

---

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln  
Klinik I für Innere Medizin  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Michael Hallek

**Serum Angiopoietin-2 als prognostischer und prädiktiver Faktor  
in der Therapie des kolorektalen Karzinoms**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Janina Lara Neuneier  
aus Köln

Promoviert am 04. Mai 2011

---

---

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln im Jahr 2011.

---

---

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Thomas Krieg

1. Berichterstatterin/Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. Ulrich T. Hacker
2. Berichterstatterin/Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. Arnulf H. Hölscher
- (3. Berichterstatterin/Berichterstatter:)

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Privatdozent Dr. med. Ulrich T. Hacker  
Dr. med. Valentin Goede

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertation wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, 16.12.2010

---

---

---

---

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Privatdozent Dr. med. Ulrich T. Hacker und Herrn Dr. med. Valentin Goede von mir selbst ausgeführt worden.

Die studienbezogenen Daten wurden von mir zusammengetragen und ausgewertet.

---

---

---

---

Danksagung:

Ich möchte mich bei Herrn Privatdozent Dr. med. Ulrich T. Hacker für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas dieser Arbeit bedanken. Besonders angenehm war die über die gesamte Zeit hervorragende und engagierte Betreuung. Die anregenden Diskussionen empfand ich stets als motivierend, hilfreich und zielführend. Seine Unterstützung bot mir über den gesamten Zeitraum einen für mich sehr wichtigen positiven Rückhalt.

Weiterhin danke ich ganz herzlich Herrn Dr. med. Valentin Goede für die unverzichtbaren Beratungen und Hilfestellungen in allen Phasen dieser Arbeit. Sowohl in der Planung und Durchführung, als auch bei der Auswertung der Untersuchungen leistete er durch seine fachliche Kompetenz und seine konstruktiven Vorschläge einen wertvollen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit. Vor allem in schwierigen Situationen haben mir seine anspornende Begleitung und sein moralischer Beistand sehr geholfen.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mit liebevoller Unterstützung immer zur Seite stehen.

---

---

---

---

Meinen Eltern

---

---

---

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>0</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1	Kolorektales Karzinom .....	5
1.1.1	Wirkung von Bevacizumab.....	9
1.1.2	Prädiktion der Wirksamkeit einer Bevacizumab-haltigen Therapie.....	13
1.1.2.1	Vaskularisierungsdichte als Biomarker einer Bevacizumab-haltigen Therapie .....	16
1.1.2.2	Blutgefäßmaturität als Biomarker einer Bevacizumab- haltigen Therapie.....	16
1.1.2.3	VEGF als Biomarker einer Bevacizumab-haltigen Therapie .....	18
1.1.2.4	Angiopoietin-2 als Biomarker einer Bevacizumab- haltigen Therapie.....	18
1.2	Fragestellung und Zielsetzung.....	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
2.1	Patientenkollektive .....	23
2.2	Material .....	27
2.2.1	Reagenzien.....	27
2.2.2	Geräte.....	29
2.2.3	Gewebeproben .....	29
2.2.4	Blutproben.....	29
2.3	Methoden.....	30
2.3.1	Vorbehandlung von Schnittpräparaten.....	30
2.3.2	Immunhistochemische Einfachfärbungen .....	30
2.3.3	Immunhistochemische Doppelfärbung .....	31
2.3.4	Analyse der Blutproben mittels ELISA .....	32
2.4	Auswertung.....	33
2.4.1	Quantitative mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen .....	33
2.4.2	Auswertung der ELISAs .....	34
2.4.3	Statistik .....	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
3.1	Patientenkollektiv-Charakteristika .....	35
3.2	Histopathologische Biomarker .....	38
3.2.1	Vaskularisierungsdichte (MVD).....	38
3.2.2	Blutgefäßmaturität (MVM).....	40
3.3	Serum Biomarker .....	42
3.3.1	VEGF .....	42
3.3.2	Angiopoietin-2 .....	44
3.4	Gesamtüberleben .....	47

---

---

3.5	Progressionsfreies Überleben.....	50
3.6	Ansprechen auf die Therapie .....	53
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>57</b>
4.1	Histopathologische Biomarker .....	58
4.1.1	Vaskularisierungsdichte (MVD).....	58
4.1.2	Blutgefäßmaturität (MVM).....	60
4.2	Serum Biomarker .....	62
4.2.1	VEGF .....	62
4.2.2	Angiopoietin-2 .....	64
4.3	Korrelation der untersuchten Faktoren.....	69
4.4	Ausblick .....	70
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>Vorabveröffentlichung.....</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>83</b>

---

---

---

---

---

---

## 0 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -Smooth Muscle Cell Actin
AEC	Aminoethylcarbazol
Ang-1/-2	Angiopoietin-1/-2
BV	Bevacizumab (Avastin®)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CT	Computertomographie
ca.	circa
CAP	Capecitabin
CAPIRI	Capecitabin – Irinotecan (=XELIRI)
CAPOX	Capecitabin – Oxaliplatin (=XELOX)
DAB	Diaminobenzidin
dest.	destilliert
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FOLFIRI	Folinsäure – 5-Fluorouracil - Irinotecan
FOLFOX	Folinsäure – 5-Fluorouracil - Oxaliplatin
g (mg, $\mu$ g)	Gramm (Milligramm, Mikrogramm)
h	Stunde
HPF	high power field (Gesichtsfeld)
IFL	Irinotecan – Bolus 5-Fluorouracil - Folinsäure
Ig	Immunglobulin
KRK	kolorektales Karzinom
l (ml, $\mu$ l)	Liter (Milliliter, Mikroliter)
LV	Leukovorin (Folinsäure)
M (mM)	Mol (Millimol)
m ( $\mu$ m, nm)	Meter (Mikrometer, Nanometer)
min	Minute
mRNA	messenger RNA (ribonucleic acid = Ribonukleinsäure)
MRT	Magnetresonanztomographie
MVD	Microvessel Density (Vaskularisierungsdichte)
MVM	Microvessel Maturity (Blutgefäßmaturität)
NBT	Nitroblautetrazolium
OS	overall survival (Gesamtüberleben)

---

---

PBS	phosphate buffered saline
PDGF- $\beta$	Platelet-derived Growth Factor $\beta$
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFS	progression-free survival (progressionsfreies Überleben)
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction (quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
Tie-2	Tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains 2
THBS2	Thrombospondin-2
TNM	Tumor-Nodus-Metastasen
UICC	Union internationale contre le cancer = International Union against Cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-1/-2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1/-2
vSMCs	Vascular Smooth Muscle Cells
XELIRI	Capecitabin – Irinotecan (=CAPIRI)
XELOX	Capecitabin – Oxaliplatin (=CAPOX)
z. B.	zum Beispiel
5-FU	5-Fluorouracil

---





# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Kolorektales Karzinom

Das kolorektale Karzinom (KRK) zählt zu den häufigsten malignen Tumoren der westlichen Welt. In Deutschland liegt es bei Männern an zweiter, bei Frauen an dritter Stelle der häufigsten Krebserkrankungen. Die Inzidenz stieg in den letzten Jahren stetig an und liegt nun bei ca. 25 pro 100.000 Einwohner. Nach den bösartigen Neubildungen der Bronchien und der Lunge stellt das kolorektale Karzinom die zweithäufigste Krebstodesursache dar. Im Jahr 2009 stand es mit zwei Prozent an neunter Stelle aller Todesursachen in Deutschland. (Statistisches Bundesamt 2009)

Wird die Diagnose frühzeitig, das heißt vor dem Auftreten von Fernmetastasen gestellt, ist die Prognose günstig. Eine vollständige Heilung ist beim Kolonkarzinom durch eine komplette Resektion des Tumors und eine adjuvante Chemotherapie in Abhängigkeit vom Stadium möglich. Eine deutlich schlechtere Prognose haben Patienten mit fortgeschrittener, metastasierter Erkrankung. Trotz chirurgischer Intervention und anschließender Chemotherapie liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nur bei etwa 10%. (Renz-Polster et al. 2006; Siewert 2006)

Die Chemotherapie spielt in der Behandlung des kolorektalen Karzinoms neben der operativen Entfernung des Tumors eine entscheidende Rolle. Sie wird sowohl in kurativer als auch in palliativer Intention eingesetzt. Dabei erfolgt die Gabe der Chemotherapie entweder vor einer geplanten Operation mit dem Ziel der Tumorverkleinerung neoadjuvant, wie z. B. beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom in Kombination mit einer Bestrahlung oder bei Lebermetastasen zum Erreichen einer sekundären Resektabilität bei primär inoperablen Metastasen, oder im Anschluss an die operative Entfernung des Tumors mit dem Ziel der Zerstörung verbliebener maligner Zellen in der adjuvanten Situation, wie beim Kolonkarzinom mit Befall von Lymphknoten. Darüber hinaus ist heute eine systemische Chemotherapie als palliativer Therapieansatz bei inoperablen Karzinomen als Standard anzusehen, nachdem die Wirksamkeit in Bezug auf die Symptomenkontrolle und die Verlängerung der Überlebenszeit gezeigt werden konnte. So konnten in den vergangenen 50 Jahren eine Reihe wirkungsvoller Medikamente zur Therapie des kolorektalen Karzinoms etabliert werden.

Schon seit den 50er Jahren wird 5-Fluorouracil (5-FU) bei der Behandlung von Patienten mit kolorektalem Karzinom angewendet und wird bis heute dort genutzt. Es handelt sich um einen Antimetaboliten, welcher bei der Zellteilung in die DNA bzw. RNA eingebaut wird und diese so funktionsuntüchtig macht. Zusätzlich wird die DNA-Synthese über eine Hemmung des Enzyms Thymidilat-Synthase unterbrochen. Die Behandlung

---

---

mit 5-FU führt zu einer medianen Überlebenszeit von 9-11 Monaten bei einer Ansprechrate von nur 10%. (Wilke et al. 2003)

Mitte der 80er Jahre wurde der Biomodulator Leukovorin (LV) (oder Folinsäure) entwickelt, welcher seitdem in einer festen Kombination mit 5-FU verwendet wird. Leukovorin hemmt durch einen ähnlichen Wirkmechanismus ebenfalls die DNA-Synthese und zeigt somit eine synergistische Wirkung zum 5-Fluorouracil, welche die Zytotoxizität verstärkt. (Schneider et al. 2007) Mit einer medianen Überlebenszeit von etwa 12 Monaten stellte die Kombination 5-FU/LV bis in die 90er Jahre hinein den Standard in der Erstlinientherapie des fortgeschrittenen KRK dar. (Goldberg 2005)

Eine Veränderung der Verabreichungsform – weg von der Bolusgabe hin zur Infusionstherapie – war mit einer weiteren Verbesserung der Überlebenszeit auf 14 Monate und der Ansprechrate auf 30% verbunden. (de Gramont et al. 2000)

Ende der 90er Jahre kamen weitere Medikamente auf den Markt, die bei der Chemotherapie des KRK Erfolg zeigten. Dabei handelte es sich zum einen um Irinotecan, einen Topoisomerase-I-Inhibitor. Während der DNA-Synthese verursacht es Doppelstrangbrüche, die irreparabel sind und somit zum Zelltod führen. Zum anderen wurde die Platinverbindung Oxaliplatin in die Behandlung des kolorektalen Karzinoms eingeführt. Die wirksamen Metabolite interagieren mit der DNA der Zellen und bilden Quervernetzungen zwischen den Doppelsträngen, was zu einer Hemmung der DNA-Synthese führt.

Es etablierten sich feste Kombinationen, die zu einem größeren Therapieerfolg führten. Zunächst wurde im Jahr 2000 in den USA Irinotecan-Bolus-5-FU/LV (IFL) als Erstlinientherapie angewendet und erzielte ein medianes Gesamtüberleben von 14,8 Monaten. Die Bolusgabe des 5-FU ging jedoch mit einer hohen Toxizität einher. (Saltz et al. 2000)

In Europa entstand zeitgleich das Therapieregime FOLFIRI, welches sich ebenfalls aus Folinsäure, 5-Fluorouracil und Irinotecan zusammensetzt. Die Toxizität war hier im Vergleich zur IFL-Kombination mit Bolus-5-FU durch die infusionale Gabe des 5-FU reduziert. Mehrere Studien konnten im Vergleich zur alleinigen Gabe von 5-FU/LV einen signifikanten Anstieg der Ansprechrate auf fast 50 Prozent zeigen. Auch die mittlere Überlebenszeit konnte signifikant von 14,4 bzw. 12,6 Monaten auf 17,4 bzw. 14,8 Monate verlängert werden. (Douillard et al. 2000; Saltz et al. 2000)

Ähnlich gute Ergebnisse lieferte das Therapieregime FOLFOX, eine Kombination aus Folinsäure, 5-Fluorouracil und Oxaliplatin. Dabei entstanden die Varianten FOLFOX-1 bis FOLFOX-7, welche sich durch die Dosierung und den zeitlichen Ablauf der Chemotherapie voneinander unterscheiden. Verschiedene Studien konnten zeigen,

---

dass ebenfalls sowohl die Ansprechrate, als auch die mittlere Überlebenszeit im Vergleich zu 5-FU/LV alleine deutlich höher sind. Bei der Ansprechrate zeigte sich eine signifikante Steigerung von 22 bzw. 23 Prozent auf 51 bzw. 49 Prozent. Die mittlere Überlebenszeit konnte von 14,7 bzw. 16,1 Monaten auf 16,2 bzw. 19,7 Monate verlängert werden. (de Gramont et al. 2000; Grothey et al. 2001).

Sowohl FOLFIRI als auch FOLFOX können das Überleben der behandelten Patienten im Vergleich zu anderen Therapieregimen verlängern und eine Verbesserung der Krankheitskontrolle bewirken. Der Vergleich der beiden Therapieregime miteinander zeigte, dass es hinsichtlich Ansprechrate, Gesamtüberleben der Patienten und damit in der Effektivität keinen Unterschied gibt. Beide Kombinationschemotherapien können gleichwertig als Erstlinientherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms eingesetzt werden. Die Entscheidung zwischen beiden Möglichkeiten muss schließlich aufgrund der zu erwartenden Nebenwirkungen getroffen werden. (Colucci et al. 2005)

Inzwischen wurde Capecitabin als Prodrug des 5-FU zugelassen, welches oral verabreicht werden kann. In der Leber wird es zu dem eigentlichen Wirkstoff konvertiert. Die Effektivität des Wirkstoffes entspricht der des 5-FU. Zwei Therapieregime, welche zur Erstlinientherapie des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms zugelassen sind, basieren auf der Anwendung von Capecitabin. Bei XELOX handelt es sich um die Kombination von Capecitabin mit Oxaliplatin. Ein Vergleich mit FOLFOX erwies die Gleichwertigkeit der Effektivität der beiden Therapieoptionen im Hinblick auf Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben. (Cassidy et al. 2008)

Für die Gabe von Capecitabin und Irinotecan (XELIRI) liegen ebenfalls klinische Daten vor. Das mediane Überleben mit 16 Monaten und die Ansprechrate von 30% sind vergleichbar mit den vorher beschriebenen Therapieregimen. (Patt et al. 2007; Gennatas et al. 2008)

Trotz des enormen Fortschrittes in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms werden vermehrt alternative Therapiemöglichkeiten und weitere Ansatzpunkte gesucht. So soll die Behandlung noch effektiver, gleichzeitig aber auch schonender und verträglicher werden. In den letzten Jahren wird vermehrt auf molekularer Ebene der Tumorentstehung geforscht. Sogenannte Targeted Drugs sollen sehr spezifisch und zielgerichtet in das Tumorwachstum eingreifen ohne dabei physiologische Vorgänge zu stören. Dieser Ansatz verspricht großen Erfolg, da eine beträchtliche Effektivität vorausgesagt wird und gleichzeitig die Nebenwirkungen im Vergleich zu den üblichen Zytostatika geringer ausfallen.

Als erster monoklonaler Antikörper in der Therapie solider Tumore konnte der Angiogenese-Hemmer Bevacizumab in diesem Bereich einen Durchbruch schaffen. Der Antikörper gegen Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) wurde im Februar 2004 für

---

eine Kombinationstherapie mit 5-FU-basierten Therapieregimen für die Behandlung des kolorektalen Karzinoms zugelassen. (Shih et al. 2006) Eine erste große Phase-III-Studie aus dem Jahr 2004 konnte belegen, dass mit der Kombination von Bevacizumab mit Irinotecan, 5-Fluorouracil und Leukovorin (IFL) eine statistisch signifikante und klinisch bedeutsame Verbesserung des Überlebens von Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom erzielt werden kann. Das mediane Gesamtüberleben konnte von 15,6 Monaten bei einer reinen IFL Chemotherapie auf 20,3 Monate beim Hinzufügen von Bevacizumab gesteigert werden. Auch das mediane progressionsfreie Überleben zeigte einen signifikanten Vorteil von Bevacizumab gegenüber dem Placebo und wurde von 6,2 auf 10,6 Monate erhöht. (Hurwitz et al. 2004)

In den folgenden Jahren etablierte sich Bevacizumab in Kombination mit den oben genannten Therapieregimen zum Standard in der Erstlinientherapie. Zahlreiche große Phase-III-Studien belegten die verbesserte Effektivität der Chemotherapie bei einer Kombination mit dem Angiogenese-Inhibitor. Ein verlängertes progressionsfreies Überleben konnte stets gezeigt werden. Eine Verlängerung des Gesamtüberlebens konnte nur in einzelnen Studien bestätigt werden. Die Ansprechrate unterschied sich in neueren Phase-III-Studien nicht zwischen einer Chemotherapie mit oder ohne Bevacizumab. Aufgrund der Gesamtergebnisse und der geringen Toxizität des Medikamentes zählt eine Kombinationschemotherapie mit Bevacizumab heute zur Standardtherapie des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms. (Kabbavar et al. 2003; Cercek et al. 2008; O'Neil et al. 2008; Saltz et al. 2008)

Ein weiterer neuer Ansatz war die Anwendung von Antikörpern gegen den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). Der Rezeptor beeinflusst vielfältige zelluläre Vorgänge wie beispielsweise Wachstum, Proliferation oder Differenzierung durch Vermittlung einer Signaltransduktion nach Interaktion mit den physiologischen Liganden, wie z. B. dem Epidermal Growth Factor (EGF). Auf den Zellen des kolorektalen Karzinoms wird dieser Rezeptor exprimiert und sorgt damit für unkontrolliertes Wachstum der Tumorzellen. Die monoklonalen Antikörper Cetuximab und Panitumumab binden am EGFR und sorgen so für eine gestörte Signaltransduktion und wirken damit antiproliferativ. (Cercek et al. 2008)

Eine der wesentlichen Wirkungen von Cetuximab besteht darin, dass es die Sensitivität gegenüber einer Chemotherapie wiederherstellen kann. Studien zeigten, dass eine Resistenz gegen Irinotecan rückgängig gemacht werden kann. Aufgrund dessen wird die Kombination von Irinotecan und Cetuximab als Zweitlinientherapie des CRC eingesetzt, wenn eine Therapie mit Irinotecan alleine fehlgeschlagen ist. Das Ansprechen der Kombination von Irinotecan plus Cetuximab ist signifikant höher als für Cetuximab alleine. (Cunningham et al. 2004) Eine große Phase-III-Studie konnte zusätzlich zei-

---

gen, dass die Kombination von Cetuximab mit herkömmlicher Chemotherapie eine verlängerte progressionsfreie Überlebenszeit erzielt. Dieser Vorteil wird allerdings nur bei Patienten mit k-ras-Wildtyp erzielt. (Van Cutsem et al. 2009)

Der k-ras-Mutationsstatus stellt einen wichtigen Prädiktor für die Wirksamkeit einer gegen den EGF-Rezeptor gerichteten Antikörpertherapie dar. Der Mutationsstatus in diesem Onkogen kann ein Ansprechen auf die Therapie mit Cetuximab voraussagen. Nur Patientin mit dem k-ras-Wildtyp profitieren von der Anti-EGFR-Therapie. Für dieses selektierte Patientengut stellt eine Kombination von Cetuximab oder Panitumumab mit einer Kombinationschemotherapie eine wichtige Behandlungsmöglichkeit in der Erstlinientherapie dar. Liegt jedoch eine k-ras-Mutation vor, so ist die Therapie mit EGFR-Antikörpern wirkungslos. Entsprechende Patienten werden demnach nicht mit einem Antikörper gegen EGFR behandelt, auch um die unnötig erhöhte Toxizität zu vermeiden. (Amado et al. 2008; Karapetis et al. 2008)

Die Kombination mehrerer Antikörper für verschiedene Angriffspunkte wird in Zukunft von großer Bedeutung sein. Eine gemeinsame Gabe von Bevacizumab und Cetuximab führte allerdings zu keinem Vorteil, sondern sogar zu einem verkürzten progressionsfreien Überleben. Für die Therapie des kolorektalen Karzinoms wird diese Kombination derzeit daher nicht empfohlen. (Hecht et al. 2009; Marshall 2009; Tol et al. 2009)

Insgesamt geht der Trend weg von einer einheitlichen Therapie des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms, hin zur „maßgeschneiderten“, individuellen Therapie für jeden einzelnen Patienten. So sollen optimale Therapieergebnisse erzielt werden.

### **1.1.1 Wirkung von Bevacizumab**

Die Angiogenese ist ein physiologischer Prozess, der hauptsächlich in der Embryonal- und Fetalphase, aber auch im weiblichen Reproduktionstrakt und bei der Wundheilung auftritt. Aus bestehenden Blutgefäßen formen sich kleine neue Aussprossungen, die zunächst nur aus Endothelzellschläuchen bestehen und dann durch Wandzellen, auch Perizyten genannt, stabilisiert werden. Die einzelnen Schritte des Prozesses werden durch Angiogenesemediatoren sehr fein reguliert. Zunächst werden die Zellkontakte zwischen den bestehenden Endothelzellen gelockert und die Basalmembran durchlässig gemacht. Nun folgt eine Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen, Endothelzellmigration in das umliegende Gewebe und die nachfolgende Proliferation der Zellen. Schließlich wachsen die Endothelzellen zusammen und bilden Zellkontakte aus, die für die Dichtigkeit der entstandenen Kapillaren sorgen. Eine Verbindung zur Extrazellulärmatrix wird hergestellt. Zur Stabilisierung wachsen abschließend Wandzellen und glatte Muskelzellen um die Endothelzellschläuche herum. Dieses ist als Zeichen der Gefäßmaturität zu werten. (Carmeliet 2003)

---

In den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts war herausgefunden worden, dass solide Tumoren den Prozess der Angiogenese nutzen. Dieser Vorgang spielt eine zentrale Rolle im Wachstum eines Tumors, da dieser ab einer Größe von ca. 1-2 mm<sup>3</sup> nicht mehr genügend Sauerstoff und Nährstoffe durch Diffusion erhält. Vorher verweilt der Tumor ruhend in einer avaskulären Phase. Der Übergang zur vaskulären Phase wird auch als „angiogenic switch“ bezeichnet. Erst danach sind dem Tumor ein exponentielles Wachstum und später eine hämatogene Fernmetastasierung möglich. Die neu gebildeten Tumorgefäße unterscheiden sich allerdings strukturell und funktionell von normalen Gefäßen. Sie sind irregulär geformt, vielfach gewunden, haben teilweise blind endende Endothelschläuche und sind nicht in Arteriolen, Venolen und Kapillaren unterteilt. Weiterhin zeigen sie eine Leckage und viele Hämorrhagien, was zu einem erhöhten interstitiellen Druck führt. Außerdem lässt sich eine geringere Stabilisierung durch Perizyten erkennen, was Zeichen für die Unreife der Gefäße ist. Insgesamt resultiert aus diesem abnormalen Gefäßbett ein suboptimaler Blutfluss im Tumor. (Carmeliet 2005; Ferrara 2005)

Zur Angiogenese ist eine Vielzahl von Mediatoren notwendig, da der Prozess aus einer fein regulierten, komplexen Kaskade von Einzelreaktionen besteht. Eine entscheidende Rolle spielt die Hochregulation des Schlüsselmediators VEGF im Tumor. Das homodimere Glykoprotein ist seit Jahrzehnten das Ziel intensiver Forschungsaktivität und wurde in den 90er Jahren als wichtigster proangiogener Faktor charakterisiert. Produziert wird der Faktor von Tumorzellen und assoziierten Stromazellen und bindet an zwei verschiedene Rezeptoren (VEGFR-1 und VEGFR-2), welche auf Endothelzellen lokalisiert sind. Die Bindung an diese Thyrosinkinase löst eine Reihe unterschiedlicher Vorgänge aus. Zunächst gibt es eine direkte Wirkung auf Endothelzellen. In vitro Experimente konnten zeigen, dass VEGF die Zellen induziert, in die Extrazellulärmatrix einzuwachsen und dort Endothelzellschläuche zu formen. Zusätzlich sorgt VEGF für eine gesteigerte Permeabilität der vorhandenen Gefäße und eine Lockerung der Zellkontakte, sodass ein Aussprossen überhaupt erst möglich wird. Weiterhin stellt VEGF ein Überlebenssignal für neu geformte Kapillarschläuche dar, da ohne dieses Signal rasch die Apoptose der Zellen eingeleitet würde. (Carmeliet 2005)

Eine Hochregulierung von VEGF wird durch eine Reihe anderer Mediatoren, aber auch durch Hypoxie verursacht. In soliden Tumoren wird eine hohe Konzentration von VEGF gefunden, was sich durch große Anteile an hypoxischen Arealen begründet. Eine erhöhte VEGF-Konzentration ist jedoch für den chaotischen Aufbau des Tumorgefäßbettes verantwortlich. Dies sorgt seinerseits für Gebiete mit mangelhafter Sauerstoff- und

---

Nährstoffversorgung im Tumor und wiederum zu einer Steigerung der VEGF-Produktion.

Die Idee durch Hemmung der Angiogenese Tumorerkrankungen zu therapieren ist nicht neu. Schon 1971 kam diese Hypothese auf und stellt seitdem das Objekt intensiver Forschungsaktivität dar. (Folkman 1971; Ferrara et al. 2005) Der Ansatzpunkt der antiangiogenen Therapie erschien initial gerade deshalb so vielversprechend, da die Vorstellung herrschte, dass kaum Nebenwirkungen auftreten können, weil die Angiogenese unter physiologischen Bedingungen beim erwachsenen Menschen im signifikanten Maße nur im weiblichen Reproduktionstrakt auftritt. So werden fast keine physiologischen Vorgänge durch die Therapie gestört. Ebenso attraktiv erschien das geringe Potential, Resistenzen zu entwickeln, da Endothelzellen stets als sehr stabil galten. Daher wurde es für unwahrscheinlich gehalten, dass diese Zellen entsprechende Mutationen bilden können.

Nach der Beschreibung von VEGF als Schlüsselmediator im Prozess der Angiogenese schien eine Hemmung dieses Faktors äußerst attraktiv. Aus diesem Grund wurde ein rekombinanter, humanisierter monoklonaler Antikörper entwickelt, welcher VEGF bindet: Bevacizumab. (Ferrara et al. 2005; Caprioni et al. 2007)

Zunächst wurde ein muriner Vorläufer des Antikörpers entwickelt, der Bevacizumab sehr ähnlich ist. Dieser wurde im Mausmodell getestet und führte zu einer vollständigen Inhibierung der Neovaskularisation im Tumor und damit auch zur Unterdrückung des Tumorwachstums. (Borgström et al. 1996)

Nachdem der humanisierte Antikörper Bevacizumab in vitro ähnliche Erfolge zeigte, folgte die Überprüfung der Wirksamkeit anhand von Maus-Xenograft Modellen. Hier konnte gezeigt werden, dass die Gefäßdichte im Tumor merklich gesenkt wurde und der interstitielle Druck um 75 Prozent zurückging. (Borgström et al. 1996; Presta et al. 1997)

Diese Ergebnisse deckten sich mit den Erwartungen: der Entzug des wichtigsten Angiogenesemediators VEGF führt zu einer Zerstörung der neuen Tumorgefäße und der Unterdrückung der Neoangiogenese. Damit kommt es im Tumor zu einer Unterversorgung an Nährstoffen und zu einer Hypoxie und so zu einem Absterben oder zumindest einer Verkleinerung des Tumors.

Die vielversprechenden Resultate im Tierversuch implizierten einen ähnlichen Erfolg beim Einsatz des Medikaments beim Menschen. Der Versuch einer Monotherapie mit Bevacizumab brachte allerdings nicht die gewünschten Ergebnisse. Die Gefäße wurden nicht wie erwartet zerstört und eine Verkleinerung des Tumors konnte somit nicht

---

bewirkt werden. Eine Verbesserung des Gesamtüberlebens konnte ebenfalls nicht gezeigt werden. (Kabbinavar et al. 2003)

Untersuchungen des Tumorgewebes und vor allem des Tumorgefäßbettes führten zum Konzept der Normalisierungstheorie. Das Tumorgefäßsystem wird durch den Einsatz von Bevacizumab nicht zerstört, sondern „normalisiert“. Das zuvor sehr chaotisch angeordnete Gefäßnetz, welches durch blind endende Kapillarschläuche, Leckagen und daraus resultierendem suboptimalen Blutfluss charakterisiert ist, verändert sich so, dass es wieder einem normalen Gefäßsystem ähnelt. Die Veränderungen treten sowohl strukturell als auch funktionell auf und lassen sich durch eine entstandene Balance zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren erklären. (Jain 2001; Jain 2005)

Im Einzelnen bedeutet es, dass der vergrößerte Gefäßdurchmesser wieder auf Normalgröße reduziert wird, die verdickte Basalmembran wieder dünner wird und die Gefäße weniger gewunden verlaufen. Eine ganz entscheidende Veränderung ist der vermehrte Besatz mit Perizyten. Das unbehandelte Tumorgefäßbett besitzt nur einen sehr kleinen Anteil von Gefäßen, die von Perizyten umgeben sind. Nach Anti-VEGF Therapie nimmt dieser Anteil stark zu, was zu einer erhöhten Stabilität und Maturität der Gefäße führt. (Lin et al. 2004; Willett et al. 2004)

Diese Normalisierung der Gefäße führt nicht nur zu einem verbesserten Transport von Sauerstoff und Nährstoffen in den Tumor, sondern auch die Chemotherapie kann ihren Zielort besser erreichen. Diese Tatsache hat zentrale Bedeutung für die Wirksamkeit von Bevacizumab. Die Effektivität der Tumorthherapie kann mittels dieses entscheidenden Aspekts deutlich gesteigert werden. Eine Kombination von Bevacizumab mit Zytostatika kann dadurch eine bessere Wirkung entfalten als eine Monotherapie. Dieser Effekt wurde im Jahr 2004 durch eine große Phase-III-Studie belegt. (Hurwitz et al. 2004)

Die Kombination von Bevacizumab mit den weiteren üblichen Therapieregimen des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms lieferte ähnliche Resultate. Große Studien konnten belegen, dass die gemeinsame Gabe von Chemotherapie mit Bevacizumab einer alleinigen Chemotherapie überlegen ist. Patienten profitieren von einer besseren Krankheitskontrolle und größtenteils von einem verlängerten Gesamtüberleben. Zusammengefasst belegen diese Studien eine 4,7-monatige Verlängerung des Lebens, welche Bevacizumab zuzuschreiben ist. (McCormack et al. 2008)

Ein weiterer Vorteil von Bevacizumab ist seine geringe Toxizität. Auch nach Langzeittherapie treten schwere Nebenwirkungen wie Perforationen des Gastrointestinaltraktes oder arterielle thrombotische Ereignisse selten auf. Die einzige Komplikation, die häufiger beobachtet wurde, ist eine entweder erstmalig aufgetretene oder verschlechterte Hypertonie. Aus diesen Gründen stellt die Kombination von Chemotherapie mit Beva-

---

cizumab den Standard in der Erstlinien- und Zweitlinientherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms dar. Dennoch ist der genaue Wirkmechanismus bislang nur zum Teil geklärt.

### **1.1.2 Prädiktion der Wirksamkeit einer Bevacizumab-haltigen Therapie**

Die Kombinationstherapie von mehreren Zytostatika mit dem Angiogenese-Inhibitor Bevacizumab stellt aktuell einen Standard in der Erstlinientherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms dar und führt zu einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens.

Die genaue Wirkungsweise von Bevacizumab im Menschen ist noch unklar. Bisher konnte nicht geklärt werden, ob die Mechanismen deckungsgleich mit den theoretischen Ansätzen oder den Ergebnissen aus Tiermodellen sind. Ein besseres Verständnis der Wirkung auf molekularer und zellulärer Ebene wäre für den zukünftigen Einsatz von Bevacizumab von entscheidender Wichtigkeit. Von besonderer klinischer Relevanz ist die Tatsache, dass nicht alle Patienten auf eine antiangiogene Therapie ansprechen. Es gilt herauszufinden, welche Patienten auf eine Therapie mit Bevacizumab ansprechen und von ihr profitieren und welche vergebens mit dem Wirkstoff behandelt werden würden. Nur so kann eine optimale Effektivität erzielt werden und unnötige Toxizitäten vermieden werden. Nicht zuletzt können die immensen Kosten dieser neuen Therapieform über eine Vorhersage des Ansprechens deutlich vermindert werden. (Jain et al. 2009) Ein weiteres Problem sind die bei einer Subgruppe der therapierten Patienten auftretenden Resistenzen. Es wäre wichtig, sowohl mögliche Resistenzen frühzeitig zu erkennen, um die Therapie rechtzeitig umstellen zu können, als auch die Ursache dieser Resistenzen zu klären. (Glade Bender et al. 2004) Es gibt verschiedene Hypothesen, die versuchen das Phänomen der Resistenzentstehung aufzuklären. Ein Ansatz besteht darin, dass alternative Angiogenesefaktoren zum VEGF, wie z. B. Angiopoietine, hochreguliert werden und so der Signalweg durch andere Mediatoren umgangen oder ersetzt wird. Andere Überlegungen basieren auf der Normalisierungstheorie: Nachdem das chaotische Tumorgefäßbett durch den Einsatz von Bevacizumab normalisiert wird, schreitet der Umbau anschließend noch weiter fort, sodass das Gefäßbett schließlich für den benötigten Blutfluss wieder inadäquat wird und die Chemotherapie erneut nur noch ineffizient transportiert werden kann. Der positive Effekt auf den Transport der Chemotherapie hält demnach nur für einen gewissen Zeitraum an. Anschließend tritt ein Gefäßstatus auf, der wiederum chaotisch und funktionell ineffektiv ist und an das Tumorgefäßbett ohne eine antiangiogene Therapie erinnert. (Jain et al. 2006) Aus dieser Hypothese ergibt sich ein Normalisierungsfenster, welches den Zeitpunkt der maximalen Normalisierung der Gefäße angibt und damit den günstigsten Moment für

---

beispielsweise eine zusätzliche Bestrahlung, da diese bei geringer Hypoxie besser wirken kann. (Jain 2005) Biomarker, die ein solches Therapiefenster charakterisieren könnten, wären von beträchtlichem klinischen Nutzen.

Biomarker sind definiert als auf molekularer, zellulärer oder funktionaler Ebene messbare Parameter, die einen speziellen genetischen oder funktionellen Status eines biologischen Systems anzeigen. (Ludwig et al. 2005) In der Onkologie werden Biomarker für Diagnosen, Staging, Prognose und Therapieentscheidungen genutzt. Anforderungen an einen Biomarker sind die Durchführbarkeit und Praktikabilität von mehrfachen Messungen, die Reproduzierbarkeit, sowie die Gewinnung über ein möglichst minimal invasives Verfahren. Eine wichtige Unterscheidung ist zwischen einem prognostischen und einem prädiktiven Biomarker zu treffen. Ein prognostischer Marker gibt Informationen über den natürlichen Verlauf und den Ausgang einer Krankheit unabhängig von einer Therapie. Im Gegensatz dazu kann ein prädiktiver Biomarker noch vor einer Therapie ein Ansprechen auf eine bestimmte Behandlung und deren Effektivität vorhersagen. (Sessa et al. 2008; Jain et al. 2009)

Die Bedeutung eines prädiktiven Biomarkers lässt sich anhand des Wirkstoffes Cetuximab beispielhaft darstellen. Hier konnte mit dem k-ras ein spezifischer Biomarker für das Ansprechen und den Therapieerfolg gefunden werden. Große Studien zeigten, dass nur Patienten mit einem Wildtyp k-ras-Gen auf eine Therapie mit einem EGFR-Antikörper ansprechen und von einem gesteigerten progressionsfreien Überleben und längerem Gesamtüberleben profitieren können. Im Gegensatz dazu liegt die Ansprechrate beim mutierten k-ras-Gen bei null Prozent. Für den klinischen Einsatz des Medikamentes legen diese Ergebnisse nahe, vor Beginn der Therapie eine Testung durchzuführen und nur entsprechende Patienten mit dem Wildtyp k-ras mit Cetuximab zu behandeln. (Amado et al. 2008; Cercek et al. 2008; Karapetis et al. 2008)

Analog zu dem k-ras-Status der Cetuximab-Therapie wird versucht, Biomarker zur Prädiktion der Effizienz der Therapie mit Bevacizumab zu etablieren. Mehrere Faktoren wurden bisher untersucht, allerdings konnte bislang kein verlässlicher Prädiktor für den klinischen Routineeinsatz gefunden werden.

Auf der Suche danach kommen hauptsächlich Marker aus dem Tumorgewebe oder aus dem Blut in Frage. Sehr invasive Maßnahmen, wie die Messung des interstitiellen Drucks im Tumor sind weniger praktikabel. Im Einzelnen wurden für das kolorektale Karzinom am Tumorgewebe die VEGF-Expression, die Expression von Thrombospondin II (THBS2), einem Angiogenese-hemmenden Faktor, die Microvessel Density

---

---

(MVD, dtsh. Vaskularisierungsdichte), sowie Tumorzell-Apoptoserate und -Proliferationsrate untersucht. (Jubb, Hurwitz et al. 2006) Ebenso wurden in vorausgehenden Arbeiten der Perizytenbesatz der Kapillaren, der Blutfluss im Tumor und der interstitielle Druck als mögliche Prädiktoren untersucht. (Willett et al. 2004) Keiner dieser Marker ist jedoch dazu geeignet, die Wirksamkeit einer gegen VEGF gerichteten Therapie vorherzusagen.

In der Kategorie von Blut-basierten Biomarkern wurden bereits die systemische VEGF-Konzentration und zirkulierende Endothelzellen analysiert ohne einen prädiktiven Wert nachweisen zu können. (Poon et al. 2001; Jubb, Hurwitz et al. 2006; Murukesh et al. 2010) Eine erhöhte Frequenz der zirkulierenden Endothelzellen konnte jedoch mit dem Vorgang der Angiogenese in Verbindung gebracht werden. Nach antiangiogener Therapie sank die Zahl der Zellen wieder auf einen Normwert ab. Dies impliziert einen möglichen Nutzen als Biomarker. Zur Validierung werden weitere Studien benötigt. Allerdings sind für die Messung der zirkulierenden Endothelzellen anspruchsvolle Methoden nötig, sodass ein routinemäßiger Einsatz in der Klinik unwahrscheinlich erscheint. (Willett et al. 2005; Bertolini et al. 2006)

Weiterhin sind die nicht-invasiven Techniken der funktionellen Bildgebung, wie z. B. CT, MRT oder PET-Untersuchungen zu nennen. Diese Methoden sind hinsichtlich der Biomarkeridentifizierung noch nicht sehr ausgereift und sehr teuer. Verschiedene vaskuläre Parameter, wie relatives Blutvolumen im Tumor, relativer Blutfluss, oder vaskuläre Permeabilität ( $K^{trans}$ ), wurden anhand von kontrastmittelverstärkter MRT, CT, Ultraschall oder PET analysiert. Die Ergebnisse gelten als vielversprechend, ihr Nutzen als Biomarker muss allerdings noch nachgewiesen werden. (Ocak et al. 2007; Provenzale 2007; Sessa et al. 2008)

Zusammengefasst gibt es bisher eine große Anzahl von Versuchen potentielle Biomarker zu identifizieren, ohne dass auf diesem Gebiet bislang ein Durchbruch erzielt werden konnte. Der Bedarf für einen solchen Prädiktor ist aber auch in Bezug auf die hohen Kosten und die Nebenwirkungen der antiangiogenen Therapie mit Bevacizumab nach wie vor von großer klinischer Bedeutung. Für die zukünftige Optimierung der Therapie mit Bevacizumab wären eine Voraussage des Ansprechens, der optimalen Dosis und des Verabreichungszeitpunktes, sowie eine Vorhersage einer möglichen Resistenzentwicklung anhand eines Biomarkers essentiell. (Jain et al. 2006; Jubb, Oates et al. 2006)

Anhand der vorausgegangenen Studien wird in der vorliegenden Arbeit der Fokus der Überlegungen auf zwei unterschiedliche Ansatzpunkte gelegt, welche zur Aufdeckung möglicher Biomarker in Betracht kommen: die Analyse der Tumorsektate beleuchtet die Vaskularisierungsdichte und die Blutgefäßmaturität in Form des Perizytenbesatzes,

---

---

die Untersuchung der Serumproben klärt die Rolle der Angiogenesemediatoren VEGF und Angiopoietin-2.

#### **1.1.2.1 Vaskularisierungsdichte als Biomarker einer Bevacizumab-haltigen Therapie**

Die Vaskularisierungsdichte oder engl. Microvessel Density (MVD) ermöglicht eine quantifizierte Darstellung der Angiogenese in einem Tumor. Sie stellt das Abbild aller angiogenen Prozesse und Ergebnisse von Signaltransduktionskaskaden zum Zeitpunkt der Untersuchung dar. Ebenso spiegelt sie das mikroskopische Ergebnis einer antiangiogenen Therapie wider. Die Bestimmung erfolgt mittels immunhistochemischer Färbung von Tumorschnitten und Auszählung der Gefäße pro Gesichtsfeld. Der so ermittelte Angiogenesestatus eines soliden Tumors zeigte für eine Reihe von Tumorentitäten eine prognostische Relevanz. Für das kolorektale Karzinom wird die Bedeutung der MVD allerdings kontrovers diskutiert. Eine Reihe von Untersuchungen konnte nachweisen, dass die MVD im Hinblick auf eine antiangiogene Therapie keine Vorhersage des Therapieerfolges liefern kann. (Hlatky et al. 2002; Des Guetz et al. 2006; Jubb, Hurwitz et al. 2006) Allerdings gibt es keine standardisierte Methode für die MVD-Messung, sodass eine alternative Auswertung eventuell neue Erkenntnisse bringen könnte. Aufgrund dieser Tatsache und der Bedeutung der MVD in anderen Tumorentitäten erscheint eine erneute Analyse der Vaskularisierungsdichte sinnvoll.

#### **1.1.2.2 Blutgefäßmaturität als Biomarker einer Bevacizumab-haltigen Therapie**

Blutgefäße bestehen aus zwei miteinander interagierenden Zellschichten. Die innere Wand der Kapillaren wird von Endothelzellen ausgekleidet. Die äußere Schicht formen perivaskuläre Zellen, auch Perizyten oder Wandzellen genannt. Sie enthalten kontraktile Filamente und werden aufgrund dessen auch als Vascular Smooth Muscle Cells (vSMCs) bezeichnet. Perizyten dienen nicht wie lange Zeit angenommen nur der Stabilisierung von Endothelzellschläuchen, sondern kommunizieren zusätzlich mit den Endothelzellen über den direkten Kontakt oder parakrine Signaltransduktionen. Während des Prozesses der Angiogenese sezernieren Endothelzellen Wachstumsfaktoren wie die Angiopoietine und PDGF- $\beta$ , welche Perizyten anlocken und so für ein weiteres Fortschreiten der Gefäßmaturität sorgen. (Gerhardt et al. 2003; Bergers et al. 2005)

Die Rekrutierung der Perizyten geschieht in einem gewissen zeitlichen Abstand zur Formung der Endothelplexus. In diesen wenigen Tagen bis zu einer Woche geschieht ein Umbau der bisher gebildeten Gefäße (Remodelling). Die Dichte der Gefäße wird der Sauerstoffversorgung angepasst, indem entweder noch weitere Gefäße aussprossen oder bereits geformte zugrunde gehen. Dieses Remodelling ist nur so lange möglich, wie noch keine Perizyten die Endothelien bedecken, also in diesem unreifen Stadium. Der Zeitraum wird als Plastizitätsfenster bezeichnet. Sobald Perizyten vorhanden

---

sind, erreicht das Gefäß einen Reifegrad, der es vor dem Absterben schützt. Der Grad des Perizytenbesatzes stellt demnach ein Zeichen der Reife des Gefäßbettes dar.

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass eine Störung der Zellkontakte zwischen Endothelzellen und Perizyten zu einer Regression der Gefäße führt. Weiterhin konnte eine Beschleunigung der Perizyten-Rekrutierung noch unreife Gefäße vor dem Absterben bewahren. Der Angiogenesemediator VEGF scheint hier eine neue Rolle zu spielen. Die Geschwindigkeit der Perizyten-Rekrutierung ist abhängig von der VEGF-Konzentration: je mehr VEGF vorhanden ist, desto schneller werden die Endothelzellschläuche von Perizyten bedeckt und desto schneller schreitet damit die Gefäßreifung und der somit Schutz vor dem Absterben fort. (Benjamin et al. 1998)

Umgekehrt deutet dies darauf hin, dass gerade im Plastizitätsfenster ein Entzug des Mediators VEGF besonders große Wirkung erzielen kann. Ohne Perizytenbesatz sind die Endothelzellen sehr empfindlich und der Einsatz von Anti-VEGF-Antikörpern scheint in dieser unreifen Phase der Gefäße am besten wirken zu können. In einem Xenograft-Modell von humanem Glioblastomen konnte gezeigt werden, dass durch Unterdrückung der VEGF-Expression nur unreife Endothelzellen zugrunde gehen, die noch nicht von Perizyten umgeben sind. (Benjamin et al. 1999) Diese Erkenntnisse sind mit der Normalisierungstheorie der antiangiogenen Therapie in Einklang zu bringen, da hier ebenfalls ein Untergang der unreifen, chaotischen Gefäßareale des Tumorgefäßbettes beschrieben ist.

In Anbetracht dieser Tatsache wurden bezüglich der Perizyten weitere Überlegungen angestellt. Für die Tumorangio-genese konnten neuere Studien einen gegensätzlichen Effekt des VEGF aufzeigen. Eine hohe Expression von VEGF im Tumor führt zu einem chaotischen Gefäßbett im Tumor mit gewundenen Gefäßen, Leckagen und vermindertem Blutfluss. Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu früher beschriebenen Resultaten eine hohe VEGF-Konzentration mit einem geringen Perizytenbesatz korreliert. (Greenberg et al. 2008) Auch diese Überlegungen unterstützen die Normalisierungstheorie: ein VEGF-Entzug sorgt für eine Normalisierung des chaotischen Gefäßbettes und führt unter anderem zu einem erhöhten Perizytenbesatz. (Willett et al. 2004)

Trotz widersprüchlicher Aussagen bezüglich der Wirkung des VEGF, brachten beide Ansätze wesentliche Gemeinsamkeiten hervor: Ein VEGF-Entzug ist besonders wirksam, wenn ein unreifes Gefäßbett mit geringem Perizytenbesatz vorliegt. Beides ist im chaotischen Tumorgefäßbett der Fall. Dies unterstützt den Ansatz, dass ein VEGF-Entzug gerade auf unreife Tumorgefäße sehr effektiv wirkt.

---

Diese Überlegungen spielen für die Tumortherapie mit dem Antikörper Bevacizumab eine große Rolle. Es ergibt sich die Schlussfolgerung, dass der Grad des Perizytenbesatzes nicht nur den Reifegrad des Gefäßbettes, sondern auch die mögliche Wirksamkeit einer Anti-VEGF-Therapie anzeigen kann. Aus diesem Grund ist der Perizytenbesatz ein möglicher Kandidat für einen Prädiktor im Kontext einer Therapie mit Bevacizumab.

### **1.1.2.3 VEGF als Biomarker einer Bevacizumab-haltigen Therapie**

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) stellt, wie oben beschrieben, den wichtigsten Mediator in der Angiogenese dar. (Carmeliet 2005) Als Zielstruktur des Antikörpers Bevacizumab verspricht er, für die Vorhersage des Erfolges einer Bevacizumab-haltigen Therapie große Bedeutung zu haben. Dies ergibt sich in der Analogie zur molekularen Therapie anderer Tumorentitäten. Bei der Therapie von Brustkrebs kann z. B. der HER2-Expressionsstatus das klinische Ansprechen auf eine Behandlung mit einem HER2-Antikörper voraussagen. Der Angriffspunkt des Antikörpers selbst stellt somit dort nicht nur einen wichtigen prognostischen Faktor, sondern auch einen Prädiktor dar. (Slamon et al. 2001) Analog dazu wurden im kolorektalen Karzinom sowohl die VEGF-Expression als auch die VEGF-Serumkonzentration in mehreren Studien analysiert. (Des Guetz et al. 2006) Es wurden teils übereinstimmende, teils gegensätzliche Resultate erzielt: eine prognostische Relevanz des VEGF konnte für das kolorektale Karzinom von einigen Forschungsgruppen sowie einer Metaanalyse belegt werden, (Poon et al. 2001; Des Guetz et al. 2006; Sessa et al. 2008; Jain et al. 2009) andere relevante Arbeiten wiederum widerlegten diese These. (Jubb et al. 2006) Im Rahmen einer Bevacizumab-haltigen Therapie jedoch wurde einheitlich gezeigt, dass VEGF keinen Stellenwert als Prädiktor aufweist. (Jubb, Hurwitz et al. 2006; Sessa et al. 2008; Jain et al. 2009) Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse erschienen erneute Untersuchungen von VEGF im Hinblick auf eine prädiktive Funktion notwendig.

### **1.1.2.4 Angiopoietin-2 als Biomarker einer Bevacizumab-haltigen Therapie**

Neben dem VEGF-Rezeptor-System stellen die Mediatoren Angiopoietin-1 und -2 mit ihrem Rezeptor Tie-2 ein weiteres Signalsystem des Gefäß-Remodellings und der Gefäßreifung dar. Die charakteristische Eigenschaft der Angiopoietine ist ihr gegensätzlicher Effekt auf den gemeinsamen Tie-2-Rezeptor, welcher auf Endothelzellen exprimiert wird. (Maisonpierre et al. 1997) Beide Faktoren werden von Endothelzellen gebildet und in speziellen Granula, den Weibel-Palade-Körpern, gespeichert. (Fiedler et al. 2004) Angiopoietin-1 bewirkt als Agonist von Tie-2 eine Phosphorylierung des Rezeptors und sorgt für die strukturelle Integrität von Blutgefäßen. Es stabilisiert und unterstützt neu gebildete Gefäße, indem es die Interaktion von Endothelzellen mit umge-

---

---

benden Zellen und der Extrazellulärmatrix fördert. Experimente, die ein Fehlen des Ang-1 imitieren, zeigten, dass dies zu schweren Gefäßmissbildungen in der Maus-embryogenese und frühzeitigem Tod des Embryos führt. In gesundem Gewebe ist eine recht stabil regulierte Menge von Ang-1 vorhanden. (Hanahan 1997)

Im Gegensatz dazu hat Angiopoietin-2 einen antagonistischen Effekt auf den Tie-2-Rezeptor. Es bindet zwar ebenfalls und mit etwa gleicher Affinität an den Rezeptor, bewirkt aber keine Phosphorylierung desselben. Eine Ang-2-Expression wird hauptsächlich dort gefunden, wo vaskuläre Umbauprozesse stattfinden, also im weiblichen Reproduktionstrakt, bei der Wundheilung und in soliden Tumoren. Hier kann es Kontext-abhängig zwei unterschiedliche Wirkungen entfalten. Wird gleichzeitig mit dem Ang-2 auch der Mediator VEGF hochreguliert, so entsteht eine proangiogene Wirkung: es kommt zu Endothelzellmigration, -proliferation und zum Aussprossen von Gefäßen. Wenn hingegen kein VEGF vorhanden ist, führt das Ang-2 zum Endothelzelltod und einer Gefäßregression. (Maisonpierre et al. 1997; Scharpfenecker et al. 2005; Falcón et al. 2009) Insgesamt zeigt sich, dass die Bindung von Ang-2 an den Tie-2-Rezeptor keine spezielle Funktion hat, sondern vermutlich vornehmlich den stabilisierenden Effekt des Ang-1 blockiert und die Gefäße so sensibler gegenüber anderen Mediatoren, wie VEGF, macht. (Hanahan 1997; Maisonpierre et al. 1997; Eklund et al. 2006)

Das Gleichgewicht zwischen Ang-1 und Ang-2 trägt zur Aufrechterhaltung des Gefäßruhezustandes bei. Dieser Zustand wird als nicht-proliferierender, anti-thrombotischer, anti-inflammatorischer und nicht-angiogener Status ruhender Endothelzellen und Perizyten definiert. Gerät dieser Zustand aus dem Gleichgewicht, kommt es zu pathologischen Prozessen: entweder kurzfristig zu Entzündung oder langfristig zur Förderung von Tumorwachstum. (Augustin et al. 2009)

In der Neoangiogenese von Tumoren ist Ang-2 von großer Bedeutung. Tierversuche konnten zeigen, dass eine Überexpression von Ang-2 in Mäusen zu einer verstärkten Vaskularisierung und zu einem Wachstum von Tumoren führt. Dieses unterstützend zeigte sich ein reduziertes Tumorwachstum nach experimentellem Ang-2-Entzug. Dieses minimierte Wachstum ist assoziiert mit einem veränderten Muster der Perizyten-Rekrutierung und -Reife. (Ahmad, Liu, Jung, Fan, Reinmuth et al. 2001; Ahmad, Liu, Jung, Fan, Wilson et al. 2001)

In der Tumorentstehung werden die Endothelzellen schon in sehr frühen Stadien von Tumorzellen stimuliert, was zur Freisetzung von Ang-2 führt. Die starke Expression von Ang-2 und die vergleichsweise geringe Bildung von Ang-1 im Tumor führen zu einem relativen Überwiegen des Ang-2. Dies bewirkt initial im Zentrum des Tumors einen Endothelzelluntergang, der die Destabilisierung und damit die Regression der Tumorgefäße zur Folge hat. Daraus resultiert im Tumorgewebe eine zentrale Nekrose. Im nun

---

sekundär kurzfristig avaskulären Tumor wird so eine Hypoxie ausgelöst, welche ihrerseits einen Anstieg der VEGF-Konzentration induziert. Am Rand des Tumors kann durch die Kombination von VEGF und Ang-2 anschließend eine ausgeprägte Tumorangiogenese stattfinden. (Holash et al. 1999; Augustin et al. 2009)

Diese Ergebnisse führten zu intensiver Forschung über den Stellenwert des Angiopoietin-Systems in humanen Tumoren. Es konnte gezeigt werden, dass Angiopoietin-2 in Tumor-assoziierten Endothelzellen im kolorektalen Karzinom hochreguliert wird. (Goede et al. 2010) Es zählt damit zu einem der wenigen protumorigenen Faktoren, die nicht von den Tumorzellen selbst gebildet werden, sondern vom umgebenden Tumorstroma. Auch systemisch steigt die Ang-2-Konzentration bei Vorliegen einer malignen Neoplasie an. Für zahlreiche Erkrankungen, darunter Leberzellkarzinom, Lungenkrebs und malignes Melanom stellt Ang-2 einen prognostischen Faktor bzw. einen Biomarker für Endothelzellaktivierung dar. (Park et al. 2007; Kuboki et al. 2008; Helfrich et al. 2009) Beim kolorektalen Karzinom konnte ein solcher Zusammenhang bisher nicht gezeigt werden. (Augustin et al. 2009)

Da dem Angiopoietin-2 eine entscheidende Rolle in der Tumorangiogenese und damit für das Wachstum eines Tumors zugesprochen wird, untersuchten etliche Forschungsgruppen den Zusammenhang zwischen diesem Faktor und klinischen Daten bzw. histopathologischen Gegebenheiten am Beispiel des kolorektalen Karzinoms. Es wurden Korrelationen zwischen einer Überexprimierung des Ang-2 im Tumor und einem schlechten histologischen Grading, erhöhter MVD, Invasion in das venöse und lymphatische System, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen, einem fortgeschrittenem Stadium und einer schlechten Prognose aufgezeigt. (Ochiumi et al. 2004; Nakayama et al. 2005; Chung et al. 2006) Die erzielten Ergebnisse waren zum Teil übereinstimmend, zum Teil widersprüchlich, sodass weitere Analysen zur Bestätigung oder Widerlegung der Thesen nötig und sinnvoll erschienen.

Zusammengefasst lässt sich aus vorangehenden Arbeiten ableiten, dass Angiopoietin-2 eine wesentliche Rolle in der Tumorangiogenese spielt. In anderen Tumorentitäten konnte Ang-2 als prognostischer Marker identifiziert werden. Für das kolorektale Karzinom konnte dies bislang nicht eindeutig gezeigt werden. Weiterhin bleibt die Frage offen, ob es in der antiangiogenen Therapie mit Bevacizumab auch als prädiktiver Biomarker gesehen werden kann. Die bisher erzielten Ergebnisse und der klare Zusammenhang zwischen dem VEGF-System und dem Ang-Tie-2-System sind in dieser Hinsicht als vielversprechend anzusehen.

---

## 1.2 Fragestellung und Zielsetzung

Die Kombination einer Chemotherapie mit dem Angiogenese-Inhibitor Bevacizumab stellt derzeit den Standard in der Erstlinientherapie des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms dar. Für die zukünftige Optimierung dieser Therapie ist die Identifizierung eines Biomarkers essentiell. Die wichtigste Aufgabe des Biomarkers besteht darin, ein Ansprechen auf die Therapie und damit den Therapieerfolg vorherzusagen. Eine solche Prädiktion ermöglicht die Auswahl entsprechender Patienten schon vor Beginn der Behandlung. Auf diese Weise kann die Effektivität der Therapie gesteigert werden. Gleichzeitig können so unnötige Toxizitäten bei Patienten mit fehlendem Ansprechen vermieden und erhebliche Kosten eingespart werden. Ziel dieser Arbeit war es, potentielle Biomarker bzw. Prädiktoren zu untersuchen.

Die Auswahl möglicher Biomarker, die in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollten, geschah nach Analyse der biologischen Grundlagen der Angiogenese und der Auswirkungen einer Angiogenese-Hemmung. Zum einen wurden mit der Vaskularisierungsdichte und der Blutgefäßmaturität in Form des Perizytenbesatzes zwei histopathologische Marker ausgewählt. Der Einsatz einer Bevacizumab-haltigen Therapie hat großen Einfluss auf die Morphologie und Maturität des Gefäßbettes. Aus diesem Grund erschien sowohl die MVD, als auch der Perizytenbesatz als möglicher Biomarker vielversprechend. Zum anderen fokussierte sich die vorliegende Analyse auf vaskuläre Angiogenesemediatoren. Dabei wurde das Augenmerk neben dem VEGF-System auf das Angiopoietin-Tie-2-System gelegt. Vieles deutet darauf hin, dass nach VEGF-Entzug durch Bevacizumab ein alternativer Signalweg über Ang-2 und den Tie-2-Rezeptor eingeschlagen wird, um so die Tumorangioese aufrecht zu erhalten. In anderen Tumorentitäten konnte bereits die entscheidende Rolle des Ang-2 als Biomarker für die Angiogenese nachgewiesen werden, im kolorektalen Karzinom hingegen blieb dies bislang offen. Eine Untersuchung des prädiktiven Wertes des Ang-2 für eine Bevacizumab-haltige Therapie wurde ebenfalls noch nicht realisiert. In dieser Arbeit wurden erstmalig entsprechende Analysen durchgeführt, um diese offenen Fragen zu beantworten.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kollektiv, bestehend aus Patienten mit kolorektalem Karzinom, die darüber hinaus teilweise eine Bevacizumab-haltige Chemotherapie erhalten haben, mit dem Ziel der Identifizierung eines Biomarkers analysiert. Dazu wurden Tumor- und Blutproben der Patienten immunhistochemisch bzw. mittels ELISA untersucht, um histopathologische und systemische Angiogenesefaktoren zu ermitteln. Die Ergebnisse wurden mit dem Ansprechen auf die Therapie und Überlebensdaten in Bezug gesetzt und ausgewertet. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der erhobenen Daten mit einem Kollektiv gesunder Probanden. Auf diese Weise wurde der Frage nachge-

---

gangen, ob die Gefäßdichte, die Gefäßreife oder einer der beiden Angiogenesemediatoren VEGF und Ang-2 als Biomarker infrage kommen.

Eine solche Untersuchung von Tumorgewebe, Blutwerten und klinischen Daten ermöglichte eine in dieser Art bisher nicht durchgeführte Analyse mit dem Ziel der Identifizierung eines prognostischen und prädiktiven Biomarkers für die Therapie des kolorektalen Karzinoms mit Bevacizumab.

---

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Patientenkollektive

Nach Zustimmung der Ethikkommissionen der Universitäten Köln und Bochum wurden 90 Patienten mit kolorektalem Karzinom in unterschiedlichen Stadien zur Analyse von Angiogenesemediatoren ausgewählt. Von den Patienten wurde nach der Aufklärung und Einverständniserklärung sowohl eine Blutprobe zum Zeitpunkt der primären Resektion, als auch eine Tumorprobe gewonnen. Dazu stellten die zuständigen Pathologen die Ergebnisse der Gewebsuntersuchung zur Verfügung. Des Weiteren wurde Einsicht in die Krankenakten gewährt, was eine Charakterisierung des Patientenguts ermöglichte. Demographische, klinische und histopathologische Parameter konnten so ausführlich dokumentiert werden.

Bei Patienten, welche mit einer palliativen Chemotherapie in der Kombination mit dem antiangiogenen Antikörper Bevacizumab behandelt wurden, wurde nach zweimonatiger Therapiedauer das klinische Ansprechen evaluiert. Dies geschah entsprechend den RECIST-Kriterien (response evaluation criteria in solid tumors). Diese Kriterien teilen das Ansprechen in vier unterschiedliche Kategorien ein: Complete Response (CR), Partial Response (PR), Progressive Disease (PD) und Stable Disease (SD). Ein komplettes Ansprechen (CR) ist definiert als das Verschwinden aller karzinombedingten Organläsionen. Weiterhin müssen alle befallenen Lymphknoten auf eine Größe unter 10 mm zurückgehen. Als partielles Ansprechen (PR) wird die Größenreduktion der Tumormasse um mindestens 30 Prozent bezeichnet. Im Gegensatz dazu wird eine Zunahme der Tumorgröße um mindestens 20 Prozent progrediente Erkrankung (PD) genannt. Dabei muss allerdings ein absolutes Größenwachstum von wenigstens 5 mm vorliegen. Jede neu hinzugekommene Organläsion wird ebenfalls als ein Progress bewertet. Von einer stabilen Krankheit (SD) spricht man, wenn die erforderlichen Kriterien für ein Ansprechen auf die Therapie oder für einen Progress nicht erfüllt werden. (Eisenhauer et al. 2009)

Bildgebende Kontrollen prätherapeutisch und beim Restaging dienten zur Bestimmung des Ansprechens der Patienten auf die Therapie oder eines möglichen Progresses der Krankheit.

Insgesamt wurden die Untersuchungen an Patienten aus drei verschiedenen Patientenkollektiven durchgeführt. Zusätzlich wurde ein weiteres Kollektiv, bestehend aus gesunden Probanden zusammengestellt, um einen Vergleich anstellen zu können.

---

## a) Kollektiv A

In der Chirurgischen Klinik des Sankt Elisabeth Krankenhauses Hohenlind wurde in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. med. Thomas Koslowsky in den Jahren 2006 und 2007 ein Patientenkollektiv bestehend aus 56 Patienten rekrutiert. Es handelte sich ausschließlich um Patienten mit neu diagnostiziertem kolorektalen Karzinom zum Zeitpunkt der primären Resektion des Tumors. Hier betrug das mediane Alter 69 Jahre mit einer Spanne von 47 bis 86 Jahren. Die UICC-Stadien variierten, den Hauptanteil machten allerdings Patienten in den UICC-Stadien II und III aus.

Eine Übersicht über die demographischen, klinischen und histopathologischen Daten gibt Tabelle 1.

**Tabelle 1: Patientencharakteristika Kollektiv A**

	N (%)
Patienten	56 (100)
Geschlecht	
m	35 (62,5)
w	21 (37,5)
Alter	
Median (Jahre)	69
Spanne (Jahre)	47 - 86
< 65 Jahre	16 (28,6)
≥ 65 Jahre	40 (71,4)
UICC-Stadium	
I	3 (5,4)
II	30 (53,6)
III	15 (26,8)
IV	8 (14,3)

N entspricht der absoluten Anzahl der Patienten, in Klammern steht der prozentuale Anteil.

## b) Kollektiv B

Ein weiteres Kollektiv, bestehend aus 19 Patienten, wurde in der onkologischen Praxis von Herrn PD Dr. med. Roland Schnell zusammengestellt. Das mediane Alter der Patienten betrug 69 Jahre, wobei die Altersspanne zwischen 54 und 83 Jahren lag. Es handelte sich hier ausschließlich um Patienten mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom, die sich folglich im UICC-Stadium IV befanden. Dabei gab es sowohl Patienten mit Erstdiagnose als auch solche mit einem Rezidiv der Erkrankung. Nach der Tumorsektion erhielten die Patienten eine kombinierte Chemotherapie des FOLFOX- oder FOLFIRI-Regimes, bzw. 5-FU/LV oder CAP, jeweils zusammen mit dem anti-

angiogenen Antikörper Bevacizumab. Blutproben wurden vor dem Start der Therapie gewonnen. Die Auflistung der Patientencharakteristika folgt in Tabelle 2.

**Tabelle 2: Patientencharakteristika Kollektiv B**

	N (%)
Patienten	19 (100)
Geschlecht	
m	10 (52,6)
w	9 (47,4)
Alter	
Median (Jahre)	69
Spanne (Jahre)	54 - 83
< 65 Jahre	8 (42,1)
≥ 65 Jahre	11 (57,9)
UICC-Stadium	
I	0 (0)
II	0 (0)
III	0 (0)
IV	19 (100)

N entspricht der absoluten Anzahl der Patienten, in Klammern steht der prozentuale Anteil.

### c) Kollektiv C

In Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. med. Anke Reinacher-Schick wurde Zugriff auf das Kollektiv einer klinischen Studie (AIO KRK 0604) der Klinik für Innere Medizin des Universitätsklinikums Bochum gewährt. Das mediane Alter der 15 Patienten dieser Studie betrug 67 Jahre und die Alterspanne lag zwischen 45 und 77 Jahren. Alle Patienten hatten ebenfalls ein metastasiertes kolorektales Karzinom und damit das UICC-Tumorstadium IV. Auch diese Patienten wurden mit einer adjuvanten Chemotherapie behandelt. Bei den Therapieregimen handelte es sich entweder um XELOX oder XE-LIRI, jeweils kombiniert mit Bevacizumab. Auch hier wurde eine Blutprobe der Patienten vor Beginn der Therapie entnommen und für die vorliegenden Analysen zur Verfügung gestellt.

Eine kurze Übersicht über die demographischen Daten des Patientenkollektivs bietet Tabelle 3.

**Tabelle 3: Patientencharakteristika Kollektiv C**

	N (%)
Patienten	15 (100)
Geschlecht	
m	9 (60)
w	6 (40)
Alter	
Median (Jahre)	67
Spanne (Jahre)	45 - 77
< 65 Jahre	7 (46,7)
≥ 65 Jahre	8 (53,3)
UICC-Stadium	
I	0 (0)
II	0 (0)
III	0 (0)
IV	15 (100)

N entspricht der absoluten Anzahl der Patienten, in Klammern steht der prozentuale Anteil.

#### d) Vergleichskollektiv Gesunde

In Zusammenarbeit mit Frau Birgit Cremer wurden an der Uniklinik Köln Serumproben von 33 gesunden Personen gesammelt. Das mediane Alter der Probanden betrug 29 Jahre mit einer Spanne von 20 bis 42 Jahre.

Dieses Kollektiv wurde erstellt, um einen Vergleich zwischen an einem Kolonkarzinom Erkrankten und Gesunden anstellen zu können.

**Tabelle 4: Charakteristika des Vergleichskollektivs Gesunde**

	N (%)
Patienten	33 (100)
Geschlecht	
m	23 (69,7)
w	10 (30,3)
Alter	
Median (Jahre)	29
Spanne (Jahre)	20 - 42

N entspricht der absoluten Anzahl der Patienten, in Klammern steht der prozentuale Anteil.

## 2.2 Material

### 2.2.1 Reagenzien

Die folgenden Reagenzien wurden für die immunhistochemischen Untersuchungen der humanen Tumorproben verwendet. Die Analyse der Blutproben wurde mittels ELISA durchgeführt. Die dafür genutzten Materialien werden ebenfalls hier aufgeführt.

#### Analyse der Tumorproben

##### Primärantikörper

a) Maus-Anti-Human-CD34-IgG, monoklonal, Klon QBEnd-10, (DAKO, Deutschland)

CD34 ist ein Transmembranprotein, welches auf unreifen hämatopoietischen Stammzellen und Endothelzellen exprimiert wird. Der Einsatz des Antikörpers Klon QBEnd-10 diente der Darstellung von Blutgefäßen durch Anfärben der Endothelzellen.

b) Maus-Anti-Human- $\alpha$ -SMA-IgG, monoklonal, Klon 1A4 (DAKO, Deutschland)

Aktin zählt als Mikrofilament zu den Zellskelettproteinen. Es spielt besonders im Aufbau des kontraktiven Apparates in Muskelzellen eine Rolle. Der hier verwendete Antikörper bindet glattmuskuläres Aktin und diente daher der Anfärbung von Perizyten und glatten Muskelzellen als Bestandteile von Blutgefäßwänden.

##### Sekundärantikörper

Ziege-Anti-Maus-Immunglobulin-IgG, biotinyliert, als gebrauchsfertige Lösung (Invitrogen / Zymed Deutschland)

##### Blockungslösung

Ziegenserum (10%) als gebrauchsfertige Lösung (Invitrogen / Zymed Deutschland)

##### Farbreaktionsenzyme

Streptavidin-Peroxidase-Lösung / Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Lösung, beide als gebrauchsfertige Lösung (Invitrogen / Zymed Deutschland)

##### Farbstoffe

a) Diaminobenzidin-Lösung (DAB)

1 mL Puffer-Konzentrat

50  $\mu$ L DAB-Lösung (konzentriert)

50  $\mu$ L konzentriertes Wasserstoffperoxid

(Alles in Form eines DAB-Kits von Invitrogen / Zymed Deutschland)

---

b) Aminoethylcarbazol-Lösung (AEC), gebrauchsfertige Lösung (Invitrogen / Zymed Deutschland)

c) Nitroblautetrazolium-Lösung (NBT) als gebrauchsfertige Lösung (Invitrogen / Zymed Deutschland)

#### Puffer

a) PBS

8 g Natriumchlorid

0,2 g Kaliumchlorid

1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat

0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat

1000 ml Aqua dest.

pH 7,4

b) PBS Tween-20

1000 ml PBS

500 µl Tween-20 (Karl Roth, Deutschland)

c) Ziegenserum (1%)

100 µl Ziegenserum (10%) (Invitrogen / Zymed Deutschland)

900 µl PBS

#### Absteigende Alkoholreihe

Xylol

Isopropanol (100%)

Ethanol (96%)

Ethanol (80%)

Ethanol (70%)

Ethanol (50%)

#### Antigendemaskierungs-Lösung

Tris-Puffer (10 mM Tris, 1mM EDTA)

1,21 g Tris

0,29 g EDTA

1000 ml Aqua dest.

pH 9,0

#### Peroxidaseblock-Lösung

200 ml Methanol mit 3% Wasserstoffperoxyd (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (beides Carl-Roth, Deutschland)

---

Sonstige Lösungen

- a) Hämatoxylin (Merck, Deutschland)
- b) Eosin (Merck, Deutschland)
- c) Glyceringelantine (Merck, Deutschland)

Analyse der Blutproben

- VEGF ELISA-Kit (R&D Systems, Deutschland)
- Ang-2 ELISA-Kit (R&D Systems, Deutschland)

### **2.2.2 Geräte**

- a) Mikrotom
- b) Mikroskop
- c) Mikrottestplatten-Schüttler
- d) Zentrifuge

### **2.2.3 Gewebeproben**

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an humanen Tumorproben von kolorektalen Karzinomen durchgeführt. Die Sammlung der Proben erfolgte nach Aufklärung der Patienten. Das Gewebe wurde sofort in Formalin fixiert und später in Paraffin eingebettet. Dieser Vorgang wurde maschinell unter den üblichen Bedingungen vom pathologischen Institut der Universitätsklinik Köln durchgeführt. Aus den Paraffinblöcken wurden anschließend an einem Mikrotom 6 µm dicke Serienschnitte hergestellt. Zu allen Gewebeproben war die pathologische Diagnose bekannt, die sowohl Staging als auch Grading umfasste. Eine Hämatoxylin und Eosin-Färbung erlaubte eine orientierende Durchsicht der Präparate.

### **2.2.4 Blutproben**

Zur Analyse der Serum Angiogenesefaktoren wurden nach einer Aufklärung präoperativ bzw. vor dem Start einer systemischen Chemotherapie mit Bevacizumab Blutproben der Patienten gewonnen. Dazu wurden Serum-Monovetten der Firma Sarstedt verwendet. Durch Zentrifugieren der geronnenen Proben wurden die zellulären Bestandteile inklusive der Gerinnungsfaktoren abgetrennt und der Überstand als Serum entnommen. Zur Konservierung wurden diese Serumproben bei -80° C eingefroren.

---

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Vorbehandlung von Schnittpräparaten

Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte wurden zunächst in Xylol für 2 x 10 Min entparaffiniert. Zur Rehydrierung wurde eine absteigende Alkoholreihe (Isopropanol 100%, Ethanol 96%, Ethanol 80%, Ethanol 70%, Ethanol 50%) und schließlich Aqua dest. verwendet. Zum Blocken der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte als nächstes für 20 Min mit Methanol mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bedeckt. Anschließend erfolgte ein Spülschritt für 3 x 2 Min in PBS. Die nun folgende Antigendemaskierung variierte in Abhängigkeit vom Primärantikörper. Für eine CD34-Färbung wurden die Schnitte in einem Tris-Puffer (10 mM Tris, 1mM EDTA) für 3 x 5 Min bei 600 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Die Antigendemaskierung für eine  $\alpha$ -SMA-Färbung wurde ebenfalls im Tris-Puffer für 20 Min bei 98° C im Ofen durchgeführt.

In beiden Fällen folgten anschließend eine ca. 20-minütige Abkühlphase bis zum Erreichen der Raumtemperatur und ein weiterer Spülschritt für 3 x 2 Min in PBS.

### 2.3.2 Immunhistochemische Einfachfärbungen

Nach der oben beschriebenen Vorbehandlung der Gewebsschnitte folgte nun die immunhistochemische Färbung. Die Inkubationen erfolgten in einer feuchten Kammer; die Spülschritte wurden jeweils für 3 x 2 Min in PBS durchgeführt.

Die Absättigung unspezifischer Proteinbindungsvalenzen in den Präparaten geschah durch Überschichten der Schnitte mit 100  $\mu$ l Ziegenserum (10%). Die Inkubationszeit hierfür betrug 10 Min. Anschließend wurde die Flüssigkeit vorsichtig entfernt, ohne das Präparat zu berühren, bzw. zu beschädigen.

Im nächsten Schritt wurden je 100  $\mu$ l der Primärantikörper-Lösung unter Vermeidung von möglicher Austrocknung oder Verletzung der Gewebe auf die Schnitte pipettiert. Unter folgenden Bedingungen wurden die verschiedenen Primärantikörper eingesetzt:

**Tabelle 5: Verdünnung der Primärantikörper**

Antikörper	Konzentration	Inkubationspuffer
CD34	1:40	Ziegenserum (1%)
$\alpha$ -SMA	1:50	Ziegenserum (1%)

In beiden Fällen erfolgte die Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Zur Kontrolle der Spezifität der Antikörper wurden bei jeder Färbung Negativkontrollen mitgeführt. Hierfür wurden die Schnitte nur mit Ziegenserum 1% ohne Primärantikörper beschichtet.

---

Nach Spülen in PBS wurden die Schnitte für 10 Min mit dem biotinylierten anti-Maus-Sekundärantikörper inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Detektierung des Sekundärantikörpers mit einer Streptavidin-Peroxidase-Lösung. Diese wurde ebenfalls für 10 Min auf den Schnitten belassen. Nach erneutem Spülen wurden die Schnitte mit dem Substrat für die Peroxidase überdeckt. Das Chromogen für die CD34-Färbung war DAB;  $\alpha$ -SMA wurde mittels NBT dargestellt. Die Inkubation erfolgte 7 Min unter Lichtabschluss. Durch Spülen mit Aqua dest. wurde die Farbreaktion gestoppt. Anschließend wurden die Präparate sehr kurz (für ca. 1 Sek.) zum Gegenfärben in Hämalun getaucht. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Glyzeringelantine eingedeckt.

### **2.3.3 Immunhistochemische Doppelfärbung**

Zur gleichzeitigen Darstellung von Endothelzellen und glattmuskulären Muskelzellen, welche die Perizyten eines Gefäßes darstellen, wurde eine immunhistochemische Doppelfärbung etabliert. Zunächst wurden dabei die Perizyten mittels Antikörper gegen  $\alpha$ -SMA gefärbt und anschließend die Gefäßendothelien durch einen Antikörper gegen CD34.

Die Vorbehandlung der Schnitte erfolgte wie oben beschrieben. Nach der Entparaffinierung in Xylol folgte die Rehydrierung durch die Alkoholreihe (Isopropanol 100%, Ethanol 96%, Ethanol 80%, Ethanol 70%, Ethanol 50%) in Aqua dest. Das Blocken der endogenen Peroxidase geschah analog zur Einfachfärbung für 20 Minuten in Methanol mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Antigendemaskierung für den ersten Teil der Doppelfärbung erfolgte durch 20-minütiges Erhitzen der Schnitte auf 98°C in einem Tris-Puffer (10 mM Tris, 1mM EDTA) im Ofen. Anschließend wurden die Schnitte für ca. 20 Min auf Raumtemperatur gekühlt.

Für die nun folgende immunhistochemische Doppelfärbung wurden die Inkubationen alle in einer feuchten Kammer durchgeführt; die Spülschritte in PBS mit 0,05% Tween-20. Zunächst wurden die unspezifischen Proteinbindungsvalenzen im Präparat durch Überdecken mit Ziegenserum (10%) für 10 Min abgesättigt. Nach vorsichtigem Entfernen der Flüssigkeit wurde ohne zu spülen der Primärantikörper gegen  $\alpha$ -SMA in einer Konzentration von 1:50 in 1%igem Ziegenserum für eine Stunde aufgebracht. Nach gründlichem Waschen in PBS mit Tween-20 wurde dann der biotinylierte Sekundärantikörper für 10 Min auf die Präparate gegeben. Anschließend folgten ein weiterer Waschschrift und danach das Aufbringen von Streptavidin-Alkalischer-Phosphatase für 20 Min. Als Substrat für das Enzym wurde nun das Chromogen NBT auf die Schnitte pipettiert und unter Lichtabschluss für 20 Min in der feuchten Kammer inkubiert. Zum Stoppen der Farbreaktion wurden die Schnitte in Aqua dest. mit 0,05% Tween-20 gespült. Die Färbung des Perizytenmarkers  $\alpha$ -SMA war damit abgeschlossen.

---

Zur Darstellung der Gefäßendothelien folgte nun eine zweite immunhistochemische Färbung des Markers CD34. Begonnen wurde mit einer erneuten Antigendemaskierung, diesmal für 3 x 5 Min im Tris-Puffer (10 mM Tris, 1mM EDTA) in der Mikrowelle. Anschließend folgte die 20-minütige Kühlung auf Raumtemperatur.

Wie bereits im ersten Teil der Färbung geschah das Absättigen der unspezifischen Proteinbindungsvalenzen durch eine 10-minütige Inkubation mit 10%igen Ziegenserum. Ohne zwischenzeitigen Spülschritt wurde danach je 100µl Primärantikörper gegen CD34 in einer Konzentration von 1:40 in Ziegenserum (1%) auf das Gewebe pipettiert und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem Waschschrift folgte dann die Beschichtung mit dem biotinylierten Sekundärantikörper mit 10-minütiger Inkubation. Anschließend erfolgten ein erneuter Waschschrift und das Überdecken der Schnitte mit Streptavidin-Peroxidase mit 10-minütiger Inkubationszeit. Nach einem weiteren Spülschritt konnte das Substrat für die Peroxidase, das Chromogen AEC, aufgebracht werden und für 10 Min auf den Schnitten belassen werden. Zum Stoppen der Farbreaktion wurde mit Aqua dest. mit 0,05% Tween-20 gespült. Die immunhistochemische Doppelfärbung war hiermit beendet und die Schnitte wurden abschließend mit Glyceringelantine eingedeckt.

#### 2.3.4 Analyse der Blutproben mittels ELISA

Die Analyse des Blutserums erfolgte mithilfe von kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay) der Firma R&D Systems. Mit dem jeweiligen Test wurden die Serumkonzentrationen der Angiogenesemediatoren VEGF und Angiopoietin-2 bestimmt. Bei allen durchgeführten Assays handelte es sich um Sandwich-ELISAs, bei denen die coating-Antikörper gegen das jeweilige Protein fest an die Mikrotiterplatte gebunden waren. Die Durchführung der Analysen geschah anhand der Gebrauchsinformation der kommerziellen Testkits.

Zunächst wurden alle Reagenzien und Serumproben auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurde der Standard vorbereitet und je nach Angiogenesemediator die Serumproben unterschiedlich verdünnt:

**Tabelle 6: Verdünnung der Serumproben**

Angiogenesemediator	Verdünnung
VEGF	keine Verdünnung
Ang-2	5-fach

Auf die 96-Well Platte wurde erst eine Pufferlösung aufgebracht und im Anschluss daran der Standard und die Serumproben, jeweils in doppelter Ausführung. Zur Bindung des löslichen Antigens an den coating-Antikörper folgte eine zweistündige Inkubations-

zeit bei Raumtemperatur auf einem Mikrottestplatten-Schüttler bei  $500 \pm 50$  rpm (revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute). In einem anschließenden Waschschrift wurden alle Wells durch Aspirieren mit einer Pipette vollständig entleert und mit Waschpuffer gefüllt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Im nächsten Schritt wurde in jede der Wells ein Antikörper-Konjugat gegeben, welches den mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase konjugierten Detektionsantikörper enthielt. Eine weitere Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler ermöglichte die Bindung des Detektionsantikörpers an das bereits gebundene Antigen, sodass ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entstand. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Wells mit der Substratlösung befüllt und für eine halbe Stunde unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Beendigung der Farbreaktion wurde die Stopplösung dazu gegeben. Mithilfe eines ELISA-Readers wurden die Farbintensitäten bei 450nm und 540nm gemessen und anhand der Standardkurve die Konzentrationen der Angiogenesemediatoren in den einzelnen Serumproben bestimmt.

## **2.4 Auswertung**

Alle mikroskopischen Auswertungen erfolgten an einem Diskussionsmikroskop der Firma Olympus, Modell BH2.

### **2.4.1 Quantitative mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen**

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte quantitativ. Es konnten zwei Parameter ermittelt werden: zum einen der Grad der Vaskularisierung anhand der in der CD34-Färbung dargestellten Blutgefäßen, zum anderen die Reife des Gefäßbettes anhand der Bestückung des Endothels mit Perizyten. Dies wurde in der Doppelfärbung von  $\alpha$ -SMA und CD34 sichtbar gemacht.

Vaskularisierungsdichte (Microvessel Density = MVD)

Das Tumorgewebe der kolorektalen Karzinome erwies sich als sehr heterogen bezüglich der Dichte der Gefäße. Zur Auswertung wurden daher zunächst bei kleinerer Vergrößerung (100fach) so genannte hot spots ausgesucht. Dies sind Stellen im Präparat, die eine lokale Anhäufung von Gefäßen darstellen. In jedem Präparat wurden fünf repräsentative hot spots ausgesucht und dann bei höherer Vergrößerung (400fach) die fünf Gesichtsfelder ausgezählt. Aus den fünf ermittelten Werten konnte nun ein Mittelwert bestimmt werden, der den Grad der Vaskularisierung widerspiegelt. Angegeben wird der Wert in Gefäße pro Gesichtsfeld (HPF = high power field). (Eberhard et al. 2000)

---

Blutgefäßmaturität (Microvessel Maturity = MVM)

In der immunhistochemischen Doppelfärbung wurden sowohl Endothelzellen der Gefäße als auch Perizyten dargestellt. Zur Auswertung wurden wiederum bei kleiner Vergrößerung (100fach) fünf repräsentative hot spots ausgewählt. Bei höherer Vergrößerung (400fach) wurden in diesen Bereichen zunächst die Blutgefäße gezählt und anschließend in den gleichen Gesichtsfeldern die Anzahl der Blutgefäße bestimmt, welche von Perizyten umgeben waren. Der daraus gebildete Quotient gibt den Anteil der Gefäße mit Perizytenbesatz an. Aus den fünf Werten, die aus fünf Gesichtsfeldern ermittelt wurden, wurde erneut ein Mittelwert bestimmt. Dieser gibt für jedes Präparat die mittlere Blutgefäßreife an und wird als Perizytenbesatz in Prozent angegeben.

#### **2.4.2 Auswertung der ELISAs**

Die Auswertung der ELISAs geschah mithilfe des Mikroplatten Spektralphotometers  $\mu$ Quant der Firma Bio-Tek Instruments und des dazu gehörigen Computerprogramms KC4. Für jeden Angiogenesefaktor wurden pro Blutprobe je zwei Werte ermittelt. Aus diesen beiden gemessenen Werten wurde der Mittelwert bestimmt. So wurde pro Patient bzw. pro Blutprobe je einen Wert für VEGF und Ang-2 im Serum bestimmt.

#### **2.4.3 Statistik**

Alle statistischen Berechnungen wurden mithilfe des Computerprogramms SPSS 17.0 für Windows durchgeführt. Das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben wurden mit der Kaplan-Meier Methode bestimmt. Der Vergleich zwischen zwei Gruppen bezüglich der Überlebenszeit wurde mit dem log-rank-Test durchgeführt. Hazard Ratios wurden mit dem Cox Regressions-Modell bestimmt. Weitere Vergleiche zwischen unterschiedlichen Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-Test, dem Kruskal-Wallis-Test und dem  $\chi^2$ -Test angestellt. Bei allen statistischen Tests handelte es sich um zweiseitige Tests. Statistische Signifikanz wurde für einen p-Wert  $p < 0,05$  festgelegt.

---

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Patientenkollektiv-Charakteristika

Zur Analyse der Daten wurden die drei oben beschriebenen Patientenkollektive A, B und C zunächst zusammen betrachtet. Es entstand so ein Gesamtkollektiv von 90 Patienten mit kolorektalem Karzinom. Dem gegenüber gestellt wurde ein Kollektiv bestehend aus 33 gesunden Probanden. Die Patientencharakteristika werden in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7: Patientencharakteristika Gesamtkollektiv**

	N (%)
Patienten	90 (100)
Geschlecht	
m	54 (60)
w	36 (40)
Alter	
Median (Jahre)	69
Spanne (Jahre)	45 - 86
< 65 Jahre	31 (34,4)
≥ 65 Jahre	59 (65,6)
UICC-Stadium	
I	3 (3,3)
II	30 (33,3)
III	15 (16,7)
IV	42 (46,7)
Chemotherapie	
nicht nachverfolgt	56 (62,2)
nachverfolgt	34 (37,8)
5-FU/LV + BV	1 (1,1)
FOLFOX + BV	4 (4,4)
FOLFIRI + BV	13 (14,3)
XELOX + BV	6 (6,7)
XELIRI + BV	9 (10,9)
CAP + BV	1 (1,1)

BV: Bevacizumab, 5-FU/LV: 5-Fluorouracil/Leukovorin, FOLFOX: 5-FU/LV/Oxaliplatin, FOLFIRI: 5-FU/LV/Irinotecan, XELOX: Capecitabin/Oxaliplatin, XELIRI: Capecitabin/Irinotecan, CAP: Capecitabin

Die 54 Männer und 36 Frauen wiesen beim Einschluss in die Studie ein medianes Alter von 69 Jahren auf, wobei die Altersspanne 45 bis 86 Jahre umfasste. Das Gesamtkollektiv bestand aus Patienten mit allen Tumorstadien, die Hauptanzahl der Patienten befand sich allerdings im UICC-Tumorstadium IV. Diese Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom wurden einer kombinierten Chemotherapie mit dem Angiogenese-Inhibitor Bevacizumab unterzogen. 74 Prozent der Patienten waren noch nicht vortherapiert, wohingegen neun Patienten bereits im Vorfeld eine Chemotherapie ohne Bevacizumab erhalten hatten. Die einzelnen Therapieregime werden in Tabelle 7 ersichtlich. 34 Patienten wurden während und nach der Bevacizumab enthaltenden Therapie beobachtet, um den Verlauf der Krankheit im Hinblick auf die klinischen Endpunkte Ansprechrate, progressionsfreies- und Gesamtüberleben dokumentieren zu können. Im Mittel geschah dieses Follow-up über einen Zeitraum von 16,6 Monaten. 19 dieser nachverfolgten Patienten sprachen auf die Therapie an, die restlichen 15 Patienten zeigten entweder einen stabilen Krankheitsverlauf oder einen Progress. Das mediane Gesamtüberleben war nach dem angegebenen Beobachtungszeitraum noch nicht erreicht, es lebten noch 25 der 34 Patienten (siehe Abbildung 1). Das mediane progressionsfreie Überleben der 34 nachverfolgten Patienten betrug 12,1 Monate (siehe Abbildung 2). Weiterführende Berechnungen erbrachten keine Hinweise auf statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Ansprechrate, des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens zwischen den verschiedenen Patientenkollektiven. Ebenso zeigten unterschiedliches Geschlecht oder verschiedene Altersgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

---

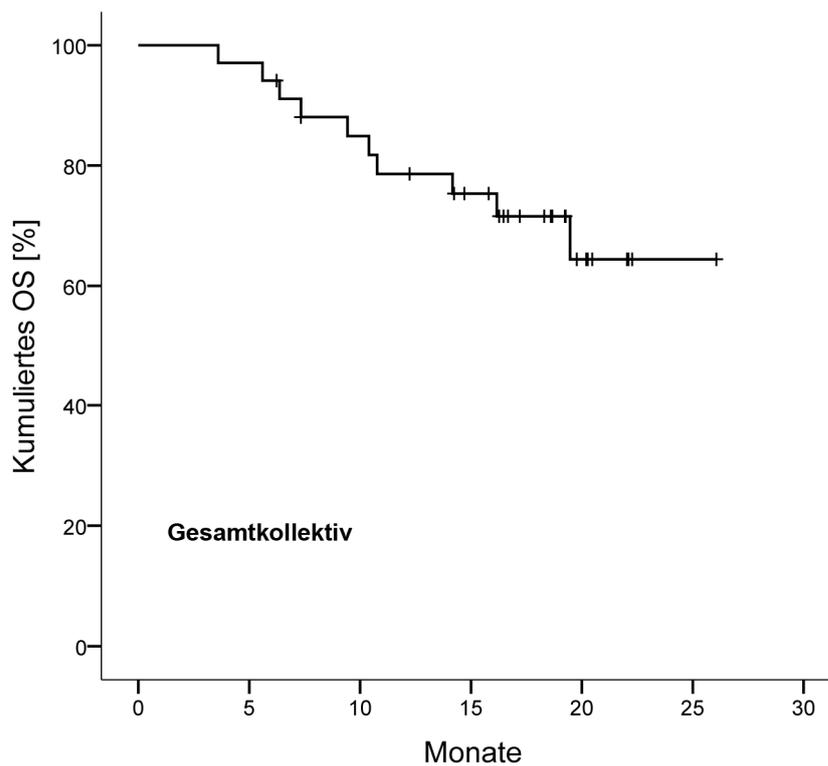


Abbildung 1: Gesamtüberleben (OS) des Gesamtkollektivs der Patienten mit kolorektalem Karzinom nach Bevacizumab-haltiger Therapie.

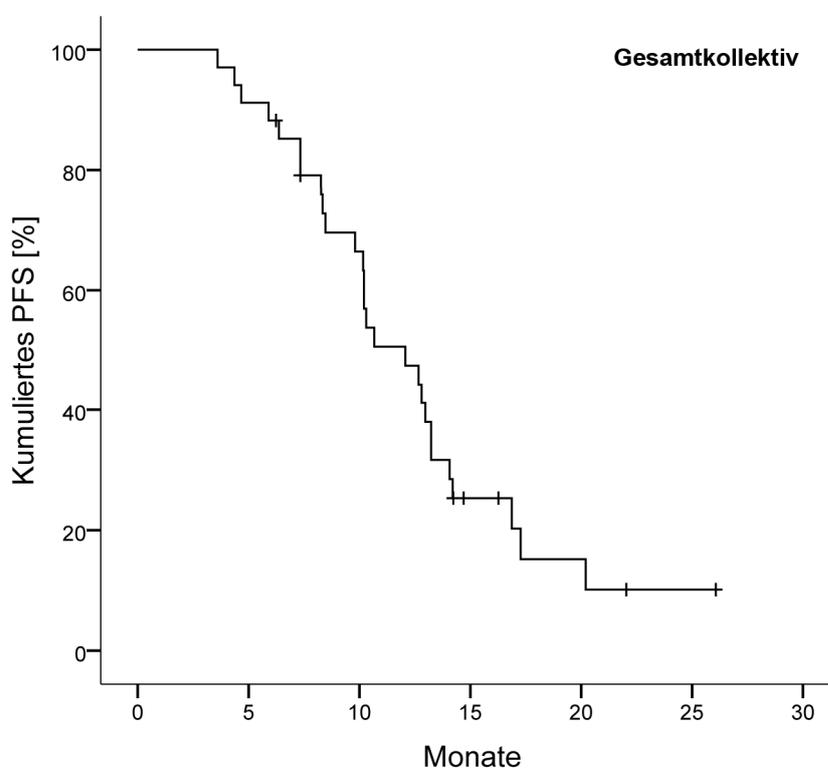


Abbildung 2: Progressionsfreies Überleben (PFS) des Gesamtkollektivs der Patienten mit kolorektalem Karzinom nach Bevacizumab-haltiger Therapie.

## 3.2 Histopathologische Biomarker

### 3.2.1 Vaskularisierungsdichte (MVD)

Die Vaskularisierungsdichte oder auch Microvessel Density (MVD) des kolorektalen Karzinoms wurde anhand von immunhistochemischen Färbungen von Tumorschnitten analysiert. Die Gefäße wurden mit einem Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD34 angefärbt und mikroskopisch quantifiziert. Zur Vereinheitlichung der Auswertung wurden stets sogenannte hot spots, also Regionen im Tumor mit höchster Gefäßdichte, ausgewählt. Beispielhaft soll die immunhistochemische Darstellung der Vaskularisierungsdichte in Abbildung 4 illustriert werden.

Die mittlere Gefäßdichte bei Patienten mit kolorektalem Karzinom betrug 35/HPF (Standardabweichung:  $\pm 13$ /HPF) bei einer Spannweite von 82/HPF (Minimum 11/HPF, Maximum 93/HPF). Ein signifikanter Unterschied zwischen den UICC-Tumorstadien ließ sich nicht erkennen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung: Stadium I:  $34 \pm 3$  vs. Stadium II:  $31 \pm 9$  vs. Stadium III:  $36 \pm 12$  vs. Stadium IV:  $40 \pm 17$ /HPF,  $p=0,365$ ), wie Abbildung 3 zeigt. Unterschiede hinsichtlich des Geschlechts oder Alters der Patienten konnten nicht gezeigt werden.

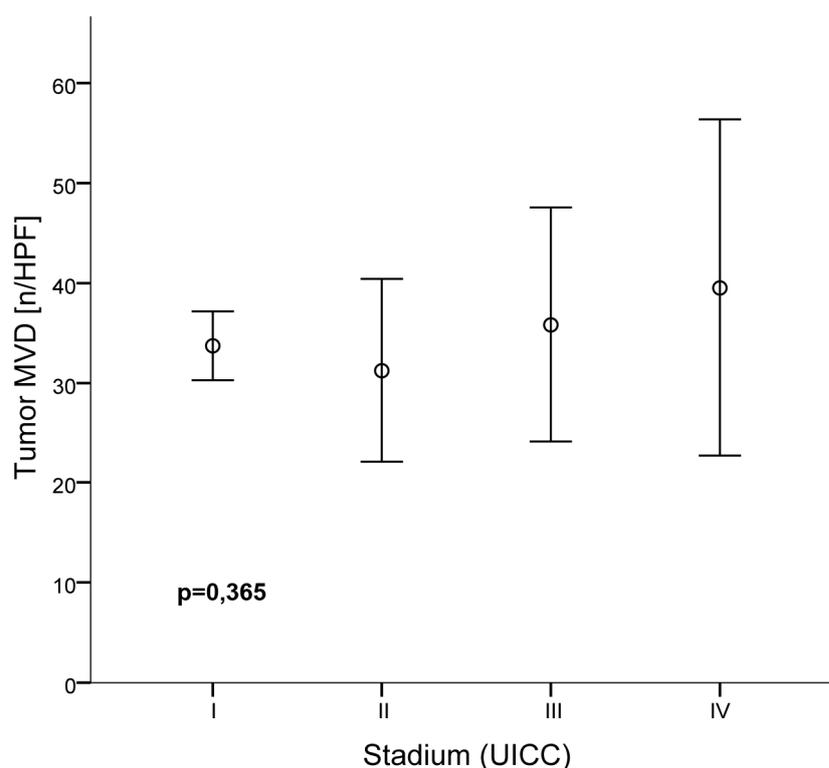


Abbildung 3: Tumor Vaskularisierungsdichte (MVD) in den UICC-Stadien I-IV des kolorektalen Karzinoms (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), ermittelt durch immunhistochemische Einfachfärbung von CD34.

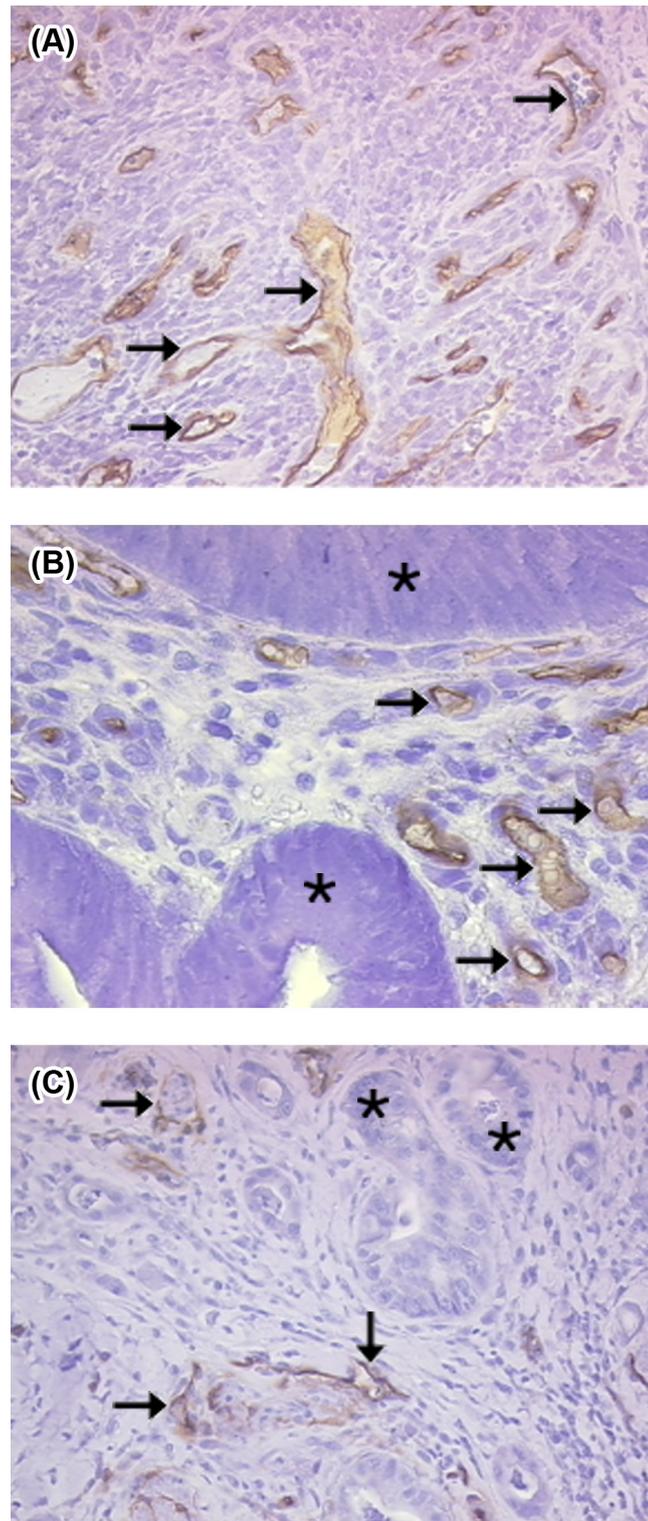


Abbildung 4: **Immunohistochemische Darstellung der Vaskularisierungsdichte.** Darstellung der Vaskularisierungsdichte (MVD) mittels immunohistochemischer Einfachfärbung gegen CD34 (Endothelzellen). Die Blutgefäße imponieren als rot gefärbte lumenhaltige Strukturen (gekennzeichnet durch →). (A) Beispiel einer hohen MVD in einem hot spot bei 400facher Vergrößerung. (B) Detailansicht eines Blutgefäßes bei höherer Vergrößerung (600fach). Tumorzellverbände sind mit \* markiert. (C) Beispiel einer niedrigen MVD in einem hot spot bei 400facher Vergrößerung.

### 3.2.2 Blutgefäßmaturität (MVM)

Die Blutgefäßreife des kolorektalen Karzinoms wurde ebenfalls durch immunhistochemische Färbungen der Tumorpräparate dargestellt. Eine Doppelfärbung von CD34 für die Gefäßendothelien zusammen mit  $\alpha$ -SMA für die umgebenden Perizyten wurde angefertigt und mikroskopisch ausgewertet. Auch hier wurden für die Quantifizierung hot spots als repräsentative Areale im Tumor ausgewählt. Die Fotos der Abbildung 6 zeigen beispielhaft die immunhistochemische Doppelfärbung. Es zeigte sich eine große Spannweite von 83 Prozent (Minimum: 10 %, Maximum: 93 %) bei einem Mittelwert von 55 % (Standardabweichung:  $\pm 22$  %). Mit fortschreitendem Tumorstadium nahm der Perizytenbesatz und damit die Gefäßreife signifikant ab (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung: Stadium I:  $76 \pm 10$  vs. Stadium II:  $62 \pm 21$  vs. Stadium III:  $47 \pm 24$  vs. Stadium IV:  $51 \pm 21$ %,  $p=0,041$ ). Die Abbildung 5 zeigt die graphische Darstellung dieser Tatsache. Eine Korrelation zwischen Gefäßdichte (MVD) und Gefäßreife (MVM) konnte nicht gezeigt werden (siehe Abbildung 11A). Eine Korrelation der Gefäßreife mit dem Alter oder dem Geschlecht bestand nicht.

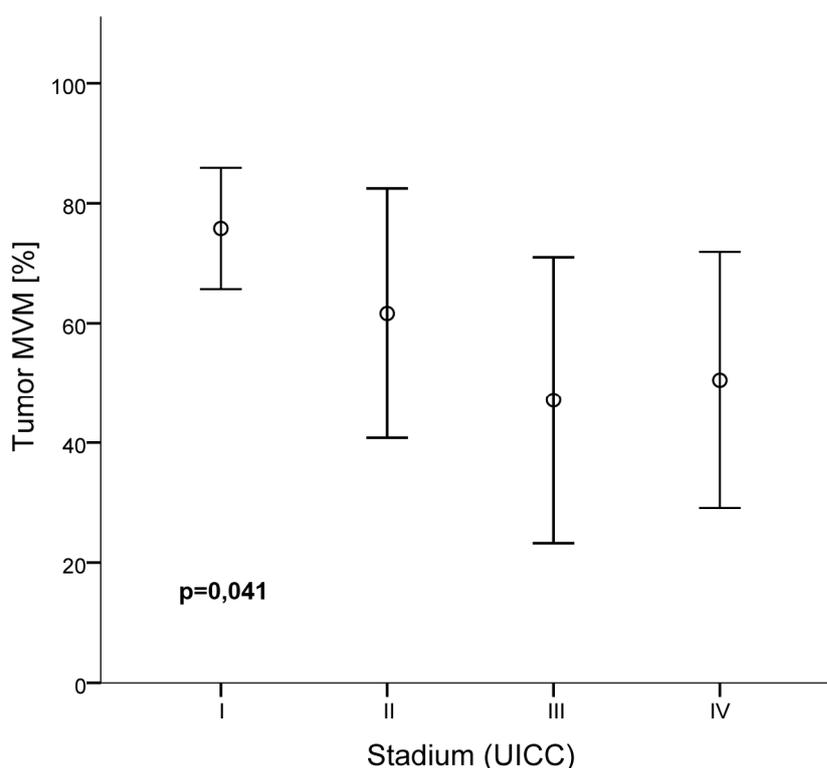


Abbildung 5: Tumor Gefäßmaturität (MVM) in den UICC-Stadien I-IV des kolorektalen Karzinoms (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), ermittelt durch immunhistochemische Doppelfärbung von CD34 und  $\alpha$ -SMA.

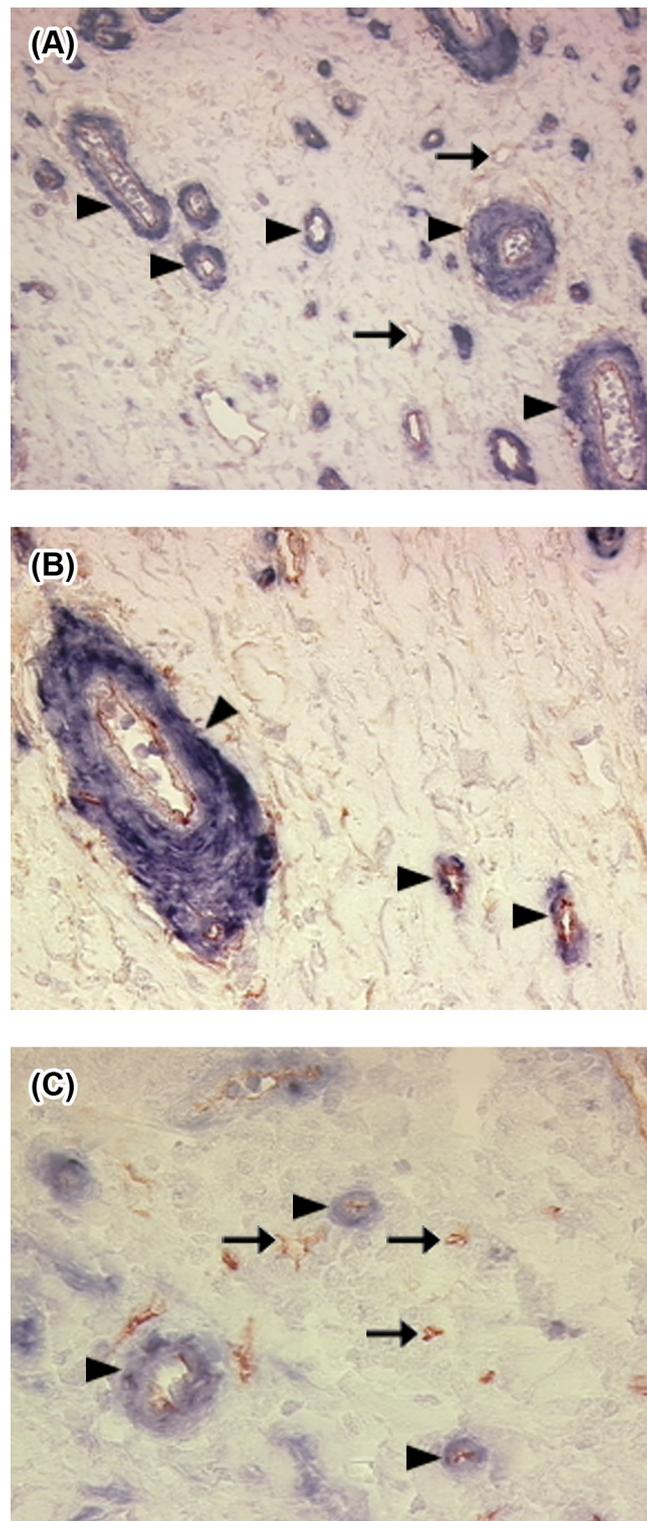


Abbildung 6: **Immunhistochemische Darstellung der Gefäßmaturität.**

Darstellung des Perizytenbesatzes (MVM) mittels immunhistochemischer Doppelfärbung gegen CD34 (Endothelzellen) und  $\alpha$ -SMA (Perizyten). Die Endothelzellen stellen sich als ringförmige rote Struktur dar (gekennzeichnet durch  $\rightarrow$ ), die Perizyten bilden einen blauen Ring (markiert mit  $\blacktriangleright$ ) um die Endothelzellen herum. (A) Beispiel eines hohen Perizytenbesatzes (MVM) in einem hot spot bei 400facher Vergrößerung. Fast alle Gefäße sind von Perizyten bedeckt. (B) Detailansicht bei höherer Vergrößerung (600fach). (C) Beispiel einer geringen MVM in einem hot spot bei 400facher Vergrößerung. Viele Gefäße weisen keinen Perizytenbesatz auf.

### 3.3 Serum Biomarker

Die Serumproben der Patienten mit kolorektalem Karzinom wurden mittels ELISA analysiert. Alle Analysen wurden vor Beginn einer systemischen Chemotherapie durchgeführt, es handelt sich folglich stets um prätherapeutische Werte. Das Interesse galt hier den Angiogenesemediatoren, die vom Tumor selbst oder vom Tumorstroma produziert und sezerniert werden und so in den systemischen Kreislauf gelangen. Bei den beiden untersuchten Faktoren handelte es sich zum einen um VEGF, gegen den sich der Angiogenese-Hemmer Bevacizumab richtet. Zum anderen um Angiopoietin-2, welches eine zentrale regulatorische Rolle im Prozess der Tumorangiogenese spielt.

Zunächst wurden die einzelnen Tumorstadien des kolorektalen Karzinoms bezüglich der Angiogeneseparameter verglichen. Anschließend folgte der Vergleich der KRK Patienten mit der gesunden Kontrollgruppe. Auch hier konnte für beide gemessenen Faktoren ein Zusammenhang mit Alter oder Geschlecht der Patienten nicht dargestellt werden.

#### 3.3.1 VEGF

Die mittlere Serumkonzentration des Angiogenesemediators VEGF betrug bei Patienten mit kolorektalem Karzinom 0,30 ng/ml (Standardabweichung:  $\pm 0,29$  ng/ml). Die gemessenen Werte lagen in einer sehr großen Spannweite zwischen 0,15 ng/ml und 1,52 ng/ml. Zwischen den einzelnen Tumorstadien gab es keinen signifikanten Unterschied der VEGF-Konzentrationen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung: Stadium I:  $0,22 \pm 0,09$  vs. Stadium II:  $0,32 \pm 0,34$  vs. Stadium III:  $0,37 \pm 0,33$  vs. Stadium IV:  $0,26 \pm 0,24$  ng/ml,  $p=0,597$ ), was durch Abbildung 7 veranschaulicht wird. Der anschließende Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe führte ebenfalls nicht zu statistisch signifikanten Unterschieden zwischen Tumorpatienten und gesunden Probanden. Der Mittelwert der Kontrollgruppe betrug 0,24 ng/ml (Standardabweichung:  $\pm 0,19$  ng/ml). Selbst Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom im Stadium IV zeigten im Vergleich zu Gesunden keine erhöhten VEGF-Konzentrationen (siehe Abbildung 8). Es konnten keine Korrelationen zwischen VEGF, Gefäßdichte (MVD) und Gefäßreife (MVM) nachgewiesen werden, was in den Abbildung 11B und C dargestellt wird.

---

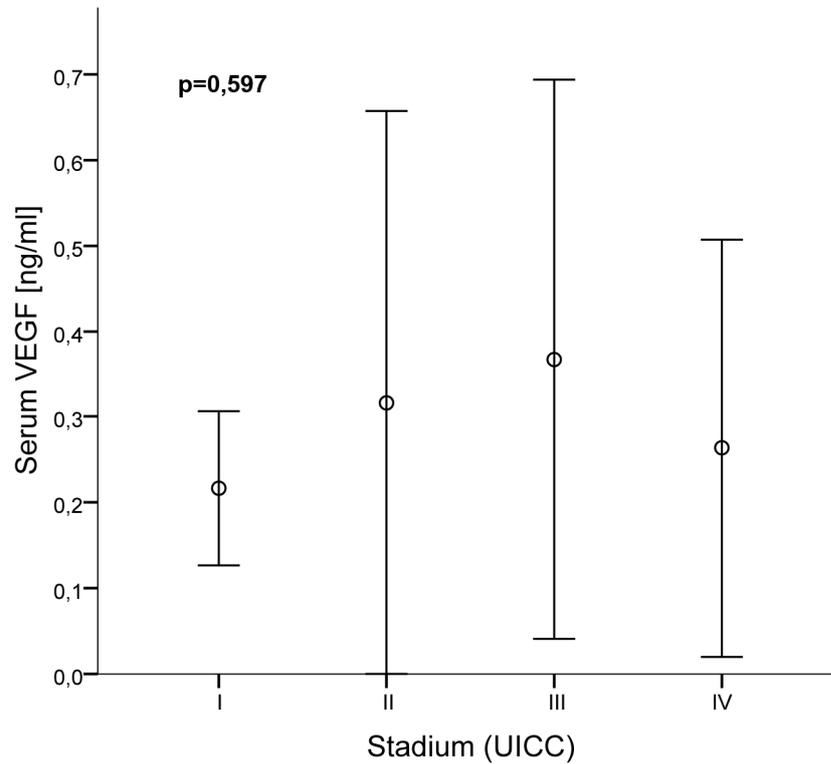


Abbildung 7: Serumkonzentrationen von VEGF in den UICC-Stadien I-IV des kolorektalen Karzinoms (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), ermittelt durch ELISA.

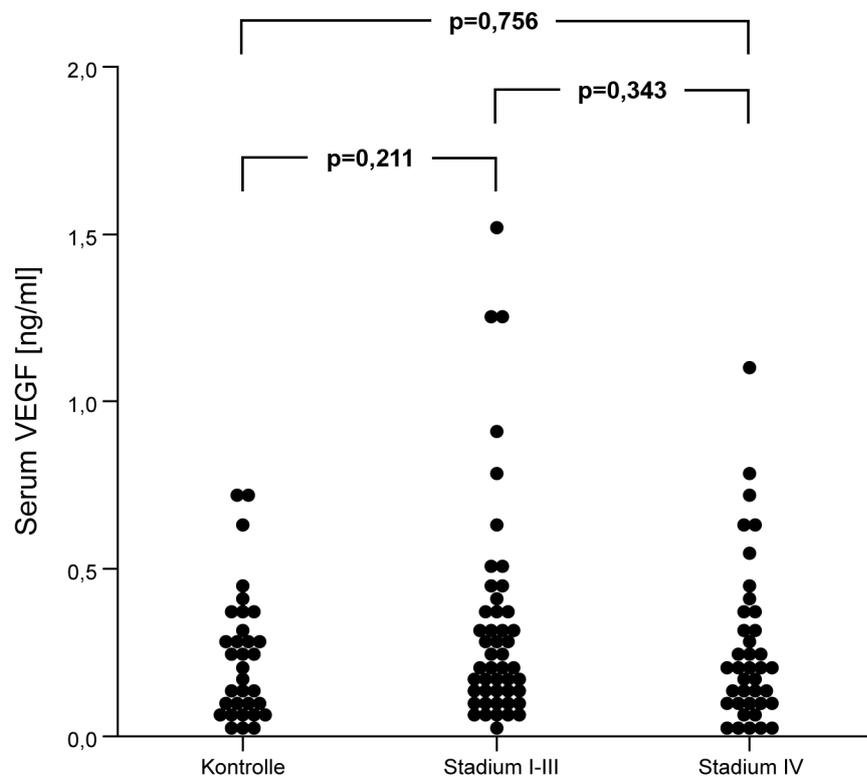


Abbildung 8: Serumkonzentrationen von VEGF im gesunden Kontrollkollektiv, bei Patienten mit nicht metastasiertem kolorektalen Karzinom (UICC-Stadien I-III) und bei Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom (UICC-Stadium IV), ermittelt durch ELISA.

### 3.3.2 Angiopoietin-2

Die Serumwerte des Angiopoietin-2 lagen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom in einem Bereich von 0,7 bis 12,1 ng/ml, bei einem Mittelwert von 3,1 ng/ml (Standardabweichung:  $\pm 2,2$  ng/ml). Im Vergleich dazu betrug die mittlere Ang-2-Konzentration im Serum von gesunden Kontrollpersonen 2,4 ng/ml (Standardabweichung:  $\pm 0,9$  ng/ml). Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium zeigten erhöhte Ang-2-Konzentrationen verglichen mit Patienten in einem frühen Stadium. (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung: Stadium I:  $1,7 \pm 0,3$  vs. Stadium II:  $2,5 \pm 1,3$  vs. Stadium III:  $2,2 \pm 1,1$  vs. Stadium IV:  $3,9 \pm 2,7$  ng/ml,  $p=0,005$ ). Die graphische Darstellung hierzu folgt in Abbildung 9. Die größte Variabilität zeigte sich bei Patienten mit metastasiertem KRK im Stadium IV. Bei diesen Patienten ließen sich signifikant höhere Ang-2-Konzentrationen nachweisen, als bei Patienten in den Stadien I-III ( $3,9$  vs.  $2,3$  ng/ml,  $p=0,001$ ). Beim Vergleich zwischen Patienten im Stadium IV und der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung des Ang-2 bei den Patienten mit metastasiertem KRK ( $3,9$  vs.  $2,4$  ng/ml,  $p=0,006$ ). Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Ang-2-Werte der Patienten im Stadium I-III nicht signifikant von denen der gesunden Probanden. Die Veranschaulichung dieser Ergebnisse findet sich in Abbildung 10. Weiterhin zeigten sich keine Korrelationen von Ang-2-Werten mit VEGF-Serumkonzentrationen, Gefäßdichte und Gefäßreife (siehe Abbildung 11D, E und F).

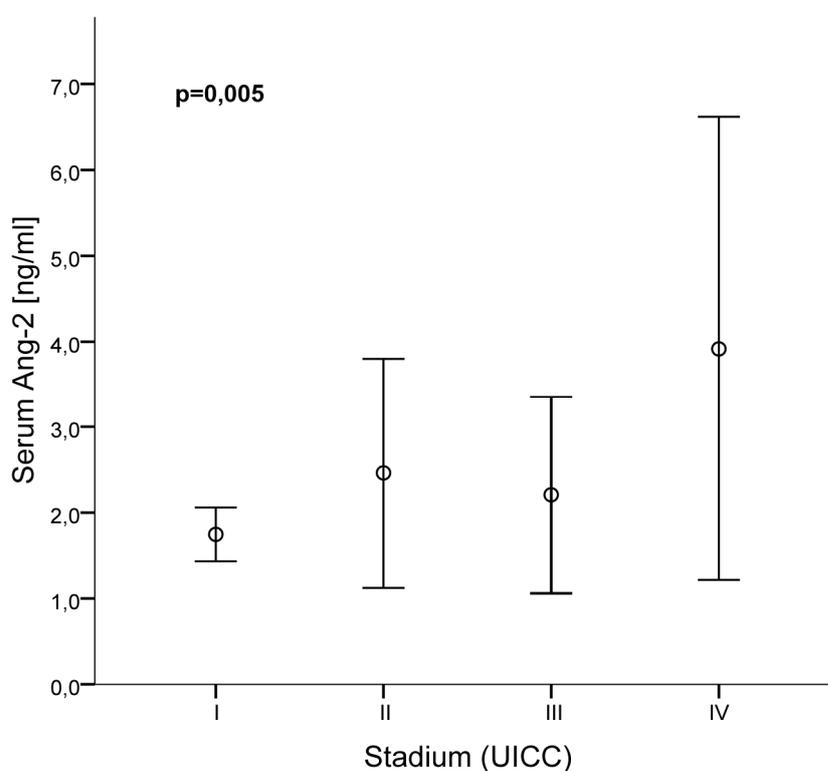


Abbildung 9: Serumkonzentrationen von Ang-2 in den UICC-Stadien I-IV des kolorektalen Karzinoms (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), ermittelt durch ELISA.

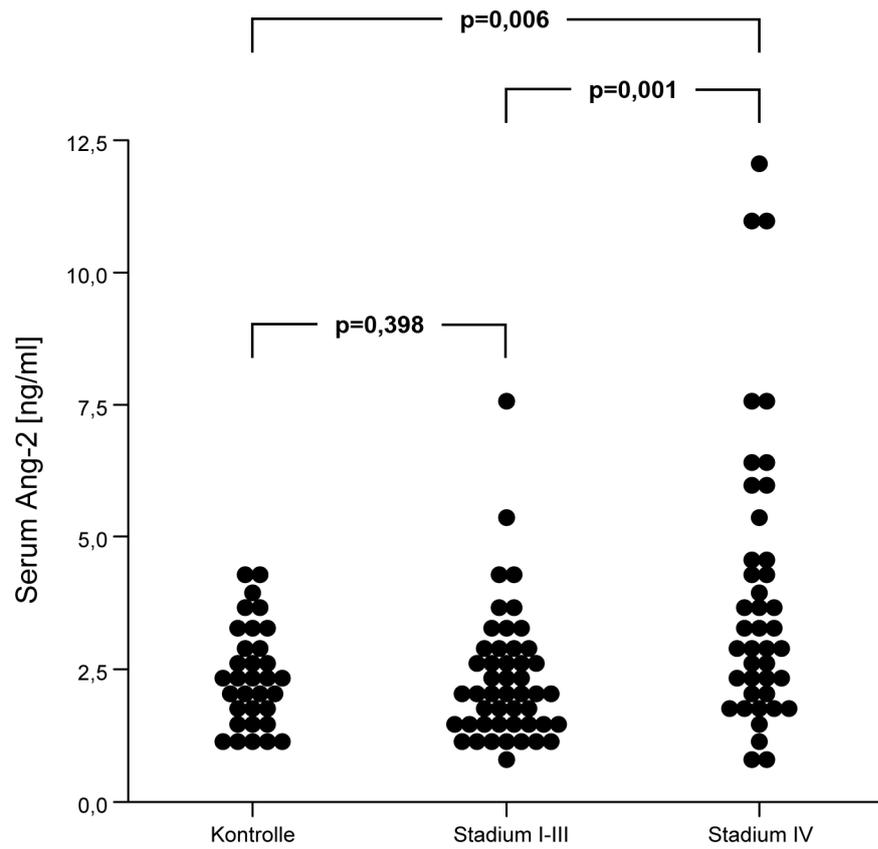


Abbildung 10: Serumkonzentrationen von Ang-2 im gesunden Kontrollkollektiv, bei Patienten mit nicht metastasiertem kolorektalen Karzinom (UICC-Stadien I-III) und bei Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom (UICC-Stadium IV), ermittelt durch ELISA.

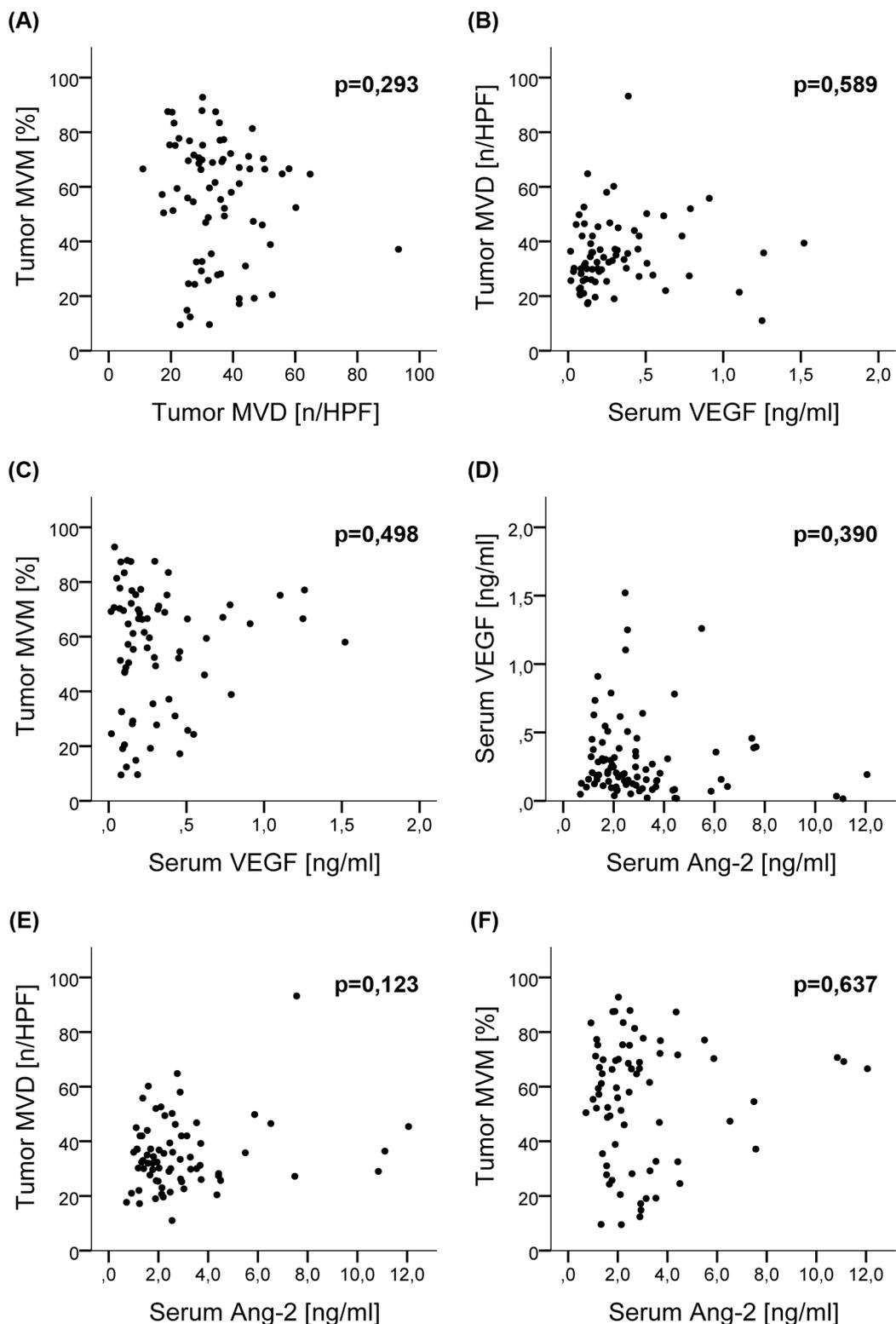


Abbildung 11: Korrelationen zwischen den Tumor- und Serumparametern. (A) Vaskularisierungsdichte und Gefäßmaturität, (B) Serumkonzentration von VEGF und Vaskularisierungsdichte, (C) Serumkonzentration von VEGF und Gefäßmaturität, (D) Serumkonzentration von Ang-2 und Serumkonzentration von VEGF, (E) Serumkonzentration von Ang-2 und Vaskularisierungsdichte, (F) Serumkonzentration von Ang-2 und Gefäßmaturität.

### 3.4 Gesamtüberleben

Ein Teil der untersuchten Patienten wurde palliativ mit einer kombinierten Chemotherapie mit Bevacizumab behandelt. Dieses Kollektiv bestand aus 34 Patienten und wurde während und nach der Therapie in Form eines durchschnittlich mehr als 16 monatigen Follow-ups im Hinblick auf die klinischen Endpunkte progressionsfreies- und Gesamtüberleben beobachtet. Bei diesen 34 Patienten wurden Gefäßdichte (MVD), Gefäßreife (MVM), Serum-VEGF und Serum-Ang-2 in Bezug zur Dauer des Gesamtüberlebens gesetzt. Dazu wurden die Patienten jeweils in zwei Subgruppen dichotomisiert, wobei der Median des jeweiligen Parameters den Trennwert darstellte. Bei der Gefäßdichte entstanden so eine Gruppe mit geringer und eine mit hoher MVD ( $<42/\text{HPF}$  vs.  $\geq 42/\text{HPF}$ ). Der entsprechende Median der MVM betrug 47 % und teilte die Gruppe in Tumore mit unreifen bzw. reifen Gefäßen. Für die Dichotomisierung in Subgruppen hinsichtlich der Serummediatoren wurde jeweils der prätherapeutische Median genutzt. VEGF-Werte kleiner als 0,19 ng/ml wurden als niedrig eingestuft, ein Wert größer oder gleich 0,19 ng/ml als hoch. Analog dazu wurden die Patienten in eine Gruppe mit niedriger Ang-2-Konzentration ( $< 3,5$  ng/ml) und eine Gruppe mit hoher Ang-2-Konzentration ( $\geq 3,5$  ng/ml) aufgeteilt.

Das Gesamtüberleben bei Patienten mit einer niedrigen prätherapeutischen Ang-2-Konzentration war signifikant länger als das von Patienten mit hohem Ang-2 im Serum ( $p=0,004$ ). Das mediane Gesamtüberleben der Patienten mit einem Ang-2-Wert  $< 3,5$  ng/ml war zum Ende des Beobachtungszeitraums noch nicht erreicht, wohingegen Patienten mit einem höheren Ang-2-Wert ein medianes Gesamtüberleben von 16,2 Monaten aufwiesen. Die Überlebensraten nach 1,5 Jahren betrugen 94 % in der Subgruppe mit niedrigem Ang-2, im Gegensatz zu 53 % in der Subgruppe mit hohem Ang-2. Das Sterberisiko war für Patienten mit niedrigem Ang-2 um 91% geringer als bei Patienten in der Subgruppe mit hohem Ang-2 (Hazard Ratio: 0,09, 95%-KI 0,01 – 0,70,  $p=0,02$ ).

Diese statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Subgruppe mit hohem und der mit niedrigem Ang-2 blieben auch dann bestehen, wenn der Trennwert variiert wurde. Analysen mit unterschiedlichen Werten zwischen 3,0 und 4,0 ng/ml lieferten ähnliche Resultate. Weiterhin wurden die Analysen für die primären kolorektalen Karzinome und die Rezidive separat durchgeführt. Auch hier konnten gleiche Ergebnisse erzielt werden.

Im Gegensatz zu diesen Resultaten des Angiopoietin-2 konnten die übrigen untersuchten Parameter MVD, MVM und VEGF keine signifikanten Ergebnisse liefern. Die Subgruppen unterschieden sich nicht im Gesamtüberleben. Die nachfolgenden Grafiken (Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14 und Abbildung 15) zeigen das Gesamtüber-

leben in Form von Kaplan-Meier-Kurven. Für alle vier untersuchten Mediatoren werden jeweils die zwei oben beschriebenen Subgruppen dargestellt.

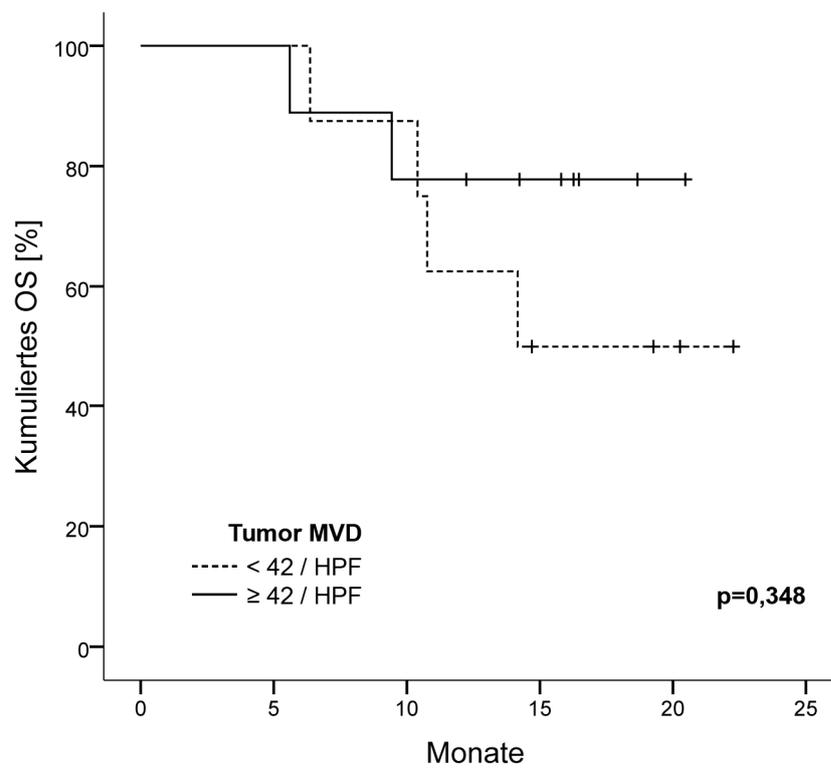


Abbildung 12: Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit kolorektalem Karzinom nach Bevacizumab-haltiger Therapie, aufgeteilt in zwei Subgruppen bezüglich der Tumor Vaskularisierungsdichte (MVD).

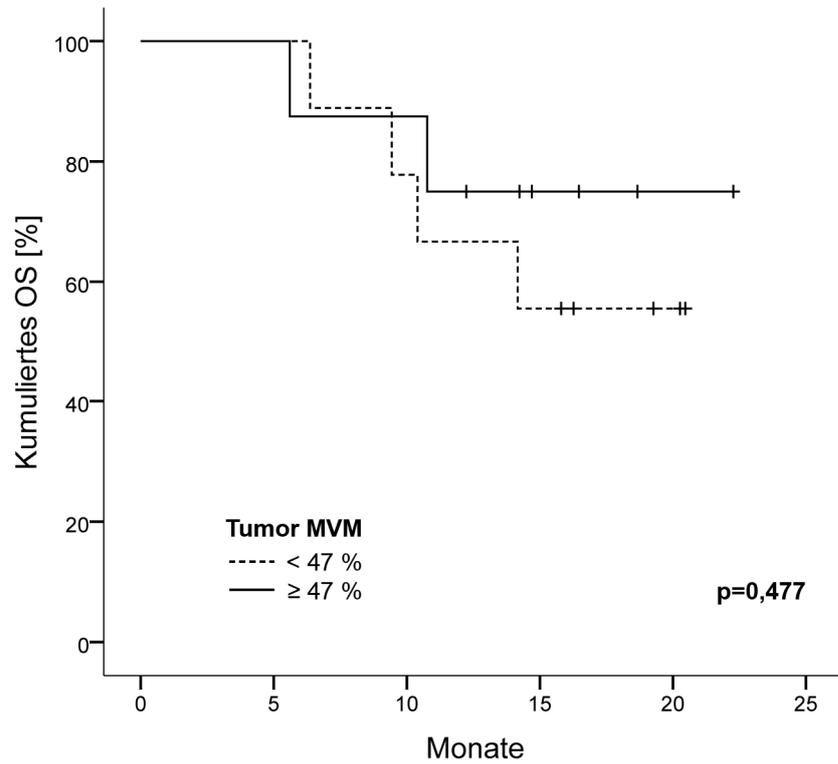


Abbildung 13: Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit kolorektalem Karzinom nach Bevacizumab-haltiger Therapie, aufgeteilt in zwei Subgruppen bezüglich der Tumor Gefäßmaturität (MVM).

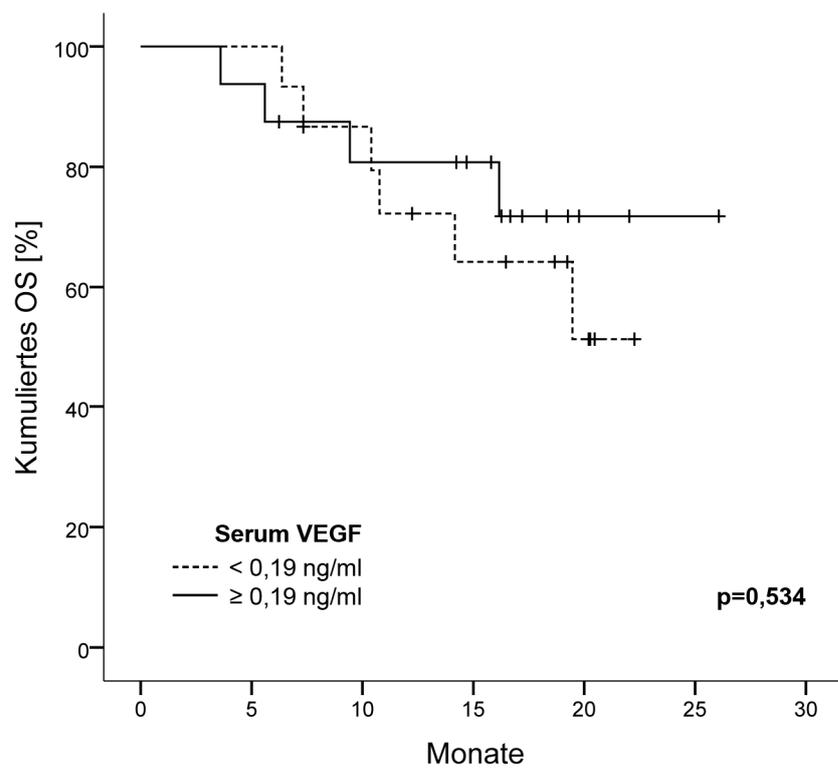


Abbildung 14: Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit kolorektalem Karzinom nach Bevacizumab-haltiger Therapie, aufgeteilt in zwei Subgruppen bezüglich der Serum VEGF-Konzentration.

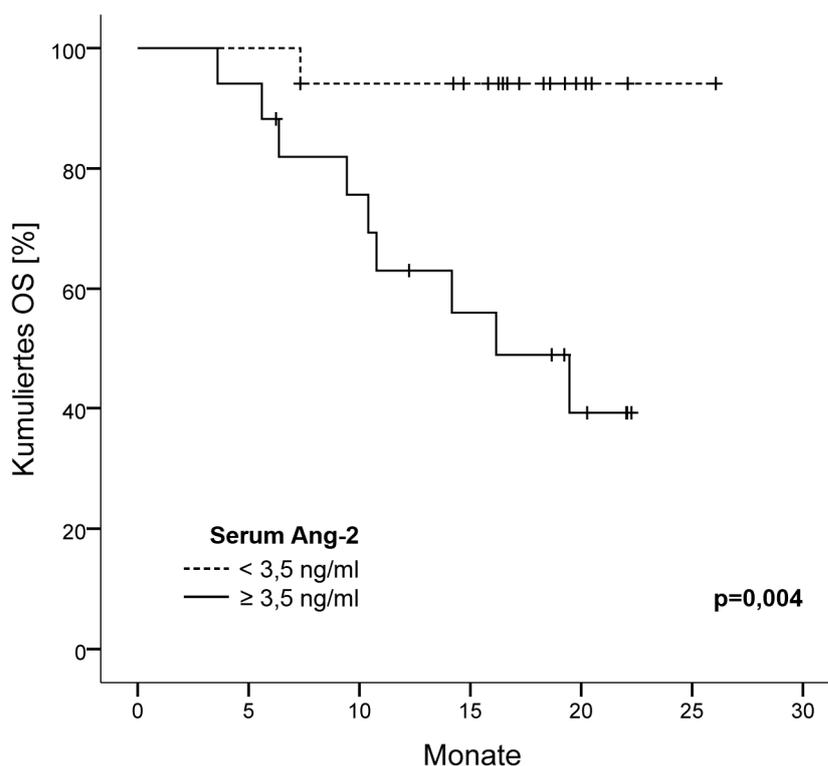


Abbildung 15: Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit kolorektalem Karzinom nach Bevacizumab-haltiger Therapie, aufgeteilt in zwei Subgruppen bezüglich der Serum Ang-2-Konzentration.

### 3.5 Progressionsfreies Überleben

Analog zu den oben beschriebenen Analysen zum Gesamtüberleben wurde mit dem „progressionsfreien Überleben“ (PFS = progression-free survival) verfahren. Auch hier wurden die vier Parameter MVD, MVM, VEGF und Ang-2 untersucht. Die Patienten wurden erneut anhand des jeweiligen Medians in Subgruppen geteilt.

Wiederum liefert Angiotensin-2 die interessantesten Ergebnisse, auch bezüglich des progressionsfreien Überlebens. Patienten mit einem niedrigen prätherapeutischen Ang-2-Level zeigten eine bessere Krankheitskontrolle, als diejenigen mit einem hohen Ang-2-Wert im Serum. Der Progress der Krankheit bei einer Ang-2-Konzentration < 3,5 ng/ml fand im Median nach 14,1 Monaten statt. Im Vergleich dazu wurde die Patienten mit einem Ang-2-Wert  $\geq 3,5$  ng/ml bereits nach 8,5 Monaten progredient. ( $p=0,009$ ). Somit verlängerte sich das progressionsfreie Überleben bei Patienten mit niedrigem Ang-2 um mehr als 5 Monate im Vergleich zu Patienten mit hohem Ang-2. Das Risiko einen Progress zu erleiden war für Patienten mit niedrigem Ang-2 um 63 % geringer als für Patienten mit hohem Ang-2 (Hazard Ratio: 0,37, 95%-KI: 0,17 – 0,80,  $p=0,01$ ).

Im Vergleich dazu konnten die Subgruppen für MVD, MVM und VEGF keinen Unterschied im progressionsfreien Überleben aufzeigen. Die folgenden Grafiken (Abbildung

16, Abbildung 17, Abbildung 18 und Abbildung 19) illustrieren das progressionsfreie Überleben für die jeweiligen Untergruppen der untersuchten Mediatoren.

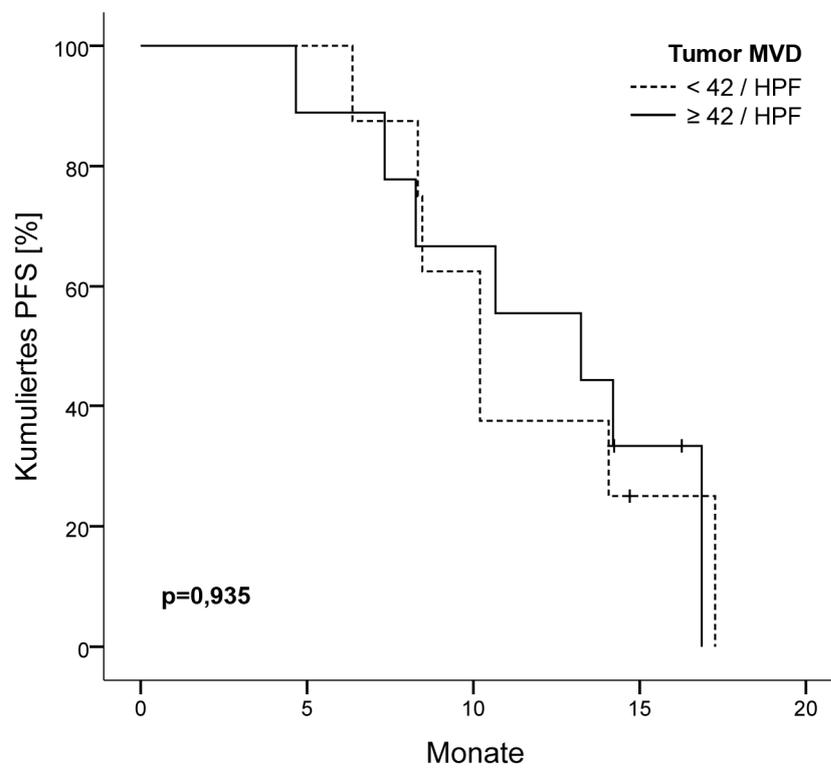


Abbildung 16: Progressionsfreies Überleben (PFS) der Patienten mit kolorektalem Karzinom nach Bevacizumab-haltiger Therapie, aufgeteilt in zwei Subgruppen bezüglich der Tumor Vaskularisierungsdichte (MVD).

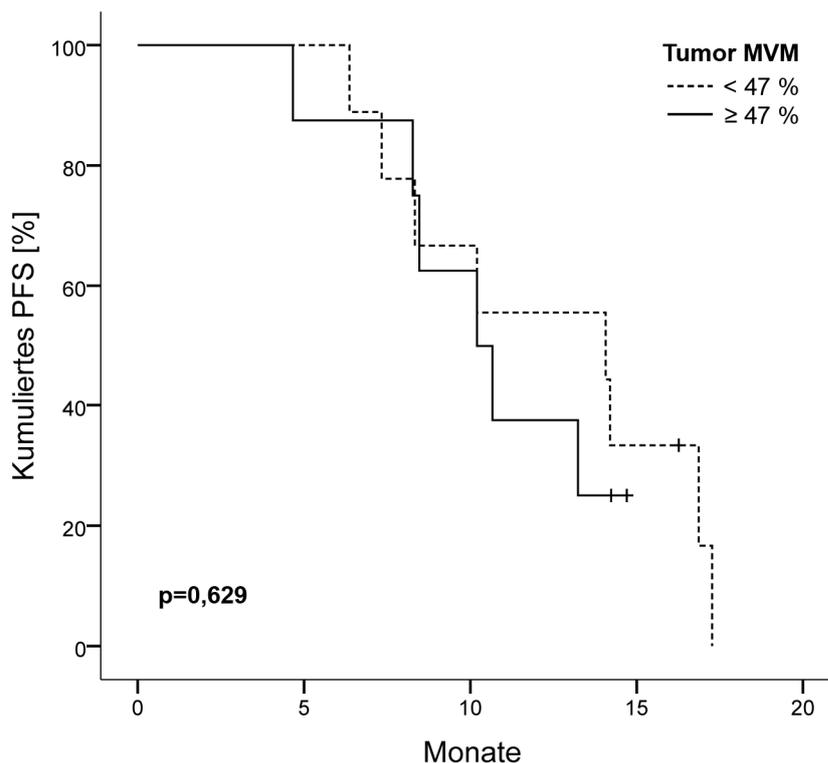


Abbildung 17: Progressionsfreies Überleben (PFS) der Patienten mit kolorektalem Karzinom nach Bevacizumab-haltiger Therapie, aufgeteilt in zwei Subgruppen bezüglich der Tumor Gefäßmaturität (MVM).

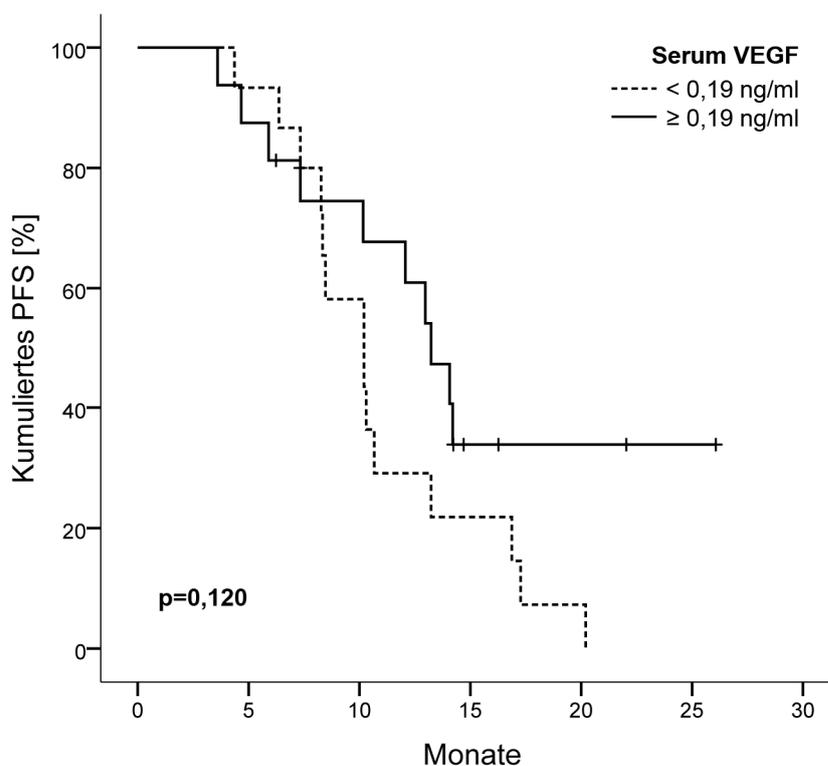


Abbildung 18: Progressionsfreies Überleben (PFS) der Patienten mit kolorektalem Karzinom nach Bevacizumab-haltiger Therapie, aufgeteilt in zwei Subgruppen bezüglich der Serum VEGF-Konzentration.

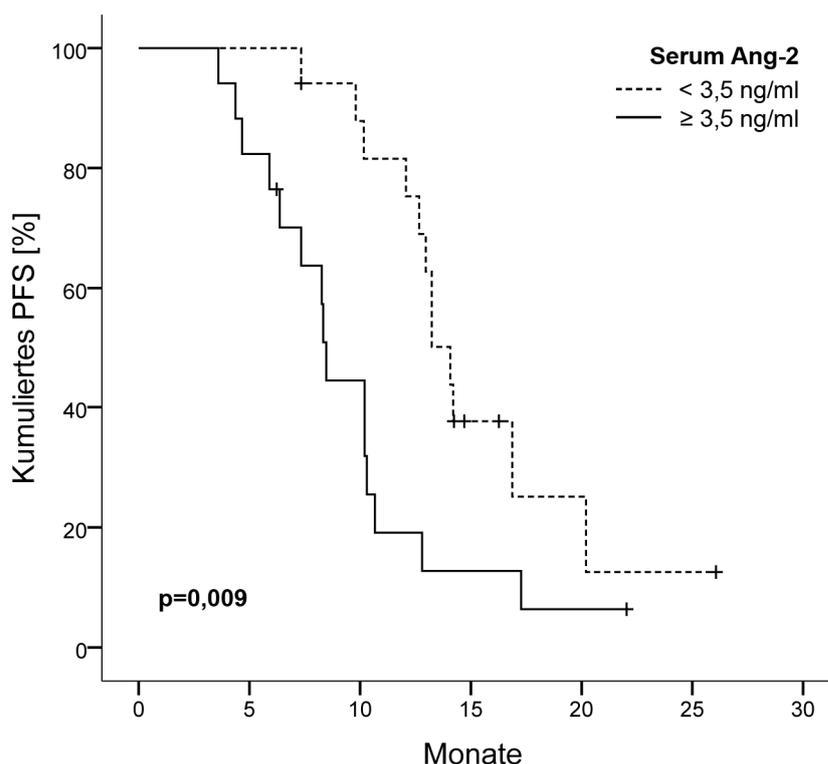


Abbildung 19: Progressionsfreies Überleben (PFS) der Patienten mit kolorektalem Karzinom nach Bevacizumab-haltiger Therapie, aufgeteilt in zwei Subgruppen bezüglich der Serum Ang-2-Konzentration.

### 3.6 Ansprechen auf die Therapie

Die Evaluation des Therapieerfolges erfolgte gemäß den RECIST-Kriterien. Die beiden Kategorien Complete Response (CR) und Partial Response (PR) wurden als Gruppe der Responder zusammengefasst, also als Gruppe derjenigen, die auf die Therapie ansprachen. Als Non-Responder wurden die Patienten ohne sichtbaren Therapieerfolg bezeichnet. Hierunter wurden die Kategorien Progressive Disease (PD) und Stable Disease (SD) zusammengefasst.

Entsprechend der Analysen zum Gesamtüberleben und zum progressionsfreien Überleben wurden auch hier die vier Parameter MVD, MVM, VEGF und Ang-2 untersucht. Die Einteilung der Patienten in Subgruppen erfolgte wie oben beschrieben.

Patienten mit einem niedrigen prätherapeutischen Serum-Ang-2 zeigten eine höhere Ansprechrate auf eine Bevacizumab-haltige Kombinationschemotherapie als Patienten mit hohem Serum-Ang-2. Die Ansprechraten betragen sehr hohe 82 % in der ersten Gruppe, beziehungsweise nur geringe 31 % in der zweiten ( $p=0,005$ ) (siehe Abbildung 20). Diesen Resultaten entsprechend liegt der mittlere Ang-2-Wert der Responder mit 3,3 ng/ml deutlich unter dem der Non-Responder (5,8 ng/ml,  $p=0,008$ ), was in Abbildung 21 veranschaulicht wird.

Wie auch schon bei den vorherigen Betrachtungen lieferten die übrigen drei Angiogenesefaktoren keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Eine hohe bzw. niedrige MVD oder MVM wiesen keine unterschiedlichen Ansprechraten auf die Bevacizumab-haltige Chemotherapie auf. Ebenso zeigte die Aufteilung nach niedrigem bzw. hohem VEGF keinen Unterschied in der Ansprechrate (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23).

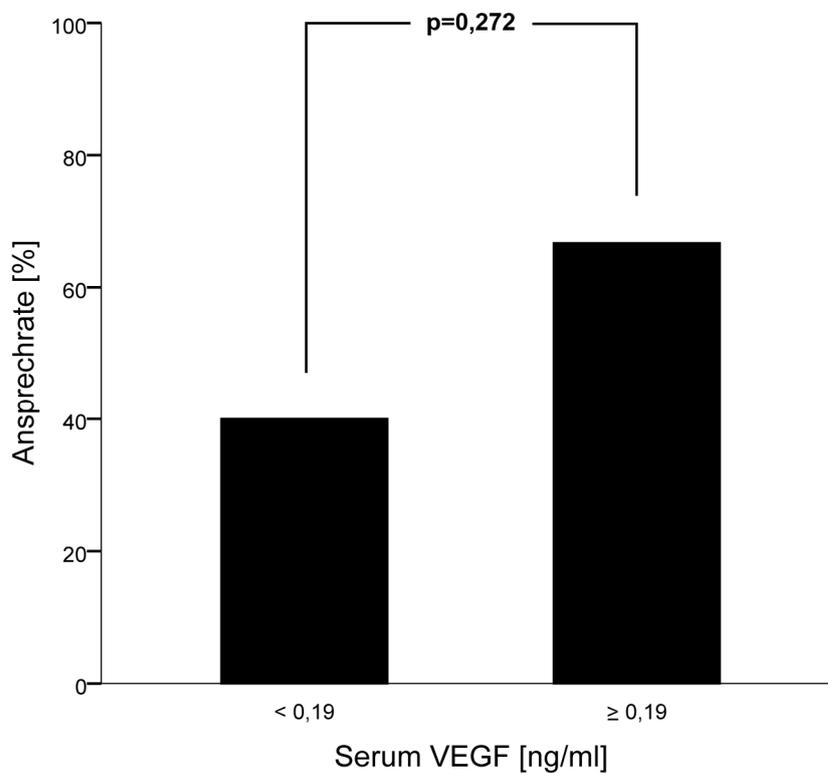


Abbildung 20: Ansprechen der Patienten mit kolorektalem Karzinom auf die Bevacizumab-haltige Therapie. Ansprechraten in den Subgruppen bezüglich der Serum VEGF-Konzentration.

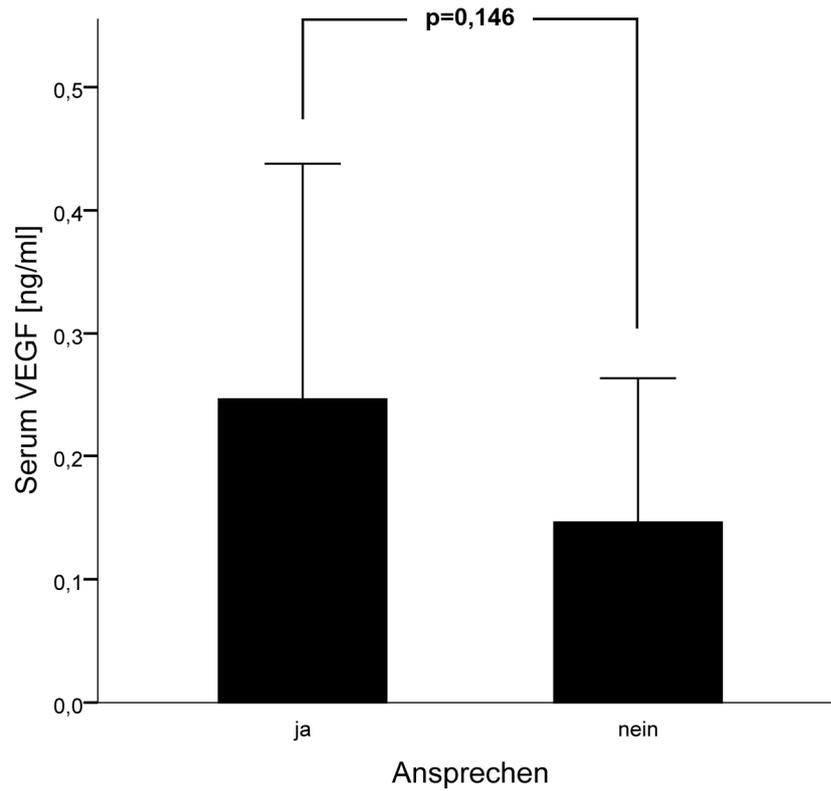


Abbildung 21: Ansprechen der Patienten mit kolorektalem Karzinom auf die Bevacizumab-haltige Therapie. Prätherapeutische Serum VEGF-Konzentration der Responder bzw. Non-Responder (Mittelwert + Standardabweichung).

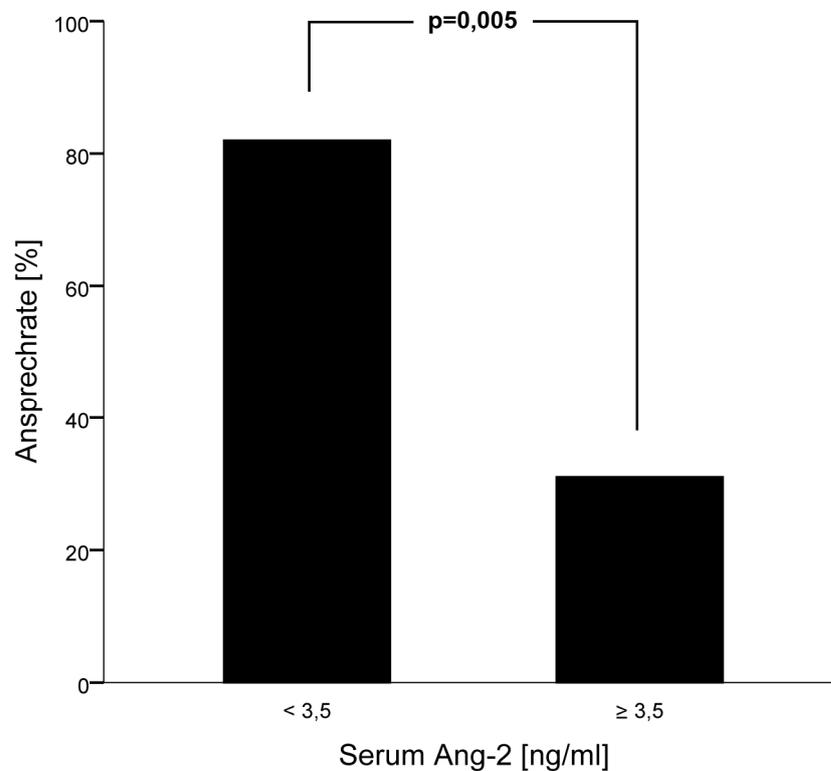


Abbildung 22: Ansprechen der Patienten mit kolorektalem Karzinom auf die Bevacizumab-haltige Therapie. Ansprechraten in den Subgruppen bezüglich der Serum Ang-2-Konzentration.

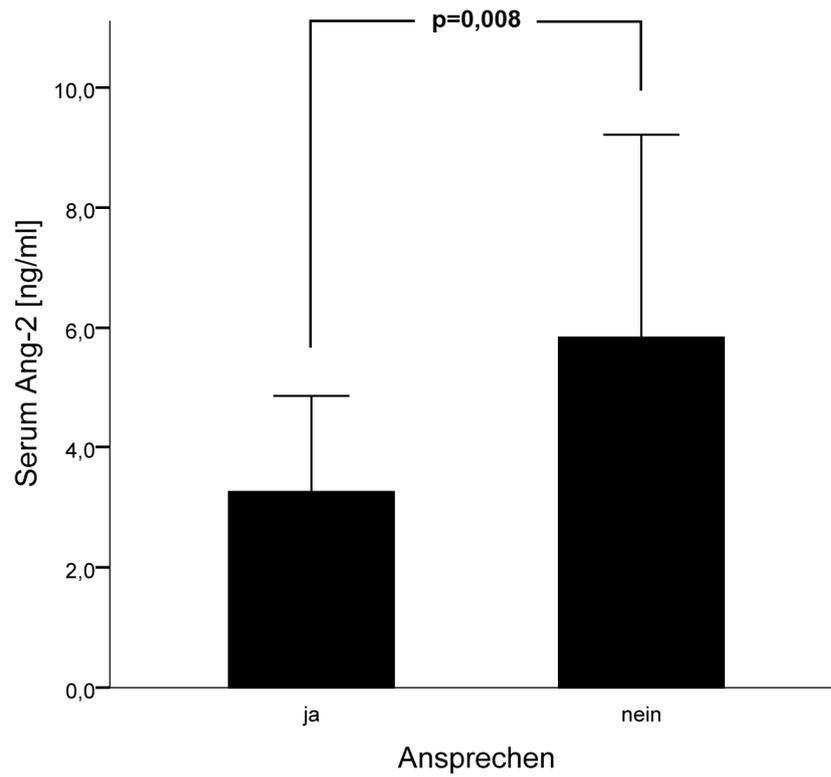


Abbildung 23: Ansprechen der Patienten mit kolorektalem Karzinom auf die Bevacizumab-haltige Therapie. Prätherapeutische Serum Ang-2-Konzentration der Responder bzw. Non-Responder (Mittelwert + Standardabweichung).

## 4 DISKUSSION

Die Einführung des Angiogenese-Inhibitors Bevacizumab stellte im Jahr 2004 einen Durchbruch in der Therapie des kolorektalen Karzinoms dar. Erstmals zeigte eine auf die Tumorangiogenese gerichtete Therapiestrategie in Kombination mit einer Chemotherapie einen klinischen Erfolg. Die Kombination des VEGF-Antikörpers mit einer Chemotherapie führte zu einer Verlängerung des progressionsfreien- und Gesamtüberlebens. Die Effizienz dieser Kombination konnte, ebenso wie die gleichzeitige geringgradige Toxizität, in weiteren großen Phase-III-Studien bestätigt werden. Aus diesem Grund wird derzeit eine Kombinationschemotherapie zusammen mit dem Angiogenese-Hemmer Bevacizumab als Standard in der Erstlinientherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms eingesetzt. (Cercek et al. 2008) Allerdings sprechen nicht alle Patienten gleich gut auf diese Art der Therapie an. Dies ist aufgrund der Komplexität der angiogenen Mechanismen und der Heterogenität der Tumore nicht verwunderlich. Für die klinische Praxis wäre es daher von essentieller Bedeutung, einen Biomarker zu etablieren, welcher ein Ansprechen auf die Therapie voraussagen kann. Mit Hilfe eines solchen Markers könnten entsprechende Patienten vor Beginn der Therapie ausgewählt werden und so von optimaler Effektivität profitieren. Zusätzlich müssten Patienten, die kein Ansprechen auf eine derartige Therapie zeigen, nicht unnötig der zusätzlichen Toxizität ausgesetzt werden. Eine erhebliche Kosteneinsparung wäre so außerdem möglich. (Sessa et al. 2008; Jain et al. 2009) Derzeit steht die Etablierung solcher Biomarker im Fokus intensiver Forschungsaktivität. Ein adäquater Marker, der den Ansprüchen entspricht und für einen klinischen Routineeinsatz nutzbar wäre, konnte allerdings bisher nicht charakterisiert werden. (De Roock et al. 2009; Murukesh et al. 2010)

Ziel dieser Arbeit war es, potentielle prädiktive Marker für die Bevacizumab-haltige Kombinationschemotherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms zu identifizieren. Zur Generierung von Hypothesen wurden zunächst die biologischen Prozesse der Tumorangiogenese betrachtet. Hier galt das Interesse sowohl morphologischen Korrelaten der Angiogenese, als auch Serummediatoren der angiogenen Signalkaskaden, wie in der Einleitung ausführlich beschrieben wurde. Insbesondere wurde das Augenmerk auf die Blutgefäßmaturität gelegt, welche anhand des Perizytenbesatzes festgestellt wurde, und auf den sezernierten Angiogenesemediator Angiopoietin-2. Beide wurden als vielversprechende potentielle Biomarker für eine Bevacizumab-haltige Therapie charakterisiert und in dieser Arbeit erstmalig auf diese Fragestellung hin analysiert. Eine zusätzliche Betrachtung galt, mit der Vaskularisierungsdichte (MVD) und dem löslichen Faktor VEGF, zwei weiteren Angiogenesefaktoren. Beide sind in der Literatur als wichtige Größen in der Tumorangiogenese beschrieben und im Rahmen

---

der Identifizierung eines Biomarkers vielfach überprüft worden. Beide Werte erwiesen sich in der Vergangenheit nicht als geeignete Prädiktoren einer Bevacizumab-haltigen Therapie. (Holden et al. 2005; Jubb, Hurwitz et al. 2006) Zur Validierung der Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit die beiden Parameter erneut und vergleichend zu obigen überprüft.

## **4.1 Histopathologische Biomarker**

Die Analyse der Tumorproben wurde anhand von immunhistochemischen Färbungen der Schnittpräparate durchgeführt. Die Darstellung der Vaskularisation im Tumor liefert das morphologische Korrelat zur Tumorangiogenese. Sie bildet das Zusammenspiel aller angiogenen Vorgänge und Regulationen ab und liefert somit wertvolle Informationen über den Angiogenesestatus direkt am Ort des Geschehens.

Untersucht wurden im Einzelnen die Vaskularisierungsdichte (MVD), welche bereits vielfach analysiert wurde und der Perizytenbesatz (MVM) der Gefäße zur Darstellung der Gefäßmaturität.

### **4.1.1 Vaskularisierungsdichte (MVD)**

Die MVD ermöglicht mittels Darstellung der Tumorblutgefäße eine Quantifizierung der Angiogenese im Tumor. Ausgehend von der Vorstellung, dass die Anzahl der Kapillaren im Tumor direkte Auswirkung auf die Wachstums- und Metastasierungsrate und damit auf den klinischen Verlauf einer Tumorerkrankung hat, konnte Anfang der 90er Jahre erstmalig ein Zusammenhang zwischen MVD und Metastasierungshäufigkeit für das Mammakarzinom aufgezeigt werden. (Weidner et al 1991) Ein solcher Zusammenhang spricht dafür, dass die MVD als prognostischer Marker bei soliden Tumoren eingesetzt werden kann. Zur Validierung dieser These wurde eine große Anzahl von Studien durchgeführt, die mittels Bestimmung der MVD das Tumorgefäßbett charakterisierten. Dabei wurde eine Reihe von Tumorentitäten untersucht, darunter auch das kolorektale Karzinom. Die Ergebnisse dieser Analysen fielen sehr unterschiedlich aus. Für einen Teil der untersuchten Tumorentitäten konnte die MVD als prognostischer Marker bestätigt werden. (Saclarides et al. 1994; Frank et al. 1995; Takebayashi et al. 1996; Tomisaki et al. 1996; Hlatky et al. 2002) Andere wiederum konnten einen solchen Zusammenhang nicht darstellen. (Bossi et al. 1995; Cianchi et al. 2002; Nanni et al. 2002) Im Rahmen des kolorektalen Karzinoms zeigte eine Metaanalyse den prognostischen Wert der MVD auf. (Des Guetz et al. 2006) In dieser Analyse waren jedoch weitere wesentliche Studien nicht enthalten, die gegenteilige Ergebnisse lieferten. Hier zeigte sich keine prognostische Relevanz der MVD im kolorektalen Karzinom. (Jubb, Hurwitz et al. 2006) Insgesamt blieben die Resultate kontrovers und die Rolle als prognostischer Biomarker umstritten. Dennoch bleibt festzuhalten, dass die MVD aufgrund

---

---

ihrer tumorbiologischen Komplexität und der großen Anzahl an bereits durchgeführten Studien einen wertvollen Parameter in der Tumorangiogenese darstellt. Es erschien sinnvoll, die vorab beschriebenen Auswertungen am vorliegenden Kollektiv zu validieren. Eine Reproduzierbarkeit der Resultate ermöglicht eine Qualitätskontrolle des hier verwendeten Patientenkollektivs für weitere Analysen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die MVD bei 72 Patienten mit kolorektalem Karzinom analysiert. Die immunhistochemischen Färbungen lieferten sowohl regionale Unterschiede der MVD innerhalb eines Tumors, als auch eine große Variabilität zwischen den verschiedenen Tumoren. Zur Quantifizierung wurden sogenannte hot spots, also Regionen mit stark ausgeprägter MVD, ausgewählt. Der Mittelwert von 35/HPF entsprach den bereits vorhandenen Daten in der Literatur. Ein Zusammenhang zwischen hoher MVD und fortgeschrittenem Tumorstadium konnte nicht dargestellt werden. Auch die Tatsache, dass keine Korrelation zwischen MVD und Gesamtüberleben bzw. progressionsfreiem Überleben aufgezeigt werden konnte, zeigt, dass die Vaskularisierungsdichte (MVD) für das vorliegende Kollektiv beim kolorektalem Karzinom nicht als prognostischer Marker gewertet werden kann.

Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, ob die MVD als prädiktiver Marker ein Ansprechen auf eine Bevacizumab-haltige Therapie voraussagen kann. Bevacizumab hat als Angiogenese-Inhibitor direkten Einfluss auf das Tumorgefäßbett. Es gab die Vermutung, dass der Antikörper besonders großen Therapiererfolg nur bei hoher prätherapeutischer MVD aufweisen kann. Je mehr Gefäße vorhanden sind, desto stärker können sie durch den Einsatz von Bevacizumab beeinflusst werden. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass die Bestimmung der MVD vor der Therapie deren Effektivität vorhersagen könne.

Den Resultaten dieser Arbeit zufolge ist dies jedoch nicht der Fall. Es konnte kein Einfluss der Vaskularisierungsdichte auf das Outcome oder Ansprechen auf eine Bevacizumab-haltige Therapie aufgezeigt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Daten aus vorangegangenen Untersuchungen anderer Gruppen gut überein. Auch diese konnten zeigen, dass die MVD keine Vorhersage bezüglich einer Bevacizumab-haltigen Therapie treffen konnte. (Hlatky et al. 2002; Jubb, Hurwitz et al. 2006; Sessa et al. 2008)

Insgesamt bleibt der Nutzen einer MVD-Bestimmung somit fraglich und umstritten. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die MVD nichts über die Funktionalität, d.h. die Perfusion des Gefäßbettes aussagt. Auch ein Wachstum der Gefäße kann ebenso wie eine Regression durch die MVD nicht dargestellt werden, da es sich nur um eine Momentaufnahme handelt. Zum anderen variiert die MVD innerhalb eines Tumors sehr stark, sodass methodische Probleme bei der exakten Bestimmung auftauchen. Insgesamt zeigt die MVD alleine nicht den Angiogenesestatus eines Tumors an. Ein weiterer

---

Nachteil der MVD ist die fehlende Möglichkeit der Bestimmung eines zeitlichen Verlaufs im Rahmen einer fortschreitenden Tumorerkrankung. Das Blutgefäßbett erfährt unter Bevacizumab eine Modifizierung, welche nur durch mehrzeitige Analysen aufgedeckt werden könnte. Da jedes Mal ein invasives Verfahren zur Materialgewinnung nötig ist, bleibt die Bestimmung der MVD klinisch nicht praktikabel.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Darstellung der Vaskularisierung im kolorektalen Karzinom mittels MVD im vorliegenden Kollektiv weder prognostische noch prädiktive Aussagekraft hat. Im Hinblick auf die fehlende Funktionalität des Mediators und der mangelnden klinischen Einsetzbarkeit aufgrund der invasiven Gewinnung sind diese Resultate weder überraschend, noch enttäuschend.

Nichtsdestotrotz liefern diese Ergebnisse im Rahmen der vorliegenden Arbeit wertvolle Erkenntnisse. Bereits veröffentlichte Resultate konnten mit dem Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit reproduziert werden. Diese Übereinstimmungen verdeutlichen, dass das zugrunde liegende Patientengut mit dem anderer großer Studien vergleichbar ist. Dies dient als Indikator für die Verwendbarkeit der Gewebeproben des Kollektivs für weitergehende Untersuchungen. Die Analysen der MVD dienten somit zur Qualitätskontrolle des untersuchten Patientenkollektivs.

#### **4.1.2 Blutgefäßmaturität (MVM)**

Der Aufbau von kleinsten Blutgefäßen ist zweischichtig: innen befinden sich Endothelzellen, außen herum Perizyten. Bei der Angiogenese werden nach Formung eines Endothelzellschlauches Perizyten rekrutiert, um Stabilität für die neuen Gefäße zu gewährleisten. Weiterhin kommunizieren die beiden unterschiedlichen Zellarten über direkte Zellkontakte oder parakrine Signaltransduktion miteinander. (Bergers et al. 2005) Die Bedeckung mit Perizyten ist als Reifezeichen des Gefäßes zu werten. Sie stellt einen Schutz vor dem Absterben des Gefäßes dar. Weiterhin konnten Experimente zeigen, dass ein VEGF-Entzug besonders bei unreifen Gefäßen mit geringem Perizytenbesatz wirksam ist. (Benjamin et al. 1999; Greenberg et al. 2008) Ein Tumorgefäßbett ist durch die chaotische Struktur der Gefäße und einen generell geringen Perizytenbesatz charakterisiert. Doch auch dort gibt es Unterschiede zwischen den Tumoren. In Anbetracht dieser Tatsache wurde vermutet, dass eine geringe Gefäßreife für eine Therapie mit Bevacizumab günstig ist. Dies ist auch mit der Normalisierungstheorie in Einklang zu bringen. Sie besagt, dass ein VEGF-Entzug nicht wie zunächst angenommen das Gefäßbett des Tumors zerstört, sondern dieses aus seiner chaotischen Form wieder in die physiologisch strukturierte Form bringt und damit normalisiert. So lässt sich auch die Tatsache erklären, dass unter einer VEGF-Entzugstherapie der Besatz

---

mit Perizyten zunimmt. (Lin et al. 2004) Die Effektivität dieser Therapie scheint demnach bei geringem Perizytenbesatz am größten zu sein.

Aufgrund dieser experimentell begründeten These ist der Perizytenbesatz als Parameter der Gefäßmaturität ein möglicher prognostischer oder gar prädiktiver Biomarker für eine Tumorerkrankung im Rahmen einer Therapie mit dem Angiogenese-Inhibitor Bevacizumab. Entsprechende Untersuchungen anhand von Gewebeproben von kolorektalen Karzinomen sind in der Literatur bisher nicht beschrieben und wurden daher in dieser Arbeit erstmalig durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Quantifizierung der Blutgefäßmaturität der Anteil der mit Perizyten bedeckten Blutgefäße (MVM) verwendet. Die Untersuchung erfolgte an Tumorproben von 72 Patienten mit kolorektalem Karzinom. Die Spannweite des Perizytenbesatzes war beträchtlich (10 – 93 %). Dabei betrug die mittlere MVM 55 Prozent. Zwischen den einzelnen Tumorstadien ließ sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der MVM nachweisen. Patienten mit einem frühen Tumorstadium wiesen einen hohen Perizytenbesatz auf, wohingegen Patienten mit fortgeschrittenem Tumor geschehen eine eher niedrige MVM zeigten. Dies lässt sich tumorbiologisch erklären: je größer der Tumor wächst, desto mehr Angiogenese muss betrieben werden, um eine suffiziente Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sicherzustellen. Dabei nimmt die Reife des Gefäßbettes mit zunehmender Größe des Tumors immer mehr ab, die MVM wird geringer. Die Erkenntnis, dass die MVM mit dem Tumorstadium korreliert, lässt darauf schließen, dass sie gleichzeitig eine Vorhersage für das Überleben treffen könnte. Entsprechend der Tumorstadien wäre es zu erwarten, dass ein hoher Perizytenbesatz - und demnach ein niedriges Tumorstadium - günstig für das Überleben der Patienten ist. Einen solcher Zusammenhang von einer geringen MVM mit einer besseren Krankheitskontrolle oder einem verlängertem Überleben ließ sich allerdings nicht nachweisen. Die Blutgefäßmaturität (Perizytenbesatz) hat demnach für das vorliegende Patientenkollektiv keinen prognostischen Stellenwert.

Zusätzlich wurde die Fähigkeit der MVM untersucht, ein Ansprechen auf eine Bevacizumab-haltige Therapie voraussagen zu können. Hier wäre im Gegensatz zum Überleben ein umgekehrter Zusammenhang zu erwarten gewesen. Ein gering ausgereiftes Gefäßbett verspricht experimentell eine höhere Sensibilität gegenüber einem VEGF-Entzug. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass eine geringe MVM ein besseres Ansprechen auf eine Bevacizumab-haltige Therapie vorhersagen könnte. Eine Auftrennung des Patientenkollektivs in hohe vs. niedrige Gefäßmaturität konnte jedoch keinen Unterschied im Hinblick auf das Ansprechen oder das Outcome aufzeigen. Die vorliegenden Analysen ergeben somit, dass die Gefäßmaturität sich nicht primär zur Prädiktion für eine Bevacizumab-haltige Therapie eignet.

---

Problematisch an der Darstellung der MVM ist auch, analog zur MVD, die fehlende Möglichkeit einen Verlauf aufzuzeigen. Im Rahmen einer fortschreitenden Tumorerkrankung, aber auch während einer Therapie mit Bevacizumab wäre es interessant den Perizytenbesatz kontinuierlich zu kontrollieren. Eine solche mehrzeitige Analyse ist aufgrund der Invasivität der Materialgewinnung nicht vertretbar. So stellt die MVM immer nur eine Momentaufnahme zum Zeitpunkt der Tumorresektion dar. Würde eine Messung exakt zu Beginn der Bevacizumab-Therapie und mindestens eine nach einer gewissen Zeit während der Therapie durchgeführt, wäre der Informationsgehalt möglicherweise größer. Dies ist allerdings für den klinischen Routineeinsatz eher nicht praktikabel.

Zusammengefasst weisen die vorliegenden Resultate darauf hin, dass der Perizytenbesatz als Darstellung der Gefäßmaturität für die Bevacizumab-haltige Therapie des kolorektalen Karzinoms weder als prognostischer noch als prädiktiver Biomarker genutzt werden kann.

## **4.2 Serum Biomarker**

Die Messung von Blutwerten zur Etablierung eines Biomarkers ist weit verbreitet. Proteine, welche in großem Maße von den Tumorzellen oder dem Tumorstroma sezerniert werden, können so im Blutkreislauf identifiziert werden. Im Vergleich zu Tumorresekten oder –biopsien ist die Gewinnung einer Blutprobe deutlich einfacher und weniger invasiv. Für einen klinischen Routineeinsatz wäre ein Serum Biomarker aus diesem Grund überlegen.

Wie auch schon bei den histopathologischen Markern wurden in dieser Arbeit mit VEGF ein bereits vielfach analysierter Mediator und ein in dieser Hinsicht neuartiger Faktor, das Angiopoietin-2 untersucht.

### **4.2.1 VEGF**

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist der am besten charakterisierte Angiogenesefaktor. Zusammen mit den Rezeptoren VEGF-R1 und –R2 zeichnet sich VEGF als wichtigster Mediator der Signaltransduktionskaskaden der Angiogenese aus. Dies lässt sich anhand von vorausgehenden Knock-out-Versuchen an Mausembryos darstellen. (Carmeliet et al. 1996; Ferrara et al. 1996) Schon der heterozygote Verlust des VEGF-Gens sorgt für letale Störungen der Vaskularisierung im Mausembryo. Beim homozygoten Fehlen des VEGF-Gens sind diese strukturellen Abnormalitäten sogar noch deutlicher ausgeprägt.

Die Wirkung des VEGF ist als proangiogen zu bezeichnen. Es führt zur Lockerung von Zellkontakten und zu einer Erhöhung der Permeabilität des bestehenden Gefäßsys-

---

tems. Dies ermöglicht eine Aussprossung neuer Endothelzellschläuche, was ebenfalls vom VEGF bewirkt wird. (Carmeliet 2005) In der Tumorangiogenese sorgt das VEGF für das charakteristische chaotische Gefäßbett mit Leckagen und geringem Perizytenbesatz. Insgesamt wird es als wichtigster Faktor in der Neoangiogenese von soliden Tumoren gesehen. Aufgrund von experimentellen und ersten klinischen Erfolgen einer Anti-VEGF-Therapie wurde im Jahr 2004 ein Antikörper gegen VEGF mit dem Namen Bevacizumab zur Therapie des kolorektalen Karzinoms zugelassen. (Borgström et al. 1996; Presta et al. 1997; Ferrara 2005; Ferrara et al. 2005)

Bei der Suche nach einem Biomarker für die Bevacizumab-haltige Therapie stand das VEGF an erster Stelle, da es die Zielstruktur des Medikamentes darstellt. Die biologischen Grundlagen implizierten, dass ein Erfolg eines VEGF-Entzuges nur bei ausreichend vorhandener VEGF-Konzentration im Tumor auftreten kann. Andererseits repräsentiert eine hohe VEGF-Konzentration eine stark ausgeprägte Tumorangiogenese, die als prognostisch ungünstig zu werten ist.

Es wurde eine große Anzahl von Studien durchgeführt, die den Zusammenhang zwischen einer hohen Expression von VEGF im Tumor bzw. einer hohen Konzentration im Blutkreislauf mit einer großen Effektivität der Therapie aufzeigen sollten. Sowohl Studien an unterschiedlichen Tumorentitäten als auch explizit am kolorektalen Karzinom lieferten gegensätzliche Ergebnisse. Eine große Phase-III-Studie konnte keinen Zusammenhang zwischen der VEGF-Expression im Tumor und einem Therapieerfolg nachweisen. Die Funktion als möglicher prognostischer oder prädiktiver Biomarker konnte so nicht dargestellt werden. (Jubb, Hurwitz et al. 2006) Im Gegensatz dazu konnte eine Metaanalyse, welche eine Reihe weiterer Studien verglich, die VEGF-Expression im Tumor zumindest als prognostischen Marker bestätigen. (Des Guetz et al. 2006) Weitere Analysen konnten zeigen, dass eine hohe Plasmakonzentration von VEGF mit einer schlechten Prognose korreliert ist. Ein Zusammenhang zum Ansprechen auf eine Bevacizumab-haltige Therapie konnte jedoch nicht gezeigt werden. (Holden et al. 2005) Insgesamt bleiben die Ergebnisse sehr unterschiedlich und teilweise gegensätzlich, sodass zur Kontrolle eine eigene Analyse durchgeführt wurde. Analog zur MVD könnte eine Reproduzierbarkeit von bereits veröffentlichten Ergebnissen zur Qualitätskontrolle des analysierten Patientenkollektivs dienen.

In der vorliegenden Arbeit wurde VEGF im Serum von 90 Patienten mit kolorektalem Karzinom und von 33 gesunden Probanden gemessen. Die mittlere VEGF-Konzentration lag bei den Tumorpatienten bei 0,30 ng/ml, bei der gesunden Kontrolle bei 0,24 ng/ml. Dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant. Die Betrachtung der Serum VEGF-Konzentrationen in den einzelnen Tumorstadien lieferte keine statistisch

---

signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit frühen bzw. fortgeschrittenen Stadien. Weitere Analysen stellten den fehlenden Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration von VEGF in Tumorpatienten mit deren progressionsfreiem Überleben bzw. Gesamtüberleben dar. Diese Resultate entsprachen einer großen Phase-III-Studie und weisen darauf hin, dass VEGF nicht als prognostischer Marker verwendet werden kann. Auch die Überprüfung einer Korrelation zwischen VEGF-Konzentration und Ansprechen auf eine Bevacizumab-haltige Therapie fiel negativ aus. Eine Dichotomisierung in hohe bzw. niedrige VEGF-Konzentration im Serum lieferte keine Vorhersage der Ansprechraten. Zusätzlich wurden die Responder bzw. Non-Responder bezüglich ihrer VEGF-Serumkonzentration verglichen. Die Mittelwerte in beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die vorliegenden Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass VEGF keine Vorhersage bezüglich des Ansprechens und des Outcomes einer Bevacizumab-haltigen Therapie treffen kann und es sich demnach nicht als Prädiktor einer antiangiogenen Therapie mit Bevacizumab eignet. Dies ist vergleichbar mit bereits veröffentlichten Resultaten von einigen anderen Forschungsgruppen. (Poon et al. 2001; Jubb, Hurwitz et al. 2006)

Zusammenfassend lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse die Aussage treffen, dass die prätherapeutische VEGF-Konzentration im Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinom im eigenen Kollektiv keinen prognostischen Marker darstellt. Ebenso wenig dient dieser Wert als Prädiktor für eine Bevacizumab-haltige Therapie. Weitere Studien, die den zeitlichen Verlauf vor und während, sowie nach Absetzen der Therapie aufzeichnen, können hier möglicherweise weiterführende Resultate liefern. Der Nutzen der VEGF-Bestimmung in dieser Arbeit bestand – analog zur MVD – in der Verwendung als Kontrolle für die Serumproben des Patientenkollektivs. Die erzielten Resultate waren deckungsgleich mit vorhergehenden Veröffentlichungen, sodass weiterführende Analysen der Serumproben anscheinend weitere sinnvolle Ergebnisse liefern können.

#### **4.2.2 Angiopoietin-2**

Das Angiopoietin-Tie-System stellt eine der wichtigsten Signaltransduktionskaskaden in der Angiogenese dar. Der Mediator Angiopoietin-2 (Ang-2) vermittelt im Zusammenhang mit VEGF eine proangiogene Wirkung und sorgt in der Wundheilung, dem weiblichen Reproduktionstrakt und, für diese Arbeit von größter Bedeutung, in soliden Tumoren für Gefäßwachstum. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass Ang-2 als wesentlicher Faktor der Tumorangio-genese das Tumorwachstum begünstigt. (Hanahan 1997; Maisonpierre et al. 1997; Ahmad, Liu, Jung, F. Fan, Reinmuth et al. 2001; Ahmad, Liu, Jung, F. Fan, M. Wilson et al. 2001; Augustin et al. 2009)

---

Aufgrund der essentiellen Bedeutung des Ang-2 in der Tumorangiogenese scheint Ang-2 als prognostischer Marker für Tumorerkrankungen genutzt werden zu können. Wie in der Einleitung dieser Arbeit ausführlich beschrieben, konnten bereits mehrere Forschungsgruppen den Zusammenhang zwischen Ang-2-Überexprimierung im Tumor und verschiedenen histopathologischen und klinischen Daten, wie z.B. Metastasierung, fortgeschrittenes Stadium oder schlechte Prognose, aufzeigen. (Ochiumi et al. 2004; Nakayama et al. 2005; Chung et al. 2006) Allerdings beruhen alle diese Erkenntnisse auf immunhistochemischen Färbungen des Angiopoietin-2 in Tumorzellen. Neueren Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zufolge wird Ang-2 allerdings ausschließlich in Endothelzellen gebildet. (Goede et al. 2010) Diese Tatsache konnte anhand von ausführlichen Analysen mittels Mikrodissektion von Tumorzellen und Tumorstroma und anschließender Quantifizierung der Ang-2-mRNA mittels qRT-PCR gezeigt werden. Eine Ang-2-mRNA konnte ausschließlich im Tumorstroma, nicht jedoch in Tumorzellen nachgewiesen werden. Zur Verifizierung dieser Resultate wurde zusätzlich ein Maus-Xenograft-Modell verwendet, bei dem menschliche KRK-Zellen in Nacktmäuse injiziert wurden und dort einen Tumor bildeten. In einer Spezies-spezifischen PCR konnte Ang-2 lediglich im murinen Tumorstroma, nicht jedoch in den humanen Tumorzellen nachgewiesen werden. Zusätzliche Versuche mittels Western Blot und ELISA erhärteten die These weiter. Daraufhin wurden die für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper sorgsam überprüft und es konnte eine mangelnde Spezifität nachgewiesen werden. Die zuvor genannten Ergebnisse beruhen demnach aller Wahrscheinlichkeit nach auf einem Färbeartefakt und sollten mit Vorsicht betrachtet werden. Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse erschien es notwendig weitere Analysen bezüglich der prognostischen Relevanz des Ang-2 im kolorektalen Karzinom durchzuführen.

Im Rahmen einer Bevacizumab-haltigen Therapie könnte Angiopoietin-2 zusätzlich als Prädiktor fungieren, weil es in engem Zusammenspiel mit VEGF, der Zielstruktur des Medikamentes, wirkt. Da es sich um ein sezerniertes Protein handelt, schien eine Messung im Blutserum sinnvolle Ergebnisse liefern zu können. Entsprechende Untersuchungen wurden bislang nicht durchgeführt, sodass die hier erzielten Resultate neu und einzigartig sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Serumproben von 90 Patienten mit kolorektalem Karzinom unterschiedlicher Tumorstadien analysiert. Die Werte variierten zwischen 0,7 ng/ml und 12,1 ng/ml und lieferten im Mittel einen höheren Wert als im Vergleichskollektiv der 33 gesunden Probanden.

---

Zwischen den einzelnen Stadien des Tumorgeschehens zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied. Je weiter fortgeschritten die Erkrankung war, desto höher fiel die Ang-2-Konzentration aus. Besonders Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom zeigten hohe Ang-2-Werte im Serum. Ein Vergleich dieser Patienten im Stadium IV mit der gesunden Kontrolle oder mit den Stadien I-III lieferte statistisch signifikante Unterschiede.

Analog zu diesen Resultaten konnten ähnliche Verhältnisse des Ang-2 bereits in anderen Tumorentitäten nachgewiesen werden. Auch Patienten mit hepatozellulärem Karzinom, nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom und malignem Melanom wiesen erhöhte Ang-2-Konzentrationen auf. Zusätzlich konnte für diese Neoplasien eine Korrelation des Ang-2-Wertes mit einem vermindertem Gesamtüberleben gezeigt werden. (Park et al. 2007; Kuboki et al. 2008; Helfrich et al. 2009) Der Zusammenhang zwischen Ang-2-Werten im Serum und dem klinischen Outcome von Patienten, welche mit Bevacizumab therapiert wurden, wurde bislang nicht erforscht.

Diese Arbeit ist die erste, die Hinweise auf die Bedeutung der prätherapeutischen Serumkonzentration von Ang-2 für den Erfolg einer Bevacizumab-haltigen Therapie eines metastasierten kolorektalen Karzinoms liefert. Das Gesamtüberleben war genauso wie das progressionsfreie Überleben bei Patienten mit niedrigem prätherapeutischem Ang-2 ( $< 3,5$  ng/ml) verlängert im Vergleich zu Patienten mit hohem Ang-2 ( $\geq 3,5$  ng/ml). Besonders hervorzuheben ist das um mehr als 90 Prozent verminderte Sterberisiko für Patienten mit niedrigem Ang-2. Auch das Risiko einen Progress der Krankheit zu erleiden war für Patienten mit niedrigem Ang-2-Wert im Serum in dieser Arbeit um 63 Prozent verringert.

Zusätzlich war das mediane progressionsfreie Überleben in der Gruppe mit niedrigem Ang-2 bis zu sechs Monate länger als das PFS bei kombinierter Chemotherapie mit Bevacizumab in den wichtigsten veröffentlichten Studien (9,4 – 10,6 Monate). Im Vergleich dazu entsprach das progressionsfreie Überleben der Patienten mit hohem prätherapeutischen Ang-2 den Werten einer Chemotherapie ohne den Zusatz von Bevacizumab. (Hurwitz et al. 2004; Saltz et al. 2008) Diese Ergebnisse implizieren die Bedeutung des Ang-2 als prognostischen Biomarker für das kolorektale Karzinom.

Tumorbiologisch könnte eine vermehrte Expression von Ang-2, die eine vaskuläre Unreife nach sich zieht, der gefäßnormalisierenden Wirkung von Bevacizumab entgegenwirken und damit auch den Transport der Chemotherapie in den Tumor negativ beeinflussen. Ein niedriges prätherapeutisches Ang-2 hingegen ist demzufolge ein Marker für eine günstige Prognose des Patienten. Die tabellarische Aufstellung der einzelnen Zeiten des progressionsfreien Überlebens liefert Tabelle 8.

---

Da im untersuchten Patientenkollektiv prätherapeutische Serumwerte von Ang-2 in der Lage waren, ein Ansprechen auf eine Therapie mit Bevacizumab vorherzusagen, ist das prätherapeutische Serum Ang-2 auch ein vielversprechender Kandidat als prädiktiver Marker für eine Bevacizumab-haltige Therapie. Patienten mit niedrigem Ang-2 sprachen in einem deutlich größeren Prozentsatz auf die Therapie an als Patienten mit hohem Ang-2. Gleichsam wiesen die Therapie-Responder im Mittel einen signifikant niedrigeren Wert des Ang-2 auf, als diejenigen, die kein Ansprechen zeigten. Mit 82% lag die Ansprechrate bei Patienten mit niedrigem Ang-2 etwa doppelt so hoch wie für die Kombination von Chemotherapie mit Bevacizumab in der Literatur beschrieben ist (38 – 44%). Diese extrem hohe Rate deutet die große Wertigkeit des Ang-2 als Prädiktor für das Ansprechen auf eine Bevacizumab-haltige Therapie an. Die prätherapeutische Bestimmung einer niedrigen Ang-2-Konzentration im Serum kann wahrscheinlich ein Ansprechen auf die Therapie voraussagen. Interessanterweise liegt die Ansprechrate bei hohem Ang-2 im Bereich der Patienten, die allein mit einer Chemotherapie, also ohne Bevacizumab, behandelt wurden. (Hurwitz et al. 2004; Saltz et al. 2008) Das verbesserte Ansprechen, das durch die Kombination der Chemotherapie mit Bevacizumab erreicht wird, scheint nur unter der Bedingung eines niedrigen prätherapeutischen Wertes des Ang-2 erzielt werden zu können. Hier bleibt allerdings hinzuzufügen, dass nicht alle Studien eine Verbesserung des Ansprechens unter Bevacizumab-haltiger Therapie belegen konnten. Eine Studie zeigte gleiche Ansprechraten für eine Chemotherapie mit oder ohne Bevacizumab (beide 38%). (Saltz et al. 2008) Ein tabellarischer Vergleich der Ansprechraten für eine Chemotherapie alleine, eine Chemotherapie in Kombination mit Bevacizumab und den Ansprechraten, bezogen auf ein hohes oder niedriges Ang-2, folgt in Tabelle 8.

**Tabelle 8: Vergleich des progressionsfreien Überlebens und der Ansprechrate mit und ohne Bestimmung der prätherapeutischen Ang-2-Konzentration**

	Chemo	Chemo + BV	Chemo + BV Ang-2 hoch	Chemo + BV Ang-2 niedrig
PFS	6,2 - 8 Monate <sup>1</sup>	9,4 - 10,6 Monate <sup>1</sup>	8,5 Monate <sup>2</sup>	14,1 Monate <sup>2</sup>
RR	35 - 38% <sup>1</sup>	38 - 44% <sup>1</sup>	31% <sup>2</sup>	82% <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Werte jeweils aus veröffentlichten Studien von Hurwitz et al. 2004; Saltz et al. 2008

<sup>2</sup> Werte aus eigenen Analysen

Chemo = Standard Kombinationschemotherapie

BV = Bevacizumab

Ang-2 = Angiopoietin-2-Konzentration im Serum

PFS = Progressionsfreies Überleben

RR = Response Rate = Ansprechrate

Die erzielten Resultate deuten darauf hin, dass das prätherapeutische Serum-Ang-2 als Prädiktor einer Bevacizumab-haltigen Therapie des kolorektalen Karzinoms interessant ist und ggf. das Outcome einer solchen Therapie vorhersagen kann. Unter der Voraussetzung, dass ein prätherapeutisch ermittelter niedriger Serumwert für Ang-2 (< 3,5 ng/ml) vorliegt, könnte eine kombinierte Behandlung von Chemotherapie mit Bevacizumab besonders erfolgreich sein. Bezüglich der Ansprechrate und des progressionsfreien Überlebens könnten so optimale Ergebnisse einer Anti-VEGF-Therapie erreicht werden. Eine Messung des Ang-2 vor dem Beginn einer Therapie könnte die Auswahl entsprechender Patienten ermöglichen.

An dieser Stelle muss kritisch erwähnt werden, dass die durchgeführten Analysen keine definitive Aussage zum prädiktiven Stellenwert von Ang-2 im Hinblick auf eine Bevacizumab-haltige Therapie erlauben, auch wenn die Unterschiede in den Ansprechraten einen Hinweis in diese Richtung ergeben haben. Die Bestimmung der Ang-2-Konzentrationen wurde nur für eine Kombinationschemotherapie mit Bevacizumab durchgeführt, nicht aber für eine Chemotherapie bzw. Bevacizumab alleine oder andere Therapieoptionen. Nur ein solcher Vergleich kann die Bestätigung liefern, dass es sich bei Ang-2 um einen Bevacizumab-spezifischen Prädiktor handelt und nicht um einen generellen Response-Parameter für eine Reihe verschiedener Therapien des kolorektalen Karzinoms. Hierzu sind größere, randomisierte Studien nötig, die das Outcome verschiedener Therapien im Hinblick auf die Ang-2-Konzentration untersuchen. Nur wenn das Outcome anderer Therapien nicht mit einem niedrigen Ang-2 korreliert ist, kann von einer Bevacizumab-Spezifität gesprochen werden. Weisen hohes Ansprechen, langes Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben bei anderen Therapien einen ähnlichen Zusammenhang mit niedrigem Ang-2 auf, so kann es nur als ein genereller Response-Parameter für das kolorektale Karzinom bezeichnet werden. Derartige Untersuchungen gestalten sich als problematisch, da Bevacizumab den Standard in der Erstlinientherapie darstellt, sodass kaum große Patientenkollektive ohne Bevacizumab-haltige Behandlung zum Vergleich zusammengestellt werden können.

Aus biologischer Sicht könnte Ang-2 sowohl als genereller Response-Parameter, als auch als Bevacizumab-spezifischer Prädiktor einen Stellenwert haben. Für einen Stellenwert als genereller Response-Parameter spricht die Tatsache, dass die Überexpression von Ang-2 eine fördernde Wirkung auf das Tumorstadium unabhängig von einer Therapie hat. Nur ein Gleichgewicht der pro- und antiangiogenen Faktoren stellt einen Ruhezustand des Gefäßbetts sicher. Ein Überwiegen des Ang-2 führt zu Vasku-

---

---

larisierungsprozessen und damit zu verstärktem Tumorwachstum. (Ahmad, Liu, Jung, F. Fan, M. Wilson et al. 2001; Augustin et al. 2009) Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Ang-2-Konzentrationen bei Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten im Vergleich zu gesunden Probanden als Kontrolle erhöht sind. Bei fortgeschrittener Krankheit steigt der Ang-2-Wert im Serum mehr an, als bei Patienten in einem frühen Tumorstadium. Die prognostische Relevanz konnte für mehrere Neoplasien nachgewiesen werden. (Park et al. 2007; Kuboki et al. 2008; Helfrich et al. 2009)

Eine Bevacizumab-spezifische Prädiktion lässt sich mit seiner Wirkung auf die Tumorangiogenese im Zusammenhang mit VEGF bzw. einem VEGF-Entzug erklären. Unter der Bedingung einer erhöhten VEGF-Konzentration unterstützt Ang-2 die Angiogenese im Tumor. Das entstehende Gefäßbett ist durch die chaotische Anordnung der Kapillaren, eine erhöhte Permeabilität und geringen Perizytenbesatz charakterisiert. Ein VEGF-Entzug durch den therapeutischen Einsatz von Bevacizumab, sorgt für eine Normalisierung des Gefäßbettes. (Hanahan 1997; Maisonpierre et al. 1997; Augustin et al. 2009; Falcón et al. 2009) Herrscht eine hohe Ang-2-Expression im Tumor und eine entsprechend hohe Ang-2-Konzentration im Serum der Patienten, scheint dieser Prozess der Normalisierung erheblich behindert zu werden. Die Wirkung des Bevacizumab wird anscheinend durch hohe Ang-2-Werte antagonisiert. Diese These wird unterstützt durch die Tatsache, dass ein niedriges Ang-2 zu einer guten Krankheitskontrolle führt; im Gegensatz dazu Patienten mit einem hohen Ang-2 ein Outcome vergleichbar mit der Therapie ohne Bevacizumab aufweisen. Dieser biologische Hintergrund spricht für eine mögliche Rolle von Serum Ang-2 als Prädiktor einer Bevacizumab-haltigen Therapie.

Zusammengefasst konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der Angiogenesemediator Ang-2 im Rahmen des kolorektalen Karzinoms als prognostischer Marker verwendet werden könnte. Weiterhin deuten die Resultate dieser Arbeit sehr stark darauf hin, dass es sich zusätzlich um einen Prädiktor für das Outcome von Patienten mit kolorektalem Karzinom handelt, die mit einer Bevacizumab-haltigen Therapie behandelt werden. Diese erstmalig aufgezeigte These muss zukünftig anhand größerer, randomisierter Studien validiert werden.

### **4.3 Korrelation der untersuchten Faktoren**

Ziel dieser Arbeit war es, einen Biomarker zu identifizieren, welcher im Rahmen einer Bevacizumab-haltigen Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms als Prädiktor genutzt werden kann. Dazu wurden zwei in dieser Hinsicht neue Mediatoren (Gefäßmaturität, Ang-2) und zwei bereits etablierte Faktoren der Angiogenese (MVD,

---

VEGF) untersucht. Weiterhin wurden zum tieferen Verständnis der tumorbiologischen Zusammenhänge Korrelationen der einzelnen Mediatoren angestellt.

Unter biologischen Gesichtspunkten würde ein Zusammenhang von MVD und MVM sinnvoll erscheinen. Eine große Gefäßdichte beispielsweise könnte eine hohe Angiogeneserate mit daraus resultierender geringer Gefäßreife implizieren. Eine Korrelation dieser beiden Mediatoren konnte im Rahmen der vorliegenden Analysen jedoch nicht aufgewiesen werden. Somit konnten beide histopathologischen Parameter bezüglich der biologischen Grundlagen der Angiogenese keine neuen Aspekte liefern.

Ein Zusammenspiel der beiden Mediatoren VEGF und Ang-2 in der Tumorangiogenese wird in experimentellen Studien beschrieben. Vorhergehenden Untersuchungen zufolge kann Ang-2 nur unter der Bedingung von erhöhten VEGF-Konzentrationen proangiogen wirken. (Maisonpierre et al. 1997) Eine Korrelation dieser beiden Parameter ließ sich allerdings im hier untersuchten Patientenkollektiv nicht aufzeigen. Weitere, bisher nicht aufgeklärte Funktionen des Ang-2 deuten sich hier an.

Ferner ließe sich aufgrund der biologischen Gegebenheiten ein Zusammenhang zwischen den Serummediatoren und den histopathologischen Merkmalen erklären. Die Vaskularisierungsdichte und die Gefäßmaturität spiegeln die Prozesse der Angiogenese wieder, die durch Signaltransduktion von VEGF und Ang-2 initiiert werden. Auch diese Thesen ließen sich anhand des untersuchten Patientenmaterials nicht bestätigen. Es konnten keine Korrelationen zwischen MVD, MVM, VEGF und Ang-2 aufgedeckt werden. Besonders der fehlende Zusammenhang zwischen dem Perizytenbesatz der Gefäße und dem Ang-2 weist darauf hin, dass sich das Ang-2 nicht allein als Surrogatmarker für die Blutgefäßmorphologie bezeichnen lässt. Diese Resultate sind Ausdruck der noch nicht vollständig aufgeklärten Funktion des Angiopoietin-2.

Zusammenfassend lässt sich darstellen, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Korrelation der untersuchten Angiogenesemediatoren aufzuzeigen war. Im Hinblick auf die tumorbiologische Grundlagenforschung der Tumorangiogenese sind demnach weitere Studien nötig, um offene Fragen zu klären.

#### **4.4 Ausblick**

Die vorliegende Arbeit konnte klinisch wichtige Resultate liefern. Sie lieferte Hinweise darauf, dass es sich bei dem Angiogenesemediator Angiopoietin-2 um einen Prädiktor für eine Bevacizumab-haltige Therapie handeln könnte. Analog zu dem k-ras-Status für eine Cetuximab-haltige Therapie, könnte Ang-2 zukünftig genutzt werden, um prätherapeutisch jene Patienten auszuwählen, die von einer Bevacizumab-haltigen Behandlung profitieren. Ang-2 scheint in der Lage sowohl das Ansprechen, als auch den Erfolg

---

einer solchen Therapie vorherzusagen. So wäre es in Zukunft möglich, nur die Patienten mit Bevacizumab zu behandeln, die wahrscheinlich einen positiven Nutzen, also größere Krankheitskontrolle und ein verlängertes Überleben, daraus ziehen können. Gleichzeitig könnte es vermieden werden, Non-Responder unnötig der erhöhten Toxizität auszusetzen. Auch wirtschaftlich würde sich ein positiver Effekt zeigen, da die Therapie mit dem Antikörper sehr kostenintensiv ist und so ein erhebliches Potential zur Kostenreduktion besteht. Aus diesen Gründen wäre eine klinische Etablierung der Ang-2-Bestimmung vor dem Start einer Bevacizumab-haltigen Therapie zur Prädiktion von großem Nutzen.

Ein weiterer Ausblick in die Zukunft liefert die Betrachtung des Ang-2 als mögliche Zielstruktur einer Therapie. Da ein erhöhter Ang-2-Wert sowohl im kolorektalen Karzinom, als auch in anderen Tumorentitäten mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, wäre eine therapeutische Blockade des Ang-2 möglicherweise eine sinnvolle Option. (Oliner et al. 2004) Erste präliminäre Studien überprüfen die Wirksamkeit eines Ang-2-Inhibitors als weiteren Angiogenese-Hemmer. (Hu et al. 2009) Dabei könnte ein Ang-2-Inhibitor sowohl alleine, als auch gemeinsam mit dem VEGF-Inhibitor Bevacizumab verabreicht werden, um synergistische Effekte zu erzielen. Im Rahmen eines solchen neuartigen Medikamentes in der Therapie solider Tumore könnte die prätherapeutische Ang-2-Konzentration ebenfalls einen bedeutenden Marker für Ansprechen und Therapieerfolg darstellen. Die Forschung bezüglich eines Ang-2-Inhibitors befindet sich allerdings erst in den Anfängen, sodass weitere Grundlagenforschung und erste klinische Studien abzuwarten bleiben.

Für die nähere Zukunft wäre eine Bestätigung der vorliegenden Ergebnisse wünschenswert. Weitere große, randomisierte Studien sind nötig, um die Rolle des Angiotensin-2 als Prädiktor einer Bevacizumab-haltigen Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms zu validieren und einen möglichen Einsatz in der klinischen Routine zu rechtfertigen.

---

---

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das kolorektale Karzinom (KRK) zählt in der westlichen Welt zu den häufigsten malignen Neoplasien. Eine Kombination aus einer Chemotherapie mit dem gegen Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) gerichteten monoklonalen Antikörper Bevacizumab stellt heute den Standard in der Erstlinientherapie der metastasierten Erkrankung dar. Die proangiogene und damit protumorigene Wirkung des VEGF kann mit Hilfe von Bevacizumab unterbunden werden. Weiterhin sorgt Bevacizumab über eine Normalisierung des Tumorgefäßbettes für einen verbesserten Transport von Chemotherapeutika zum Wirkort im Tumor. Biomarker, welche die Wirksamkeit einer antiangiogenen Therapie mit Bevacizumab vorhersagen können, konnten bislang nicht gefunden werden. Für die Optimierung des klinischen Einsatzes des Medikamentes im Hinblick auf eine Vermeidung von Nebenwirkungen und auf die Finanzierbarkeit ist die Etablierung eines solchen Biomarkers essentiell. Angiopoietin-2 (Ang-2) ist im Zusammenspiel mit VEGF ein zentraler Regulator der Tumorangiogenese und beeinflusst die Gefäßreife.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, potentielle Biomarker im Hinblick auf eine Bevacizumab-haltige Therapie bei Patienten mit kolorektalem Karzinom zu untersuchen. Mit der Gefäßdichte (Microvessel Density, MVD) und der Gefäßreife, gemessen anhand der Bedeckung von Endothelzellen mit Perizyten (Microvessel Maturity, MVM), wurden zwei etablierte vaskuläre Parameter ausgewertet. Weiterhin wurde das Serum VEGF sowie das Serum Angiopoietin-2 gemessen.

Ang-2 im Serum war bei Patienten mit KRK im Stadium IV signifikant erhöht im Vergleich zu Patienten in den Stadien I-III (n=90) sowie gesunden Kontrollen (n=33). In einer Gruppe von Patienten (n=34) mit metastasiertem KRK unter Bevacizumab-haltiger Therapie, die prospektiv klinisch verfolgt wurden, zeigte sich, dass weder die MVD noch die MVM oder die prätherapeutischen VEGF-Serumspiegel mit dem klinischen Verlauf korrelierten. Im Gegensatz dazu waren niedrige (< 3,5 ng/ml) prätherapeutische Serum Ang-2-Werte im Vergleich zu Werten >3,5 ng/ml mit einem günstigen klinischen Verlauf korreliert: Die Ansprechrate lag bei 82% vs. 31%,  $p < 0,01$ . Das mediane progressionsfreie Überleben ergab 14,1 Monate gegenüber 8,5 Monaten,  $p < 0,01$  und das Todesrisiko war in der Gruppe mit niedrigem Ang-2 um 91% reduziert,  $p < 0,05$ .

Basierend auf diesen Daten kann eine prognostische Bedeutung für Serum Ang-2 angenommen werden. Die Frage, ob das prätherapeutische Serum Ang-2 auch prädiktiv für die Wirksamkeit von Bevacizumab ist, kann nur in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden, die auch eine Kontrollgruppe von Patienten einschließen, welche nur

---

mit einer Chemotherapie behandelt worden sind. Solche Untersuchungen werden aktuell vorbereitet. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit der biologischen Funktion des Ang-2: es sorgt für eine Entreifung von Gefäßen und führt damit zu einem unreifen, chaotisch aufgebauten Gefäßsystem. Damit könnte es als Gegenspieler der durch Bevacizumab induzierten Normalisierung des Gefäßbettes wirken und eine morphologische und funktionelle Stabilisierung der Gefäße verhindern und somit den Transport der Chemotherapeutika zum Wirkort im Tumor erschweren. Es wäre allerdings auch denkbar, dass Serum Ang-2 ein Biomarker für die Zugänglichkeit eines Tumors für Chemotherapie im Allgemeinen ist. In Zukunft sind größere, prospektive Studien nötig, um diese vielversprechenden Ergebnisse zu validieren.

---

---

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahmad, S.A., Liu, W., Jung, Y.D., Fan, F., Reinmuth, N., Bucana, C.D. & Ellis, L.M., 2001. Differential expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in colon carcinoma. A possible mechanism for the initiation of angiogenesis. *Cancer*, 92(5), 1138-43.
  2. Ahmad, S.A., Liu, W., Jung, Y.D., Fan, F., Wilson, M., Reinmuth, N., Shaheen, R.M., Bucana, C.D. & Ellis, L.M., 2001. The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Research*, 61(4), 1255-9.
  3. Amado, R.G., Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, D.J., Juan, T., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R., Patterson, S.D. & Chang, D.D., 2008. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(10), 1626-1634.
  4. Augustin, H.G., Koh, G.Y., Thurston, G. & Alitalo, K., 2009. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(3), 165-177.
  5. Benjamin, L.E., Golijanin, D., Itin, A., Pode, D. & Keshet, E., 1999. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(2), 159-65.
  6. Benjamin, L.E., Hemo, I. & Keshet, E., 1998. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development (Cambridge, England)*, 125(9), 1591-8.
  7. Bergers, G. & Song, S., 2005. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-Oncology*, 7(4), 452-64.
  8. Bertolini, F., Shaked, Y., Mancuso, P. & Kerbel, R.S., 2006. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nature Reviews. Cancer*, 6(11), 835-845.
  9. Borgström, P., Hillan, K.J., Sriramarao, P. & Ferrara, N., 1996. Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy. *Cancer Research*, 56(17), 4032-9.
  10. Bossi, P., Viale, G., Lee, A.K., Alfano, R., Coggi, G. & Bosari, S., 1995. Angiogenesis in colorectal tumors: microvessel quantitation in adenomas and carcinomas with clinicopathological correlations. *Cancer Research*, 55(21), 5049-5053.
  11. Caprioni, F. & Fornarini, G., 2007. Bevacizumab in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Future Oncology (London, England)*, 3(2), 141-8.
-

- 
12. Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. & Nagy, A., 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380(6573), 435-439.
  13. Carmeliet, P., 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, 9(6), 653-60.
  14. Carmeliet, P., 2005. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, 69 Suppl 3, 4-10.
  15. Cassidy, J., Clarke, S., Díaz-Rubio, E., Scheithauer, W., Figer, A., Wong, R., Koski, S., Lichinitser, M., Yang, T., Rivera, F., Couture, F., Sirzén, F. & Saltz, L., 2008. Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(12), 2006-2012.
  16. Cercek, A. & Saltz, L.B., 2008. First-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: an overview of recent data on chemotherapy plus targeted agents. *Clinical Colorectal Cancer*, 7 Suppl 2, S47-51.
  17. Chung, Y., Hou, Y., Chang, C. & Hseu, T., 2006. Expression and prognostic significance of angiopoietin in colorectal carcinoma. *Journal of Surgical Oncology*, 94(7), 631-8.
  18. Cianchi, F., Palomba, A., Messerini, L., Boddi, V., Asirelli, G., Perigli, G., Bechi, P., Taddei, A., Pucciani, F. & Cortesini, C., 2002. Tumor angiogenesis in lymph node-negative rectal cancer: correlation with clinicopathological parameters and prognosis. *Annals of Surgical Oncology*, 9(1), 20-26.
  19. Colucci, G. u. a., 2005. Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(22), 4866-4875.
  20. Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., Chau, I. & Van Cutsem, E., 2004. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 351(4), 337-45.
  21. De Roock, W., Biesmans, B., De Schutter, J. & Tejpar, S., 2009. Clinical biomarkers in oncology: focus on colorectal cancer. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 13(2), 103-114.
  22. Des Guetz, G., Uzzan, B., Nicolas, P., Cucherat, M., Morere, J., Benamouzig, R., Breau, J. & Perret, G., 2006. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *British Journal of Cancer*, 94(12), 1823-1832.
  23. Douillard, J.Y., Cunningham, D., Roth, A.D., Navarro, M., James, R.D., Karasek, P., Jandik, P., Iveson, T., Carmichael, J., Alakl, M., Gruia, G., Awad, L. & Rougier, P., 2000. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet*, 355(9209), 1041-7.
-

- 
24. Eberhard, A., Kahlert, S., Goede, V., Hemmerlein, B., Plate, K.H. & Augustin, H.G., 2000. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Research*, 60(5), 1388-1393.
  25. Eisenhauer, E.A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L.H., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., Rubinstein, L., Shankar, L., Dodd, L., Kaplan, R., Lacombe, D. & Verweij, J., 2009. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 45(2), 228-247.
  26. Eklund, L. & Olsen, B.R., 2006. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Experimental Cell Research*, 312(5), 630-41.
  27. Falcón, B.L., Hashizume, H., Koumoutsakos, P., Chou, J., Bready, J.V., Coxon, A., Oliner, J.D. & McDonald, D.M., 2009. Contrasting actions of selective inhibitors of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 on the normalization of tumor blood vessels. *The American Journal of Pathology*, 175(5), 2159-2170.
  28. Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J. & Moore, M.W., 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380(6573), 439-442.
  29. Ferrara, N., 2005. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology*, 69 Suppl 3, 11-6.
  30. Ferrara, N., Hillan, K.J. & Novotny, W., 2005. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333(2), 328-35.
  31. Ferrara, N. & Kerbel, R.S., 2005. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 438(7070), 967-74.
  32. Fiedler, U., Scharpfenecker, M., Koidl, S., Hegen, A., Grunow, V., Schmidt, J.M., Kriz, W., Thurston, G. & Augustin, H.G., 2004. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood*, 103(11), 4150-4156.
  33. Folkman, J., 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine*, 285(21), 1182-6.
  34. Frank, R.E., Saclarides, T.J., Leurgans, S., Speziale, N.J., Drab, E.A. & Rubin, D.B., 1995. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Annals of Surgery*, 222(6), 695-699.
  35. Gennatas, C., Michalaki, V., Gennatas, S. & Papalambros, E., 2008. Irinotecan plus capecitabine as first-line chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Anticancer Research*, 28(3B), 1923-1926.
  36. Gerhardt, H. & Betsholtz, C., 2003. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell and Tissue Research*, 314(1), 15-23.
-

- 
37. Glade Bender, J., Cooney, E.M., Kandel, J.J. & Yamashiro, D.J., 2004. Vascular remodeling and clinical resistance to antiangiogenic cancer therapy. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 7(4-5), 289-300.
  38. Goede, V., Coutelle, O., Neuneier, J., Reinacher-Schick, A., Schnell, R., Koslowsky, T.C., Weihrauch, M.R., Cremer, B., Kashkar, H., Odenthal, M., Augustin, H.G., Schmiegel, W., Hallek, M. & Hacker, U.T., 2010. Identification of serum angiopoietin-2 as a biomarker for clinical outcome of colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing therapy. *British Journal of Cancer*, 103(9), 1407-1414.
  39. Goldberg, R.M., 2005. Advances in the treatment of metastatic colorectal cancer. *The Oncologist*, 10 Suppl 3, 40-48.
  40. de Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., Papamichael, D., Le Bail, N., Louvet, C., Hendler, D., de Braud, F., Wilson, C., Morvan, F. & Bonetti, A., 2000. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(16), 2938-47.
  41. Greenberg, J.I., Shields, D.J., Barillas, S.G., Acevedo, L.M., Murphy, E., Huang, J., Schepke, L., Stockmann, C., Johnson, R.S., Angle, N. & Cheresch, D.A., 2008. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature*, 456(7223), 809-813.
  42. Grothey, A., Deschler, B. & Kroening, H., 2001. Bolus 5-fluorouracil (5-FU)/ folinic acid (FA) (Mayo) vs. weekly high-dose 24h 5-fu infusion/A + oxaliplatin (OXA) in advanced colorectal cancer (CRC). Results of a phase III study. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 20, 496.
  43. Hanahan, D., 1997. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5322), 48-50.
  44. Hecht, J.R., Mitchell, E., Chidiac, T., Scroggin, C., Hagenstad, C., Spigel, D., Marshall, J., Cohn, A., McCollum, D., Stella, P., Deeter, R., Shahin, S. & Amado, R.G., 2009. A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(5), 672-680.
  45. Helfrich, I., Edler, L., Sucker, A., Thomas, M., Christian, S., Schadendorf, D. & Augustin, H.G., 2009. Angiopoietin-2 levels are associated with disease progression in metastatic malignant melanoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(4), 1384-1392.
  46. Hlatky, L., Hahnfeldt, P. & Folkman, J., 2002. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(12), 883-893.
  47. Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D. & Wiegand, S.J., 1999. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5422), 1994-1998.
-

- 
48. Holden, S.N., Ryan, E. & Kearns, A., 2005. Benefit from bevacizumab (BV) is independent of pretreatment plasma vascular endothelial growth factor-A (pl-VEGF) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). , 23(16S, Part I of II (June 1 Supplement)), 3555.
  49. Hu, B. & Cheng, S., 2009. Angiopoietin-2: development of inhibitors for cancer therapy. *Current Oncology Reports*, 11(2), 111-116.
  50. Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R. & Kabbinavar, F., 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 350(23), 2335-42.
  51. Jain, R.K., 2001. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nature Medicine*, 7(9), 987-9.
  52. Jain, R.K., 2005. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in anti-angiogenic therapy. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5706), 58-62.
  53. Jain, R.K., Duda, D.G., Clark, J.W. & Loeffler, J.S., 2006. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nature Clinical Practice. Oncology*, 3(1), 24-40.
  54. Jain, R.K., Duda, D.G., Willett, C.G., Sahani, D.V., Zhu, A.X., Loeffler, J.S., Batchelor, T.T. & Sorensen, A.G., 2009. Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 6(6), 327-338.
  55. Jubb, A.M., Hurwitz, H.I., Bai, W., Holmgren, E.B., Tobin, P., Guerrero, A.S., Kabbinavar, F., Holden, S.N., Novotny, W.F., Frantz, G.D., Hillan, K.J. & Koeppen, H., 2006. Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(2), 217-27.
  56. Jubb, A.M., Oates, A.J., Holden, S. & Koeppen, H., 2006. Predicting benefit from anti-angiogenic agents in malignancy. *Nature Reviews. Cancer*, 6(8), 626-35.
  57. Kabbinavar, F., Hurwitz, H.I., Fehrenbacher, L., Meropol, N.J., Novotny, W.F., Lieberman, G., Griffing, S. & Bergsland, E., 2003. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(1), 60-65.
  58. Karapetis, C.S., Khambata-Ford, S., Jonker, D.J., O'Callaghan, C.J., Tu, D., Tebbutt, N.C., Simes, R.J., Chalchal, H., Shapiro, J.D., Robitaille, S., Price, T.J., Shepherd, L., Au, H., Langer, C., Moore, M.J. & Zalcberg, J.R., 2008. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 359(17), 1757-1765.
  59. Kuboki, S., Shimizu, H., Mitsuhashi, N., Kusashio, K., Kimura, F., Yoshidome, H., Ohtsuka, M., Kato, A., Yoshitomi, H. & Miyazaki, M., 2008. Angiopoietin-2 levels in the hepatic vein as a useful predictor of tumor invasiveness and prognosis in human hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 23(7 Pt 2), e157-164.
-

- 
60. Lin, M.I. & Sessa, W.C., 2004. Antiangiogenic therapy: creating a unique "window" of opportunity. *Cancer Cell*, 6(6), 529-31.
  61. Ludwig, J.A. & Weinstein, J.N., 2005. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nature Reviews. Cancer*, 5(11), 845-856.
  62. Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., Daly, T.J., Davis, S., Sato, T.N. & Yancopoulos, G.D., 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5322), 55-60.
  63. Marshall, J.L., 2009. Vascular Endothelial Growth Factor plus Epidermal Growth Factor Receptor Dual Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer: Synergy or Antagonism? *Journal of Oncology*, 2009, 937305.
  64. McCormack, P.L. & Keam, S.J., 2008. Bevacizumab: a review of its use in metastatic colorectal cancer. *Drugs*, 68(4), 487-506.
  65. Murukesh, N., Dive, C. & Jayson, G.C., 2010. Biomarkers of angiogenesis and their role in the development of VEGF inhibitors. *British Journal of Cancer*, 102(1), 8-18.
  66. Nakayama, T., Hatachi, G., Wen, C., Yoshizaki, A., Yamazumi, K., Niino, D. & Sekine, I., 2005. Expression and significance of Tie-1 and Tie-2 receptors, and angiopoietins-1, 2 and 4 in colorectal adenocarcinoma: Immunohistochemical analysis and correlation with clinicopathological factors. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 11(7), 964-9.
  67. Nanni, O., Volpi, A., Frassinetti, G.L., De Paola, F., Granato, A.M., Dubini, A., Zoli, W., Scarpi, E., Turci, D., Oliverio, G., Gambi, A. & Amadori, D., 2002. Role of biological markers in the clinical outcome of colon cancer. *British Journal of Cancer*, 87(8), 868-875.
  68. Ocak, I., Baluk, P., Barrett, T., McDonald, D.M. & Choyke, P., 2007. The biologic basis of in vivo angiogenesis imaging. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 12, 3601-3616.
  69. Ochiuni, T., Tanaka, S., Oka, S., Hiyama, T., Ito, M., Kitadai, Y., Haruma, K. & Chayama, K., 2004. Clinical significance of angiopoietin-2 expression at the deepest invasive tumor site of advanced colorectal carcinoma. *International Journal of Oncology*, 24(3), 539-47.
  70. Oliner, J., Min, H., Leal, J., Yu, D., Rao, S., You, E., Tang, X., Kim, H., Meyer, S., Han, S.J., Hawkins, N., Rosenfeld, R., Davy, E., Graham, K., Jacobsen, F., Stevenson, S., Ho, J., Chen, Q., Hartmann, T. & Michaels, M., 2004. Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2. *Cancer Cell*, 6(5), 507-16.
  71. O'Neil, B.H. & Goldberg, R.M., 2008. Innovations in chemotherapy for metastatic colorectal cancer: an update of recent clinical trials. *The Oncologist*, 13(10), 1074-1083.
  72. Park, J.H., Park, K.J., Kim, Y.S., Sheen, S.S., Lee, K.S., Lee, H.N., Oh, Y.J. & Hwang, S.C., 2007. Serum angiopoietin-2 as a clinical marker for lung cancer. *Chest*, 132(1), 200-206.
-

- 
73. Patt, Y.Z., Lee, F., Liebmann, J.E., Diamandidis, D., Eckhardt, S.G., Javle, M., Justice, G.R., Keiser, W., Salvatore, J.R., Bexon, A. & Lin, E., 2007. Capecitabine plus 3-weekly irinotecan (XELIRI regimen) as first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer: phase II trial results. *American Journal of Clinical Oncology*, 30(4), 350-357.
  74. Poon, R.T., Fan, S.T. & Wong, J., 2001. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19(4), 1207-1225.
  75. Presta, L.G., Chen, H., O'Connor, S.J., Chisholm, V., Meng, Y.G., Krummen, L., Winkler, M. & Ferrara, N., 1997. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Research*, 57(20), 4593-9.
  76. Provenzale, J.M., 2007. Imaging of angiogenesis: clinical techniques and novel imaging methods. *AJR. American Journal of Roentgenology*, 188(1), 11-23.
  77. Renz-Polster, H., Krautzig, S. & Braun, J., 2006. *Basislehrbuch Innere Medizin 3.* Aufl., Urban & Fischer Verlag.
  78. Saclarides, T.J., Speziale, N.J., Drab, E., Szeluga, D.J. & Rubin, D.B., 1994. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. *Diseases of the Colon and Rectum*, 37(9), 921-926.
  79. Saltz, L.B., Cox, J.V., Blanke, C., Rosen, L.S., Fehrenbacher, L., Moore, M.J., Maroun, J.A., Ackland, S.P., Locker, P.K., Pirotta, N., Elfring, G.L. & Miller, L.L., 2000. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 343(13), 905-14.
  80. Saltz, L.B., Clarke, S., Díaz-Rubio, E., Scheithauer, W., Figer, A., Wong, R., Koski, S., Lichinitser, M., Yang, T., Rivera, F., Couture, F., Sirzén, F. & Cassidy, J., 2008. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(12), 2013-2019.
  81. Scharpfenecker, M., Fiedler, U., Reiss, Y. & Augustin, H.G., 2005. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 4), 771-780.
  82. Schneider, D. & Richling, F., 2007. *Fakten. Arzneimittel 2007 3.* Aufl., Georg Thieme Verlag.
  83. Sessa, C., Guibal, A., Del Conte, G. & Rüegg, C., 2008. Biomarkers of angiogenesis for the development of antiangiogenic therapies in oncology: tools or decorations? *Nature Clinical Practice. Oncology*, 5(7), 378-391.
  84. Shih, T. & Lindley, C., 2006. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clinical Therapeutics*, 28(11), 1779-802.
  85. Siewert, J.R., 2006. *Chirurgie 8.* Aufl., Springer Verlag.
-

- 
86. Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J. & Norton, L., 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England Journal of Medicine*, 344(11), 783-792.
  87. Statistisches Bundesamt, 2009. Todesursachen. Available at: <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistik/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/SterbefaelleInsgesamt,templated=renderPrint.psml> [Zugegriffen November 24, 2010].
  88. Takebayashi, Y., Aklyama, S., Yamada, K., Akiba, S. & Aikou, T., 1996. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer*, 78(2), 226-231.
  89. Tol, J., Koopman, M., Cats, A., Rodenburg, C.J., Creemers, G.J.M., Schrama, J.G., Erdkamp, F.L.G., Vos, A.H., van Groeningen, C.J., Sinnige, H.A.M., Richel, D.J., Voest, E.E., Dijkstra, J.R., Vink-Börger, M.E., Antonini, N.F., Mol, L., van Krieken, J.H.J.M., Dalesio, O. & Punt, C.J.A., 2009. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 360(6), 563-572.
  90. Tomisaki, S., Ohno, S., Ichiyoshi, Y., Kuwano, H., Maehara, Y. & Sugimachi, K., 1996. Microvessel quantification and its possible relation with liver metastasis in colorectal cancer. *Cancer*, 77(8 Suppl), 1722-1728.
  91. Van Cutsem, E., Köhne, C., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C., Makhson, A., D'Haens, G., Pintér, T., Lim, R., Bodoky, G., Roh, J.K., Folprecht, G., Ruff, P., Stroh, C., Tejpar, S., Schlichting, M., Nippgen, J. & Rougier, P., 2009. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 360(14), 1408-1417.
  92. Weidner, N., Semple, J.P., Welch, W.R. & Folkman, J., 1991. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 324(1), 1-8.
  93. Wilke, H. & Van Cutsem, E., 2003. Current treatments and future perspectives in colorectal and gastric cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 14 Suppl 2, ii49-55.
  94. Willett, C.G., Boucher, Y., Duda, D.G., di Tomaso, E., Munn, L.L., Tong, R.T., Kozin, S.V., Petit, L., Jain, R.K., Chung, D.C., Sahani, D.V., Kalva, S.P., Cohen, K.S., Scadden, D.T., Fischman, A.J., Clark, J.W., Ryan, D.P., Zhu, A.X., Blaszkowsky, L.S., Shellito, P.C., Mino-Kenudson, M. & Lauwers, G.Y., 2005. Surrogate markers for antiangiogenic therapy and dose-limiting toxicities for bevacizumab with radiation and chemotherapy: continued experience of a phase I trial in rectal cancer patients. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(31), 8136-8139.
  95. Willett, C.G., Boucher, Y., di Tomaso, E., Duda, D.G., Munn, L.L., Tong, R.T., Chung, D.C., Sahani, D.V., Kalva, S.P., Kozin, S.V., Mino, M., Cohen, K.S., Scadden, D.T., Hartford, A.C., Fischman, A.J., Clark, J.W., Ryan, D.P., Zhu, A.X., Blaszkowsky, L.S., Chen, H.X., Shellito, P.C., Lauwers, G.Y. & Jain, R.K., 2004. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. *Nature Medicine*, 10(2), 145-7.
-

## 7 VORABVERÖFFENTLICHUNG

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgendem Artikel veröffentlicht:

Goede, V., Coutelle, O., Neuneier, J., Reinacher-Schick, A., Schnell, R., Koslowsky, T.C., Weihrauch, M.R., Cremer, B., Kashkar, H., Odenthal, M., Augustin, H.G., Schmiegel, W., Hallek, M. & Hacker, U.T., 2010. Identification of serum angiopoietin-2 as a biomarker for clinical outcome of colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing therapy. *British Journal of Cancer*, 103(9), 1407-1414.

---

## **8 LEBENSLAUF**

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

---