

Institut für Anatomie und Zellbiologie

Verbesserung der Medikamenteneinbringung in
solide Tumoren durch Modifikation der
Extrazellulären Matrix

Improving drug delivery into solid tumors by modification of
the extracellular matrix



Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Klasse Biomedizin

vorgelegt von
Florian Röhrig
aus Ochsenfurt

Würzburg, 2015



Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender

Prof. Dr. Thomas Dandekar

Erster Betreuer

Dr. Erik Henke

Zweiter Betreuer

Prof. Dr. Georg Krohne

Dritter Betreuer

Prof. Dr. Ulrich Schatzschneider

Eingereicht am:

.....

Bürostempel

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

meiner mich immer unterstützenden Oma Sonja

Danksagung

Dr. Erik Henke möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie die individuelle Betreuung mit vielen Freiheiten danken. Sein offenes Ohr bei allen Problemen, ob im Labor oder zuhause, und seine hilfsbereite Art haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. Elke Butt möchte ich für die herzliche Beherbergung unserer Arbeitsgruppe im Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie und für ihre offene und fröhliche Art danken.

Prof. Dr. Süleyman Ergün möchte ich für die spontane Aufnahme unserer Gruppe im Institut für Anatomie und Zellbiologie, sowie die Geduld, die er aufbringen musste danken. Außerdem für die großartige Chance, die er mir durch die Weiterbeschäftigung in der Anatomie geboten hat.

Prof. Dr. Georg Krohne und Prof. Dr. Ulrich Schatzschneider möchte ich herzlich für die Übernahme der Betreuung sowie ihre Ideen in unseren Treffen danken.

Prof. Dr. Thomas Dandekar möchte ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitz danken.

Frau Dr. Gabriele Blum-Oehler und Frau Jennifer Heilig möchte ich für die geleistete Hilfe im Bezug auf die Graduiertenschule danken.

Meiner Kollegin Helene Hoffmann möchte ich für die gemeinsame Zeit, die wir hatten danken. Ich bin froh, dass wir uns gegenseitig durch so manche schwierige Phase helfen konnten.

Meinem Bachelor Michel und meiner Bachelorette Sabrina möchte ich von ganzem Herzen für die Freundschaft danken, die sich entwickelt hat und für den Spaß, den wir hatten und haben. Mit euch waren auch die längsten Tage witzig und auch die blödesten Ergebnisse noch amüsant. Außerdem natürlich für den experimentellen Teil (vor allem bei der rekombinanten Expression von LOX und LOXL2), den ihr beide zu dieser Arbeit beigetragen habt.

Den Mitarbeitern der Klinischen Biochemie - und hier vor allem Sabine Gätzner (die viele der Klonierungen dieser Arbeit vorgenommen und mir falls ich Zeitnot hatte auch in der Zellkultur ausgeholfen hat), Claudia Schütz, Petra Hönig-Liedl, Katja Blouin, Elfi Walter und meinem Ersatzvater Erhard Kress - möchte ich für das tolle Miteinander das wir hatten, und nach wie vor haben, danken. Die experimentellen Hilfen, die ihr geleistet habt aufzuzählen und die moralische Unterstützung in allen Situationen, die ihr geliefert habt, würde den Rahmen dieser Danksagung absolut sprengen.

Den Mitarbeiter des Institutes für Anatomie und Zellbiologie möchte ich für die herzliche und unkomplizierte Aufnahme danken. Besonderer Dank gilt natürlich Alla Ganscher, Ursula Roth und Nadja Niedermeier, die mir das schnelle Einarbeiten in den dortigen Laboralltag ermöglicht haben. Frau Sabine Katzschmann und Anett Diker möchte ich herzlich dafür danken, dass Sie immer ein offenes Ohr und mir allen bürokratischen Schreibkram vom Hals gehalten haben. Herrn Waldemar Axt und Herrn Winfried Zeier möchte ich für die Gespräche auf dem Gang danken, die immer ein gutes Gefühl bei mir hinterlassen haben. Herrn Michael Christof möchte ich für seine unkomplizierte und kompetente Art bei jeglicher Lösung von technischen Problemen danken, die er immer mit einem Lächeln auf den Lippen aus der Welt geschaffen hat. Meinen Doktoranden-Kollegen Damiano, Andrea, Marie und Katharina möchte ich ganz herzlich für die tolle Aufnahme in ihre Gruppe, für den Spaß den wir hatten (und haben) und für das gegenseitige Kraft geben danken. Ursula Roth möchte ich nicht nur für die Hilfe beim Bestellen, sondern auch für die zahlreichen Gespräche und die Gesellschaft danken. Ein besonderer Dank gilt meinen

wissenschaftlichen Kolleginnen und Kollegen. Dr. Valentin Gorboulev, Prof. Dr. Esther Asan, Dr. Jochen Bauer, Dr. Jan Allmannritter, Dr. Marion Holbach-Gutzeit, Dr. Helmut Kipp, Prof. Dr. Stefanie Kürten, Dr. Nicole Wagner möchte ich für die Hilfe in allen Belangen und für zahlreiche Hilfestellungen und Tipps danken. Ein ganz besonderer Dank soll dabei an Frau Dr. Athina Hübner, PD Dr. Stefan Hübner (nicht verwandt oder verschwägert, gell? ;-)) und Maik Veyhl-Wichmann gehen, die sich in allen Belangen aufopferungsvoll um mich gekümmert haben und mir immer mit Rat und Tat, sowie hervorragenden Ideen zu Seite standen. Und last but not not least meine Lieblingskollegin vom Raum D206 (um das mal zu zitieren), Dr. Verena Pfeiffer, deren lautes Organ einen manchmal beim Schreiben in die Verzweiflung trieb: Danke für die tolle und, hoffentlich noch einige Zeit dauernde, Zusammenarbeit und das witzige Miteinander.

Allen anderen, die ich hier nicht erwähnt habe, möchte ich für das nette Miteinander und das gegenseitige Aushelfen, das dieses Institut auszeichnet, danken.

Danke Egon. Du weißt wofür.

Meinen Geschwistern Josef, Annemarie und Peter möchte ich dafür danken, dass sie ihren kleinen Besserwisser so gut ertragen. Ich bin jeden Tag froh, dass es euch gibt und wir so zusammenstehen. Und Josef: danke fürs Lesen.

Meinen Eltern möchte ich für die jahrelange Unterstützung und die Hilfe in allen Situationen danken. Und Papa: Der Vater eines Doktors ist nicht automatisch auch Doktor! ;-)

Meiner Oma Sonja, der ich auch diese Arbeit widmen möchte, und meinem Opa Florian möchte ich für die immense Unterstützung meines Studiums danken. Ohne dich/euch wäre das alles vermutlich nicht möglich gewesen...

Meiner Freundin Isa möchte ich für einfach alles danken. Du hast mich in der wohl schwierigsten Phase kennen, und zum Glück auch lieben, gelernt. Die Kraft, die du mir

gegeben hast, ist nicht in Buchstaben zu packen. Danke.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Die Erkrankung „Krebs“	1
1.2 Behandlung solider Tumoren	2
1.2.1 Klassische Therapien	2
1.2.2 Experimentelle Therapien	5
1.3 Tumorangiogenese, Tumorstromatologie und Hypoxie	6
1.4 Hypothese der Gefäßnormalisierung	11
1.5 Einbringung von Medikamenten in solide Tumoren	14
1.6 Modifikation der Tumorstromatologie	18
1.7 Die extrazelluläre Matrix und ihr Einfluss auf den Tumor	18
1.7.1 Lysinoxidasen	20
1.7.2 Kollagene und Elastin	21
1.7.3 Vorarbeiten	22
1.7.3.1 Das MT6-Fibrosarkom-Modell und die anti-angiogenetische Therapie	22
1.8 Ziele der Arbeit	27
2 Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Geräte	29

2.1.2	Chemikalien	32
2.1.3	Größenstandards	33
2.1.4	Enzyme	33
2.1.5	Kits	34
2.1.6	Antibiotika	35
2.1.7	Puffer	35
2.1.8	Medien	40
2.1.9	Biologisches Material	41
2.1.9.1	Versuchstiere	41
2.1.9.2	Zelllinien	42
2.1.9.3	Bakterien	43
2.1.9.4	Antikörper	43
2.1.9.5	Vektoren	43
2.1.10	Software und Datenbanken	44
2.2	Methoden	45
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	45
2.2.1.1	Isolierung und Aufreinigung von Plasmiden (Miniprep & Maxiprep)	45
2.2.1.2	Bestimmung von DNA/RNA Konzentrationen	45
2.2.1.3	Erstellung von Primern	45
2.2.1.4	Polymerase Chain Reaction / PCR	46
2.2.1.5	Aufreinigung von PCR-Produkten, Gelbanden und Vek- toren	47
2.2.1.6	Generierung von A-Überhängen	48
2.2.1.7	TOPO [®] Cloning [®] von PCR-Produkten	48
2.2.1.8	Ligation	49
2.2.1.9	Isolation von DNA aus Geweben	49
2.2.1.10	Isolation von DNA aus Zellen	50
2.2.1.11	Isolation von RNA aus Zellen und Geweben	50

2.2.1.12	<i>in vitro</i> -Transkription von RNA	50
2.2.1.13	Aufreinigung von RNA	51
2.2.1.14	RNase H-Assay	51
2.2.1.15	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren	52
2.2.1.16	Sequenzierung von DNA	53
2.2.1.17	Expressionprofiling durch Fragmentanalyse GeXP	54
2.2.1.18	Restriktionsverdau	55
2.2.1.19	Rekombinante Expression von hLOX und hLOXL2	56
2.2.2	Mikrobiologische Methoden	56
2.2.2.1	Flüssigkultur von Bakterien	56
2.2.2.2	Kryokonservierung von Bakterien	57
2.2.2.3	Bestimmung von Bakterienkonzentrationen durch photometrische Messung	57
2.2.2.4	Bakterienkultivierung auf Agar-Selektionsplatten	57
2.2.2.5	Transformation von Plasmiden in kompetente Bakterien	58
2.2.3	Peptidchemie	58
2.2.3.1	Solid-Phase-Peptide-Synthese	58
2.2.3.2	Zyklisierung eines Peptids durch Ausbildung einer Disulfidbrücke	59
2.2.3.3	Ellman's Test zum Nachweis freier Thiolgruppen	60
2.2.3.4	Ringschluss durch Ruthenium-katalysierte Alkenmetathese	61
2.2.4	Proteinbiochemische und biochemische Methoden	62
2.2.4.1	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese / SDS-PAGE	62
2.2.4.2	Färben von Proteingelen mittels kolloidalem Coomassie	64
2.2.4.3	Färben von Proteingelen mittels Silberfärbung	64
2.2.4.4	Western-Blot	64

2.2.4.5	Proteinnachweis auf einer Nitrozellulose- oder PVDF-Membran	65
2.2.4.6	Enhanced Chemiluminescence zur Detektion von HRP-gekoppelten Antikörpern	65
2.2.4.7	Strippen von Antikörpern	66
2.2.4.8	Aufreinigung von Hexa-Histidin-Fusionsproteinen	66
2.2.4.9	Dialyse von Proteinlösungen	67
2.2.4.10	Fällung von Proteinen	67
2.2.4.11	Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels BCA-Assay	68
2.2.4.12	Extraktion von Extrazellulärer Matrix aus Tumoren	68
2.2.4.13	Aufreinigung von Peptiden mittels HPLC	68
2.2.4.14	Größenbestimmung von Proteinen und Peptiden mittels MALDI-TOF	69
2.2.4.15	Extraktion von Doxorubicin aus Geweben	70
2.2.4.16	Transwell-Permeabilitätsassay	70
2.2.4.17	LOX-Aktivitätsassay	71
2.2.4.18	Extraktion von Fluorescein-gelabelten Peptiden aus Geweben	72
2.2.5	Mikroskopische Methoden	72
2.2.5.1	Fixierung von Zellen	72
2.2.5.2	Indirekte Immunfluoreszenz	72
2.2.5.3	Kryoschnitte	73
2.2.5.4	Konfokale Mikroskopie	73
2.2.6	Methoden der Zellkultur	74
2.2.6.1	Kultivierung von Zellen	75
2.2.6.2	Passagieren von Zellen	75
2.2.6.3	Kryokonservierung von Zellen	75
2.2.6.4	Rekultivierung von kryokonservierten Zellen	75

2.2.6.5	tube-formation assay (Matrigel-Assay)	76
2.2.6.6	Proliferationsassay	76
2.2.6.7	Toxizitätsassay	77
2.2.6.8	Bestimmung von Zellkonzentrationen mittels Neubauer-Zählkammer	77
2.2.6.9	Herstellung pseudo-lentiviraler Partikel in HEK293T-Zellen und Transduktion von Zielzellen	77
2.2.6.10	Co-Kultur von Zellen	80
2.2.6.11	3D-Zellkultur / hanging drops	80
2.2.6.12	3D Zellkultur / alginate beads	81
2.2.6.13	3D-Zellkultur / natural scaffolds	81
2.2.6.14	3D-Zellkultur / PLA/PGLA-sponges	82
2.2.6.15	<i>in vitro</i> Peptide binding assay	83
2.2.7	Tierversuche	85
2.2.7.1	Allgemeine Haltungsbedingungen von Mäusen	85
2.2.7.2	Implantation von Tumoren in Mäuse	85
2.2.7.3	<i>in vivo</i> peptide binding	85
2.2.7.4	Behandlungsstudien	86
2.3	Statistik	88
3	Ergebnisse	89
3.1	Verifizierung der Nichtbeeinflussung des Tumorwachstums im MT6-Tumormodell durch verstärkte anti-angiogenetische Therapie	89
3.2	Vergleichende Toxizitätsassays für Doxorubicin und Paclitaxel	89
3.3	Histologische Untersuchungen von 4T1- und MT6-Tumoren	91
3.3.1	Picrosirius-Rot-Färbung	91
3.3.2	Masson-Goldner-Trichrom-Färbung (MGTR)	92
3.4	EZM-Gehalt der Tumoren	93
3.4.1	Harnstofflösliche EZM-Fraktion (usECM)	94

3.4.2	komplette EZM (cECM)	94
3.5	Permeabilitäts-Assay	95
3.6	mRNA-Expressions-Analyse von EZM-Proteinen in 4T1- und MT6-Tumoren .	97
3.7	LOX-Aktivitätsassay	98
3.8	Quervernetzung von Matrigel durch rekombinantes humanes LOX bzw. LOXL2	99
3.9	Untersuchung von Veränderungen nach Inhibition von Lysyoxidasen in verschiedenen Tumormodellen	102
3.9.1	Tumorwachstum	102
3.9.2	Diffusion aus den Gefäßen	103
3.9.3	Medikamentenmenge im Tumor	103
3.9.4	Medikamentenmenge in Nicht-Ziel-Organen	106
3.9.5	Relative Permeabilität der Matrix	106
3.10	Kombination von Chemotherapeutikum und Lysyloxidase-Inhibition in Mau- stumormodellen	107
3.10.1	4T1-Tumormodell	108
3.10.2	EMT6-Tumormodell	109
3.11	Inhibition von Lysyloxidasen bei kombinierter anti-angiogenetischer The- rapie und Chemotherapie im MT6-Tumormodell	110
4	Diskussion	113
5	Zusammenfassung / Summary	125
6	Anhang	129
	Literaturverzeichnis	135

Abbildungsverzeichnis

1.1	Typischer Verlauf einer Brustkrebserkrankung.	2
1.2	Therapeutische Ziele einer Chemotherapie	4
1.3	Vergleich der Tumorvaskulatur mit Blutgefäßen im Muskel	8
1.4	Schematische Übersicht über VEGF und seine Rezeptoren	10
1.5	Schema des Konzepts der Gefäßnormalisierung	13
1.6	Schematische Übersicht über Faktoren, die den Wirkstofftransport in den Tumor beeinflussen	14
1.7	Schematische Darstellung der insuffizienten Versorgung durch Diffusion im Tumor	16
1.8	Perivaskuläre Verteilung des Chemotherapeutikums Doxorubicin in EMT6-Tumoren	17
1.9	Schematische Darstellung wichtiger durch das Liganden/Rezeptorpaar VEGF-A/VEGFR-2 aktivierter Signalwege und deren Wirkung in Endothelzellen	19
1.10	MT6-Tumorschnitte mit Färbung für PanEC	23
1.11	Kombinationstherapie von mG6-31 und Doxil in MT6-Tumoren	24
1.12	Extraktion von Doxil aus mG6-31- und IgG-behandelten MT6-Tumoren	25
1.13	Kombinationstherapie von mG6-31 und Doxorubicin in 4T1-Tumoren	26
1.14	Diffusion von Hoechst33342 aus Blutgefäßen in 4T1 und MT6-Tumoren nach Behandlung mit einem Kontroll-Antikörper bzw. mG6-31	27
1.15	Korrelation zwischen Hoechst-positivem Gewebesvolumen und Oberfläche der Blutgefäße in 4T1- und MT6-Tumoren nach Behandlung mit einem Kontroll-Antikörper bzw. mG6-31	28
2.1	Schema eines RNase H-Assays	52
2.2	Schematische Darstellung des Ablaufes eines Expressionsprofilings	55

2.3	Übersicht über die Solid Phase Peptide Synthesis	59
2.4	Reaktionsmechanismus der Aktivierung und Aminosäurekopplung	61
2.5	Schema einer Ringschlussmetathesereaktion	62
2.6	Schematische Übersicht über den EZM-Extraktions-Prozess	69
2.7	Schema des Lysyloxidase-Aktivitätsassays	71
2.8	Strahlengang eines konfokalen Mikroskops	74
2.9	Schematische Übersicht über eine lentivirale Transduktion	78
2.10	Schema der Hanging drop Methode	81
2.11	Aufbau eines 3DKube-Versuchs zur Besiedlung von dezellularisierten Därmen	83
2.12	Allgemeines Schema einer Behandlungsstudie in Mäusen	86
3.1	Behandlung von MT6-Fibrosarkomen mit erhöhter Dosis an mG6-31	90
3.2	Resistenz von 4T1- und MT6-Zellen gegen das Chemotherapeutikum Doxorubicin	91
3.3	Resistenz von 4T1- und MT6-Zellen gegen das Chemotherapeutikum Paclitaxel	91
3.4	EC ₅₀ -Werte der beiden Chemotherapeutika Doxorubicin und Paclitaxel für die Zelllinien 4T1 und MT6	92
3.5	Mittels Picosirius-Rot auf bindegewebige Anteile gefärbte Dünnschnitte der beiden Tumormodelle 4T1 und MT6	93
3.6	Masson-Goldner-Trichrom-gefärbte Dünnschnitte von 4T1- und MT6-Tumoren	93
3.7	Prozentualer Anteil an usECM und cECM im 4T1- und MT6-Tumormodell .	95
3.8	Permeabilitätsassay für cECM aus 4T1- und MT6-Tumoren	96
3.9	Relative Permeabilität der cECM aus 4T1- und MT6-Tumoren	96
3.10	Relative Permeabilität der usECM aus 4T1- und MT6-Tumoren	97
3.11	mRNA-Expression verschiedener extrazellulärer Matrixproteine in 4T1- und MT6-Zellen	98
3.12	Aktivitätsassay für Lysyloxidasen in Zellkulturüberständen mehrerer Zelllinien	99

3.13	Permeabilität einer Matrix-beschichteten Membran vor und nach Vernetzung durch Formaldehyd	100
3.14	Western Blot und Aktivitätsassay für die rekombinaten Proteine LOX und LOXL2	101
3.15	Permeabilitätsassay für eine Matrix-beschichtete Transwell-Membran nach Vernetzung durch hmLOX beziehungsweise rhLOXL2	102
3.16	Lysyloxidase-Inhibition in etablierten Tumoren	104
3.17	Exemplarische Aufnahmen der Hoechst33342-Penetration in den Tumormodellen EMT6, MT6 und LLC nach Inhibition der Lysyloxidasen	105
3.18	Penetrationstiefe durch Hoechst33342 nach Inhibition der Lysyloxidasen durch β APN	105
3.19	Einfluss der Behandlung mit β APN auf die Akkumulation von Doxorubicin in Tumoren	106
3.20	Doxorubicin-Akkumulation in Nicht-Ziel-Geweben nach Behandlung mit β APN	107
3.21	Permeabilität von mit EZM aus verschiedenen Tumormodellen beschichteten Transwell-Membranen mit und ohne Inhibition von Lysyloxidasen . . .	107
3.22	Behandlung etablierter 4T1-Tumoren mit einer Kombinationstherapie aus β APN und Doxorubicin	108
3.23	Anzahl von 4T1-Makrometastasen in Lungen behandelter Tiere	109
3.24	Behandlung etablierter EMT6-Tumoren mit einer Kombinationstherapie aus β APN und Doxorubicin	110
3.25	Behandlung etablierter MT6-Tumoren mit einer Kombinationstherapie aus β APN, mG6-31 und Doxorubicin	111
3.26	Penetration von Hoechst33342 ins MT6-Tumorgewebe nach viertägiger β APN-Behandlung und mG6-31-Einzeldosis	112
4.1	Schematisches Modell des Zusammenhangs zwischen „Gefäßnormalisierung“ und Permeabilität der EZM	123

A.1	pGEX-hmLOX-Vektor zur Expression der Lysyloxidase in <i>E. coli</i>	134
A.2	pLVX-hLOXL2-puro-Vektor zur Expression von LOXL2 in HEK283T-Zellen . .	134

Tabellenverzeichnis

2.1	Chemikalien	32
2.2	humane Tumorzelllinien	42
2.3	murine Zelllinien	42
2.4	primäre Antikörper	43
2.5	sekundäre Antikörper	43
2.6	Vektoren	43
2.7	Reinheit von Nukleinsäuren	45
2.8	Schema eines 50 μ L Standard-PCR-Ansatzes	48
2.9	Schema eines Standard-PCR-Cycler-Programms	48
2.10	Pipettierschema eines 20 μ L Ligationsansatzes	49
2.11	Pipettierschema eines T7 <i>in vitro</i> Transkriptionsansatzes	51
2.12	Pipettierschema eines SP6 <i>in vitro</i> Transkriptionsansatzes	51
2.13	Pipettierschema eines RNase H-Reaktionsmixes	52
2.14	Cyclerprogramm für eine Sequenzierungsreaktion	53
2.15	Pipettierschema eines RT-Reaktionsansatzes	55
2.16	Pipettierschema eines Restriktionsverdau	56
2.17	Beispiel für eine SPPS	60
2.18	Pipettierschema für 20 mL Trenngel-Lösung	63
2.19	Pipettierschema für 3 mL Sammel-Lösung mit 5% Acrylamid	63
2.20	Schema des Laufmittelgradienten für eine Peptid-Aufreinigungs-HPLC	69
2.21	Pipettierschema für einen Reaktionsansatz LOX-Aktivitätsassay	72
2.22	Pipettierschema für einen Transfektionsansatz zur Herstellung pseudo-lentiviraler Partikel	79

2.23	Übersicht über in dieser Arbeit verwendete implantierbare Tumor-Modell-systeme	85
2.24	Übersicht über die Behandlungspläne zur Untersuchung der veränderten Doxorubicin-Einbringung in Tumoren durch Inhibierung von Lysyl-Oxidasen.	87
A.1	Übersicht über verwendete Primer.	129
A.2	Übersicht der zur Klonierung von hmLOX verwendeten Nukleotidsequenz.	131
A.3	Übersicht der zur Klonierung von rhLOXL2 verwendeten Nukleotidsequenz.	132

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
β APN	β -Aminopropionitril
BCA	bichinonic acid
BFP	blue fluorescent protein
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovine serum albumine
C.I.	Confidence interval (Konfidenzintervall)
Cisplatin	<i>cis</i> -Diammindichloroplatin (II)
C-terminal	Carboxyterminal
Da	Dalton
DCE	Dichlorethan
DCM	Dichlormethan
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxy ribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
dNTP	deoxynucleoside triphosphate
dsDNA	double-stranded DNA (doppelsträngige DNA)
Dox	Doxorubicin
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	extracellular matrix
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid (Ethyldiamintetraessigsäure)
ER	Endoplasmatisches Retikulum

EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Focal adhesion kinase
FAM	Fluorescein amidite
FCS	fetal calf serum
FDA	Food and Drug Administration
FGF	fibroblast growth factor
gDNA	genomische DNA
GFP	green fluorescent protein
H ₂ O bidest.	doppelt destilliertes Wasser
h	hora (Stunde)
HBS	HEPES buffered saline
HEK	human embryonic kidney
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
His	Histidin
hLOX	humane Lysyloxidase
hLOXL2	humanes LOXL2
HPLC	high performance liquid chromatography
HRE	hypoxia response element
HRP	horseradish peroxidase
Hs	<i>Homo sapiens</i>
ID	injizierte Dosis
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LOX(L)	Lysyloxidase (like)
M	molar
MALDI-TOF	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization and time-of-flight mass spectrometer
min	pars minuta (Minute)

mL	Milliliter
Mm	<i>Mus musculus</i>
mM	millimolar
mRNA	messenger-RNA
MVD	microvessel density
MWP	Multiwell Plate
nm	Nanometer
N-terminal	Aminoterminal
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PBS	phosphate buffered saline
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PGF	Placental growth factor
PLA	polylactic acid (Polymilchsäure)
PGLA	Polylactid-co-Glycolid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qd	quaque die (täglich)
RFU	relative fluorescence unit
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RPM	revolutions per minute (UPM; Umdrehungen pro Minute)
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide electrophoresis
SPPS	solid-phase-peptide-synthesis, Festphasenpeptidsynthese
ssDNA	singel-stranded DNA (einzelsträngige DNA)
TBS	Tris buffered saline
TIS	Triisopropylsilan
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TERT	Telomerase reverse Transkriptase

TFA	Trifluoroacetic acid (Trifluoressigsäure)
TMP	Trimethylpyridin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
μL	Mikroliter
μM	mikromolar
μm	Mikrometer
v.Chr.	vor Christus
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs	versus (gegen)

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Die Erkrankung „Krebs“

„Within a year, if all goes well, the first cancer patient will be injected with two new drugs that can eradicate any type of cancer, with no obvious side effects and no drug resistance – in mice.“ ...

„The new drugs, angiostatin and endostatin, work by interfering with the blood supply tumors need. Given together, they make tumors disappear and not return.“

- Gina Kolata in ihrem Artikel „HOPE IN THE LAB: A special report.“, *The New York Times*, 3.Mai 1998

Weltweit betrachtet ist Krebs nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache für nicht übertragbare Krankheiten. 2012 erkrankten dabei 14 Millionen Menschen neu an Krebs, 8,2 Millionen starben (Ferlay *et al.*, 2012). Aus medizinischer Sicht handelt es sich bei Krebs um eine maligne Neoplasie. Dieses unkontrollierte Zellwachstum resultiert aus mehrerer Mutationen bzw. Epimutationen in einer Zelle, die die Ausschaltung der Wachstumsregulation und/oder Differenzierung zur Folge haben (siehe Abbildung 1.1).

Die hier betroffenen Gene werden dabei als Proto-Onkogene bzw. als Tumorsuppressorgene bezeichnet.

Proto-Onkogene sind hierbei Gene, die vor allem für Wachstumsfaktoren oder Proteine der Zellzykluskontrolle kodieren. Durch chromosomale Translokation, Genamplifikation oder Mutation kann aus diesen Proto-Onkogenen ein Onkogen entstehen (Bishop, 1991). Das Protein eines Onkogens

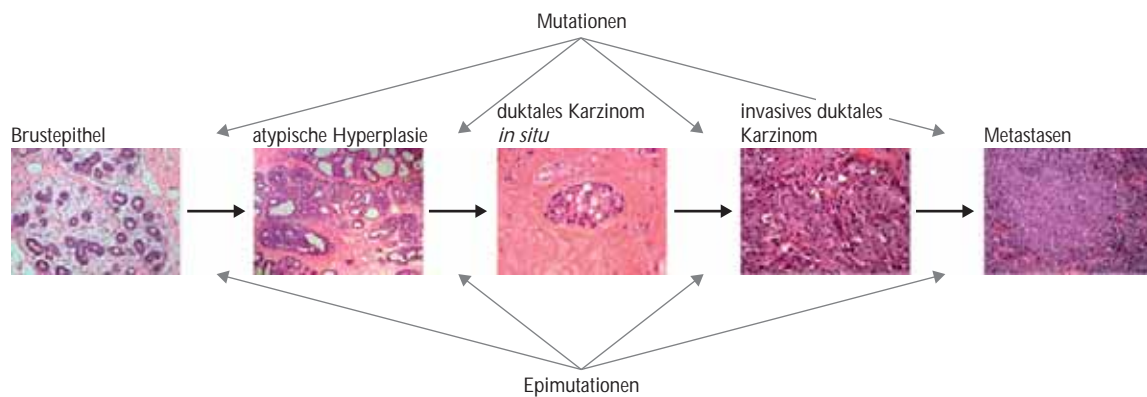


Abbildung 1.1: Natürlicher Verlauf einer Brustkrebserkrankung. Brustkrebs entwickelt sich meist aus normalem Brustepithel. Durch mehrere molekulare Veränderungen, genetische sowie epigenetische, entwickelt sich zuerst eine atypische Hyperplasie. Durch weitere Veränderungen kann aus dieser Hyperplasie ein Karzinom hervorgehen. Die Veränderungen, die zu einer Hyperplasie führen sind dabei nicht gut charakterisiert, allerdings kann genetische Prädisposition diesen Prozess begünstigen.

Modifiziert nach Rivenbark und Coleman (2012)

kann dann dazu führen, dass sich die Zelle unkontrolliert teilt und Apoptose verhindert wird. Die Genprodukte von Tumorsuppressorgen wirken meist repressiv auf den Zellzyklus oder fördern die Apoptose. Ihr Verlust führt entweder zu einer unkontrollierten Proliferation der Zellen beziehungsweise kommt es bei einer Schädigung des Erbgutes nicht mehr zur Einleitung der Apoptose.

Ein klassischer und gut charakterisierter Tumorsuppressor ist p53, der in der Literatur oft als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird. Erworben hat er sich diesen Titel durch seine prominente Rolle in der Regulation der Apoptose nach Schädigung der DNA. Diese Schädigung führt zu einer Stabilisierung von p53, der als Transkriptionsfaktor wirkt, und im folgenden die Expression von Genen steuert, die an der Regulation des Zellzyklus, an der DNA-Reparatur sowie eben an der Einleitung der Apoptose beteiligt sind (Lane, 1992). Allen malignen Neoplasien gemein ist die Neigung zur Metastasierung, die meist der eigentlich Grund für die Letalität dieser Erkrankungen ist (Gupta und Massagué, 2006).

1.2 Behandlung solider Tumoren

1.2.1 Klassische Therapien

Die moderne Medizin stützt sich bei der Behandlung solider Tumoren auf drei klassische Standbeine (Nelson *et al.*, 2001; Network *et al.*, 2003):

- die operative Entfernung von neoplastischem Gewebe (Resektion),
- die Bestrahlung des Tumors (Radiotherapie) und
- die systemische, medikamentöse Behandlung (z.B. Chemotherapie, Hormontherapie, gezielte Therapeutika).

Die Resektion des Tumors stellt wohl die ertümlichste Methode zur Behandlung einer Krebserkrankung dar. So finden sich bereits in Papyri der Ägypter, die auf das Jahr 2650 v.Chr. datiert wurden, Berichte über Brustkrebs, sowie die damals durchgeführten Behandlungen. Diese bestanden neben der Resektion vor allem durch Ausbrennen des malignen Gewebes (Saber, 2010). Auch heute noch werden Tumoren operativ entfernt. Da es sich bei einer Resektion allerdings um eine invasive und traumatische Behandlungsmethode handelt, ist diese auch immer mit den bei jeder Operation auftretenden Gefahren für den Patienten verbunden. So stellt nicht nur die nötige Anästhesierung, sondern auch die makroskopische Einschätzung des Chirurgen zur Tumorgrenze, ein Risiko dar, da eventuell verbleibende Tumorzellen ein Rezidiv der Erkrankung verursachen können.

Die zweite klassische Therapiemethode stellt die Radiotherapie dar. Da ausdifferenzierte Zellen über DNA-Reparaturmechanismen verfügen, die Tumorzellen meist fehlen, sind diese empfindlicher gegenüber energiereichen Strahlen. Hier kommen vor allem ionisierende Strahlen zum Einsatz. Durch die Erzeugung von Radikalen im Tumorgewebe wird dort das Erbgut der Zellen so weit geschädigt, dass diese apoptotisch werden. Dies ist besonders in stark vaskularisierten Tumoren erfolgreich, da der im Blut enthaltene Sauerstoff leicht zu ionisieren ist.

Das dritte Standbein der klassischen Tumorthherapie wird landläufig als Chemotherapie bezeichnet. Hier wird vor allem mit Zytostatika gearbeitet, die die Teilung von Zellen auf verschiedene Weisen inhibieren. Diese Inhibition der Proliferation trifft vor allem Tumorzellen, da diese eine sehr hohe Proliferationsrate besitzen. Allerdings befinden sich im Körper auch andere, nicht entartete Zellen, die schnell proliferieren und die ebenfalls im Rahmen dieser Therapie geschädigt werden. Bekannt sind daher auch die Nebenwirkungen dieser Therapie, wie Haarausfall und Diarrhö. Bedingt sind diese eben dadurch, dass auch die Follikelzellen der Haarwurzeln und die Epithelzellen des Darms durch ihre hohe Teilungsrate stark anfällig für Zytostatikabehandlungen sind.

Die therapeutischen Ziele einer Chemotherapie können in vier Gruppen unterteilt werden (siehe Abbildung 1.2):

- kurative Therapie
- adjuvante Therapie
- neoadjuvante Therapie
- palliative Therapie

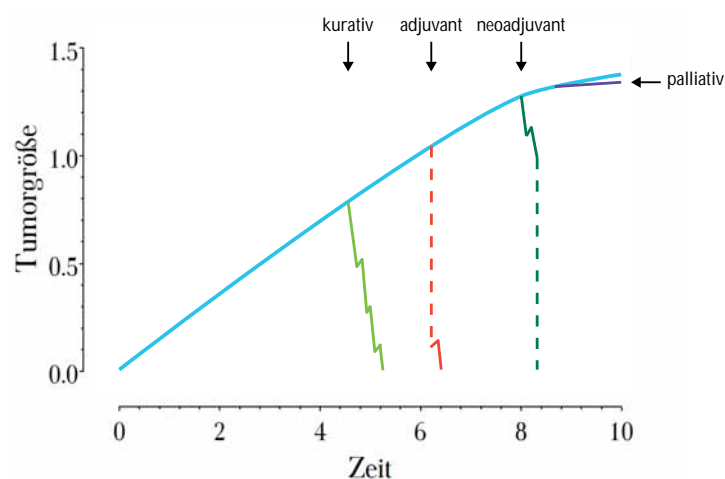


Abbildung 1.2: Therapeutische Ziele einer Chemotherapie. Chemotherapie in der Tumorbehandlung kann grundsätzlich mit vier Zielen appliziert werden. Das Idealziel ist die kurative Behandlung, die den Tumor vollständig vernichtet (hellgrün). Weit häufiger wird Chemotherapie als adjuvante Therapie eingesetzt. Hier wird die Tumormasse chirurgisch entfernt und eventuell verbleibende Tumorzellen sowie Mikrometastasen mittels Chemotherapie bekämpft (rot). Auch ein neoadjuvanter Einsatz ist gebräuchlich. Hier wird ein inoperabler Tumor mittels chemotherapeutischer Behandlung so weit geschrumpft, bis er eine operable Größe erreicht und chirurgisch entfernt werden kann (dunkelgrün). Doch recht häufig kann Chemotherapie nur noch palliativ eingesetzt werden, also den Tumor allenfalls noch in der Wachstumsgeschwindigkeit hemmen, den Patienten aber nicht mehr retten (lila).

Modifiziert nach Freissmuth *et al.* (2012)

Das Idealziel jeder Chemotherapie ist die Heilung der Krebserkrankung. Dieses kurative Ziel der Therapie kann vor allem mit Therapieschemata, die mehrere Chemotherapeutika beinhalten, erreicht werden. Notwendig ist dies vor allem deswegen, weil ein Tumor mit einem Volumen von nur 1 cm^3 rund 10 Millionen Zellen beinhaltet (Del Monte, 2009). Durch die genetische Instabilität von

Tumorzellen, ist die Variabilität der Resistenzen dort recht hoch (Cahill *et al.*, 1999). Eine Monotherapie stellt demnach lediglich eine Selektion für die entsprechenden Resistenzen dar. Erst eine Kombination mehrere Therapeutika kann in der Lage sein alle Zellen zu vernichten. Problematisch ist allerdings auch, dass zahlreiche Wirkmechanismus-unabhängige Resistenzmechanismen existieren. Bekannt ist dabei vor allem die *multiple drug resistance* (MDR). Hier besitzen Tumorzellen *per se* oder entwickeln unter Behandlung eine große Zahl an ABC-Transportern, die Medikamente wieder aus den Zellen ausschleusen (Ueda *et al.*, 1987).

Ist der Tumor operabel, wird meist nach der Resektion der Tumormasse mit Chemotherapie behandelt. Dadurch sollen zunächst eventuell bei der Operation nicht entfernte Tumorzellen abgetötet werden und darüber hinaus potentiell vorhandene und dormante Mikrometastasen zerstört werden, da deren Auswachsen zu Makrometastasen ein bekanntes Phänomen nach der Resektion des Primärtumors ist (Fisher *et al.*, 1983; Peeters *et al.*, 2006). Im Falle eines inoperablen Tumors, beispielsweise aufgrund seiner Größe oder Invasivität, kann dieser durch eine neoadjuvante Chemotherapie in einen operablen Zustand gebracht und anschließend reseziert werden. Als letzte Möglichkeit steht die lebensverlängernde, aber keine Heilung des Patienten mehr versprechende, palliative Chemotherapie zur Verfügung.

Die Wahl der richtigen Behandlung erweist sich in der Klinik allerdings oft als problematisch. So ist beispielsweise die Effizienz einer Brustkrebsbehandlung nicht nur von der Klassifizierung der Krebserkrankung abhängig (Colleoni *et al.*, 2008; Mathieu *et al.*, 2012; Bauer *et al.*, 2010), sondern sogar vom Bildungsstand der Patientin (Helgeson *et al.*, 2000) und dem geographischen Behandlungsort (Farrow *et al.*, 1992). Während ein Teil der Patienten von einer bestimmten Standardtherapie profitiert, kann eben jene Therapie für einen anderen Teil einen konträren Effekt erzielen.

1.2.2 Experimentelle Therapien

In experimentellen Phasen befinden sich außerdem die Gentherapie, sowie die Immuntherapie. Die Gentherapie eröffnete 2003 ein neues Kapitel im Kampf gegen Krebs, als der erste Wirkstoff, Gendicine, in China zur Behandlung von Hals-Nasen-Ohren-Tumoren zugelassen wurde (Wilson, 2005). Im Falle von Gendicine wird mittels eines nicht-replikationsfähigen Adenovirus das Gen für ein funktionelles p53-Protein in die Zellen eingebracht und so die Tumorzellen in die Apoptose gezwungen.

Die Immuntherapie besitzt eine wesentlich längere Historie. So entdeckte bereits im 19. Jahrhundert der New Yorker Chirurg William Coley, dass in einigen wenigen Fällen eine bakterielle Infektion der Patienten einen Rückgang der Tumormasse zur Folge hatte (Nauts, 1989). Vermutet wird hier, dass durch Aktivierung des Immunsystems gegen den bakteriellen Erreger, der Tumor ins Kreuzfeuer der Immunzellen gerät und dadurch teilweise bekämpft wird. In neueren Ansätzen werden hier beispielsweise zuvor entnommene T-Lymphozyten *in vitro* aktiviert und dem Patienten re-injiziert. Diese aktivierten T-Lymphozyten sind dann in der Lage Tumorzellen zu zerstören (Mazumder und Rosenberg, 1984). Sowohl für die Genterapie als auch für die Immuntherapie eröffnet dabei die Möglichkeit der next-generation-Sequenzierung des Patientengenoms völlig neue, da personalisierte, Therapieansätze (Rivenbark *et al.*, 2013).

1.3 Tumorangiogenese, Tumervaskulatur und Hypoxie

1963 versuchten Folkman *et al.* auf der Suche nach einem Ersatz für Bluttransfusionen, Schilddrüsen von Hunden mit einer Hämoglobin-haltigen Lösung am Leben zu erhalten. Dabei injizierten sie in diese auch Maus-Melanomzellen, um zu testen, ob diese isolierten Organe in der Lage sind, Tumorstadium zu fördern. Die so erhaltenen Tumoren wuchsen bis zu einer Größe von maximal 1-2 mm im Durchmesser (Folkman *et al.*, 1963). 1972 erkannten Gimbrone *et al.*, dass das Wachstum von Tumoren abhängig von der Bildung neuer Blutgefäße ist (Gimbrone *et al.*, 1972). In seinen Experimenten implantierte er Tumorfragmente in die Cornea von Kaninchen und beobachtete die Vaskularisierung dieser Implantate. Dieses Einwachsen von Blutgefäßen hatte ein starkes Tumorstadium zur Folge. Bei Implantation in die *Camera anterior bulbi* waren angiogenetische Ereignisse durch die räumliche Trennung vom bestehenden Blutgefäßsystem unmöglich und die Versorgung konnte ausschließlich durch Diffusion ermöglicht werden. Hier erreichte das Implantat eine maximale Größe von etwa einem Millimeter im Durchmesser. Das Wachstum von Tumoren war also von der Vaskularisierung abhängig.

Die Bildung eines Gefäßsystems kann dabei durch zwei Prozesse erfolgen:

- zum einen durch die **Vaskulogenese**, bei der aus mesodermalen Stammzellen *de novo* Angioblasten gebildet werden. Diese formen nachfolgend ein primitives Gefäßsystem ohne Lumen (Sabin und Sabin, 2002). Dieser Prozess spielt vor allem bei der Ausbildung des vas-

kulären Plexus während der Embryogenese eine Rolle.

- zum anderen durch die **Angiogenese**. Dabei werden vier unterschiedliche Arten von Angiogenese unterschieden: die sprossende Angiogenese, Angiogenese durch Invagination, die Weitung und Elongation, sowie die Angiogenese durch die Integration von im Blutstrom zirkulierenden Angioblasten. Angiogenetische Prozesse sind vor allem in der Wundheilung bzw. in der Vaskularisierung von Tumoren zu finden.

Die Stimulation mit einem pro-angiogenetischen Faktor führt zu einer Aufweitung eines bestehenden Blutgefäßes. Nach dieser Aufweitung wird durch die antagonistisch wirkenden Notch-Liganden Dll4 und Jagged1 eine einzelne Endothelzelle als „Tipzelle“ selektiert (Benedito *et al.*, 2009). Anschließend wird im Bereich dieser „Tipzelle“ die Basalmembran des Blutgefäßes degradiert, wobei sich auch das Blutgefäß umgebende Perizyten ablösen. Nach Verlust der Zell-Zell-Kontakte zu den Nachbar-Endothelzellen beginnt die „Tipzelle“ in Richtung des pro-angiogenetischen Signals, mit Hilfe eines Umbaus der extrazellulären Matrix, zu wandern. Sogenannte „Stalk-Zellen“ folgen der „Tipzelle“ und proliferieren dabei. Die dabei stattfindende Elongation des neuen Gefäßes wird von der Bildung eines Lumens begleitet. Perizyten werden dabei von proliferierenden „Stalk-Zellen“ rekrutiert und stabilisieren so das neu gebildete Gefäß. Nach Fusion mit einem Nachbargefäß wird das neu gebildete Blutgefäß perfundiert, was dazu führt, dass das Endothel in einen Ruhezustand verfällt. In diesem werden erneut starke Zell-Zell-Kontakte ausgebildet und eine Basalmembran zwischen Endothel und Perizyten sezerniert (Carmeliet und Jain, 2011).

Wirft man einen genaueren Blick auf die Morphologie der Vaskulatur in einem Tumor und vergleicht diese mit der Vaskulatur von normalen Gewebe, fällt auf, dass sich das Gefäßsystem im Tumor klar vom normalen Gefäßbild unterscheidet. Während sich die Vaskulatur in ursprünglichen Geweben hierarchisch in Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen und Venen gliedern lässt und dabei höchstgradig geordnet erscheint, ist die Vaskulatur in Tumoren geprägt von einem chaotischen Aufbau (vergleiche Abbildung 1.3). Gekennzeichnet ist dieser Aufbau durch eine nicht-hierarchische Gliederung, sowie einem unregelmäßigem Netzwerk der Blutgefäße, welche eine erhöhte Permeabilität aufweisen (Peterson, 1979). Dieses defekte Gefäßbild hat zur Folge, dass der Blutstrom im Tumor das Gewebe nicht ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen kann und sich deswegen oft, ab einer gewissen Größe des Tumors, hypoxische und nekrotische Bereiche determi-

nieren lassen (Jain, 1988a, 1989; Brown *et al.*, 2001). Auch lässt sich oft ein oszillierender Blutstrom im Tumor nachweisen (Chaplin *et al.*, 1987).

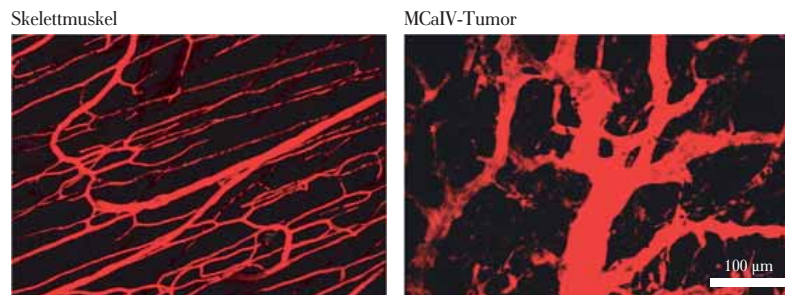


Abbildung 1.3: Vergleich der Tumervaskulatur mit Blutgefäßen im Muskel. 2-Photonenaufnahme von Blutgefäßen im normalen Muskel einer Maus und einem Tumor. Während im Muskel das Gefäßbild geordnet erscheint, ist die Vaskulatur des Tumors geprägt von erweiterten Gefäßen und einer chaotischen Anordnung. Verändert nach Tong *et al.* (2004)

Doch nicht nur bei Betrachtung auf makroskopischer Ebene erscheint die Morphologie der Vaskulatur im Tumor defizient, auch auf mikroskopischer Ebene zeigen sich Abnormitäten, die die Versorgung des Gewebes behindern. Native Blutgefäße besitzen eine geschlossene Schicht aus Endothelzellen, die den Intravasalraum des Gefäßes vom umliegenden Gewebe abgrenzt. Dieses einschichtige Epithel sitzt auf einer Basallamina auf und verfügt über Adhärenskontakte aus VE-Cadherin, sowie über *tight* und *gap junctions* (Dejana *et al.*, 1995; Vestweber, 2008). Subendothelial schließt sich nun, alters- und gefäßabhängig, eine Schicht aus Muskelzellen oder Perizyten an, ein Charakteristikum reifer Blutgefäße.

Im Gegensatz dazu zeigen Blutgefäße im Tumor meist einen unreifen Zustand ohne Besatz mit stabilisierenden Perizyten (Morikawa *et al.*, 2002). Eine weitere Abweichung von der Norm kann die Dicke der umgebenden extrazellulären Matrix sein, sowie die unzureichende Auskleidung mit Endothelzellen. Dabei lassen sich im Endothel oft Lücken und sogenannte Fenster beobachten (Baluk *et al.*, 2005). Als Konsequenz aus diesen Anomalien zeigen Blutgefäße im Tumor eine starke Neigung zur Hämorrhagie ins umliegende Gewebe, was zu Hämatomen führt und auch die Bildung von Thrombosen begünstigt (Nagy *et al.*, 2010).

Die Ausbildung von Blutgefäßen ist ein höchstgradig regulierter Prozess, der im adulten Menschen beispielsweise in der Wundheilung zu finden ist (Knighton *et al.*, 1981; Nissen *et al.*, 1998). Wichtig für die korrekte Ausbildung des Gefäßsystems ist dabei das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-

angiogenetischen Signalen (Benjamin *et al.*, 1999; Ferrara und Alitalo, 1999). Gestartet wird der angiogenetische Prozess in der Wundheilung durch Signale während der inflammatorischen Phase (Velnar *et al.*, 2009). In die Wunde einwandernde Zellen des Immunsystems schütten dabei Cyto- und Chemokine aus, die die Proliferation und Migration von Endothelzellen fördern.

Auch in Tumoren kommt der Ausschüttung von inflammatorischen Cyto- und Chemokinen durch Tumor-assoziierte Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Angiogenese zu (Wahl und Kleinman, 1998). So ist die exzessive Sekretion pro-inflammatorischer Stoffe ein starker Aktivator von Proliferation, Migration und Angiogenese in Tumoren (Mantovani *et al.*, 2006). Diese hoch-inflammatorische Umgebung im Tumor gleicht dabei stark den physiologischen Bedingungen, die eben auch während der Wundheilung herrschen. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass die **Neovaskularisierung** eines Tumors sehr stark der **Revaskularisierung**, die während der Wundheilung statt findet, ähnelt (Iyer *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2004). Ein Aspekt, der dazu führte, dass Tumoren als nicht-heilende Wunden bezeichnet wurden (Dvorak, 1986). Dies ist eine Sichtweise, die Harold Dvorak 1986 postulierte und die retrospektive von Schäfer und Werner (2008) und Anderen als korrekt betrachtet wurde. Entscheidend für die Morphologie der Vaskulatur im Tumor ist allerdings der Unterschied zwischen diesen beiden Prozessen. Während im Laufe der Wundheilung pro-angiogenetische Faktoren rereguliert oder endogen inhibiert werden, geschieht dies im Tumor nicht (Gasparini *et al.*, 1997; Lalla *et al.*, 2003; Kidd *et al.*, 2010). Dieses Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenetischen Faktoren im Tumor führt zu einer defizienten und defekten Vaskulatur.

Als prominentester und bekanntester pro-angiogenetischer Faktor gilt hierbei der *vascular endothelial growth factor-A* (VEGF-A). Eine wichtige und mittlerweile gut dokumentierte Eigenschaft von VEGF-A ist die Induktion der endothelialen Proliferation (Leung *et al.*, 1989; Connolly *et al.*, 1989; Conn *et al.*, 1990; Goto *et al.*, 1993). Eine zweite wichtige Funktion von VEGF-A ist dessen Funktion als Überlebensfaktor für neu-gebildete Blutgefäße (Alon *et al.*, 1995). Dabei sind zur Formation und zum Erhalt von Blutgefäßen wechselnde Phasen zwischen Induktion und Inhibition der Angiogenese nötig (O'Reilly *et al.*, 1997). Als direkter Antagonist zu VEGF-A wirkt dabei vor allem *soluble* VEGFR1 (sVEGFR1) (Tolsma *et al.*, 1993; Kendall und Thomas, 1993). Weitere Angiogenese-inhibierende Faktoren sind beispielsweise Thrombospondin, Endostatin und Angiostatin. Da intratumoral nicht nur erhöhte Level an VEGF-A, sondern auch signifikant reduzierte an Antagonisten wie eben Thrombospondin oder sVEGFR1 detektiert werden (Good *et al.*, 1990; Volpert *et al.*, 1995; Lawler, 2002; Jain, 2003), könnte eben dieses Ungleichgewicht einer der Gründe für die defiziente Vaskulatur in Tumoren sein.

Für die Signaltransduktion von VEGF-A zeigen sich zwei Rezeptor-Tyrosinkinasen verantwortlich: VEGFR-1 und VEGFR-2. Daneben existiert mit den Neuropilinen noch eine Reihe an Co-Rezeptoren (Neufeld *et al.*, 1999). Diese Rezeptoren werden recht unterschiedlich exprimiert. Während VEGFR-2 vor allem auf lymphatischen und vaskulären Endothelzellen zu finden ist, wird VEGFR-1 auf einer Vielzahl von Zellen, wie haematopoetischen Stammzellen, Monozyten, Makrophagen und vaskulären Endothelzellen präsentiert (Holmes *et al.*, 2007). Die durch den VEGFR-1 vermittelte Signalkaskade ist dabei für Umstrukturierungsereignisse der Vaskulatur verantwortlich (Fong *et al.*, 1995). VEGFR-2-Signale spielen vor allem bei Migration, Proliferation, Differenzierung und dem Überleben von Endothelzellen eine Rolle (Matthews *et al.*, 1991).

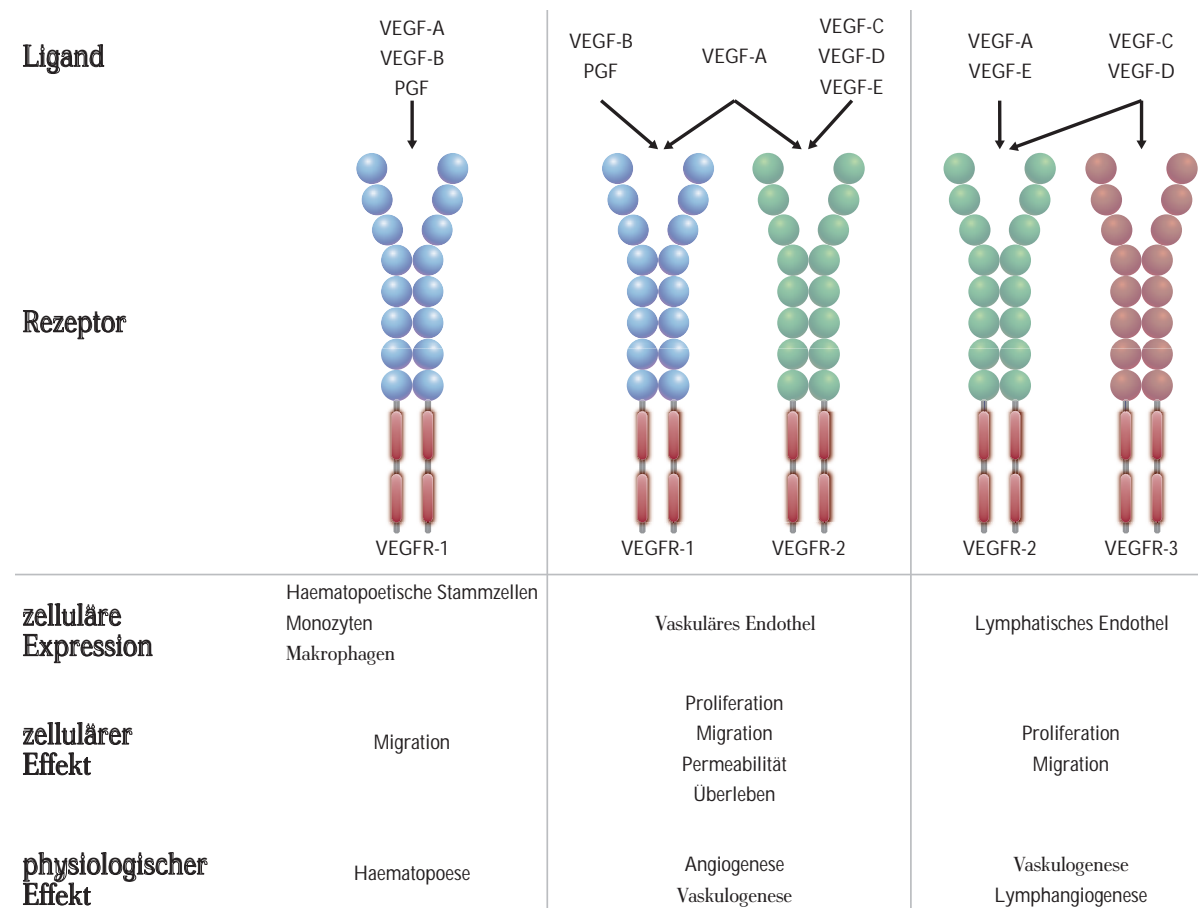


Abbildung 1.4: Schematische Übersicht über VEGF und seine Rezeptoren. Jeder der VEGF-Liganden (VEGF-A, B, C, D und E, sowie PGF) bindet auf eine spezifische Weise an eine der drei Rezeptor-Tyrosinkinasen VEGFR-1, -2 oder -3. Diese unterscheiden sich im Expressionsmuster zwischen verschiedenen Zelltypen. Ebenfalls dargestellt sind die downstream-Effekte auf die einzelnen Zellen nach Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinasen, sowie die resultierenden physiologischen Effekte.

VEGF= *vascular endothelial factor*, VEGFR = *VEGF receptor*, PGF = *placental growth factor*; Modifiziert nach Holmes *et al.* (2007)

Neben dem hauptsächlich für die Signalgebung von angiogenetischen Prozessen verantwortlichen Liganden / Rezeptor-Paar VEGF-A und VEGFR-2, spielen weitere Liganden der Rezeptor-Tyrosinkinase VEGFR-2 wie VEGF-C, -D und -E bei diesen und anderen Signalwegen eine Rolle (Park *et al.*, 1994; Olofsson *et al.*, 1998). Eine Übersicht über VEGF-Liganden, ihre Rezeptoren, deren Expressionsmuster, sowie die zellulären und physiologischen Folgen ihrer Signalgebung liefert Abbildung 1.4.

Die Regulation der VEGF-A-Expression erfolgt vor allem durch zwei Wege: zum einen über den Sauerstoff-Partialdruck und zum anderen über Wachstumsfaktoren wie beispielsweise FGF (Seghezzi *et al.*, 1998). Die Expressionskontrolle über den Sauerstoffpartialdruck erfolgt dabei über den *hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1) (Iyer *et al.*, 1998). HIF-1 ist ein Heterodimer aus dem Hypoxie regulierten HIF-1 α und dem konstitutiv exprimierten Faktor HIF-1 β . In Anwesenheit von Sauerstoff hydroxylieren Prolyl-Hydroxylasen HIF-1 α (Ivan *et al.*, 2001). Diese Modifikation wiederum ermöglicht die Bindung an den Von-Hippel-Lindau-Komplex. Die Interaktion mit diesem Komplex bewirkt die Ubiquitinierung von HIF-1 α , welche dieses für das Proteasom markiert und so zu dessen Degradation führt (Cockman *et al.*, 2000). In Abwesenheit von Sauerstoff erfolgt diese Hydroxylierung und damit die Degradation nicht und HIF-1 α bindet HIF-1 β , um den HIF-1-Komplex zu formen. Dieser Komplex translokiert in den Zellkern, bindet dort an *hypoxia response elements* (HRE) und bewirkt so die Expression von Genen wie VEGF-A und dessen Rezeptor VEGFR-2 (Wang *et al.*, 1995; Forsythe *et al.*, 1996; Gerber *et al.*, 1997). Innerhalb von Tumoren kommt es durch Hypoxie und/oder genetische Veränderungen zu einer massiven Überexpression von HIF-1 α (Zhong *et al.*, 1999; Talks *et al.*, 2000; Wiesener *et al.*, 2001). Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Überexpression von HIF-1 α auch zu erhöhten Leveln an VEGF-A innerhalb des Tumors führt und dies einer der Schlüssel zur Vaskularisierung von Tumoren ist (Zagzag *et al.*, 2000; Bos *et al.*, 2001; Giatromanolaki *et al.*, 2001).

1.4 Hypothese der Gefäßnormalisierung

Aus seinen Beobachtungen zur Tumorangio-genese und der Inhibition des Tumorwachstums, wenn diese behindert war, schlug Folkman die Tumolvaskulatur als therapeutisches Ziel zur Bekämpfung von Krebs vor, mit dem Ziel den Tumor komplett auszuhungern (Folkman, 1971). Mit der Entdeckung von VEGF-A (als *vascular permeability factor* / VPF) durch die Gruppe von Harold Dvorak Anfang der 80er-Jahre und der Klonierung und Charakterisierung durch die Gruppe Napoleon Ferrara's 1989 war auch ein mögliches Zielprotein für die von Judah Folkman 1971 vorgeschlagene anti-angiogenetische

Therapie gefunden (Folkman, 1971; Senger *et al.*, 1983; Leung *et al.*, 1989). Die Hoffnung bestand durch Blockade der Signalkaskade von VEGF-A und seinem Rezeptor VEGFR-2 die Vaskulatur des Tumors zu zerstören und auf diese Weise Krebs zu heilen. Diese Idee führte mehr als drei Jahrzehnte nach Folkman's Vorschlag zur Zulassung des monoklonalen VEGF-Antikörpers Bevacizumab durch die *Food and Drug Administration* (FDA) (Hurwitz *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2007). Es folgten bald darauf die Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren Sunitinib (Demetri *et al.*, 2006; Motzer *et al.*, 2006) und Sorafenib (Abou-Alfa *et al.*, 2006; Escudier *et al.*, 2007), sowie einige andere. Allen gemeinsam ist jedoch, dass sie zwar, in Kombination mit einem Chemotherapeutikum, das Leben der Patienten im Bereich von mehreren Monaten verlängern können, jedoch das ursprüngliche Ziel Krebs zu heilen nicht erfüllen konnten (Kerbel, 2008). Des Weiteren mehren sich die Beweise, dass eine anti-angiogenetische Therapie die Metastasierung beschleunigt und die Invasivität eines Tumors signifikant erhöhen kann (Ebos *et al.*, 2009; Pàez-Ribes *et al.*, 2009). Dies ist vor allem deswegen ein Problem, da sich vor allem die Metastasierung und eher selten der Primärtumor für die Letalität von Krebserkrankungen verantwortlich zeichnet (Gupta und Massagué, 2006).

Interessant war allerdings die Beobachtung, dass VEGF-Inhibitoren in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika deren Effizienz signifikant erhöhten (Teicher, 1996; Hurwitz *et al.*, 2004; Sandler *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2007). Eine Tatsache, die dazu führte, das beispielsweise Bevacizumab in der Europäischen Union und den USA nur für Kombinationstherapien mit Chemotherapeutika zugelassen wurde (einzige Ausnahme für eine Monotherapie mit Bevacizumab ist das rezidivierende Glioblastoma multiforme (Cohen *et al.*, 2009)). Basierend auf den Beobachtungen von Teicher 1996 (der erstmals zeigte, dass die Kombination einer anti-angiogenetischen Therapie mit einer zytotoxischen Therapie deren Effizienz erhöhte) und dem Wissen um die defiziente Vaskulatur im Tumor, postulierte Rakesh K. Jain 2001 seine Hypothese zur Tumolvaskulatur-„Normalisierung“ (Jain, 2001). Jain geht bei seiner Hypothese davon aus, dass durch die Verwendung eines VEGF-Inhibitors das exzessive Übergewicht von pro-angiogenetischen Faktoren abgefangen wird und so ein neues Gleichgewicht von pro- und anti-angiogenetischen Faktoren entsteht. Dieses Gleichgewicht führt dann zu einer vorübergehenden „Normalisierung“ der Vaskulatur. Dieses verbesserte Gefäßsystem führt subsequent zu einer erhöhten Einbringung von Therapeutika in den Tumor. Dass diese Hypothese zumindest in Mausmodellen zutrifft, konnte zwischenzeitlich durch hochauflösende *in vivo*-Mikroskopie bestätigt werden (Vakoc *et al.*, 2009). Doch bereits Jain selbst erkannte die therapeutischen Grenzen dieser Theorie. Bei Gabe einer zu starken Dosis anti-angiogenetischer Medikation stirbt schnell eine zu große Zahl an Gefäßen im Tumor ab, was zu Hypoxie, Nekrose

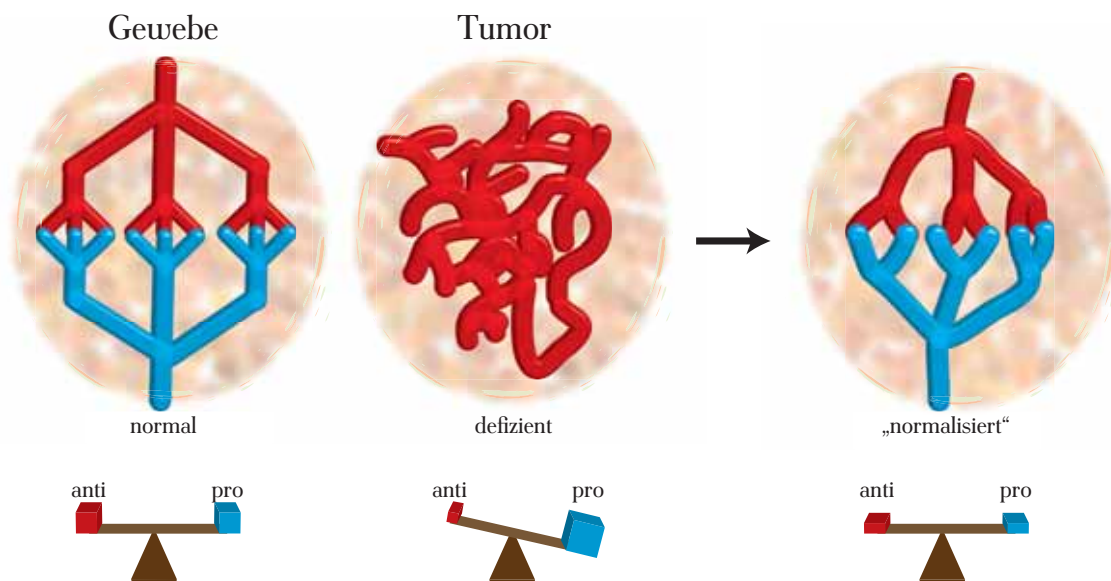


Abbildung 1.5: Schema des Konzepts der „Gefäßnormalisierung“. Übersicht über die von Rakesh K. Jain entwickelte Theorie der „Gefäßnormalisierung“. Im normalen Gewebe herrscht ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenetischen Faktoren. Dies führt zu einer hierarchisch gegliederten Vaskulatur, die eine optimale Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen sowie Sauerstoff gewährleistet. Die inflammatorische Umgebung im Tumor bewirkt ein starkes Ungleichgewicht zugunsten pro-angiogenetischer Stoffe, was zu einem ständigen Remodelling der Vaskulatur führt. Die Blutgefäße bleiben dabei in einem unreifen Zustand, das Gefäßsystem zeigt keine hierarchische Gliederung und kann so das Gewebe nicht ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen. Die daraus resultierende Hypoxie und nekrotische Bereiche begünstigen dabei den Erhalt der Inflammation. Durch Behandlung mit einem VEGF-Inhibitor wird ein Teil des pro-angiogenetischen Signals entfernt und das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenetischen Stoffen, zumindest begrenzt, wieder hergestellt. Die Folge kann eine „Normalisierung“ der Tumolvaskulatur sein. Dabei sind die Gefäße in einem reiferen Zustand, sowie besser strukturiert. Resultierend ist die Versorgung des Gewebes verbessert, die Hypoxie nimmt ab und die Einbringung von Medikamenten in das Tumorgewebe wird erhöht.

Modifiziert nach Jain (2001)

und verzögertem Tumorwachstum führt. Gerade die hypoxische Umgebung kann aber wiederum die Metastasierungsrate und Invasivität des Tumors erhöhen (Ebos *et al.*, 2009; Pàez-Ribes *et al.*, 2009). Auf der anderen Seite kann die Tumolvaskulatur nach einer „Normalisierungsphase“ wieder den Phänotyp der chaotischen Vaskulatur zeigen, wenn der Tumor resistent gegen die anti-angiogenetische Therapie wird. Dies könnte beispielsweise durch die Aktivierung alternativer angiogenetischer Signalwege geschehen. Dennoch stellt die Kombinationstherapie von Bevacizumab und einem Chemotherapeutikum eine entscheidende Verbesserung der Medikamenteneinbringung in den Tumor dar.

1.5 Einbringung von Medikamenten in solide Tumoren

Zur systemischen Behandlung eines Tumors muss ein Anti-Tumormedikament vor allem zwei Grundvoraussetzungen erfüllen. Zum einen muss es *in vivo* in der ungewöhnlichen Mikroumgebung eines Tumors effektiv sein und zum anderen muss es die Tumorzellen in einer therapeutisch wirksamen Dosis erreichen. Dabei spielen mehrere Faktoren eine Rolle und beeinflussen, in unterschiedlichen Maßen, die Menge an Medikament, die tatsächlich Tumorzellen erreicht. Eine Übersicht über beteiligte Faktoren gibt Abbildung 1.6.

Systemisch verabreichte Medikamente erreichen den Tumor über das Blutgefäßsystem. Haben sie den Tumor erreicht, muss ein Übertritt des Stoffes durch die Wand des Blutgefäßes in das Tumorgewebe statt finden. In einem nächsten Schritt muss es - entweder durch Zellen oder durch extrazelluläre Räume - zu den Tumorzellen gelangen und von diesen aufgenommen werden. Jeder dieser Schritte für sich stellt pharmakologisch unterschiedliche Herausforderungen an das verwendete Molekül oder den Partikel.

Wirkstofftransport über das Blutgefäßsystem

Die Gabe der meisten Chemotherapeutika erfolgt intravenös oder peroral/entoral. Die systemische Verteilung erfolgt jedoch in beiden Fällen über das vaskuläre Kompartiment. Oral verabreichte Medi-

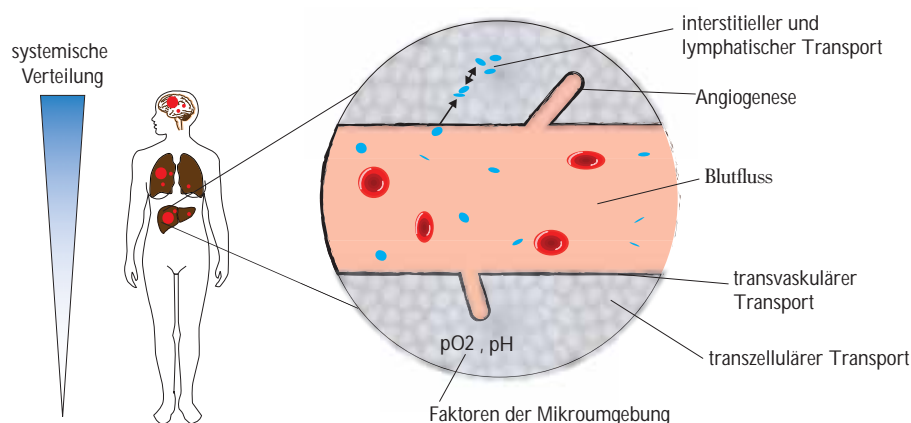


Abbildung 1.6: Schematische Übersicht über Faktoren, die den Wirkstofftransport in den Tumor beeinflussen. Der Transport von Wirkstoffen in den Tumor muss als mehrschrittiger Prozess verstanden werden. So spielen neben der systemischen Verteilung auch Prozesse im Tumor selbst eine Rolle. Zum einen der Blutfluss im Tumor, durch den der Transport bereits erheblich limitiert sein kann. Dann der Austritt des Medikamentes über die Vaskulatur, bis hin zum interstitiellen, lymphatischen oder transzellulären Transport im Gewebe selbst. Dort spielen auch Faktoren wie der Sauerstoffpartialdruck oder der pH-Wert eine Rolle.

Adaptiert nach Jain (2012)

kamente müssen dazu entweder über die Schleimhäute in Mund oder Magen oder über das Epithel des Darms resorbiert werden. Intravenös verabreichte Therapeutika müssen diese Hürde nicht nehmen, sondern gelangen direkt in den Blutstrom. Dort werden Medikamente von Albuminen oder anderen Serumproteinen gebunden (Sudlow *et al.*, 1976; Ghuman *et al.*, 2005). Dies hat vor allem eine Konsequenz: das gebundene Medikament wird nach und nach wieder freigesetzt (Depotwirkung) und verbleibt so für einen bestimmten Zeitraum im Patienten. Die Bindung an Serumproteine verhindert auch, in einem gewissen Maße, die renale Ausscheidung und den hepatischen Abbau (Kratz, 2008). Allerdings wird dadurch auch jeglicher Transport über Transporterproteine inhibiert (ebenda).

Systemische Distribution von Medikamenten

Die Durchblutung und die mittlere Durchblutungsgeschwindigkeit sind maßgeblich für die Verweildauer von Medikamenten in den einzelnen Organen. Gut durchblutete Organe wie die Lunge werden dabei schneller von Medikamenten erreicht als weniger gut durchblutete Bereiche wie Fettgewebe. Entscheidend für den Übertritt ins jeweilige Gewebe ist dann vor allem die Permeabilität des Endothels beziehungsweise die Fenestrierung des dortigen Kapillarsystems, sowie Faktoren wie die Lipophilie des Medikamentes oder der umgebende pH-Wert (Freissmuth *et al.*, 2012).

Einfluss der Tumervaskulatur

Das Vorhandensein und die Qualität der Vaskulatur ist für die Medikamenteneinbringung in den Tumor von großer Wichtigkeit (Liotta *et al.*, 1974; Skinner *et al.*, 1995). Kleine Tumoren mit einem Durchmesser von weniger als 2 mm werden dabei von der Vaskulatur des umliegenden Gewebes versorgt. Größere Tumoren aktivieren angiogenetische Prozesse, die zur Ausbildung von Mikrogefäßen führen (Folkman *et al.*, 1995). Das Blutgefäßsystem des Tumors besitzt dabei allerdings nicht den strengen hierarchischen Aufbau, der aus normalen Geweben bekannt ist. Die Gefäße sind heterogen im Gewebe verteilt, oft größer und stark durchlässig (Rubin und Casarett, 1966; Yamaura und Sato, 1974). Die daraus resultierenden Probleme sind in Abbildung 1.7 schematisch dargestellt. Die defiziente Vaskulatur resultiert in einer heterogenen Mikroumgebungsverteilung im Tumor. Dieser besteht, ab einer gewissen Größe, aus gut vaskularisierten Bereichen (vor allem in der Peripherie), aus hypovaskulären, semi-nekrotischen Bereichen (zwischen Peripherie und Zentrum) und einem avaskulären, nekrotischen, meist zentralen, Bereich (Jain, 1990). Bedingt wird dies vor allem durch den mangelnden Nährstofftransport ins Tumorzentrum, wobei Sauerstoff eine zentrale Rolle übernimmt. Diese Heterogenität der Blutgefäße resultiert auch in einer ungleichen Verteilung

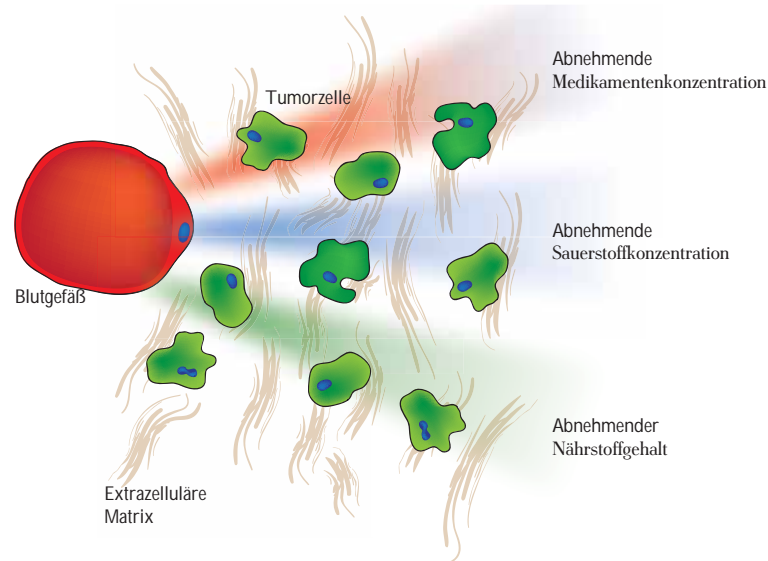


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der insuffizienten Versorgung durch Diffusion im Tumor. Durch eine unzureichende Dichte und mangelnde Qualität der Blutgefäße in Tumoren ergeben sich mehrere Probleme. So werden Tumorzellen, die zu weit für Diffusion von Blutgefäßen entfernt liegen, nur unzureichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Dies führt zu Regulationsprozessen in diesen Zellen, die zu einem aggressiveren Phänotyp führen. Ein weit größeres Problem stellt allerdings die nicht mehr pharmakologisch wirksame Konzentration an Medikamenten dar, die diese Zellen erreicht.

von Medikamenten im Tumor (Jain, 1988a). Deutlich wird diese Tatsache in den Bildern von Priemeau *et al.* (2005). Dieser untersuchte den Zusammenhang von Blutgefäßen und der Verteilung des gebräuchlichen Chemotherapeutikums Doxorubicin in soliden Maustumoren. Er konnte dabei zeigen, dass das Therapeutikum lediglich Areale um die Blutgefäße herum erreicht, jedoch einige Teile des Tumors vor dem Therapeutikum geschützt bleiben. Diese findet man vor allem um hypoxische Bereiche (vergleiche Abbildung 1.8). Diese geschützten Tumorzellen stellen die Therapie mit einem kurativen Ziel vor ein deutliches Problem.

Eine weitere Konsequenz, die sich aus der ungewöhnlichen Vaskularisierung von Tumoren ergibt, ist, dass durch die erhöhte Permeabilität der Tumorblutgefäße vermehrt intravasale Flüssigkeit in das Tumorgewebe gelangt. Dies führt zu einem erhöhten Druck der interstitiellen Flüssigkeit (*interstitial fluid pressure / IFP*) (Young *et al.*, 1950; Gullino *et al.*, 1964; Boucher *et al.*, 1991). Auch dieser erhöhte intratumorale Druck und die damit einhergehende peritumorale Ödem-Bildung erschweren die Einbringung von Medikamenten (Heldin *et al.*, 2004). Außerdem gibt es Indizien dafür, dass freiwerdende interstitielle Flüssigkeit aus dem Tumor Wachstumsfaktoren und Tumorzellen in das umliegende Gewebe transportiert und so die Progression des Tumors vorantreibt (Jain *et al.*, 2007). Dieser Prozess scheint sich dabei auch noch selbst zu verstärken, da der erhöhte IFP zu einer Kom-

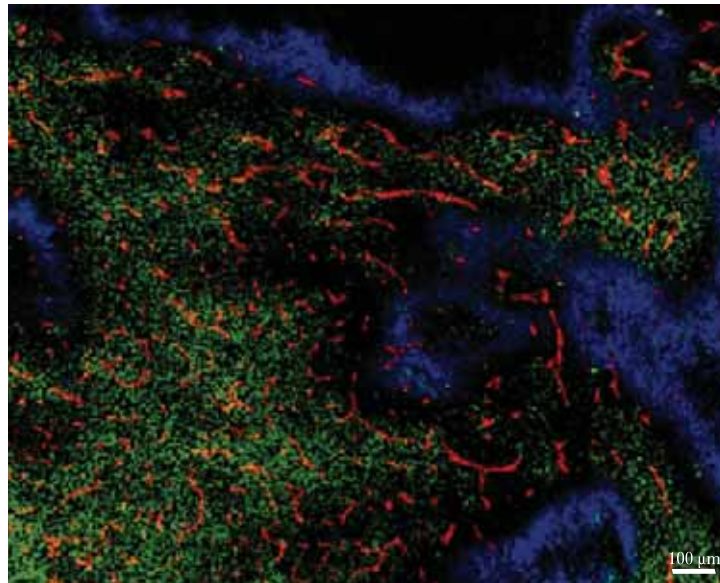


Abbildung 1.8: Perivaskuläre Verteilung des Chemotherapeutikums Doxorubicin in EMT6-Tumoren. Die heterogene Verteilung des Medikaments (grün) geht Hand in Hand mit der heterogenen Verteilung der Blutgefäße (rot). Durch Diffusion aus der Vaskulatur ist das Medikament dann auch nur in perivaskulären Bereichen zu detektieren. Um hypoxische Areale (blau) wird kein Medikament gefunden. Diese Tumorzellen sind vor der Behandlung aufgrund ihrer Lage geschützt. Abbildung adaptiert aus Primeau *et al.* (2005)

pression des lymphatischen Gefäßsystems führt und so der Abfluss überschüssiger interstitieller Flüssigkeit verhindert wird (Fukumura *et al.*, 2010).

Jedoch bietet die spezielle Morphologie der Tumorvaskulatur auch eine pharmakologische Nische. Durch den Austritt an Intravasal-Flüssigkeit, kommt es zum *enhanced permeability and retention effect* (EPR). Die Theorie zu diesem Effekt ist, dass durch die Permeabilität der Gefäße im Tumor, dort Therapeutika von einer molekularen Masse zwischen 15 und 70 kDa durch die endotheliale Schicht in das umliegende Gewebe diffundieren und sich dort anreichern können. Im Gegensatz dazu ist dies, wegen des korrekt ausgebildeten Endothels, in normalem Gewebe nicht möglich (Matsumura und Maeda, 1986). Nichtsdestotrotz sind Medikamente davon abhängig in den Tumor transportiert zu werden, um dort aus den Blutgefäßen zu den Tumorzellen zu gelangen. Der unzureichende Transport von Therapeutika stellt weiterhin ein Hemmnis auf dem Weg zur wirksamen Therapie von Krebs dar. Ein Schlüssel zur erfolgreichen Bekämpfung dieser Erkrankungen kann demnach in der Verbesserung der Medikamenteneinbringung zu finden sein.

1.6 Modifikation der Tumervaskulatur

Die Inhibierung des potentesten bekannten pro-angiogenetischen Wachstumsfaktors VEGF-A zeigte nicht den gewünschten Erfolg, nämlich die völlige Aushungerung des Tumors durch eine vollständige Zerstörung seiner Vaskulatur. Paradoxerweise eröffneten aber gerade die nicht-zufriedenstellenden Ergebnisse der anti-angiogenetischen Medikation einen völlig neuen Ansatz für die therapeutischen Möglichkeiten dieser Anwendung. Die hypothetische „Normalisierung“ lindert die Hypoxie des Tumors und könnte ihn so in einem nicht-invasiven Stadium halten, während zugleich die Einbringung von Medikamenten zur Bekämpfung der Tumorzellen erhöht wird. Problematisch ist dabei aber weiterhin die große Zahl an unbekanntem Variablen: Für welchen Patienten ist diese Therapie sinnvoll? Welche Dosis wird für den jeweiligen Patienten benötigt, um den gewünschten Effekt zu erzielen? Wie groß ist das Zeitfenster der verbesserten Einbringung?

Die große Zahl an Proteinen, die an der Signalkaskade des VEGF-Signalweges beteiligt ist, macht es auch wahrscheinlich, dass alternative Signale diesen an anderer Stelle aktivieren können. Dies ist eine der Möglichkeiten warum Tumoren nach einiger Zeit nicht mehr auf die anti-angiogenetische Therapie ansprechen. Drei wichtige durch VEGF-A-Bindung an VEGFR-2 ausgelöste Signalwege beinhalten die Enzyme c-Raf-1 (Takahashi *et al.*, 1999), die Phosphoinositid-3-Kinase (Dayanir *et al.*, 2001) und die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (Shu *et al.*, 2002) (siehe Abbildung 1.9), welche an der Vermittlung von Migrations-, Proliferations- und Überlebenssignalen beteiligt sind. Diese Signalwege können allerdings auch über alternative Faktoren wie den *tumor necrosis factor* (TNF) (aktiviert c-Raf-1) (Belka *et al.*, 1995) oder Integrin-vermittelte Signale (aktivieren beispielsweise die Phosphoinositid-3-Kinase) (Chekenya *et al.*, 2008) und viele weitere aktiviert werden.

1.7 Die extrazelluläre Matrix und ihr Einfluss auf den Tumor

Ein weiteres „Normalisierungs“ziel stellt die abnormale Mikroumgebung des Tumors dar. Im Mittelpunkt steht dort die extrazelluläre Matrix (EZM), jene Komposition aus Matrixproteinen und mit ihr assoziierten Faktoren, die nahezu alle Zellen umgibt. Diese Matrix besteht aus einer Vielzahl an Komponenten, von denen einige im Laufe der Metazoen-Evolution hoch konserviert blieben. Dies trifft vor allem auf diejenigen Proteine zu, die am Aufbau der Basallamina beteiligt sind, wie Typ IV Kollagen, Laminine, Nidogen, Perlekan und Typ XV/XVIII Kollagen (Whittaker *et al.*, 2006). Der

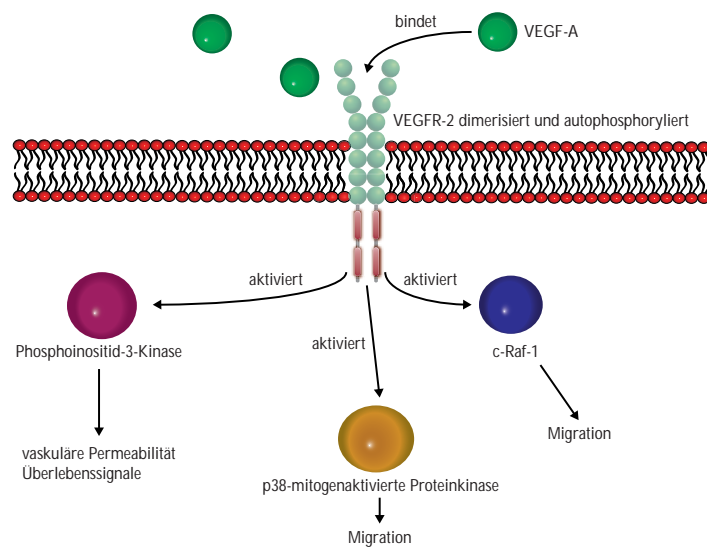


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung wichtiger durch das Liganden/Rezeptorpaar VEGF-A/VEGFR-2 aktivierter Signalwege und deren Wirkung in Endothelzellen. Die Bindung von VEGF-A an seinen Rezeptor VEGFR-2 führt zu dessen Dimerisierung und Aktivierung durch Autophosphorylation. Subsequent werden dann wichtige intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die beispielsweise die Enzyme c-Raf-1, Phosphoinositid-3-Kinase und p38-mitogenaktivierte Proteinkinase beinhalten.

Adaptiert nach Olsson *et al.* (2006)

direkte Vergleich der Zusammensetzung von normaler EZM und der EZM aus Tumoren hat gezeigt, dass sich beide entschieden voneinander unterscheiden (Naba *et al.*, 2012). Nach Beobachtungen, dass hochmolekulare Stoffe wie Antikörper, liposomale Medikamente oder virale Vektoren den Tumor nur unzureichend penetrieren, stand die EZM als möglicher Grund im Fokus einiger Gruppen (Netti *et al.*, 2000; McKee *et al.*, 2006). Dabei konnte 2009 *in vivo* gezeigt werden, dass fibrilläres Kollagen den Transport von 150 nm großen Partikeln direkt behindert (Perentes *et al.*, 2009). Ein Effekt der retrospektive mit diesem Wissen entdeckt wurde, war, dass Hypertonie-Patienten, die mit einem Angiotensin-2-Rezeptor-Inhibitor wie Losartan behandelt wurden, besser auf Chemotherapie ansprachen (Nakai *et al.*, 2010). Bedingt ist dies dadurch, dass Losartan die Aktivierung des *transforming growth factor* β (TGF β) inhibiert und so die Kollagenproduktion vermindert (Diop-Frimpong *et al.*, 2011). Ein Umstand der besonders beachtenswert erscheint, da erhöhte Level an Kollagen, Hyaluronan oder anderer Matrixproteine zu erhöhtem mechanischen Stress in Tumoren führen kann. Dieser erhöhte mechanische Stress kann dann die Tumorzellen in einen invasiveren Phänotypen überführen (Janet *et al.*, 2012; Stylianopoulos *et al.*, 2012). Der Abbau von Kollagenen durch in den Tumor injizierte Kollagenasen kann dagegen die Diffusionstiefe von systemisch verabreichten onkolytischen, viralen Partikeln deutlich erhöhen (McKee *et al.*, 2006). Dies zeigt, dass die Auflockerung der Matrix einen positiven Effekt auf den Transport von Substanzen in den Tumor

haben kann und zusätzlich die Zellen in einer mechanisch relaxierten Umgebung einen weniger invasiven Phänotypen aufweisen. Ein therapeutischer Ansatz mit dem Ziel die extrazelluläre Matrix eines Tumors aufzulockern, wäre demnach doppelt sinnvoll.

1.7.1 Lysyloxidasen

Ein wichtiger Faktor für die Stabilität der EZM ist die Quervernetzung von Proteinen innerhalb der Matrix (Harley *et al.*, 2007). Diese Quervernetzung wird beispielsweise durch Enzyme aus der Familie der Lysyloxidasen (LOX) bewerkstelligt. Diese besteht aus fünf Mitgliedern (LOX und den LOX-like-Proteinen 1 bis 4), welche dieselbe katalytische Funktion aufweisen, aber Unterschiede hinsichtlich Expressionsmuster und subzellulärer Lokalisation zeigen (Kenyon *et al.*, 1993; Saito *et al.*, 1997; Jang *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2001). Alle Isozyme sind dabei vor allem im C-terminalen Bereich stark konserviert (Csiszar *et al.*, 2002). Dieser Bereich beinhaltet neben einer Kupferbindestelle, eine Zytokinrezeptor-ähnliche Domäne und eine Lysine-Tyrosylquinon-Kofaktor-Bindestelle (*lysine tyrosylquinone cofactor site / LTQ*). Der N-terminale Bereich ist weniger stark konserviert und so werden vor allem die unterschiedlichen intrazellulären Regulationsaufgaben der einzelnen Familienmitglieder mit diesem Bereich assoziiert. Die Untersuchungen von LOX waren lange Zeit extrem limitiert, da es schwer löslich ist und dazu neigt Aggregate auszubilden. Ein Durchbruch brachten die Arbeiten von Narayanan *et al.* (1974). Er konnte zeigen, dass die Oxidase in Puffern mit 4-6 M Harnstoff gelöst und die Aktivität durch Entfernen des Harnstoffes wiederhergestellt werden konnte. Nachfolgend wurde LOX durch verschiedene Gruppen aus unterschiedlichen Geweben wie Knorpel (Stassen, 1976) oder humaner Plazenta (Kuivaniemi *et al.*, 1984) aufgereinigt und näher charakterisiert. Die dabei gefundenen molekularen Massen bewegten sich alle im Bereich um 32 kDa. Durch chromatographische Aufreinigung wurden jedoch weitere Größen detektiert und so mögliche Splicing-Varianten bzw. Isoformen entdeckt (Kagan, 1986). Anfang der 90er Jahre wurde dann die Prozessierung von LOX aufgeklärt (Trackman *et al.*, 1992; Cronshaw *et al.*, 1995). LOX wird dabei als *precursor* von 46,6 kDa von seiner mRNA translatiert. Im endoplasmatischen Retikulum (ER) wird das für den Transport dorthin verantwortliche Signalpeptid am N-Terminus abgespalten, was zu einer 44,5 kDa großen Version aus Propeptid und Peptid führt. Es folgen Modifizierungsschritte im ER und Golgi-Apparat wie eine N-Glykolisierung in der Propeptid-Region, sowie die Bindung von Kupfer und die Anlagerung des LTQ-Kofaktors. Nach Transport des nun 50 kDa großen Peptids in den extrazellulären Raum, spaltet die Prokollagen-C-Endopeptidase (auch bekannt als BMP1) den

Propeptid-Anteil ab und setzt so das 32 kDa große aktive Enzym frei (Trackman *et al.*, 1992). Das abgespaltene Propeptid scheint dabei über zahlreiche regulatorische Funktionen zu verfügen. So kann es beispielsweise die Proliferation von glatten Muskelzellen inhibieren (Hurtado *et al.*, 2008) oder nach Wiederaufnahme in die Zelle mit Hsp70 und c-Raf interagieren, um so den ERK-Signalweg zu inhibieren (Sato *et al.*, 2011). In vielen Krebserkrankungen ist dieser konstitutiv aktiviert (Hilger *et al.*, 2002) und Proteine seiner Signalkaskade sind demnach auch therapeutische Ziele (beispielsweise Sorafenib als raf-Inhibitor oder Combimetinib als MEK-Inhibitor).

Eine Möglichkeit die LOX-Familie zu inhibieren, bietet die Verwendung von β -Aminopropionitril (β APN) (Sampath Narayanan *et al.*, 1972). Allerdings gibt es hier Widersprüche in der Literatur. Während mindestens eine Gruppe behauptet, LOXL2 ließe sich nicht durch β APN inhibieren (Kim *et al.*, 2011), konnten Andere und auch unsere eigenen Experimente einen klaren Inhibitionseffekt auch für LOXL2 zeigen (Vadasz *et al.*, 2005; Barry-Hamilton *et al.*, 2010; Rodriguez *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2013).

1.7.2 Kollagene und Elastin

Die zwei wichtigsten Substrate für LOX(L)-Enzyme sind Kollagene und Elastin. Kollagene sind eine Multigen-Familie mit mindestens 45 Mitgliedern (Birk und Brückner, 2011). Sie sind dabei die häufigsten im menschlichen Körper vorkommenden Proteine und der Hauptbestandteil der EZM. Jedes Kollagenmolekül besteht dabei aus drei Polypeptidketten und besitzt mindestens eine Tripelhelix-Kollagendomäne aus (Gly-X-Y)-Bausteinen. Die für diese Tripelhelix nötigen Polypeptidketten werden im rauen endoplasmatischen Retikulum als Pro- α -Ketten mit N- und C-terminalen Propeptidsequenzen synthetisiert. Innerhalb des endoplasmatischen Retikulums werden vor allem Proline durch das Enzym Prolyl-4-Hydroxylase zu Hydroxyprolin hydroxyliert. Drei Pro- α -Ketten lagern sich dann zu einem Prokollagen in einer Tripelhelix zusammen. Nach einer Glykosylierung vor allem an Lysinen, welche für die folgende Exozytose wichtig zu sein scheint, wird das Prokollagen aus der Zelle ausgeschleust. Durch Abspaltung der C- und N-terminalen Propeptidsequenz, welche von Prokollagen-Peptidasen wie dem *bone morphogenic protein 1* bewerkstelligt wird, entstehen Tropokollagenmoleküle. Diese lagern sich in einer Selbstmontage zu 10-300 nm dicken Kollagenfibrillen zusammen. Kollagenfibrillen bilden dann durch einen weiteren Zusammenlagerungsschritt Kollagenfasern aus. Auf Basis der gebildeten supramolekularen Strukturen können Kollagene in acht Familien gegliedert werden (Gordon und Hahn, 2010):

1. fibrilläre Kollagene (Isotypen I-III, V und XI)
2. Fibrillen-assoziierte Kollagene (Isotypen IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX und XXI)
3. Kollagen, das hexagonale Netzwerke ausbildet (Isotypen VIII und X)
4. Kollagen der Basallamina (Isotyp IV)
5. Perlenschnurartige Kollagene (Isotyp VI)
6. Ankerkollagene für die Basallamina (Isotyp VII)
7. Transmembran-Kollagene (Isotypen XIII und XVII)
8. Typ XV und XVIII-Kollagene

Die wichtigste Komponente elastischer Fibrillen in der EZM ist Elastin. Dieses ist in sogenannte Mikrofibrillen, welche vor allem aus Fibrillin bestehen, eingebettet und ist für die Elastizität dieser Strukturen verantwortlich (Sandberg *et al.*, 1981; Cleary und Gibson, 1996). Im Menschen kodiert lediglich ein Gen für Elastin, von welchem allerdings bisher elf splicing-Varianten bekannt sind, die zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten synthetisiert werden (Vrhovski und Weiss, 1998). Elastin ist es eines der hydrophobsten bekannten Proteine und extrem schlecht wasserlöslich. Bedingt ist diese Unlöslichkeit vor allem durch den hohen Quervernetzungsgrad der Lysinreste des Elastins. Es findet sich hauptsächlich in Geweben, die über eine gewisse Elastizität verfügen müssen wie in der Haut, in der Lunge und vor allem in der Lamina um Blutgefäße (Uitto, 1979).

1.7.3 Vorarbeiten

1.7.3.1 Das MT6-Fibrosarkom-Modell und die anti-angiogenetische Therapie

Um die verbesserte Einbringung von Medikamenten nach einer „Normalisierung“ der Vaskulatur durch Inhibition von VEGF zu testen, schien das MT6-Fibrosarkom-Modell ein geeigneter Kandidat. Begründet war dies vor allem durch die hohe Zahl an unreifen Blutgefäßen im Tumor, die eine nachfolgende „Normalisierung“ begünstigen sollten und der Tatsache, dass Tumoren mesenchymalen Ursprungs (Sarkome) schlecht auf systemische Chemotherapie ansprechen (Constantinidou *et al.*, 2013). Gezeigt werden konnte dies auch in einer Meta-Analyse, die belegt, dass zur üblichen Resektion von Sarkomen adjuvant verabreichte Chemotherapie keine signifikante Verbesserung der Überlebensrate der Patienten bewirkt (Woll *et al.*, 2012). Gründe für dieses Versagen

der Chemotherapie konnten dabei nicht identifiziert werden. Um die Hypothese der Verbesserung der Chemotherapie nach Gefäß-„Normalisierung“ durch anti-angiogenetische Behandlung zu testen, wurden MT6-Tumorzellen in Mäuse implantiert (Sandhu *et al.*, 2000) und an Tag zwölf und 18 nach Implantation mit einem VEGF-Antikörper, welcher sowohl humanes als auch murines VEGF-A zu binden vermag (mG6-31, 5 mg/kg Körpergewicht (Liang *et al.*, 2006)), bzw. einem Kontrollantikörper (Kontroll-IgG, 5 mg/kg KG) behandelt. Diese anti-angiogenetische Behandlung hatte dabei keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der Tumoren. Allerdings wurde das Gefäßbild wie erwartet verändert. Wie in Abbildung 1.10 zu sehen ist, nahm die Dichte an Blutgefäßen im Tumor nach der Behandlung deutlich ab. Bei Doppelfärbungen mit einem Marker für Endothelzellen sowie einem

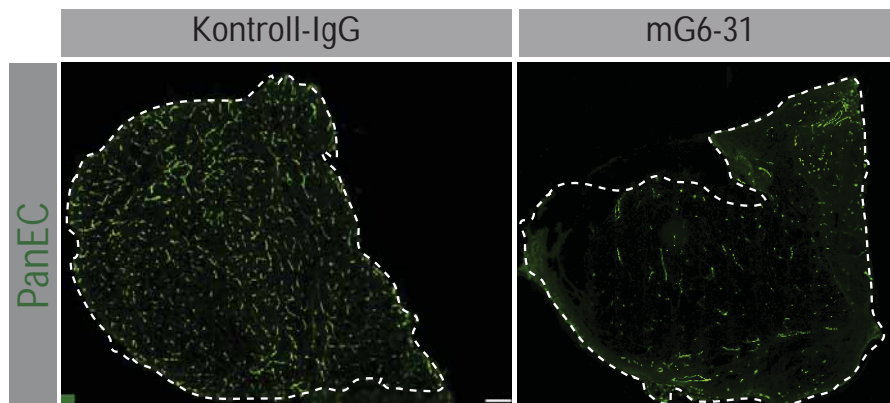


Abbildung 1.10: MT6-Tumorschnitte mit Färbung für PanEC. Nach Anfärbung für das Panendotheliale Zell-Antigens wird deutlich, dass durch Behandlung mit mG6-31 die Zahl an Blutgefäßen im Tumor abnimmt. Maßstab: 1mm

Marker für Perizyten (NG2) konnte gezeigt werden, dass die Gefäße nach Behandlung einen stärkeren Besatz mit Perizyten aufweisen. Dies zeigte eine Reifung der verbliebenen Blutgefäße. Diese Tatsache machte das Tumormodell interessant für eine Kombinationstherapie aus anti-angiogenetischer Vorbehandlung zur „Gefäßnormalisierung“ und einer anschließenden Chemotherapie, um die positiven Effekte dieser „Normalisierung“ zu untersuchen. Positiv war hier vor allem, dass das Modell nicht mit einer Wachstumsreduktion der Tumoren auf die anti-angiogenetische Therapie anspricht. Eine eventuell beobachtete höhere Effizienz der anschließenden Therapie mit zytostatischen Therapeutika kann so, mit hoher Wahrscheinlichkeit, auf eine verbesserte Medikamenteneinbringung zurückgeführt werden. Die meisten Tumormodelle reagieren bereits auf eine anti-angiogenetische Behandlung mit reduziertem Wachstum, so dass es bei gleichzeitiger Gabe von Chemotherapeutika

schwierig ist eine höhere therapeutische Effizienz auf einen bestimmten Mechanismus zurückzuführen.

Um nun die durch diese „Normalisierung“ prognostizierte verbesserte Einbringung von Medikamenten zu untersuchen, wurde ein Kombinationstherapie-Schema im Mausversuch getestet. Dabei wurde zwölf Tage nach der Implantation der Tumoren mit mG6-31 behandelt und anschließend an den Tagen 14 und 16 das Chemotherapeutikum Doxorubicin bzw. Doxil (je 5 mg/kg KG) injiziert. Es folgten zwei weitere dieser Behandlungsrunden (vgl. Abbildung 1.11). Unerwarteterweise zeigte sich hier, dass die reine Behandlung mit den Chemotherapeutika effektiver war als die Kombination eines Chemotherapeutikums mit der anti-angiogenetischen Behandlung (siehe Abbildung 1.11). Um

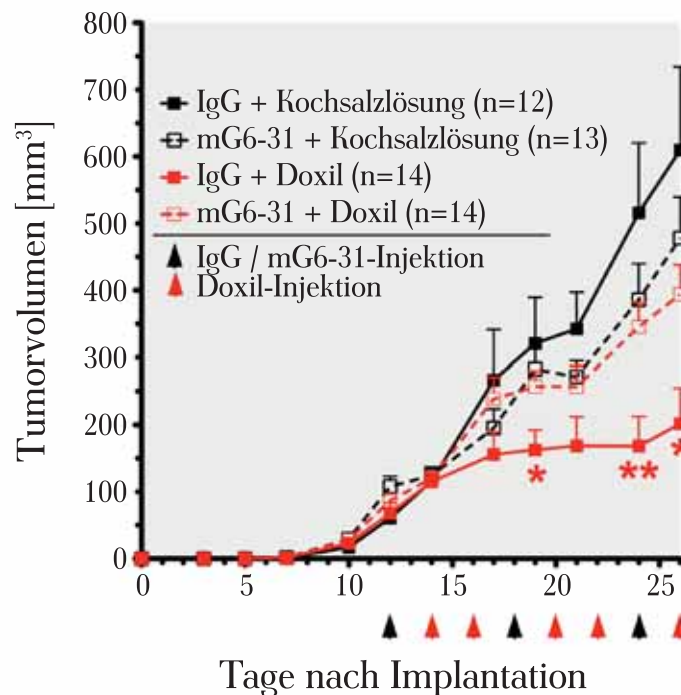


Abbildung 1.11: Kombinationstherapie von mG6-31 und Doxil in MT6-Tumoren. Die Behandlung der Tumoren erfolgte nach deren Etablierung in der Maus an Tag zwölf nach Implantation. Auf eine Antikörper-Injektion erfolgten zwei Gaben von Doxil. Die Verabreichung von mG6-31 hatte keinen Effekt auf das Tumorwachstum, der zytotoxische Effekt des Chemotherapeutikums wurde allerdings herabgesetzt. Fehlerbalken: \pm SEM. Asterisks zeigen statistische Signifikanz der Doxil behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe mit einem p-Wert $< 0,05$.

zu untersuchen, ob dieser Effekt durch eine verminderte zytotoxische Wirkung der Therapeutika oder durch eine verminderte Einbringung der Medikamente in den Tumor bedingt ist, wurde Doxil

aus mit mG6-31 und mit IgG-behandelten Tumoren extrahiert, um die dort akkumulierte Menge zu bestimmen. Dabei konnte festgestellt werden, dass deutlich weniger Chemotherapeutikum nach der vermeintlichen „Gefäßnormalisierung“ im Tumor angereichert war (vgl. Abbildung 1.12). Da dieser

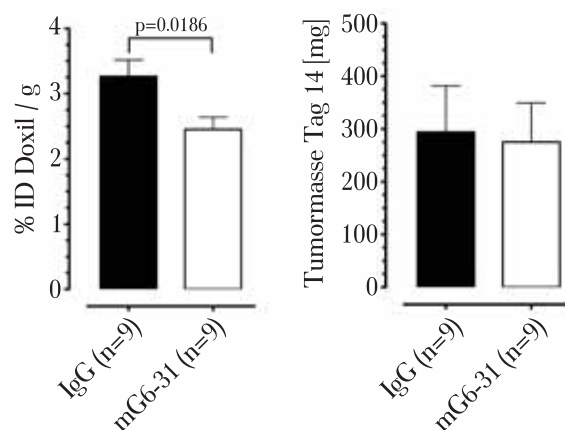


Abbildung 1.12: Extraktion von Doxil aus mG6-31- und IgG-behandelten MT6-Tumoren. Die Vorbehandlung von Tumoren mit mG6-31 führt zu einer verminderten Akkumulation von Doxil in den Tumoren verglichen zu Tumoren, welche mit einem Kontroll-Antikörper behandelt wurden. Angegeben ist hierbei der Prozentsatz der injizierten Dosis (ID) pro Gramm Tumorgewebe. Fehlerbalken: \pm SEM.

Effekt nicht zur Hypothese passte, wurde ein weiteres Tumormodell herangezogen. Die Wahl fiel auf das murine Brustkrebsmodell 4T1. Auch hier wurde nun eine Kombinationstherapie nach dem selben Schema wie zuvor im MT6-Tumormodell durchgeführt (siehe Abbildung 1.13). Im Gegensatz zum MT6-Tumormodell spricht das 4T1-Modell wie erwartet auf die Behandlung an. Dabei wird das Tumorwachstum schon durch die anti-angiogenetische Behandlung inhibiert. Eine noch stärkere Inhibition ist nach anti-angiogenetischer Vorbehandlung und anschließender Gabe des Chemotherapeutikums zu beobachten. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass nicht etwa die Menge an Chemotherapeutikum im Tumor durch die „Normalisierung“ beeinflusst wird, sondern vielmehr die Verteilung. Dabei wurde nach mG6-31-Behandlung der DNA-Interkalations-Farbstoff Hoechst33342 injiziert und anschließend dessen Verteilung im Tumorgewebe fluoreszenz-mikroskopisch untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die nach mG6-31-Behandlung von Hoechst33342 erreichte Fläche etwa viermal so groß war wie die erreichte Fläche von Tumoren, welche mit einem Kontroll-Antikörper behandelt worden waren.

Um nun den Unterschied zwischen beiden Modellen zu untersuchen, wurden verschiedene Gefäß-

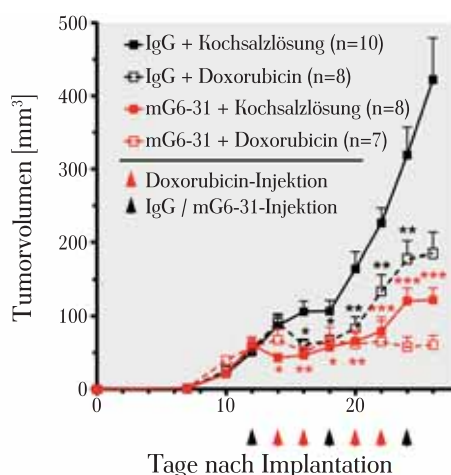


Abbildung 1.13: Kombinationstherapie von mG6-31 und Doxorubicin in 4T1-Tumoren. Die Behandlung der Tumoren erfolgte nach deren Etablierung in der Maus an Tag zwölf nach Implantation. Auf eine Antikörper-Injektion erfolgten zwei Gaben von Doxorubicin. Die Verabreichung von mG6-31 hat bereits einen inhibierenden Effekt auf das Tumorstadium. Durch eine Kombination von Doxorubicin und vorausgehender anti-angiogenetischer Behandlung wird der zytotoxische Effekt des Chemotherapeutikums deutlich verbessert. Fehlerbalken: \pm SEM. Asterisks zeigen statistische Signifikanz der markierten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

parameter vor und nach der anti-angiogenetischen Behandlung untersucht. Dabei konnten zuerst keine signifikanten Unterschiede, welche dieses differenzierte Ansprechen auf die Behandlung erklären könnten, gefunden werden. Den Durchbruch brachte die Beobachtung, dass die Diffusion von Hoechst33342 aus den Blutgefäßen der MT6-Tumoren bereits vor der Behandlung mit mG6-31 recht begrenzt stattfand, wenn man dies mit der Diffusion von Hoechst33342 aus den Gefäßen von 4T1-Tumoren verglich. Dieser Effekt wurde noch deutlicher nach Behandlung mit mG6-31. Während die Diffusion aus den Gefäßen von 4T1-Tumoren deutlich verbessert wurde, diffundierte das Medikamenten-Surrogat aus den MT6-Blutgefäßen nur marginal besser ins umliegende Tumorgewebe (vgl. Abbildung 1.14). Die statistische Auswertung bestätigte diese Beobachtung und zeigte, dass die durch ein Blutgefäß versorgte Fläche im 4T1-Modell sowohl bei Behandlung mit einem Kontroll-Antikörper als auch - wesentlich stärker - nach Behandlung mit mG6-31 signifikant größer war als für das MT6-Modell (vgl. Abbildung 1.15). Das unterschiedliche Ansprechen beider Tumormodelle auf die anti-angiogenetische Behandlung warf etliche Fragen nach dem „Warum?“ auf.

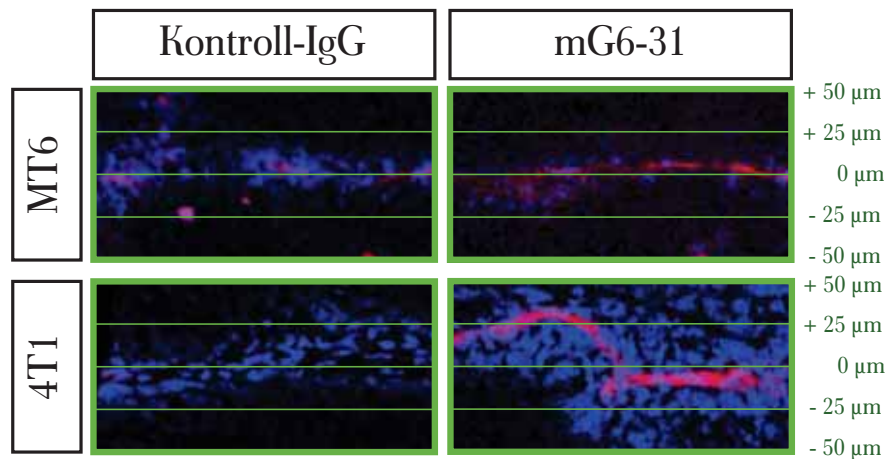


Abbildung 1.14: Diffusion von Hoechst33342 aus Blutgefäßen in 4T1 und MT6-Tumoren nach Behandlung mit einem Kontroll-Antikörper bzw. mG6-31. Mittels konfokaler Mikroskopie wurde die Diffusion von Hoechst33342 aus den Blutgefäßen für beide Tumormodelle nach Behandlung mit einem Kontroll-Antikörper und dem VEGF-Antikörper mG6-31 bestimmt. Bereits im Kontroll-MT6-Tumor zeigt sich nur eine geringe Penetrationstiefe ins umliegende Gewebe. Im 4T1-Kontroll-Tumor diffundiert Hoechst33342 wesentlich tiefer ins Tumorgewebe. Diese Diffusion lässt sich für das 4T1-Modell noch verbessern, indem der Tumor mit mG6-31 vorbehandelt wird. Ein Effekt, der sich für das MT6-Modell so nicht erzielen lässt.

1.8 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit sollte die Ursachen für das unterschiedliche Ansprechen zweier Tumormodelle auf den subsequenten Medikamententransport nach einer anti-angiogenetischen Vorbehandlung aufklären. Diese Vorbehandlung sollte nach der Hypothese von Rakesh K. Jain durch die „Normalisierung“ der Tumervaskulatur zu einer erhöhten Effizienz einer nachfolgenden Chemotherapie führen.

Während das 4T1-Modell für metastasierenden Brustkrebs nach einer anti-angiogenetischen Vorbehandlung mit einer Verbesserung der Effizienz einer nachfolgenden chemotherapeutischen Behandlung reagierte, zeigte sich für Tumoren des Fibrosarkom-Modells MT6 eine verminderte Effizienz nach dieser Vorbehandlung. Zur Aufklärung dieser unterschiedlichen Reaktionen wurden bereits vor dieser Arbeit einige Versuche unternommen. So konnte bereits gezeigt werden, dass zwischen beiden Modellen keine signifikanten Unterschiede in den Gefäßparametern vor und nach der anti-angiogenetischen Behandlung erkennbar waren. Beide Modelle zeigten die für eine „Normalisierung“ erwarteten Veränderungen.

Die Untersuchung der Diffusion des Medikamenten-Surrogates Hoechst33342 zeigte jedoch ein unterschiedliches Diffusionsverhalten dieses Stoffes aus den Gefäßen der beiden Tumormodelle. Auf Basis dieser Beobachtung sollten mögliche Unterschiede für die unterschiedlich ausgeprägte Diffusi-

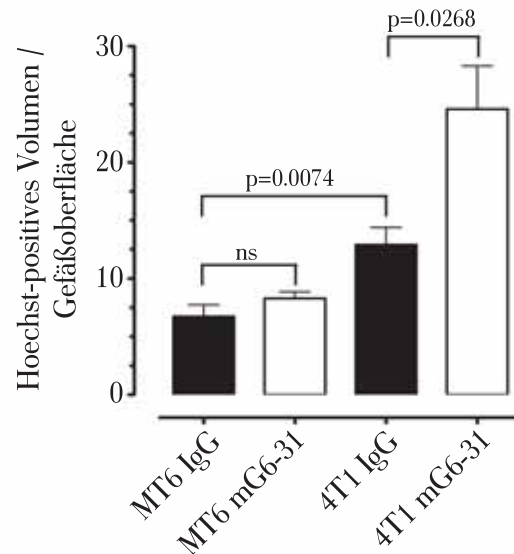


Abbildung 1.15: Korrelation zwischen Hoechst-positivem Gewebenvolumen und Oberfläche der Blutgefäße in 4T1- und MT6-Tumoren nach Behandlung mit einem Kontroll-Antikörper bzw. mG6-31. Das je Oberflächeneinheit der Blutgefäße versorgte Volumen in 4T1-Tumoren ist bei Behandlung mit einem Kontroll-Antikörper signifikant größer als im MT6-Tumormodell. Während die Gabe von mG6-31 dieses Volumen im 4T1-Modell noch signifikant vergrößert, zeigt sich in MT6-Tumoren nur eine marginale Zunahme des versorgten Volumens. Fehlerbalken: \pm SEM, $n=4$

on gefunden werden. Im Fokus stand dabei vor allem die Quantität und Qualität der extrazellulären Matrix, da diese - nach rationeller Betrachtung der Tatsachen - durch ihre Eigenschaften maßgeblich die Diffusion durch den extrazellulären Raum bestimmt. Hierzu sollten zuerst Tumoren beider Modelle auf ihre eventuell unterschiedliche Histologie hin untersucht werden. Die so gewonnen Erkenntnisse sollten die Grundlage für nachfolgende proteinbiochemische Analysen mittels Western Blotting sowie molekularbiologische Analysen wie mRNA-Expressionsanalysen darstellen. Auf diese Weise sollten ein oder mehrere Proteine identifiziert werden, die sich für das unterschiedliche Diffusionsverhalten auszeichnen könnten. Durch Überexpressions-Experimente mit den so identifizierten Kandidaten-Proteinen sowie Versuche mit rekombinanten Proteinen, sollte die funktionelle Rolle der gefundenen Proteine in der Diffusion von Medikamenten im Tumor mittels geeigneter und zu etablierender Experimente geklärt werden. Bei Bestätigung einer entscheidenden Rolle der identifizierten Proteine, sollten diese mittels pharmakologisch etablierter Methoden inhibiert werden und der Einfluss dieser Inhibition auf den Medikamententransport in den beiden zugrunde gelegten Tumormodellen nach anti-angiogenetischer Vorbehandlung untersucht werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

- Agarosegelapparatur Horizon[®] 11.14 Whatman (GE Healthcare, München)
- Analog Vortex Mixer (VWR International GmbH, Darmstadt)
- analytische HPLC Wave[®] (Transgenomic Limited, Hillington, UK)
- Confocal Laser Scanning Microscope Leica TCS SP3 und SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar)
- Confocal Laser Scanning Microscope Nikon Eclipse Ti-A1 (Nikon Corp., Tokyo, JP)
- Cryotom Jung CM3000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar)
- Developer M35 X-OMAT Processor (Kodak GmbH, Rochester, NY, USA))
- Eismaschine AF 100 (Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, USA)
- Feinwaage Analytic AC 120 S (Sartorius AG, Göttingen)
- Flow Cytometer BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)
- Folienschweißgerät Polystar[®] 100 GE (Rische + Herfurth GmbH, Hamburg)
- Homogenisator IKA[®] Ultra Turrax[®] T8
- Horizontalschüttler KS 10 (Edmund Bühler GmbH, Hechingen)
- Horizontalschüttler Rotamax 120 (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach)

- Inkubator B12 (Heraeus Holding GmbH, Hanau)
- Inkubator Certomat[®] BS-1 (B. Braun Biotech International, Melsungen)
- Inkubator Certomat[®] H (B. Braun Biotech International, Melsungen)
- Inkubator Certomat[®] R (B. Braun Biotech International, Melsungen)
- inverses Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200 (Carl Zeiss AG, Jena)
- inverses Mikroskop Zeiss Axiovert 25 (Carl Zeiss AG, Jena)
- Kamera Spot Pursuit (Visitron GmbH, Puchheim)
- Kühlzentrifugen 5810 R und 5804 R (Eppendorf AG, Hamburg)
 - Multiwell-Plate Rotor A-2-DWP (Eppendorf AG, Hamburg)
 - Eppendorf Cap Rotor F45-30-11 (Eppendorf AG, Hamburg)
 - Falcon Rotor A-4-62 (Eppendorf AG, Hamburg)
- Magnetrührer mit Heizfunktion MS-H-S (Dragon Laboratory Instruments Limited, Peking, CN)
- MALDI-TOF Massenspektrometer autoflex[™] mit flexControl[™] 2.0 Software (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA)
- Multilable Plate Reader Wallac Victor² (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA)
- Peqlab Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- pH Meter PHM 92 (Radiometer GmbH, Willich)
- Pipetten Rainin Classic PR-2, PR-10, PR-20, PR-200, PR-1000 (Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
- Pipettierhilfe accu-jet[®] pro (Brand GmbH & Co. KG, Wertheim)
- Power Supply Consort E861 (Sigma-Adrich, St. Louis, MO, USA)
- Power Supply PowerPac[™] Basic (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Power Supply PowerPac[™] HC (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Rotationsmischer (bezogen durch A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH, Estenfeld)

- SDS-PAGE Gelkammer Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- semi-quantitative HPLC
 - Knauer UV Detector K-2600 (Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH, Berlin)
 - Knauer Pump K-1001 (Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH, Berlin)
 - Super Fraction Collector SF-2120 (Advantec MFS Incorporation, Dublin, CA, USA)
 - Säule PLRP-S, Porengröße 100 Å, Partikelgröße 8 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
- Speedvac Concentrator plus (Eppendorf AG, Hamburg)
- Sterilbank Sterilgard Type A/B3 (The Baker Company, Sanford, FL, USA)
- Thermocycler MyCycler™ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Thermocycler T1 (Biometra GmbH, Göttingen)
- Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg)
- Tischzentrifuge 5415 D (Eppendorf AG, Hamburg)
- Ultrazentrifuge L-80 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)
 - Rotor SW 32 Ti
 - Rotor SW 55 Ti
- UV Transilluminator TFX-35M (Life Technologies, New York, NY, USA)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Incorporation, New York, NY, USA)
- Waage Laboratory LC 4800 P (Sartorius AG, Göttingen)
- Wasserbad Typ 3043 (Köttermann GmbH & Co. KG, Hänigsen)
- Water jacked Incubator Forma 3336 (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- Wetblot Transfer Unit TE 62 Amersham Biosciences (GE Healthcare GmbH, München)
- Zentrifuge Universal 16 A (Hettich Holding GmbH & Co. oHG, Kirchleugern)

2.1.2 Chemikalien

Standardchemikalien wurden über die Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen.

Tabelle 2.1: Chemikalien. Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Name	bezogen von
β -Aminopropionitrile fumarate salt	Sigma-Aldrich
Ampliflu Red	Sigma-Aldrich
1,2-Ethandiol	Sigma-Aldrich
14-Azido-3,6,9,12-tetraoxadecanoic acid solution	Sigma-Adrich
2,4,6-Trimethylpyridin	Sigma-Aldrich
5(6)-Carboxyfluorescein	Sigma-Aldrich
Acetonitril	Sigma-Aldrich und Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth
Benzylidene-bis(tricyclohexylphosphine)-dichloro ruthenium (Grubbs Katalysator 1 st Generation)	Sigma-Adrich
Cadaverine dihydrochloride	Sigma-Aldrich
Casein Sodium salt, from bovine milk	Sigma-Aldrich
Dabco	Carl Roth
Dichlorethan	Sigma-Aldrich
Dichlormethan	Carl Roth
Diethylether	Carl Roth
Dimethylsulfoxid	Carl Roth
Direct Red 80 (Sirius Red)	Sigma-Adrich
GelStar Nucleic Acid Gel Stain 10.000x	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Kolliphor [®] EL	Sigma-Aldrich
Molekularsieb 0,3 nm	Merck
Mowiol 4-88	Carl Roth
N,N-Diethylformamid	Sigma-Aldrich
N,N-Diisopropylethylamin	Sigma-Aldrich

N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU)	Sigma-Aldrich
Natriumalginat aus Braunalgen	Sigma-Aldrich
Natriumazid	Carl Roth
Piperidin	Sigma-Aldrich
Poly(D,L-lactide)/glycolide	Sigma-Aldrich
Poly(L-lactide)	Sigma-Aldrich
Pyridin	Sigma-Aldrich
Resorufin	Sigma-Adrich
Rink Amide AM resin (100-200 mesh)	Merck KGaA / Novabiochem [®]
Rotiphorese [®] Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth
Sodium butryate	Sigma-Adrich
Trifluoressigsäure	Carl Roth
Triisopropylsilan	Sigma-Aldrich

2.1.3 Größenstandards

- für Proteine
Precision Plus Protein[™] Standards, Dual Color (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- für DNA
GeneRuler[™] 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific GmbH (Fermentas))
Quick-Load[®] 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
Quick-Load[®] 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- für RNA
RiboRuler[™] High Range RNA Ladder Ready-to-Use, 200 to 6000 bases (Thermo Fisher Scientific GmbH (Fermentas))

2.1.4 Enzyme

- Polymerasen
 - Taq-DNA Polymerase, eigene Herstellung
 - Taq-DNA Polymerase, Thermo Fisher Scientific GmbH (Fermentas)

- Pfu DNA Polymerase, Thermo Fisher Scientific GmbH (Fermentas)
- Herculase II DNA Polymerase, Thermo Fisher Scientific GmbH (Agilent Technologies)
- Restriktionsenzyme
 - *EcoRI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
 - *BamHI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- sonstige Enzyme
 - RNase H (10 mg/mL) (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
 - Proteinase K (10 mg/mL) (Merck KGaA, Darmstadt)
 - invitrogen T4 DNA-Ligase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

2.1.5 Kits

- GETM Healthcare AmershamTM ECL plus Western Blotting Detection Reagents (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- GenomeLab DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)
- IllustraTM GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, München)
- invitrogen Dual Promoter TA Cloning[®] Kit pCR[®]II vector (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
- invitrogen Dual Promoter TA TOPO[®] Cloning[®] Kit pCR[®]II vector ([®])
- NucleoSpin[®] Plasmid Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)
- NucleoSpin[®] RNA Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)
- Pierce BCATM Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- peqGold Hot Start Mix S (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen)
- ProteoMassTM Peptide MALDI-MS Calibration Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen N.V., Hilden)
- Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen N.V., Hilden)

- Ambion[®] mmessage mmachine SP6 Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
- TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

2.1.6 Antibiotika

Name	[c] stock	[c] in Lösung	Hersteller
Ampicillin	100 mg/ mL	100 µg/ mL	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Kanamycin	50 mg/ mL	50 µg/ mL	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)

2.1.7 Puffer

- Coomassie-Färbelösung (kolloidal)
 - 0,02% Coomassie-Brilliant-Blue-G250
 - 5% Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat
 - 10% Ethanol (96%)
 - 2% ortho-Phosphorsäure (100%)
- Coomassie-Entfärbelösung
 - 10% Ethanol (96%)
 - 2% ortho-Phosphorsäure (100%)
- EZM Extraktionspuffer 1 / Hochsalzpuffer
 - 3,4 M NaCl
 - 50 mM Tris-HCl pH 7,4
 - 4 mM EDTA–Na₂
- EZM Extraktionspuffer 2 / Harnstoff-Extraktionspuffer
 - 0,2 M NaCl
 - 50 mM Tris-HCl pH 7,4

- 4 mM EDTA–Na₂
- 2 M Harnstoff
- EZM Extraktionspuffer 3 / Tris-Dialyse-Puffer
 - 0,15 M NaCl
 - 50 mM Tris-HCl pH 7,4
 - 4 mM EDTA–Na₂
- 2x HBS / HEPES buffered saline
 - 280 nM NaCl
 - 50 mM HEPES pH 7,1
 - 1,5 mM Na₂HPO₄
- LOX-Aktivitäts-Assay-Reaktionspuffer
 - 137 mM NaCl
 - 12 mM Phosphat
 - 2,7 mM KCl
 - pH 7,4
 - 10 µM Ampliflu Red
 - 10 mM Cadaverin
 - 0,5 U/mL HRP
- Lysepuffer für Mausgewebe
 - 50 mM NaCl
 - 5 mM EDTA–Na₂
 - 100 µg/mL Proteinase K
 - 10 mM Tris-HCl pH 8,5
steril filtriert (0,2 µm Porengröße)
- PBS(-T) / phosphate buffered saline

-
- 137 mM NaCl
 - 12 mM Phosphat
 - 2,7 mM KCl
 - pH 7,4
 - für PBS-T: Zugabe von 0,1% Tween-20

 - Proteinaufreinigungs-Waschpuffer A
 - 10 mM Tris pH 10,5
 - 6 M Harnstoff
 - 100 mM NaH_2PO_4

 - Proteinaufreinigungs-Waschpuffer B
 - 10 mM Tris pH 9,0
 - 6 M Harnstoff
 - 100 mM NaH_2PO_4

 - Proteinaufreinigungs-Elutionspuffer C
 - 10 mM Tris pH 7,5
 - 6 M Harnstoff
 - 100 mM NaH_2PO_4

 - Proteinaufreinigungs-Elutionspuffer D
 - 10 mM Tris pH 6,0
 - 6 M Harnstoff
 - 100 mM NaH_2PO_4

 - RIPA
 - 50 mM Tris pH 8,0
 - 150 mM NaCl
 - 1% Triton-X

- 1 mM EDTA–Na₂
- 0,1% SDS
- RNase H Reaktionspuffer (5x)
 - 30 mM Tris pH 7.8
 - 300 mM KCl
 - 12,5 mM MgCl₂
 - sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße)
- RNA-Ladepuffer (4x)
 - 89,5% Formamid
 - 0,02% SDS
 - 0,5 mM EDTA–Na₂
 - ad 100% H₂O
- SDS-Gelelektrophorese-Laufpuffer
 - 5 mM Tris pH 8,0
 - 50 mM Glycin
 - 0,02% SDS
- SDS-Gelelektrophorese-Ladepuffer
 - 50 mM Tris pH 6,3
 - 100 mM DTT
 - 10% Glycerin
 - 0,1% Bromphenolblau
 - 2% SDS
- Silberfärbungs-Fixierer für ein Gel
 - 1,9 g Na₂B₄O₇
 - 4 mL 25% Glutaraldehydlösung

- 96 mL H₂O
- Silberfärbelösung für ein Gel
 - 1,84 mL 1 M NaOH
 - 1,96 mL Ammoniak
 - 4 mL 20% Silbernitrat
 - 92 mL H₂O
- Silberfärbungs-Reduzierer für ein Gel
 - 10 mL 100% Ethanol
 - 600 µL 1% Zitronensäure
 - 20 µL 37% Formaldehyd
- TAE-Puffer
 - 40 mM Tris pH 8,0
 - 20 mM Essigsäure
 - 1 mM EDTA–Na₂
- TBE-Puffer
 - 89 mM Tris pH 8,0
 - 89 mM Borsäure
 - 2 mM EDTA–Na₂
- TBS(-T)
 - 20 mM Tris pH 7,5
 - 150 mM NaCl
 - 2 mM EDTA–Na₂
 - für TBS-T: Zugabe von 0,1% Triton-X
- TE
 - 10 mM Tris pH 8,0

- 1 mM EDTA–Na₂
- Tris-Puffer für SDS-PAGE
 - Lower Buffer
 - * 1 M Tris pH 8,8
 - Upper Buffer
 - * 1 M Tris pH 6,8
- Wetblot-Transferpuffer
 - 50 mM Tris pH 8,3
 - 380 mM Glycin
 - 1,6 mM EDTA–Na₂
 - 0,1% SDS
 - 20% Methanol

2.1.8 Medien

- Medien für die Zellkultur
 - Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% FCS und 1x Penicillin/Streptomycin, Standardmedium für alle Tumorzelllinien und HEK-Zellen (Life technologies, Carlsbad, CA, USA)
 - EBM-2 (Lonza Group AG, Basel, Schweiz)
 - EGM-2, Standardmedium für alle Endothelzellen (Lonza Group AG, Basel, Schweiz)
 - PAA Endothelial Medium (GE Healthcare, München)
 - PAA Quantum 263 for Tumor cells (GE Healthcare, München)
 - PAA Quantum 333 for Fibroblasts (GE Healthcare, München)
 - Vasculife, Standardmedium für alle Endothelzellen (Lifeline Cell Technology, Frederick, MD, USA)
- Medien für die Bakterienkultur

- LB-Medium (1 L)
 - * 10 g Bacto™ Trypton
 - * 5 g Hefeextrakt
 - * 10 g NaCl
 - * pH 7,5
- SOC outgrowth medium (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)

2.1.9 Biologisches Material

2.1.9.1 Versuchstiere

- C57BL/6 (Charles River, Sulzfeld)
- BALB/c (Charles River, Sulzfeld)
- NU/NU Nacktmäuse Crl:NU-Foxn1^{nu} (Charles River, Sulzfeld)

2.1.9.2 Zelllinien

Tabelle 2.2: humane Tumorzelllinien. Die in dieser Arbeit verwendeten bzw. erstellten Tumorzelllinien. Die Einbringung von genetischem Material wurde mittels lentiviraler Transduktion bewerkstelligt.

Name	Histologischer Typ	bezogen von
HEK-293T	immortalisierte embryonale Nierenzellen	ATTC, Manassas, VA, USA
MCF7	Adenokarzinom	ATTC, Manassas, VA, USA
MCF7-BFP	Adenokarzinom	basierend auf MCF7
MDA-MB-231	Adenokarzinom	ATTC, Manassas, VA, USA
MDA-MB-231-BFP	Adenokarzinom	basierend auf MDA-MB-231
MDA-MB-435S	Melanom	ATTC, Manassas, VA, USA
MDA-MB-468	Adenokarzinom	ATTC, Manassas, VA, USA
SK-BR-3	Angiosarkom	ATTC, Manassas, VA, USA
ZR-75-1	Adenokarzinom	ATTC, Manassas, VA, USA

Tabelle 2.3: murine Zelllinien. Die in dieser Arbeit verwendeten murinen Zelllinien und in welchem Modell sie tumorigen sind.

Name	Histologischer Typ	Tumorigen in	bezogen von
38290 TTT	Fibrosarkom	BALB/c	NCI, Bethesda, MD, USA
4T1	Adenokarzinom	BALB/c	ATTC, Manassas, VA, USA
Ac755	Adenokarzinom	C57BL/6	NCI, Bethesda, MD, USA
E0771	Adenokarzinom	C57BL/6	NCI, Bethesda, MD, USA
EMT6	Mammakarzinom	BALB/c	ATTC, Manassas, VA, USA
LLC	Karzinom	BALB/c	ATTC, Manassas, VA, USA
MMT 060562	Adenokarzinom	BALB/c	NCI, Bethesda, MD, USA
MT6	Fibrosarkom	C57BL/6	ATTC, Manassas, VA, USA
SVR	Angiosarkom	NU/NU Nacktmaus	ATTC, Manassas, VA, USA

2.1.9.3 Bakterien

- One Shot[®]TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

2.1.9.4 Antikörper

Tabelle 2.4: primäre Antikörper Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper

Antigen	Wirt	Verdünnung WB	Blocking	Hersteller
Aktin	rabbit	1:1.000	2% BSA	Sigma-Aldrich
HIF1 / <i>alpha</i>	mouse	1:1.000	0,2% BSA	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)
penta-His	mouse	1:2.000	3% BSA	Qiagen (Hilden)
LOX	rabbit	1:500	3% BSA	Imgenex Corp. (San Diego, CA, USA)
LOXL2	rabbit	1:500	3% BSA	Biorbyt Ltd. (Cambridge, UK)

Tabelle 2.5: sekundäre Antikörper. Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper

Name	Verdünnung WB	Hersteller
polyclonal goat- α -mouse-HRP	1:20.000	Dianova GmbH (Hamburg)
goat- α -rabbit-HRP	1:20.000	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)

2.1.9.5 Vektoren

Tabelle 2.6: Vektoren. Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren

Name	Verwendung	Hersteller
pGEX-4T1	bakterieller Expressionsvektor	GE Healthcare, München
pLVX-puro	lentivirales Carrier-Plasmid	Clontech, Mountain View, CA, USA
pCMV-d8.91	lentivirales Packaging-Plasmid	Addgene, Cambridge, MA, USA
pCMV-VSV-G	lentivirales Envelope-Plasmid	Addgene, Cambridge, MA, USA

2.1.10 Software und Datenbanken

- Adobe Illustrator (Adobe Systems, San Jose, CA, USA)
- Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA)
- BD FACSuite Software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)
- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, letzter Zugriff 04.11.2013)
- Chembiodraw Ultra 13.0 (PerkinElmer Informatics, Waltham, MA, USA)
- eXpress Profiler Software (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)
- Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>, letzter Zugriff 13.01.2014, Schindelin *et al.* (2012))
- flexAnalysis™ 2.0 Software (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA)
- Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)
- Leica Confocal Software SP2 und SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar)
- Microsoft Office 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)
- Multialin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>, letzter Zugriff 18.11.2013)
- Nikon Confocal Software NIS-Elements 4.1 (Nikon, Tokyo, Japan)
- Primerblast (<http://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, letzter Zugriff 18.11.2013)
- Serial Cloner 2. 6 (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html, letzter Zugriff 03.11.2013)
- VisiView Software

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung und Aufreinigung von Plasmiden (Miniprep & Maxiprep)

Für eine Miniprep wurden 4 mL einer Bakterien-Flüssigkultur entsprechend dem Herstellerprotokoll mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel GmbH) aufgearbeitet. Für eine Maxiprep wurden 200 mL Flüssigkultur und das Qiagen® Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll verwendet.

2.2.1.2 Bestimmung von DNA/RNA Konzentrationen

Um die Konzentration von DNA zu messen, wurde eine Absorptionsmessung bei 260 nm vorgenommen, da bei dieser Wellenlänge das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt. Dabei entspricht eine optische Dichte von 1 einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/µL. Um die Verunreinigung der DNA-Lösung mit Proteinen zu bestimmen, wird das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 nm zu der optischen Dichte bei 280 nm herangezogen. Weiterhin wichtig ist das Verhältnis der optischen Dichten bei 260 nm und 230 nm, welches über Verunreinigungen mit aromatischen Verbindungen, wie Phenol und Kohlenhydraten, Auskunft gibt. Tabelle 2.7 gibt Aufschluss über die zu erwartenden Konzentrationen bei einem OD₂₆₀ von 1 und die gewünschten Reinheiten.

Tabelle 2.7: Reinheit von Nukleinsäuren Bestimmung der Konzentration [c] und der Reinheit von Nukleinsäuren mittels photometrischer Messung

	[c] für OD ₂₆₀ = 1	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀
dsDNA	50 µg/µL	> 1,8	> 2,0
ssDNA	37 µg/µL	> 1,8	> 2,0
Oligonukleotide	ca. 30 µg/µL	> 1,8	> 2,0
RNA	40 µg/µL	> 2,0	> 2,0

2.2.1.3 Erstellung von Primern

Um eine geeignete Nukleotidsequenz für einen Primer zu bestimmen, sind mehrere Punkte zu beachten. Ein erster wichtiger Punkt ist die Länge des Primers, welche idealerweise zwischen 18

und 22 Nukleotiden liegt. Wichtig ist die Länge vor allem für die Schmelztemperatur (T_m), welche linear mit ihr ansteigt. T_m ist dabei die Temperatur, bei der 50% der DNA-Moleküle als Doppelstrang (ds) vorliegen und 50% als Einzelstrang (ss). Dies ist insoweit von Bedeutung, dass unterhalb von T_m der Primer mit seiner zugehörigen DNA-Matrize hybridisiert, während er sich bei höheren Temperaturen davon löst. Die Wahl der T_m spielt in einer PCR eine entscheidende Rolle, da eine zu hohe T_m dazu führen kann, dass beteiligte Enzyme denaturieren, während es bei einer zu niedrigen T_m zu unspezifischen Bindungen des Primers an nicht-homologe Sequenzen kommen kann. Ein ebenfalls wichtiger Faktor für die T_m ist die Nukleotid-Zusammensetzung, da G/C-Basenpaare thermodynamisch stabiler sind als A/T-Basenpaare. Dies liegt darin begründet, dass G/C-Basenpaare drei Wasserstoffbrücken, A/T-Basenpaare dagegen nur zwei Wasserstoffbrücken ausbilden. Ein hoher G/C-Wert führt somit zu einer höheren T_m . Zur Insertion eines PCR-Produktes in einen Klonierungsvektor wurden an die Enden der Primer geeignete Schnittstellen für spezifische Restriktionsenzyme und zwei Adenin-Basen angehängt. Die Adenin-Basen sollten ein besseres Einsetzen der Restriktionsenzyme gewährleisten. Das Primerdesign erfolgte mit PrimerBLAST (Ye *et al.*, 2012). Dabei wurde darauf geachtet, dass die designten Primer weder mit sich selbst, noch der *forward*- mit dem *reverse*-Primer hybridisierten. Des Weiteren mussten Haarnadelstrukturen innerhalb der Primer vor der Bestellung selbiger ausgeschlossen werden. Primer wurden über IDT (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, USA) bestellt. Eine Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer befindet sich im Anhang in Tabelle A.1.

2.2.1.4 Polymerase Chain Reaction / PCR

1976 entdeckten Chien *et al.* (1976) eine thermostabile DNA-Polymerase im Archae-Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase). *T. aquaticus* besiedelt Geysire und heiße Quellen mit einer Temperatur von bis zu 80°C. Dies macht auch das Vorhandensein hitzebeständiger Proteine im Bakterium notwendig. Die Entdeckung der Taq-Polymerase ebnete den Weg für die 1983 von Kary Mullis (Mullis *et al.*, 1992; Saiki *et al.*, 1988) auf einer Autofahrt erdachte Methode der Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes *in vitro*. Da die Taq-Polymerase auch nach einem Hitzeschock bei 96°C noch in einem funktionstüchtigen Zustand vorliegt und doppelsträngige DNA (dsDNA) bei eben dieser Temperatur in zwei Einzelstränge (ssDNA) dissoziiert, konnte DNA in einem zyklischen Prozess synthetisiert werden. Diese Methode wurde als *polymerase chain reaction* (PCR) bekannt und brachte Kary Mullis 1993 den Nobelpreis ein. Für eine PCR werden neben einer hitzebeständigen Polymerase noch drei weitere Komponenten benötigt:

- eine dsDNA als Matrize; diese DNA wird auch *template* genannt
- zwei Primer, die den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt begrenzen und der DNA-Polymerase als Startpunkt dienen
- Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) als Bausteine für den neu-synthetisierten DNA-Strang

Ein PCR-Zyklus besteht dabei aus drei Schritten:

1. **Denaturierung / Melting.** Im ersten Schritt muss die doppelsträngig vorliegende *template* DNA aufgeschmolzen werden. Dies geschieht in der Regel bei einer Temperatur von 94 – 96°C, da hier die Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren aufgebrochen werden. Im ersten Zyklus wird hierbei meist für mehrere Minuten erhitzt, um sicherzustellen, dass Primer und *template* DNA einzelsträngig vorliegen.
2. **Hybridisierung / Annealing.** Im nächsten Schritt wird die Temperatur so weit abgesenkt, dass die im Überschuss vorliegenden Primer (im Vergleich zum *template*) an ihren komplementären DNA-Abschnitt auf dem *template* binden. Die *annealing*-Temperatur wird dabei über die Primer bestimmt (siehe 4.2.3) und lag etwa zwischen 50 und 65°C.
3. **Elongation.** Eine Temperaturerhöhung auf 68- 72°C, abhängig von der verwendeten Polymerase, führt zu optimalen Bedingungen für die Polymerase. Diese füllt ab dem 3'-Ende des Primers den fehlenden Strang anhand des *templates* mit komplementären Nukleotiden auf. Der Primer bildet dabei das 5'-Ende des neu-synthetisierten Stranges. Da jedes Produkt eines solchen 3-Schritt-Zyklus am Ende wieder als Matrize für den nächsten Zyklus dienen kann, nimmt die Zahl der Produkte exponentiell zu. In der Regel läuft eine PCR über 25 – 35 Zyklen.

Für Standard-PCRs wurde das in Tabelle 2.8 dargestellte Pipettierschema und das in Tabelle 2.9 gezeigte Cycler-Schema verwendet.

2.2.1.5 Aufreinigung von PCR-Produkten, Gelbanden und Vektoren

Falls nötig wurden PCR-Produkte, Gelbanden oder Vektoren mit dem IllustrTMGFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

Tabelle 2.8: Schema eines 50 μL Standard-PCR-Ansatzes.

Volumen	Reagenz	Konzentration / Menge
2 μL	<i>template</i> DNA	10 - 50 ng
5 μL	10X Taq-Polymerase-Puffer	
1 μL	dNTP-Mix	10 mM je dNTP
2.5 μL	<i>forward</i> Primer	10 μM stock
2.5 μL	<i>reverse</i> Primer	10 μM stock
0.2 μL	Taq-DNA-Polymerase	5 units/ μL
32.8 μL	steriles, deionisiertes Wasser	

Tabelle 2.9: Schema eines Standard-PCR-Cycler-Programms

- Schritt 1: initiale Denaturierung für 2 Minuten bei 95°C
- Schritt 2: Denaturierung für 1 Minute bei 95°C
- Schritt 3: Primer-Annealing für 30 Sekunden bei 5°C unter der T_m der Primer
- Schritt 4: Elongation der DNA für 2 Minuten bei 72°C
- Schritt 5: Wiederholung der Schritte 2-4 für 30 Zyklen
- Schritt 6: finale Elongation für 5 Minuten bei 72°C
- Schritt 7: Kühlen auf 4°C

2.2.1.6 Generierung von A-Überhängen

Um die Klonierung von PCR-Produkten in TA-Vektoren zu ermöglichen, ist es nötig an die vorliegenden *blunt ends* Adenosin-Überhänge zu generieren. Hierzu wurde das PCR-Produkt final mit Taq-Polymerase inkubiert. Dabei wurden zu einem 50 μL PCR-Ansatz 1 μL Taq-Polymerase hinzugefügt und für 10 Minuten auf 72°C erhitzt. Nach anschließender kurzer Inkubation auf Eis, konnte der so mit 3'-A-Überhängen versehene Ansatz für das (TOPO[®]) TA Cloning[®] verwendet werden.

2.2.1.7 TOPO[®] Cloning[®] von PCR-Produkten

PCR-Produkte mit einem 3'-Desoxyadenosin-Überhang können leicht und effizient in TOPO[®]-Vektoren, die linearisiert und mit einem 3'-Desoxythymidin-Überhang versehen sind, kloniert werden. Ein wichtiges Merkmal dieser Vektoren ist dabei die kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase I. Diese bindet an dsDNA und spaltet Phosphodiesterbrücken des Phosphat-Desoxyribose-Rückgrats eines DNA-Stranges nach einer 5'-CCCTT-Sequenz (Shuman, 1991). Die beim Spalten freiwerdende Energie wird dabei genutzt, um eine kovalente Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des

gespaltenen Stranges und einem Tyrosyl-Rest der Topoisomerase I herzustellen. Diese Phospho-Tyrosyl-Bindung zwischen DNA und Enzym kann nun von der 5'-Hydroxyl-Gruppe des gespaltenen Stranges angegriffen werden. Dabei wird die Topoisomerase freigesetzt (Shuman, 1994).

Das (TOPO[®]) TA Cloning[®] wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll von invitrogen durchgeführt. Die Transformation erfolgte in die mitgelieferten kompetenten TOPI0-Zellen.

2.2.1.8 Ligation

Sollten DNA-Inserts in Vektoren ligiert werden, wurde dies in der Regel mit einer T4-Ligase bewerkstelligt. Hierbei wurde das Insert im 3-fachen Überschuss zum Vektor eingesetzt. Ein typischer Ligationsansatz hatte ein Volumen von 20 μL . Das Pipettierschema ist Tabelle 2.10 zu entnehmen.

Tabelle 2.10: Pipettierschema eines 20 μL Ligationsansatzes

Komponente	Menge
10x T4 Ligase Puffer (New England Biolabs)	2 μL
Vektor-DNA	0,025 pmol
Insert-DNA	0,075 pmol
T4 DNA-Ligase (New England Biolabs)	1 μL
deionisiertes Wasser	auf 20 μL auffüllen

2.2.1.9 Isolation von DNA aus Geweben

Um DNA aus Mausgeweben zu isolieren, wurde als Ausgangsmaterial entweder die Schwanzspitze oder Ohrlochmarken verwendet. Das Ausgangsmaterial wurde in ein steriles 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und 500 μL Mauslysepuffer zupipettiert. Um eine vollständige Lyse des Gewebes zu erreichen, wurde dieses für mindestens 3 Stunden bis maximal über Nacht bei 56°C und 300 rpm inkubiert. Um unlösbares Material zu sedimentieren wurde anschließend für 10 Minuten bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 μL Isopropanol überführt. Die DNA präzipitierte so und konnte durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei maximaler Umdrehung sedimentiert werden. Der Überstand wurde verworfen und die DNA für etwa 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Im letzten Arbeitsschritt wurde das Pellet in einem angemessenen Volumen TE-Puffer resuspendiert und der

DNA-Gehalt sowie die Reinheit der Probe mittels photometrischer Messung determiniert (siehe 2.2.1.2).

2.2.1.10 Isolation von DNA aus Zellen

Um DNA aus Zellen zu isolieren wurden diese in 6-MWD subkonfluent gezogen. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und anschließend die Zellen in 500 μ L DPBS mit einem Zellschaber vom Boden der Platte gekratzt und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation bei maximaler Umdrehungszahl wurden die Zellen sedimentiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 500 μ L Mauslysepuffer wurde analog zu 2.2.1.9 fortgefahren.

2.2.1.11 Isolation von RNA aus Zellen und Geweben

Um RNA aus Zellen oder Geweben zu isolieren, wurde das RNeasy[®] Mini Kit nach Herstellerprotokoll verwendet.

2.2.1.12 *in vitro*-Transkription von RNA

Um RNA für RNase H-Assays zu generieren, wurde das entsprechende Gen mittels PCR amplifiziert (siehe 2.2.1.14). Das PCR-Produkt wurde dann mittels TA Cloning[®] (siehe 2.2.1.7) in einen Vektor kloniert, der über einen T7- und/oder SP6-Promotor verfügte. Der Transkription vorangehend war ein Verdau mit einem geeigneten Restriktionsenzym (siehe 2.2.1.18, um den Vektor zu linearisieren. Nach einer Aufreinigung des linearisierten Vektors (siehe 2.2.1.5), wurden 250 ng (bzw. 350 ng bei Transkription vom SP6-Promotor) Vektor für die *in vitro*-Transkription verwendet. Für die *in vitro*-Transkription durch den T7-Promotor wurde das TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit entsprechend dem Herstellerprotokoll genutzt. Das Pipettierschema eine Transkriptionsansatzes ist aus Tabelle 2.11 ersichtlich. Nach erfolgter Transkription wurde die erhaltene RNA mittels des NucleoSpin[®] RNA Kit aufgereinigt und anschließend bei -80°C gelagert.

Analog wurde bei Nutzung des SP6-Promotors zur *in vitro*-Transkription vorgegangen. Hier wurde zur Transkription das SP6 Transcription Kit von Ambion[®] verwendet. Das Pipettierschema eine Ansatzes ist in Tabelle 2.12 dargestellt.

Tabelle 2.11: Pipettierschema eines T7 *in vitro* Transkriptionsansatzes

Komponente	Menge
5x TranscriptAid Reaktionspuffer	4 μL
ATP	2 μL
CTP	2 μL
GTP	2 μL
UTP	2 μL
TranscriptAid Enzyme Mix	2 μL
DNA template	250 ng
Nuklease-freies Wasser	ad 20 μL

Tabelle 2.12: Pipettierschema eines SP6 *in vitro* Transkriptionsansatzes

Komponente	Menge
10x SP6 Reaktionspuffer	2 μL
NTP/CAP	10 μL
Enzym-Mix	2 μL
DNA template	350 ng
Nuklease-freies Wasser	ad 20 μL

2.2.1.13 Aufreinigung von RNA

RNA wurde bei Bedarf mit dem NucleoSpin[®] RNA Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

2.2.1.14 RNase H-Assay

Um die Effektivität verschiedener Antisense-Oligonukleotide zu testen, wurde ein RNase H-Assay verwendet. RNase H ist eine nicht-spezifische Endonuklease, die Heteroduplices aus RNA und DNA spaltet (Hausen und Stein, 1970; Miller *et al.*, 1973). Mit einem RNase H-Assay kann die Affinität verschiedener chemisch modifizierter Antisense-Oligonukleotide zu einer Ziel-RNA und deren Fähigkeit den RNase H-Abbau zu induzieren getestet werden.

Der schematische Ablauf eines solchen Assays ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Dabei wurde RNA generiert (siehe 2.2.1.12), die später auch *in vivo* herunter-reguliert werden sollte. Das Antisense-Oligonukleotid wurde dann in verschiedenen Konzentrationen (0 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM und 500 nM) zusammen mit RNase H zur Ziel-RNA gegeben. Das Pipettierschema eines Ansatzes ist in Tabelle 2.13 zu sehen. Nach Bindung des DNA-haltigen Oligonukleotides an die RNA wurde diese durch die RNase H gespalten. In einem Agarosegel (siehe 2.2.1.15) konnten

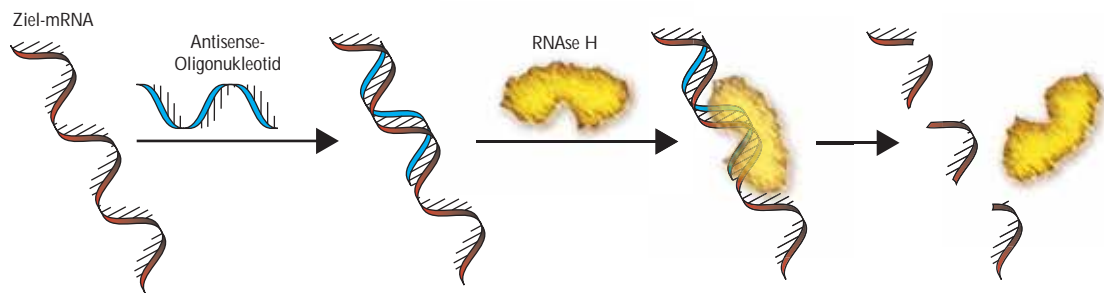


Abbildung 2.1: Schema eines RNase H-Assays Nach Bindung eines DNA-haltigen Antisense-Oligonukleotides an die RNA, kann der so entstandene Heteroduplex durch die unspezifische Endonuklease RNase H gebunden und der RNA-Strang gespalten werden.

dann sowohl der Abbau der RNA als auch die Zunahme an Degradationsprodukten determiniert werden. Dabei wurde ein Foto des Gels mithilfe des Programms Fiji ausgewertet und das Verhältnis undegradierter und degradierter RNA bestimmt. Durch Prism 5 wurde auf Basis des Modells $y = \frac{100}{1 + 10^{\frac{\log(\text{inhibitor}) - \log IC_{50}}{HillSlope}}}$ (log(inhibitor) vs. normalized response - Variable slope) der IC_{50} für alle zu testenden Antisense-Oligonukleotide bestimmt.

Tabelle 2.13: Pipettierschema eines RNase H-Reaktionsmixes

Komponente	Menge
DTT (10 mM)	1 μ L
RNase H Reaktionspuffer (5x)	2 μ L
RNA (100 ng/ μ L)	1 μ L
RNase H	1 u
RNase-freies Wasser	ad 8 μ L
Oligonukleotid (verschiedene Konzentrationen)	2 μ L

2.2.1.15 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren ihrer Größe nach aufzutrennen, wird sich deren negative Ladung nutzbar gemacht. Diese lässt sie in einem elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode laufen. Im Gegensatz zu einer Auftrennung von Proteinen wird in diesem Fall nicht Polyacrylamid als Matrix gewählt, sondern Agarose. Die verwendete Agarose-Konzentration ist dabei maßgeblich für den Trenngrößenbereich verantwortlich. Für Nukleinsäuren in einem Bereich von 0,4 – 7 kb ist eine Agarose-Konzentration von 1% (w/v) ideal. Für die Anfertigung eines 1%-igen Gels zur Auftrennung von

DNA wurde 1 g Agarose in 100 mL 1x TBE-Puffer gelöst und aufgeköcht. Für RNA-Gele wurde statt TBE-Puffer TAE-Puffer verwendet. Nachdem diese Lösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurden ihr 2 µL GelRed zugesetzt. Das Gel wurde anschließend in eine Elektrophoresekammer gestellt und mit Laufpuffer (1x TBE bzw 1x TAE) überschichtet. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V. Die Größenbestimmung erfolgte über einen Vergleich zum entsprechend der Probe mit ins Gel geladenen Größenmarker. Die Detektion der Fragmente wurde unter UV-Licht vorgenommen und das Gel dort fotografiert.

2.2.1.16 Sequenzierung von DNA

Um DNA-Abschnitte zu sequenzieren, wurde die von Frederick Sanger entwickelte Methode in modifizierter Form verwendet (Sanger *et al.*, 1977). Für eine Sequenzierung wurden 100 - 150 ng DNA denaturiert und mit 3 µL Quick Start Mix aus dem GenomeLab DTCS Quick Start Kit, sowie 2 µL des für den Sequenzierungsbeginn erforderlichen Primer. Die Reaktionsbedingungen im Thermocycler sind Tabelle 2.14 zu entnehmen.

Tabelle 2.14: Cyclerprogramm für eine Sequenzierungsreaktion

Temperatur	Dauer	
95°C	2 min	
98°C	20 s	} 35 Zyklen
56°C	20 s	
60°C	4 min	
60°C	3 min	
10°C	∞	

Anschließend wurden 10 µL des PCR-Produktes durch Zugabe von 10 µL ddH₂O, 2 µL 0,5 M EDTA (pH 8,0), 1 µL Glykogen sowie 2 µL 3 M Natriumacetat inaktiviert. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch 60 µL eiskalten 100%-igen Ethanol. Im Anschluss konnte die DNA durch 5-minütige Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C sedimentiert werden. Das erhaltene Pellet wurde mit 180 µL 70%-igen Ethanol gewaschen und erneut wie zuvor durch Zentrifugation pelletiert. Im Folgenden wurde der Überstand verworfen und das Pellet unter Lichtausschluss getrocknet. Schlussendlich

wurde die DNA in 35 μ L SLS resuspendiert und am Kapillarsequencer CEQ800 (Beckman Coulter) sequenziert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der eXpress Profiler Software (Beckman Coulter).

2.2.1.17 Expressionprofiling durch Fragmentanalyse GeXP

Um das Expressionsprofil einer Zelllinie unter verschiedenen Bedingungen bzw. von Geweben zu erstellen, wurde das GeXP-System von Beckman Coulter verwendet. Hierbei wird mRNA aus dem gewünschten Zellen bzw. Gewebe isoliert (siehe 2.2.1.11) und mittels reverser Transkription und reverse Primern in cDNA umgeschrieben. Hierbei wurden Primer für die zu analysierenden Gene eingesetzt, die zusätzlich an einen universalen reverse Tag gekoppelt waren. Diese Mischung aus Primern, der Primerplex, kann Tabelle A.1 im Anhang entnommen werden. Auf diese Weise wurde cDNA für alle gewünschten Gene erhalten, die zusätzlich reverse von einer universale Tag-Sequenz flankiert wurde. Im nächsten Schritt wurde eine Multiplex-PCR verwendet, in der sowohl chimäre als auch universale Primersets zum Einsatz kamen. Chimäre forward Primer bestanden dabei aus einem Anteil genspezifischer Sequenz, die für die Bindung an die cDNA-Amplikons verantwortlich waren und einer forward universalen Tag-Sequenz. Hier entstanden dann für alle zu analysierenden Gene Amplikons, die an beiden Seiten von universalen Tag-Sequenzen flankiert wurden. Im zweiten Schritt der PCR (ab Zyklus 3) banden vor allem die universalen Primer an die in den beiden ersten Zyklen entstanden templates. Diese universalen Primer waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff WellRED gekoppelt. Wichtig beim Design der Primerplexe war, dass die Amplikons der unterschiedlichen Gene eine unterschiedliche Länge aufwiesen. Durch Analyse im Kapillarsequencer CEQ800 und der zugehörigen Software konnten die relativen Mengen an Amplikon für jedes Gen im Vergleich mit einem housekeeping-Gen determiniert werden. Der Ablauf dieses Prozesses ist in Abbildung 2.2 dargestellt. Essentiell für eine korrekte Quantifizierung ist sowohl die Wahl eines geeigneten housekeeping-Gens, als auch die richtige Verdünnung der dem Kit beiliegenden KAN^r RNA in der reversen Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion). Hierfür wurden für jeden Primerplex im Vorfeld verschiedene Konzentrationen dieser Kontroll-RNA getestet und diejenige ausgewählt deren Signal median zu denen der zu testenden Amplikons lag. Das Pipettierschema einer RT-Reaktion ist in Tabelle 2.15 zu sehen. Der Arbeitsablauf wurde komplett nach den Herstellerangaben mit Hilfe des GenomeLab™ GeXP Start Kit (Beckman Coulter) durchgeführt.

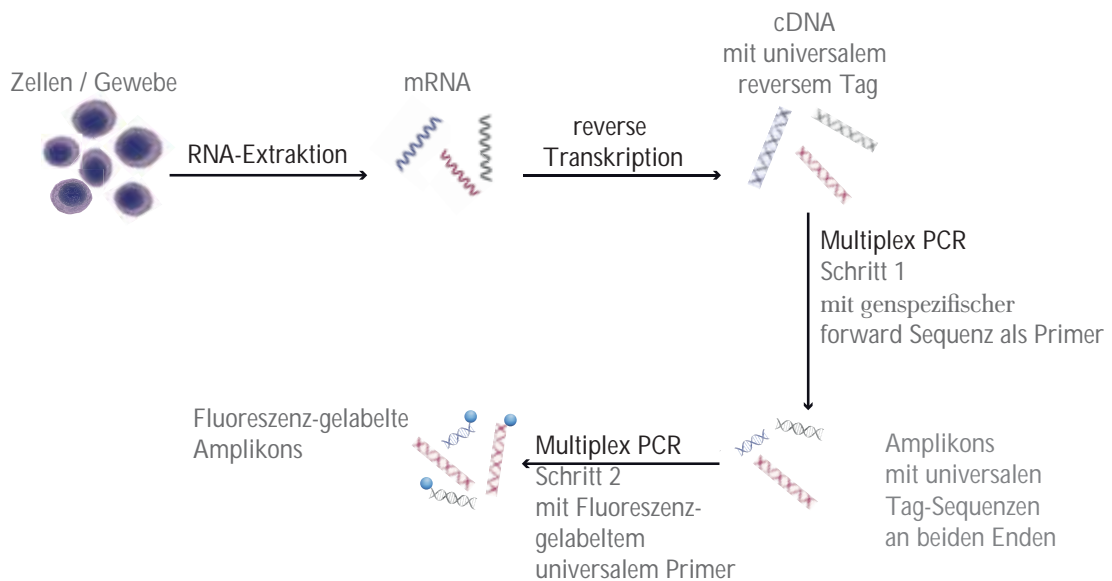


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Ablaufes eines Expressionsprofilings

Tabelle 2.15: Pipettierschema eines RT-Reaktionsansatzes

Komponente	Menge
RT Primerplex	2 μL
RT Puffer (5x)	4 μL
Verdünnte KAN ^r RNA	5 μL
Reverse Transkriptase	1 μL
RNA-Probe	5 μL (25 - 100 ng)
Nuklease-freies Wasser	3 μL

2.2.1.18 Restriktionsverdau

Um DNA-Fragmente umzuklonieren, Vektoren zu linearisieren oder Klone zu analysieren wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Dazu wurden Endonukleasen eingesetzt, die innerhalb einer DNA-Sequenz in einem spezifischen Bereich schneiden. Dabei schneiden manche Restriktionsenzyme so, dass Überhänge an den Schnittstellen entstehen (*sticky ends*) und andere so, dass glatte Enden (*blunt ends*) vorliegen. *Sticky ends* können dabei mit komplementären Enden ligiert werden, die mit demselben Enzym geschnitten wurden. Dies macht man sich beim Umklonieren von DNA-Fragmenten zunutze. Für einen Standardansatz wurden die in Tabelle 2.16 genannten Mengen zusammenpipettiert und für zwei bis drei Stunden bei der optimalen Reaktionstemperatur der verwendeten Enzyme inkubiert. Das Ergebnis eines Restriktionsverdaus wurde in der Regel in einem 1%-Agarose-Gel aufgetrennt (siehe 2.2.1.15). Wurde der Ansatz sofort für einen weiteren Verdau ver-

wendet, wurde zuvor das Restriktionsenzym durch eine Temperaturerhöhung auf 65 – 68°C für 15 Minuten inaktiviert.

Tabelle 2.16: Pipettierschema eines Restriktionsverdau

Komponente	Menge
DNA	2 µg
Restriktionspuffer (10x)	2 µL
Restriktionsenzym	2 µL
Nuklease-freies Wasser	ad 20 µL

2.2.1.19 Rekombinante Expression von hLOX und hLOXL2

Um cDNA der beiden Enzyme zu erhalten wurde RNA aus HUVEC isoliert (siehe 2.2.1.11) und in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.1.12). Mittels PCR (siehe 2.2.1.4) wurden die entsprechenden Abschnitte für aktives, reifes hmLOX (ohne Signal- und Propeptid) amplifiziert (Primer siehe Anhang Tabelle A.1). Über den reversen Primer wurde ein 6xHis-Tag an das Protein gekoppelt, sodass eine Aufreinigung über eine Säulenmatrix möglich war (siehe 2.2.4.8). Das PCR-Produkt wurde in einen pGEX-4T1-Vektor ligiert und in chemokompetente *E.coli* transformiert (siehe 2.2.2.5). Durch Gabe von IPTG konnte so die Expression des hmLOX in einer Flüssigkultur von Bakterien gestartet werden (siehe 2.2.2.1).

Analog wurde für die Expression von hLOXL2 vorgegangen. Hier wurde allerdings nicht das Signalpeptid aus der CDS entfernt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde dabei in den lentiviralen Vektor pLVX-puro ligiert und konnte so über lentivirale Transduktion in HEK-Zellen eingeführt werden (siehe 2.2.6.9), die LOXL2 stabil exprimierten. Dieses konnte aus dem Zellüberstand aufgereinigt werden.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Flüssigkultur von Bakterien

Für eine Übernacht-Kultur wurden 8 mL LB-Medium supplementiert mit dem jeweiligen benötigten Antibiotikum in ein steriles 12 mL Zellkulturrohrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) pipettiert. Das Medium wurde dann mit Hilfe einer sterilen 200 µL Pipettenspitze aus einer Kryokultur

(siehe 2.2.2.2 von Bakterien oder durch Picken einer Bakterienkolonie von einer Agar-Selektionsplatte (siehe 2.2.2.4) angeimpft. Anschließend wurde das Röhrchen bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) in einen Inkubator gegeben. Größere Bakterienkulturen mit Volumen von 200 bis 500 mL konnten durch Überführen der Übernachtskultur in einen sterilen Erlenmeyer-Kolben mit Schikane und der entsprechenden Menge an Antibiotikum-supplementiertem LB-Medium erhalten werden.

2.2.2.2 Kryokonservierung von Bakterien

Um Bakterienkulturen für die Langzeitlagerung zu erhalten, wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden 900 µL einer Bakterienkultur (siehe 2.2.2.1) mit 100 µL sterilem Glycerin vermischt und diese Kultur bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 Bestimmung von Bakterienkonzentrationen durch photometrische Messung

Um die Konzentration der Bakterien in der Lösung zu bestimmen, wurde deren Extinktionswert bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Bei einer Messlänge von 1 cm entspricht dabei eine optische Dichte (OD) von 1 etwa $8 \cdot 10^8$ Zellen je mL. Als Nullwert wurde die OD von sterilem LB-Medium bestimmt.

2.2.2.4 Bakterienkultivierung auf Agar-Selektionsplatten

Zur Herstellung von Agarplatten wurden 1,5% Agar in LB-Medium gegeben und durch Autoklavieren gelöst und sterilisiert. Nach Abkühlung auf etwa 50°C, wurde dem Agargemisch das entsprechende Antibiotikum zugesetzt und es so in sterile Petrischalen gegossen, dass der Boden bedeckt war. Nach Erkalten des Agars wurden die Schalen auf den Kopf gestellt und für eine Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Das auf den Kopf stellen war nötig, um ein Betropfen des Agars durch Kondenswasser zu vermeiden. Die Lagerung erfolgte ebenfalls in herumgedrehten Zustand bei 4°C für maximal 4 Wochen. Um eine Plattenkultur herzustellen, wurden etwa 50 µL einer Flüssigkultur als Verdünnungsausstriches mit einer Impföse oder verdünnt mit einem sterilen Drygalski-Spatel auf den Agar ausgebracht.

2.2.2.5 Transformation von Plasmiden in kompetente Bakterien

Um Plasmide zu amplifizieren, wurden diese in kompetente Bakterien transformiert. Dazu wurden Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Plasmid-DNA vermischt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis, erfolgte ein Hitzeschock von 42°C für 45 Sekunden. Die so transformierten Bakterien wurden für weitere zwei Minuten auf Eis inkubiert und dann mit 250 µL SOC-Medium vermischt. Die so erhaltene Bakterienkultur wurde für 30 Minuten bei 37°C und 250 rpm horizontal geschüttelt. Im Anschluss wurden je 10, 100 und 140 µL der Kultur auf Selektions-Agarplatten ausplattiert. Diese Selektions-Agarplatten wurden dann über Nacht bei 37°C inkubiert. Die am nächsten Tag erkennbaren Bakterienkolonien wurden dann entweder gepickt und in eine größere Flüssigkultur überführt oder direkt verarbeitet.

2.2.3 Peptidchemie

2.2.3.1 Solid-Phase-Peptide-Synthesis

Die Synthese von Peptidsequenzen war ein essentieller Teil der vorliegenden Arbeit. Verwendet wurde dabei die Fmoc-Strategie zur solid phase peptide synthesis (Festphasenpeptidsynthese). Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) dient dabei als basenlabile N- α -Schutzgruppe, die eine multiple Addition der jeweiligen Aminosäure verhindert. Vor dem nächsten Kopplungsschritt konnte diese Schutzgruppe mittels einer 20%-igen Piperidin-Lösung in N,N-Dimethylformamid abgespalten und so die Aminogruppe zurück in den reaktiven Zustand versetzt werden. Die zu koppelnde Aminosäure wurde durch das Uroniumsalz HBTU in einen aktivierten Ester überführt (siehe Abbildung 2.4 (A)), welcher vom nukleophilen Stickstoff, der Aminogruppe der bereits gekoppelten Aminosäure angegriffen werden konnte. Unter Abspaltung von H₂O wurde so eine neue Peptidbindung zwischen den beiden Aminosäuren geformt (siehe Abbildung 2.4 (B)). Nach Entschützen der so gekoppelten Aminosäure wurde dies so lange wiederholt, bis die gewünschte Sequenz erreicht war. Das finale Abtrennen und Entschützen erfolgte durch 95% Trifluoressigsäure mit 5% H₂O und 1% Triisopropylsilan. Enthielt die synthetisierte Sequenz zwei Cysteine, die später eine Disulfidbrücke bilden sollte, wurde für die Abspaltung die Menge an zugesetztem H₂O auf 2,5% reduziert und 2,5% Ethandiol zum Schutz des Schwefels zugesetzt. Eine Übersicht über die Synthesestrategie gibt Abbildung 2.3. Exemplarisch ist die Synthese eines Tripeptides mit der Sequenz Glycin-Serin-Threonin in Tabelle 2.17 dargestellt. Alle Inkubationsschritte erfolgten in einer Argonatmosphäre.

Nach der Abspaltung vom Harz, wurde die Peptid-haltige Lösung mit einem Argonstrom abgeblasen,

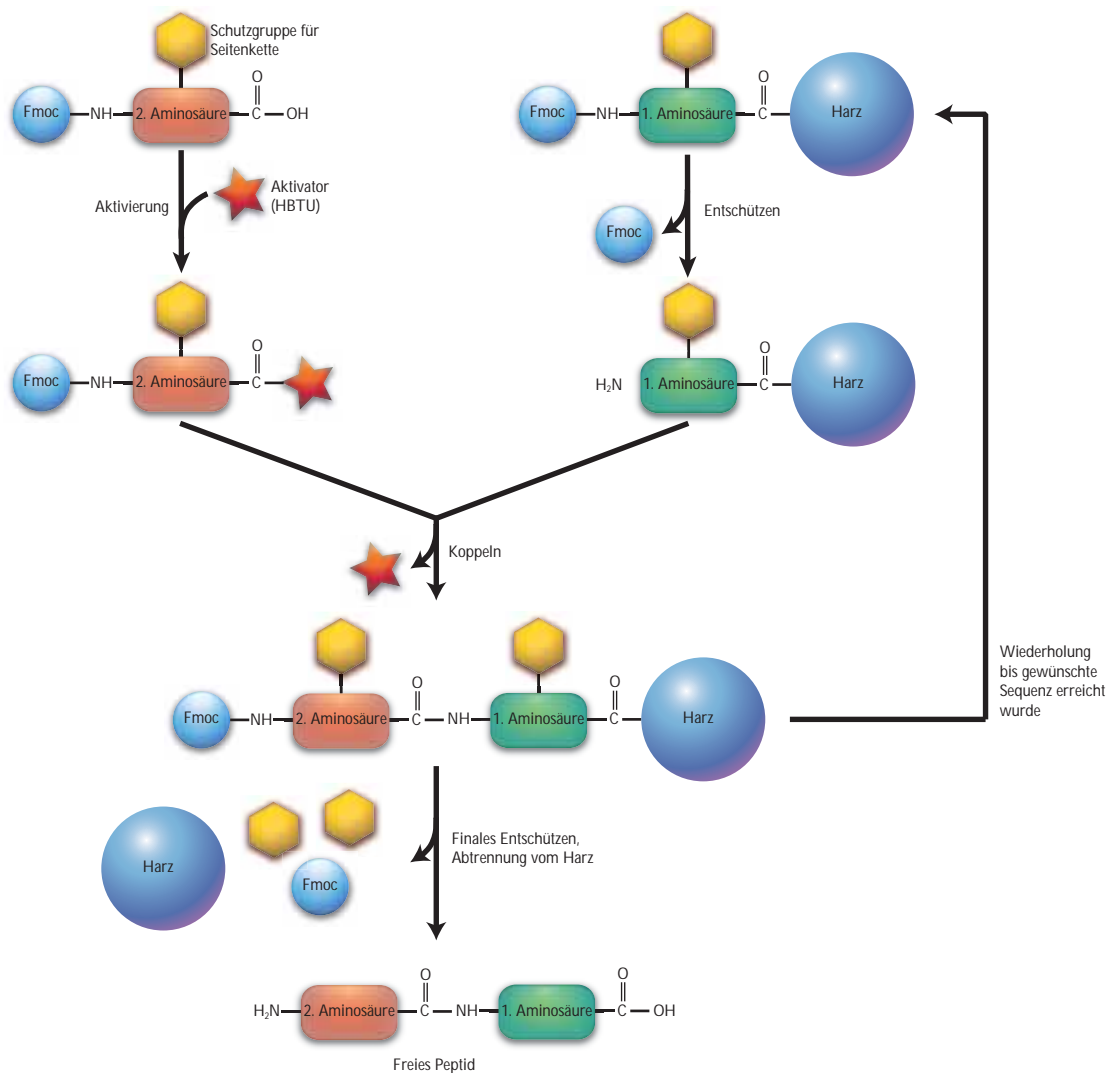


Abbildung 2.3: Übersicht über die Solid Phase Peptide Synthesis

das neunfache Volumen Diethylether zugesetzt und für 1 Stunde bei -20°C inkubiert. Dies bewirkte die Präzipitation des freien Peptides. Durch Zentrifugation für 20 Minuten bei maximaler Umdrehung wurde sedimentiert und anschließend noch zwei Mal mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknen des Peptides, wurde eine Probe für die Massenbestimmung vorbereitet (siehe 2.2.4.14) und eine Aufreinigung mittels HPLC durchgeführt (siehe 2.2.4.14).

2.2.3.2 Zyklisierung eines Peptids durch Ausbildung einer Disulfidbrücke

Wurden bei der Synthese des Peptides im C- und N-terminalen Bereich Cysteine eingebracht, so bestand die Möglichkeit das Peptid, durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Thiolgruppen der Cysteine, zu zyklisieren. Bewerkstelligt wurde dies durch Oxidation in leicht basischem

Tabelle 2.17: Beispiel für eine SPPS. Synthese eines Tripeptides mit der Sequenz GST.DMF = *N,N*-Dimethylformamid, TMP = Trimethylpyridin, DCM = Dichlormethan, TFA = Trifluoressigsäure, TIS = Triisopropylsilan

Schritt	Reagenz	Menge in Eq.	Dauer in min
Zugabe des Harzes	rink amide resin	1	-
Quellen des Harzes	DCM	-	30
Waschen	DMF	-	3 x 1
Entschützen	20% Piperidin in DMF	-	20
Waschen	DMF	-	3 x 1
Koppeln der 1. Aminosäure	Fmoc-Thr(tBu)-OH HBTU in 4% 2,4,6-TMP in DMF	5 4,8	90
Waschen	DMF	-	3 x 1
Entschützen	20% Piperidin in DMF	-	20
Waschen	DMF	-	3 x 1
Koppeln der 2. Aminosäure	Fmoc-Ser(tBu)-OH HBTU in 4% 2,4,6-TMP in DMF	5 4,8	90
Waschen	DMF	-	3 x 1
Entschützen	20% Piperidin in DMF	-	20
Waschen	DMF	-	3 x 1
Koppeln der 3. Aminosäure	Fmoc-Gly-OH HBTU in 4% 2,4,6-TMP in DMF	5 4,8	90
Waschen	DMF	-	3 x 1
Waschen	DCM	-	3 x 1
Abspalten und finales Entschützen	94% TFA 5% H ₂ O 1% TIS		30

Milieu (He *et al.*, 2006). 75 mg Peptid wurden dazu in 250 mL 0,1 Ammoniumbikarbonat gelöst und für 48 h gerührt.

2.2.3.3 Ellman's Test zum Nachweis freier Thiolgruppen

Um nach der Zyklisierung sicherzustellen, dass keine freien Thiolgruppen mehr vorliegen, wurde ein Ellman's Test durchgeführt (Ellman, 1959). Dazu wurden je 50 µL der Peptidlösung vor und nach der Zyklisierung mit je 1 mL 0,1 M NaH₂PO₄ mit pH 8 und 20 µL einer 4 mg/mL 5,5-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure) in 0,1 M NaH₂PO₄ mit pH 8 versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 412 nm gemessen und zwischen den beiden jeweiligen Proben verglichen. Eine geringer Absorption war dabei mit einer geringeren Zahl freier Thiolgruppen korreliert.

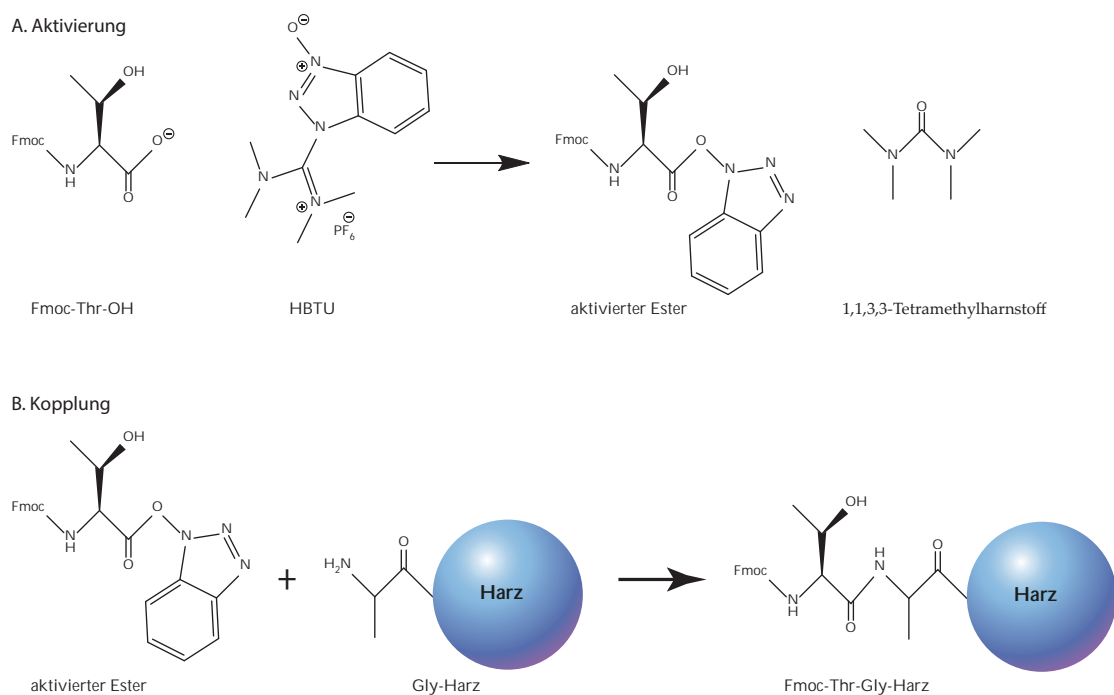


Abbildung 2.4: Reaktionsmechanismus der Aktivierung und Aminosäurekopplung. (A) Die Aktivierung der zu koppelnden Aminosäure erfolgt unter basischen Bedingungen durch das Uronium-Reagenz HBTU, das die Aminosäure in einen reaktiveren aktivierten Ester überführt. (B) Dieser aktivierte Ester kann nukleophil von der Aminogruppe der bereits gekoppelten Aminosäure angegriffen und so eine kovalente Peptidbindung geformt werden.

2.2.3.4 Ringschluss durch Ruthenium-katalysierte Alkenmetathese

Durch das Einführen von Alken-haltigen Aminosäuren, konnten synthetisierte Peptide mit einer Alken-Klammer versehen werden (Johannes *et al.*, 2010). Eine schematische Darstellung dieser Ringschlussmetathese ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Die Reaktion wird durch einen Ruthenium-haltigen Katalysator (Grubbs' Katalysator 1st Generation) katalysiert (Grubbs und Trnka, 2004). Durch den Ringschluss wurde Ethen freigesetzt, das als Gas der Reaktion entweicht. Der Ringschluss erfolgte während der SPPS (siehe 2.2.3.1) unmittelbar vor dem Entschützen für die Kopplung des Linkers bzw. von Fluorescein. Das Harz wurde dabei drei Mal mit DCE unter Argon-Strom gewaschen und anschließend in 10 mL 10 mM Grubbs-Katalysator (Grubbs Catalyst 1st Generation, Sigma-Aldrich) in trockenem DCE für 4 Stunden inkubiert. Eventuell verdampftes DCE wurde sukzessive durch frisches, trockenes DCE ersetzt. Nach dem Ringschluss wurde das Harz zwei Mal mit DCE, drei Mal mit DCM, drei Mal mit DMSO und drei Mal mit DMF gewaschen. Nun wurde durch Zugabe von 20% Piperidin in DMF für 20 Minuten entschützt und der Linker bzw. Fluorescein gekoppelt.

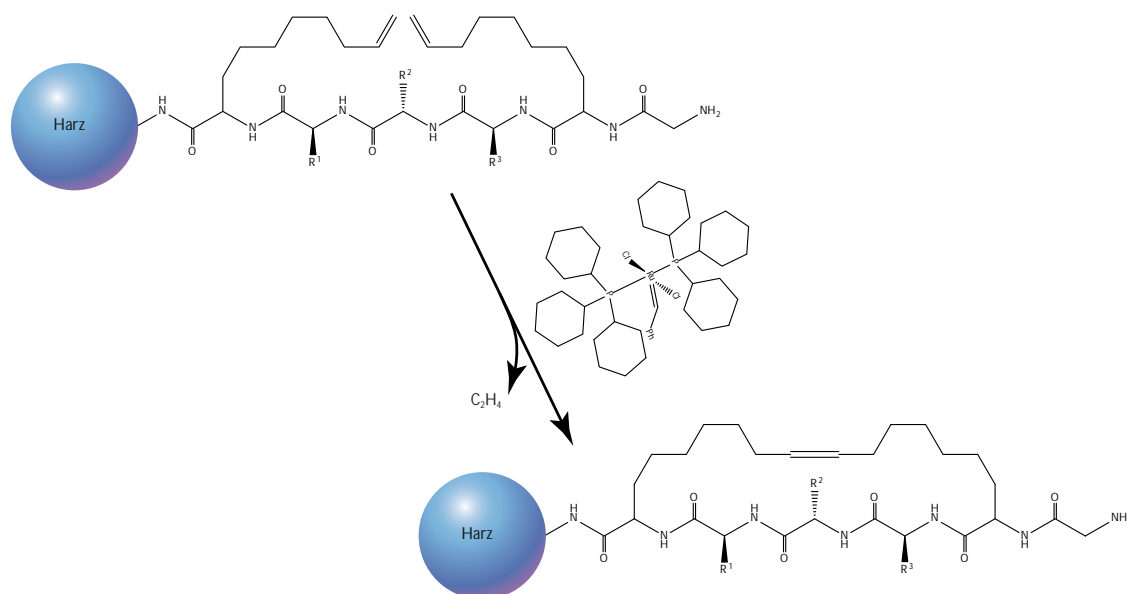


Abbildung 2.5: Schema einer Ringschlussmetathesereaktion. Durch Einfügen zweier Aminosäuren mit Alkenresten, besteht die Möglichkeit das Peptid mit einer Hydrocarbon-Klammer zu stabilisieren. Die Reaktion beider Alkene wird dabei als Ringschlussmetathese bezeichnet und findet in Anwesenheit von Benzylidenbis(tricyclohexylphosphin)dichlororuthenium, nach seinem Entwickler auch als Grubbs's Katalysator 1. Generation bezeichnet, statt. Während der Reaktion wird Ethen frei, das als Gas entweicht.

2.2.4 Proteinbiochemische und biochemische Methoden

2.2.4.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese / SDS-PAGE

Um Proteine ihrer Masse nach aufzutrennen, bedient man sich im Allgemeinen der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Geschwindigkeit mit der Proteine in einem elektrischen Feld wandern, hängt gewöhnlich von drei Faktoren ab: (1) ihrer Größe, (2) ihrer Ladung und (3) ihrer räumlichen Struktur. Durch die Zugabe des stark amphipatischen Detergenzes SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat) wird sowohl die Ladung als auch die Struktur aus dieser Gleichung genommen. SDS lagert sich an die Proteine an, und bricht so deren eventuelle Quartärstrukturen auf. Mit seiner stark negativen Ladung überdeckt es zudem die Eigenladung der Proteine. Um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten, wird außerdem β -Mercaptoethanol zugesetzt, welches sämtliche Disulfidbrücken im Protein spaltet und das Proteingemisch auf 95°C erhitzt, um sämtliche Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzulösen. Die SDS-PAGE bedient sich zweier Gelsysteme mit unterschiedlichen pH-Werten. Das aufzutrennende Proteingemisch wird hierbei zuerst im Übergangsbereich zwischen dem sogenannten Sammelgel und dem Trenngel aufkonzentriert. Dies geschieht aufgrund des Feldstärkegradienten, der aus den beiden verschiedenen pH-Werten resul-

tiert. Das Trenngel konnte in verschiedenen Acrylamid-Konzentrationen hergestellt und so optimal auf die zu trennenden Proteine abgestimmt werden. Das verwendete Puffersystem wurde nach Thomas und Kornberg hergestellt (Thomas und Kornberg, 1975). Eine Übersicht über die Zusammensetzung der Trenngele gibt Tabelle 2.18. Das Pipettierschema für ein Sammelgel ist aus Tabelle 2.19 ersichtlich.

Tabelle 2.18: Pipettierschema für 20 mL Trenngel-Lösung

Acrylamidkonzentration (%)	8	10	12	15	18
Trennbereich (kDa)	30-95	20-80	12-60	10-43	8-38
H ₂ O (mL)	9,3	7,9	6,6	4,6	2,6
30% Acrylamid-Lösung (mL)	5,3	6,7	8	10	12
1,5 M Tris (ph 8,8) (mL)	5	5	5	5	5
10% APS (µL)	200	200	200	200	200
TEMED (µL)	20	20	20	20	20

Tabelle 2.19: Pipettierschema für 3 mL Sammel-Lösung mit 5% Acrylamid

Komponente	Menge
H ₂ O (mL)	2,1
30% Acrylamid-Lösung (mL)	0,5
1 M Tris (ph 6,8) (µL)	380
10% APS (µL)	30
TEMED (µL)	3

Nach Gießen des Trenngels, wurde dieses bis zur vollständigen Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Proteinproben wurden mit $\frac{1}{5}$ 5x SDS-Probenpuffer versehen, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend ins Gel geladen. Zur Determination der Größe, wurde zusätzlich ein Größenstandard geladen. Die Elektrophorese erfolgte für 10 Minuten bei 20 V und bis zur vollständigen Auftrennung der Proteine bei 100 V. Das Gel wurde im Anschluss entweder direkt gefärbt (siehe 2.2.4.2 und 2.2.4.3) oder auf eine Membran geblottet (siehe 2.2.4.4)

2.2.4.2 Färben von Proteingelen mittels kolloidalem Coomassie

Die kolloidale Coomassie-Färbung kann als Weiterentwicklung der recht unsensitiven herkömmlichen Coomassie-Färbung angesehen werden (Kang *et al.*, 2002). Sie färbt Proteinbanden bis zu 2 ng und ist nahezu so sensitiv wie eine Silberfärbung. Zu Beginn wurden die Gele für 3 x 10 Minuten in ddH₂O gewaschen, um das enthaltene SDS aus den Gelen zu entfernen, da dies für eine starke Hintergrundfärbung sorgte. Anschließend wurden die Gele in die Färbelösung gegeben und unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Nach etwa 15 Minuten konnten bereits größere Proteinmengen detektiert werden, eine Sättigung der Banden war nach etwa 3 Stunden erreicht. Gele mit zu starkem Hintergrund wurden bei Raumtemperatur unter Schwenken mit der Entfärbelösung so lange entfärbt bis der Hintergrund weitgehend verschwunden war. Gele ohne Hintergrund wurden in ddH₂O gegeben und zur Dokumentation eingescannt.

2.2.4.3 Färben von Proteingelen mittels Silberfärbung

Die Silberfärbung stellte die aufwendigste, aber auch sensitivste verwendete Methode dar, um Proteingele anzufärben. Die Nachweisgrenze einer Silberfärbung lag bei etwa 1 ng. Üblicherweise wurde das Gel zuerst mit Coomassie (siehe 2.2.4.2) gefärbt, da auf diese Weise eine Vorfixierung unnötig wurde. Coomassie-gefärbte Gele wurden für 2 x 20 Minuten in ddH₂O gewaschen und anschließend für 15 Minuten im Silberfärbungs-Fixierer unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Gele wurden dann für 3 x 20 Minuten in ddH₂O gewaschen und im Anschluss für 20 Minuten in frisch angesetzte Silberfärbelösung gegeben. Es folgten drei Waschschrte von je exakt 5 Minuten in ddH₂O, bevor die Gele in Reduzierer gegeben wurden. Nach etwa 30 Sekunden begannen sich die Proteinbanden rotbraun zu färben, da die Silberionen durch den Reduzierer als Silberkarbonat ausfielen. Die Reaktion wurde nach spätestens 5 Minuten bzw. bei ausreichender Färbung durch mehrfaches Spülen gestoppt. Anschließend wurden die Gele zur Dokumentation eingescannt.

2.2.4.4 Western-Blot

Zur Detektion von bestimmten Proteinen, die durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt worden waren (siehe 2.2.4.1), mussten diese auf einer Membran immobilisiert werden. Hierzu wurde das Wetblot-Verfahren genutzt. Als Membran diente entweder PVDF (Immobilon-P Membrane, 0,45 µm, Merck KGaA, Darmstadt) oder Nitrozellulosemembran (Whatman[®] Protran[®], 0,45 µm, GE Healthcare, München) . Die PVDF-Membran musste vor der Benutzung für 2 Minuten in Methanol aktiviert

werden, während die Nitrozellulose-Membran in Wetblot-Puffer äquilibriert wurde. Währenddessen wurden das zu blottende Gel sowie je zwei Stücke Whatman[®]-Papier (Whatman[®] 3MM Chr, GE Healthcare, München) in Wetblot-Puffer äquilibriert. Der Blotting-Vorgang erfolgte in einer Wetblot-Kammer bei 80 V und 4°C für 1,5 Stunden.

2.2.4.5 Proteinnachweis auf einer Nitrozellulose- oder PVDF-Membran

Nach dem Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Membran (siehe 2.2.4.4), wurden unspezifische Bindestellen durch Inkubation in Blocking-Lösung abgeblockt. Diese Blocking-Lösung richtete sich nach dem nachfolgend verwendeten Antikörper (siehe Tabelle 2.4) und erfolgte bei Raumtemperatur für 1 Stunde. Die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde über Nacht durchgeführt. Dabei wurde die Membran mit einer entsprechend angepassten Menge Antikörperlösung luftdicht eingeschweißt und auf einen Rotationsmischer bei 4°C aufgeklebt. Nach erfolgter Inkubation wurde 3 x 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und die dann die Inkubation mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2.5) für 30 Minuten bei Raumtemperatur vorgenommen. Nach der Inkubation wurde nicht gebundener Antikörper durch 3 x 5 Minuten waschen mit TBS-T entfernt. Der Blot konnte nun mit der Enhanced Chemiluminescence-Methode detektiert werden (siehe 2.2.4.6).

2.2.4.6 Enhanced Chemiluminescence zur Detektion von HRP-gekoppelten Antikörpern

Zum Nachweis HRP-gekoppelter Antikörper nutzt man das Enhanced Chemiluminescence Detektionssystem. In der dem ECL zugrunde liegenden Reaktion wird im alkalischen Milieu Luminol oxidiert. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Peroxidase, welche an den sekundären Antikörper gekoppelt ist. Luminol befindet sich während dieser Reaktion kurz in einem isoenergetisch angeregten Singulett-Zustand und emittiert so beim Zurückfallen in einen energetisch günstigeren Zustand ein Photon im blauen Bereich des Lichtspektrums. Diese Photonen werden mit Hilfe eines aufgelegten Röntgenfilms detektiert und so Orte auf der Membran sichtbar gemacht, an welchen sich der sekundäre, Peroxidase-gekoppelte Antikörper befand. Verwendet wurde dabei das ECL plus Western Blotting Kit (GE Healthcare, München). Verfahren wurde laut Herstellerprotokoll. Die Inkubationszeit mit der ECL-Lösung betrug 3 Minuten, während dieser wurde die Lösung permanent über den Blot pipettiert. Anschließend wurde der Blot zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt und in

einer Dunkelkammer der Röntgenfilm aufgelegt. Die Dauer der Exposition des Röntgenfilms mit dem Chemilumineszenzsignal wurde abhängig von dessen Stärke zwischen 10 Sekunden und 30 Minuten gewählt. Der Röntgenfilm wurde im Anschluss durch das automatische Entwicklersystem M35 X-OMAT Processor Developer (Kodak) entwickelt. Zu Dokumentationszwecken konnte der Blot eingescannt werden.

2.2.4.7 Strippen von Antikörpern

Gebundene Antikörper konnten mittels eines Strip-Puffers von der Nitrozellulose entfernt werden. Dies war vor allem notwendig, wenn nach erfolgter Detektion eines Proteins, ein weiteres Protein auf dem Blot mit einem Antikörper nachgewiesen werden sollte. PVDF-Membranen waren für das Strippen dabei wesentlich geeigneter als solche aus Nitrozellulose, da bei letztere bei jedem Strip-Vorgang auch die geblocteten Proteine teilweise entfernt wurden. Das Strippen erfolgte über 2 x 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Blot 3 x 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und musste vor erneuter Inkubation mit einem Antikörper wieder gebloct werden (siehe 2.2.4.5).

2.2.4.8 Aufreinigung von Hexa-Histidin-Fusionsproteinen

Um reines LOXl2 für nachfolgende Experimente herzustellen, wurde mit einem entsprechenden Carrier-Plasmide pseudo-lentivirale Partikel erzeugt (siehe 2.2.6.9, die zur Transduktion der Gene in Zielzellen genutzt wurden (siehe 2.2.6.9. Für die Herstellung von LOX wurde die kodierende Sequenz ohne die Anteile für Signal- und Propeptid in einen bakteriellen Expressionsvektor (pGEX-4T1) kloniert und in *E. coli* B12 eingebracht. Die Expression konnte durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden. Da LOXl2 sezerniert werden sollte, wurde die Aufreinigung aus konditioniertem Medium vorgenommen. Für die Aufreinigung von LOX wurden Bakterienlysate verwendet.

Vorbereitung der Säulenmatrix Das übliche Säulenvolumen betrug 1 mL. Hierzu wurden 2 mL der 1:1 in 30% Ethanol gelagerten Co-IDA-Agarose in eine 50 mL Spritze mit speziell dafür angefertigter Fritte pipettiert und mit 5 mL Proteinaufreinigungs-Waschpuffer A überschichtet. Um die Matrix dann auf den richtigen pH-Wert zu äquilibrieren, wurde sie mit dem 10-fachen Säulenvolumen Waschpuffer A gespült. Anschließend konnte sie mit konditioniertem Medium aus LOX- bzw LOXL2-exprimierenden Zellen bzw. Bakterienlysaten überschichtet werden.

Aufreinigung über die Säulenmatrix Das konditionierte Medium wurde auf die Säule gegeben und

der Durchlauf komplett aufgefangen und bei -20°C gelagert, nachdem eine Probe für das Kontrollgel entnommen worden war. Anschließend wurde die Matrix in zwei Waschschrritten gereinigt und dann das Fusionsprotein durch zwei Elutionspuffer von der Säule gelöst. Die Aufreinigung wurde nach dem nachstehenden Schema vorgenommen: 40-faches Matrixvolumen Waschpuffer A pH 10,5 20-faches Matrixvolumen Waschpuffer B pH 9,0 15-faches Matrixvolumen Elutionspuffer C pH 7,5 10-faches Matrixvolumen Elutionspuffer D pH 6,0

Die jeweiligen Durchläufe wurden aufgefangen und nach der Entnahme einer Probe bei -20°C gelagert. Die Waschpuffer wurden als Ganzes, die Elutionspuffer dagegen in Aliquots zu à 1,5 ml aufgefangen. Die eluierten Proteine in Puffer C und D wurden in ihrem denaturierten Zustand maximal 3 Tage bei 4°C gelagert.

Aufbereitung der Säule Da eine Säule für bis zu 5 Aufreinigungen desselben Fusionsproteins verwendet werden konnte, wurde sie nach Gebrauch mit dem 15-30-fachen Matrixvolumen an Waschpuffer A gespült und anschließend für mindestens 30 Minuten in 0,5 M NaOH-Lösung inkubiert. Nach mehrmaligen Spülen mit 30%igem Ethanol konnte die Säule in selbigen bei 4°C gelagert werden.

2.2.4.9 Dialyse von Proteinlösungen

Um die nach einer Proteinaufreinigung unter denaturierenden Bedingungen vorliegenden Proteine zu renaturieren, musste der Harnstoff aus dem Elutionsspuffer schrittweise entfernt werden. Dies bewirkte eine sukzessive Rückfaltung der Polypeptidketten in ihre natürliche Konstitution. Um den Harnstoff zu entfernen, wurde die Protein-haltige Lösung in einen semi-permeablen Dialyseschlauch geladen, dessen Porengröße so gewählt wurde, dass zwar Harnstoff hindurch diffundieren konnte, aber das Fusionsprotein im Inneren verblieb. Durch ein Außenmedium ohne oder mit geringerer Harnstoffkonzentration konnte so der Harnstoff aus der Lösung entfernt werden, da er entlang seinem osmotischen Gradienten aus dem Schlauch in das umgebende Medium diffundierte.

2.2.4.10 Fällung von Proteinen

Aceton-Fällung Um Proteine, die sich in einer wässrigen Lösung befanden, zu fällen, wurde diese mit dem 9-fachen Volumen an -20°C kaltem 100%igem Aceton *p.A.* vermischt und entweder über Nacht bei -20°C oder für 2 Stunden bei -70°C inkubiert. Um die so gefällten Proteine zu sedimentieren, wurde der Ansatz nach der Inkubationszeit für 10 Minuten bei 4°C und $5.000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das so erhaltene Pellet aus Protein wurde luftgetrocknet und anschließend in einer geeigneten Menge SDS-Gelelektrophorese-Ladepuffer resuspendiert. Die

so erhalten Probe konnte bei -20° gelagert werden.

Trichloressigsäure-Fällung Bei zuckerhaltigen Proteinlösungen konnte keine Fällung mittels Aceton vorgenommen werden, da Aceton auch Zucker ausfällt. Alternativ konnte in diesen Fällen eine Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) vorgenommen werden. Hierzu wurde die proteinhaltige Lösung mit TCA in einer Endkonzentration von 10% (v/v) versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Sedimentation der Proteine wurde anschließend bei $16.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde zur Neutralisation mit einigen μL 1 M NaOH versetzt und anschließend in einer geeigneten Menge SDS-Gelelektrophorese-Ladepuffer resuspendiert.

2.2.4.11 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels BCA-Assay

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das Pierce BCATM Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerprotokoll verwendet. Bevorzugt wurde die Variante bei 60°C gewählt.

2.2.4.12 Extraktion von Extrazellulärer Matrix aus Tumoren

Proteine der Extrazellulären Matrix wurden nach einem adaptierten Protokoll basierend auf Kleinman *et al.* (1986) aus Tumorfragmenten extrahiert. Definierte Tumormassen wurden in 2 mL/g EZM Extraktionspuffer 1 unter Zuhilfenahme eines Ultra Turrax auf Eis homogenisiert. Durch Ultrazentrifugation ($100.000 \times g$, 4°C , 30 Minuten) wurden nicht-lösliche Proteine, wie die EZM, sedimentiert. Das Pellet wurde im selben Volumen EZM Extraktionspuffer 1 resuspendiert und erneut ultrazentrifugiert (dito). Die so erhaltenen Proteine wurden entweder direkt in PBS resuspendiert und als complete ECM (cECM) bezeichnet oder für eine Harnstoffextraktion verwendet. Für letzter wurde das Pellet in 1,8 mL/g Ausgangsmaterial EZM Extraktionspuffer 2 resuspendiert, kurz homogenisiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Unlösliches Material wurde durch einstündige Zentrifugation bei $26.000 \times g$ und 4°C pelletiert. Der Überstand mit Harnstoff-löslichen Proteinen wurde drei Mal in EZM Extraktionspuffer 3 dialysiert, um Harnstoff zu entfernen (siehe 2.2.4.9). Die nach einer Harnstoffextraktion erhaltene EZM wurde als urea soluble ECM (usECM) bezeichnet. Der Gehalt an Proteinen wurde mittels BCA-Assay bestimmt (siehe 2.2.4.11). Eine schematische Übersicht über den Prozess der EZM-Extraktion gibt Abbildung 2.6.

2.2.4.13 Aufreinigung von Peptiden mittels HPLC

Zur Aufreinigung von SPPS synthetisierten Peptiden wurde eine semi-preparative HPLC benutzt. Als Säulenmaterial fungierten dabei Polystyrene/Divinylbenzen-Partikel mit einer Größe von $8 \mu\text{m}$

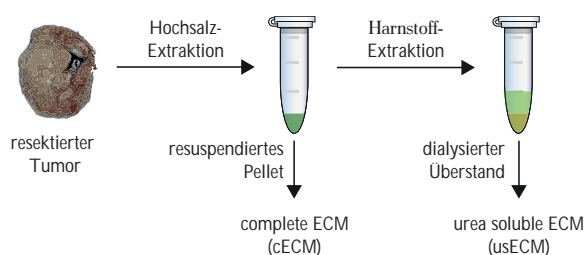


Abbildung 2.6: Schematische Übersicht über den EZM-Extraktions-Prozess

und Poren von 100 Å. Die zu reinigenden Peptide wurde entweder in DMSO oder in 0,1% TFA in H₂O gelöst. DMSO gelöste Peptide mussten 1:10 in 0,1% TFA in H₂O verdünnt werden bevor sie in das System geladen wurden. Das initiale Laufmittel war 0,1% TFA in 75% Acetonitril/ 25% H₂O (Laufmittel A). Das zweite Laufmittel stellte 0,1% TFA in H₂O dar (Laufmittel B). Der für die Peptidreinigung verwendete Gradient ist in Tabelle 2.20 dargestellt. Die Detektion der Peptide

Tabelle 2.20: Schema des Laufmittelgradienten für eine Peptid-Aufreinigungs-HPLC. Laufmittel A: 0,1% TFA in 75% Acetonitril/25% H₂O, Laufmittel B: 0,1% TFA in H₂O

Zeit [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL]
initial	100	0	15
2	100	0	15
18	0	100	15
21	0	100	15
23	100	0	15
30	100	0	15

erfolgte über eine photometrische Messung bei 220 nm. Mittels eines Probensammlers wurden 10 mL Aliquots im Bereich von 8 Minuten bis 18 gesammelt. Aliquots für die in der Detektion Peaks ermittelt wurden, wurden durch Messung am Massenpektrometer genauer charakterisiert (siehe 2.2.4.14), entsprechende Aliquots vereint und anschließend mittels einer Lyophilie gefriergetrocknet.

2.2.4.14 Größenbestimmung von Proteinen und Peptiden mittels MALDI-TOF

Um den Inhalt einzelner Aliquots aus einem HPLC-Lauf genau zu bestimmen bzw. um die korrekte Synthese von Peptiden zu verifizieren, wurde eine massenspektrometrische Messung durchgeführt. Verwendet wurde dazu das ProteoMass™ Peptide MALDI-MS Calibration Kit (Sigma-Aldrich). Peptidproben wurden abhängig von ihrer Löslichkeit in Acetonitril oder 0,1% TFA in Acetonitril gelöst

und auf eine Matrix aus α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure auf einer MTP AnchorChip 400/384 Platte getüpfelt. Die Messung und Auswertung erfolgte mittels des autoflexTM-Systems und der zugehörigen Software.

2.2.4.15 Extraktion von Doxorubicin aus Geweben

Um die Verteilung von Medikamenten im gesamten System einer Maus zu untersuchen, wurde die von Laginha *et al.* (2005) beschriebene Methode mit leichter Modifizierung verwendet. Einem oder mehreren Versuchstieren wurde ein Bolus von 100 μg Doxorubicin in 0,9% NaCl retroorbital injiziert und für zwei Stunden zirkulieren lassen. Die Maus / Mäuse wurde(n) anschließend durch cervicale Dislokation oder durch CO_2 getötet. Alle zu untersuchenden Organe wurden entnommen, in abgewogene Eppendorf-Gefäße gegeben und auf Trockeneis eingefroren. Als Kontrolle zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz wurde einem Kontrolltier ohne Doxorubicin-Gabe dieselben Organe entnommen. Entnommene Gewebe konnten bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert werden. Um die Homogenisierung der Proben zu ermöglichen, wurde die vierfache Menge Wasser zugegeben (w/v) und das Organ mittels eines Ultra-Turrax auf Eis homogenisiert. 200 μL des Homogenisats wurde in ein neues Cap überführt und 50 μL 10% Triton X-100 zugegeben. Nach 10 minütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 750 μL 0,75 N HCl in 2-Propanol. Nachdem die Proben gevortext wurden, wurden sie für 12-16 Stunden bei -20°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben ein weiteres Mal gevortext und dann durch Zentrifugation bei maximaler Umdrehung und 4°C für 20 Minuten geklärt. 200 μL Überstand wurden in einer schwarzen 96-MWP pipettiert und in einem Multilabel Plate Reader bei $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ gemessen. Nach Abzug der organspezifischen Hintergrundfluoreszenz konnte anhand einer Doxorubicin-Standardreihe der Anteil der injizierten Dosis pro g Gewebe errechnet werden.

2.2.4.16 Transwell-Permeabilitätsassay

Die Membranen eines 24-MWP transwell-Einsatzes (33 mm^2 Fläche je Membran, Costar, Cölbe) wurden mit $3 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ EZM oder Proteinen in 50 μL Volumen überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Zur Rekonstituierung der EZM wurde die obere Kammer des transwells mit 150 μL PBS gefüllt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 850 μL 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Doxorubicin in PBS in den unteren Teil des transwells gegeben. Die Diffusion von Doxorubicin durch die (beschichtete) Membran wurde über 6 h kontinuierlich mittels eines Multilabel Plate Readers bei $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 570 \text{ nm}$ detektiert.

Für einen LOX-Modifikations-Assay wurden 140 µg Matrigel (10 µg/mm²) mit 10 µg aufgereinigtem, rekombinantem hmLOX oder hLOXL2 in 50 µL (+/- 500 µM βAPN) gemischt und wie zuvor auf die Membranen eines transwell-Einsatzes (96-MWP-Format, 14 mm² Membranfläche, Costar, Cölbe) gegeben. Nach 6-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Membran getrocknet und wie zuvor vorgegangen (100 µL PBS in die obere Kammer, 300 µL Doxorubicin in PBS in die untere Kammer).

2.2.4.17 LOX-Aktivitätsassay

Um die relative Aktivität von Lysyloxidasen in Überständen und Zelllysaten zu determinieren, wurde ein LOX-Aktivitätsassay benutzt. Als Grundlage zur Etablierung diente dabei die von Palamakumbura und Trackman (2002) entwickelte Methode, die in Abbildung 2.7 dargestellt ist. Grundlage für die Detektion ist die Entstehung von Wasserstoffperoxid durch die Desaminierung von Cadaverin, welches allen LOX-Familienmitglieder als Substrat dient. Das bei dieser Oxidation entstandene H₂O₂ kann anschließend durch eine Meerrettich-Peroxidase (HRP) genutzt werden, um das nicht-fluoreszierende Ampliflu Red zu fluoreszierendem Resorufin zu oxidieren. Da diese Reaktion auch spontan in Abwesenheit von LOX(L) stattfindet, wurde als Negativkontrolle je ein Ansatz durch Zugabe von βAPN, einem LOX(L)-Inhibitor, inhibiert und von der eigentlichen Probe abgezogen. Die Zunahme von Resorufin kann zeitaufgelöst in einem Plattenlesegerät verfolgt werden. Aus dem Unterschied der Steigungen der inhibierten und nicht-inhibierten Probe kann die relative Gesamtaktivität der Lysyloxidasen berechnet werden.

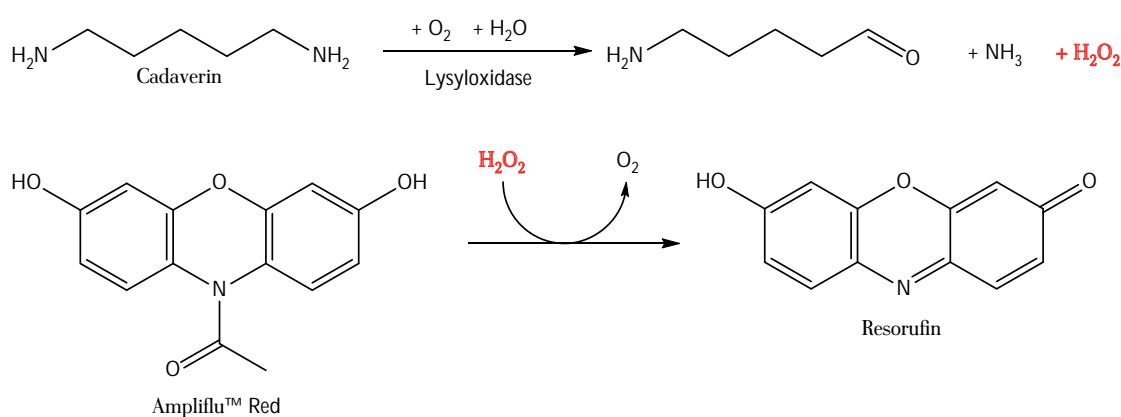


Abbildung 2.7: Schema des Lysyloxidase-Aktivitätsassays. Putativ Lysyloxidase-haltige Medien werden zu einer Reaktionsmischung mit Cadaverin, Meerrettich-Peroxidase und dem Farbstoff Ampliflu Red gegeben. Ist LOX vorhanden, oxidiert es Cadaverin. Bei dieser Reaktion wird H₂O₂ frei. In Anwesenheit von H₂O₂ oxidiert die Meerrettich-Peroxidase das nicht-fluoreszierende Ampliflu Red zu fluoreszierendem Resorufin. Dieses kann mit Hilfe eines multitable plate readers detektiert werden.

Tabelle 2.21: Pipettierschema für einen Reaktionsansatz LOX-Aktivitätsassay

Komponente	Menge in μL
2x PBS pH 8,2	75
100 μM Ampliflu Red in DMSO	15
100 mM Cadaverin	15
HRP 1 U/mL	15
nicht inhibiert: ddH ₂ O	30
bzw. inhibiert: 2,5 mM βAPN	30

2.2.4.18 Extraktion von Fluorescein-gelabelten Peptiden aus Geweben

Die Extraktion von Fluorescein-gelabelten Peptiden aus Geweben erfolgte analog zur Extraktion von Doxorubicin (siehe 2.2.4.15). Allerdings wurde statt 0,75 N HCl in 2-Propanol, Acetonitril verwendet.

2.2.5 Mikroskopische Methoden

2.2.5.1 Fixierung von Zellen

Fixierung von Kulturzellen mit Aceton / Methanol

Zellen wurden auf Deckgläsern oder in Chamberslides wachsen gelassen und kurz in PBS gespült. Es folgte eine Inkubation von 10 Minuten in -20°C kaltem Methanol und anschließend eine 10-minütige Inkubation in -20°C kaltem Aceton *p.A.* Die Zellen wurden im Anschluss luftgetrocknet.

Fixierung von Kulturzellen mit Formaldehyd / Triton™ X-100

Kulturzellen wurden kurz in PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten in einer 2%-igen Formaldehyd-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Um die so fixierten Zellen zu permeabilisieren, wurden sie anschließend kurz in PBS gewaschen und für 10 Minuten in eine 0,1% Triton-Lösung gegeben. Es folgte ein erneutes Waschen in PBS. Die Zellen durften dabei nicht austrocknen und wurden direkt im Anschluss verwendet.

2.2.5.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Alle Inkubationen erfolgten in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur, um ein Austrocknen der Präparate zu vermeiden. Nach der Fixierung wurden die Präparate für 30 Minuten mit dem entsprechend in PBS verdünntem Primärantikörper inkubiert. Um nicht gebundenen Antikörper aus den Proben auszuwaschen, wurden diese für 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die 30-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Folgte keine weitere Inkubation mit Anti-

körpern, wurde hier nach 20 Minuten Hoechst 33258 zur Färbung der DNA zugefügt. Anschließend wurden überschüssiger Antikörper und Hoechst durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt, die Proben für 1 Minute in 100% Ethanol entwässert und anschließend luftgetrocknet. Durch Zugabe eines Tropfens Mowiol wurden die Proben dann eingebettet. Bei einer doppelten Immunfluoreszenz wurde nach der Inkubation mit dem Sekundäntikörper dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem zweiten Primäntikörper inkubiert. Die folgenden Schritte erfolgten wie bereits beschrieben. Die Untersuchung der Proben erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop oder einem konfokalen Mikroskop.

2.2.5.3 Kryoschnitte

Für 3D-Rekonstruktionen und zur Beurteilung von Medikamentenverteilung wurden entsprechend Organe bzw. Tumoren nach der Resektion in Kryoschälchen gegeben und mit O.C.T. überschichtet. Durch Inkubation auf Trockeneis wurden die Proben gefroren und dann bei -80°C bis zum Anfertigen der Schnitte gelagert. Kryoschnitte wurden an einem Jung-CM3000 angefertigt. Die Schnittdicke betrug dabei je nach Anforderung 10 - 200 μm . Die Objekttemperatur während des Schneidens lag für die meisten Gewebe bei -16°C und die Kammertemperatur bei -35°C . Die Schnitte wurden mit einem Objektträger aufgenommen und mit Mowiol eingebettet.

2.2.5.4 Konfokale Mikroskopie

1955 entwickelte Dr. Marvin Minsky die konfokale Mikroskopie (Minsky, 1988). Auslöser waren seine Untersuchungen des Golgi-Apparates in Nervenzellen des Gehirns und seine Unzufriedenheit mit der Signal/Noise-Ratio konventioneller Mikroskopie. Das Innovative an der konfokalen Mikroskopie ist das Ausblenden von Streulicht durch eine Lochblende, der Dektektor-Apartur, sowie die Anregung nur eines Punktes des Präparates. Der Strahlengang des konfokalen Prinzips ist in Abbildung 2.8 dargestellt. Für die Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie standen drei verschiedene Systeme im Laufe dieser Arbeit zur Verfügung. Für 3D-Rekonstruktionen von Vaskulatur und/oder Medikamentenverteilung wurden meist Bildreihen mit einem 20x Trockenobjektiv und einer konfokalen Schnittdicke von 1 μm aufgenommen. Die Rekonstruktion in 3D erfolgte mittels des auf ImageJ basierenden Open Source Image Processing Package Fiji.

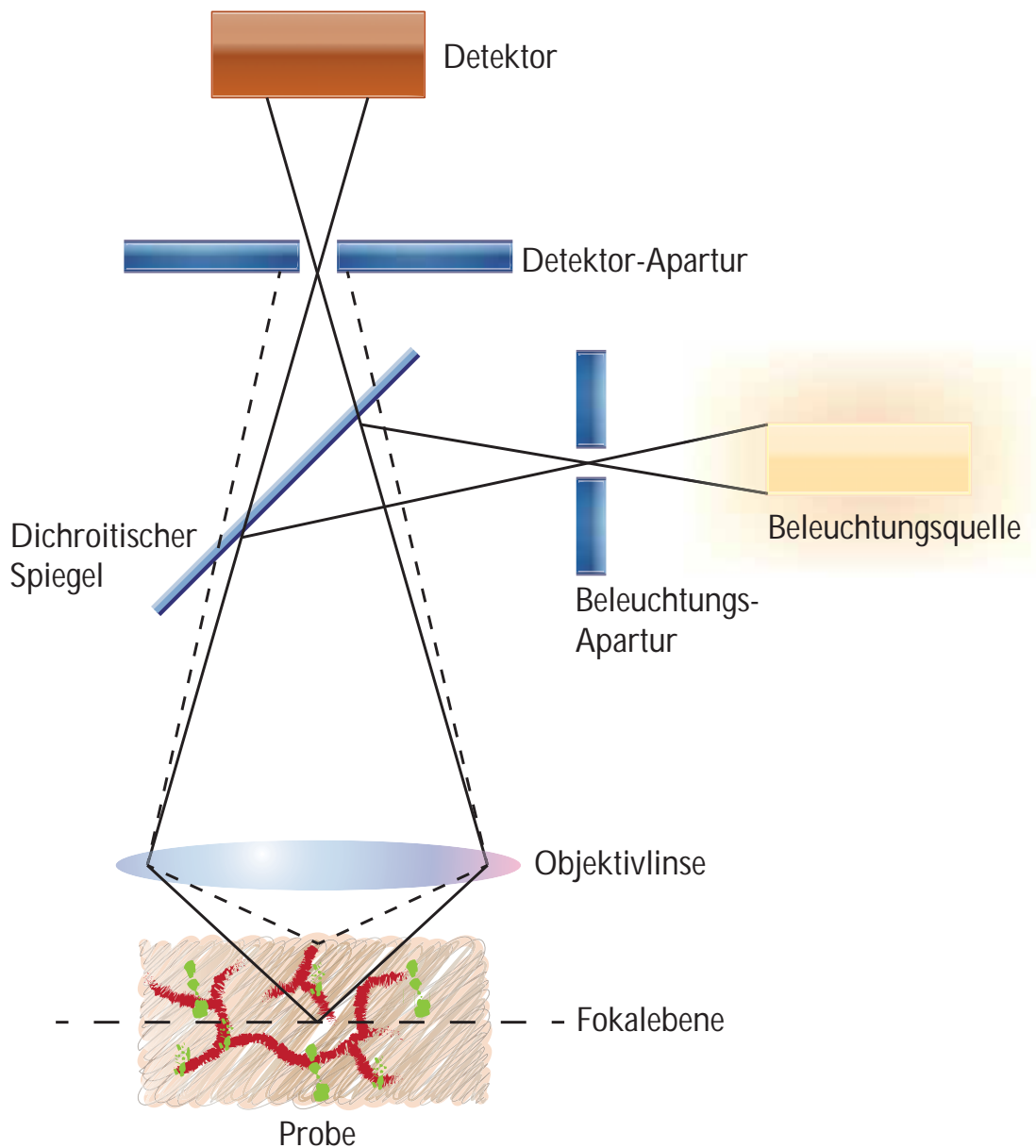


Abbildung 2.8: Strahlengang eines konfokalen Mikroskops. Das Licht aus einer Beleuchtungsquelle, üblicherweise ein Laser, wird durch eine Beleuchtungs-Apartur gebündelt und auf einen dichroitischen Spiegel gelenkt, der als Strahlenteiler fungiert und das Anregungslicht auf die Probe umlenkt. Das dort emittierte Licht passiert den den Strahlenteiler und trifft, wenn es aus der Fokusebene stammt, auf den Detektor. Streulicht gelangt nicht durch die Detektor-Apartur. Auf diese Weise kann ein scharfes Bild der Fokusebene erzeugt werden.

2.2.6 Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten wurden unter keimarmen Bedingungen in einer Sterilbank durchgeführt.

2.2.6.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung von Zellen erfolgte im jeweils für die Zellen geeigneten Medium (siehe 2.1.8) bei 37°C, 95%-iger Luftfeuchte und 5% CO₂.

2.2.6.2 Passagieren von Zellen

Um Expression-Änderungen durch Kontakt-Inhibition zu vermeiden, mussten adherent wachsende Zelllinien subkonfluent gehalten werden. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde ein geeignetes Volumen Trypsin-EDTA zu den Zellen pipettiert (z.B. für eine T75-Zellkulturflasche 1 mL) und die Zellen so lange damit bei Raumtemperatur inkubiert bis sie sich aufgerundet hatten. Zu diesem Zweck wurden sie unter dem Mikroskop beobachtet. Nach Aufrundung wurden die Zellen durch seitliches Klopfen vom Boden gelöst. Um das Trypsin zu inaktivieren, wurde dann Serum supplementiertes Medium zu den abgelösten Zellen gegeben und entweder ein Teil der Lösung direkt in ein neues Kultivierungsbehältnis überführt oder die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und dann eine genau definierte Zahl Zellen für nachfolgende Experimente ausgesät.

2.2.6.3 Kryokonservierung von Zellen

Für die Langzeitlagerung konnten Zellen entsprechend den Angaben in 2.2.6.2 geerntet werden. Die Zellen wurden nach der Trypsinbehandlung in DMEM mit 10% FCS und Pen/Strep aufgenommen und in ein 15 mL Falcon überführt. Durch Zentrifugation bei 200 x g wurden die Zellen sedimentiert und das Medium mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Je nach Zellzahl wurden das Pellet in 2 bis 4 mL Einfriermedium (10% DMSO in DMEM mit 10% FCS und Pen/Strep) aufgenommen und je 1 mL in ein Kryoröhrchen pipettiert. Diese wurden in eine Einfrierhilfe (MrFROSTY) gegeben und für 4-24 Stunden bei -80°C inkubiert. Anschließend wurden die konservierten Zellen in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.2.6.4 Rekultivierung von kryokonservierten Zellen

Um kryokonservierte Zellen (siehe 2.2.6.3) wieder zu kultivieren, wurden ein Kryoröhrchen schnell bei 37°C aufgetaut und der Inhalt in das 15-fache Volumen des jeweils benötigten Mediums in einer T75-Zellkulturflasche gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt, um DMSO zu entfernen.

2.2.6.5 tube-formation assay (Matrigel-Assay)

Bei Inkubation von HUVEC auf einer Schicht aus extrazellulärer Matrix beginnen diese nach einem Tag spinnennetzartige Strukturen auszubilden. Dies wird als *tube formation* bezeichnet. Da die Strukturbildung durch Zugabe von Inhibitoren verhindert werden kann, wird dieser Versuch als einer der primären Tests für anti-angiogenetisch wirkende Substanzen verwendet. Wir testeten damit auch die Wirkung von *knockdowns* einzelner endothelialer Transkriptionsfaktoren in HUVEC. Das *readout* dieses Test ist allerdings stark beschränkt und nicht mit der *in vivo* Situation vergleichbar. Für einen tube-formation assay wurde die kommerziell erhältliche extrazelluläre Matrix BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix (BD Biosciences, San Jose, USA) mit und ohne Wachstumsfaktor-Reduzierung verwendet. Dazu wurden 150 µL des Matrigel in ein well einer 48-MWP pipettiert und die Platte 1 h bei 560 x g ohne Bremse zentrifugiert. Die Temperatur beim Start der Zentrifugation lag bei 4°C und wurde im Laufe der Zentrifugation sukzessiv auf 25°C erhöht, da Matrigel ab einer Temperatur von etwa 10°C irreversibel gelt. Nach erfolgter Ausgelung wurden je well 40.000 HUVEC, mit oder ohne knockdown eines Transkriptionsfaktors, in 500 µL Endothelmedium pipettiert. 24 Stunden später wurde die gesamte Fläche eines wells fotografisch erfasst und die Strukturen mittels Fiji händisch analysiert. Determiniert wurde dabei die Anzahl an Knotenpunkten, die Durchschnittslänge der Strukturen zwischen zwei Knotenpunkten und die Gesamtlänge des Netzwerks.

2.2.6.6 Proliferationsassay

Um die Proliferationsrate einer Zelllinie zu bestimmen, wurden an Tag 1 500 Zellen je well in mindestens vier 96-MWP ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Nach 8 Stunden wurde die erste Platte aus dem Brutschrank genommen, das Medium abgesaugt und zur vollständigen Entfernung von Phenolrot die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Platte bei -80°C bis zum Ende des Versuchs eingefroren. Die zweite Platte wurde nach 24 h, die dritte nach 48 h und die vierte nach 72 h aus dem Brutschrank genommen und entsprechend der ersten behandelt. Waren alle Platten bei -80°C eingefroren, wurde jedes well mit 200 µL RIPA-Puffer mit 1:20.000 GelStar versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je well 150 µL in eine schwarze 96-MWP überführt und in einem Multilabel Plate Reader bei $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$ gemessen. Die Messung der ersten Platte wurde dabei als Proliferation von 1 gesetzt, die Messwerte der späteren Platten als Vielfaches dieser relativen Proliferation.

2.2.6.7 Toxizitätsassay

Zur Bestimmung der Toxizität eines Wirkstoffes auf eine Zelllinie, wurde ein Toxizitätstest durchgeführt. Dabei wurden je well einer 96-MWP abhängig von der Größe der zu testenden Zelllinie $0,5 - 1 \cdot 10^6$ ausgesät. Nachdem die Zellen adhärent waren, wurden verschiedene Konzentrationen der zu testenden Substanz zugegeben. Diese waren für Doxorubicin, Cis-Platin und Paclitaxel beispielsweise 0, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1.000, 2.000 und 5.000 nM. Nach 72 h Inkubation wurden die Zelle mit PBS gewaschen und dann bei -80°C eingefroren. Anschließend wurde jedes well mit 200 μL RIPA-Puffer mit 1:20.000 GelStar versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden je well 150 μL in eine schwarze 96-MWP überführt und in einem Multilabel Plate Reader bei $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$ gemessen. Normiert wurde dabei auf unbehandelte wells.

2.2.6.8 Bestimmung von Zellkonzentrationen mittels Neubauer-Zählkammer

Um Konzentrationen von Partikeln oder Zellen in einer Lösung zu bestimmen, kann eine Neubauer-Zählkammer verwendet werden. Nach Reinigung des Deckglases und der eigentlichen Kammer mit 100% Ethanol, wurde das Deckglas durch leichtes Anhauchen befeuchtet und so auf die Kammer geschoben, dass zwischen Deckglas und den Stegen der Kammer Newtonsche Ringe zu erkennen waren. Diese Ringe sind ein Zeichen dafür, dass sich der Abstand zwischen Deckglas und Zählkammer im Bereich der Lichtwellenlänge befindet und somit vernachlässigbar ist. Innerhalb der Kammer befinden sich Zählfelder. Dabei bilden 16 Kleinquadrate ein Zählquadrat mit einer Fläche von 1 mm^2 . Bei korrektem Sitz des Deckglases auf der Zählkammer beträgt die Höhe 0,1 mm. Bei befüllter Kammer entspricht das Volumen des ausgezählten Bereichs somit $0,1 \text{ mm}^3$. Die Konzentration kann dann nach $\frac{\text{Teilchen}}{\text{mL}} = \text{Anzahl gezählter Teilchen in 16 Kleinquadraten} \cdot 10^4 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$ berechnet werden.

2.2.6.9 Herstellung pseudo-lentiviraler Partikel in HEK293T Zellen und Transduktion von Zielzellen

Um Gensequenzen stabil in Zellen einzubringen, kann das lentivirale Transduktions-System benutzt werden. Hier werden drei Plasmide in Produzentenzellen, meist HEK293T, eingebracht. Diese Plasmide sind:

1. ein Envelope-Plasmid (pVSV-G); beinhaltet *env*

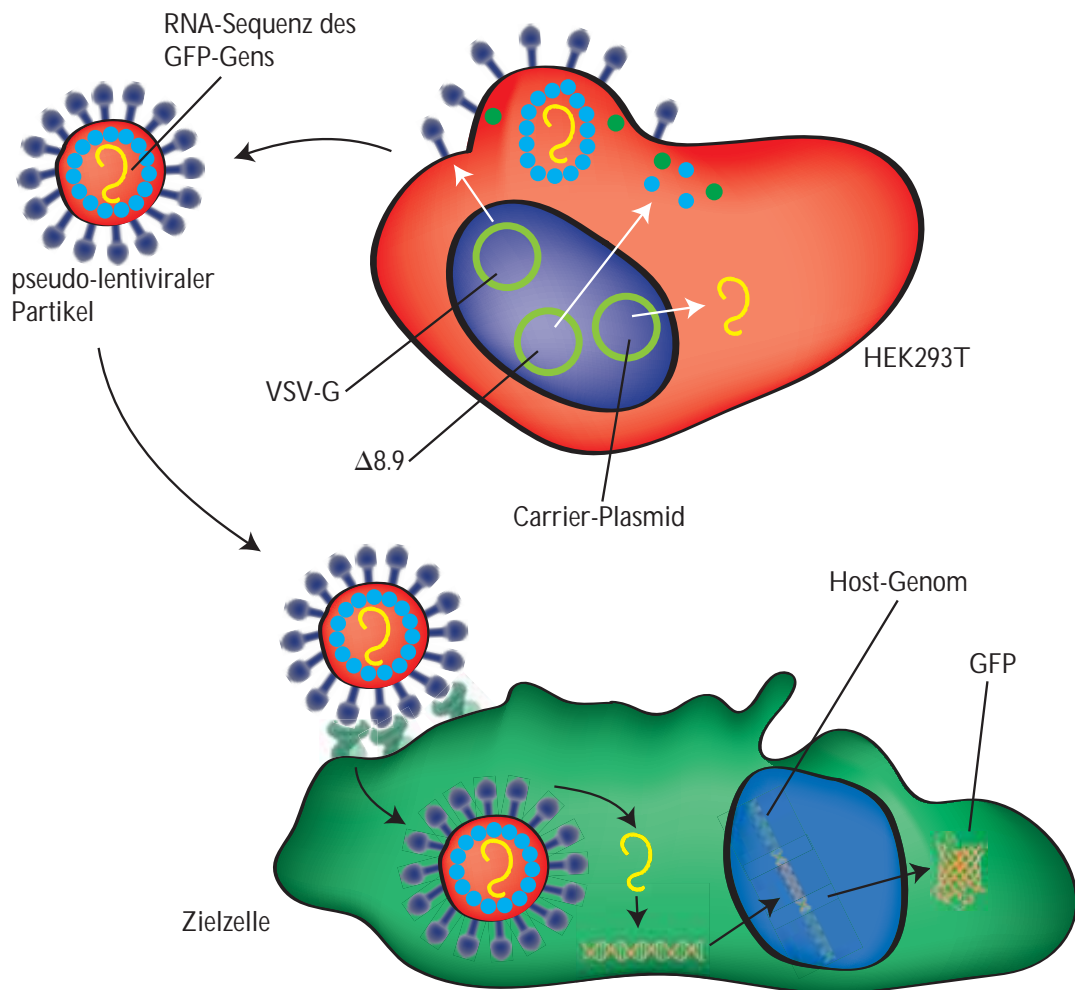


Abbildung 2.9: Schematische Übersicht über eine lentivirale Transduktion. Durch Einbringung dreier Plasmide in Produzentenzellen, üblicherweise HEK293T, stellen diese pseudo-lentivirale Partikel her. Diese Tragen die zu transduziernde Sequenz als RNA-Kopie (hier beispielhaft die Sequenz für GFP) sowie alle für den Einbau in das Zielgenom benötigten Proteine in sich. Nach der Infektion der Zielzellen wird die einzubringende Sequenz an einer willkürlichen Stelle ins Genom integriert. Durch Miteinbringung eines Selektionsmarkers wie Puromycin können nicht-infizierte Zellen abgetötet werden.

2. ein Packaging-Plasmid (pCMV-dR8.91); beinhaltet *gag*, *pol* und *rev*
3. ein Carrier-Plasmid; beinhaltet die in die Zielzellen einzubringende Sequenz

Sind alle drei Plasmide in die Produzentenzellen eingebracht, stellen diese pseudo-lentivirale Partikel her, die zur Infektion der Zielzellen verwendet werden können.

Zur Herstellung von pseudo-lentiviralen Partikeln, wurden 24 Stunden vor der Transfektion 10 cm Petrischalen für die Zellkultur mit Poly-L-Lysin beschichtet. Anschließend mussten $6 \cdot 10^6$ HEK293T Zellen in 15 mL DMEM mit 10% FCS und ohne Antibiotika ausgesät werden. Für die Transfektion

wurden alle Lösungen auf Raumtemperatur erwärmt und dann gemäß Tabelle 2.22 zusammenpipettiert.

Tabelle 2.22: Pipettierschema für einen Transfektionsansatz zur Herstellung pseudo-lentiviraler Partikel

Komponente	Menge in μL
packaging plasmid	12 μg
envelope plasmid	4 μg
carrier plasmid	15 μg
add 660 μL H_2O	
2 M CaCl_2	90 μL

Diese Plasmidlösung mit CaCl_2 wird für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen werden in einem neuen Reaktionsgefäß 750 μL 2x HBS vorgelegt und anschließend die Plasmidlösung tropfenweise zugegeben. Die erhaltene Lösung wird eine Minute durch einen Luftstrom (Pipettor mit Pasteurpipette) durchmischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe der Lösung zu den Zellen erfolgt tropfenweise unter Schwenken. Ab diesem Schritt wurden die Zellen unter S2-Bedingungen gehalten. Nach 8 Stunden wurde das Medium der Zellen gewechselt, wobei nun Antibiotika beinhaltet waren. Außerdem 10 mM Natriumbutryat, zur Erhöhung der Virusproduktion (Tanaka *et al.*, 1991). Aufgrund der Toxizität von Natriumbutryat musste das Medium 12-16 Stunden nach dem letzten Wechsel erneut gewechselt werden (DMEM mit 10% FCS und Pen/Strep). 48 Stunden nach der Transfektion wurde, falls möglich, die Transfektionseffizienz durch Prüfung des Fluoreszenzsignals bestimmt. Parallel wurden nun die Zielzellen vorbereitet. Diese mussten so in 6-MWP ausgesät werden, dass sie für mindestens 72 Stunden subkonfluent blieben (in der Regel 10^5 Tumorzellen bzw. $5 \cdot 10^5$ Primärzellen).

72 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Infektion der Zielzellen mit den pseudo-lentiviralen Partikeln. Hierzu wurde der Überstand der Produzentenzellen mit einer 20 mL Spritze abgenommen und durch einen 0,45 μm Filter gedrückt, um den Übertrag von Zellen zu verhindern. Der Überstand konnten nun entweder direkt mit 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Polybren zu den Zielzellen gegeben oder durch einen Ultrazentrifugationsschritt aufkonzentriert werden. Für die Aufkonzentration wurde für 4 Stunden bei 20.000 x g zentrifugiert, um eine Sedimentation der pseudo-lentiviralen Partikel zu bewirken. Diese konnten dann in jedem beliebigen Volumen und Medium resuspendiert werden. Bei Bedarf

wurde der Überstand nach Zugabe von 10% Trehalose zur Langzeitlagerung bei -80°C eingefroren. Um eine höhere Infektionsrate zu erreichen, war es möglich den Infektionsschritt zu wiederholen. 8-12 Stunden nach der Infektion wurde der Überstand mit pseudo-viralen Partikeln von den Zielzellen entfernt und die Zellen konnten sich für 48 Stunden erholen. Durch anschließende Selektion mit Puromycin bzw. Neomycin konnten nicht transduzierte Zellen abgetötet werden. Hierzu wurden die Zellen auf etwa 30% Konfluenz gesplittet (siehe 2.2.6.2) und anschließend mit $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ (Tumorzellen) bzw. $6\ \mu\text{g}/\text{mL}$ (Primärzellen) Puromycin für 48 Stunden selektiert.

2.2.6.10 Co-Kultur von Zellen

Die Co-Kultivierung von Zellen wurde in 8-well chamberslides durchgeführt. Die Gesamtzellzahl je well betrug 3.000 Zellen in $300\ \mu\text{L}$ Medium. Eventuelle Strukturbildungen wurden durch Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht.

2.2.6.11 3D-Zellkultur / hanging drops

Da es in der normalen 2D-Zellkultur keinerlei metabolische Gradienten gibt, ist diese nur bedingt geeignet, um Substanzen auf ihre Toxizität oder ihren Einfluss auf den Zellmetabolismus zu testen. Eine Zwischenlösung zu *in vivo* Tests könnte die 3D-Zellkultur bieten. Hier kann die komplexe Umgebung lebender Gewebe zumindest rudimentär nachempfunden werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dabei mehrere Möglichkeiten der 3D-Kultur getestet. Dabei sollten am Ende humanisierte und prävasikularisierte Tumoren stehen, in denen der knockdown von endothelialen Transkriptionsfaktoren ähnliche bzw. vergleichbare Ergebnisse wie in *in vivo* Versuchen zeigt und die somit als Vorab-Testsystem für die Entwicklung von Therapeutika genutzt werden können.

Für eine hanging drop 3D-Kultur wurden 96- bzw. 384-MWP der Firma 3D Biomatrix verwendet. Die Handhabung erfolgte dabei laut Herstellerprotokoll. Die Gesamtzellzahl je Sphäre betrug 5.000 Zellen. Für Tri-Kulturversuche wurden 700 Fibroblasten (NHDF), 2.300 Endothelzellen (HUVEC) und 2.000 Tumorzellen (MDA-MB-231; MCF7) verwendet. In Abbildung 2.10 ist der schematische Ablauf einer Sphäroid-Bildung in einer hanging drop-Platte dargestellt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden einzelne Sphären der Platte durch Abtropfen auf einen Objektträger entnommen und eingebettet. Die Untersuchung der Sphären erfolgte mittels Konfokaler Mikroskopie (siehe 2.2.5.4 auf eventuelle endotheliale Strukturbildungen).

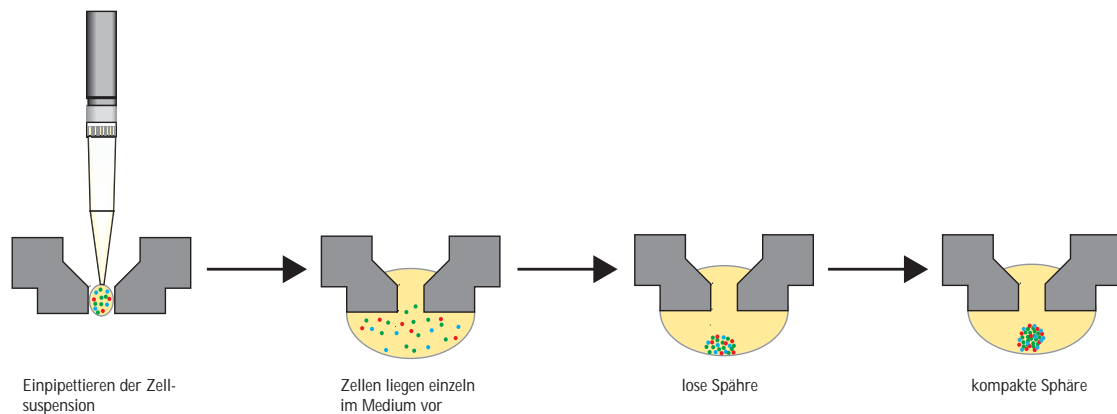


Abbildung 2.10: Schema der Hanging drop Methode

2.2.6.12 3D Zellkultur / alginate beads

1,5%ige Alginate-Lösung in H₂O wurde durch einen 0,22 µm Spritzenfilter steril filtriert und anschließend im Vakuum entgast. Zellen wurden durch Trypsination geerntet (siehe 2.2.6.2) und die Zellkonzentration auf $3 \cdot 10^7$ /mL in FCS-freiem Medium eingestellt. Danach wurde vorsichtig das doppelte Volumen an Alginate-Lösung zugegeben, wobei darauf geachtet wurde keine Luft in die Suspension einzubringen, um ein späteres Aufschwimmen der Tropfen zu vermeiden. Die Zellsuspension mit Alginate wurde dann in eine 1 mL-Insulinspritze gefüllt und vorsichtig aus 2-4 cm Höhe in 37°C warme 50 mM Calciumchlorid-Lösung getropft. Die beads wurden für 10 Minuten in der Calciumchlorid-Lösung belassen, um ein vollständiges Gelieren des Alginats sicherzustellen. Anschließend wurden die beads mit Hilfe einer Transferpipette in PBS überführt und mehrfach gewaschen. Zur weiteren Stabilisierung wurden sie dann zuerst für 5 Minuten in 0,05% Poly-L-Lysin-Lösung gegeben und nochmals mit PBS gewaschen. Es folgte ein abschließender Inkubationsschritt in 0,1% Alginate in PBS für 5 Minuten. Nach einem finalen Waschschrift wurden die beads einzeln in 12-MWP in je 1 mL Medium überführt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden einzelne beads eingebettet und mittels konfokaler Mikroskopie (siehe 2.2.5.4) auf eventuelle endotheliale Strukturen untersucht.

2.2.6.13 3D-Zellkultur / natural scaffolds

Aus Versuchsmäusen wurden Teile der Dünndarms entnommen und der Chymus vorsichtig herausgedrückt, um Einrisse der Darmwand zu vermeiden. Anschließend wurde der Darm durch Inkubation für etwa 24 h in 1% SDS in PBS dezellularisiert. Bei Bedarf wurde diese SDS-Lösung gewechselt. Danach wurde der Darm mehrfach mit PBS gespült, um SDS vollständig zu entfernen. Zur

Sterilisation wurde das dezellularisierte Organ in 70% Ethanol gegeben und unter keimarmen Bedingungen mehrfach mit PBS gewaschen. Zellen wurden durch Trypsination geerntet (siehe 2.2.6.2) und die Zellkonzentration auf $1 \cdot 10^7/\text{mL}$ in DMEM mit FCS und Pen/Strep eingestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 1 mL-Insulinspritze eingefüllt. Der Darm wurde in etwa 5-8 cm große Stücke geteilt und ein einzelner Stück auf steriles Backpapier, das auf die offene Seite eines Becherglases gespannt war, gelegt. Mit Hilfe einer sterilen Nadel-Faden-Kombination wurde der Darm an einem Ende durch einen chirurgischen Knoten verschlossen. In das noch offene Ende wurde dann die Kanüle der Insulinspritze eingeführt und dann vorsichtig mit einem nicht ganz zugezogenen chirurgischen Knoten fixiert. Nach Einfüllen der Zellsuspension wurde die Kanüle aus dem Darm gezogen und zeitgleich der Knoten festgezogen. Durch Einfügen mehrerer Knoten wurde das mit Zellen gefüllte Darmstück unterteilt und in etwa 1 cm große Teilstücke geschnitten. Diese wurde in je 2 mL Medium einzeln in die Wells einer 6-MWP gelegt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert bzw. in 3DKubes™ (Kiyatec Inc., Greenville, SC, USA) gegeben (Versuchsaufbau siehe Abbildung 2.11). Dabei wurde DMEM mit 10% FCS und Pen/Strep mit einer Durchflussgeschwindigkeit von etwa 50 mL/Stunde durch die Kammern geleitet. Das Medium wurde dabei am Ende eines Durchlaufs wieder zurück in die Reservoir-Flasche gepumpt und dort bei Bedarf händisch gewechselt. Durch Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm sollte das System keimfrei gehalten werden.

2.2.6.14 3D-Zellkultur / PLA/PGLA-sponges

Eine weitere Möglichkeit um Zellen in drei Dimensionen zu kultivieren, stellen Schwämme aus biodegradierbaren Materialien dar. Diese werden in einem geeigneten Lösungsmittel, welches idealerweise leicht zu verdampfen ist, gelöst und über ein wasserlösliches Material, wie Salze, gegeben. Nach Polymerisation kann das wasserlösliche Material ausgewaschen werden und hinterlässt Poren in Größe der Kristalle im polymerisierten Trägermaterial. Ausgewählt wurde für diese Methode eine 1:1 Mischung aus 2,5% Polymilchsäure und 2,5% Polylactid-co-Glycolid in Chloroform, welche über NaCl-Kristalle gegeben wurde. Dabei wurden 400 mg NaCl in den unteren (etwa 2.5 cm) Teil einer abgeschnittenen Teil einer Pasteurpipette gegeben. Diese wurde vorher im unteren Bereich etwa 3 mm hoch mit verflüssigtem 50:50 Paraffin-Wachs und Polyolefin (Polyethen) verschlossen und mit Hilfe einer Gummidichtung aufrecht in einer 12-MWP fixiert. Durch eine 90-minütige Zentrifugation bei 550 x g unter Temperaturerhöhung auf 35°C wurde die PLA/PGLA-Lösung ins Salz gepresst. Um sicherzustellen, dass sämtliches Chloroform verdampft war, wurde die Konstruktion für 30 Minuten

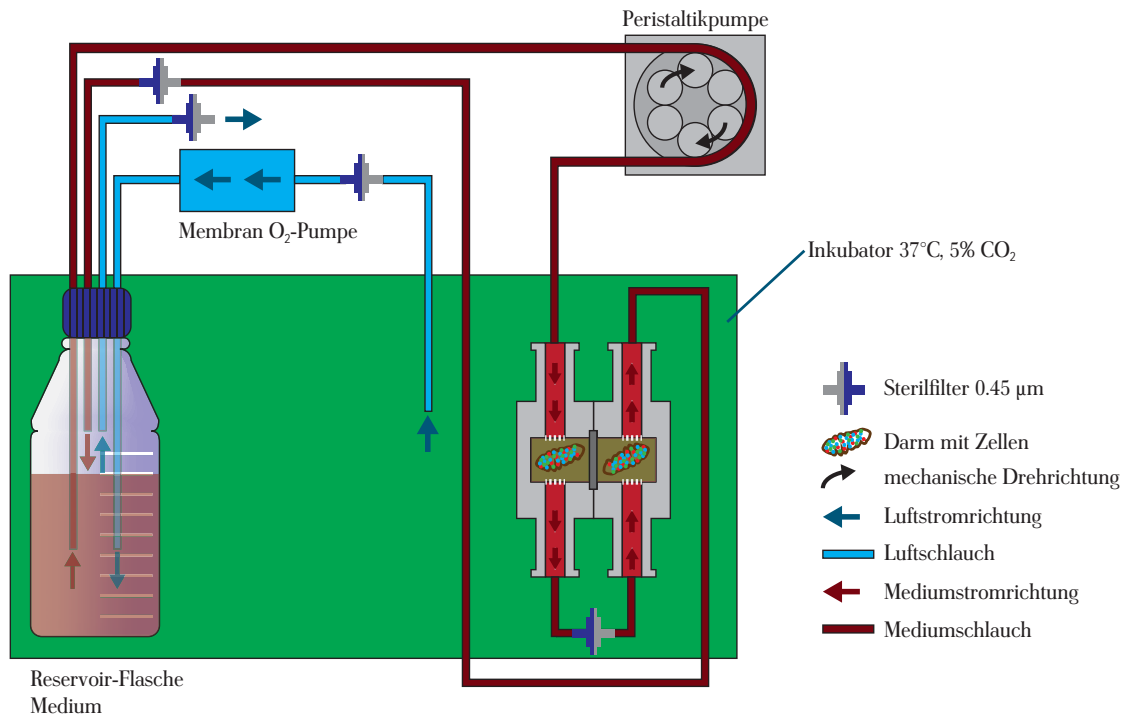


Abbildung 2.11: Aufbau eines 3DKube-Versuchs zur Besiedlung von dezellularisierten Därrmen. Rezellularisierte Mäusedünndärme wurden in 3DKubes inkubiert. Zur Simulation des Blutstroms wurde DMEM mit 10% FCS und Pen/Strep mit einer Durchflussgeschwindigkeit von etwa 50 mL/Stunde durch die Kammern geleitet.

in einem Exsikkator unter Vakuum gestellt. Anschließend wurde das NaCl durch mehrtägige Inkubation in ddH₂O ausgelaugt. Das so entstandene Schwämmchen wurde durch 70%-igen Ethanol sterilisiert und anschließend unter keimarmen Bedingungen bis zur Verwendung getrocknet. Zur Besiedlung mit Zellen wurden zwei Methoden verwendet: das Auftropfen einer Zellsuspension mit $1 \cdot 10^7$ Zellen/mL in DMEM bzw. das Einspritzen derselben Zellkonzentration mit Hilfe einer 1 mL-Insulinspritze. Die besiedelten Schwämme wurden dann einzeln in wells einer 6-MWP auf einem Orbitalschüttler bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.6.15 *in vitro* Peptide binding assay

Um die Affinität von synthetisierten Peptiden zu Zellen zu bestimmen, wurden die zu testenden Peptide entweder C-terminal mit 5(6)-Carboxyfluorescein synthetisiert oder über den C-terminalen Linker mit Carboxyfluorescein gekoppelt. Die so Fluorophor-markierten Peptide wurden dann so in DMSO gelöst, dass zum Erreichen der Endkonzentration (üblicherweise 200 - 500 nM) maximal 1% des Endvolumens zu den Zellen pipettiert werden musste. Die Versuche wurden in 96- (Auswertung über Multilable Plate Reader) bzw. 6-MWP (Flow Cytometry) mit 5.000 bzw. 50.000 Zellen durch-

geführt. Vor dem Aussäen der Zellen wurden die Platten mit FCS über Nacht bei 37°C abgesättigt und drei Mal mit PBS gewaschen, um unspezifische Bindungen der zu testenden Peptide an die Platten zu minimieren. Die Peptide wurden entweder für 30 Minuten oder für 24 Stunden mit den Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und am Ende auf zwei verschiedene Weisen ausgewertet:

2.2.6.15.1 Auswertung mittels Durchflusszytometrie Die Zellen wurden am Ende des Versuchs zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 500 µL Trypsin je well abgelöst. Durch Zugabe von 3 mL DMEM wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen in 15 mL Falcons überführt und bei 170 x g sedimentiert. Es folgten drei Waschschrirte mit 5 mL PBS. Die Zellen wurden in 1 mL PBS resuspendiert und 20.000 Zellen am Flow Cytometer (FL1-Kanal) gemessen. Berücksichtigt wurden nur ganze Zellen (Gate mithilfe des forward und sideward scatters). Die Autofluoreszenz nicht behandelter Zellen wurde vom erhaltenen Wert abgezogen. Die Auswertung erfolgte mittels einer Testversion von FCS 4 Plus Research Edition (DeNovo Software) und Graphpad Prism.

2.2.6.15.2 Auswertung durch Fluoreszenzmessung am Multilable Plate Reader Um sämtliche gebundene und internalisierte Peptide zu erhalten, wurden die Zellen am Versuchsende zwei Mal mit PBS gewaschen und dann bei -80°C zum Zellaufschluss eingefroren. Nach Zugabe und von 200 µL RIPA wurden die Platten für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann 150 µL des Zellhomogenisates in schwarze 96-MWP überführt. Die Determination des Fluoreszenz-Signals erfolgt in einem Multilable Plate Reader bei $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$. Normiert wurde dabei auf unbehandelte Zellen. Um die Bindungsaffinität zwischen verschiedenen Zelllinien vergleichbar zu machen, wurde analog zu einem Proliferationsassay die Zellzahl bestimmt und die Werte auf die Zellzahl normiert (siehe 2.2.6.6). Die Auswertung erfolgte über Microsoft Excel und Graphpad Prism.

2.2.7 Tierversuche

2.2.7.1 Allgemeine Haltungsbedingungen von Mäusen

Sämtliche Mäuse wurden unter kontrollierten Bedingungen bei 22°C Raumtemperatur, 55-65% Luftfeuchtigkeit und zwölfstündigem Tag-Nachtrhythmus gehalten. Sie hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu Wasser und einer standardisierten Labornahrung. Die Reinigung der Käfige erfolgte durch Umsetzung einmal pro Woche. Als Enrichment diente ein halber Eierkarton. Die Aufsicht über Tierversuche erfolgte durch die Regierung von Unterfranken.

2.2.7.2 Implantation von Tumoren in Mäuse

Tabelle 2.23: Übersicht über in dieser Arbeit verwendete implantierbare Tumor-Modellsysteme

Zelllinie	Mausstamm	implantierte Zellen	Implantationsort	orthotopisch
4T1	BALB/c	1×10^5	inguinaler Brustfettkörper	ja
E0771	C57BL/6	1×10^6	inguinaler Brustfettkörper	ja
EMT6	BALB/c	1×10^6	inguinaler Brustfettkörper	ja
LLC	BALB/c	1×10^6	subkutan, dorsolateral	nein
MT6	C57BL/6	1×10^6	subkutan, dorsolateral	nein
SVR	NU/NU	1×10^6	subkutan, dorsolateral	nein

Vor allen Implantationen wurden die Mäuse mindestens für eine Woche im Tierstall unter standardisierten Haltungsbedingungen gehalten (siehe 2.2.7.1). Die Implantationen erfolgten in einem Volumen von 50 μ L steriler Injektionslösung (0,9% NaCl) mit einer 1 mL-Insulinspritze. Für Implantationen in den inguinalen Brustfettkörper wurden die Mäuse durch Inhalation von Isofluran anästhesiert und der Fettkörper durch einen kleinen Einschnitt freigelegt. Nach erfolgter Injektion der Zellsuspension wurde die Haut der Maus durch eine Klammer verschlossen.

2.2.7.3 *in vivo* peptide binding

Um die Affinität von hoing peptides zu ihren Zielzellen zu untersuchen, sind *in vivo* Versuche unabdingbar. Hierzu wurden Mäusen mit Tumoren (siehe 2.2.7.2) 100 μ g Fluorescein-gelabeltes Peptid bzw. Fluorescein retrobulbär injiziert. Nach 100 Minuten erfolgte eine ebenfalls retrobulbäre Injektion von Isolectin GS-B4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. 500 μ g/mL in 0,9% NaCl), welches an alle

perfundierten Blutgefäße bindet und diese später in der mikroskopischen Auswertung detektierbar macht, da es an das Fluorophor Alexa-647 gekoppelt ist. 20 Minuten nach dieser zweiten Injektion wurden die Mäuse getötet und Tumoren, Nieren und Leber entnommen. Diese wurden in zwei Teile geschnitten und je eine Hälfte für Extraktionsversuche (siehe 2.2.4.18) eingefroren (-80°C) und die andere Hälfte in Tissue-Tek O.C.T.TM Compound eingebettet, um Dünnschnitte für die konfokale Mikroskopie anzufertigen (siehe 2.2.5.3 und 2.2.5.4).

2.2.7.4 Behandlungstudien

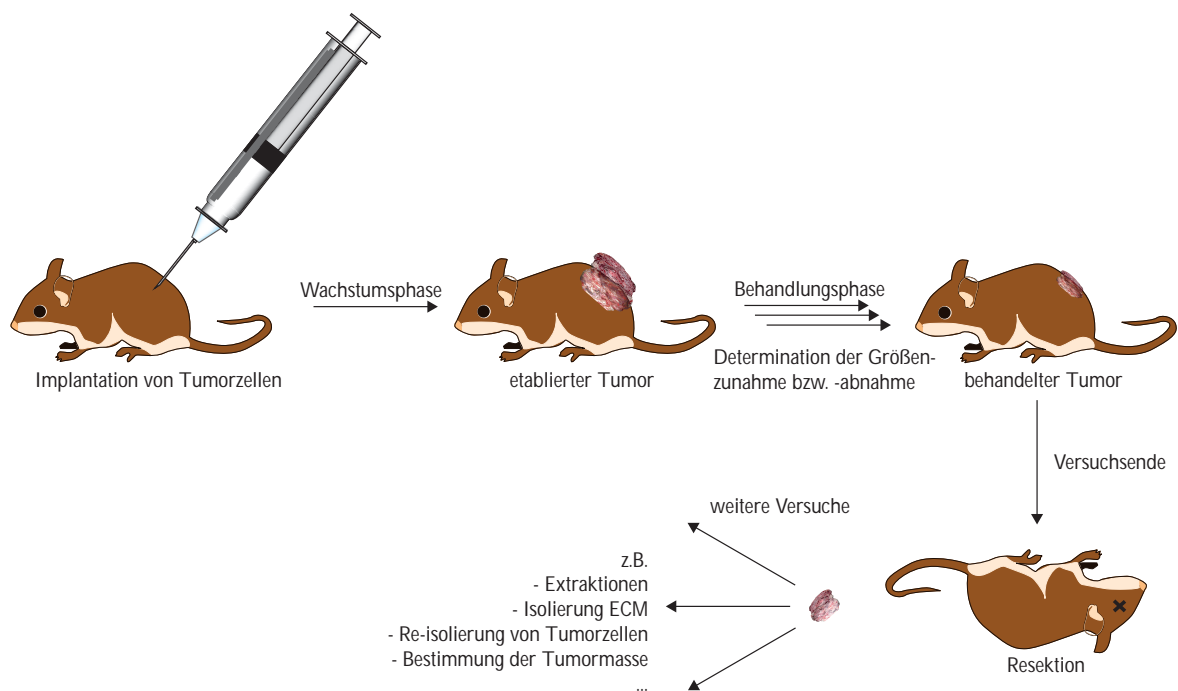


Abbildung 2.12: Allgemeines Schema einer Behandlungsstudie in Mäusen.

2.2.7.4.1 Doxorubicin Distribution in unbehandelten und β -APN behandelten Tieren

Um die Einbringung von Chemotherapeutika in Tumoren unter Lysyl-Oxidase-Inhibierung zu untersuchen, wurden Tumoren in Mäuse implantiert (siehe 2.2.7.2) und diese bis zu einer palpierbaren Größe wachsen gelassen (je nach Modell zwischen 20 und 100 mm³). Die Tiere wurden dann in zwei Gruppen unterteilt (n=5). Eine Gruppe erhielt über 8 bis 11 Tage intraperitoneale Injektionen eines Lysyl-Oxidase-Inhibitors (100 mg/kg Körpergewicht β APN in 0,9% NaCl). Die andere Gruppe

Tabelle 2.24: Übersicht über die Behandlungspläne zur Untersuchung der veränderten Doxorubicin-Einbringung in Tumoren durch Inhibierung von Lysyl-Oxidasen. Da auf Basis der Tumorgrößen mit der Inhibierung von Lysyloxidasen begonnen wurde, gibt diese Tabelle Auskunft über den Tag des Behandlungsbegins nach der Tumorimplantation und über die Dauer der täglichen Injektionen. Injektionen erfolgten intraperitoneal (100 mg/kg Körpergewicht β APN in 0,9% NaCl zur Inhibierung von Lysyloxidasen). Als Kontrollsubstanz diente 0,9% NaCl.

Zelllinie	Tag Behandlungsbeginn	Behandlungsdauer
4T1	10	8 (2 Tage Behandlungspause)
EMT6	9	10
LLC	9	10
MT6	16	11

0,9% NaCl als Kontrollsubstanz. Am Tag des Versuchsendes erfolgte eine finale Bolus-Gabe von Doxorubicin (5 mg/kg Körpergewicht) für Doxorubicin-Extraktionsversuche (siehe 2.2.4.15, sowie in zwei Tiere ohne sichtbare Tumornekrosen eine Injektion von Hoechst (20 mg/mL in 0,9% NaCl) und Isolectin GS-B4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. 500 μ g/mL in 0,9% NaCl). Von diesen beiden Tieren wurden zusätzlich Proben für die Mikroskopie (durch Fixierung in 4% Formaledehyd in PBS), sowie für Kryoschnitte (siehe 2.2.5.3) eingebettet. Kryoschnitte erfolgte mit einer Schnittdicke von 10 μ m und 200 μ m. Die gesamte Tumorfläche von 10 μ m-Schnitten wurde als Übersicht in Hellfeld und Hoechst-Fluoreszenz aufgenommen. Anschließend erfolgte die Berechnung der Hoechst-positiven Fläche mittels der Imaging-Software Fiji. Von den 200 μ m-Schnitten wurden z-stacks mittels konfokaler Mikroskopie z-stacks mit $\Delta z = 1 \mu$ m angefertigt (10x Objektiv Leica SP3/5 bzw. 20x Objektive Nikon Eclipse Ti-A1). Diese dienten entweder zu dreidimensionalen Rekonstruktion der Vaskulatur (Plugin 3DViewer) oder um die Diffusion von Hoechst ausgehend von Blutgefäßen zu vermessen.

2.2.7.4.2 Kombinationstherapie anti-VEGF, Doxorubicin und/oder β APN Die Behandlungsstudien wurden ab Tag 12 nach der Implantation durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich bereits palpierbare Tumoren etabliert. Hierzu wurde mG6-31 oder ein anti-Ragweed Kontrollantikörper injiziert (5 mg/kg Körpergewicht). Antikörperinjektionen erfolgten alle sechs Tage, also an den Tagen 12, 18 und 24 durch intraperitoneale Injektion. Die Gabe von Doxorubicin/Doxil (beide 5 mg/kg Körpergewicht) oder Paclitaxel (20 mg/kg Körpergewicht) erfolgte durch intraperitoneale Injektion an den Tagen 14, 16, 20, 22, 26, 28, 32 und 34. Als Kontrollsubstanz für Doxorubicin wurde 0,9% NaCl und für Paclitaxel EtOH/Cremophor (1:1, v:v; verdünnt in 0,9% NaCl) verwendet. β APN wurde in einer Menge von 100 mg/kg Körpergewicht in 0,9% NaCl täglich durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Als Kontrollsubstanz diente hier ebenfalls 0,9% NaCl. Größenveränderungen

des Tumors wurden durch 2-tägliche Messungen mittels einer Schiebelehre verfolgt. Hierzu wurde der Tumor perpendicular vermessend (l = Länge, b = Breite). Das Volumen wurde nach folgender Formel errechnet:

$$V = \frac{\pi \cdot l \cdot b^2}{6}$$

Zusätzlich wurden die Tumoren *post mortem* gewogen. Dabei wurden nur Tumoren berücksichtigt, die komplett aus dem Tier resektiert werden konnten.

2.3 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mithilfe von Prism5 (Graphpad, LaJolla, CA, USA) durchgeführt. Um zwei Gruppen zu vergleichen, wurde ein ungepaarter, zwei-schwänziger Student's T-Test verwendet. Außerdem wurden die Proben auf signifikante Variation der Varianz getestet. Alle statistischen Analysen wurden zwischen Sätzen von individuellen biologischen Replikaten durchgeführt.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Verifizierung der Nichtbeeinflussung des Tumorwachstums im MT6-Tumormodell durch verstärkte anti-angiogenetische Therapie

Da Tumoren des MT6-Modells nicht mit einer Wachstumsreduktion auf die anti-angiogenetische Behandlung reagierten, sollte dieser Effekt näher untersucht werden. Um zu testen, ob die Ineffektivität der anti-angiogenetischen Therapie dosisbedingt war, wurden zwei Mausgruppen zwölf Tage nach der Implantation der Tumoren entweder mit 7,5 mg mG6-31 je Kilogramm Körpergewicht oder mit derselben Dosis eines Kontrollantikörpers (IgG, anti-ragweed) behandelt. Die Applikation der Antikörper wurde alle vier Tage durchgeführt. Dies entsprach effektiv 200% der bisherigen Dosis von 5 mg pro Kilogramm Körpergewicht alle sechs Tage. In Abbildung 3.1 ist dabei das Wachstum der Fibrosarkome der beiden Gruppen dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass die beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied im Tumorwachstum zeigten.

3.2 Vergleichende Toxizitätsassays für Doxorubicin und Paclitaxel

Im Gegensatz zum MT6-Tumormodell reagieren 4T1-Tumoren auf eine anti-angiogenetische Behandlung mit einer Reduktion des Tumorwachstums. Um die unterschiedliche Therapieeffizienz zu erklären, war auch eine unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Tumormodelle gegenüber Chemotherapeutika denkbar. Zur Untersuchung dieser möglichen Chemoresistenz wurden Toxizi-

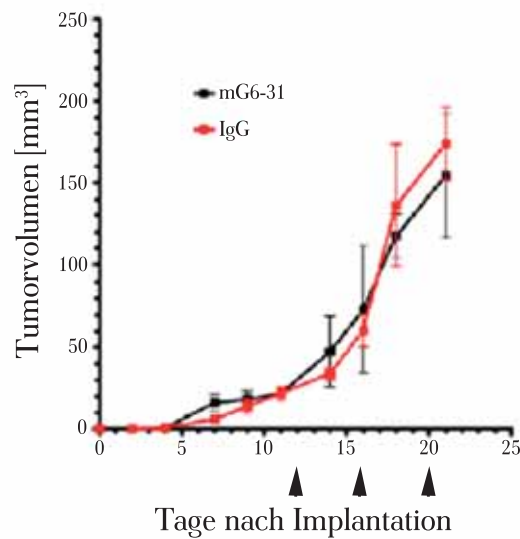


Abbildung 3.1: Behandlung von MT6-Fibrosarkomen mit erhöhter Dosis an mG6-31. Um zu testen, ob eine Erhöhung der Dosis des anti-angiogenetischen Antikörpers die therapeutische Effizienz verbessert, wurden Mäuse mit implantiertem Tumor ab Tag zwölf nach der Implantation mit 7,5 mg/kg KG des Antikörpers oder derselben Dosis eines Kontrollantikörpers behandelt. Dabei wurden drei Applikationsrunden im viertägigen Rhythmus durchgeführt (Pfeilköpfe zeigen Behandlungstage). Mit mG6-31 behandelte Tumoren zeigen dabei kein signifikant verlangsamtes Wachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe. Fehlerbalken: \pm SEM. 95% C.I.

tätsassays durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass beide Zelllinien keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber den Chemotherapeutika Doxorubicin (vgl. Abbildung 3.2) und Paclitaxel (vgl. Abbildung 3.3) aufwiesen. Auf Basis der Toxizitätskurven wurden dabei für beide Zelllinien EC_{50} -Werte der Chemotherapeutika errechnet (vgl. Abbildung 3.4). Dieser Wert gibt die errechnete Konzentration an Chemotherapeutikum an, die ausreicht, um die Anzahl der Tumorzellen in Kultur nach dreitägiger Behandlung auf 50% zu reduzieren. Auch hier war deutlich erkennbar, dass beide Therapeutika keinen signifikant unterschiedlichen zytotoxischen Effekt auf die Zellen besaßen.

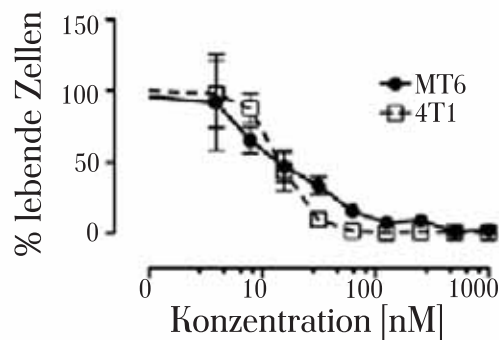


Abbildung 3.2: Resistenz von 4T1- und MT6-Zellen gegen das Chemotherapeutikum Doxorubicin. In einem Toxizitätsassay wurde die Empfindlichkeit von 4T1- und MT6-Zellen gegenüber dem Chemotherapeutikum Doxorubicin bestimmt. Dabei zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelllinien. Fehlerbalken: \pm SEM. 95% C.I.

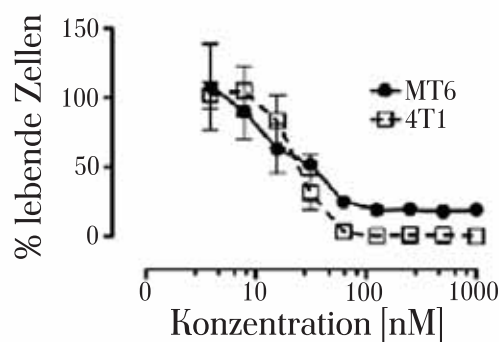


Abbildung 3.3: Resistenz von 4T1- und MT6-Zellen gegen das Chemotherapeutikum Paclitaxel. In einem Toxizitätsassay wurde die Empfindlichkeit von 4T1- und MT6-Zellen gegenüber dem Chemotherapeutikum Paclitaxel bestimmt. Dabei zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelllinien. Fehlerbalken: \pm SEM. 95% C.I.

3.3 Histologische Untersuchungen von 4T1- und MT6-Tumoren

3.3.1 Picrosirius-Rot-Färbung

Auf der Suche nach Unterschieden zwischen beiden Tumormodellen sollte aufgrund der Vorergebnisse, die gezeigt hatten, dass die Diffusion aus den Gefäßen verschieden stark ausgeprägt war, die Verteilung der extrazellulären Matrix untersucht werden. Dazu wurden Dünnschnitte von 4T1- und MT6-Tumoren mittels Picrosirius-Rot gefärbt. Dieser Farbstoff wird zur Sichtbarmachung von bindegewebigen Anteilen eines Gewebes verwendet und lagert sich vor allem an retikuläre Fasern und

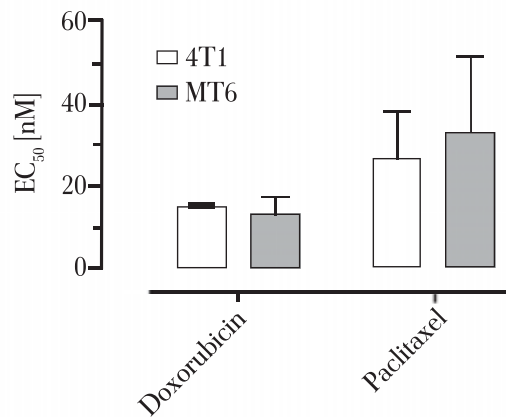


Abbildung 3.4: EC₅₀-Werte der beiden Chemotherapeutika Doxorubicin und Paclitaxel für die Zelllinien 4T1 und MT6. Auf Basis der Kurven in den Abbildungen 3.2 und 3.3 wurden EC₅₀-Werte für die Therapeutika in beiden Zelllinien berechnet. Dabei war kein signifikanter Unterschied für ein Chemotherapeutikum zwischen den beiden Zelllinien nachweisbar. Fehlerbalken: \pm SEM.

Kollagene an (Puchtler *et al.*, 1973). Eine exemplarische Färbung ist in Abbildung 3.5 zu sehen. Hier war zwischen beiden Tumormodellen ein klarer Unterschied bezüglich der Verteilung der kollagenreichen Gewebeanteile zu erkennen. Während im 4T1-Modell das Bindegewebe in Strängen vorlag, welche oft um Blutgefäße zu finden waren, waren bindegewebige Anteile im MT6-Tumorgewebe ubiquitär und recht gleichmäßig verteilt. Dabei lagen die 4T1-Zellen im Tumor in Inseln, welche nahezu frei von Kollagen und retikulären Fasern waren. Zwischen diesen Inseln aus Zellen lagen dann bindegewebesreiche Bereiche. Die Tumorzellen des MT6-Modells waren dagegen komplett und recht homogen in Matrix eingebettet.

3.3.2 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung (MGTR)

Eine weitere Methode zur Darstellung von Bindegewebe in der Mikroskopie ist die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung. Um die vorherigen Ergebnisse zu bestätigen wurden weitere Schnitte der beiden Tumormodelle mittels dieser Methode angefärbt (siehe exemplarisch Abbildung 3.6). Auch hier zeigte sich die bereits bekannte Verteilung der kollagenen Gewebeanteile. Während in den 4T1-Tumoren Inseln aus Tumorzellen zwischen bindegewebigen Strängen, die vor allem um Blutgefäße herum lokalisierten, zu erkennen waren, zeigte das Bindegewebe in MT6-Tumor-Dünnschnitten eine gleichmäßige Verteilung zwischen den Zellen.

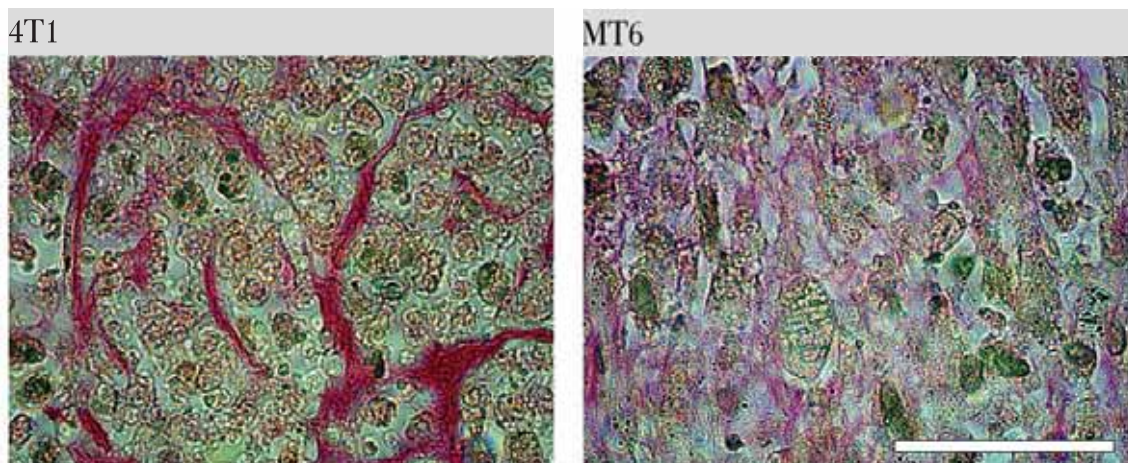


Abbildung 3.5: Mittels Picrosirius-Rot auf bindegewebige Anteile gefärbte Dünnschnitte der beiden Tumormodelle 4T1 und MT6. Das Färberegebnis dieser Methode stellt Zytoplasma und nicht-bindegewebige Anteile grünlich-gelb dar, und zeigt eine rote Anfärbung des Bindegewebes (v.a. Kollagene und Elastine). In Schnitten von 4T1-Tumoren lag Kollagen in Strängen vor allem um Blutgefäße herum vor. Die dazwischenliegenden Inseln aus Tumorzellen waren dagegen nahezu Bindegewebe-frei (linkes Bild). MT6-Tumorschnitte zeigen eine ubiquitäre Verteilung von Kollagen und retikulären Fasern (rechtes Bild). Maßstab: 25 μ m

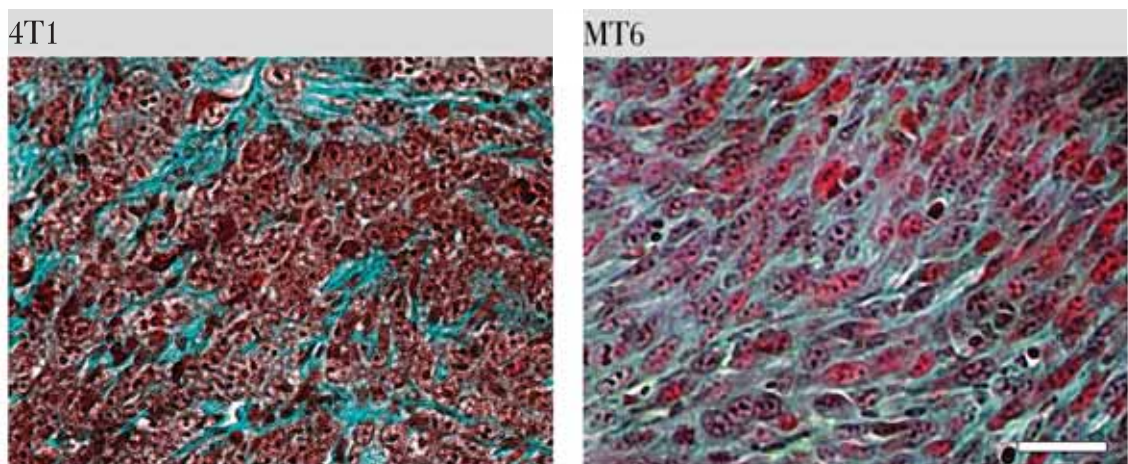


Abbildung 3.6: Masson-Goldner-Trichrom-gefärbte Dünnschnitte von 4T1- und MT6-Tumoren. Diese Anfärbung des Bindegewebes zeigt kollagenes Bindegewebe sowie Mucus in grün-blau, Zellkerne in braunschwarz, sowie Zytoplasma und nicht-bindegewebige Anteile in rot. Während das kollagenes Bindegewebe in Dünnschnitten von 4T1-Tumoren in Strängen vorlag, welche vor allem um Blutgefäße herum zu finden war (linkes Bild), zeigte auch diese Färbemethode eine ubiquitäre Färbung um alle Zellen in MT6-Tumoren (rechtes Bild). Maßstab: 25 μ m

3.4 EZM-Gehalt der Tumoren

Die ungleiche Verteilung von Bindegewebe in den beiden Tumormodellen führte zur Frage, ob der Gehalt an extrazellulärer Matrix in beiden Modellen vergleichbar ist oder in einem Modell mehr Matrix als im anderen vorliegt. Zur Klärung dieser Frage wurde nach einem Standard-Protokoll die

EZM aus Tumoren beider Modelle extrahiert (O'Brien *et al.*, 2010).

3.4.1 Harnstofflösliche EZM-Fraktion (usECM)

Im ersten Extraktionsversuch wurde das Protokoll von O'Brien *et al.* (2010) ohne Veränderungen befolgt. Das Protokoll zur Extraktion bestand dabei aus zwei wesentlichen Schritten: im ersten Schritt wurden mit Hilfe eines Hochsalzpuffers zelluläre Bestandteile entfernt. Das so erhaltene Pellet aus unlöslichen (Matrix-) Bestandteilen wurde dann in einem Harnstoff-Puffer gelöst. Nicht lösliche Anteile wurden dabei entfernt. Bezeichnet wurde das Resultat dieser Matrix-Extraktion als „urea soluble ECM“ (usECM). Das Ergebnis war überraschend, denn es zeigte einen größeren Anteil an extrazellulärer Matrix in 4T1-Tumoren als in MT6-Tumoren (siehe Abbildung 3.7, Säule 1 vs. Säule 3). Erwartet war ein höherer Anteil an EZM in den MT6-Tumoren, da dort in den mikroskopischen Untersuchungen augenscheinlich eine größere Menge vorlag als im 4T1-Modell (vergleiche 3.6 und 3.5).

3.4.2 komplette EZM (cECM)

Die Beobachtung, dass bei gleichen Tumormassen zu Extraktionsbeginn die resultierenden Pellets aus unlöslichem Material nach der Resuspension in Harnstoffpuffer für MT6-Tumoren wesentlich größer waren, als für 4T1-Tumoren, führte zur Hypothese, dass der Anteil an nichtharnstofflöslicher Matrix in MT6-Tumoren deutlich höher sein musste als in 4T1-Tumoren. Um diesem qualitativen Matrixunterschied Rechnung zu tragen, wurde das Protokoll dahingehend modifiziert, dass, statt der Lösung der im Hochsalzpuffer unlöslichen Bestandteile in Harnstoffpuffer, eine Resuspension des gesamten Hochsalzpuffer-Pellets durchgeführt wurde. Die so erhaltene EZM wurde als „complete ECM“ (cECM) bezeichnet. Für diese cECM lag der Anteil an Matrix im Tumor für MT6-Tumoren signifikant über dem Anteil an EZM in 4T1-Tumoren (siehe Abbildung 3.7).

Beim Vergleich zwischen der usECM und der cECM beider Tumormodelle konnte beobachtet werden, dass für das 4T1-Modell der harnstofflösliche Anteil an Matrix nahezu dem Anteil an cECM entspricht (siehe Abbildung 3.7), also die gesamte Matrix in Harnstoffpuffer löslich war. Dies traf nicht auf die Matrix des MT6-Modells zu. Hier ist signifikant weniger Matrix harnstofflöslich als im Tumor vorhanden. Dieses Resultat implizierte nicht nur einen quantitativen Unterschied, sondern auch einen qualitativen.

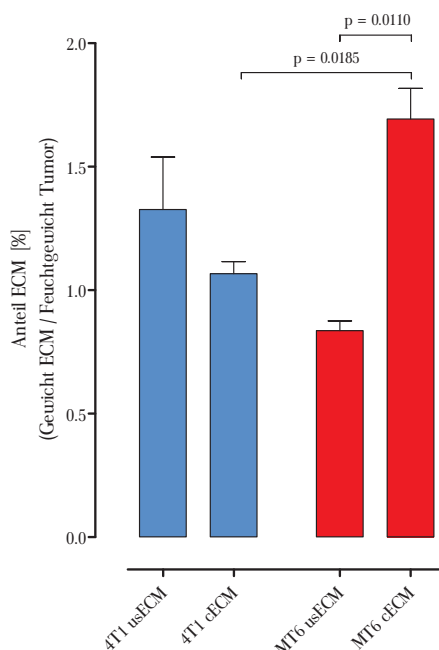


Abbildung 3.7: Prozentualer Anteil an usECM und cECM im 4T1- und MT6-Tumormodell. Zwei modifizierte Extraktionsmethoden wurden verwendet um EZM aus den beiden Tumormodellen zu extrahieren. Dabei zeigte sich nicht nur ein quantitativer, sondern auch ein qualitativer Unterschied zwischen der Matrix der beiden Tumormodelle. Während der Gehalt an cECM im MT6-Modell gegenüber dem 4T1-Modell signifikant größer ist, lässt sich die gesamte Matrix des 4T1-Modells in einem Harnstoffpuffer resuspendieren. Die Matrix des MT6-Modells dagegen ist nur zum Teil im Harnstoffpuffer resuspendierbar. Fehlerbalken: \pm SEM.

3.5 Permeabilitäts-Assay

Da die bisherigen Ergebnisse den Schluss nahelegten, dass zwischen den extrazellulären Matrices aus MT6- und 4T1-Tumoren ein qualitativer Unterschied bestand und dieser für die unterschiedlich gute Diffusion von Medikamenten aus den Blutgefäßen ins Gewebe verantwortlich sein könnte, sollte die Permeabilität der extrahierten Matrices für Medikamente getestet werden. Hierzu wurden die Membranen von Transwelleinsätzen mit definierten Mengen an extrahierter Matrix beschichtet. Anschließend wurde die Diffusion des Chemotherapeutikums Doxorubicin durch diese beschichteten Membranen zeitaufgelöst detektiert. Dies konnte durch die starke Eigenfluoreszenz von Doxorubicin in Echtzeit in einem geeigneten Plattenlesegerät geschehen.

Die Ergebnisse in Abbildung 3.8 zeigen die Permeabilität der mit cECM beschichteten Membranen, sowie einer unbeschichteten Kontrollmembran. Bei der Untersuchung dieser cECM wurde deutlich, dass die Durchlässigkeit der Matrix aus MT6-Tumoren verglichen mit der Matrix aus 4T1-Tumoren deutlich verringert war. Auf Basis dieser zeitaufgelösten Messung, konnte dann die relative Permeabilität der cECM für beide Tumor-Matrices errechnet werden (siehe Abbildung 3.9).

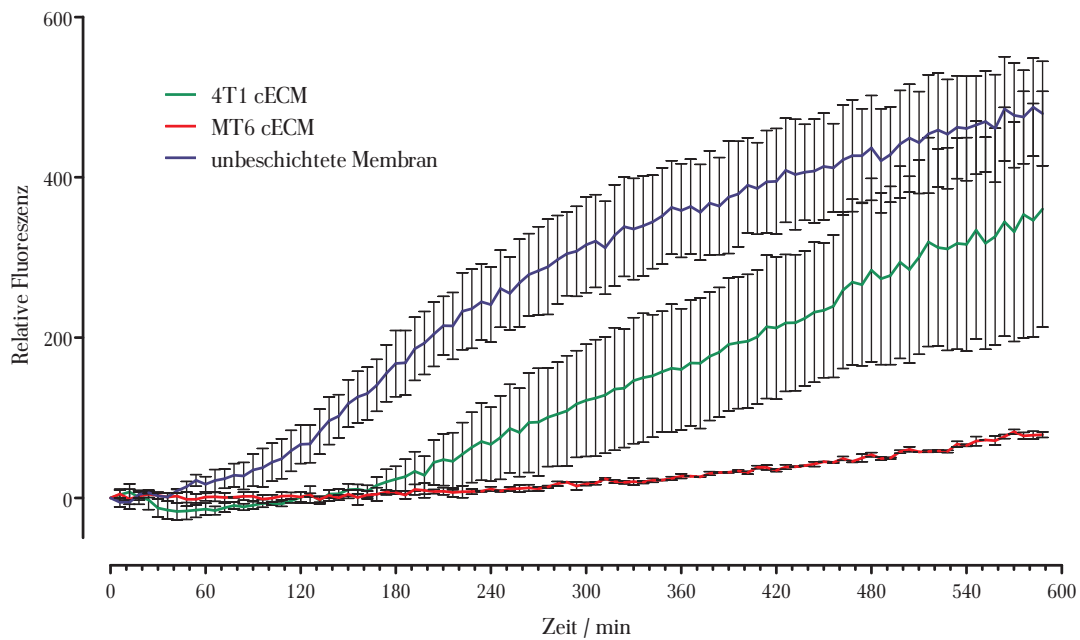


Abbildung 3.8: Permeabilitätsassay für cECM aus 4T1- und MT6-Tumoren. Während das fluoreszierende Chemotherapeutikum Doxorubicin relativ frei durch die unbeschichtete Membran zu diffundieren vermochte, war die Permeabilität der mit Matrix beschichteten Membranen für das Medikament deutlich reduziert. Dabei verhinderte die cECM aus MT6-Tumoren nahezu vollständig den Übertritt von Doxorubicin durch die Membran, wohingegen die Matrix aus 4T1-Tumoren eine deutliche Permeabilität für das Medikament aufwies. Fehlerbalken: \pm SEM.

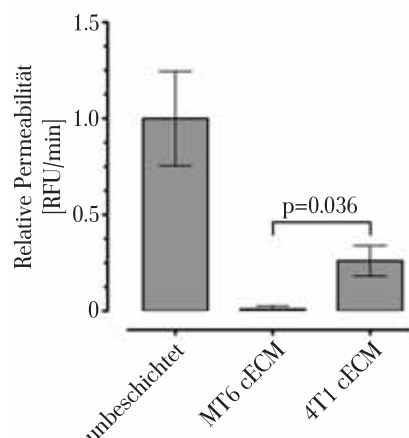


Abbildung 3.9: Relative Permeabilität der cECM aus 4T1- und MT6-Tumoren. Auf Basis der Ergebnisse der zeitaufgelösten Messung (siehe Abbildung 3.8), wurde die Kurvensteigung als relative Permeabilität berechnet. Es ist zu erkennen, dass die Permeabilität der aus 4T1-Tumoren isolierten kompletten Matrix signifikant größer war, als die Permeabilität der kompletten Matrix aus MT6-Tumoren. Fehlerbalken: \pm SEM.

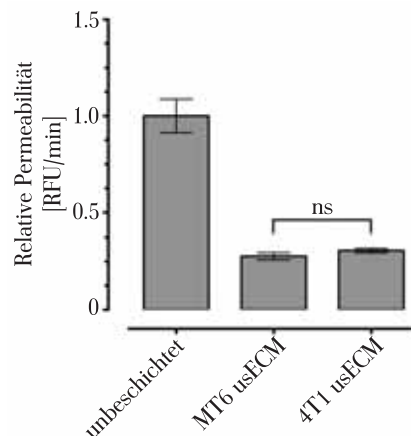


Abbildung 3.10: Relative Permeabilität der usECM aus 4T1- und MT6-Tumoren. Auf Basis der Ergebnisse der zeitaufgelösten Messung, wurde die Kurvensteigung als relative Permeabilität berechnet. Im Gegensatz zur cECM (vgl. Abbildung 3.9) waren die Unterschiede zwischen der Permeabilität der usECM aus 4T1- und MT6-Tumoren nicht signifikant. Fehlerbalken: \pm SEM.

Um den Qualitätsunterschied zwischen den Matrices beider Tumormodelle zu zeigen, wurde dieselbe Messung mit den harnstofflöslichen Anteilen (usECM) der beiden Matrices wiederholt (siehe Abbildung 3.10).

Dabei konnte gezeigt werden, dass es keinen signifikanten Unterschied im harnstofflöslichen Teil der beiden Tumor-Matrices gab. Der Unterschied in der Permeabilität der Tumormatrices musste also im nichtharnstofflöslichen Anteil der Matrix liegen.

3.6 mRNA-Expressions-Analyse von EZM-Proteinen in 4T1- und MT6-Tumoren

Um den Unterschied der beiden Tumor-Matrices weiter aufzuklären, wurden mRNA-Expressions-Analysen der Matrix-Proteine in beiden Tumorzelllinien durchgeführt. Dazu wurde das GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System verwendet. Das Ergebnis dieser Fragment-Analyse zur Bestimmung der Expressionslevel ist in Abbildung 3.11 zu sehen. Dabei war vor allem die wesentlich stärkere Expression von vier von fünf Mitgliedern der Familie der Lysyloxidasen auffällig. So waren LOX sowie LOXL2 mehr als 100-fach stärker in MT6-Zellen exprimiert als in 4T1-Zellen. Lediglich die mRNA für das Protein LOXL3 war in geringem Maße häufiger in 4T1-Zellen zu finden. Da Lysyloxidasen für die Quervernetzung von EZM-Proteinen wie Kollagenen und Elastinen verantwortlich sind, wurde vermutet, dass die geringere Permeabilität des Tumorgewebes in MT6-Tumoren durch die erhöhte Expression dieser Proteinfamilie bedingt war. Wichtig war dabei auch die Überlegung,

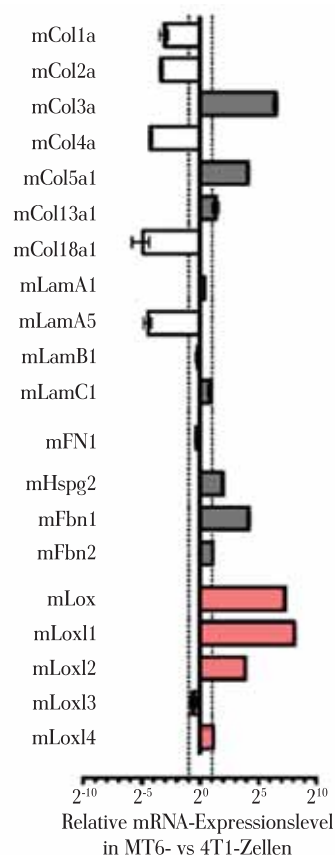


Abbildung 3.11: mRNA-Expression verschiedener extrazellulärer Matrixproteine in 4T1- und MT6-Zellen. Mit Hilfe des GeXP-Systems wurden die mRNA-Expressionslevel verschiedener Proteine der extrazellulären Matrix in 4T1- und MT6-Zellen bestimmt. Dargestellt ist die relative Expression der mRNA der MT6-Zellen bezogen auf die Expression in 4T1-Zellen. Dabei konnte gezeigt werden, dass es zwar deutliche Unterschiede in der Expression von Kollagenen oder Lamininen gab, diese erlaubt allerdings keine einfache Interpretation und vor allem Erklärung für das unterschiedlich Diffusionsverhalten. Jedoch konnte eine erhöhte Expression von vier von fünf Mitgliedern der Familie der Lysyloxidasen für MT6-Zellen nachgewiesen werden (rote Balken). Fehlerbalken: \pm SEM.

dass quervernetzte Kollagene auch in Harnstoffpuffern als schwer- bis unlöslich gelten und erst nach proteolytischer Spaltung resuspendiert werden können (Nishihara, 1970).

3.7 LOX-Aktivitätsassay

Um den Nachweis zu erbringen, dass die Aktivität der Lysyloxidase-Familie in MT6-Zellen höher ist als in 4T1-Zellen, wurde ein LOX-Aktivitätsassay etabliert, mit dessen Hilfe die Gesamtaktivität der verschiedenen Lysyloxidasen in Lysaten oder Zellkultur-Überständen bestimmt werden konnte. Mit Hilfe dieses Assays wurden neben den beiden bisherigen Zelllinien 4T1 und MT6 auch eine weitere Mammakarzinom-Linie aus der Maus (EMT6), sowie vier humane Mammakarzinom-Linien (MCF7,

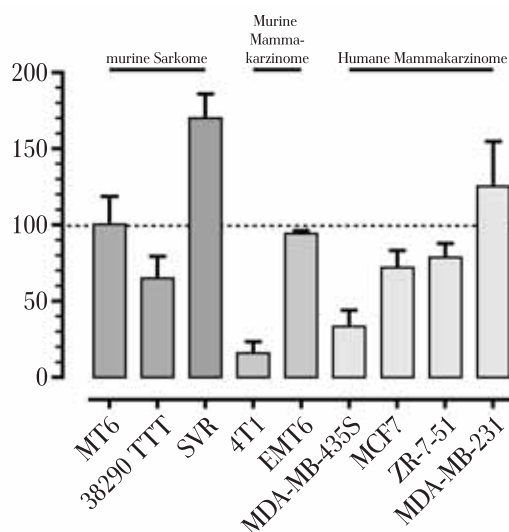


Abbildung 3.12: Aktivitätsassay für Lysyloxidasen in Zellkulturüberständen mehrerer Zelllinien. Die Aktivität der Lysyloxidase-Familie wurde bestimmt und dann auf die Aktivität in MT6-Zellkulturüberständen normiert. Die in MT6-Zellen beobachtete Aktivität von Lysyloxidasen stellte kein Alleinstellungsmerkmal dieser Zelllinie dar. Ebenso konnte in verschiedenen Tumorklassen, wie Sarkomen oder Karzinomen, Zelllinien mit starker, aber auch schwacher Aktivität bestimmt werden. Fehlerbalken: \pm SEM.

MDA-MB-231, MDA-MB-435S und ZR-7-51) und zwei zusätzliche murine Sarkom-Linien (38290 TTT und SVR) untersucht (siehe Abbildung 3.12). Dabei wurden alle Messergebnisse auf die Aktivität der Lysyloxidasen in den Zellkulturüberständen von MT6-Zellen normiert (=100%). Auffällig war dabei, dass die Aktivität der Lysyloxidasen in MT6-Zellen keine Besonderheit dieser Zelllinie darstellte, sondern diese ähnlich stark war wie in EMT6-, MCF7-, ZR-75-1- sowie MDA-MB-231-Zellen. Lediglich 4T1- und MDA-MB-435S-Zellen zeigten eine deutlich geringere Aktivität der Lysyloxidasen. Für die murine Angiosarkom-Linie SVR konnte die stärkste Aktivität der verwendeten Zelllinien detektiert werden. Dabei konnte allerdings nicht festgestellt werden, dass Sarkom- oder Karzinom-Zelllinien eine stärkere Aktivität der Lysyloxidasen aufwiesen.

3.8 Quervernetzung von Matrigel durch rekombinantes humanes LOX bzw. LOXL2

Da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass die Vernetzung von kommerziell erhältlicher extrazellulärer Matrix (Matrigel) durch Inkubation mit Formaldehyd die Diffusion von Doxorubicin durch diese Matrix konzentrationsabhängig verringern kann (siehe Abbildung 3.13), sollte dies auch für die Quervernetzung durch Lysyloxidasen geprüft werden.

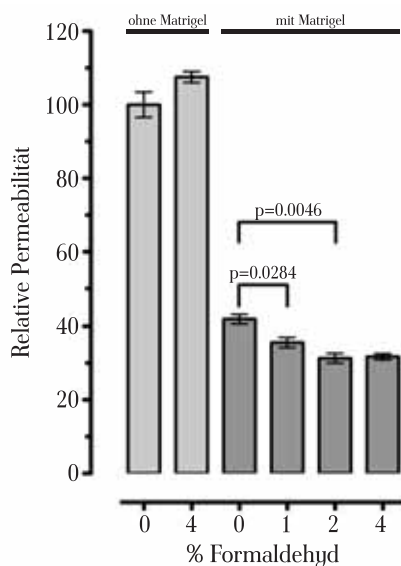


Abbildung 3.13: Permeabilität einer Matrix-beschichteten Membran vor und nach Vernetzung durch Formaldehyd. Membranen einer Transwell-Platte wurden mit $3 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ Matrigel in Anwesenheit verschiedenerer Konzentrationen von Formaldehyd beschichtet. Anschließend wurde die Diffusion des Chemotherapeutikums Doxorubicin durch diese Membran mittels Fluoreszenz-Messung detektiert. Die erhaltenen Werte wurden auf unbeschichtete Membranen normalisiert. Dabei war zu erkennen, dass eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Diffusion durch Formaldehyd erreicht werden kann. Fehlerbalken: \pm SEM.

Hierfür sollten zwei Mitglieder der LOX-Familie rekombinant exprimiert werden. Dies geschah im Rahmen der Bachelorarbeiten von Sabrina Keller und Michel Tenspolde. Hierbei wurde die Sequenz von humanem, reifen LOX (hmLOX; kodierende Sequenz ohne Signal- und Propeptid; siehe Tabelle A.3) in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX kloniert und in *E. coli* B12 exprimiert (siehe Abbildung A.1). Das so erhaltene Peptid konnte über den angehängten Hexa-Histidin-Tag mittels einer Co^{2+} -Agarose-Säule durch Affinitäts-Chromatografie aufgereinigt werden. Das aufgereinigte Peptid wurde mittels Western Blot geprüft und zeigte im LOX-Aktivitätsassay, dass es funktionell war (siehe Abbildung 3.14 A und B).

Zur Expression von LOXL2 (rhLOXL2) wurde dessen kodierende Sequenz (siehe Tabelle A.2) in den lentiviralen Expressionsvektor pLVX-puro kloniert (siehe Abbildung A.2). Mithilfe der so erzeugten lentiviralen Partikel wurden HEK 293 Zellen stabil transfiziert und das Protein aus dem Zellüberstand ebenfalls über eine Co^{2+} -Agarose-Säule durch Affinitäts-Chromatografie aufgereinigt. Auch hier wurde das rekombinante Protein im Western Blot verifiziert und positiv auf seine Aktivität im Aktivitätsassay geprüft.

Anschließend wurden beide Proteine analog zum Vorversuch anstatt Formaldehyd zu mit Matrigel

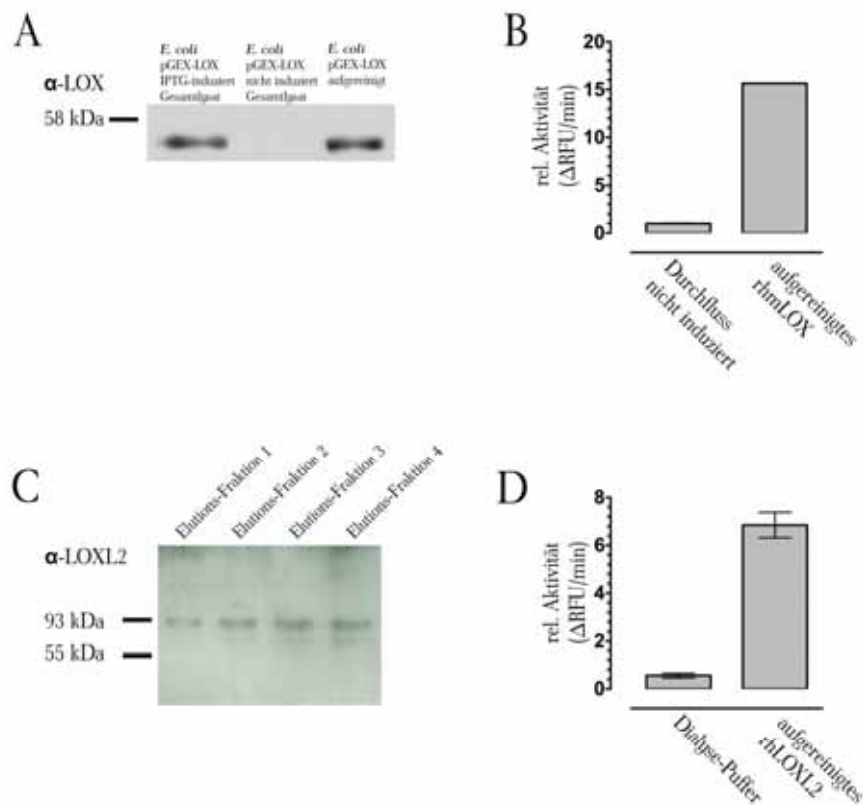


Abbildung 3.14: Western Blot und Aktivitätsassay für die rekombinaten Proteine LOX und LOXL2. **A** Western Blot von Gesamtllysaten der *E. coli*-Expressionskolonie vor und nach der Expressionsinduktion mittels IPTG, sowie der aufgereinigten Lysyloxidase. Sowohl nach einer Expressionsinduktion durch IPTG als auch nach der Aufreinigung kann das Proenzym der Lysyloxidase mit einer Größe von 50 kDa detektiert werden. **B** Ergebnis des LOX-Aktivitätsassays für LOX. Getestet wurde die präsumtiv LOX-haltige Fraktion gegenüber dem Durchfluss. Dabei war zu erkennen, dass die LOX-haltige Fraktion der Aufreinigung eine starke Aktivität zeigte. **C** Western Blot verschiedener Elutions-Fractionen der Aufreinigung von LOXL2. Das 87 kDa große Enzym konnte dabei in verschiedenen Mengen in den einzelnen Fraktionen nachgewiesen werden. **D** Ergebnis des LOX-Aktivitätsassays für LOXL2. Getestet wurde das aufgereinigte Enzym gegenüber dem verwendeten Dialyse-Puffer. Das aufgereinigte LOXL2 zeigte dabei die erwartete Aktivität.

(bzw. Kollagen I) beschichteten Transwell-Membranen gegeben (siehe Abbildung 3.15). Hier konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von hmLOX zu Matrigel die Permeabilität der Matrixschicht signifikant auf $69,5\% \pm 1,5\%$ herabsetzt. Auch die Inkubation von Matrigel mit rhLOXL2 setzte die Permeabilität signifikant auf $71,1\% \pm 3,9\%$ herab. Dasselbe Ergebnis konnte erzielt werden, wenn Matrigel durch Kollagen I ersetzt wurde. Diese negative Beeinflussung der Permeabilität konnte durch Zugabe des LOX-Familien-Inhibitors β APN für beide Proteine erfolgreich verhindert werden.

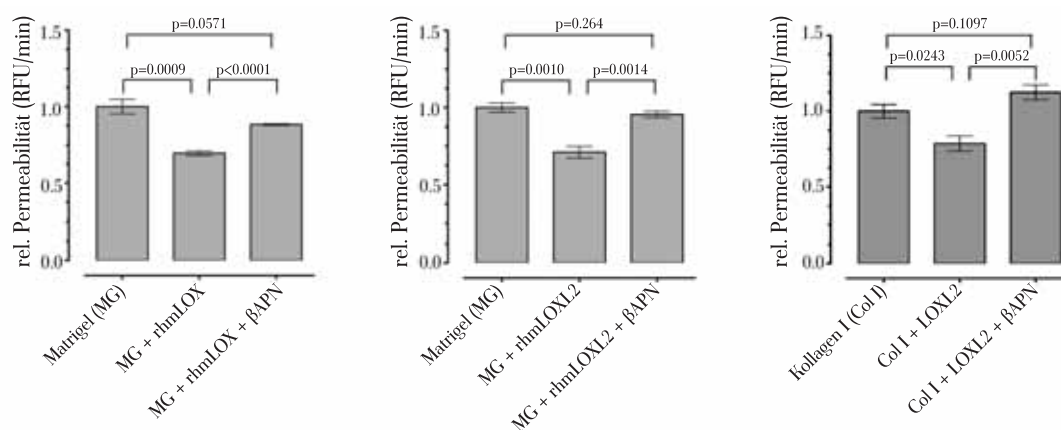


Abbildung 3.15: Permeabilitätsassay für eine Matrix-beschichtete Transwell-Membran nach Vernetzung durch LOX beziehungsweise LOXL2. Membranen einer Transwell-Platte wurden mit $3 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ Matrigel beziehungsweise Kollagen I in Anwesenheit von hmLOX oder rhLOXL2 beschichtet. Als Kontrolle diente eine beschichtete Membran ohne Zugabe des jeweiligen Enzyms. Sowohl die Inkubation der Membran mit hmLOX als auch mit rhLOXL2 führte im Vergleich mit einer nicht-inkubierten Membran zu einer geringeren Diffusion von Doxorubicin durch diese. Diese Lysyloxidase-vermittelte Inhibierung der Diffusion konnte durch gleichzeitige Inkubation mit dem Lysyloxidase-Inhibitor β APN verhindert werden. Fehlerbalken: \pm SEM.

3.9 Untersuchung von Veränderungen nach Inhibition von Lysyoxidasen in verschiedenen Tumormodellen

Die extrazelluläre Matrix im MT6-Tumormodell konnte die Diffusion von Molekülen im Vergleich zum 4T1-Modell behindern. Diese Behinderung konnte vor allem auf die erhöhte Aktivität von Lysyloxidasen zurückgeführt werden, welche auch in *in vitro*-Versuchen in der Lage waren EZM so zu modifizieren, dass die Diffusion erschwert wurde. Durch eine Inhibition der Lysyloxidasen mit β APN konnte die Diffusion durch die EZM wesentlich verbessert werden. Im folgenden sollte der Effekt der Inhibition von Lysyloxidasen auf verschiedene Parameter in mehreren Tumormodellen getestet werden. Hierzu wurden etablierte Tumoren mit täglich 100 mg/kg Körpergewicht β APN in Kochsalzlösung behandelt (Erler *et al.*, 2006) und Parameter wie das Tumorwachstum, die Diffusion von Hoechst33342 aus Blutgefäßen in den Tumor, die Gesamtmedikament-Einbringung in den Tumor sowie in Nicht-Zielorgane und die Permeabilität der EZM erfasst und untersucht.

3.9.1 Tumorwachstum

In drei der getesteten Tumormodelle (E0771, EMT6 und MT6) hatte die Behandlung mit dem Lysyloxidase-Inhibitor keine signifikanten Beeinflussung des Wachstums zur Folge. Dagegen war

das Wachstum der Tumoren im 4T1-Modell unter LOX-Inhibition signifikant verringert, während die Wachstumskurve von behandelten Tumoren im LLC-Modell sogar signifikant über den Werten der nicht-LOX-inhibierten Tumoren lag. Zur Kontrolle der Messungen wurden am Versuchsende alle Tumoren entnommen und deren Massen bestimmt (siehe 3.16). Hier konnten die im lebenden Tier bestimmten Tumorgrößen bestätigt werden und es waren auch bei dieser Endpunktmessung dieselben signifikanten Unterschiede im Wachstum der 4T1- und LLC-Tumoren ersichtlich, während die Tumoren der drei verbleibenden Modelle keinen Größenunterschied zeigten.

3.9.2 Diffusion aus den Gefäßen

Um Veränderungen der Diffusion von Medikamenten aus den Tumorblutgefäßen nach Inhibition der LOX-Familie zu untersuchen, wurde den Tieren am Versuchsende Hoechst33342 injiziert. In Abbildung 3.17 sind dabei exemplarisch Aufnahmen von LOX-inhibierten Tumoren und Kontroll-Tumoren der Modelle EMT6, MT6 und LLC zu sehen. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die Diffusionstrecke des Medikamenten-Surrogats nach Inhibition der Quervernetzung der EZM aus den Gefäßen deutlich erhöht ist. Eine statistische Auswertung dieser Aufnahmen ist in Abbildung 3.18 zu sehen. Hier konnte für alle Tumormodelle gezeigt werden, dass eine Inhibition der Lysyloxidasen die Penetration des Farbstoffes in das die Blutgefäße umgebende Gewebe signifikant erhöht. Für die statistische Auswertung dieses Sachverhaltes wurden mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskopes z-stacks (je 30 slides in 0,9 μm -Schritten; $n=4$) angefertigt. Die Auswertung ergab dabei für alle fünf untersuchten Modelle eine signifikante Erhöhung der Gewebepenetration durch Hoechst33342 nach Inhibition der Lysyloxidasen (siehe Abbildung 3.18).

3.9.3 Medikamentenmenge im Tumor

Zur Untersuchung des Einflusses der Inhibition von Lysyloxidasen auf die im Tumor akkumulierende Menge an Medikament, wurde zuvor systemisch appliziertes Doxorubicin aus Tumoren extrahiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass in drei von fünf Modellen die Einbringung signifikant verbessert werden konnte. So wurden aus Tumoren der Modelle 4T1, EMT6 und MT6 nach Behandlung mit β APN signifikant größere Mengen an Doxorubicin detektiert. In E0771-Tumoren konnte zwischen Behandlungsgruppe und Kontrollgruppe kein Unterschied festgestellt werden, während dieser im LLC-Modell im nicht signifikanten Bereich blieb (siehe Abbildung 3.19).

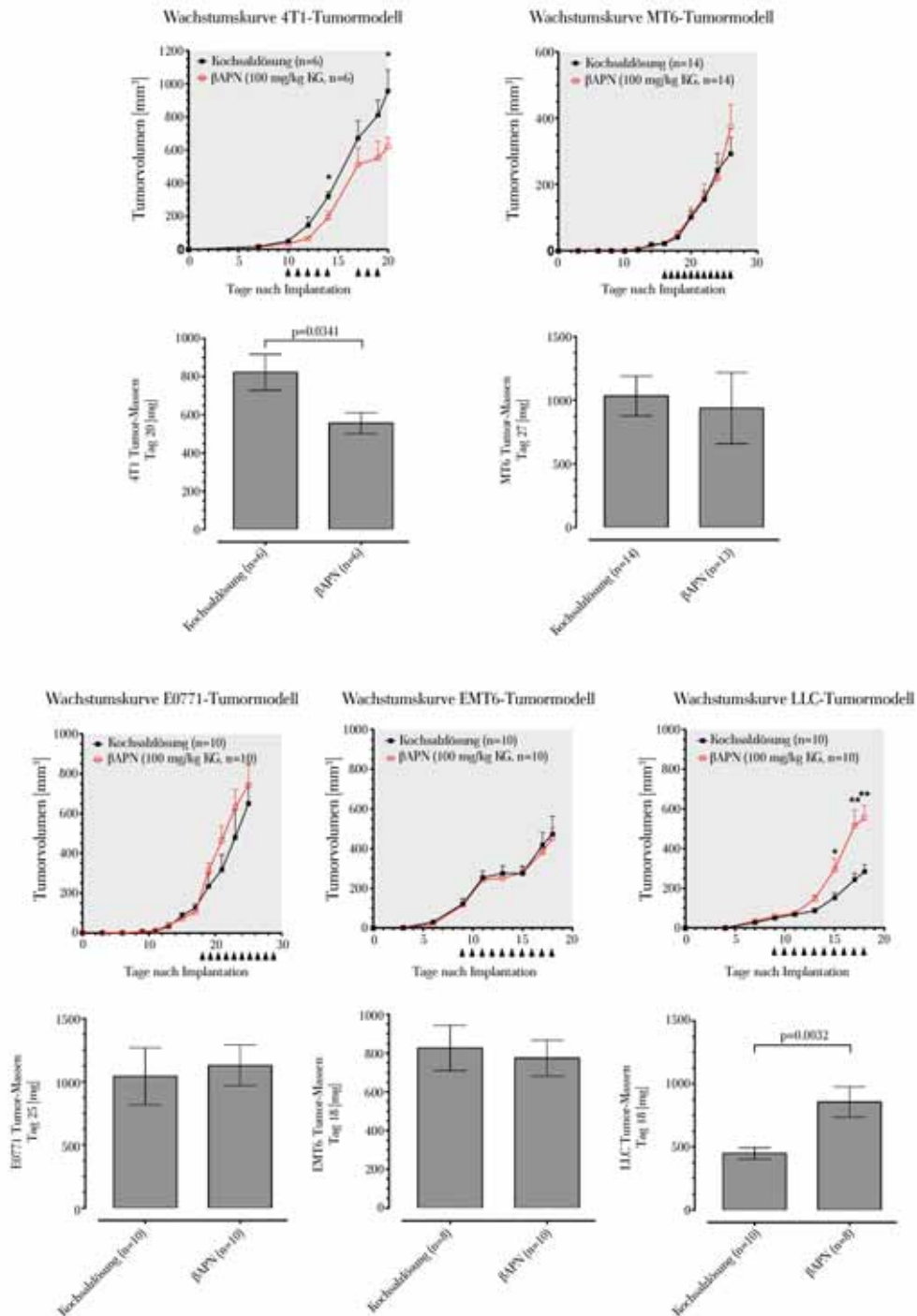


Abbildung 3.16: Lysyloxidase-Inhibition in etablierten Tumoren. In fünf verschiedenen Tumormodellen wurde die Beeinflussung des Wachstums durch Inhibition der Lysyloxidasen getestet. Hierzu wurden die Tumoren bis auf palpierbare Größe heranwachsen gelassen und dann durch tägliche, intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg KG β APN in 0,9 %-Kochsalzlösung behandelt. Außerdem wurde mithilfe einer Schiebelehre die Größe der Tumoren bestimmt. Zusätzlich wurden am Versuchsende sämtliche Tumoren vollständig entnommen und die Massen bestimmt. Während E0771-, EMT6- und MT6-Tumoren keine signifikanten Wachstumsunterschiede unter Inhibition der Lysyloxidasen gegenüber den Kontrollgruppen aufwiesen, reagierten Tumoren des 4T1-Modells mit signifikant verringertem Wachstum auf die Inhibition. Interessanterweise zeigten LLC-Tumoren nach Inhibition der LOX-Familie ein signifikant stärkeres Wachstum. Asteriske zeigen statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$. Fehlerbalken: \pm SEM.

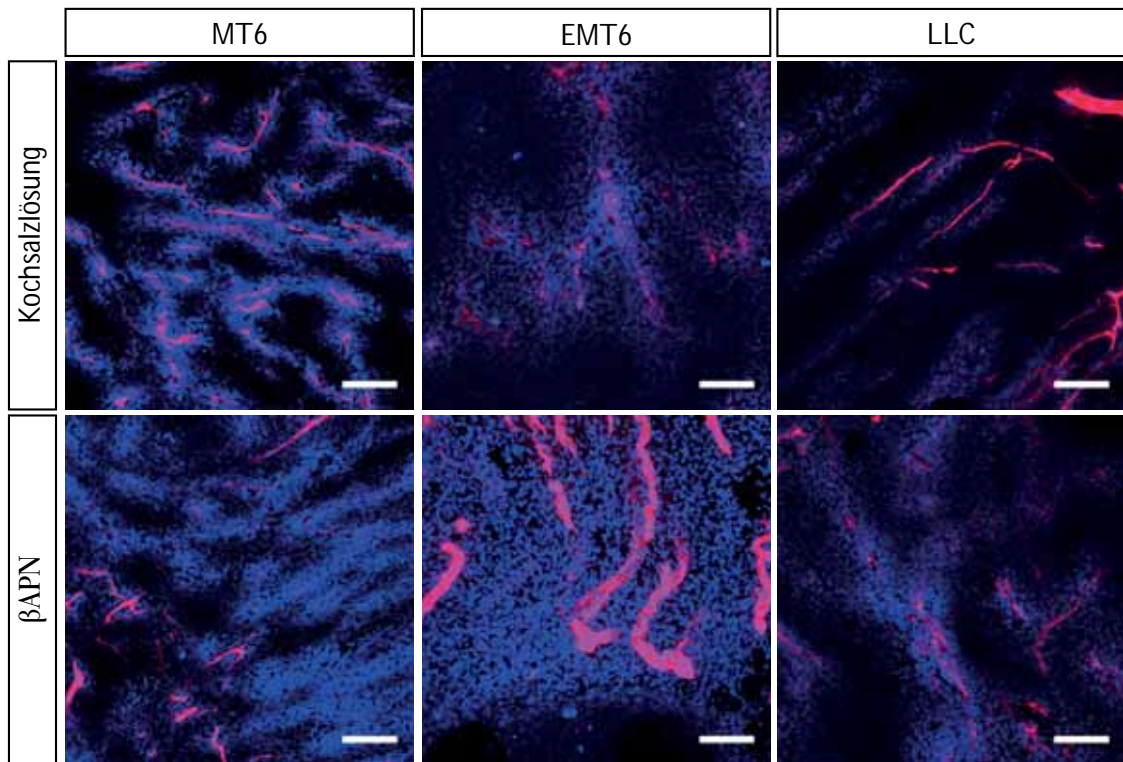


Abbildung 3.17: Exemplarische Aufnahmen der Hoechst33342-Penetration in den Tumormodellen EMT6, MT6 und LLC nach Inhibition der Lysyloxidasen. Beispielhaft sind hier Bilder aus, mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskopes aufgenommenen, z-stacks gezeigt. Dabei ist zu erkennen, dass die Inhibition der EZM-quervernetzenden LOX-Familie durch β APN die Penetration des Farbstoffes Hoechst33342 (blau) ins Gewebe erleichtert. Perfundierte Blutgefäße wurden durch Injektion von Fluoreszenz-markiertem Isolectin sichtbar gemacht (rot). Maßstab: 100 μ m

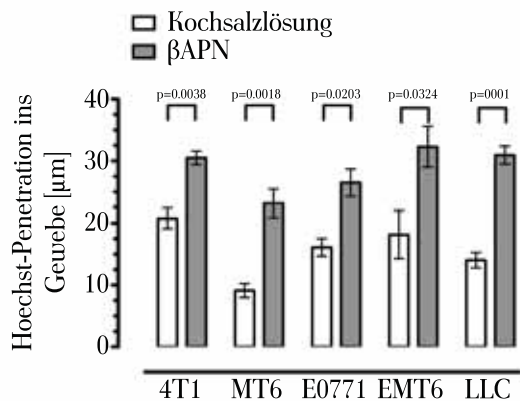


Abbildung 3.18: Penetrationstiefe von Hoechst33342 nach Inhibition der Lysyloxidasen durch β APN. Die Penetrationstiefe wurde anhand von konfokalen 3D-Aufnahmen bestimmt (z-stacks mit 30 slides in 0,9 μ m-Schritten; n=4). Dabei war zu erkennen, dass die Inhibition der LOX-Familie die Penetrationsdistanz von Blutgefäßen ins Tumorgewebe in allen fünf Modellen signifikant erhöht. Fehlerbalken: \pm SEM.

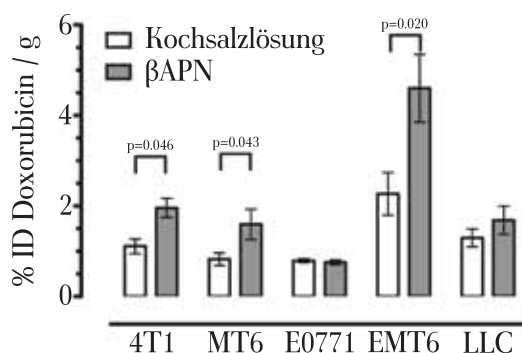


Abbildung 3.19: Einfluss der Behandlung mit β APN auf die Akkumulation von Doxorubicin in Tumoren. Die Menge an Doxorubicin, die aus den Tumoren nach der Behandlung mit β APN extrahiert werden konnte, war in 4T1-, EMT6- und MT6-Tumoren signifikant erhöht. Für E0771- und LLC-Tumoren konnte dies nicht gezeigt werden. Fehlerbalken: \pm SEM.

3.9.4 Medikamentenmenge in Nicht-Ziel-Organen

Da Lysyloxidasen in zahlreichen Geweben wie dem Herzen, Muskeln oder Haut stark exprimiert werden (Fagerberg *et al.*, 2014), sollte in einem weiteren Experiment geprüft werden, ob deren Inhibition unerwünschte Akkumulationseffekte des Chemotherapeutikums in Nicht-Ziel-Organen nach sich zieht. Hierfür wurden C57Bl/6J-Mäuse über 14 Tage entweder mit β APN (100 mg/kg KG qd) oder mit Kochsalzlösung behandelt. Am Versuchsende wurde ein Bolus Doxorubicin injiziert und die Akkumulation in verschiedenen Organen detektiert (siehe Abbildung 3.20). Hier konnte kein Unterschied zwischen der Kontroll- und Behandlungsgruppe festgestellt werden. Dies zeigte, dass die Inhibition der Lysyloxidasen vor allem die im ständigen Umbau befindliche EZM des Tumors traf während die „ruhende“ EZM von Organen, zumindest innerhalb des untersuchten Zeitraums, unbeeinflusst blieb.

3.9.5 Relative Permeabilität der Matrix

Zur Verifizierung, dass die Inhibition der Lysyloxidasen in den verwendeten Tumormodellen die Permeabilität beeinflusst, wurde aus mit β APN-behandelten Tumoren und Kontroll-Tumoren extrazelluläre Matrix extrahiert. Diese extrahierten Matrices wurden dann auf ihre Permeabilität für das Chemotherapeutikum Doxorubicin, mittels eines Transwell-Permeabilitätsassay, getestet. Dabei zeigte sich, dass die Permeabilität der extrahierten EZM in allen Modellen bis auf das LLC-Modell durch die Inhibition der LOX-Familie signifikant gesteigert werden konnte (siehe Abbildung 3.21).

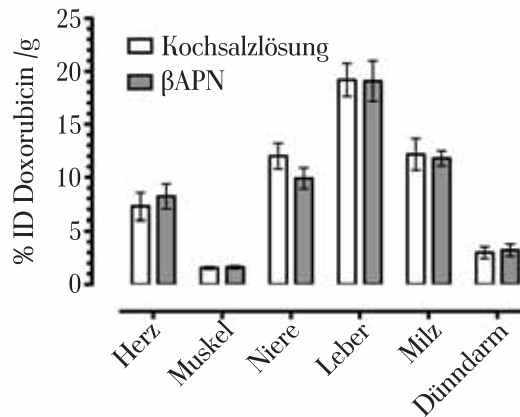


Abbildung 3.20: Doxorubicin-Akkumulation in Nicht-Ziel-Geweben nach Behandlung mit β APN. Zwei Mausgruppen wurden entweder mit β APN oder mit Kochsalzlösung für zwei Wochen behandelt. Am Versuchsende wurde den Mäusen Doxorubicin injiziert und dessen Anreicherung in verschiedenen Geweben detektiert. Dabei konnte zwischen beiden Gruppen in keinem Organ ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Fehlerbalken: \pm SEM.

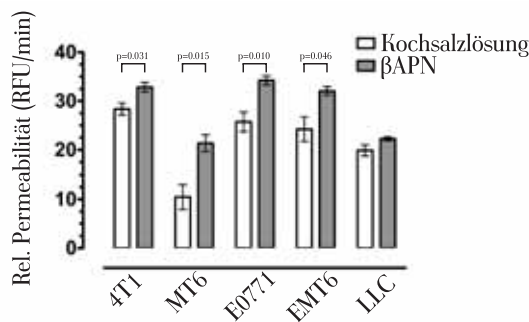


Abbildung 3.21: Permeabilität von mit EZM aus verschiedenen Tumormodellen beschichteten Transwell-Membranen mit und ohne Inhibition von Lysyloxidasen. Extrazelluläre Matrix aus verschiedenen Tumormodellen wurde nach Behandlung mit β APN, beziehungsweise Kochsalzlösung als Kontrolle, extrahiert. Anschließend wurden Transwell-Membranen mit $3 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ dieser EZM beschichtet und die Permeabilität für Doxorubicin detektiert. Dabei zeigte sich, dass die Inhibition in allen Modellen, bis auf das LLC-Modell, die Permeabilität signifikant verbesserte. Fehlerbalken: \pm SEM.

3.10 Kombination von Chemotherapeutikum und Lysyloxidase-Inhibition in Maustumormodellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Inhibition von Lysyloxidasen sowohl die Akkumulation als auch die Penetration eines Chemotherapeutikums in Tumoren verbessern kann, sollte eine Kombinationstherapie auf ihre Effizienz in der Behandlung der Tumorerkrankung getestet werden. Hierzu wurden zwei Modelle ausgewählt. Das 4T1-Modell gilt als klinisch relevantes Modell für invasiven, metastasierenden Brustkrebs. Als zweites Modell wurde das EMT6-Tumormodell verwendet,

da dieses wie das MT6-Modell auf β APN-Behandlung als Monotherapie nicht mit einem veränderten Wachstum der Tumoren angesprochen hatte, aber die Einbringung von Medikament durch Inhibition der LOX-Familie signifikant gesteigert werden konnte.

3.10.1 4T1-Tumormodell

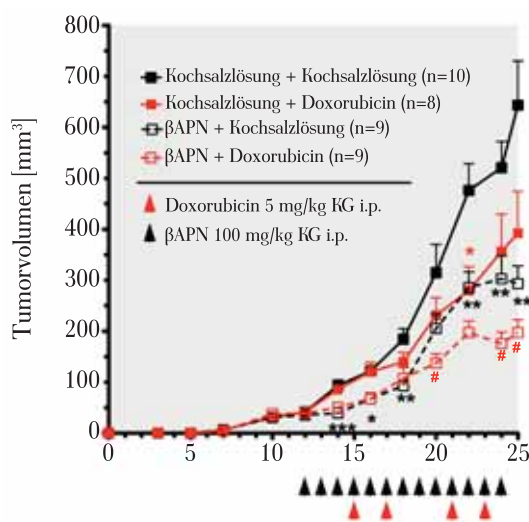


Abbildung 3.22: Behandlung etablierter 4T1-Tumoren mit einer Kombinationstherapie aus β APN und Doxorubicin. Bereits etablierte Tumoren wurden mit einer Kombination aus β APN und Doxorubicin behandelt. Diese Kombination erbrachte einen stärkeren inhibitorischen Effekt als beide Medikamente alleine. Asteriske zeigen statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe. Rauten eine statistischen Signifikanz gegenüber den Monotherapie-Gruppen; #, *: $p < 0,05$; ##, **: $p < 0,01$. Fehlerbalken: \pm SEM.

Für die Kombinationsbehandlungsstudie wurden vier Gruppen unterschieden. Die erste Gruppe erhielt lediglich Kochsalzlösungen und diente als Negativkontrolle. Die zweite Gruppe erhielt Injektionen des Chemotherapeutikums Doxorubicin (5 mg/kg KG) und Kochsalzlösung, während Gruppe drei eine Monotherapie mit β APN (100 mg/kg KG qd) (plus Kochsalzlösung) erhielt. Gruppe vier wurden sowohl β APN als auch Doxorubicin verabreicht. Das Tumorstadium wurde in regelmäßigen Abständen überwacht (siehe Abbildung 3.22). Während die Tumoren der Kontrollgruppe starkes Wachstum zeigten, sprachen alle drei weiteren Gruppen mit reduziertem Wachstum auf die jeweilige Behandlung an. Die größten Reduktionseffekt zeigte dabei wie erwartet die Kombination aus Doxorubicin und β APN. Da es sich beim 4T1-Modell um ein metastasierendes Modell handelt,

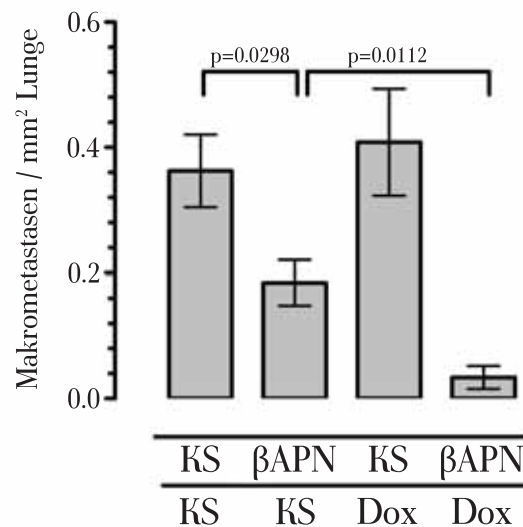


Abbildung 3.23: Anzahl von 4T1-Makrometastasen in Lungen behandelter Tiere. Die Anzahl an Makrometastasen wurde in Hämatoxylin-Eosin gefärbten Dünnschnitten der Lungen bestimmt. Dabei war zu erkennen, dass die Behandlung mit β APN zu einer signifikanten Reduktion an Metastasen führte, während die reine Behandlung mit Doxorubicin keinen Einfluss auf die Anzahl der Metastasen hatte. Eine Kombination aus beiden Therapeutika führte zu einer weiteren Inhibition der Metastasen, die verglichen mit der bereits beobachteten Reduktion in β APN-behandelten Tieren signifikant war. Fehlerbalken: \pm SEM. (Dox = Doxorubicin, KS= Kochsalzlösung)

dessen Metastasen vor allem in der Lunge zu finden sind, wurde dort am Ende des Versuchs nach Veränderungen in der Metastasierung gesucht. Die bekannte frühe Metastasierung des 4T1-Modells bedeutete, dass schon zu Behandlungsbeginn Mikrometastasen vorhanden waren (Granot *et al.*, 2011). Hier zeigte sich, dass bereits die Behandlung mit β APN, die Zahl an Makrometastasen in der Lunge im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduzierte (siehe Abbildung 3.23). Doxorubicin hatte keinen Einfluss auf die Zahl der Metastasen, während die Kombination mit β APN dessen alleinigen inhibitorischen Effekt signifikant verbessern konnte.

3.10.2 EMT6-Tumormodell

Im EMT6-Modell zeigte die Monotherapie mit β APN wie zuvor keine Auswirkung auf das Wachstum der Tumoren. Eine Behandlung mit Doxorubicin führte bereits zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums. Eine Kombinationstherapie aus β APN und Doxorubicin erzielte jedoch in mehr als der Hälfte der Tiere einen so starken Rückgang der Tumormasse, dass Tumoren am Versuchsende nicht mehr detektierbar waren (vergleiche Abbildung 3.16 und Abbildung 3.24).

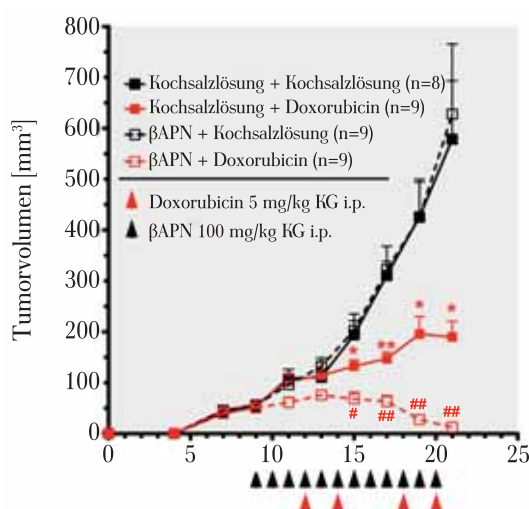


Abbildung 3.24: Behandlung etablierter EMT6-Tumoren mit einer Kombinationstherapie aus β APN und Doxorubicin. Während die Behandlung bereits etablierter Tumoren mit β APN deren Wachstum verglichen mit der Kontrollgruppe nicht beeinflusste, konnte mit Hilfe des Chemotherapeutikums Doxorubicin dieses signifikant inhibiert werden. Wurde mit einer Kombination aus β APN und Doxorubicin behandelt, so konnte das Tumorstadium deutlich und signifikant verringert werden. Mit dieser Kombinationstherapie konnte in mehr als der Hälfte der Tiere die Tumormasse so weit reduziert werden, dass diese nicht mehr detektierbar war. Asteriske zeigen statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe. Rauten eine statistische Signifikanz gegenüber den Monotherapie-Gruppen; #, *: $p < 0,05$, ##, **: $p < 0,01$. Fehlerbalken: \pm SEM.

3.11 Inhibition von Lysyloxidasen bei kombinierter anti-angiogenetischer Therapie und Chemotherapie im MT6-Tumormodell

Da in den vorherigen Versuchen die Inhibition von Lysyloxidasen durch β APN einen stark positiven Effekt auf die Akkumulation an Medikamenten im Tumor bewirkte und dabei nicht nur die Gesamtmenge an Therapeutikum im Tumor erhöht werden konnte, sondern auch die Verteilung verbessert wurde, sollte untersucht werden, ob eine Inhibition der LOX-Familie den negativen Effekt der reduzierten Gefäßdichte nach anti-angiogenetischer Therapie im MT6-Modell aufheben könnte. Hierzu wurden Tiere mit bereits etablierten MT6-Tumoren mit β APN vorbehandelt und anschließend Doxorubicin verabreicht (siehe Abbildung 3.25). Dabei zeigte sich, dass die Vorbehandlung mit β APN, die Effizienz der nachfolgenden Doxorubicin-Behandlung signifikant steigern konnte. Diese Effizienz des Chemotherapeutikums konnte durch eine anti-angiogenetische Behandlung zur „Gefäßnormalisierung“ weiter verbessert werden. Hier konnte durch die Kombination aus anti-angiogenetischer Therapie, Inhibition der Lysyloxidasen und einem Chemotherapeutikum das

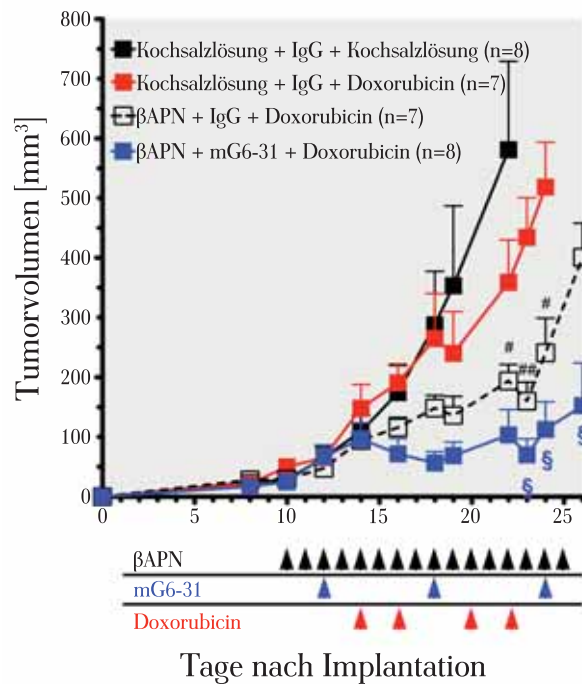


Abbildung 3.25: Behandlung etablierter MT6-Tumoren mit einer Kombinationstherapie aus β APN, mG6-31 und Doxorubicin. Bereits etablierte Tumoren wurden mit einer Kombination aus β APN, mG6-31 und Doxorubicin behandelt. Diese Dreifachkombinationsbehandlung konnte die bereits erhöhte Effizienz der Doppelkombinationsbehandlung aus β APN und Doxorubicin weiter verbessern. Rauten zeigen eine statistische Signifikanz der Doppelbehandlung gegenüber der Monotherapie- und Kontroll-Gruppe; Paragraphen indizieren eine statistische Signifikanz der Dreifachkombinationsbehandlung gegenüber der Doppelbehandlungsgruppe. #, §: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$. Fehlerbalken: \pm SEM.

Tumorstadium nahezu gestoppt werden.

Um nun zu untersuchen, ob die erhöhte Effizienz der Therapie durch eine Verbesserung des Medikamententransports in den Tumor bedingt wurde, wurden Tiere mit etablierten Tumoren über vier Tage mit β APN behandelt. An Tag drei der Behandlung erfolgte ein einzelner Bolus von mG6-31. Am Versuchsende wurde den Tieren Hoechst33342 sowie Fluoreszenz-markiertes Isolectin injiziert. So konnten perfundierte Blutgefäße sowie die Diffusion von Hoechst aus diesen ins umliegende Gewebe in Dünnschnitten detektiert werden. Die statistische Auswertung ergab, dass nach einer einzelnen Gabe des VEGF-Antikörpers keine Verbesserung der Hoechst-Diffusion ins Gewebe messbar war. Auch die reine Verwendung von β APN konnte über diesen kurzen Zeitraum nicht zu einer signifikanten Verbesserung der Permeabilität des Tumorstromas führen. Die Kombination aus beiden bewirkte allerdings eine signifikant erhöhte Eindringtiefe von Hoechst33342 ins Gewebe (siehe Abbildung 3.26). Dies zeigte, dass die Veränderung der Matrix durch Inhibition der Lysolysidasen in Kombination mit der Verbesserung der Vaskulatur durch Abfangen von VEGF den

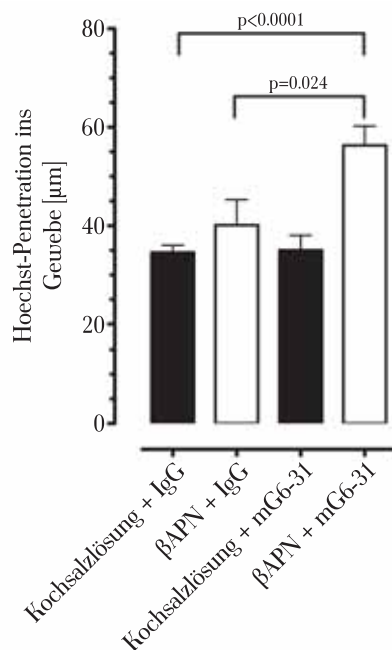


Abbildung 3.26: Penetration von Hoechst33342 ins MT6-Tumorgewebe nach viertägiger β APN-Behandlung und mG6-31-Einzeldosis. Tiere mit etablierten MT6-Tumoren wurden vier Tage mit 100 mg/kg KG β APN behandelt. Am Tag drei dieser Behandlung erfolgte die Injektion eines Bolus mG6-31 (50 mg/kg KG). Am Versuchsende wurden den Tieren sowohl Hoechst33342 als Medikamenten-Surrogat als auch Isolectin IB₄ aus *Griffonia simplicifolia*, das an Alexa Fluor[®]647 gekoppelt war, zur Markierung der perfundierten Blutgefäße injiziert. Dünnschnitte dieser Tumoren wurden an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop ausgewertet und die Eindringtiefe von Hoechst33342 aus den Blutgefäßen ins Gewebe bestimmt. Dabei war zu erkennen, dass weder die relative kurze Behandlung mit β APN noch ein Bolus mG6-31 ausreicht, um die Penetration zu verbessern. Die Kombination aus beiden verbessert allerdings die Diffusion von Hoechst33342 ins Stroma signifikant. Fehlerbalken: \pm SEM.

Medikamententransport und die Effizienz der Therapie deutlich verbessern kann.

Kapitel 4

Diskussion

Eines der großen Probleme systemischer Therapien zur Behandlung von Krebserkrankungen ist der unzureichende Transport der Wirkstoffe in den Tumor. Eine Schlüsselrolle kommt dabei dem Blutgefäßsystem zu, da systemisch wirkende Medikamente über dieses zu den Zielorten transportiert werden müssen. Die unreife und chaotische Vaskulatur, die in den meisten Tumoren beobachtet wird, wurde bereits als weitgehend ursächlich für die verringerte Medikamenteneinbringung erkannt und beschrieben (Less *et al.*, 1991; Eberhard *et al.*, 2000; Joanne *et al.*, 2001; Nagy *et al.*, 2010). Die dysfunktionale Vaskulatur bewirkt auch eine ungleichmäßige Verteilung von Wirkstoffen innerhalb des Tumors, so dass dort zahlreiche Zellen nur subtherapeutischen Wirkstoffkonzentrationen ausgesetzt werden oder gar nicht in Kontakt mit dem Therapeutikum kommen. Eine Verbesserung der Einbringung von Medikamenten könnte einen positiven Einfluss auf bisher etablierte Therapien haben, da größere Areale des Tumors mit pharmakologisch wirksamen Mengen an Medikament in Kontakt kämen. Dies könnte auch eine Herabsetzung der Dosis ermöglichen und so zu einer Verminderung der Nebenwirkungen der Chemotherapie führen. Dies ist ein wichtiger Aspekt da die Nebenwirkungen gebräuchlicher Antitumorwirkstoffe eine enorme Belastung für den Patienten darstellen und häufig zum vorzeitigen Abbruch der Therapie führen.

In bisherigen Arbeiten zum Medikamententransport in soliden Tumoren steht vor allem die dysfunktionale Vaskulatur im Fokus der Untersuchungen. Nach der Hypothese von Rakesh K. Jain resultiert diese dysfunktionale Vaskulatur aus einem Überschuss an pro-angiogenetischen Faktoren. Als mögliche Verbesserung dieses Gefäßbildes gilt die „Gefäßnormalisierung“ der Vaskulatur durch eine anti-angiogenetische Therapie.

Diese „Normalisierung“ kann anhand von acht Parametern beschrieben werden:

1. die Organisation der Blutgefäße erscheint weniger chaotisch als im unbehandelten Tumor (Gazit *et al.*, 1997; Baish und Jain, 2000).

2. die resultierenden Blutgefäße befinden sich in einem reiferen Zustand, da sie stärker von Perizyten bedeckt sind (Tong *et al.*, 2004; Inai *et al.*, 2004; Winkler *et al.*, 2004).
3. in unbehandelten Tumoren ist die Basalmembran häufig zu dick beziehungsweise gar nicht vorhanden. Im Laufe einer „Normalisierung“ gleicht sie sich der Basalmembranstärke normaler Gefäße an (Tong *et al.*, 2004; Inai *et al.*, 2004; Winkler *et al.*, 2004).
4. die zuvor erweiterten Gefäßlumen werden verkleinert (Tong *et al.*, 2004; Winkler *et al.*, 2004).
5. die Gefäßdichte nimmt ab (Tong *et al.*, 2004; Inai *et al.*, 2004; Winkler *et al.*, 2004).
6. der interstitielle Druck des Gewebes gleicht sich dem Druck in den Kapillaren an statt wie im unbehandelten Tumor größer zu sein (Lee *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 2004; Willett *et al.*, 2004).
7. die Hypoxie des Tumors wird verringert (Lee *et al.*, 2000; Winkler *et al.*, 2004).
8. die Verteilung von Medikamenten im Tumor wird homogener (Teicher, 1996; Tong *et al.*, 2004; Willett *et al.*, 2004).

Durch eine anti-angiogenetische Therapie kann in der Klinik in einem Teil der Patienten die Effizienz einer Chemotherapie verbessert werden. Für diese Verbesserung der Effizienz ist nach der Hypothese von Rakesh K. Jain die beobachtete „Normalisierung“ verantwortlich.

Dabei konnten nicht nur die Arbeiten der Gruppe um Rakesh K. Jain Beweise für eine verbesserte Perfusion von Tumoren nach Blockade des VEGF-Signalwegs finden (Jain, 2001, 2005; Goel *et al.*, 2011, 2012). Auch Dings *et al.* konnten über die Messung des Sauerstoffgehaltes im Tumor zeigen, dass eine anti-angiogenetische Therapie die Durchblutung dort fördert (Dings *et al.*, 2007). Betrachtet man diese verbesserte Perfusion im Lichte der Arbeiten von Dunn *et al.* (1995) und Primeau *et al.* (2005), die besagen, dass die Diffusion kleiner Moleküle in enger Korrelation zum Sauerstoffpartialdruck im Tumor steht, kann aus dieser Tatsache abgeleitet werden, dass eine anti-angiogenetische Therapie die Einbringung von Medikamenten in den Tumor verbessert.

Allerdings konnte in anderen Studien gezeigt, beziehungsweise aus ihnen abgeleitet werden, dass eine anti-angiogenetische Therapie auch einen deutlichen negativen Effekt auf den Medikamententransport in Tumoren haben kann (Sorensen *et al.*, 2012; Van der Veldt *et al.*, 2012). So konnten Sorensen *et al.* (2012) zeigen, dass im Fall von Glioblastom-Patienten nur etwa ein Drittel mit einer verbesserten Perfusion auf die anti-angiogenetische Therapie reagierte. Ein weiteres Drittel

zeigte sogar eine verminderte Perfusion unter anti-angiogenetischer Medikation. Eine Erklärung für dieses unterschiedliche Ansprechen der Patienten auf die Therapie konnten die Autoren dieser Arbeit aber nicht liefern. Da die anti-angiogenetische Therapie in dieser Studie nicht adjuvant zu einer Chemotherapie verwendet wurde, kann nur spekuliert werden, ob dies nicht trotz Perfusionsverminderung, beispielsweise durch eine homogenere Verteilung des Wirkstoffes, einen positiven Effekt auf die Medikamenteneinbringung zeigen könnte. Eine weitere wichtige Arbeit zu diesem Thema wurde von Van der Veldt *et al.* (2012) publiziert. Die Autoren dieser Studie untersuchten den Effekt des VEGF-Antikörpers Bevacizumab auf die Einbringung von Docetaxel in nichtkleinzellige Bronchialkarzinome. Sie konnten dabei zeigen, dass bereits nach fünf Stunden eine signifikante Erniedrigung der Perfusion im Tumor detektierbar war. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die postulierte „Normalisierung“ durch die anti-angiogenetische Vorbehandlung nicht zu einer homogenen Verteilung des Medikamentes im Tumor führte. Diese Ergebnisse scheinen im Widerspruch zum oft beobachteten positiven Effekt der anti-VEGF-Therapie auf eine Chemotherapie zu stehen. Die mögliche Bandbreite des Therapie-Ergebnisses spiegelt hierbei die Problematik bei der Wahl der richtigen Behandlung für individuelle Patienten wieder, da die Kombination beider Therapien für einen Teil der Patienten eine signifikante Verbesserung, für einen anderen Teil allerdings eine deutliche Reduktion der Lebenszeit bedeuten kann.

Da die Einbringung von Medikamenten in den Tumor aber nicht nur ein zweischrittiger Prozess aus Aufnahme des Stoffes in den Körper und Verteilung über das Gefäßsystem ist, sondern einen Prozess mit weiteren Schritten darstellt, ist es notwendig auch andere Schritte wie den Austritt aus den Gefäßen, also den transendothelialen Transport, und die Diffusion im Zielgewebe genauer zu untersuchen, um die Einbringung von Medikamenten verbessern zu können. Nach der Verteilung über das Gefäßsystem ist der Austritt der Medikamente aus diesem in das Zielgewebe sowie die dortige Verteilung von Bedeutung. Letzterer Schritt ist hauptsächlich von den Diffusionseigenschaften des Gewebes abhängig. Diese Eigenschaften werden vor allem durch die extrazelluläre Matrix, in welche die Zellen eingebettet sind, bestimmt.

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit waren die Beobachtungen der Medikamentenverteilung im MT6-Sarkom-Modell. Das Modell zeigte nach einer anti-angiogenetischen Vorbehandlung die bekannten Effekte der „Gefäßnormalisierung“. So konnte eine geringere Gefäßdichte, allerdings mit einem höheren Reifegrad der verbleibenden Gefäße und einem höheren Bedeckungsgrad mit stabilisierenden Perizyten beobachtet werden. Die Einbringung von Medikamenten in den Tumor war dabei jedoch nicht - wie etwa im Vergleichsmodell 4T1 - erhöht, sondern sogar verringert.

In dieser Arbeit konnte erstmals ein möglicher Hinweis auf die Gründe für den unterschiedlichen Therapieerfolg gefunden werden. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass nach einer anti-angiogenetischen Vorbehandlung die Eigenschaften der extrazellulären Matrix maßgeblich für die resultierenden Konsequenzen in der Effizienz der Behandlung sind. Dabei konnte der starke Zusammenhang zwischen der Gefäßqualität, der Gefäßquantität sowie den Eigenschaften der extrazellulären Matrix auf den Medikamententransport in den Tumor gezeigt werden. Diese Ergebnisse liefern einen Hinweis darauf, dass die anti-angiogenetische Therapie als adjuvante Maßnahme in einem Teil der Patienten keinen beziehungsweise einen negativen Einfluss auf den Transport von subsequently verabreichten Therapeutika haben könnte.

Es wurde gezeigt, dass die Quervernetzung von Matrixproteinen und die daraus resultierende Versteifung der extrazellulären Matrix durch die Proteinfamilie der Lysyloxidasen dabei die Verteilung von Medikamenten im Tumor behindern und so die Effizienz einer Chemotherapie erniedrigt. Dabei kann die Versteifung der extrazellulären Matrix durch Quervernetzung auch den positiven Effekt der „Gefäßnormalisierung“ durch eine anti-angiogenetische Therapie auf die Medikamenteneinbringung ins Gegenteil verkehren und die Menge an Therapeutikum, die die Tumorzellen erreicht, weiter herabsetzen.

Das in dieser Arbeit verwendete MT6-Sarkom-Modell eignete sich besonders zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen den drei für die Medikamenteneinbringung in soliden Tumoren verantwortlichen Faktoren Gefäßqualität, Gefäßquantität und den Eigenschaften der extrazellulären Matrix, da es auf eine anti-angiogenetische Therapie nicht mit einer Wachstumsreduktion reagierte. Diese Unempfindlichkeit des MT6-Tumor-Modells auf eine anti-VEGF-Behandlung erlaubte eine genauere Untersuchung sekundärer Effekte einer anti-angiogenetischer Therapie wie den Einfluss auf den Transport von Medikamenten und insbesondere auf deren Effizienz.

Sowohl im verwendeten MT6-Sarkom-Modell als auch bei Patienten ist die Frage nach der optimalen Dosierung des anti-angiogenetischen Wirkstoffes zu stellen. Denn wie bei allen Wachstumsfaktoren gilt auch für VEGF das *French flag model*, also die Annahme, dass ein gewisser Schwellenwert erreicht und ein weiterer nicht überschritten werden darf, um eine bestimmte Morphologie zu erreichen (Wolpert, 1969). So wäre es denkbar, dass aufgrund der putativ schlechteren Perfusion von MT6-Sarkomen *per se* ein effektiver Schwellenwert des Antikörpers nicht erreicht wird. Ein Grund weswegen mit einer Verdopplung der Dosis des VEGF-Antikörpers getestet wurde, ob so das Wachstum der Tumore, zumindest vorübergehend, vermindert werden könnte. Dies geschah vor allem auf der Grundlage, dass die meisten murinen Tumor-Modelle auf eine anti-angiogenetische Therapie

mit einer deutlichen Reduktion des Wachstums reagieren (Gerber und Ferrara, 2005). Doch auch die Verdopplung der Dosis führte nicht zu einer Inhibition des Tumorwachstums.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen in Patienten, war in diesen Experimenten jedoch die Möglichkeit gegeben die Tumore genauer zu untersuchen und dort das Gefäßbild nach anti-VEGF-Therapie zu charakterisieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem VEGF-Antikörper in der Tat einen Effekt auf die Vaskulatur hatte, wenn sie auch nicht das Tumorwachstum inhibierte. Beobachtet werden konnten die exakt von verschiedenen Gruppen beschriebenen „Normalisierungseffekte“ wie Abnahme der Gefäßdichte und Reifung der verbleibenden Gefäße (Yuan *et al.*, 1996; Hansen-Algenstaedt *et al.*, 2000; Jain, 2003; Vakoc *et al.*, 2009). Nachdem offensichtlich war, dass man zwar eine „Normalisierung“ erreichte, aber dennoch die Effizienz einer zusätzlich applizierten Chemotherapie nicht gesteigert werden konnte, wurde ein zweites Modell, in dem dieser erwartete Effekt beobachtbar war, hinzugezogen. In diesem zweiten Modell, dem 4T1-Modell für metastasierenden Brustkrebs, konnte bereits durch die Gabe des VEGF-Antikörpers das Tumorwachstum inhibiert werden. Auch das Chemotherapeutikum alleine war dazu in der Lage. Aber die Kombination aus beiden senkte in diesem Modell das Wachstum nahezu auf Null. Nach der anti-angiogenetischen Behandlung wurde das Chemotherapeutikum homogener im Tumor verteilt. Dies entsprach dem erwarteten Effekt einer anti-angiogenetischer Therapie auf die Effizienz einer subsequenten Chemotherapie und war im Einklang mit der „Normalisierungs“-Hypothese von Jain. Da das Gefäßbild der beiden untersuchten Tumor-Modelle sich vor und nach Behandlung mit dem VEGF-Antikörper sehr ähnlich war und weder signifikante Unterschiede in der Gefäßdichte als auch in sonstigen Parametern zu finden waren, wurde schnell der Blick auf den nächsten Schritt des Medikamententransportes gelegt: die Diffusion aus den Gefäßen ins Gewebe.

Hier waren deutliche Unterschiede zwischen den beiden Modellen auszumachen. Während bereits vor der Inhibition des VEGF-Signalweges im 4T1-Modell moderate Mengen des Chemotherapeutikums in das Tumorgewebe aus den Blutgefäßen diffundierten und diese Diffusion durch die Reifung der Blutgefäße während der „Normalisierung“ noch gesteigert werden konnte, war die Diffusion im MT6-Modell von Beginn an erschwert und konnte lediglich marginal durch eine „Normalisierung“ verbessert werden. Da präsumtiv der interzelluläre Transport von Medikamenten im Tumor eine größere Rolle spielt als der intrazelluläre Transport (Jain, 1988b), war eine genauere Betrachtung der extrazellulären Matrix naheliegend. Vor allem da bereits gezeigt worden war, dass der Transport von Medikamenten in desmoplastischen Tumoren durch die Abundanz an Matrixproteinen behindert wird (Hidalgo und Von Hoff, 2012; Feig *et al.*, 2012). Dies führte zur Untersuchung ob

MT6-Tumoren einen signifikant größeren Anteil an Extrazellulärmatrix beinhalten als Tumoren des 4T1-Vergleichsmodells.

Im ersten Extraktionsversuch, der auf der Resuspension des zellfreien Tumormaterials in einem Harnstoffpuffer basierte, konnte dies nicht gezeigt werden. Aus den Beobachtungen während der Extraktion konnte allerdings darauf geschlossen werden, dass das verwendete Protokoll zur Extraktion von Proteinen der extrazellulären Matrix für die hier gewünschte Bestimmung der Gesamtmenge an Matrix nicht geeignet war. Begründet war dies mit der Beobachtung, dass MT6-Tumore einen sehr hohen Anteil an nicht in Harnstoffpuffer löslichen Materials besaßen, welches in diesem Protokoll verworfen wurde. Eine Modifikation der Extraktion, nämlich die Resuspendierung des gesamten unlöslichen Materials nach der Hochsalzextraktion der Zellbestandteile, zeigte einen größeren Anteil an extrazellulärer Matrix in den MT6-Tumoren. Die unterschiedliche Löslichkeit der Matrix-Bestandteile der beiden Tumor-Modelle gab einen ersten Hinweis auf qualitative Unterschiede dieser beiden Tumormatrices. Dieser qualitative Unterschied dürfte entscheidend für die Behinderung der Diffusion sein. Gezeigt werden konnte dies vor allem in den Permeabilitäts-Assays der kompletten extrazellulären Matrix. Hier verhinderte vor allem der nicht in Harnstoffpuffer lösliche Anteil der MT6-Matrix die Diffusion durch eine damit beschichtete Membran.

Bei der Suche nach Gründen für die Unlöslichkeit von Matrixbestandteilen in einem Harnstoffpuffer und nach den Ergebnissen der mRNA-Expressions-Analyse standen die Mitglieder der Lysyloxidase-Familie im Fokus dieser Arbeit, da sie sich maßgeblich für die Quervernetzung von Matrixproteinen zeichnen. So ist schon seit einiger Zeit bekannt, dass quervernetzte Kollagene ohne enzymatische Spaltung faktisch unlöslich sind (Nishihara, 1970). Dem entsprechend ist der hohe Anteil harnstoffunlöslicher Bestandteile, und deren Beitrag zur EZM-Permeabilität, ein erster Hinweis auf eine mögliche Rolle der Lysyloxidasen in der Gewebeverteilung von Wirkstoffen.

Die laut mRNA-Expressions-Analyse hoch regulierten LOX-Mitglieder in den MT6-Zellen waren logische Kandidaten für die Ursache der Diffusions-Inhibition. Mittels Aktivitäts-Assays konnte nachgewiesen werden, dass Lysyloxidasen im MT6-Modell stärker aktiv waren als im 4T1-Modell. Diese erhöhte Aktivität war allerdings keine Besonderheit der MT6-Zelllinie, sondern eine Vielzahl an Tumorzelllinien zeigten, in weiteren Untersuchungen, eine ähnlich starke und sogar stärkere Aktivität. Dies traf auch auf humane Zelllinien zu. Um die Rolle der Lysyloxidasen auf den Medikamententransport näher zu untersuchen, wurde nach Methoden zur Inhibition dieser Enzymfamilie gesucht. Mit β APN konnte ein Inhibitor für die gesamte Lysyloxidase-Familie gefunden werden (Siegel *et al.*, 1970). Die Rolle der Lysyloxidasen in der Erkrankung Krebs ist dabei extrem paradox. So wird es

zum einen in verschiedenen Studien als Tumorsuppressor (Tan *et al.*, 1996; Kaneda *et al.*, 2004; Min *et al.*, 2007) und zum anderen als Metastasierungspromotor beschrieben (Kirschmann *et al.*, 2002; Lapointe *et al.*, 2004; Erler und Giaccia, 2006). Daneben gibt es aber auch Berichte über eine verstärkte Tumorprogression bei erhöhten Lysyloxidase-Leveln (Akiri *et al.*, 2003; Levental *et al.*, 2009; Baker *et al.*, 2011).

Diese augenscheinlich paradoxe Rolle scheint dabei der Tatsache geschuldet, dass Lysyloxidasen nicht nur für die extrazelluläre Quervernetzung von Matrixproteinen verantwortlich sind, sondern auch intrazelluläre Aufgaben wie die Expressionsregulation beeinflussen. Dies kann beispielsweise durch eine Modifikation der Histone H1 und H2, die eine Sequenzhomologie zum Lysyloxidase-Substrat Tropoelastin aufweisen, geschehen (Giampuzzi *et al.*, 2003). Durch die Desaminierung von Lysin in Histonen kann dabei die Expression verschiedener Gene sowohl negativ als auch positiv reguliert werden (Oleggini und Di Donato, 2011). So werden durch LOX-Aktivität die Expression von Kollagen III α I, Twist1 und Elastin erhöht (Giampuzzi *et al.*, 2000; Oleggini *et al.*, 2007; El-Haibi *et al.*, 2012), während die Expression von Cyclin D1 vermindert wird (Schietke *et al.*, 2010). Zuvor war bereits gezeigt worden, dass eine onkogene Transformation meist mit einer verstärkten Transkription und somit auch mit einer verstärkten Phosphorylierung von Histonen einhergeht (Chadee *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1995). Im Zuge einer solchen onkogenen Transformation von Zellen wird auch Lysyloxidase von den Zellen herunterreguliert und so zeigt eine Reihe von Karzinomen eine verminderte Expression von LOX (Hämäläinen *et al.*, 1995; He *et al.*, 2002; Bouez *et al.*, 2006). Dies bestärkt die Rolle von LOX als Tumorsuppressor. Eine ähnliche Rolle konnte auch für LOXL2 gezeigt werden, welches dabei vor allem Histon H3 modifiziert (Rost *et al.*, 2002). Während jedoch LOX aufgrund seiner intrazellulären Aufgaben in Karzinomen herabreguliert zu sein scheint, könnten für die extrazelluläre Quervernetzung andere Mitglieder der Proteinfamilie hochreguliert werden. Eine weitere wichtige Rolle spielt auch das abgespaltene Propeptid, welches sowohl NF- κ B- (Palamakumbura *et al.*, 2004) als auch den ERK-Signalweg inhibiert (Sato *et al.*, 2011) und die *ras*-Transformation von Zellen umkehren kann (Min *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2011). Diese Transformation wird durch eine konstitutiv aktive Form des *ras*-Proteins ausgelöst, welches durch die Aktivierung einer nachfolgenden Signalkaskade permanent proliferationsfördernde Signale in der Zelle bewirkt (Malumbres und Barbacid, 2003). Die Umkehr dieser Transformation hat dabei einen stark inhibierenden Effekt auf das Wachstum der Tumorzellen.

Zusammengenommen scheint die genaue Auswirkung einer Über- bzw. Unterexpression der Lysyloxidasen in gewissem Maße kontextabhängig zu sein. Die fünf Familienmitglieder der Lysyloxidasen

zeigen zwar eine starke Homologie zueinander auf, scheinen aber, zumindest was ihre intrazellulären Signalwirkungen und Einflüsse betrifft, eine unterschiedliche Substratspezifität zu besitzen.

Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse stützen dabei die These, dass eine Überexpression von Lysyloxidasen allgemein und vor allem ihre extrazelluläre Wirkung, nämlich die Vernetzung der EZM, zu einer verstärkten Metastasierung führt und die Inhibition zumindest die Zahl an Makrometastasen vermindert. Die Auswirkungen auf das Wachstum des Primärtumors zeigte eine größere Bandbreite. Das Wachstum des Primärtumors und auch die Zahl an Makrometastasen war in den durchgeführten Experimenten in einer Zelllinie, dem 4T1-Modell, durch die Lysyloxidase-Inhibition vermindert.

Da diese Zelllinie eine sehr geringe Lysyloxidase-Aktivität aufzeigte, könnte hier durch die Inhibition die für ein Wachstum nötige „Mindestmenge“ an Lysyloxidasen abgefangen worden sein. Alternativ könnte die starke Invasivität dieser Zelllinie Lysyloxidasen-abhängig sein. Durch deren Inhibition könnte die Invasion ins umliegende Gewebe behindert worden sein. So konnte von Baker *et al.* (2013) gezeigt werden, dass eine Versteifung der Extrazellulärmatrix des Tumors zu einer Aktivierung des FAK/SRC-Signalweges führt. Die Aktivierung dieses Signalweges führt zu einem invasiveren und proliferativeren Phänotyp. Die verminderte Proliferation könnte dabei das geringere Wachstum des Primärtumors erklären.

Die erhöhte Invasivität kann auf die erhöhte Zellmotilität zurückgeführt werden, welche aus dem aktivierten FAK/SRC-Signalweg resultiert (Gilmore und Romer, 1996). Die Zellmotilität kann dabei ein sehr starker Hinweis auf das Metastasierungspotential einer Tumorzelle sein (Partin *et al.*, 1989). Das Deaktivieren des FAK/SRC-Signalweges durch Inhibition der Versteifung der EZM durch Lysyloxidasen könnte also zu einem weniger proliferativen und invasivem Tumor führen.

Im Gegensatz dazu konnte im LLC-Modell, einem Lungenkarzinom-Modell, eine Wachstumssteigerung nach der Inhibition der Lysyloxidasen beobachtet werden. Laut Literatur besitzen Adenokarzinome der Lunge erhöhte Level an LOX bzw. LOXL (Borcuk *et al.*, 2005; Tsuchiya *et al.*, 2005). Dass die Expression von Lysyloxidasen das Wachstum der Tumore bremsen kann, konnten Akiri *et al.* (2003) zeigen. Hier wurden sowohl unveränderte MCF7-Zellen, eine humane Adenokarzinomlinie der Brust, als auch MCF7-Zellen, die LOX überexprimierten, in Mäuse implantiert. Dabei zeigten die überexprimierenden Zellen ein schwächeres Wachstum bei stärkerer Metastasierungsneigung als die Kontroll-Zellen.

LLC-Zellen wachsen zu sehr invasiven Tumoren aus, die auch eine hohe Metastasierungsrate be-

sitzen. Die Inhibition von LOX könnte die LLC-Tumore dahingehend transformiert haben, dass sie ein stärkeres Wachstum bei geringer Metastasierungsrate zeigen. Die verminderte Metastasierung konnte dabei zumindest im 4T1-Modell beobachtet werden. Für das LLC-Modell wurden allerdings keine Untersuchungen diesbezüglich angestellt, so dass hierüber nur spekuliert werden kann und zur Klärung dieses Sachverhaltes weitere Untersuchungen nötig wären.

Denkbar wäre auch ein weiterer Mechanismus. Peyrol *et al.* konnten zeigen, dass, im Falle eines Adenokarzinoms der Brust, die stärkste Expression von Lysyloxidasen in den Myofibroblasten und Myoepithelzellen des umliegenden Gewebes detektierbar ist (Peyrol *et al.*, 1997). Ihre Schlussfolgerung daraus war, dass dies eine Abwehrreaktion darstellt und die dortige Versteifung der Matrix den Tumor einkapselt. Vielleicht ist also die Aktivität der Lysyloxidasen im LLC-Modell vor allem in der Peripherie des Tumors zu finden und wirkt so inhibierend auf das Wachstum. Bei Inhibition der LOX-Familie entfällt diese Versteifung der Tumor-Gewebe-Grenze und der Tumor kann besser in das umliegende Gewebe invadieren. Diese Theorie steht aber im Widerspruch zu den Beobachtungen von Erler und Giaccia (2006) und auch Anderen, die gezeigt haben, dass eine Versteifung der Matrix zu einer erhöhten Zellmotilität und so Invasivität führt. Einer Erklärung für diesen Widerspruch würde vielleicht eine histologische Untersuchung der Gewebeverteilung von Lysyloxidasen liefern. Denkbar wäre, dass für eine erhöhte Zellmotilität der Tumorzellen Lysyloxidasen im Tumorgewebe selbst aktiv sein müssen, während für eine Einkapselung eine erhöhte Aktivität im Gewebe um den Tumor denkbar wäre.

Während das Wachstum der Tumor-Modelle unterschiedlich auf die Inhibition der Lysyloxidasen reagierte, konnte in allen Modellen eine verbesserte Gewebepenetration aus den Blutgefäßen ins Tumorgewebe beobachtet werden. Dies zeigt die wichtige Rolle, die die Quervernetzung von Matrixproteinen bei diesem Prozess spielt und welche Möglichkeit eine Inhibition der LOX-Familie bietet. Bei der Medikamenteneinbringung in Tumoren spielen vor allem drei Faktoren eine Rolle: die Gefäßqualität, die Gefäßdichte und die Eigenschaften der extrazellulären Matrix. Bei geringer Versteifung der extrazellulären Matrix überwiegt im Falle einer anti-angiogenetisch vermittelten „Normalisierung“ der positive Effekt der verbesserten Gefäßqualität die Abnahme der Gefäßdichte. So finden sich zwar weniger Blutgefäße im Tumor, da sich diese aber in einem funktionellerem und reiferen Zustand befinden und somit präsumtiv besser perfundiert sind, kann mehr Medikament aus ihnen in den Tumor diffundieren. Dies konnte im 4T1-Tumor-Modell gezeigt werden. In Tumoren mit dichter extrazellulärer Matrix überwiegt dagegen der Effekt der abnehmenden Gefäßdichte den positiven Einfluss der Verbesserung der Gefäßqualität. Die verbleibenden Blutgefäße sind zwar

ebenfalls in einem reiferen Zustand, können aber aufgrund der schlecht diffusiblen Umgebung weniger Medikament in den Tumor einbringen als die vorherige höhere Zahl an unreifen Gefäßen. Dieser Sachverhalt konnte im MT6-Modell beobachtet werden. Eine graphische Darstellung dieses Zusammenhangs ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

Im MT6-Modell war also die vorherige „Gefäßnormalisierung“ ein Störfaktor für die subsequente Chemotherapie, da weniger Medikament das Tumorgewebe erreichen konnte. Im Gegensatz dazu stand das 4T1-Tumor-Modell. Hier hatte die Vorbehandlung mit einem VEGF-Antikörper die vorhergesagten positiven Effekte der „Normalisierung“ zur Folge: mehr Medikament im Tumor, bessere Verteilung des Therapeutikums und so eine höhere Effizienz der Therapie.

Die hier vorliegenden Ergebnisse bieten erstmals einen Erklärungsansatz für die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse nach einer anti-angiogenetischen Vorbehandlung auf die Perfusion und die damit vermutlich in Korrelation stehende Medikamenteneinbringung in soliden Tumoren. Dabei konnte gezeigt werden, dass es stark kontextabhängig ist, ob eine anti-angiogenetische Therapie die Medikamentenversorgung des Tumors steigert oder gar erniedrigt. Hier kann eine zu dichte Matrix, den eigentlich förderlichen Effekt der „Gefäßnormalisierung“ nicht nur zunichte machen, sondern sogar ins Negative verkehren. Denn es konnten zwar die Effekte einer „Normalisierung“ im MT6-Modell, wie eine Abnahme der Gefäßdichte bei gleichzeitiger Reifung der verbleibenden beobachtet werden, jedoch wurde dies durch die schlechte Permeabilität der extrazellulären Matrix mehr als ausgeglichen.

Im MT6-Modell konnte der negative Effekt der dichten Matrix durch Inhibition der Lysyloxidasen aufgehoben werden und so nahezu wieder dieselbe therapeutische Effizienz der Medikation hergestellt werden, die im Vergleichsmodell 4T1 erzielt worden war.

Das unterschiedliche Reagieren auf dasselbe Therapieschema zeigt die Notwendigkeit der vorherigen Abklärung ob ein Tumor für diese Art der Therapie geeignet ist. Es wäre also wichtig Kriterien für Patientenbehandlungen zu finden, die im Vorfeld den Erfolg einer anti-angiogenetisch induzierten „Normalisierungs“-Behandlung abklären. Patienten mit dichter extrazellulärer Matrix könnten nachteilig auf eine Kombinations-Therapie aus einem anti-angiogenetischen Medikament und einem Antitumorwirkstoff reagieren. Patienten mit einer vergleichsweise lockeren Extrazellulärmatrix dagegen von diesem Behandlungsschema profitieren.

Ein möglicher Marker hierfür könnte die Aktivität der Lysyloxidasen im Tumorgewebe sein. Sind diese in einem Tumor sehr aktiv, so ist eine adjuvante anti-angiogenetische Therapie eher nachteilig für den intratumoralen Transport von parallel verabreichten Therapeutika. Da allerdings in

nahezu allen untersuchten Modellen eine Verbesserung der Medikamenteneinbringung durch die Inhibition der LOX-Familie erzielt werden konnten, unabhängig von der Dichte der Matrix, wäre ein klinisch verfügbarer LOX-Inhibitor vielleicht ein gutes kombinatorisches Element zur Verbesserung aller bereits bestehender Therapien.

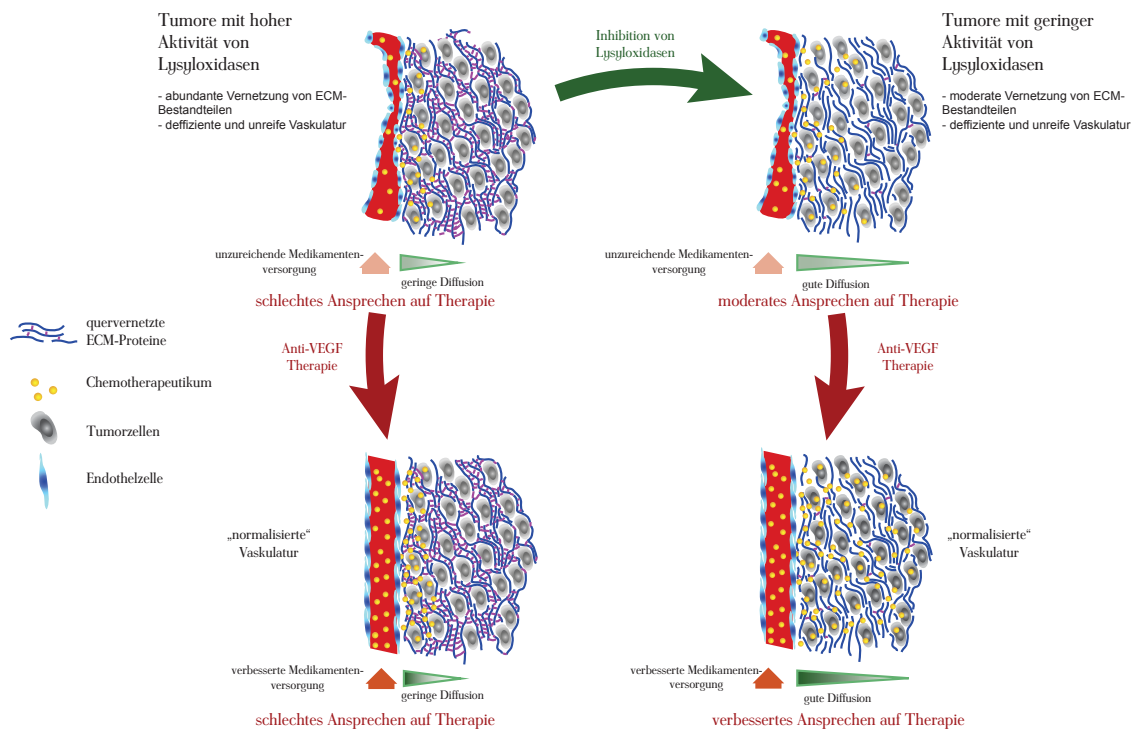


Abbildung 4.1: Schematisches Modell des Zusammenhangs zwischen „Gefäßnormalisierung“ und Permeabilität der EZM. Durch eine anti-angiogenetische Therapie wird die Reifung der Vaskulatur ausgelöst. Diese resultiert in einer verbesserten Perfusion der Gefäße und so einem erhöhten Transport von Sauerstoff und Medikamenten in diesen. In Tumoren mit hoher Aktivität der Lysyloxidasen ist die Permeabilität der Matrix extrem niedrig. Trotz der erhöhten Medikamentenmenge durch den verbesserten Blutstrom, wird nur ein geringes Volumen an Tumormasse in einer pharmakologisch wirksamen Dosis erreicht. Durch eine Inhibition der quervernetzenden Lysyloxidasen wird die Diffusion durch die Matrix verbessert und so die erhöhte Einbringung von Medikamenten nach einer anti-angiogenetisch induzierten „Gefäßnormalisierung“ wiederhergestellt.

Das Zusammenspiel aus Matrix-Synthese und -Abbau sowie die Interaktion der Tumorzellen mit dieser Matrix ist ein entscheidender Faktor in der Progression der Erkrankung (Boudreau und Bissell, 1998). Und so ist denkbar, dass in anderen Tumor-Modellen, beziehungsweise in Patienten, andere Faktoren als Lysyloxidasen die Permeabilität der Matrix verändern. Das Labor von Richard O. Hynes hat dabei im Rahmen des Matrisome Projects 238 Proteine im Menschen identifiziert,

welche die Extrazellulärmatrix regulieren (Naba *et al.*, 2012). Diese Fülle an Proteinen, die in der Lage sind die Quantität und/oder Qualität der extrazellulären Matrix zu verändern, können auch in Tumoren fehlreguliert sein. So wäre eine Unterexpression von EZM-spaltenden Proteinen, wie Matrix-Metalloproteasen, genauso in der Lage zu einer dichten Matrix zu führen wie die Überexpression von quervernetzenden Lysyloxidasen. Durch Untersuchungen der Expression dieser regulatorischen Proteine in Tumoren könnten vielleicht weitere Ziele identifiziert werden, deren Inhibition eine Verbesserung der Medikamenteneinbringung zur Folge hätte.

Ramajujan *et al.* aus der Gruppe von Rakesh K. Jain konnte zeigen, dass Kollagen I die Diffusion von Molekülen stark behindern kann (Ramanujan *et al.*, 2002). Bisher konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Kollagen I, beispielsweise durch Halofuginone, die Progression des Tumorwachstums und auch die Angiogenese hemmt (Abramovitch *et al.*, 1999; Elkin *et al.*, 1999; Abramovitch *et al.*, 2004). Bis dato wurde Halofuginone dabei zwar in einer Phase I-Arzneimittelstudie auf seine Pharmakokinetik und Verträglichkeit in Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren getestet, aber keinerlei Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Inhibition von Kollagen auf den Medikamententransport durchgeführt (de Jonge *et al.*, 2006). In diesem Zusammenhang lässt sich nur eine Studie finden, in welcher gezeigt wurde, dass die gleichzeitige intratumorale Injektion von bakterieller Kollagenase und einem onkolytischen Virus dessen Verteilung positiv beeinflusste (McKee *et al.*, 2006). Die Arbeit von Brown *et al.* (2003) konnte zeigen, dass die Gabe von Relaxin, einem Hormon das vor allem während der Schwangerschaft der Frau zur Entspannung des Uterus gebildet wird und zur Hochregulation von Matrix-degradierenden Enzymen wie Matrix-Metalloproteasen führt (Unemori und Amento, 1990), den Transport durch Diffusion im Tumor verbessert. Andere Gruppen konnten zeigen, dass die enzymatische Entfernung von Hyaluronan, einem Glykosaminoglykan der extrazellulären Matrix, zu einer Reduktion des intratumoralen Druckes führt, dadurch subsequent zu einer verbesserten Perfusion der Blutgefäße und einer Verbesserung der Effizienz von Therapeutika (Provenzano und Hingorani, 2013; Jacobetz *et al.*, 2013).

Sicherlich spielen nicht nur der Kollagen-Gehalt, Hyaluronan oder Matrix-Metalloproteasen eine Rolle wenn die Diffusion von Molekülen durch die extrazelluläre Matrix betrachtet werden soll. Weitere Untersuchungen der extrazellulären Matrix von Tumoren sollten weitere therapeutische Ziele, vielleicht auch im Zusammenhang mit Matrix-vermittelten Resistenzmechanismen, zutage fördern. Eine adjuvante Therapie zur Verbesserung der Diffusion von Medikamenten in Tumoren könnte einen entscheidenden Schritt in der Krebsbehandlung auf dem Weg zum kurativen Therapieziel darstellen.

Kapitel 5

Zusammenfassung / Summary

Bei der Behandlung solider Tumoren spielen systemisch verabreichte Chemotherapeutika eine wichtige Rolle. Allerdings akkumulieren diese Therapeutika besser in normalem Gewebe als in Tumoren. Als Ursache für diesen unzureichenden Transport von Medikamenten in den Tumor wurde bisher vor allem die dysfunktionale Tumolvaskulatur diskutiert. Diese befindet sich in einem chaotischen und unreifen Zustand ohne ausreichende Bedeckung der Gefäße mit stabilisierenden Perizyten. Aus dem Zustand der Vaskulatur resultierend erreichen Medikamente den Tumor nur in geringem Ausmaß und werden dort heterogen verteilt. Als Grund für den Zustand der Vaskulatur wurde ein großer Überschuss an pro-angiogenetischen Faktoren im Tumor ausgemacht. Durch eine anti-angiogenetische Behandlung konnte in präklinischen Modellen für einen gewissen Zeitraum die Tumolvaskulatur „normalisiert“ werden. Dies zeichnete sich vor allem durch Veränderung von zwei wichtigen Parametern für die Medikamenteneinbringung aus: zum Einen kommt es zu einer Reduktion der Gefäßdichte. Zum Anderen zu einer Reifung der Blutgefäße. In einem Teil von Patienten scheint dabei der Effekt der Gefäßverbesserung zu überwiegen und es kann eine verbesserte Perfusion detektiert werden. Mutmaßlich führt dies auch zu einer verbesserten Einbringung von Therapeutika in den Tumor und so zu einer erhöhten Effizienz der Therapie. In einem weiteren Teil der Patienten scheint jedoch der Effekt der Gefäßreduktion zu überwiegen und die detektierte Perfusion im Tumor wird durch die Behandlung verringert.

Das in dieser Arbeit verwendete MT6-Fibrosarkom-Modell reagierte auf eine anti-angiogenetische Therapie nicht mit einer sonst in murinen Modellen beobachteten Wachstumsreduktion. Diese ermöglichte eine so bisher nicht mögliche Untersuchung der sekundären Effekte einer anti-angiogenetischen Therapie wie die Medikamenteneinbringung in den Tumor. Die Vaskulatur in MT6-Tumoren zeigte dabei nach einer anti-angiogenetischen Vorbehandlung, die erwarteten Merk-

male einer „normalisierten“ Vaskulatur wie eine Reduktion der Gefäßdichte bei gleichzeitiger Reifung der verbleibenden Gefäße. Dies führte jedoch nicht zu einer verbesserten Effizienz einer subsequenten Chemotherapie. Durch Vergleich mit einem weiteren Tumor-Modell, dem 4T1-Modell für ein metastasierendes Mammakarzinom, konnten signifikante Unterschiede im Gefäßbild beider Modelle ausgeschlossen werden. Durch mikroskopische Methoden konnte dabei beobachtet werden, dass die Diffusion von Medikamenten aus den Blutgefäßen des MT6-Modells im Vergleich zum 4T1-Modell verringert war. Weitere Untersuchungen deuten auf eine Differenz in der Qualität der extrazellulären Matrix der verwendeten Tumor-Modelle. Durch mRNA-Expressionsanalysen konnte die Enzymfamilie der Lysyloxidasen als mögliche Ursache für diesen Diffusionsunterschied identifiziert werden. Lysyloxidasen katalysieren vor allem die Quervernetzung von Proteinen der Extrazellulärmatrix. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Quervernetzung von Matrixproteinen durch Lysyloxidasen ursächlich für die Diffusions-Inhibition kleiner Moleküle wie das Chemotherapeutikum Doxorubicin sein kann. Durch spezifische Inhibition der Lysyloxidasen mittels des Inhibitors β APN konnte diese Diffusions-Inhibition sowohl *in vitro* als auch im MT6-Tumor-Modell nahezu vollständig verhindert werden. Die hohe Aktivität von Lysyloxidasen im MT6-Modell stellte allerdings kein Alleinstellungsmerkmal dieses Modells dar. In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Lysyloxidasen in einer Vielzahl von murinen und humanen Tumorzelllinien überexprimiert wird. Die Inhibition von Lysyloxidasen durch β APN konnte dabei in allen untersuchten Modellen die Einbringung von Medikamenten in den Tumor erhöhen und könnte so eine sinnvolle adjuvante Maßnahme zur Verbesserung bestehender Chemotherapien darstellen.

Summary

Systemically administered chemotherapeutics play a major role in the treatment of solid tumors. However, these chemotherapeutics accumulate better in healthy tissue than in tumors. The reason for this insufficient transport of drugs into the tumor could be the dysfunctional tumor vasculature, which is in a chaotic and immature state without an adequate vessel coverage by stabilizing pericytes. As a result of this vasculature, only small amounts of drugs reach the tumor and are further just heterogeneously distribu-

ted. A great abundance of pro-angiogenic factors in the tumor was believed to cause this insufficient vasculature. In pre-clinical models, „normalization“ of the tumor vasculature could be achieved with anti-angiogenic therapy for a certain period of time. This was characterized by changes in two important parameters for drug administration: on the one hand reduction of vessel density, on the other hand maturation of blood vessels. In one part of patients, the effect of vessel normalization seems to be predominant leading to improved perfusion. Presumably, this leads to improved administration of chemotherapeutics into the tumor and therefore to a more efficient therapy. In another part of patients, the effect of vessel reduction seems to be predominant and the detectable perfusion in the tumor is decreased. The MT6 fibrosarcoma model, which was used in this work, did not respond to the anti-angiogenic therapy with an inhibition of tumor growth as usually observed in murine models. This observation enabled a so far not possible investigation of the secondary effects of an anti-angiogenic therapy, such as drug transport into the tumor. After the anti-angiogenic pre-treatment, the vasculature of MT6 tumors indicated the expected characteristics of a „normalized“ vasculature, such as reduction of vessel density and simultaneous maturation of remaining vessels. However, this did not lead to improved efficacy of subsequently administered chemotherapy. Comparison with another tumor model, the 4T1 model for metastasizing mamma carcinoma, did not reveal significant differences in the vessel pattern. Observation with microscopic methods indicated a reduced diffusion of drugs from the blood vessels of the MT6 model compared to those of the 4T1 model. Further investigations showed differences in the quality of the extracellular matrix of both used tumor models. mRNA expression analyses revealed the family of lysyl oxidases as a putative cause for the differences in diffusion. Lysyloxidases catalyze primarily the cross-linking of proteins of the extracellular matrix. Moreover, it was shown that the cross-linking of matrix proteins by lysyl oxidases is causative for the inhibition of diffusion of small molecules such as the chemotherapeutic doxorubicin. A specific inhibition of lysyl oxidases with the inhibitor β APN could almost entirely prevent the inhibition of diffusion *in vitro* and in the MT6 model. However, the high activity of lysyl oxidases in the MT6 model is not a unique feature of this model. Further investigations showed,

that lysyl oxidases are over expressed in many human and murine tumor cell lines. In all investigated models, inhibition of lysyl oxidases with β APN improved drug transport into the tumor and β APN could therefore be a reasonable adjuvant therapy to improve the efficacy of already existing chemotherapeutics.

Kapitel 6

Anhang

Die Primer die während dieser Arbeit verwendet wurden sind in Tabelle A.1 aufgelistet.

Tabelle A.1: Übersicht über verwendete Primer. Sequenzen sind in 5' - 3'-Richtung angegeben.

Gen	Fragmentgrößeforward primer	reverse primer
mFn1	132 AGGTGACACTATAGAATATG GTACGACTCACTATAGGGAA	TGCACGTGCCTGGGCAAT CGGGAGGACACAGGGCTCC
mLama5	135 AGGTGACACTATAGAATAGG GTACGACTCACTATAGGGAG	TCACACTTATCAGCCGTGGCA TCGTCCTGCGTGATGCGCT
mCol3a1	126 AGGTGACACTATAGAATAAGA GTACGACTCACTATAGGGAAAG	GGCTTTGATGGACGCAA CTCCGTTGTCTCCTGGAA
mLamc1	142 AGGTGACACTATAGAATACGC GTACGACTCACTATAGGGACA	ACTGTCCGACTGGCACT CGGGCGGCACAGTCTCAC
mCol2a1	147 AGGTGACACTATAGAATAAGA GTACGACTCACTATAGGGAGC	AGGGTCTGGCTGGCGCT TCGCCTCGTTCACCAGCA
mColl8a1	151 AGGTGACACTATAGAATACGT GTACGACTCACTATAGGGAGA	GGCGCTGGCCTCTTTGT CAGTGCACAGGGCTCACCC
mFbn1	154 AGGTGACACTATAGAATAAGG GTACGACTCACTATAGGGACC	CCCCCTGCAGTTACGGT TCGGCCCATGCCATTCC
mLamal	188 AGGTGACACTATAGAATATGG GTACGACTCACTATAGGGACG	CCTCGGTGCTCTGGGTC GCACGTGCTCCACGAGTTT
mColl3a1	146 AGGTGACACTATAGAATAGAC GTACGACTCACTATAGGGAGG	GAAGGGAGGCCTGGAGCG AACCTCTGCTCCCGGGTCG
mFbn2	172 AGGTGACACTATAGAATATCT GTACGACTCACTATAGGGAAC	CTGGATGCCTCTGGGCTGA TGGTAGTGCTGGACGTAGCC
mCol4a1	175 AGGTGACACTATAGAATAGCA GTACGACTCACTATAGGGAGG	TTGGCGGCTCTCCAGGG GCCGGGTACACCTTGGTC

Gen	Fragmentgröße	forward primer	reverse primer
mLamb1	191	AGGTGACACTATAGAATATGC GTACGACTCACTATAGGGAGC	GCCCCTGTGGATGGAGT GTTGCTGTTCCGGCCTTC
mColla1	196	AGGTGACACTATAGAATATGA GTACGACTCACTATAGGGATC	TGGCAAACCCGGCCCCC CGGGAAGGCCTCGTCTC
mCol5a1	201	AGGTGACACTATAGAATATGC GTACGACTCACTATAGGGAAG	CCACCAAGCAGCTGTACC AGGAAGACAGGGGAGCGGC
mHspg2	217	AGGTGACACTATAGAATAACG GTACGACTCACTATAGGGAAC	GCCTGGCATCGTGCAA CGGCAGGCACTCGGATCT
mB2m	242	AGGTGACACTATAGAA GTACGACTCACTATAGGGAGG	TAAGTGGCTGCTACTCGGCGCT CGGGTGGAACTGTGTTACG
mLOX1	225	AGGTGACACTATAGAATAGGC GTACGACTCACTATAGGGAAG	CACCCAGCCACATAGATCG TAGGGGTCGGGCACCAGG
mLOXL1	207	AGGTGACACTATAGAATACCG GTACGACTCACTATAGGGAG	CGTGCTGGAGCCACCT CCTGCACGTAGTTAGGGTCCG
mLOXL2	187	AGGTGACACTATAGAATATTC GTACGACTCACTATAGGGAG	TTCTGGGCAACCAGGGCG CTAGGCTCAGGGAAGGCAGC
mLOXL3	178	AGGTGACACTATAGAATATCC GTACGACTCACTATAGGGAAC	AGCCTCTGGAGTTGTGCC GGAGACCCCACTGAAGC
mLOXL4	127	AGGTGACACTATAGAATAAGG GTACGACTCACTATAGGGATG	CCCCTTAGCGTCTCTCTG GGCCACATCATGGTATTTCAG
mPDGFB	129	AGGTGACACTATAGAATACGC GTACGACTCACTATAGGGAAG	TCTTCCTTCCTCTCTGC TGGTCGCTCAGCATTTC
mVEGFB	154	AGGTGACACTATAGAATACCC GTACGACTCACTATAGGGAAG	CTGTGTCCAGTTTGAT TTCCATGCTCAGAGGCAC
mFGF2	192	AGGTGACACTATAGAATATGT GTACGACTCACTATAGGGATC	GCCAACCGGTACCTTG GTTTCAGTGCCACATACCA
mPDGFA	216	AGGTGACACTATAGAATATGG GTACGACTCACTATAGGGAAT	TACTGAATTTCCCGCC CAACTCCCGGGGTATCTC
mVEGFA	226	AGGTGACACTATAGAATAGGC GTACGACTCACTATAGGGAGT	CTCCGAAACCATGA CCACCAGGGTCTCAATCG
mCAIX	166	AGGTGACACTATAGAATAGGT GTACGACTCACTATAGGGAAT	GCACCTCAGTACTGCTT GGGACAGCACTGTTTCGT
mGlut1	186	AGGTGACACTATAGAATAATA GTACGACTCACTATAGGGATA	GTTACAGCGCGTCCGTT GCCGAAGTGCAGTGATCC
hB2M	213	AGGTGACACTATAGAATATCG GTACGACTCACTATAGGGACA	GGCCGAGATGTCTCGCT ATGTCCGATGGATGAAACCCAGA
hLOX	195	AGGTGACACTATAGAATAGGG GTACGACTCACTATAGGGATA	CGACGACCCTTACAACCC GGGGTCGGCCACCAGGTC
hLOXL1	177	AGGTGACACTATAGAATACCG GTACGACTCACTATAGGGATC	CGGTCTCCCTGACTTGG GGTGGCCTCAGGGGCATA
hLOXL2	146	AGGTGACACTATAGAATAACC GTACGACTCACTATAGGGACA	GGCCGTGGTGAGTTGTG CCGCTCTCAGTCGCACC
hLOXL3	167	AGGTGACACTATAGAATAGCC GTACGACTCACTATAGGGACC	CTTAGGGTCTGCTCGGC GTGGAAGGGGACGGAGAC
hLOXL4	135	AGGTGACACTATAGAATAAAC GTACGACTCACTATAGGGATG	TGGGGGCTCACCGAAGC GCGTCCCCGACCAGAACC

Tabelle A.2: Übersicht der zur Klonierung von hmLOX verwendeten Nukleotidsequenz.

GAATTC	EcoRI-Schnittstelle
ATG	Startcodon
CATCATCACCATCACCAC	His-Tag
TAG	Stopcodon
GCTAGC	NheI-Schnittstelle

GAATTCATGC GCTTCGCCTG GACCGTGCTC CTGCTCGGGC CTTTGCAGCT CTGCGCGCTA
 GTGCACTGCG CCCCTCCCGC CGCCGGCCAA CAGCAGCCCC CGCGCGAGCC
 GCCGGCGGCT CCGGGCGCCT GGCGCCAGCA GATCCAATGG GAGAACAACG GGCAGGTGTT
 CAGCTTGCTG AGCCTGGGCT CACAGTACCA GCCTCAGCGC CGCCGGGACC CGGGCGCCGC
 CGTCCCTGGT GCAGCCAACG CCTCCGCCCA GCAGCCCCGC ACTCCGATCC TGCTGATCCG
 CGACAACCGC ACCGCCGCGG CGCGAACGCG GACGGCCGGC TCATCTGGAG TCACCGCTGG
 CCGCCCCAGG CCCACCGCCC GTCACTGGTT CCAAGCTGGC TACTCGACAT CTAGAGCCCC
 CGAAGCTGGC GCCTCGCGCG CGGAGAACCA GACAGCGCCG GGAGAAGTTC CTGCGCTCAG
 TAACCTGCGG CCGCCCAGCC GCGTGGACGG CATGGTGGGC GACGACCCTT ACAACCCCTA
 CAAGTACTCT GACGACAACC CTTATTACAA CTACTACGAT ACTTATGAAA GGCCCAGACC
 TGGGGGCAGG TACCGGCCCG GATACGGCAC TGGCTACTTC CAGTACGGTC TCCCAGACCT
 GGTGGCCGAC CCCTACTACA TCCAGGCGTC CACGTACGTG CAGAAGATGT CCATGTACAA
 CCTGAGATGC GCGGCGGAGG AAAACTGTCT GGCCAGTACA GCATACAGGG CAGATGTCAG
 AGATTATGAT CACAGGGTGC TGCTCAGATT TCCCCAAAGA GTGAAAAACC AAGGGACATC
 AGATTTCTTA CCCAGCCGAC CAAGATATTC CTGGGAATGG CACAGTTGTC ATCAACATTA
 CCACAGTATG GATGAGTTTA GCCACTATGA CCTGCTTGAT GCCAACACCC AGAGGAGAGT
 GGCTGAAGGC CACAAAGCAA GTTTCTGTCT TGAAGACACA TCCTGTGACT ATGGCTACCA
 CAGGCGATTT GCATGTA CTG CACACACACA GGGATTGAGT CCTGGCTGTT ATGATACCTA
 TGGTGCAGAC ATAGACTGCC AGTGGATTGA TATTACAGAT GTAAAACCTG GAAACTATAT
 CCTAAAGGTC AGTGTAACCC CCAGCTACCT GGTTCTGAA TCTGACTATA CCAACAATGT
 TGTGCGCTGT GACATTCGCT ACACAGGACA TCATGCGTAT GCCTCAGGCT GCACAATTC
 ACCGTATCCC CGCAGCATCA TCACCATCAC CACTAGGCTA GC

Tabelle A.3: Übersicht der zur Klonierung von rhLOXL2 verwendeten Nukleotidsequenz.

GAATTC	EcoRI-Schnittstelle
ATG	Startcodon
CATCATCACCATCACCAC	His-Tag
TAG	Stopcodon
GCTAGC	NheI-Schnittstelle

GAATTCATGG AGAGGCCTCT GTGCTCCCAC CTCTGCAGCT GCCTGGCTAT GCTGGCCCTC
 CTGTCCCCC TGAGCCTGGC ACAGTATGAC AGCTGGCCCC ATTACCCCGA GTACTTCCAG
 CAACCGGCTC CTGAGTATCA CCAGCCCCAG GCCCCCGCCA ACGTGGCCAA GATTCAGCTG
 CGCCTGGCTG GGCAGAAGAG GAAGCACAGC GAGGGCCGGG TGGAGGTGTA CTATGATGGC
 CAGTGGGGCA CCGTGTGCGA TGACGACTTC TCCATCCACG CTGCCACGT CGTCTGCCGG
 GAGCTGGGCT ACGTGGAGGC CAAGTCCTGG ACTGCCAGCT CCTCCTACGG CAAGGGAGAA
 GGGCCCATCT GGTTAGACAA TCTCCACTGT ACTGGCAACG AGGCGACCTT TGCAGCATGC
 ACCTCCAATG GCTGGGGCGT CACTGACTGC AAGCACACGG AGGATGTCCG TGTGGTGTGC
 AGCGACAAAA GGATTCCTGG GTTCAAATTT GACAATTCGT TGATCAACCA GATAGAGAAC
 CTGAATATCC AGGTGGAGGA CATTCCGATT CGAGCCATCC TCTCAACCTA CCGCAAGCGC
 ACCCCAGTGA TGGAGGGCTA CGTGGAGGTG AAGGAGGGCA AGACCTGGAA GCAGATCTGT
 GACAAGCACT GGACGGCCAA GAATTCCCGC GTGGTCTGCG GCATGTTTGG CTTCCCTGGG
 GAGAGGACAT ACAATACCAA AGTGTACAAA ATGTTTGCCT CACGGAGGAA GCAGCGCTAC
 TGGCCATTCT CCATGGACTG CACCGGCACA GAGGCCACA TCTCCAGCTG CAAGCTGGGC
 CCCCAGGTGT CACTGGACCC CATGAAGAAT GTCACCTGCG AGAATGGGCT ACCGGCCGTG
 GTGAGTTGTG TGCCTGGGCA GGTCTTCAGC CCTGACGGAC CCTCAAGATT CCGGAAAGCG
 TACAAGCCAG AGCAACCCCT GGTGCGACTG AGAGGCGGTG CCTACATCGG GGAGGGCCGC
 GTGGAGGTGC TCAAAAATGG AGAATGGGGG ACCGTCTGCG ACGACAAGTG GGACCTGGTG
 TCGGCCAGTG TGGTCTGCAG AGAGCTGGGC TTTGGGAGTG CCAAAGAGGC AGTCACTGGC
 TCCCGACTGG GGCAAGGGAT CGGACCCATC CACCTCAACG AGATCCAGTG CACAGGCAAT
 GAGAAGTCCA TTATAGACTG CAAGTTCAAT GCCGAGTCTC AGGGCTGCAA CCACGAGGAG
 GATGCTGGTG TGAGATGCAA CACCCTGCC ATGGGCTTGC AGAAGAAGCT GCGCCTGAAC

GGCGGCCGCA ATCCCTACGA GGGCCGAGTG GAGGTGCTGG TGGAGAGAAA CGGGTCCCTT
GTGTGGGGGA TGGTGTGTGG CCAAACTGG GGCATCGTGG AGGCCATGGT GGTCTGCCGC
CAGCTGGGCC TGGGATTCGC CAGCAACGCC TTCCAGGAGA CCTGGTATTG GCACGGAGAT
GTCAACAGCA ACAAAGTGGT CATGAGTGGA GTGAAGTGCT CGGGAACGGA GCTGTCCCTG
GCGCACTGCC GCCACGACGG GGAGGACGTG GCCTGCCCCC AGGGCGGAGT GCAGTACGGG
GCCGGAGTTG CCTGCTCAGA AACCGCCCCT GACCTGGTCC TCAATGCGGA GATGGTGCAG
CAGACCACCT ACCTGGAGGA CCGGCCCATG TTCATGCTGC AGTGTGCCAT GGAGGAGAAC
TGCCTCTCGG CCTCAGCCGC GCAGACCGAC CCCACCACGG GCTACCGCCG GCTCCTGCGC
TTCTCCTCCC AGATCCACAA CAATGGCCAG TCCGACTTCC GGCCCAAGAA CGGCCGCCAC
GCGTGGATCT GGCACGACTG TCACAGGCAC TACCACAGCA TGGAGGTGTT CACCCACTAT
GACCTGCTGA ACCTCAATGG CACCAAGGTG GCAGAGGGCC ACAAGGCCAG CTTCTGCTTG
GAGGACACAG AATGTGAAGG AGACATCCAG AAGAATTACG AGTGTGCCAA CTTGCGCGAT
CAGGGCATCA CCATGGGCTG CTGGGACATG TACCGCCATG ACATCGACTG CCAGTGGGTT
GACATCACTG ACGTGCCCCC TGGAGACTAC CTGTTCCAGG TTGTTATTAA CCCCACTTC
GAGGTTGCAG AATCCGATTA CTCCAACAAC ATCATGAAAT GCAGGAGCCG CTATGACGGC
CACCGCATCT GGATGTACAA CTGCCACATA GGTGGTTCCT TCAGCGAAGA GACGGAAAAA
AAGTTTGAGC ACTTCAGCGG GCTCTTAAAC AACCAGCTGT CCCC GCAGCA TCATCACCAT
CACCCTAGG CTAGC

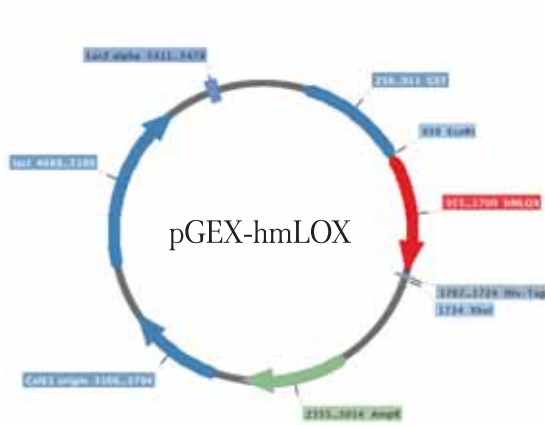


Abbildung A.1: pGEX-hmLOX-Vektor zur Expression der Lysyloxidase in *E. coli*

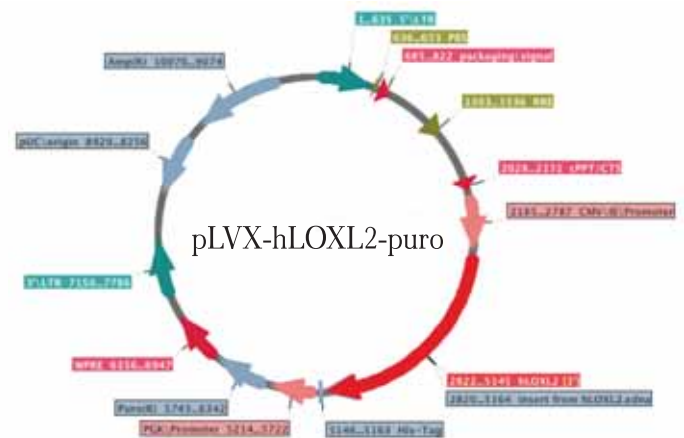


Abbildung A.2: pLVX-hLOXL2-puro-Vektor zur Expression von LOXL2 in HEK283T-Zellen

Literaturverzeichnis

- Abou-Alfa, G. K., Schwartz, L., Ricci, S., Amadori, D., Santoro, A., Figer, A., De Greve, J., Douillard, J.-Y., Lathia, C., Schwartz, B., *et al.* (2006). Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Journal of clinical oncology*, 24(26), 4293–4300.
- Abramovitch, R., Dafni, H., Neeman, M., Nagler, A., und Pines, M. (1999). Inhibition of neovascularization and tumor growth, facilitation of wound repair, by halofuginone, an inhibitor of collagen type i synthesis. *Neoplasia*, 1(4), 321–329.
- Abramovitch, R., Itzik, A., Harel, H., Nagler, A., Vlodavsky, I., und Siegal, T. (2004). Halofuginone inhibits angiogenesis and growth in implanted metastatic rat brain tumor model-an mri study. *Neoplasia*, 6(5), 480–489.
- Akiri, G., Sabo, E., Dafni, H., Vadasz, Z., Kartvelishvily, Y., Gan, N., Kessler, O., Cohen, T., Resnick, M., Neeman, M., *et al.* (2003). Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo. *Cancer research*, 63(7), 1657–1666.
- Alon, T., Hemo, I., Itin, A., Pe'er, J., Stone, J., und Keshet, E. (1995). Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature medicine*, 1(10), 1024–1028.
- Baish, J. W. und Jain, R. K. (2000). Fractals and cancer. *Cancer research*, 60(14), 3683–3688.
- Baker, A., Bird, D., Lang, G., Cox, T. R., und Erler, J. (2013). Lysyl oxidase enzymatic function increases stiffness to drive colorectal cancer progression through fak. *Oncogene*, 32(14), 1863–1868.
- Baker, A.-M., Cox, T. R., Bird, D., Lang, G., Murray, G. I., Sun, X.-F., Southall, S. M., Wilson, J. R., und Erler, J. T. (2011). The role of lysyl oxidase in src-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(5), 407–424.
- Baluk, P., Hashizume, H., und McDonald, D. M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Current opinion in genetics & development*, 15(1), 102–111.
- Barry-Hamilton, V., Spangler, R., Marshall, D., McCauley, S., Rodriguez, H. M., Oyasu, M., Mikels, A., Vaysberg, M., Ghermazien, H., Wai, C., *et al.* (2010). Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nature medicine*, 16(9), 1009–1017.
- Bauer, J. A., Chakravarthy, A. B., Rosenbluth, J. M., Mi, D., Seeley, E. H., De Matos Granja-Ingram, N., Olivares, M. G., Kelley, M. C., Mayer, I. A., Meszoely, I. M., Means-Powell, J. A., Johnson, K. N., Tsai, C. J., Ayers, G. D., Sanders, M. E., Schneider, R. J., Formenti,

- S. C., Caprioli, R. M., und Pietenpol, J. A. (2010). Identification of markers of taxane sensitivity using proteomic and genomic analyses of breast tumors from patients receiving neoadjuvant paclitaxel and radiation. *Clin. Cancer Res.*, 16(2), 681–690.
- Belka, C., Wiegmann, K., Adam, D., Holland, R., Neuloh, M., Herrmann, F., Krönke, M., und Brach, M. (1995). Tumor necrosis factor (tnf)-alpha activates c-raf-1 kinase via the p55 tnf receptor engaging neutral sphingomyelinase. *The EMBO journal*, 14(6), 1156.
- Benedito, R., Roca, C., Sörensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M., und Adams, R. H. (2009). The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell*, 137(6), 1124–1135.
- Benjamin, L. E., Golijanin, D., Itin, A., Pode, D., Keshet, E., *et al.* (1999). Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *Journal of Clinical Investigation*, 103(2), 159–165.
- Birk, D. E. und Brückner, P. (2011). Collagens, suprastructures, and collagen fibril assembly. In *The extracellular matrix: An overview* (pp. 77–115). Springer.
- Bishop, J. M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 64(2), 235–248.
- Borcuk, A. C., Kim, H. K., Yegen, H. A., Friedman, R. A., und Powell, C. A. (2005). Lung adenocarcinoma global profiling identifies type II transforming growth factor- β receptor as a repressor of invasiveness. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 172(6), 729–737.
- Bos, R., Zhong, H., Hanrahan, C. F., Mommers, E. C., Semenza, G. L., Pinedo, H. M., Abeloff, M. D., Simons, J. W., van Diest, P. J., und van der Wall, E. (2001). Levels of hypoxia-inducible factor-1 α during breast carcinogenesis. *Journal of the national cancer institute*, 93(4), 309–314.
- Boucher, Y., Kirkwood, J. M., Opacic, D., Desantis, M., und Jain, R. K. (1991). Interstitial hypertension in superficial metastatic melanomas in humans. *Cancer research*, 51(24), 6691–6694.
- Boudreau, N. und Bissell, M. J. (1998). Extracellular matrix signaling: Integration of form and function in normal and malignant cells. *Current opinion in cell biology*, 10(5), 640–646.
- Bouez, C., Reynaud, C., Noblesse, E., Thépot, A., Gleyzal, C., Kanitakis, J., Perrier, E., Damour, O., und Sommer, P. (2006). The lysyl oxidase lox is absent in basal and squamous cell carcinomas and its knockdown induces an invading phenotype in a skin equivalent model. *Clinical cancer research*, 12(5), 1463–1469.
- Brown, E., McKee, T., Pluen, A., Seed, B., Boucher, Y., Jain, R. K., *et al.* (2003). Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation. *Nature medicine*, 9(6), 796–800.

- Brown, E. B., Campbell, R. B., Tsuzuki, Y., Xu, L., Carmeliet, P., Fukumura, D., und Jain, R. K. (2001). In vivo measurement of gene expression, angiogenesis and physiological function in tumors using multiphoton laser scanning microscopy. *Nature medicine*, 7(7), 864–8.
- Cahill, D. P., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., und Lengauer, C. (1999). Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends in cell biology*, 9(12), M57–M60.
- Carmeliet, P. und Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298–307.
- Chadee, D. N., Taylor, W. R., Hurta, R. A., Allis, C. D., Wright, J. A., und Davie, J. R. (1995). Increased phosphorylation of histone h1 in mouse fibroblasts transformed with oncogenes or constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 270(34), 20098–20105.
- Chang, H. Y., Sneddon, J. B., Alizadeh, A. A., Sood, R., West, R. B., Montgomery, K., Chi, J.-T., van de Rijn, M., Botstein, D., und Brown, P. O. (2004). Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: Similarities between tumors and wounds. *PLoS biology*, 2(2), e7.
- Chaplin, D. J., Olive, P. L., und Durand, R. E. (1987). Intermittent blood flow in a murine tumor: radiobiological effects. *Cancer research*, 47(2), 597–601.
- Chekenya, M., Krakstad, C., Svendsen, A., Netland, I., Staalesen, V., Tysnes, B., Selheim, F., Wang, J., Sakariassen, P. Ø., Sandal, T., *et al.* (2008). The progenitor cell marker ng2/mpg promotes chemoresistance by activation of integrin-dependent pi3k/akt signaling. *Oncogene*, 27(39), 5182–5194.
- Chien, A., Edgar, D. B., und Trela, J. M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.*, 127(3), 1550–1557.
- Cleary, E. G. und Gibson, M. A. (1996). Elastic tissue, elastin and elastin associated microfibrils. *Extracellular matrix*, 2, 95–140.
- Cockman, M. E., Masson, N., Mole, D. R., Jaakkola, P., Chang, G.-W., Clifford, S. C., Maher, E. R., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., und Maxwell, P. H. (2000). Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25733–25741.
- Cohen, M. H., Shen, Y. L., Keegan, P., und Pazdur, R. (2009). FDA drug approval summary: bevacizumab (avastin®) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *The oncologist*, 14(11), 1131–1138.
- Colleoni, M., Viale, G., Zahrieh, D., Bottiglieri, L., Gelber, R. D., Veronesi, P., Balduzzi, A., Torrisi, R., Luini, A., Intra, M., Dellapasqua, S., Cardillo, A., Ghisini, R., Peruzzotti, G., und Goldhirsch, A. (2008). Expression of ER, PgR, HER1, HER2, and response: A study of preoperative chemotherapy. *Ann. Oncol.*, 19(3), 465–472.

- Conn, G., Bayne, M. L., Soderman, D. D., Kwok, P. W., Sullivan, K. A., Palisi, T. M., Hope, D. A., und Thomas, K. A. (1990). Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(7), 2628–2632.
- Connolly, D. T., Heuvelman, D. M., Nelson, R., Olander, J. V., Eppley, B. L., Delfino, J., Siegel, N., Leimgruber, R., und Feder, J. (1989). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 84(5), 1470.
- Constantinidou, A., Pollack, S., Loggers, E., Rodler, E., und Jones, R. L. (2013). The evolution of systemic therapy in sarcoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 13(2), 211–223.
- Cronshaw, A. D., Fothergill-Gilmore, L. A., und Hulmes, D. (1995). The proteolytic processing site of the precursor of lysyl oxidase. *Biochem. J*, 306, 279–284.
- Csiszar, K., Fong, S. F., Ujfalusi, A., Krawetz, S. A., Salvati, E. P., Mackenzie, J. W., und Boyd, C. D. (2002). Somatic mutations of the lysyl oxidase gene on chromosome 5q23. 1 in colorectal tumors. *International journal of cancer*, 97(5), 636–642.
- Dayanir, V., Meyer, R. D., Lashkari, K., und Rahimi, N. (2001). Identification of tyrosine residues in vascular endothelial growth factor receptor-2/FLK-1 involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase and cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 17686–17692.
- de Jonge, M., Dumez, H., Verweij, J., Yarkoni, S., Snyder, D., Lacombe, D., Marreaud, S., Yamaguchi, T., Punt, C., Van Oosterom, A., *et al.* (2006). Phase i and pharmacokinetic study of halofuginone, an oral quinazolinone derivative in patients with advanced solid tumours. *European journal of cancer*, 42(12), 1768–1774.
- Dejana, E., Corada, M., und Lampugnani, M. G. (1995). Endothelial cell-to-cell junctions. *The FASEB Journal*, 9(10), 910–918.
- Del Monte, U. (2009). Does the cell number 10⁹ still really fit one gram of tumor tissue. *Cell Cycle*, 8(3), 505–506.
- Demetri, G. D., van Oosterom, A. T., Garrett, C. R., Blackstein, M. E., Shah, M. H., Verweij, J., McArthur, G., Judson, I. R., Heinrich, M. C., Morgan, J. A., *et al.* (2006). Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: A randomised controlled trial. *The Lancet*, 368(9544), 1329–1338.
- Dings, R. P., Loren, M., Heun, H., McNiell, E., Griffioen, A. W., Mayo, K. H., und Griffin, R. J. (2007). Scheduling of radiation with angiogenesis inhibitors anginex and avastin improves therapeutic outcome via vessel normalization. *Clinical Cancer Research*, 13(11), 3395–3402.
- Diop-Frimpong, B., Chauhan, V. P., Krane, S., Boucher, Y., und Jain, R. K. (2011). Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 2909–2914.

- Dunn, J. F., Ding, S., O'Hara, J. A., Liu, K. J., Rhodes, E., Weaver, J. B., und Swartz, H. M. (1995). The apparent diffusion constant measured by mri correlates with po2 in a rif-1 tumor. *Magnetic resonance in medicine*, 34(4), 515–519.
- Dvorak, H. F. (1986). Tumors: Wounds that do not heal: Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine*, 315(26), 1650–1659.
- Eberhard, A., Kahlert, S., Goede, V., Hemmerlein, B., Plate, K. H., und Augustin, H. G. (2000). Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer research*, 60(5), 1388–1393.
- Ebos, J. M., Lee, C. R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G. A., Christensen, J. G., und Kerbel, R. S. (2009). Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer cell*, 15(3), 232–239.
- El-Haibi, C. P., Bell, G. W., Zhang, J., Collmann, A. Y., Wood, D., Scherber, C. M., Csizmadia, E., Mariani, O., Zhu, C., Campagne, A., *et al.* (2012). Critical role for lysyl oxidase in mesenchymal stem cell-driven breast cancer malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(43), 17460–17465.
- Elkin, M., Ariel, I., Miao, H.-Q., Nagler, A., Pines, M., de Groot, N., Hochberg, A., und Vlodavsky, I. (1999). Inhibition of bladder carcinoma angiogenesis, stromal support, and tumor growth by halofuginone. *Cancer research*, 59(16), 4111–4118.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82(1), 70–77.
- Erler, J. T., Bennewith, K. L., Nicolau, M., Dornhöfer, N., Kong, C., Le, Q.-T., Chi, J.-T. A., Jeffrey, S. S., und Giaccia, A. J. (2006). Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*, 440(7088), 1222–1226.
- Erler, J. T. und Giaccia, A. J. (2006). Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer research*, 66(21), 10238–10241.
- Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W. M., Szczylik, C., Oudard, S., Siebels, M., Negrier, S., Chevreau, C., Solska, E., Desai, A. A., *et al.* (2007). Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 356(2), 125–134.
- Fagerberg, L., Hallström, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpoor, S., Danielsson, A., Edlund, K., Asplund, A., Sjåstedt, E., Lundberg, E., Szigartyo, C. A.-K., Skogs, M., Takanen, J. O., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Nilsson, P., Schwenk, J. M., Lindskog, C., Danielsson, F., Mardinoglu, A., Sivertsson, s., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Zwahlen, M., Olsson, I., Navani, S., Huss, M., Nielsen, J., Ponten, F., und Uhlen, M. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular Cellular Proteomics*, 13(2), 397–406.

- Farrow, D. C., Hunt, W. C., und Samet, J. M. (1992). Geographic variation in the treatment of localized breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 326(17), 1097–1101.
- Feig, C., Gopinathan, A., Neesse, A., Chan, D. S., Cook, N., und Tuveson, D. A. (2012). The pancreas cancer microenvironment. *Clinical Cancer Research*, 18(16), 4266–4276.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., *et al.* (2012). Globocan 2012 v1. 0, cancer incidence and mortality worldwide: Iarc cancer base no. 10 [internet], international agency for research on cancer, 2013.
- Ferrara, N. und Alitalo, K. (1999). Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nature medicine*, 5(12).
- Fisher, B., Gunduz, N., und Saffer, E. A. (1983). Influence of the interval between primary tumor removal and chemotherapy on kinetics and growth of metastases. *Cancer Research*, 43(4), 1488–1492.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *The New England journal of medicine*, 285(21), 1182–1186.
- Folkman, J., Long, D. M., und Becker, F. F. (1963). Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer*, 16, 453–467.
- Folkman, J., Mendelsohn, J., Howley, P., Israel, M., und Liotta, L. (1995). The molecular basis of cancer. *Philadelphia: WB Sanders.-1995.-202 p.*
- Fong, G.-H., Rossant, J., Gertsenstein, M., und Breitman, M. (1995). Role of the flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376(6535), 66–70.
- Forsythe, J. A., Jiang, B.-H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., und Semenza, G. L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology*, 16(9), 4604–4613.
- Freissmuth, M., Offermanns, S., und Böhm, S. (2012). *Pharmakologie & Toxikologie*. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Fukumura, D., Duda, D. G., Munn, L. L., und Jain, R. K. (2010). Tumor microvasculature and microenvironment: Novel insights through intravital imaging in pre-clinical models. *Microcirculation*, 17(3), 206–225.
- Gasparini, G., Bonoldi, E., Gatti, C., Vinante, O., Toi, M., Tominaga, T., Gion, M., Dittadi, R., Verderio, P., Boracchi, P., *et al.* (1997). Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(2), 139–147.

- Gazit, Y., Baish, J. W., Safabakhsh, N., Leunig, M., Baxter, L. T., und Jain, R. K. (1997). Fractal characteristics of tumor vascular architecture during tumor growth and regression. *Microcirculation*, 4(4), 395–402.
- Gerber, H.-P., Condorelli, F., Park, J., und Ferrara, N. (1997). Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes *flt-1*, but not *flk-1/KDR*, is up-regulated by hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 272(38), 23659–23667.
- Gerber, H.-P. und Ferrara, N. (2005). Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer research*, 65(3), 671–680.
- Ghuman, J., Zunszain, P. A., Petitpas, I., Bhattacharya, A. A., Otagiri, M., und Curry, S. (2005). Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *Journal of molecular biology*, 353(1), 38–52.
- Giampuzzi, M., Botti, G., Di Duca, M., Arata, L., Ghiggeri, G., Gusmano, R., Ravazzolo, R., und Di Donato, A. (2000). Lysyl oxidase activates the transcription activity of human collagen iii promoter possible involvement of ku antigen. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46), 36341–36349.
- Giampuzzi, M., Oleggini, R., und Donato, A. D. (2003). Demonstration of in vitro interaction between tumor suppressor lysyl oxidase and histones {H1} and h2: definition of the regions involved. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1647(1â2), 245 – 251. 3rd International Symposium on Vitamin B6, PQQ, Carbonyl Catalysis and Quinoproteins.
- Giatromanolaki, A., Koukourakis, M., Sivridis, E., Turley, H., Talks, K., Pezzella, F., Gatter, K., und Harris, A. (2001). Relation of hypoxia inducible factor 1 α and 2 α in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *British Journal of Cancer*, 85(6).
- Gilmore, A. und Romer, L. (1996). Inhibition of focal adhesion kinase (fak) signaling in focal adhesions decreases cell motility and proliferation. *Molecular biology of the cell*, 7(8), 1209–1224.
- Gimbrone, M. A., Leapman, S. B., Cotran, R. S., und Folkman, J. (1972). Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J. Exp. Med.*, 136(2), 261–276.
- Goel, S., Duda, D. G., Xu, L., Munn, L. L., Boucher, Y., Fukumura, D., und Jain, R. K. (2011). Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiological reviews*, 91(3), 1071–1121.
- Goel, S., Wong, A. H.-K., und Jain, R. K. (2012). Vascular normalization as a therapeutic strategy for malignant and nonmalignant disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(3), a006486.

- Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Frazier, W. A., und Bouck, N. P. (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(17), 6624–6628.
- Gordon, M. K. und Hahn, R. A. (2010). Collagens. *Cell and tissue research*, 339(1), 247–257.
- Goto, F., Goto, K., Weindel, K., und Folkman, J. (1993). Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 69(5), 508–517.
- Granot, Z., Henke, E., Comen, E. A., King, T. A., Norton, L., und Benezra, R. (2011). Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer cell*, 20(3), 300–314.
- Grubbs, R. H. und Trnka, T. M. (2004). Ruthenium-catalyzed olefin metathesis. *Ruthenium in Organic Synthesis*, (pp. 153–177).
- Gullino, P. M., Clark, S. H., und Grantham, F. H. (1964). The interstitial fluid of solid tumors. *Cancer Research*, 24(5), 780–797.
- Gupta, G. P. und Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: Building a framework. *Cell*, 127(4), 679–695.
- Hämäläinen, E.-R., Kemppainen, R., Kuivaniemi, H., Tromp, G., Vaheri, A., Pihlajaniemi, T., und Kivirikko, K. I. (1995). Quantitative polymerase chain reaction of lysyl oxidase mrna in malignantly transformed human cell lines demonstrates that their low lysyl oxidase activity is due to low quantities of its mrna and low levels of transcription of the respective gene. *Journal of Biological Chemistry*, 270(37), 21590–21593.
- Hansen-Algenstaedt, N., Stoll, B. R., Padera, T. P., Dolmans, D. E., Hicklin, D. J., Fukumura, D., und Jain, R. K. (2000). Tumor oxygenation in hormone-dependent tumors during vascular endothelial growth factor receptor-2 blockade, hormone ablation, and chemotherapy. *Cancer research*, 60(16), 4556–4560.
- Harley, B. A., Leung, J. H., Silva, E. C., und Gibson, L. J. (2007). Mechanical characterization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Acta biomaterialia*, 3(4), 463–474.
- Hausen, P. und Stein, H. (1970). Ribonuclease h. *European Journal of Biochemistry*, 14(2), 278–283.
- He, H. T., Gårsoy, R. N., Kupczyk-Subotkowska, L., Tian, J., Williams, T., und Siahaan, T. J. (2006). Synthesis and chemical stability of a disulfide bond in a model cyclic pentapeptide: Cyclo(1,4)-cys-gly-phe-cys-gly-oh. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(10), 2222–2234.

- He, J., Tang, H., Wang, Y., Xiong, M., Zhou, F., Shao, K., und Li, T. (2002). [expression of lysyl oxidase gene in upper digestive tract carcinomas and its clinical significance]. *Ai zheng= Aizheng= Chinese journal of cancer*, 21(6), 671–674.
- Heldin, C.-H., Rubin, K., Pietras, K., und Östman, A. (2004). High interstitial fluid pressure an obstacle in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(10), 806–813.
- Helgeson, V. S., Cohen, S., Schulz, R., und Yasko, J. (2000). Group support interventions for women with breast cancer: who benefits from what? *Health Psychol*, 19(2), 107–114.
- Hidalgo, M. und Von Hoff, D. D. (2012). Translational therapeutic opportunities in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Clinical Cancer Research*, 18(16), 4249–4256.
- Hilger, R., Scheulen, M., und Strumberg, D. (2002). The ras-raf-mek-erk pathway in the treatment of cancer. *Oncology Research and Treatment*, 25(6), 511–518.
- Holmes, K., Roberts, O. L., Thomas, A. M., und Cross, M. J. (2007). Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular signalling*, 19(10), 2003–2012.
- Hurtado, P. A., Vora, S., Sume, S. S., Yang, D., Hilaire, C. S., Guo, Y., Palamakumbura, A. H., Schreiber, B. M., Ravid, K., und Trackman, P. C. (2008). Lysyl oxidase propeptide inhibits smooth muscle cell signaling and proliferation. *Biochemical and biophysical research communications*, 366(1), 156–161.
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., *et al.* (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *New England journal of medicine*, 350(23), 2335–2342.
- Inai, T., Mancuso, M., Hashizume, H., Baffert, F., Haskell, A., Baluk, P., Hu-Lowe, D. D., Shalinsky, D. R., Thurston, G., Yancopoulos, G. D., *et al.* (2004). Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *The American journal of pathology*, 165(1), 35–52.
- Ito, H., Akiyama, H., Iguchi, H., Iyama, K.-i., Miyamoto, M., Ohsawa, K., und Nakamura, T. (2001). Molecular cloning and biological activity of a novel lysyl oxidase-related gene expressed in cartilage. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 24023–24029.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., und Kaelin Jr, W. G. (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O₂ sensing. *Science*, 292(5516), 464–468.
- Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, a. M., Yu, a. Y., und Semenza, G. L. (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor α 1. *Genes & Development*, 12(2), 149–162.

- Iyer, V. R., Eisen, M. B., Ross, D. T., Schuler, G., Moore, T., Lee, J. C., Trent, J. M., Staudt, L. M., Hudson, J., Boguski, M. S., *et al.* (1999). The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science*, 283(5398), 83–87.
- Jacobetz, M. A., Chan, D. S., Neesse, A., Bapiro, T. E., Cook, N., Frese, K. K., Feig, C., Nakagawa, T., Caldwell, M. E., Zecchini, H. I., *et al.* (2013). Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut*, 62(1), 112–120.
- Jain, R. K. (1988a). Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer research*, 48(10), 2641–58.
- Jain, R. K. (1988b). Transvascular and interstitial transport in tumors. In *Vascular endothelium in health and disease* (pp. 215–220). Springer.
- Jain, R. K. (1989). Delivery of novel therapeutic agents in tumors: Physiological barriers and strategies. *Journal of the National Cancer Institute*, 81(8), 570–576.
- Jain, R. K. (1990). Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer research*, 50(3 Supplement), 814s–819s.
- Jain, R. K. (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy. *Nature medicine*, 7(9), 987–989.
- Jain, R. K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nature medicine*, 9(6), 685–693.
- Jain, R. K. (2005). Normalization of tumor vasculature: An emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 307(5706), 58–62.
- Jain, R. K. (2012). Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Advanced drug delivery reviews*.
- Jain, R. K., Tong, R. T., and Munn, L. L. (2007). Effect of vascular normalization by antiangiogenic therapy on interstitial hypertension, peritumor edema, and lymphatic metastasis: insights from a mathematical model. *Cancer Research*, 67(6), 2729–2735.
- Janet, M. T., Cheng, G., Tyrrell, J. A., Wilcox-Adelman, S. A., Boucher, Y., Jain, R. K., and Munn, L. L. (2012). Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(3), 911–916.
- Jang, W., Hua, A., Spilson, S. V., Miller, W., Roe, B. A., and Meisler, M. H. (1999). Comparative sequence of human and mouse BAC clones from the *mnd2* region of chromosome 2p13. *Genome Research*, 9(1), 53–61.
- Joanne, L. Y., Rak, J. W., Carmeliet, P., Nagy, A., Kerbel, R. S., and Coomber, B. L. (2001). Heterogeneous vascular dependence of tumor cell populations. *The American journal of pathology*, 158(4), 1325–1334.

- Johannes, K., Watzke, M., und Martens, J. (2010). Synthesis of α , β -unsaturated caprolactams starting from heterocyclic imines. *ChemInform*, 41(41).
- Kagan, H. M. (1986). Characterization and regulation of lysyl oxidase. *Biology of extracellular matrix*, 1, 321–398.
- Kaneda, A., Wakazono, K., Tsukamoto, T., Watanabe, N., Yagi, Y., Tatematsu, M., Kaminishi, M., Sugimura, T., und Ushijima, T. (2004). Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. *Cancer research*, 64(18), 6410–6415.
- Kang, D., Gho, Y. S., Suh, M., und Kang, C. (2002). Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin-Korean Chemical Society*, 23(11), 1511–1512.
- Kendall, R. L. und Thomas, K. A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(22), 10705–10709.
- Kenyon, K., Modi, W. S., Contente, S., und Friedman, R. (1993). A novel human cDNA with a predicted protein similar to lysyl oxidase maps to chromosome 15q24-q25. *Journal of Biological Chemistry*, 268(25), 18435–18437.
- Kerbel, R. S. (2008). Tumor angiogenesis. *New England Journal of Medicine*, 358(19), 2039–2049.
- Kidd, L., Stephens, A., Kuliwaba, J., Fazzalari, N., Wu, A., und Forwood, M. (2010). Temporal pattern of gene expression and histology of stress fracture healing. *Bone*, 46(2), 369–378.
- Kim, Y.-M., Kim, E.-C., und Kim, Y. (2011). The human lysyl oxidase-like 2 protein functions as an amine oxidase toward collagen and elastin. *Molecular biology reports*, 38(1), 145–149.
- Kirschmann, D. A., Seftor, E. A., Fong, S. F., Nieva, D. R., Sullivan, C. M., Edwards, E. M., Sommer, P., Csiszar, K., und Hendrix, M. J. (2002). A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer research*, 62(15), 4478–4483.
- Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Hassell, J. R., Star, V. L., Cannon, F. B., Laurie, G. W., und Martin, G. R. (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry*, 25(2), 312–318.
- Knighton, D., Silver, I., Hunt, T., *et al.* (1981). Regulation of wound-healing angiogenesis—effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery*, 90(2), 262–270.
- Kratz, F. (2008). Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 132(3), 171–183.

- Kuivaniemi, H., Savolainen, E.-R., und Kivirikko, K. (1984). Human placental lysyl oxidase purification, partial characterization, and preparation of two specific antisera to the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 259(11), 6996–7002.
- Laginha, K. M., Verwoert, S., Charrois, G. J., und Allen, T. M. (2005). Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors. *Clinical cancer research*, 11(19), 6944–6949.
- Lalla, R. V., Boissoneau, D. S., Spiro, J. D., und Kreutzer, D. L. (2003). Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Archives of Otolaryngology & Head & Neck Surgery*, 129(8), 882.
- Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381), 15–16.
- Lapointe, J., Li, C., Higgins, J. P., van de Rijn, M., Bair, E., Montgomery, K., Ferrari, M., Egevad, L., Rayford, W., Bergerheim, U., *et al.* (2004). Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(3), 811–816.
- Lawler, J. (2002). Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Journal of cellular and molecular medicine*, 6(1), 1–12.
- Lee, C.-G., Heijn, M., di Tomaso, E., Griffon-Etienne, G., Ancukiewicz, M., Koike, C., Park, K., Ferrara, N., Jain, R. K., Suit, H. D., *et al.* (2000). Anti-vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Research*, 60(19), 5565–5570.
- Less, J. R., Skalak, T. C., Sevick, E. M., und Jain, R. K. (1991). Microvascular architecture in a mammary carcinoma: branching patterns and vessel dimensions. *Cancer research*, 51(1), 265–273.
- Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W.-J., Goeddel, D. V., und Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246(4935), 1306–1309.
- Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., Fong, S. F., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., *et al.* (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, 139(5), 891–906.
- Liang, W.-C., Wu, X., Peale, F. V., Lee, C. V., Meng, Y. G., Gutierrez, J., Fu, L., Malik, A. K., Gerber, H.-P., Ferrara, N., *et al.* (2006). Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF. *Journal of Biological Chemistry*, 281(2), 951–961.
- Liotta, L. A., Kleinerman, J., und Saidel, G. M. (1974). Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer research*, 34(5), 997–1004.

- Malumbres, M. und Barbacid, M. (2003). Ras oncogenes: the first 30 years. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 459–465.
- Mantovani, A., Schioppa, T., Porta, C., Allavena, P., und Sica, A. (2006). Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(3), 315–322.
- Mathieu, M. C., Mazouni, C., Kesty, N. C., Zhang, Y., Scott, V., Passeron, J., Arnedos, M., Schnabel, C. A., Delaloge, S., Erlander, M. G., und Andre, F. (2012). Breast Cancer Index predicts pathological complete response and eligibility for breast conserving surgery in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ann. Oncol.*, 23(8), 2046–2052.
- Matsumura, Y. und Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research*, 46(12 Part 1), 6387–6392.
- Matthews, W., Jordan, C. T., Gavin, M., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., und Lemischka, I. R. (1991). A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(20), 9026–9030.
- Mazumder, A. und Rosenberg, S. A. (1984). Successful immunotherapy of natural killer-resistant established pulmonary melanoma metastases by the intravenous adoptive transfer of syngeneic lymphocytes activated in vitro by interleukin 2. *J. Exp. Med.*, 159(2), 495–507.
- McKee, T. D., Grandi, P., Mok, W., Alexandrakis, G., Insin, N., Zimmer, J. P., Bawendi, M. G., Boucher, Y., Breakefield, X. O., und Jain, R. K. (2006). Degradation of fibrillar collagen in a human melanoma xenograft improves the efficacy of an oncolytic herpes simplex virus vector. *Cancer research*, 66(5), 2509–2513.
- Miller, H. I., Riggs, A. D., und Gill, G. N. (1973). Ribonuclease h (hybrid) in escherichia coli identification and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 248(7), 2621–2624.
- Miller, K., Wang, M., Gralow, J., Dickler, M., Cobleigh, M., Perez, E. A., Shenkier, T., Cella, D., und Davidson, N. E. (2007). Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 357(26), 2666–2676.
- Min, C., Kirsch, K. H., Zhao, Y., Jeay, S., Palamakumbura, A. H., Trackman, P. C., und Sonenshein, G. E. (2007). The tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide reverses the invasive phenotype of her-2/neu-driven breast cancer. *Cancer research*, 67(3), 1105–1112.
- Minsky, M. (1988). Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, 10(4), 128–138.

- Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R. K., und McDonald, D. M. (2002). Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *The American journal of pathology*, 160(3), 985–1000.
- Motzer, R. J., Michaelson, M. D., Redman, B. G., Hudes, G. R., Wilding, G., Figlin, R. A., Ginsberg, M. S., Kim, S. T., Baum, C. M., DePrimo, S. E., *et al.* (2006). Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 24(1), 16–24.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., und Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*, 24, 17–27.
- Naba, A., Clauser, K. R., Hoersch, S., Liu, H., Carr, S. A., und Hynes, R. O. (2012). The matrisome: In silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(4), M111–014647.
- Nagy, J. A., Chang, S.-H., Shih, S.-C., Dvorak, A. M., und Dvorak, H. F. (2010). Heterogeneity of the tumor vasculature. In *Seminars in thrombosis and hemostasis*, volume 36 (pp. 321): NIH Public Access.
- Nakai, Y., Isayama, H., Ijichi, H., Sasaki, T., Sasahira, N., Hirano, K., Kogure, H., Kawakubo, K., Yagioka, H., Yashima, Y., *et al.* (2010). Inhibition of renin-angiotensin system affects prognosis of advanced pancreatic cancer receiving gemcitabine. *British journal of cancer*, 103(11), 1644–1648.
- Narayanan, A. S., Siegel, R. C., und Martin, G. R. (1974). Stability and purification of lysyl oxidase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 162(1), 231–237.
- Nauts, H. C. (1989). Bacteria and cancer - Antagonisms and benefits. *Cancer Surv.*, 8(4), 713–723.
- Nelson, H., Petrelli, N., Carlin, A., Couture, J., Fleshman, J., Guillem, J., Miedema, B., Ota, D., und Sargent, D. (2001). Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(8), 583–596.
- Netti, P. A., Berk, D. A., Swartz, M. A., Grodzinsky, A. J., und Jain, R. K. (2000). Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer research*, 60(9), 2497–2503.
- Network, N. C. C. *et al.* (2003). Breast cancer clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 1(2), 148.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., und Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*, 13(1), 9–22.

- Nishihara, T. (1970). Method for solubilization of collagen fibers with proteolytic enzymes. US Patent 3,530,037.
- Nissen, N. N., Polverini, P., Koch, A. E., Volin, M. V., Gamelli, R. L., und DiPietro, L. A. (1998). Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *The American journal of pathology*, 152(6), 1445.
- O'Brien, J., Fornetti, J., und Schedin, P. (2010). Isolation of mammary-specific extracellular matrix to assess acute cell-ECM interactions in 3D culture. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 15(3), 353–364.
- Oleggini, R. und Di Donato, A. (2011). Lysyl oxidase regulates mmtv promoter: indirect evidence of histone h1 involvement. *Biochemistry and Cell Biology*, 89(6), 522–532.
- Oleggini, R., Gastaldo, N., und Di Donato, A. (2007). Regulation of elastin promoter by lysyl oxidase and growth factors: cross control of lysyl oxidase on $\text{tgf-}\beta 1$ effects. *Matrix biology*, 26(6), 494–505.
- Olofsson, B., Korpelainen, E., Pepper, M. S., Mandriota, S. J., Aase, K., Kumar, V., Gunji, Y., Jeltsch, M. M., Shibuya, M., Alitalo, K., *et al.* (1998). Vascular endothelial growth factor b (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(20), 11709–11714.
- Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J., und Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling? in control of vascular function. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(5), 359–371.
- O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R., und Folkman, J. (1997). Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *cell*, 88(2), 277–285.
- Pàez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Viñals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D., und Casanovas, O. (2009). Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer cell*, 15(3), 220–231.
- Palamakumbura, A. H., Jeay, S., Guo, Y., Pischon, N., Sommer, P., Sonenshein, G. E., und Trackman, P. C. (2004). The propeptide domain of lysyl oxidase induces phenotypic reversion of ras-transformed cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40593–40600.
- Palamakumbura, A. H. und Trackman, P. C. (2002). A fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples. *Analytical biochemistry*, 300(2), 245–251.
- Park, J. E., Chen, H. H., Winer, J., Houck, K. A., und Ferrara, N. (1994). Placenta growth factor. potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to flt-1 but not to flk-1/KDR. *Journal of Biological Chemistry*, 269(41), 25646–25654.

- Partin, A. W., Schoeniger, J. S., Mohler, J. L., und Coffey, D. S. (1989). Fourier analysis of cell motility: correlation of motility with metastatic potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(4), 1254–1258.
- Peeters, C. F., De Waal, R. M., Wobbes, T., Westphal, J. R., und Ruers, T. J. (2006). Outgrowth of human liver metastases after resection of the primary colorectal tumor: A shift in the balance between apoptosis and proliferation. *International journal of cancer*, 119(6), 1249–1253.
- Perentes, J. Y., McKee, T. D., Ley, C. D., Mathiew, H., Dawson, M., Padera, T. P., Munn, L. L., Jain, R. K., und Boucher, Y. (2009). In vivo imaging of extracellular matrix remodeling by tumor-associated fibroblasts. *Nature methods*, 6(2), 143.
- Peterson, H.-I. (1979). *Tumor blood circulation: angiogenesis, vascular morphology, and blood flow of experimental and human tumors*. CRC.
- Peyrol, S., Raccurt, M., Gerard, F., Gleyzal, C., Grimaud, J. A., und Sommer, P. (1997). Lysyl oxidase gene expression in the stromal reaction to in situ and invasive ductal breast carcinoma. *The American journal of pathology*, 150(2), 497.
- Primeau, A. J., Rendon, A., Hedley, D., Lilge, L., und Tannock, I. F. (2005). The distribution of the anticancer drug doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 11(24), 8782–8788.
- Provenzano, P. und Hingorani, S. (2013). Hyaluronan, fluid pressure, and stromal resistance in pancreas cancer. *British journal of cancer*, 108(1), 1–8.
- Puchtler, H., Waldrop, F. S., und Valentine, L. S. (1973). Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beiträge zur Pathologie*, 150(2), 174–187.
- Ramanujan, S., Pluen, A., McKee, T. D., Brown, E. B., Boucher, Y., und Jain, R. K. (2002). Diffusion and convection in collagen gels: implications for transport in the tumor interstitium. *Biophysical journal*, 83(3), 1650–1660.
- Rivenbark, A. G. und Coleman, W. B. (2012). Field cancerization in mammary carcinogenesis - Implications for prevention and treatment of breast cancer. *Exp. Mol. Pathol.*, 93(3), 391–398.
- Rivenbark, A. G., OâConnor, S. M., und Coleman, W. B. (2013). Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: Challenges for personalized medicine. *American Journal of Pathology, The*.
- Rodriguez, H. M., Vaysberg, M., Mikels, A., McCauley, S., Velayo, A. C., Garcia, C., und Smith, V. (2010). Modulation of lysyl oxidase-like 2 enzymatic activity by an allosteric antibody inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 285(27), 20964–20974.

- Rost, T., Pyritz, V., Rathcke, I., Görögh, T., Dünne, A., und Werner, J. (2002). Reduction of lox-and loxl2-mrna expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Anticancer research*, 23(2B), 1565–1573.
- Rubin, P. und Casarett, G. (1966). Microcirculation of tumors part I: Anatomy, function, and necrosis. *Clinical radiology*, 17(3), 220–229.
- Saber, A. (2010). Ancient Egyptian surgical heritage. *J Invest Surg*, 23(6), 327–334.
- Sabin, F. R. und Sabin, F. R. (2002). Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessels, blood-plasma and red blood-cells as seen in the living chick. 1917. *J. Hematother. Stem Cell Res.*, 11(1), 5–7.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487–491.
- Saito, H., Papaconstantinou, J., Sato, H., und Goldstein, S. (1997). Regulation of a novel gene encoding a lysyl oxidase-related protein in cellular adhesion and senescence. *Journal of Biological Chemistry*, 272(13), 8157–8160.
- Sampath Narayanan, A., Siegel, R. C., und Martin, G. R. (1972). On the inhibition of lysyl oxidase by β -aminopropionitrile. *Biochemical and biophysical research communications*, 46(2), 745–751.
- Sandberg, L. B., Soskel, N. T., Leslie, J. G., *et al.* (1981). Elastin structure, biosynthesis, and relation to disease states. *N Engl J Med*, 304(10), 566–579.
- Sandhu, J. K., Haqqani, A. S., und Birnboim, H. C. (2000). Effect of dietary vitamin E on spontaneous or nitric oxide donor-induced mutations in a mouse tumor model. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(17), 1429–1433.
- Sandler, A., Gray, R., Perry, M. C., Brahmer, J., Schiller, J. H., Dowlati, A., Lilienbaum, R., und Johnson, D. H. (2006). Paclitaxel - carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 355(24), 2542–2550.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74(12), 5463–5467.
- Sato, S., Trackman, P. C., Mäki, J. M., Myllyharju, J., Kirsch, K. H., und Sonenshein, G. E. (2011). The ras signaling inhibitor lox-pp interacts with hsp70 and c-raf to reduce erk activation and transformed phenotype of breast cancer cells. *Molecular and cellular biology*, 31(13), 2683–2695.
- Schäfer, M. und Werner, S. (2008). Cancer as an overhealing wound: An old hypothesis revisited. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(8), 628–638.

- Schietke, R., Warnecke, C., Wacker, I., Schödel, J., Mole, D. R., Campean, V., Amann, K., Goppelt-Strube, M., Behrens, J., Eckardt, K.-U., *et al.* (2010). The lysyl oxidases *lox* and *lox2* are necessary and sufficient to repress e-cadherin in hypoxia¹⁹ insights into cellular transformation processes mediated by hif-1. *Journal of Biological Chemistry*, 285(9), 6658–6669.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., und Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*, 9(7), 676–682.
- Seghezzi, G., Patel, S., Ren, C. J., Gualandris, A., Pintucci, G., Robbins, E. S., Shapiro, R. L., Galloway, A. C., Rifkin, D. B., und Mignatti, P. (1998). Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: An autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *The Journal of cell biology*, 141(7), 1659–1673.
- Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., und Dvorak, H. F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219(4587), 983–985.
- Shu, X., Wu, W., Mosteller, R. D., und Broek, D. (2002). Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Molecular and cellular biology*, 22(22), 7758–7768.
- Shuman, S. (1991). Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88(22), 10104–10108.
- Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.*, 269(51), 32678–32684.
- Siegel, R. C., Pinnell, S. R., und Martin, G. R. (1970). Cross-linking of collagen and elastin. properties of lysyl oxidase. *Biochemistry*, 9(23), 4486–4492.
- Skinner, S. A., Frydman, G. M., und O'Brien, P. E. (1995). Microvascular structure of benign and malignant tumors of the colon in humans. *Digestive diseases and sciences*, 40(2), 373–384.
- Sorensen, A. G., Emblem, K. E., Polaskova, P., Jennings, D., Kim, H., Ancukiewicz, M., Wang, M., Wen, P. Y., Ivy, P., Batchelor, T. T., *et al.* (2012). Increased survival of glioblastoma patients who respond to antiangiogenic therapy with elevated blood perfusion. *Cancer research*, 72(2), 402–407.
- Stassen, F. L. (1976). Properties of highly purified lysyl oxidase from embryonic chick cartilage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 438(1), 49–60.

- Stylianopoulos, T., Martin, J. D., Chauhan, V. P., Jain, S. R., Diop-Frimpong, B., Bardeesy, N., Smith, B. L., Ferrone, C. R., Hornicek, F. J., Boucher, Y., *et al.* (2012). Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(38), 15101–15108.
- Sudlow, G., Birkett, D., und Wade, D. (1976). Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular Pharmacology*, 12(6), 1052–1061.
- Takahashi, T., Ueno, H., und Shibuya, M. (1999). VEGF activates protein kinase c-dependent, but ras-independent raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene*, 18(13).
- Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., und Harris, A. L. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *The American journal of pathology*, 157(2), 411–421.
- Tan, R. S.-P., Taniguchi, T., und Harada, H. (1996). Identification of the lysyl oxidase gene as a target of the antioncogenic transcription factor, IRF-1, and its possible role in tumor suppression. *Cancer research*, 56(10), 2417–2421.
- Tanaka, J., Sadanari, H., Sato, H., und Fukuda, S. (1991). Sodium butyrate-inducible replication of human cytomegalovirus in a human epithelial cell line. *Virology*, 185(1), 271–280.
- Taylor, W. R., Chadee, D. N., Allis, C. D., Wright, J. A., und Davie, J. R. (1995). Fibroblasts transformed by combinations of ras, myc and mutant p53 exhibit increased phosphorylation of histone h1 that is independent of metastatic potential. *FEBS letters*, 377(1), 51–53.
- Teicher, B. A. (1996). A systems approach to cancer therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*, 15(2), 247–272.
- Thomas, J. O. und Kornberg, R. D. (1975). Cleavable cross-links in the analysis of histone-histone associations. *FEBS Lett.*, 58(1), 353–358.
- Tolsma, S. S., Volpert, O. V., Good, D. J., Frazier, W. A., Polverini, P. J., und Bouck, N. (1993). Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *The Journal of cell biology*, 122(2), 497–511.
- Tong, R. T., Boucher, Y., Kozin, S. V., Winkler, F., Hicklin, D. J., und Jain, R. K. (2004). Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer research*, 64(11), 3731–3736.
- Trackman, P. C., Bedell-Hogan, D., Tang, J., und Kagan, H. (1992). Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor. *Journal of Biological Chemistry*, 267(12), 8666–8671.

- Tsuchiya, M. I., Okuda, H., Takaki, Y., Baba, M., Hirai, S.-i., Ohno, S., und Shuin, T. (2005). Renal cell carcinoma-and pheochromocytoma-specific altered gene expression profiles in vhl mutant clones. *Oncology reports*, 13(6), 1033–1042.
- Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M. M., und Pastan, I. (1987). Expression of a full-length cDNA for the human MDRI gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(9), 3004–3008.
- Uitto, J. (1979). Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in diseases. *Journal of Investigative Dermatology*, 72(1).
- Unemori, E. N. und Amento, E. P. (1990). Relaxin modulates synthesis and secretion of procollagenase and collagen by human dermal fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 265(18), 10681–10685.
- Vadasz, Z., Kessler, O., Akiri, G., Gengrinovitch, S., Kagan, H. M., Baruch, Y., Izhak, O. B., und Neufeld, G. (2005). Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in wilson's disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2. *Journal of hepatology*, 43(3), 499–507.
- Vakoc, B. J., Lanning, R. M., Tyrrell, J. A., Padera, T. P., Bartlett, L. A., Stylianopoulos, T., Munn, L. L., Tearney, G. J., Fukumura, D., Jain, R. K., *et al.* (2009). Three-dimensional microscopy of the tumor microenvironment in vivo using optical frequency domain imaging. *Nature medicine*, 15(10), 1219–1223.
- Van der Veldt, A. A., Lubberink, M., Bahce, I., Walraven, M., de Boer, M. P., Greuter, H. N., Hendrikse, N. H., Eriksson, J., Windhorst, A. D., Postmus, P. E., *et al.* (2012). Rapid decrease in delivery of chemotherapy to tumors after anti-VEGF therapy: Implications for scheduling of anti-angiogenic drugs. *Cancer cell*, 21(1), 82–91.
- Velnar, T., Bailey, T., und Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528–1542.
- Vestweber, D. (2008). VE-cadherin the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(2), 223–232.
- Volpert, O. V., Stellmach, V., und Bouck, N. (1995). The modulation of thrombospondin and other naturally occurring inhibitors of angiogenesis during tumor progression. *Breast cancer research and treatment*, 36(2), 119–126.
- Vrhovski, B. und Weiss, A. S. (1998). Biochemistry of tropoelastin. *European Journal of Biochemistry*, 258(1), 1–18.
- Wahl, L. M. und Kleinman, H. K. (1998). Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(21), 1583–1584.

- Wang, G. L., Jiang, B.-H., Rue, E. A., und Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the national academy of sciences*, 92(12), 5510–5514.
- Whittaker, C. A., Bergeron, K.-F., Whittle, J., Brandhorst, B. P., Burke, R. D., und Hynes, R. O. (2006). The echinoderm adhesome. *Developmental biology*, 300(1), 252–266.
- Wiesener, M. S., Münchenhagen, P. M., Berger, I., Morgan, N. V., Roigas, J., Schwiertz, A., Jürgensen, J. S., Gruber, G., Maxwell, P. H., Löning, S. A., *et al.* (2001). Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α in clear cell renal carcinomas. *Cancer research*, 61(13), 5215–5222.
- Willett, C. G., Boucher, Y., Di Tomaso, E., Duda, D. G., Munn, L. L., Tong, R. T., Chung, D. C., Sahani, D. V., Kalva, S. P., Kozin, S. V., *et al.* (2004). Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nature medicine*, 10(2), 145–147.
- Wilson, J. M. (2005). Gendicine: the first commercial gene therapy product. *Hum. Gene Ther.*, 16(9), 1014–1015.
- Winkler, F., Kozin, S. V., Tong, R. T., Chae, S.-S., Booth, M. F., Garkavtsev, I., Xu, L., Hicklin, D. J., Fukumura, D., di Tomaso, E., *et al.* (2004). Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer cell*, 6(6), 553–563.
- Woll, P. J., Reichardt, P., Le Cesne, A., Bonvalot, S., Azzarelli, A., Hoekstra, H. J., Leahy, M., Van Coevorden, F., Verweij, J., Hogendoorn, P. C., *et al.* (2012). Adjuvant chemotherapy with doxorubicin, ifosfamide, and lenograstim for resected soft-tissue sarcoma (eortc 62931): a multicentre randomised controlled trial. *The lancet oncology*, 13(10), 1045–1054.
- Wolpert, L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *Journal of theoretical biology*, 25(1), 1–47.
- Wu, M., Min, C., Wang, X., Yu, Z., Kirsch, K. H., Trackman, P. C., und Sonenshein, G. E. (2007). Repression of bcl2 by the tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide inhibits transformed phenotype of lung and pancreatic cancer cells. *Cancer research*, 67(13), 6278–6285.
- Xu, L., Go, E. P., Finney, J., Moon, H., Lantz, M., Rebecchi, K., Desaire, H., und Mure, M. (2013). Post-translational modifications of recombinant human lysyl oxidase-like 2 (rhLOXL2) secreted from drosophila S2 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(8), 5357–5363.
- Yamaura, H. und Sato, H. (1974). Quantitative studies on the developing vascular system of rat hepatoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 53(5), 1229–1240.

- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., und Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134.
- Young, J., Llumsden, C., und Stalker, A. (1950). The significance of the "tissue pressure of normal testicular and of neoplastic (brown-pearce carcinoma) tissue in the rabbit. *The Journal of pathology and bacteriology*, 62(3), 313–333.
- Yuan, F., Chen, Y., Dellian, M., Safabakhsh, N., Ferrara, N., und Jain, R. K. (1996). Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), 14765–14770.
- Zagzag, D., Zhong, H., Scalzitti, J. M., Laughner, E., Simons, J. W., und Semenza, G. L. (2000). Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in brain tumors. *Cancer*, 88(11), 2606–2618.
- Zhong, H., De Marzo, A. M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D. A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W. B., Semenza, G. L., und Simons, J. W. (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer research*, 59(22), 5830–5835.

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Verbesserung der Medikamenteneinbringung in solide Tumore durch Modifikation der Extrazellulären Matrix“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, den 15. Februar 2015

Florian Röhrig

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den 15. Februar 2015

Florian Röhrig