

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

**Vaskulartoxische Wirkung von Taxanen
bei fortgeschrittenen Tumorerkrankungen**



Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Johannes Rainer
aus Petersberg bei Fulda

Würzburg, September 2023

Referent: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

Koreferent: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Februar 2024

Der Promovierende ist Arzt.

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS MAMMA-KARZINOM	1
1.2	PACLITAXEL UND DESSEN EINSATZ IN DER THERAPIE DES MAMMA-KARZINOMS	6
1.3	DAS ENDOTHEL	12
1.3.1	<i>Endothelzellmarker</i>	15
1.4	DER TUMOR UND SEINE MIKROUMGEBUNG	17
1.5	VASKULARTOXIZITÄT VON PACLITAXEL.....	19
1.6	ZIELSETZUNG.....	20
2	MATERIALIEN UND METHODEN	21
2.1	ETHIKVOTUM ZUR DURCHFÜHRUNG DER TIERVERSUCHE	21
2.2	HERKUNFT UND BEHANDLUNG DER VERSUCHSTIERE	21
2.3	ORGANPRÄPARATION UND FIXIERUNG	22
2.4	EINBETTUNG UND MIKROTOMIE	22
2.5	FÄRBUNGEN	23
2.5.1	<i>Grundlagen der histologischen Färbung</i>	23
2.5.2	<i>Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	23
2.5.3	<i>Immunmarkierung</i>	24
2.5.4	<i>Immunhistochemie – DAB-Färbung</i>	26
2.5.5	<i>Immunfluoreszenz</i>	33
2.6	BILDAUFNAHME, STATISTISCHE ANALYSE UND AUSWERTUNG.....	34
2.7	VERWENDETE ANTIKÖRPER, CHEMIKALIEN UND GERÄTE	36
3	ERGEBNISSE	39
3.1	EVALUIERUNG DER OPTIMALEN DEMASKIERUNGEN UND VERDÜNNUNGEN DER PRIMÄRANTIKÖRPER	39
3.2	UNTERSUCHUNG DER TRPC6-EXPRESSION IN PERIPHEREN ORGANEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM PROGRESS DER TUMORERKRANKUNG	45
3.2.1	<i>Herz</i>	45
3.2.2	<i>Niere</i>	48
3.3	UNTERSUCHUNGEN DES GEFÄßSYSTEMS PERIPHERER ORGANE IN ABHÄNGIGKEIT VOM PROGRESS DER TUMORERKRANKUNG	50
3.3.1	<i>Herz</i>	50
3.3.2	<i>Niere</i>	54
3.3.3	<i>Tumor</i>	55
4	DISKUSSION	57
4.1	EINFLUSS DES DEMASKIERUNGSPUFFERS AUF DAS FÄRBEERGEBNIS.....	57
4.2	URSACHE DER KAPILLÄREN VERÄNDERUNGEN AM HERZEN	58
4.3	ÜBERTRAGBARKEIT DER ERGEBNISSE VOM TIERMODELL AUF DEN MENSCHEN UND IN DEN KLINIKALLTAG	62
4.4	BEDEUTUNG DER ZUNAHME DER TRPC6-EXPRESSION AUF KARDIALEN ENDOTHELZELLEN.....	63
4.5	SYSTEMISCHE EFFEKTE VON TUMORERKRANKUNGEN AUF DAS GEFÄßSYSTEM	64
5	ZUSAMMENFASSUNG	67
6	REFERENZEN	68
7	APPENDIX	I
I	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
III	TABELLENVERZEICHNIS	IV
IV	DANKSAGUNG	V
V	LEBENS LAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

1 Einleitung

1.1 Das Mamma-Karzinom

Maligne Tumore werden landläufig auch als Krebs bezeichnet und zeichnen sich durch ein invasives, Gewebsverbände zerstörendes und oft rasches Wachstum aus. Nicht selten existieren innerhalb eines soliden Tumors mehrere subklonale Teiltumore, die aus einzelnen Zellen hervorgegangen sind, und denen es durch unterschiedliche Mutationen möglich wurde, aus dem physiologischen Lebenszyklus der Zelle auszubrechen und sich unkontrolliert zu vermehren. Die im Rahmen der Differenzierung erworbenen gewebsspezifischen Eigenschaften können teilweise oder komplett verloren gehen [1]. Als Karzinom werden maligne Tumore bezeichnet, welche von epithelialen Zellen ausgehen [1].

Laut dem *WHO Report on Cancer* für das Jahr 2020 sind Krebserkrankungen für einen von sechs Todesfällen weltweit verantwortlich. Auch in den Ländern des globalen Südens wird eine Verschiebung der Krankheitslast von Infektionskrankheiten hin zu nicht-übertragbaren Krankheiten, zu denen auch Krebserkrankungen gehören, beobachtet [2]. Brustkrebs im Speziellen war im Jahre 2018 auch weltweit betrachtet mit etwa 2,1 Millionen Neuerkrankungen (knapp ein Viertel der Krebs-Neuerkrankungen bei Frauen) die mit Abstand häufigste neu diagnostizierte Krebserkrankung bei Frauen überhaupt [2]. Auch in Deutschland ist das Mamma-Karzinom mit einer jährlichen Inzidenz von circa 69.000 Neuerkrankungen im Jahr 2016 das häufigste Malignom der Frau und, abgesehen von nicht-melanotischem Hautkrebs, die häufigste neudiagnostizierte Tumorentität im Jahre 2016. In etwa 1% der Erkrankungsfälle sind Männer betroffen [3].

Das Mamma-Karzinom (auch als Brustkrebs bezeichnet) umfasst von unterschiedlichen Zellen des Brustdrüsengewebes ausgehende Neubildungen, welche die pathologischen Charakteristika der Malignität erfüllen. Grundsätzlich lassen sich anhand histologischer Charakteristika zwei Formen des Mamma-Karzinoms unterscheiden: das duktales Karzinom, welches von den Epithelzellen der Milchgänge ausgeht, und das lobuläre Karzinom, welches seinen Ursprung in den Läppchen der Milchdrüsen hat [4]. Mit etwa 80% Anteil an den diagnostizierten Karzinomen ist das duktales Karzinom der weitaus häufigere Subtyp. Für beide Subtypen existieren epitheliale Vorläuferläsionen, welche analog als Duktales (DCIS) oder Lobuläres Carcinoma in situ (LCIS) bezeichnet werden.

Seltener kommen papilläre, medulläre oder muzinöse Typen vor. Das inflammatorische Mamma-Karzinom ist eine seltene Sonderform des Mamma-Karzinoms, die durch diffuse Hautrötungen auffällig wird und durch eine disseminierte Lymphangiosis carcinomatosa in den Lymphspalten der Haut gekennzeichnet ist, was die Prognose der betroffenen Patienten ungleich verschlechtert [5].

Inzwischen sind unterschiedliche Risikofaktoren in den Blickpunkt der klinischen Diagnostik gerückt. Neben allgemeinen und lebensstilbedingten Risikofaktoren, wie höheres Alter, Adipositas und Alkoholkonsum sind vor allem hormonelle Aspekte wie Nullipara bzw. späte Erstschwangerschaft, frühe Menarche oder späte Menopause und genetische Aspekte (Mamma-Karzinome in der näheren Familienanamnese, genetische Mutationen auf Hochrisikogenen) von Relevanz [3, 5]. Besonderen Stellenwert haben hierbei Mutationen auf den Genen BRCA-1 und BRCA-2 (*BRCA=Breast Cancer*), die bei den Trägerinnen zu einem erhöhten Lebenszeitrisiko von 80% für die Entstehung eines Mamma-Karzinoms und 60% für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms führen [5]. Aus diesem Grund sollte Betroffenen bei Vorliegen mehrerer Brustkrebsfälle in der Familienanamnese eine humangenetische Beratung und Diagnostik angeboten und ein intensiviertes Vorsorgeprogramm empfohlen werden.

Hinweise auf das Vorliegen eines Mamma-Karzinoms kann die klinische Untersuchung bringen. Obligat sind hier neben der Anamnese, welche aufgrund der genetischen Komponente insbesondere die Familienanamnese berücksichtigen sollte, die Inspektion und (bimanuelle) Palpation der Brust der Patientin bzw. des Patienten. Klassischerweise könnten bei Vorliegen eines Mamma-Karzinoms eine Asymmetrie beider Brüste, eine Mamillenretraktion oder Orangenhaut („*Peau d'orange*“) zu beobachten sein. An der Brust selbst kann ein derber, unverschieblicher Knoten als Tastbefund auffallen. Im fortgeschrittenen Stadium sind auch Exulzerationen möglich, wie auch eine lymphogene Metastasierung in die abführenden Lymphknotenstationen. Da in etwa 55% der Mamma-Karzinome im oberen äußeren Quadranten der Brust lokalisiert sind, sollten insbesondere die axillären und supraklavikulären Lymphknoten palpirt und nach Auffälligkeiten gefahndet werden [5].

Auf dem Blutweg metastasiert das Mamma-Karzinom am häufigsten in die Leber, die Lunge und das Skelett. Hämatogene Metastasen sind bei etwa 5-8% der PatientInnen bereits bei Diagnosestellung vorhanden [5].

Bei klinischem Verdacht beziehungsweise suspektem Tastbefund empfiehlt sich ein gestaffeltes Vorgehen apparativer Diagnostik über die Mammasonographie, die

Mammographie in zwei Ebenen bis hin zum MRT der Brust. Gegebenenfalls kann präoperativ eine Biopsie zur histologischen Sicherung der Diagnose und Klassifikation des Subtyps erwogen werden, alternativ erfolgt die definitive histologische Aufarbeitung am Operationspräparat [6].

Durch die Einführung von Screening-Programmen in der Vergangenheit wird die Diagnose Brustkrebs heute häufiger schon in früheren Stadien gestellt. Dadurch eröffnen sich bessere Chancen für die Therapie der Betroffenen, was in der Folge zu einer Verbesserung der Prognose beiträgt. Das Brustkrebscreening zählt zu Maßnahmen der Sekundärprävention, deren Ziel es ist, eine bereits ausgebrochene Erkrankung in möglichst frühen Stadien zu erkennen, um bessere Chancen für Therapie und Prognose zu erzielen. Standardverfahren zur Früherkennung von Brustkrebs ist die Mammographie in zwei Ebenen, welche gesichert zu einer Reduktion der brustkrebsbedingten Mortalität um ca. 20% über alle Altersgruppen führt [6]. In Deutschland empfiehlt der Gemeinsame Bundesausschuss aktuell Frauen zwischen dem 50. bis 69. Lebensjahr die Teilnahme am Mammographiescreening, auf das die Patientinnen alle 24 Monate einen Anspruch haben und zu dem sie in regelmäßigen Abständen eingeladen werden [7].

Neben dem histologischen Grading ist der Hormonrezeptorstatus des Tumors ein weiterer entscheidender Parameter für die Therapieplanung und somit auch die Prognose der Patientinnen bzw. Patienten. Hierbei wird mittels immunhistochemischer Techniken der Anteil an Tumorzellen ermittelt, die positiv für die jeweils untersuchten unterschiedlichen Rezeptoren bzw. Gewebemarker sind. Je nach Grad der Expression ergeben sich unterschiedliche Ansätze für die Chemotherapie wie auch Hinweise auf ein unterschiedliches Metastasierungsverhalten [8, 9]. Standardmäßig empfiehlt die S3-Leitlinie zu Diagnostik und Therapie des Mamma-Karzinoms die Untersuchung des Tumorgewebes auf Expression von Hormonrezeptoren für Progesteron und Östrogen, den Wachstumsfaktorrezeptor HER2 sowie den Proliferationsmarker Ki-67 [6]. Exprimiert ein Tumor keinen dieser Rezeptorsubtypen, wird er als triple-negativ bezeichnet; dies betrifft etwa 12-17% aller diagnostizierten Tumore [10]. Allerdings können auch Tumore anderer Subtypen, wie zum Beispiel die des „basal-like breast cancer“, einen triple-negativen Status aufweisen und trotzdem ein anderes Therapieansprechen zeigen wie triple-negative Tumore im engeren Sinn. Hier kann es also zu Überlappungen in der immunhistochemischen Klassifikation kommen, was die pathologische Klassifikation erschweren kann.

Auffällig an triple-negativen Brusttumoren ist, dass häufiger jüngere Patientinnen erkranken und diese Tumore aufgrund ihres aggressiveren Wachstums oft mit einer ungleich schlechteren Prognose assoziiert sind [11].

Grundsätzlich beruht auch die Therapie des Mamma-Karzinoms auf den „klassischen“ drei Säulen der Tumorthherapie (Abbildung 1): der Chirurgie, deren Ziel eine möglichst restlose Resektion des Tumorgewebes ist, der medikamentenbasierten systemischen Chemotherapie und der Bestrahlung. In letzter Zeit wurden diese drei Ansätze durch neue Therapieverfahren wie Immunmodulation oder targeted-therapy ergänzt, sodass man hier fast von einer neuen, vierten Therapiesäule sprechen könnte. Die Systemtherapie bei operablem Brustkrebs kann entweder vor der Operation zur Herstellung der Operabilität (neoadjuvant), im Anschluss an die Operation (adjuvant) oder im Rahmen einer R1-Situation nach im Schnellschnitt mikroskopisch unvollständiger Resektion (additiv) erfolgen.

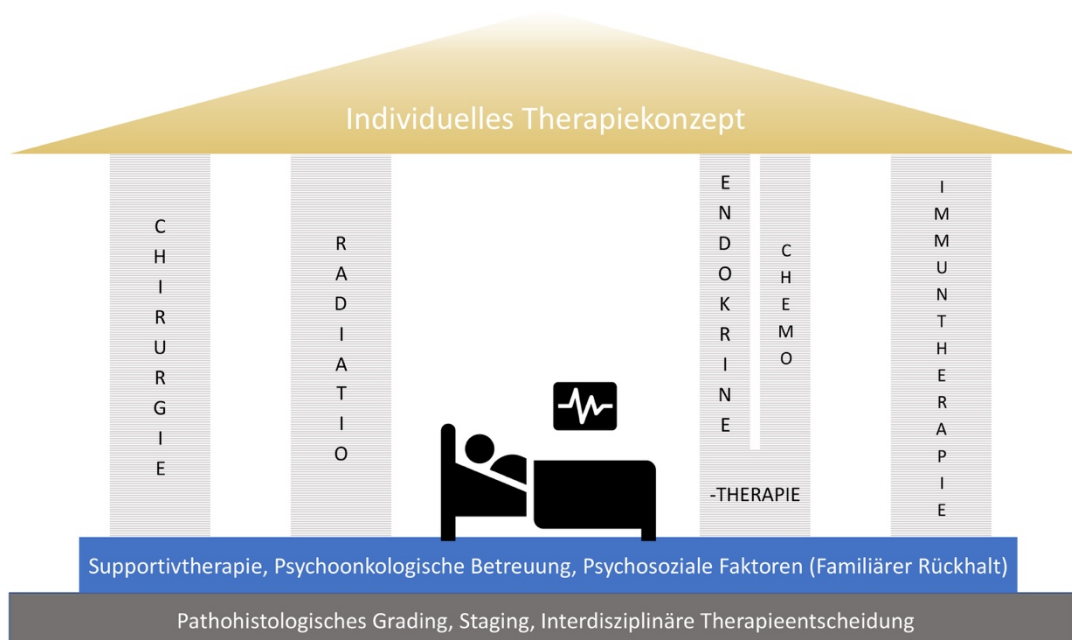


Abbildung 1: Die vier Säulen der Brustkrebstherapie.

Im Anschluss an die Diagnosesstellung folgt die interdisziplinäre Aufstellung eines individuellen Therapiekonzepts, welches mit Supportivtherapien kombiniert wird. Im Zentrum der Therapie steht im Optimalfall die Patientin bzw. der Patient unter Berücksichtigung psychosozialer Faktoren [6, 12].

Hauptbestandteil in der Therapie des lokoregionär diagnostizierten Mamma-Karzinoms ist die vollständige chirurgische Resektion des Tumors, wobei die Schnittgrenzen frei von Tumorgewebe sein sollten. Einen definierten Mindestabstand zur Resektion im Gesunden gibt die Leitlinie hierbei nicht an. Die R0-Resektion (mikroskopisch tumorfreie Schnittränder) ist Voraussetzung für den Erfolg einer postoperativen adjuvanten Strahlentherapie und sollte deswegen dringend angestrebt werden. Sofern Tumorgöße,

Tumortyp und vorbestehendes Brustgewebe es zulassen, sollte die Therapie brusterhaltend durchgeführt werden, falls die Patientin dies wünscht. Alternativ bleibt die Kompletterfernung der Brust (Mastektomie), welche generell nach inkompletter Tumorresektion oder bei inflammatorischem Mamma-Karzinom durchgeführt werden sollte [6].

Eine weitere wesentliche Therapiesäule in der adjuvanten Therapie des Mamma-Karzinoms ist die postoperative Strahlentherapie der betroffenen Brust mit einer Gesamtdosis von 40-50Gy, je nach Fraktionierung [6]. Nach der aktuellen S3-Leitlinie ist sie die wichtigste und auch effektivste Maßnahme, um das Rezidivrisiko im ehemaligen Tumorbett zu senken und sollte unabhängig vom Tumorsubtyp angewandt werden. Neben der Senkung der Rezidivwahrscheinlichkeit und der Verbesserung des krankheitsfreien Gesamtüberlebens können durch die Nachbestrahlung auch Nachresektionen verhindert werden, was sich positiv auf die Morbidität der Patientinnen wie auch positiv auf das kosmetische Ergebnis auswirkt. Bei allen prämenopausalen Patientinnen und postmenopausalen Patienten mit Risikofaktoren wird zusätzlich eine Boostbestrahlung empfohlen. Je nach Nodalstatus kann auch eine Bestrahlung der Lymphabflusswege sinnvoll sein [6].

Das Chemotherapieregime bei auf die Brust lokalisierter Primärerkrankung wird hauptsächlich vom immunhistologisch ermittelten Hormonrezeptorstatus des Tumors bestimmt. Als chemotherapeutische Therapieoption wird beim triple-negativen Mamma-Karzinom aktuell die adjuvante Systemtherapie empfohlen, welche ein Taxan und ein Anthrazyklin enthält und über 18-24 Wochen durchgeführt werden sollte [6]. Laut Leitlinie profitieren besonders Frauen mit positivem Nodalstatus bzw. anderen Risikofaktoren (jüngere Frauen <35 Jahre, High-grade Tumorstatus) von einer taxanbasierten Chemotherapie. Auch im neoadjuvanten Therapiesetting (z.B. bei fortgeschrittenen Tumoren bzw. zum Erreichen eines Downstaging oder der Ermöglichung einer anschließenden brusterhaltenden Tumorresektion) wird eine Anthrazyklin- und Taxanbasierte Kombinationschemotherapie über 18-24 Wochen präoperativ empfohlen. Hier existieren zahlreiche etablierte Regime wie beispielsweise die Gabe von 4 Zyklen Epirubicin + Cyclophosphamid gefolgt von 12 wöchentlichen Gaben Paclitaxel [6]. Interessanterweise ist der Effekt der neoadjuvanten Chemotherapie im Hinblick auf die Remission bei Hormonrezeptor-negativen Karzinomen (d.h. den aggressiveren Karzinomen) am größten [13]. Ein entscheidender Surrogatmarker für die Prognose und das Gesamtüberleben nach neoadjuvanter Chemotherapie ist die histopathologische Komplettremission („*pathological complete response*“), welche durch ein Fehlen von

invasiven Tumorzellen in Brust und axillären Lymphknoten definiert ist [14]. Bei Patientinnen mit Hormonrezeptor-negativen bzw. triple-negativen Karzinomen lassen sich mit 30-40% verhältnismäßig hohe Raten histopathologischer Komplettremission erzielen. Auch sind es besonders Patientinnen dieser Subgruppe, die nach histopathologischer Komplettremission von einem verbesserten Gesamtüberleben profitieren [13].

Ob die Chemotherapie neoadjuvant oder adjuvant durchgeführt wird, hat bei gleichem Chemotherapieregime allerdings keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben [6].

Bei Überexpression von HER-2 durch die Tumorzellen wird die Therapie durch den Antikörper Trastuzumab für ein Jahr ergänzt. Aufgrund der kombinierten Kardiotoxizität von Anthrazyklinen und Trastuzumab ist ein Monitoring der kardialen Funktion bei dieser Kombination besonders relevant, um eine Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion frühzeitig zu erkennen und die Entwicklung einer Herzinsuffizienz in Folge der Behandlung zu vermeiden [15]. Bei Karzinomen, die für Östrogen- oder Progesteronrezeptoren positiv sind, wird nach Abschluss der adjuvanten Chemotherapie eine endokrine Therapie empfohlen, da diese sowohl zu einer signifikanten Senkung der Rezidivwahrscheinlichkeit wie auch der Mortalität beiträgt [16]. Die Wahl der Medikamente erfolgt je nach Alter der Patientinnen. Prämenopausale Frauen werden für mindestens 5 Jahre mit dem selektiven Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen therapiert. Bei postmenopausalen Patientinnen wird auf Aromatasehemmer wie z.B. Anastrozol und Letrozol zurückgegriffen, die über eine Senkung der systemischen Östrogenspiegel den hormonrezeptorpositiven Tumorzellen einen Wachstumsreiz entziehen. Sie haben in Studien ein verbessertes Gesamtüberleben im Vergleich zur alleinigen Tamoxifentherapie gezeigt. Auch hier beträgt der Einnahmezeitraum fünf Jahre [6].

1.2 Paclitaxel und dessen Einsatz in der Therapie des Mamma-Karzinoms

Paclitaxel ist ein Chemotherapeutikum aus der Zytostatikagruppe der Taxane, die zu den klassischen Zytostatika gezählt werden. Klassische Zytostatika sind Substanzen, die an unterschiedlichen Angriffspunkten in den Zellzyklus eingreifen und hemmend auf die Zellteilung wirken. Da die klassischen Zytostatikatherapien im Allgemeinen systemisch verabreicht werden, wirkt die Therapie verhältnismäßig unspezifisch nicht nur auf die schnell proliferierenden Tumorzellen (das gewünschte Therapieziel), sondern auch auf andere proliferierende Gewebe, woraus die „klassischen“ Nebenwirkungen der

Zytostatikatherapie resultieren [17]. Beispielhaft seien hier gastrointestinale unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) wie Mukositiden oder Ösophagitiden oder eine Hemmung der Proliferation der hämatopoetischen Stammzellen genannt, die in einer Anämie, Thrombo-, und Leukopenie resultiert und mit vermehrter Müdigkeit, Abgeschlagenheit und gesteigerter Infektanfälligkeit einhergeht. Des Weiteren werden Keimzellteilung und -reifung wie auch die fetale Entwicklung durch Zytostatika eingeschränkt (teratogene Wirkung) [17]. Weitere häufig beschriebene gastrointestinale Nebenwirkungen der Zytostatikatherapie, die mit einem hohen Leidensdruck für die betroffenen Patienten einhergehen, sind Übelkeit und Erbrechen. Als ursächlich werden hier zentrale Effekte der Zytostatika vermutet, insbesondere eine Wirkung auf die zentrale Chemorezeptor-Triggerzone der Area postrema und eine Beeinflussung des serotonergen Neurotransmittersystems. Im Falle von Paclitaxel tritt diese Nebenwirkung allerdings eher selten (in ca. 10-30% der Fälle) auf [18].

Als Chemotherapeutikum in der Tumorthherapie wurde Paclitaxel ursprünglich im Rahmen des *National Cancer Institute Program* entdeckt, wobei tausende Pflanzenextrakte auf ihre zytostatische Wirksamkeit getestet wurden. Im Jahre 1963 wurde Paclitaxel als ein Bestandteil des Extrakts der Rinde der pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* entdeckt und acht Jahre später, im Jahre 1971, die antikarzinogene Wirkung dieses Extrakts festgestellt [19]. Im Jahre 1992 wurde Paclitaxel von der *FDA (Food and Drug Administration)*, für die Arzneimittelzulassung in den USA zuständige Behörde) zur Behandlung des Ovarial-Karzinoms zugelassen und von der Firma Bristol-Myers-Squibb unter dem Handelsnamen *Taxol* vertrieben. Zwei Jahre später folgte die Zulassung zur Therapie des Mamma-Karzinoms sowie inzwischen zur Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchial-Karzinoms (NSCLC) [20]. Da der Wirkstoffbedarf durch die natürlichen Vorkommen nicht zu decken war, wurde im Jahre 1988 eine semi-synthetische und im Jahre 1994 eine chemische Methode entwickelt, um Paclitaxel herzustellen [21, 22].

Da den Mikrotubuli, die neben Aktin- und Intermediärfilamenten zentrale Bestandteile des zellulären Zytoskeletts sind, für die proliferationshemmende Wirkung von Paclitaxel eine zentrale Bedeutung zukommt, soll an dieser Stelle kurz auf deren Aufbau eingegangen werden. Sie sind von ihrer Gestalt her circa 25nm durchmessende Hohlzylinder, welche sich in einem dynamischen Prozess von Auf- und Abbau befinden und aus Tubulinpolymeren bestehen, die sich wiederum aus Tubulin-Heterodimeren von α - und β -Untereinheiten zusammensetzen. Die Stabilität der Mikrotubuli wird durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Tubulinmolekülen sichergestellt

[23]. Eine wesentliche Funktion des Mikrotubuli-Gerüsts ist neben der Beteiligung bei der Zellmotilität sowie bei intrazellulären Transportvorgängen die Formung der mitotischen Spindel im Rahmen der Metaphase während der Mitose im Verlauf des Zellzyklus [24, 25].

Der Zellzyklus, welcher von proliferierenden Zellen (und somit auch von Tumorzellen) durchlaufen wird, gliedert sich grundsätzlich neben einer verhältnismäßig langen Interphase in eine recht kurze Mitosephase (M-Phase), in der die eigentliche Zellteilung stattfindet [23]. Während der Interphase, die in G₀/G₁-, S- und G₂-Phase unterteilt wird, laufen unter anderem verschiedene Synthesevorgänge ab, welche die Zelle auf den Eintritt in die folgende Zyklusphase vorbereiten [24]. Innerhalb der M-Phase des Zellzyklus, welche sich wiederum in 5 Phasen unterteilen lässt, seien hier besonders zwei Phasen hervorgehoben, die für das spätere Verständnis der Wirkung von Paclitaxel sehr bedeutsam sind, nämlich die Metaphase und die Anaphase.

Mikrotubuli weisen einen polaren Aufbau mit einem sogenannten (+)-Ende und einem (-)-Ende auf. Die Enden unterscheiden sich zum Beispiel in der Geschwindigkeit der Auf- und Abbauvorgänge, welche am (+)-Ende schneller vorstattengehen [24]. Diese Vorgänge laufen in Abhängigkeit und unter Verbrauch des zellulären Energieträgers Guanosintriphosphat (GTP) ab. Die Bindung und Hydrolyse von GTP zu Guanosindiphosphat (GDP) erfolgt an der β -Tubulin-Untereinheit; an derselben Untereinheit, an der Paclitaxel bindet [26]. Durch die Bindung von Paclitaxel erfolgen tatsächlich strukturelle Veränderungen auf molekularer Ebene im Aufbau der Mikrotubuli, wodurch diese stabilisiert werden [20, 26].

In subnanomolaren Konzentrationen hemmt Paclitaxel den Abbau der Mikrotubuli, wohingegen es interessanterweise, sofern es in höheren Konzentrationen verabreicht wird, Zahl und Masse der Mikrotubuli erhöht [27]. Diese so gebildeten Mikrotubuli sind jedoch in ihrer Funktion dysfunktional und im Vergleich zu normalen Mikrotubuli außergewöhnlich stabil gegenüber ungünstigen Umweltbedingungen wie Kälte oder chemischen Einflüssen [28].

Durch Paclitaxel wird die physiologische Mikrotubuli-Dynamik erheblich beeinträchtigt und der Zellzyklus am Metaphase-Anaphase-Übergang während der Mitosephase durch Formung einer inkompletten Metaphasen-Chromosomenplatte und einem verändertem Spindel-Arrangement unterbrochen [20, 27]. Dies führt letztendlich zur Apoptose [25]. Aufgrund dessen liegt nahe, dass Paclitaxel besonders auf Zellen wirkt, die aktuell den Zellzyklus durchlaufen, also proliferieren. Dies betrifft neben den sich oft schnell

teilenden Tumorzellen allerdings auch Gewebe mit physiologisch hoher Proliferation, wie zum Beispiel das hämatopoetische System.

Da Paclitaxel nur während der M-Phase des Zellzyklus seine zytostatische Wirkung entfaltet, wird es auch zu den phasenspezifischen Zytostatika gezählt [29].

Der Begriff Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod. Damit ist gemeint, dass der im Rahmen der Apoptose vorkommende selektive Zelluntergang ein physiologisches Phänomen ist, dem im Rahmen der Embryonalentwicklung wie auch im adulten Organismus eine entscheidende Bedeutung zukommt. Grundsätzlich lassen sich zwei Wege unterscheiden, auf denen der Mechanismus des programmierten Zelltodes aktiviert werden kann. Ein Weg läuft über Rezeptoren auf der Zelloberfläche ab (u.a. Rezeptoren der Tumornekrosefaktor-Familie [TNF-Familie]), die durch entsprechende Liganden von außen aktiviert werden können (extrinsischer Weg) [30]. Dem gegenüber steht ein intrinsischer Signalweg, welcher hauptsächlich über Proteine der Bcl-2 Familie kontrolliert wird, die unter anderem die Freisetzung von Cytochrom C regulieren [31]. Die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien ins Zytoplasma wiederum führt weiter Downstream zu einer Aktivierung von Caspasen (selektiven Proteasen), die in der Endstrecke den Zelluntergang zur Folge hat [30, 32]. Bcl-2 und Proteine seiner Familie weisen eher antiapoptotische Eigenschaften auf. Durch Paclitaxel wird Bcl-2 gehemmt, was über weitere Zwischenschritte zu einem Stopp des Zellzyklus und letztlich zum Übergang in den Zelltod führt [33].

Neben seiner Mikrotubuli-stabilisierenden Wirkung sind auch andere Mechanismen bekannt, über die Paclitaxel zur Apoptose von Tumorzellen führt. So konnte nachgewiesen werden, dass Paclitaxel, in hohen Dosen verabreicht, zu einer Schädigung mitochondrialer Membranen führt, wodurch Cytochrom C ins Zytoplasma freigesetzt und die Apoptose eingeleitet wird [34]. Außerdem steigert Paclitaxel auch die zytosolischen Calcium-Spiegel durch Ausstrom von Calcium-Ionen (Ca^{2+}) aus den Mitochondrien wie auch aus dem endoplasmatischen Retikulum. In geringer Dosis verabreichtes Paclitaxel führt dahingegen zu einem Calciumionen-Einstrom von extrazellulär in Brustkrebszellen. Gerade diese von extrazellulär einströmenden Calciumionen scheint für das Anstoßen der apoptotischen Vorgänge entscheidend zu sein [35].

Neben diesen Mechanismen, die zum Zelluntergang führen, wurden unter Paclitaxel-Therapie auch immunmodulatorische Effekte beobachtet. So kann Paclitaxel durch Stimulierung Tumor-assoziiertes Makrophagen und damit einhergehender

Beeinflussung des Interleukin- und Zytokinmusters in Richtung einer vermehrten Sekretion von Tumornekrosefaktor α ($\text{TNF}\alpha$) und Interleukin-12 (IL-12) über eine Aktivierung von NK-Zellen zu einem Rückgang des Tumorwachstums führen [36].

Ein in letzter Zeit zunehmend im Fokus stehendes Problem ist die Entwicklung von Resistenzen gegen die Paclitaxel-Therapie innerhalb der Tumore. Als mögliche Mechanismen werden eine verstärkte Expression von Proteinen der ATP-binding cassette (ABC)-Superfamilie diskutiert, welche wie P-Glykoprotein als Effluxpumpen für Medikamente fungieren. Als weitere Mechanismen für den Wirkverlust kommen Veränderungen des Proteinmusters an Checkpoints der Zusammenstellung der Mitosespindel oder direkte Alterationen an Mikrotubuli-assoziierten Proteinen in Betracht [37, 38]. Auch eine Veränderung des zellulären microRNA-(miRNA)-Musters mit folgender veränderter Expression unterschiedlicher Zielgene wird als Ursache einer Resistenz gegen die Chemotherapie diskutiert [20]. Diese Mechanismen der erworbenen (sekundären) Resistenz ermöglichen den jeweiligen Zellen einen Überlebensvorteil im Vergleich zu den übrigen Tumorzellen, sodass es hier im ungünstigen Fall zu einer Selektion resistenter Zellklone und somit zu einem Versagen der Chemotherapie kommen kann.

Dem Nutzen, mit dem Paclitaxel bei unterschiedlichen Tumorerkrankungen als Chemotherapeutikum eingesetzt wird, stehen auch Nebenwirkungen unterschiedlicher Schwere gegenüber, unter denen die Patienten leiden können.

Die wichtigsten auf den Wirkstoff Paclitaxel selbst zurückgeführten Nebenwirkungen sind die Neuropathie und die Neutropenie [25]. Unter Paclitaxel-Therapie wurden bei circa 60-70% der chemotherapierten Patientinnen periphere Neuropathien beobachtet, welche sich dosislimitierend auswirkten oder sogar unter Umständen eine Beendigung der Therapie erforderten. Die Patientinnen klagten meist über brennende Schmerzen, Taubheit, Kälteempfindlichkeit und Kribbeln, wobei die Symptome meist ein handschuh- und sockenförmiges Verteilungsmuster aufwiesen und teils irreversibel waren, was für die Patienten eine deutliche Einschränkung ihrer Lebensqualität bedeutete [39, 40]. Die Pathogenese dieser Neuropathie ist bis heute noch nicht vollständig verstanden. Als ursächlich diskutiert werden neben einer naheliegenden Einschränkung des axonalen Transports durch die Paclitaxel-Therapie auch eine Schädigung der Mitochondrien durch Veränderung des mitochondrialen Membranpotenzials [41, 42]. Andere Arbeiten konnten im Tierversuch an Nagetieren Veränderungen an der Ionenkanalausstattung der Neurone selbst nachweisen, welche ebenfalls an der Entstehung der Neuropathie

beteiligt sein könnten [43]. Interessanterweise kamen Arbeiten derselben Arbeitsgruppe zu dem Ergebnis, dass Paclitaxel über Bindung an Toll-like-Receptor 4 (TLR-4) zu einer Sensitivierung von TRPV1 (*transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*) auf Ganglienzellen des Hinterhorns führt, die mit einer verstärkten Schmerzweiterleitung und Hyperalgesie in vivo einhergeht [44]. TRPV1 ist ein auf Nozizeptoren exprimierter Kationenkanal, der durch Hitze, inflammatorische Botenstoffe und eine Vielzahl weiterer Noxen aktiviert werden kann und auf der Haut einen brennenden bzw. in der Muskulatur einen krampfenden Schmerz vermittelt [45]. Mutmaßlich beeinflusst Paclitaxel über Bindung an TLR-4 auch die Freisetzung von Neuropeptiden und intrazellulären Calciumströmen, was die Entstehung einer peripheren Neuropathie begünstigen kann. Allerdings wurde als pathologisches Korrelat bereits eine Abnahme der Meissner'schen Tastkörperchen sowie epidermaler Nervenfasern beschrieben, was unter anderem als Erklärungsansatz für die beobachteten Taubheitsgefühle dienen könnte [46]. Daneben wurden unter Paclitaxel-Therapie auch Störungen der Erregungsweiterleitung am Herzen beobachtet, welche sich in Form von Bradykardien, Tachyarrhythmien und AV-Blockierungen äußerten [47].

Eine wichtige Nebenwirkung, die bei der Therapie mit lösungsmittel-basiertem Paclitaxel beobachtet wurde, sind Histamin-vermittelte Hypersensitivitätsreaktionen, welche meist innerhalb der ersten zehn Minuten nach Beginn der Infusion auftreten. Meist wird die Hypersensitivitätsreaktion allerdings nicht auf den Wirkstoff selbst, sondern auf sein Lösungsmittel, welches unter dem Namen *Cremophor* vertrieben wird, zurückgeführt. Die Strukturformel von Paclitaxel weist, wie andere Substanzen aus der Gruppe der Taxane, einen äußerst apolaren Charakter auf, woraus eine schlechte Wasserlöslichkeit folgt. Um trotzdem eine Infusion möglich zu machen, ist ein Detergenz notwendig. Im Falle von Paclitaxel wird hierzu *Cremophor* (Polyoxyethylen 35-Rizinusöl) verwendet, das 1:1 mit wasserfreiem Ethanol gemischt zur Injektion verwendet wird [33, 48]. Allerdings existieren auch Fallbeobachtungen, die Hypersensitivitätsreaktionen auf Paclitaxel selbst zurückführen [49]. Die Symptome sind hier ähnlich denen anderer histamin-vermittelter Allergien, nämlich unter anderem Dyspnoe, Bronchospasmen, Urtikaria, Flush-Symptomatik, Tachykardie und (arterielle) Hypotension. Als Auslöser wird hier eine von Immunglobulin E (IgE) unabhängige direkte Freisetzung von Mastzellmediatoren vermutet [50]. Durch Verlängerung der Infusionsdauer und eine Prophylaxe durch Prämedikation mit Antihistaminika und Kortikosteroiden konnte die Rate dieser Infusionsreaktionen gesenkt werden. Trotz der Prämedikation treten leichte

Reaktionen bei Infusion von *Cremophor*-basiertem Paclitaxel noch bei ca. 30-40% der behandelten Patienten auf [48].

Um diese, hauptsächlich auf das Lösungsmittel zurückgeführten anaphylaktoiden Reaktionen zu vermeiden, wurde nach alternativen, lösungsmittelfreien Formulierungen gesucht. Als geeignet erwiesen hat sich ein Nanocarriersystem, bei dem an Albumin-Nanopartikel gebundenes Paclitaxel intravenös infundiert wird (*nanoparticle albumin-bound paclitaxel/nab-Paclitaxel*). Albumin fungiert physiologisch im Plasma als Transportprotein für hydrophobe Moleküle und führt durch Bindung an den endothelialen Rezeptor gp160 zur Aktivierung von Caveolin-1, was die Bildung von Caveolae an der Zelloberfläche induziert und die Transzytose durch die Endothelzellen einleitet [33]. Durch Koppelung von Paclitaxel an Albumin wird so eine bessere Umverteilung aus dem Plasmakompartiment möglich. Im Tumoriger Interstitium wiederum wird Paclitaxel nach Bindung des Albumins an das Albumin-bindende Glykoprotein SPARC, das Annahmen zufolge im Tumorgewebe überexprimiert ist, in unmittelbarer Nähe zu den Tumorzellen freigesetzt, was zu einer Steigerung der Wirksamkeit führt [51]. Unter Therapie mit nab-Paclitaxel treten weniger lösungsmittel-bedingte UAW auf, wodurch die antihistaminerge Prämedikation entfällt, jedoch bleiben weiterhin die Paclitaxel-typischen Nebenwirkungen bestehen [33].

Heute wird Paclitaxel vor allem als Kombinationspartner in Chemotherapieregimen gynäkologischer Karzinome wie dem Mamma- oder Ovarialkarzinom eingesetzt, aber auch in der Therapie des fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) [52].

Aktueller Gegenstand klinischer und pharmakologischer Forschungen sind neue Formulierungen wie das oben erwähnte nab-Paclitaxel, die ein günstigeres Nebenwirkungsprofil mit einer spezifischeren Wirksamkeit im Tumorgewebe verbinden.

1.3 Das Endothel

Das Endothel umfasst die Gesamtheit der Zellen, welche die Blutgefäße, Lymphgefäße und die Herzinnenräume von innen auskleiden. Neben seiner Beteiligung bei zahlreichen Transportvorgängen zur Versorgung der darunterliegenden Gewebe und Prozessen der Immunabwehr wie der Leukozytenadhäsion und -diapedese hat es auch eine elementare Bedeutung als dynamische Barriere. Dies gilt sowohl für Flüssigkeiten und Lösungen wie auch für korpuskuläre Blutbestandteile in der Trennung des intravasalen vom extravasalen Kompartiment. Diese Barrierefunktion reicht in ihrer

Bandbreite beispielhaft vom diskontinuierlichen Endothel der Milzsinoide oder des Knochenmarks, bis zum extrem dichten Endothel der Kapillaren des Gehirns, das die Blut-Hirn-Schranke bildet [53].

Histologisch betrachtet ist es ein einschichtiger Verband von platten Zellen (aus diesem Grund auch oftmals als „Monolayer“ bezeichnet), welche in ihrer Funktion hochspezialisiert sind und nicht nur untereinander, sondern auch mit den Blutzellen oder den darunterliegenden Myozyten der Media kommunizieren (myoendotheliale Kontakte). Über verschiedene Adhäsionsproteine sind die Endothelzellen untereinander verbunden und über Fokalkontakte in der darunter liegenden extrazellulären Matrix verankert [23].

Die Endothelzellen weisen auf ihrer Oberfläche eine unterschiedliche Antigenarchitektur auf, die je nach Gewebe und Aktivierungszustand einem dynamischen Wandel unterliegt. Um die zahlreichen Funktionen und Abläufe, an denen die Endothelzellen beteiligt sind, erfüllen zu können ist ein ausgefeiltes Netzwerk an zellulären Rezeptoren und Botenstoffen notwendig, die wiederum über intrazelluläre Signalkaskaden zu einer Anpassung der Funktion führen [54]. Die Rezeptoren sind von ihrer Molekülstruktur her Proteine, welche antigene Eigenschaften zeigen, was man sich im Rahmen der Immunhistochemie zu Nutzen macht. Darauf wird an späterer Stelle im Methodenteil gesondert eingegangen werden.

Entscheidend für die vorliegende Arbeit ist es hier, dass einzelne Antigene gewebsspezifisch oder in Reaktion auf bestimmte Stimuli von den Endothelzellen exprimiert werden, andere Marker jedoch kontinuierlich und gewebsunabhängig [55].

Zwar sind sämtliche Gefäße des Herz-Kreislauf-Systems von Endothel ausgekleidet, der sich darunter anschließende Aufbau des Blutgefäßes unterscheidet sich jedoch je nach Lage des betreffenden Gefäßabschnitts im Gefäßbaum. Im makrovaskulären Stromgebiet der Arterien und Venen ist die Gefäßwand grundsätzlich aus drei Schichten aufgebaut: Die innerste Schicht bildet der endotheliale Monolayer und subendotheliales Gewebe (in Kombination als Intima bezeichnet). Daran schließen sich (je nach Kaliber des Gefäßes) mehrere Schichten aus glatten Muskelzellen an, welche in ihrer Gesamtheit als Media bezeichnet werden. Nach außen wird das Gefäß durch eine bindegewebige Schicht in die Umgebung eingebettet, welche als Adventitia bezeichnet wird. Im kapillären Stromgebiet hingegen wird die Gefäßwand lediglich durch die auf einer Basallamina aufsitzenden Endothelzellen gebildet, welche je nach Reifungsgrad des Gefäßes von Perizyten, die neben weiteren Funktionen für eine Stabilisierung der Gefäßwand sorgen, umgeben sind [23].

Eine wesentliche endotheliale Funktion ist die Aufrechterhaltung einer Permeabilitätsbarriere zwischen dem intravasalen und extravasalen Kompartiment [23]. Dieser Barrierefunktion kann das Endothel nur durch ein ausgeklügeltes System von Zell-Zell-Kontakten zwischen den einzelnen Endothelzellen nachkommen. Von besonderer Bedeutung sind hierbei Tight junctions und Adherens junctions. Tight junctions sorgen für die enge Verbindung an der luminalen Seite der Endothelzellen gegenüber dem Blutstrom. Sie bestehen aus mehreren Proteinen, u.a. seien hier Claudine und Occludin erwähnt. Insbesondere im Endothel der Blut-Hirn-Schranke nehmen die Tight junctions eine zentrale Stellung ein [53]. Adherens junctions dagegen werden durch homologe Interaktion von VE-Cadherin-Molekülen (VE = vascular endothelial) auf benachbarten Endothelzellen gebildet. Die membranständigen VE-Cadherine sind über β - und γ -Catenine im Aktin-Zytoskelett der Endothelzellen verankert [53]. Sie sind von besonderer Bedeutung in der Regulation der Endothel-Permeabilität im kapillären Stromgebiet [56]. Daneben nehmen die VE-Cadherin Moleküle in Komplexen mit PECAM-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule 1*) und VEGFR-2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*) eine zentrale Rolle als Mechanosensoren gegenüber dem durch den Blutstrom verursachten Scherstress ein [57].

Unter dem Einfluss verschiedener Entzündungsmediatoren (z.B. Histamin, Bradykinin) kommt es kurzfristig zu einer Lösung der interzellulären endothelialen Kontakte und einer Abrundung der Endothelzellen, was mit einer akuten Permeabilitätssteigerung des Endothels einhergeht. Diese Permeabilitätssteigerung kann angepasst an die erforderlichen Prozesse von einer Reorganisation der VE-Cadherin/Catenin-Komplexe unter Erhalt der adhäsiven Eigenschaften bis zu einer Internalisierung von VE-Cadherin-Molekülen reichen, um den parazellulären Durchtritt intravasaler Komponenten und die Diapedese von Leukozyten zu ermöglichen [53, 58].

Der Grad der endothelialen Permeabilität wird durch ein fein ausbalanciertes System an Botenstoffen sowie in Abhängigkeit der Einwirkung von physikalischen Kräften wie z.B. Scherstress auf das Endothel gesteuert. So sorgen z.B. Faktoren wie FGF (fibroblast growth factor) oder Angiopoetin-1 für eine Aufrechterhaltung bzw. Stabilisierung der endothelialen Barriere, wohingegen Entzündungsmediatoren bei inflammatorischem Geschehen (über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) oder VEGF (*vascular endothelial growth factor*) im Rahmen der Angiogenese (über Rezeptortyrosinkinasen) die endotheliale Permeabilität erhöhen [53].

Weitere Arbeiten haben gezeigt, dass die Abrundung der Endothelzellen durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration vermittelt wird. Entscheidend an der Modulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von Endothelzellen sind Proteine der TRPC-Familie (TRPC = *transient receptor potential channel*) beteiligt, welche als unselektive Kationenkanäle fungieren (Permeabilität für $\text{Ca}^{2+} \gg \text{Na}^+, \text{Mg}^{2+}$) [59]. In der TRPC-Familie sind aktuell 7 Subtypen beschrieben (TRPC1-7). Insbesondere TRPC3 und TRPC6 wurden auf Endothelzellen der kleinen Gefäße nachgewiesen [60].

In vitro konnte nachgewiesen werden, dass VEGF die Steigerung der endothelialen Permeabilität hauptsächlich über den Rezeptor VEGFR-2 vermittelt. Des Weiteren sind auch Gq/G11-vermittelte Vorgänge beschrieben, über die VEGF ebenfalls zu einer Destabilisierung der Endothelbarriere führt [53]. Durch Bindung extrazellulärer Mediatoren an Gq-Protein gekoppelte Rezeptoren wird das Enzym Phospholipase C (PLC) aktiviert, welches das membranständige Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in Diacylglycerol (DAG, was membranständig verbleibt) und Inositoltrisphosphat (IP3) spaltet. IP3 wiederum vermittelt eine Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern des endoplasmatischen Retikulums, wohingegen DAG zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führt [61]. Unabhängig von der Aktivierung der nachgeschalteten PKC kann DAG TRPCs aktivieren, was wiederum zu einem Calciumionen-Einstrom von extrazellulär führt (wie dies in angefügter Arbeit für TRPC6 nachgewiesen werden konnte) [62]. Somit führt VEGF über Bindung an seinen Rezeptor zu einem über TRPCs vermittelten Calciumeinstrom, der wiederum eine Permeabilitätssteigerung des Endothels als eine Voraussetzung der Angiogenese bedingt.

Inwieweit die unterschiedlichen Prozesse zusammenwirken (müssen), um die Endothelbarriere aufzulockern, bzw. die Ergebnisse auf die unterschiedlichen Gefäßabschnitte in vivo übertragbar sind, bleibt noch unverstanden [53].

1.3.1 Endothelzellmarker

Wie oben beschrieben unterscheidet sich das Expressionsmuster von Proteinen auf der Endotheloberfläche je nach Gewebe, Differenzierungsgrad und Aktivität des Endothels. Auch der Lebensstil oder eine medikamentöse Therapie können die Antigenarchitektur beeinflussen [55]. Aus diesem Grund wurden verschiedene endotheliale Antigene in der vorliegenden Arbeit auf ihre Expression in den untersuchten Geweben evaluiert, die im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen:

CD31 (CD=*Cluster of differentiation*; synonym PECAM-1) ist ein hoch glykosyliertes Glykoprotein, welches auf Zellen der hämatopoetischen Zellreihe (Thrombozyten, Monozyten, neutrophilen Granulozyten) mit Ausnahme der Erythrozyten und insbesondere auf Endothelzellen an ihrer basolateralen Membran in junktionalen Bereichen hoch exprimiert ist. PECAM-1 fungiert im Komplex mit VE-Cadherin und VEGFR-2 als Mechanosensor gegenüber Scherkräften des Blutstroms. Zudem ist es entscheidend an der Aufrechterhaltung der endothelialen Permeabilitätsbarriere beteiligt [63, 64]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass PECAM-1-Defizienz zu einer mangelnden Antwort des Herz-Kreislauf-Systems auf hämodynamische Kräfte führt. Am Herz äußerte sich PECAM-1-Defizienz in einer fehlenden Fähigkeit durch kardiales Remodeling oder durch Hypertrophie von Herzmuskelfasern auf biomechanischen Stress zu reagieren, was letztlich zu Herzversagen führte [65].

CD34 wird vor allem von hämatopoetischen und endothelialen Vorläuferzellen und den meisten Kapillar-Endothelzellen exprimiert, wohingegen größere Gefäße oft CD34-negativ sind [66, 67].

CD105 (Endoglin) ist ein mit dem TGF β -Rezeptorkomplex assoziiertes Glykoprotein, welches auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Zellen lymphatischer Organe und Makrophagen exprimiert wird. In regenerierenden und fetalen Endothelien, d.h. Geweben, in denen aktuell Angio(neo)genese abläuft, ist die CD105-Expression gesteigert [68]. Ebenso konnte auf Endothelzellen von Tumorblutgefäßen eine gesteigerte CD105-Expression gezeigt werden [69]. Jedoch konnte die Expression von CD105 auch im Gefäßsystem unterschiedlicher humaner Organe im physiologischen Zustand mit Ausnahme der Brust nachgewiesen werden (u.a. der Lunge, der Niere und des Gehirns). Dort wurde es vorwiegend im Bereich der Kapillaren und kleinen Gefäße exprimiert, wohingegen sich das Endothel der meisten Gefäße des makrovaskulären Stromgebietes überwiegend CD105-negativ bzw. bestenfalls schwach positiv zeigte [70].

VE-Cadherin ist ein endothelspezifisches Protein, das, wie oben beschrieben, neben weiteren Funktionen entscheidend am Aufbau der Adherens junctions zwischen den Endothelzellen und somit an der Steuerung der endothelialen Permeabilität beteiligt ist [53, 57]. VE-Cadherin gehört zu den frühesten von endothelialen Vorläuferzellen exprimierten Markern. Es scheint eine fundamentale Rolle als Adhäsionsprotein während der Angiogenese einzunehmen, wodurch es für die Betrachtung der Blutgefäße innerhalb von Tumoren zu einem interessanten Ziel wird [71].

1.4 Der Tumor und seine Mikroumgebung

Im Falle von soliden Tumoren beginnt die Tumorerkrankung oft durch genetische Defekte einzelner Zellen. Diese Defekte können einerseits zu einer Mutation bzw. einem Verlust von Tumorsuppressorgenen führen, die ihre Funktion als tumorunterdrückende Gene nicht mehr wahrnehmen können. Andererseits kann es zu Mutationen in Protoonkogenen kommen, die zu sogenannten Onkogenen entarten und unkontrolliertes Zellwachstum und -proliferation anstoßen. Hierdurch können sich die betroffenen Zellen unabhängig von Wachstumsfaktoren und den übrigen Zellen ihres Zellverbandes teilen [72].

Mit Fortschreiten der Tumorerkrankung kommt es zu weiteren Mutationen im Genom der Tochterzellen, sodass sie sich zunehmend mehr von der ursprünglichen Tumorzelle unterscheiden. Einzelne dieser Zellen haben möglicherweise gegenüber anderen Zellen des Tumors im Kontext der Tumormikroumgebung einen Wachstumsvorteil, der ihre Entwicklung begünstigt. Somit sind die Zellen eines Tumors keinesfalls Klone der Ursprungszelle, vielmehr entwickelt sich im Laufe des Tumorwachstums eine Zahl an „Quasi-Zellklonen“. Dieses Phänomen wird unter dem Begriff der genetischen Heterogenität oder auch der Intratumor-Heterogenität zusammengefasst [73]. Dadurch wird eine zielgerichtete Tumorthherapie erschwert. Zudem steigt mit zunehmender Anzahl an Mutationen die Wahrscheinlichkeit der Entstehung resistenter Tochterzellen gegen die eingesetzten Zytostatika.

Jedoch kann nicht nur die einzelne Tumorzelle Mechanismen entwickeln, um die Wirkung von Zytostatika abzuschwächen. In letzter Zeit konzentrierten sich die wissenschaftlichen Beobachtungen auch auf den Einfluss der Tumormikroumgebung auf die Entwicklung und das Metastasierungsverhalten maligner Erkrankungen. Die Tumorzellen wachsen eingebettet in einem Netzwerk extrazellulärer kollagener Matrix, dessen Aufbau und Eigenschaften direkten Einfluss auf die Nährstoffversorgung wie auch auf die therapeutischen Angriffsmöglichkeiten der Tumorzellen nehmen. Das ist ein Fakt, mit dem sich die Tumor-Arbeitsgruppe um Dr. E. Henke (Tumor-AG) in den letzten Jahren intensiv auseinandergesetzt hat [74, 75].

Aber auch abseits vom primären Tumorfokus bringt eine Tumorerkrankung systemische Auswirkungen auf den Gesamtorganismus mit sich. Diese werden zwar oft erst in späten Stadien der Tumorerkrankung durch die Symptome der Fernmetastasierung in andere Organe oder die Tumorkachexie offenbar, beginnen allerdings schon deutlich früher. Erkennbar wird dies durch frei im Blutstrom zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor*

cells, CTCs), Mikrometastasierungen, aber auch durch vom Tumor freigesetzte Zytokine und Botenstoffe, die systemisch auf den Organismus der Erkrankten wirken [76].

Tumorzellen weisen oft eine hohe proliferative Aktivität auf. Für diese Wachstumsvorgänge sind ein ausreichendes Nährstoffangebot und eine ausreichende Sauerstoffversorgung von entscheidender Bedeutung. Mit zunehmender TumorgroÙe werden diese Ressourcen immer knapper. Die zunehmende Hypoxie führt zur Freisetzung von Mediatoren, die die Gefäßversorgung verbessern und somit die Nährstoffversorgung der Zellen sicherstellen sollen. Ein wichtiger Faktor, der hier freigesetzt wird und die Aussprossung neuer BlutgefäÙe aus bestehenden BlutgefäÙen (Angiogenese) induziert, ist der *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Er ist ein homodimeres Glykoprotein, welches auf zwei endothelial lokalisierte Rezeptoren (VEGFR-1 und -2) wirkt, worüber die Angiogenese angestoÙen wird. Neben der durch Hypoxie bedingten Freisetzung von VEGF kann seine Expression auch durch mutierte Tumor-Onkogene oder durch Mutation in Tumorsuppressorgenen wie p53 gesteigert werden [77, 78]. Die VEGF-Familie wird wiederum in unterschiedliche Wachstumsfaktoren untergliedert. Ein entscheidender an der Angiogenese beteiligter Faktor dieser Familie ist VEGF-A, durch dessen Freisetzung eine ausreichende Versorgung der (Tumor-) Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen wiederhergestellt werden soll. Morphologisch bedeutsam ist dabei, dass die unter VEGF-Einfluss im Tumor gebildeten BlutgefäÙe strukturell unreif sind und ungeordnet im Tumorgewebe verlaufen [78].

Vorarbeiten der Tumor -AG an in vitro kanalförmig kultivierten HUVEC-Zellen (HUVEC = *human umbilical vein endothelial cells*) haben gezeigt, dass Paclitaxel weniger als 1h nach Injektion zu Lecks in der endothelialen Barriere führt, die sich 8h später wieder geschlossen hatten. Somit scheint dieser Vorgang in vitro reversibel zu sein [79]. Auch in vivo konnte eine signifikante Extravasation von injiziertem fluorescein-markiertem Dextran als Ausdruck der Gefäßleakagen beobachtet werden, jedoch kam es zusätzlich zu einem Kollaps der GefäÙe, weswegen dieser Vorgang als irreversibel betrachtet werden könne. Weitere Messungen deuteten darauf hin, dass diese Durchlässigkeit durch eine Abrundung der Endothelzellen mit einer kurzfristigen Lösung der junctionalen Zell-Zell-Kontakte bedingt war [79].

Auch konnte nachgewiesen werden, dass Paclitaxel über Bindung an Toll-like-Rezeptor-4 (TLR4) eine Freisetzung/Abspaltung von DAG bewirkt. Dies führt zu einem Ca^{2+} -Einstrom von extrazellulär in die Endothelzellen von TumorblutgefäÙen [34, 35].

Tatsächlich konnte durch Vorarbeiten der Tumor-AG weiter nachgewiesen werden, dass der durch Paclitaxel bedingte Ca^{2+} -Einstrom in die Endothelzellen von Tumorblutgefäßen über TRPC6-Kanäle vermittelt wird, da bei Inhibition von TRPC6 die Permeabilitätssteigerung des Endothels unter Paclitaxel-Behandlung ausblieb. Gleichzeitig ist entscheidend, dass TRPC6 unter VEGF-Einfluss vermehrt exprimiert wird [80].

1.5 Vaskulartoxizität von Paclitaxel

Unter Vaskulartoxizität versteht man den schädigenden Einfluss von Substanzen auf das Gefäßsystem. Dieser kann sich durch direkte objektivierbare Schäden an Komponenten des Gefäßsystems zeigen (z.B. am Endothel) oder sich durch Veränderungen der Gefäßfunktion (Tonusänderung, Inflammation) bemerkbar machen. Für die Patienten bringt dies zahlreiche Komplikationen mit sich, die von Veränderungen des Blutdrucks bis zu Thrombenbildung und -verschleppung mit Myokardinfarkten oder cerebralen Insulten bzw. Okklusion eines Gefäßes mit nachgeschalteter Ischämie reichen [81].

Aufgrund der Tatsache, dass für ein fortschreitendes Tumorwachstum die Neubildung von Gefäßen nötig ist, um die Nährstoffversorgung der Tumorzellen sicherzustellen, wurde die Angiogenese zu einem neuen therapeutischen Ziel auserkoren [81]. Dies wird heute in Therapieregimen z.B. durch Inhibitoren des Gefäß-Wachstumsfaktors VEGF wie Bevacizumab erreicht.

Allerdings können auch „klassische“ Zytostatika zu Gefäßschäden führen, auch wenn diese Wirkung nicht direkt beabsichtigt und eventuell sogar schädigend für die Patienten ist. Diese Substanzen wurde in einem Review mit dem treffenden Begriff der „akzidentellen anti-angiogenen Medikamente“ zusammengefasst [81].

Im Falle von Paclitaxel wurden dessen anti-angiogene Eigenschaften schon 1996 beschrieben. So konnte bereits damals in vivo eine dosisabhängige Inhibition der Angiogenese und in vitro ein Rückgang von Zellmotilität, Chemotaxis sowie einer vollständigen Inhibition der Formation der Endothelzellen zu neuen Gefäßen nachgewiesen werden [82]. Zudem wurden durch Paclitaxel Einschränkungen in der Geschwindigkeit des vesikulären Transports festgestellt sowie eine Lösung und Abrundung von Endothelzellen bei Exposition gegenüber Konzentrationen von 1nM Paclitaxel [81]. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den beobachteten Veränderungen an kanalisierten HUVEC-Zellen in Vorarbeiten der Tumor-AG [79].

1.6 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll aufbauend auf den in Vorarbeiten der Tumor-AG nachgewiesenen vaskulardisruptiven Effekten der Taxantherapie im Tumor die Frage untersucht werden, ob die systemische Therapie mit Paclitaxel zu Gefäßveränderungen bzw. Gefäßschäden in peripheren (stark durchbluteten) Organen wie dem Herz oder den Nieren in Abhängigkeit vom Progress der Tumorerkrankung führt.

Insbesondere soll das Hauptaugenmerk auf mikroskopisch sichtbaren Veränderungen der Organmorphologie (Einblutungen, Nekrosen) oder Veränderungen der vaskulären Makro- und Mikroarchitektur innerhalb der untersuchten Organe liegen. Dazu wurden Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Schnitte der Organe untersucht sowie immunhistochemische Färbungen auf endotheliale Antigene (u.a. CD31, CD34, CD105) zur Darstellung der Gefäße angefertigt.

Wie oben beschrieben konnte in Vorarbeiten der Tumor-AG nachgewiesen werden, dass die durch Paclitaxel bedingte Vaskulartoxizität entscheidend über TRPC6 vermittelt wird. Da die im Rahmen einer Tumorerkrankung erhöhten VEGF-Spiegel nicht nur lokal sondern in gewissem Maße auch systemisch wirken und VEGF über oben beschriebenen Mechanismus zu einer Hochregulierung der Expression von TRPC6 auf Endothelzellen führt, soll auch die TRPC6-Ausstattung des Endothels peripherer Organe in Abhängigkeit vom Ausmaß der Tumorerkrankung mittels Immunfluoreszenzfärbungen beurteilt werden.

Somit soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag zum besseren Verständnis der systemischen Auswirkungen einer Tumorerkrankung unter Betrachtung des Einflusses einer Taxan-basierten Chemotherapie liefern.

2 Materialien und Methoden

2.1 Ethikvotum zur Durchführung der Tierversuche

Die Durchführung der Tierversuche wurde im Vorhinein durch die Regierung von Unterfranken als zuständiger Aufsichtsbehörde genehmigt (AZ 55.2-2531.01-74/12).

2.2 Herkunft und Behandlung der Versuchstiere

Zur Klärung der Frage, ob fortgeschrittene Tumorerkrankungen in Kombination mit einer Paclitaxel-Therapie zu Veränderungen am Gefäßbett peripherer Organe führen, wurden 14 genotypisch ähnliche Mäuse (Versuchstiere) entsprechend untenstehendem Schaubild eingeteilt, sodass sich insgesamt sechs Experimentalgruppen ergaben (Abbildung 2). Während Ihres Aufenthalts wurden die Tiere im Einklang mit den entsprechenden Vorgaben gehalten und hatten Futter und Wasser zur freien Verfügung.

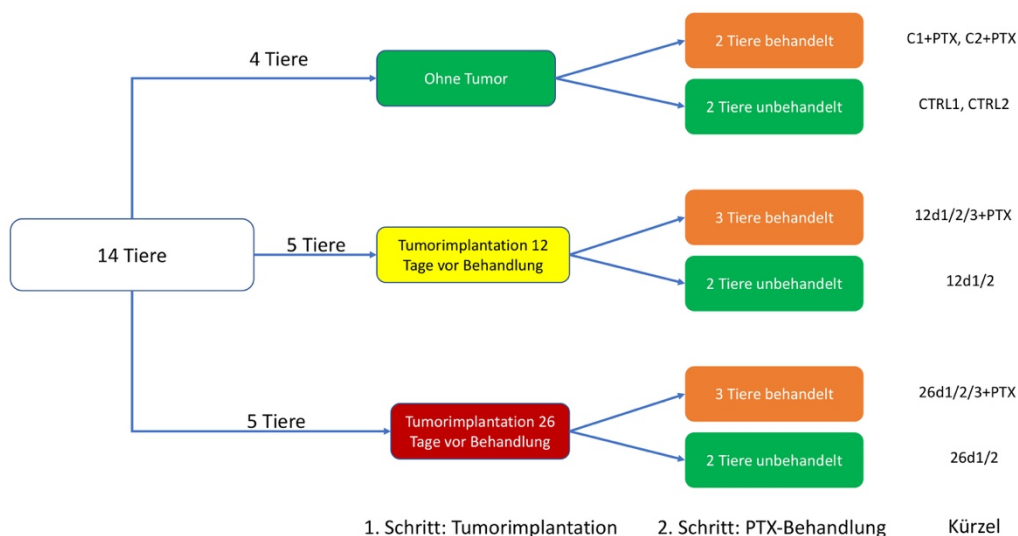


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsdesigns.

Erläuterungen zu den Kürzeln: C/CTRL=Kontrolltier ohne Tumor, 12d=Tumorimplantation 12 Tage vor Injektion, 26d=Tumorimplantation 26 Tage vor Injektion, 1/2/3=Nummern der einzelnen Tiere, +PTX=Behandlung mit Paclitaxel. Die sechs Gruppen im 2. Schritt entsprechen den sechs Experimentalgruppen.

Den Mäusen der tumortragenden Gruppen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Tumorzellen der AT3-Brustkrebs-Zelllinie orthotop implantiert. Diese Zeitpunkte waren entsprechend obiger Graphik 26 Tage bzw. 12 Tage vor dem Zeitpunkt der Behandlung.

Am Behandlungstag wurde den Tieren der Experimentalgruppe (mit Paclitaxel-Therapie) Paclitaxel in einer Dosierung von 20 mg/kg/Körpergewicht verabreicht. Den Tieren der

Kontrollgruppe (ohne Paclitaxel-Therapie) wurde zum gleichen Zeitpunkt wie den behandelten Tieren Ethanol+Cremaphor als Kontrollsubstanz injiziert.

2.3 Organpräparation und Fixierung

Drei Tage nach der Behandlung wurden die Tiere mittels CO₂-Narkose eingeschlüpfert. Nach medianer Thorakolaparotomie wurden die Tiere mittels Punktion am linken Ventrikel mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (engl. phosphate-buffered saline; PBS) und anschließend 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS perfundiert, um möglichst Blutleere zu erreichen. Anschließend wurden Herz, Lungen, Leber, Dickdarm (nach Spülen des Darmlumens mit PBS), sowie im Fall der tumortragenden Tiere die Tumore entnommen. Das Gehirn wurde nach Kraniotomie entfernt. Alle Organe wurden über 24h in 4 % PFA immersionsfixiert und für weitere 24h in mehreren Chargen PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Nieren für eine optimale Einbettung frontal geschnitten, das Hirn sagittal und die Herzen quer. Der Darm wurde in Stücke von circa 5mm Länge geteilt und für jedes Tier individuell in einer Kassette eingebettet. Die Lungen wurden vor Fixierung und Einbettung mit Hilfe eines Exsikkators und angeschlossener Vakuumpumpe entlüftet. Daran anschließend wurden die Organe der Tiere zunächst für 6h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler und anschließend nach Erneuerung des Fixans über Nacht bei 4-8°C in 4%PFA/PBS fixiert.

2.4 Einbettung und Mikrotomie

Um von den fixierten Organen Schnitte in einer für die histologische Untersuchung notwendigen Schnittdicke im Mikrometerbereich anfertigen zu können, ist die sogenannte Einbettung notwendig. Als Standard hat sich hierbei für in Formalin fixierte Organe die Einbettung in Paraffinwachs etabliert [83]. Nach der Fixierung in Formaldehyd über Nacht wurden die Organstücke für 4x30 Minuten in PBS und anschließend mehrmals in 70% Ethanol gewaschen. Danach durchlaufen die Organstücke im Einbettautomat die aufsteigende Alkoholreihe und werden somit dehydriert, und mit Xylol als Intermedium in Paraffinwachs überführt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Chronologischer Ablauf des Einbettprozesses

EtOH=Ethanol

Medium	70% EtOH I	70% EtOH II	80% EtOH	96% EtOH	100% Iso-propanol I	100% Iso-propanol II	100% Iso-propanol III	Xylol I	Xylol II	Xylol III	Paraffin I	Paraffin II
Zeit (h)	½	1	2 ½	3	1 ½	2	2	1 ½	2	2	4	4

Die Gesamtdauer des Einbettprozesses beträgt somit 26h zuzüglich 12 Minuten Wechselzugabe.

Die so vorbehandelten Gewebestücke wurden anschließend in Blöckchen von Paraffinwachs eingegossen. Aus diesen wurden anschließend am Mikrotom 5µm dicke Schnitte angefertigt, von denen je zwei folgende Schnitte auf *SuperFrost*-Objektträger aufgezogen wurden. Nach Trocknung der aufgezogenen Schnitte im Wärmeschrank über Nacht bei 37°C wurde ein Objektträger stets H&E gefärbt.

2.5 Färbungen

2.5.1 Grundlagen der histologischen Färbung

Unter Histologie versteht man das Studium von tierischen oder pflanzlichen Geweben unter dem Mikroskop. Dabei bedient man sich histologischer Färbungen, um Details der einzelnen Gewebebestandteile sicht- und differenzierbar zu machen und den Kontrast innerhalb des Gewebes zu verstärken [84]. Eine elementare Färbung in der histologischen Diagnostik ist die Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

2.5.2 Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) gehört sicherlich zu den Standardfärbungen des histologischen Labors. Die H&E-Färbung kann zu den Übersichtsfärbungen gerechnet werden, welche eine Kern- und eine Zytoplasmafärbung beinhalten und bei begrenztem Zeitaufwand einen Überblick über das zu untersuchende Gewebe mit seinen Strukturen erlauben [83].

Hämatoxylin kommt hierbei als Kernfarbstoff zum Einsatz, wobei korrekterweise sein Oxidationsprodukt, das Hämatein, den eigentlichen Farbstoff darstellt. In Kombination mit Alaunen entstehen Hämatoxylin-Aluminium-Lacke (Hämalaune), welche eine positive Partialladung aufweisen und an die (im sauren pH-Bereich) aufgrund des negativ geladenen Phosphatrückgrats negativ geladene DNA binden. Im zweiten Schritt wird der pH durch Spülen in Leitungswasser erhöht, wodurch es zu Umlagerungen und

Ladungsänderungen innerhalb der Hämalaun-Komplexe kommt, die in der charakteristischen Blauverfärbung der Kerne resultieren. Allerdings ist die Anfärbbarkeit von Kernstrukturen mit Hämatoxylin auch nach Entfernen der DNA noch gegeben, weshalb auch andere Bindungsstellen des Hämalauns innerhalb des Kerns (z.B. die Histone) diskutiert werden. Der definitive Färbemechanismus der Hämatoxylin/Hämatein-Färbung ist also noch nicht abschließend verstanden [83]. Die H&E-Schnitte der vorliegenden Arbeit wurden nach Mayer gefärbt.

Eosin Y (von griechisch *Eos* = die Morgenröte) ist ein negativ geladener Farbstoff, der über Ionenbindungen an positiv geladene zytoplasmatische Proteine binden kann. Neben dem Zytoplasma werden durch ihn auch kollagenes Bindegewebe in einem roten Farbton angefärbt. Da auch Anteile des Kerns mittels Eosin gefärbt werden, erscheinen die Kerne schlussendlich nach Abschluss der H&E-Färbung violett [83].

Der Ablauf der H&E-Färbung ist wie folgt: Zunächst werden die Schnitte über Xylol I und II (für je zehn Minuten) und die absteigende Alkoholreihe (EtOH 100% I und II, 96%, 80%, 70%, 50% für je zwei Minuten) in Aqua dest. (nochmals zwei Minuten) überführt. Daran schließt sich die Färbung mit Hämalaun nach Mayer für zehn Minuten an und zwei Spülschritte in Aqua dest., zwischen denen für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen wird. Die Gegenfärbung erfolgt in wässriger 0,1%iger Eosin-Lösung für zehn Minuten, gefolgt von einem weiteren Spülen mit Aqua dest. Anschließend wird für zwei Minuten in 96% EtOH gewaschen und für je fünf Minuten in 100% EtOH I und II die Alkoholreihe aufwärts geführt. Abschließend verbleiben die Schnitte für je fünf Minuten in Xylol I und II und werden mit DePeX eingedeckt.

2.5.3 Immunmarkierung

Antigene sind bestimmte Moleküle auf der Zelloberfläche, gegen die das Immunsystem Antikörper bilden kann. Dies können zum Beispiel Polysaccharide oder Aminosäuregruppen sein [83].

Physiologischerweise geschieht dies bei Kontakt von körperfremden Antigenen mit dem Immunsystem des Organismus, um diese Strukturen abzufangen und zu neutralisieren; allerdings können sich Antikörper auch gegen körpereigene Antigene richten, was im Zuge der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen von Bedeutung ist [85].

Antikörper sind Proteine, welche zu den Immunglobulinen zählen und Teil des humoralen Immunsystems sind. Sie bestehen aus zwei schweren und zwei leichten, über Disulfidbrücken verbundenen, Polypeptidketten [86]. An den Enden der y-förmigen

Arme des Antikörpers (Fab-Teil) befindet sich die Antigenbindungsstelle, das sogenannte Epitop. Am anderen Ende des Antikörpers befindet sich der innerhalb der Unterart des Antikörpers und Spezies konstante Fc-Teil, welcher selbst immunogene Eigenschaften aufweist; somit kann das Immunsystem eines Organismus bei Kontakt mit Antikörpern einer anderen Spezies selbst Antikörper gegen diese fremden Antikörper bilden (Abbildung 3).

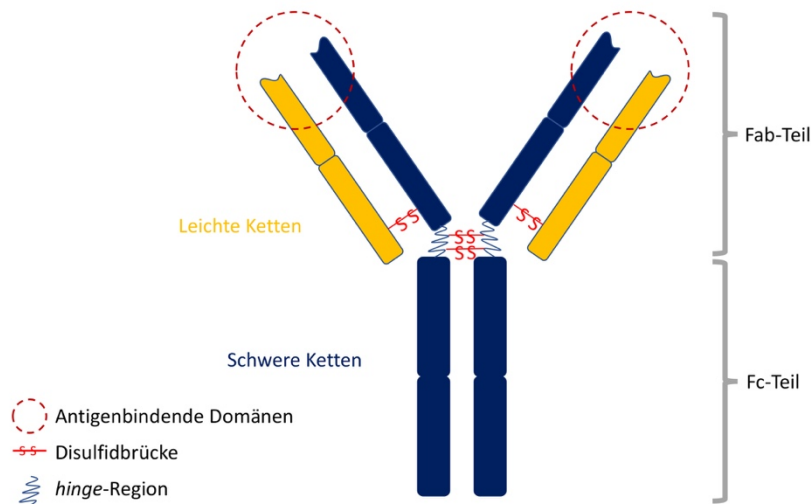


Abbildung 3: Struktur eines IgG-Antikörpers.
Modifiziert nach Lüllmann-Rauch, Asan et al. [23].

Aufgrund von u.a. Molekulargewicht und Funktion werden fünf Unterarten von Antikörpern unterschieden, wobei in der vorliegenden Arbeit zur Immunmarkierung ausschließlich Antikörper der Klasse IgG verwendet wurden.

Die Immunmarkierung beruht auf der Eigenschaft von Antigenen mit korrespondierenden Antikörpern eine nicht-kovalente Bindung einzugehen, wodurch ein sogenannter Antigen-Antikörper-Komplex entsteht [87]. Die Bindungsstärke zwischen Antigen und Antikörper wird durch die Affinität charakterisiert.

Der entscheidende Knackpunkt der Immunmarkierung ist, dass die genutzten Antikörper mit unterschiedlichen Molekülen beladen sind, welche als Marker dienen und somit nach Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes ein Signal am Ort des Antigens abgeben. So lassen sich aufgrund des Musters verschiedener Marker auf ihrer Oberfläche unterschiedliche Zelltypen klar charakterisieren. Anhand dessen kann über das antigene Expressionsmuster auf die zellulären Funktionen oder auf die Herkunft einer Zelle aus unterschiedlichen Zelllinien geschlossen werden. Diese Eigenschaft der

Immunmarkierung macht man sich insbesondere zur Charakterisierung unterschiedlicher Zelltypen in der Tumordiagnostik zu Nutze.

Man unterscheidet verschiedene Methoden, mit denen die Antigene markiert und damit für die mikroskopische Betrachtung sichtbar gemacht werden können. Neben dem Prinzip der direkten Immunmarkierung, bei der der Primärantikörper, der an das nachzuweisende Antigen bindet, direkt an eine Markersubstanz gekoppelt ist und zum Nachweis genutzt wird, existiert das Prinzip der indirekten Immunmarkierung. Bei diesem Verfahren nutzt man einen Sekundärantikörper, welcher sich gegen den Primärantikörper richtet und aus einer anderen Spezies als der Primärantikörper gewonnen wird. Dadurch können ein oder mehrere Moleküle des Sekundärantikörpers an den Fc-Teil des Primärantikörpers binden. Durch die Möglichkeit der Bindung mehrerer Sekundärantikörper an den Primärantikörper kann eine Signalamplifikation am Ort des Antigens erreicht werden, was einen klaren Vorteil der indirekten Immunmarkierung darstellt [86].

2.5.4 Immunhistochemie – DAB-Färbung

Die Diaminobenzidin-Färbung (DAB-Färbung) gehört zu den enzymbasierten Detektionsmethoden der Immunhistochemie. Als Enzym wird im Rahmen der DAB-Färbung meist die Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase/HRP*) verwendet, welche DAB zu einem braunen, wasserunlöslichen Feststoff umsetzt.

Jede DAB-Färbung gliedert sich in einen ersten und einen zweiten Arbeitstag, während die Schnitte über Nacht mit dem Primärantikörper bedeckt bei 4°C im Kühlschrank inkubiert werden.

Tag eins beginnt mit der Entparaffinierung der noch in Paraffinwachs eingebetteten Organschnitte, angefangen bei Xylol über die absteigende Alkoholreihe, um das Paraffin von den Organschnitten zu lösen und eine Rehydrierung zu ermöglichen. Hierzu werden zu Beginn die benötigten Objektträger, auf denen jeweils zwei aufeinanderfolgende Schnitte (ein Testschnitt und ein Kontrollschnitt) aus demselben Paraffinblock aufgezo-gen worden sind, in ein Färbekorbchen oder eine Objektträgerhalterung aus Metall oder Plastik überführt und jeweils für zehn Minuten in zwei mit Xylol gefüllte Färbetröge (Xylol II und Xylol I) gestellt. Die Schnitte wurden nach dem Bad im Xylol weiter die absteigende Alkoholreihe abwärts geführt über Ethanol 100% II, Ethanol 100% I, Ethanol 96%, Ethanol 80% und Ethanol 70%. In diesen Lösungen verblieben die Schnitte jeweils für fünf Minuten. Daran anschließend wurden die Schnitte zweimal

zweieinhalb Minuten in vollentsalztem Wasser (VE-H₂O) gewaschen, welches zwischenzeitlich nochmals erneuert wurde.

Damit sind die Schnitte entparaffiniert und rehydriert und somit bereit für die folgende Demaskierung der Antigenstrukturen.

Die Demaskierung ist notwendig, um die Antigene im Gewebe wieder den Antikörpern zugänglich zu machen, da die vorherigen Prozesse, insbesondere die Fixierung mit Formaldehyd und die Einbettung, die antigenen Strukturen verändern können und somit eine Bindung von Antikörpern erschweren oder gar unmöglich machen können. Ohne Demaskierung kann es bei der immunhistochemischen Färbung passieren, dass das Signal nur schwach ausfällt oder komplett ausbleibt. Dies liegt daran, dass Formaldehyd die Proteine im Gewebe durch inter- und intramolekulare Methylenbrücken fixiert, was Auswirkungen auf die sterische Konformation der Epitope haben und somit die Antikörperbindung behindern kann [86, 88].

Neben der bei der hier vorliegenden Arbeit verwendeten thermischen Demaskierung durch Hitze existieren noch etablierte proteolytische Verfahren, um diese Formaldehyd-bedingten Vernetzungen rückgängig zu machen.

Die hitzeinduzierte Demaskierung, auch als HIER (*heat induced epitop retrieval*) bezeichnet, arbeitet bei feuchter Hitze mit Temperaturen um die 100°C in einem pH-Bereich von 2-10. Dies führt zu einer Permeabilisierung des Gewebes und einer Freilegung der Epitope. Emoto et al. mutmaßen in ihrer Arbeit, dass die Polypeptide der Zelloberfläche nach Demaskierung im sauren/basischen pH-Bereich positive oder negative Partiaalladungen tragen. Die dadurch entstehenden elektrostatischen Wechselwirkungen würden den hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der Peptidkette entgegenwirken, wodurch ein Balancezustand zwischen diesen beiden Kräften begünstigt würde. Dieser Balancezustand sei wiederum für die ordnungsgemäße Restitution der Proteinstruktur während des Abkühlvorgangs wichtig und verhindere, dass die Proteine eine zufällige, ungeordnete Konformation annehmen (Abbildung 4) [88]. Die endgültigen chemischen Mechanismen, die dieser Reaktion zugrunde liegen, sind jedoch noch nicht vollständig verstanden [83].

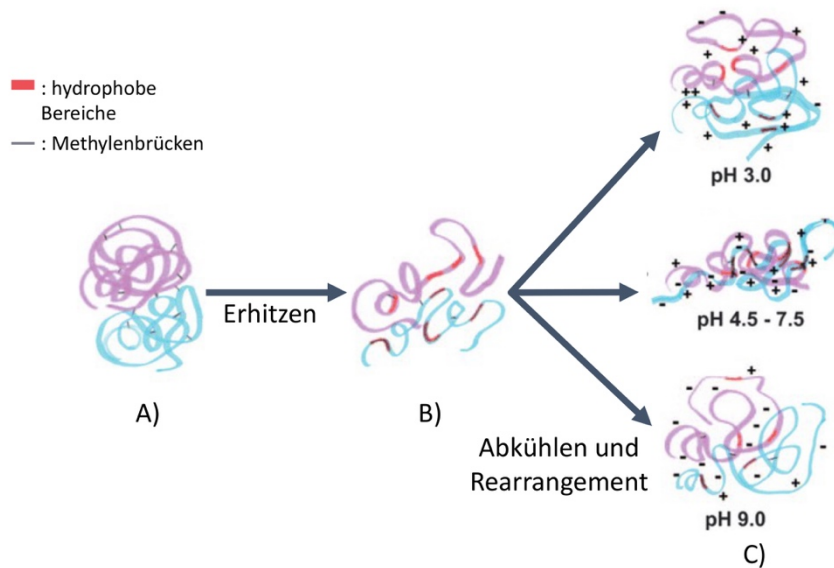


Abbildung 4: Änderungen in der Tertiärstruktur eines Proteins.

A) nach der Fixierung, B) nach dem Erhitzen mit aufgebrochener Tertiärstruktur und C) nach Abkühlen und Rearrangement der Proteine bei unterschiedlichen pH-Werten der verwendeten Puffer. Modifiziert nach Emoto et al [88].

Zur thermischen Demaskierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Mikrowelle verwendet. Die Schnitte werden vom VE-H₂O in eine vorher mit dem jeweiligen Demaskierungspuffer gefüllte Mikrowellen-geeignete Küvette gestellt und anschließend in der Mikrowelle erhitzt und siebenmal für zehn Sekunden im Abstand von einer Minute aufgekocht. Im Anschluss daran wird die heiße Küvette aus der Mikrowelle entnommen und darf für ca. eine halbe Stunde abkühlen, bevor der nun abgekühlte Demaskierungspuffer durch kontinuierliches Befüllen der Küvette mit VE-H₂O für fünf Minuten ausgetauscht wird.

Auf die Demaskierung folgt die Blockierung der endogenen Peroxidase für zehn Minuten in 3%-iger wässriger Wasserstoffperoxidlösung (Wasserstoffperoxid=H₂O₂), die durch Verdünnen der 35%igen H₂O₂-Stock-Lösung mit VE-H₂O hergestellt wurde. Nach Abschluss des endogenen Peroxidase-Blocks wird die Wasserstoffperoxid-Lösung verworfen und die Schnitte werden zuerst für je zweimal fünf Minuten in VE-H₂O und daran anschließend für dreimal fünf Minuten in PBS-Puffer auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend werden die Objektträger aus der mit PBS gefüllten Küvette entnommen, mit einem Zellstofftuch abgetrocknet und überschüssige Flüssigkeit vorsichtig von den Rändern der Schnitte entfernt, ohne diese zu berühren. Daraufhin werden Test- und Kontrollfeld mithilfe eines PAP-Pens umrandet, welcher eine fettige Barrierschicht bildet, um ein Herunterfließen der Lösungen von den Schnitten bzw. ein

Vermischen derselben zu verhindern. Hiernach werden die Schnitte für ein bis zwei Stunden mit Normalserum desjenigen Tieres blockiert, aus dem der gewünschte Sekundärantikörper stammt, um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers zu verhindern (zum Beispiel 5% normalem Ziegen Serum [engl. *normal goat serum*; NGS]), falls der Sekundärantikörper aus der Ziege stammt). Für die Aufbewahrung der Schnitte während der Inkubationszeit werden lichtdichte feuchte Kammern genutzt, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Die Objektträger werden auf den Stegen innerhalb der feuchten Kammer platziert und eine entsprechende Menge an Blocklösung wird mittels einer Eppendorf-Pipette auf die einzelnen Schnitte gegeben (üblicherweise 35µl für Herz- und Tumorschnitte, 45µl für Nierenschnitte). Dabei ist penibel darauf zu achten, dass der gesamte Schnitt von Flüssigkeit bedeckt ist, um ein Austrocknen des Präparates während der Inkubationszeit zu verhindern. Um dies zu erreichen, kann die aufpipettierte Flüssigkeit vorsichtig mit der Pipettenspitze um den Schnitt herum ausgezogen werden. Die mit der Blocklösung überschichteten Schnitte werden nun für circa zwei Stunden bei Raumtemperatur in den feuchten Kammern inkubiert.

Nach Ablauf der Blockzeit erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper, der sich gegen die im Rahmen des Experiments gesuchten Antigene richtet. Der Primärantikörper wird üblicherweise in 0,2%BSA/PBS bzw. 0,2%BSA/1%NGS/PBS verdünnt. Um die Schnitte mit dem Primärantikörper zu überschichten, wird die Blocklösung von den Objektträgern auf ein Zellstofftuch abgekippt und der Bereich zwischen PAP-Pen und Schnitt vorsichtig mit einem Zellstofftuch getrocknet, um überschüssige Flüssigkeit von den Schnitten zu entfernen. Der Objektträger wird erneut auf den Stegen der feuchten Kammer platziert und auf das A-Feld, welches den der Schrift abgewandten Schnitt bezeichnet, wiederum mittels Eppendorf-Pipetten der entsprechend verdünnte Primärantikörper aufgetragen (üblicherweise 30µl pro Herz-/Tumorschnitt, 40µl pro Nierenschnitt). Analog dazu wird auf das B-Feld, das den der Beschriftung des Objektträgers zugewandten Schnitt umfasst und die Negativkontrolle des Versuchs darstellt, die reine Antikörperverdünnungslösung aufgetragen. Auch nach Auftragen der Antikörperverdünnung ist analog zum Auftragen der Blocklösung darauf zu achten, dass die gesamten Schnitte über ihren Rand mit Flüssigkeit bedeckt sind, um ein Austrocknen zu verhindern. Die befüllten feuchten Kammern werden über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Der zweite Arbeitstag der DAB-Färbung beginnt mit dem Abspülen der Primärantikörperverdünnungslösung von den Objektträgern. Hierzu werden die inkubierten Objektträger aus dem Kühlschrank entnommen, die Schnitte auf Anzeichen

von Trockenheit geprüft und im Anschluss der Primärantikörper mittels PBS aus einer Pasteurpipette vom B- zum A-Feld abgespült. Daraufhin werden die Objektträger in eine mit PBS gefüllte Hellendahl-Küvette gestellt und für dreimal fünf Minuten in PBS auf dem Schüttler gewaschen.

Nach erneutem Abtrocknen und Auflegen der Objektträger in der feuchten Kammer werden die Schnitte im Dunkeln für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Auch hier gibt es unterschiedliche Arten von Sekundärantikörpern. Die im Rahmen der DAB-Färbung verwendeten Sekundärantikörper waren entweder mit Biotin (Vitamin H) beladen, was als Coenzym für andere enzymatische Reaktionen dient, bei denen Carboxygruppen transferiert werden, oder an ein Polymer gebunden, was eine sensitivere Detektion ermöglicht [83].

Bei Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers macht man sich die hohe Affinität des Biotins zu (Strept-)Avidin zunutze, die in Kombination durch nicht-kovalente Wechselwirkungen einen relativ stabilen Komplex bilden. Circa 30 Minuten vor Verwendung wird der Avidin-Biotin-Komplex (AB-Komplex) aus seinen zwei Komponenten hergestellt. An die Biotinmoleküle sind hierbei die zur späteren Detektion notwendigen Enzymmoleküle gebunden (Abbildung 5).

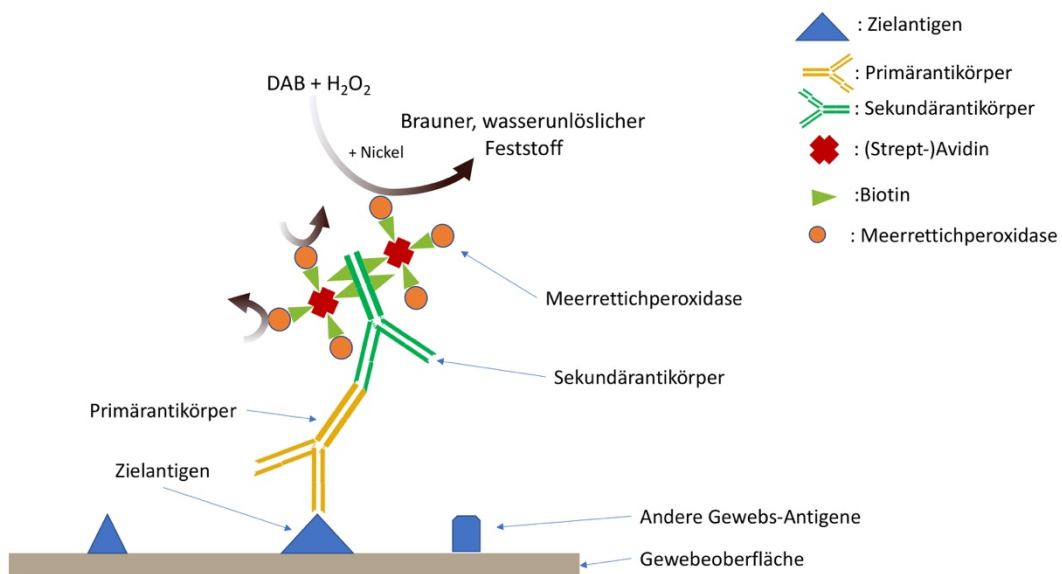


Abbildung 5: Prinzip der DAB-Reaktion bei Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers und des AB-Komplexes.

Die braunen Pfeile symbolisieren die Umsetzung des Chromogens DAB. Modifiziert nach Key, M. [89].

Im Falle des sogenannten „Polymerantikörpers“ ist der Sekundärantikörper an ein Rückgrat in Form eines langen Makromoleküls gekoppelt, an welchem viele

Enzymmoleküle befestigt sind. Dadurch wird erreicht, dass am Ort der Bindung des Sekundärantikörpers, der über den Primärantikörper dem Ort des Antigens entspricht, vermehrt Moleküle des Chromogens umgesetzt werden, was am Ort des Antigens zu einer Signalverstärkung und somit zu einer höheren Sensitivität dieser Methode führt (Abbildung 6) [83].

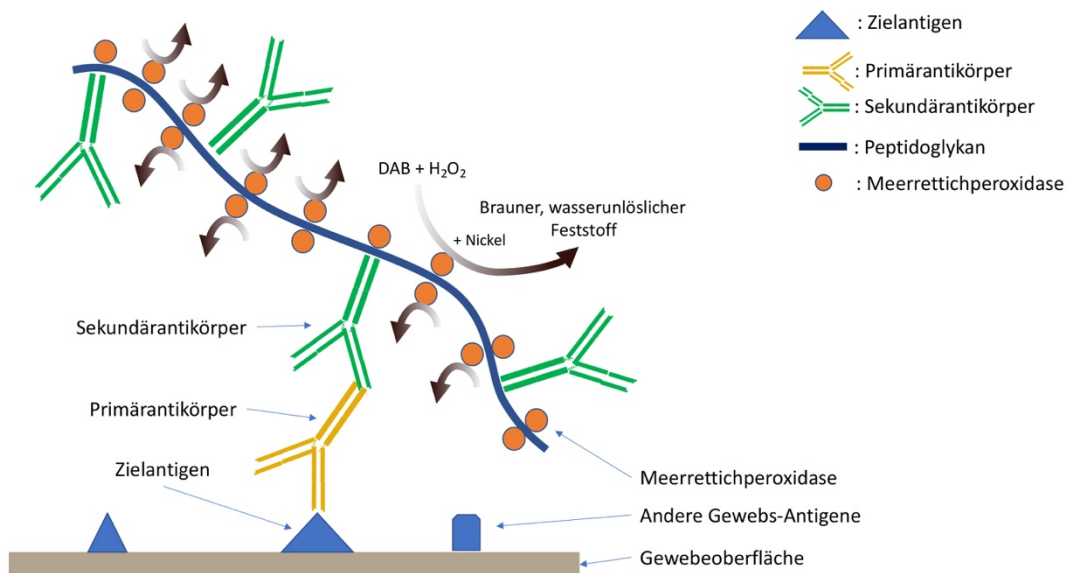


Abbildung 6: Prinzip der DAB-Reaktion bei Verwendung eines Polymerantikörpers.

Die Vielzahl der an das Peptidoglykan-Rückgrat gekoppelten Enzymmoleküle ermöglicht eine vermehrte Umsetzung des Chromogens und somit eine Signalverstärkung am Ort der Bindung. Modifiziert nach Lang et al.[83], Musa et al. [90].

Nach Ablauf der Inkubationszeit des Sekundärantikörpers werden die Objektträger wiederum in eine mit PBS gefüllte Hellendahl-Küvette überführt, das PBS direkt einmal erneuert und anschließend zweimal fünf Minuten in PBS im Dunkeln auf dem Schüttler gewaschen. Daran schließen sich zwei weitere Waschgänge auf dem Schüttler im Dunkeln an, diesmal wird jedoch 0,1M Phosphatpuffer (PB-Puffer, pH=7,4) als Waschpuffer verwendet.

Parallel zum letzten Waschschriff in PB-Puffer wird die Entwicklungslösung für die DAB-Färbung angesetzt. Diese wird aus folgenden Chemikalien in einem mit Alufolie lichtgeschützt umwickelten Messzylinder (um die lichtempfindlichen Chemikalien Nickelsulfat [NiSO₄] und DAB zu schützen) auf dem Magnetrührer unter Zuhilfenahme eines Magnet-Rührfischs angesetzt:

- 67,5ml PB- Puffer (Raumtemperatur)
- 1350µl Nickelsulfat (4°C)
- 1350µl Glucose (10%) (-20°C)

- 150µl Ammoniumchlorid (18mg) (4°C)
- 1,5ml DAB (22,5mg/ml) (-20°C)
- 225µl Glucose-Oxidase (1,2mg/ml dest. H₂O) (-20°C)

In Klammern sind jeweils die Lagerungstemperaturen der einzelnen Substanzen angegeben.

Die Glucose-Oxidase wird erst kurz vorher zugegeben, da sie das Enzym ist, welches die Entwicklungsreaktion startet. Mit Zugabe der DAB-Lösung in die Küvette mit den zu entwickelnden Objektträgern wird eine Stoppuhr gestartet, um die Entwicklungszeit nach Abschluss protokollieren zu können.

Für den Entwicklungsvorgang sind primär zwei chemische Reaktionen entscheidend: Die Glucose-Oxidase setzt die Glucose zusammen mit Sauerstoff zu Gluconolacton und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) um. Dieses H₂O₂ wird nun von der an den Polymer- bzw. Biotin-Molekülen gebundenen Meerrettich-Peroxidase verwendet, um die Oxidation von DAB in einen braunen, wasserunlöslichen Feststoff zu katalysieren (Abbildung 6, Abbildung 7). Das Nickelsulfat sorgt für eine vermehrte Schwärzung des Reaktionsproduktes, was den Kontrast verbessert [83].

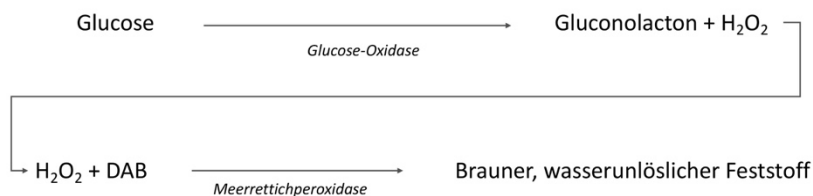


Abbildung 7: Reaktionsablauf der DAB-Reaktion

Sobald das Signal die gewünschte Stärke erreicht hat, wird die DAB-Reaktion gestoppt, indem die Schnitte in eine mit PBS gefüllte Hellendahl-Küvette gestellt werden.

Hiernach werden die Schnitte erneut für dreimal fünf Minuten in PBS auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend werden die Objektträger wieder in eine Objektträgerhalterung einsortiert und in einer Küvette kurz in vollentsalztem Wasser gewaschen, um Rückstände der im PBS enthaltenen Mineralsalze zu entfernen.

Nun schließt sich die Gegenfärbung in angesäuertes 0,1%-iger Kernechtrotlösung an. Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung ist ein Lack, der selektiv die Zellkerne rot anfärbt [86]. In dieser Lösung verblieben die Schnitte für drei Minuten und wurden nach Ablauf der Zeit nochmals kurz in VE-H₂O gewaschen, um überschüssige Kernechtrotlösung

abzuspülen und eine Verschleppung in die aufsteigende Alkoholreihe zu minimieren. Die Objektträger werden über 70%-igen, 80%-igen und 96%-igen Ethanol, in dem die Objektträger für jeweils eine Minute verbleiben, zu 100%-igem Ethanol I und 100% Ethanol II geführt, worin die Objektträger jeweils drei Minuten verbleiben. Abgeschlossen wird die aufsteigende Alkoholreihe durch Xylol I und Xylol II für jeweils fünf Minuten. Aus dem Xylol II werden die Objektträger nun unter dem Abzug entnommen und mit DePeX eingedeckt.

2.5.5 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzfärbung beruht auf dem Prinzip, dass bestimmte Moleküle, welche mit dem Licht einer für das jeweilige Molekül definierten Wellenlänge angeregt werden, Licht einer ganz bestimmten langwelligeren Wellenlänge emittieren. Solche Moleküle bezeichnet man als Fluorochrome [86]. Durch Absorption von Photonen können Elektronen kurzfristig ein weiter vom Kern entferntes (im Grundzustand) unbesetztes Orbital besetzen. Beim Zurückfallen auf ihr ursprüngliches Energieniveau durchlaufen die Elektronen einen energetischen „Zwischenzustand“, weshalb sie energieärmeres Licht einer größeren Wellenlänge wie der Anregungswellenlänge emittieren, bevor sie schließlich auf das Energieniveau des Grundzustand zurückkehren [83]. Durch Nutzung unterschiedlicher mit Fluorochromen markierter Sekundärantikörper, welche durch Licht unterschiedlicher Wellenlängen angeregt werden und dementsprechend Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren, ist es möglich, im Rahmen einer Färbung mehrere Antigene zu detektieren und deren Verteilung innerhalb des Gewebes mit hohem Kontrast zu untersuchen.

Vom Ablauf her unterscheidet sich Tag eins der Immunfluoreszenzfärbung im Wesentlichen nicht von Tag eins der DAB-Färbung. Im Rahmen der Immunfluoreszenzfärbung ist die Blockierung der endogenen Peroxidase nicht notwendig, deshalb kann dieser Schritt entfallen, ebenso wie die sich daran anschließenden Waschschrte in VE-H₂O, da die enzymbasierte Entwicklung entfällt.

Aus diesem Grund werden die Schritte des ersten Arbeitstages hier nicht nochmals separat aufgeführt, sondern es wird auf die obigen Erläuterungen verwiesen. Am zweiten Tag gibt es im Verlauf jedoch einige signifikante Unterschiede, weswegen auf diesen Arbeitstag nun etwas detaillierter eingegangen werden soll.

An den im Falle der Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Sekundärantikörper ist im Gegensatz zur DAB-Färbung kein Biotinmolekül/Polymer gekoppelt, sondern ein

Fluorochrom. Mit dem Sekundärantikörper werden die Objektträger für eine Stunde in der feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert.

Daran schließt sich ein erneutes Waschen für dreimal zwei Minuten in PBS auf dem Schüttler an. Dabei ist wichtig, dass die Schnitte währenddessen im Dunkeln stehen. Hierauf folgt die Gegenfärbung mit 4',6-Diamidin-2'-phenylindol (DAPI) in einer Verdünnung von 1:5000 (1µg/ml) für zehn Minuten in der feuchten Kammer im Dunkeln. DAPI ist ein Farbstoff, welcher mit der DNA interkaliert und somit für die Anfärbung der Zellkerne genutzt wird. DAPI wird durch verhältnismäßig kurzwelliges Licht angeregt und emittiert Licht im blauen Farbspektrum (Absorptionsmaximum bei 359nm Wellenlänge, Emission bei 461nm).

Darauffolgend werden die Objektträger erneut für fünfmal drei Minuten in PBS im Dunkeln auf dem Schüttler gewaschen.

Anschließend werden die Schnitte aus dem PBS genommen, kurz in VE-H₂O getaucht, um überschüssige anhaftende Salze des PBS zu entfernen, mit Mowiol+DABCO eingedeckt und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.6 Bildaufnahme, statistische Analyse und Auswertung

Für die Aufnahmen der IHC-gefärbten Organschnitte wurden die All-in-one-Fluoreszenzmikroskope BZ-X800 und BZ-9000 der Marke *Keyence* verwendet. Die Aufnahmen wurden im Hellfeld mit der Farbkamera angefertigt. Für Detailaufnahmen wurde das Objektiv mit 40-facher Vergrößerung, für Übersichtsaufnahmen der gesamten Organschnitte das 10er Objektiv und die Stitching-Funktion zum automatisierten Zusammensetzen der Aufnahmen verwendet.

Die Aufnahmen der Immunfluoreszenzschnitte wurden am Nikon-Konfokalmikroskop A1 angefertigt. Hierbei wurden stets 4 Kanäle aufgenommen (DAPI, cy2 als Kanal für die Hintergrundfluoreszenz und cy3.5 und cy5 für den Nachweis der jeweiligen Sekundärantikörper-Signale). Die Aufnahmen erfolgten mit 20-facher Vergrößerung, für Detailaufnahmen wurde zusätzlich ein 3-facher Digitalzoom verwendet. Zur Reduzierung der Hintergrundfluoreszenz wurde der cy2-Kanal vor der Auswertung in Fiji von den übrigen Kanälen subtrahiert.

Für Analyse und Auswertung der Aufnahmen wurden die Programme Fiji von ImageJ und Microsoft Excel for Mac (Version 16.51) zur tabellarischen Auftragung verwendet.

Die durch CD31 bzw. CD105 positiv markierten Kapillaren am Herz wurden händisch mittels Freihandauswahl umrandet und mit Hilfe des Measure Tools von Fiji unter anderem auf Fläche, Zirkularität und Umfang vermessen. Als Kapillaren wurden dabei CD105-/CD31-positive Gefäße betrachtet, die allseits von Herzmuskelgewebe umgeben waren und nur eine endotheliale Wandschicht aufwiesen, das heißt von keiner lichtmikroskopisch sichtbaren Media umgeben waren. Zudem wurde als Cut-Off zur Erfüllung der Definition als Kapillare eine Fläche von $300\mu\text{m}^2$ festgelegt. Außerdem wurden in der Auswertung nur Kapillaren mit einer Zirkularität $>0,85$ berücksichtigt, um sicherzustellen, dass in die Auswertung möglichst nur quer angeschnittene Kapillaren eingehen.

Für die Analyse der kolokalen Expression von CD34 und TRPC6 wurde das JACoP-Plugin in Fiji verwendet und der Prozentsatz an CD34 positiven Pixeln erfasst, der gleichzeitig im TRPC6-Kanal positiv war (Mander's Koeffizient) [91, 92].

Die Bildbearbeitung und Erstellung der Abbildungen erfolgte mit GIMP-2.10 und Inkscape. Die Grafiken wurden mit Hilfe von Microsoft PowerPoint für Mac (Version 16.56) und Inkscape erstellt.

Die statistischen Analysen und graphischen Auftragungen wurden mit Origin durchgeführt. Aus den Rohdaten wurden die Mittelwerte, die Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwerts (engl. *standard error of the mean*, SEM) berechnet. Beim Vergleich zweier normalverteilter Gruppen wurde der ungepaarte Student's t-test angewendet. Als signifikant wurden Werte von $p < 0,05$ betrachtet, als höchstsignifikant ein $p < 0,001$.

2.7 Verwendete Antikörper, Chemikalien und Geräte

Tabelle 2: Primärantikörper

Antigen	Ursprungsspezies	Artikelnummer	Hersteller
CD31	Rabbit-polyclonal	ab28364	Abcam
CD34	Rat-monoclonal	ab8158	Abcam
CD105	Rabbit-polyclonal	PA5-79203	ThermoFisher-Scientific
TRPC6	Guinea-pig-polyclonal	AGP-002	Alomone labs
VE-Cadherin	Rat-monoclonal	13-1441-82	eBioscience
VEGFR-2	Rabbit-polyclonal	B7252	Assaybiotech
VEGF-A	Rabbit-polyclonal	ab46154	Abcam

Tabelle 3: Sekundärantikörper

Antikörper	Ursprungsspezies	Artikelnummer	Hersteller
ImmPRESS Goat Anti-Rat IgG (Mouse Adsorbed) Polymer Kit, Peroxidase	Goat	MP-7444	Vector Laboratories
ImmPRESS Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Kit, Peroxidase	Horse	MP-7401	Vector Laboratories
Goat-anti-rat-cy3	Goat	112-165-003	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.
Goat-anti-rabbit-cy5	Goat	111-175-144	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.
Alexa Fluor 647 Invitrogen Goat Anti-Guinea pig	Goat	A-21450	ThermoFisher Scientific
Goat-anti-rabbit-biot.	Goat	BA-1000	Vector Laboratories
Goat-anti-rat-biot.	Goat	BA-9400	Vector Laboratories
AB-Komplex	-	PK-4000	Vector Laboratories

Tabelle 4: Chemikalien und Materialien

Name	Artikelnummer	Hersteller
Albumine from bovine serum, Fraction V (BSA)	A9647	Sigma-Aldrich
Aluminiumsulfat-18-hydrat, (reinst)	11044	Sigma-Aldrich
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	09700	Fluka
Chloralhydrat	A4431	AppliChem
Citronensäure	A1350,1000	AppliChem
D(+) - Glucose	A1422,0500	AppliChem
DAB (3,3-Diaminobenzidin)	D5637	Sigma-Aldrich
DABCO (1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan)	0718	Roth
DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol dihydrochlorid)	10 236 276 001	Roche
Deckgläser 50mm	24x40mm	Menzel-Gläser
DePeX	18243.02	Serva
Di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei	131679.1211	AppliChem Panreac.
EDTA	X986.2	Roth
Eosin Y	A0822	AppliChem

2 Materialien und Methoden

Name	Artikelnummer	Hersteller
Ethanol 96%, vergällt mit 1% MEK	Sorte 641	Nordbrand
Ethanol mind. 99%, vergällt mit 1% MEK	Sorte 642	Nordbrand
Glycerol (wasserfrei)	A3552	AppliChem
Goat Serum	G9023	Sigma-Aldrich
GOD (Glucose-Oxidase) <small>Typ VII from</small>	G2133	Sigma-Aldrich
<small>Aspergillus niger</small>		
Hämatoxylin	50837	Chroma
Histosec Pastillen (zur Paraffineinbettung)	1.11609.2504	Merck
Isopropanol (2-Propanol)	REF 11365	Morphisto
Kaliumaluminiumsulfat	A2811	AppliChem
Kaliumchlorid	6781.1	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	A3620	AppliChem
Kernechtrot	5189	Merck
Mowiol 4-88	0713	Roth
Natriumjodat (NaJO ₃)	7412159	Merck
Nickelsulfat (NiSO ₄)	1.06727.0100	Merck
Objektträger SuperFrost Plus		R. Langenbrinck
Paclitaxel		Sigma-Aldrich
PAP-Pen	MKP-1	Kisker Biotech
Paraformaldehyd (reinst), (PFA)	0335.3	Roth
Tri-Natriumcitratdihydrat	A1351,1000	AppliChem
Tris-Base/Trizma	T1503	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid 35%	9683.3	Roth
Xylol (redestilliert)		Zu 99,9% über Uni Würzburg bezogen

Tabelle 5: Puffer- und Färbelösungen mit Zusammensetzung

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
0,01M phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline; PBS, pH 7,4)	40,03g NaCl (Natriumchlorid) 1g KCl (Kaliumchlorid) 6,8g Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat) 1g KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat) Ad 5l mit Aqua dest. auffüllen
0,1M Phosphatpuffer (PB-Puffer, pH 7,36 – 7,40)	4,9g KH ₂ PO ₄ 23,3g Na ₂ HPO ₄ wasserfrei Ad 2l mit Aqua dest. auffüllen und pH auf 7,4 einstellen
0,01M Citratpuffer (pH 6)	18ml 0,1 M Citronensäure (21g/l Citronensäure) 82ml 0,1 M Tri-Natriumcitrat (29,4g/l Tri-Natriumcitratdihydrat) Ad 1l mittels Aqua dest. auffüllen
0,01M Tris-Puffer (pH 9)	10mM Tris-Base = 1,21g 1mM EDTA = 0,37g pH-Einstellung auf 9,0 mit 1N oder 5N Natronlauge Ad 1l mittels Aqua dest. auffüllen
0,5M Tris-Puffer (pH 10)	60,57g Trizma Base 950ml VE-H ₂ O Circa 2,3ml 5N HCl (pH-Einstellung auf 10,0) Ad 1l mit VE-H ₂ O auffüllen
3%ige Wasserstoffperoxidlösung	18ml 35%ige Wasserstoffperoxidlösung 192ml VE-H ₂ O Ansatz für eine Küvette
DAB-Entwicklungslösung	67,5ml PB-Puffer 1,35 ml Nickelsulfat (13mg/ml) 1,35 ml Glucoselösung (10%) 0,15 ml Ammoniumchlorid (180mg/ml) 1,5 ml DAB (22,5mg/ml) 0,225 ml Glucose-Oxidase (1,2mg/ml)

2 Materialien und Methoden

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Kernechtrötlösung 0,1% (angesäuert) = 0,1% Kernechtröt in 5% wässriger Aluminiumsulfat-Lösung	50g Aluminiumsulfat-18-hydrat (reinst) 1g Kernechtröt 1l Aqua dest.
H.-E.-Färbung: Hämalaun nach Mayer	1g/l Hämatoxylin 0,2g/l Natriumjodat 50g/l Kaliumaluminiumsulfat 50g/l Chloralhydrat 1g/l kristalline Citronensäure
Eosin, 0,1% wässrig Mowiol+DABCO	1g/l Eosin in Aqua dest. 6,0g Glycerin 2,4g Mowiol 6,0 ml Aqua dest. 12,0 ml 0,2M Tris-HCl (pH 8,5) 25mg/ml DABCO

Tabelle 6: Geräte und Mikroskope

Name	Artikelnummer/Typ	Hersteller
Einbettautomat	TP 1020	Leica
Eppendorf-Pipetten	Finnpipette	ThermoFisher Scientific
Gießstation	Modell 2080/K	BAVIMED
Magnetrührer	Typ RH	Janke & Kunkel GmbH
Mikroskope:		
ZEISS Primo Star Durchlichtmikroskop		Carl Zeiss Microimaging GmbH
Konfokalmikroskop	Eclipse Ti-A1	Nikon Corporation
Keyence	BZ-X800	Keyence Corporation
Keyence	BZ-9000	Keyence Corporation
Mikrotom	SM2000R	Leica
Mikrowelle	MW7820	Severin Microwave & Grill
Pipetboy	P6080	Propette
Schüttler	KL-2	Edmund Bühler
Tischzentrifuge	Typ 1-14	Sigma Laborzentrifugen
Trockenschrank (für OTs)		Memmert
Vortex	Type FVL-2400N	Biosan
Wasserbad	1052	GFL

Tabelle 7: Verwendete Software und deren Hersteller

Software	Hersteller
Keyence BZ II Analyzer	Keyence Corporation
Keyence BZ II Viewer	Keyence Corporation
NIS Elements Imaging Software	Nikon Corporation
Fiji based on ImageJ2	Open Source
Origin Pro, Version 2021	OriginLab Corporation
Microsoft Word for Mac	Microsoft
Microsoft Excel for Mac	Microsoft
Microsoft PowerPoint for Mac	Microsoft
Inkscape	The Inkscape Project

3 Ergebnisse

3.1 Evaluierung der optimalen Demaskierungen und Verdünnungen der Primärantikörper

Um die Antigenexpression auf dem gesamten Organschnitt beurteilen zu können, ist ein gleichmäßiges Färbemuster über die komplette Fläche des Organs notwendig.

Zunächst wurden verschiedene Antikörper gegen Blutgefäßantigene getestet, um geeignete Marker zu identifizieren, die ein homogenes Färbemuster auf den Organen zeigen. Hierzu wurden zunächst Antikörper gegen CD31, CD34, VE-Cadherin, VEGF-A und VEGFR-2 auf Herz, Niere, Leber und Gehirn getestet.

Dabei ergab sich anfangs das Problem einer unbefriedigenden und inkonstanten Anfärbung der Antigene, insbesondere von CD31, auf der Schnittfläche von Herz und Nieren bei Verwendung eines Citratpuffers (pH=6,0) zur thermischen Demaskierung. Nachdem sich dieses Problem auch in der Immunfluoreszenzfärbung nicht zur Zufriedenheit lösen ließ (und somit nicht durch Probleme im Rahmen der DAB-Entwicklung bedingt zu sein schien), wurde versucht, durch Abänderung des Färbeprotokolls eine Verbesserung des Ergebnisses zu erzielen. In Analogie zur Arbeit von Wang et al., wurden immunhistochemische Färbungen unter Nutzung unterschiedlicher Demaskierungspuffer durchgeführt. Die Autoren konnten zeigen, dass bei bestimmten Antigenen (u.a. CD31) eine Demaskierung im alkalischen Milieu der etablierten sauren Demaskierung mittels Citratpuffer im Hinblick auf die Färbeintensität überlegen ist [93]. Auch in weiteren anderen Arbeiten wurde der entscheidende Einfluss des bei der Demaskierung verwendeten pH-Wertes in Abhängigkeit vom jeweiligen Antigen beschrieben [88, 94]. Deswegen wurden neben dem „konventionellen“ leicht sauren Citratpuffer zur Testung der thermischen Demaskierung zwei weitere in der Arbeit von Wang et al. untersuchte Puffer im basischen Milieu verwendet, nämlich 0,01M Tris/EDTA-Puffer (pH=9) und 0,5M Tris-Puffer (pH=10).

Die Ergebnisse von Wang et al. konnten für CD31 sowohl auf Tumorgewebe, wie auch auf Herz- und Nierengewebe bestätigt werden, wobei hierfür noch der AB-Komplex Verwendung fand. Beim verwendeten Antikörper zeigt sich durchweg bei Demaskierung unter Nutzung des alkalischen 0,5M Tris-Puffers ein besseres Färbeergebnis (Abbildung 8).

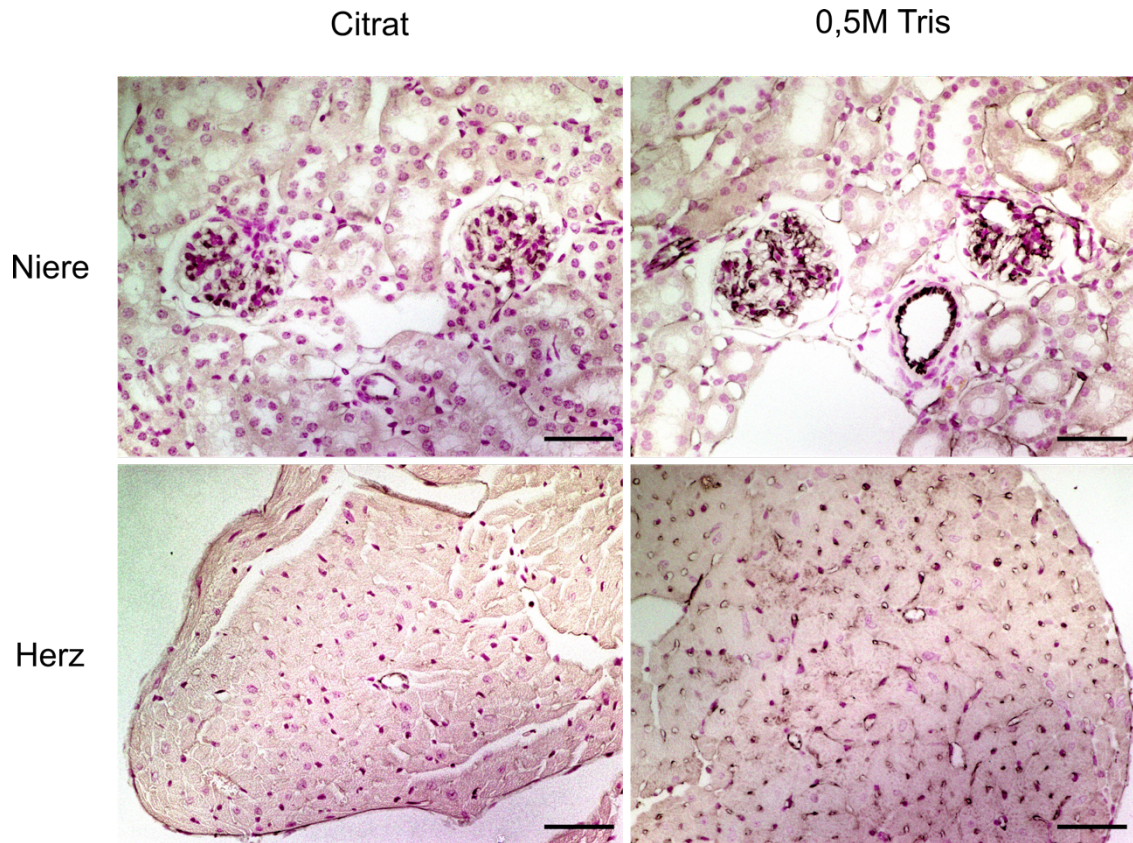


Abbildung 8: Vergleich des IHC-Färbeergebnisses gegen CD31 bei unterschiedlicher Demaskierung.

Links nach Demaskierung mit Citratpuffer (pH=6) bzw. rechts mit 0,5M Tris-Puffer (pH=10) auf Gewebe der Nierenrinde und des Herzmuskels. Bei Nutzung des 0,5M Tris-Puffers zur Demaskierung lässt sich ein deutlich stärkeres Färbeergebnis insbesondere im kapillären Stromgebiet erzielen. Verdünnung des Primäantikörpers 1:50, Skala=50 μ m.

Am Gehirn und auf Lebergewebe ließ sich das Färbeergebnis von CD31 durch Nutzung unterschiedlicher Demaskierungspuffer nicht optimieren, weswegen sich die künftigen Untersuchungen auf Herz-, Nieren- und Tumorgewebe beschränkten.

Im Falle der Leber beschrieben bereits andere Vorarbeiten, dass die hepatischen Sinusendothelzellen von Nagetieren oft eine geringe bis fehlende CD31-Expression aufweisen, bzw. lediglich Blutgefäße der portalen Trias und Zentralvenen CD31 exprimieren [95, 96].

Außerdem zeigten sich die in zahlreichen Arbeiten als panendotheliale Gefäßmarker etablierten Glykoproteine CD31, CD34 (als Marker für hämatopoetische Vorläuferzellen) und CD105 im Vergleich zu weiteren getesteten Markern (VE-Cadherin, VEGFR-2) im Hinblick auf das Färbeergebnis als überlegen, weshalb diese fortan zur Färbung und Identifizierung von Blutgefäßen verwendet wurden [55, 67, 97].

Im Falle von CD34 hat sich auf den drei untersuchten Organen dahingegen die Demaskierung im leicht sauren Milieu mit Citratpuffer (pH=6,0) als überlegen

herausgestellt, hier war auf allen drei untersuchten Organen das beste Ergebnis zu erzielen (Abbildung 9).

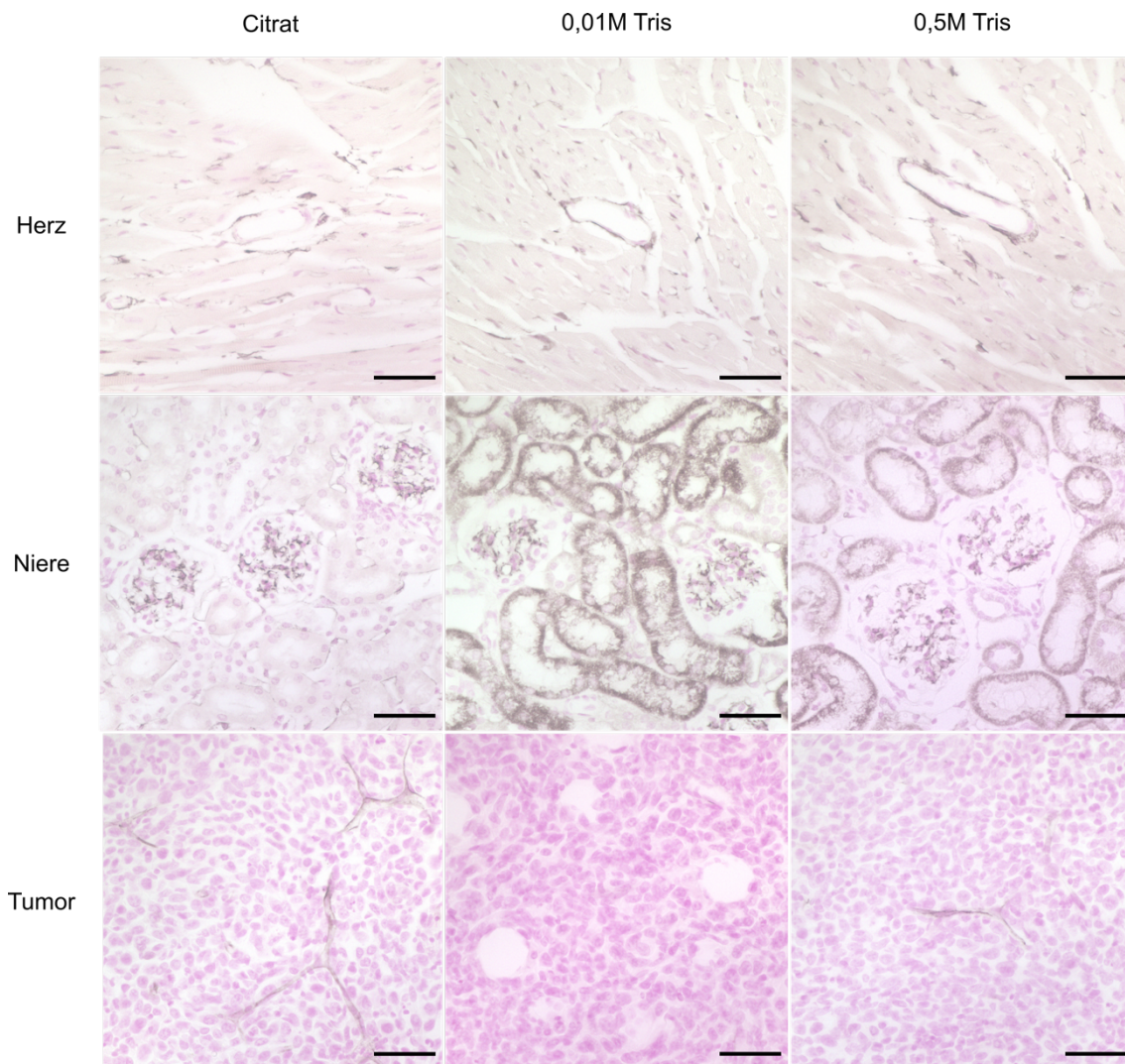


Abbildung 9: Übersicht über Demaskierungen für CD34.

Auf Schnitten des Herzens funktioniert die IHC-Färbung in dieser Verdünnung (1:50) sowohl im sauren wie auch im alkalischen Milieu zufriedenstellend. An der Niere im Alkalischen ausgeprägte unspezifische DAB-Randreaktion. Am Tumor wird bei Verwendung des Citratpuffers der beste Kontrast erzielt. Verdünnung von CD34 auf Herz- und Nierenschnitten 1:50, auf Tumorschnitten 1:200, Skala 50µm.

Interessanterweise ließ sich der Antikörper auf Nieren- und Tumorschnitten problemlos bis zu einer Verdünnung von 1:200 verdünnen, wohingegen das Signal auf Herzschnitten bei dieser Verdünnung schon zu schwach war.

Im Verlauf der Färbungen wurde die Testreihe um den Marker CD105 ergänzt. Dieser wurde bereits in der Vergangenheit als Marker zur Detektion von Angiogenese innerhalb von Tumoren genutzt [96]. Die Testfärbungen gegen CD105 haben gezeigt, dass eine zu geringe Verdünnung (gleichbedeutend mit einer zu hohen Konzentration) des Primärantikörpers im Rahmen der DAB-Entwicklung zu einer unverhältnismäßigen

Verstärkung der Hintergrundreaktion führt, was eine Auswertung der entsprechenden Proben erschwert oder gar unmöglich macht. Hier zeigte die Färbung mit einer Verdünnung des von 1:50 eine sehr starke Hintergrundreaktion (Abbildung 10, Tabelle 8). Optimale Ergebnisse erzielte der Endoglin-Antikörper bei einer 10-fach höheren Verdünnung von 1:500.

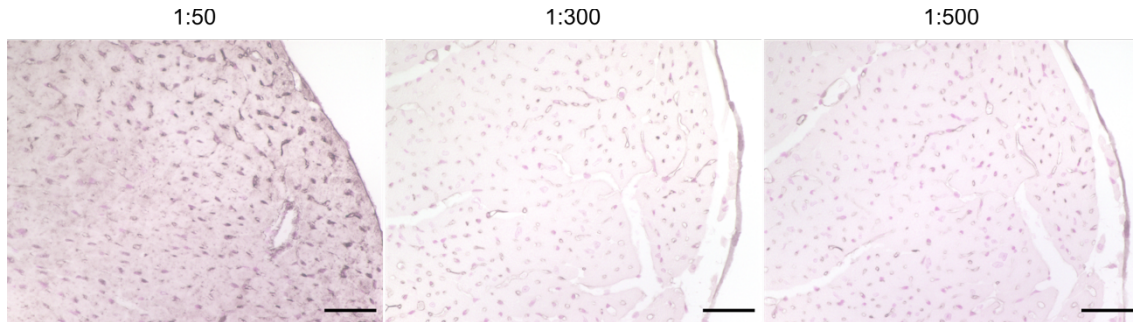


Abbildung 10: IHC-Färbungen gegen CD105 auf Herzschnitten in unterschiedlichen Verdünnungsstufen.

Während die Hintergrundreaktion bei einer Verdünnung von 1:50 noch sehr stark ist, bleibt sie bei höheren Primärantikörperverdünnungen von 1:300-1:500 aus. Skala=50µm

Zudem kann durch eine höhere Verdünnung Primärantikörper eingespart und somit ein kosteneffizienteres Arbeiten ermöglicht werden. Erstaunlicherweise und im Gegensatz zu den beiden anderen untersuchten Antigenen unterscheidet sich im Falle von CD105 der optimale pH-Bereich für die Demaskierung von Organ zu Organ. Bei Herz- und Nierenschnitten war das Signal bei Demaskierung im stark alkalischen Milieu des 0,5M Tris-Puffers (pH=10) am stärksten. Im Tumor dagegen war bei Nutzung des stark alkalischen Puffers zwar auch ein positives Signal erkennbar, jedoch mit einer stärkeren Hintergrundfärbung und somit einer Kontrastverschlechterung (immer jeweils bei einer Primärantikörperverdünnung von 1:500 und Nutzung des Polymerantikörpers als Sekundär-Antikörper) (Abbildung 11).

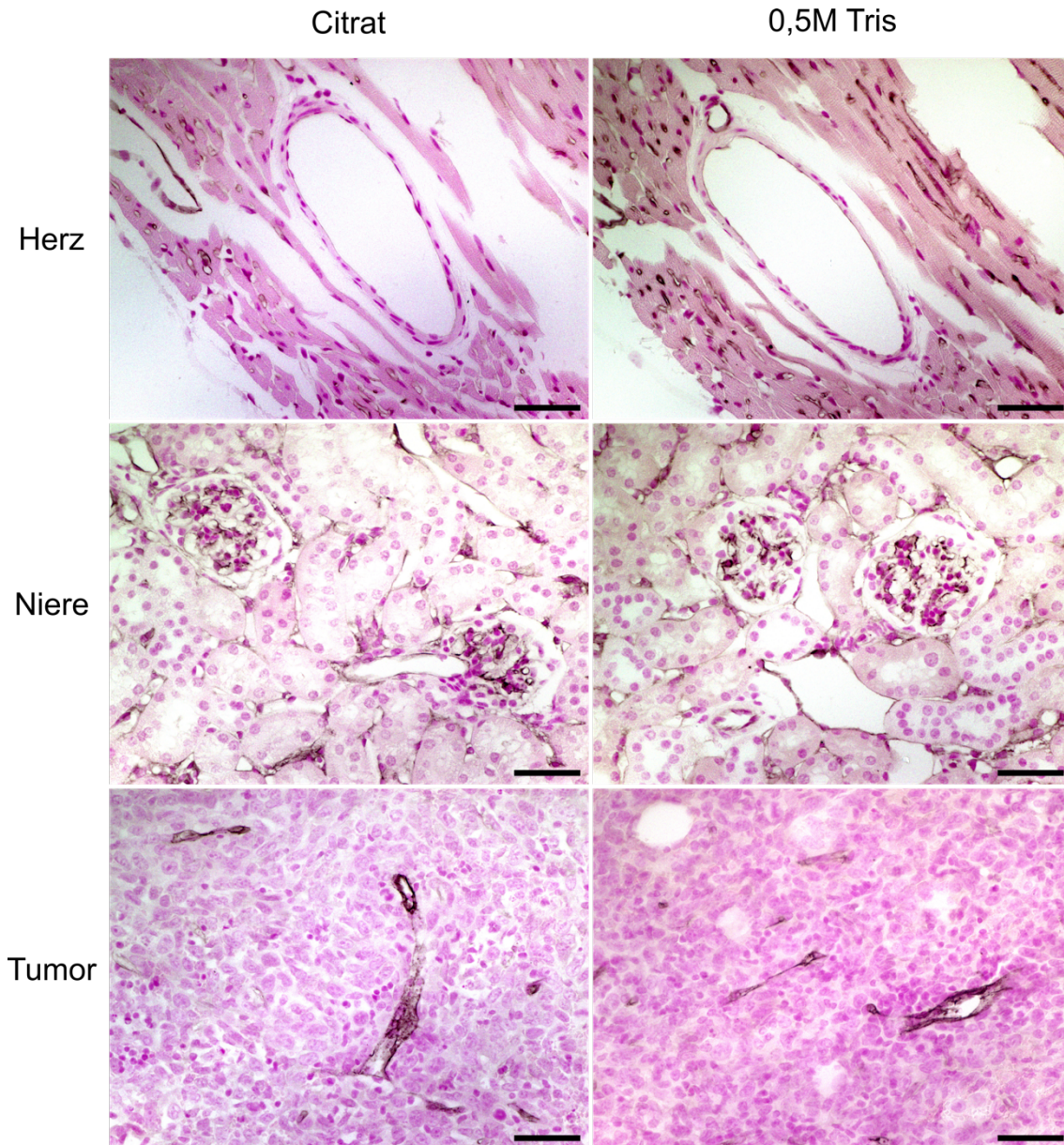


Abbildung 11: Vergleich des IHC-Färbeergebnisses gegen CD105 bei unterschiedlichen Demaskierungen.

Nach Demaskierung mit saurem Citrat- bzw. alkalischem 0,5M Tris-Puffer auf Herz-, Nieren- und Tumorschnitten. Am Herz zeigt sich in der Kapillardarstellung die deutliche Überlegenheit der alkalischen gegenüber der sauren Demaskierung. Verdünnung des Primärantikörpers 1:500, Skala=50µm.

Der Einfluss der Nutzung unterschiedlicher Demaskierungspuffer ließ sich auch in der Immunfluoreszenzfärbung nachweisen. Für TRPC6 zeigte sich auf allen drei untersuchten Geweben ein deutlich stärkeres Signal bei Demaskierung im basischen Milieu. Da das Fluoreszenz-Signal bei Nutzung des stark alkalischen 0,5M Tris-Puffers recht deutlich überstrahlte, wurde für die folgenden Färbungen zur Demaskierung 0,01M Tris/EDTA-Puffer verwendet.

3 Ergebnisse

In der folgenden Tabelle wurden die Organe mit den jeweiligen Demaskierungspuffern gegen die gefärbten Antigene mit den Verdünnungsstufen der Primärantikörper aufgetragen. Die Qualität des Signals wurde semiquantitativ in vier Abstufungsgraden visuell beurteilt und tabellarisch eingetragen.

Tabelle 8: Tabellarische Aufstellung der optimalen Demaskierung.

In Abhängigkeit von Organ, gewünschtem Antigen, verwendetem Puffer zur Demaskierung und Verdünnung des Primärantikörpers. Legende zur Beschreibung des Färbeergebnisses: ++ (ausgezeichnet), + (gut), o (neutral, nicht optimal), - (schlecht bzw. nicht funktioniert). AB=AB-Komplex, P=Polymerantikörper, IF=Immunfluoreszenzfärbung. Fett hervorgehoben ist jeweils die beste Kombination von Puffer und Verdünnung für jedes Organ bzw. entsprechenden Primärantikörper.

Organ	Demaskierungs- puffer	CD31	CD34			CD105				TRPC6
			1:50 (AB)	1:50 (AB)	1:100 (P)	1:200 (P)	1:50 (P)	1:100 (P)	1:300 (P)	
Herz	Citratpuffer (pH 6)	-	+	+	-	-	o	o/+	o	o
	0,01M Tris (pH 9)	++	+	o/-	-	o	+		+/o	++
	0,5M Tris (pH 10)	+	o			o		+	++	+
Niere	Citratpuffer (pH 6)	-	+	++	++	o	o	o	+	o
	0,01M Tris (pH 9)	+	-			-				++
	0,5M Tris (pH 10)	++	-			o		+	++	+
Tumor	Citratpuffer (pH 6)	-	++	++	++	+	o/+		++	o
	0,01M Tris (pH 9)	+		o/-	-	-	-		+	+
	0,5M Tris (pH 10)	++		o	-	-	-/o		o	o

3.2 Untersuchung der TRPC6-Expression in peripheren Organen in Abhängigkeit vom Progress der Tumorerkrankung

Da in Vorarbeiten nachgewiesen wurde, dass Paclitaxel über TRPC6 zu einem Calciumionen-Einstrom in Endothelzellen des Tumors führt, infolgedessen die endotheliale Barriere undicht wird, interessierte uns nun die TRPC6-Expression im Gefäßsystem der peripheren Organe [80].

3.2.1 Herz

Hierzu wurden am Herz Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen gegen CD34 und TRPC6 durchgeführt. Sowohl in den Blutgefäßen der Herzen der Kontrollgruppe wie auch der Behandlungsgruppe konnte mit zunehmender TumorgroÙe eine Zunahme der Manders-Koeffizienten von CD34 und TRPC6 beobachtet werden (Abbildung 13, Abbildung 14). Dies ist auch visuell deutlich in den endothelialen Bereichen der Koronararterien erkennbar, sofern man Aufnahmen entsprechender Bereiche der Herzen des Kontrolltieres mit Aufnahmen des 26-Tage-tumortragenden Tieres vergleicht (Abbildung 12).

Zudem scheint die TRPC6-Expression mit Fortschreiten der Tumorerkrankung auch auf den Myozyten der Media zuzunehmen.

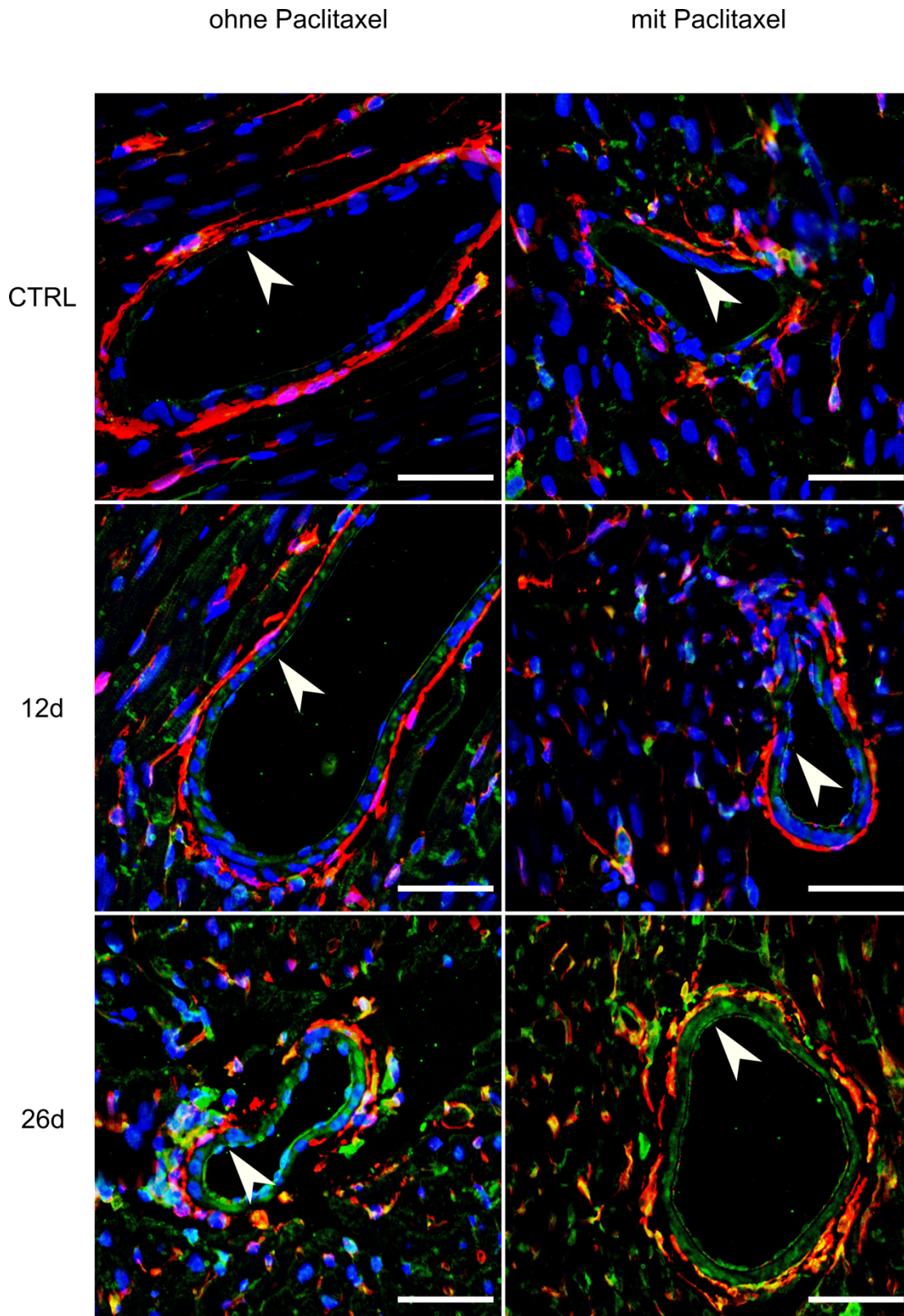


Abbildung 12: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen CD34 und TRPC6.

CD34-cy3 (rot), TRPC6-cy5 (grün), DAPI-Kernfärbung (blau). In den Abbildungen sind jeweils beispielhafte Querschnitte der Koronararterien dargestellt. Sowohl bei den unbehandelten Tieren wie auch bei den behandelten Tieren ist mit Progress der Tumorerkrankung ein Anstieg der endothelialen TRPC6-Expression erkennbar (Pfeilspitzen zeigen eine Zunahme des Signals im cy5-Kanal). Auch die TRPC6-Expression auf Myozyten der Media scheint anzusteigen. Skala=50µm.

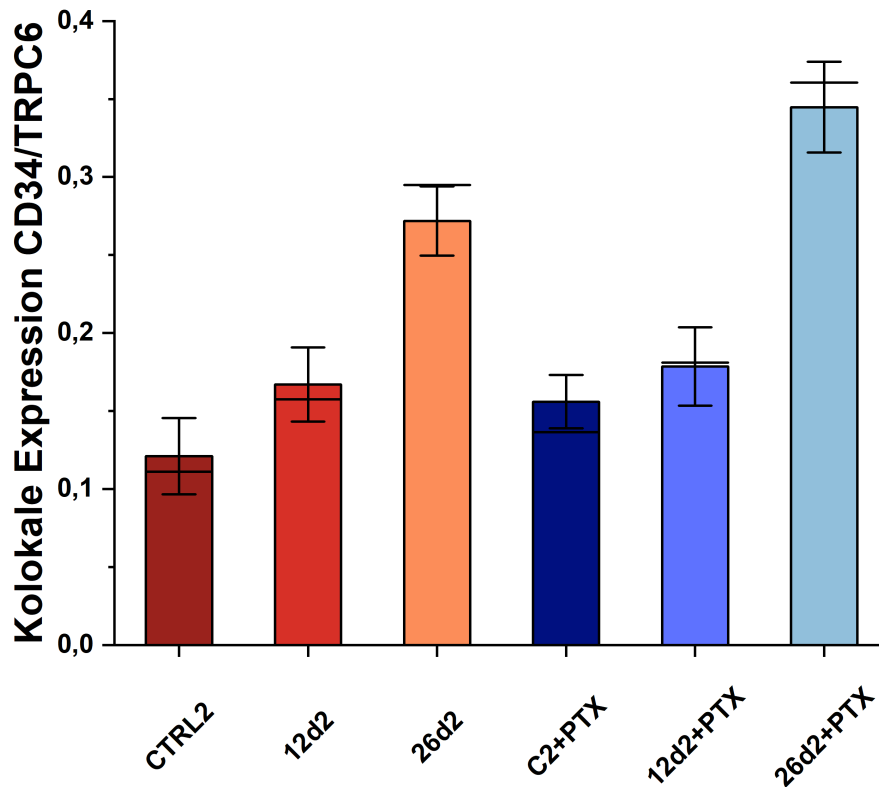


Abbildung 13: Vergleich der Mittelwerte der Manders-Koeffizienten von CD34 und TRPC6 auf Herzgewebe.

Untersucht und dargestellt wurde der prozentuale Anteil der CD34-positiven Pixel, die sich auch TRPC6-positiv darstellten. Sowohl in der unbehandelten wie in der PTX-behandelten Gruppe ist bei größeren Tumoren der Manders-Koeffizient von CD34 und TRCP6 erhöht. Die Höhe der Balken entspricht jeweils den Mittelwerten. Zusätzlich dargestellt sind Medianlinie und Fehlerbalken \pm SEM.

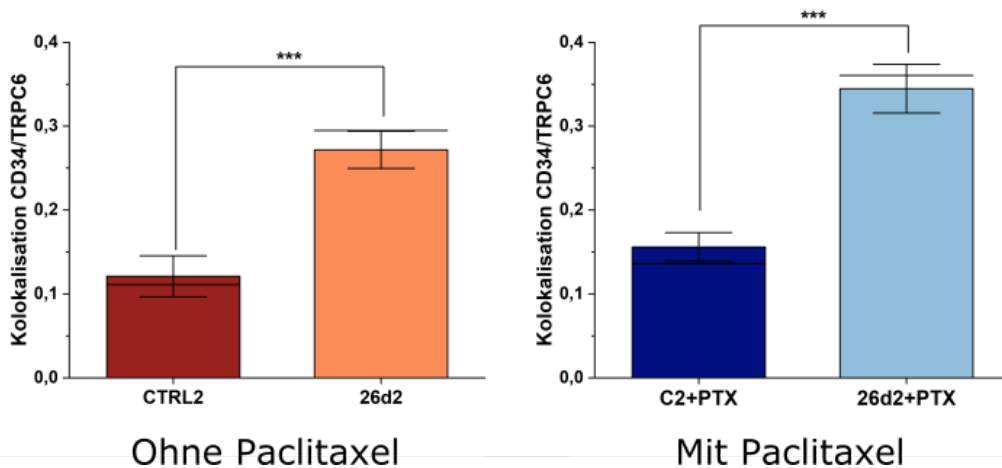


Abbildung 14: Vergleich der Mittelwerte der Manders-Koeffizienten von CD34 und TRPC6 innerhalb der Behandlungsgruppen.

Im direkten Vergleich der Kontrolltiere mit den 26 Tage tumortragenden Tieren lässt sich sowohl in der unbehandelten wie in der PTX-behandelten Gruppe ein höchstsignifikanter Anstieg der Manders-Koeffizienten von CD34 und TRPC6 beobachten. Die Höhe der Balken entspricht jeweils den Mittelwerten. Zusätzlich dargestellt sind Medianlinie und Fehlerbalken \pm SEM.

3.2.2 Niere

Analog wurden auf den Nierenschnitten Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen zur Untersuchung der kolokalen Expression von CD31 und TRPC6 mit entsprechenden Antikörpern durchgeführt. Auffallend war hierbei ein positives Signal im TRPC6-Kanal im Bereich der Nierentubuli. Möglicherweise wurde dies durch eine unspezifische Reaktion des TRPC6-Antikörpers mit Ionenkanälen des renalen Tubulusepithels verursacht (Abbildung 15). Visuell zeigten sich die Kapillarschlingen der Glomeruli überwiegend negativ für TRPC6, wohingegen Anteile der Bowman'schen Kapsel TRPC6-positiv erschienen.

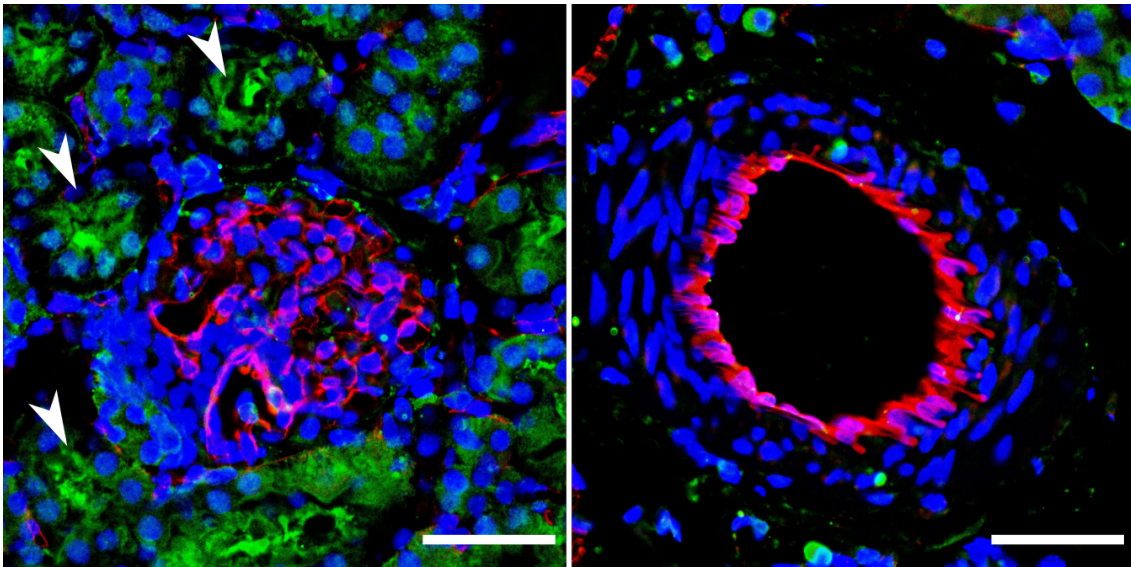


Abbildung 15: Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gegen CD31 und TRPC6 auf Nierengewebe. CD31-cy3 (rot), TRPC6-cy5 (grün), DAPI-Kernfärbung (blau). Links: Aufnahme eines Nierenglomerulums mit angrenzenden Tubuli, rechts: eine Nierenarterie im Querschnitt. Deutlich erkennbar ist die unspezifische Bindung von TRPC6 an Zellen der Nierentubuli (Pfeilspitzen). Skala=50 μ m.

Um trotzdem eine Auswertung der Proben durchführen zu können, richtete sich das Augenmerk auf die größeren Gefäße mit im DAPI-Kanal erkennbar angefärbter Media. Die so identifizierten Gefäße wurden in der Bildbearbeitung virtuell isoliert und auf kolokale Expression von CD31 und TRPC6 untersucht.

An den so isolierten renalen Arterien nehmen die Mittelwerte der Manders-Koeffizienten von CD31 und TRPC6 ebenfalls mit steigender TumorgroÙe zu (Abbildung 16). Im direkten Vergleich innerhalb der Behandlungsgruppen unterschieden sich die Ergebnisse zwischen Kontrolltieren und 26-Tage-tumortragenden Tieren jedoch nicht signifikant (vgl. Abbildung 17). Ebenso sticht der Anstieg der endothelialen TRPC6-Expression im visuellen Vergleich nicht so deutlich hervor wie im Fall der Herzen (Abbildung 18, vgl. Abbildung 12).

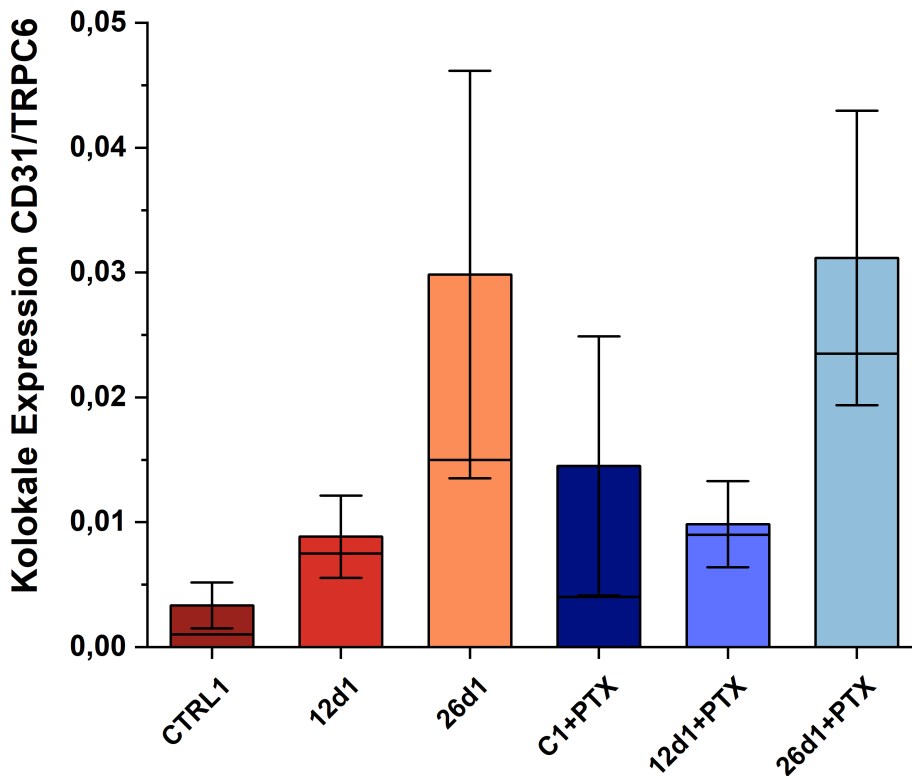


Abbildung 16: Vergleich der Mittelwerte der Manders-Koeffizienten von CD31 und TRPC6 im Bereich der renalen Arterien.

Untersucht und dargestellt wurde der prozentuale Anteil der CD34-positiven Pixel, die sich auch TRPC6-positiv darstellten. Zwar zeigt sich insgesamt betrachtet ebenfalls ein Anstieg der Manders-Koeffizienten zwischen Kontrollen und 26-Tage-tumortragenden Tieren, jedoch ist der Prozentanteil deutlich geringer und im Vergleich nicht signifikant (vgl. Abbildung 17). Die Höhe der Balken entspricht jeweils dem Mittelwert. Zusätzlich dargestellt sind Medianlinie und Fehlerbalken \pm SEM.

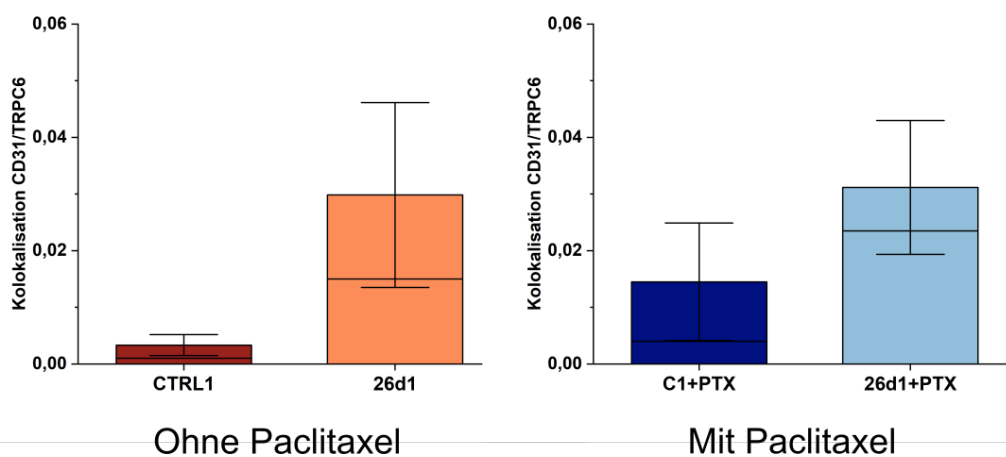


Abbildung 17: Vergleich der Mittelwerte der Manders-Koeffizienten von CD31 und TRPC6 auf renalen Arterien innerhalb der Behandlungsgruppen.

Vergleicht man die Mittelwerte der Manders-Koeffizienten von CD31 und TRPC6 auf renalen Arterien von Kontrolltieren und 26d-Tieren jeweils innerhalb der Behandlungsgruppen, so sind die Mittelwerte bei größeren Tumoren ebenfalls größer. Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. Die Höhe der Balken entspricht dem Mittelwert. Zusätzlich dargestellt sind Medianlinie und Fehlerbalken \pm SEM.

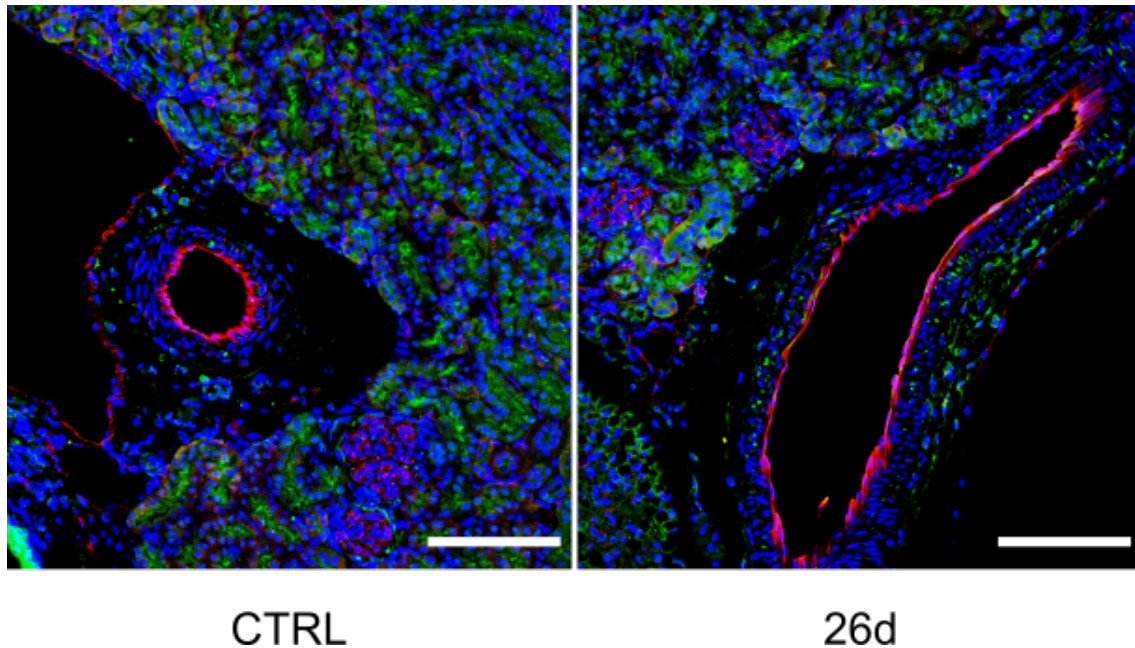


Abbildung 18: Gegenüberstellung renaler Arterien des Kontrolltieres und des 26 Tage tumortragenden-Tieres der unbehandelten Experimentalgruppe.

Auf der Abbildung gegenübergestellt sind Ausschnittsvergrößerungen zweier renaler Arterien (CD31-cy3 [rot], TRPC6-cy5 [grün] und DAPI [blau]). Im direkten Vergleich innerhalb der unbehandelten Gruppe zwischen Kontrolltiere und 26-Tage-tumortragendem Tier tritt der Anstieg der endothelialen TRPC6-Expression nicht so deutlich hervor wie auf den Herzen. Skala=150 μ m.

3.3 Untersuchungen des Gefäßsystems peripherer Organe in Abhängigkeit vom Progress der Tumorerkrankung

Um Aussagen über das Gefäßsystem der murinen peripheren Organe treffen zu können, wurden zunächst immunhistochemische Färbungen gegen die endothelialen Antigene CD31, CD34 und CD105 auf den Herzen und Nieren der Versuchstiere (der 14 Labormäuse, vgl. 2.1) durchgeführt und anschließend lichtmikroskopisch auf Veränderungen/Auffälligkeiten untersucht.

3.3.1 Herz

Insbesondere auf den gegen CD31 und CD105 gefärbten Herzschnitten der behandelten Tiere mit fortgeschrittener Tumorerkrankung waren im Kapillarstromgebiet im Vergleich zu den Kontrolltieren Kaliberschwankungen der Kapillaren auffällig. Besonders deutlich wird dies in den subepikardialen Randbereichen und im Verlaufsbereich der Koronargefäße erkennbar (Abbildung 19, Abbildung 20).

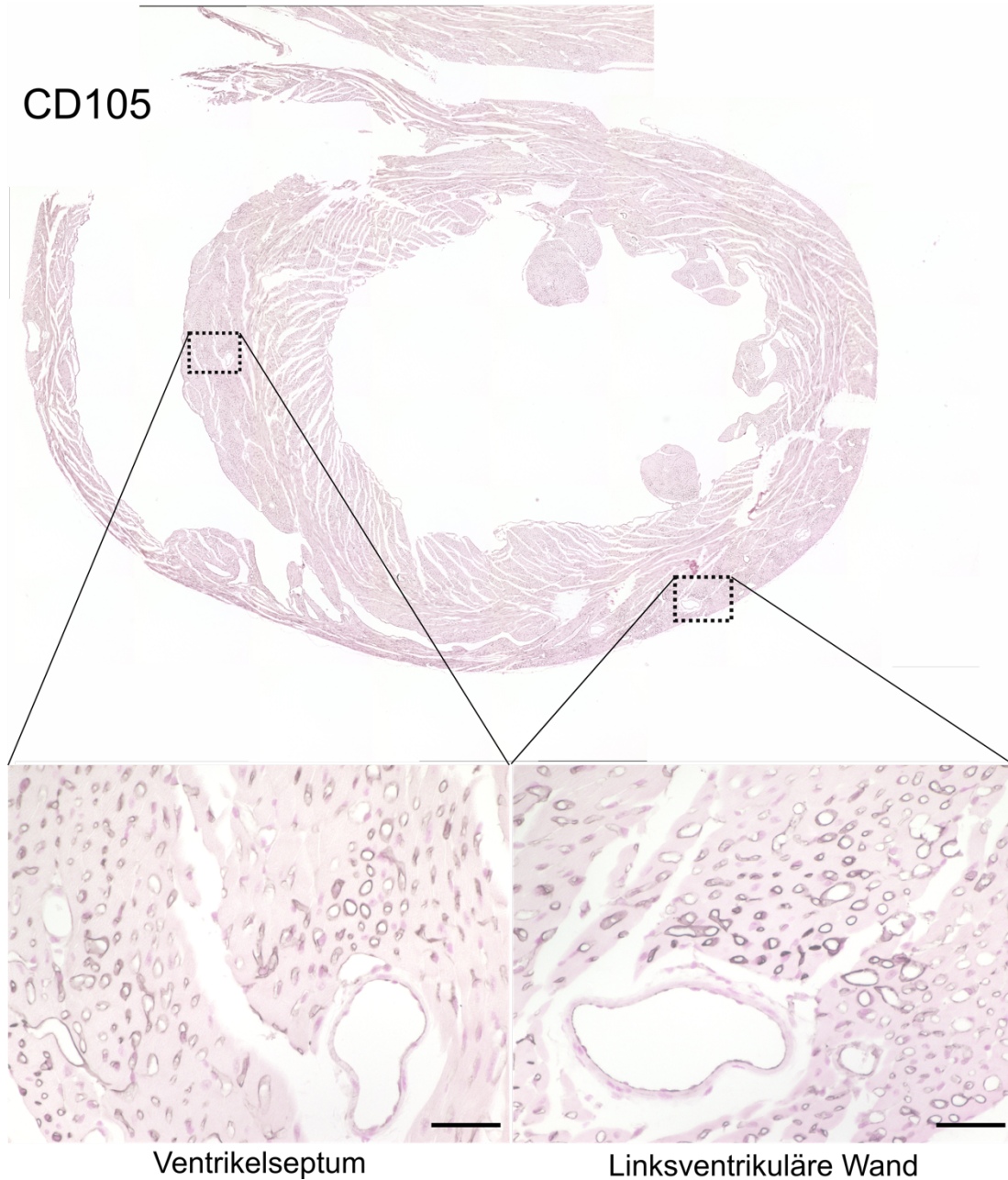


Abbildung 19: IHC-Färbung gegen CD105 am Herz eines 26d+PTX-Tieres.

Sowohl im Bereich der linksventrikulären Wand wie auch des Ventrikelseptums zeigen sich die im Bereich der Koronararterien liegenden Kapillaren teils erweitert und dysmorph verformt. Skala=50µm.

Die betreffenden Kapillaren zeigten sich gegenüber denen der Kontrolltiere deutlich erweitert und verplumpt sowie teilweise dysmorph verformt.

Erstaunlicherweise ließ sich diese Tendenz bei Betrachtung der restlichen Proben ebenfalls in der unbehandelten Gruppe feststellen. Auch hier waren Veränderungen der kardialen Kapillararchitektur bei fortgeschrittenerem Tumorstadium offensichtlich (Abbildung 20).

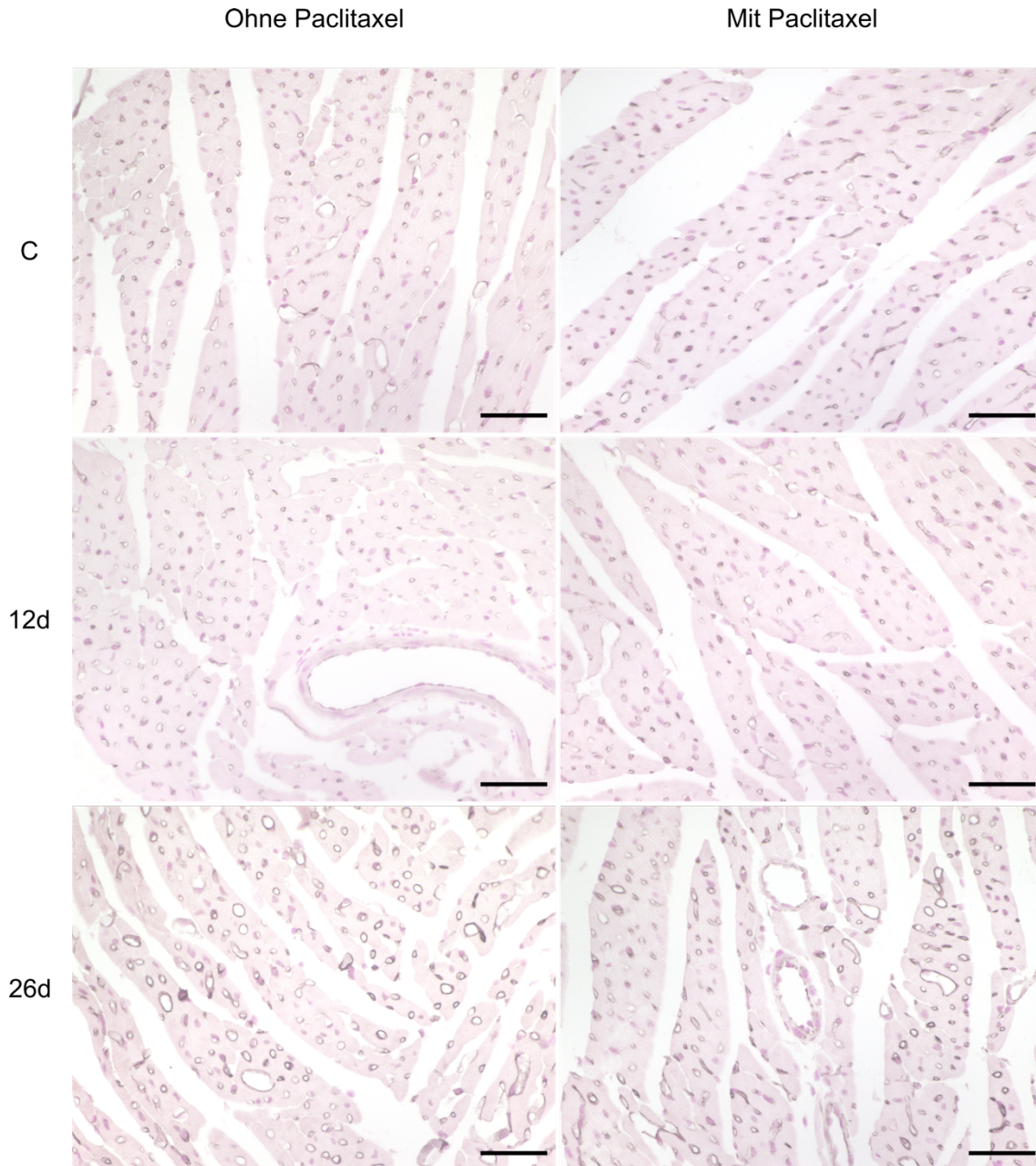


Abbildung 20: Gegenüberstellung von Aufnahmen gegen CD105 gefärbter kardialer Kapillaren. Sowohl in der Kontrollgruppe wie auch in der Behandlungsgruppe wird ein Kalibersprung der kardialen Kapillaren bei Tieren der 26d-Gruppe im Vergleich zu den nicht-tumortragenden Kontrolltieren (C) deutlich. In der 12d-Gruppe sind diese Veränderungen lediglich in Anfangsstadien erkennbar. Skala=50µm.

Quantitativ ausgewertet bestätigt sich tatsächlich dieser Trend. Mit Fortschreiten der Tumorerkrankung kommt es zu einer deutlichen und gegenüber den Kontrolltieren hochsignifikanten Zunahme in den Mittelwerten der kardialen Kapillarfläche (Abbildung 21, Abbildung 22).

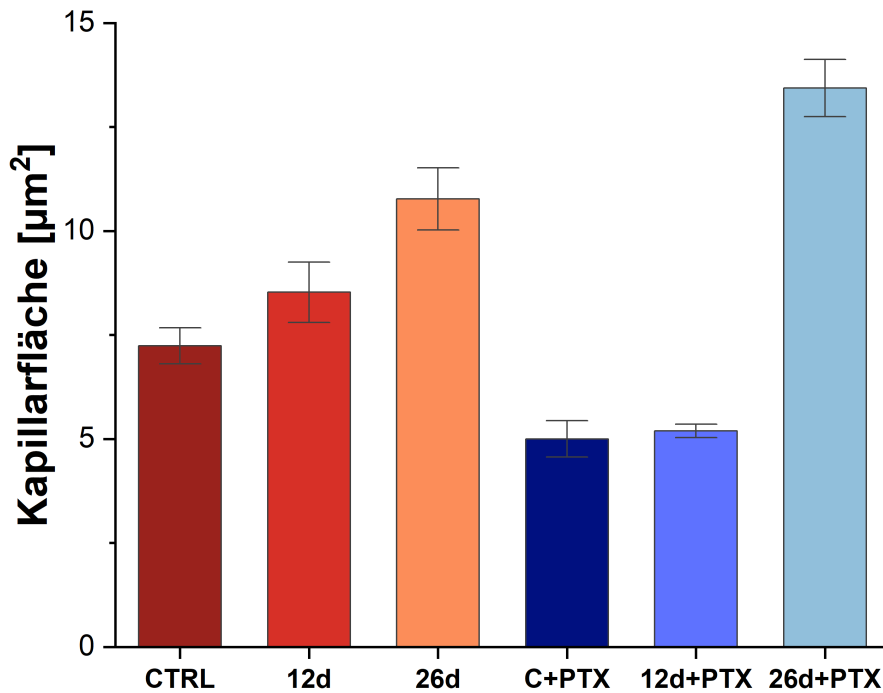


Abbildung 21: Vergleich der Mittelwerte der kardialen Kapillarfläche zwischen den einzelnen Experimentalgruppen.

Sowohl in der unbehandelten Gruppe (rote Farbtöne) wie auch in der Paclitaxel-behandelten Gruppe (blaue Farbtöne) ist eine deutliche Tendenz zur Kaliberzunahme in kardialen Kapillaren mit Progress der Tumorerkrankung erkennbar. Kapillarausmessung nach IHC-Färbung gegen CD105. Zur Berechnung ausgemessene Felder $n=454-1337$, Fehlerbalken \pm SEM.

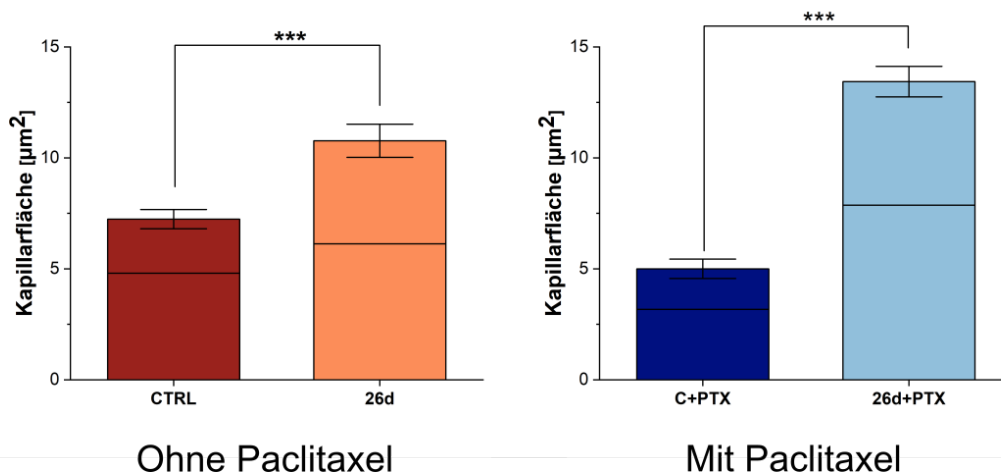


Abbildung 22: Vergleich der Mittelwerte der kardialen Kapillarflächen zwischen Kontrollgruppe und nach 26-tägigem Tumorwachstum jeweils ohne bzw. mit Paclitaxelbehandlung.

Die durchschnittliche Kapillarfläche der tumortragenden Tiere ist deutlich erhöht im Vergleich zu der der tumorfreien Tiere auf einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,01\%$. Die Balkenhöhe entspricht jeweils dem Mittelwert. Zusätzlich dargestellt sind Medianlinie und Fehlerbalken \pm SEM.

Vergleicht man die Kapillarflächen der unbehandelten Kontrolltiere (CTRL) mit der der korrespondierenden Paclitaxel-behandelten Kontrolltiere (C+PTX), erkennt man, dass es nach Paclitaxel-Gabe bei Tieren der C+PTX-Gruppe zu einer Verringerung der kardialen Kapillarfläche kommt, möglicherweise durch eine gewisse kapilläre Kontraktion. In der 12d-Gruppe (mittleres Diagramm in Abbildung 23) scheint Paclitaxel der in unbehandelten Tieren beobachteten Dilatation entgegenzuwirken. Lediglich im Falle der größeren über 26 Tage gewachsenen Tumoren ist dieser Effekt nicht erkennbar (rechtes Diagramm in Abbildung 23).

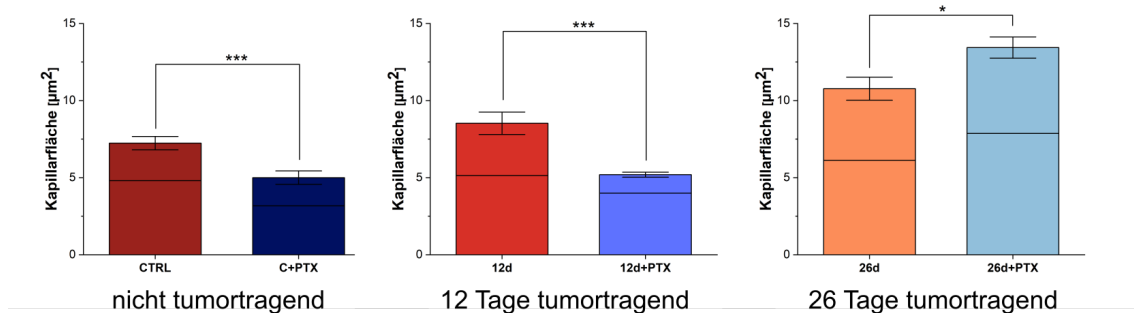


Abbildung 23: Betrachtung des Einflusses der Paclitaxel-Therapie auf die Mittelwerte der kardialen Kapillarflächen in unterschiedlichen Tumorstadien.

Unter Paclitaxel-Therapie zeigen sich die durchschnittlichen Kapillarflächen der PTX-behandelten Kontroll- und 12d-Tiere höchstsignifikant kleiner im Vergleich zur korrespondierenden nicht-therapierten Vergleichsgruppe. Dieser Effekt ist bei Vergleich der 26d-Gruppen nicht erkennbar. Die Höhe der Balken entspricht jeweils dem Mittelwert. Zusätzlich dargestellt sind Medianlinie und Fehlerbalken \pm SEM.

Zudem konnten in gewissem Maße die Ergebnisse von Balza et al. bestätigt werden, wonach CD105 auch im normalen murinen Gewebe in den Kapillaren von Herz und Niere exprimiert wird [70]. Die großen Gefäße von Herz und Nieren zeigten sich, wie in der zitierten Arbeit auch, nur schwach positiv für CD105. Das Endokard, der endotheliale Überzug der Herzzinnenräume, zeigte sich deutlich positiv für CD105.

3.3.2 Niere

Auch die Nierenschnitte wurden auf die Antigene CD31, CD34 und CD105 gefärbt. Während CD34 insbesondere in den Kapillaren der Glomeruli und den im Bereich des Nierenmarks verlaufenden Vasa recta stark exprimiert wird, sind die peritubulären Kapillaren der Nierenrinde eher schwach bis mäßig stark positiv für CD34. Zudem finden sich zahlreiche CD34⁺ Zellen in der Adventitia größerer Arterien, wohingegen sich das Endothel der größeren Gefäße CD34-negativ zeigt. Hier ließen sich im visuellen Vergleich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen im Hinblick auf Gefäßmorphologie und Expression der einzelnen untersuchten Marker erkennen (vgl. Abbildung 24).

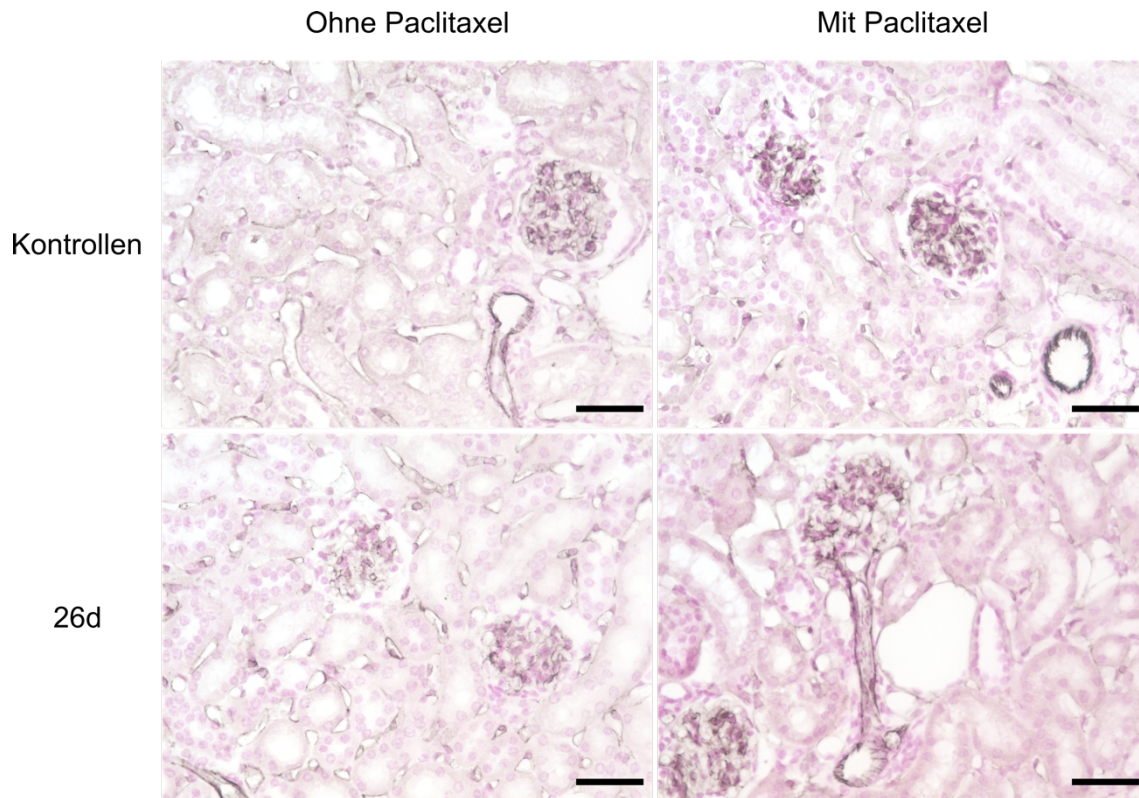


Abbildung 24: Vergleich des IHC-Färberegebnisses auf Schnitten der Nierenrinde gegen CD31. Auf den Schnitten lassen sich in Bezug auf die Glomeruli und Kapillaren der Nierenrinde keine signifikanten visuellen Unterschiede erkennen. Skala=50 μ m.

Auf den H&E-gefärbten Schnitten der Nieren ließen sich in der vergleichenden Betrachtung keine histopathologischen Auffälligkeiten feststellen.

3.3.3 Tumor

Das Gefäßsystem innerhalb des Tumors ist durch unreife und undichte Gefäße sowie ungeordnete Gefäßverläufe gekennzeichnet, welche aufgrund Tumorhypoxie-bedingter, VEGF-mediierter Angiogenese entstehen [98].

Dies wurde auch bei der Betrachtung der gegen CD31 bzw. CD105 gefärbten AT3-Tumorschnitte deutlich (Abbildung 25A). Die von Nandigama et al. gezeigten rudimentären Gefäßreste innerhalb der Tumornekrosezonen unter Paclitaxel-Therapie ließen sich nicht auf allen Tumoren bestätigen (ein Beispiel in Abbildung 25B) [79]. Dies mag allerdings auch der Tatsache geschuldet sein, dass die in dieser Arbeit untersuchten Tumore nur geringe nekrotische Flächen aufwiesen.

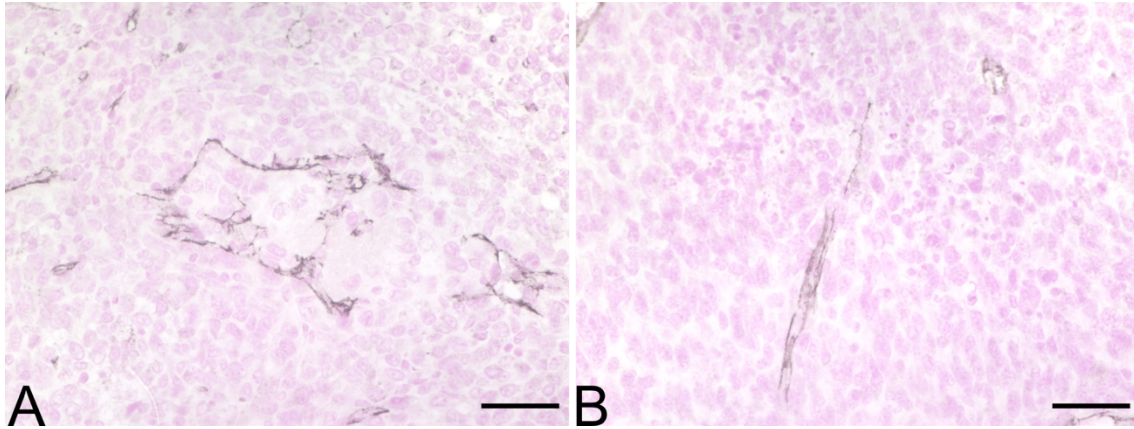


Abbildung 25: IHC-Färbung auf AT3-Tumoren gegen CD31.

Ungeordneter Verlauf der Tumorblutgefäße mit diskontinuierlicher CD31-Expression (A), Tumorblutgefäß im Grenzbereich der Nekrosezone, das bei Einziehen in nekrotische Bereiche abbricht (B). Skala=50 μ m.

4 Diskussion

4.1 Einfluss des Demaskierungspuffers auf das Färbeergebnis

Der verwendete Demaskierungspuffer – oder genauer gesagt dessen pH-Wert – hat einen elementaren Einfluss auf das Färbeergebnis. Dabei konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass sich nicht nur die einzelnen Antigene im Hinblick auf die optimalen pH-Bereiche zur Demaskierung deutlich unterscheiden, sondern auch, dass das Ergebnis der Demaskierung desselben Antigens in unterschiedlichen Geweben variieren kann.

Insbesondere für den etablierten Gefäßmarker CD31 konnte festgestellt werden, dass sich die Signalintensität bei Nutzung eines basischen Puffers zur Demaskierung – verglichen mit einer Demaskierung im sauren Milieu – deutlich verbessert. Dies hat verständlicherweise einen direkten Einfluss auf das Färbeergebnis. Vorarbeiten konnten diesen Vorteil bereits für Tumorgewebe nachweisen, während hier gezeigt werden konnte, dass auf Herz- und Nierengewebe ebenfalls die Demaskierung im alkalischen Milieu dem „konventionellen“ sauren Citratpuffer überlegen ist [93]. Ähnlich verhielt es sich mit dem in der Immunfluoreszenz-Färbung verwendeten TRPC6-Antikörper, bei dem eine Demaskierung mit Hilfe des alkalischen 0,01M Tris-Puffers die besten Ergebnisse erbrachte. Im Falle von CD34 blieb die Demaskierung im sauren Milieu im Hinblick auf die Färbeintensität der alkalischen Demaskierung überlegen, wohingegen sich bei CD105 sogar Unterschiede zwischen den untersuchten Geweben feststellen ließen (vgl. Tabelle 8).

Die Abhängigkeit des Färbeergebnisses vom pH-Wert der zur Demaskierung verwendeten Lösung konnte bereits in zahlreichen Arbeiten nachgewiesen werden [88, 94, 99]. Einen Erklärungsansatz bieten hier Emoto et al. über das schon in Abbildung 4 dargestellte unterschiedliche Rearrangement der Proteine nach dem Erhitzen. Die biochemischen Kräfte in diesem für die spätere Antikörperbindung entscheidenden Prozess werden durch den pH-Wert und die Zusammensetzung des verwendeten Puffers maßgeblich beeinflusst [88]. Dies gilt gleichermaßen für immunhistochemische wie auch für Immunfluoreszenzfärbungen.

Eine entscheidende Frage, der man sich weiterhin bei Betrachtung mittels immunhistochemischer Techniken gefärbter Schnitte bewusst sein sollte, ist die nach der Effizienz der Demaskierung. Das heißt: Welcher Anteil der tatsächlich im Gewebe vorliegenden Antigene bleibt aufgrund der während Fixierung und Aufbereitung

entstehenden Veränderungen der Proteinarchitektur trotz optimaler Demaskierung der Antikörperbindung unzugänglich? Hierüber lässt sich trotz der in vorliegender Arbeit verwendeten unterschiedlichen Puffer keine endgültige Aussage treffen. Eine Möglichkeit der Beantwortung dieser Frage wäre ein Vergleich der Signalintensität des untersuchten Antigens auf formalin-fixiertem paraffin-eingebettetem (FFPE)-Gewebe und frischem/nativem Gewebe [100]. Insbesondere für die Evaluation der Expressionslevel von Proliferationsmarkern wie Ki-67, deren Prozentsatz therapieentscheidend sein kann, könnte dies von Relevanz sein.

Heute ist die hitzeinduzierte Demaskierung eine universell verwendete Technik zur Demaskierung von FFPE-Schnitten sowohl in der histologischen Grundlagenforschung wie auch in der Histopathologie, die nicht nur für immunhistochemische und Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzt wird, sondern auch in durchflusszytometrischen Analysen Anwendung findet [100]. Gerade deshalb ist eine sorgfältige Versuchsplanung und Testung des Färbeverhaltens des gewünschten Antikörpers vor Verwendung im eigentlichen Experiment bzw. in der eigentlichen Untersuchung elementar wichtig, um über ein optimales Färbeergebnis valide Aussagen über die Antigenexpression im untersuchten Gewebe erzielen zu können.

4.2 Ursache der kapillären Veränderungen am Herzen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es im Mausmodell mit zunehmendem Progress der Tumorerkrankung zu klaren und deutlichen morphologischen Veränderungen der kardialen Kapillararchitektur kommt. Diese reichen von Kaliberschwankungen über eine augenscheinliche Erweiterung der Lumina kardialer Kapillaren, die insbesondere in die Koronararterien umgebenden Myokard festgestellt werden konnte. Die maximale Ausprägung konnte jeweils an den Herzen der 26-Tage-tumortragenden Tiere (somit mit den fortgeschritteneren Tumoren) beobachtet werden. Gleichzeitig konnte deutlich gemacht werden, dass eine Chemotherapie mit Paclitaxel offensichtlich einen Einfluss auf die Ausprägung dieser Veränderungen nimmt. Nicht erst seit der Entdeckung kardialer Nebenwirkungen von Chemotherapeutika wie Anthrazyklinen oder Trastuzumab ist die Kardioonkologie, die Betrachtung von Auswirkungen einer Tumorerkrankung auf das Herz, ein expandierendes Forschungsgebiet, welches zunehmend im Fokus wissenschaftlicher Betrachtungen steht. Ein beachtlicher Prozentsatz von etwa 40% der nicht-krebsbedingten Todesfälle bei Tumorpatienten ist auf Erkrankungen des Herzens zurückzuführen [101]. Unabhängig davon kann eine kardiovaskuläre Vorerkrankung parallel zur

Tumordiagnose schon bestehen, bzw. wird in ihrer Entstehung parallel zum Verlauf der Tumorerkrankung durch kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Adipositas, Diabetes, Nikotinkonsum und Hyperlipidämie begünstigt [102]. Auch für Taxan-basierte Chemotherapien bei Brustkrebs konnte ein risikosteigernder Effekt im Hinblick auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz beobachtet werden [103].

In der Vergangenheit wurde in zahlreichen Arbeiten die Assoziation zwischen Krebserkrankungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen diskutiert. So konnte nachgewiesen werden, dass Krebszellen selbst vasoaktive Botenstoffe wie Vasopressin sezernieren, welche das kardiovaskuläre System direkt beeinflussen (vgl. Abbildung 26) [104]. Andererseits produzieren z.B. Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms natriuretisches Peptid vom B-Typ (BNP), dessen Vorläufer nT-proBNP eine wesentliche Rolle als Biomarker in der Herzinsuffizienz-Diagnostik spielt [105, 106]. Im Blut von Tumorpatienten zirkulieren schon vor Einleitung einer zytostatischen (und evtl. kardiotoxischen) Tumortherapie kardiale Marker wie BNP, nT-proBNP und mid-regional pro-adrenomedullin (MR-proADM), deren Anstieg mit dem Progress der Tumorerkrankung und einer deutlich höheren Mortalität assoziiert ist [104]. Diese erhöhten Spiegel könnten auf einen subklinisch in Folge der Tumorerkrankung vorbestehenden Myokardschaden hinweisen [104].

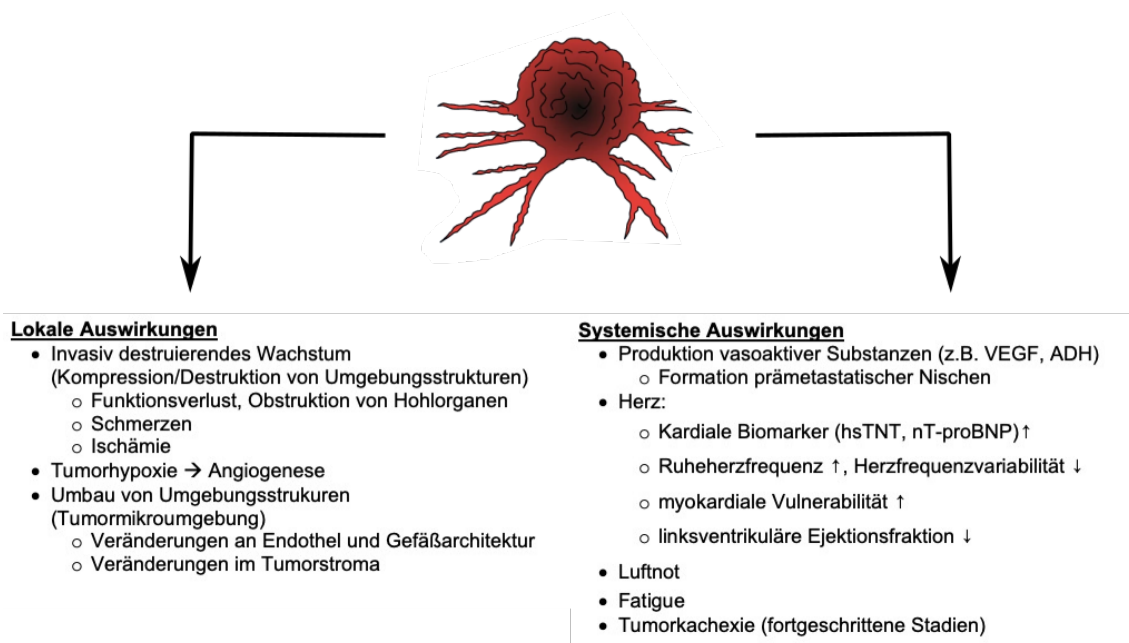


Abbildung 26: Übersicht beispielhafter lokaler und systemischer Auswirkungen einer Tumorerkrankung.

Der Primärtumor (im oberen Teil der Abbildung schematisch dargestellt) beeinflusst nicht nur seine lokale Tumormikroumgebung durch parakrine sezernierte Botenstoffe, sondern verursacht durch Freisetzung systemischer Mediatoren Effekte in weit entfernten Endorganen. hsTNT=hochsensitives Troponin T. Modifiziert nach Anker et al., Cedervall et al. [102, 107].

Überraschenderweise konnten auch bei kardiovaskulär asymptomatischen Tumorpatienten über 100-fach über dem oberen Referenzwert erhöhte Spiegel an hochsensitivem Troponin T (hsTNT) nachgewiesen werden, die ebenfalls mit einer Mortalitätszunahme assoziiert waren [104]. Troponin T, ein Protein, welches im kontraktilen Apparat der Kardiomyozyten an Tropomyosin gebunden ist und bei Schädigung der Herzmuskelzellen mit einem Peak 12h nach dem schädigenden Ereignis ins Plasma freigesetzt wird, ist in der klinischen Diagnostik als wichtiger Marker myokardialer Zellschädigung etabliert [108]. Deshalb diskutieren auch die Autoren der hier zitierten Arbeit eine im Rahmen der Krebserkrankung einsetzende myokardiale Schädigung, die in der routinemäßigen Echokardiographie noch nicht nachweisbar sein muss und sich somit einer klinischen Diagnosestellung entzieht [104]. Des Weiteren konnten retrospektive Analysen einen Zusammenhang zwischen erhöhter Herzfrequenz und erhöhter Mortalität bei Brustkrebspatientinnen zeigen [109], welcher eventuell durch eine erhöhte adrenerge Aktivität erklärt werden könnte, unter der im Mausmodell höhere Metastasierungsraten nachgewiesen werden konnten (was laut Anker et al. wiederum die erhöhte Mortalität erklären könnte) [102, 110]. Somit kann eine Tumorerkrankung direkt oder indirekt Einfluss auf die Herzfunktion und somit auch auf das Outcome der Patientinnen und Patienten nehmen.

Im Rahmen der Brustkrebstherapie wurde schon oft der Einfluss einer (Hochdosis-) Chemotherapie sowie einer Bestrahlung auf kardiale Marker wie das schon erwähnte hsTNT untersucht, infolgedessen ein Zusammenhang zwischen hsTNT-Anstieg und Entwicklung einer ventrikulären systolischen Dysfunktion festgestellt werden konnte [111-113]. Jedoch existieren bislang fast keine Arbeiten, die die vorbestehende Höhe der Serumspiegel dieser kardialen Marker im Falle von Brustkrebspatientinnen evaluieren. Allerdings konnten auch bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom schon vor Einleitung der Therapie signifikant höhere hsTNT-Spiegel nachgewiesen werden [114]. Aktuelle kardioonkologische Reviews und Leitlinien empfehlen schon heute eine prätherapeutische Evaluation des kardiovaskulären Status [115, 116]. Der Hintergedanke hierbei ist eine Risikoabschätzung vor Therapiebeginn zu erstellen, um eine im Hinblick auf das patientenspezifische kardiovaskuläre Risiko ausgerichtete geeignete Chemotherapie wählen zu können.

Aufbauend auf den Beobachtungen der erhöhten Serumspiegel kardialer Marker in humanen Patienten wäre die Evaluation der Serumspiegel von Markern wie BNP oder hsTNT im Mausmodell sicherlich ebenfalls eine spannende Perspektive für zukünftige Untersuchungen. Ob nämlich die Veränderungen der Kapillarmorphologie zwangsläufig

zu einer Einschränkung der myokardialen Funktion führen, bleibt nach unseren Beobachtungen unklar. Morphologische Veränderungen wie myokardiale Nekrosen oder Einblutungen ließen sich jedenfalls nicht nachweisen.

Eine weitere entscheidende Fragestellung ist die nach der Ätiologie der Veränderungen der Kapillarmorphologie. Sind diese durch den Tumor selbst bzw. durch die von diesem Tumor systemisch sezernierten Faktoren (wie z.B. VEGF) bedingt, die in der Folge zu einer Dilatation der kardialen Kapillaren führen? Ein Ansatz wäre hier ein weiteres Experiment im Mausmodell bei Tumorwachstum unter VEGF-Blockade, welches neue Erkenntnisse bringen könnte. Blieben unter VEGF-Blockade die Kaliberabweichungen in den Mäusen mit 26-tägigem Tumorwachstum aus, würde dies auf eine VEGF-vermittelte Dilatation hindeuten. Ergänzend dazu könnte man prüfen, ob die Veränderungen an gesunden Kontrolltieren nach VEGF-Gabe induzierbar sind. Allerdings sezerniert ein Tumor je nach Subtyp noch eine Vielzahl weiterer Botenstoffe, die kardial wirksam sein könnten. Auch bleibt unklar, ob die Veränderungen bei anderen Tumorentitäten reproduzierbar sind.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob die beobachtete Dilatation nur passagerer Natur und damit reversibel ist (innerhalb der physiologischen Regulation der vaskulären Gefäßweite, beispielsweise über Freisetzung von Stickstoffmonoxid [NO]) und nur auftritt, wenn das Gefäßsystem mit den vom Tumor sezernierten Signalmolekülen konfrontiert wird, oder ob der Erweiterung tiefgreifende Umbauvorgänge in der Architektur der Kapillaren zugrunde liegen, die gegebenenfalls irreversibel sind.

Offenbar scheinen die Veränderungen nicht durch die Paclitaxel-Behandlung bedingt zu sein, da auch in der unbehandelten Gruppe der Mittelwert der Kapillarfläche mit steigender Tumorlast zunimmt.

Wie eingangs erwähnt, scheint die Paclitaxel-Therapie Einfluss auf das Ausmaß der Veränderungen zu nehmen, da die Fläche der Kapillaren der nicht-tumortragenden und der 12-Tage-tumortragenden Tiere im Mittelwert signifikant kleiner ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Tatsächlich wurde im Falle von mit Paclitaxel beschichteten Koronarstents schon eine vasokonstriktorische Wirkung des Medikaments beschrieben, die nach Gabe von NO reversibel war [117]. Erklärt wird dies dadurch, dass Paclitaxel durch eine inhibitorische Wirkung auf den VEGF-Signalweg eine geringere Aktivierung der NO-Synthase bewirkt, was zu einer relativen Vasokonstriktion im Vergleich zu unbehandelten Gefäßen führt [118]. Nimmt man einen ähnlichen

Mechanismus bei systemischer Applikation an, wäre dies zumindest ein Erklärungsansatz, der gut zu obigen Ergebnissen passen würde.

Eine weitere Frage ist, warum die morphologischen Veränderungen lediglich im Herz und nicht auf den Nieren zu beobachten sind. Zumindest ließen sich dort keine morphologischen Veränderungen in der Kapillararchitektur erkennen.

Limitationen in der Herangehensweise sind sicherlich der recht kleine Stichprobenumfang mit insgesamt 14 Versuchstieren. Außerdem können sich durch das freihändige Umfahren der Kapillaren sowie dem Einschließen von nicht hinreichend quer angeschnittenen Kapillaren in die Auswertung Fehler in der Abschätzung der durchschnittlichen kardialen Kapillarfläche ergeben. Um dem entgegenzuwirken, wurden wie oben beschrieben, nur Kapillaren einer Zirkularität von $>0,85$ in der Auswertung berücksichtigt.

4.3 Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Tiermodell auf den Menschen und in den Klinikalltag

Die Frage, die sich bei einer Vielzahl der im Tiermodell untersuchten wissenschaftlichen Fragestellungen stellt, ist die der Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Versuchstier auf den Menschen.

Am offensichtlichsten ist hier sicher die Vergleichbarkeit der Tumorlast der Maus mit der eines Patienten. 26 Tage nach Implantation beträgt das Gewicht der AT3-Primärtumore ca. 2g. Bei einem durchschnittlich geschätzten Gesamtgewicht einer Labormaus von 30g macht der Tumor also $\sim 13\%$ des Körpergewichts der Maus aus. Würde man dies auf einen menschlichen Patienten übertragen und ein Körpergewicht von 80kg annehmen, müsste der Tumor ein Gesamtgewicht von ca. 10,5kg auf die Waage bringen, was einer enormen Tumorlast gleichkommen würde.

Allerdings beginnen die beobachteten Veränderungen schon in früheren Tumorstadien, auch wenn sie noch nicht so deutlich hervortreten. Zudem steht noch die Frage im Raum, inwiefern die beobachteten Veränderungen für den Patienten mit Beschwerden einhergehen würden. Diese Frage lässt sich im Mausmodell nur schwer beantworten.

Man sollte hierbei auch nicht außer Acht lassen, dass die von einer Tumorerkrankung betroffenen Patienten unterschiedlich stark vorerkrankt sein können. Im Idealfall sind die Grunderkrankungen dieser Patienten schon medikamentös therapiert. Inwieweit diese medikamentöse Therapie Einfluss auf etwaige tumorbedingte Gefäßveränderungen nimmt, bleibt zu evaluieren. Im Falle von erblichen Tumorsyndromen, wie beispielsweise

bei Mutationen im BRCA1/2-Gen beim Mamma-Karzinom, erkranken jedoch durchaus jüngere Patientinnen [119]. Hier wäre ein engmaschigeres Monitoring auf kardiovaskuläre Komplikationen in Erwägung zu ziehen, bzw. eine Risikostratifizierung der Patientinnen zu empfehlen, wie sie in den Guidelines der *European Society of Cardiology* empfohlen wird [116]. Inwieweit die kapillarmorphologischen Veränderungen am Herz bereits in ihren Anfangsstadien zu einer kardialen Symptomatik führen, bleibt unklar.

4.4 Bedeutung der Zunahme der TRPC6-Expression auf kardialen Endothelzellen

Sowohl im kardialen Gefäßbett wie auch in den renalen Arterien der Versuchstiere konnte mit Progress der Tumorerkrankung eine hochsignifikante Zunahme der endothelialen TRPC6-Expression beobachtet werden. In Zusammenschau mit der ebenfalls beobachteten Dilatation kardialer Kapillaren ist es interessant, dass TRPC6 wesentlich an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt ist. So konnten Dietrich et al. im Tiermodell zeigen, dass Aorten TRPC6-defizienter Mäuse eine erhöhte Kontraktilität und Sensitivität gegenüber adrenerg wirksamen Substanzen zeigten [120].

Des Weiteren werden Hypothesen diskutiert, nach denen TRPC6 neben weiteren TRPC-Subtypen eine entscheidende Rolle in Signalwegen spielt, die eine myokardiale Hypertrophie induzieren. Zudem ist es mutmaßlich in der Modulation der Herzfrequenz und der Detektion der kardialen Wandspannung von Bedeutung [121].

Studien im Mausmodell konnten zeigen, dass TRPC6 in Reaktion auf Hypoxie/Ischämie und den damit einhergehenden oxidativen Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowohl auf renalen Podozyten wie auch auf glatten Gefäßmuskelzellen hochreguliert wird und einen Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration vermittelt. Dies bestätigt im Falle der glatten Muskelzellen der Gefäßwand die den Gefäßtonus modulierenden Eigenschaften von TRPC6 [122, 123]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass ROS wie H₂O₂ die Offenheitswahrscheinlichkeit von TRPC6 erhöhen [124]. Daneben erhöhen nicht nur lokal bei ischämischer Nierenschädigung freigesetzte ROS die TRPC6-Expression auf Podozyten, sondern auch VEGF führt dosisabhängig zu einer Erhöhung der podozytären TRPC6-Expression, welche über VEGFR-2 vermittelt zu sein scheint. In der gleichen Arbeit konnte auch eine erhöhte glomeruläre TRPC6-Expression in Nieren von Patienten mit diabetischer Nephropathie nachgewiesen werden, wobei Diabetes mellitus ebenfalls mit erhöhten systemischen VEGF-Serumspiegeln einhergeht [125].

Postuliert man nun, dass mit fortschreitender Tumorerkrankung die VEGF-Serumwerte steigen, deuten die in vorliegender Arbeit gewonnenen Ergebnisse in eine ganz ähnliche Richtung, nur dass es sich im Falle des Herzens um ein anderes Organ und im Falle der Endothelzelle um einen anderen Zelltyp handelt. Trotzdem kommt es auch hier mit Fortschreiten der Tumorerkrankung zu einem Anstieg der Expression von TRPC6 im CD34⁺ Endothel bzw. der Expression von TRPC6 allgemein. An dieser Stelle wäre sicher eine Bestätigung dieser These durch Messung der VEGF-Serumwerte in Abhängigkeit vom Fortschritt der Tumorerkrankung sinnvoll.

Gleichzeitig ist erwähnenswert, dass der VEGF-Hemmer Bevacizumab bereits heute beim metastasierten Mamma-Karzinom Eingang in die Therapie gefunden hat [6, 126]. Inwieweit eine zusätzliche Therapie mit Bevacizumab die hier präsentierten Ergebnisse beeinflusst und möglicherweise einer hier beobachteten Steigerung der TRPC6-Expression bei fortgeschrittenen Tumoren entgegenwirkt, bleibt zu evaluieren.

In vorliegender Arbeit konnte mit Fortschreiten der Tumorerkrankung eine Zunahme der TRPC6-Expression in kardialen Gefäßen gezeigt werden. Trotzdem bleibt noch die Frage offen, ob die gesteigerte TRPC6-Expression mit den dilatierten Kapillaren bzw. einer systemischen Wirkung von durch den Tumor sezernierten Faktoren in Zusammenhang steht oder ob diese Beobachtungen unabhängig voneinander auftreten.

4.5 Systemische Effekte von Tumorerkrankungen auf das Gefäßsystem

Die vom Tumor im Zuge der Tumorphypoxie und darauffolgenden Angiogenese ausgeschütteten Faktoren beeinflussen nicht nur die Endothelzellen der Tumorblutgefäße sondern auch diejenigen entfernt gelegener Gefäßabschnitte. Deutlich wird die entscheidende Rolle des Gefäßsystems während einer Tumorerkrankung beispielsweise an den führenden krebsbedingten Todesursachen wie Metastasierung und Thrombose [107].

Im Falle von Organen, in die der jeweilige Primarius charakteristischerweise metastasiert, wird dies im Modell der *prämetastatischen Nische* deutlich. Hierbei kommt es durch vom Tumor systemisch sezernierte Faktoren zu entscheidenden Veränderungen, noch bevor die Aussaat metastatischer Zellen beginnt [127]. Als erster Schritt in diesem Prozess wird eine Permeabilisierung der Endothelbarriere betrachtet, woran entscheidend VEGF-A beteiligt ist. Am Beispiel der Metastasierung in die Lunge konnte nachgewiesen werden, dass durch vom Tumor freigesetzte Faktoren wie VEGF-A, TNF und TGF β eine Mikroumgebung geschaffen wird, die die Absiedelung

zirkulierender Tumorzellen begünstigt. Damit gehen nicht nur Veränderungen der Endothelbarriere sondern auch der Umbau des Stromas und der extrazellulären Matrix am Zielorgan durch beteiligte Matrixmetalloproteasen (MMPs) einher [127].

Auch den von Tumorzellen abgeschnürten Membranvesikeln, den sogenannten Exosomen, wird ein entscheidender Einfluss auf die Vorbereitung der prämetastatischen Nische zugeschrieben. Sie enthalten Proteine und Genombestandteile (DNA, mRNA, miRNA) der Tumorzellen, die im Verdacht stehen, die Zielzellen zur Formierung prämetastatischer Nischen anzuregen. Dies konnte im Falle des Pankreaskarzinoms an Leberzellen gezeigt werden [128].

Daneben konnten auch Auswirkungen auf das Gefäßsystem von Organen beobachtet werden, die nicht primäre Zielorgane von Metastasierung sind. So konnte nachgewiesen werden, dass in Nieren tumortragender Tiere höhere Zahlen an neutrophilen Granulozyten als in der Vergleichsgruppe gefunden wurden. Damit einhergehend zeigte sich auch eine verschlechterte Gefäßfunktion. Mutmaßlich ausgelöst wurde sie durch NETs (engl. *neutrophile extracellular traps*), die eine Thrombenbildung im Gefäßsystem peripherer Organe induzieren können, was letztlich zur krebssbedingten Organschädigung beiträgt [129]. NETs spielen physiologischerweise eine wichtige Rolle in der Abwehr und Bekämpfung bakterieller Infektionen und bestehen aus DNA neutrophiler Granulozyten und antimikrobiellen Proteinen [129].

Im Rahmen der histologischen Untersuchungen ergaben sich deutliche Anhaltspunkte für Gefäßveränderungen im Kapillarbett des Herzens, die dem Anschein nach mit dem Progress der Tumorerkrankung in ihrer Ausprägung zunehmen. Ebenso steigt im Endothel der Koronararterien die Expression von TRPC6 mit steigendem Tumorstadium an. Diese Veränderungen könnten somit durch den Tumor bedingt sein, sodass dieser die Antigenarchitektur des Endothels weit entfernter Gefäßabschnitte beeinflussen würde. Andererseits könnten sich diese Veränderungen auch reaktiv auf zirkulierende Tumorzellen bzw. deren Bestandteile entwickeln.

Zusammenfassend lässt sich jedoch feststellen, dass die dargestellten Ergebnisse neue Einblicke in die systemischen Auswirkungen einer Tumorerkrankung bieten. Ob diese Veränderungen die Funktion bzw. den Metabolismus der jeweiligen Gewebe und Organe und in der Folge des Gesamtorganismus beeinflussen, bleibt zwar bislang unklar, dennoch lassen die gleichfalls beobachteten Veränderungen in der TRPC6-Expression des Endothels auf eine signifikante Änderung der endothelialen Antigenarchitektur schließen. Diese dürfte nicht ohne Konsequenzen bleiben, weshalb weitere Arbeiten zu

diesem Thema elementar wichtig sind, um ein besseres Verständnis für die systemischen Auswirkungen einer Tumorerkrankung auf den gesamten Organismus zu erreichen.

5 Zusammenfassung

Die Erforschung und Behandlung von Tumorerkrankungen stehen seit Jahrzehnten im Fokus des wissenschaftlichen und medizinischen Interesses. Im Falle des Mamma-Karzinoms existieren zahlreiche Studien und etablierte Leitlinien zu Prävention, Diagnostik und Therapie der Erkrankung. Gleichzeitig sind die Therapieeffekte vieler Chemotherapeutika im Tumor schon gut verstanden bzw. eine Optimierung der Therapie (durch synergistisch wirkende Medikamente) weiterhin zentraler Gegenstand aktueller Forschung. Paclitaxel hat sich gerade bei gynäkologischen Tumoren als Standardmedikament etabliert. Des Weiteren wurde in jüngster klinischer Forschung dem Gefäßsystem innerhalb des Tumors ein Hauptaugenmerk gewidmet.

Die Untersuchung systemischer, gegebenenfalls lange symptomloser Auswirkungen von Tumorerkrankungen auf das Gefäßsystem anderer peripherer Organe rückt allerdings erst in jüngster Zeit in den Blickpunkt wissenschaftlicher Betrachtungen.

Um hierzu beizutragen, wurde ein murines AT3-Tumormodell erstellt und die peripheren Organe von Mäusen mittels immunhistochemischer Techniken auf endotheliale Antigene gefärbt und hinsichtlich Auffälligkeiten/Veränderungen mit den Organen gesunder Kontrolltiere verglichen. Gleichzeitig wurde der Einfluss einer Taxan-basierten Chemotherapie auf die Gefäße in peripheren Organen evaluiert. Insgesamt wurde die Expression von vier mit dem Gefäßsystem assoziierten Antigenen (CD31, CD34, CD105, TRPC6) untersucht.

Soweit im Rahmen der gewählten Methoden beurteilbar ergaben sich keine Hinweise auf durch Paclitaxel bedingte direkte Gefäßschäden im Sinne von Einblutungen. Allerdings konnte insbesondere im Herz mit Progress der Tumorerkrankung eine zunehmende Erweiterung der kardialen Kapillaren nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass mit Fortschreiten der Tumorerkrankung die Expression von TRPC6 auf kardialen Endothelzellen ansteigt. Somit zeigen sich sowohl morphologische als auch molekulare Veränderungen im Gefäßsystem eines vom Tumor nicht betroffenen Organs, die primär durch das Fortschreiten der Tumorerkrankung und nicht durch die Taxan-basierte Chemotherapie bedingt zu sein scheinen.

Die Ursachen dieser Veränderungen auf molekularer Ebene und die Relevanz der Beobachtungen für den klinischen Alltag und die Tumorthherapie von Patientinnen und Patienten bedürfen weiterer klinischer Untersuchungen.

Jedoch könnten die gezeigten Ergebnisse eine neue Perspektive in der Entdeckung und Prävention von Folgeerkrankungen für Tumorpatienten bieten.

6 Referenzen

1. Aigner, K.R. and F.O. Stephens, *Onkologie Basiswissen*. 2016, Berlin, Heidelberg: Springer. 1 Online-Ressource (XX, 313 Seiten).
2. *WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all*. 2020, World Health Organization: Geneva.
3. *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. 2019, Robert-Koch-Institut: Berlin.
4. Lasch, L. and S. Fillenberg, *Basiswissen Gynäkologie und Geburtshilfe*. Springer-Lehrbuch. 2017, Berlin: Springer. XV, 294 Seiten.
5. Petru, E., et al., *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. 5., vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage ed. 2019, Berlin ; Heidelberg: Springer. 1 Online-Ressource (XXI, 306 S. 47 Abb., 40 Abb. in Farbe).
6. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. 2020.
7. *Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses über die Früherkennung von Krebserkrankungen*. 2009, Gemeinsamer Bundesausschuss.
8. Hicks, D.G., et al., *Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5/6, and overexpress HER2 or EGFR*. *Am J Surg Pathol*, 2006. **30**(9): p. 1097-104.
9. Allison, K.H., et al., *Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Update*. *Arch Pathol Lab Med*, 2020. **144**(5): p. 545-563.
10. Foulkes, W.D., I.E. Smith, and J.S. Reis-Filho, *Triple-negative breast cancer*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(20): p. 1938-48.
11. Reis-Filho, J.S. and A.N. Tutt, *Triple negative tumours: a critical review*. *Histopathology*, 2008. **52**(1): p. 108-18.
12. Balogh, E.P., et al., *Patient-centered cancer treatment planning: improving the quality of oncology care. Summary of an Institute of Medicine workshop*. *Oncologist*, 2011. **16**(12): p. 1800-5.
13. Cortazar, P., et al., *Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis*. *Lancet*, 2014. **384**(9938): p. 164-72.
14. von Minckwitz, G., et al., *Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(15): p. 1796-804.
15. Romond, E.H., et al., *Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(16): p. 1673-84.
16. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. *Lancet*, 2005. **365**(9472): p. 1687-717.
17. Seifert, R., *Basiswissen Pharmakologie*. Springer-Lehrbuch. 2018, Berlin ; Heidelberg: Springer. 1 Online-Ressource (XXII, 494 S. 67 Abb. in Farbe).
18. Shankar, A., et al., *Prevention of Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting in Cancer Patients*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015. **16**(15): p. 6207-13.

19. Wani, M.C., et al., *Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia*. J Am Chem Soc, 1971. **93**(9): p. 2325-7.
20. Abu Samaan, T.M., et al., *Paclitaxel's Mechanistic and Clinical Effects on Breast Cancer*. Biomolecules, 2019. **9**(12).
21. Denis, J.N., et al., *A Highly Efficient, Practical Approach to Natural Taxol*. Journal of the American Chemical Society, 1988. **110**(17): p. 5917-5919.
22. Holton, R.A., et al., *First Total Synthesis of Taxol .1. Functionalization of the B-Ring*. Journal of the American Chemical Society, 1994. **116**(4): p. 1597-1598.
23. Lüllmann-Rauch, R. and E. Asan, *Taschenlehrbuch Histologie*. 6., vollständig überarbeitete Auflage ed. 2019, Stuttgart ; New York: Georg Thieme Verlag. 781 S.
24. Lüllmann-Rauch, R. and E. Asan, *Taschenlehrbuch Histologie*. 2015, Stuttgart: Thieme. 726 S.
25. Rowinsky, E.K. and R.C. Donehower, *Paclitaxel (taxol)*. N Engl J Med, 1995. **332**(15): p. 1004-14.
26. Xiao, H., et al., *Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(27): p. 10166-10173.
27. Jordan, M.A., et al., *Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(20): p. 9552-6.
28. Schiff, P.B., J. Fant, and S.B. Horwitz, *Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol*. Nature, 1979. **277**(5698): p. 665-7.
29. Dellas, C., *Kurzlehrbuch Pharmakologie*. 2. Auflage ed. 2018, München, Deutschland: Elsevier. 1 Online-Ressource (IX, 629 Seiten).
30. Reed, J.C., *Mechanisms of apoptosis*. Am J Pathol, 2000. **157**(5): p. 1415-30.
31. Orrenius, S., B. Zhivotovsky, and P. Nicotera, *Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 552-65.
32. Tsujimoto, Y., *Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?* Genes Cells, 1998. **3**(11): p. 697-707.
33. Vishnu, P. and V. Roy, *Safety and Efficacy of nab-Paclitaxel in the Treatment of Patients with Breast Cancer*. Breast Cancer (Auckl), 2011. **5**: p. 53-65.
34. Kidd, J.F., et al., *Paclitaxel affects cytosolic calcium signals by opening the mitochondrial permeability transition pore*. J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 6504-10.
35. Pan, Z., A. Avila, and L. Gollahon, *Paclitaxel induces apoptosis in breast cancer cells through different calcium--regulating mechanisms depending on external calcium conditions*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(2): p. 2672-94.
36. Wanderley, C.W., et al., *Paclitaxel Reduces Tumor Growth by Reprogramming Tumor-Associated Macrophages to an M1 Profile in a TLR4-Dependent Manner*. Cancer Res, 2018. **78**(20): p. 5891-5900.
37. McGrogan, B.T., et al., *Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1785**(2): p. 96-132.
38. Nemcova-Furstova, V., et al., *Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters*. Toxicol Appl Pharmacol, 2016. **310**: p. 215-228.

39. Nyrop, K.A., et al., *Patient-Reported Toxicities During Chemotherapy Regimens in Current Clinical Practice for Early Breast Cancer*. *Oncologist*, 2019. **24**(6): p. 762-771.
40. Staff, N.P., et al., *Pathogenesis of paclitaxel-induced peripheral neuropathy: A current review of in vitro and in vivo findings using rodent and human model systems*. *Exp Neurol*, 2020. **324**: p. 113121.
41. Yilmaz, E., S.C. Watkins, and M.S. Gold, *Paclitaxel-induced increase in mitochondrial volume mediates dysregulation of intracellular Ca(2+) in putative nociceptive glabrous skin neurons from the rat*. *Cell Calcium*, 2017. **62**: p. 16-28.
42. Flatters, S.J.L. and G.J. Bennett, *Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction*. *Pain*, 2006. **122**(3): p. 245-257.
43. Li, Y., et al., *DRG Voltage-Gated Sodium Channel 1.7 Is Upregulated in Paclitaxel-Induced Neuropathy in Rats and in Humans with Neuropathic Pain*. *J Neurosci*, 2018. **38**(5): p. 1124-1136.
44. Li, Y., et al., *The Cancer Chemotherapeutic Paclitaxel Increases Human and Rodent Sensory Neuron Responses to TRPV1 by Activation of TLR4*. *J Neurosci*, 2015. **35**(39): p. 13487-500.
45. Pape, H.-C., et al., *Physiologie*. 9. vollständig überarbeitete Auflage ed. 2019, Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag. 1028 S.
46. Boyette-Davis, J.A., et al., *Persistent chemoneuropathy in patients receiving the plant alkaloids paclitaxel and vincristine*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013. **71**(3): p. 619-26.
47. Rowinsky, E.K., et al., *Cardiac disturbances during the administration of taxol*. *J Clin Oncol*, 1991. **9**(9): p. 1704-12.
48. ten Tije, A.J., et al., *Pharmacological effects of formulation vehicles : implications for cancer chemotherapy*. *Clin Pharmacokinet*, 2003. **42**(7): p. 665-85.
49. Essayan, D.M., et al., *Successful parenteral desensitization to paclitaxel*. *J Allergy Clin Immunol*, 1996. **97**(1 Pt 1): p. 42-6.
50. Rosello, S., et al., *Management of infusion reactions to systemic anticancer therapy: ESMO Clinical Practice Guidelines*. *Ann Oncol*, 2017. **28**(suppl_4): p. iv100-iv118.
51. Desai, N.P., et al., *Improved effectiveness of nanoparticle albumin-bound (nab) paclitaxel versus polysorbate-based docetaxel in multiple xenografts as a function of HER2 and SPARC status*. *Anticancer Drugs*, 2008. **19**(9): p. 899-909.
52. Socinski, M.A., et al., *Weekly nab-paclitaxel in combination with carboplatin versus solvent-based paclitaxel plus carboplatin as first-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: final results of a phase III trial*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(17): p. 2055-62.
53. Wettschureck, N., B. Strilic, and S. Offermanns, *Passing the Vascular Barrier: Endothelial Signaling Processes Controlling Extravasation*. *Physiol Rev*, 2019. **99**(3): p. 1467-1525.
54. Mai, J., et al., *An evolving new paradigm: endothelial cells--conditional innate immune cells*. *J Hematol Oncol*, 2013. **6**: p. 61.

55. Goncharov, N.V., et al., *Markers and Biomarkers of Endothelium: When Something Is Rotten in the State*. *Oxid Med Cell Longev*, 2017. **2017**: p. 9759735.
56. Dejana, E., et al., *Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees*. *Cell Tissue Res*, 2009. **335**(1): p. 17-25.
57. Tzima, E., et al., *A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress*. *Nature*, 2005. **437**(7057): p. 426-31.
58. Lum, H. and A.B. Malik, *Regulation of vascular endothelial barrier function*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(3 Pt 1): p. L223-41.
59. Weber, E.W. and W.A. Muller, *Roles of transient receptor potential channels in regulation of vascular and epithelial barriers*. *Tissue Barriers*, 2017. **5**(2): p. e1331722.
60. Tiruppathi, C., et al., *Impairment of store-operated Ca²⁺ entry in TRPC4(-/-) mice interferes with increase in lung microvascular permeability*. *Circ Res*, 2002. **91**(1): p. 70-6.
61. Ahmmed, G.U. and A.B. Malik, *Functional role of TRPC channels in the regulation of endothelial permeability*. *Pflugers Arch*, 2005. **451**(1): p. 131-42.
62. Pocock, T.M., R.R. Foster, and D.O. Bates, *Evidence of a role for TRPC channels in VEGF-mediated increased vascular permeability in vivo*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **286**(3): p. H1015-26.
63. Lertkiatmongkol, P., et al., *Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)*. *Curr Opin Hematol*, 2016. **23**(3): p. 253-9.
64. Woodfin, A., M.B. Voisin, and S. Nourshargh, *PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(12): p. 2514-23.
65. McCormick, M.E., et al., *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 mediates endothelial-cardiomyocyte communication and regulates cardiac function*. *J Am Heart Assoc*, 2015. **4**(1): p. e001210.
66. Delia, D., et al., *CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro*. *Blood*, 1993. **81**(4): p. 1001-8.
67. Fina, L., et al., *Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells*. *Blood*, 1990. **75**(12): p. 2417-26.
68. Wang, J.M., et al., *A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues*. *Int J Cancer*, 1993. **54**(3): p. 363-70.
69. Burrows, F.J., et al., *Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy*. *Clin Cancer Res*, 1995. **1**(12): p. 1623-34.
70. Balza, E., et al., *Lack of specificity of endoglin expression for tumor blood vessels*. *Int J Cancer*, 2001. **94**(4): p. 579-85.
71. Cavallaro, U., S. Liebner, and E. Dejana, *Endothelial cadherins and tumor angiogenesis*. *Exp Cell Res*, 2006. **312**(5): p. 659-67.
72. Weinberg, R.A., *Tumor suppressor genes*. *Science*, 1991. **254**(5035): p. 1138-46.
73. Burrell, R.A., et al., *The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution*. *Nature*, 2013. **501**(7467): p. 338-45.

74. Henke, E., R. Nandigama, and S. Ergun, *Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy*. Front Mol Biosci, 2019. **6**: p. 160.
75. Nandigama, R., et al., *Restriction of drug transport by the tumor environment*. Histochem Cell Biol, 2018. **150**(6): p. 631-648.
76. Quail, D.F. and J.A. Joyce, *Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis*. Nat Med, 2013. **19**(11): p. 1423-37.
77. Carmeliet, P., *VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer*. Oncology, 2005. **69 Suppl 3**: p. 4-10.
78. Weis, S.M. and D.A. Cheresh, *Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability*. Nature, 2005. **437**(7058): p. 497-504.
79. Nandigama, R., et al., *Taxanes act as vascular disrupting agents and increase rate of metastasis when combined with anti-angiogenic therapy*. bioRxiv, 2022: p. 2022.07.18.500307.
80. Hla Mohammed Ali, R.N., Philipp Wörsdörfer, Süleyman Ergün, Erik Henke, *Taxanes induce tumor-specific vascular permeability via TLR4/TRPC6 triggered Ca²⁺-influx*.
81. Soultati, A., et al., *Endothelial vascular toxicity from chemotherapeutic agents: preclinical evidence and clinical implications*. Cancer Treat Rev, 2012. **38**(5): p. 473-83.
82. Belotti, D., et al., *The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity*. Clin Cancer Res, 1996. **2**(11): p. 1843-9.
83. Lang, G., *Histotechnik Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. 2., überarb. und aktualisierte Aufl.* ed. 2013, Wien [u.a.]: Springer. XXI, 444 S.
84. Alturkistani, H.A., F.M. Tashkandi, and Z.M. Mohammedsaleh, *Histological Stains: A Literature Review and Case Study*. Glob J Health Sci, 2015. **8**(3): p. 72-9.
85. Elkon, K. and P. Casali, *Nature and functions of autoantibodies*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2008. **4**(9): p. 491-8.
86. Romeis, B., M. Mulisch, and E. Aescht, *Mikroskopische Technik*. 18. Aufl. ed. 2010, Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. 1 Online-Ressource (XII, 551 S.).
87. van Oss, C.J., R.J. Good, and M.K. Chaudhury, *Nature of the antigen-antibody interaction. Primary and secondary bonds: optimal conditions for association and dissociation*. J Chromatogr, 1986. **376**: p. 111-9.
88. Emoto, K., S. Yamashita, and Y. Okada, *Mechanisms of heat-induced antigen retrieval: does pH or ionic strength of the solution play a role for refolding antigens?* J Histochem Cytochem, 2005. **53**(11): p. 1311-21.
89. Key, M., *Immunohistochemistry Staining Methods*, in *Immunohistochemical Staining Methods*, G.L. Kumar, Rudbeck, L., Editor. 2009, Dako North America: Carpinteria, California. p. 57,58.
90. Z, A.M., J.Q. B, and A.K.A.S. AW, *Evaluation of Immunohistochemistry-Equivocal (2+) HER2 Gene Status in Invasive Breast Cancer by Silver DNA in Situ Hybridization (SISH) and its Association with Clinicopathological Variables*. Iran J Pathol, 2017. **12**(1): p. 9-19.
91. Bolte, S. and F.P. Cordelieres, *A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy*. J Microsc, 2006. **224**(Pt 3): p. 213-32.

92. Dunn, K.W., M.M. Kamocka, and J.H. McDonald, *A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy*. Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **300**(4): p. C723-42.
93. Wang, D., et al., *Immunohistochemistry in the evaluation of neovascularization in tumor xenografts*. Biotech Histochem, 2008. **83**(3-4): p. 179-89.
94. Shi, S.R., et al., *Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies*. J Histochem Cytochem, 1995. **43**(2): p. 193-201.
95. Strauss, O., et al., *Immunofluorescence identifies distinct subsets of endothelial cells in the human liver*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 44356.
96. Lalor, P.F., et al., *Human hepatic sinusoidal endothelial cells can be distinguished by expression of phenotypic markers related to their specialised functions in vivo*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(34): p. 5429-39.
97. Pusztaszeri, M.P., W. Seelentag, and F.T. Bosman, *Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues*. J Histochem Cytochem, 2006. **54**(4): p. 385-95.
98. Ruoslahti, E., *Specialization of tumour vasculature*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(2): p. 83-90.
99. Kim, S.H., et al., *Evaluation of antigen retrieval buffer systems*. J Mol Histol, 2004. **35**(4): p. 409-16.
100. Shi, S.R., Y. Shi, and C.R. Taylor, *Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades*. J Histochem Cytochem, 2011. **59**(1): p. 13-32.
101. Zaorsky, N.G., et al., *Causes of death among cancer patients*. Ann Oncol, 2017. **28**(2): p. 400-407.
102. Anker, M.S., S. Hadzibegovic, and S. von Haehling, *[Tumor effects on the heart and circulation]*. Internist (Berl), 2020. **61**(11): p. 1120-1124.
103. Szmit, S., et al., *Predictors of new-onset heart failure and overall survival in metastatic breast cancer patients treated with liposomal doxorubicin*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 18481.
104. Pavo, N., et al., *Cardiovascular biomarkers in patients with cancer and their association with all-cause mortality*. Heart, 2015. **101**(23): p. 1874-80.
105. Ohsaki, Y., et al., *Human small cell lung cancer cells produce brain natriuretic peptide*. Oncology, 1999. **56**(2): p. 155-9.
106. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur J Heart Fail, 2016. **18**(8): p. 891-975.
107. Cedervall, J., A. Dimberg, and A.K. Olsson, *Tumor-Induced Local and Systemic Impact on Blood Vessel Function*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 418290.
108. Totzeck, M., M. Glas, and T. Rassaf, *[Biomarkers in cardio-oncology patients]*. Internist (Berl), 2020. **61**(11): p. 1114-1119.
109. Lee, D.H., et al., *Resting heart rate as a prognostic factor for mortality in patients with breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2016. **159**(2): p. 375-84.

110. Sloan, E.K., et al., *The sympathetic nervous system induces a metastatic switch in primary breast cancer*. *Cancer Res*, 2010. **70**(18): p. 7042-52.
111. Cardinale, D., et al., *Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy*. *Circulation*, 2004. **109**(22): p. 2749-54.
112. Cardinale, D., et al., *Myocardial injury revealed by plasma troponin I in breast cancer treated with high-dose chemotherapy*. *Ann Oncol*, 2002. **13**(5): p. 710-5.
113. Hughes-Davies, L., et al., *Serum cardiac troponin T levels during treatment of early-stage breast cancer*. *J Clin Oncol*, 1995. **13**(10): p. 2582-4.
114. Danese, E., et al., *Highly-sensitive troponin I is increased in patients with gynecological cancers*. *Clin Biochem*, 2013. **46**(12): p. 1135-1138.
115. Cardinale, D., V. Caruso, and C.M. Cipolla, *The breast cancer patient in the cardioncology unit*. *J Thorac Dis*, 2018. **10**(Suppl 35): p. S4306-S4322.
116. Zamorano, J.L., et al., *2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC)*. *Eur Heart J*, 2016. **37**(36): p. 2768-2801.
117. Togni, M., et al., *Local vascular dysfunction after coronary paclitaxel-eluting stent implantation*. *Int J Cardiol*, 2007. **120**(2): p. 212-20.
118. Campia, U., *Vascular effects of cancer treatments*. *Vasc Med*, 2020. **25**(3): p. 226-234.
119. Copson, E.R., et al., *Germline BRCA mutation and outcome in young-onset breast cancer (POSH): a prospective cohort study*. *Lancet Oncol*, 2018. **19**(2): p. 169-180.
120. Dietrich, A., et al., *Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6-/- mice*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(16): p. 6980-9.
121. Ahmad, A.A., et al., *Physiological and pathophysiological role of transient receptor potential canonical channels in cardiac myocytes*. *Prog Biophys Mol Biol*, 2017. **130**(Pt B): p. 254-263.
122. Zhao, B., et al., *The role of TRPC6 in oxidative stress-induced podocyte ischemic injury*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **461**(2): p. 413-20.
123. Ding, Y., et al., *Reactive oxygen species-mediated TRPC6 protein activation in vascular myocytes, a mechanism for vasoconstrictor-regulated vascular tone*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(36): p. 31799-809.
124. Graham, S., et al., *Canonical transient receptor potential 6 (TRPC6), a redox-regulated cation channel*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(30): p. 23466-76.
125. Thilo, F., et al., *VEGF regulates TRPC6 channels in podocytes*. *Nephrol Dial Transplant*, 2012. **27**(3): p. 921-9.
126. Miller, K., et al., *Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(26): p. 2666-76.
127. Peinado, H., et al., *Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases*. *Nat Rev Cancer*, 2017. **17**(5): p. 302-317.
128. Costa-Silva, B., et al., *Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver*. *Nat Cell Biol*, 2015. **17**(6): p. 816-26.

129. Cedervall, J., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Accumulate in Peripheral Blood Vessels and Compromise Organ Function in Tumor-Bearing Animals*. *Cancer Res*, 2015. **75**(13): p. 2653-62.

7 Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Art. Nr.	Artikelnummer
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BRCA	<i>BReast CAncer</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Rinderserumalbumin)
°C	Grad Celsius
CA	Kalifornien
Ca/Ca ²⁺	Calcium/Calciumionen
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CTC	<i>circulating tumor cells</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (=Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Behörde für Lebens- und Arzneimittel der Vereinigten Staaten von Amerika)
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
Gy	Gray
h	<i>hour(s)</i> = Stunde(n)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
hsTNT	hochsensitives Troponin T
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
Ig	Immunglobulin
l	Liter
MA	Massachusetts
Mg/Mg ²⁺	Magnesium/Magnesiumionen
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
miRNA	micro-Ribonukleinsäure
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
Na/Na ⁺	Natrium/Natriumionen
NET	<i>neutrophile extracellular trap</i>
NGS	<i>Normal Goat Serum</i> (normales Ziegenserum)
nm	Nanometer
PA	Pennsylvania
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PECAM-1	<i>platlet/endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PTX	Paclitaxel

SEM	<i>Standard error of the mean</i> (engl. Standardfehler des Mittelwertes)
sog.	sogenannt(e)
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TLR-4	<i>Toll-like-Receptor 4</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRPC	<i>Transient receptor potential channel</i>
TRPV1	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1</i>
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
z.B.	zum Beispiel

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die vier Säulen der Brustkrebstherapie.....	4
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des Versuchsdesigns.....	21
Abbildung 3:	Struktur eines IgG-Antikörpers.	25
Abbildung 4:	Änderungen in der Tertiärstruktur eines Proteins.	28
Abbildung 5:	Prinzip der DAB-Reaktion bei Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers und des AB-Komplexes.	30
Abbildung 6:	Prinzip der DAB-Reaktion bei Verwendung eines Polymerantikörpers.	31
Abbildung 7:	Reaktionsablauf der DAB-Reaktion	32
Abbildung 8:	Vergleich des IHC-Färbeergebnisses gegen CD31 bei unterschiedlicher Demaskierung.	40
Abbildung 9:	Übersicht über Demaskierungen für CD34.....	41
Abbildung 10:	IHC-Färbungen gegen CD105 auf Herzschnitten in unterschiedlichen Verdünnungsstufen.....	42
Abbildung 11:	Vergleich des IHC-Färbeergebnisses gegen CD105 bei unterschiedlichen Demaskierungen.....	43
Abbildung 12:	Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen CD34 und TRPC6.....	46
Abbildung 13:	Vergleich der Mittelwerte der Manders-Koeffizienten von CD34 und TRPC6 auf Herzgewebe.	47
Abbildung 14:	Vergleich der Mittelwerte der Manders-Koeffizienten von CD34 und TRPC6 innerhalb der Behandlungsgruppen.....	47
Abbildung 15:	Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gegen CD31 und TRPC6 auf Nierengewebe.....	48
Abbildung 16:	Vergleich der Mittelwerte der Manders-Koeffizienten von CD31 und TRPC6 im Bereich der renalen Arterien.	49
Abbildung 17:	Vergleich der Mittelwerte der Manders-Koeffizienten von CD31 und TRPC6 auf renalen Arterien innerhalb der Behandlungsgruppen. ...	49
Abbildung 18:	Gegenüberstellung renaler Arterien des Kontrolltieres und des 26 Tage tumortragenden-Tieres der unbehandelten Experimentalgruppe.	50
Abbildung 19:	IHC-Färbung gegen CD105 am Herz eines 26d+PTX-Tieres.	51
Abbildung 20:	Gegenüberstellung von Aufnahmen gegen CD105 gefärbter kardialer Kapillaren.	52
Abbildung 21:	Vergleich der Mittelwerte der kardialen Kapillarfläche zwischen den einzelnen Experimentalgruppen.	53
Abbildung 22:	Vergleich der Mittelwerte der kardialen Kapillarflächen zwischen Kontrollgruppe und nach 26-tägigem Tumorwachstum jeweils ohne bzw. mit Paclitaxelbehandlung.	53
Abbildung 23:	Betrachtung des Einflusses der Paclitaxel-Therapie auf die Mittelwerte der kardialen Kapillarflächen in unterschiedlichen Tumorstadien.....	54
Abbildung 24:	Vergleich des IHC-Färbeergebnisses auf Schnitten der Nierenrinde gegen CD31.....	55
Abbildung 25:	IHC-Färbung auf AT3-Tumoren gegen CD31.....	56
Abbildung 26:	Übersicht beispielhafter lokaler und systemischer Auswirkungen einer Tumorerkrankung.	59

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chronologischer Ablauf des Einbettprozesses	23
Tabelle 2: Primärantikörper	36
Tabelle 3: Sekundärantikörper	36
Tabelle 4: Chemikalien und Materialien	36
Tabelle 5: Puffer- und Färbelösungen mit Zusammensetzung.....	37
Tabelle 6: Geräte und Mikroskope	38
Tabelle 7: Verwendete Software und deren Hersteller.....	38
Tabelle 8: Tabellarische Aufstellung der optimalen Demaskierung.....	44

IV Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Süleyman Ergün für die Möglichkeit zur Durchführung der Promotion in seinem Institut sowie seinen Rat und seine wertvollen Hinweise bedanken.

Herrn Dr. Erik Henke danke ich für das interessante und vielseitige Thema zur Erstellung meiner Dissertation sowie seine zahlreichen wertvollen Ratschläge und Hinweise, sowohl während des experimentellen Teils wie auch während des Schreibprozesses im Rahmen einer hervorragenden Betreuung. Auch möchte ich mich bei ihm für seinen Einsatz und seine Vermittlung in der Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Rosenwald und dem Institut für Pathologie bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald danke ich für seine Expertise und seine bereichernden Hinweise sowie für die Übernahme der Zweitbetreuung meiner Dissertation.

Zudem möchte ich dem gesamten Team des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg danken. Mein besonderer Dank gilt Frau Erna Kleinschroth für ihre Bereitschaft jederzeit mit Rat und Ideen zur Seite zu stehen. Ohne sie wäre das histologische Labor der Anatomie nicht das, was es ist. Ebenso gilt mein Dank Frau Doris Dettelbacher-Weber, Frau Brigitte Treffny und Frau Elke Varin.

Danke auch meinen Mitdotorandinnen und -dotoranden für die Unterstützung und Zusammenarbeit während des praktischen Teils der Arbeit, sowie die Hinweise im Rahmen des Schreibprozesses. Ihr habt es ermöglicht, den experimentellen Teil der Arbeit in einer angenehmen und produktiven Arbeitsatmosphäre durchzuführen!

Dann möchte ich mich bei meinen Korrekturlesern Hannah Klaes, Leon Kircher und Tobias Pumm für ihren kritischen Blick sowie ihre Nachfragen und Kommentare bedanken. Danke für Eure Genauigkeit, Eure Gründlichkeit und Eure wertvollen Hinweise.

Schlussendlich gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, die mich von klein auf für die Medizin begeistert haben und mich auf meinem Weg durch das Medizinstudium und die Promotion stets in allen Lagen und Bereichen unterstützt haben. Ohne euch wäre ich heute nicht da, wo ich bin!