

Inhaltsverzeichnis

Erklärung.....	3
Inhaltsverzeichnis.....	4
1 Einleitung.....	6
2 Literaturübersicht.....	8
2.1 Gliatumoren.....	8
2.1.1 Einteilung.....	8
2.1.2 Genetische Veränderungen.....	9
2.1.3 Prognostische Faktoren.....	10
2.1.4 Therapeutische Optionen.....	10
2.2 Temozolomid (TMZ).....	11
2.2.1 Pharmakologie und -kinetik.....	11
2.2.2 Wirkmechanismus.....	12
2.2.3 Dosierschemata.....	13
2.3 Resistenz- und Reparaturmechanismen.....	13
2.4 Angiogenese.....	14
2.4.1 Vascular Endothelia Growth Factor (VEGF).....	15
2.4.2 Cyclooxygenase 2.....	15
2.5 Humane endotheliale Nabelschnurvenen-Zellen.....	16
2.6 Prinzip der anti-angiogenen Therapie.....	16
2.7 Prinzip der kontinuierlichen niedrigdosierten oder metronomen Therapie.....	17
2.8 Migration als Problem der Gliomtherapie.....	18
3 Ziel der Arbeit.....	19
4 Material und Methoden.....	20
4.1 Versuchstiere.....	20
4.2 Temozolomid (TMZ).....	20
4.2.1 Herstellung und Dosierung einer TMZ-Injektionslösung.....	20
4.3 Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC).....	21
4.4 Tumorzellen.....	21
4.4.1 Zellkultur.....	22
4.4.2 Zytotoxizitäts-Untersuchungen.....	22
4.4.3 Herstellung von Sphäroiden.....	23
4.4.4 Migrationsuntersuchungen.....	23
4.5 Tumormodelle.....	23
4.5.1 Subkutanen Tumormodell zur Ermittlung des Tumorwachstums.....	23
4.5.2 Rückenhautkammermodell (RHK) zur Ermittlung der Tumervaskularisation....	24
4.6 Intravitalvideomikroskopie.....	27
4.6.1 Multifluoreszenzvideomikroskopie.....	27
4.6.2 Auswertungsparameter.....	28
4.7 Immunhistologie.....	31
4.8 RNA-Analyse.....	32
4.8.1 Gewebeaufbereitung.....	32
4.8.2 Reverse Transkriptase.....	32
4.8.3 Polymerase-Kettenreaktion.....	33
4.8.4 Auftrennen der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese.....	34
4.9 Proteindetektion mittels Western Blot.....	34
4.9.1 Probenaufbereitung.....	34
4.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	34
4.9.3 SDS-PAGE Gelelektrophorese.....	34
4.9.4 Semi-Dry-Blot.....	35

4.10	Tabelle verwendeter Chemikalien	36
4.11	Protokolle	37
4.11.1	Immunhistochemische Färbungen und H.&E. Färbung	37
4.11.2	Western Blot	37
4.11.3	Puffer und Lösungen	39
5	Ergebnisse	40
5.1	Wachstumsverhalten und Chemoresistenz gegenüber TMZ in vitro	40
5.1.1	SF188wt- und SF188tr-Zelllinien	40
5.2	Zytotoxizitätsassay in der Zellkultur (MTT-Assay)	41
5.2.1	SF188wt und SF188tr Zellen	41
5.2.2	HUVEC Zellen	42
5.3	Vergleich der Migration von Sphäroiden in vitro	43
5.4	Charakterisierung der Tumorzellen in vivo	45
5.4.1	Untersuchungen im subkutanen Tumormodell	45
5.4.2	Intravitalmikroskopie der Rückenhautkammern	45
5.4.3	Immunhistologische Untersuchungen der Zelllinien auf Gefäßdichte in der RHK	47
5.4.4	Expression der angiogenen Faktoren VEGF und Cox-2	48
5.5	Vergleich der Therapiemodelle unter TMZ-Therapie	49
5.5.1	Vergleich der TMZ-Therapiedosen im subkutanen Tumormodell	49
5.5.2	Wirkungsvergleich der TMZ-Therapiedosen auf die Tumorangiogenese in der Rückenhautkammer	50
5.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	51
6	Diskussion	52
6.1	Gliome	52
6.1.1	Gliome und deren vaskuläre Besonderheiten	52
6.1.2	Gliome und deren infiltrative Eigenschaften	53
6.1.3	Rolle der Cyclooxygenase-2 bei der Neovaskularisation	54
6.1.4	Rolle der Migration	56
6.2	Temozolomid in der Gliomtherapie	56
6.3	TMZ in der low-dose bzw. metronomischen Therapie	57
6.4	Tumormodelle	59
6.4.1	Subkutanen Tumormodell	59
6.4.2	Tumormodell der RHK	60
7	Schlussfolgerung	61
8	Zusammenfassung	62
8.1	Summary	63
9	Abkürzungen	65
10	Referenzen	67
11	Danksagung	71