

**Aus dem Universitätsklinikum Münster**  
**Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe**  
**-Direktor: Univ. - Prof. Dr. med. L. Kiesel-**

**Einfluss des Endothelin – A – Rezeptorantagonisten**  
**Atrasentan auf das Wachstumsverhalten**  
**des Mammakarzinoms *in vivo***

**INAUGURAL – DISSERTATION**

**zur**

**Erlangung des doctor medicinae**

**der Medizinischen Fakultät**

**der Westfälischen Wilhelms – Universität Münster**

**vorgelegt von**

**Meyer, Volker**

**aus Esens**

**2008**

*Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms – Universität Münster*

Dekan : Univ. – Prof. Dr. Volker Arolt  
1. Berichterstatter : Priv. – Doz. Dr. Pia Wülfing  
2. Berichterstatter : Prof. Dr. Martin Westphal  
Tag der mündlichen Prüfung : 09.05.2008

**Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
-Direktor: Univ. - Prof. Dr. med. L. Kiesel-**

**Referent : Priv. Doz. Dr. med. Pia Wülfing  
Koreferent: Prof. Dr. med. Martin Westphal**

**Zusammenfassung**

**„Einfluss des Endothelin – A – Rezeptorantagonisten Atrasentan auf das  
Wachstumsverhalten des Mammakarzinoms *in vivo*“**

vorgelegt von Volker Meyer

**Einleitung:** Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau. In den Industrieländern beträgt das Risiko etwa 1:9, im Laufe des Lebens daran zu erkranken. Therapeutisch stehen bis jetzt neben der Operation v.a. verschiedene Chemotherapien und endokrine Therapiestrategien zur Verfügung. In den vergangenen Jahren sind die zielgerichteten Therapien („targeted therapies“) als neue effektivere und nebenwirkungsärmere Option in den Fokus der onkologischen Forschung gerückt. Auch die Endothelin (ET)-Achse stellt ein potentiell „Target“ für die Tumorthherapie dar. Die ET-Achse setzt sich aus den drei Peptiden ET-1, ET-2 und ET-3 und den beiden Rezeptoren ET<sub>A</sub>R und ET<sub>B</sub>R zusammen. Von besonderer Bedeutung für die antitumorale Therapie scheint dabei der ET<sub>A</sub>-Rezeptor zu sein.

In dieser Arbeit wird daher der Einfluss des selektiven ET<sub>A</sub>R-Antagonisten, *Atrasentan* (ABT-627), auf das Wachstum von Mammakarzinom-Xenografttumoren im Mausmodell untersucht. Diese Ergebnisse werden in den Kontext weiterer Forschungsergebnisse gestellt.

**Material und Methoden:** Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt: In der ersten wurden 40 Mäuse in 4 Therapiearmen nach s.c. Injektion von Mammakarzinomzellen (MCF-7 Zellen mit positivem ET<sub>A</sub>R- und ER-Status) in die rechte Flanke wie folgt behandelt: (1) mit Atrasentan mono, (2) mit Paclitaxel, einem etablierten Chemotherapeutikum, (3) einer Kombination der beiden Substanzen oder (4) mit Trägerlösung (Kontrollgruppe). Die genannten Substanzen wurden 2 x täglich intraperitoneal injiziert. Die Auswertung erfolgte anhand 1) Volumenbestimmung der Xenograftumoren mittels Meßschieber 2) Diffusionsgewichteter MRT 3) Bestimmung der vaskulären Volumenfraktion mittels Eisenoxidkontrastmittel – MRT 4) RT – PCR und 5) Immunhistochemie. Da die erste Versuchsreihe auf eine Wirksamkeit besonders bei frühzeitigem Einsatz von Atrasentan hindeutete, wurde eine zweite Reihe zur weiteren Überprüfung dieser Hypothese durchgeführt (n=16 Mäusen). In jedem Therapiearm wurden 8 Mäuse behandelt. Diese erhielten entweder Atrasentan oder (als Kontrollen) lediglich Trägerlösung. Im Gegensatz zur ersten Versuchsreihe, bei der die Therapie 10 Tage nach dem Xenografting startete, wurde die Therapie bei der 2. Versuchsreihe am Tag der Tumorzell-Injektion eingeleitet.

**Ergebnisse:** Es zeigte sich eine signifikante Wachstumshemmung der Tumoren durch die Atrasentan-Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe (p = 0,002). Es ließen sich keine additiven Effekte durch Kombination von Atrasentan mit Paclitaxel erzielen. Bei den Tumoren der mit Atrasentan behandelten Tiere fanden sich signifikant höhere ET<sub>A</sub>R – Konzentrationen und eine geringere Mikrogefäßdichte als in der Kontrollgruppe.

In der zweiten Versuchsreihe konnte bei der Hälfte der Mäuse (4 von 8) ein Tumorwachstum komplett verhindert werden, während in der Kontrollgruppe alle Tiere Tumoren ausbildeten.

**Diskussion:** Wir schlussfolgern aus unseren Daten, dass durch selektive Hemmung von ETAR mittels Atrasentan das Wachstum ET<sub>A</sub>R-positiver Tumoren *in vivo* gehemmt werden kann. Besonders viel versprechend erscheint der frühzeitige Einsatz der Substanz. Möglicherweise sind die beobachteten präventiven Effekte auf eine Hemmung der Invasion und Angiogenese der Tumorzellen zurück zu führen. Übertragen auf die Klinik, erscheint eine Anwendung im Bereich der adjuvanten Therapie denkbar. Dieses Konzept wird in weiteren präklinischen Studien derzeit weiter untersucht.

**Tag der mündlichen Prüfung : 09.05.2008  
Aktenzeichen tierexp. Genehmigung : G5/2004, AZ 50.0835.1.0**

**MEINEN ELTERN**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1	ZIELE DER ARBEIT .....	- 1 -
1.2	DAS MAMMAKARZINOM .....	- 2 -
1.2.1	Epidemiologie .....	- 2 -
1.2.2	Erkrankungsrisiko und Risikofaktoren .....	- 4 -
1.2.3	Formen des Mammakarzinoms .....	- 8 -
1.2.4	Pathogenese .....	- 9 -
1.2.5	Prognose und Prognosefaktoren .....	- 10 -
1.2.5.1	<i>TNM – Klassifikation</i> .....	- 11 -
1.2.5.2	<i>Grading</i> .....	- 12 -
1.2.5.3	<i>Histologie</i> .....	- 12 -
1.2.5.4	<i>Hormonrezeptorstatus</i> .....	- 13 -
1.2.6	Diagnostik .....	- 14 -
1.2.7	Therapie .....	- 15 -
1.3	ANGIOGENESE .....	- 18 -
1.3.1	Einordnung und Definition .....	- 18 -
1.3.2	Pathologische Angiogenese .....	- 21 -
1.3.3	Tumorangiogenese und „angiogenetischer Switch“ .....	- 22 -
1.3.4	Angiogenese als unabhängiger Prognosefaktor des Mammakarzinoms .....	- 27 -
1.4	DIE ENDOTHELINACHSE .....	- 28 -
1.4.1	Endotheline: Struktur und Vorkommen .....	- 28 -
1.4.2	Die Rezeptoren der Endothelinachse .....	- 29 -
1.4.3	Synthese und Abbau von Endothelin-1 .....	- 29 -
1.4.4	Physiologie der Endothelinachse .....	- 30 -
1.4.5	Pathophysiologie der Endothelinachse .....	- 32 -
1.4.6	Rolle der Endothelinachse in der Tumorangiogenese .....	- 33 -
1.4.6.1	<i>Direkte Beeinflussung der Angiogenese</i> .....	- 33 -
1.4.6.2	<i>Indirekte Beeinflussung der Angiogenese</i> .....	- 36 -
1.4.7	Expression der Endothelinachse beim Mammakarzinom .....	- 38 -
1.4.8	Endothelinexpression bei anderen Malignomen .....	- 43 -
1.4.8.1	<i>... beim Ovarialkarzinom</i> .....	- 43 -
1.4.8.2	<i>... beim Prostatakarzinom</i> .....	- 44 -
1.4.8.3	<i>... beim Blasenkarzinom</i> .....	- 44 -
1.4.8.4	<i>... beim malignen Melanom</i> .....	- 44 -
1.4.8.5	<i>... beim Nierenzellkarzinom</i> .....	- 45 -
1.4.8.6	<i>... beim Bronchialkarzinom</i> .....	- 45 -
1.4.8.7	<i>... beim Kolonkarzinom</i> .....	- 45 -
1.4.8.8	<i>... beim Cervixkarzinom</i> .....	- 45 -
1.4.8.9	<i>... beim Kaposi – Sarkom</i> .....	- 46 -
1.4.9	Zusammenfassung: Rolle der Endotheline bei Malignomen .....	- 47 -
1.4.10	Endothelinrezeptorantagonisten .....	- 48 -

1.4.10.1	<i>Unselektive ET<sub>A/B</sub>R – Antagonisten</i> .....	- 49 -
1.4.10.2	<i>Selektive ET<sub>A</sub>R – Antagonisten</i> .....	- 50 -
1.4.10.3	<i>Atrasentan</i> .....	- 51 -
1.4.10.3.1	<i>Metabolismus</i> .....	- 52 -
1.4.10.3.2	<i>Anwendungsgebiete</i> .....	- 53 -
1.4.10.4	<i>ZD4054</i> .....	- 56 -
1.4.10.5	<i>Selektive ET<sub>B</sub>R – Antagonisten</i> .....	- 57 -
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>- 59 -</b>
2.1	AUFBAU DER STUDIE.....	- 59 -
2.1.1	Die Mäuse .....	- 60 -
2.1.2	Zellkultur, Matrigel und β-Östradiol-Pellets .....	- 60 -
2.2	BEHANDLUNG DER MÄUSE.....	- 61 -
2.2.1	Paclitaxel .....	- 62 -
2.3	AUSWERTUNG .....	- 63 -
2.3.1	Übersicht .....	- 63 -
2.3.2	Diffusionsgewichtete Magnetresonanztomographie (DWI) .....	- 65 -
2.3.2.1	<i>Grundlagen</i> .....	- 65 -
2.3.2.2	<i>Anwendung des Verfahrens</i> .....	- 66 -
2.3.3	Bestimmung der VVF mittels USPIO.....	- 67 -
2.3.3.1	<i>Grundlagen</i> .....	- 67 -
2.3.3.2	<i>USPIO – Nanopartikel</i> .....	- 68 -
2.3.3.3	<i>Anwendung des Verfahrens</i> .....	- 69 -
2.3.4	RT – PCR .....	- 70 -
2.3.5	Immunhistochemie .....	- 71 -
2.3.6	Statistische Analyse.....	- 72 -
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>- 73 -</b>
3.1	TUMORVOLUMINA.....	- 73 -
3.2	GEWICHT.....	- 78 -
3.3	DIFFUSIONSGEWICHTETE MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE (DWI) .....	- 79 -
3.4	BESTIMMUNG DER VVF MITTELS EISENOXIDMESSUNGEN .....	- 80 -
3.5	RT – PCR.....	- 81 -
3.6	IMMUNHISTOCHEMIE .....	- 83 -
3.7	TUMORVOLUMINA DER ZWEITEN VERSUCHSREIHE .....	- 84 -

<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>- 87 -</b>
4.1	BEDEUTUNG DER ENDOTHELINACHSE .....	- 87 -
4.2	ERGEBNISSE .....	- 88 -
4.2.1	Tumorvolumina der ersten Versuchsreihe .....	- 88 -
4.2.2	RT-PCR.....	- 90 -
4.2.3	DWI.....	- 91 -
4.2.4	VVF mittels Eisenoxidsmessung .....	- 93 -
4.2.5	Tumorvolumina der zweiten Versuchsreihe .....	- 94 -
4.3	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK .....	- 95 -
4.4	SCHLUSSWORT .....	- 97 -
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>- 98 -</b>
<b>6</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>- 126 -</b>
<b>7</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>- 127 -</b>

**ANHANG**

I	: Glossar.....	- 128 -
II	: Liste der verwendeten Materialien.....	- 130 -

## 1 Einleitung

### 1.1 Ziele der Arbeit

Anhand eines Xenograft – Nacktmausmodells soll in dieser Studie der Einfluss des selektiven Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten Atrasentan® auf das Wachstumsverhalten von Xenografttumoren der humanen ET<sub>A</sub>R-positiven Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 *in vivo* untersucht werden.

Einer der wichtigsten Vorgänge, die das Wachstum von Tumoren und deren Metastasierung ermöglichen, ist die Angiogenese. Eine wirksame Blockade der Gefäßneubildung (antiangiogenetische Therapie) könnte zu einer Nekrotisierung bestehenden Tumorgewebes führen und die Metastasierung erschweren. Besonders viel versprechend erscheint ein Einsatz antiangiogenetischer Substanzen in der adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms. Diese könnte möglicherweise die gefürchtete Mikrometastasierung, welche Jahre nach der Erstdiagnose zur Metastasierung führen kann, verhindern oder reduzieren: Mikrometastasen ohne Blutversorgung könnten nicht „anwachsen“, da sie ab einer Größe von 1-2 mm<sup>3</sup> einen Anschluss an das Blutgefäßsystem des Wirtsorganismus benötigen.

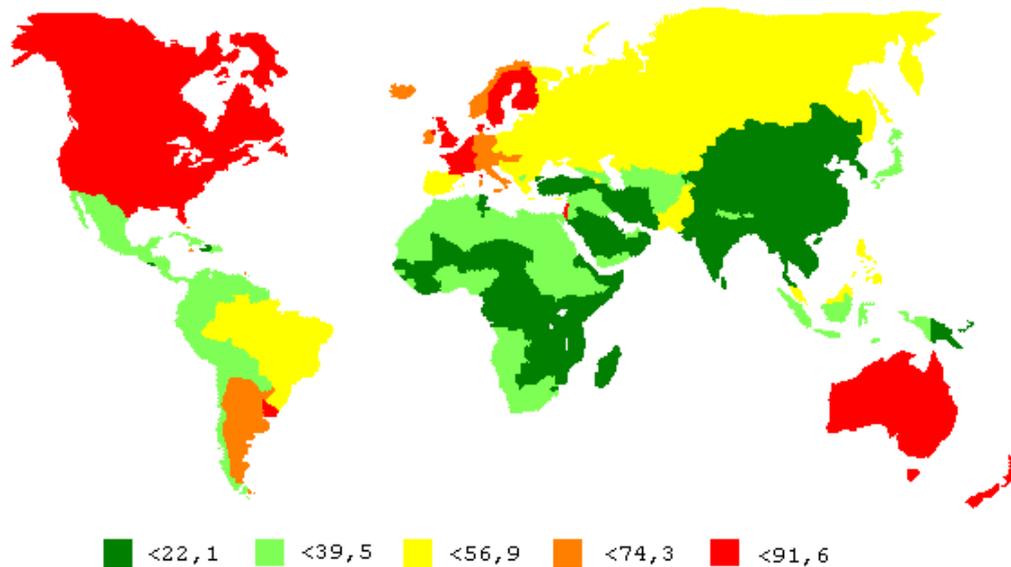
Die Angiogenese ist von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen abhängig, zu denen auch die „Endothelin (ET)-Achse“ gehört. Eine Endothelin-Überexpression konnte bei verschiedenen malignen Entitäten nachgewiesen werden, unter anderem auch beim Mammakarzinom. Insofern war auch der Aspekt einer anti-angiogenetischen Wirkung der ET<sub>A</sub>R-Hemmung Teil dieser Arbeit.

Um einen möglichen additiven therapeutischen Effekt des Atrasentans zusammen mit dem bekannten Chemotherapeutikum Paclitaxel zu untersuchen, haben wir darüberhinaus im Xenograftmodell die Wirkung von Paclitaxel als Mono-Therapie sowie in Kombination mit Atrasentan untersucht.

Meines Wissens ist diese Arbeit die erste, die sich mit der Wirkung eines selektiven Endothelinrezeptor-Antagonisten auf das Wachstumsverhalten von Mammakarzinomen anhand eines Xenograft – Modells *in vivo* beschäftigt.

## 1.2 Das Mammakarzinom

### 1.2.1 Epidemiologie



**Abbildung 1:** Altersstandardisierte Inzidenzen des Mammakarzinoms weltweit (jedes Alter, pro 100.000). Weitere Anmerkungen: *Siehe Text.*

*Adaptiert aus: Parkin et al. [310]*

Im Jahr 2000 erkrankten weltweit über eine Million Frauen an Brustkrebs, womit diese Erkrankung mit Abstand das häufigste Malignom der Frau darstellt [131, 310].

Bösartige Erkrankungen der Brust gelten, nach dem Bronchialkarzinom, als zweithäufigste Krebsneuerkrankung überhaupt auf der Welt [308], obwohl fast ausschließlich Frauen erkranken. Weniger als 1% der Neuerkrankungen betreffen Männer [117, 314].

Hinsichtlich der weltweiten Verteilung bestehen große Unterschiede v.a. zwischen den Industrienationen und den Entwicklungsländern [308]: Die höchsten *Inzidenzraten* werden in den höher entwickelten Ländern erreicht (siehe **Abbildung 1**): So beträgt die ASR<sup>\*,†</sup> für „more developed countries“ 63,22, die für „less developed countries“ 23,07. In Deutschland lag sie 1998 bei 63,0 [131].

Eine Ausnahme stellt Japan dar: Hier wird eine *Inzidenz* (ASR) von lediglich 21,9

\* ASR= „Altersstandardisierte Rate“: Zur Vergleichbarkeit unterschiedlicher Länder herangezogene Umrechnung der altersspezifischen Werte in altersstandardisierte, die sich auf eine fiktive „Standardbevölkerung“ bezieht (z.B. Welt- oder Europastandard) pro 100.000 Einwohner, Männer und Frauen inbegriffen.

† Weltstandard

beschrieben [274], wobei die Rate hier seit den späten 60er Jahren relativ gesehen stärker als in den übrigen industrialisierten Ländern ansteigt [470] und mit einem längerfristigen Erreichen des westlichen Niveaus gerechnet wird [358, 418].

Auch für die *Mortalität* gilt, dass diese in den Industrieländern am höchsten ist; Gemessen an der ASR\* lag 1994 die höchste Mortalitätsrate mit 26,4 in Dänemark vor, in Japan betrug sie lediglich 7,1. Deutschland lag mit 22,1 vor den USA (20,7) [277]. Allerdings finden sich in der Literatur recht unterschiedliche Angaben [131, 308].

In Europa lässt sich grob ein Nord – Süd und ein West – Ost – Gefälle ausmachen: Inzidenzen und Mortalität sind z.B. in Deutschland, Großbritannien und den Benelux–Staaten z.T. weitaus höher als in den Mittelmeerländern wie Griechenland oder Spanien. Die niedrigsten Raten sind jedoch in Osteuropa zu finden: V.a. Weißrussland, aber auch das Baltikum und Rumänien haben sehr niedrige Inzidenz- und Mortalitätsraten aufzuweisen [255, 422].

Laut Statistischem Bundesamt wurden im Jahr 2002 in Deutschland insgesamt 161.879 Frauen wegen einer bösartigen Neubildung der Brustdrüse stationär behandelt. Nach ICD-10 – Verschlüsselung (C50) stellt dies (nach der Entbindung) die zweithäufigste Diagnose von aus dem Krankenhaus entlassenen vollstationären Patientinnen dar [396].

Bundesweit erkranken jährlich ca. 47.500 Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 63 Jahren, ungefähr 4 Jahre unter dem aller Krebsarten insgesamt [41].

Im Jahr 2003 starben in Deutschland 17.173 Frauen an Brustkrebs [395].

---

\* Weltstandard

## 1.2.2 Erkrankungsrisiko und Risikofaktoren

Das Risiko für eine Frau in der „westlichen Welt“ irgendwann im Leben Brustkrebs zu entwickeln liegt je nach Studie bei 1:8 bis 1:10 – [43, 138, 253]. Das Risiko steigt mit zunehmendem Alter, wobei sich der Anstieg ab dem 50. Lebensjahr verlangsamt und in den folgenden Jahren teilweise sogar ein leichtes Absinken der Inzidenzen auftritt. Dies wird zum einen auf die Hormonsituation in der Postmenopause zurückgeführt, zum anderen aber auch auf unterschiedliche Lebensverhältnisse zwischen zwei aufeinander folgenden Generationen [310].

In **Tabelle 1** werden etablierte Risikofaktoren aufgelistet, wie sie im „Manual Mammakarzinome“ des Tumorzentrums München [383], angegeben werden:

Risikofaktor	Relatives Risiko
Familiäre Belastung (Verwandschaft 1. Grades)	1,4 – 13,6
Alter (=50 Jahre vs <50 Jahre)	6,5
Gutartige Brusterkrankung: Atypische Hyperplasie	4,0 – 4,4
Alter bei erster Lebendgeburt (>30 Jahre vs <20 Jahre)	1,3 – 2,2
Alter bei Menopause (=55 Jahre vs <55 Jahre)	1,5 – 2,0
Familiäre Belastung (Verwandschaft 2. Grades)	1,5 – 1,8
Gutartige Brusterkrankung: Biopsie (mit jedem histologischen Befund)	1,5 – 1,8
Alter bei Menarche (<12 Jahre vs =14 Jahre)	1,2 – 1,5
Hormonersatztherapie (HET)	1,0 – 1,5

**Tabelle 1:** Etablierte Risikofaktoren des Mammakarzinoms. Erläuterungen: Siehe Text.

Aus: Sittek et al. [383]

Die positive Familienanamnese ist v.a. für die Entwicklung von Brustkrebs im jüngeren Alter von Bedeutung: So beschreibt die *Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer* [93] ein deutlich erhöhtes Erkrankungsrisiko von 2,91 für eine unter 35 – Jährige, wenn eine Verwandte ersten Grades, also Mutter oder Schwester, an Brustkrebs erkrankt ist verglichen mit unter 35 – jährigen Frauen ohne eine entsprechende Familienanamnese. Sind zwei erstgradig Verwandte betroffen, verdoppelt sich dieses Risiko sogar.

In der Altersgruppe der 65–69 – Jährigen mit einer erkrankten Verwandten verringert sich die Wahrscheinlichkeit im Vergleich zu Frauen mit „leerer“ Familienanamnese auf 1,61.

Das Alter der Frauen spielt, wie bei anderen Krebsformen auch, eine wesentliche Rolle: Das Risiko zu erkranken verdoppelt sich etwa alle zehn Jahre bis zur Menopause, um anschließend weniger stark anzusteigen, bzw. in einigen Ländern sogar zunächst zu stagnieren [274]. *Morris et al.* [285] geben die Wahrscheinlichkeit für eine 30 – jährige Frau innerhalb der nächsten 10 Jahre zu erkranken mit 0,4% an. Für eine 40 – jährige liegt sie bei 1,4%, für 60 – bzw. 70 – jährige bei 3,4% und 4,1%.

Eine gute Darstellung über den Zusammenhang zwischen dem Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken, dem Lebensalter und der familiären Vorbelastung gibt die folgende Tabelle:

Alter	Anzahl erstgradig Verwandter, die am Mamma – Ca leiden/litten		
	0	1	2
20	0,04	0,1	0,2
30	0,4	1,0	2,0
40	1,4	2,5	5,2
50	1,9	3,2	5,3
60	2,3	3,5	5,6
70	2,5	4,2	5,7

**Tabelle 2:** Wahrscheinlichkeit (in %) für die Entwicklung eines Mammakarzinoms innerhalb der nächsten zehn Jahre bei Frauen unterschiedlichen Alters in entwickelten Ländern mit keinem, einem oder zwei von der Krankheit betroffenen Angehörigen.

*Adaptiert aus: [93]*

Abschließend muss allerdings angeführt werden, dass lediglich eine von neun Brustkrebspatientinnen eine positive Familienanamnese aufzuweisen hat. Das Gros der Patientinnen ( $\frac{8}{9}$ ) erkrankt, ohne dass erstgradig Verwandte betroffen sind.

Für den Anstieg der Krankheitsfälle nach der Menopause werden u.a. eine Überexpression von Östrogenrezeptoren und oxidativer Stress verantwortlich gemacht, der zu einem Verlust bestimmter DNA – Bindungsproteine führt [327].

Das späte Einsetzen der Menopause lässt sich als eine, auf das gesamte Leben bezogene, Erhöhung der endogenen Östrogenzufuhr interpretieren [81]. Der Einfluss des „Lebenszeit – Östrogens“ lässt sich an einem Extrembeispiel veranschaulichen: *Trichopoulos et al.* [421]

konnten zeigen, dass eine vor dem 35. Lebensjahr operativ herbeigeführte, künstliche Menopause mittels Eierstockentfernung eine Reduktion des späteren Brustkrebsrisikos auf  $\frac{1}{3}$  im Vergleich zu nicht - ovariectomierten Frauen mit sich bringt. Auch bei den Trägern der BRCA-1 – und BRCA-2 - Mutation (*siehe unten*) führt eine Ovariectomie, je früher, desto stärker, zu einer Risikominderung um bis zu 50% [129]. Ein Beispiel für den Einfluß des Zeitpunktes der natürlich einsetzenden Menopause auf das Mammakarzinom-Erkrankungsrisiko ist in **Tabelle 1, S. - 4 -** dargestellt. Dabei haben Frauen, bei denen die Menopause mit 55 Jahren eintritt, ein bis zu doppelt so hohes Risiko zu erkranken, als Frauen, die früher (< 55 Jahre) menopausal werden.

Das Alter zum Zeitpunkt der Menarche hat ebenfalls einen Langzeiteffekt auf die Wahrscheinlichkeit an einem Mammakarzinom zu erkranken [40]. Dabei spielt das Alter der Diagnosestellung eine Rolle [84]: Pro Jahr einer späteren Menarche verringert sich das Risiko prämenopausal zu erkranken um 9% und das Risiko postmenopausal zu erkranken um etwa 4%. So wird berichtet, dass eine Frau, die im Alter von 15 Jahren oder später ihre Menarche hatte, prämenopausal lediglich ein relatives Erkrankungsrisiko von 0,66 hat im Vergleich zu einer Frau, die ihre Menarche mit 11 Jahren oder früher erlebte [83]. Für Trägerinnen der BRCA-1 / BRCA – 2 – Mutationen wird eine sogar noch höhere protektive Wirkung einer späten Menarche angegeben [233].

Auch das Alter bei der Geburt des ersten Kindes ist offenbar von Relevanz [9]: Am günstigsten wirken sich Erstgeburten in einem Alter der Mutter von unter 25 Jahren aus: Zwar kommt es Monate bis wenige Jahre nach der Geburt zu einem Anstieg der Inzidenzraten des Mammakarzinoms im Vergleich zu Nullipara; nach etwa 10 Jahren wandelt sich dieser Effekt jedoch in einen protektiven um. Auch „Geburtenreichtum“ wirkt sich auf lange Zeit gesehen protektiv aus. Gebären Frauen ihr erstes Kind hingegen mit 30 Jahren oder später, fehlt ihnen der protektive Langzeitschutz und es wird sogar von gegenteiligen Effekten berichtet.

Benigne Brustveränderungen ohne Zelltypen haben offenbar nur ein vergleichsweise geringes karzinogenes Potential [261]. Nichtproliferative benigne Veränderungen der Brust, wie Zysten oder Fibroadenome, zeigen keine Neigung, häufiger Malignome zu entwickeln [43].

Die Hormonersatztherapie (HET) wurde in der Literatur sehr ausführlich im Zusammenhang mit einer potentiellen Brustkrebsentwicklung untersucht [36, 92, 95, 351] .

Dabei fand die *Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer* heraus, dass sich das Brustkrebsrisiko für Frauen unter HET für jedes Behandlungsjahr um den Faktor 1,023 im Vergleich zu Nichtbehandelten erhöht. Frauen mit 5 - jähriger oder längerer

Behandlungsdauer hatten ein relatives Risiko von 1,35. Lag das Behandlungsende fünf Jahre oder länger zurück, war kein signifikant höheres Erkrankungsrisiko im Vergleich zu Nichtbehandelten nachweisbar [92]. Frauen, die sich einer Östrogen – Progesteron – Behandlung unterziehen erkrankten offenbar deutlich häufiger als solche, die mit einer anderen Form, wie der Tibolon – oder der Östrogen - Monotherapie, behandelt werden [36]. Studienergebnisse der *Women's health Initiative* [351] berichten vom Überwiegen von Nachteilen bei der kombinierten Östrogen - / Progesteronsubstitutionstherapie bezüglich des Auftretens koronarer Herzerkrankungen, von Schlaganfällen, Lungenembolien und Brustkrebs. Protektive Effekte der Hormonsubstitution wurden hinsichtlich der Inzidenz von kolorektalen Karzinomen, Hüftfrakturen und Endometriumkarzinomen beobachtet. Die Gesamtsterblichkeit zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Substituierten und Nichtsubstituierten. Generell hat eine HET aber auch viele Vorteile, so dass individuell abgewogen werden sollte, ob und wie lange eine Substitution sinnvoll ist [95, 428].

Nicht einzeln aufgeführt in **Tabelle 1** ist das Vorliegen einer BRCA-1 bzw. BRCA-2 – Mutation. Aufgrund ihrer großen Bedeutung gerade in Familien mit einer Häufung von Brustkrebsfällen soll diese genetische Prädisposition an dieser Stelle erwähnt werden: In Deutschland weisen 24% der Familien mit mindestens zwei prämenopausal aufgetretenen Mammakarzinomen eine BRCA-1- und 13% eine BRCA-2-Mutation auf [215]. Die Aussagen über die Wahrscheinlichkeit für die Trägerinnen in ihrem Leben Brustkrebs zu entwickeln reichen von 56% [400] bis hin zu 80 oder 90% [143, 205].

In der Literatur werden noch viele weitere Einflussfaktoren beschrieben, v.a. sogenannte „Lifestyle – Faktoren“, die das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken beeinflussen könnten: So hat das Stillen offenbar einen positiven Einfluss [90, 426], wohingegen eine Diabetes Mellitus Typ 2 – Erkrankung [448], regelmäßiger Alkoholkonsum [168], die Einnahme oraler Kontrazeptiva [91], langjährige Nachtarbeit [275], Adipositas [366], der Konsum gegrillten Fleisches [152] oder auch Bestrahlung [281] als negativ bewertet werden. Kein oder kaum Einfluss zeigte sich nach Untersuchungen zum Tabakkonsum [78, 168], zu stattgehabten Aborten [37], zur Form des Fettkonsums (gesättigte vs. ungesättigte Fettsäuren) [152], zur Einnahme von Vitaminen als Nahrungsergänzungsmittel [152, 262], zu beruflicher Belastung [3] oder zum Koffeinkonsum [479].

Von unklarem Einfluss sind CMV- oder EBV-Infektionen [338], stattgehabte Präeklampsien [194] oder auch Sport [342, 432].

### 1.2.3 Formen des Mammakarzinoms

**Tabelle 3** zeigt eine Übersicht der WHO zur Einteilung nichtinvasiver und invasiver Mammakarzinome.

Unter dem Begriff „lobuläre Neoplasie“ wurden *atypische lobuläre Hyperplasie* und *lobuläres Carcinoma in situ (LCIS)* zusammengefasst.

Eine lobuläre Neoplasie gilt nicht als obligate Präkanzerose, sondern als Risikoerhöhung für die Karzinomentstehung. Ob lobuläre Neoplasien noch als „präinvasiv“ oder als „Risikofaktor“ zu bezeichnen sind, wird kontrovers diskutiert [17] [381].

Frauen mit einem LCIS haben ein jährliches Risiko von 1-2% und ein Lebenszeit-Risiko von 30-40% ein invasives Karzinom zu entwickeln [241].

Das DCIS macht etwa 6% der neu diagnostizierten Mammakarzinome aus [427]. Üblicherweise entwickelt sich nach seiner Diagnose (wenn keine Therapie erfolgt) innerhalb von 10 Jahren ein meist duktales Mammakarzinom.

Gemeinsames Merkmal der *in situ* Karzinome ist der fehlende Nachweis einer Stromainvasion bei intakter Basalmembran.

Von den invasiven Karzinomen sind die invasiven duktales die häufigsten (40-75%). Es folgen das invasiv-lobuläre (5-15%), das medulläre (1-7%), das tubuläre (1-2%), das muzinöse (1-2%) und das papilläre Karzinom (1-2%). Die übrigen Formen treten in einer

Nichtinvasive Karzinome
<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Duktales Carcinoma in situ (DCIS)</li> <li>▶ Lobuläre Neoplasie*</li> </ul>
Invasive Karzinome
<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Invasives duktales Karzinom                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- gemischter Typ NOS*</li> <li>- pleomorphes Karzinom</li> <li>- Karzinom mit osteoklastenartigen Riesenzellen</li> <li>- Karzinom mit chorionkarzinomartigen Merkmalen</li> <li>- Karzinom mit melanotischen Merkmalen</li> </ul> </li> <li>▶ Invasives lobuläres Karzinom</li> <li>▶ Medulläres Karzinom</li> <li>▶ Tubuläres Karzinom</li> <li>▶ Muzinöses Karzinom u.a. muzinreiche Tumoren                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- muzinöses Karzinom</li> <li>- Zystadenokarzinom und zylinderezelliges muzinöses Karzinom</li> <li>- Siegelringzellkarzinom</li> </ul> </li> <li>▶ Invasives papilläres Karzinom</li> <li>▶ Invasives kribriiformes Karzinom</li> <li>▶ Neuroendokrine Tumoren                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- solides neuroendokrines Karzinom</li> <li>- atypischer Carcinoidtumor</li> <li>- kleinzelliges Karzinom</li> <li>- großzelliges neuroendokrines Karzinom</li> </ul> </li> <li>▶ Invasives mikropapilläres Karzinom</li> <li>▶ Apokrines Karzinom</li> <li>▶ Metaplastische Karzinome                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- rein epitheliale metaplastische Karzinome</li> </ul> </li> <li>▶ Plattenepithelkarzinom</li> <li>▶ Adenokarzinom mit Spindelzell – Metaplasie</li> <li>▶ Adenosquamöses Karzinom</li> <li>▶ Mukoepidermoides Karzinom                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- gemischtes epithelial-/mesenchymales metaplastisches Karzinom</li> </ul> </li> <li>▶ Lipidreiches Karzinom</li> <li>▶ Sekretorisches Karzinom</li> <li>▶ Onkozytäres Karzinom</li> <li>▶ Adenoid – zystisches Karzinom</li> <li>▶ Azinuszell-Karzinom</li> <li>▶ Glykogenreiches Klarzellkarzinom</li> <li>▶ Sebazeöses Karzinom</li> <li>▶ Inflammatorisches Karzinom</li> </ul>

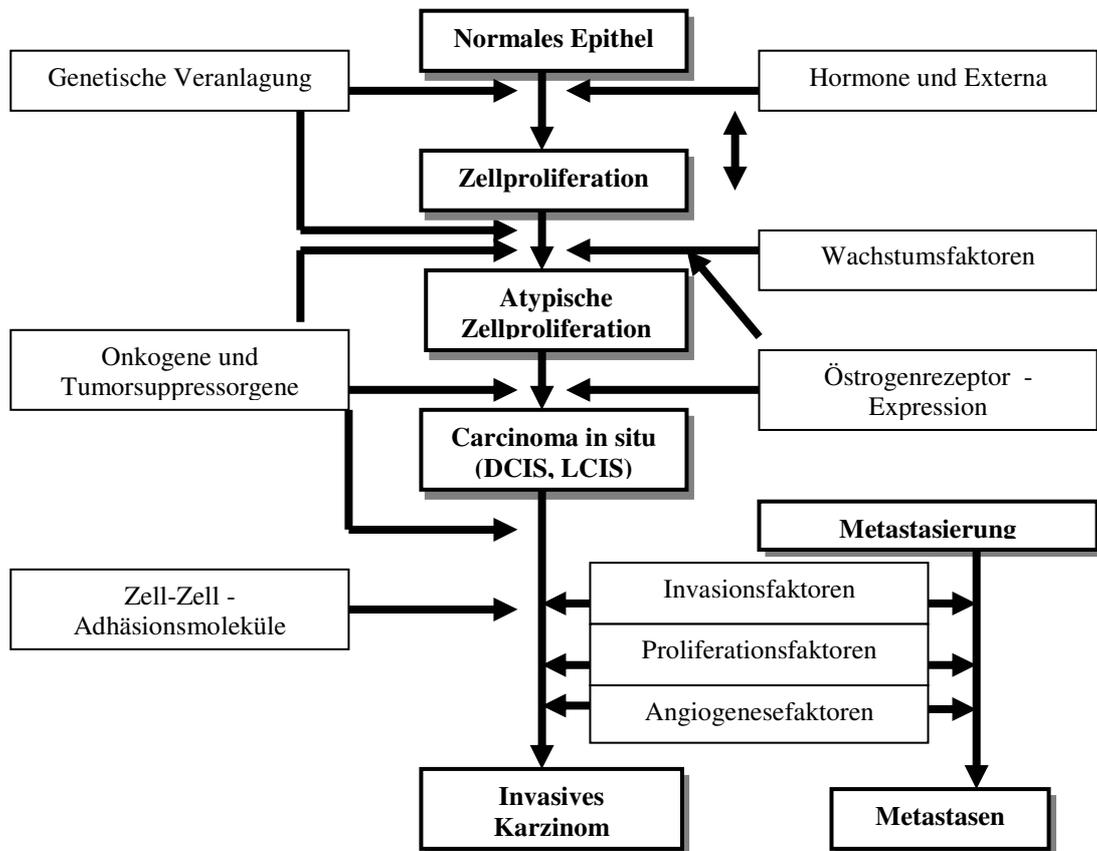
**Tabelle 3:** Modifizierte WHO – Klassifikation der nichtinvasiven und invasiven Mammakarzinome.  
 \*=umstritten, siehe Text  
 Aus: Lebeau et al.[251]

\* NOS = Not otherwise specified

Häufigkeit von unter einem Prozent auf [251]. Das tubuläre, invasiv-kribriforme, muzinöse und das adenoid-zystische Karzinom nehmen einen nachweislich günstigeren Verlauf [130, 349]. Varianten des invasiv-lobulären Karzinoms zeigen hingegen sehr schlechte Prognosen [114, 115].

### 1.2.4 Pathogenese

Ein klares Sequenzmodell, wie es etwa beim Adenokarzinom des Kolon nachgewiesen werden konnte [434], ließ sich beim Mammakarzinom bis jetzt nicht entwickeln [432]. Da nur etwa 5-10% der Mammakarzinomfälle auf nachweisbare und bekannte genetische Aberrationen wie BRCA-1 /-2- Mutationen zurückzuführen sind und damit das Gros der Erkrankungen den sporadischen Fällen zuzuordnen ist [43], muss man wohl von einem multimodalen Prozess ausgehen: Chemische, physikalische, virale und genetische Faktoren werden in einem initialen Schritt diskutiert [31, 109, 173, 321], der zu atypischer Zellproliferation führen soll (zu den Risikofaktoren siehe auch **Kapitel 1.2.2**). Unter dem Einfluss von Onkogenen wie *c-myc* (*8q24*) oder *erbB2* (*17q12*) und dem Ausschalten von



**Abbildung 2:** Multimodale Karzinogenese des Mammakarzinoms.

Adaptiert aus: Beckmann et al. [31]

Tumorsuppressorgenen wie *BRCA-1/-2* (*17q21* und *13q12-13*), *NM23* (*17q*) oder *ER* (*6q*) kommt es zur Ausbildung eines Carcinoma in situ. Mit Hilfe von Kollagenasen, Matrix-Metalloproteinasen, Angiogenesefaktoren und dem Fehlen von Zelladhäsionsmolekülen wie *E-Cadherin* und *Integrinen* wird anschließend die Basalmembran durchbrochen und es entsteht ein invasives Karzinom [31] (siehe auch **Abbildung 2**).

### 1.2.5 Prognose und Prognosefaktoren

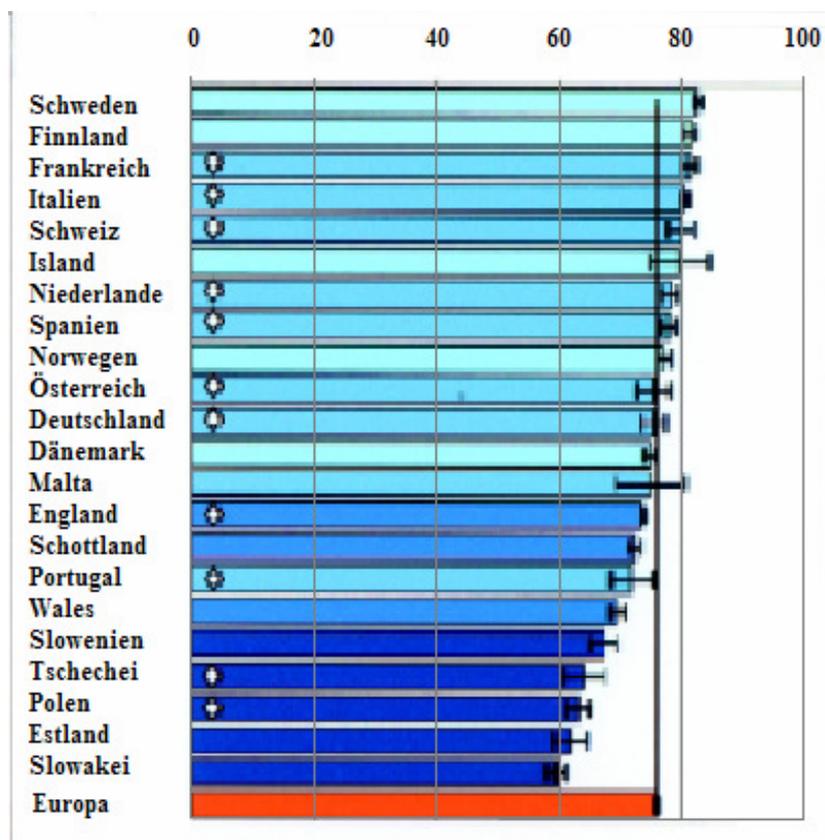
Die Prognose des Mammakarzinoms gilt, relativ zu anderen Krebserkrankungen gesehen, als gut [309].

In Nord- und Westeuropa beträgt die relative\* Fünfjahres-Überlebensrate etwa 80%, in Osteuropa ca. 60-70% (siehe auch **Abbildung 3**).

Für Deutschland wird vom *Tumorzentrum München* ein relatives Fünfjahres - Überleben von 82% und eine relative Zehnjahres - Überlebensrate von 69% angegeben, wobei Neuerkrankte im Kollektiv belassen wurden [131].

Im Folgenden sollen die anerkannten Prognosefaktoren genannt werden.

Laut der *Arbeitsgruppe Prognosefaktoren der Projektgruppe Mammakarzinom des Tumorzentrums München* sind folgende Faktoren für die Prognose von klinischer Relevanz [171]:



**Abbildung 3:** Altersstandardisierte Fünfjahres - Überlebensraten (%) in verschiedenen europäischen Ländern (relatives Überleben).

Adaptiert aus: Coleman et al. [89]

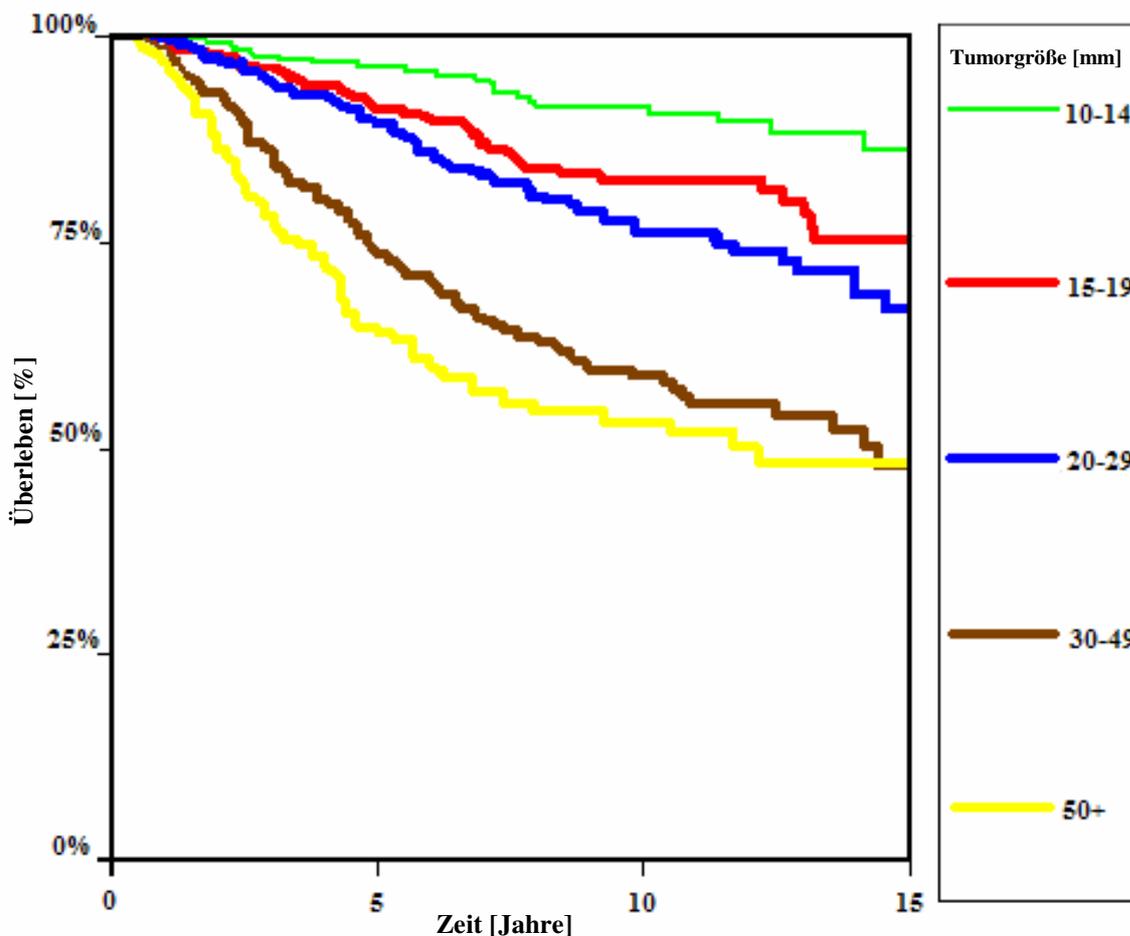
\* „relatives Überleben“: Ist ein Schätzwert für das tumorspezifische Überleben, im Gegensatz zum „Gesamtüberleben“, das alle Sterbefälle berücksichtigt, auch wenn diese nicht unmittelbar mit der Tumorerkrankung im Zusammenhang stehen.

- ▶ TNM – Status (*Tumorgröße, axillärer Lymphknotenbefall, Fernmetastasierung*)
- ▶ Morphologie (*Grading G1-3, histologischer Typ, Hämangiosis carcinomatosa*)
- ▶ Steroidhormonrezeptorstatus (*Östrogen- bzw. Progesteronrezeptoren*)

### 1.2.5.1 TNM – Klassifikation

„T“ bezeichnet die Größe des Tumors und seine Ausdehnung: T1= ≤2cm, T2= 2-5 cm, T3= >5cm, T4= jede Größe, aber Ausdehnung auf Brustwand oder Haut. Unter „T4d“ wird das inflammatorische Karzinom eingeordnet. „N“ steht für den Lymphknotenstatus, je nachdem, ob und wie viele Lymphknotenstationen befallen sind. „M“ bezieht sich auf das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen [123].

Die Bedeutung der Tumorgröße für die Prognose lässt sich in **Abbildung 4** nachvollziehen.



**Abbildung 4:** Kaplan – Meier – Darstellung der Überlebensraten von Mammakarzinompatientinnen mit unterschiedlicher Tumorgröße.

Adaptiert aus: Michaelson [278], siehe dort mit Anm.

Auch der positive Lymphknotenstatus trägt erheblich zur Reduktion des wahrscheinlichen Gesamtüberlebens bei: *Michaelson et al.* berichten, dass jeder zusätzliche positive Lymphknoten mit einer Letalitätssteigerung um ungefähr 6% einhergeht. Eine eingetretene Fernmetastasierung gilt momentan in aller Regel als noch nicht heilbar [179].

### 1.2.5.2 Grading

Das *Grading* des Tumors beschreibt seinen Differenzierungsgrad und gibt somit Anhalt für seine Malignität. Dabei werden die Faktoren Tubulusausbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate histologisch untersucht und jedem Befund ein „*Score*“ von 1-3 zugeordnet, so dass schließlich ein *Endscore* von 3 bis 9 berechnet werden kann. Dabei stehen 8 und 9 für das *Grading* G3, was einem hohen Malignitätsgrad und einer schlechten Differenzierung entspricht. Ein G2-Tumor wird durch einen *Score* von 6 oder 7 beschrieben und gilt als mäßig differenziert mit mäßiger Malignität. Wurde ein Wert von „5“ oder weniger ermittelt, liegt ein G1-Tumor mit guter Differenzierung und geringem Malignitätsgrad vor [252, 357].

### 1.2.5.3 Histologie

Unterschiedlichen histologischen Tumortypen wird ebenfalls ein Einfluss auf die Prognose zugeschrieben: Von besonders guter Prognose mit 5 – Jahres – Überlebensraten von etwa 95% sind das tubuläre, das papilläre und das muzinöse Karzinom [252]. Allerdings sind diese Subtypen des Mammakarzinoms sehr selten: Sie machen insgesamt lediglich 2-5% aus [49, 252]. Am häufigsten sind das duktales (65-80%), mit Abstand gefolgt vom lobulären Karzinom (6-15%) [252].

Morphologie	5 – JÜR [%]
Invasiv – duktales Karzinom	81
Invasiv – lobuläres Karzinom	86
NOS – Karzinome	66
Komedokarzinome	87
Andere „spezielle Typen“*	95

**Tabelle 4:** Fünfjahresüberlebensraten verschiedener histologischer Mammakarzinomtypen (Auswahl). \*= Tubuläre, papilläre, apokrine, cribriforme, muzinöse, Siegelringzell - Karzinome. NOS= „not otherwise specified“.

Adaptiert aus: *Allemanni et al. [10]*

*Allemani et al.* [10] geben für das invasive duktales Karzinom eine 5-Jahres-Überlebensrate von 81% an, wobei sie für die sogenannten „NOS - Karzinome“, die etwa 70-80% der duktal-invasiven Karzinome ausmachen [49], eine 5-JÜR von lediglich 66% beschreiben (**siehe Tabelle 4**). Für die Prognose ist es beinahe unerheblich, ob ein invasiv-duktales oder –lobuläres Karzinom vorliegt [276].

Unter „*Hämangiosis carcinomatosa*“ versteht man den Befall von Blutgefäßen im Randbereich des Tumors [49]. Unter den Karzinomen ohne Lymphknotenbefall findet man in 13% der Fälle diese prognostisch ungünstige Variante [181].

#### 1.2.5.4 Hormonrezeptorstatus

Die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus hat erheblichen Einfluss auf die spätere Therapie [124]. Zwar gibt es Kontroversen darüber, inwieweit der Rezeptorstatus als eigenständiger Prognosefaktor zu sehen ist, da mit einem günstigen Hormonrezeptorstatus auch andere eigenständige günstige Effekte (wie Kernzahl oder Mitoserate) verbunden seien und nichts über das Metastasierungsverhalten ausgesagt werde [118]; *Grann et al.* [157] konnten nach Auswertung der SEER\* – Datenbank mit etwa 155.000 Mammakarzinomfällen mit erfasstem Hormonrezeptorstatus jedoch folgendes Bild zeichnen: Fast  $\frac{2}{3}$  der Karzinome hatten einen positiven Östrogen<sup>†</sup>- und einen positiven Progesteronrezeptorstatus<sup>‡</sup>. Etwa 20% hatten sowohl einen negativen ER- als auch einen negativen PR-Status. Circa 13% hatten einen positiven ER- bei negativem PR-Status, knapp über 3% einen negativen ER-Status mit positivem PR-Status. Der Hormonrezeptorstatus war unabhängig von anderen Prognosefaktoren wie Alter, *Grading* oder Tumorstadium prognostisch relevant.

**Tabelle 5** soll den Einfluss des Hormonrezeptors auf die Prognose deutlich machen (*siehe folgende Seite*).

Dennoch nimmt der Wert des Hormonrezeptorstatus als prognostischer Faktor bei langer Nachbeobachtungszeit und in Abhängigkeit von der Therapie ab, so dass er v.a. als prädiktiver Faktor<sup>§</sup> von Wert ist [171].

Von diesen etablierten Prognosefaktoren abgesehen soll in **Kapitel 1.3** die *Angiogenese* detaillierter beleuchtet werden.

---

\* SEER = National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results Program

† =ER positiv

‡ =PR positiv

§ also ein den Therapieerfolg voraussagender Faktor

Erkrankungs- spezifisches Überleben	Hormonrezeptor- status			
	ER+ / PR+	ER+ / PR-	ER- / PR+	ER- / PR-
5 Jahre	91.6 (91.4 – 91.8)	85.8 (85.2 – 86.4)	82.4 (81.2 – 83.6)	76.2 (75.6–76.8)
10 Jahre	84.2 (83.7–84.7)	77.4 (76.3–78.5)	75.5 (73.7–77.3)	70.0 (70.1–71.7)

**Tabelle 5:** Brustkrebspezifisches Überleben in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus.  
In Klammern das 95% - Konfidenzintervall.

Adaptiert aus: Grann et al. [157]

### 1.2.6 Diagnostik

Bei postmenopausalen Frauen ist aufgrund der geringeren Brustgewebisdichte die *Mammographie* nach wie vor diagnostisches Mittel der Wahl, wohingegen die *Mammosonographie* bei jüngeren Frauen aufgrund der höheren Gewebedichte vorteilhaft ist – die Kombination beider Verfahren erhöht die Sensitivität [34]. Auch die *Palpation* der Brust – v.a. durch die Patientinnen selbst – ist wichtig: 10-15% der Karzinome sind zwar palpabel, nicht aber mammographisch erfassbar. Eine zusätzliche Sonographie kann nur bis zu 40% der Karzinome ohne mammographisches Korrelat aufdecken [384].

Eine *Sekretzytologie* und *Galaktographie* (evtl. durch *Duktussonographie* ergänzt) werden bei pathologischer Sekretion aus den Milchgängen der Brust durchgeführt.

Die magnetresonanztomographische Darstellung der Mamma wird derzeit nur nach Ausschöpfen der anderen diagnostischen Verfahren eingesetzt. Ein Mamma-MRT hat eine hohe Sensitivität (>90%), aber eine mäßige Spezifität (ca. 60%) für die Aufdeckung von Mammakarzinomen [107], so dass es nicht als Screeningmaßnahme geeignet ist, sondern nur der weiteren Abklärung unklarer mammographischer oder sonographischer Herde dient [286]. Bei suspekten Befunden sollte vor einer diagnostischen, operativen Abklärung die *minimal-invasive Diagnostik* stehen.

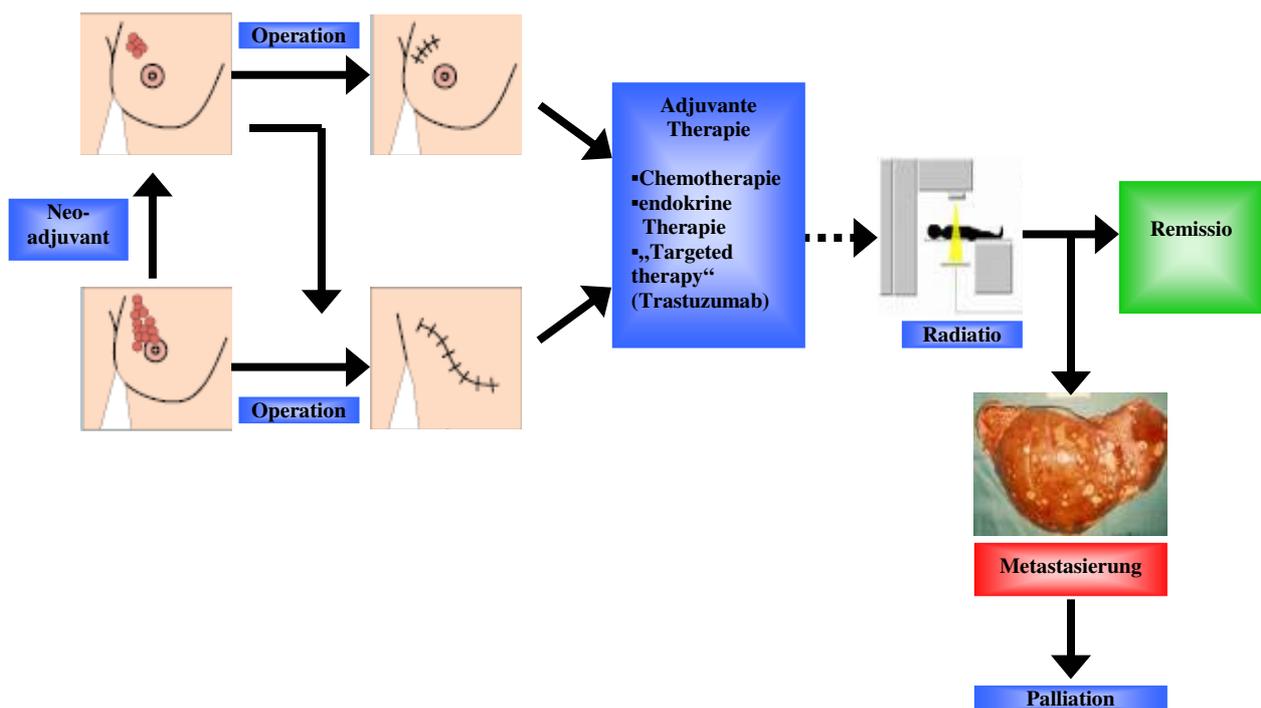
Größere Mengen bioptischen Materials lassen sich mittels *Vakuumsaugbiopsie* gewinnen, z.B. beim röntgenologischen Vorliegen von Mikrokalk. Lassen sich suspekte Herde sonographisch darstellen, sollte eine sonographisch gesteuerte Stanzbiopsie erfolgen, bei mammographisch darstellbarem Befund eine stereotaktische Stanzbiopsie [384].

### 1.2.7 Therapie

Nach histologischer Diagnosesicherung und allgemeinen präoperativen Voruntersuchungen, die z.B. bei fortgeschritteneren Befunden eine Fernmetastasierung ausschließen sollen, stehen zwei operative Verfahren (s.a. **Abbildung 5**) zur Verfügung:

- 1) Die brusterhaltende Therapie (BET) mit Sentinellymphknotenentfernung ± Axilladissektion und anschließender Strahlentherapie
- 2) Die modifizierte radikale Mastektomie (MRM) mit Sentinellymphknotenentfernung ± Axilladissektion und evtl. plastischer Mammarekonstruktion.

Die BET bietet gegenüber der MRM bei korrekter Indikationsstellung aus onkologischer Sicht keine Nachteile [433]. Man geht davon aus, dass bei etwa 70% der Mammakarzinompatientinnen eine BET möglich ist [27].



**Abbildung 5:** *Behandlungskonzept des Mammakarzinoms*

Je nach Größe des Primärtumors wird entweder zunächst eine primär-systemische Therapie eingeleitet, die medikamentös zu einer Verkleinerung des Tumors führen soll und es wird anschließend operiert, oder es wird sofort eine Mastektomie bzw. eine brusterhaltende Therapie (BET) durchgeführt. Nach BET ist eine Bestrahlung obligat. Nach adjuvanter Therapie kommt es entweder zur Remission oder, nach Nichtansprechen auf die Therapie, evtl. zur Ausbildung von Fernmetastasen, die eine palliative Therapie nach sich ziehen. Selbstverständlich ist eine Fernmetastasierung auch bereits in anderen Stadien der Therapie möglich (Einzelheiten: Siehe Text.)

Adaptiert aus:[27, 147, 178, 210, 364, 386, 391]

Findet sich ein lokal weit fortgeschrittener Tumor, sollte eine neoadjuvante Therapie durchgeführt werden, die medikamentöse Maßnahmen (Chemotherapie oder seltener endokrine Therapie) beinhaltet. Als neoadjuvante Chemotherapie ist insbesondere die präoperative Verabreichung von 6 x TAC etabliert (Docetaxel, Adriamycin, Cyclophosphamid) [5].

Zur primären Bestrahlung wird nur sehr selten bei lokal sehr weit fortgeschrittenen Fällen gegriffen.

Nach der Operation wird bei den meisten Patientinnen - wenn nicht neoadjuvant entsprechend vorbehandelt wurde - eine adjuvante Therapie eingeleitet. Die adjuvante medikamentöse Therapie baut auf drei Säulen: (1) Chemotherapie, (2) endokrine Therapie und (3) targeted therapies. Diese Therapien werden je nach Tumorbiologie und individuellem Risiko der Patientin verschieden kombiniert oder auch einzeln verabreicht.

Besteht eine Indikation zu einer adjuvanten Chemotherapie ist derzeit eine anthrazyklinhaltige Kombinationstherapie Standard, z.B. 6 x FEC/FAC. Sind Lymphknoten befallen, ist zusätzlich die Gabe eines Taxans (Docetaxel oder Paclitaxel) indiziert, z.B. 6 x TAC, 3 x FEC → 3 x Doc, 4 x AC → 4 x Paclitaxel [5, 27]. Zu den häufigsten Nebenwirkungen der Chemotherapeutika zählen (febrile) Neutropenien, Alopezie, Nausea, Myalgien, Stomatitiden, Kardiotoxizität, allergische Reaktionen, Neuropathien, Ödeme und Anämien [311].

Bei positivem HER-2/neu – Status ist eine adjuvante Therapie mit dem humanisierten monoklonalen IgG-Antikörper *Trastuzumab (Herceptin®)* für 1 Jahr indiziert, die in großen Studien zu einer Halbierung des Risikos für ein Rezidiv geführt hat [210, 386].

Ist eine endokrine Therapie bei positivem Hormonrezeptorstatus indiziert, stehen verschiedene Substanzen zur Verfügung: 1) die selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) wie *Tamoxifen*, 2) die Gruppe der Aromataseinhibitoren (AIs) und 3) reine Östrogenrezeptor-Antagonisten wie *Fulvestrant (Faslodex®)*. Die adjuvante endokrine Therapie wird über mindestens 5 Jahre durchgeführt. Tamoxifen kann in der Prä- und Postmenopause eingesetzt werden. In den letzten Jahren haben jedoch Studien die Überlegenheit der Aromatasehemmer (*Anastrozol, Letrozol und Exemestan*) gegenüber Tamoxifen bei postmenopausalen Mammakarzinom-Patientinnen hinsichtlich Wirksamkeit und Nebenwirkungsprofil nachweisen können [75, 103, 207, 410]. Die AIs können adjuvant folgendermaßen eingesetzt werden 1) *upfront* (Einsatz von Beginn an für 5 Jahre; zugelassen: Anastrozol und Letrozol) 2) *Switch/Sequenz*: nach initialer 2-3-jähriger Gabe von Antiöstrogenen (Tamoxifen) Wechsel auf AI (Anastrozol oder Exemestan), bis insgesamt 5

Jahre erreicht sind, 3) *erweiterte adjuvante Therapie*: Nach fünfjähriger Tamoxifengabe erfolgt der Einsatz eines AI (zugelassen: Letrozol) bei rückfallfreien Patientinnen.

Eine Übersicht zu Einteilung und Therapieempfehlung laut St. Gallen – Leitlinien 2007 liefert **Tabelle 6**.

Niedriges Risiko	Mittleres Risiko	Hohes Risiko
<p>pN0 sowie <u>alle</u> folgenden Kriterien:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Alter <math>\geq 35</math> Jahre</li> <li>▪ TumorgroÙe <math>\leq 2</math> cm</li> <li>▪ hohe Differenzierung (G1)</li> <li>▪ HER-2/neu negativ</li> <li>▪ keine Hämangiosis carcinomatosa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pN0 sowie mindestens <u>eines</u> der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> <li>- TumorgroÙe <math>&gt; 2</math> cm</li> <li>- mittlere oder geringe Differenzierung (G2/G3)</li> <li>- Hämangiosis carcinomatosa</li> <li>- HER2 positiv</li> <li>- Alter <math>&gt; 35</math> Jahre</li> </ul> </li> <li>• pN+ (1-3 Lymphknoten) und HER2 negativ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pN+ (1-3 Lymphknoten) und HER2 positiv</li> <li>• pN+ (mindestens 4 Lymphknoten)</li> </ul>
<b>Allgemeine Therapieempfehlung</b>		
<p><i>hormonsensibel/fraglich hormonsensibel:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Endokrine Therapie oder</li> <li>▪ keine Therapie</li> </ul> <p><i>Nicht hormonsensibel:</i> entfällt</p>	<p><i>Sicher hormonsensibel:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Endokrine Therapie oder Chemotherapie gefolgt von endokriner Therapie, ggf. Trastuzumab</li> </ul> <p><i>Fraglich hormonsensibel:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Chemotherapie gefolgt von endokriner Therapie, ggf. Trastuzumab</li> </ul> <p><i>Nicht hormonsensibel:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Chemotherapie, ggf. Trastuzumab</li> </ul>	<p><i>Sicher / fraglich Hormonsensibel:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Chemotherapie, von endokriner Therapie gefolgt; ggf. Trastuzumab</li> </ul> <p><i>Nicht hormonsensibel:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Chemotherapie; ggf. Trastuzumab</li> </ul>

**Tabelle 6:** Empfehlungen zu Risikoeinteilung und Therapie des Mammakarzinoms nach St.Gallen 2007

Adaptiert aus: [254]

## 1.3 Angiogenese

### 1.3.1 Einordnung und Definition

In der Literatur werden zur Unterscheidung bestimmter Abläufe der *Neovaskularisation* die Begriffe der *Vaskulogenese*, der *Arteriogenese* und der *Angiogenese* unterschieden [380].

Den Vorgang der Blutgefäßneubildung beim Embryo nennt man *Vaskulogenese* [340].

Dabei spielt sich folgendes ab: Wurde der Embryo zunächst per Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt,

kommt es jetzt durch

Differenzierung aus

undifferenziertem

Mesoderm von

Vorläuferzellen der

*Angioblasten* und

*Hämatoblasten*

zunächst zur Bildung

sogenannter Blutinseln

innerhalb des

Dottersackes [139].

Aus den äußeren

Anteilen bilden sich

Endothelzellen heraus, die inneren Anteile differenzieren zu Hämatoblasten. Aufgrund ihrer engen Beziehung zueinander während der *Ontogenese* geht man davon aus, dass Angio- und Hämatoblasten einen gemeinsamen Vorläufer haben, den *Hämangioblasten* [340].

Durch den Zusammenschluss zahlreicher Blutinseln innerhalb des Dottersackes entsteht ein primitives Gefäßnetzwerk (**Abbildung 6**).

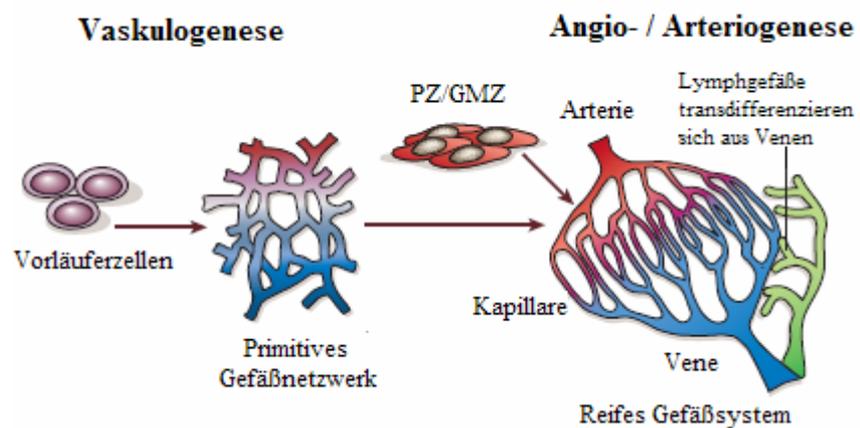
Wurde früher die These vertreten, *Vaskulogenese* sei nur im embryonalen

Entwicklungsabschnitt möglich, geht man mittlerweile davon aus, dass auch im adulten

Stadium eine *de-novo*-Formierung von Gefäßen möglich ist [15, 69].

Für diesen Prozess der *Vaskulogenese* – also die Bildung von Blutinseln und

Zusammenschluss zu einem primitiven Netzwerk – sind Wachstumsfaktoren aus der Gruppe



**Abbildung 6:** Entstehung der Gefäßsysteme: Während der Vaskulogenese entwickeln sich aus Endothelvorläuferzellen primitive arteriovenöse Geflechte. In der darauffolgenden Angiogenese dehnt sich das Geflecht aus, Perizyten (PZ) und glatte Muskelzellen (GMZ) kleiden sich entwickelnde Endothelkanäle aus – ein reifes Gefäßsystem entsteht. Lymphgefäße kommen mittels Transdifferenzierung aus Venen zustande.

Adaptiert aus: Carmeliet et al. [70]

der FGF\* von entscheidender Bedeutung. Ohne FGF kommt es nicht zur Bildung von Blutinseln [140]. Eine weitere wichtige Eigenschaft der FGF-Wachstumsfaktoren liegt offenbar in der Induktion des flk-1-Rezeptors auf hämangioblastischen Vorläuferzellen. Letztere differenzieren dann weiter zu flk-1-positiven Epithel- und/oder hämatopoetischen Zellen [339]. Neuerdings wurden flk-1-positive Zellen aber auch in Vorläufern von Muskelzellen nachgewiesen [287], so dass die frühere Annahme, sie seien nur auf die oben genannten Vorläuferzellen beschränkt, evtl. aufgegeben werden muss [136].

Die flk-1-Rezeptoren (wie auch die verwandten flt-1-Rezeptoren) binden als *Liganden* VEGF†. Die Bedeutung dieses Wachstumsfaktors ließ sich tierexperimentell ermitteln: Mäuse, die, statt *homozygot*, *heterozygot* für das VEGF-Gen sind, sterben früh (etwa nach der Hälfte der notwendigen Schwangerschaftszeit) aufgrund ungenügender Gefäßsystementwicklung [72]. Das gleiche Schicksal erleiden Mausembryonen, die mit einem Gendefekt für den flk-1-Rezeptor ausgestattet sind: Es kommt zu keiner Vaskularisierung; weder im Dottersack, noch im Embryo sind dann Blutgefäße nachweisbar. Hämatopoetische Vorläufer sind in gendefekten Dottersäcken z.T. um das 100-fache reduziert. Stattdessen finden sich ausgeprägte Nekrosen im Embryo selbst [375]. Die spätere Bestimmung der sich bereits während der *Vaskulogenese* ausgebildeten ersten, primitiven Gefäße ist offenbar zumindest größtenteils bereits genetisch determiniert, bevor es überhaupt zur Blutzirkulation kommt [183] – dabei wird die Bildung arterieller Gefäße durch eine Signalkaskade aus Shh‡, VEGF und anschließend dem *Notch-Signalweg* ausgelöst [249]. Ephrine und ihre Tyrosinkinaserzeptoren verhindern als „Markierung“ der jeweiligen Gefäße ein „Vermischen“ von Venen und Arterien [300]. Ephrin-B2 markiert arterielle, Ephrin-B4 venöse Gefäße [437]. Darüber hinaus verfügen spätere Venen über den VEGF-Co-Rezeptor Neuropilin-2, spätere Arterien über Neuropilin-1 [99]. Venen, die später zu Lymphgefäßen heranreifen, verfügen über das *Homebox-Gen* Prox-1; beim Ausschalten des Gens im Tierversuch kommt es zum Erliegen der Lymphgefäßsprossung, wohingegen die Angiogenese des Blutgefäßsystems nicht beeinträchtigt wird [444].

Beim weiteren Wachstum des Embryos, nach Abschluss der Vaskulogenese, entsteht eine zunehmende Minderversorgung mit Sauerstoff. Durch die nun folgende hypoxievermittelte Ausschüttung von HIF§ werden zahlreiche angiogenetische Gene stimuliert, wobei die Induktion von VEGF als „treibende Kraft“ der nun folgenden *Angiogenese* die

---

\* FGF = Fibroblast Growth Factor, Fibroblastenwachstumsfaktoren

† VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor = Vaskulärer Endothelwachstumsfaktor

‡ Shh = Sonic hedgehog

§ HIF = Hypoxia-inducible transcription factor = Hypoxievermittelter Transkriptionsfaktor

erwähnenswerteste ist [120, 297]: Unter dem Einfluss von VEGF werden zwei Prozesse ausgelöst, die zusammengefasst als *Angiogenese* bezeichnet werden: Der eine wird als „Sprießen“ bezeichnet und beschreibt die *de novo*-Formierung von Kapillaren, ausgehend von postkapillären Venolen [380]. Dabei kommt es zu Endothelzellmigration, -proliferation und anschließender Gefäßformation [312].

Der zweite Prozess wird als *intussuszeptives Wachstum*<sup>\*</sup> bezeichnet [63]. Auch dieser Prozess wurde weiter differenziert [61, 116], lässt sich aber folgendermaßen zusammenfassen:

Von den Endothelzellen gehen schlanke Gewebesäulen aus, die sich zu Gewebenetzen zusammenschließen und letztlich zur Teilung bereits vorhandener Gefäße führen, so dass ein engmaschiges Kapillarnetz entsteht [116].

Physiologisch gewollt ist Angiogenese dort, wo gesundes Gewebe beschädigt wurde oder aufgrund höherer Beanspruchung mehr Sauerstoff und Nährstoffe benötigt [70]. VEGF und andere Wachstumsfaktoren (z.B. auch die Endotheline, siehe **Kapitel 1.4**) werden aufgrund von Hypoxie und / oder Hypoglykämie dann verstärkt ausgeschüttet.

Die Vorgänge im Rahmen der pathologischen Angiogenese werden weiter unten besprochen.

Der dritte wichtige Schritt in der Neovaskularisierung wird *Arteriogenese* genannt. Er wurde geprägt, um die Ausbildung von Arterien und vor allem auch von Kollateralarterien, die sich z.B. im Rahmen arteriosklerotischer Erkrankungen ausbilden können, von der *Angiogenese* zu differenzieren [180]. Man versteht unter *Arteriogenese* die Auskleidung der Gefäßendothelwände mit glatten Muskelzellen und Perizyten, so dass Arterien aus Arteriolen entstehen, wobei die Rekrutierung der glatten Muskelzellen vornehmlich mit Hilfe von PDGF-B<sup>†</sup> abläuft [70].

*Arteriogenese* und *Angiogenese* unterscheiden sich zum einen darin, dass *Arteriogenese* nicht von Hypoxie abhängig ist: Vielmehr wurden Scherkräfte, die aufgrund eines höheren Blutflusses entstehen, als Trigger erkannt [365]. Durch die Scherkräfte, aber auch durch Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$ <sup>‡</sup>, LPS<sup>§</sup> oder MCP-1<sup>\*\*</sup>, kommt es zur ICAM-1<sup>††</sup>-vermittelten Adhäsion von Monozyten – ein essentieller Schritt für die folgende *Arteriogenese* [185].

---

\* lat. intus= innen; suscipere = aufnehmen

† PDGF = Platelet –derived growth factor

‡ TNF- $\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$

§ LPS = Lipopolysaccharid

\*\* MCP = monocyte chemoattractant protein

†† ICAM = Intercellular Adhesion Molecule

*Arteriogenese* beschreibt im Normalfall auch kein Sprießen oder eine Intussuszeption aus Kapillaren, sondern benötigt bereits vorhandene Arteriolen [71]. Weiterhin kann *Angiogenese* alleine keinen größeren arteriellen Verschluss kompensieren [62]: Aufgrund der Gefäßdurchmesserbegrenzung kommt es bei der *Angiogenese* zu einer Blutflusszunahme um das maximal 1,5 - 1,7-fache; durch *Arteriogenese* gebildete Kollaterale erreichen das 10 – 20 – fache an Blutfluss [365].

### 1.3.2 Pathologische Angiogenese

*Angiogenese* beeinflusst die Pathogenese zahlreicher Krankheitsbilder. An dieser Stelle sei eine Auswahl genannt:

- Beim *M. Alzheimer* z.B. wird sowohl ein „Zuviel“ als auch ein „Zuwenig“ an *Angiogenese* diskutiert [108, 429]. Ein „Zuwenig“ liegt initial vor, wenn es infolge *vaskulärer Regression* zu Hypoxie und folglich zur Ischämieentwicklung kommt. Die Endothelzellen reagieren dann auf Hypoxie und Entzündungsreaktionen geschädigter Gefäße mit einer überschießenden VEGF-Produktion, was zu einer erheblichen Gefäßproliferation führt. Die Umbauprozesse führen aber auch zur Freisetzung neurotoxischer Substanzen, wie z.B. die von  $\beta$ -Amyloid, das als pathologisches Korrelat des M.Alzheimer gilt.
- Bei der *Amyotrophen Lateralsklerose (ALS)* wird eine Perfusionsminderung durch den Mangel an „VEGF-Protektion“ für den neuronalen Zelluntergang mitverantwortlich gemacht [304].
- Nach einem *Schlaganfall* führt eine verstärkte Angiogenese möglicherweise zu einer Verbesserung neurologischer Funktionen [438]. Durch Mutationen im *Notch-Signalweg* wird eine Form von Arteriopathie ausgelöst, die mit der Zeit zu *lakunären Infarkten* führt [211].
- Während Patienten mit *Arteriosklerose* einerseits von verstärkter Angiogenese und damit Kollateralenbildung profitieren [14], bilden *Vasa vasorum*, die in arteriosklerotische Plaques eindringen, möglicherweise eine Eintrittspforte für Leukozyten und fördern somit die *Plaueproliferation* [58].
- Eine Erklärung für die Entstehung eines *Bluthochdrucks* ist, dass es aufgrund ungenügenden VEGF (u.ä.) – Einflusses zur *Rarefizierung* von Kapillaren, Arteriolen und Venolen kommt, so dass der Druck in den verbliebenen Gefäßen ansteigt [55].
- Beim *Diabetes mellitus* ist die Fähigkeit zur Kollateralenbildung eingeschränkt [436], VEGF wird vermindert ausgeschüttet [341].

- Tritt ein *Ulcus ventriculi* in Verbindung mit einer *Helicobacter pylori* – Besiedelung auf, schütten die Bakterien *Zytokine* aus, die eine Revaskularisierung behindern [204].
- Im Rahmen der *Präeklampsie* wurde das bereits vor Symptombeginn auftretende Ansteigen des löslichen Flt<sup>\*</sup> –1-Rezeptors und ein Absinken von PlGF beschrieben [257]. Auch andere Fehlregulationen von Angiogenesefaktoren tragen offenbar zur Entstehung der Präeklampsie bei [272].
- VEGF und HIF spielen eine große Rolle bei der *fetalen Lungenreife* [94]. Bei einem Mangel dieser Faktoren kommt es zum RDS<sup>†</sup>.
- Bei der *Osteoporose* wurde eine Korrelation zwischen Abnahme an Angiogenesefaktoren im Alter und der Knochendichte festgestellt [268].
- *Frakturen*, die unter dem Einfluss von Angiogeneseinhibitoren standen, verheilten kaum oder gar nicht [175].

### 1.3.3 Tumorangiogenese und „angiogenetischer Switch“

Im „gewöhnlichen“ Blutgefäß eines Erwachsenen befindet sich etwa 1 von 10.000 Endothelzellen im Stadium der Zellteilung. Zum Vergleich: Etwa 14% der Darmepithelzellen sind fortwährend in einer Phase der Zelldivision, so dass man bei der Zeitspanne, die eine „Totalerneuerung“ des Darmepithels benötigt, von Tagen, bei der des Gefäßendothels von Jahren spricht [169].

Unter physiologischen Bedingungen ruht die in **Kapitel 1.3.1** beschriebene Angiogenese nach Abschluss der Gefäßentwicklung nahezu – es herrscht ein austariertes Gleichgewicht zwischen proangiogenetischen Faktoren und solchen, die inhibitorisch auf die Endothelproliferation wirken. Man spricht in diesem Zusammenhang von einem „ausgeschalteten *angiogenetischen Switch*“ [170], s.a. **Abbildung 7**.

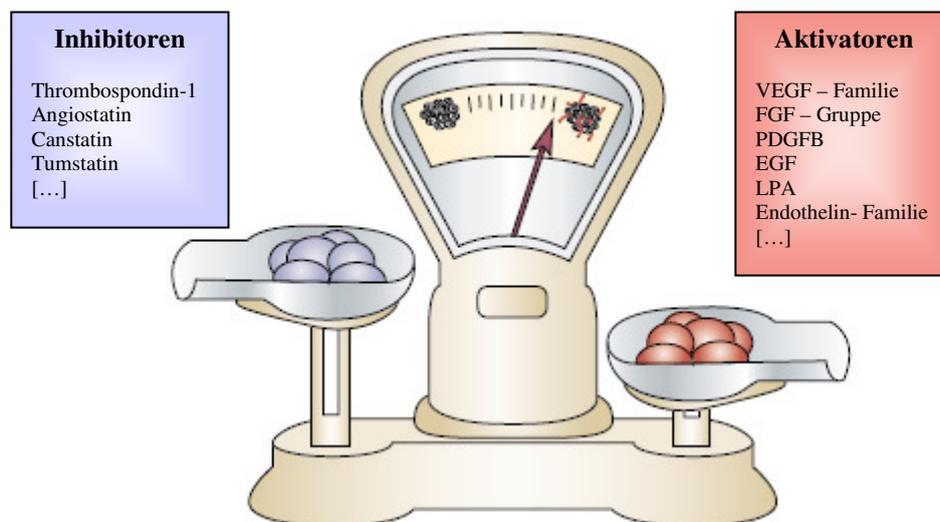
Normalerweise wird letzterer z.B. im Rahmen des weiblichen Reproduktionszyklus<sup>7</sup> eingeschaltet, respektive bei Ovulation, Menstruation, Implantation und Gestation – hier überwiegen (zeitweise) proangiogenetische Faktoren [482]. Auch nach Verletzungen, bei Entzündungen und Organerhalt/-ausbau wird der *angiogenetische Switch* zeitweise auf „ein“ geschaltet [70].

---

\* Flt = [engl.] fms-like tyrosine kinase

† RDS = [engl.] respiratory distress syndrome = akutes Lungenversagen

Ein aktivierter *angiogenetischer Switch* ist für Tumoren essentiell: Tumoren, die passiv durch Diffusion ernährt werden, können lediglich eine Größe von 1-2mm<sup>3</sup> erreichen [142]. Erst durch Vaskularisierung können sie ihr Volumen um das z.T. mehrfach tausendfache erhöhen. Dies konnte z.B. in Experimenten gezeigt werden, in denen Tumoren zunächst auf der nicht vaskularisierten *Cornea* der Ratte platziert wurden. blieb die *Cornea* devaskularisiert, geschah hinsichtlich der Tumorgöße nichts. Kam es jedoch zur Vaskularisierung, führte dies zu massivem Wachstum des Tumors [153]. Wird die Proliferation neuer Gefäße unterdrückt, kann der Tumor nicht weiter wachsen und wird sogar nekrotisch [189]. Tumorzellen sind daher „bemüht“, das Gleichgewicht zwischen Angiogenese-Aktivatoren und -Inhibitoren aufzuheben – der *angiogenetische Switch* wird dauerhaft auf „ein“ geschaltet (**Abbildung 7**). Dies erreichen sie zum einen durch Wachstum: Je weiter das Tumorgewebe von der nächsten Kapillare entfernt liegt (weiter als 100 µm von der nächsten Kapillare entfernt kann keine Zelle *via* Diffusion überleben [170]), desto größer ist die Hypoxie in diesem Gewebe und umso stärker die Ausschüttung von HIF<sup>\*</sup>, was, wie weiter oben bereits beschrieben, zur Freisetzung von Angiogenese-Aktivatoren wie VEGF führt [120]. Auch exprimieren Tumoren oft verstärkt Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, so dass die Tumorzellen bereits bei geringen Konzentrationen dieser Faktoren übermäßig proliferieren [170]. Beispiele für eine Überexprimierung sind u.a. der HER-2/neu – [412], der EGF<sup>†</sup> - [110] oder auch der Endothelin-A-Rezeptor (ET<sub>A</sub>R) [456] (siehe **Kapitel 1.4.2**).



**Abbildung 7:** Darstellung des „angiogenetischen Switches“ anhand einer Waage. Im Beispiel überwiegen proangiogenetische Faktoren – der Switch ist auf „ein“ geschaltet. Weitere Einzelheiten: Siehe Text.

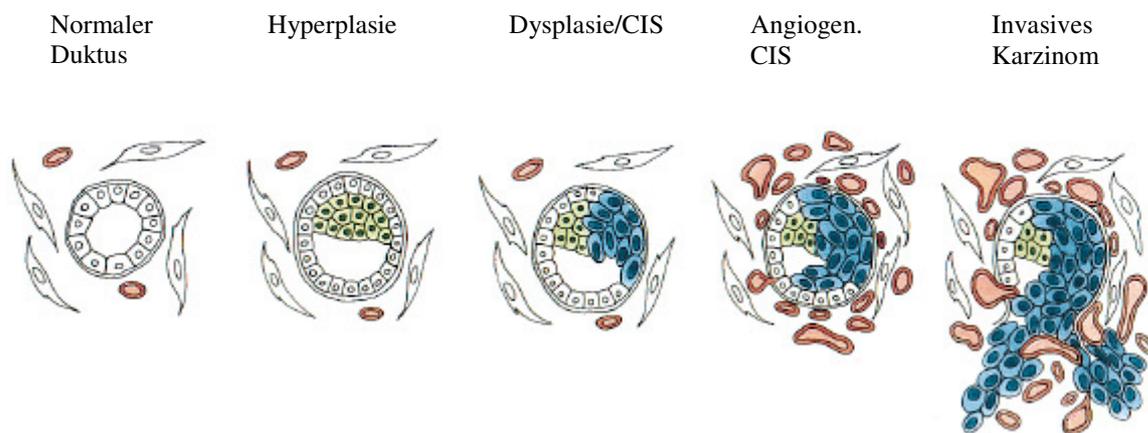
Abkürzungen: Siehe Glossar im **Anhang**

*Adaptiert Aus: Bergers et al [39]*

\* HIF = hypoxia inducible factor

† EGF = Epidermal Growth Factor

Beim Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass bereits der histologische „Vorläufer“, das *duktale Carcinoma in situ (DCIS)*, von einer erhöhten Dichte an Mikrogefäßen umgeben ist [164]. Tumorangiogenese läuft also bereits in sehr frühen, noch nicht-invasiven, Stadien ab [169, 170, 177]. Es werden dabei zwei weitere Mechanismen diskutiert: Der eine geht von einer Rekrutierung von Makrophagen und Endothelzellen aus, die wiederum Wachstumsfaktoren freisetzen, der andere beschreibt eine direkte Freisetzung von VEGF u.a. durch das DCIS selbst [132, 165]. **Abbildung 8** zeigt schematisch den Übergang von einem hyperplastischen Gewebe zu einem DCIS bis hin zum invasiven Mammakarzinom:



**Abbildung 8:** Ein duktale Mammakarzinom entwickelt sich aus zunächst hyperplastischen Zellen, von denen sich einige zu einem Carcinoma in situ (CIS) entwickeln. Diese wiederum sezernieren Wachstumsfaktoren, die den „angiogenetischen Switch“ aktivieren, was zur Gefäßproliferation und konsekutiv zu massivem Tumorwachstum und metastatischem Potential führt.  
 Aus: Hanahan et al. [169]

Die so entstandenen Blutgefäße erhalten allerdings ein „chaotisches“ Aussehen:

Es lassen sich kaum Venolen, Arteriolen oder Kapillaren differenzieren; stattdessen haben diese Gefäße „von allem etwas“. Auch das umgebende perimurale Gewebe zeigt Abnormalitäten, so dass Tumorgefäße im allgemeinen im Vergleich zu physiologisch entstandenen Gefäße wesentlich instabiler sind – ein Ansatzpunkt für antiangiogenetische Therapien [33, 283].

Bei der Blutgefäßneubildung stehen dem Tumor außer dem angiogenetischen Sprießen auch Intussuszeption und Vaskulogenese zur Verfügung [73].

Eine möglicherweise von Angiogenese nahezu unabhängige Form der Versorgung wird mit dem englischen Begriff „*co-option*“ beschrieben und lässt sich am besten wohl als „Mitnutzung bereits vorhandener Gefäße“ übersetzen [336]. Als Grundlage steht die Beobachtung, dass Tumoren, die in gut vaskularisiertes Gewebe implantiert wurden, sofort

„anwachsen“ und ihre Größe massiv zunimmt [187]. Das mitgenutzte Blutgefäß reagiert aber offenbar mit der Ausschüttung von Angiopoietin-2, einem Angiogeneseinhibitor, woraufhin es zur Gefäßregression und konsekutiv zur Tumornekrose kommt. Der Tumor selbst kann dies nur überstehen, wenn er seinerseits eine Neoangiogenese mittels VEGF einleitet.

In **Tabelle 7** sind eine Auswahl proangiogenetischer Faktoren aufgeführt (**Siehe S. - 26 -**).

Auswahl angiogenetischer Faktoren...	...und eine Auswahl ihrer Aufgaben
<b>Angiopoietin -1</b>	Rekrutierung glatter Muskelzellen via Aktivierung von Tyrosinkinaserzeptoren (TIE -2) = Gefäßreifung [402]
<b>FGF</b> ( <i>Fibroblast Growth Factor</i> )	Wenigstens 20 verschiedene Subformen. Klassische Vertreter: aFGF und bFGF; Potente Angiogenese – Faktoren mit multiplen Funktionen, u.a. Endothelzellenproliferation, -migration, -differenzierung [219, 244, 247]
<b>Endotheline</b>	<b>Siehe Kapitel 1.4</b>
<b>VEGF-A, -B, -C, -D</b> ( <i>Vascular Endothelial G.F.</i> )	Rekrutierung, Reifung, Erhalt von Endothelzellen [99]; Sprießen und Intussuszeption von Gefäßen [312]; Multiple Funktionen in Nicht – Endothelzellen [99]; Neuroprotektive Effekte [398].
<b>PIGF</b> ( <i>Placenta Growth Factor</i> )	Mitglied der VEGF – Familie; spricht v.a. den VEGFR-1 – Rezeptor an [265]. Seine Aktivierung führt in erster Linie zu Endothelzellmigration, nicht –proliferation [297].
<b>PDGF</b> ( <i>Platelet Derived Growth Factor</i> )	Perizytenummantelung kleinster Gefäße [259] Rekrutierung VEGF-produzierenden Stromas [119]
<b>G-CSF / GM-CSF</b> ( <i>Granulocyte –Colony – Stimulating Factor / Granulocyte – Macrophage Stimulat. Factor</i> )	Mobilisierung von Endothelvorläuferzellen [GM-CSF] [406] Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen [G-CSF] [407]
<b>Leptin</b>	Endothelzellproliferation [379] Formierung von Kapillaren [56]
<b>IL-8</b>	Endothelzellproliferation und –erhalt [258]
<b>Proliferin</b>	Endothelzellmigration [201]
<b>IGF</b> ( <i>Insuline Like Growth Factor</i> )	Endothelzellmigration; + Hyperglykämie: Gefäßformation [289, 377]
<b>TGF b</b> ( <i>Transforming Growth Factor β</i> )	Proliferation glatter Muskelzellen [320]
<b>hCG</b> ( <i>humanes Choriongonadotropin</i> )	Endothelzellmigration und Kapillarformation [481]
<b>Prostaglandin</b>	G – Protein – vermittelte intrazelluläre Aktivierung anderer Faktoren, z.B. VEGF. [200]
<b>HGF</b> ( <i>Hepatocyte growth factor</i> )	Endothelzellmigration; potenter Aktivator anderer Faktoren, z.B. VEGF [206]
<b>Östrogene</b>	Endothelzellmigration, -proliferation und Gefäßformation [282]

**Tabelle 7:** Eine Auswahl proangiogenetischer Wachstumsfaktoren, die direkt oder indirekt auf Endothelzellen wirken und sich teilweise gegenseitig beeinflussen.

### 1.3.4 Angiogenese als unabhängiger Prognosefaktor des Mammakarzinoms

Die intratumorale Angiogeneseaktivität wird mittels Bestimmung der Mikrogefäßdichte (MVD<sup>\*</sup>) festgelegt. *Weidner et al.* untersuchten Gewebestanzungen invasiver Mammakarzinome, mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung gegen Faktor VIII (von Willebrand-Faktor) – Färbung. Im Bereich des „Hot Spots“, respektive dem Bereich mit der höchsten Vaskularisierung, wurde die Anzahl an Mikroblutgefäßen gezählt und mit dem klinischen Krankheitsverlauf korreliert [441]. Es stellte sich heraus, dass eine klare Korrelation zwischen der Anzahl von Mikrogefäßen im Tumor und dem Vorliegen von Metastasen (sowohl Lymph- als auch Fernmetastasen) besteht. Für jede Zunahme von 10 Mikrogefäßen in einem 0,7386 mm<sup>2</sup> großen untersuchten Feld kommt es zu einer 1,59-fachen Risikoerhöhung bezüglich der Metastasenbildung. *Weidner et al.* folgerten daraus, dass die Anzahl an Mikrogefäßen in einem bestimmten Feld innerhalb des Tumors möglicherweise als unabhängiger prognostischer Faktor zu werten sei.

In einer wenig später erschienenen Studie untersuchte die Gruppe um *Weidner* den Einfluss der Mikrogefäßdichte auf Gesamt- und rezidivfreies Überleben beim frühen Mammakarzinom (T1-T3, N0-N2, M0) [440]. Auch hier findet sich eine signifikante Assoziation: Während alle Patienten mit einer MVD von mehr als 100 Mikrogefäßen pro 0,7386mm<sup>2</sup> großem Feld innerhalb von 33 Monaten ein Rezidiv erleiden, kommt es bei den Patienten mit 33 oder weniger Gefäßen lediglich in unter 5% der Fälle zum Rezidiv. Darüberhinaus stellt sich die MVD als einziger statistisch signifikanter Faktor bezüglich des Gesamtüberlebens bei nodal-negativen Patientinnen dar. Vor diesem Hintergrund stellen *Weidner et al.* die Hoffnung auf, zukünftig Hoch- von Niedrigrisikopatientinnen mittels MVD-Bestimmung besser als bislang differenzieren zu können.

*Toi et al.* bestätigen die Ergebnisse, nutzten aber zusätzlich zur Faktor VIII - eine weitere anti-endotheliale Antikörperfärbung mit *Anti-CD-31*, was die Identifikation auch viel kleinerer Gefäße ermöglicht [414]. Darüberhinaus beschreiben sie in einer weiterführenden Studie eine Korrelation zwischen gut vaskularisierten Tumoren und der Höhe von VEGF-/FGF- Leveln und anderer Wachstumsfaktoren [415].

*Gasparini et al.* schließlich bestätigen die Relevanz der MVD als Angiogeneseindikator und prognostischer Marker [150] und schließen daraus, dass der Hemmung von Angiogenese in der Therapie des Mammakarzinoms möglicherweise sowohl im neoadjuvanten, adjuvanten als auch langfristigen Therapiebereich größte Bedeutung zukommen könnte [149].

---

\* MVD = [engl] micro vessel density

## 1.4 Die Endothelinachse

Die drei Endotheline, ET-1, ET-2 und ET-3, und ihre beiden Rezeptoren, ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub>, werden als so genannte „Endothelinachse“ (im anglo-amerikanischen Sprachraum: Endothelin-axis) zusammengefasst.

### 1.4.1 Endotheline: Struktur und Vorkommen

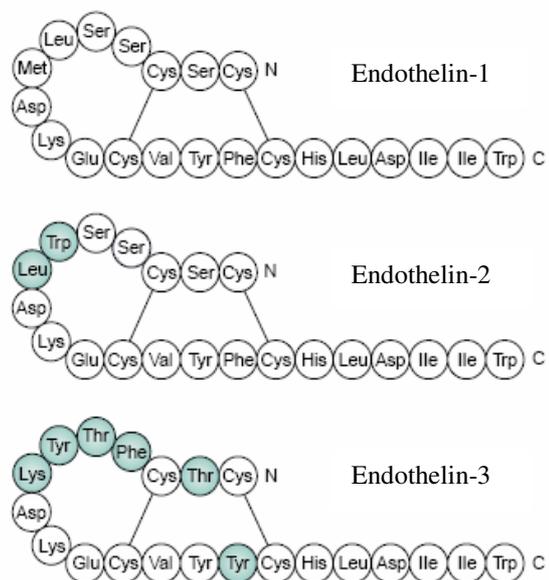
*Furchgott et al.* beobachteten bereits 1980, dass die Dilatation und Kontraktion von Blutgefäßen mittels vasoaktiver Substanzen wie Acetylcholin nur in Gegenwart von Endothelzellen möglich ist [145]. Sie vermuteten, dass nach Rezeptorenbindung der Vasoaktiva eine oder mehrere lokal wirkende Substanzen freigesetzt werden müssten. Eine dieser Substanzen wurde 1988 von *Yanagisawa et al.* als „21 Aminosäuren–Endothelzell–Peptid“ isoliert und „Endothelin“ (ET) genannt [464].

Kurz darauf gelang es einer Arbeitsgruppe um *Inoue*, drei Gene zu identifizieren und zu klonieren, die für drei Isopeptide kodieren:

ET-1, ET-2 und ET-3 [195] (**Abbildung 9**).

ET-2 ist das hydrophobste, ET-3 das polarste der drei Endotheline. Diese Eigenschaft korreliert mit der vasokonstriktorischen Potenz: ET-2 zeigt die höchste maximale Vasokonstriktion, ET-3 die schwächste [195].

Ähnliche Peptidstrukturen, die kardiotoxischen *Sarafotoxine*, finden sich im Gift verschiedener Schlangenarten wieder [122].



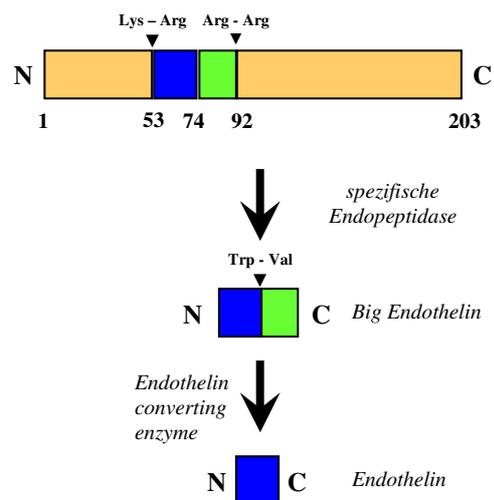
**Abbildung 9 :** Aminosäurestruktur der drei isoformen Endothelin (ET) – Peptide. Farblich gekennzeichnet sind die Positionen, an denen sich ET-2 bzw. ET-3 vom ET-1 unterscheiden.

*Adaptiert aus: [269]*

### 1.4.2 Die Rezeptoren der Endothelinachse

Als Rezeptoren für die drei Endotheline wurden die beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ET<sub>A</sub>R\* und ET<sub>B</sub>R† ermittelt [12, 359]. Darüberhinaus zeigten sich zunächst Hinweise auf das Vorliegen zweier Subtypen des ET<sub>B</sub>-Rezeptors: ET<sub>B1</sub>R und ET<sub>B2</sub>R [390]. Es wurde zunächst angenommen, dass der ET<sub>B1</sub>R in den Gefäßendothelzellen, der ET<sub>B2</sub>R hingegen in den glatten Muskelzellen vornehmlich zu finden sei [322]. Diese Unterteilung wurde allerdings aufgegeben, da es sich zeigte, dass zum einen ET<sub>B1</sub>R und ET<sub>B2</sub>R vom selben Gen kodiert werden [280], zum anderen die These, dass die beiden ET<sub>B</sub>-Subtypen ein unterschiedliches Verhalten in Bezug auf einen nichtselektiven ET-Antagonisten zeigten [439], nicht bestätigt werden konnte [141]. Ein dritter, ET<sub>C</sub>R‡ genannter Rezeptortyp wird beim *Xenopus laevis* (Krallenfrosch) beschrieben [212], ist jedoch bis jetzt nicht beim Säugetier bzw. Menschen nachgewiesen [322].

Der ET<sub>A</sub>-Rezeptor bindet ET-1 und ET-2 mit höherer Affinität als ET-3, wohingegen der ET<sub>B</sub>-Rezeptor alle drei Endotheline in gleicher Stärke bindet [106]. In Blutgefäßen werden ET<sub>A</sub>-Rezeptoren von den glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert, wohingegen die Endothelzellen den ET<sub>B</sub>-Rezeptor ausbilden [141, 256].



### 1.4.3 Synthese und Abbau von Endothelin-1

Nach Proteinbiosynthese aus dem Endothelin-1 Gen erfolgt die Synthese des ET-1 vom 203 Aminosäuren langen Prä-Proendothelin über das 39-Aminosäuren lange „Big Endothelin“ bis hin zum 21-Aminosäuren beinhaltenden Endothelin [353] (**Abbildung 10**).

Der letzte Schritt erfolgt mit Hilfe des „Endothelin converting enzyme“ (ECE), einer

**Abbildung 10:** Biosynthese des Endothelins. Aus dem 203 Aminosäuren langen Präproendothelin wird proteolytisch das 39 Aminosäuren lange Big Endothelin an den dargestellten Positionen herausgetrennt und anschließend mittels des „Endothelin converting enzyme“ zwischen Position 21 und 22 wiederum getrennt. Es entsteht das 21 Aminosäuren lange Endothelin.

Adaptiert aus: [256, 464]

\* ET<sub>A</sub>R = Endothelin-A-Rezeptor

† ET<sub>B</sub>R = Endothelin-B-Rezeptor

‡ ET<sub>C</sub>R = Endothelinrezeptor C

*Metalloproteinase* [306]. Die ET-1 Synthese wird gefördert durch: Angiotensin II [372], Adrenalin [226], Scherkräfte [473], verschiedene Wachstumsfaktoren [224, 232, 250, 271, 353], Hypoxie [47], oxidiertes LDL [227], HDL [228] Insulin [291, 303], Thrombin [228, 368], Kokain [182], Interleukin-6 und Interleukin-1 [353, 462].

Gehemmt wird die Ausschüttung von ET-1 u.a. durch: CNP\* [416], ANP†, BNP‡ [229], Heparin [469], Adrenomedullin [225], Angiopietin [273], oder auch Prostacyclin [452].

Der *Abbau* von ET-1 erfolgt zum einen über die membranständige Metalloproteinase *Neprilysin* und zum anderen über die Aktivierung von ET<sub>B</sub>R, was zur *Clearance* von ET-1 führt [389].

#### 1.4.4 Physiologie der Endothelinachse

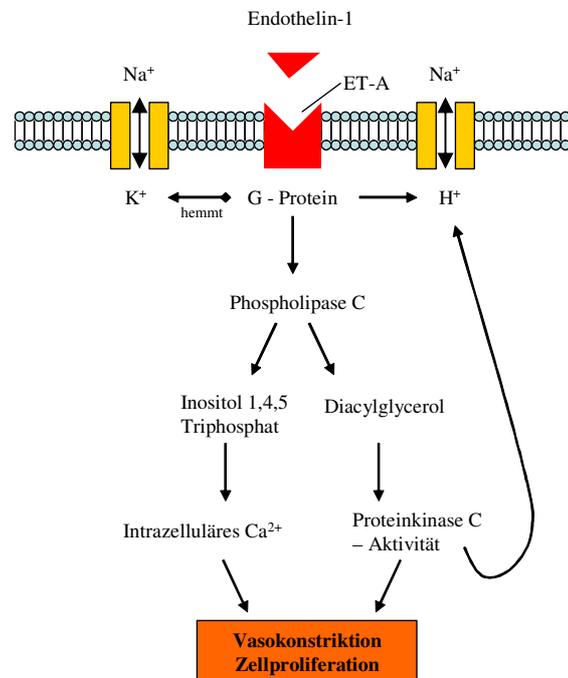
In Endothelzellen werden etwa ¾ des ET-1 an die abluminale Seite abgegeben [471], wo es an benachbarten Zellen an ET<sub>A</sub>-Rezeptoren bindet und zur Vasokonstriktion führt. *Levin* bezeichnet daher das ET-1 als *parakrines*, weniger als *endokrines* Hormon [256].

In **Abbildung 11** werden die Wege der Signalübertragung mittels ET-1 aufgeführt, die zu Vasokonstriktion und verstärkter Zellproliferation führen.

Aber Endotheline haben außer der hämodynamischen und mitogenen eine Vielzahl weiterer Funktionen, z.B.:

**Herz** → positiv inotroper und chronotroper Effekt [80, 148, 198].

**Neuroendokriniem** → Stimulation von Prostacyclin, Prostaglandin [334], Kortikosteroiden und Katecholaminen



**Abbildung 11:** Durch ET-1 ausgelöste Signalwege nach Bindung an den ET-A Rezeptor. Mittels des G-Proteins werden verschiedene Ionenkanäle beeinflusst, was in Herzmuskelzellen einen antiarrhythmogenen Effekt mit sich bringt. Durch die Aktivierung der Phospholipase formieren sich Inositoltriphosphat und Diacylglycerin. Ersteres führt zu einer Erhöhung der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, was zu einer Vasokonstriktion führt. Diacylglycerin stimuliert zusammen mit Ca<sup>2+</sup> die Proteinkinase C, die wiederum den mitogenen Effekt des ET-1 vermittelt.

Adaptiert aus: [256]

\* CNP = C – Type Natriuretic Peptide

† ANP = Atrial Natriuretic Peptide

‡ BNP = Brain Natriuretic Peptide

[330], Freisetzung von Substanz P in Hypophyse und Hypothalamus [64]; von Gonadotropin im Hypophysenvorderlappen [397] und Funktion als Neuropeptid im –hinterlappen [472].

**Niere** → Verminderung der glomerulären Filtrationsrate [263], Erhöhung des intrarenalen Gefäßwiderstandes [216], Beeinflussung von Natrium- und Wassertransport [222].

**Gastrointestinaltrakt** → Kontraktion glatter Muskelzellen [356, 405], Verringerung der Plasma-Glukoseclearance, Begünstigung einer Hyperglykämie [23], Förderung der Wundheilung ventrikulärer Ulcera [7], aber auch poulceröser Effekt [443]. Erleichterung der Leukozytenadhäsion in submukösen Venolen [52], Mobilisierung von  $Ca^{2+}$  und Förderung der Glykolyse in Hepatozyten [374].

**Lunge** → potente Bronchokonstriktion [425].

**Geschlechtsorgane** → Stimulation der Ausschüttung von Progesteron aus den Leydig – Zellen [133].

**Haut** → Melanogenese-Förderung [193], Einfluss auf die Wundheilung [196]

**Promitogene Wirkung** → Stimulation der Zellteilung in glatten Muskelzellen [48, 442], Astrozyten [76], glomerulären Mesangiumzellen [223], Fibroblasten [65], Ovarien [401], Megakaryozyten [209], Osteoblasten [235], Melanozyten [403] und Mammastromazellen [371].

**Genexpression** → Induktion der Expression der mRNA verschiedener Gene wie z.B. c-jun, c-myc, jun B, c-fos, Egr-1, SGK1 [60, 133, 449, 465, 474]; Förderung der Synthese von Prostacyclin [452], ANF\* [184], Phospholipase A [370], Inositoltriphosphat; über Diacylglycerin die Synthese von Proteinkinase C (siehe **Abbildung 11**); Stimulation verschiedener **Wachstumsfaktoren** [419], wie z.B. von VEGF [74, 270, 302] und PDGF [202] (s.a. **Kapitel 1.4.6**).

---

\* ANF = atrial natriuretic factor

### 1.4.5 Pathophysiologie der Endothelinachse

Aufgrund des nahezu *ubiquitären* Vorkommens der beiden Endothelinrezeptoren, v.a. in Lunge, Herz, Gehirn und Gastrointestinaltrakt [106], lassen sich verschiedene Krankheitsbilder zumindest teilweise mit der Endothelinachse in Verbindung bringen:

**Ontogenese** → ET<sub>A</sub>R-defiziente Mäuse entwickelten allesamt CATCH 22\* -Syndrome [86]. Defekte des ET<sub>B</sub>R-Gens führen bei Maus und Mensch zum aganglionären Megakolon und zu Pigmentstörungen [29]. Ein Fehler im für den ET<sub>B</sub>R-kodierenden Gen ist an der Entwicklung des Morbus Hirschsprung beteiligt [325]. Der ET<sub>B</sub>R ist zwischen dem 10. und 12,5. Tag für die Neuralleistenentwicklung unerlässlich und wird für die Migration enteraler Neuroblasten benötigt [378]. Postnatale ET-1-Antagonisierung führt zum Persistieren des offenen Ductus arteriosus [408]. Homozygote Knockout-Mäuse für ET-1 sterben bei Geburt aufgrund respiratorischer Insuffizienz. Heterozygote zeigen erhöhte Blutdruckwerte und kraniofaziale Abnormalitäten [237].

**Chronische Herzinsuffizienz / Hypertonie** → Im Speichel Erkrankter lassen sich erhöhte Endothelin-Konzentrationen messen [113]. Auch zeigen herzinsuffiziente Patienten erhöhte ET-1-Plasmaspiegel, die mit erhöhtem rechts- und linksventrikulärem Füllungsdruck und dem Ausmaß der pulmonalen Hypertonie korrelieren. Offenbar wird die Endothelinachse bei solchen Patienten verstärkt aktiviert, um die Insuffizienz zu kompensieren [218, 269]. Je höher der ET-1-Plasmaspiegel bei den Erkrankten, desto schlechter die Prognose [323]. Sowohl pulmonaler als auch arterieller Blutdruck sinken signifikant unter Gabe eines *nichtselektiven Endothelin-Rezeptorantagonisten* [218], Vor- und Nachlast werden gesenkt [38] (zu den ET-Rezeptor-Antagonisten: **siehe Kapitel 1.4.10**).

**Lungenerkrankungen** → Mögliche Rolle der Endotheline beim Asthma bronchiale, fibrosierender Alveolitis, pulmonaler Hypertonie [24], Sarkoidose und Pneumonie [331].

**Neurologische Erkrankungen** → erhöhte ET-Konzentrationen bei subarachnoidalen Blutungen. Mögliche Verwicklung in Entstehung und Unterhalt von zerebralen Insulten, M.Alzheimer und einer Vielzahl anderer neurologischer Erkrankungen [298]. ET<sub>B</sub>R-defiziente Ratten zeigen eine erhöhte Neuronenapoptoserate und eine verstärkte Neigung zu durch Ischämie ausgelösten Gewebsnekrosen [382].

**Nierenerkrankungen** → Akutes Nierenversagen, Glomerulonephritiden, diabetische Nephropathie und Glomerulosklerosis sind Beispiele für eine Endothelinbeteiligung bei Nephropathien [199, 307].

---

\* CATCH 22 = Cardiac malformation, Abnormal facies, Thymic hypoplasia, Cleft palate, Hypocalcemia; "22" wegen der Mikrodeletion am langen Arm des Chromosoms 22.

Eine Vielzahl anderer Erkrankungen werden direkt oder indirekt im Zusammenhang mit der ET-Achse diskutiert, z.B. *atopische Dermatitis* [188], *seborrhoische Keratose* [266, 409], *Gefäßverschlusserkrankungen der Retina* [174], verschiedene *gastrointestinale Krankheitsbilder* [243].

Von besonderem Interesse ist auch die mögliche **Schmerzinduktion** unter ET-1-Einfluss: In verschiedenen Tiermodellen wurde eine hyperalgetische Wirkung des ET-1 festgestellt, die offenbar über ET<sub>A</sub>R wie auch über ET<sub>B</sub>R vermittelt wird [137, 328].

Der genauen Pathomechanismus für die Schmerzentstehung unter ET-1-Einfluss ist unklar; „gewöhnliche“ Analgetika wie Ibuprofen oder Indometacin wirken in üblicher Dosierung nicht gegen den ET-1-induzierten Schmerz [293].

#### **1.4.6 Rolle der Endothelinachse in der Tumorangiogenese**

Wie in **Kapitel 1.3.3** bereits beschrieben, spielen bei der Tumorangiogenese Wachstumsfaktoren v.a. aus der Familie der VEGF oder auch FGF eine herausragende Rolle. *Richard et al.* bezeichnen sie daher als die „proklamierten Champions“ im Bereich der Angiogenese [337], verweisen aber zugleich auf eine andere Gruppe von Mediatoren: Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die z.B. mittels Thrombin, Angiotensin II oder Endothelinen Einfluss auf die Angiogenese nehmen. ET-1 wird sowohl ein direkter als auch ein indirekter Effekt auf die Angiogenese zugeschrieben [21].

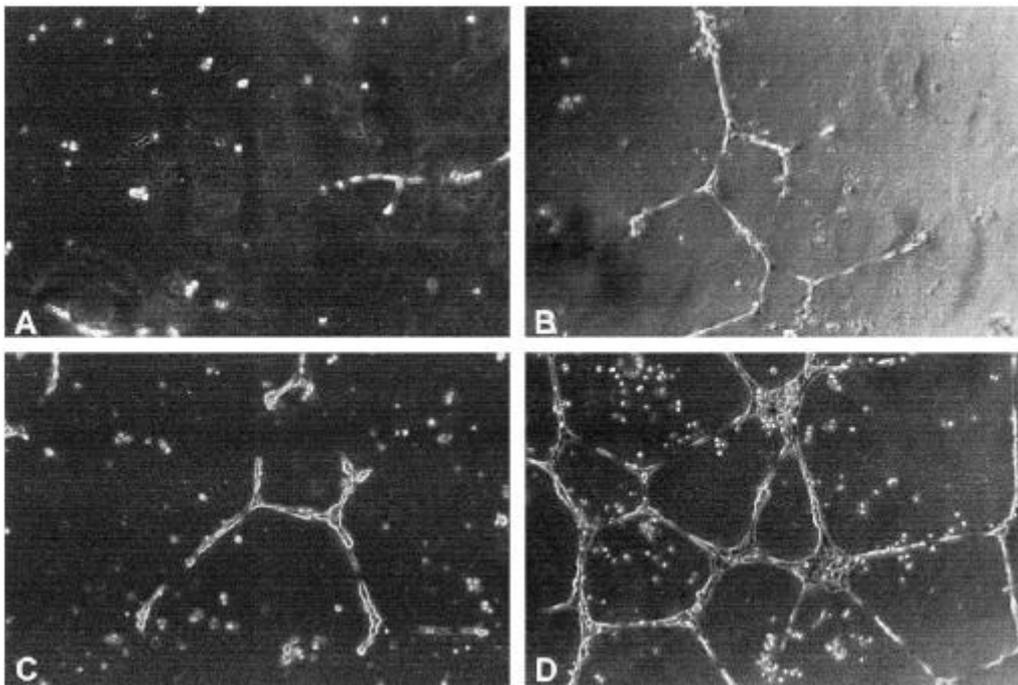
##### **1.4.6.1 Direkte Beeinflussung der Angiogenese**

*Salani et al.* untersuchten die Auswirkungen von ET-1 auf die *Proliferation, Migration und Invasion* von humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen [362]. Dabei zeigt sich eine um bis zu 50% gesteigerte Proliferationstätigkeit der Endothelzellen unter ET-1-Gabe im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen, die mit Hilfe eines ET<sub>B</sub>-Rezeptorantagonisten (BQ788) vollständig aufhebbar sind. Ein ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonist (BQ123) erreicht nur eine sehr geringe Verminderung der erhöhten Proliferationsgeschwindigkeit. Auch die Migrationsfähigkeit wird durch ET-1 um bis zu 50% erhöht. Eine zusätzliche Gabe von VEGF verstärkt diesen Effekt noch additiv. Werden in die Endothelzelllösung ET<sub>B</sub>R-Agonisten wie ET-3 oder auch das Sarafotoxin S6c gegeben, kommt es zu einer Migrationszunahme; wird der oben genannte ET<sub>B</sub>R-Antagonist BQ788 zugefügt, kommt es zu einer signifikanten Abnahme, die beim

BQ123 nicht beobachtet wird. Weiterhin wurde die Fähigkeit, Basalmembranen zu überwinden, unter ET-1 – Einfluss stimuliert. Wie bei Proliferation und Migration lassen sich deutliche Steigerungen bezüglich der Invasion unter kombinierter Gabe von VEGF und ET-1 ermitteln, wohingegen der ET<sub>B</sub>R–Antagonist eine signifikant höhere Invasionsabnahme bewirkt als der ET<sub>A</sub>R–Antagonist.

Diese Ergebnisse bestätigen Resultate anderer Gruppen, die den Zusammenhang zwischen ET<sub>B</sub>R–Stimulation durch ET-1-, bzw. ET-3 und Migrations- und Proliferationsverhalten von Endothelzellen *in vitro* beschreiben [155, 478].

*Salani et al* untersuchten schließlich die Auswirkungen von ET-1 und VEGF auf die Angiogenese *in vivo* [362], indem Mäusen Matrigel implantiert wurde, das entweder mit ET-1 oder VEGF angereichert war; nach 7 Tagen konnte keiner der beiden Faktoren alleine zu einem signifikanten Anstieg in Bezug auf die Vaskularisierung des Matrigels beitragen. Lediglich die Kombination beider Substanzen führte zu einer deutlichen Gefäßneubildung (siehe **Abbildung 12**).



**Abbildung 12:** 200-fache Vergrößerung des nach 7 Tagen entnommenen Matrigels  
(Einzelheiten: siehe Text)

- A → Matrigel ohne ET-1 / VEGF (Kontrollgruppe)
- B → Matrigel mit 10nmol/L ET-1
- C → Matrigel mit 1ng/ml VEGF
- D → Matrigel mit 10nmol/L ET-1 und 1ng/ml VEGF

Aus: *Salani et al.* [362]

Dieser kumulative Effekt zeigt die Unabhängigkeit der beiden Substanzen voneinander [21]. Weitere Hinweise auf die Fähigkeit von ET-1, *in vivo* Angiogenese zu stimulieren, wurden anhand des ET-1-Einflusses auf die Gefäßneubildung in der Chorioallantois des Huhns [100], auf die lokale Angiogenese der Ratte nach Subarachnoidalblutung [208] und auf die Neovaskularisation innerhalb der Cornea der Ratte [32] nachgewiesen, wobei in letztgenannter Studie ausdrücklich auf die Abhängigkeit der Angiogenese auch vom ET<sub>A</sub>-Rezeptor hingewiesen wird – nicht nur vom ET<sub>B</sub>-Rezeptor. Besonders der Einfluss der Endotheline auf Tumorstromavaskularisierung und -proliferation konnte ermittelt werden (siehe **Kapitel 1.4.7** und **1.4.8**).

Allerdings gibt es auch Berichte von nichtangiogenetischer Fähigkeit der Endotheline: ET-1 und ET-3 zeigen in einem „Ratten-Schwamm-Modell“ im Gegensatz zu Angiotensin II und vasoaktivem intestinalen Peptid keine Gefäßproliferation [191]. In einem Chorionallantoismodell ergeben sich unter ET-1 – Einfluss, im Gegensatz zum Erythropoetin-Einfluss, keine Gefäßneubildungen [335].

Die direkte Angiogenese wird also im Hinblick auf Endothelzellenmigration, -proliferation und Invasion vornehmlich über ET<sub>B</sub>-Rezeptoren vermittelt; die Ausschüttung von VEGF und HIF und die Mitogenese glatter Muskelzellen und Perizyten wird über den ET<sub>A</sub>-Rezeptoren gesteuert [32, 292, 362] (siehe das folgende **Kapitel 1.4.6.2**). Bei der direkten Beeinflussung der Angiogenese durch ET-1 scheint die Aktivierung von *Matrix-Metalloproteinasen (MMP)* von großer Bedeutung zu sein [346]. MMP erleichtern u.a. die Invasion von Tumor- bzw. Endothelzellen in andere Blutgefäße mittels Proteolyse der extrazellulären Matrix, v.a. von Laminin und der Adhäsionsmoleküle E-Cadherin und CD-44. Aber auch weitere Wachstumsfaktoren werden durch MMP freigesetzt, z.B. IGF oder TGF- $\alpha$ , die indirekt Angiogenese fördern [127].

### 1.4.6.2 Indirekte Beeinflussung der Angiogenese

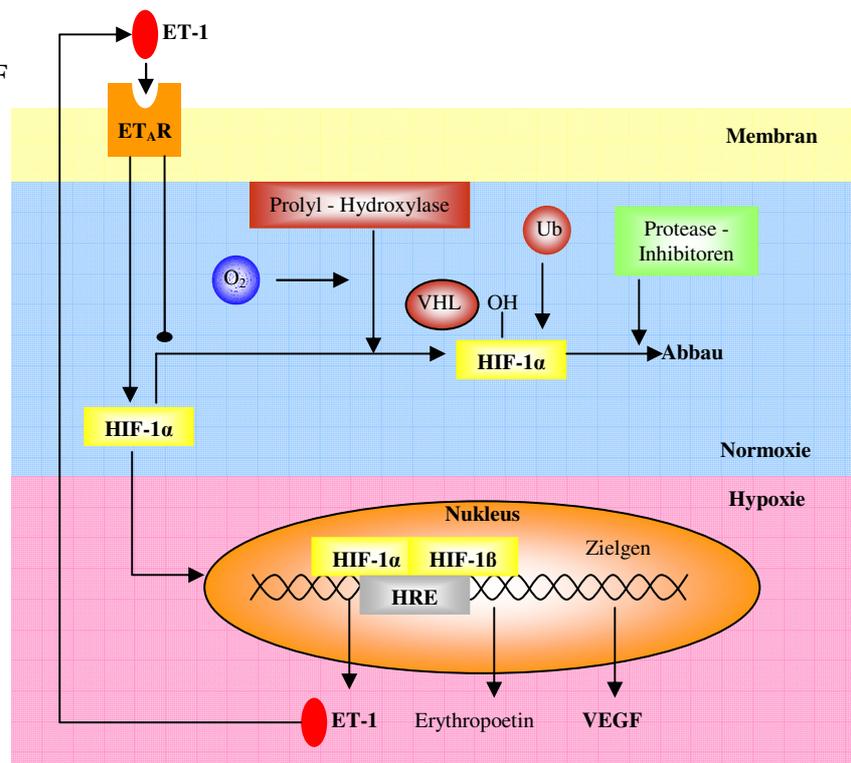
Bagnato et Spinella stellten die These auf, dass im Rahmen der Angiogenese zunächst eine ET<sub>B</sub>R-Aktivierung mittels ET-1 über para- und autokrine Effekte zu Migration, Proliferation und Invasion von Endothelzellen führe (siehe oben, **Kapitel 1.4.6.1**). Wie in **Abbildung 13** dargestellt komme es anschließend durch Bindung von ET-1 an ET<sub>A</sub>R- zu einer verstärkten HIF- und konsekutiven VEGF-Freisetzung, die zur eigentlichen Angiogenese mit Sprießen und Intussuszeption beitrage [21].

Unter letztgenannter Stimulation von HIF / VEGF durch ET-1 versteht man *die indirekte Angiogenesestimulation* des

ET-1, das sowohl durch HIF als auch durch VEGF seinerseits wiederum stimuliert wird [271, 302].

Während der Tumorangio- genese werden verschiedene Wachstumsfaktoren ausgeschüttet; den Hauptantrieb für die VEGF-Synthese bildet aber HIF-1 (s.a. **Kapitel 1.3.3**) [172, 302], der auch weitere

Angiogenesefaktoren stimuliert, z.B. Adrenomedullin, Angiopoetin-2, FGF, HGF, IGF, (TGF)- $\alpha$ , und TGF- $\beta$ . Und auch Endotheline werden unter hypoxischen Bedingungen /HIF-Einfluss verstärkt synthetisiert [172, 242].



**Abbildung 13:** Wechselseitige Beeinflussung von ET-1 und HIF-1 $\alpha$ .

Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1 $\alpha$  durch eine Prolylhydroxylase posttranslational hydroxyliert, so dass es komplexbildend mit dem Von-Hippel-Landau-Faktor (VHL) interagieren kann. Dieser Komplex führt zur Ubiquitinierung des HIF-1 $\alpha$  und anschließendem proteolytischem Abbau, der durch Proteaseninhibitoren aufgehalten werden kann.

Bei fehlendem Sauerstoff wird HIF-1 $\alpha$  nicht abgebaut, sondern gelangt in den Zellkern, reagiert mit Cofaktoren wie HIF-1 $\beta$  und bindet an ein HRE (Hypoxia Responsive Element), woraufhin Wachstumsfaktoren wie VEGF und Erythropoetin, aber auch ET-1 freigesetzt werden.

Letzteres bindet an den ET<sub>A</sub>-Rezeptor, dessen Besetzung zur Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  beiträgt. ET-1 täuscht auch bei Normoxie eine Hypoxie vor, so dass der Abbau von HIF-1 $\alpha$  erschwert wird. Bei Hypoxie wird mittels ET-1 der Hypoxie-Stimulus potenziert.

Adaptiert aus: Bagnato/Spinella [21]

Den Nachweis, dass ein direkter Zusammenhang zwischen ET-1- und HIF- Überexpression zumindest beim Mammakarzinom besteht, erbrachten *Wülfing* und *Smollich*: Mittels Immunhistochemie wurden 600 Gewebeproben von 200 bösartigen Mammatumoren hinsichtlich ihrer Expression von HIF-1 $\alpha$ , ET-1, ET<sub>A</sub>R und ECE-1\* untersucht [387]. Dabei zeigten sich signifikante Korrelationen zwischen der jeweiligen Expression von ET-1 und HIF-1 $\alpha$ . Zwischen HIF-1 $\alpha$  und ET<sub>A</sub>R bzw. ECE-1 lassen sich hingegen keine Korrelationen finden. Um den Effekt von Hypoxie als Stimulus auf die ET-1-Ausschüttung aufzudecken, inkubierte die Arbeitsgruppe Mammakarzinomzellen der MCF-7-Reihe unterschiedlich lange mit Kobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub>). Als Ergebnis lassen sich zunächst nach zweistündiger Hypoxie-Simulation eine Erhöhung der nun ermittelten ET-1-Konzentration um mehr als 100% im Vergleich zu einer nicht mit CoCl<sub>2</sub> inkubierten Kontrollgruppe feststellen. Anschließend sinkt der ET-1-Spiegel aber dramatisch ab, um nach 16 Stunden sogar bei nur noch ca. 85% der Kontrollgruppe zu liegen. Nach 24 Stunden pendelt sich der Wert bei den in der Kontrollgruppe zu messenden Konzentrationen ein. Das zunächst starke Ansteigen und anschließende rasante Absinken der ET-Konzentrationen wird darauf zurückgeführt, dass das ET-1 in sogenannten „*Weibel-Palade-Körpern*“, also Speichervesikeln, die u.a. auch den von Willebrand-Faktor oder auch Interleukin-8 enthalten [430], gespeichert und erst bei entsprechenden Stimuli (in diesem Fall Hypoxie) freigegeben wird. Somit steht eine erhebliche Menge an ET-1 innerhalb kürzester Zeit zur Verfügung. Das rasante Absinken wird auf das Einsetzen entsprechender Abbaumechanismen zurückgeführt.

In einem dritten Schritt wurde die Invasionsfähigkeit der Karzinomzellen unter hypoxischen Bedingungen, unter ET-1-Stimulation sowie unter Gabe eines entsprechenden ET<sub>A</sub>R-Blockers (*Atrasentan*, siehe **Kap. 1.4.10.3**) geprüft. Es zeigte sich, dass ET-1 und Hypoxie einen jeweils ähnlich starken invasionsfördernden Effekt haben. Jedoch sind die Effekte beider Stimuli komplett reversibel unter ET<sub>A</sub>R-Antagonisierung.

Auch bei anderen malignen Erkrankungen finden sich häufig signifikante HIF-1 – Überexpressionen: So z.B. in Glioblastomen und Hämangioblastomen [476], ovariellen Epithelzellkarzinomen [44, 451], Mamma- [53, 54, 104], Cervix- [45], Oropharynx- [4], Ösophagus- [234] und Bronchialkarzinomen [435]. Auch Endotheline werden in zahlreichen Tumoren im Übermaß exprimiert (siehe folgende Kapitel).

---

\* ECE-1 = Endothelin converting enzyme-1

### 1.4.7 Expression der Endothelinachse beim Mammakarzinom

*Kusuhara et al.* untersuchten das Vorkommen von ET-1 in verschiedenen humanen Tumorzelllinien [238]. Sie stießen dabei auf besonders hohe Konzentrationen des Endothelins in Mamma-, Pankreas- und Kolonkarzinomzelllinien. Von einer anderen Gruppe wird die Fähigkeit des ET-1 gezeigt, ruhende Epithelkarzinomzellen des Cervix- bzw. Larynxkarzinoms zur Proliferation zu bewegen [376].

*Yamashita et al.* maßen die ET-1-Protein-Konzentration in Gewebeproben von Mammakarzinomen und verglichen diese mit Proben von normalem Brustgewebe bzw. benignen Mammatumoren [461]. Dabei zeigt sich ein signifikant höheres ET-1-Protein-Vorkommen in den malignen Tumoren verglichen mit Normalgewebe oder benignen Tumoren.

Allerdings stellt die Arbeitsgruppe heraus, dass es weder Anzeichen für eine Korrelation der ET-1-Konzentration mit dem Stadium der Brustkrebserkrankung, noch mit Tumorgröße, Lymphknotenbefall, histologischem Typ, Hormonrezeptorstatus oder auch Alter des Patienten gebe. Vielmehr lasse sich eine ungefähr gleich starke Erhöhung von ET-1 sowohl in sehr frühen wie auch sehr späten Stadien finden. Daraus wird geschlossen, dass ET-1 nicht für das (spätere) Wachstum des Tumors, sondern vielmehr in einem sehr frühen Stadium für die Entartung duktaler Mammaepithelzellen verantwortlich sei.

Es wurde bereits gezeigt, dass ein Carcinoma in situ mittels verstärkter Ausschüttung verschiedener Wachstumsfaktoren bereits vor der vaskulären Invasion von einer erhöhten Gefäßdichte umgeben ist. (s.a. **Kapitel 1.3.3**). Eine Erhöhung der Angiogenesetätigkeit könnte also bereits in frühen Stadien die Transformierung von einem DCIS hin zum Karzinom begünstigen.

Daher untersuchten *Wülfing et al.* duktale Carcinoma in situ hinsichtlich der Expression verschiedener Wachstumsfaktoren, einschließlich der Endothelinachse [454]. Es findet sich in der Mehrzahl der DCIS-Fälle eine starke Expression von Flt-4, bFGF-R1, VEGF-C und des ET<sub>A</sub>R. Interessanterweise sind diese Wachstumsfaktoren bzw. ihre Rezeptoren in „reinen“ DCIS häufiger anzutreffen als in DCIS von Patientinnen mit einem koexistenten invasiven Mammakarzinom. ET-1 hingegen ist, wie der ET<sub>B</sub>-Rezeptor, insgesamt seltener, dafür aber etwas häufiger im DCIS mit invasiver Komponente als im reinen DCIS exprimiert. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, dass der immunhistochemische Nachweis der vier oben genannten häufig im reinen DCIS vorkommenden Faktoren / Rezeptoren und ihre anschließende antiangiogenetische Behandlung möglicherweise den „angiogenetischen

Switch“ und damit die Entwicklung von *Invasion* und dadurch möglicher *Metastasierung* aufhalten könnte.

Die von *Yamashita et al.* [461, 463] beschriebene fehlende Korrelation zwischen den oben genannten klassischen Prognosefaktoren und der ET-1-Protein-Expression des Mammakarzinomgewebes wird von *Kojima et al.* bestätigt [230]. Allerdings finden sich Korrelationen zwischen positivem ET-1-Status und dem Vorliegen von Fernmetastasen und der Rezidivneigung: Das 5-Jahres rezidivfreie Überleben beträgt bei ET-1-positiven etwa 74% im Vergleich zu ca. 96% bei ET-1- negativen Patientinnen. Auch ist die 5-Jahresüberlebensrate signifikant geringer bei ET-1-positiven Patientinnen.

*Alanen et al.* fanden fünf Jahre später erhöhte Werte von ET-1-mRNA und ET-1-Protein in Mammakarzinomen [8]. Darüberhinaus konnten erhöhtes ET-3- und ein vermehrtes ET<sub>B</sub>R – mRNA-Vorkommen ermittelt

werden. Allerdings konnte kein mRNA-Nachweis des ET<sub>A</sub>-Rezeptors erbracht werden, weder im gesunden noch im neoplastischen Brustgewebe.

*Wülfing et al.* hingegen weisen sowohl eine Proteinüberexpression von ET<sub>A</sub>R und ET<sub>B</sub>R [456] als auch erhöhte mRNA-Werte von ET<sub>A</sub>R und ET-1, nicht jedoch von ET<sub>B</sub>R in den Epithelzellen maligner Mammatumoren nach [457].

Es finden sich in 43% der untersuchten Gewebeproben erhöhte Werte für ET-1-Protein. Dies ist ein deutlich

geringerer Prozentsatz als in der deutlich kleineren Studie von *Alanen* [8], steht aber in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Kojima et al.* [230]. In der Studie von *Alanen et al* wurden lediglich Proben von 25 invasiven Brustkrebsfällen untersucht, wohingegen *Wülfing's* Untersuchungen über 170 Fälle umfassen. Darüberhinaus zeigen *Wülfing et al.*

Klinisch – pathologischer Parameter	Anteil der Tumoren mit genannten Parametern und gleichzeitig erhöhter ET <sub>A</sub> R – Expression (%)	p-Wert
Histologisches Grading		
I-II	38,8%	0,009
III	60,0%	
ER – Status		0,038
positiv	54,2%	
Negativ	36,8%	
Her-2/neu – Status		0,003
negativ	44,0%	
Positiv	90,9%	
Lymphgefäßinvasion		0,030
Nein	41,8%	
Ja	62,2%	
Lokalrezidiv		0,047
Nein	43,5%	
Ja	66,7%	
Fernmetastasen		0,013
Nein	40,3%	
Ja	62,2%	
Erkrankungsfreies 5 - JÜ*		0,030
Ja	38,3%	
Nein	58,5%	

**Tabelle 8:** Korrelation zwischen klinisch-pathologischen Parametern und Vorliegen einer ET<sub>A</sub>R – Überexpression bei primärem Mammakarzinom.

*Adaptiert aus: Wülfing et al [456]*

\* 5 - JÜ = Fünfjahresüberleben

Assoziationen zwischen ET-1, ET<sub>A</sub>R und ET<sub>B</sub>R und klinisch-pathologischen Parametern auf: ET<sub>A</sub>-Rezeptor-positive Tumoren zeigen signifikant häufiger ein schlechtes histologisches Grading und seltener ein erkrankungsfreies Fünfjahres- Überleben (siehe **Tabelle 8, S.- 39 -**) als ET<sub>A</sub>R-negative Tumoren. Auch sind gehäuft ein positiver Her-2/neu- und (dies eher unerwartet) ein positiver ER-Status anzutreffen. ET<sub>A</sub>R – positive Tumoren sind außerdem verstärkt von einer Lymphgefäßinvasion begleitet.

Patientinnen mit positivem ET<sub>A</sub>R-Status entwickeln darüberhinaus signifikant öfter Lokalrezidive und Fernmetastasen. Keine Signifikanz liegt zwischen dem Vorliegen des ET<sub>A</sub>-Rezeptors und dem „T“- und „N“- Status der Tumoren vor. Auch zum PR – Status kann keine Assoziation hergestellt werden. Das mittlere krankheitsfreie Überleben (*disease-free survival, DFS*) liegt für ET<sub>A</sub>R-negative Patientinnen bei 90 +/- 4 Monaten, für ET<sub>A</sub>R-positive bei 74 +/- 6 Monaten. Der sogenannte MIB-1-labeling Index\* zeigt hinsichtlich der Verteilung zwischen geringer und hoher Proliferationsrate zunächst keine Assoziation mit einer erhöhten ET<sub>A</sub>R-Protein-Expression. Allerdings haben Patientinnen mit geringer Proliferationsrate und gleichzeitigem Vorliegen eines positiven ET<sub>A</sub>R-Status ein signifikant verringertes erkrankungsfreies Überleben im Vergleich zu ET<sub>A</sub>R-negativen Patientinnen.

Das gleiche gilt für Fälle mit günstigem histologischen Grading (G I-II), positivem ER- und negativem Her-2/neu-Status und dem Fehlen einer Lymphgefäßinvasion.

Das erkrankungsfreie Überleben ist bei Patientinnen mit positivem ET<sub>B</sub>R-Protein-Status im Vergleich zur ET<sub>B</sub>R-negativen Gruppe nicht signifikant verändert.

Bei Vorliegen einer erhöhter ET-1-Protein-Expression lässt sich lediglich ein statistisch nicht signifikanter Trend ermitteln: ET-1- positive haben ein erkrankungsfreies Überleben von 77 +/- 6 Monaten, ET-1-negative von 87 +/- 4 Monaten. Allerdings findet sich mit zunehmender Tumorgöße eine signifikant steigende ET-1-Protein-Expression. Auch bei Vorliegen eines ungünstigen *Gradings* oder einer Lymphgefäßinvasion ist die ET-1-Protein-Expression erhöht. Inflammatorische Karzinome zeigen ebenfalls häufig eine ET-1-Protein-Überexpression. Das Gesamtüberleben ist jedoch nicht signifikant mit dem ET<sub>A/B</sub>-Rezeptor- und ET-1 – Status assoziiert.

Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte in einer weiteren Studie duktile Carcinomata in situ, lobuläre Carcinomata in situ, invasive Mammakarzinome und gesundes Brustgewebe hinsichtlich der Protein-Expression von ET-1, ET<sub>A</sub>R und ET<sub>B</sub>R [455]. Es zeigt sich ein

---

\* MIB – 1 – Labeling index: Gibt die Proliferationsrate eines untersuchten Gewebes an. MIB-1 markiert während des Zellzyklus (G1, G2, S und M-Phasen) nukleäre Antigene, ähnlich dem monoklonalen Antikörper Ki-67 [385].

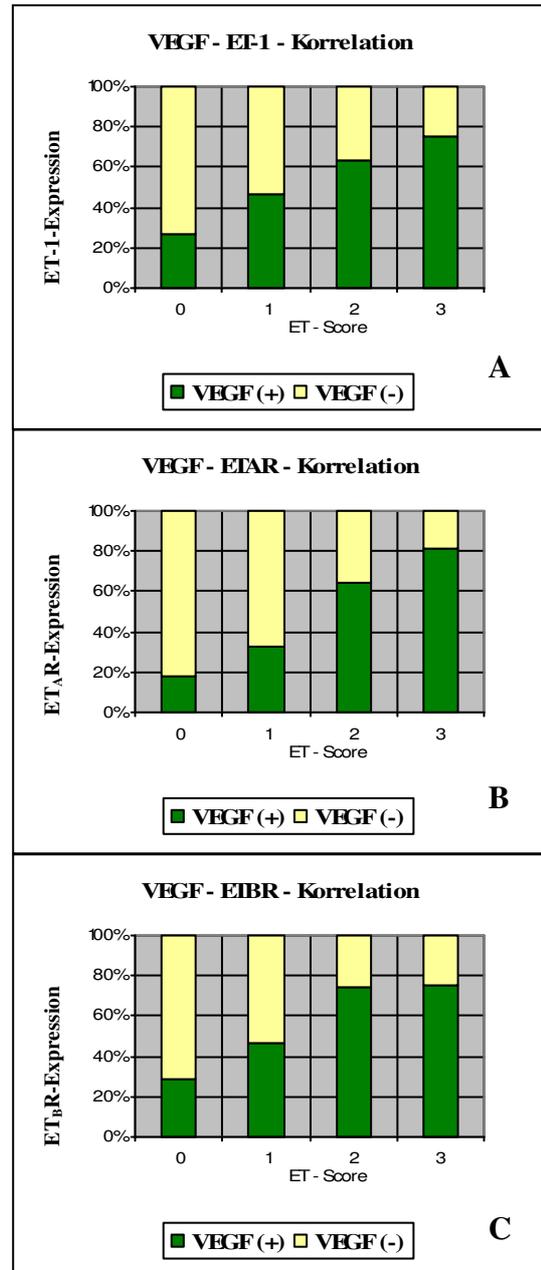
schrittweiser Anstieg der Expression von ET-1 und ET<sub>A</sub>R vom gesunden Gewebe über das Carcinoma in situ bis hin zum invasiven Mammakarzinom.

*Grimshaw et al.* fanden ebenfalls eine erhöhte Expression der Endothelinachse bei invasiven Mammakarzinomen [161]. Es fand sich eine hypoxievermittelte Ausschüttung von ET-2, das via ET<sub>B</sub>-Rezeptor *autokrin* die Tumorzellen vor Schäden durch Hypoxie schützt. Eine Blockade des ET<sub>B</sub>-Rezeptors führt zu einer erhöhten Tumornekroserate *in vivo*. In einer späteren Studie untersuchte die genannte Arbeitsgruppe fünf verschiedene Mammatumor – Zelllinien (MCF-7, BT20, BT474, SKBR3 und MDAMB468) hinsichtlich ihrer Endothelin / Endothelinrezeptorexpression [160]. Alle Zelllinien exprimierten die mRNA für ET-1, ET-2 und ET<sub>B</sub>R. ET<sub>A</sub>R war lediglich in einer Zelllinie (BT20) nicht nachzuweisen. Mittels ET-1 und -2 ist eine Migration der Tumorzellen induzierbar. Auf ET-3 reagieren die Zellen nicht. Die BT20–Zelllinie zeigt eine abgeschwächte Migrationsfähigkeit im Vergleich zu den anderen Zellkulturen. Die Zugabe von Endothelinen zu Makrophagen–Tumor–„Cokulturen“ führt zu einer erheblich gesteigerten Produktion von MMP-2 und -9, die weder nach Zugabe von Endothelinen zu Makrophagen–„Reinkulturen“ noch zu Tumor–„Reinkulturen“ zu beobachten ist. Die MMP-Ausschüttung geht mit einer Erhöhung der Invasionsrate der Tumorzellen einher. Eine Antagonisierung ist sowohl mittels ET<sub>A</sub>R- (BQ-123) als auch mittels ET<sub>B</sub>R–Hemmung (BQ-788) erfolgreich. Ein additiver Effekt beider Antagonisten wird hierbei nicht beobachtet. Auch eine unspezifische MMP–Antagonisierung (mittels *FN439*) führt zur Verlangsamung der Invasionsrate. Die Autoren schlußfolgern, dass der Endothelinachse hinsichtlich Invasion und Progression von Mammakarzinomzellen eine erhebliche Bedeutung zukomme. *Rai et al.* ermittelten bei Ratten mit Brusttumoren eine im Vergleich zu gesundem Brustgewebe erhöhte Blutflussrate unter ET-1 – Einfluss, die offenbar ET<sub>B</sub>R – vermittelt ist und durch selektive Hemmung von ET<sub>B</sub>R abzuschwächen ist [329]. *Wülfing et al.* untersuchten den Effekt der Endothelinachse in Bezug auf das Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Epirubicin und Cyclophosphamid [458]. Es zeigte sich, dass 50% der ET<sub>A</sub>R – positiven Fälle unter der Therapie keine Besserung zeigen, wohingegen die ET<sub>A</sub>R – negativen Patientinnen lediglich zu 7% als therapieresistent einzustufen sind. Der ET<sub>A</sub>R – Status lässt sich als unabhängiger, prädiktiver Wert für die Chemotherapieresistenz ermitteln. Als nächstes rückten *Wülfing et al.* die Frage in den Mittelpunkt, inwieweit die Endothelinachse direkt oder auch indirekt über die Freisetzung von VEGF Einfluss auf die Angiogenese (gemessen als MVD) beim Mammakarzinom nimmt [458]. Die Gruppe bestätigt dabei zum einen die schon von anderen Gruppen [151, 413] berichtete Korrelation

zwischen MVD und VEGF – Expression (Siehe auch **Kapitel 1.3.3**). **Abbildung 14** zeigt die signifikante positive Korrelation zwischen der Proteinexpression von VEGF und ET-1, bzw. ET<sub>A</sub>R und ET<sub>B</sub>R. Hinsichtlich der MVD ergibt sich ein ähnliches Bild: zunehmende Mikrogefäßdichte geht mit zunehmend positivem ET-1, ET<sub>A</sub>R und ET<sub>B</sub>R – Status einher. Dabei wird eine besonders deutliche Zunahme der Endothelin-Expression beim Übergang zwischen leicht und mittelgradig vaskularisierten Tumoren entdeckt. Bei hochvaskularisierten Tumoren ist kaum ein Anstieg der ET<sub>A</sub>R oder ET<sub>B</sub>R – Positivität zu verzeichnen. Die Arbeitsgruppe stellt daher die These auf, dass die ET – Rezeptoren v.a. zu einem frühen Zeitpunkt der Neovaskularisierung der Mammakarzinome von Bedeutung sein könnten.

*Hagemann et al.* fanden erhöhte ET-1-Protein-Serumkonzentrationen bei Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen, verglichen mit denen ohne Lymphknotenmetastasierung [167].

Während die Gruppe eine Korrelation zwischen ET- Gehalt und Invasionsneigung bei malignen Tumoren beschreibt, kann sie keine Übereinstimmung zwischen ET-1 – Überexpression / - Stimulation und Entartungspotential bei benignen Epithelzellen entdecken.



**Abbildung 14:** Korrelationen zwischen VEGF und ET-1 (A), ET<sub>A</sub>R (B) und ET<sub>B</sub>R (C) – Expression.

Der „ET-Score“ wurde als Einteilung für die jeweilige Stärke der immunhistochemischen Färbung gewählt. „0“ bedeutet keine, „1“ eine schwache, „2“ eine mäßige und „3“ eine starke Färbung / Expression.

Mit zunehmender Expression von ET-1, ETAR und ETBR nimmt auch die Häufigkeit der VEGF – Expression zu.

Adaptiert aus: *Wülfing et al. [458]*

## 1.4.8 Endothelinexpression bei anderen Malignomen

Bei einer Reihe weiterer Malignome wurde die Bedeutung der Endothelinachse für die Karzinogenese, Angiogenese oder Metastasierung untersucht.

### 1.4.8.1 ... beim Ovarialkarzinom

Im gesunden Ovar spielt die Endothelinachse offenbar eine Rolle in der Regulation der Durchblutung [267]. Es konnte gezeigt werden, dass ET-1 von Ovarialkarzinomzellen produziert wird und autokrin auf ET<sub>A</sub>-Rezeptoren wirkt, wodurch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie VEGF induziert wird [22]. ET-1 und ET<sub>A</sub>R finden sich gehäuft in maligne transformiertem Gewebe verglichen mit Normalgewebe, wohingegen die ET<sub>B</sub>R-Expression in malignem Gewebe geringer ist. Außerdem fördert ET-1 die Proliferation von Tumorzellen [20]. In zwei Ovarialkarzinom-Zelllinien (HEY und OVCA 433) kommt es über den ET<sub>A</sub>-Rezeptor zur Aktivierung verschiedener Matrix-Metalloproteasen, was eine verstärkte Tumorzellmigration und -invasion zur Folge hat [348]. Vor diesem Hintergrund wird auch das erhöhte Metastasierungspotential unter ET-1-Einfluss diskutiert [346]. Durch Freisetzung von Prostaglandin E<sub>2</sub> wird ebenfalls das Invasions- und Metastasierungspotential ovarieller Karzinome gesteigert [393].

Eine Aktivierung des ET<sub>A</sub>R durch ET-1 führt in einem *in vivo* – Mausmodell zu einer Phosphorylierung von Connexin-43, was eine Destabilisierung von interzellulären Gap Junctions zur Folge hat. Dieser Verlust könnte zu einer erschwerten Wachstumskontrolle der Tumorzellen beitragen [394].

Die Konzentrationen von ET-1 korrelieren in Ovarialkarzinomen mit den VEGF-Werten. ET-1 ist darüberhinaus in der Lage, die Synthese von VEGF in ähnlichem Ausmaß zu steigern wie der Einfluss von Hypoxie [360]. Die Steigerung der VEGF-Freisetzung wird von ET-1 offenbar durch HIF-1-Induktion erreicht. Dieser Effekt ist mit Hilfe eines selektiven ET<sub>A</sub>R – Antagonisten (BQ123) hemmbar [392]. Das Wachstum von Ovarialkarzinomzellen selbst kann ebenfalls mit Hilfe eines ET<sub>A</sub>R – Antagonisten (ABT-627 = Atrasentan → siehe auch **Kapitel 1.4.10.3**) *in vitro* gehemmt werden [361].

### 1.4.8.2 ... beim Prostatakarzinom

Im Ejakulat der Prostata finden sich hohe ET-1-Protein-Konzentrationen [294]. ET-1 bewirkt offenbar eine ausgeprägte Kontraktion glatter Muskelzellen in der Prostata [245]. Diese Kontraktion wird sowohl über ET<sub>A</sub>- als auch ET<sub>B</sub>-Rezeptoren vermittelt [220].

Beim Prostatakarzinom findet sich eine erhöhte ET-1 und ET<sub>A</sub>R- und erniedrigte ET<sub>B</sub>R – mRNA-Expression [294, 295]. Eine erhöhte ET-1 –Protein-Expression geht beim Prostatakarzinom mit einem rascheren Fortschreiten des Tumorwachstums einher [154].

Darüberhinaus sind erhöhte ET-1-Werte mit stärkeren Schmerzen der Patienten verbunden (siehe auch **Kap. 1.4.5**): Die selektiven ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten YM598 und Atrasentan konnten in Mausmodellen eine signifikante Schmerzreduktion herbeiführen [475].

ET-1 verhindert die Apoptose maligner Prostatazellen, da die Bindung an den überexprimierten ET<sub>A</sub>R zur Verhinderung von Apoptosen beiträgt und der „Gegenspieler“, ET<sub>B</sub>R, unterrepräsentiert ist [296].

*Zum Einsatz von ET<sub>A</sub>R-Antagonisten beim Prostatakarzinom siehe **Kap. 1.4.10.3.2** und **Kap. 1.4.10.4**.*

### 1.4.8.3 ... beim Blasenkarzinom

In der gesunden Blase finden sich ET-1 und seine Rezeptoren in Epithel, glatten Muskelzellen und Fibroblasten. ET-1 ist an der Regulation des Muskeltonus der Blase beteiligt [355, 420].

Beim Blasenkarzinom findet sich eine Überexpression der Endothelinachse, wobei hier offenbar ET<sub>B</sub>R dominiert. Es finden sich keine Assoziationen zum TNM – Status oder histologischen Grading [453, 454].

### 1.4.8.4 ... beim malignen Melanom

Beim malignen Melanom (*MM*) findet sich ebenfalls eine gesteigerte ET-1-Expression [468]. Ähnlich wie beim Blasenkarzinom, wird auch beim Melanom v.a. ET<sub>B</sub>R überexprimiert [111, 240]. Ein ET<sub>B</sub>R – Antagonist verhindert das Wachstum maligner Melanome *in vitro* und *in vivo*; ein ET<sub>A</sub>R – Antagonist hat diese Wirkung nicht [239]. Es gibt Hinweise darauf, dass beim *MM* die Funktionen von ET<sub>A</sub>R und ET<sub>B</sub>R in weiten Teilen vertauscht sind [102].

#### **1.4.8.5 ... beim Nierenzellkarzinom**

Präproendothelin wird in einer Nierenkarzinom-Zelllinie (ccRCC) verstärkt exprimiert, wohingegen es in der PRCC – Zelllinie signifikant herunterreguliert ist [121]. Eine Expression von ET-1 und ET<sub>A</sub>R findet sich in sechs untersuchten Nierenzellkarzinomzelllinien - ET<sub>B</sub>R in dreien - und die Gabe von ET-1 vermindert die Apoptose maligner Zellen [318].

#### **1.4.8.6 ... beim Bronchialkarzinom**

In einer Vielzahl untersuchter Bronchialkarzinomzelllinien ist die ET<sub>A</sub>R-Proteinexpression herunterreguliert [6].

Es finden sich keine Hinweise auf eine autokrine Wirkweise wie z.B. beim Ovarialkarzinom. Allerdings wird in einem Mausmodell mittels des ET<sub>A</sub>R – Antagonisten Atrasentan (siehe **Kapitel 1.4.10.3**) eine erhebliche Verringerung von Lungenmetastasen erreicht [411].

#### **1.4.8.7 ... beim Kolonkarzinom**

Verschiedene Kolonkarzinom-Zelllinien sezernieren ET-1 [313]. Im Vergleich zu gesundem Kolongewebe zeigen Adenome und Adenokarzinome eine gesteigerte Expression von Bestandteilen der Endothelinachse. ET<sub>A</sub>R ist v.a. in stromalen Myofibroblasten neoplastischen Gewebes zu finden, wohingegen ET<sub>B</sub>R in Endothelzellen vermehrt exprimiert wird [128]. ET-1 verhindert als autokriner „Überlebensfaktor“ *in vitro* teilweise die durch Bosentan (unselektiver ET<sub>A</sub>R/ET<sub>B</sub>R – Antagonist) geförderte Apoptose von Kolonkarzinomzellen [125, 126].

#### **1.4.8.8 ... beim Cervixkarzinom**

In HPV\* - positiven Cervixkarzinomzellen wirkt ET-1 *via* ET<sub>A</sub>R mitogen. Bei Nacktmäusen kann eine komplette Wachstumsblockade von humanen Cervixkarzinomen mittels ET<sub>A</sub>R – Blockade durch Atrasentan (siehe auch **Kapitel 1.4.10.3**) erreicht werden; in Kombination mit Paclitaxel werden additive Effekte erzielt [18].

---

\* HPV = Humanes Papilloma Virus

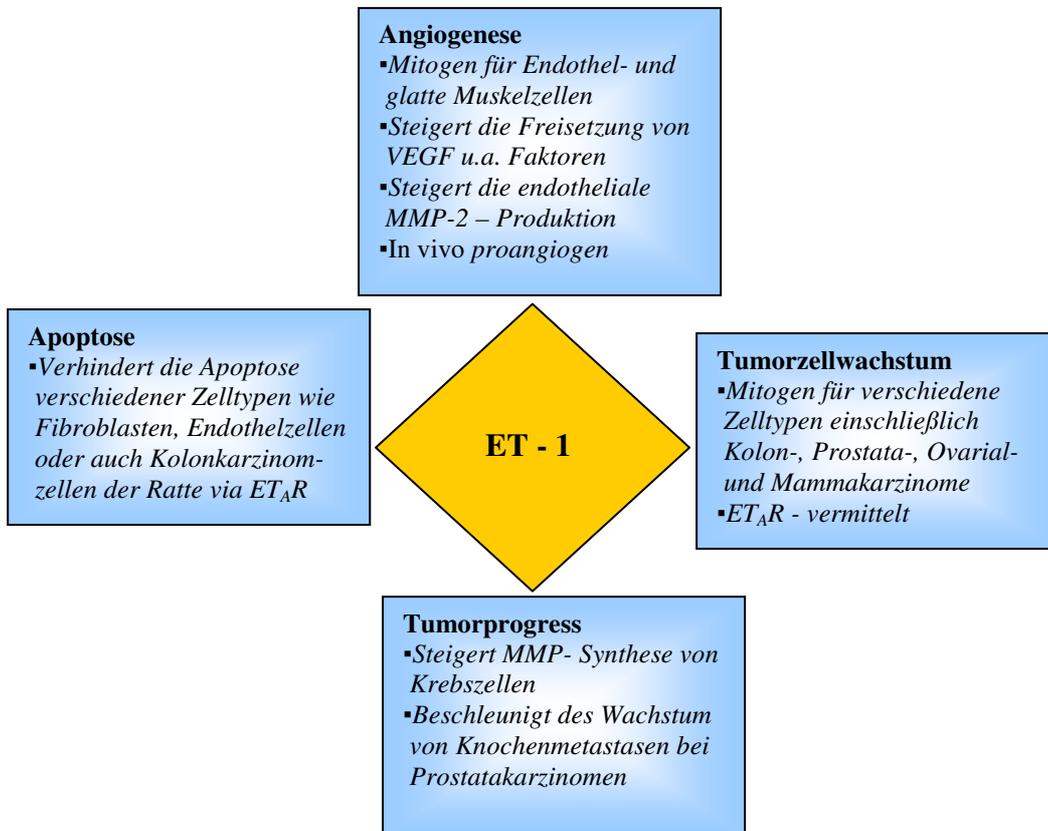
#### **1.4.8.9 ... beim Kaposi – Sarkom**

Kultivierte Kaposi – Sarkom - Zellen sezernieren ET-1 [96], exprimieren ETAR- und ETBR-mRNA und können in ihrem Wachstum durch ET<sub>A</sub>R (BQ123)- und ET<sub>B</sub>R – Antagonisten (BQ 788) gebremst werden [19].

### 1.4.9 Zusammenfassung: Rolle der Endotheline bei Malignomen

Es konnte gezeigt werden, dass die Endothelinachse auf verschiedenen Ebenen die Entstehung und Progression von Malignomen fördert: Sei es durch direkte oder indirekte Angiogenesestimulation (**Kapitel 1.4.6**), Verhinderung der Apoptose, wie z.B. anhand von Kolonkarzinomzellen der Ratte oder auch humanen Prostatakarzinomzellen gezeigt (**Kapitel 1.4.8.7** und **1.4.8.2**) oder durch Erleichterung des Metastasierungspotentials maligner Zellen *via* Invasionsförderung, wie z.B. bei Mamma- und Ovarialkarzinomen (**Kapitel 1.4.7** und **1.4.8.1**).

Der „Schlüsselrezeptor“ scheint meist ET<sub>A</sub>R zu sein, während ET<sub>B</sub>R eher als „guter“ Rezeptor die Clearance von ET-1 bewirkt und Apoptose von Tumorzellen vermittelt. Eine Ausnahme stellt das maligne Melanom dar, bei dem vermutlich dem ET<sub>B</sub>R eine größere Rolle zukommt, bzw. die Funktionsweisen von ET<sub>A</sub>R und ET<sub>B</sub>R miteinander vertauscht sind (**Kapitel 1.4.8.4**). Eine Übersicht über die Rolle des Endothelins in der Kanzerogenese zeigt **Abbildung 15**:

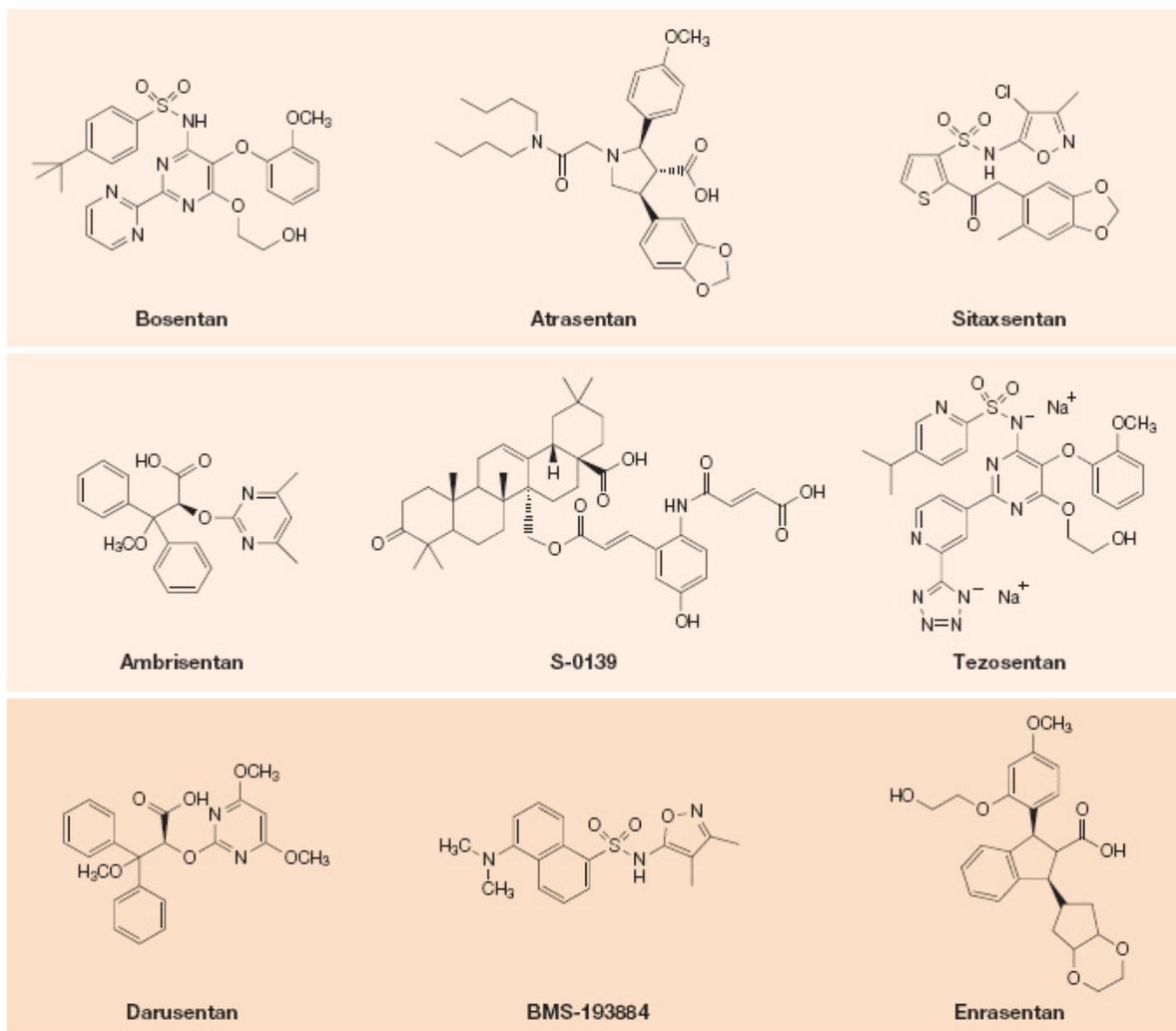


**Abbildung 15:** Übersicht zur Beteiligung des Endothelins bei Entstehung und Unterhalt maligner Neoplasien.

Adaptiert aus: Grant et al. [158]

### 1.4.10 Endothelinrezeptorantagonisten

Aufgrund der offensichtlich großen Bedeutung der Endothelinachse hinsichtlich der Beteiligung an Entstehung und Erhalt verschiedener Krankheiten, wie z.B. Bluthochdruck, Herzinsuffizienz, Lungenerkrankungen oder auch Nephropathien (siehe **Kapitel 1.4.5**), wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Medikamente entwickelt, die durch gezielte Antagonisierung der Endothelinrezeptoren Einfluss auf Krankheitsentstehung und -verlauf nehmen sollen. Auch im Bereich der Malignome wurden Präparate entwickelt, die noch in der klinischen Erprobung sind. **Abbildung 16** zeigt eine Übersicht der Strukturformeln einer Reihe von Substanzen, von denen bis dato nur der unselektive ET<sub>A</sub>-/ET<sub>B</sub>R-Antagonist Bosentan, als einziger ET-Rezeptorantagonist, durch die FDA\* zugelassen wurde [333, 423].



**Abbildung 16:** Strukturformeln von Endothelinrezeptorantagonisten (Auswahl).  
Einzelheiten: Siehe Text.

Aus: Remuzzi et al. [333]

\* FDA = United States' Food and Drug Administration

Die Endothelinrezeptorantagonisten lassen sich zum einen in die *peptidischen* Substanzen wie BQ123 oder FR139317 und die *nichtpeptidischen* wie Atrasentan (**Kap. 1.4.10.3**) Bosentan (**Kap. 1.4.10.2**) oder ZD4054 (**Kap.1.4.10.4**) unterteilen.

Im Gegensatz zu peptidischen Substanzen sind Nicht-Peptide in der Lage, oral wirkungsvoll aufgenommen zu werden [105].

Eine weitere Unterteilung unterscheidet *unselektive* ET<sub>A</sub>R/ET<sub>B</sub>R Antagonisten von solchen, die selektiv oder spezifisch entweder ET<sub>A</sub>R oder ET<sub>B</sub>R hemmen (s.u.).

#### **1.4.10.1 Unselektive ET<sub>A/B</sub>R – Antagonisten**

Sie hemmen die beiden Rezeptoren etwa gleich stark.

An erster Stelle ist hier Bosentan (Tracleer®) zu nennen, da es bis jetzt das einzige Mitglied der „-sentan“ – Klasse mit Marktzulassung ist (s.o.). Es wurde im Jahr 2001 von der FDA als erstes Arzneimittel überhaupt zur gezielten oralen Behandlung der pulmonalen Hypertonie zugelassen [134]. Bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie von Grad III oder IV (WHO) bewirkt Bosentan eine signifikante Besserung hinsichtlich Dyspnoe und Ausdauer.

Möglicherweise hat es auch positive Auswirkungen auf Herzinsuffizienz, Hypertonie, ischämische Herzerkrankungen und Nierenerkrankungen [79]. Im Hinblick auf die Behandlung der pulmonalen Hypertonie ist vor allem die Möglichkeit der oralen Applikation des Bosentans gegenüber der herkömmlichen Therapie mit i.v. Prostacyklinen von Vorteil [88].

Bosentan wird auch in anderen Bereichen experimentell eingesetzt. So führt der Einsatz *in vitro* zu einer erhöhten Apoptoserate bei menschlichen Kolonkarzinomzellen [125].

Die weiterhin aufgeführten unselektiven Antagonisten Tezosentan und TAK-044 haben im Tiermodell u.a. blutdrucksenkende (Tezosentan) [87] und Ischämieschäden – begrenzende Wirkungen (TAK-044) [231] gezeigt.

### 1.4.10.2 Selektive ET<sub>A</sub>R – Antagonisten

Hierzu gehören aus obiger Liste BQ123, FR139317, Darusentan, Enrasentan, BMS193884, Sitaxsentan, Ambrisentan, S-0139 und Atrasentan. Atrasentan wird in **Kapitel 1.4.10.3** ausführlich behandelt. Nicht in **Abbildung 16** aufgeführt ist ZD4054. Dieses Präparat wird aufgrund seiner Eigenschaften und aufgrund der vielversprechenden Studienlage ausführlich in **Kapitel 1.4.10.4** angesprochen.

*BQ123* vermindert im Rattenmodell den Grad der pulmonalen Hypertonie [50] und erhöht bei Ratten die postischämische kardiale Kontraktilität [404]. Außerdem potenziert BQ123 die analgetische Wirkung von Morphinen im Tiermodell – der genaue analgetische Mechanismus ist nicht bekannt, allerdings kommt es nicht zu einer Bindung an Opioidrezeptoren [42]. Auch Tumorschmerz können im Tiermodell unter BQ123 – Gabe vermindert werden [369].

*FR139317* verhindert in Tiermodellen eine durch injiziertes ET-1 ausgelöste Aktivierung bestimmter cerebraler Areale, woraus die Autoren eine mögliche Einsatzmöglichkeit bei verschiedenen Neuropathologien wie Epilepsien oder Ischämien ableiten [162].

Darüberhinaus wirkt es im Rattenmodell blutdrucksenkend und verringert die Ausprägung kardialer Hypertrophie [144]. Klinische Studien stehen noch aus.

*Darusentan* hat beim Menschen eine blutdrucksenkende Wirkung - um diastolisch bis zu 11 mmHg und systolisch bis zu 16 mmHg [290]. Bei Herzinsuffizienzpatienten kommt es unter Darusentangebe zu einer prognostisch günstigen Absenkung des BNP – Spiegels\* [319]. Bei salzhypertensiven Ratten zeigt sich ein nephroprotektiver Effekt [352]. In der 2004 erschienenen *EARTH*<sup>†</sup> –Studie werden keine therapeutischen Vorteile des Darusentans hinsichtlich der Therapie einer chronischen Herzinsuffizienz verglichen mit einem Plazebo erreicht [11]. In einer randomisierten, plazebokontrollierten Phase II-Studie an 115 Patienten mit therapieresistentem arteriellem Hypertonus bewirkt Darusentan eine signifikante Blutdrucksenkung, Phase III-Studien für dieses Anwendungsgebiet stehen allerdings noch aus [46].

Bei Ratten mit Hyperinsulinämie, Hypertriglyceridämie und Bluthochdruck zeigt *Enrasentan* kardio- und nephroprotektive Effekte und senkt den Blutdruck [98].

Es gehört der Klassifikation nach zwar zu den ET<sub>A</sub>R-Antagonisten, hat aber eine relativ hohe Affinität zum ET<sub>B</sub>R, so dass man nicht von *selektivem* ET<sub>A</sub>R-Antagonisten sprechen kann [97]. Im Rahmen einer randomisierten, doppelblinden Studie mit 72 Patienten mit asymptomatischer linksventrikulärer Herzinsuffizienz konnten die im Tiermodell erbrachten

---

\* BNP = Brain Natriuretic Peptide

† EARTH = EndothelinA Receptor Antagonist Trial in Heart Failure

Ergebnisse nicht übertragen werden. Vielmehr verstärkt sich die Herzinsuffizienz unter Enrasentan [324].

*BMS193884* war zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit vorgesehen, wird aber nach einer Phase II – Studie aufgrund zu starker Transaminasenerhöhungen nicht mehr klinisch erprobt [192, 333].

*S-0139* inhibiert u.a. in einem Rattenmodell die durch ET-1 ausgelöste Hypertonie, reduziert die kardiale Hypertrophie in einem Modell viraler Myokarditis und verhindert den Progress pulmonaler Hypertonie [333].

*Sitaxsentan* hat gute Chancen, nach Bosentan ebenfalls die Marktzulassung zur Behandlung der pulmonalen arteriellen Hypertonie zu erhalten [186], wobei es offenbar vor allem ein geringeres Nebenwirkungspotential als Bosentan (s.o.) aufweist [26] und somit eine Alternative zu Bosentan darstellen könnte [35]. In multizentrischen, randomisierten, plazebokontrollierten Studien verbesserte Sitaxsentan die physische Belastbarkeit der Patienten sowie weitere funktionelle und hämodynamische Parameter [85, 190, 246].

Auch *Ambrisentan* werden Zulassungschancen im Bereich der Behandlung der pulmonalen Hypertonie eingeräumt [186]. In Phase II- und III-Studien ergeben sich erhöhte physikalische Belastbarkeit und eine Verbesserung von Lebensqualität sowie weiterer klinischer Parameter unter Ambrisentan. Außerdem ist das Nebenwirkungsprofil günstiger als das von Bosentan oder Sitaxsentan [25, 186]. Weitere Phase II- und –III-Studien werden z.Zt. noch durchgeführt [424].

### 1.4.10.3 Atrasentan

Atrasentan (Xinlay®- Abbott Laboratories, IL, U.S.), auch unter dem Namen des Enantiomers ABT-627 oder als sein Racemat A-127722 zu finden, ist ein selektiver, hochpotenter ET<sub>A</sub>R – Antagonist ( $K_i^* \text{ET}_A = 0.034 \text{ nM}$ ;  $K_i \text{ET}_B = 63.3 \text{ nM}$ ) – er bindet etwa 1800-fach stärker an den ET<sub>A</sub>-Rezeptor als an den ET<sub>B</sub>-Rezeptor [305].

Das Molekulargewicht beträgt  $546 \text{ g mol}^{-1}$  (zur chemischen Struktur s. **Abbildung 16**) [431]. Das apparente Verteilungsvolumen ist dosisabhängig: Bei einer Dosis von 1mg ergibt sich in einer Phase-1- Studie bei gesunden Probanden ein  $V_{\text{app}}$  von 970 l/kg, wohingegen nach Gabe von 139,5mg eine  $V_{\text{app}}$  von 350 l/kg erreicht wird. Das Absinken wird, zumindest teilweise, mit einer Sättigung der ET<sub>A</sub>- Rezeptoren im Gewebe erklärt.

---

\*  $k_i$  = Hemmkonstante. Sie gibt die Fähigkeit einer Substanz an, kompetitiv an einen Rezeptor zu binden. Je niedriger  $k_i$ , desto geringer ist die benötigte Stoffmenge zur Rezeptorenbindung und desto höher die Affinität zu diesem Rezeptor.

Nach oraler Gabe hat Atrasentan eine Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 20-25$  h [363].

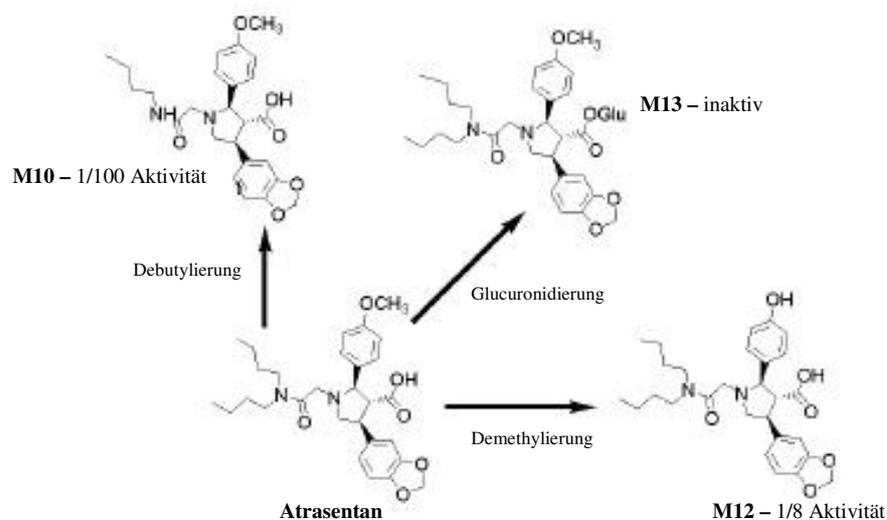
In präklinischen Studien ergibt sich nach Verabreichung von Atrasentan ein dosisabhängiger Anstieg von ET-1, der bei einer Dosierung von 1mg Atrasentan/d erst nach einigen Tagen, bei einer Dosierung von 20mg/d bereits nach ca. 4h einsetzt [66, 431]. Als Ursache halten die Autoren einen durch die  $ET_A$ R-Blockade ausgelösten negativen Feedback-Mechanismus für möglich. Angesichts der geringen Affinität des Atrasentans zu  $ET_B$ R schätzen sie die Möglichkeit eines durch  $ET_B$ R-Antagonisierung ausgelösten ET-1-Anstiegs infolge verringerter ET-1-Clearance hingegen für unwahrscheinlich ein.

#### 1.4.10.3.1 Metabolismus

Atrasentan wird rasch absorbiert:  $1\frac{1}{2}$ h nach oraler Gabe wird der maximale Wirkspiegel erreicht; der ständige Wirkspiegel pendelt sich nach 7 Tagen Atrasentan - Einnahme ein [66]. Atrasentan wird zu mehr als 90% hepatisch und nur zu etwa 4% renal eliminiert. Ungefähr  $\frac{2}{3}$  werden unverändert, demethyliert oder glucuronidiert über den Fäzes ausgeschieden (s.a.

**Abbildung 17**). Weniger als 4% werden in einer debutylierten Form ausgeschieden.

Darüberhinaus gibt es vier nicht identifizierte Metaboliten [1].



**Abbildung 17:** Metabolismus des Atrasentans und Restaktivität der Metaboliten.

Adaptiert aus: [1]

### 1.4.10.3.2 Anwendungsgebiete

Auch die therapeutische Entwicklung von Atrasentan entstammt dem Indikationsspektrum kardiopulmonaler Erkrankungen. In einer Studie zur kongestiven Herzinsuffizienz führt die orale Einnahme von Atrasentan zu einer Senkung des pulmonalen arteriellen Druckes und des pulmonalen Gefäßwiderstandes.

Gleichzeitig erhöht sich die kardiale Auswurfsleistung [51]. In einem Rattenmodell zum Typ-I-Diabetes zeigen sich unter Atrasentangabe kardioprotektive Effekte [450].

Eine Recherche bei der Cochrane – Review - Datenbank zur Wirkung des Atrasentans ergab v.a. therapeutische Effekte im Bereich der pulmonalen Hypertonie mit einer signifikanten Besserung klinischer Parameter wie Dyspnoe sowie des kardiopulmonalen Status [260].

Auch bei bestimmten Formen des Asthmas könnte Atrasentan Anwendung finden [156].

In den vergangenen Jahren werden zunehmend auch die Effekte von Atrasentan bei onkologischen Erkrankungen präklinisch und z.T. auch in ersten klinischen Studien untersucht.

Gut untersucht wurde die Auswirkung der Atrasentangabe auf Tumorzellen, v.a. auf Prostatakarzinome:

Nachdem in vorklinischen Untersuchungen die große Bedeutung der Endothelinachse bei Prostatakarzinomen deutlich wurde (s. a. **Kapitel 1.4.8.2**) [295], wird Atrasentan v.a. in Bezug auf seine klinischen Einsatzmöglichkeiten beim hormonrefraktären Prostatakarzinom hin untersucht [333]. Hier verspricht man sich v.a. eine Verringerung der Häufigkeit und Ausprägung von Knochenmetastasen, die in *in vitro*- und *in vivo* - Studien durch Gabe von Atrasentan verhindert oder abgeschwächt werden können [166, 466].

In Phase I Studien werden Verträglichkeit und Pharmakokinetik untersucht mit Dosierungen zwischen 10mg und 140mg/d [66], 1mg und 139.5mg/d [363], 0.2-40 mg/d [431] und 2.5-95 mg/d [480]. Dabei zeigt sich, dass Atrasentan pharmakokinetisch bei einer  $t_{1/2}$  von 20-25 h für eine einzelne Dosis pro Tag geeignet ist. Insgesamt wird es als gut verträglich eingestuft [431]. Besonders vorteilhaft erscheint bei der Therapie mit Atrasentan, dass die beobachteten Nebenwirkungen verglichen mit denen bekannter Chemotherapeutika verhältnismäßig mild sind. Typische Nebenwirkungen des ET<sub>A</sub>R-Antagonisten sind Rhinitiden, Nasenkongestion, Cephalgie, periphere Ödeme, Nausea und Dyspnoe; diese Symptome sind überwiegend durch die vasodilatatorischen Eigenschaften des Atrasentans erklärbar [363]. Schwerwiegendere Nebenwirkungen, die häufiger bei Atrasentan als in der

Placebogruppe beobachtet wurden, sind Anämien, Herzinsuffizienz, Herzinfarkt und Pneumonien bei ca. 1-4% der Probanden [1].

In einer anderen Studie sind auch nach Gabe von höheren Dosen (95mg) keine Nebenwirkungen aufgetreten, die einen Abbruch der Therapie nötig gemacht hätten [480].

Eine randomisierte Phase II- Studie zur Wirkung von Atrasentan alleine oder in Kombination mit dem Bisphosphonat Zolendronsäure bei knochenmetastasiertem Prostatakarzinom erbrachte für die Kombination keine Vorteile im Vergleich zur Zolendronsäure – Therapie allein. Allerdings räumen die Autoren die positiven Effekte in Tierversuchen ein und halten eine mögliche Einsatzmöglichkeit des Atrasentans in Kombination mit anderen Osteoblastenhemmstoffen potenziell für vielversprechend [279].

In einer randomisierten, doppelblinden, plazebokontrollierten Phase II – Studie mit 288 Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom zeigte sich bei einer Gabe von 10mg Atrasentan/d eine Verlängerung der Progressionszeit der Erkrankung im Vergleich zur Plazebo – Gruppe. Auch eine Verzögerung des PSA-Progresses ist zu beobachten. Allerdings zeigen beide Beobachtungen zwar einen starken Trend, sind statistisch betrachtet jedoch nicht signifikant [67]. Ferner wird unter Atrasentan von einer Verringerung metastaseninduzierten Schmerzes berichtet [66].

Eine randomisierte, doppelblinde, plazebokontrollierte Phase III - Studie mit 809 Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom ergab keine signifikante Verzögerung der Zeit bis zum Fortschreiten der Erkrankung. Allerdings kann der weitere Anstieg der alkalischen Phosphatase i.S. signifikant verzögert werden, der Anstieg des PSA\* jedoch nicht [1, 68]. Insgesamt gesehen gelang es nicht, signifikante Besserungen hinsichtlich des Krankheitsprogresses beim metastasierten, hormonrefraktären Prostatakarzinom unter Atrasentangebe vs.. Plazebogabe zu zeigen [288].

Da dieses primäre Ziel nicht und nur 1 von 5 sekundären Zielen mit fraglicher klinischer Relevanz in der Phase III-Studie erreicht wird, und weil die FDA die Phase II-Studie als „nicht gut durchgeführt“ einstuft [135], wurde im Herbst 2005 der Antrag auf Marktzulassung von Xinlay® zur Behandlung o.g. Karzinome durch die FDA abgelehnt [2].

Eine Phase III – Studie zum Vergleich der Therapie mit herkömmlichem Behandlungsregime mit oder ohne Atrasentan bezüglich Überlebensraten und Wachstumsverzögerung bei Patienten mit viertgradigem, hormonrefraktärem Prostatakarzinom mit Knochenmetastasen steht allerdings noch aus – Ergebnisse werden für 2010 erwartet [326].

---

\* PSA = Prostataspezifisches Antigen

Beim *Ovarialkarzinom* ist ebenfalls eine Überexpression der Endothelinachse bekannt (s.a. **Kapitel 1.4.8.1**). *Salani et al.* zeigten, dass ET-1 bei diesen Tumoren als autokriner Wachstumsfaktor auf den ET<sub>A</sub>-Rezeptor wirkt. *In vitro* können die mitogenen Eigenschaften von ET-1 auf das Wachstum ovarieller Krebszellen unter dem Einfluss von Atrasentan unterbunden werden [361]. *In vivo* zeigten *Rosano et al.* [347] im Ovarialkarzinom-Xenograftmodell ETAR-positiver Ovarialkarzinom-Zellen (PMOV1 und PMOV2) eine Tumolvolumenreduktion von fast  $\frac{2}{3}$  unter Atrasentantherapie im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Durch Kombination mit Paclitaxel kann dieser antitumorale Effekt noch zusätzlich gesteigert werden. Außerdem findet sich in der mit Atrasentan behandelten Gruppe eine Verringerung der intratumoralen VEGF – Konzentration um 45%, die unter zusätzlicher Paclitaxelgabe sogar 60% beträgt.

Die gleiche Arbeitsgruppe um *Anna Bagnato* konnte in einem *in vivo* –Xenograftmodell zeigen, dass Atrasentan in der Lage ist, das Tumorwachstum einer ET<sub>A</sub>R-positiven Cervixkarzinomzelllinie (CaSki) zu hemmen. Die gleiche Therapie zeigt bei einer anderen Zelllinie (C33A), von der bekannt ist, dass sie keinen ET<sub>A</sub>Rezeptor exprimiert, keinerlei Wirkung. Bei den erfolgreich behandelten Mäusen lässt sich eine signifikant verminderte intratumorale MVD im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen.

In einem weiteren Schritt wurden die Kombinationen von Paclitaxel mono, Paclitaxel / ET-1, Paclitaxel / ET-1 / Atrasentan und schließlich Paclitaxel / Atrasentan erprobt und mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

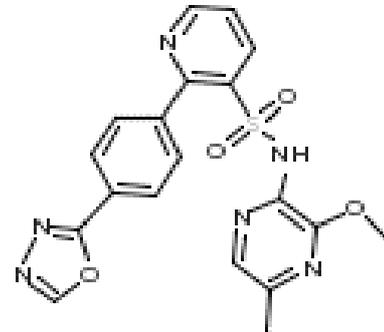
Unter Paclitaxel-Therapie nimmt die Tumorgöße nur auf etwa die Hälfte der Größe der unbehandelten Gruppe zu, wohingegen bei zusätzlicher ET-1-Verabreichung der Therapieerfolg z.T. wieder aufgehoben wird: Die Tumoren erreichen etwa 65-70 % der Größe der Kontrollgruppe. Bei darüberhinaus zusätzlicher Therapie mit Atrasentan wird der schädliche ET-1 – Einfluss aufgehoben und sogar ein noch geringeres Tumorwachstum erzielt als bei Paclitaxel – Therapie alleine. Am besten sind die Ergebnisse bei einer Behandlung mit der Kombination aus Paclitaxel und Atrasentan, worunter nur ca. 40% der Größe der Kontrollgruppe erreicht werden [18].

#### 1.4.10.4 ZD4054

ZD4054 ist kein *selektiver*, sondern ein *spezifischer* ET<sub>A</sub>R-Antagonist mit einem Molekulargewicht von 424,4 g mol<sup>-1</sup> (zur chemischen Struktur, siehe **Abbildung 18**) [16].

Er wird als *spezifisch* bezeichnet, weil er hochpotent an ET<sub>A</sub>R bindet (K<sub>i</sub>=13nm) und gleichzeitig keine messbare Affinität zu ET<sub>B</sub>R aufweist [284].

Die t<sub>1/2</sub> im Plasma liegt in präklinischen Studien zwischen 9,10 and 9,65 h bei einer Dosierung von 10mg bzw. 30mg [284]. Bis zu einer Dosierung von 120mg/d wird ZD4054 gut vertragen und ist als Nichtpeptid oral verfügbar.



**Abbildung 18:** Strukturformel von ZD4054.

Aus: [16]

Weitere Dosiserhöhungen gehen vermehrt mit Cephalgie, Nausea und Erbrechen einher. Die Elimination erfolgt zu ca. 80% *via* unveränderter Elimination *renal*. *Hepatisch* werden 5-19% größtenteils unverändert über den Faeces ausgeschieden [82].

Nach Verabreichung von ZD4054 zeigen sich keine erhöhten Level von ET-1 bzw. seines Vorläufers Big-Endothelin-1 [284], wie es bei Antagonisierung von ET<sub>B</sub>R zu beobachten ist [399] und auch bei „hochselektiven“ ET<sub>A</sub>R-Antagonisten mit geringer ET<sub>B</sub>R-Aktivität, wie etwa Atrasentan, vorkommt (siehe **Kap. 1.4.10.3**).

In einem Rattenmodell inhibiert ZD4054 die durch Zugabe von ET-1 ausgelösten anti-apoptotischen Effekte: Die Apoptoserate nimmt zu. Auch nach Verabreichung eines selektiven ET<sub>B</sub>R-Agonisten (BQ3020) nimmt die Apoptoserate zu.

Diese ET<sub>B</sub>R-gesteuerte Zunahme ist nicht durch ZD4054 reversibel [102]. ZD4054 fördert somit also pro-apoptotische Signale (ET<sub>B</sub>R-gesteuert) und verhindert anti-apoptotische (ET<sub>A</sub>R-gesteuert).

Die Arbeitsgruppe um *Rosano* berichtet sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* –

Untersuchungen von erheblichem positiven Einfluss auf Invasionsrate und

Wachstumsverhalten von Ovarialkarzinomen [343-345], wobei sich als besonders erfolgreich auch die Kombinationstherapie mit Hemmern epidermaler Wachstumsfaktoren oder auch mit Paclitaxel herausstellte.

In einem *in vitro*-Modell zum metastasierenden Prostatakarzinom hemmt ZD4054 kompetitiv die Proliferation osteoblastischer MC3T3.E1/J1-Zellen und unreifer HCB-171-Osteoblasten-Vorläuferzellen, die durch ET-1 zuvor zum Wachstum angeregt wurden. Ein ET<sub>B</sub>R-

Antagonist (BQ788) hat diesen Effekt nicht [101]. In einem *in vivo*-Modell mit SCID\* - Mäusen zum Blasenkarzinom (*TSU-Pr1*) verzögert ZD4054 die Entstehung von Knochenmetastasen und verhindert sie sogar bei Kombination mit dem bewährten Bisphosphonat Pamidronsäure [446]. Ein weiteres *in vivo*-Modell mit der Blasenkarzinom-Zelllinie TSU-Pr1 an SCID-Mäusen beschreibt, dass durch Kombination von ZD4054 und Bisphosphonaten auch Weichgewebismetastasen, respektive Lungen- und Gehirnetastasen, verhindert werden. Nierenmetastasen werden in diesem Modell allerdings nicht verhindert [445].

In einem *in vitro*-Modell mit verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien zeigt ZD4054 kumulative Effekte mit Taxanen [317].

In einer doppelblinden Phase-II-Studie mit 312 Patienten mit hormonrefraktärem, knochenmetastasiertem Prostatakarzinom erreicht ZD4054 ein im Vergleich zum Placebo signifikant besseres Gesamtüberleben ( $p=0,008$ ), wohingegen hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens keine signifikanten Unterschiede bestehen [203]

#### **1.4.10.5 Selektive ET<sub>B</sub>R – Antagonisten**

In oben dargestellter Liste findet sich kein selektiver ET<sub>B</sub>R – Antagonist, was in erster Linie auf den fehlenden klinischen Nutzen eines solchen zurückzuführen ist [105].

Stattdessen wird z.B. der ET<sub>B</sub>R – Antagonist BQ-788 im Rahmen experimenteller Studien gerne eingesetzt, um z.B. die Wirksamkeit eines ET<sub>A</sub>R – Antagonisten zu überprüfen [301].

Für eine klinische Anwendung eines selektiven ET<sub>B</sub>R – Antagonisten ergeben sich sowohl auf kardiovaskulärem als auch auf onkologischem Gebiet Nachteile:

Die selektive ET<sub>B</sub>R-Blockade mit BQ-788 erhöht in einer Studie den Blutdruck und den peripheren Gefäßwiderstand gesunder Probanden, gleichzeitig wird die Herzleistung herabgesetzt [399].

In einigen Malignomen wird ET<sub>B</sub>R entweder nicht überexprimiert (z.B. beim Prostatakarzinom) [292], oder eine Antagonisierung des ET<sub>B</sub>R ergibt keine Wachstumshemmung des Tumors (so zu finden beim Ovarialkarzinom) [20].

Eine vielversprechende Studie zur Auswirkung einer ET<sub>B</sub>R-Blockade durch BQ-788 auf das Wachstumsverhalten maligner Melanome zeigt, dass zwar (erstaunlicherweise) die Apoptoserate der Melanomzellen unter BQ-788-Einfluss steigt; gleichzeitig nimmt aber die

---

\* SCID = Severe Combined Immunodeficiency; Mäusen mit SCID fehlen T- und B-Lymphozyten

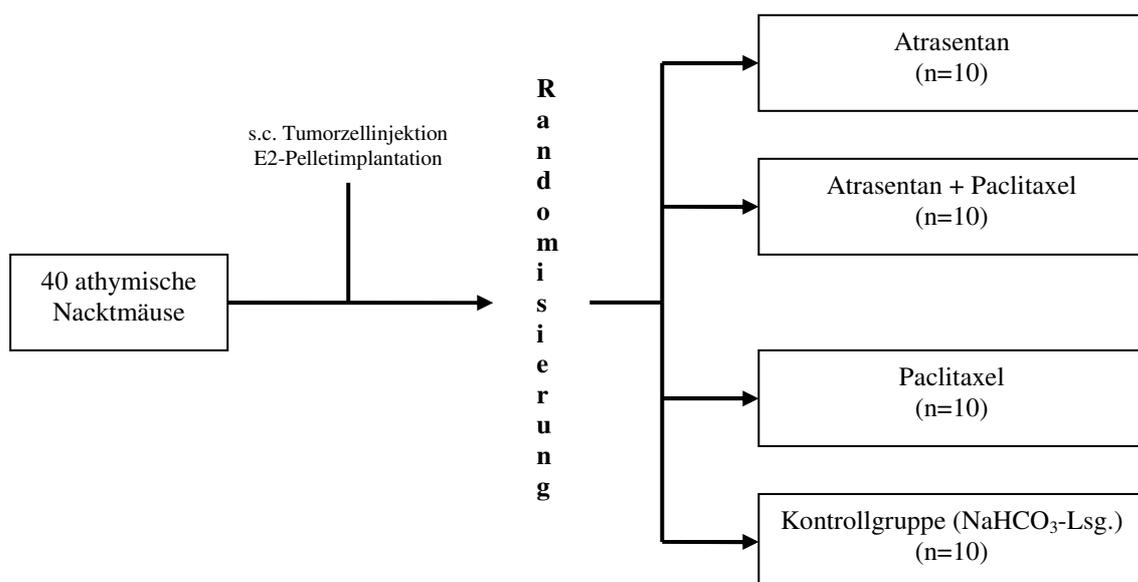
VEGF-Konzentration und damit die Angiogenesetätigkeit zu [240]. Eine mögliche Ursache für die widersprüchlichen Ergebnisse der ET<sub>B</sub>R-Antagonisierung könnte in einer verringerten ET-1-Clearance und einer kompensatorischen *upregulation* von ET<sub>A</sub>R liegen [292].

Darüberhinaus gibt es Hinweise dafür, dass in einigen Tumorentitäten, so auch im malignen Melanom, die Funktionen der beiden Endothelin-Rezeptoren in weiten Teilen „vertauscht“ sind [102].

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Aufbau der Studie

Es wurden zwei Versuchsreihen an weiblichen, athymischen Nacktmäusen (CD-1 NU/NU; Charles River, Sulzfeld, Deutschland, s.u.) durchgeführt: In der ersten Reihe wurden bei insgesamt 40 Mäusen in Matrigel eingebettete menschliche MCF-7 – Mammakarzinomzellen ( $3 \times 10^7$  MCF-7-Zellen in 100  $\mu$ l Matrigel, s.a. **Kap. 2.1.2**) in die rechte Flanke s.c. injiziert. MCF-7 Zellen exprimieren den ET<sub>A</sub>-Rezeptor, nicht aber den ET<sub>B</sub>R und wachsen hormonabhängig (ER-positiv). Aufgrund der Hormonabhängigkeit dieser Mammakarzinomzellen, wurde ein 17 $\beta$  – Östradiol – Pellet (Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA.) in das präpektorale Fettpolster implantiert. Die Mäuse wurden vor Therapiebeginn randomisiert auf vier Therapiearme verteilt (s. **Abbildung 19**): Zehn Mäuse erhielten eine Monotherapie mit dem selektiven ET<sub>A</sub>R - Antagonisten Atrasentan (s.a. **Kap. 1.4.10.3**) in einer Dosierung von 10mg /kg Körpergewicht, weitere zehn eine Monotherapie mit Paclitaxel (Taxol®; Bristol Myers Squibb, München) in einer Dosierung von 20mg/kg Körpergewicht und zehn Mäuse erhielten eine kombinierte Atrasentan-/Paclitaxeltherapie. Die übrigen zehn Mäuse wurden als Kontrollgruppe mit der Trägerlösung (7 Teile aqua ad iniectabilia und 1 Teil 0,25N Natriumhydrogencarbonat) behandelt.



**Abbildung 19:** Therapiearme der ersten Versuchsreihe. Einzelheiten: Siehe Text.

Nach Abschluss und Auswertung der ersten Reihe wurden in einer zweiten Versuchsreihe 16 Mäusen ebenfalls Tumorzellen, wie oben beschrieben, injiziert. Es folgte nun eine randomisierte Splittung in zwei Behandlungsgruppen: Acht Mäuse erhielten Atrasentan und die anderen acht nur die Trägerlösung.

### 2.1.1 Die Mäuse

Bei den eingesetzten Tieren handelt es sich um weibliche athymische Nacktmäuse (**Abbildung 20**). Sie werden vom Hersteller mit CD-1® NU/NU bezeichnet. Solche Mäuse besitzen keinen Thymus und sind daher T-Zellen – immundefizient. Sie sind homozygot haarlos und vom Albinophänotyp [77]. Der erste Bericht über die erfolgreiche Implantation (und anschl. Anwachsen) menschlicher Tumorzellen bei immundefizienten, athymischen Nacktmäusen stammt aus dem Jahre 1969 von *Rygaard et al.* [354]. Seitdem hat sich das Verfahren zur Nutzung von Xenograft-Modellen in der Tumorforschung mehr und mehr durchgesetzt. Limitiert wird es u.a. dadurch, dass Tumoren in Xenograft-Modellen selten metastasieren und man die Wirksamkeit antiangiogenetischer Präparate immer vor dem Hintergrund betrachten muss, dass die Blutgefäße von der Maus stammen, nicht vom Menschen [214].



**Abbildung 20:** CD-1® NU/NU Nacktmaus.  
Aus: [77]

### 2.1.2 Zellkultur, Matrigel und $\beta$ -Östradiol-Pellets

Die verwendeten humanen Mammakarzinom - MCF-7 –Zellkulturen waren ER – positiv und zeigten in vorhergehenden Versuchen [457] eine ET<sub>A</sub>R – Überexpression, jedoch keine ET<sub>B</sub>R-Expression. Ferner wurde eine ET-1 Expression der Zellen nachgewiesen.

Die MCF-7 Zellen wurden in einem RPMI-1640 Medium (Gibco, Karlsruhe; enthält: 2000mg/l D-Glukose, 110mg/l Natriumpyruvat und nicht –essentielle Aminosäuren, jedoch

kein L-Glutamin [197]) kultiviert, dem 10% fetales Kalbsserum (PAA GmbH, Cölbe), 1% L-Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin zugesetzt wurden.

Nach Inkubation in einer humiden, 5% CO<sub>2</sub> – enthaltenden Atmosphäre bei 37°C wurden die zur Injektion vorgesehenen Zellen mit PBS\* gewaschen und 10 min. lang mit 1000 xg bei 4°C zentrifugiert.

Anschließend wurden 3x10<sup>7</sup> MCF-7 Zellen in 100µl Matrigel (s.u.) und 100µl PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde bei 4°C gekühlt und den Mäusen in die rechte Flanke injiziert.

Bei dem verwendeten Matrigel (BD Biosciences, Heidelberg) handelt es sich um eine gelöste Basalmembran-Präparation, die aus dem Engelbreth-Holm-Swarm – Maussarkom [146, 176, 213] gewonnen wird und zahlreiche Proteine der extrazellulären Matrix enthält, u.a. Laminin, Kollagen IV und Heparansulfat-Proteoglykane. Auch Wachstumsfaktoren wie FGF oder TGF-β sind enthalten. Bei Raumtemperatur polymerisiert das Matrigel zu einer der menschlichen Basalmembran sehr ähnlichen Matrix und ermöglicht ein schnelleres „Anwachsen“ von Tumoren [30]. Außerdem kann u.a. auch die angiogenetische *in vivo* – Aktivität erfasst werden [373]. Ohne Matrigel wachsen MCF-7 – Zellen, unabhängig von der injizierten Menge, im Xenograft-Modell nicht an [299].

Da die Hormonabhängigkeit der ET-positiven MCF-7 Zellen bekannt ist, wurden 17β – Östradiol – Pellets (Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA.) präpektoral implantiert, die über 60 Tage insgesamt 0,72mg Östradiol abgeben und sich bei ähnlichen Versuchen bewährt haben [221].

## 2.2 Behandlung der Mäuse

Nach oben dargestellter Implantation der Tumoren wurden in der ersten Versuchsreihe zehn Mäuse mit Atrasentan (s.a. **Kap. 1.4.10.3**) als Monotherapie behandelt. Es wurde dabei eine Atrasentan-Dosierung von 10mg /kg Körpergewicht pro Tag appliziert. Einer Maus mit einem Gewicht von 30g wurden also 0,3mg Atrasentan, auf zwei Tagesdosen à 0,15mg verteilt, im 12-stündigem Abstand verabreicht. Das mit einer pharmazeutischen Feinwaage abgewogene Atrasentan wurde in Trockenform jeweils in die Tagesdosen eingeteilt und am Abend vor der Injektion mit einem Teil 0,25 N Natriumhydrogencarbonatlösung (B.Braun Melsungen AG) und sieben Teilen Aqua ad iniectabilia (B.Braun Melsungen AG) in Lösung gebracht.

---

\* PBS = Phosphate Buffered Saline

Die Injektionen erfolgten intraperitoneal.

In Arm 2 wurden die Tiere (n=10) mit Paclitaxel (s.a. **Kap. 2.2.1**) in einer Dosierung von 20mg/kg Körpergewicht alle vier Tage behandelt. Dementsprechend erhielt eine 30g schwere Maus jeden vierten Tag 0,6mg Paclitaxel. Vom Hersteller (Bristol Myers Squibb, München) wurde Paclitaxel (Taxol®) in einer Konzentration von 6mg Paclitaxel/ml geliefert. Zur besseren Handhabung des im Vergleich zur Atrasentanlösung recht viskösen Taxols® wurden die zu injizierenden 100µl der gelieferten Lösung mit 200µl 0,9%iger Kochsalzlösung (B.Braun Melsungen AG) verdünnt und somit jeder Maus pro Therapietag diese 300µl verabreicht. Die Injektion erfolgte ebenfalls intraperitoneal.

Die dritte Therapiegruppe wurde mit einer Kombination aus Atrasentan und Paclitaxel behandelt. Diese Mäuse erhielten die Atrasentan in der oben beschriebenen Weise; die Injektionen erfolgten zeitgleich mit denen bei der Atrasentan – mono-Gruppe. Das Paclitaxel wurde analog zum Paclitaxel-Monotherapiearm alle 4 Tage verabreicht.

Um mögliche Wechselwirkungen zwischen den Substanzen zu vermeiden, wurde Paclitaxel um 6 Stunden zeitversetzt zum Atrasentan appliziert.

Die Kontroll-Gruppe wurde nur mit Trägerlösung (7 Teile aqua ad iniectabilia und 1 Teil 0,25N Natriumhydrogencarbonat) behandelt. Analog zu den mit Atrasentan behandelten Tieren erfolgten die Applikationen 2x/d.

Die Behandlung wurde 10 Tage nach Tumor – Inokulation begonnen und dauerte 30 Tage.

In der zweiten Versuchsreihe mit insgesamt 16 Mäusen, von denen acht Tiere mit Atrasentan mono und acht nur mit Trägerlösung behandelt wurden, wurde frühzeitiger mit der Therapie begonnen und zwar bereits am Tag der MCF-7- Zell – Injektion (30 Tage Therapiedauer) .

### **2.2.1 Paclitaxel**

Paclitaxel (Taxol®; Bristol Myers Squibb, München) wurde ursprünglich aus der Rinde der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isoliert; mittlerweile wird es auch partialsynthetisch aus heimischen Eibenarten gewonnen [13]. Paclitaxel lagert sich an die  $\beta$ -Tubulin - Untereinheiten der Mikrotubuli an; auf diese Weise hemmt es die Depolymerisation von Mikrotubuli und führt zur Bildung atypischer Mikrotubuli. Daraus resultiert eine Mitosehemmung [264].

Bei Paclitaxel handelt es sich um ein bewährtes Chemotherapeutikum, das häufig in Kombination mit anderen Chemotherapeutika oder auch als Monotherapie beim Mammakarzinom und auch in der Therapie des Ovarialkarzinoms eingesetzt wird [447].

In früheren Studien mit MCF-7 – Xenograft – Mausmodellen zeigte Paclitaxel in der von uns eingesetzten Dosierung bei MCF-7 Zellen eine besonders hohe antitumorale Aktivität verglichen zur Wirkung auf andere Zelllinien [236].

Paclitaxel wurde in einer Dosierung von 6mg/ml geliefert. Als Lösungsmittel diente Cremophor® (BASF, Ludwigshafen; vertrieben über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), ein Rizinusöl- und Ethylenoxidderivat.

## 2.3 Auswertung

### 2.3.1 Übersicht

Während der Therapie wurde an jedem 3. Tag die Größe der Tumoren mit Hilfe eines Messschiebers (**Abbildung 21**) in den Dimensionen Länge x Breite ermittelt.

Anschließend wurden die Tumorumfänge unter Verwendung der Formel

$$Volumen = \frac{(Länge \times Breite)^2}{2}$$

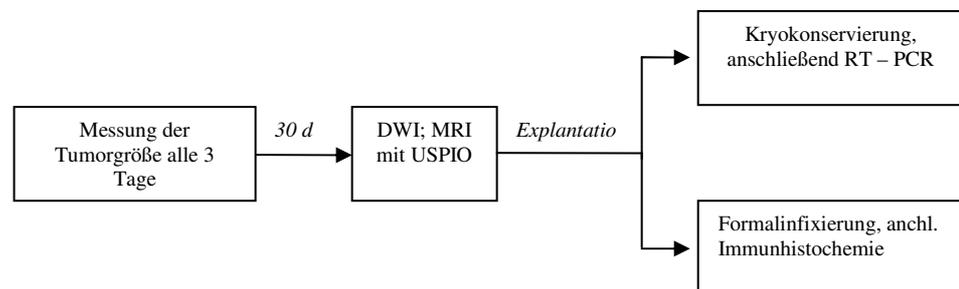
errechnet.

errechnet.

Darüberhinaus wurden die

Mäuse an jedem Messtag gewogen.

Nach 30 Behandlungstagen wurden die Tumoren ein letztes Mal vermessen. Im Anschluss wurden die Mäuse nacheinander mit Hilfe von Ketamin (125 mg/kg Körpergewicht) und Xylocain (12,5 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert und einer diffusionsgewichteten Magnetresonanztomographie (DWI) – Untersuchung (s.a. **Kap. 2.3.2**) zugeführt. Bei den



**Abbildung 21:** Oben: Übersicht zur Auswertung der ersten

Versuchsreihe.

DWI = diffusion weighted imaging; MRI = magnet resonance imaging; USPIO = Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxyde

Links: Messschieber, wie er bei der Ermittlung der Tumormaße verwendet wurde.

Mäusen mit palpablem Tumor aus der Atrasentan – bzw. Kontrollgruppe wurde darüberhinaus eine Bestimmung der vaskulären Volumenfraktion (VVF) mittels eines Eisenoxidkontrastmittels (USPIO<sup>\*</sup>) durchgeführt (s.a. **Kap. 2.3.3**).

Um eine Auskühlung der Tiere zu verhindern, wurden diese auf mit 40°C warmem Wasser gefüllten Kulturflaschen (Nunclon®, Nunc GmbH&Co. KG, Wiesbaden) fixiert.

Im Anschluss an die magnetresonanztomographischen Untersuchungen erhielten die Mäuse eine tödliche Überdosis an Ketamin und Xylocain. Es erfolgte nun die Explantation der Tumoren, die geteilt und zum einen in Nunc – Röhrchen (Nunc CryoTubes®, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) zur späteren Durchführung einer RT – PCR (siehe **Kapitel 2.3.4**) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zum anderen in phosphatgepuffertem Formalin fixiert wurden zur folgenden immunhistochemischen Untersuchung (siehe **Kapitel 2.3.5**).

Die Tumoren in der zweiten Versuchsreihe wurden wie oben beschrieben vermessen. Nach 30 Tagen erhielten die Mäuse eine Ketamin/Xylocain – Überdosierung wie oben beschrieben. Die Explantation der Tumoren erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie nach der ersten Reihe.

---

\* USPIO = Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxyde

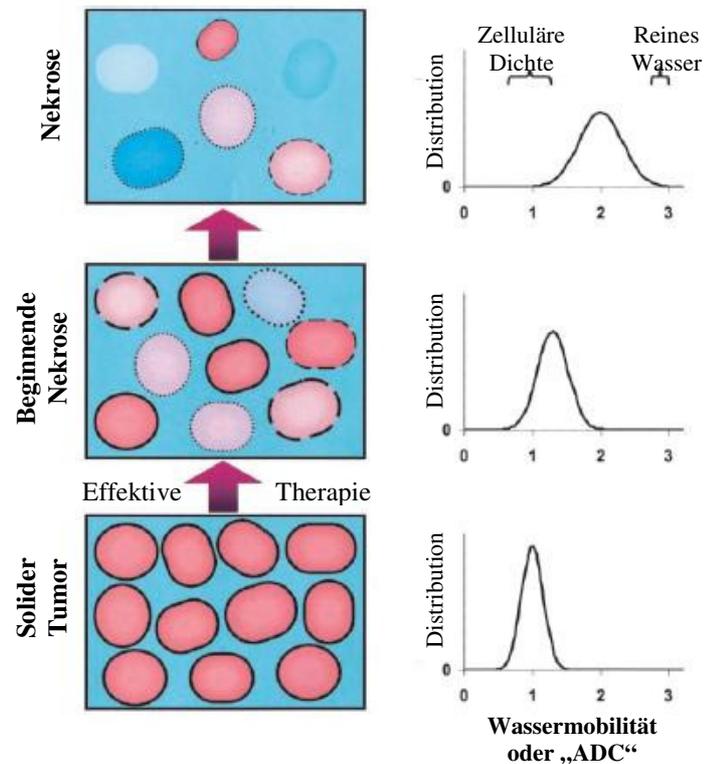
## 2.3.2 Diffusionsgewichtete Magnetresonanztomographie (DWI)

### 2.3.2.1 Grundlagen

An dieser Stelle soll nicht auf Grundlagen der MRT – Technik eingegangen werden. Siehe hierzu z.B. *Schick F.* [367].

Das Verfahren der DWI wurde gewählt, um Unterschiede zwischen den einzelnen Therapiegruppen hinsichtlich der Ausbildung nekrotischer Areale aufzudecken.

Dies erfolgt unter der folgenden Vorstellung: Der MRT sendet nacheinander zwei Impulse aus: Der erste überträgt eine Phasenverschiebung auf die Signalquelle, also auf die Wasserprotonen. Ein zweites Signal löscht diese



**Abbildung 22:** Schematische Darstellung der Beziehung zwischen Änderungen der zellulären Gewebedichte und der als ADC-Wert gemessenen Wassermobilität. Einzelheiten: Siehe Text.

Aus: *Ross et al.* [350]

Phasenverschiebung wieder komplett, wenn das Proton am gleichen Ort wie zuvor verblieben ist. Jede Bewegung, die zwischen den beiden Signalen stattfindet, bewirkt eine inkomplette Auslöschung: Somit reflektiert das Ausmaß der Signalauslöschung direkt das Ausmaß der Wassermobilität – je geringer die Signalauslöschung, desto größer die Wassermobilität. Eine größere Wassermobilität ist immer dann gewährleistet, wenn es möglichst wenige Widerstände gibt, wie z.B. Zellmembranen (s. **Abbildung 22**). Hinsichtlich der antitumoralen Therapie heisst das: Ist eine Therapie effektiv, kommt es zu verstärkter Apoptose und nekrotischem Zelluntergang. Zellmembranen werden durchlässig, Wasser kann verstärkt diffundieren. Die Signalauslöschung verringert sich, weil die Wassermobilität erhöht ist. Dies spiegelt sich in einem erhöhten ADC – Wert\* wider [350].

\* ADC = Apparent Diffusion Coefficient

Die Wassermobilität setzt sich aus den intra-, extra- und transzellulären Protonenbewegungen und der Mikrogefäßzirkulation (Perfusion) zusammen. Am meisten Einfluss in *in vivo* – Modellen haben dabei der Extrazellulärraum und die Perfusion [248].

Es seien Beispiele für ADC – Werte verschiedener Kompartimente aufgeführt:

Knochenmark hat bei 1,5 Tesla einen sehr geringen ADC – Wert von  $0,15 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$  [28].

Gehirngewebe besitzt bei gleicher Tesla ca. einen von  $0,6 - 0,8 \times 10^{-3} \text{cm}^2/\text{s}$  und cerebrospinaler Liquor ungefähr  $3,0 \times 10^{-3} \text{cm}^2/\text{s}$  [350].

### 2.3.2.2 Anwendung des Verfahrens

Alle MRT – Untersuchungen erfolgten mit einem 1,5 Tesla MR-System (Intera, Philips, Best, Niederlande). Oberhalb des zu untersuchenden Tumorareals wurde eine Oberflächenspule mit einem Durchmesser von 47 mm angebracht (Microscopy Coil 47, Philips, Best, Niederlande). Vor Beginn der eigentlichen DWI wurden T2-gewichtete MRT – Aufnahmen erstellt, um eine Übersicht über die Lage und Größe der Tumoren zu erhalten. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe einer T2 – gewichteten TSE\* - Sequenz bei einem TSE Faktor von 15, einem Field of view (FOV) von 100x100 mm, einer Matrixgröße von 384x384 Pixeln (rekonstruiert 512x512 Pixel) und einer Schichtdicke von 3,0 mm bei 6 Schichtaufnahmen in transversaler Orientierung durchgeführt. Die Schichtlücke betrug 0,3 mm. Als Echozeit (TE) wurden 100 ms gewählt, die Repetitionszeit (TR) betrug 2700 ms. Die Schichtaufnahmen dauerten pro Maus/Tumor 2:01 min.

Die anschließenden DWI – Untersuchungen wurden bei den Mäusen durchgeführt, bei denen ein Tumor aufgrund der Voraufnahmen deutlich erkennbar und abgrenzbar und eine anschließende Auswertung möglich war. Von den neun nach 30 Behandlungstagen noch lebenden Mäusen der Atrasentangruppe wurden somit sechs ausgewertet, von den zehn der Kontrollgruppe ebenfalls sechs, von den zehn der Mischgruppe zwei und von den sieben der Taxol – Gruppe eine.

Die DWI wurde nun mittels DiffMSepi<sup>†</sup> - Sequenz durchgeführt. Das FOV<sup>‡</sup> betrug 100 x 100 mm bei einer Matrixgröße von 128 x 128 Pixeln (rekonstruiert 512 x 512 Pixel). Es wurden 9 Schichten gescannt mit einer Dicke von jeweils 3,0 mm und einer Schichtlücke von 0,3 mm.

---

\* TSE = Turbo Spin Echo

† DiffMSepi = diffusion (weighted) multishot echoplanar imaging

‡ FOV = Field Of View

Die Echozeit (TE) betrug 12,0 ms, die Repetitionszeit 2000ms. Die Untersuchung dauerte jeweils 2:47 min.

Zusätzlich zur Multishot (MS) – Bildgebung erfolgte eine SingleShot (SS) Untersuchung. Sie wurde mit einer DiffSSStse\* bei einem TSE Faktor von 27, einem FOV von 100 x 100 mm und einer Schichtdicke von 3,0 mm bei einer Lücke von 0,3 mm durchgeführt. Die TE betrug 62 ms, die TR 2000 ms. Die Untersuchung pro Tumor dauerte 1:52 min.

Zur Ermittlung der ADC – Werte wurden ROI† über die einzelnen Schichten der Tumore gelegt. Aus der Summe der Werte der einzelnen Schichten wurde das Mittel gebildet und als ADC – Wert des Gesamttumors aufgefasst.

### 2.3.3 Bestimmung der VVF mittels USPIO

#### 2.3.3.1 Grundlagen

Es soll der vaskuläre Anteil und somit die Durchblutung der Tumoren ermittelt werden.

Dem Verfahren zur Bestimmung der Vaskulären Volumen Fraktion (VVF) mittels USPIO‡ – Nanopartikeln liegt die Annahme zugrunde, dass sich die Änderung der transversalen Relaxationsrate ( $\Delta R_2^*$ ) proportional zur lokalen Durchblutung innerhalb eines Tumorumfanges (V) verhält, unter Berücksichtigung einer Plasmakonzentrationsfunktion des verabreichten Kontrastmittels (f(P)) und einer dosisabhängigen Konstanten (k) :

$$\Delta R_2^* = k \times f(P) \times V \quad [57, 112, 316].$$

Unter der Voraussetzung, dass sich das zugeführte Kontrastmittel in einem Fließgleichgewicht befindet, lässt sich die Formel vereinfachen: Die Änderung der transversalen Relaxationsrate ( $\Delta R_2^*$ ) ist dann dem perfundierten Tumorumfang (V(t)) und einer Konstanten (k), die die dosisabhängige Plasmakonzentration des Kontrastmittels beschreibt, proportional:  $\Delta R_2^*(t) = k \times V(t)$  [59, 316].

Die Relaxationsrate ( $R_2^*$ ) lässt sich anhand der MRT – Sequenz (double echo EPI) abschätzen:  $1/T_2^* = R_2^* = 1/(TE_2 - TE_1) \times \ln(SI_{TE1}/SI_{TE2})$ .

---

\* DiffSSStse = Diffusion (weighted) SingleShot Turbo Spin Echo

† ROI = Region Of Interest

‡ USPIO = Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxyde

Dabei sind  $TE_1$  und  $TE_2$  = Echozeit 1 und 2 [msec],  $SI_{TE1}$  stellt die Signalintensität von Echo1 und  $SI_{TE2}$  die von Echo2 dar. Daraus folgt, dass sich die *Änderung* der Relaxationsrate ( $\Delta R2^*$ ) wie folgt ausdrücken lässt:

$$\Delta R2^* = [(1/TE_2 - TE_1) \times \ln(SI_{TE1post} / SI_{TE2post})] - [(1/TE_2 - TE_1) \times \ln(SI_{TE1prä} / SI_{TE2prä})],$$

wobei  $SI_{TE1post}$  und  $SI_{TE2post}$  die in der EPI-Dual Sequenz gemessenen Signalintensitäten *nach* Kontrastmittelgabe und  $SI_{TE1prä}$  und  $SI_{TE2prä}$  die entsprechenden Signalintensitäten *vor* Kontrastmittelgabe darstellen.

Die Vaskuläre Volumenfraktion (VVF) lässt sich nun durch Kalibrierung der ermittelten  $\Delta R2^*$  für den Tumor mit der  $\Delta R2^*$  des Muskelgewebes berechnen, wobei mit 1,89% als bekanntes vaskuläres Volumen von „Mausmuskulatur“ multipliziert wird:

$$VVF_{\text{Tumor}} = \Delta R2^*_{\text{Tumor}} / \Delta R2^*_{\text{Muskulatur}} \times 1,89\% \quad [316, 477].$$

### 2.3.3.2 USPIO – Nanopartikel

Bei den verwendeten USPIO – Nanopartikeln (SH U 555 C, Resovist®, Schering AG, Berlin) handelt es sich um 3-5 nm große Carboxydextran – ummantelte Eisenoxidkerne (Ferucarbotran), die in wässriger Umgebung mit Hydrathülle einen Durchmesser von etwa 20nm erreichen [316]. Das SH U 555 C wurde als fertige Lösung in einer Konzentration von 0,5 mmol Fe/ml eingesetzt [417]. Es hat gegenüber niedermolekularen Kontrastmitteln den Vorteil, nicht so schnell transendothelial zu diffundieren [315], so dass es sich gut dazu eignet eine Aussage über die Vaskularisierung des untersuchten Gewebes zu treffen.

Relaxationsmessungen ergaben im wässrigem Milieu eine  $r1$  von  $22s^{-1}(mmol/L)^{-1}$  und eine  $r2$  von  $45s^{-1}(mmol/L)^{-1}$  bei  $40^\circ C$  und 20 MHz. In klinischen Phase I – Studien zeigte SH U 555 C eine Plasmahalbwertszeit von ungefähr 6 Stunden [59, 332].

### 2.3.3.3 Anwendung des Verfahrens

Die Mäuse wurden anästhesiert und auf einer wärmenden Unterlage fixiert, wie in **Kap. 2.3** beschrieben. Zur Injektion des USPIO – Kontrastmittels (KM) wurde den anästhesierten Mäusen aus der Atrasentan- und der Kontrollgruppe jeweils ein 28G – Katheter (Institut für Klinische Radiologie, Uniklinik Münster) in die V. jugularis gelegt. Oberhalb des zu untersuchenden Tumorareals wurde eine Oberflächenspule mit einem Durchmesser von 47mm angebracht (Microscopy Coil 47, Philips, Best, Niederlande). Zunächst erfolgte eine MRT – Untersuchung mit einem 1,5 Tesla MR-System (Intera, Philips, Best, Niederlande), um eine anatomische Übersicht über den jeweiligen Tumor zu erhalten. Diese Aufnahmen wurden mit Hilfe einer T2 – gewichteten TSE\* - Sequenz bei einem Field of view (FOV) von 100x100 mm, einer Matrixgröße von 384x384 Pixeln (rekonstruiert 512x512 Pixel) und einer Schichtdicke von 3,0 mm bei 6 Schichtaufnahmen in transversaler Orientierung durchgeführt. Die Schichtlücke betrug 0,3 mm. Als Echozeit (TE) wurden 100 ms gewählt, die Repetitionszeit (TR) betrug 2700 ms. Die Schichtaufnahmen dauerten pro Maus/Tumor 2:01 min.

Nach Abschluss der Übersichts - MRT – Untersuchung wurden zwei weitere Messungen vorgenommen, um die transversalen Relaxationsraten  $R2^*$  zu ermitteln, *prä* und *post* KM – Gabe. Den Mäusen der Atrasentan- und Kontrollgruppe wurden  $80\mu\text{mol Fe / kg KG}$  über den Jugulariskatheter injiziert. Unmittelbar darauf erfolgten die MRT – Untersuchungen mittels EpiDual – Sequenz: Die  $TE_1$  betrug 9,52ms, die  $TE_2$  19,04ms und die TR 605ms.

Das FOV maß 100x100 mm bei einer Matrixgröße von 112x112 Pixeln (rekonstruiert 256x256 Pixel). Die Schichten waren 2,0mm dick mit einer Lücke von 0,2mm. Pro Tumor/Maus dauerte der MRT-Scan 2:14min. Um die VVF berechnen zu können wurden ROI<sup>†</sup> so gesetzt, dass Schicht für Schicht erfasst wurde, bis das gesamte Tumolvolumen vermessen und  $R2^*$  ermittelt wurde. Um  $\Delta R2^*$  zu ermitteln, wurden die ROI kopiert und in die jeweils korrespondierenden MR – Bilder *prä* und *post* KM – Gabe eingefügt.

Zur Berechnung der VVF wurde der Vorgang an der Muskulatur wiederholt, so dass die o.g. Formel  $VVF_{\text{Tumor}} = \Delta R2^*_{\text{Tumor}} / \Delta R2^*_{\text{Muskulatur}} \times 1,89 \%$  Anwendung finden konnte.

\* TSE = Turbo Spin Echo

† ROI = region of interest

### 2.3.4 RT – PCR

Das gewonnene, schockgefrorene Gewebematerial wurde mit Hilfe des RNeasy® Mini Kit und des RnaseFree-Dnase Set® (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) von kontaminierender DNA befreit. Anschließend wurde die RNA unter Verwendung des Advantage® RT-for-PCR Kit (BD Clontech, Heidelberg) revers transkribiert: Dazu wurde 1µg der RNA revers transkribiert und multipliziert. Die folgenden Primer-Sequenzen wurden eingesetzt:

- ET-1: 5'- TGCTCCTGCTCGTCCCTGATGGATAAAGAG – 3' vorwärts und 5' – GTCACATAACGCTCTCTGGAGGGCTT – 3' rückwärts.
- ET<sub>A</sub>R: 5' - GATCACAATGACTTTGGCGTATTTC – 3' vorwärts und 5'- CTCAAGCTGCCATTCCTTCT -3' rückwärts.
- ET<sub>B</sub>R: 5' – CTAAAGGAGACAGGACGGCACCATC -3' vorwärts und 5'- GATTCGCAGATAACTTCCTT -3' rückwärts.

Das *housekeeping* Gen  $\beta$ -Aktin wurde als interne Kontrolle eingesetzt. Um die optimale Menge des für die PCR notwendigen Transkripts zu bestimmen und um sicherzustellen, dass das cDNA – Produkt von der Menge des verwendeten Transkripts abhing, wurden unterschiedliche Mengen der Transkript-Matrize und verschieden viele Zyklen in der PCR getestet. Die PCR – Produkte wurden auf 2%igem Agarosegel mittels Elektrophorese analysiert und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die entstandenen DNA – Banden wurden unter UV-Bestrahlung mit Hilfe des BioDoc Analyzesystems (Biometra, Göttingen) fotografiert. Als Positivkontrollen dienten für die ET-1 Ovarialkarzinomgewebe, für die ET<sub>A</sub>R MCF-7 – Zellen und für ET<sub>B</sub>R die Melanom-Zelllinie A-375. Im Anschluß wurde eine densitometrische Analyse der PCR – Produkte mit dem Analyseprogramm Scion Image Beta 4.02 Win program (Scion Corp., Frederick, MD, USA) durchgeführt. Die der ET-1 und ET<sub>A</sub>R – Expression entsprechenden Signale wurden relativ zu  $\beta$ -Aktin für jede Probe quantifiziert.

### 2.3.5 Immunhistochemie

Die formalinfixierten Paraffinblöcke der Tumorproben wurden in 3µm-dicke Scheiben geteilt und anschließend HE<sup>\*</sup>-gefärbt. Daraufhin erfolgte die Deparaffinisierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte, die dann in Reveal Pufferlösung (BioCarta, Hamburg) getränkt und anschließend unter Druck (103kPa für 5min.) gekocht wurden. Nach Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurde eine Immunreaktion mit primären Antikörpern gegen ET-1 (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA, USA, Verdünnung 1:100) und gegen ET<sub>A</sub>R (Alexis, Grünberg; Verdünnung 1:400) durchgeführt, indem die Proben mit den Antikörperlösungen über Nacht bei 41°C inkubiert wurden. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Waschung mit Methanol, dem 0,6%-iges Wasserstoffperoxid zugesetzt war, um die endogene Peroxidase auszuschwemmen. Der gegen ET-1 gerichtete, gebundene, primäre Kaninchen-Antikörper wurde nun mit Hilfe des Dako Rabbit-EnVision-HRP (Dako GmbH, Hamburg) detektiert; selbiges Verfahren wurde zur Detektion des gegen ET<sub>A</sub>R gerichteten, gebundenen, primären Schaf-Antikörpers angewandt - hier musste allerdings ergänzend ein Kaninchen – Antikörper gegen Schafantikörper (Dianova, Hamburg; Verdünnung 1:50) als „Verbindungsglied“ zwischengeschaltet werden. Die HRP-Kennzeichnung konnte nun mit dem NovaRed substrate kit (Vektor Laboratories, Burlingame, CA, USA) sichtbar gemacht werden. Es erfolgte eine semiquantitative Analyse der Immunfärbung. Die Färbungen wurden je nach Färbeintensität in die Kategorien „0=negativ“, „1=schwach positiv“, „2=mäßig positiv“, „3=stark positiv“ eingeteilt. Ferner wurde der prozentuale Anteil gefärbter Zellen je Schnitt bestimmt. Der Färbegrad wurde letztlich aus dem Produkt Färbeintensität x prozentualer Anteil gefärbter Zellen ermittelt.

Darüberhinaus wurden dem Tumor direkt benachbarte Präparate – Abschnitte immunhistochemisch hinsichtlich ihrer Gefäßdichte untersucht. Hierzu wurden die Schnitte mit dem monoklonalen Mausantikörper CD31 Ab (Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark; Verdünnung 1:400) bei Raumtemperatur 25min. lang inkubiert, gefolgt vom biotinylierten sekundären Antikörper und Streptavidin-Komplex (Dako TechMate, Hamburg) für jeweils 20 Minuten. Zur Detektion der Immunfärbung wurde modifiziertes Fuchsin eingesetzt. Die Zellkerne wurden mit Haematoxylin gegengefärbt. Die Auszählung der Blutgefäße erfolgte, wie in **Kapitel 1.3.4** beschrieben, lichtmikroskopisch in den „Hot spots“ bei 400-facher Vergrößerung. Dabei wurde jede gefärbte Endothelzelle und jedes Endothelfragment, das klar von benachbarten größeren Gefäßen getrennt war, als Mikrogefäß gewertet – das

---

\* HE = Hämatoxylin/Eosin

Vorhandensein eines Gefäßlumens war kein zwingend notwendiges Kriterium. Als Positivkontrollen dienten Ovarialkarzinom- und Prostatakarzinom-Gewebe sowie Schnitte eines Hämangioms. Von diesen Geweben war zuvor bekannt, dass sie ET-1, ET<sub>A</sub>R und CD31 koexprimieren. Als Negativkontrollen wurden die Färbungen ohne den primären Antikörper durchgeführt.

### 2.3.6 Statistische Analyse

Sämtliche Daten über Tumorgrößen und Bildgebung wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel (Microsoft® Excel 2002, SP3) erfasst. Dabei wurden im Speziellen die folgenden Parameter berücksichtigt:

- Tumorgröße (Länge und Breite) und daraus berechnetes Tumolvolumen (mm<sup>3</sup>)
- Messergebnisse der Eisenoxid- und DWI – Untersuchungen und Berechnung der VVF und ADC-Werte aus den Rohdaten nach in **Kapitel 2.3.2** und **2.3.3** genannten Formeln
- Gewicht der Mäuse (g)
- Ergebnisse der RT – PCR (relative ET-1- bzw. ET<sub>A</sub>R/ET<sub>B</sub>R –mRNA Expression)
- Immunhistochemie (relative ET-1 und ET<sub>A</sub>R-Proteinexpression)

Zum paarweisen Vergleich der anti-tumoralen Effekte der jeweiligen Behandlungen (Atrasentan *versus* Kontrolle / Paclitaxel / Kombination, bzw. Paclitaxel *versus* Kontrolle; und kombinierte Therapie mit Atrasentan + Paclitaxel *versus* Kontrolle) sowie zum Vergleich der MVD zweier Gruppen wurde der zweigeteilte unpaarige Student *t* – Test durchgeführt. Für die ermittelten VVF und ADC – Werte wurden paarweise Student *t* – Tests durchgeführt. Dabei wurde das Statistikprogramm Graph Pad Prism (Graph Pad Software, Vers. 4.0 for Windows, San Diego, Kalifornien, USA) verwendet.

Zur Überprüfung der Korrelationen zwischen Tumorwachstum („Ja“ *versus* „Nein“) und jeweiligem Behandlungsarm wurden Kreuztabellen erstellt und der  $\chi^2$  und Fisher's Test durchgeführt.

Für alle statistischen Analysen wurde ein *p*-Wert von  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant erachtet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Tumorumlumina

Die Ergebnisse der Tumorumlumina-Bestimmung der einzelnen Versuchstiere der ersten Versuchsreihe sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt. Die Volumina wurden mit Hilfe der Formel  $\text{Tumorummolumen} = \frac{(\text{Lange} \times \text{Breite})^2}{2}$  berechnet.

Beh.-Tag Lfd.Nr.	7	10	13	16	19	22	25	28	31
Maus 1	149,1	180	175,7	172,0	165,9	265,7	197,1	189,5	291,5
Maus 2	103,8	90,6	72,0	79,6	99,1	99,7	118,3	125,3	170,5
Maus 3	81,0	80,0	42,5	62,0	78,4	86,0	89,0	107,5	122,9
Maus 4	0,0	0,0	0	21,4	20,3	16,9	28,8	36,3	25,4
Maus 5	107,5	[+]							
Maus 6	0	22,1	37,9	40,9	62,7	68,9	68,3	42,5	15,9
Maus 7	14,5	29,5	31,2	30,6	30,6	33,8	28,8	28,7	37,9
Maus 8	111,0	296,1	279,5	439,4	466,3	618,8	596,2	700	866,8
Maus 9	33,8	43,9	50,8	100,6	123,5	236,7	279,9	350,5	505,8
Maus 10	8,7	18,4	31,2	28,7	41,5	44,0	71,3	54,9	30
<b>Mittelwert</b>	<b>60,9</b>	<b>84,5</b>	<b>80,1</b>	<b>108,4</b>	<b>120,9</b>	<b>163,4</b>	<b>164,2</b>	<b>181,7</b>	<b>229,6</b>
<b>Ohne Maus 8*</b>	<b>55,4</b>	<b>58,1</b>	<b>55,2</b>	<b>67,0</b>	<b>77,8</b>	<b>106,5</b>	<b>110,2</b>	<b>116,9</b>	<b>150,0</b>
<b>Ohne M. 8+9#</b>	<b>58,1</b>	<b>60,1</b>	<b>55,8</b>	<b>62,2</b>	<b>71,2</b>	<b>87,9</b>	<b>85,9</b>	<b>83,5</b>	<b>99,2</b>

**Tabelle 9:** Tumorumlumina [mm<sup>3</sup>] der mit Atrasentan behandelten Gruppe der ersten Versuchsreihe.

[+] = verstorben.

\* = Maus 8 wich an Tag 31 um mehr als das doppelte der Standardabweichung vom Mittelwert ab.

# = Maus 9 erwies sich als therapieresistent (weiteres *siehe Diskussion, Kapitel 4.2.1*)

Beh.-Tag Lfd.Nr.	7	10	13	16	19	22	25	28	31
Maus 11	42,3	39,4	72,2	41,5	32,8	30,4	32,2	38,1	14,8
Maus 12	102,4	126,6	116,6	106,5	127,0	130,6	103,5	112,9	109,8
Maus 13	62,7	112,9	63,7	64,5	57,8	36,1	26,5	39,2	42,3
Maus 14	96,4	122,9	116,5	112,9	134,3	141,1	93,3	112,9	166,8
Maus 15	21,4	78,4	75,8	110,1	88,6	76,3	54,3	52,5	42,5
Maus 16	62,4	78,4	50,3	62,2	97,2	54,6	40,9	47,2	54,3
Maus 17	31,2	60,4	60,4	62,0	58,9	69,4	54,0	69,2	43,2
Maus 18	130,1	80,8	64,9	91,5	85,7	73,5	58,3	69,2	62,0
Maus 19	71,5	106,9	100	45,0	62,4	45,6	56,4	38,0	31,3
Maus 20	161,8	123,5	86,3	103,2	127,8	157,7	83,5	91,8	88,2
<b>Mittelwert</b>	<b>78,2</b>	<b>93,0</b>	<b>80,7</b>	<b>79,9</b>	<b>87,3</b>	<b>81,5</b>	<b>60,3</b>	<b>67,1</b>	<b>65,5</b>

**Tabelle 10:** Tumorumlumina [mm<sup>3</sup>] der mit der Kombinationstherapie aus Atrasentan und Paclitaxel behandelten Gruppe der ersten Versuchsreihe.

Beh.-Tag Lfd.Nr.	7	10	13	16	19	22	25	28	31
Maus 31	0	48,1	30,9	85,3	108,7	83,5	74,7	54,5	35,2
Maus 32	35,0	35,2	50,9	48,7	91,8	80,8	60,6	39,4	49,0
Maus 33	116,5	71,5	130,6	154,0	89,1	185,0	73,7	[+]	
Maus 34	31,2	54,5	36,3	55,7	43,5	69,2	33,8	45,0	36,5
Maus 35	88,6	103,2	74,7	72,5	118,3	71,4	50,6	71,4	43,2
Maus 36	83,9	60,6	73,3	86,4	71,4	91,9	64,8	73,7	85,7
Maus 37	39,4	78,0	86,5	73,5	81,0	62,7	71,5	50,9	92,0
Maus 38	46,5	[+]							
Maus 39	111,4	123,5	72,0	48,4	87,7	95,3	108,1	57,9	
Maus 40	61,6	83,7	47,2	40,4	110	60,6	50,9	54,6	103,8
<b>Mittelwert</b>	<b>61,4</b>	<b>73,1</b>	<b>66,9</b>	<b>73,9</b>	<b>89,1</b>	<b>88,9</b>	<b>65,4</b>	<b>55,9</b>	<b>63,6</b>

**Tabelle 11:** Tumolvolumina [cm<sup>3</sup>] der mit Paclitaxel behandelten Gruppe der ersten Versuchsreihe.

[+] = verstorben.

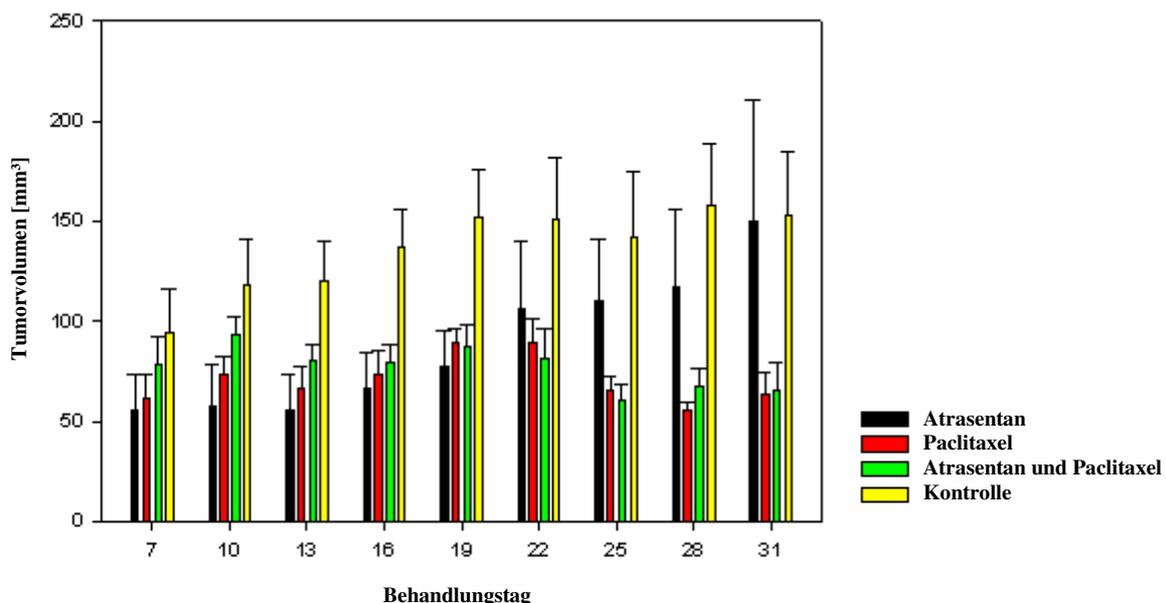
Beh.-Tag Lfd.Nr.	7	10	13	16	19	22	25	28	31
Maus 21	50	161,8	153,7	184,5	188,6	236,2	225,8	246,4	284,6
Maus 22	241,9	288,8	244,4	264,1	334,4	335,2	310,9	313,6	299,8
Maus 23	66,8	52,3	47,4	71,5	62,4	50,9	58,5	106,5	91,8
Maus 24	116,6	112,1	144,8	170,5	181,2	242,2	248,7	277,7	249,8
Maus 25	161,8	156,2	110,1	85,7	123,5	124,6	69,2	62,2	54,6
Maus 26	46,1	61,6	30	141,1	141,9	82,0	86,4	82,9	56,1
Maus 27	91,2	119,1	171,1	164,7	168,0	215,0	242,2	230,8	209,2
Maus 28	116,6	106,5	97,2	78,4	109,1	77,8	80,1	72,0	78,7
Maus 29	52,3	90,7	116,4	96,0	116,1	81,0	66,5	110	153,9
Maus 30	0	36,0	86,6	111,6	97,8	60,6	34,8	73,8	51,2
<b>Mittelwert</b>	<b>94,3</b>	<b>118,5</b>	<b>120,2</b>	<b>136,8</b>	<b>152,3</b>	<b>150,6</b>	<b>142,3</b>	<b>157,6</b>	<b>153,0</b>

**Tabelle 12:** Tumolvolumina [mm<sup>3</sup>] der mit der Trägerlösung behandelten Kontrollgruppe der ersten Versuchsreihe.

Nach der ersten Tumorvolumen-Messung, am siebten Tag, zeigte die Atrasentangruppe im Vergleich zu den anderen Therapiegruppen die im Mittel niedrigsten Volumina: Es ergab sich ein Tumorvolumen von  $55,4 \pm 18,6 \text{ mm}^3$ , wohingegen in der Kontrollgruppe  $94,3 \pm 21,9 \text{ mm}^3$  festzustellen war. Die Paclitaxelgruppe hatte ein mittleres Tumorvolumen von  $61,4 \pm 12,0 \text{ mm}^3$ , die Kombinationsgruppe  $78,2 \pm 14,1 \text{ mm}^3$ .

Dabei ist zu beachten, dass Maus 8 (Atrasentan-Gruppe) von der statistischen Auswertung ausgeschlossen wurde, da sich bei ihr ein von den übrigen Mäusen extrem abweichendes Tumorwachstumsverhalten zeigte: Ihr Tumorvolumen lag mit ca.  $867 \text{ mm}^3$  etwa um 12% oberhalb der doppelten Standardabweichung vom Mittelwert, die  $774 \text{ mm}^3$  betrug (siehe **Tabelle 9**).

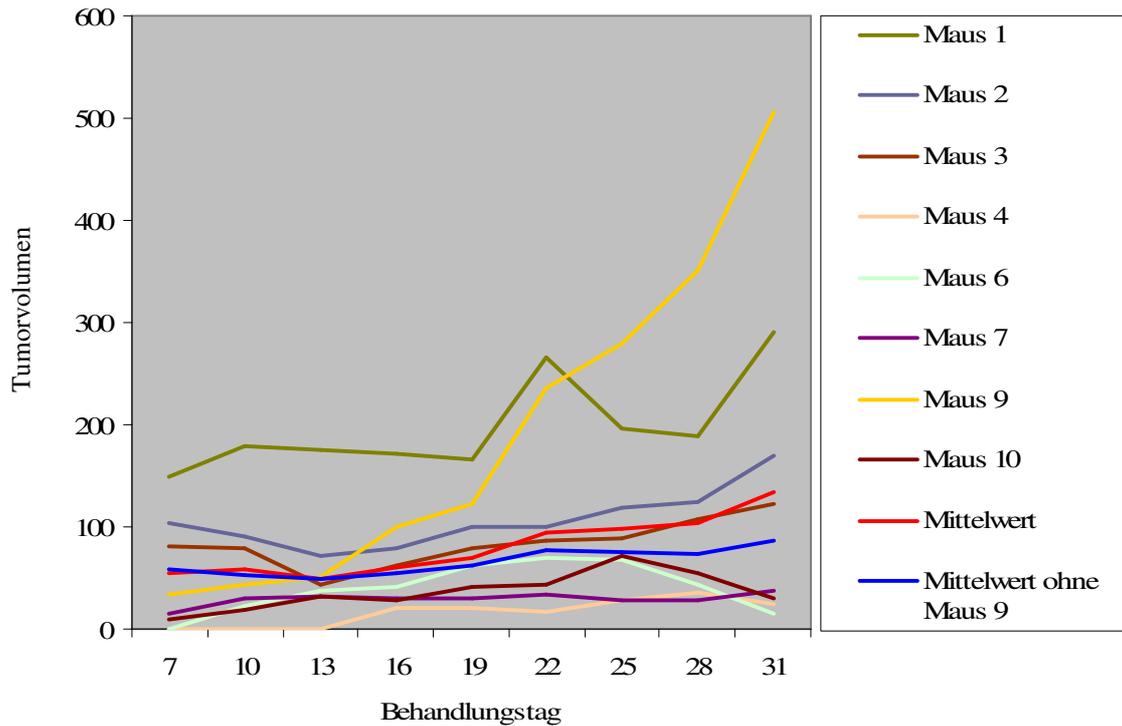
Das Säulendiagramm in **Abbildung 23** zeigt die Entwicklung der mittleren Tumorgrößen im Verlauf der Therapie; dabei ergaben sich signifikant geringere Werte für die Atrasentangruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe bis ungefähr zur dritten Behandlungswoche. Danach kam es zu einem sprunghaften Anstieg der Tumorgröße innerhalb der Atrasentan – Bahandlungsgruppe, was annähernd zu einem Erreichen der Kontrollgruppenvolumina nach 31 Behandlungstagen führte (mittleres Volumen Atrasentangruppe:  $150 \text{ mm}^3$ ; Kontrollgruppe:  $153 \text{ mm}^3$ ). Die beobachtete übermäßige Zunahme des mittleren Tumorvolumens der Atrasentan-Gruppe war auf das übermäßige



**Abbildung 23:** Säulen-Balken – Diagramm der mittleren Tumorvolumina.

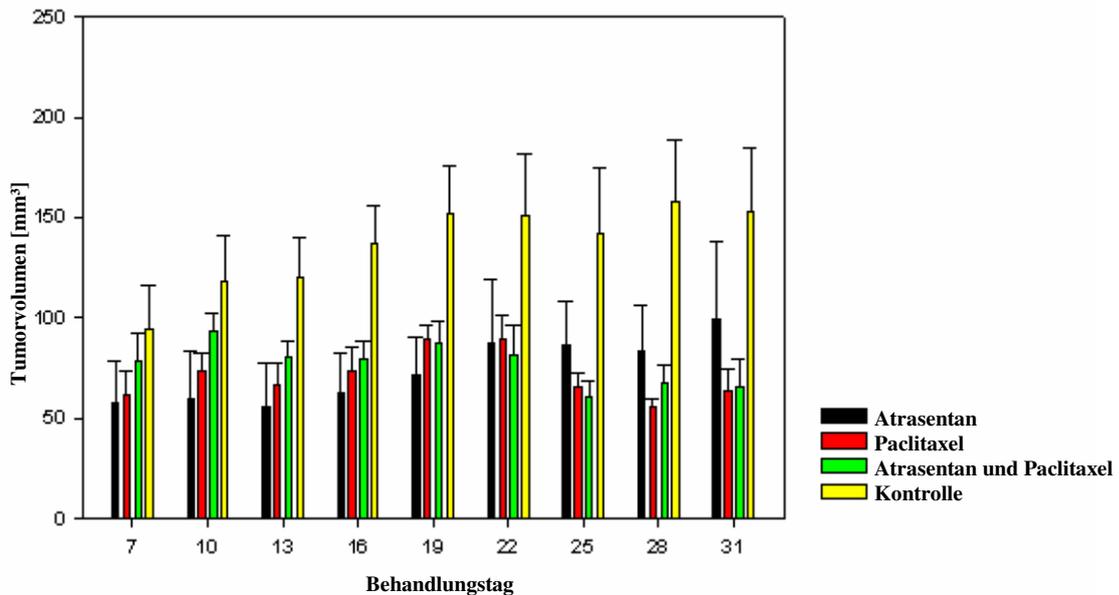
Bis zum 19. Behandlungstag zeigt die Atrasentangruppe ein signifikant geringeres Tumorvolumen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach etwa drei Wochen erhöht sich das Tumorvolumen innerhalb der Atrasentangruppe allerdings, um letztlich nach 31 Tagen zu den Volumina der Kontrollgruppe aufzuschließen. Säulen = Mittleres Tumorvolumen; Balken = Standardfehler.

Beachte auch **Abbildung 25** und weitere Einzelheiten im Text.



**Abbildung 24:** Tumorzellen [mm<sup>3</sup>] der einzelnen Mäuse der Atrasentangruppe.

Auffällig ist der nahezu ungebremste Anstieg der Tumorzellen bei Maus 9. Maus 5 starb bereits nach der ersten Therapiewoche und ist hier nicht aufgeführt. Maus 8 zeigte ein so überproportionales Tumorzellenwachstum, dass sie nicht weiter in die statistischen Berechnungen eingeschlossen wurde. Weitere Einzelheiten: Siehe Text.



**Abbildung 25:** Säulen – Balken – Diagramm der mittleren Tumorzellen ohne Maus 9, die als Ausreißer betrachtet werden kann. Beachte in diesem Zusammenhang auch die enorme Beeinflussung der mittleren Volumina der gesamten Behandlungsgruppe anhand **Abbildung 23**. Weitere Einzelheiten: Siehe Text.

Säulen = Mittleres Tumorzellen [mm<sup>3</sup>]; Balken = Standardfehler

Tumorstadium einer Maus zurückzuführen (Maus 9, siehe **Abbildung 24**).

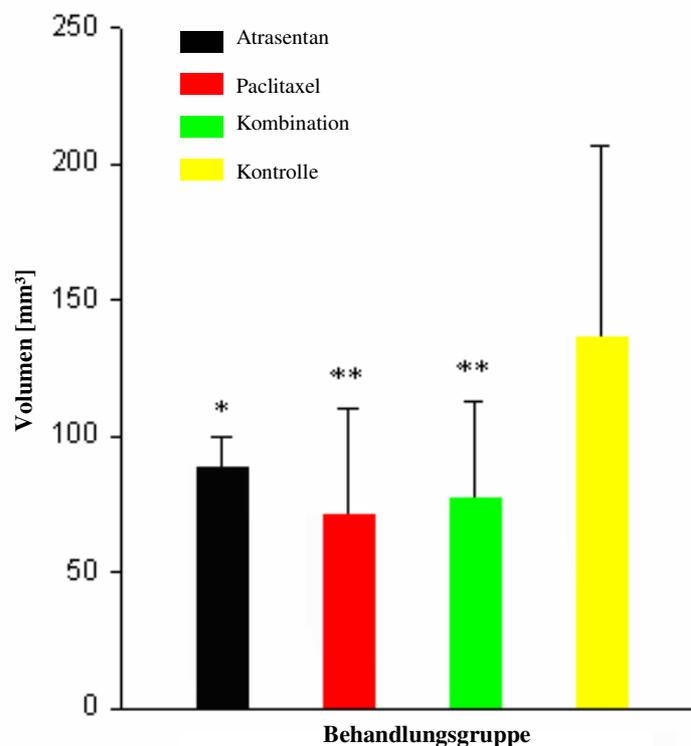
Über den gesamten Behandlungszeitraum betrachtet lag die Atrasentan-Gruppe mit einem mittleren Tumorstadium von  $88,5 \text{ mm}^3$  dennoch signifikant niedriger als die Kontrollgruppe mit  $136,2 \text{ mm}^3$  ( $p = 0,002$ , siehe **Abbildung 26**).

Nach Ausschluss des Ausreißers (Maus 9) zeigten sich die Unterschiede im Tumorstadium zwischen der Atrasentan- und der Kontroll-Gruppe noch deutlicher: Über den gesamten Behandlungszeitraum ergab sich ein durchschnittliches Tumorstadium von  $73,8 \pm 5,3 \text{ mm}^3$  für die Atrasentan- im Gegensatz zu  $136,2 \pm 7,0 \text{ mm}^3$  für die Kontrollgruppe, was einem hochsignifikanten p-Wert von  $p < 0,001$  entsprach (siehe **Abbildung 25**).

Für die Paclitaxel-Gruppe ergab sich das niedrigste Durchschnittsvolumen für die gesamte Zeit der Therapie: Die mittlere Tumorstadium lag bei  $70,9 \pm 38,8 \text{ mm}^3$ .

Die Kombinationstherapie führte zu einem mittleren Volumen von  $77,1 \pm 35,6 \text{ mm}^3$ .

Damit zeigte die Paclitaxel-Gruppe den besten antitumorösen Effekt, gefolgt von der Kombinationstherapie (**Abbildung 26**).



**Abbildung 26:** Durchschnittliche Volumina innerhalb der einzelnen Therapiegruppen über die gesamte Zeit der Behandlung betrachtet, also nach 10 prä – Therapie – und 31 Therapietagen. Säulen = Mittleres Tumorstadium, Balken = Standardfehler

\* = signifikant von der Kontrollgruppe abweichend mit  $p = 0,002$

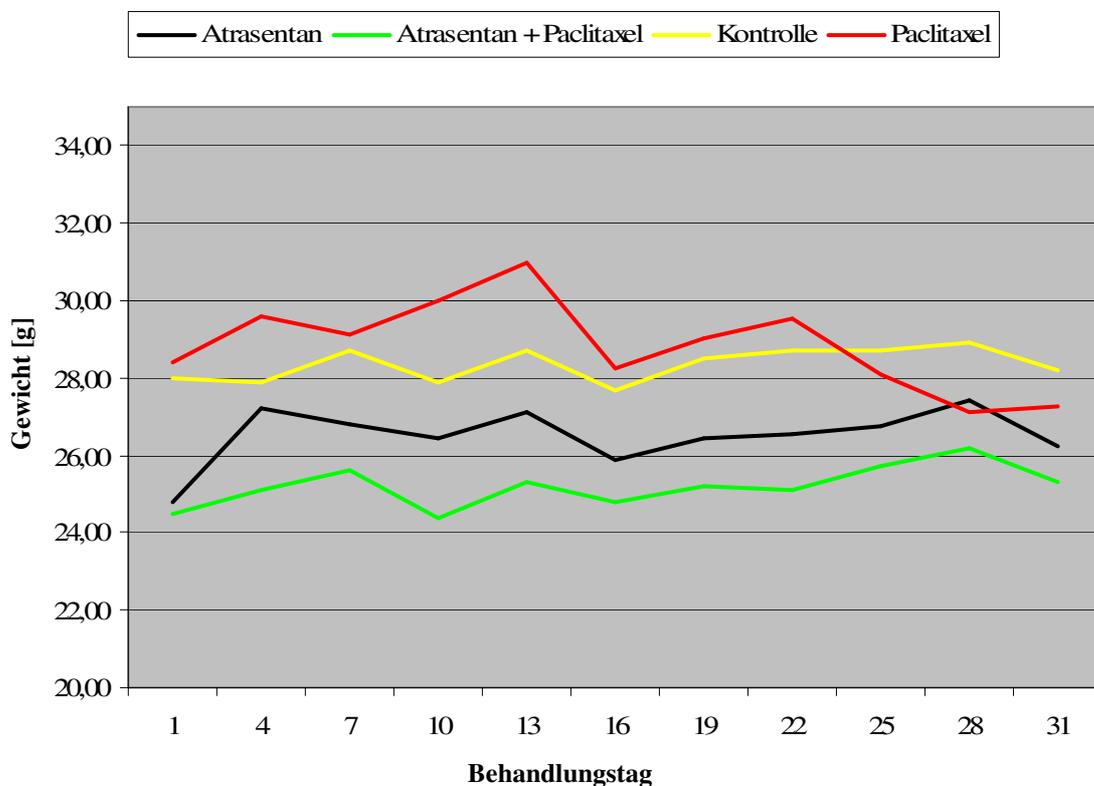
\*\* = signifikant von der Kontrollgruppe abweichend mit  $p < 0,001$

### 3.2 Gewicht

Hinsichtlich des Gewichtes der behandelten Tiere ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Therapiegruppen. Das mittlere Gewicht in der Atrasentangruppe lag am ersten Behandlungstag bei 24,8 g (Standardabweichung  $\pm 3,16$  g), die Kontrollgruppe wog im Mittel  $28 \pm 2,05$  g, die Paclitaxelgruppe  $28,4 \pm 1,62$  g und die Kombinationstherapiegruppe  $24,5 \pm 2,97$  g.

Nach relativ stabilem Verlauf (siehe **Abbildung 27**) betrug das Gewicht innerhalb der Atrasentangruppe nach 31 Therapietagen  $26,22 \pm 2,35$ g, das der Kontrollgruppe  $28,2 \pm 2,36$  g, das der Paclitaxelgruppe  $27,29 \pm 1,98$  g und das der Kombinationsgruppe  $25,3 \pm 3,63$  g.

Die Atrasentangruppe nahm also im Mittel um 1,42 g an Gewicht zu, die Kontrollgruppe um 0,2 g und die Kombinationsgruppe um 0,8 g. Die Paclitaxelgruppe war im Mittel um 1,11 g leichter.



**Abbildung 27:** Verlauf des mittleren Gewichtes [g] innerhalb der verschiedenen Behandlungsgruppen. Einzelheiten: *siehe Text*.

### 3.3 Diffusionsgewichtete Magnetresonanztomographie (DWI)

Die Ergebnisse der DWI sind in **Tabelle 13** für die Atrasentan- und in **Tabelle 14** für die Kontrollgruppe dargestellt:

Maus	MSepi	SSepi
1	0,67	0,96
2	0,60	1,04
3	0,70	0,95
8	0,70	0,99
9	0,52	0,63
10	0,82	0,95
<b>Mittelwert</b>	<b>0,67</b>	<b>0,92</b>
<b>SD</b>	<b>0,09</b>	<b>0,13</b>

**Tabelle 13:** Mittels DWI ermittelte ADC-Werte der Atrasentangruppe.  
Angaben in  $10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s.  
MSepi = Multi Shot Echo Planar Imaging;  
SSepi = Single Shot Echo Planar Imaging;  
SD = Standardabweichung

Maus	MSepi	SSepi
21	0,87	0,93
22	1,26	1,58
23	0,98	1,14
24	0,77	1,09
27	1,40	1,92
28	1,23	1,43
29	0,86	1,18
<b>Mittelwert</b>	<b>1,05</b>	<b>1,32</b>
<b>SD</b>	<b>0,22</b>	<b>0,32</b>

**Tabelle 14:** Mittels DWI ermittelte ADC-Werte der Kontrollgruppe.  
Angaben in  $10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s.  
MSepi = Multi Shot Echo Planar Imaging;  
SSepi = Single Shot Echo Planar Imaging;  
SD = Standardabweichung

Beim Multi Shot – Verfahren ergab sich für die Atrasentangruppe ein mittlerer ADC – Wert von  $0,67 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s (KI:  $0,56 - 0,78 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s), beim Single Shot – Verfahren einer von  $0,92 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s (KI:  $0,77 - 1,07 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s).

In der Kontrollgruppe wurden im Multi Shot – Verfahren im Mittel  $1,05 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s (KI:  $0,83 - 1,26 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s) und im Single Shot – Verfahren  $1,32 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s (KI:  $1,01 - 1,64 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s) ermittelt.

Im Student's *t*-Test ergab ein paarweiser Vergleich der Multi Shot – Verfahren (Atrasentan vs Kontrollgruppe) einen p-Wert von  $p = 0,016$ . Der gleiche Vergleich im Single Shot – Verfahren erbrachte einen p-Wert von  $p = 0,034$ .

Beide Werte sind als statistisch signifikant zu erachten.

### 3.4 Bestimmung der VVF mittels Eisenoxidmessungen

Von den untersuchten Mäusen ließen sich letztlich von fünf Atrasentan- und vier Kontrollgruppenmäusen VVF - Werte ermitteln, die in **Tabelle 15** zusammengefasst wurden. Für die Atrasentangruppe ergab sich eine mittlere VVF von 1,3732% (KI: 0,2282 – 2,518 %), für die Kontrollgruppe eine von 2,1956% (KI: 0,01788 – 4,373). Im paarweisen Vergleich ergab sich ein nicht signifikanter p-Wert von  $p = 0,604$ . Es fielen hohe Varianzen innerhalb der beiden Gruppen auf.

<b>Atrasentan</b>	<b>VVF [%]</b>		<b>Kontrolle</b>	<b>VVF [%]</b>
Maus 01	1,0529		Maus 21	3,7794
Maus 02	1,3741		Maus 22	1,8467
Maus 03	2,9539		Maus 23	0,5231
Maus 08	0,7949		Maus 24	2,6330
Maus 09	0,6904			
<b>Mittelwert</b>	<b>1,3732</b>		<b>Mittelwert</b>	<b>2,1956</b>
<b>Median</b>	<b>1,0529</b>		<b>Median</b>	<b>2,24</b>
<b>SD</b>	<b>0,9222</b>		<b>SD</b>	<b>1,369</b>

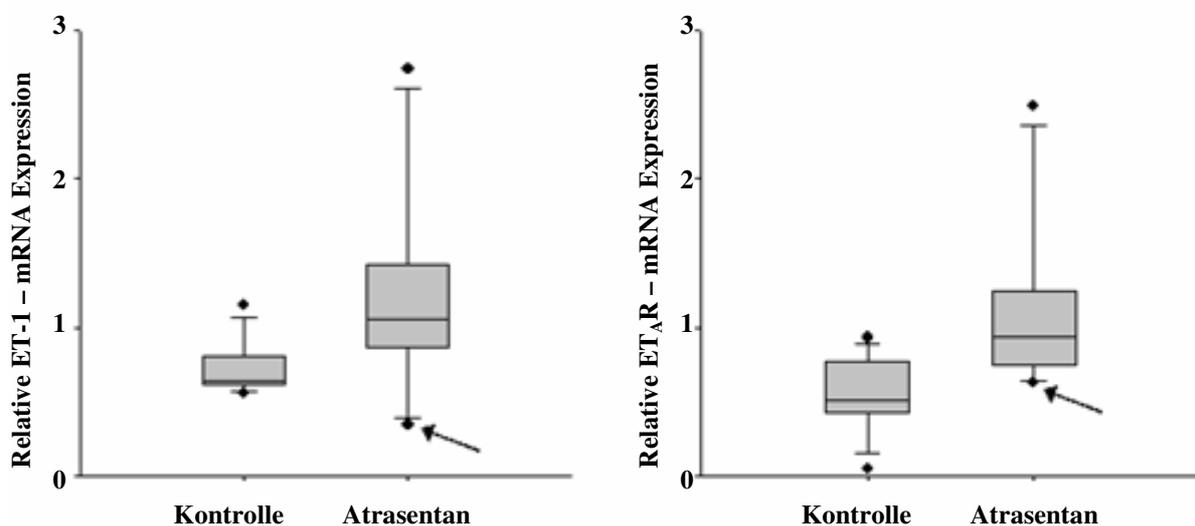
**Tabelle 15:** Ergebnisse der Eisenoxidmessungen zur Bestimmung der vaskulären Volumen Fraktion (VVF). Aufgrund der geringen Anzahl an Mäusen ist neben dem Mittelwert auch der Median angegeben.

### 3.5 RT – PCR

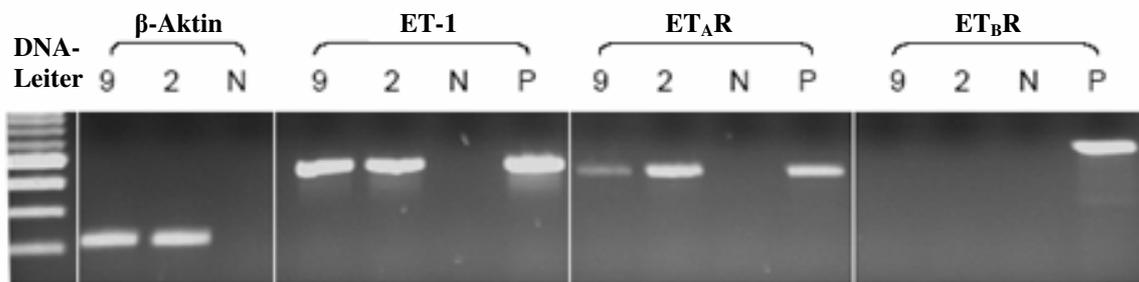
Nach Durchführung der RT-PCR und densitometrischer Analyse unter Verwendung von  $\beta$ -Aktin als *housekeeping Gen* zeigten sich unterschiedliche Werte innerhalb aller Arme bezüglich der ET-1 bzw. ET<sub>A</sub>R – mRNA Expression; ET<sub>B</sub>R - mRNA konnte in keiner der Tumorproben nachgewiesen werden.

Im Vergleich zur Kontrolle zeigten sich innerhalb der Atrasentangruppe signifikant höhere Expressionen von ET<sub>A</sub>R – mRNA ( $p = 0,037$ ). Die mittlere ET-1 – mRNA - Expression hingegen zeigte für die Atrasentangruppe lediglich eine höhere Tendenz ( $p = 0,107$ ) (siehe **Abbildung 28**). Auffällig war die hohe Varianz innerhalb der Atrasentangruppe: sie lag für die ET-1-mRNA – Expression um das Vierfache und für die ET<sub>A</sub>R – Expression um das Zweifache über der Varianz innerhalb der Kontrollgruppe.

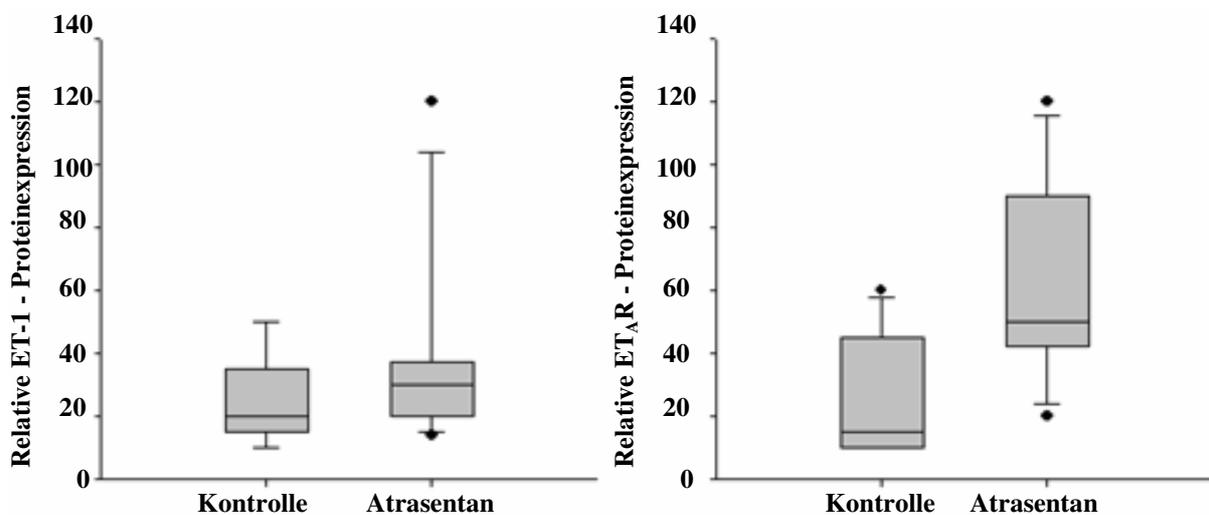
Der Ausreißer, Maus 9, zeigte eine deutlich geringere ET<sub>A</sub>R – Expression als z.B. Maus 2, die ein gutes Therapieansprechen zeigte (siehe **Abbildung 29** der folgenden Seite).



**Abbildung 28:** Darstellung der zur  $\beta$ -Aktin – Probe relativen ET-1 bzw. ET<sub>A</sub>R – mRNA Expression der Atrasentan– und der Kontrollgruppe. Auffällig ist die hohe Varianz innerhalb der Atrasentan-Gruppe. Mit dem Pfeil gekennzeichnet sind die Werte des Ausreissers, Maus 9.  
*Einzelheiten im Text.*



**Abbildung 29:** Expression von ET-1, ET<sub>A</sub>R und ET<sub>B</sub>R – mRNA anhand der Beispiele von Maus 9, Maus 2 und der Positiv-, bzw. Negativkontrollen. Links  $\beta$ -Aktin als *housekeeping*



**Abbildung 30:** Gegenüberstellung der Proteinexpression von ET-1 und ET<sub>A</sub>R für die Kontroll- bzw. Atrasentangruppe. Die Werte ergaben sich aus dem Produkt aus Färbeintensität und prozentalem Anteil eingefärbter Zellen (siehe auch **Kap. 2.3.5**). Auch hier fällt die hohe Varianz der Werte innerhalb der Atrasentangruppe auf.  
Säulen = Mittlere Proteinexpression der jeweiligen Gruppe; Balken = Standardabweichung.

### 3.6 Immunhistochemie

In der Immunhistochemie fanden sich signifikant höhere Expressionen für ET<sub>A</sub>R-Protein in der Atrasentan- im Vergleich

zur Kontrollgruppe (p=0,036).

Für die ET-1 - Proteinexpression fanden sich keine signifikanten

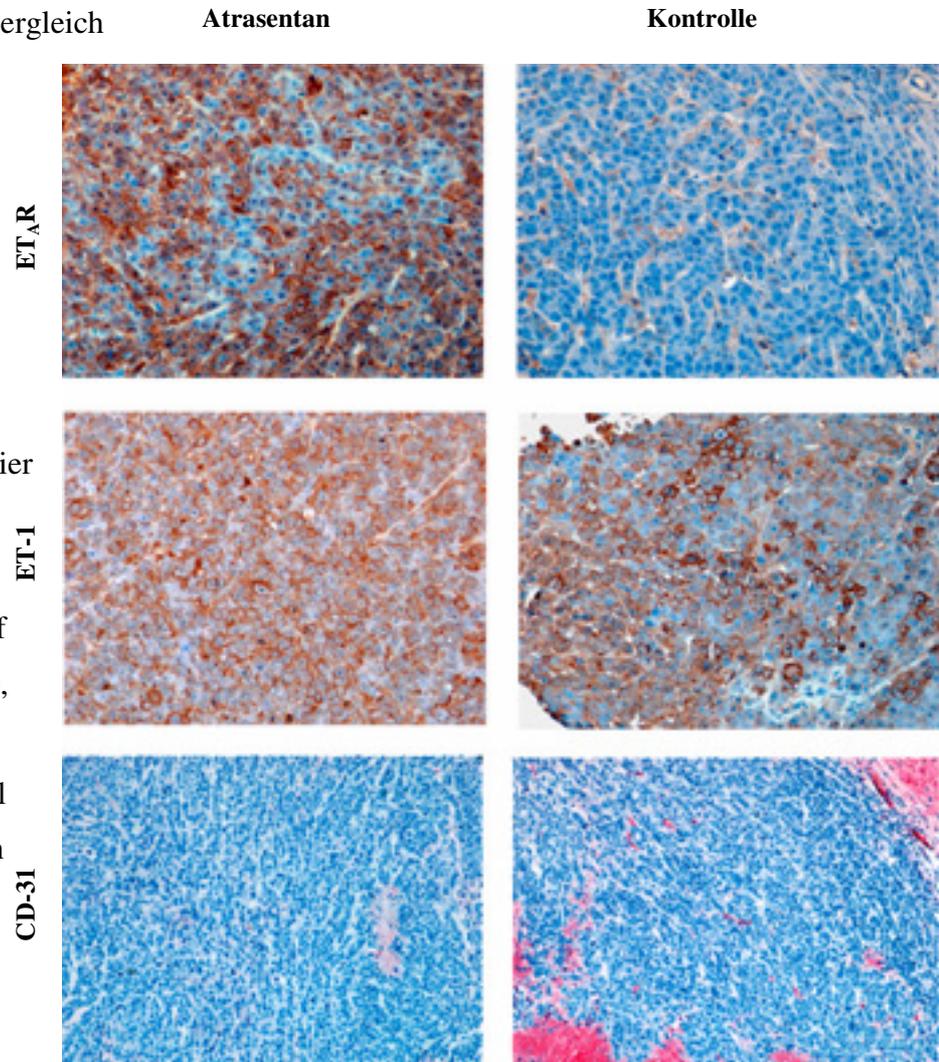
Unterschiede, allerdings fiel auch hier die hohe Varianz der Werte innerhalb der Atrasentangruppe auf (siehe **Abbildung 30**, vorherige Seite).

Für die mit Paclitaxel behandelten Gruppen fanden sich keine erhöhten ET<sub>A</sub>R - Werte.

Nach Analyse der CD-31 -

Färbungen fand sich tendenziell (p = 0,086) eine

deutlich geringere Vaskularisierungsdichte innerhalb der Atrasentangruppe (5,71 +/- 0,97) im Vergleich zur Kontrollgruppe (10,86 +/- 2,58), siehe auch **Abbildung 31**.



**Abbildung 31:** Beispiele für das Färbeverhalten der Gewebeschnitte in den jeweiligen Gruppen. Für ET<sub>A</sub>R zeigt sich eine signifikant höhere Proteinexpression innerhalb der Atrasentangruppe im Vergleich zur Kontrolle. Im Bereich der ET-1 - Proteinexpression finden sich keine signifikanten Unterschiede. Unten ist die CD -31 - Färbung als Marker für Vaskularisierung dargestellt. In der Kontrollgruppe finden sich deutlich mehr Blutgefäße.

### 3.7 Tumorummolumina der zweiten Versuchsreihe

Es wurde eine zweite Versuchsreihe mit  $n = 16$  Mäusen durchgeführt, von denen 8 Mäuse, wie bereits beschrieben (**Kap. 2.1**) eine Atrasentan- und die übrigen 8 lediglich eine Trägerlösung erhielten. Im Unterschied zur ersten Versuchsreihe wurde vom Tag der Implantation an 30 Tage lang therapiert. Die Ergebnisse im Folgenden in tabellarischer Form:

Beh.-Tag Lfd. Nr.	8	11	14	17	20	23	26	30
Maus 1	0	0	0	5,9	17,0	25,0	39,4	30
Maus 2	27,6	21,3	26,3	14,8	27,7	25,7	60,6	47,4
Maus 3	32,5	24,4	25,4	24,3	14,8	13,3	14,1	19,6
Maus 4	0	0	0	0	0	0	0	0
Maus 5	0	0	0	0	0	0	0	0
Maus 6	45,5	32,5	24,4	24,3	21,4	22,3	0	0
Maus 7	0	0	0	0	0	0	0	0
Maus 8	34,4	30	56,4	36,5	45,3	33,6	39,4	37,9
<b>Mittelwert</b>	<b>17,5</b>	<b>13,5</b>	<b>16,6</b>	<b>13,2</b>	<b>15,8</b>	<b>15,0</b>	<b>21,9</b>	<b>19,3</b>
<b>M.-Wert nur T[+]</b>	<b>35,0</b>	<b>27,1</b>	<b>33,1</b>	<b>21,2</b>	<b>25,2</b>	<b>24,0</b>	<b>30,7</b>	<b>33,7</b>

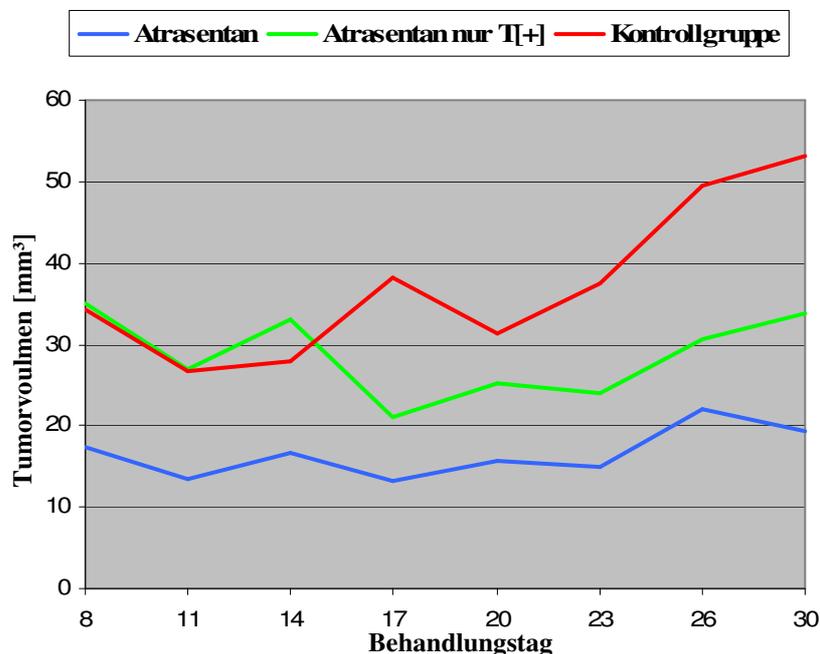
**Tabelle 16:** Tumorummolumina [mm<sup>3</sup>] der zweiten Versuchsreihe innerhalb der mit Atrasentan behandelten Gruppe.

Beh.-Tag Lfd. Nr.	8	11	14	17	20	23	26	30
<b>Maus 9</b>	33,8	38,4	39,4	51,2	18,4	20,4	21,4	14,8
<b>Maus 10</b>	41,0	14,8	22,4	28,4	28,6	36,5	33,6	39,2
<b>Maus 11</b>	62,2	30	38,0	67,0	47,4	64,7	97,8	110,1
<b>Maus 12</b>	20,4	14,0	17,9	20,3	42,5	52,5	91,8	106,7
<b>Maus 13</b>	35,0	35,1	32,5	36,5	30,9	27,6	44,1	44,1
<b>Maus 14</b>	21,9	20,4	15,5	12,1	10,4	13,4	14,1	12,8
<b>Maus 15</b>	35,0	38,0	28,7	60,0	39,2	48,9	56,5	58,6
<b>Maus 16</b>	25,4	22,5	28,6	30,0	32,5	35,1	36,5	37,9
<b>Mittelwert</b>	<b>34,3</b>	<b>26,7</b>	<b>27,9</b>	<b>38,2</b>	<b>31,2</b>	<b>37,4</b>	<b>49,5</b>	<b>53,0</b>

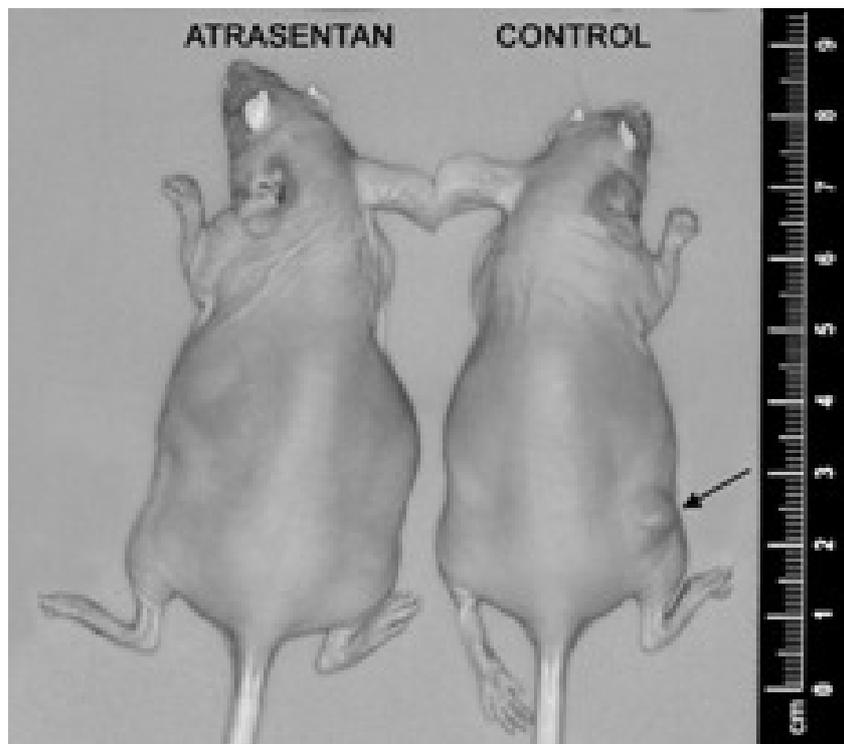
**Tabelle 17:** Tumorummolumina [mm<sup>3</sup>] der zweiten Versuchsreihe innerhalb der Kontrollgruppe.

Nach der ersten Behandlungswoche zeigten alle Mäuse innerhalb der Kontrollgruppe ein erkennbares Tumorwachstum, wohingegen lediglich bei vier der acht mit Atrasentan behandelten Tiere Tumoren erkennbar waren ( $p = 0,021$ ). Nach 18 Behandlungstagen zeigte sich bei einem weiteren mit Atrasentan behandelten Tier ein (verzögertes) Tumorwachstum. In der Atrasentangruppe lag das mittlere Tumorumfugen über den Verlauf der gesamten Therapiedauer bei  $16,6 \pm 1 \text{ mm}^3$ ; in der Kontrollgruppe bei  $37,3 \pm 3,4 \text{ mm}^3$ . Dieser Unterschied zugunsten der Atrasentangruppe was statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ). Selbst wenn die Mäuse in der Atrasentangruppe, die überhaupt keinen Tumor entwickelten, herausgerechnet wurden, zeigte sich weiterhin ein statistisch signifikanter Unterschied mit signifikant kleineren Tumorumfugen in der Atrasentangruppe:  $28,8 \pm 1,8 \text{ mm}^3$  versus  $37,3 \pm 3,4 \text{ mm}^3$ . ( $p = 0,043$ ) (siehe **Abbildung 32**).

In **Abbildung 33** sind repräsentativ für diese Versuchsreihe zwei Mäuse aus den jeweiligen Behandlungsarmen dargestellt, von denen nur die Maus der Kontrollgruppe ein deutliches Tumorwachstum zeigt.



**Abbildung 32:** Mittlere Tumorumfugen nach Auswertung der zweiten Versuchsreihe mit insgesamt 16 Mäusen. Atrasentan zeigte ein signifikant geringeres Tumorwachstum als es in der Kontrollgruppe vorzufinden war. Auch nach Herausnahme der Mäuse, die keinen Tumor entwickelten blieb das mittlere Tumorwachstum signifikant geringer.



**Abbildung 33:** Beispiel für eine mit Atrasentan (links) und eine mit Kontrollösung behandelte Maus. Der Pfeil zeigt auf den Tumor in der rechten Flanke der Maus.

## 4 Diskussion

### 4.1 Bedeutung der Endothelinachse

Die Endothelinachse war 1988 zunächst aufgrund ihrer vasokonstriktorischen Eigenschaften entdeckt worden (siehe **Kap. 1.4**). In den letzten Jahren ist die ET-Achse auch in den Fokus des Interesses der onkologischen Forschung gerückt, da der ET<sub>A</sub> – Rezeptor von verschiedenen Malignomen (u.a. vom Ovarial-, Prostata-, Nierenzell-, Kolon- und Cervixkarzinom) überexprimiert wird und ein potenzielles *Target* für die zielgerichtete molekulare Krebstherapie darstellt. Auch beim Mammakarzinom findet sich eine signifikant stärkere ET<sub>A</sub>R Expression als in benignem Brustgewebe (siehe **Kap. 1.4.7 und 1.4.8**). Beim Mammakarzinom korreliert die ET<sub>A</sub>R Expression mit einer schlechteren Prognose und einer Chemotherapieresistenz [456, 460].

Eine grundsätzliche Frage der Angiogeneseforschung ist, inwieweit sich Tumoren *in vivo* durch Blockade der Gefäßversorgung bekämpfen lassen. Schlüsselfaktoren dabei sind VEGF und HIF sowie weitere Wachstumsfaktoren (siehe **Kap. 1.3.3**). Dabei spielt die Endothelinachse offenbar eine große Rolle: Sowohl eine direkte als auch eine indirekte (vornehmlich über VEGF vermittelte) Beeinflussung der Angiogenese durch die ET-Achse sind bekannt (siehe **Kap. 1.4.6**).

Es sind eine Vielzahl von ET-Rezeptor-Antagonisten entwickelt worden, die die Endothelinrezeptoren selektiv oder unselektiv hemmen (siehe **Kap. 1.4.10**). Einer der selektiven ET<sub>A</sub>R-Antagonisten ist das Atrasentan: Atrasentan hemmt selektiv den ET<sub>A</sub>R und zeigt vielversprechende antitumorale Effekte sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* (siehe **Kap. 1.4.10.3**). Der besondere Vorteil des Atrasentans im Hinblick auf einen potenziellen klinischen Einsatz als Krebstherapie liegt in einem verhältnismäßig günstigen Nebenwirkungsprofil (siehe **Kap. 1.4.10.3**) und der oralen Einnahmemöglichkeit. Zwar wurde 2005 ein Antrag auf Zulassung zur Therapie des hormonrefraktären Prostatakarzinoms von der FDA abgelehnt; weitere Studien stehen allerdings noch aus (siehe **Kap.1.4.10.3.2**).

Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführte *in vivo*-Studie untersucht den Stellenwert einer anti-ET<sub>A</sub>R-Therapie beim Mammakarzinom. Unsere Ergebnisse weisen auf die antitumorale Effektivität von ET<sub>A</sub>R-Antagonisten, respektive Atrasentan, beim Mammakarzinom hin.

## 4.2 Ergebnisse

### 4.2.1 Tumorumina der ersten Versuchsreihe

In einer ersten Versuchsreihe haben wir mit der antitumoralen Therapie am 10. Tag begonnen. Bei diesem Setting zeigte sich, dass besonders initial (bei der ersten Messung der Tumorumina an Tag 7 nach Therapiebeginn) die mittleren Tumorumina in der Atrasentangruppe deutlich geringer als in den übrigen Therapiegruppen waren: Das mittlere Tumorumin in der Atrasentangruppe lag am ersten Meßtag bei 55,4 mm<sup>3</sup>; in der Kontrollgruppe bei 94,3 mm<sup>3</sup> und in der Paclitaxel- und Kombinationsgruppe bei 61,4 mm<sup>3</sup> bzw. 78,2 mm<sup>3</sup>. Das Tumorumin in der Atrasentangruppe lag initial also um ca. 40% niedriger als in der Kontrollgruppe.

Diese starke initiale Wirksamkeit des Atrasentans ließ jedoch relativ betrachtet im weiteren Therapieverlauf etwas nach: Betrachtet man an dieser Stelle noch einmal **Abbildung 23**, so fällt der massive Anstieg der mittleren Tumorumina von Tag 19 auf Tag 22 der Therapie innerhalb der Atrasentangruppe auf. Ein zweiter starker Anstieg lässt sich von Tag 28 auf Tag 31 ausmachen, so dass das mittlere Tumorumin der Atrasentangruppe letztlich annähernd das Niveau der Kontrollgruppe erreicht. Die mittleren Tumorumina der Kontrollgruppe hingegen zeigt zu Beginn der Behandlung einen stetigen Zuwachs, stagniert etwas zwischen Tag 19 und 25 und steigt zum Ende hin wieder weiter an.

Die Paclitaxelgruppe zeigt zunächst ein leichtes Ansteigen und ab der Hälfte der Therapiedauer einen deutlichen Abfall des Tumorumins. Insgesamt stellte sich das Zytostatikum Paclitaxel als effektivste antitumorale Therapie in dieser Studie heraus: Die Volumenreduktion betrug im Vergleich zur Kontrollgruppe fast 60%.

Eine ähnliche Effektivität erreichte die Kombinationstherapie aus Paclitaxel und Atrasentan. Ein additiver Effekt durch die Kombination von Zytostatikum und ET<sub>A</sub>R-Antagonisten, wie er aus anderen Studien im Bereich von Cervix- und Ovarialkarzinomen beschrieben wurde ([18, 347] siehe **Kap. 1.4.10.3**), konnte in unserer Studie nicht festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass Atrasentan durch seine antiangiogenetischen Eigenschaften die Anreicherung von Paclitaxel im Tumorgewebe behinderte.

Wodurch ist jedoch der plötzliche deutliche Tumoruminanstieg innerhalb der Atrasentangruppe gegen Ende der Therapiedauer zu erklären? Nach genauer Betrachtung der Meßwerte (**Abbildung 24**) fällt die massive Tumorzunahme von Maus 9 auf: Zu keinem

Zeitpunkt zeigte sie ein Ansprechen auf die Therapie. Wir vermuteten, dass diese Maus tatsächlich therapieresistent für eine ET<sub>A</sub>R – Antagonisten – Behandlung sein müsste und führten weitere statistische Analysen ohne die Volumina dieses Ausreissers durch. Daraufhin ließ sich das Diagramm aus **Abbildung 25** erstellen: Von Tag 7 bis 13 stagnieren die mittleren Tumorumfänge und zeigen sogar eine Tendenz zum Rückgang; die anschließend einsetzende Zunahme fällt wesentlich weniger steil aus als unter Mitberücksichtigung von Maus 9. Nach 31 Therapietagen zeigt die Atrasentangruppe ein mittleres Volumen von  $73.8 \pm 5.3 \text{ mm}^3$ , die Kontrollgruppe eines von  $136.2 \pm 7.0 \text{ mm}^3$  ( $p < 0.001$ ), was einer Volumenreduktion von ca. 45% entspricht. Die Therapieresistenz von Maus 9 legte die Vermutung nahe, dass diese Maus möglicherweise eine geringere ET<sub>A</sub>R – Expression haben könnte, so dass die zielgerichtete Therapie in diesem Fall unter ungünstigen Voraussetzungen stattgefunden hätte. Diese Hypothese wurde sowohl immunhistochemisch als auch mittels RT-PCR bestätigt: Im Vergleich zur mittleren ET<sub>A</sub>R-Expression in den Tumoren der Atrasentangruppe fanden sich im Tumor der Maus 9 signifikant geringere ET<sub>A</sub>R – Werte (siehe Abb. **Abbildung 29**). Somit lagen bei Maus 9 weniger Bindungsmöglichkeiten für Atrasentan vor.

#### 4.2.2 RT-PCR

Hinsichtlich der ET<sub>A</sub>R – mRNA – Expression fielen verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant höhere Konzentrationen bei der Atrasentangruppe auf ( $p = 0,037$ ); auch die Varianz der ET<sub>A</sub>R – mRNA und der Protein – Expression war viel stärker ausgeprägt (siehe **Abbildung 29** und **Abbildung 30**). Eine mögliche Begründung für diese Beobachtung könnte eine kompensatorische Hochregulierung von ET<sub>A</sub> – Rezeptoren als Reaktion auf die medikamentöse Antagonisierung sein. Ein solches Phänomen ist z.B. auch für Opioidrezeptoren bekannt: Eine chronische Antagonisierung, z.B. mittels Naloxon, führt zu einer Hochregulierung von Opioidrezeptoren, was sich in einer gesteigerten Wirksamkeit für Opioide nach Absetzen der Antagonisierung zeigt [467].

Da in der vorliegenden Arbeit die Mäuse mit hohen ET<sub>A</sub>R – Konzentrationen aber gut auf die Therapie ansprachen, lassen sich folgende Schlüsse ziehen: 1) Die Dosis von 10 mg / kg KG war therapeutisch trotz Hochregulierung ausreichend; 2) Tumoren mit einer niedrigen ET<sub>A</sub>R – Dichte zeigen ein eher geringes bis gar kein Ansprechen auf eine entsprechende Antagonisierung. Somit ist von einer Art Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Rezeptordichte und therapeutischem Ansprechen auszugehen: je mehr Target, desto wirksamer die zielgerichtete Therapie.

### 4.2.3 DWI

Die Ergebnisse der diffusionsgewichteten MRT (DWI) (siehe **Kap. 3.3**) sind zunächst nicht schlüssig: Die Atrasentangruppe erreicht mit einem mittleren ADC – Wert von  $0,67 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$  im Multi Shot Verfahren, bzw.  $0,92 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$  im Single Shot Verfahren eine signifikant niedrigere Wassermobilität als die Kontrollgruppe, die im Multi Shot – Verfahren  $1,05 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$  und im Single Shot Verfahren  $1,32 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$  erreichte ( $p = 0,016$  bzw.  $0,034$ ). Wie in **Kapitel 2.3.2** beschrieben, sprechen die signifikant höheren ADC – Werte der Kontrollgruppe für eine höhere Wassermobilität innerhalb des Tumors im Vergleich zur Atrasentangruppe. Eigentlich hätte man aber höhere ADC – Werte für die Behandlungsgruppe erwartet, da eine höhere Wassermobilität für das Vorliegen von Nekrosen und somit für den Therapieerfolg spräche. *Ross et al.* [350] bezeichnen in einem simplifizierten Bild den ADC – Wert als umgekehrt proportional zur Zellularität:  $ADC = \frac{1}{Z}$ , wobei Z die „Zellularität“, also die Zelldichte darstellt. In diesem Modell gilt somit, dass eine Abnahme der zellulären Dichte, wie sie bei Nekrotisierungen und Apoptosen erfolgt, zu einer Erhöhung des ADC – Wertes führt. Auch im Hinblick auf das gute therapeutische Ansprechen des Atrasentans (s. Tumorumlumina) hätte man unter der Atrasentantherapie eigentlich eine höhere Nekrose rate und somit höhere ADC-Werte erwartet. Hier sind die folgenden Hypothesen zu diskutieren: 1) Laut *Baur et al.* [28] und *Latour et al.* [248] setzt sich die Wassermobilität eben nicht nur aus der extrazellulären Komponente, also „freiem Wasser“, sondern ebenso aus der Perfusionskomponente zusammen.

Legt man diese Theorie zugrunde, könnte der höhere ADC – Wert der Kontrollgruppe also auch durch eine gesteigerte Perfusion bedingt sein, die ja in der Atrasentangruppe geringer ausgeprägt ist (MVD Atrasentan:  $5,71 \pm 0,97$ ; MVD Kontrolle:  $10,86 \pm 2,58$ ).

Da nicht klar ist, inwieweit wirklich die Nekrose oder die Perfusion der Tumoren entscheidend für die ADC – Werte ist, müsste man somit die Methode der DWI für den Kontext dieser Studie als ungeeignet bezeichnen.

2) Bei der Auswertung der DWI konnten innerhalb der Atrasentangruppe die Tumorumlumina dreier Mäuse nicht bestimmt werden (Maus 4,6,7), da die sehr kleinen Tumoren nicht gegenüber dem umgebenden Gewebe abgegrenzt werden konnten.

Es handelte sich bei diesen Mäusen aber ja gerade um diejenigen, bei denen besonders geringe Tumorumlumina und somit ein gutes therapeutisches Ansprechen vorlagen (s.a.

**Tabelle 9).** So wurden also nur die Tumoren erfasst, die etwas größer waren und daher möglicherweise nicht in so großem Maße von der Therapie profitierten wie die kleinen Tumoren.

3) Die Tumoren der Kontrollgruppe waren größer. Innerhalb der Tumoren könnten sich aufgrund des starken Wachstums bereits Nekroseherde ausgebildet haben.

Dieser Ansatz würde die These stützen, dass Atrasentan besser geeignet zu sein scheint, Tumoren von vornherein am Wachstum zu hindern, als bereits größere Tumore verkleinern zu können.

#### 4.2.4 VVF mittels Eisenoxiddmessung

Bei Betrachtung der VVF-Mittelwerte kann zunächst von einer Bestätigung des Therapieerfolges gesprochen werden: Die Kontrollgruppe hat demnach eine mittlere VVF von 2,2 %, die Atrasentangruppe eine von 1,37%. Die Dichte an Blutgefäßen innerhalb der Tumore der Atrasentangruppe erreicht somit nur ca. 60% der Dichte der Kontrollgruppe (siehe auch **Tabelle 15**).

Dies spricht zunächst für einen Therapieerfolg des Atrasentans. Allerdings: Bei genauer Analyse fällt eine gewisse Inkohärenz dieser Daten mit den ermittelten Tumorumfängen auf: So zeigt die Maus 3 am letzten Therapietag ein Tumorumfang von lediglich 123 mm<sup>3</sup> auf, hat allerdings eine VVF von 2,95%. Hingegen zeigen die Mäuse 8 und 9, die ja aufgrund überproportionalen Wachstums teilweise ausgeschlossen wurden, recht niedrige VVF – Werte von weit unter 1%. In der Kontrollgruppe hingegen sind die Resultate nachvollziehbar: Die Mäuse mit großen Tumoren von >240mm<sup>3</sup>, also Maus 21, 22 und 24, haben recht hohe Werte, worunter Maus 21 mit mehr als 3% VVF hervorsticht.

Maus 23 hingegen hat eine VVF von 0,52% und ein Tumorumfang von lediglich 92 mm<sup>3</sup>. Statistisch zeigten sich somit die VVF der beiden Gruppen auch als nicht signifikant ( $p = 0,6$ ). Mögliche Fehlerquellen könnten zum einen die relativ geringe Anzahl von Tieren, die erfolgreich untersucht bzw. ausgewertet wurden, darstellen: Schon die invasiven Maßnahmen wie z.B. das Legen des Jugulariskatheters verliefen nicht bei jeder Maus so günstig, dass anschließend die recht langwierige Untersuchung immer überstanden wurde. Auch die Auswertung der bildgebenden Daten erwies sich als teilweise schwierig: Bei sehr kleinen Tumoren war die Abgrenzung zu gesundem Gewebe nicht immer klar gegeben. Es waren also letztlich relativ wenig Tumoren evaluierbar.

In zukünftigen Untersuchungen sollte also von vornherein eine größere Zahl von Mäusen mittels Eisenoxiddmessung untersucht werden, um Meßfehler gering zu halten. Auch muss man aus unseren Beobachtungen zu dem Schluss kommen, dass sich das Verfahren in der angewandten Form nur dazu eignet, um größere (>100mm<sup>3</sup>) Tumoren zu untersuchen. Die kleineren Tumoren sind allesamt meist nur schwer abgrenzbar, so dass es leicht zu Fehlern kommen kann.

#### 4.2.5 Tumorumina der zweiten Versuchsreihe

Aufgrund der Tatsache, dass die Atrasentanbehandlung insbesondere initial, respektive in den ersten Wochen nach Therapiebeginn eine besonders viel versprechende antitumorale Wirkung zeigte, wurde in einer zweiten Versuchsreihe der Effekt eines noch frühzeitigeren Therapiebeginns auf das Tumorstadium untersucht. In dieser Serie wurde mit der Therapie bereits am Tag der s.c. Tumorzell-Implantation begonnen, während im ersten Versuch der Therapiebeginn 10 Tage später war.

Bei diesem Vorgehen entwickelte die Hälfte der Mäuse, die mit Atrasentan behandelt wurden, tatsächlich zunächst überhaupt keinen Tumor. Nach 18 Tagen zeigte eine Maus allerdings ein verzögertes Tumorstadium, so dass letztlich 3 Mäuse über die gesamte Therapiezeit von 31 Tagen hinweg tumorfrei blieben. Bei den Tieren aus der Atrasentangruppe, bei denen trotz Therapie zwar ein Tumor entstanden war, zeigten sich jedoch ebenfalls signifikante antitumorale Effekte mit deutlich kleineren Tumorumina als in der Kontrollgruppe (28,7 mm<sup>3</sup> versus 37,27 mm<sup>3</sup>; p = 0,043). Diese Daten deuten darauf hin, dass eine frühzeitige anti-ET<sub>A</sub>R-Therapie mit Atrasentan möglicherweise die Implantation von Tumorzellen und das nachfolgende Anwachsen der Tumoren verhindern kann. Übertragen auf potenzielle klinische Anwendungsmöglichkeiten würde dieses Modell am ehesten der adjuvanten Therapie, bei der es ja u.a. um das Verhindern des Anwachsens okkult disseminierter Tumorzellen geht, entsprechen.

Die beobachteten v.a. frühzeitigen antitumoralen Effekte sind möglicherweise auch auf die antiangiogenetischen Wirkungen des Atrasentans zurück zu führen. Grundsätzlich wird der entscheidende Schritt bei der Tumorstadium auch von anderen Autoren in sehr frühen Stadien der Krebsentstehung gesehen; ist der „angiogenetische Switch“ erst einmal eingeschaltet, wird es schwierig bis unmöglich, ihn über einen einzelnen Weg wieder auszuschalten [169, 170, 177].

### 4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die anti-ET<sub>A</sub>R-Therapie mit dem selektiven ET<sub>A</sub>R-Antagonisten Atrasentan das Tumorwachstum der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 *in vivo* signifikant verlangsamt und bei frühzeitigem Therapiebeginn z.T. ganz verhindert werden konnte. Die besten antitumoralen Ergebnisse wurden bei frühzeitiger Gabe, respektive bei Therapiebeginn am Tag der Tumorzell-Implantation, erzielt. Diese Beobachtung würden wir am ehesten auf eine Hemmung der Invasivität der Tumorzellen zurück führen. Diese These deckt sich mit Erkenntnissen *Smollich's und Wülfing's* [387]. Die Arbeitsgruppe konnte zunächst, wie in **Kap. 1.4.6.2** beschrieben, *in vitro* zeigen, dass unter dem Einfluss von Hypoxie verstärkt ET-1 ausgeschüttet wird, was zur verstärkten Invasion der dort beobachteten MCF-7-Zellen führt. Durch Zugabe des ET<sub>A</sub>R-Antagonisten Atrasentan lässt sich die hypoxievermittelte Induktion der Zellinvasion vollständig aufhalten. Somit wäre ein möglichst frühzeitiger Einsatz von ET<sub>A</sub>R-Antagonisten sinnvoll, noch vor der Zellinvasion. Diese und unsere Ergebnisse sind im Einklang mit den *ex vivo* bzw. *in vitro* Daten anderer Arbeitsgruppen. So vermuteten *Yamashita et al.* [461], wie in **Kapitel 1.4.6.2** beschrieben, dass ET-1 in einem sehr frühen Stadium eine Rolle bei der Kanzerogenese spielen müsse. *Grimshaw et al.* [159-161] beschrieben in diesem Zusammenhang die Förderung der Invasionsfähigkeit von Karzinomzellen unter ET-1 – Einfluss (**Kapitel 1.4.7**). Die Ergebnisse unserer eigenen Arbeitsgruppe um *P. Wülfing et al.* [454-456, 458] bestätigten die genannten Beobachtungen beim Mammakarzinom *in vitro* und *in vivo*: Die Endothelinachse wird in frühen Invasionsstadien bereits auf hohem Niveau exprimiert, in späteren Stadien erfolgt keine Zunahme der Rezeptordichte. Möglicherweise ist die besonders frühzeitige Wirkung des Atrasentans u.a. auf die antiangiogenetischen Eigenschaften des ET<sub>A</sub>R-Antagonisten zurück zu führen. Denkbar ist beispielsweise, dass der „angiogenetische Switch“ durch Atrasentan verzögert „eingeschaltet“ wird. Ist dieser jedoch bereits aktiviert, kommen zahlreiche Angiogenesestimulatoren und – faktoren zum Tragen. Eine alleinige Blockade der Endothelinachse könnte dann für einen signifikanten antitumoralen Effekt nicht mehr ausreichend sein. Eine denkbare Option für den Einsatz von ET<sub>A</sub>R-Antagonisten zu späteren Zeitpunkten der Tumorentstehung könnte die Kombination zahlreicher Angiogeneseinhibitoren sein, die an den verschiedenen „Hebelpunkten“ der Gefäßneubildung ansetzen und somit additive Effekte erzielen könnten.

In weiteren *in vivo* Studien sollte nun die antitumorale Wirkung unterschiedlicher Dosierungen des Atrasentans untersucht werden. Ferner sollte die Kombination von ET<sub>A</sub>R-

---

---

Antagonisten und anderen *targeted therapies* (z.B. die Kombination mit einer anti-VEGF-Therapie mit z.B. Bevacizumab) untersucht werden.

Hinsichtlich einer möglichen klinischen Anwendung von Atrasentan ist nach den vorliegenden Daten – sollten sie sich in späteren Studien bestätigen – am ehesten an einen Einsatz im Rahmen der adjuvanten Therapie nach Mammakarzinomerkrankung zu denken, um das „Anwachsen“ von Metastasen zu verhindern. Dies deckt sich mit den Beobachtungen um z.B. *Kojima et al* [230] und *Wülfing et al.* [456], die ja beide die Relevanz der Endothelinachse in Bezug auf die Metastasierung des Mammakarzinoms unterstreichen (Siehe **Kapitel 1.4.7**). Im Hinblick auf eine erhöhte Chemoresistenz bei ET<sub>A</sub>R – Überexpression der Tumoren (*Wülfing et al.* [460], **Kap. 1.4.7**) sollte auch die Kombination einer anti-ET<sub>A</sub>R-Therapie mit den etablierten Polychemotherapien weiter untersucht werden. Möglicherweise könnte durch die Zugabe eines ET<sub>A</sub>R – Antagonisten die Wirksamkeit der Chemotherapie erhöht werden.

Ein interessanter Ansatzpunkt im Bereich der Endothelinachse wurde für MCF-7-Mammakarzinomzellen durch *Smollich et al.* untersucht [388]: Anstatt ET<sub>A</sub>R zu antagonisieren, wird bereits die Synthese für ET-1 gestört, indem ein ECE-1<sup>\*</sup>-Antagonist (RO 67-7447) eingesetzt wird. Tatsächlich reduziert der ECE-1-Antagonist über eine Hemmung der Synthese von ET-1 die Invasionsrate von MCF-7-Zellen.

Weitere Hoffnung macht auch die Weiterentwicklung anderer ET<sub>A</sub>R-Antagonisten. Besonders gute Ergebnisse liegen im Bereich des *spezifischen* ET<sub>A</sub>R-Antagonisten ZD4054 vor. Wie bereits in **Kap. 1.4.10.4** beschrieben wird unter ZD4054-Monotherapie beim metastasierten Prostatakarzinom ein *Gesamtüberlebensvorteil* erzielt [203], was unter der Behandlung mit Atrasentan als Monotherapie nicht gelang (siehe **Kap. 1.4.10.3.2**). Als mögliche Ursache kommt die ET<sub>B</sub>R-Antagonisierung durch Atrasentan in Betracht, womit sowohl proapoptische Effekte verhindert werden, als auch die ET-1-Clearance gehemmt wird [163].

Die Arbeitsgruppe um *Wülfing et al.* untersuchte im Rahmen einer *in vitro*-Studie als erste den Einfluss von ZD4054 auf die Expression der Endothelinachse und auf das Invasionsverhalten der Mammakarzinomzelllinien MCF-7, MDA-MB-231 und MDA-MB-468 [459]. ZD4054 bewirkt dabei eine signifikante, dosisabhängige Reduktion der Synthese von ET-1-, ETAR- und ECE-1-mRNA. Außerdem werden Migrations- und Invasionsfähigkeit der untersuchten Zelllinien signifikant vermindert.

---

\* ECE-1 = Endothelin-converting enzyme-1

Bei Kombination mit Aromatasehemmern wie Letrozol oder Anastrozol oder mit dem Östrogen-Antagonisten Fulvestrant verstärkten sich Migrations- und Invasionsabnahme noch zusätzlich.

#### 4.4 Schlusswort

Kürzlich titelte das „Time“ – Magazin: „Warum Brustkrebs die Welt erobert“ (siehe **Abbildung 34**). Die Autorin bezeichnet darin die zukünftige Entwicklung von Prävalenz,



**Abbildung 34:** „Warum Brustkrebs die Welt erobert“

*Time Mag. 10/2007 [217]*

Mortalität und Letalität des Mammakarzinoms etwas drastisch als „globale Brustkrebskrise“ [217].

Populär geschrieben, in der Einschätzung aber korrekt: Das Mammakarzinom wird sich aller Voraussicht nach weiter ausbreiten, gerade auch in den heutigen Schwellenländern.

Diese Entwicklung macht die Suche nach neuen Wirkstoffen und Therapieansätzen – vom heutigen Stand der Dinge abgesehen – nur umso wichtiger.

Dabei werden sich sicher nicht alle Mammakarzinome mittels zielgerichteter oder antiangiogenetischer Medikamente bekämpfen lassen können. Dafür sind die verschiedenen Tumoren bekanntermaßen viel zu heterogen.

Vielleicht wird man aber in (hoffentlich) nicht allzu ferner Zukunft „maßgeschneiderte“ Therapien

anbieten können, die einen sehr differenzierten Hormon- und Angiogenesefaktoren – Rezeptorstatus des jeweiligen Tumors als Grundlage haben werden. Die Studien zu ZD4054, aber auch zu anderen „targeted therapies“ geben Anlass zur Hoffnung.

Möglicherweise wird man dann eines Tages dazu übergehen, ganz gezielt mehrere Angiogeneseinhibitoren, endokrine Therapien und Chemotherapeutika miteinander zu kombinieren und somit dieser leider so häufigen multimodalen Erkrankung multimodal begegnen.

## 5 Literaturverzeichnis

- [1] Abbott Laboratories - briefing document. "XINLAY(TM) (atrasentan hydrochloride) - oncologic drugs advisory committee (ODAC) briefing document - Treatment of patients with hormone-refractory prostate cancer metastatic to bone". Illinois, N.J., **2005**.
- [2] Abbott Laboratories - Press Release. "FDA Advisory Committee Does Not Recommend Approval of Xinlay(TM) (Atrasentan)". Abbott Park, Illinois: Abbott Laboratories, **2005**.
- [3] Achat H, Kawachi I, Byrne C, Hankinson S, Colditz G. A prospective study of job strain and risk of breast cancer. **Int J Epidemiol** **2000**; *29* (4): 622-8.
- [4] Aebbersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. **Cancer Res** **2001**; *61* (7): 2911-6.
- [5] AGO - Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie KM. Diagnostic And Treatment Of Patients With Primary And Metastatic Breast Cancer. **2007**.
- [6] Ahmed SI, Thompson J, Coulson JM, Woll PJ. Studies on the expression of endothelin, its receptor subtypes, and converting enzymes in lung cancer and in human bronchial epithelium. **Am J Respir Cell Mol Biol** **2000**; *22* (4): 422-31.
- [7] Akimoto M, Hashimoto H, Maeda A, Shigemoto M, Yamashita K. Roles of angiogenic factors and endothelin-1 in gastric ulcer healing. **Clin Sci (Lond)** **2002**; *103* Suppl 48: 450S-454S.
- [8] Alanen K, Deng DX, Chakrabarti S. Augmented expression of endothelin-1, endothelin-3 and the endothelin-B receptor in breast carcinoma. **Histopathology** **2000**; *36* (2): 161-7.
- [9] Albrektsen G, Heuch I, Hansen S, Kvale G. Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects. **Br J Cancer** **2005**; *92* (1): 167-75.
- [10] Allemani C, Sant M, Berrino F, Aareleid T, Chaplain G, Coebergh JW, Colonna M, Contiero P, Danzon A, Federico M, *et al.* Prognostic value of morphology and hormone receptor status in breast cancer - a population-based study. **Br J Cancer** **2004**; *91* (7): 1263-8.
- [11] Anand I, McMurray J, Cohn JN, Konstam MA, Notter T, Quitzau K, Ruschitzka F, Luscher TF. Long-term effects of darusentan on left-ventricular remodelling and clinical outcomes in the EndothelinA Receptor Antagonist Trial in Heart Failure (EARTH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet** **2004**; *364* (9431): 347-54.
- [12] Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. **Nature** **1990**; *348* (6303): 730-2.
- [13] Arbuck SG, Dorr A, Friedman MA. Paclitaxel (Taxol) in breast cancer. **Hematol Oncol Clin North Am** **1994**; *8* (1): 121-40.
- [14] Arenillas JF, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Rosell A, Molina CA, Rovira A, Ribo M, Sanchez E, Quintana M. Angiogenesis in symptomatic intracranial atherosclerosis: predominance of the inhibitor endostatin is related to a greater extent and risk of recurrence. **Stroke** **2005**; *36* (1): 92-7.
- [15] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. **Circ Res** **1999**; *85* (3): 221-8.
- [16] AstraZeneca. ZD4054 information to support

Pre-clinical Studies: AstraZeneca, pp. 7, **2005**.

- [17] Aulmann S, Penzel R, Schirmacher P, Sinn HP. [Lobular carcinoma in situ (LCIS): risk factor and precursor of invasive lobular breast cancer]. **Verh Dtsch Ges Pathol** **2007**; *91*: 208-13.
- [18] Bagnato A, Cirilli A, Salani D, Simeone P, Muller A, Nicotra MR, Natali PG, Venuti A. Growth inhibition of cervix carcinoma cells in vivo by endothelin A receptor blockade. **Cancer Res** **2002**; *62* (22): 6381-4.
- [19] Bagnato A, Rosano L, Di Castro V, Albini A, Salani D, Varmi M, Nicotra MR, Natali PG. Endothelin receptor blockade inhibits proliferation of Kaposi's sarcoma cells. **Am J Pathol** **2001**; *158* (3): 841-7.
- [20] Bagnato A, Salani D, Di Castro V, Wu-Wong JR, Tecce R, Nicotra MR, Venuti A, Natali PG. Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth. **Cancer Res** **1999**; *59* (3): 720-7.
- [21] Bagnato A, Spinella F. Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis. **Trends Endocrinol Metab** **2003**; *14* (1): 44-50.
- [22] Bagnato A, Tecce R, Moretti C, Di Castro V, Spergel D, Catt KJ. Autocrine actions of endothelin-1 as a growth factor in human ovarian carcinoma cells. **Clin Cancer Res** **1995**; *1* (9): 1059-66.
- [23] Balsiger B, Rickenbacher A, Boden PJ, Biecker E, Tsui J, Dashwood M, Reichen J, Shaw SG. Endothelin A-receptor blockade in experimental diabetes improves glucose balance and gastrointestinal function. **Clin Sci (Lond)** **2002**; *103* Suppl 48: 430S-433S.
- [24] Barnes PJ. Endothelins and pulmonary diseases. **J Appl Physiol** **1994**; *77* (3): 1051-9.
- [25] Barst RJ. A review of pulmonary arterial hypertension: role of ambrisentan. **Vasc Health Risk Manag** **2007**; *3* (1): 11-22.
- [26] Barst RJ, Langleben D, Badesch D, Frost A, Lawrence EC, Shapiro S, Naeije R, Galie N. Treatment of pulmonary arterial hypertension with the selective endothelin-A receptor antagonist sitaxsentan. **J Am Coll Cardiol** **2006**; *47* (10): 2049-56.
- [27] Bauerfeind I, vBF, Eiermann W., Euler U., Harbeck N., von Koch F., Höß C., Kuchenbauer F. LA, Lombardo M., Rutke S., Salat C., Schaffer P., Untch M., Wolf C. W-HA. Aus: MANUAL Mammakarzinome: "Primär systemische Therapie". *Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München, München 2005*.
- [28] Baur A, Reiser MF. Diffusion-weighted imaging of the musculoskeletal system in humans. **Skeletal Radiol** **2000**; *29* (10): 555-62.
- [29] Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, Yanagisawa M. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. **Cell** **1994**; *79* (7): 1277-85.
- [30] BD Biosciences. Driving Cellular Communications - Purified Extracellular Matrix Proteins and Attachment Factors. Bedford, MA 01730 USA: Becton, Dickinson and Company, **2000**.
- [31] Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA, Bender HG. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. **J Mol Med** **1997**; *75* (6): 429-39.
- [32] Bek EL, McMillen MA. Endothelins are angiogenic. **J Cardiovasc Pharmacol** **2000**; *36* (5 Suppl 1): S135-9.
- [33] Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. **J Clin Invest** **1999**; *103* (2): 159-65.
- [34] Benson SR, Blue J, Judd K, Harman JE. Ultrasound is now better than mammography for the detection of invasive breast cancer. **Am J Surg** **2004**; *188* (4): 381-5.

- [35] Benza RL, Mehta S, Keogh A, Lawrence EC, Oudiz RJ, Barst RJ. Sitaxsentan treatment for patients with pulmonary arterial hypertension discontinuing bosentan. **J Heart Lung Transplant** 2007; 26 (1): 63-9.
- [36] Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. **Lancet** 2003; 362 (9382): 419-27.
- [37] Beral V, Bull D, Doll R, Peto R, Reeves G. Breast cancer and abortion: collaborative reanalysis of data from 53 epidemiological studies, including 83?000 women with breast cancer from 16 countries. **Lancet** 2004; 363 (9414): 1007-16.
- [38] Berger R, Stanek B, Hulsmann M, Frey B, Heher S, Pacher R, Neunteufl T. Effects of endothelin a receptor blockade on endothelial function in patients with chronic heart failure. **Circulation** 2001; 103 (7): 981-6.
- [39] Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nat Rev Cancer** 2003; 3 (6): 401-10.
- [40] Bernstein L. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2002; 7 (1): 3-15.
- [41] Bertz J, Hentschel, S., Hundsdörfer, G., Kaatsch, P., Katalinic, A., Lehnert, M., Schön, D., Stegmaier, C., Ziegler, H. Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. *Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, Saarbrücken* 2004.
- [42] Bhalla S, Matwyshyn G, Gulati A. Potentiation of morphine analgesia by BQ123, an endothelin antagonist. **Peptides** 2002; 23 (10): 1837-45.
- [43] Bilimoria MM, Morrow M. The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. **CA Cancer J Clin** 1995; 45 (5): 263-78.
- [44] Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenecker G, Oberhuber G. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. **Clin Cancer Res** 2001; 7 (6): 1661-8.
- [45] Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. **Cancer Res** 2000; 60 (17): 4693-6.
- [46] Black HR, Bakris GL, Weber MA, Weiss R, Shahawy ME, Marple R, Tannoury G, Linas S, Wiens BL, Linseman JV, *et al.* Efficacy and safety of darusentan in patients with resistant hypertension: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled dose-ranging study. **J Clin Hypertens (Greenwich)** 2007; 9 (10): 760-9.
- [47] Blauw GJ, Westendorp RG, Srivastava N, Burggraaf K, Frolich M, Simons R, Cohen AF, Meinders AE. Hypoxia-induced arterial endothelin does not influence peripheral vascular tone. **J Cardiovasc Pharmacol** 1995; 26 Suppl 3: S242-3.
- [48] Bobik A, Grooms A, Millar JA, Mitchell A, Grinpukel S. Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. **Am J Physiol** 1990; 258 (3 Pt 1): C408-15.
- [49] Böcker W, Kunze, K.-D., "Mamma". In: Böcker, Denk, Heitz: Pathologie. **München, Jena** 2001.
- [50] Bonvallet ST, Zamora MR, Hasunuma K, Sato K, Hanasato N, Anderson D, Stelzner TJ. BQ123, an ETA-receptor antagonist, attenuates hypoxic pulmonary hypertension in rats. **Am J Physiol** 1994; 266 (4 Pt 2): H1327-31.
- [51] Borgeson DD, Grantham JA, Williamson EE, Luchner A, Redfield MM, Opgenorth TJ, Burnett JC, Jr. Chronic oral endothelin type A receptor antagonism in experimental heart failure. **Hypertension** 1998; 31 (3): 766-70.
- [52] Boros M, Massberg S, Baranyi L, Okada H, Messmer K. Endothelin 1 induces leukocyte adhesion in submucosal venules of the rat small intestine. **Gastroenterology** 1998; 114 (1): 103-14.
- [53] Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently

- predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. **Cancer** **2003**; 97 (6): 1573-81.
- [54] Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, Abeloff MD, Simons JW, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst** **2001**; 93 (4): 309-14.
- [55] Boudier HA. Arteriolar and capillary remodelling in hypertension. **Drugs** **1999**; 58 *Spec No 1*: 37-40.
- [56] Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. **Circ Res** **1998**; 83 (10): 1059-66.
- [57] Boxerman JL, Hamberg LM, Rosen BR, Weisskoff RM. MR contrast due to intravascular magnetic susceptibility perturbations. **Magn Reson Med** **1995**; 34 (4): 555-66.
- [58] Boyle JJ, Wilson B, Bicknell R, Harrower S, Weissberg PL, Fan TP. Expression of angiogenic factor thymidine phosphorylase and angiogenesis in human atherosclerosis. **J Pathol** **2000**; 192 (2): 234-42.
- [59] Bremer C, Mustafa M, Bogdanov A, Jr., Ntziachristos V, Petrovsky A, Weissleder R. Steady-state blood volume measurements in experimental tumors with different angiogenic burdens a study in mice. **Radiology** **2003**; 226 (1): 214-20.
- [60] Bruneau BG, de Bold AJ. Selective changes in natriuretic peptide and early response gene expression in isolated rat atria following stimulation by stretch or endothelin-1. **Cardiovasc Res** **1994**; 28 (10): 1519-25.
- [61] Burri PH, Tarek MR. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. **Anat Rec** **1990**; 228 (1): 35-45.
- [62] Buschmann I, Katzer E, Bode C. Arteriogenesis - is this terminology necessary? **Basic Res Cardiol** **2003**; 98 (1): 1-5.
- [63] Caduff JH, Fischer LC, Burri PH. Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. **Anat Rec** **1986**; 216 (2): 154-64.
- [64] Calvo JJ, Gonzalez R, De Carvalho LF, Takahashi K, Kanse SM, Hart GR, Ghatei MA, Bloom SR. Release of substance P from rat hypothalamus and pituitary by endothelin. **Endocrinology** **1990**; 126 (5): 2288-95.
- [65] Cambrey AD, Harrison NK, Dawes KE, Southcott AM, Black CM, du Bois RM, Laurent GJ, McAnulty RJ. Increased levels of endothelin-1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis contribute to fibroblast mitogenic activity in vitro. **Am J Respir Cell Mol Biol** **1994**; 11 (4): 439-45.
- [66] Carducci MA, Nelson JB, Bowling MK, Rogers T, Eisenberger MA, Sinibaldi V, Donehower R, Leahy TL, Carr RA, Isaacson JD, *et al.* Atrasentan, an endothelin-receptor antagonist for refractory adenocarcinomas: safety and pharmacokinetics. **J Clin Oncol** **2002**; 20 (8): 2171-80.
- [67] Carducci MA, Padley RJ, Breul J, Vogelzang NJ, Zonnenberg BA, Daliani DD, Schulman CC, Nabulsi AA, Humerickhouse RA, Weinberg MA, *et al.* Effect of endothelin-A receptor blockade with atrasentan on tumor progression in men with hormone-refractory prostate cancer: a randomized, phase II, placebo-controlled trial. **J Clin Oncol** **2003**; 21 (4): 679-89.
- [68] Carducci MA, Saad F, Abrahamsson PA, Dearnaley DP, Schulman CC, North SA, Sleep DJ, Isaacson JD, Nelson JB. A phase 3 randomized controlled trial of the efficacy and safety of atrasentan in men with metastatic hormone-refractory prostate cancer. **Cancer** **2007**; 110 (9): 1959-66.
- [69] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Med** **2003**; 9 (6): 653-60.
- [70] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature** **2005**; 438 (7070): 932-6.

- [71] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nat Med** **2000**; *6* (4): 389-95.
- [72] Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenshtein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. **Nature** **1996**; *380* (6573): 435-9.
- [73] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature** **2000**; *407* (6801): 249-57.
- [74] Carpenter TC, Schomberg S, Stenmark KR. Endothelin-mediated increases in lung VEGF content promote vascular leak in young rats exposed to viral infection and hypoxia. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** **2005**; *289* (6): L1075-82.
- [75] Cataliotti L, Buzdar AU, Noguchi S, Bines J, Takatsuka Y, Petrakova K, Dube P, de Oliveira CT. Comparison of anastrozole versus tamoxifen as preoperative therapy in postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: the Pre-Operative "Arimidex" Compared to Tamoxifen (PROACT) trial. **Cancer** **2006**; *106* (10): 2095-103.
- [76] Cazaubon S, Chaverot N, Romero IA, Girault JA, Adamson P, Strosberg AD, Couraud PO. Growth factor activity of endothelin-1 in primary astrocytes mediated by adhesion-dependent and -independent pathways. **J Neurosci** **1997**; *17* (16): 6203-12.
- [77] Charles River Laboratories. Research Models and Services U.S. Catalog. Wilmington, MA 01887: Charles River Laboratories, **2006**.
- [78] Chaturvedi P. Does smoking increase the risk of breast cancer? **Lancet Oncol** **2003**; *4* (11): 657-8; *discussion* 658.
- [79] Cheng JW. Bosentan. **Heart Dis** **2003**; *5* (2): 161-9.
- [80] Cingolani HE, Villa-Abrille MC, Cornelli M, Nolly A, Ennis IL, Garciarena C, Suburo AM, Torbidoni V, Correa MV, Camilionde Hurtado MC, *et al.* The positive inotropic effect of angiotensin II: role of endothelin-1 and reactive oxygen species. **Hypertension** **2006**; *47* (4): 727-34.
- [81] Clamp A, Danson S, Clemons M. Hormonal and genetic risk factors for breast cancer. **Surgeon** **2003**; *1* (1): 23-31.
- [82] Clarkson-Jones J *et al.* Metabolism of [14C]-ZD4054 in healthy volunteers. In: ECCO 14 (European Cancer Conference), Barcelona, 2007.
- [83] Clavel-Chapelon F. Differential effects of reproductive factors on the risk of pre- and postmenopausal breast cancer. Results from a large cohort of French women. **Br J Cancer** **2002**; *86* (5): 723-7.
- [84] Clavel-Chapelon F, Gerber M. Reproductive factors and breast cancer risk. Do they differ according to age at diagnosis? **Breast Cancer Res Treat** **2002**; *72* (2): 107-15.
- [85] Cleland JG, Coletta AP, Lammiman M, Witte KK, Loh H, Nasir M, Clark AL. Clinical trials update from the European Society of Cardiology meeting 2005: CARE-HF extension study, ESSENTIAL, CIBIS-III, S-ICD, ISSUE-2, STRIDE-2, SOFA, IMAGINE, PREAMI, SIRIUS-II and ACTIVE. **Eur J Heart Fail** **2005**; *7* (6): 1070-5.
- [86] Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T, Kumada M, Hammer RE, Yanagisawa M. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. **Development** **1998**; *125* (5): 813-24.
- [87] Clozel M, Ramuz H, Clozel JP, Breu V, Hess P, Loffler BM, Coassolo P, Roux S. Pharmacology of tezosentan, new endothelin receptor antagonist designed for parenteral use. **J Pharmacol Exp Ther** **1999**; *290* (2): 840-6.
- [88] Cohen H, Chahine C, Hui A, Mukherji R. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. **Am J Health Syst Pharm** **2004**; *61* (11): 1107-19.

- [89] Coleman MP, Gatta G, Verdecchia A, Esteve J, Sant M, Storm H, Allemani C, Ciccolallo L, Santaquilani M, Berrino F. EURO CARE-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20th century. **Ann Oncol** 2003; 14 Suppl 5: v128-49.
- [90] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. **Lancet** 2002; 360 (9328): 187-95.
- [91] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. **Lancet** 1996; 347 (9017): 1713-27.
- [92] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. **Lancet** 1997; 350 (9084): 1047-59.
- [93] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. **Lancet** 2001; 358 (9291): 1389-99.
- [94] Compornolle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, Plaisance S, Dor Y, Keshet E, Lupu F, *et al.* Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. **Nat Med** 2002; 8 (7): 702-10.
- [95] Coombs NJ, Taylor R, Wilcken N, Boyages J. Hormone replacement therapy and breast cancer: estimate of risk. **Bmj** 2005; 331 (7512): 347-9.
- [96] Corbeil J, Evans LA, Vasak E, Cooper DA, Penny R. Culture and properties of cells derived from Kaposi sarcoma. **J Immunol** 1991; 146 (9): 2972-6.
- [97] Cosenzi A. Enrasentan, an antagonist of endothelin receptors. **Cardiovasc Drug Rev** 2003; 21 (1): 1-16.
- [98] Cosenzi A, Bernobich E, Bonavita M, Bertola G, Trevisan R, Bellini G. Antihypertensive treatment with enrasentan (SB217242) in an animal model of hypertension and hyperinsulinemia. **J Cardiovasc Pharmacol** 2002; 39 (4): 488-95.
- [99] Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. **Nature** 2005; 438 (7070): 937-45.
- [100] Cruz A, Parnot C, Ribatti D, Corvol P, Gasc JM. Endothelin-1, a regulator of angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. **J Vasc Res** 2001; 38 (6): 536-45.
- [101] Curtis N BN, Curwen J. ZD4054 blocks ET-1-stimulated phosphorylation of p44/42 mitogen-activated kinase and proliferation of osteoblast cells. **Proc Am Ass Cancer Research** 2005.
- [102] Curtis N HZ, Brooks N, Curwen J. ZD4054 specifically inhibits ETA-mediated anti-apoptotic effects, but not ETB-mediated pro-apoptotic effects. **European Journal of Cancer Supplement** 2004.
- [103] Cuzick J. Aromatase inhibitors in prevention--data from the ATAC (arimidex, tamoxifen alone or in combination) trial and the design of IBIS-II (the second International Breast Cancer Intervention Study). **Recent Results Cancer Res** 2003; 163: 96-103; discussion 264-6.
- [104] Dales JP, Garcia S, Meunier-Carpentier S, Andrac-Meyer L, Haddad O, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Charpin C. Overexpression of hypoxia-inducible factor HIF-

- alpha predicts early relapse in breast cancer: retrospective study in a series of 745 patients. **Int J Cancer** **2005**; *116* (5): 734-9.
- [105] Davenport AP. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. **Pharmacol Rev** **2002**; *54* (2): 219-26.
- [106] Davenport AP, Battistini B. Classification of endothelin receptors and antagonists in clinical development. **Clin Sci (Lond)** **2002**; *103 Suppl 48*: 1S-3S.
- [107] Davis PL, McCarty KS, Jr. Sensitivity of enhanced MRI for the detection of breast cancer: new, multicentric, residual, and recurrent. **Eur Radiol** **1997**; *7 Suppl 5*: 289-98.
- [108] de la Torre JC. Alzheimer's disease: how does it start? **J Alzheimers Dis** **2002**; *4* (6): 497-512.
- [109] DeBruin LS, Josephy PD. Perspectives on the chemical etiology of breast cancer. **Environ Health Perspect** **2002**; *110 Suppl 1*: 119-28.
- [110] Delarue JC, Terrier P, Terrier-Lacombe MJ, Mouriessse H, Gotteland M, May-Levin F. Combined overexpression of c-erbB-2 protein and epidermal growth factor receptor (EGF-R) could be predictive of early and long-term outcome in human breast cancer: a pilot study. **Bull Cancer** **1994**; *81* (12): 1067-77.
- [111] Demunter A, De Wolf-Peeters C, Degreef H, Stas M, van den Oord JJ. Expression of the endothelin-B receptor in pigment cell lesions of the skin. Evidence for its role as tumor progression marker in malignant melanoma. **Virchows Arch** **2001**; *438* (5): 485-91.
- [112] Dennie J, Mandeville JB, Boxerman JL, Packard SD, Rosen BR, Weisskoff RM. NMR imaging of changes in vascular morphology due to tumor angiogenesis. **Magn Reson Med** **1998**; *40* (6): 793-9.
- [113] Denver R, Tzanidis A, Martin P, Krum H. Salivary endothelin concentrations in the assessment of chronic heart failure. **Lancet** **2000**; *355* (9202): 468-9.
- [114] DiCostanzo D, Rosen PP, Gareen I, Franklin S, Lesser M. Prognosis in infiltrating lobular carcinoma. An analysis of "classical" and variant tumors. **Am J Surg Pathol** **1990**; *14* (1): 12-23.
- [115] Dixon JM, Anderson TJ, Page DL, Lee D, Duffy SW. Infiltrating lobular carcinoma of the breast. **Histopathology** **1982**; *6* (2): 149-61.
- [116] Djonov V, Schmid M, Tschanz SA, Burri PH. Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. **Circ Res** **2000**; *86* (3): 286-92.
- [117] Donegan WL. Cancer of the breast in men. **CA Cancer J Clin** **1991**; *41* (6): 339-54.
- [118] Donegan WL. Tumor-related prognostic factors for breast cancer. **CA Cancer J Clin** **1997**; *47* (1): 28-51.
- [119] Dong J, Grunstein J, Tejada M, Peale F, Frantz G, Liang WC, Bai W, Yu L, Kowalski J, Liang X, *et al.* VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis. **Embo J** **2004**; *23* (14): 2800-10.
- [120] Dor Y, Porat R, Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. **Am J Physiol Cell Physiol** **2001**; *280* (6): C1367-74.
- [121] Douglas ML, Richardson MM, Nicol DL. Endothelin axis expression is markedly different in the two main subtypes of renal cell carcinoma. **Cancer** **2004**; *100* (10): 2118-24.
- [122] Ducancel F. Endothelin-like peptides. **Cell Mol Life Sci** **2005**; *62* (23): 2828-39.
- [123] Duraker N, Caynak ZC. Prognostic value of the 2002 TNM classification for breast carcinoma with regard to the number of metastatic axillary lymph nodes. **Cancer** **2005**; *104* (4): 700-7.

- [124] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. **Lancet** **1998**; *351 (9114)*: 1451-67.
- [125] Eberl LP, Egidy G, Pinet F, Juillerat-Jeanneret L. Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in colon carcinoma cells via the protein kinase C-pathway. **J Cardiovasc Pharmacol** **2000**; *36 (5 Suppl 1)*: S354-6.
- [126] Eberl LP, Valdenaire O, Saintgiorgio V, Jeannin JF, Juillerat-Jeanneret L. Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in rat colon carcinoma cells. **Int J Cancer** **2000**; *86 (2)*: 182-7.
- [127] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer** **2002**; *2 (3)*: 161-74.
- [128] Egidy G, Juillerat-Jeanneret L, Jeannin JF, Korth P, Bosman FT, Pinet F. Modulation of human colon tumor-stromal interactions by the endothelin system. **Am J Pathol** **2000**; *157 (6)*: 1863-74.
- [129] Eisen A, Lubinski J, Klijn J, Moller P, Lynch HT, Offit K, Weber B, Rebbeck T, Neuhausen SL, Ghadirian P, *et al.* Breast cancer risk following bilateral oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an international case-control study. **J Clin Oncol** **2005**; *23 (30)*: 7491-6.
- [130] Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. **Histopathology** **1992**; *20 (6)*: 479-89.
- [131] Engel J. HD, Kerr J., Schubert-Fritschle G. Aus: MANUAL Mammakarzinome: "Epidemiologie". *Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München, München 2003.*
- [132] Engels K, Fox SB, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. Distinct angiogenic patterns are associated with high-grade in situ ductal carcinomas of the breast. **J Pathol** **1997**; *181 (2)*: 207-12.
- [133] Ergul A, Glassberg MK, Majercik MH, Puett D. Endothelin-1 promotes steroidogenesis and stimulates protooncogene expression in transformed murine Leydig cells. **Endocrinology** **1993**; *132 (2)*: 598-603.
- [134] FDA - U.S.'s Food And Drug Administration. FDA Talk Paper: "FDA approves first oral medication for pulmonary arterial hypertension": FDA - U.S.'s Food And Drug Administration, **2001**.
- [135] FDA - U.S.'s Food And Drug Administration. Questions for the oncology drugs advisory committee: United State's Food And Drug Administration, pp. 4, **2005**.
- [136] Ferguson JE, 3rd, Kelley RW, Patterson C. Mechanisms of endothelial differentiation in embryonic vasculogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** **2005**; *25 (11)*: 2246-54.
- [137] Ferreira SH, Romitelli M, de Nucci G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **J Cardiovasc Pharmacol** **1989**; *13 Suppl 5*: S220-2.
- [138] Feuer EJ, Wun LM, Boring CC, Flanders WD, Timmel MJ, Tong T. The lifetime risk of developing breast cancer. **J Natl Cancer Inst** **1993**; *85 (11)*: 892-7.
- [139] Flamme I, Frolich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. **J Cell Physiol** **1997**; *173 (2)*: 206-10.
- [140] Flamme I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. **Development** **1992**; *116 (2)*: 435-9.
- [141] Flynn MA, Haleen SJ, Welch KM, Cheng XM, Reynolds EE. Endothelin B receptors on human endothelial and smooth-muscle cells show equivalent binding pharmacology. **J Cardiovasc Pharmacol** **1998**; *32 (1)*: 106-16.
- [142] Folkman J. What is the Evidence That Tumors are Angiogenesis Dependent? **J Natl Cancer Inst** **1990**; *82 (1)*: 4 - 6.

- [143] Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. **Lancet** **1994**; *343* (8899): 692-5.
- [144] Fujita K, Matsumura Y, Miyazaki Y, Takaoka M, Morimoto S. Effects of the endothelin ETA-receptor antagonist FR139317 on development of hypertension and cardiovascular hypertrophy in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. **Jpn J Pharmacol** **1996**; *70* (4): 313-9.
- [145] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** **1980**; *288* (5789): 373-6.
- [146] Futaki S, Hayashi Y, Yamashita M, Yagi K, Bono H, Hayashizaki Y, Okazaki Y, Sekiguchi K. Molecular basis of constitutive production of basement membrane components. Gene expression profiles of Engelbreth-Holm-Swarm tumor and F9 embryonal carcinoma cells. **J Biol Chem** **2003**; *278* (50): 50691-701.
- [147] Gabka C. J. AC, Bauerfeind I., Baumeister R. G. H., Eiermann W., Fügler Th. ,, Funke I. HU, Höß C., Janni W., Kolben M., Lebeau A., Plattner B., Schwoerer M., Untch M. dWJC. Aus: MANUAL Mammakarzinome: "Operative Therapie des primären Mammakarzinoms". *Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München, München 2005.*
- [148] Garcia R, Lachance D, Thibault G. Positive inotropic action, natriuresis and atrial natriuretic factor release induced by endothelin in the conscious rat. **J Hypertens** **1990**; *8* (8): 725-31.
- [149] Gasparini G, Biganzoli E, Bonoldi E, Morabito A, Fanelli M, Boracchi P. Angiogenesis sustains tumor dormancy in patients with breast cancer treated with adjuvant chemotherapy. **Breast Cancer Res Treat** **2001**; *65* (1): 71-5.
- [150] Gasparini G, Harris AL. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. **J Clin Oncol** **1995**; *13* (3): 765-82.
- [151] Gasparini G, Toi M, Gion M, Verderio P, Dittadi R, Hanatani M, Matsubara I, Vinante O, Bonoldi E, Boracchi P, *et al.* Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. **J Natl Cancer Inst** **1997**; *89* (2): 139-47.
- [152] Gerber B, Muller H, Reimer T, Krause A, Friese K. Nutrition and lifestyle factors on the risk of developing breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** **2003**; *79* (2): 265-76.
- [153] Gimbrone MA, Jr., Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. **J Exp Med** **1972**; *136* (2): 261-76.
- [154] Gohji K, Kitazawa S, Tamada H, Katsuoka Y, Nakajima M. Expression of endothelin receptor a associated with prostate cancer progression. **J Urol** **2001**; *165* (3): 1033-6.
- [155] Goligorsky MS, Budzikowski AS, Tsukahara H, Noiri E. Co-operation between endothelin and nitric oxide in promoting endothelial cell migration and angiogenesis. **Clin Exp Pharmacol Physiol** **1999**; *26* (3): 269-71.
- [156] Gosselin M, Goulet S, Wu-Wong JR, Wessale JL, Ogenorth TJ, Boulet LP, Battistini B. Effects of a selective ET(A)-receptor antagonist, atrasentan (ABT-627), in murine models of allergic asthma: demonstration of mouse strain specificity. **Clin Sci (Lond)** **2002**; *103 Suppl 48*: 367S-370S.
- [157] Grann VR, Troxel AB, Zojwalla NJ, Jacobson JS, Hershman D, Neugut AI. Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma. **Cancer** **2005**; *103* (11): 2241-51.
- [158] Grant K, Loizidou M, Taylor I. Endothelin-1: a multifunctional molecule in cancer. **Br J Cancer** **2003**; *88* (2): 163-6.
- [159] Grimshaw MJ. Endothelins in breast tumour cell invasion. **Cancer Lett** **2005**; *222* (2): 129-38.

- [160] Grimshaw MJ, Hagemann T, Ayhan A, Gillett CE, Binder C, Balkwill FR. A role for endothelin-2 and its receptors in breast tumor cell invasion. **Cancer Res** **2004**; *64* (7): 2461-8.
- [161] Grimshaw MJ, Naylor S, Balkwill FR. Endothelin-2 is a hypoxia-induced autocrine survival factor for breast tumor cells. **Mol Cancer Ther** **2002**; *1* (14): 1273-81.
- [162] Gross PM, Weaver DF, Ho LT, Pang JJ, Edvinsson L. FR139317, a specific ETA-receptor antagonist, inhibits cerebral activation by intraventricular endothelin-1 in conscious rats. **Neuropharmacology** **1994**; *33* (10): 1155-66.
- [163] Growcott W HM, Curtis N, Curwen J. Phenotypic in vitro differentiation of the specific endothelin A receptor antagonist, ZD4054, from the selective endothelin antagonist, atrasentan. In: EORTC, 2007.
- [164] Guidi AJ, Fischer L, Harris JR, Schnitt SJ. Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast. **J Natl Cancer Inst** **1994**; *86* (8): 614-9.
- [165] Guidi AJ, Schnitt SJ, Fischer L, Tognazzi K, Harris JR, Dvorak HF, Brown LF. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of the breast. **Cancer** **1997**; *80* (10): 1945-53.
- [166] Guise TA, Yin JJ, Mohammad KS. Role of endothelin-1 in osteoblastic bone metastases. **Cancer** **2003**; *97* (3 Suppl): 779-84.
- [167] Hagemann T, Binder C, Binder L, Pukrop T, Trumper L, Grimshaw MJ. Expression of endothelins and their receptors promotes an invasive phenotype of breast tumor cells but is insufficient to induce invasion in benign cells. **DNA Cell Biol** **2005**; *24* (11): 766-76.
- [168] Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CW, Jr., Coates RJ, Liff JM, Talamini R, Chantarakul N, *et al.* Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. **Br J Cancer** **2002**; *87* (11): 1234-45.
- [169] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell** **1996**; *86* (3): 353-64.
- [170] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** **2000**; *100* (1): 57-70.
- [171] Harbeck N, Eiermann W, Engel J, Funke I, Janni W, Lebeau A, Permanetter W, Raab G, Untch M, Zenzoum I. MANUAL Mammakarzinome - Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom. **München** **2003**.
- [172] Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. **Nat Rev Cancer** **2002**; *2* (1): 38-47.
- [173] Harris CC. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. **Cancer Res** **1991**; *51* (18 Suppl): 5023s-5044s.
- [174] Haufschild T, Prunte C, Messerli J, Flammer J. Increased endothelin-1 plasma level in young adults with retinal vascular occlusive diseases. **Klin Monatsbl Augenheilkd** **2004**; *221* (5): 357-9.
- [175] Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. **Bone** **2001**; *29* (6): 560-4.
- [176] Hayashi Y, Emoto T, Futaki S, Sekiguchi K. Establishment and characterization of a parietal endoderm-like cell line derived from Engelbreth-Holm-Swarm tumor (EHSPEL), a possible resource for an engineered basement membrane matrix. **Matrix Biol** **2004**; *23* (1): 47-62.
- [177] Heimann R, Ferguson D, Gray S, Hellman S. Assessment of intratumoral vascularization (angiogenesis) in breast cancer prognosis. **Breast Cancer Res Treat** **1998**; *52* (1-3): 147-58.

- [178] Heinemann V. AA, Beinert T., Dietzfelbinger H., Eiermann W., Gabius S., Harbeck N. KS, Kau W., Lombardo S.M., Lorenz T., Merx P., Pihusch R., Rauthe C. SD, Sauer H., Untch M., Wolf C. Aus: MANUAL Mammakarzinome: "Systemische Therapie des metastasierten Mammakarzinoms". *Tumorzentrum München und W.Zuckschwerdt Verlag München, München 2005.*
- [179] Heinemann V. BJ, Eiermann W., Gabius S., Harbeck N., Kahlert St., Raab G., Rauthe G., Sattler D., Sauer H., Untch M.,. MANUAL Mammakarzinome - Systemische Therapie des metastasierten Mammakarzinoms. *Tumorzentrum München, München 2003.*
- [180] Helisch A, Schaper W. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. **Microcirculation 2003**; 10 (1): 83-97.
- [181] Henderson IC, Patek AJ. The relationship between prognostic and predictive factors in the management of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat 1998**; 52 (1-3): 261-88.
- [182] Hendricks-Munoz KD, Gerrets RP, Higgins RD, Munoz JL, Caines VV. Cocaine-stimulated endothelin-1 release is decreased by angiotensin-converting enzyme inhibitors in cultured endothelial cells. **Cardiovasc Res 1996**; 31 (1): 117-23.
- [183] Herzog Y, Guttman-Raviv N, Neufeld G. Segregation of arterial and venous markers in subpopulations of blood islands before vessel formation. **Dev Dyn 2005**; 232 (4): 1047-55.
- [184] Hilal-Dandan R, Ramirez MT, Villegas S, Gonzalez A, Endo-Mochizuki Y, Brown JH, Brunton LL. Endothelin ETA receptor regulates signaling and ANF gene expression via multiple G protein-linked pathways. **Am J Physiol 1997**; 272 (1 Pt 2): H130-7.
- [185] Hoefler IE, van Royen N, Rectenwald JE, Deindl E, Hua J, Jost M, Grundmann S, Voskuil M, Ozaki CK, Piek JJ, *et al.* Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1-mediated mechanisms. **Circ Res 2004**; 94 (9): 1179-85.
- [186] Hoepfer MM. Is sitaxsentan a safe and efficacious treatment for pulmonary arterial hypertension? **Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2006**; 3 (10): 536-7.
- [187] Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. **Science 1999**; 284 (5422): 1994-8.
- [188] Holla LL, Vasku A, Lzakovic V, Znojil V. Variants of endothelin-1 gene in atopic diseases. **J Investig Allergol Clin Immunol 2001**; 11 (3): 193-8.
- [189] Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. **Nat Med 1995**; 1 (2): 149-53.
- [190] Horn EM, Widlitz AC, Barst RJ. Sitaxsentan, a selective endothelin-A receptor antagonist for the treatment of pulmonary arterial hypertension. **Expert Opin Investig Drugs 2004**; 13 (11): 1483-92.
- [191] Hu DE, Hiley CR, Fan TP. Comparative studies of the angiogenic activity of vasoactive intestinal peptide, endothelins-1 and -3 and angiotensin II in a rat sponge model. **Br J Pharmacol 1996**; 117 (3): 545-551.
- [192] Hulpke-Wette M, Buchhorn R. BMS-193884 and BMS-207940 Bristol-Myers Squibb. **Curr Opin Investig Drugs 2002**; 3 (7): 1057-61.
- [193] Imokawa G, Miyagishi M, Yada Y. Endothelin-1 as a new melanogen: coordinated expression of its gene and the tyrosinase gene in UVB-exposed human epidermis. **J Invest Dermatol 1995**; 105 (1): 32-7.
- [194] Innes KE, Byers TE. Preeclampsia and breast cancer risk. **Epidemiology 1999**; 10 (6): 722-32.

- [195] Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. **Proc Natl Acad Sci U S A** **1989**; *86* (8): 2863-7.
- [196] Inoue H, Imokawa H, Yamanaka M, Isono E, Ando K, Kubota T, Aihara M, Ishida H. Detection of endothelin 1,2 and endothelin-like immunoreactant in wound surface and plasma in mice with thermal injury. **Life Sci** **1993**; *52* (25): PL291-6.
- [197] Invitrogen - Gibco. Advanced RPMI 1640 and D-MEM/F-12 - product news. Paisley, U.K.: Invitrogen, **2004**.
- [198] Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T. Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. **Pflugers Arch** **1988**; *413* (1): 108-10.
- [199] Ivic MA, Stefanovic V. Endothelins in hypertension and kidney diseases. **Pathol Biol (Paris)** **1998**; *46* (9): 723-30.
- [200] Jabbour HN, Sales KJ. Prostaglandin receptor signalling and function in human endometrial pathology. **Trends Endocrinol Metab** **2004**; *15* (8): 398-404.
- [201] Jackson D, Volpert OV, Bouck N, Linzer DI. Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein. **Science** **1994**; *266* (5190): 1581-4.
- [202] Jaffer FE, Knauss TC, Poptic E, Abboud HE. Endothelin stimulates PDGF secretion in cultured human mesangial cells. **Kidney Int** **1990**; *38* (6): 1193-8.
- [203] James ND et al. ZD4054, a potent, specific endothelin A receptor antagonist, improves overall survival in pain-free or mildly symptomatic patients with hormone-resistant prostate cancer (HRPC) and bone metastases. In: ECCO 14 (European Cancer Conference), Barcelona, 2007.
- [204] Jenkinson L, Bardhan KD, Atherton J, Kalia N. Helicobacter pylori prevents proliferative stage of angiogenesis in vitro: role of cytokines. **Dig Dis Sci** **2002**; *47* (8): 1857-62.
- [205] Jernstrom H, Lerman C, Ghadirian P, Lynch HT, Weber B, Garber J, Daly M, Olopade OI, Foulkes WD, Warner E, et al. Pregnancy and risk of early breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2. **Lancet** **1999**; *354* (9193): 1846-50.
- [206] Jiang WG, Martin TA, Parr C, Davies G, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. **Crit Rev Oncol Hematol** **2005**; *53* (1): 35-69.
- [207] Jones SE. Exemestane as adjuvant treatment of early breast cancer: intergroup exemestane study/tamoxifen exemestane adjuvant multicenter trials. **Clin Breast Cancer** **2006**; *6 Suppl 2*: S41-4.
- [208] Josko J, Hendryk S, Jedrzejowska-Szypulka H, Slowinski J, Gwozdz B, Lange D, Snietura M, Zwirska-Korczala K, Jochem J. Cerebral angiogenesis after subarachnoid hemorrhage (SAH) and endothelin receptor blockage with BQ-123 antagonist in rats. **J Physiol Pharmacol** **2001**; *52* (2): 237-48.
- [209] Kabadere SD, Uzuner K, Altuner Y, Uyar R. The mitogenic activity of endothelin-1 on megakaryocytopoiesis in vitro. **Arch Physiol Biochem** **2001**; *109* (1): 69-73.
- [210] Kahlert S. AC, Eiermann W. , Funke I., Harbeck N., Heinemann V., Janni W., Oberlechner E. PP, Pihusch R. , Rauthe G., Sauer H. , Schwoerer M., Sommer H., Rack B. SC, Untch M. , Wolf C. Aus: MANUAL Mammakarzinome: "Adjuvante Systemtherapie". *Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München, München 2005*.
- [211] Kalimo H, Ruchoux MM, Viitanen M, Kalaria RN. CADASIL: a common form of hereditary arteriopathy causing brain infarcts and dementia. **Brain Pathol** **2002**; *12* (3): 371-84.

- [212] Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. **J Biol Chem** **1993**; *268* (25): 19126-33.
- [213] Kato M, Koike Y, Ito Y, Suzuki S, Kimata K. Multiple forms of heparan sulfate proteoglycans in the Engelbreth-Holm-Swarm mouse tumor. The occurrence of high density forms bearing both heparan sulfate and chondroitin sulfate side chains. **J Biol Chem** **1987**; *262* (15): 7180-8.
- [214] Kelland LR. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. **Eur J Cancer** **2004**; *40* (6): 827-36.
- [215] Kiechle B, Ditsch, Kuschel, Plattner, Schwarz-Boeger, Untch V. MANUAL Mammakarzinome - Hereditäres Mammakarzinom. **München** **2003**.
- [216] King AJ, Brenner BM, Anderson S. Endothelin: a potent renal and systemic vasoconstrictor peptide. **Am J Physiol** **1989**; *256* (6 Pt 2): F1051-8.
- [217] Kingsbury K. Why breast cancer is spreading around the world. **TIME**. Vol. 10/07, **2007**.
- [218] Kiowski W, Sutsch G, Hunziker P, Muller P, Kim J, Oechslin E, Schmitt R, Jones R, Bertel O. Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. **Lancet** **1995**; *346* (8977): 732-6.
- [219] Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. **Annu Rev Physiol** **1991**; *53*: 217-39.
- [220] Kobayashi S, Tang R, Wang B, Opgenorth T, Langenstroer P, Shapiro E, Lepor H. Binding and functional properties of endothelin receptor subtypes in the human prostate. **Mol Pharmacol** **1994**; *45* (2): 306-11.
- [221] Kogai T, Kanamoto Y, Che LH, Taki K, Moatamed F, Schultz JJ, Brent GA. Systemic retinoic acid treatment induces sodium/iodide symporter expression and radioiodide uptake in mouse breast cancer models. **Cancer Res** **2004**; *64* (1): 415-22.
- [222] Kohan DE. The renal medullary endothelin system in control of sodium and water excretion and systemic blood pressure. **Curr Opin Nephrol Hypertens** **2006**; *15* (1): 34-40.
- [223] Kohno M, Horio T, Yokokawa K, Yasunari K, Kurihara N, Takeda T. Endothelin modulates the mitogenic effect of PDGF on glomerular mesangial cells. **Am J Physiol** **1994**; *266* (6 Pt 2): F894-900.
- [224] Kohno M, Ikeda M, Johchi M, Horio T, Yasunari K, Kurihara N, Takeda T. Interaction of PDGF and natriuretic peptides on mesangial cell proliferation and endothelin secretion. **Am J Physiol** **1993**; *265* (5 Pt 1): E673-9.
- [225] Kohno M, Kano H, Horio T, Yokokawa K, Yasunari K, Takeda T. Inhibition of endothelin production by adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. **Hypertension** **1995**; *25* (6): 1185-90.
- [226] Kohno M, Murakawa K, Yokokawa K, Yasunari K, Horio T, Kurihara N, Takeda T. Production of endothelin by cultured porcine endothelial cells: modulation by adrenaline. **J Hypertens Suppl** **1989**; *7* (6): S130-1.
- [227] Kohno M, Ohmori K, Wada Y, Kondo I, Noma T, Fujita N, Mizushige K, Mandal AK. Inhibition by eicosapentaenoic acid of oxidized-LDL- and lysophosphatidylcholine-induced human coronary artery smooth muscle cell production of endothelin. **J Vasc Res** **2001**; *38* (4): 379-88.
- [228] Kohno M, Yasunari K, Yokokawa K, Murakawa K, Horio T, Kanayama Y, Fuzisawa M, Inoue T, Takeda T. Thrombin stimulates the production of immunoreactive endothelin-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells. **Metabolism** **1990**; *39* (10): 1003-5.
- [229] Kohno M, Yasunari K, Yokokawa K, Murakawa K, Horio T, Takeda T. Inhibition by atrial and brain natriuretic peptides of endothelin-1 secretion after stimulation with

- angiotensin II and thrombin of cultured human endothelial cells. **J Clin Invest** **1991**; *87* (6): 1999-2004.
- [230] Kojima K, Nihei Z. Expression of endothelin-1 immunoreactivity in breast cancer. **Surg Oncol** **1995**; *4* (6): 309-15.
- [231] Kojima M, Kusumoto K, Fujiwara S, Watanabe T, Fujino M. Role of endogenous endothelin in the extension of myocardial infarct size studied with the endothelin receptor antagonist, TAK-044. **J Cardiovasc Pharmacol** **1995**; *26 Suppl 3*: S365-8.
- [232] Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. **FEBS Lett** **1988**; *238* (2): 249-52.
- [233] Kotsopoulos J, Lubinski J, Lynch HT, Neuhausen SL, Ghadirian P, Isaacs C, Weber B, Kim-Sing C, Foulkes WD, Gershoni-Baruch R, *et al.* Age at menarche and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Cancer Causes Control** **2005**; *16* (6): 667-74.
- [234] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Skarlatos J, Corti L, Blandamura S, Piazza M, Gatter KC, Harris AL. Hypoxia inducible factor (HIF-1a and HIF-2a) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. **Cancer Res** **2001**; *61* (5): 1830-2.
- [235] Kozawa O, Kawamura H, Hatakeyama D, Matsuno H, Uematsu T. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor synthesis in osteoblasts: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. **Cell Signal** **2000**; *12* (6): 375-80.
- [236] Kubota T, Matsuzaki SW, Hoshiya Y, Watanabe M, Kitajima M, Asanuma F, Yamada Y, Koh JI. Antitumor activity of paclitaxel against human breast carcinoma xenografts serially transplanted into nude mice. **J Surg Oncol** **1997**; *64* (2): 115-21.
- [237] Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao WH, Kamada N, *et al.* Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. **Nature** **1994**; *368* (6473): 703-10.
- [238] Kusuhara M, Yamaguchi K, Nagasaki K, Hayashi C, Suzaki A, Hori S, Handa S, Nakamura Y, Abe K. Production of endothelin in human cancer cell lines. **Cancer Res** **1990**; *50* (11): 3257-61.
- [239] Lahav R, Heffner G, Patterson PH. An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A** **1999**; *96* (20): 11496-500.
- [240] Lahav R, Suva ML, Rimoldi D, Patterson PH, Stamenkovic I. Endothelin receptor B inhibition triggers apoptosis and enhances angiogenesis in melanomas. **Cancer Res** **2004**; *64* (24): 8945-53.
- [241] Lakhani SR, Audretsch W, Cleton-Jensen AM, Cutuli B, Ellis I, Eusebi V, Greco M, Houslton RS, Kuhl CK, Kurtz J, *et al.* The management of lobular carcinoma in situ (LCIS). Is LCIS the same as ductal carcinoma in situ (DCIS)? **Eur J Cancer** **2006**; *42* (14): 2205-11.
- [242] Lal H, Yu Q, Ivor Williams K, Woodward B. Hypoxia augments conversion of big-endothelin-1 and endothelin ET(B) receptor-mediated actions in rat lungs. **Eur J Pharmacol** **2000**; *402* (1-2): 101-10.
- [243] Lam HC, Lo GH, Lee JK, Lu CC, Chu CH, Sun CC, Chuang MJ, Wang MC. Salivary Immunoreactive Endothelin in Patients with Upper Gastrointestinal Diseases. **J Cardiovasc Pharmacol** **2004**; *44*: S413-S417.
- [244] Landgren E, Klint P, Yokote K, Claesson-Welsh L. Fibroblast growth factor receptor-1 mediates chemotaxis independently of direct SH2-domain protein binding. **Oncogene** **1998**; *17* (3): 283-91.

- [245] Langenstroer P, Tang R, Shapiro E, Divish B, Oppenorth T, Lepor H. Endothelin-1 in the human prostate: tissue levels, source of production and isometric tension studies. **J Urol** **1993**; *150 (2 Pt 1)*: 495-9.
- [246] Langleben D, Hirsch AM, Shalit E, Lesenko L, Barst RJ. Sustained symptomatic, functional, and hemodynamic benefit with the selective endothelin-A receptor antagonist, sitaxsentan, in patients with pulmonary arterial hypertension: a 1-year follow-up study. **Chest** **2004**; *126 (4)*: 1377-81.
- [247] Larsson H, Klint P, Landgren E, Claesson-Welsh L. Fibroblast growth factor receptor-1-mediated endothelial cell proliferation is dependent on the Src homology (SH) 2/SH3 domain-containing adaptor protein Crk. **J Biol Chem** **1999**; *274 (36)*: 25726-34.
- [248] Latour LL, Svoboda K, Mitra PP, Sotak CH. Time-dependent diffusion of water in a biological model system. **Proc Natl Acad Sci U S A** **1994**; *91 (4)*: 1229-33.
- [249] Lawson ND, Vogel AM, Weinstein BM. sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. **Dev Cell** **2002**; *3 (1)*: 127-36.
- [250] Le Brun G, Aubin P, Soliman H, Ropiquet F, Villette JM, Berthon P, Creminon C, Cussenot O, Fiet J. Upregulation of endothelin 1 and its precursor by IL-1beta, TNF-alpha, and TGF-beta in the PC3 human prostate cancer cell line. **Cytokine** **1999**; *11 (2)*: 157-62.
- [251] Lebeau A. HB, Nährig J., Permanetter W. Aus: MANUAL Mammakarzinome: "Pathomorphologie des Mammakarzinoms". *Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München, München 2005.*
- [252] Lebeau A. NW, Permanetter W., MANUAL Mammakarzinome - Pathomorphologie des Mammakarzinoms. *Tumorzentrum München, München 2003.*
- [253] Lehnert M, Hense, HW., Mattauch, V., Krieg, V., Schlake, W. Epidemiologisches Krebsregister für den Regierungsbezirk Münster: Krebserkrankungen im Regierungsbezirk Münster - Brustkrebs. **2001**; *Registerbrief 2001/1.*
- [254] Lellé RJ. Bericht von der 10. Sankt Gallener Konferenz. Münster: Frauenklinik des Universitätsklinikums Münster, **2007.**
- [255] Levi F, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C. Cancer mortality in Europe, 1995-1999, and an overview of trends since 1960. **Int J Cancer** **2004**; *110 (2)*: 155-69.
- [256] Levin ER. Endothelins. **N Engl J Med** **1995**; *333 (6)*: 356-63.
- [257] Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, *et al.* Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. **N Engl J Med** **2004**; *350 (7)*: 672-83.
- [258] Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. **J Immunol** **2003**; *170 (6)*: 3369-76.
- [259] Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. **Science** **1997**; *277 (5323)*: 242-5.
- [260] Liu C, Chen J. Endothelin receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension. **Cochrane Database Syst Rev** **2006**; *3*: CD004434.
- [261] London SJ, Connolly JL, Schnitt SJ, Colditz GA. A prospective study of benign breast disease and the risk of breast cancer. **Jama** **1992**; *267 (7)*: 941-4.
- [262] London SJ, Stein EA, Henderson IC, Stampfer MJ, Wood WC, Remine S, Dmochowski JR, Robert NJ, Willett WC. Carotenoids, retinol, and vitamin E and risk of proliferative benign breast disease and breast cancer. **Cancer Causes Control** **1992**; *3 (6)*: 503-12.

- [263] Lopez-Farre A, Montanes I, Millas I, Lopez-Novoa JM. Effect of endothelin on renal function in rats. **Eur J Pharmacol** **1989**; *163 (1)*: 187-9.
- [264] Lüllmann H. MK, Wehling M., "Antineoplastische Wirkstoffe: Hemmung der Mikrotubulus-Depolymerisation"; Aus: Lüllmann et al.: Pharmakologie und Toxikologie. *Thieme Verlag, Stuttgart 2003*.
- [265] Lutun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): novel therapeutic targets for angiogenic disorders. **Ann N Y Acad Sci** **2002**; *979*: 80-93.
- [266] Manaka L, Kadono S, Kawashima M, Kobayashi T, Imokawa G. The mechanism of hyperpigmentation in seborrhoeic keratosis involves the high expression of endothelin-converting enzyme-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$ , which stimulate secretion of endothelin 1. **Br J Dermatol** **2001**; *145 (6)*: 895-903.
- [267] Mancina R, Barni T, Calogero AE, Filippi S, Amerini S, Peri A, Susini T, Vannelli GB, Burrello N, Forti G, *et al.* Identification, characterization, and biological activity of endothelin receptors in human ovary. **J Clin Endocrinol Metab** **1997**; *82 (12)*: 4122-9.
- [268] Martinez P, Esbrit P, Rodrigo A, Alvarez-Arroyo MV, Martinez ME. Age-related changes in parathyroid hormone-related protein and vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells. **Osteoporos Int** **2002**; *13 (11)*: 874-81.
- [269] Masaki T. Historical review: Endothelin. **Trends Pharmacol Sci** **2004**; *25 (4)*: 219-24.
- [270] Masuzawa K, Goto K, Jesmin S, Maeda S, Miyauchi T, Kaji Y, Oshika T, Hori S. An endothelin type A receptor antagonist reverses upregulated VEGF and ICAM-1 levels in streptozotocin-induced diabetic rat retina. **Curr Eye Res** **2006**; *31 (1)*: 79-89.
- [271] Matsuura A, Yamochi W, Hirata K, Kawashima S, Yokoyama M. Stimulatory interaction between vascular endothelial growth factor and endothelin-1 on each gene expression. **Hypertension** **1998**; *32 (1)*: 89-95.
- [272] Maynard SE, Venkatesha S, Thadhani R, Karumanchi SA. Soluble Fms-like tyrosine kinase 1 and endothelial dysfunction in the pathogenesis of preeclampsia. **Pediatr Res** **2005**; *57 (5 Pt 2)*: 1R-7R.
- [273] McCarter SD, Lai PF, Suen RS, Stewart DJ. Regulation of endothelin-1 by angiopoietin-1: implications for inflammation. **Exp Biol Med (Maywood)** **2006**; *231 (6)*: 985-91.
- [274] McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. **Bmj** **2000**; *321 (7261)*: 624-8.
- [275] Megdal SP, Kroenke CH, Laden F, Pukkala E, Schernhammer ES. Night work and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. **Eur J Cancer** **2005**; *41 (13)*: 2023-32.
- [276] Mersin H, Yildirim E, Gulben K, Berberoglu U. Is invasive lobular carcinoma different from invasive ductal carcinoma? **Eur J Surg Oncol** **2003**; *29 (4)*: 390-5.
- [277] Mettlin C. Global breast cancer mortality statistics. **CA Cancer J Clin** **1999**; *49 (3)*: 138-44.
- [278] Michaelson JS, Silverstein M, Wyatt J, Weber G, Moore R, Halpern E, Kopans DB, Hughes K. Predicting the survival of patients with breast carcinoma using tumor size. **Cancer** **2002**; *95 (4)*: 713-23.
- [279] Michaelson MD, Kaufman DS, Kantoff P, Oh WK, Smith MR. Randomized phase II study of atrasentan alone or in combination with zoledronic acid in men with metastatic prostate cancer. **Cancer** **2006**; *107 (3)*: 530-5.
- [280] Mizuguchi T, Nishiyama M, Moroi K, Tanaka H, Saito T, Masuda Y, Masaki T, de Wit D, Yanagisawa M, Kimura S. Analysis of two pharmacologically predicted

- endothelin B receptor subtypes by using the endothelin B receptor gene knockout mouse. **Br J Pharmacol** **1997**; *120* (8): 1427-30.
- [281] Modan B, Chetrit A, Alfandary E, Katz L. Increased risk of breast cancer after low-dose irradiation. **Lancet** **1989**; *1* (8639): 629-31.
- [282] Morales DE, McGowan KA, Grant DS, Maheshwari S, Bhartiya D, Cid MC, Kleinman HK, Schnaper HW. Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. **Circulation** **1995**; *91* (3): 755-63.
- [283] Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. **Am J Pathol** **2002**; *160* (3): 985-1000.
- [284] Morris CD, Rose A, Curwen J, Hughes AM, Wilson DJ, Webb DJ. Specific inhibition of the endothelin A receptor with ZD4054: clinical and pre-clinical evidence. **Br J Cancer** **2005**; *92* (12): 2148-52.
- [285] Morris CR, Wright WE, Schlag RD. The risk of developing breast cancer within the next 5, 10, or 20 years of a woman's life. **Am J Prev Med** **2001**; *20* (3): 214-8.
- [286] Morris EA. Screening for breast cancer with MRI. **Semin Ultrasound CT MR** **2003**; *24* (1): 45-54.
- [287] Motoike T, Markham DW, Rossant J, Sato TN. Evidence for novel fate of Flk1+ progenitor: contribution to muscle lineage. **Genesis** **2003**; *35* (3): 153-9.
- [288] Murphy G. Atrasentan for metastatic hormone refractory prostate cancer. **Issues Emerg Health Technol** **2005**; (77): 1-4.
- [289] Nakao-Hayashi J, Ito H, Kanayasu T, Morita I, Murota S. Stimulatory effects of insulin and insulin-like growth factor I on migration and tube formation by vascular endothelial cells. **Atherosclerosis** **1992**; *92* (2-3): 141-9.
- [290] Nakov R, Pfarr E, Eberle S. Darusentan: an effective endothelin A receptor antagonist for treatment of hypertension. **Am J Hypertens** **2002**; *15* (7 Pt 1): 583-9.
- [291] Nava P, Guarner V, Posadas R, Perez I, Banos G. Insulin-induced endothelin release and vasoreactivity in hypertriglyceridemic and hypertensive rats. **Am J Physiol** **1999**; *277* (1 Pt 2): H399-404.
- [292] Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P. The endothelin axis: emerging role in cancer. **Nat Rev Cancer** **2003**; *3* (2): 110-6.
- [293] Nelson JB. Endothelin receptor antagonists. **World J Urol** **2005**; *23* (1): 19-27.
- [294] Nelson JB, Chan-Tack K, Hedican SP, Magnuson SR, Opgenorth TJ, Bova GS, Simons JW. Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. **Cancer Res** **1996**; *56* (4): 663-8.
- [295] Nelson JB, Hedican SP, George DJ, Reddi AH, Piantadosi S, Eisenberger MA, Simons JW. Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. **Nat Med** **1995**; *1* (9): 944-9.
- [296] Nelson JB, Udan MS, Guruli G, Pflug BR. Endothelin-1 inhibits apoptosis in prostate cancer. **Neoplasia** **2005**; *7* (7): 631-7.
- [297] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **Faseb J** **1999**; *13* (1): 9-22.
- [298] Nie XJ, Olsson Y. Endothelin peptides in brain diseases. **Rev Neurosci** **1996**; *7* (3): 177-86.
- [299] Noel A, Simon N, Raus J, Foidart JM. Basement membrane components (matrigel) promote the tumorigenicity of human breast adenocarcinoma MCF7 cells and provide an in vivo model to assess the responsiveness of cells to estrogen. **Biochem Pharmacol** **1992**; *43* (6): 1263-7.
- [300] Oike Y, Ito Y, Hamada K, Zhang XQ, Miyata K, Arai F, Inada T, Araki K, Nakagata N, Takeya M, *et al.* Regulation of vasculogenesis and angiogenesis by EphB/ephrin-

- B2 signaling between endothelial cells and surrounding mesenchymal cells. **Blood** **2002**; *100* (4): 1326-33.
- [301] Okada M, Nishikibe M. BQ-788, a selective endothelin ET(B) receptor antagonist. **Cardiovasc Drug Rev** **2002**; *20* (1): 53-66.
- [302] Okuda Y, Tsurumaru K, Suzuki S, Miyauchi T, Asano M, Hong Y, Sone H, Fujita R, Mizutani M, Kawakami Y, *et al.* Hypoxia and endothelin-1 induce VEGF production in human vascular smooth muscle cells. **Life Sci** **1998**; *63* (6): 477-84.
- [303] Oliver FJ, de la Rubia G, Feener EP, Lee ME, Loeken MR, Shiba T, Quertermous T, King GL. Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells. **J Biol Chem** **1991**; *266* (34): 23251-6.
- [304] Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, *et al.* Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. **Nat Genet** **2001**; *28* (2): 131-8.
- [305] Opgenorth TJ, Adler AL, Calzadilla SV, Chiou WJ, Dayton BD, Dixon DB, Gehrke LJ, Hernandez L, Magnuson SR, Marsh KC, *et al.* Pharmacological characterization of A-127722: an orally active and highly potent ETA-selective receptor antagonist. **J Pharmacol Exp Ther** **1996**; *276* (2): 473-81.
- [306] Opgenorth TJ, Wu-Wong JR, Shiosaki K. Endothelin-converting enzymes. **Faseb J** **1992**; *6* (9): 2653-9.
- [307] Orth SR, Viedt C, Amann K, Ritz E. Endothelin in renal diseases and cardiovascular remodeling in renal failure. **Intern Med** **2001**; *40* (4): 285-91.
- [308] Parkin DM. International variation. **Oncogene** **2004**; *23* (38): 6329-40.
- [309] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin** **2005**; *55* (2): 74-108.
- [310] Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **Eur J Cancer** **2001**; *37 Suppl 8*: S4-66.
- [311] Partridge AH, Burstein HJ, Winer EP. Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer. **J Natl Cancer Inst Monogr** **2001**; (30): 135-42.
- [312] Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. **Cancer Treat Res** **2004**; *117*: 3-32.
- [313] Peduto Eberl L, Bovey R, Juillerat-Jeanneret L. Endothelin-receptor antagonists are proapoptotic and antiproliferative in human colon cancer cells. **Br J Cancer** **2003**; *88* (5): 788-95.
- [314] Perkins GH, Middleton LP. Breast cancer in men. **Bmj** **2003**; *327* (7409): 239-40.
- [315] Persigehl T, Heindel W, Bremer C. MR and optical approaches to molecular imaging. **Abdom Imaging** **2005**; *30* (3): 342-54.
- [316] Persigehl T, BR, Matuszewski L., Wall A., Kessler T., Kooijman H., Meier N., Ebert, W., Berdel W., Heindel W., Mesters R., Bremer C., Early, non-invasive monitoring of anti-angiogenic tumor treatment by USPIO enhanced MRI. Münster: Institut für Klinische Radiologie der Uniklinik Münster, **2004**.
- [317] Pflug BR MK, D'Antonio JM, Bocola-Mavar E, Curwen Jon, Growcott JW, Nelson JB., Defining the basis of an operational model for enhanced efficacy of combination therapy using an endothelin receptor antagonist and chemotherapeutic agents. In: EORTC, 2007.
- [318] Pflug BR, Zheng H, Udan MS, D'Antonio JM, Marshall FF, Brooks JD, Nelson JB. Endothelin-1 promotes cell survival in renal cell carcinoma through the ET(A) receptor. **Cancer Lett** **2006**.
- [319] Philipp S, Monti J, Pagel I, Langenickel T, Notter T, Ruschitzka F, Luscher T, Dietz R, Willenbrock R. Treatment with darusentan over 21 days improved cGMP

- generation in patients with chronic heart failure. **Clin Sci (Lond)** **2002**; *103 Suppl 48*: 249S-253S.
- [320] Platten M, Wick W, Weller M. Malignant glioma biology: role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. **Microsc Res Tech** **2001**; *52 (4)*: 401-10.
- [321] Pogo BG, Holland JF. Possibilities of a viral etiology for human breast cancer. A review. **Biol Trace Elem Res** **1997**; *56 (1)*: 131-42.
- [322] Pollock DM, Keith TL, Highsmith RF. Endothelin receptors and calcium signaling. **Faseb J** **1995**; *9 (12)*: 1196-204.
- [323] Pousset F, Isnard R, Lechat P, Kalotka H, Carayon A, Maistre G, Escolano S, Thomas D, Komajda M. Prognostic value of plasma endothelin-1 in patients with chronic heart failure. **Eur Heart J** **1997**; *18 (2)*: 254-8.
- [324] Prasad SK, Dargie HJ, Smith GC, Barlow MM, Grothues F, Groenning BA, Cleland JG, Pennell DJ. Comparison of the dual receptor endothelin antagonist enrasentan with enalapril in asymptomatic left ventricular systolic dysfunction: a cardiovascular magnetic resonance study. **Heart** **2006**; *92 (6)*: 798-803.
- [325] Puffenberger EG, Hosoda K, Washington SS, Nakao K, de Wit D, Yanagisawa M, Chakravart A. A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. **Cell** **1994**; *79 (7)*: 1257-66.
- [326] Quinn Dea. Docetaxel and Prednisone With or Without Atrasentan in Treating Patients With Stage IV Prostate Cancer and Bone Metastases That Did Not Respond to Previous Hormone Therapy, **2008**.
- [327] Quong J, Eppenberger-Castori S, Moore D, 3rd, Scott GK, Birrer MJ, Kueng W, Eppenberger U, Benz CC. Age-dependent changes in breast cancer hormone receptors and oxidant stress markers. **Breast Cancer Res Treat** **2002**; *76 (3)*: 221-36.
- [328] Raffa RB, Schupsky JJ, Jacoby HI. Endothelin-induced nociception in mice: mediation by ETA and ETB receptors. **J Pharmacol Exp Ther** **1996**; *276 (2)*: 647-51.
- [329] Rai A, Gulati A. Evidence for the involvement of ET(B) receptors in ET-1-induced changes in blood flow to the rat breast tumor. **Cancer Chemother Pharmacol** **2003**; *51 (1)*: 21-8.
- [330] Rebuffat P, Mazzocchi G, Macchi C, Malendowicz LK, Gottardo G, Nussdorfer GG. Mechanisms and receptor subtypes involved in the stimulatory action of endothelin-1 on rat adrenal zona glomerulosa. **Int J Mol Med** **1999**; *3 (3)*: 307-10.
- [331] Reichenberger F, Schauer J, Kellner K, Sack U, Stiehl P, Winkler J. Different expression of endothelin in the bronchoalveolar lavage in patients with pulmonary diseases. **Lung** **2001**; *179 (3)*: 163-74.
- [332] Reimer P, Bremer C, Allkemper T, Engelhardt M, Mahler M, Ebert W, Tombach B. Myocardial perfusion and MR angiography of chest with SH U 555 C: results of placebo-controlled clinical phase i study. **Radiology** **2004**; *231 (2)*: 474-81.
- [333] Remuzzi G, Perico N, Benigni A. New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. **Nat Rev Drug Discov** **2002**; *1 (12)*: 986-1001.
- [334] Remy-Jouet I, Cartier F, Lesouhaitier O, Kuhn JM, Fournier A, Vaudry H, Delarue C. Mechanism of action of endothelins on adrenocortical cells. **Horm Metab Res** **1998**; *30 (6-7)*: 341-5.
- [335] Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. **Blood** **1999**; *93 (8)*: 2627-36.
- [336] Ribatti D, Vacca A, Dammacco F. New non-angiogenesis dependent pathways for tumour growth. **Eur J Cancer** **2003**; *39 (13)*: 1835-41.

- [337] Richard DE, Vouret-Craviari V, Pouyssegur J. Angiogenesis and G-protein-coupled receptors: signals that bridge the gap. **Oncogene** **2001**; *20* (13): 1556-62.
- [338] Richardson AK, Cox B, McCredie MR, Dite GS, Chang JH, Gertig DM, Southey MC, Giles GG, Hopper JL. Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and risk of breast cancer before age 40 years: a case-control study. **Br J Cancer** **2004**; *90* (11): 2149-52.
- [339] Risau W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature** **1997**; *386* (6626): 671-4.
- [340] Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. **Annu Rev Cell Dev Biol** **1995**; *11*: 73-91.
- [341] Rivard A, Silver M, Chen D, Kearney M, Magner M, Annex B, Peters K, Isner JM. Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. **Am J Pathol** **1999**; *154* (2): 355-63.
- [342] Rockhill B, Willett WC, Hunter DJ, Manson JE, Hankinson SE, Spiegelman D, Colditz GA. Physical activity and breast cancer risk in a cohort of young women. **J Natl Cancer Inst** **1998**; *90* (15): 1155-60.
- [343] Rosano L, Di Castro V, Spinella F, Decandia S, Natali PG, Bagnato A. ZD4054, a potent endothelin receptor A antagonist, inhibits ovarian carcinoma cell proliferation. **Exp Biol Med (Maywood)** **2006**; *231* (6): 1132-5.
- [344] Rosano L, Di Castro V, Spinella F, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. ZD4054, a specific antagonist of the endothelin A receptor, inhibits tumor growth and enhances paclitaxel activity in human ovarian carcinoma in vitro and in vivo. **Mol Cancer Ther** **2007**; *6* (7): 2003-11.
- [345] Rosano L, Di Castro V, Spinella F, Tortora G, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. Combined targeting of endothelin A receptor and epidermal growth factor receptor in ovarian cancer shows enhanced antitumor activity. **Cancer Res** **2007**; *67* (13): 6351-9.
- [346] Rosano L, Salani D, Di Castro V, Spinella F, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 promotes proteolytic activity of ovarian carcinoma. **Clin Sci (Lond)** **2002**; *103 Suppl 48*: 306S-309S.
- [347] Rosano L, Spinella F, Salani D, Di Castro V, Venuti A, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. Therapeutic targeting of the endothelin a receptor in human ovarian carcinoma. **Cancer Res** **2003**; *63* (10): 2447-53.
- [348] Rosano L, Varmi M, Salani D, Di Castro V, Spinella F, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 induces tumor proteinase activation and invasiveness of ovarian carcinoma cells. **Cancer Res** **2001**; *61* (22): 8340-6.
- [349] Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. **J Clin Oncol** **1993**; *11* (11): 2090-100.
- [350] Ross BD, Moffat BA, Lawrence TS, Mukherji SK, Gebarski SS, Quint DJ, Johnson TD, Junck L, Robertson PL, Muraszko KM, *et al.* Evaluation of cancer therapy using diffusion magnetic resonance imaging. **Mol Cancer Ther** **2003**; *2* (6): 581-7.
- [351] Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, *et al.* Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **Jama** **2002**; *288* (3): 321-33.
- [352] Rothermund L, Traupe T, Dieterich M, Kossmehl P, Yagil C, Yagil Y, Kreutz R. Nephroprotective effects of the endothelin ET(A) receptor antagonist darusentan in salt-sensitive genetic hypertension. **Eur J Pharmacol** **2003**; *468* (3): 209-16.
- [353] Rubanyi GM, Botelho LH. Endothelins. **Faseb J** **1991**; *5* (12): 2713-20.
- [354] Rygaard J, Povlsen CO. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. **Acta Pathol Microbiol Scand** **1969**; *77* (4): 758-60.
- [355] Saenz de Tejada I, Mueller JD, de Las Morenas A, Machado M, Moreland RB, Krane RJ, Wolfe HJ, Traish AM. Endothelin in the urinary bladder. I. Synthesis of

- endothelin-1 by epithelia, muscle and fibroblasts suggests autocrine and paracrine cellular regulation. **J Urol** **1992**; *148* (4): 1290-8.
- [356] Saida K, Mitsui Y, Ishida N. A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity. **J Biol Chem** **1989**; *264* (25): 14613-6.
- [357] Sainsbury JR, Anderson TJ, Morgan DA. ABC of breast diseases: breast cancer. **Bmj** **2000**; *321* (7263): 745-50.
- [358] Sakamoto G, Sugano H. Pathology of breast cancer: present and prospect in Japan. **Breast Cancer Res Treat** **1991**; *18 Suppl 1*: S81-3.
- [359] Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. **Nature** **1990**; *348* (6303): 732-5.
- [360] Salani D, Di Castro V, Nicotra MR, Rosano L, Tecce R, Venuti A, Natali PG, Bagnato A. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. **Am J Pathol** **2000**; *157* (5): 1537-47.
- [361] Salani D, Rosano L, Di Castro V, Spinella F, Venuti A, Padley RJ, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. ABT-627, a potent endothelin receptor A antagonist, inhibits ovarian carcinoma growth in vitro. **Clin Sci (Lond)** **2002**; *103 Suppl 48*: 318S-321S.
- [362] Salani D, Taraboletti G, Rosano L, Di Castro V, Borsotti P, Giavazzi R, Bagnato A. Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. **Am J Pathol** **2000**; *157* (5): 1703-11.
- [363] Samara E, Dutta S, Cao G, Granneman GR, Dordal MS, Padley RJ. Single-dose pharmacokinetics of atrasentan, an endothelin-A receptor antagonist. **J Clin Pharmacol** **2001**; *41* (4): 397-403.
- [364] Schaffer P. LH, Panzer M., Riepl M., Röper B., Sommer H., Wuttge-Hannig A. Aus: MANUAL Mammakarzinome: "Radioonkologische Behandlung". *Tumorzentrum München und W.Zuckschwerdt Verlag München, München 2005.*
- [365] Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** **2003**; *23* (7): 1143-51.
- [366] Schapira DV, Clark RA, Wolff PA, Jarrett AR, Kumar NB, Aziz NM. Visceral obesity and breast cancer risk. **Cancer** **1994**; *74* (2): 632-9.
- [367] Schick F. Grundlagen der Magnetresonanztomographie (MRT). **Radiologe** **2005**; *45*: 69-88.
- [368] Schini VB, Hendrickson H, Heublein DM, Burnett JC, Jr., Vanhoutte PM. Thrombin enhances the release of endothelin from cultured porcine aortic endothelial cells. **Eur J Pharmacol** **1989**; *165* (2-3): 333-4.
- [369] Schmidt BL, Pickering V, Liu S, Quang P, Dolan J, Connelly ST, Jordan RC. Peripheral endothelin A receptor antagonism attenuates carcinoma-induced pain. **Eur J Pain** **2006**.
- [370] Schramek H, Wang Y, Konieczkowski M, Simonson MS, Dunn MJ. Endothelin-1 stimulates cytosolic phospholipase A2 activity and gene expression in rat glomerular mesangial cells. **Kidney Int** **1994**; *46* (6): 1644-52.
- [371] Schrey MP, Patel KV, Tezapsidis N. Bombesin and glucocorticoids stimulate human breast cancer cells to produce endothelin, a paracrine mitogen for breast stromal cells. **Cancer Res** **1992**; *52* (7): 1786-90.
- [372] Scott-Burden T, Resink TJ, Hahn AW, Vanhoutte PM. Induction of endothelin secretion by angiotensin II: effects on growth and synthetic activity of vascular smooth muscle cells. **J Cardiovasc Pharmacol** **1991**; *17 Suppl 7*: S96-100.
- [373] Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Perruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. **Proc Natl Acad Sci U S A** **1997**; *94* (25): 13612-7.

- [374] Serradeil-Le Gal C, Jouneaux C, Sanchez-Bueno A, Raufaste D, Roche B, Preaux AM, Maffrand JP, Cobbold PH, Hanoune J, Lotersztajn S. Endothelin action in rat liver. Receptors, free Ca<sup>2+</sup> oscillations, and activation of glycogenolysis. **J Clin Invest** 1991; 87 (1): 133-8.
- [375] Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. **Nature** 1995; 376 (6535): 62-6.
- [376] Shichiri M, Hirata Y, Nakajima T, Ando K, Imai T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine growth factor for human cancer cell lines. **J Clin Invest** 1991; 87 (5): 1867-71.
- [377] Shigematsu S, Yamauchi K, Nakajima K, Iijima S, Aizawa T, Hashizume K. IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. **Endocr J** 1999; 46 Suppl: S59-62.
- [378] Shin MK, Levorse JM, Ingram RS, Tilghman SM. The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. **Nature** 1999; 402 (6761): 496-501.
- [379] Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. **Science** 1998; 281 (5383): 1683-6.
- [380] Simons M. Angiogenesis: where do we stand now? **Circulation** 2005; 111 (12): 1556-66.
- [381] Simpson PT, Gale T, Fulford LG, Reis-Filho JS, Lakhani SR. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: pathology of atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma in situ. **Breast Cancer Res** 2003; 5 (5): 258-62.
- [382] Siren AL, Lewczuk P, Hasselblatt M, Dembowski C, Schilling L, Ehrenreich H. Endothelin B receptor deficiency augments neuronal damage upon exposure to hypoxia-ischemia in vivo. **Brain Res** 2002; 945 (1): 144-9.
- [383] Sittek H. dWJC, Eiermann W., Engel J., Gauwerky J., Hellemann H. P., Heywang-Köbrunner S. KIM, Mahl G., Perlet C., Sommer H., Strigl R., Untch M. MANUAL Mammakarzinome - Screening und Diagnostik. *Tumorzentrum München, München* 2003.
- [384] Sittek H. dWJC, Engel J., Hellemann H.P., Heywang-Köbrunner S.H., Keßler M., Mahl G. PC, Sommer H., Strauss A., Strigl R., Untch M. Aus: MANUAL Mammakarzinome: "Mammographie-Screening, bildgebende und minimal-invasive Diagnostik". *Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München, München* 2005.
- [385] Siziopikou KP, Schnitt SJ. MIB-1 Proliferation Index in Ductal Carcinoma In Situ of the Breast: Relationship to the Expression of the Apoptosis-Regulating Proteins bcl-2 and p53. **Breast J** 2000; 6 (6): 400-406.
- [386] Smith I, Chua S. Medical treatment of early breast cancer. I: adjuvant treatment. **Bmj** 2006; 332 (7532): 34-7.
- [387] Smollich M, Gotte M, Kersting C, Fischgrabe J, Kiesel L, Wulfing P. Selective ET(A)R antagonist atrasentan inhibits hypoxia-induced breast cancer cell invasion. **Breast Cancer Res Treat** 2007.
- [388] Smollich M, Gotte M, Yip GW, Yong ES, Kersting C, Fischgrabe J, Radke I, Kiesel L, Wulfing P. On the role of endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) and neprilysin in human breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2007; 106 (3): 361-9.
- [389] Smollich M, Wulfing P. The endothelin axis: a novel target for pharmacotherapy of female malignancies. **Curr Vasc Pharmacol** 2007; 5 (3): 239-48.
- [390] Sokolovsky M, Ambar I, Galron R. A novel subtype of endothelin receptors. **J Biol Chem** 1992; 267 (29): 20551-4.

- [391] Sommer H. LL, Lindner H., Riepl M., von Rottkay P., Schaffer P., Sittek H. „A. W-H. Aus: MANUAL Mammakarzinome: "Palliative Strahlentherapie und/oder Operationen im metastasierten Stadium". *Tumorzentrum München und W.Zuckschwerdt Verlag München, München 2005.*
- [392] Spinella F, Rosano L, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in ovarian carcinoma cells. **J Biol Chem** 2002; 277 (31): 27850-5.
- [393] Spinella F, Rosano L, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1-induced prostaglandin E2-EP2, EP4 signaling regulates vascular endothelial growth factor production and ovarian carcinoma cell invasion. **J Biol Chem** 2004; 279 (45): 46700-5.
- [394] Spinella F, Rosano L, Di Castro V, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 decreases gap junctional intercellular communication by inducing phosphorylation of connexin 43 in human ovarian carcinoma cells. **J Biol Chem** 2003; 278 (42): 41294-301.
- [395] Statistisches Bundesamt Wiesbaden. Fachserie 12 / Reihe 4: Gesundheitswesen - Todesursachen in Deutschland: Statistisches Bundesamt, 2003.
- [396] Statistisches Bundesamt Wiesbaden. Fachserie 12 / Reihe 6.2: Gesundheitswesen. - Diagnosedaten der Krankenhauspatientinnen und -patienten 2002. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt, 2004.
- [397] Stojilkovic SS, Merelli F, Iida T, Krsmanovic LZ, Catt KJ. Endothelin stimulation of cytosolic calcium and gonadotropin secretion in anterior pituitary cells. **Science** 1990; 248 (4963): 1663-6.
- [398] Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. **Bioessays** 2004; 26 (9): 943-54.
- [399] Strachan FE, Spratt JC, Wilkinson IB, Johnston NR, Gray GA, Webb DJ. Systemic blockade of the endothelin-B receptor increases peripheral vascular resistance in healthy men. **Hypertension** 1999; 33 (1 Pt 2): 581-5.
- [400] Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. **N Engl J Med** 1997; 336 (20): 1401-8.
- [401] Sugawara F, Ninomiya H, Okamoto Y, Miwa S, Mazda O, Katsura Y, Masaki T. Endothelin-1-induced mitogenic responses of Chinese hamster ovary cells expressing human endothelinA: the role of a wortmannin-sensitive signaling pathway. **Mol Pharmacol** 1996; 49 (3): 447-57.
- [402] Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. **Cell** 1996; 87 (7): 1171-80.
- [403] Swope VB, Medrano EE, Smalara D, Abdel-Malek ZA. Long-term proliferation of human melanocytes is supported by the physiologic mitogens alpha-melanotropin, endothelin-1, and basic fibroblast growth factor. **Exp Cell Res** 1995; 217 (2): 453-9.
- [404] Szabo G, Bahrle S, Fazekas L, MacDonald D, Stumpf N, Vahl CF, Hagl S. Endothelin-A receptor antagonist BQ123 protects against myocardial and endothelial reperfusion injury. **Thorac Cardiovasc Surg** 1998; 46 (4): 232-6.
- [405] Takahashi K, Jones PM, Kanse SM, Lam HC, Spokes RA, Ghatei MA, Bloom SR. Endothelin in the gastrointestinal tract. Presence of endothelinlike immunoreactivity, endothelin-1 messenger RNA, endothelin receptors, and pharmacological effect. **Gastroenterology** 1990; 99 (6): 1660-7.

- [406] Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. **Nat Med** **1999**; *5 (4)*: 434-8.
- [407] Tanaka J, Miyake T, Shimizu T, Wakayama T, Tsumori M, Koshimura K, Murakami Y, Kato Y. Effect of continuous subcutaneous administration of a low dose of G-CSF on stem cell mobilization in healthy donors: a feasibility study. **Int J Hematol** **2002**; *75 (5)*: 489-92.
- [408] Taniguchi T, Muramatsu I. Pharmacological knockout of endothelin ET(A) receptors. **Life Sci** **2003**; *74 (2-3)*: 405-9.
- [409] Teraki E, Tajima S, Manaka I, Kawashima M, Miyagishi M, Imokawa G. Role of endothelin-1 in hyperpigmentation in seborrheic keratosis. **Br J Dermatol** **1996**; *135 (6)*: 918-23.
- [410] Thurlimann B, Keshaviah A, Coates AS, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, Paridaens R, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Rabaglio M, *et al.* A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. **N Engl J Med** **2005**; *353 (26)*: 2747-57.
- [411] Titus B, Frierson HF, Jr., Conaway M, Ching K, Guise T, Chirgwin J, Hampton G, Theodorescu D. Endothelin axis is a target of the lung metastasis suppressor gene RhoGDI2. **Cancer Res** **2005**; *65 (16)*: 7320-7.
- [412] Tiwari RK, Borgen PI, Wong GY, Cordon-Cardo C, Osborne MP. HER-2/neu amplification and overexpression in primary human breast cancer is associated with early metastasis. **Anticancer Res** **1992**; *12 (2)*: 419-25.
- [413] Toi M, Hoshina S, Takayanagi T, Tominaga T. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. **Jpn J Cancer Res** **1994**; *85 (10)*: 1045-9.
- [414] Toi M, Kashitani J, Tominaga T. Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. **Int J Cancer** **1993**; *55 (3)*: 371-4.
- [415] Toi M, Kondo S, Suzuki H, Yamamoto Y, Inada K, Imazawa T, Taniguchi T, Tominaga T. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. **Cancer** **1996**; *77 (6)*: 1101-6.
- [416] Tokudome T, Horio T, Soeki T, Mori K, Kishimoto I, Suga S, Yoshihara F, Kawano Y, Kohno M, Kangawa K. Inhibitory effect of C-type natriuretic peptide (CNP) on cultured cardiac myocyte hypertrophy: interference between CNP and endothelin-1 signaling pathways. **Endocrinology** **2004**; *145 (5)*: 2131-40.
- [417] Tombach B, Reimer P, Bremer C, Allkemper T, Engelhardt M, Mahler M, Ebert W, Heindel W. First-pass and equilibrium-MRA of the aortoiliac region with a superparamagnetic iron oxide blood pool MR contrast agent (SH U 555 C): results of a human pilot study. **NMR Biomed** **2004**; *17 (7)*: 500-6.
- [418] Tominaga S, Kuroishi T. Epidemiology of Breast Cancer in Japan. **Breast Cancer** **1995**; *2 (1)*: 1-7.
- [419] Tostes RC, Touyz RM, He G, Ammarguella F, Schiffrin EL. Endothelin A receptor blockade decreases expression of growth factors and collagen and improves matrix metalloproteinase-2 activity in kidneys from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **J Cardiovasc Pharmacol** **2002**; *39 (6)*: 892-900.
- [420] Traish A, Moran E, Krane RJ, Saenz de Tejada I. Endothelin in the urinary bladder. II. Characterization of endothelin receptor subtypes. **J Urol** **1992**; *148 (4)*: 1299-306.
- [421] Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P. Menopause and breast cancer risk. **J Natl Cancer Inst** **1972**; *48 (3)*: 605-13.
- [422] Tyczynski J, Bray F., Parkin Maxwell D. Breast cancer in Europe. **European Network Of Cancer Registries (ENCR) - Cancer Fact Sheets** **2002**; *2*.

- [423] U.S. Food and Drug Administration (FDA). Catalog of FDA Approved Drug Products, **2006**.
- [424] U.S. national institutes of health. clinicaltrials.gov. Vol. 2008, **2008**.
- [425] Uchida Y, Ninomiya H, Saotome M, Nomura A, Ohtsuka M, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T, Hasegawa S. Endothelin, a novel vasoconstrictor peptide, as potent bronchoconstrictor. **Eur J Pharmacol** **1988**; *154 (2)*: 227-8.
- [426] United Kingdom National Case-Control Study Group. Breast feeding and risk of breast cancer in young women. United Kingdom National Case-Control Study Group. **Bmj** **1993**; *307 (6895)*: 17-20.
- [427] Untch M, dWJC, Eiermann W., Engel J., Gabka C.J., Höß C., Janni W., Kahlert S. vKF, Lebeau A., Oberlechner E., Permanetter W., Röper B., Schaffer P. Aus: MANUAL Mammakarzinome: "Klinik der in-situ-Karzinome". *Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München*, **München 2005**.
- [428] Untch M, GK, Höß C., Kahlert St., Perlet C., Rauthe G. MANUAL Mammakarzinome - Hormonelle Substitutionstherapie (HRT) und Mammakarzinom. **München 2003**.
- [429] Vagnucci AH, Jr., Li WW. Alzheimer's disease and angiogenesis. **Lancet** **2003**; *361 (9357)*: 605-8.
- [430] van Mourik JA, Romani de Wit T, Voorberg J. Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. **Histochem Cell Biol** **2002**; *117 (2)*: 113-22.
- [431] Verhaar MC, Grahn AY, Van Weerd AW, Honing ML, Morrison PJ, Yang YP, Padley RJ, Rabelink TJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of ABT-627, an oral ETA selective endothelin antagonist, in humans. **Br J Clin Pharmacol** **2000**; *49 (6)*: 562-73.
- [432] Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G. Breast cancer. **Lancet** **2005**; *365 (9472)*: 1727-41.
- [433] Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, Aguilar M, Marubini E. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. **N Engl J Med** **2002**; *347 (16)*: 1227-32.
- [434] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N Engl J Med** **1988**; *319 (9)*: 525-32.
- [435] Volm M, Koomagi R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. **Anticancer Res** **2000**; *20 (3A)*: 1527-33.
- [436] Waltenberger J. Impaired collateral vessel development in diabetes: potential cellular mechanisms and therapeutic implications. **Cardiovasc Res** **2001**; *49 (3)*: 554-60.
- [437] Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. **Cell** **1998**; *93 (5)*: 741-53.
- [438] Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. **Stroke** **2004**; *35 (7)*: 1732-7.
- [439] Warner TD, Allcock GH, Corder R, Vane JR. Use of the endothelin antagonists BQ-123 and PD 142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDRF. **Br J Pharmacol** **1993**; *110 (2)*: 777-82.
- [440] Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. **J Natl Cancer Inst** **1992**; *84 (24)*: 1875-87.
- [441] Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. **N Engl J Med** **1991**; *324 (1)*: 1-8.

- [442] Weissberg PL, Witchell C, Davenport AP, Hesketh TR, Metcalfe JC. The endothelin peptides ET-1, ET-2, ET-3 and sarafotoxin S6b are co-mitogenic with platelet-derived growth factor for vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis** **1990**; *85* (2-3): 257-62.
- [443] Whittle BJ, Esplugues JV. Induction of rat gastric damage by the endothelium-derived peptide, endothelin. **Br J Pharmacol** **1988**; *95* (4): 1011-3.
- [444] Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. **Cell** **1999**; *98* (6): 769-78.
- [445] Williams D TE, Sreedharan D, Brooks N, Curwen J, Growcott JW. The combination of the specific endothelin A receptor antagonist ZD4054 and submaximal bisphosphonate pamidronate prevents soft-tissue metastasis. In: EORTC, 2007.
- [446] Williams ED TE, Sreedharan D, Brooks N. The combination of a specific endothelin A receptor antagonist ZD4054 and submaximal bisphosphonate pamidronate prevents bone metastasis. **European Journal of Cancer Supplements** **2006**; *4* (12): 15.
- [447] Wiseman LR, Spencer CM. Paclitaxel. An update of its use in the treatment of metastatic breast cancer and ovarian and other gynaecological cancers. **Drugs Aging** **1998**; *12* (4): 305-34.
- [448] Wolf I, Sadetzki S, Catane R, Karasik A, Kaufman B. Diabetes mellitus and breast cancer. **Lancet Oncol** **2005**; *6* (2): 103-11.
- [449] Wolf SC, Schultze M, Risler T, Rieg T, Lang F, Schulze-Osthoff K, Brehm BR. Stimulation of serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 gene expression by endothelin-1. **Biochem Pharmacol** **2006**; *71* (8): 1175-83.
- [450] Wolkart G, Stessel H, Saad Z, Kirchengast M, Brunner F. Cardioprotective effects of atrasentan, an endothelin-A receptor antagonist, but not of nitric oxide in diabetic mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. **Br J Pharmacol** **2006**; *148* (5): 671-81.
- [451] Wong C, Wellman TL, Lounsbury KM. VEGF and HIF-1alpha expression are increased in advanced stages of epithelial ovarian cancer. **Gynecol Oncol** **2003**; *91* (3): 513-7.
- [452] Wright HM, Malik KU. Prostacyclin synthesis elicited by endothelin-1 in rat aorta is mediated by an ETA receptor via influx of calcium and is independent of protein kinase C. **Hypertension** **1995**; *26* (6 Pt 2): 1035-40.
- [453] Wulfing C, Eltze E, Piechota H, Abol-Enein H, Wulfing P, Bode ME, Hertle L, Sievert KD. Expression of endothelin-1 and endothelin-A and -B receptors in invasive bladder cancer. **Oncol Rep** **2005**; *13* (2): 223-8.
- [454] Wulfing C, Eltze E, Yamini J, Wulfing P, Bierer S, Bocker W, Hertle L, Semjonow A, Sievert KD. Expression of the endothelin axis in bladder cancer: relationship to clinicopathologic parameters and long-term survival. **Eur Urol** **2005**; *47* (5): 593-600.
- [455] Wulfing P, Diallo R, Kersting C, Wulfing C, Poremba C, Greb RR, Bocker W, Kiesel L. Endothelin-1, Endothelin-A- and Endothelin-B-receptor expression in preinvasive and invasive breast disease. **Oncol Rep** **2004**; *11* (4): 791-6.
- [456] Wulfing P, Diallo R, Kersting C, Wulfing C, Poremba C, Rody A, Greb RR, Bocker W, Kiesel L. Expression of endothelin-1, endothelin-A, and endothelin-B receptor in human breast cancer and correlation with long-term follow-up. **Clin Cancer Res** **2003**; *9* (11): 4125-31.
- [457] Wulfing P, Gotte M, Sonntag B, Kersting C, Schmidt H, Wulfing C, Buerger H, Greb R, Bocker W, Kiesel L. Overexpression of Endothelin-A-receptor in breast cancer: regulation by estradiol and cobalt-chloride induced hypoxia. **Int J Oncol** **2005**; *26* (4): 951-60.
- [458] Wulfing P, Kersting C, Tio J, Fischer RJ, Wulfing C, Poremba C, Diallo R, Bocker W, Kiesel L. Endothelin-1-, endothelin-A-, and endothelin-B-receptor expression is

- correlated with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in breast cancer. **Clin Cancer Res** 2004; 10 (7): 2393-400.
- [459] Wülfing P, SM, Götte M, Fischgräbe J, Radke I, Chen S, Kiesel L. ZD4054, a selective endothelin A receptor antagonist, reduces breast cancer cell migration and invasion and exhibits additive effects with aromatase inhibitors and fulvestrant. In: EORTC, 2007.
- [460] Wulfing P, Tio J, Kersting C, Sonntag B, Buerger H, Wulfing C, Euler U, Boecker W, Tulusan AH, Kiesel L. Expression of endothelin-A-receptor predicts unfavourable response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. **Br J Cancer** 2004; 91 (3): 434-40.
- [461] Yamashita J, Ogawa M, Inada K, Yamashita S, Matsuo S, Takano S. A large amount of endothelin-1 is present in human breast cancer tissues. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol** 1991; 74 (3): 363-9.
- [462] Yamashita J, Ogawa M, Nomura K, Matsuo S, Inada K, Yamashita S, Nakashima Y, Saishoji T, Takano S, Fujita S. Interleukin 6 stimulates the production of immunoreactive endothelin 1 in human breast cancer cells. **Cancer Res** 1993; 53 (3): 464-7.
- [463] Yamashita J, Ogawa M, Sakai K. Prognostic significance of three novel biologic factors in a clinical trial of adjuvant therapy for node-negative breast cancer. **Surgery** 1995; 117 (6): 601-8.
- [464] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature** 1988; 332 (6163): 411-5.
- [465] Yin J, Lee JA, Howells RD. Stimulation of c-fos and c-jun gene expression and down-regulation of proenkephalin gene expression in C6 glioma cells by endothelin-1. **Brain Res Mol Brain Res** 1992; 14 (3): 213-20.
- [466] Yin JJ, Mohammad KS, Kakonen SM, Harris S, Wu-Wong JR, Wessale JL, Padley RJ, Garrett IR, Chirgwin JM, Guise TA. A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100 (19): 10954-9.
- [467] Yoburn BC, Sierra V, Lutfy K. Chronic opioid antagonist treatment: assessment of receptor upregulation. **Eur J Pharmacol** 1989; 170 (3): 193-200.
- [468] Yohn JJ, Smith C, Stevens T, Hoffman TA, Morelli JG, Hurt DL, Yanagisawa M, Kane MA, Zamora MR. Human melanoma cells express functional endothelin-1 receptors. **Biochem Biophys Res Commun** 1994; 201 (1): 449-57.
- [469] Yokokawa K, Mandal AK, Kohno M, Horio T, Murakawa K, Yasunari K, Takeda T. Heparin suppresses endothelin-1 action and production in spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol** 1992; 263 (5 Pt 2): R1035-41.
- [470] Yonemoto RH. Breast cancer in Japan and United States: epidemiology, hormone receptors, pathology, and survival. **Arch Surg** 1980; 115 (9): 1056-62.
- [471] Yoshimoto S, Ishizaki Y, Sasaki T, Murota S. Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells. **Stroke** 1991; 22 (3): 378-83.
- [472] Yoshizawa T, Shinmi O, Giaid A, Yanagisawa M, Gibson SJ, Kimura S, Uchiyama Y, Polak JM, Masaki T, Kanazawa I. Endothelin: a novel peptide in the posterior pituitary system. **Science** 1990; 247 (4941): 462-4.
- [473] Yoshizumi M, Kurihara H, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Yazaki Y. Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun** 1989; 161 (2): 859-64.

- [474] Yumet G, Chin MH, Carey B, Soprano KJ, Lipson KE. Endothelin-1 induces gene expression through stimulation of endothelin type A receptors in normal rat kidney cells. **J Cell Physiol** **1995**; *164* (3): 491-8.
- [475] Yuyama H, Koakutsu A, Fujiyasu N, Fujimori A, Sato S, Shibasaki K, Tanaka S, Sudoh K, Sasamata M, Miyata K. Inhibitory Effects of a Selective Endothelin-A Receptor Antagonist YM598 on Endothelin-1-induced Potentiation of Nociception in Formalin-induced and Prostate Cancer-induced Pain Models in Mice. **J Cardiovasc Pharmacol** **2004**; *44 Suppl 1*: S479-82.
- [476] Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. **Cancer** **2000**; *88* (11): 2606-18.
- [477] Zhu H, Melder RJ, Baxter LT, Jain RK. Physiologically based kinetic model of effector cell biodistribution in mammals: implications for adoptive immunotherapy. **Cancer Res** **1996**; *56* (16): 3771-81.
- [478] Ziche M, Morbidelli L, Donnini S, Ledda F. ETB receptors promote proliferation and migration of endothelial cells. **J Cardiovasc Pharmacol** **1995**; *26 Suppl 3*: S284-6.
- [479] Zografos GC, Panou M, Panou N. Common risk factors of breast and ovarian cancer: recent view. **Int J Gynecol Cancer** **2004**; *14* (5): 721-40.
- [480] Zonnenberg BA, Groenewegen G, Janus TJ, Leahy TW, Humerickhouse RA, Isaacson JD, Carr RA, Voest E. Phase I dose-escalation study of the safety and pharmacokinetics of atrasentan: an endothelin receptor antagonist for refractory prostate cancer. **Clin Cancer Res** **2003**; *9* (8): 2965-72.
- [481] Zygmunt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, Kunzi-Rapp K, Munstedt K, Rao CV, Lang U, Preissner KT. Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. **J Clin Endocrinol Metab** **2002**; *87* (11): 5290-6.
- [482] Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** **2003**; *110 Suppl 1*: S10-8.

## 6 Danksagung

Frau Privatdozentin Dr. med. habil. Pia Wülfing gilt mein besonderer Dank hinsichtlich der Überlassung des Themas, der Bereitstellung von Materialien, der freundlichen Integration in die Arbeitsgruppe und der fachlichen, ausführlichen Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Dr. med. Thorsten Persigehl möchte ich für seine geduldige und hilfreiche Einführung in die radiologischen und tierexperimentellen Techniken als ein immer zur Seite stehender kompetenter Ansprechpartner danken.

Bei den MRT – Untersuchungen und –auswertungen erwies sich Frau Janine Ring als unentbehrlich – vielen Dank.

Ein großes „Danke“ auch an das „Laborteam“ mit Barbara Kloke, Monika Offers, Birgit Pers und Vera Samoilova für die labortechnische Unterstützung.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern und Stefanie Berger für alle Unterstützung, Geduld und Motivation.

## 7 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Volker Meyer

geboren am 02.09.1980 in Esens

Eltern: Dipl. Kfm. Klaus Werner Meyer und Inge Meyer; geb. Roloff

Drei Geschwister

### Schulbildung

1987 – 1991	Grundschule Esens-Nord
1991 – 1993	Orientierungsstufe Esens
1993 – 2000	Niedersächsisches Internatsgymnasium Esens
Juni 2000	Abitur

### Hochschulbildung

Oktober 2000	Studium der Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, vorklinischer Abschnitt
März 2003	Physikum
April 2003	Studium der Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, klinischer Abschnitt
Februar 2006	Praktisches Jahr
April 2007	Ärztliche Prüfung
Seit August 2007	Assistenzarzt in der Artemed Fachklinik, Prof. Dr. Dr. K. Salfeld, Bad Oeynhausen

## Anhang

## I: Glossar

Abkürzung	Definition
ADC	Apparent Diffusion Coefficient
ANF	Atrial Natriuretic Factor
ANP	Atrial Natriuretic Peptide
ASR	„Altersstandardisierte Rate“ :Zur Vergleichbarkeit unterschiedlicher Länder herangezogene Umrechnung der altersspezifischen Werte in altersstandardisierte, die sich auf eine fiktive „Standardbevölkerung“ bezieht (z.B. Welt- oder Europastandard) pro 100.000 Einwohner, Männer und Frauen inbegriffen.
BET	Brusterhaltende Therapie
BNP	Brain Natriuretic Peptide
CATCH 22	Symptomenkomplex aus [engl.] Cardiac malformation, Abnormal facies, Thymic hypoplasia, Cleft palate, Hypocalcemia, der aufgrund einer Mikrodeletion am langen Arm des Chromosoms 22 zustande kommt
CIS	Carcinoma In Situ
CMV	Cytomegalievirus
CNP	C-type Natriuretic Peptide
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DWI	Diffusion Weighted Imaging, Diffusionsgewichtete Magnetresonanztomographie
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECE-1	Endothelin Converting Enzyme-1
Echo	Signalintensität
EGF	Epidermal Growth Factor
EPI	Echoplanar Imaging
ER + / -	Östrogenrezeptorstatus positiv / negativ
ET-1 /-2/-3	Endothelin 1, 2, 3
ET <sub>A</sub> R / ET <sub>B</sub> R	Endothelin – A / - B – Rezeptor
FDA	United States' Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
Flt	fms-like tyrosine kinase
G 1/2/3	Grading des Tumors, also Differenzierungsgrad
GMZ	Glatte Muskelzellen
hCG	humanes Choriongonadotropin
HDL	High Density Lipoproteins, Lipoproteine hoher Dichte
HET	Hormoneratztherapie
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxia - Inducible Transcription Factor
HPV	Humanes Papilloma Virus
i.S.	im Serum
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IGF	Insuline Like Growth Factor

IL-8	Interleukin 8
JÜR	-Jahresüberlebensrate (z.B. 10-JÜR)
KG	Körpergewicht
$k_i$	Hemmkonstante. Sie gibt die Fähigkeit einer Substanz an, kompetitiv an einen Rezeptor zu binden. Je niedriger $k_i$ , desto geringer ist die benötigte Stoffmenge zur Rezeptorenbindung und desto höher die Affinität zu diesem Rezeptor.
KI	(95%) Konfidenzintervall
KM	Kontrastmittel
LDL	Low Density Lipoproteins, Lipoproteine niedriger Dichte
LK	Lymphknoten
LPA	Lysophosphatic acid
LPS	Lipopolysaccharid
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MRM	Modifizierte Radikale Mastektomie
MRT	Magnetresonanztomographie
MSepi	Multi Shot Echo Planar Imaging
MVD	Microvessel Density, Mikrogefäßdichte
NOS - Karzinom	„Not Otherwise Specified“: Keiner der anderen histologischen Mammakarzinomtypen zuzuordnende Form vom gemischten Typ.
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet – Derived Growth Factor
PIGF	Placenta Growth Factor
PR + / -	Progesteronrezeptorstatus positiv / negativ
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PZ	Perizyten
$R_2$	Relaxationsrate
RDS	Respiratory Distress Syndrome, akutes Lungenversagen
ROI	Region Of Interest
RT - PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SCID	Severe Combined Immunodeficiency; Mäusen mit SCID fehlen T- und B-Lymphozyten
SD	Standardabweichung (engl.: standard deviation)
SEER	National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results Program
Shh	Sonic hedgehog
SSepi	Single Shot Echo Planar Imaging
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TE	Echozeit
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNM - Status	Maß zur Beschreibung des Erkrankungsstadiums: T = Tumorgroße, N = axillärer Lymphknotenbefall, M = Fernmetastasierung
Trp	Tryptophan
Val	Valin
$V_{app}$	Apparentes Verteilungsvolumen.
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VVF	Vaskuläre Volumen Fraktion
WHO	Weltgesundheitsorganisation

## II: Liste der verwendeten Materialien

Bereich	Verwendetes Material / Hersteller
Mausmodell	56 CD-1® NU/NU Nacktmäuse
	ET <sub>A</sub> R – positive MCF-7 – Zellkulturen
	RPMI-1640 Medium (Gibco, Karlsruhe)
	Fetales Kalbsserum (PAA GmbH, Cölbe)
	Matrigel (BD Biosciences, Heidelberg)
	17β – Östradiol – Pellets (Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA.)
Therapie	Natriumhydrogencarbonatlösung 0,25 N (B.Braun Melsungen AG)
	Paclitaxel (Taxol®; Bristol Myers Squibb, München)
	Aqua ad iniectabilia (B.Braun Melsungen AG)
	NaCl – Lsg. 0,9% (B.Braun Melsungen AG)
	Atrasentan (Xinlay®- Abbott Laboratories, IL, U.S.)
Bildgebung	1,5 Tesla MR-System (Intera, Philips, Best, Niederlande)
	Microscopy Coil 47 (Philips, Best, Niederlande)
	USPIO – Nanopartikel (SH U 555 C, Resovist®, Schering AG, Berlin)
RT - PCR	RNeasy® Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)
	RnaseFree-Dnase Set® (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)
	Advantage® RT-for-PCR Kit (BD Clontech, Heidelberg)
	BioDoc Analyze system (Biometra, Göttingen)
	Scion Image Beta 4.02 Win program“ (Scion Corp., Frederick, MD, USA)
Immunhistochemie	Reveal buffer (BioCarta, Hamburg)
	ET-1 - Antikörper (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA, USA)
	ET <sub>A</sub> R - Antikörper (Alexis, Grünberg)
	Dako Rabbit-EnVision-HRP (Dako GmbH, Hamburg)
	NovaRed substrate kit (Vektor Laboratories, Burlingame, CA, USA)
	CD31 Ab (Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark)
	Streptavidin Komplex (Dako TechMate, Hamburg)
Analyse	Excel (Microsoft® Excel 2002, SP3)
	Graph Pad Prism (Graph Pad Software, vers. 4.0 for Windows, San Diego, Kalifornien, USA)