten T-Zell-Proliferation soll IL-10 die Ausbreitung von T-Helferzellen sowie die Ausreifung von dendritischen Zellen und damit die Immunantwort auf die Tumorzellen hemmen [80]. In gleicher Weise soll VEGF, welches von den auch in dieser Studie verwendeten CT26-Zellen verstärkt exprimiert wird, ebenfalls die Ausreifung der dendritischen Zellen hemmen [50]. Neben diesen Effekten ist jedoch mit wesentlich komplexeren Vorgängen zu rechnen, die weitere und tiefere Untersuchungen erfordern, was aber nicht Ziel dieser Arbeit war.

Besonders erwähnenswert ist zudem die Beobachtung, dass nicht nur die Transplantate eine verlängerte Kontraktionsdauer zeigten, die Behandlung mit den Immunsuppressiva resultierte allgemein in einem verlängerten Überleben der Mäuse, im Falle des Cyclosporin A sogar bei deutlich erhöhter Tumorlast, aber deutlich geringerer Tumorkachexie im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Behandlung mit diesen Immunsuppressiva zu einer Verbesserung des Allgemeinbefindens bzw. einer subjektiven Symptomlinderung führt, die schlussendlich zu einer gewissen Kompensation der Tumorbeschwerden beiträgt und somit das Überleben verlängert. Dazu passend konnte in Studien mit einem Cyclooxygenase-2-Inhibitor (Celecoxib) gezeigt werden, dass die Hemmung der Entzündung, die ja auch durch Immunsuppressiva stattfindet, zu einer Verringerung der Tumorkachexie (insbesondere auch bei CT26 Tumoren) und zu einer Überlebensverlängerung führte (persönliche Mitteilung Dr. Koehl, Uni Regensburg).

#### ***4.6 Schlussfolgerung***

In dieser Studie zeigte sich, dass Immunsuppressiva neben der erwarteten transplantatprotektiven Wirkung auch das Tumorwachstum von etablierten Tumoren positiv bzw. negativ beeinflussen können. Rapamycin zeigte hier in einem kombinierten Tumor-Transplantationsmodell eine verlängernde Wirkung auf das Transplantatüberleben und hatte zudem, in direktem Gegensatz zu dem etablierten Cyclosporin A, eine deutliche tumorinhibitorische Komponente. Da die Neuentstehungen und Rezidive eines Tumors eine der bedeutendsten Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie sind, eröffnet Rapamycin eine interessante Therapieoption bei Patienten, die entweder einem hohen Risiko eines Tumorrezidivs ausgesetzt sind oder bei denen nach einer Transplantation ein neuer Tumor diagnostiziert wurde.

## 5 Zusammenfassung

### 1. Einleitung:

In der Transplantationsmedizin ist eine Suppression des Immunsystems zur Verhinderung der Transplantatabstoßung unumgänglich. Doch neben der erhöhten Infektanfälligkeit ist ein gesteigertes Risiko der „de novo-“ sowie der Rezidivtumor Erkrankung (bis zu 500-fach erhöht) ein ernsthaftes Problem. Dem Immunsuppressivum Rapamycin wird in neueren Studien eine antiproliferative und antiangiogene Wirkung bescheinigt, die dieses Problem lösen könnte. Bisher wurden die Effekte von Immunsuppressiva auf Immunsystem und Tumoren separat untersucht. In dieser Studie, die die klinische Situation von Transplantationen in Kombination mit einer Tumorerkrankung simulieren soll, wird Rapamycin im Vergleich zum etablierten Cyclosporin A in einem kombinierten Tumor-Transplantations-Modell an Mäusen auf die gleichzeitige Wirkung bezüglich Transplantatabstoßung und Tumorwachstum getestet.

### 2. Material und Methoden:

Die Versuchstiere wurden 7 Tage nach subkutaner Applikation syngener CT26-Kolonkarzinomzellen randomisiert und in Behandlungsgruppen mit verschiedenen Dosierungen von Cyclosporin A (40 mg/kgKG/d), Rapamycin (1,5 und 4,5 mg/kgKG/d) und als Kontrollgruppe mit NaCl 0,9% aufgeteilt. Am Tag 7 führten wir eine „Ear-heart“-Transplantation (C<sub>3</sub>H zu Balb/c) durch und begannen mit der medikamentösen Therapie. Anschließend wurden die Tiere für maximal 4 Wochen bezüglich Transplantatüberleben und Tumorwachstum beobachtet.

### **3. Ergebnisse:**

In der Kontrollgruppe waren bei allen Tieren (7/7) die Tumorkomplikationen ca. 17 Tage nach Transplantation der limitierende Faktor bei noch schlagenden Herzen, wobei hier der Tumor selbst eine gewisse, immunsuppressive Wirkung gehabt haben muss. Unter Rapamycin zeigten sich bis zum Ende des Versuchs funktionell intakte, schlagende Herz-Transplantate und ein reduziertes Tumorwachstum (277 vs. 348 mm<sup>3</sup> Kontrolle, d 15) bei allen 6 Mäusen. Im Gegensatz dazu erlagen die Tiere (7/7) unter Cyclosporintherapie nach durchschnittlich 23 Tagen ( $\pm 2,8$ ) der deutlich höheren Tumorlast (545 vs. 348 mm<sup>3</sup>, d 15) bei noch vitalen Transplantaten.

### **4. Schlussfolgerung:**

In dieser tierexperimentellen Studie konnten wir bestätigen, dass CsA zwar eine potente immunsuppressive, abstossungsprotektive Wirkung auf transplantierte Organe hat, ein bestehender Tumor in seinem Wachstum aber eher gefördert wird. In direktem Gegensatz dazu zeigte sich, dass Rapamycin in normalen immunsuppressiven Dosierungen Transplantate vor der Abstoßung schützen und gleichzeitig einen bestehenden Tumor angreifen kann. Zwar konnten die Tumore mit Rapa nicht eliminiert werden, was auch nicht zu erwarten war, aber als potentes, transplantatprotektives Immunsuppressivum mit zusätzlicher Wirkung gegen Tumore könnte es in Kombination mit einer „konventionellen“ antineoplastischen Chemotherapie einen immensen Fortschritt in der Transplantationsmedizin darstellen und das Dilemma der Tumorbehandlung bei Transplantationspatienten verringern.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Penn, I.** Occurrence of Cancers in Immunosuppressed Organ Transplant Recipients. *Clinical Transplants*; 147-158; 1998
2. **Rinaldi M, Pellegrini C, D'Armini AM, Aiello M, Negri M, Arbustini E, Ippoliti G, Viganò M.** Neoplastic disease after heart transplantation: single center experience. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* **19**; 696-701; 2001
3. **Meyer CG, Penn I, James L.** Liver transplantation for cholangiocarcinoma: results in 207 patients. *Transplantation* **69**; 1633-1637; 2000
4. **Garver RI, Zorn GL, Wu X, McGiffin DC, Young KR Jr., Pinkard NB.** Recurrence of bronchioloalveolar carcinoma in transplanted lungs. *New England Journal of Medicine* **340**; 1071-1074; 1999
5. **Sheil AGR, Disney APS, Mathew TH, Amiss N.** De novo malignancy emerges as a major cause of morbidity and late failure in renal transplantation. *Transplantations Proceedings* **25**; 1383;1993
6. **Jain A, DiMartini A, Kashyap R, Youk A, Rohal S, Fung J.** Long-term follow-up after liver transplantation for alcoholic liver disease under Tacrolimus. *Transplantation* **70**; 1335-1342; 2000
7. **Gallo P, Agozzino L, Angelini A, Arbustini E, Bartoloni G, Bernucci P, Bonacina E, Bosman C, Catani G, di Gioia C, Giordana C, Leone O, Motta T, Pucci A, Rocco M.** Causes of late failure after heart transplantation : a ten-year survey. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **16**; 1113; 1997

8. **Fung JJ, Jain A, Kwak EJ, Kusne S, Dvorchik I, Eghtesad B.** De novo malignancies after liver transplantation: A major cause of late death. *Liver Transplantation* **7**; S109-S118; 2001
9. **Buell JF, Gross TG, Woodle ES.** Malignancy after Transplantation. *Transplantation* **80**; S254-S264; 2005
10. **Euvrard S, Ulrich C, Lefrancois N.** Immunosuppressants and skin cancer in transplant patients: focus on rapamycin. *Dermatologic Surgery* **30**; 628-633, 2004
11. **Ramsay HM, Fryer AA, Hawley CM, Smith AG, Harden PN.** Non-melanoma skin cancer risk in the Queensland renal transplant population. *British Journal of Dermatology* **147**; 950; 2002
12. **Bordea C, Wojnarowska F, Millard PR Doll H, Welsh K, Morris PJ.** Skin cancer in renal-transplant recipients occur more frequently than previously recognized in a temperate climate. *Transplantation* **77**; 574-579; 2004
13. **Haberal M, Karakayali H, Emiroglu R Basaran O, Moray G, Bilgin N.** Malignant tumors after renal transplantation. *Artificial Organs* **26**; 778-781; 2002
14. **Hoshida Y, Aozasa K.** Malignancies in organ transplant recipients. *Pathology International* **54**; 649-658; 2004
15. **Penn I.** Tumors after renal and cardiac transplantation. *Hematology / Oncology clinics of North America* **7**; 431-45;1993

16. **Buell J, Hanaway M, Thomas M**, et al. Malignancies associated with liver transplantation. In: Busuttil RW, Klintmalm GB, et al. Transplantation of the liver. Philadelphia: W.B. Saunders, 2004
17. **Buell J, Gross T, Beebe T**, et al. Cancer after renal transplantation. In : Cohen EP et al. Cancer and the kidney. New York City: Oxford University Press, 2004
18. **Sheiner PA, Magliocca JF, Bodian CA, Kim-Schluger L, Altaca G, Guarrera JV, Emre S, Fishbein TM, Guy SR, Schwartz ME, Miller CM**. Long-term medical complications in patients surviving  $\geq 5$  years after liver transplant. *Transplantation* **69**; 781-789; 2000
19. **Gaston RS, Alveranga DY, Becker BN, Distant DA, Held PJ, Bragg-Gresham JL, Humar A, Ting A, Wynn JJ, Leichtman AB**. Kidney and pancreas transplantation. *American Journal of Transplantation* **3** (suppl. 4); 64-77; 2003
20. **Geissler EK, Schlitt HJ**. The relation between immunosuppressive agents and malignancy. *Current Opinion in Organ Transplantation* **9**; 394-399; 2004
21. **Penn I**. Cancers in Renal Transplant Recipients. *Advances in Renal Replacement Therapy* **7**; 147-156; 2000
22. **Chu SH, Lai MK, Huang CC, Chuang CK, Chen HW, Chen CS**. Prognosis of posttransplant lymphomas in patients treated with Cyclosporine, Azathioprine and Prednisolone. *Transplantation Proceedings* **26**; 1981-1982; 1994



23. **Johnson RWG, Kreis H, Oberbauer R, Brattström C, Claesson K, Eris J.** Sirolimus allows early cyclosporine withdrawal in renal transplantation resulting in improved renal function and lower blood pressure. *Transplantation* **72**; 777-786; 2001
24. **Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D, Giral M, Blancho G, Dreno B, Soullillon JP.** Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two Cyclosporin regimens. *Lancet* **351**; 623-628; 1998
25. **Burnet FM.** The concept of immunological surveillance. *Progress in experimental Tumor Research* **13**; 1-27; 1970
26. **Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old JL, Schreiber RD.** IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumor development and shape tumor immunogenicity. *Nature* **410**; 1107-1111, 2001
27. **Herman M, Weinstein T, Korzets A, Chagnac A, Ori Y, Zevin D, Malachi T, Gafter U.** Effect of cyclosporin A on DNA repair and cancer incidence in kidney transplant recipients. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **137**; 14-20; 2001
28. **Freise CE, Ferrell L, Liu T, Ascher NL, Roberts JP.** Effect Of Systemic Cyclosporine On Tumor Recurrence After Liver Transplantation In A Model Of Hepatocellular Carcinoma. *Transplantation* **67**; 510-513; 1999
29. **Hojo M, Morimoto t, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, Shimbo T, Suthanthiran M.** Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* **397**; 530-534; 1999

30. **Marcil I, Stern RS.** Squamous-cell cancer of the skin in patients given PUVA and Cyclosporin: nested cohort crossover study. *Lancet* **358**; 1042-1045; 2001
31. **Friedlaender MM, Rubinger D, Rosenbaum E, Amir G, Siguencia E.** Temporary regression of Merkel cell carcinoma metastase after cessation of cyclosporine. *Transplantation* **73**; 1849-1850; 2002
32. **Hussein MM, Mooij JM, Roujouleh HM.** Regression of post-transplant Kaposi sarcoma after discontinuing cyclosporin and giving mycophenolate mofetil instead. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* **15**; 1103-1104; 2000
33. **Ogata M, Kikuchi H, Ono K Ohtsuka E, Gamachi A, Kashima K, Nasu M.** Spontaneous regression of Epstein-Barr-virus-negative Non-Hodgkin-Lymphoma after withdrawal of cyclosporine in a patient with refractory anemia. *International Journal of Hematology* **2**; 164; 2004
34. **Beveridge T, Krupp P, McKibbin C.** Lymphomas and lymphoproliferative lesions developing under cyclosporine therapy. *Lancet* **323**; 788; 1984
35. **Swann PF, Waters TR, Moulton DC Xu YZ, Zheng Q, Edwards M, Mace R.** Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science* **273**; 1109-1111; 1996
36. **Penn I, Hammond W, Brettschneider L Starzl TE.** Malignant lymphomas in transplantation patients. *Transplantation Proceedings* **1**; 106-112; 1969

37. **Bottomly WW, Ford G, Cunliffe WJ Cotterill JA.** Aggressive squamous cell carcinomas developing in patients receiving long-term azathioprine. *British Journal of Haematology* **133**; 460-462; 1995
38. **Lewis P, Hazleman BL, Hanka R Roberts S.** Cause of death in patients with rheumatoid arthritis with particular reference to azathioprine. *Annals of the Rheumatic Diseases* **39**; 457-461; 1980
39. **Scharf J, Nahir M, Eidelman S, Jacobs R, Levin D.** Carcinoma of the bladder with azathioprine therapy. *Journal of the American Medical Association* **237**; 152; 1997
40. **Krutchik AN, Buzdar AU, Tashima CK.** Azathioprine and breast carcinoma. *Journal of the American Medical Association* **239**; 107; 1978
41. **Schneck SA, Penn I.** De-novo brain tumors in renal transplant recipients. *Lancet* **1**; 983; 1971
42. **Mc Geown MG, Douglas JF, Middleton D.** One thousand renal transplants at Belfast City Hospital: post-graft neoplasia 1968-1999, comparing azathioprine only with cyclosporine-based regimes in a single centre. *Clinical Transplants*; 193; 2000
43. **Funch D, Ko H, Travasso J, Mechlowicz J, Walker A.** Association between mycophenolate mofetil and development of post-transplant lymphoproliferative disorder in renal transplant patients in the US (Abstract). *American Journal of Transplantation* **3**; 348; 2003

44. **Robson R.** Risk of PTLD & other malignancies in renal transplant patients treated with MMF: a prospective observational cohort study (Abstract). *Präsentiert auf dem American Transplant Congress; Washington DC; 31.05.-01.06.2003*
45. **Guba M, Graeb C, Jauch KW.** Pro- and anti-cancer effects of immunosuppressive agents used in organ transplantation. *Transplantation* **77**; 1777-1782; 2004
46. **Koehl GE, Gaumann A, Zuelke C, Hoehn A, Hofstaedter F, Schlitt HJ, Geissler EK.** Development of de novo cancer in p53 knock-out mice is dependent on the type of long-term immunosuppression used. *Transplantation* **82**; 741-748; 2006
47. **Walker SE, Anver MR, Schechter SL, Bole GG.** Prolonged lifespan and high incidence of neoplasms in NZB/NZW mice treated with hydrocortisone sodium succinate. *Kidney International* **14**;151-157; 1978
48. **Trattner A, Hodak E, David M, Sandbank M.** The appearance of Kaposi sarcoma during corticosteroid therapy. *Cancer* **72**; 1779-1783; 1993
49. **Sorensen HT, Mellekjaer L, Nielsen GL, Baron JA, Olsen JH, Karagas MR.** Skin cancers and Non-Hodgkin lymphoma among users of system glucocorticoids: a population-based cohort study. *Journal of the National Cancer Institute* **96**; 709-711; 2004
50. **Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK.** Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature Medicine*; **8**; 128-135; 2002

51. **Luan FL, Hojo M, Maluccio M, Yamaji K, Suthanthiran M.** Rapamycin blocks tumor progression: unlinking immunosuppression from antitumor efficacy. *Transplantation* **73**; 1565-1572; 2002
52. **www.Wyeth.com**
53. **Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML.** Rapamycin in transplantation: A review of the evidence. *Kidney International* **59**; 3-16; 2001
54. **Sacks SH.** Rapamycin on trial. *Nephrology Dialysis Transplantation* **14**; 2087-2089; 1999
55. **Huang S, Houghton PJ.** Resistance to Rapamycin: A novel anticancer drug. *Cancer and Metastasis Reviews* **20**; 69-78; 2001
56. **Sehgal SN.** Rapamune<sup>®</sup> (Rapa, Rapamycin, Sirolimus): Mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clinical Biochemistry* **31**; 335-340; 1998
57. **Gregory CR, Pratt RE, Huie P, Shorthouse R, Dzau VJ, Billingham ME, Morris RE.** Effects of treatment with Cyclosporin, FK 506, Rapamycin, mycophenolic acid, or deoxyspergualin on vascular muscle proliferation in vitro and in vivo. *Transplantation Proceedings* **25**; 770-771; 1993
58. **Humar R, Kiefer FN, Berns H, Resink TJ, Battegay EJ.** Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR) - dependent signaling. *The FASEB Journal* **16**; 771-780; 2002

59. **Koehl GE, Schlitt HJ, Geissler EK.** Rapamycin and tumor growth: mechanisms behind its anticancer activity. *Transplantation Reviews* **19**; 20-31; 2005
60. **Guba M, Yezhelyev M, Eichhorn ME, Schmid G, Ischenko I, Papyan A, Graeb C, Seeliger H, Geissler EK, Jauch KW, Bruns CJ.** Rapamycin induces tumor-specific thrombosis via tissue factor in the presence of VEGF. *Blood* **105**; 4463-4469; 2005
61. **Trotter JF.** Sirolimus in liver transplantation. *Transplantation Proceedings* **35**; S193-S200; 2003
62. **Fortin MC, Raymond MA, Madore F, Fugère JA, Pâquet M, St-Louis G, Hèbert MJ.** Increased risk of thrombotic microangiopathy in patients receiving a cyclosporin-sirolimus combination. *American Journal of Transplantation* **4**; 649-652; 2004
63. **Paramesh AS, Grosskreutz C, Florman SS, Gondolesi GE, Sharma S, Kaufman SS, Fishbein TM.** Thrombotic microangiopathy associated with combined sirolimus and tacrolimus immunosuppression after intestinal transplantation. *Transplantation* **77**; 129-131; 2004
64. **Barone GW, Gurley BJ, Abul-Ezz SR, Gökden N.** Sirolimus-induced thrombotic microangiopathy in a renal transplant recipient. *American Journal of Kidney Diseases* **42**; 202-206; 2003
65. **Robson M, Cote I, Abbs I, Koffman G, Goldsmith D.** Thrombotic micro-angiopathy with sirolimus-based immunosuppression: potentiation of calcineurin-inhibitor-induced endothelial damage?. *American Journal of Transplantation* **3**; 324-327; 2003

66. **Fey TA, Krause RA, Hsieh GC, Andrews JM, Bretheim PT, Morgan SJ, Luly JR, Mollison KW.** Improved Methods for Transplanting Split-heart Neonatal Cardiac Grafts Into the Ear Pinna of Mice and Rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **39**; 9-17; 1998
67. **Brattain MG, Strobel-Stevens J, Fine D, Webb M, Sarrif AM.** Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties. *Cancer Research* **40**; 2142-2146; 1980
68. **Wilkinson AH, Smith JL, Hunsicker LG, Tobacman J, Kapelanski D, Johnson M, Wright FH, Behrendt DM, Corry RJ.** Increased frequency of posttransplant lymphomas in patients treated with cyclosporine, azathioprine and prednisone. *Transplantation* **47**; 293-296; 1989
69. **Koehl GE, Andrassy J, Guba M, Richter S, Kroemer A, Scherer MC, Steinbauer M, Graeb C, Jauch KW, Geissler EK.** Rapamycin protects allografts from rejection while simultaneously attacking tumors in immunosuppressed mice. *Transplantation* **77**; 1319-1326; 2004
70. **King-Biggs MB, Dunitz JM, Park SJ, Savik SK, Hertz MI.** Airway anastomotic dehiscence associated with use of Sirolimus immediately after lung transplantation. *Transplantation* **75**; 1437-1443; 2003
71. **Koehl G, Guba M, Seeliger H, Steinbauer M, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK.** Rapamycin treatment at immunosuppressive doses affects tumor blood vessel circulation. *Transplantation Proceedings* **35**; 2135-2136; 2003

72. **Hausmann MR, Schaffler MB, Majeska RJ.** Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* **29**; 560-564; 2001
73. **Grewe M, Gansauge F, Schmid RM, Adler G, Seufferlein T.** Regulation of cell growth and cyclin D1 expression by the constitutively active FRAP-p70<sup>s6K</sup> pathway in human pancreatic cancer cells. *Cancer Research* **59**; 3581-3587; 1999
74. **Seeliger H, Guba M, Koehl GE, Doenecke A, Steinbauer M, Bruns CJ, Wagner C, Frank E, Jauch KW, Geissler EK.** Blockage of 2-Deoxy-D-Ribose-induced angiogenesis with rapamycin counteracts a thymidine phosphorylase-based escape mechanism available for colon cancer under 5-fluorouracil therapy. *Clinical Cancer Research* **10**; 1843-1852; 2004
75. **Eng CP, Sehgal SN, Vezina C.** Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *The Journal of Antibiotics* **37**; 1231-1237; 1984
76. **Bruns CJ, Koehl GE, Guba M, Yezhelyev M, Steinbauer M, Seeliger H, Schwend A, Hoehn A, Jauch KW, Geissler EK.** Rapamycin-induced endothelial cell death and tumor vessel thrombosis potentiate cytotoxic therapy against pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research* **10**; 2109-2119; 2004
77. **Guba M, Cernaianu G, Koehl G, Geissler EK, Jauch KW, Anthuber M, Falk W, Steinbauer M.** A primary tumor promotes dormancy of solitary tumor cells before inhibiting angiogenesis. *Cancer Research* **61**; 5575-5579; 2001
78. **Thomson AW, Lu L.** Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance? *Immunology Today* **20**; 27-32; 1999



79. **Garcia-Hernandez ML, Hernandez-Pando R, Gariglio P, Berumen J.** Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation. *Immunology* **105**; 231-243; 2002
80. **Lee WC, Qiani S, Wan Y, Li W, Xing Z, Gauldie J, Fung JJ, Thomson AW, Lu L.** Contrasting effects of myeloid dendritic cells transduced with an adenoviral vector encoding interleukin-10 on organ allograft and tumor rejection. *Immunology* **1001**; 233-241; 2000
81. **Koehl GE, Wagner F, Stoeltzing O, Lang SA, Steinbauer M, Schlitt HJ, Geissler EK.** Mycophenolate Mofetil Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis In Vitro but Has Variable Antitumor Effects In Vivo, Possibly Related to Bioavailability. *Transplantation* **83(5)**, 607-614; 2007
82. **Roymans D, Slegers H.** Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *European Journal of Biochemistry* **268**; 487-498; 2001
83. **Sansal I, Seller WR.** The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *Journal of Clinical Oncology* **22**; 2954-2963; 2004
84. **Panwalkar A, Verstovsek S, Giles FJ.** Mammalian target of rapamycin inhibition as therapy for hematologic malignancies. *Cancer* **100**; 657-666; 2004
85. **Hay N, Sonenberg N.** Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development* **18**; 1926-1945; 2004
86. **Gingras AC, Raught B, Sonenberg N.** Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes & Development* **15**; 807-827; 2001

87. **Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL.** Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Research* **60**; 1541-1545; 2000
88. **Carmeliet P., Jain RK.** Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**; 249-257; 2000
89. **Ferrara N.** The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Research and Treatment* **36**; 127-137; 1995

## Danksagung

Herrn Prof. Edward K. Geissler, Ph.D., danke ich für die hervorragende und stets freundliche Unterstützung und Supervision bei dieser Promotionsarbeit, insbesondere die Anleitung und Überwachung der Operationen sowie die ständige Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Gudrun Koehl, dass sie mich in die Forschungsgruppe aufgenommen hat, für die intensive wissenschaftliche Betreuung bei der Planung und Durchführung der Experimente, insbesondere auch der Operationen und der Überwachung der tumortragenden Tiere und für das Korrekturlesen der Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Marcus Scherer danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, die hilfreiche Betreuung während der Doktorarbeit und für die konstruktiven Diskussionen beim Aufarbeiten der Daten und Verfassen der Arbeit.

Desweiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die Hilfe bei den labortechnischen Grundlagen, das Überlassen der Zellkulturen und die nette Zusammenarbeit bei den Versuchsreihen bedanken, insbesondere bei Frau Erika Frank, Frau Anna Höhn, Fr. Stefanie Richter und Frau Dr. Koehl für die Kultur der CT26-Zellen.

Für die private Unterstützung, Liebe und Inspiration danke ich ganz besonders meiner Frau Steff.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Eltern, die mich Zeit meines Lebens liebevoll unterstützt und mir das Studium erst ermöglicht haben.

## Lebenslauf

### **Sebastian Richter**

**Geburtsdatum** 10.12.1975  
**Geburtsort** Braunschweig  
**Familienstand** verheiratet mit Fr. Stefanie Richter, geb. Flegel

### **Schulbildung:**

1982-1986 Grundschule Unsernherrn  
1986-1995 Apian Gymnasium Ingolstadt; Abitur

### **Zivildienst:**

1995-1996 Klinikum Ingolstadt, Stat. 49a

### **Akademische Ausbildung:**

November 1996 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Regensburg  
März 1999 Ärztliche Vorprüfung  
März 2000 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
September 2002 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
Oktober 2003 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### **Praktisches Jahr:**

Oktober 2002 Department of General Surgery, Cecilia Makiwane Hospital,  
Universität Kapstadt, Südafrika  
Februar 2003 Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinik Regensburg  
Juni 2003 Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Universitätsklinik  
Regensburg

### **Beruflicher Werdegang:**

seit Januar 2004 Assistenzarzt an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin,  
Zentralklinikum Augsburg