

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

**Einfluss der Lysyloxidase-katalysierten Matrix-Quervernetzung
auf Tumorwachstum, -metabolismus und -malignität**

Effects of LOX(L)-catalyzed extracellular matrix crosslinking on
tumor growth, metabolism and malignity

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Leonie Rossow
aus Bayreuth

Würzburg, November 2017

Referent: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

Koreferent: Prof. Dr. med. Ralf Bargou

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2019

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Meinem Papa gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Die Krebserkrankung	1
1.2 Chemotherapie	2
1.3 Tumormikroumgebung	3
1.3.1 Tumor-assoziierte Zellen.....	4
1.3.2 Gefäßsystem des Tumors	4
1.3.3 Extrazelluläre Matrix.....	5
1.4 Lysyloxidasen	6
1.5 Vorarbeiten.....	8
1.5.1 Tumorwachstum nach LOXL(L)-Inhibierung	8
1.5.2 Nekrotisierung des Tumorgewebes nach LOX(L)-Inhibierung	11
1.5.3 Medikamenteneinbringung in das Tumorgewebe und relative Permeabilität der EZM nach LOX(L)-Inhibierung	11
1.5.4 Makrophageninfiltration nach LOX(L)-Inhibierung.....	11
1.5.5 Blutgefäßdichte nach LOX(L)-Inhibierung	12
1.5.6 mRNA-Expressionsanalyse in β APN-behandelten Tumoren	13
1.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Murine Tumorlinien	15
2.2 Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen.....	16
2.3 Chemikalien	17
2.4 Puffer und Lösungen	18
2.5 Kits	19
2.6 Wachstumsfaktoren.....	20
2.7 Primersequenzen	21
2.8 Geräte	22
2.9 Färbemethoden.....	23
2.9.1 Immunhistochemische Färbungen.....	23

Inhaltsverzeichnis

2.9.1.1	Diaminobenzidinfärbung	23
2.9.1.2	Immunfluoreszenzfärbung	25
2.9.2	Histologische Färbungen	26
2.9.2.1	Picrosiriusrot-Färbung	26
2.9.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	27
2.10	Mikroskopie	27
2.11	Elektronische Bildverarbeitung	27
2.12	Genexpressionsanalysen	28
2.12.1	Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion	28
2.12.2	Durchführung der RT-PCR	29
2.12.3	Kapillarelektrophorese	32
2.13	Statistische Auswertung	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Korrelation von Tumorwachstum mit Zellproliferation und -apoptose nach LOX(L)-Inhibierung	34
3.2	Tumorversorgung nach LOX(L)-Inhibierung	39
3.3	4T1-Tumorversorgung bei LOX-/LOXL2-Überexpression	41
3.4	Auswirkungen der LOX(L)-Aktivität auf die Blutgefäßdichte	46
3.5	Korrelation von Tumorversorgung und EZM nach LOX(L)-Inhibierung	47
3.6	mRNA-Expressionsanalyse in 2D-Zellkulturen, 3D-MTS und Tumoren	52
3.7	Tumor-assoziierte Makrophagen	55
4	Diskussion	57
5	Zusammenfassung/Summary	66
	Literaturverzeichnis	68
	Danksagung	X

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zusammensetzung der Tumormikroumgebung	3
Abbildung 2: Struktur der LOX(L)-Familienmitglieder	6
Abbildung 3: Oxidative Desaminierung von Peptidyllysin-Resten zu Peptidyl-AAS, katalysiert durch die Proteinfamilie der Lysyloxidasen	7
Abbildung 4: Tumorwachstum nach LOX(L)-Inhibierung.....	10
Abbildung 5: Quantifizierung der CD34-positiven Fläche in 4T1-, MT6-, EMT6-, E0771- und LLC-Tumoren	12
Abbildung 6: Quantifizierung der CD31-positiven Fläche in 4T1- und MT6-Tumoren	12
Abbildung 7: mRNA-Expressionsanalyse verschiedener Wachstumsfaktoren/Zytokine in MT6-, LLC-, EMT6-, E0771- und 4T1-Tumoren nach β APN-Behandlung .	13
Abbildung 8: RT-Reaktion mit genspezifischen Reverse-Primern.....	29
Abbildung 9: Multiplex-PCR mit genspezifischen und universellen Forward-Primern.....	31
Abbildung 10: Quantifizierung der proliferierenden Zellen mit Ki-67 in allen fünf Tumorlinien.....	35
Abbildung 11: Vergleich von Tumorzentrum und Tumorrand Ki-67-gefärbter LLC-Tumore	36
Abbildung 12: Räumliche Aufteilung der Ki-67-gefärbten Intensität in unbehandelten und β APN-behandelten LLC-Tumoren.....	36
Abbildung 13: Quantifizierung der Ki-67-positiven Zellen in 4T1-MTS.....	37
Abbildung 14: IHC-Färbung von 4T1-MTS-Gewebeschnitten mit dem Proliferationsmarker Ki-67	38
Abbildung 15: Quantifizierung der ClCasp-3-positiven Zellen in 4T1-Tumorschnitten.....	38
Abbildung 16: IHC-Färbung von 4T1-Tumorschnitten mit dem Apoptosemarker ClCasp-3.....	39
Abbildung 17: Quantifizierung des nekrotischen Tumorgewebes in E0771-, EMT6- und LLC-Tumoren	40
Abbildung 18: HE-Färbung eines unbehandelten bzw. β APN-behandelten E0771-Tumors...	40
Abbildung 19: Quantifizierung des nekrotischen Tumorgewebes in allen fünf Tumorlinien .	41
Abbildung 20: Tumorwachstumskurven von 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren.....	42
Abbildung 21: Quantifizierung der nekrotischen Gewebeflächen in 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren.....	43

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 22: HE-Färbung von 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren.....	43
Abbildung 23: IHC-Färbung mit Ki-67 an der Grenze von 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren.....	44
Abbildung 24: Quantifizierung der fibrillären Kollagenanteile in PSR-gefärbten 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren	45
Abbildung 25: PSR-Färbung von 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren	45
Abbildung 26: Quantifizierung der H33342-Gewebepenetration in 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren.....	46
Abbildung 27: Quantifizierung der Doxorubicin-Akkumulation in 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren zwei Stunden nach der Injektion.....	46
Abbildung 28: Quantifizierung der MVD mit CD34 in 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren	47
Abbildung 29: CD34-IHC-Färbung in 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren.....	47
Abbildung 30: Quantifizierung von Tumorzellen mit nukleärer Hif1 α -Immunreaktivität in nicht-vaskularisierten spontanen 4T1-Lungenmetastasen.....	49
Abbildung 31: IHC-Färbung mit Hif1 α in nicht-vaskularisierten spontanen 4T1-Lungenmetastasen	49
Abbildung 32: Größenverteilung der 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-MTS nach sechs Tagen Kultivierung	50
Abbildung 33: HE-Färbung bzw. IHC-Färbung mit CA IX und Ki-67 von 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-MTS	51
Abbildung 34: Quantifizierung der zentralen Nekroseflächen in 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-MTS	52
Abbildung 35: Quantifizierung der Ki-67- positiven Zellen in 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-MTS	52
Abbildung 36: Übersicht der verschiedenen Effekte einer veränderten LOX(L)-Aktivität in 2D-Zellkulturen, 3D-MTS und Tumoren.....	53
Abbildung 37: mRNA-Expressionsanalyse verschiedener Wachstumsfaktoren/Zytokine nach β APN-Behandlung in MT6- und 4T1-2D-Zellkulturen	54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 38: mRNA-Expressionsanalyse verschiedener Wachstumsfaktoren/Zytokine bei LOX-/LOXL2-Überexpression in 4T1-2D-Zellkulturen, 4T1-MTS und 4T1-Tumoren	55
Abbildung 39: Hypothese: Die LOX(L)-Inhibierung könnte die Zellproliferation und damit das Tumorwachstum auf zwei unterschiedlichen Wegen beeinflussen	58
Abbildung 40: Auswirkungen der LOX(L)-Inhibierung auf die MVD im Tumor	62
Abbildung 41: mRNA-Expressionsanalyse von VEGF-A in 4T1-, MT6-, E0771-, EMT6- und LLC-Tumoren nach β APN-Behandlung	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: murine Tumorlinien	15
Tabelle 2: Primärantikörper	16
Tabelle 3: Sekundärantikörper	17
Tabelle 4: Wachstumsfaktoren: Plex 1	20
Tabelle 5: Wachstumsfaktoren: Plex 2	20
Tabelle 6: Primersequenzen: Plex 1	21
Tabelle 7: Primersequenzen: Plex 2	21
Tabelle 8: Liste der verwendeten Geräte	22
Tabelle 9: RT-Mastermix (für einen RT-Ansatz)	30
Tabelle 10: RT-Programm	30
Tabelle 11: PCR-Mastermix (für einen PCR-Ansatz)	32
Tabelle 12: PCR-Programm	32

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AAS	Peptidyl- α -Amino adipic- δ -Semialdehyde
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
Angpt	Angiopoetin
Aquadest	aqua destillata
Arg-1	Arginase-1
A.U.	arbitrary unit
BMP-1	knochenmorphogenetisches Protein-1 (bone morphogenetic protein-1)
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serum-Albumin (bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA (copy DNA)
CICasp-3	Cleaved Caspase-3
CRL	Zytokinrezeptor-ähnlich (cytocin receptor-like)
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4'-6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure, DNS (deoxyribonucleic acid)
dsDNA	doppelsträngige DNA (double-stranded DNA)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid)
EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	fokale Adhäsionskinase
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
fw	forward
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte-colony-stimulating factor)

Abkürzungsverzeichnis

GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor)
Hif	Hypoxie-induzierter Faktor
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H33342	Hoechst33342
iNOS	inducible nitric oxide synthase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kPa	Kilopascal
LLC	Lewis Lung Carcinoma
LOX	Lysyloxidase
LOX(L)	Lysyloxidasen (LOX + LOXL1-4)
LTQ	Lysyl-Tyrosyl-Quinon
M	Mol
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm ³	Kubikmillimeter
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	messenger RNA
MTS	multizelluläre Tumorsphäroide
MVD	mikrovaskuläre Blutgefäßdichte (microvascular vessel density)
n	Anzahl
n. a.	nicht auffindbar
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NGS	Normal-Goat-Serum
NPG	Neopentylglykol
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)

Abkürzungsverzeichnis

PDGF	platelet-derived growth factor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pos.	positiv
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT	reverse Transkriptase
rv	reverse
SCF	Stammzellfaktor (stem cell factor)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
SLS	Sample Loading Solution
SRCR	scavenger receptor cysteine-rich
Tab.	Tabelle
TGF- β	transforming growth factor-beta
TMU	Tumormikroumgebung
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
vgl.	vergleiche
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
z. B.	zum Beispiel
β APN	β -Aminopropionitril
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Die Krebserkrankung

Die Diagnose „Krebs“ stellt noch heute Ärzte und Wissenschaftler vor eine große Herausforderung. Im Jahr 2012 wurden weltweit 14,1 Millionen Neuerkrankungen registriert, während 8,2 Millionen Menschen der Krankheit erlagen. Die am häufigsten diagnostizierten Krebsarten waren Lungen-, Brust- und Kolonkrebs, wobei Lungenkrebs die meisten Todesopfer forderte. Nach Schätzungen der WHO im Jahr 2011 verursacht Krebs mittlerweile mehr Todesfälle als die Folgen der koronaren Herzkrankheit oder von Schlaganfällen [1].

Tumore können aus jeglichen abnormal proliferierenden Körperzellen hervorgehen. Über 100 verschiedene Krebsarten sind bekannt. Selbst innerhalb eines gleichen Organs existieren noch weitere Tumorsubtypen [2-4]. Die unterschiedlichen Krebsarten können sich in ihrem Verhalten und der Reaktion auf die Therapie wesentlich unterscheiden. Allgemein differenziert man benigne von malignen Tumoren. Benigne Tumore wachsen verdrängend und nicht-infiltrativ. Außerdem bleiben sie auf ihren Entstehungsort lokalisiert. Dagegen wachsen maligne Tumore invasiv in das umgebende Gewebe und besitzen die Fähigkeit zu metastasieren. Nur Letztere werden sachgemäß zu den Krebserkrankungen gezählt [4].

Das Genom, auch als Erbgut bezeichnet, umfasst die Gesamtheit der Erbinformationen einer Zelle. Jeder zellulären Veränderung geht eine spezifische genomische und/oder epigenetische Modifikation voraus. Die notwendigen Voraussetzungen, welche eine Zelle veranlassen, maligne zu entarten, liegen daher in Änderungen des Erbguts. Diese genomischen Modifikationen führen dann zu den für Krebszellen charakteristischen phänotypischen Veränderungen [3]. So besteht normalerweise ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und -apoptose. Krebszellen weisen jedoch Defekte innerhalb der für diese Prozesse zuständigen Regulationsmechanismen auf [2]. Mutationen können diesen genetischen Schaden auf zwei verschiedenen Wegen anrichten: Zum einen können Proto-Onkogene mutieren, wodurch es zu einer konstant verstärkten Funktion kommen kann oder sich neue Eigenschaften entwickeln können. Zum anderen können Mutationen zu einem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen führen. Proto-Onkogene fördern unter anderem Zellteilung, -wachstum und -überleben [2, 5, 6]. Tumorsuppressorgene regulieren normalerweise den Zellzyklus, verhindern ein uneingeschränktes Zellwachstum und vermitteln DNA-Reparaturmechanismen. Bei Funktionsverlust wird der natürliche Zelltod nicht mehr eingeleitet, was in einer

übermäßigen und ungebremsten Zellproliferation resultiert [6]. Es sind zahlreiche Risikofaktoren für Krebserkrankungen bekannt. Nur etwa fünf bis zehn Prozent der für die Krebsentstehung ursächlichen Mutationen sind erblich bedingt. Den Hauptrisikofaktor stellt die Lebensweise des Menschen dar. Dies betrifft vor allem übermäßigen Tabak- und Alkoholkonsum, Ernährungsgewohnheiten, Fettleibigkeit, aber auch Infektionen. In bis zu 95 % bedingen diese Risikofaktoren die Entstehung einer Krebserkrankung [7].

1.2 Chemotherapie

Die Krebsbehandlung stützt sich auf drei Säulen. Die operative Entfernung des Tumors, die Radiotherapie und die systemische Therapie mittels Zytostatika [8, 9]. Eine systemische Chemotherapie bei soliden Tumoren kann als kurative oder palliative Maßnahme erfolgen. Eine kurative Therapie hat eine Heilung zum Ziel. Dabei kann die Chemotherapie adjuvant nach Resektion des Tumors erfolgen, um mögliche, klinisch nicht nachweisbare Mikrometastasen zu behandeln. Andererseits kann sie neoadjuvant eingesetzt werden, das heißt präoperativ, mit dem Ziel die Tumorausdehnung vor der chirurgischen Resektion zu verringern. Ein palliatives Eingreifen dient hingegen dazu, den Krankheitsprogress zu verlangsamen und die Lebensqualität des Patienten zu verbessern. Dies ist in Fällen sinnvoll, in welchen keine vollständige Genesung mehr zu erwarten ist. Bei einer Krebserkrankung im fortgeschrittenen Stadium, welches sich z. B. in einer Inoperabilität aufgrund der Tumorgröße bzw. -lage oder einer Metastasierung äußern kann, nimmt die systemische Chemotherapie eine wichtige Rolle ein. Es werden Zytostatika, auch als Chemotherapeutika bezeichnet, eingesetzt. Diese inhibieren durch verschiedene Mechanismen die Zellteilung von Tumorzellen, beispielsweise durch eine Induzierung von DNA-Schäden oder durch eine Unterbrechung der Mitose [10]. Die therapeutische Breite von Zytostatika ist jedoch gering: Zum einen wirken sie auf alle schnell proliferierenden, das heißt schnell wachsenden und sich teilenden Zellen im Körper. Dies trifft zwar auf Tumorzellen zu, jedoch auch auf einige gesunde Körperzellen, wie Darmepithel- und Haarfollikelzellen. Aufgrund dieser teilweise nur geringen Selektivität zwischen Tumor- und Normalzellen entstehen die oft erheblichen Nebenwirkungen. Diese können beispielsweise Übelkeit, Magen-Darm-Beschwerden oder Schädigungen des Immunsystems sein, welche häufig einen frühzeitigen Therapieabbruch bedingen [10, 11]. Zum anderen kann der Tumor resistent gegenüber der verwendeten Chemotherapie sein. Oft spricht die Therapie initial an, verliert dann jedoch schrittweise an Wirkung und resultiert schließlich in einem erneuten Tumorwachstum. Zwei Gründe können dafür ursächlich sein: Die Tumorzellen sind aufgrund

genetischer Charakteristika grundsätzlich resistent gegenüber der Chemotherapie oder sie entwickeln eine sekundäre Resistenz im Laufe der Behandlung [9].

Da die Chemotherapeutika über das Blut in den Tumor gelangen, verteilen sie sich im ganzen Körper [11]. So wurde bereits für verschiedene Medikamente gezeigt, dass deren Konzentration nach systemischer Gabe im Tumorgewebe geringer war als in gesunden Geweben. Eine höhere Dosis würde jedoch zu noch stärkeren Nebenwirkungen auf den Gesamtorganismus führen [12, 13].

1.3 Tumormikroumgebung

Tumore bestehen nicht nur aus einer Ansammlung maligner Zellen, sondern bilden eine Art komplexes, bösartiges Organ. Die Tumormikroumgebung (TMU) wird aus der extrazellulären Matrix (EZM), dem Gefäßsystem des Tumors, sezernierten Wachstumsfaktoren, einer Vielzahl an Tumor-assoziierten Zellen, den eigentlichen Tumorzellen und deren wechselseitigen Interaktionen gebildet (vgl. Abb. 1) [14, 15]. Die TMU kann sich zwischen einzelnen Tumoren stark unterscheiden. Das hat wichtige klinische Auswirkungen, da sie einen großen Einfluss auf den Verlauf und die Behandlung der Krebserkrankung ausübt. Die bösartige TMU ist z. B. für die für solide Tumore typische reduzierte Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen verantwortlich. Dadurch wird das maligne Verhalten weiter bestärkt, da sowohl Hypoxie als auch metabolischer Stress Invasivität und Metastasierung fördern [16-18].

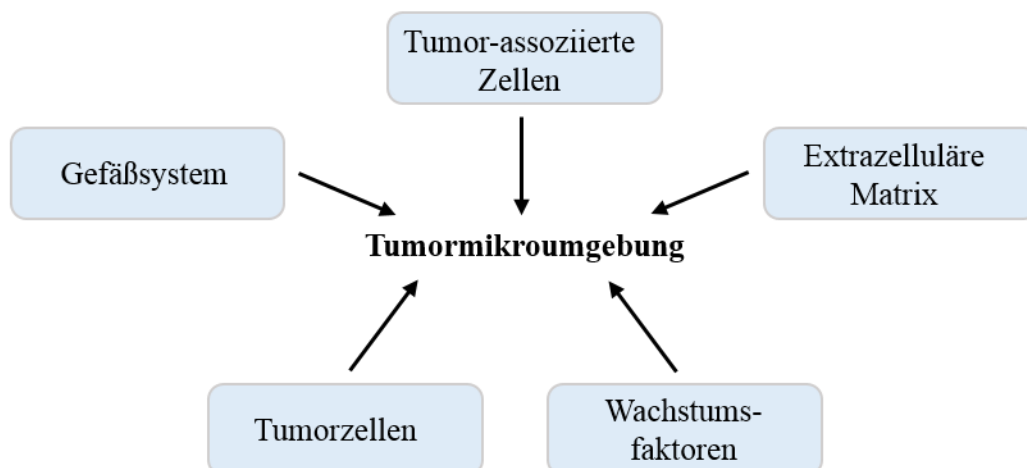


Abbildung 1: Zusammensetzung der Tumormikroumgebung. Das Gefäßsystem, tumor-assoziierte Zellen, die extrazelluläre Matrix, Wachstumsfaktoren und die eigentlichen Tumorzellen bilden zusammen mit deren wechselseitigen Interaktionen die Mikroumgebung des Tumors.

1.3.1 Tumor-assoziierte Zellen

Tumor-assoziierte Zellen, wie Makrophagen, Fibroblasten oder Lymphozyten, haben oftmals tumor-unterstützende Zellfunktionen, da deren Phänotyp durch den Tumor geändert werden kann [19]. So können z. B. Monozyten zu Tumor-assoziierten Makrophagen ausdifferenzieren, welche Zytokine produzieren, die dann unter anderem eine Metastasierung fördern [20]. Die interzelluläre Kommunikation innerhalb der TMU wird durch komplexe Interaktionen von Zytokinen und Enzymen gesteuert [15]. Von allen Tumor-assoziierten Zellen nehmen Tumor-assoziierte Makrophagen den größten Teil ein [21]. Die Analyse Tumor-assoziiierter Makrophagen im Tumor wird jedoch dadurch erschwert, dass im Tumormikromilieu verschiedene Makrophagentypen mit unterschiedlichen Eigenschaften nachgewiesen werden können. Tumor-assoziierte Makrophagen sind in der Lage, ihren Phänotyp in Abhängigkeit verschiedener Umweltstimuli zu ändern. Zwei Hauptgruppen werden unterschieden: Klassisch aktivierte M1-Subtypen und alternativ aktivierte M2-Subtypen. Während M1-Makrophagen gegen den Tumor gerichtet sind, besitzen M2-Makrophagen den Tumor unterstützende Zellfunktionen [21, 22].

1.3.2 Gefäßsystem des Tumors

Auch das Blutgefäßsystem des Tumors wirkt sich auf die therapeutische Effizienz von Chemotherapeutika aus. So spielen die Blutgefäßdichte und -qualität eine wichtige Rolle in der Verteilung und Einbringung der Medikamente in das Tumorgewebe [23, 24]. Gefäße in Tumoren sind unreif, stark verzweigt, mit wenig Perizyten besetzt und permeabler als Blutgefäße in nicht-neoplastischen Geweben. Es entsteht dadurch ein inkonsistenter und ungleichmäßiger Blutfluss. Die schlechte Durchblutung führt wiederum zu einer verringerten Medikamenteneinbringung in das Tumorgewebe. Das ineffiziente Gefäßnetzwerk resultiert aus einer stark pro-angiogenetischen Tumormikroumgebung [24, 25]. Das permanent stark pro-angiogenetische Milieu führt dazu, dass sich vaskuläre endotheliale Zellen in einem konstant aktivierten Status befinden, wodurch die Blutgefäße kontinuierlich umgeformt werden [11]. Eines der wichtigsten pro-angiogenetischen Zytokine ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor-A (VEGF-A), welcher in vielen Tumoren überexprimiert wird. VEGF-A stimuliert die Migration und Proliferation von Endothelzellen und führt darüber hinaus zu einer höheren Permeabilität von Blutgefäßen. Hypoxische Bedingungen und eine vermehrte

Expression von bestimmten Wachstumsfaktoren, wie des platelet-derived growth factors (PDGF), stimulieren die Expression von VEGF-A [26].

1.3.3 Extrazelluläre Matrix

Die EZM besteht aus einem dichten Netzwerk quervernetzter Proteine und kommt in Organen oder auch als spezialisierte Form in Basallaminae vor [27]. Die EZM im Tumor unterscheidet sich deutlich von jener im normalen bzw. nicht-malignen Gewebe. Einer der Hauptunterschiede der EZM im Tumor im Vergleich zur derjenigen im Normalgewebe ist deren gesteigerte Masse. Diese kann bis zu 60 % des Tumolvolumens einnehmen. Des Weiteren ist das Gewebe durch enzymatische Modifikationen wesentlich rigider [24]. Die EZM übt großen Einfluss auf die Tumorprogression aus: So unterstützt sie die Zellmigration und steigert außerdem das Wachstum und Überleben von Tumorzellen. Das veränderte Zellverhalten, wie es in der dichten und rigiden EZM von Tumoren beobachtet wurde, kann die Effektivität der Zytostatika und die Reaktion auf die Therapie wesentlich beeinflussen [28-30]. Neben dem bereits erwähnten Problem, dass sich Medikamente nicht nur im Tumor, sondern im ganzen Körper verteilen, besteht ein weiteres großes Problem hinsichtlich des Medikamententransportes: Die heterogene Verteilung der Zytostatika innerhalb eines Tumors. Dadurch werden viele Tumorzellen gar nicht oder zumindest in keiner therapeutisch relevanten Medikamentenkonzentration erreicht [24]. Die Zusammensetzung und Eigenschaften der EZM üben einen wichtigen Einfluss auf die Medikamentendiffusionsrate des Tumors aus. Die EZM formt eine regelrechte Barriere, welche von Medikamenten erst überwunden werden muss, um an die einzelnen Tumorzellen zu gelangen. Dadurch wird ein effektiver Transport der Medikamente innerhalb des Tumors beeinträchtigt [24, 31, 32].

Kollagen ist das häufigste Gerüstprotein in der EZM und trägt wesentlich zu deren GewebestEIFheit bei. Die Kollagenquervernetzung führt zu einer Gewebefibrosierung, welche wiederum das Malignitätsrisiko erhöhen kann. Verschiedene Enzyme, wie beispielsweise Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Lysyloxidasen (LOX(L)), tragen zur Reifung und Organisation der Kollagene bei und üben so einen wichtigen Einfluss auf die Stabilität und biomechanischen Eigenschaften der EZM aus [29]. Eine erhöhte LOX(L)-Expression wird mit einer schlechten Prognose verknüpft, da sie zu einer erhöhten Invasion und Migration von Tumorzellen führt [33]. Dies wiederum kann eine Metastasierung begünstigen [34]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von LOX oder LOXL2 durch eine

verstärkte Kollagenquervernetzung den Wirkstofftransport in das Tumorgewebe beeinträchtigt [11].

1.4 Lysyloxidasen

Die LOX(L)-Familie besteht aus LOX und vier paralogen LOX-like Proteinen, LOXL1-4 (vgl. Abb. 2). Alle Mitglieder sind kupferabhängige Aminoxygenasen. Die Hauptfunktion der LOX(L)-Familie besteht in der kovalenten Quervernetzung von Elastin und Kollagenfasern in der EZM [35, 36].

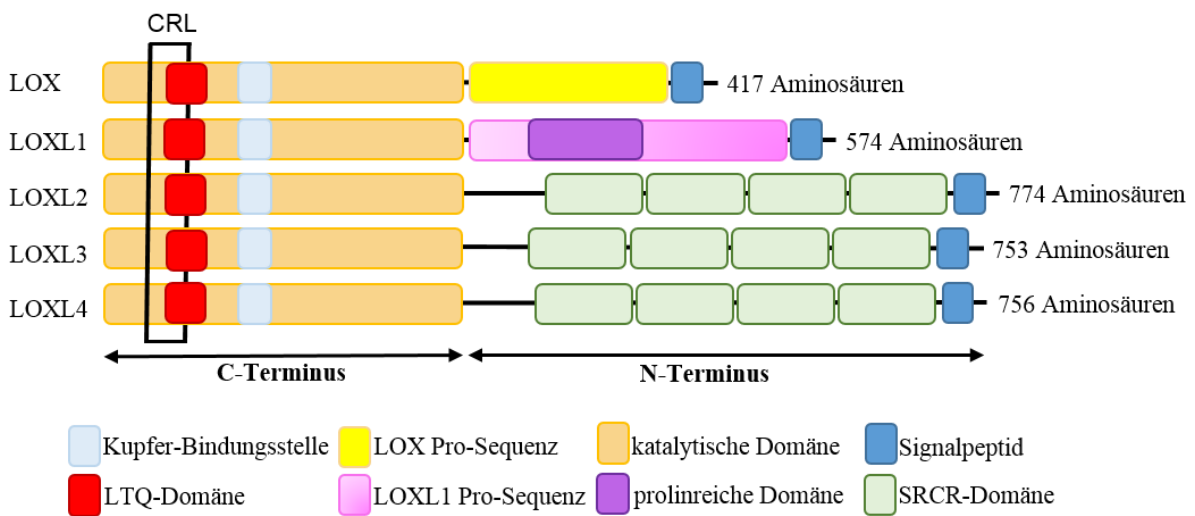


Abbildung 2: Struktur der LOX(L)-Familienmitglieder. Alle LOX(L)-Mitglieder besitzen einen hoch konservierten C-Terminus. Dieser beinhaltet eine Kupfer-Bindungsstelle, eine LTQ-Domäne und eine CRL-Domäne. Dahingegen unterscheiden sich die N-Termini innerhalb der LOX(L)-Familienmitglieder. Alle Mitglieder besitzen ein Signalpeptid, jedoch nur LOX und LOXL1 eine Pro-Sequenz. Der N-Terminus von LOXL1 weist außerdem eine prolinreiche Domäne auf. Neben dem Signalpeptid umfassen die N-Termini von LOXL2, LOXL3 und LOXL4 jeweils vier SRCR-Domänen. Modifiziert nach Barker et al. (2012) [35].

Aufbau: Die Proteine der LOX(L)-Familie besitzen einen hoch konservierten C-Terminus mit einer Kupfer-Bindungsstelle, einer Lysyl-Tyrosyl-Quinon(LTQ)-Cofaktor-Domäne und einer Zytokinrezeptor-ähnlichen(CRL)-Domäne. Die Kupfer-Bindungsstelle und die LTQ-Cofaktor-Domäne sind für die Proteinkonformation und die katalytische Aktivität der LOX(L)-Proteine essentiell. Im Gegensatz zum konstanten C-Terminus ist der N-Terminus der LOX(L)-Familienmitglieder mannigfaltiger. LOX und LOXL1-4 besitzen ein Signalpeptid, jedoch lediglich LOX und LOXL1 eine Pro-Sequenz. LOXL1 beinhaltet außerdem eine prolinreiche Domäne. Dahingegen enthalten die N-Termini von LOXL2, LOXL3 und LOXL4 jeweils vier

Einleitung

scavenger receptor cysteine-rich(SRCR)-Domänen. Diese SRCR-Domänen sind vermutlich an der Zelladhäsion und an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt [35, 37].

Biosynthese von LOX: Die LOX-Synthese erfolgt über ein Vorläuferpeptid. Das Gen, welches für das LOX-Protein kodiert, ist auf dem humanen Chromosom 5 (5q23.2-q31.2) lokalisiert [38]. LOX wird als ein 46 kDa schweres Prä-Proenzym synthetisiert. Dieses umfasst eine N-terminale Signalsequenz von 21 Aminosäuren, eine propeptidische Domäne und eine katalytisch aktive Domäne. Nach Abspaltung der Signalsequenz folgt eine N-Glykosylierung im Golgi-Apparat zu einem 50 kDa schweren Proenzym, welches anschließend in den Extrazellulärraum sekretiert wird. Schließlich wird das Proenzym in ein katalytisch aktives, reifes 32 kDa schweres Protein und ein 18 kDa schweres LOX-Propeptid gespalten. Diese Reaktion wird durch das knochenmorphogenetische Protein-1 (BMP-1), eine Metalloproteinase, katalysiert [36, 38-41].

Funktionsweise: Die Hauptfunktion der LOX(L) ist die post-translationale kovalente Quervernetzung von Kollagen und Elastin in der EZM. Während dieser Reaktion katalysieren sie die oxidative Desaminierung von spezifischen Peptidyllysine-Resten in Kollagenfasern und Elastin-Proteinen zu Peptidyl- α -Amino adipic- δ -Semialdehyden (AAS) (vgl. Abb. 3). Für die katalytische Aktivität von LOX werden ein Kupferatom und der LTQ-Cofaktor benötigt. Die entstandenen hochreaktiven Semialdehyde können spontan mit benachbarten Aldehyden oder mit ϵ -Aminogruppen der Peptidyllysine kondensieren, wodurch die kovalente Quervernetzung entsteht [36, 37]. Diese Quervernetzung führt zu einer erhöhten Gewebesteifheit und dadurch zu einer reduzierten Medikamentendiffusionsrate innerhalb des Tumors [11].

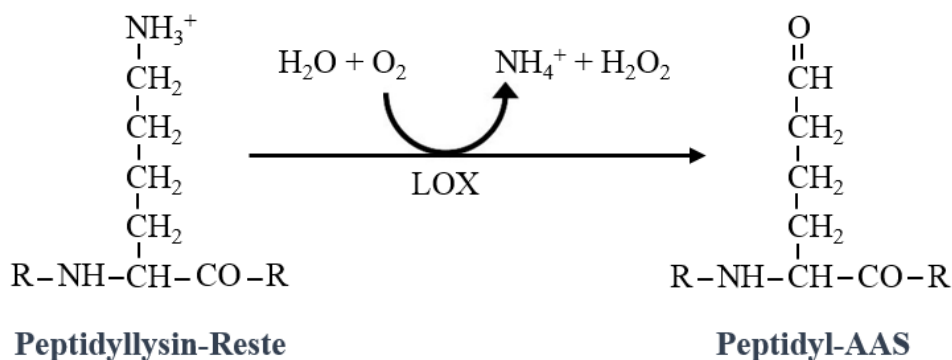


Abbildung 3: Oxidative Desaminierung von Peptidyllysine-Resten zu Peptidyl-AAS, katalysiert durch die Proteinfamilie der Lysyloxidasen. Modifiziert nach Lucero & Kagan (2006) [37].

Die Funktion von LOX ist für die normale Bindegewebsfunktion essentiell. Die entstandene Quervernetzung von Kollagenen und Elastinen reguliert die Rigidität und strukturelle Integrität der umliegenden Gewebe [42]. Hornstra *et al.* (2003) berichteten darüber, dass LOX-Knockout-Mäuse während oder kurz nach der Geburt starben. Die fehlende Bindegewebeformation führte zu einer Insuffizienz der Aorta und des Diaphragmas, was die funktionelle Bedeutung der LOX(L)-Familie unterstreicht [43].

Die Expression von LOX und LOXL1-4 wird normalerweise streng kontrolliert. Eine Hochregulation und übermäßige Aktivität der Proteine konnte jedoch in vielen Krebsarten gezeigt werden [44]. Die vermehrte LOX-Expression wird dabei mit einer erhöhten Metastasierungsrate und verringerten Überlebenschance in Verbindung gebracht [45]. Geläufige Inhibitoren der LOX(L)-Familie sind β -Aminopropionitril (β APN) oder spezifische Antikörper. Eine Inhibierung von LOX(L) führte zu einer reduzierten Metastasierung und Invasion in präklinischen Tumormodellen [18].

1.5 Vorarbeiten

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden Auswirkungen auf das Tumorstadium, die Nekrotisierung des Tumorgewebes, die Medikamenteneinbringung, die Makrophageninfiltration und die Blutgefäßdichte in fünf verschiedenen murinen Tumormodellen, nach einer LOX(L)-Hemmung mittels β APN-Behandlung, analysiert. Bei den untersuchten Tumoren handelte es sich um 4T1-, EMT6- und E0771-Mammakarzinome, Lewis Lung Karzinome (LLC) und MT6-Fibrosarkome [11, 24, 46, 47].

1.5.1 Tumorstadium nach LOXL(L)-Inhibierung

Das Wachstum von verschiedenen Tumormausmodellen unter einer Behandlung mit β APN wurde in der Dissertationsarbeit von Röhrig (2015) untersucht [46]. Nachdem die Tumore voll etabliert waren, das bedeutet nach Überschreiten eines durchschnittlichen Volumens von 50 mm^3 , startete die Behandlung. Beginnend neun bis 17 Tage nach der jeweiligen Tumorzellimplantation erhielten die Mäuse eine tägliche intraperitoneale Injektion mit β APN-Fumarat in 0,9 % Kochsalzlösung, 100 mg/kg Körpergewicht (KG). Die Kontrollgruppe erhielt Natrium-Fumarat in 0,9 % Kochsalzlösung. Sobald einzelne Tumore ein Volumen von 1000 mm^3 erreicht hatten, wurde der Versuch abgebrochen und es folgte die Tumorstadiumresektion [24, 46].

Einleitung

Mehrere Studien berichteten von einem konstant verringerten Tumorwachstum nach der Inhibierung von LOX(L) [18, 33, 48]. Im Gegensatz dazu wiesen Röhrigs Ergebnisse eine deutliche Divergenz im Verhalten verschiedener Tumore hinsichtlich ihres Wachstums nach der LOX(L)-Hemmung mittels β APN auf. Lediglich 4T1-Tumore reagierten auf die β APN-Behandlung mit einem geringeren Wachstum, während das Wachstum der LLC-Tumore sogar zunahm. Bei den drei anderen untersuchten Tumoren (MT6, EMT6 und E0771) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungs- und Kontrollgruppen (vgl. Abb. 4) [24, 46]. Das unterschiedliche Tumorwachstum hat beträchtliche Auswirkungen auf den klinischen Einsatz von LOX(L)-Inhibitoren als pharmakologische Medikation. Es stellt sich somit die Frage, warum die Tumore so unterschiedlich auf die Inhibierung von LOX(L) reagieren. Deshalb soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welche Faktoren/Prozesse für das unterschiedliche Wachstum verantwortlich sein könnten.

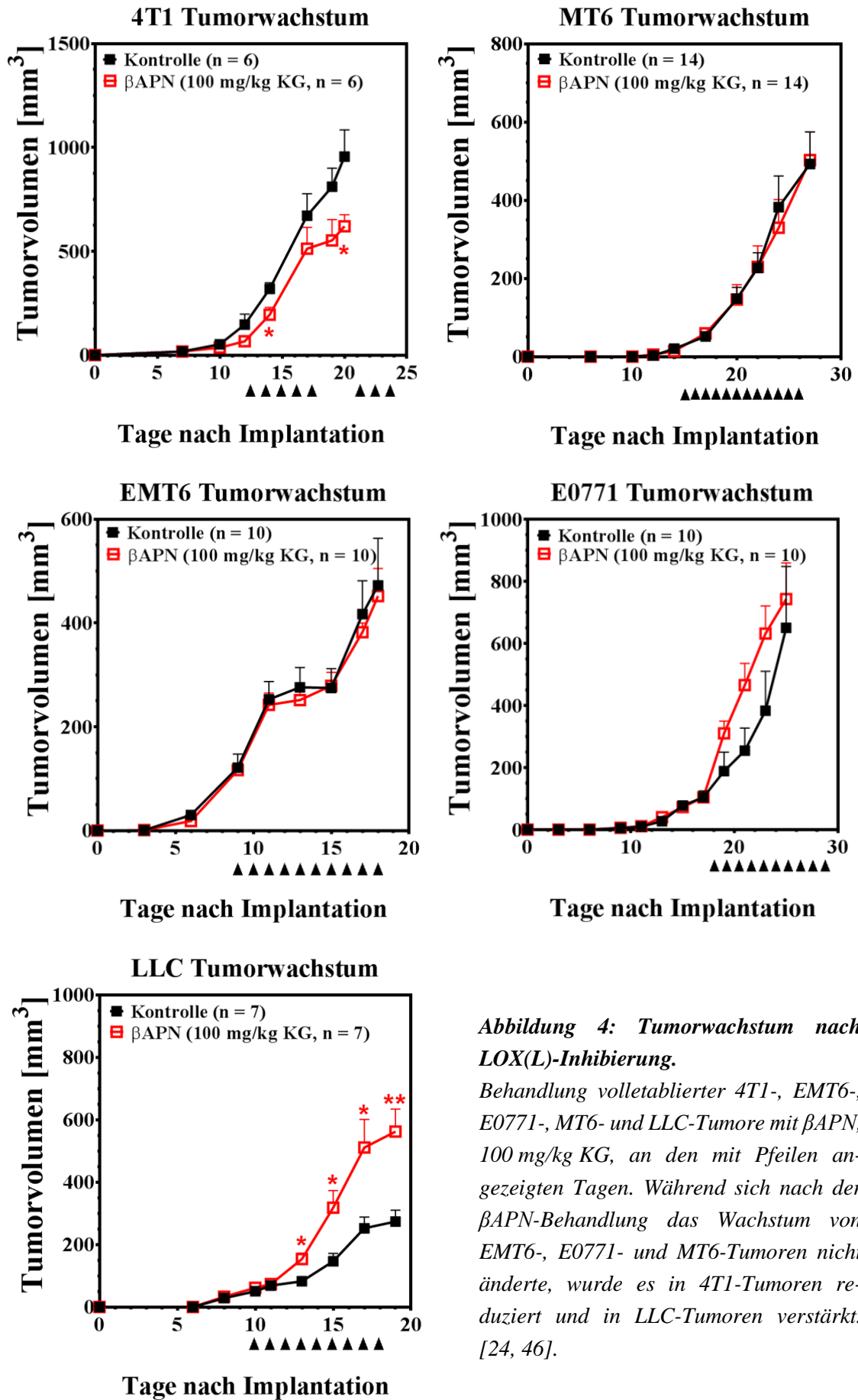


Abbildung 4: Tumorwachstum nach LOX(L)-Inhibierung.

Behandlung vollstablierter 4T1-, EMT6-, E0771-, MT6- und LLC-Tumore mit β APN, 100 mg/kg KG, an den mit Pfeilen angezeigten Tagen. Während sich nach der β APN-Behandlung das Wachstum von EMT6-, E0771- und MT6-Tumoren nicht änderte, wurde es in 4T1-Tumoren reduziert und in LLC-Tumoren verstärkt. [24, 46].

1.5.2 Nekrotisierung des Tumorgewebes nach LOX(L)-Inhibierung

Trotz der unterschiedlichen Wachstumsraten nach der LOX(L)-Inhibierung mit β APN zeigten die MT6- und 4T1-Tumore eine signifikante Verringerung des nekrotischen Gewebeanteils im Tumor [24]. In dieser Arbeit soll ergänzend der nekrotische Gewebeanteil nach β APN-Behandlung in den LLC-, EMT6- und E0771-Tumoren untersucht werden.

1.5.3 Medikamenteneinbringung in das Tumorgewebe und relative Permeabilität der EZM nach LOX(L)-Inhibierung

Röhrig (2015) zeigte in seiner Dissertationsarbeit, dass eine LOX(L)-Inhibierung in allen fünf Tumorlinien zu einer erhöhten Penetration des injizierten Farbstoffes Hoechst33342 (H33342) in das umgebende Tumorgewebe führte. Außerdem belegte er, dass eine LOX(L)-Inhibierung auch einen positiven Einfluss auf die Medikamentenakkumulation von Doxorubicin ausübt. So konnte nach β APN-Behandlung in 4T1-, EMT6- und MT6-Tumoren eine signifikant erhöhte Anreicherung von Doxorubicin beobachtet werden. Um zu beweisen, dass Änderungen in der EZM ursächlich für die reduzierte Versorgung waren, testete Röhrig außerdem die Permeabilität von Doxorubicin mittels eines Transwell-Permeabilitätsassays an isolierter EZM unbehandelter und β APN-behandelter Tumoren. Dabei konnte in allen Tumorlinien nach β APN-Behandlung eine erhöhte Permeabilität für Doxorubicin gezeigt werden, die für vier der fünf Tumorlinien statistisch signifikant war [46]. Die gleichen Untersuchungen sollen ferner bei einer ektopischen Überexpression von LOX-/LOXL2 in 4T1-Tumoren untersucht werden.

1.5.4 Makrophageninfiltration nach LOX(L)-Inhibierung

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass es in vier der fünf Tumorlinien nach LOX(L)-Inhibierung zu einer veränderten Dichte aller Makrophagen kam. Während in 4T1- und E0771-Tumoren mehr Makrophagen nach β APN-Behandlung zu sehen waren, wurden in EMT6- und MT6-Tumoren weniger Makrophagen beobachtet. Zwischen β APN-behandelten und unbehandelten LLC-Tumoren konnten keine signifikanten Änderungen in der Anzahl der Makrophagen festgestellt werden. Für die Analyse wurde der Antikörper F4/80 verwendet, ein nicht-selektiver Makrophagenmarker [47]. Weiterhin soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine LOX(L)-Inhibierung auch zu einer Verschiebung innerhalb der

Makrophagenpopulationen führen würde, also zu einer veränderten Anzahl an M1- bzw. M2-Makrophagen.

1.5.5 Blutgefäßdichte nach LOX(L)-Inhibierung

Der Vergleich zwischen β APN-behandelten und unbehandelten Tumoren ergab einen signifikanten Rückgang an CD34(Endothelzellmarker)-positiven Zellen in den 4T1-, MT6- und EMT6-Tumoren. Bei den LLC- und E0771-Tumoren waren keine wesentlichen Unterschiede zu sehen. Da MT6-Tumorzellen selbst viel CD34 exprimieren, wurden nur Flächen mit keinen bzw. geringen CD34-positiven Tumorzellen für die Quantifizierung ausgewertet. Das Ergebnis wurde außerdem mit einem Alternativmarker (CD31) verifiziert (vgl. Abb. 5, 6) [47, 49]. In der vorliegenden Arbeit soll ferner die Blutgefäßdichte bei einer LOX-/LOXL2-Überexpression in 4T1-Tumoren untersucht werden.

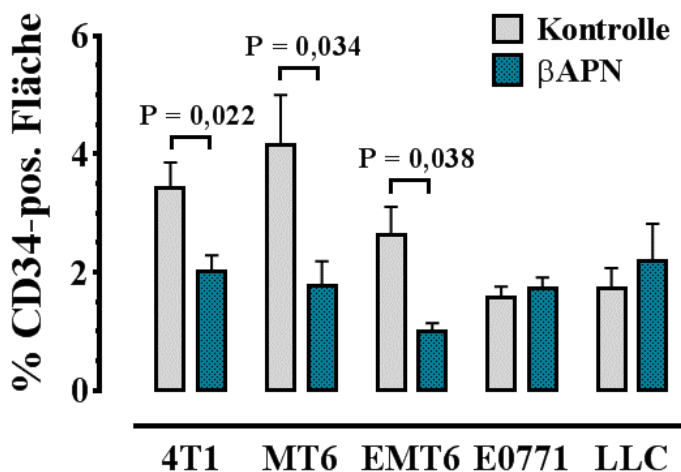


Abbildung 5: Quantifizierung der CD34-positiven Fläche in 4T1-, MT6-, EMT6-, E0771- und LLC-Tumoren. Nach β APN-Behandlung ist in den 4T1-, MT6- und EMT6-Tumoren ein signifikanter Rückgang der Blutgefäßdichte zu sehen. In den E0771- und LLC-Tumoren zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der jeweiligen Behandlungs- und Kontrollgruppe. $n = 5$. Fehlerbalken \pm SEM. [47, 49].

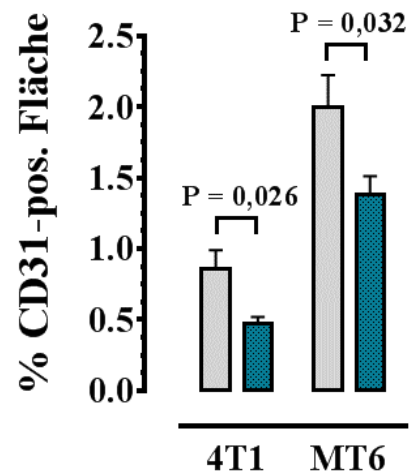


Abbildung 6: Quantifizierung der CD31-positiven Fläche in 4T1- und MT6-Tumoren. Auch mit dem alternativen Gefäßmarker CD31 kann eine signifikant verringerte Blutgefäßdichte in 4T1- und MT6-Tumoren festgestellt werden. $n = 5$. Fehlerbalken \pm SEM. [47, 49].

1.5.6 mRNA-Expressionsanalyse in β APN-behandelten Tumoren

In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren/Zytokine nach LOX(L)-Inhibierung in den fünf Tumoren untersucht. Die Expression von Angiopoetin-2 (Angpt2) sank in drei der fünf Tumormodelle (4T1, MT6 und LLC), während sie in den E0771-Tumoren stieg. Die PDGF-B-Expression stieg in den EMT6- und E0771-Tumoren, wohingegen sie in den MT6-Tumoren verringert wurde. Besonders in den 4T1-Tumoren konnte insgesamt nach LOX(L)-Inhibierung ein weniger malignes Genexpressionsprofil beobachtet werden. Über die Richtung der Expression der übrigen Faktoren ließen sich keine einheitlichen Aussagen treffen (vgl. Abb. 7) [47, 49]. Um direkte von sekundären und tertiären Effekten der LOX(L)-Aktivität zu differenzieren, wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich β APN-behandelte 4T1- und MT6-2D-Zellkulturen, sowie 4T1-2D-Zellkulturen, 4T1-3D-Zellkulturen und 4T1-Tumore bei LOX-/LOXL2-Überexpression untersucht.

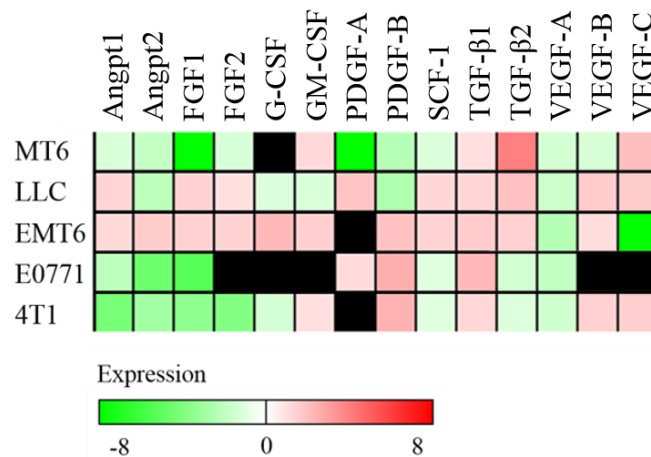


Abbildung 7: mRNA-Expressionsanalyse verschiedener Wachstumsfaktoren/Zytokine in MT6-, LLC-, EMT6-, E0771- und 4T1-Tumoren nach β APN-Behandlung. Die Analyse wurde mittels einer Multiplex RT-PCR durchgeführt. Anhand der Farbskala kann die Stärke der veränderten Expression abgelesen werden. Rot = erhöhte Expression, grün = verminderte Expression, schwarz = Wachstumsfaktor/Zytokin nicht auffindbar. n = 4. [47, 49].

1.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Aufbauend auf den Erkenntnissen der genannten Vorarbeiten, soll in dieser Arbeit das Potenzial von LOX(L)-Inhibitoren, die Tumorversorgung und die Effektivität des Medikamententransportes zu verbessern, in fünf verschiedenen murinen Tumormodellen (4T1, MT6, EMT6,

Einleitung

E0771, LLC) untersucht werden. Es sollen weitere Auswirkungen einer veränderten LOX(L)-Aktivität auf die Zusammensetzung des Tumorstromas anhand der genannten murinen Tumore aufgezeigt werden. Einerseits werden die Effekte einer LOX(L)-Inhibierung mit β APN in allen Tumoren untersucht, andererseits die Folgen einer ektopischen Überexpression von LOX bzw. LOXL2 in 4T1-Tumoren. Von besonderem Interesse sind dabei Änderungen hinsichtlich der Zellproliferation und -apoptose, des nekrotischen Tumorgewebes, der Blutgefäßdichte, der Hypoxie, der Expression von Wachstumsfaktoren und Tumor-assoziierten Makrophagen. Zusätzliche Kenntnisse über diese Parameter können weiteren Aufschluss darüber geben, ob und inwiefern LOX(L)-Inhibitoren die Medikamentendiffusion im Tumorgewebe verbessern. Um direkte von sekundären oder gar tertiären Effekten der LOX(L)-Aktivität auf die jeweiligen Tumorbestandteile zu unterscheiden, wurden neben etablierten Tumoren auch 2D-Zellkulturen und 3D-multizelluläre Tumorsphäroide (MTS) zusätzlich zu den Tumoren untersucht. Die veränderte Expression der Wachstumsfaktoren wurde mittels mRNA-Quantifizierung auf einer multiplexfähigen Plattform (GeXP, *Beckman Coulter*) durchgeführt. Alle weiteren Parameter wurden mittels immunhistochemischer Färbungen und Immunfluoreszenzfärbungen auf fixierten Gewebeschnitten untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Murine Tumorlinien

Tabelle 1: murine Tumorlinien

Tumorlinie	Tumor	Gewebe	Mausstamm	Injektion
4T1	Adenokarzinom	Brust	BALB/c	Brustfettpolster
MT6	Sarkom	Bindegewebe	C57Bl6/J	Subkutan, unterer Rückenbereich
EMT6	Karzinom	Brust	BALB/c	Brustfettpolster
E0771	Karzinom	Brust	C57Bl6/J	Brustfettpolster
LLC	Adenokarzinom	Lunge	C57Bl6/J	Subkutan, unterer Rückenbereich

Alle Mäuse waren weiblich und gleichaltrig. Die jeweiligen Tumorzellen wurden, wie in Tabelle 1 genannt, entweder in das Brustfettpolster oder in den unteren Rückenbereich injiziert. Mit dem Überschreiten eines durchschnittlichen Tumorumfanges von 50 mm^3 begann die β APN-Behandlung. Es wurden 100 mg/kg KG bzw. 30 mg/kg KG β APN-Fumarat in $0,9 \%$ Kochsalzlösung als tägliche intraperitoneale Injektion verabreicht. Als Kontrolle diente Natrium-Fumarat in $0,9 \%$ Kochsalzlösung. Die Lungen- und Tumorsektion erfolgte, nachdem einzelne Tumore 1000 mm^3 groß waren.

Neben den β APN-behandelten Tumoren wurden im Rahmen der mRNA-Expressionsanalyse β APN-behandelte 4T1-2D- und MT6-2D-Zellen analysiert. Weiterhin wurden Folgen einer ektopischen Überexpression von LOX/LOXL2 in 4T1-Tumoren, 4T1-3D-MTS und 4T1-2D-Zellkulturen untersucht. Für die Herstellung der LOX-/LOXL2-überexprimierenden 4T1-Zellen wurde eine lentivirale Transfermethode angewendet. 3D-MTS sind kugelförmige Tumorzellaggregate, welche mittels der Liquid-Overlay-Technik mit geringen Veränderungen anhand des Protokolls nach Walser *et al.* (2013) erzeugt wurden. Dabei werden die Tumorzellen auf einer nicht adhäsiven Oberfläche, wie z. B. Agarose, inkubiert, wodurch die Tumorzellen spontan Sphäroide generieren [50].

2.2 Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen

Tabelle 2: Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Ursprung	Markierung	Firma
Arg-1	1:50	Goat	M2-Makrophagen	<i>Abcam</i> (ab60176)
CA IX	1:25 (Tumor) 1:50 (MTS)	Rabbit	Hypoxie	<i>Santa Cruz</i> (sc-25599)
CD31	1:50	Rabbit	Endothelzellen	<i>Abcam</i> (ab28364)
CD34	1:50	Rat	Endothelzellen	<i>Abcam</i> (ab8158)
ClCasp-3	1:100	Rabbit	Apoptose	<i>Cell Signaling</i> #9664
F4/80	1:50	Rat	Makrophagen	<i>Abcam</i> (ab16911)
Hif1 α	1:100	Rabbit	Hypoxie	<i>Novus Biologicals</i> (NB100-479)
iNOS	1:50	Mouse	M1-Makrophagen	<i>Biosciences</i> (BD-610432)
Ki-67	1:50	Rabbit	Proliferierende Zellen	<i>Abcam</i> (ab16667)
VEGF-A	1:100	Rabbit	VEGF-A	<i>Abcam</i> (ab46154)

Tabelle 3: Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Wirt	Markierung	Firma
Goat-anti-rabbit-biotin	1:250	Goat	Biotinylierter Antikörper	<i>Dianova</i>
Goat-anti-rat-biotin	1:250	Goat	Biotinylierter Antikörper	<i>Dianova</i>
Goat-anti-mouse-biotin	1:250	Goat	Biotinylierter Antikörper	<i>Dianova</i>
Donkey-anti-goat-cy3	1:800	Donkey	Fluorophor-gekoppelter Antikörper	<i>Dianova</i>
Goat-anti-rat-cy5	1:200	Goat	Fluorophor-gekoppelter Antikörper	<i>Dianova</i>

2.3 Chemikalien

Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	<i>Merck</i>
Aluminiumsulfat (Al ₂ (SO ₄) ₃)	<i>Merck</i>
Chloralhydrat	<i>AppliChem</i>
Citronensäure (C ₆ H ₈ O ₇)	<i>AppliChem</i>
Depex	<i>Serva</i>
Diaminobenzidin (DAB)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Direct Red	<i>Sigma-Aldrich</i>
Eosin Y	<i>AppliChem</i>
Fast Green	<i>Sigma-Aldrich</i>
Hämatoxylin	<i>Carl Roth</i>
D-Glukose	<i>AppliChem</i>
Glukose-Oxidase	<i>Sigma-Aldrich</i>
PAP-Rabbit:	<i>Dianova</i>
Kaliumsulfat (KAl(SO ₄) ₂)	<i>AppliChem</i>
Kernechtrot	<i>Merck</i>

Material und Methoden

Natriumjodat (NaJO_3)	<i>Merck</i>
Nickelsulfat (NiSO_4)	<i>Merck</i>
Tri-Natriumcitrat	<i>Applichem</i>
Tris-EDTA:	<i>Sigma-Aldrich</i>
Xylol:	<i>Sigma-Aldrich</i>

2.4 Puffer und Lösungen

Ammoniumchlorid für DAB	9 g NH_4Cl in 50 ml aqua destillata (Aquadest)
Citratpuffer, pH 6	1000 ml Aquadest 21 g Citronensäure 29,4 g Tri-Natriumcitrat
DAB	5 g DAB in 222,22 ml Tris-NaCl Puffer (pH = 7,4)
DAB-Lösung	67,5 ml Phosphatpuffer 1,35 ml NiSO_4 1,35 ml 10 % Glukose 150 μl NH_4Cl 1,5 ml DAB 225 μl Glukose-Oxidase
0,1% Eosin	0,1 g Eosin Y in Aquadest lösen
Glukose (10%) für DAB	10 g α/β D-Glukose-Gemisch in 100 ml Aquadest
Hämalaun nach Mayer	1 g Hämatoxylin in 1000 ml Aquadest lösen 0,2 g NaJO_3 50 g $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ unter Umschütteln lösen 50 g Chloralhydrat 1 g kristallisierte $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ Lösung vor Gebrauch filtrieren
Kernechtrot	1000 ml Aquadest 50 g $[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{H}_2\text{O}]$ 1 g Kernechtrot

Material und Methoden

Nickelsulfat für DAB	1,3 g NiSO ₄ in 100 ml Aquadest
0,1 M PBS, pH = 7,4	40,03 g NaCl 6,8 g Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei) 1 g KH ₂ PO ₄ 1 g KCl Substanzen mit Aquadest auf Volumen von 5 l auffüllen pH = 7,4: Einstellung mit HCl
0,1 M Phosphatpuffer, pH = 7,4	4,9 g KH ₂ PO ₄ (wasserfrei) 29,2 g [Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O]

2.5 Kits

VECTASTATIN Elite ABC Standard Kit (PK_6100)-Peroxidase:

- Reagenz A (Avidin-Lösung)
- Reagenz B (biotinyliertes Enzym)

GenomeLab™ GeXP Start Kit von Beckman Coulter:

- RT Buffer 5X
- Reverse Transcriptase
- PCR Buffer 5X
- DNase-/Rnase-freies Wasser
- DNA Size Standard-400
- Mineral Oil
- GenomeLab Sample Loading Solution
- 25 mM MgCl₂
- Thermo-Start DNA Polymerase (A25395)

2.6 Wachstumsfaktoren

Tabelle 4: Wachstumsfaktoren: Plex 1

Wachstumsfaktoren		Funktion
PDGF-A	platelet-derived growth factor-A	Wundheilung, Zellproliferation, Angiogenese
PDGF-B	platelet-derived growth factor-B	Wundheilung, Zellproliferation, Angiogenese
VEGF-A	vascular endothelial growth factor-A	Angiogenese, Vaskulogenese
VEGF-B	vascular endothelial growth factor-B	Angiogenese, Vaskulogenese
VEGF-C	vascular endothelial growth factor-C	Angiogenese, Vaskulogenese
TGF- β 1	transforming-growth-factor- β 1	Zellproliferation, Zelldifferenzierung
TGF- β 2	transforming-growth-factor- β 2	Zellproliferation, Zelldifferenzierung

Tabelle 5: Wachstumsfaktoren: Plex 2

Wachstumsfaktoren		Funktion
Angpt1	Angiopoetin-1	Angiogenese
Angpt2	Angiopoetin-2	Angiogenese
FGF1	fibroblast growth factor-1	Fibroblastenwachstum
FGF2	fibroblast growth factor-2	Fibroblastenwachstum
G-CSF	granulocyte-colony-stimulating factor	Bildung von Granulozyten im Knochenmark
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony- stimulating factor	Reifung von Makrophagen oder Monozyten
SCF	stem cell factor	Differenzierung von Stammzellen, Proliferation

2.7 Primersequenzen

Tabelle 6: Primersequenzen: Plex 1

Gen	Zugang	Länge [bp] (+Anhänge)	Forward Primer (fw) Reverse Primer (rv)
mPDGF-A	NM_008808.3	180 (216)	fw: TGGTACTGAATTTTCGCCGCC rv: ATCAACTCCCGGGGTATCTC
mPDGF-B	NM_011057.3	93 (129)	fw: CGCTCTTCCTTCCTCTCTGC rv: AGTGGTCGCTCAGCATTCA
mVEGF-A	NM_00102525 0.3	190 (226)	fw: GGCCTCCGAAACCATGAACT rv: GTCCACCAGGGTCTCAATCG
mVEGF-B	NM_011697.3	118 (154)	fw: CCCCTGTGTCCCAGTTTGAT rv: AGTTCATGCTCAGAGGCAC
mVEGF-C	NM_009506.2	200 (236)	fw: GGCGTGTTCCCTGCTCG rv: CTGGGTACAGGACAGACATCA
mTGF-β1	NM_011577.1	167 (203)	fw: CTGCTGACCCCCACTGATAC rv: GGGCTGATCCCGTTGATTTC
mTGF-β2	NM_009367.3	174 (210)	fw: CAGAGTTCAGGGTCTTCCGC rv: CTGTCACGTCGAAGGAGAGC

Tabelle 7: Primersequenzen: Plex 2

Gen	Zugang	Länge [bp] (+Anhänge)	Forward Primer (fw) Reverse Primer (rv)
mAngpt1	NM_009640.4	133 (169)	fw: ACACGTGGAGCCGGATTTCT rv: TTGTATCTGGGCCATCTCCGA
mAngpt2	NM_007426.4	144 (180)	fw: CACTACGACGACTCAGTGCAAA rv: GGTTCTGCACCACATTCTGTT
mFGF1	NM_010197.3	126 (162)	fw: AGTGGAGTGAAGAGAGCCCC rv: GGTTGAACCTCTCGGTCAGG

Material und Methoden

mFGF2	NM_008006.2	156 (192)	fw: TGTGCCAACCGGTACCTTG rv: TCGTTTCAGTGCCACATACCA
mG-CSF	NM_009971.1	181 (217)	fw: GGAGCAAGTGAGGAAGATCCA rv: GAGCTGGCTTAGGCACTGT
mGM-CSF	NM_009969.4	205 (241)	fw: AGGTAGAAGTCGTCTCTAACGAG rv: ATGAAATCCGCATAGGTGGTAACT
mSCF	NM_013598.2	195 (231)	fw: TCGTTCGAGCTACCCA rv: ACAAGAGGATTAATAGGAGCAGT

2.8 Geräte

Tabelle 8: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Magnetrührer	<i>MR 2000</i>	<i>Heidolph</i>
Mikroskope:		
Durchlichtmikroskop		<i>Carl Zeiss</i>
Fluoreszenz-Mikroskop	<i>Keyence BZ-9000</i>	<i>Keyence</i>
Konfokalmikroskop	<i>Nikon Eclipse Ti-A1</i>	<i>Nikon</i>
Mikrowelle	<i>NN-E201WM</i>	<i>Panasonic</i>
PCR-Thermocycler	<i>Thermocycler T1</i>	<i>Biometra</i>
Präzisionswaage	<i>Kern PLJ-G</i>	<i>Kern</i>
RNA-Messgerät	<i>Nanodrop 2000c</i> <i>Spectrophotometer</i>	<i>Thermo Scientific</i>
Schüttler	<i>Universalschüttler</i>	<i>Edmund Bühler</i>
Sequenzierer	<i>CEQTM 8000</i>	<i>Beckman Coulter</i>
Trockenofen		<i>Memmert</i>
Vortex	<i>Genie 2</i>	<i>Scientific Industries</i>

2.9 Färbemethoden

Ungefärbtes Gewebe kann lichtmikroskopisch nur schwer beurteilt werden, da die unterschiedlichen Strukturen relativ kontrastarm sind. Zur Erzielung einer Kontrasterhöhung werden die Gewebeschnitte mit Farbstoffen behandelt. Somit wird eine Untersuchung der Schnitte hinsichtlich ihrer zellulären Zusammensetzung ermöglicht [51].

2.9.1 Immunhistochemische Färbungen

Das Prinzip von immunhistochemischen (IHC)-Färbungen beruht auf der Identifizierung eines Stoffes mittels der Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei wird die Affinität von spezifischen Antikörpern zu bestimmten Epitopen im Gewebe genutzt. Der Antikörper ist dabei mit einem Detektionssystem gekoppelt, wodurch seine Sichtbarmachung auf dem Gewebeschnitt ermöglicht wird [52].

2.9.1.1 Diaminobenzidinfärbung

Diaminobenzidin (DAB) wird durch die Meerrettichperoxidase oxidiert. Es entsteht ein unlösliches, braunes Präzipitat, welches anschließend detektiert werden kann [52].

Zuerst werden die Gewebeschnitte für jeweils zehn Minuten in Xylol I und Xylol II entparaffiniert. Durch eine absteigende Alkoholreihe (100 % II EtOH, 100 % I EtOH, 96 % EtOH, 80 % EtOH, 70 % EtOH, Aquadest) werden die Schnitte für je fünf Minuten rehydriert. Anschließend wird die endogene Peroxidase-Aktivität mittels einer 3 % H₂O₂-Stocklösung für zehn Minuten unter Schütteln blockiert und die Schnitte zweimal für je fünf Minuten mit Aquadest gewaschen. Nun erfolgt die Antigendemaskierung: Diese kann sauer mit Citratpuffer oder basisch mit Tris-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) durchgeführt werden. Bei allen Antikörpern, mit Ausnahme des Antikörpers Carboanhydrase IX (CA IX), erfolgte eine saure Antigendemaskierung. Hierfür werden die Präparate in Citratpuffer im Mikrowellenherd für zehn Sekunden zum Kochen gebracht. Nach 50 Sekunden Abkühlzeit wird dieser Schritt sechsmal wiederholt und der Citratpuffer mit den Schnitten für 30 Minuten abgekühlt. Bei der basischen Antigendemaskierung werden die Schnitte in Tris-EDTA in der Mikrowelle zweimal für jeweils zehn Sekunden aufgekocht und 30 Sekunden abgekühlt. Danach werden die Gewebeschnitte in Tris-EDTA für eine halbe Stunde bei 95 °C in den Trockenofen gestellt. Anschließend wird der Citratpuffer bzw. das Tris-EDTA für fünf Minuten durch fließendes

Material und Methoden

Aquadest gespült. Nachfolgend werden die Proben dreimal für je fünf Minuten in einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Mittels 5 % Normal-Goat-Serum (NGS) in PBS findet nun eine Blockierung unspezifischer Bindungen, für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer, statt. Nach diesem Schritt erfolgt die Inkubation des Primärantikörpers über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Dazu wird der jeweilige Antikörper meist im Verhältnis 1:50 oder 1:100 mit 0,2 % Rinder-Serum-Albumin (BSA) und 1 % NGS in PBS verdünnt. Parallel dazu werden Negativkontrollen durchgeführt, um die Antikörperspezifität zu überprüfen. Dafür werden lediglich 0,2 % BSA, 1 % NGS in PBS ohne Primärantikörper auf die Schnitte gegeben.

Am nächsten Tag werden die Gewebeschnitte dreimal mit PBS unter Schütteln gewaschen und darauffolgend mit dem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert. Dieser ist gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet, wird aber selbst aus einer anderen gewonnen. Der jeweilige Sekundärantikörper, meist goat-anti-rabbit-biotin, wird im Verhältnis 1:250 mit 1 % NGS in PBS verdünnt. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur für eine Stunde in einer feuchten Kammer. Alle folgenden Waschschrte müssen im Dunkeln durchgeführt werden. Nach Ende der Inkubationszeit wird erneut dreimalig in PBS für je fünf Minuten gewaschen. Bei Verwendung der Antikörper Hif1 α , Cleaved Caspase-3 (ClCasp-3) und CA IX wird eine zusätzliche Inkubation mit Peroxidase-Anti-Peroxidase(PAP)-Rabbit durchgeführt, um das Antikörpersignal zu verstärken. Die Verdünnung beträgt dabei 1:500 in steriler PBS und die Inkubationszeit 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Die Gewebeschnitte werden erneut für dreimal jeweils fünf Minuten in PBS unter Schütteln gewaschen. Daraufhin wird mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser bindet an den biotinylierten Sekundärantikörper und muss 30 Minuten vor seiner Inkubation hergestellt werden. Dazu werden Reagenz A und B des VECTASTATIN Elite ABC Standard Kit zu gleichen Teilen 1:250 in steriler PBS verdünnt. Nun werden die Schnitte zweimal in PBS und dann zweimal in Phosphatpuffer für je fünf Minuten gewaschen. Währenddessen wird die DAB-Lösung, bestehend aus 67,5 ml Phosphatpuffer, 1350 μ l Nickelsulfat, 1350 μ l 10 % Glukose, 150 μ l Ammoniumchlorid, 1,5 ml DAB und 225 μ l Glukose-Oxidase, hergestellt. Die Glukose-Oxidase startet die Reaktion, weshalb sie erst in der letzten Waschminute hinzugegeben wird. Die Entwicklung erfolgt in einer dunklen Küvette und wird unter einem Durchlichtmikroskop beobachtet. Ist die gewünschte Antikörperintensität erreicht (meist nach 10 – 15 Minuten), wird dreimalig mit PBS gewaschen. Danach werden die Schnitte kurz in Aquadest, dann für eineinhalb Minuten in 0,1 %

Kernechtrot und ein weiteres Mal in Aquadest getaucht. Anschließend werden die Gewebeschnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % EtOH, 80 % EtOH, 96 % EtOH für je eine Minute; 100 % I EtOH, 100 % II EtOH für je drei Minuten) und Xylol I und Xylol II für je fünf Minuten dehydriert. Zuletzt werden die Schnitte mit Depex eingedeckelt.

2.9.1.2 Immunfluoreszenzfärbung

Immunfluoreszenzfärbungen haben den Vorteil, dass mehrere Epitope an einem Präparat nachgewiesen werden können. Dabei ist es wichtig, dass die Primärantikörper aus verschiedenen Spezies stammen und die jeweiligen entgegen gerichteten Sekundärantikörper mit einem Fluorophor gekoppelt sind. Diese Fluorophore müssen bei unterschiedlichen Wellenlängen Licht absorbieren, um die Signale der beiden Primärantikörper unterscheiden zu können. Außerdem dürfen die Sekundärantikörper nicht aus der gleichen Spezies ihres Primärantikörpers stammen [52].

Die Entparaffinierung, die absteigende Alkoholreihe und die Antigendemaskierung erfolgen analog der DAB-Färbung (vgl. Kapitel 2.9.1.1). Danach wird der Citratpuffer für fünf Minuten durch fließendes Aquadest ersetzt. Im Anschluss werden die Gewebeschnitte dreimal für jeweils fünf Minuten mit PBS unter Schütteln gewaschen. Mit 5% NGS werden unspezifische Bindungen blockiert. Die Inkubationszeit beträgt zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Für die anschließende erste Primärantikörperinkubation wird der jeweilige Antikörper in 0,2 % BSA und 1 % NGS in PBS in der entsprechenden Konzentration verdünnt und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Auch hier werden zusätzlich meist Negativkontrollen der Gewebeschnitte durchgeführt.

Am darauffolgenden Tag werden die Proben dreimal für je fünf Minuten unter Schütteln gewaschen und im Anschluss mit dem ersten Sekundärantikörper, z. B. goat-anti-rat cy5, in entsprechender Verdünnung mit steriler PBS in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Alle folgenden Waschschrte müssen ab diesem Zeitpunkt im Dunkeln erfolgen. Nach Ende der Inkubationszeit werden die Schnitte erneut dreimal für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen. Es folgt die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper über Nacht bei 4 °C in der jeweiligen Verdünnung mit 0,2 % BSA, 1 % NGS in PBS.

Am dritten Tag werden die Schnitte dreimal für je fünf Minuten mit PBS gewaschen. Nun kann die Inkubation des zweiten Sekundärantikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer

feuchten Kammer erfolgen. Dieser wird ebenfalls mit steriler PBS verdünnt. Im Anschluss müssen die Gewebeschnitte dreimal für je zwei Minuten gewaschen werden. Danach werden sie für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 4'-6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), Verdünnung 1:5000 in steriler PBS, inkubiert. Anschließend werden die Schnitte sechsmal für jeweils drei Minuten mit PBS gewaschen. Letztlich werden sie kurz in Aquadest getaucht, mit Neopentylglykol (NPG) eingedeckelt und mit Nagellack umrandet.

2.9.2 Histologische Färbungen

Mittels histologischer Färbungen können bestimmte Gewebestrukturen, je nach Affinität zu dem verwendeten Farbstoff, hervorgehoben werden. Dadurch können die einzelnen Strukturen lichtmikroskopisch detektiert werden [51].

2.9.2.1 Picrosiriusrot-Färbung

Mithilfe einer Picrosiriusrot(PSR)-Färbung können die bindegewebigen Anteile eines Gewebes rot eingefärbt werden. Der Farbstoff PSR lagert sich vor allem an kollagenen (I, III, (VI)) und retikulären Fasern an [53].

Zuerst erfolgt eine Entparaffinierung analog des DAB-Protokolls (vgl. Kapitel 2.9.1.1) und darauffolgend eine Rehydrierung für jeweils zwei Minuten mittels einer absteigenden Alkoholreihe (100 % II EtOH, 100 % I EtOH, 96 % EtOH, 80 % EtOH, 70 % EtOH, Aquadest). Die Proben werden für zehn Minuten mit 0,1 % Fast Green gefärbt, kurz in Aquadest gewaschen und für zehn Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt. Danach werden die Schnitte kurz in Aquadest getaucht und für eine Stunde mit Picrosiriusrot (0.1 % Direct Red 80 in gesättigter Pikrinsäure) gefärbt. Im Anschluss werden sie mit 0,5 % Essigsäure I und 0,5 % Essigsäure II für je zwei Minuten abgespült. Die Dehydrierung erfolgt mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (96 % EtOH, 100 % I EtOH, 100 % II EtOH) sowie Xylol I und II für je fünf Minuten. Die Gewebeschnitte werden analog des DAB-Protokolls (siehe Kapitel 2.9.1.1) eingedeckelt.

2.9.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung dient als Übersichtsfärbung.

Die Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgen analog der PSR-Färbung (vgl. Kapitel 2.9.2.1). Danach werden die Gewebeschnitte für zehn Minuten in Hämalun nach Mayer getaucht, die Proben mit Aquadest gewaschen, für zehn Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt und dann erneut mit Aquadest gespült. Nun werden die Schnitte für zehn Minuten in 0,1 % Eosin getaucht und mit Aquadest gewaschen. Mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (96 % EtOH für zwei Minuten, 100 % I EtOH, 100 % II EtOH für je fünf Minuten) und Xylol I und II für je fünf Minuten werden die Gewebeschnitte dehydriert und in einem letzten Schritt mit Depex eingedeckelt.

2.10 Mikroskopie

Mit dem Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop *Keyence BZ-9000* wurden die HE-, IHC- und PSR-gefärbten Proben aufgenommen. Mithilfe dieses Mikroskops kann ein Gesamtbild der jeweiligen Gewebeschnitte aufgenommen werden, was die Auswertung des ganzen Tumors ermöglicht. Dabei wird das „Hellfeld“ als Betrachtungsmodus und die Einstellung „Farbkamera“ beibehalten.

Mittels des Konfokalmikroskops *Nikon Eclipse Ti-A1* werden hochauflösende Bilder von den immunfluoreszenz-gefärbten Ganzgewebeschnitten aufgenommen. Für die Fluoreszenzaufnahmen wurden die Filter Cy3 und Cy5 verwendet.

2.11 Elektronische Bildverarbeitung

Die quantitative Auswertung der Mikroskopaufnahmen wurde mit dem Bildverarbeitungsprogramm *ImageJ* durchgeführt. Hiermit können die Aufnahmen binärisiert werden. Das bedeutet, dass ein Bild erstellt wird, welches lediglich aus den beiden Farben Schwarz (gefärbt) und Weiß (ungefärbt) besteht. Die gemessenen schwarzen Flächen werden in eine *Excel*-Datei übernommen, um anschließend den prozentualen Anteil der angefärbten Fläche zur Gesamtfläche ermitteln zu können.

Bei den Hif1 α -gefärbten 4T1-Lungenmetastasen wurde das Zusatzmodul „point picker“ von ImageJ verwendet. Mit diesem Modul können die Hif1 α -positiven Zellen der beiden

Behandlungsgruppen gezählt und miteinander verglichen werden. Eine Zelle wurde als positiv angesehen, wenn mehr als 50 % des Zellkerns gefärbt waren.

Um den Dichte- bzw. Intensitätsunterschied der Ki-67-positiven Zellen in den LLC-Tumoren zwischen Tumorrand und -zentrum zu messen, wurde zuerst der jeweilige Tumormasseschwerpunkt festgelegt. Anschließend wurden mehrere Geraden vom Tumorrand zum Tumormasseschwerpunkt gezogen und der Intensitäts-(Grauwert)plot entlang dieser Linien gemessen.

Alle Graphen wurden mit dem Programm *Prism 6* erstellt. Die mit dem *Keyence BZ-9000* aufgenommenen Bilder wurden mit dem Programm *PowerPoint 2013* oder *GIMP* bearbeitet.

2.12 Genexpressionsanalysen

Mittels Genexpressionsanalysen können Auswirkungen einer veränderten LOX(L)-Aktivität auf die einzelnen Tumorzellen analysiert werden. Gene können mittels messenger RNA(mRNA)-Untersuchungen nachgewiesen werden. Die mRNA dient als Bauplan für die Proteinbiosynthese in Zellen, also die Umsetzung von genetischer Information in Proteine [54]. In dieser Arbeit wurde die mRNA-Expressionsanalyse anhand 4T1-2D-Zellkulturen, 4T1-3D-MTS und 4T1-Tumoren durchgeführt, welche LOX oder LOXL2 überexprimieren. Des Weiteren wurde diese Methode an β APN-behandelten 4T1- und MT6-2D-Zellkulturen angewandt.

2.12.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht, auch bei geringen Ausgangsmengen an DNA, eine exponentielle Amplifizierung bestimmter Nukleotidsequenzen. Die klassische PCR beinhaltet drei Schritte: die Denaturierung der DNA, das Annealing (Primeranlagerung) sowie die Elongation der Zielsequenz. Bei der Denaturierung wird die DNA in ihre Einzelstränge aufgetrennt. An diese lagern sich spezifische Primer an komplementäre Stellen der DNA-Matrize an. Nachfolgend synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase, vom 3'-Ende der Primer ausgehend, neue DNA-Doppelstränge. Durch die zyklische Wiederholung dieser einzelnen Schritte kann eine gewünschte Zielsequenz exponentiell vermehrt werden [55, 56].

Die Versuche wurden mittels Multiplex-PCR durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine moderne Anwendung der PCR, welche mehrere PCR-Reaktionen in einer Tube kombinieren kann. Das hat den Vorteil, dass mehrere Primer gleichzeitig verwendet und somit mehrere DNA-Abschnitte untersucht bzw. mehrere Gene gleichzeitig nachgewiesen werden können.

Es werden zwei unterschiedliche Arten von Primern angewandt, sogenannte genspezifische und universelle Primer. Die genspezifischen Primer besitzen einen Universal-Tag, dessen Sequenz bei allen Genen gleich ist. Die Sequenz der universellen Primer entspricht der Sequenz der Universal-Tags in den genspezifischen Primern. Um die Primer mittels Kapillarelektrophorese nachweisen zu können, ist der universelle Forwardprimer mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert.

2.12.2 Durchführung der RT-PCR

Für die folgenden Reaktionen wurde das *GenomeLabTM GeXP* Start Kit von *Beckman Coulter* verwendet.

Reverse Transkription:

Prinzip: Vor der eigentlichen Vervielfältigung muss die RNA in DNA umgeschrieben werden. Dabei synthetisiert die reverse Transkriptase die copy DNA (cDNA) komplementär zur mRNA-Sequenz. Die entstandenen cDNA-Fragmente sind anschließend durch die Universalsequenz der genspezifischen reversen Primer markiert (vgl. Abb. 8).

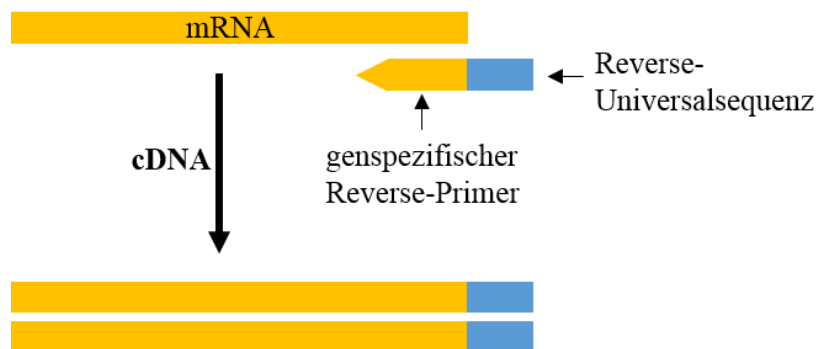


Abbildung 8: RT-Reaktion mit genspezifischen Reverse-Primern. Die entstandene cDNA der verschiedenen Gene ist mit der Universalsequenz der zugegebenen Reverse-Primer flankiert.

Durchführung: Zuerst wird die mRNA-Konzentration der jeweiligen Proben mit dem *NanoDrop 2000c Spectrophotometer* der Firma *Thermo Scientific* bestimmt.

Material und Methoden

Es werden jeweils 25 ng bzw. 12,5 ng der mRNA verwendet. Dafür wird die Konzentration der einzelnen Proben jeweils auf 5 ng/ μ l bzw. 2,5 ng/ μ l mit DNase/RNase-freiem Wasser verdünnt. Anschließend wird der Mastermix zusammenpipettiert (vgl. Tab. 9) und davon 5 μ l in Tubes vorgelegt. Dazu werden jeweils 5 μ l der verdünnten RNA-Proben pipettiert. Nun kann die reverse Transkription mittels eines vollautomatisch programmierbaren Thermocyclers der Firma *Biometra* erfolgen. Hierbei durchlaufen die Tubes festgelegte Temperaturzyklen, um die cDNA zu erstellen (vgl. Tab. 10).

Tabelle 9: RT-Mastermix (für einen RT-Ansatz)

Substanz	Menge
DNase-/RNase-freies Wasser	1,5 μ l
RT Buffer 5X	2 μ l
Reverse Primer Plex	1 μ l
Reverse Transkriptase	0,5 μ l
RT-Ansatz: 5 μ l Mastermix + 5 μ l RNA (5 ng/ μ l)	

Tabelle 10: RT-Programm

Temperatur in °C	Zeit in Minuten
48	1
42	60
95	5
4	Ende

Polymerase-Kettenreaktion:

Prinzip: Die in der reversen Transkription entstandene cDNA soll vervielfältigt werden. Die cDNA wird durch den genspezifischen Forwardprimer mit einer Universalsequenz am 5'-Ende erkannt und es wird doppelsträngige DNA (dsDNA) gebildet. Der mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markierte universelle Primer erkennt die Universalsequenz des zuvor verwendeten genspezifischen Forwardprimers, welcher für die Herstellung der doppelsträngigen DNA

benötigt wurde. Das Resultat ist ein Pool fluoreszenzmarkierter PCR-Produkte, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge der Größe nach aufgetrennt werden können (vgl. Abb. 9).

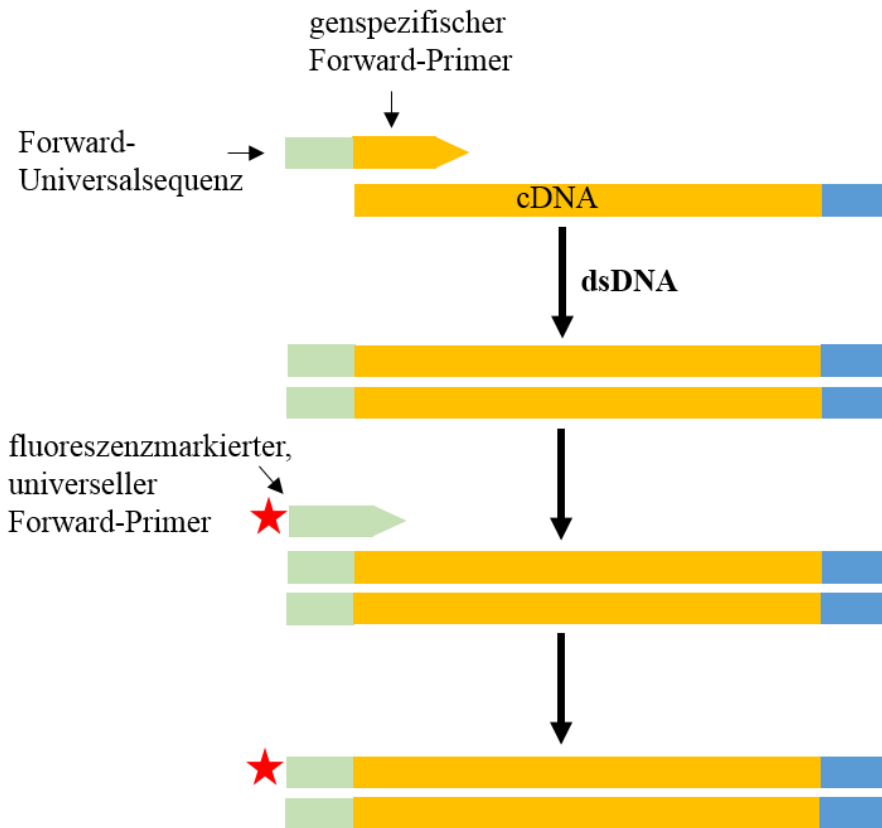


Abbildung 9: Multiplex-PCR mit genspezifischen und universellen Forward-Primern. Es entsteht ein Pool der vervielfältigten gewünschten Gene, die mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert sind.

Durchführung: Zunächst wird der PCR-Mastermix zusammenpipettiert (vgl. Tab. 11). Davon werden 5,35 µl in Tubes vorgegeben und 4,65 µl der jeweiligen cDNA dazu pipettiert. Nun durchlaufen die Tubes ein PCR-Programm im Thermocycler (vgl. Tab. 12), welches 35 Zyklen umfasst.

Tabelle 11: PCR-Mastermix (für einen PCR-Ansatz)

Substanz	Menge
PCR Buffer 5X	2 µl
25 mM MgCl ₂	2 µl
Forward Primer Plex	1 µl
Thermo-Start Taq-Polymerase	0,35 µl
PCR-Ansatz: 5,35 µl Mastermix + 4,65 µl cDNA	

Tabelle 12: PCR-Programm

Temperatur in °C	Zeit in Minuten
95	10
94	0,5
55	0,5
70	1
4	Ende
Zyklenanzahl: 35	

2.12.3 Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese ermöglicht die Auftrennung und Detektion unterschiedlich langer DNA-Fragmente über ein elektrisches Feld. Durch eine angelegte Hochspannung wandern die Fragmente aufgrund ihrer Ladungszahl unterschiedlich schnell auf die Anode zu. Anhand der Peakhöhe kann dann die jeweilige Expressionsstärke ermittelt werden. Für die Analyse der Genexpression wird das Gerät *CEQTM 8000 Genetic Analysis System* von *Beckman Coulter* verwendet.

Durchführung: Zuerst wird die aus der PCR-Reaktion erhaltene dsDNA mit DNase-/RNase-freiem Wasser in einem Verhältnis 1:10 bzw. 1:5 verdünnt. Dazu werden 2 µl des jeweiligen DNA-Ansatzes zu 18 µl bzw. 8 µl Wasser pipettiert. Danach wird der DNA Size Standard-400

mit der Sample Loading Solution (SLS) im Verhältnis 1:200 vermengt. Von diesem Standard-SLS-Mix werden 20 µl in eine 96-Well Proben-Mikroplatte vorgelegt und 2 µl von der verdünnten dsDNA hinzugegeben. Durch vorsichtiges auf- und abpipettieren werden die Lösungen vermischt. Zuletzt kommt je ein Tropfen Mineralöl auf die Mikroplatte. Anschließend erfolgt die Analyse in dem *CEQTM 8000 Genetic Analysis System*. Die Injektionszeit beträgt, von den jeweiligen Proben abhängig, 15 – 45 Sekunden.

Die Messergebnisse werden mittels *Excel 2010* ausgewertet. Dabei wird der Mittelwert der unbehandelten und der βAPN-behandelten bzw. LOX-/LOXL2-überexprimierenden Proben berechnet und miteinander verglichen. Eine veränderte mRNA-Expression um den Faktor 1,5 gilt als relevant. Als interner Normierungsstandard wurde die Signalstärke für die RPS29-mRNA verwendet [57].

2.13 Statistische Auswertung

Für die statistischen Analysen wurde entweder *Excel 2013* oder *Prism 6* verwendet. Alle Daten werden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aufgezeigt. Bei dem Vergleich zweier Gruppen wurde der unpaare Student T-Test angewendet. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

Für die Versuche wurden fünf verschiedene murine Tumorzelllinien verwendet: 4T1-, EMT6- und E0771-Mammakarzinome, LLC-Lungenkarzinome und MT6-Fibrosarkome. Mittels pharmakologischer LOX(L)-Inhibierung aller Mitglieder der Proteinfamilie durch β APN zum einen und durch eine ektopische Überexpression der LOX(L)-Familienmitglieder LOX und LOXL2 zum anderen, wurden die Auswirkungen der LOX(L)-Aktivität auf Zellproliferation und -apoptose, Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, Angiogenese, Hypoxie, die Makrophageninfiltration und die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren/Zytokine untersucht. Dabei standen für die immunhistochemischen und histologischen Färbungen sowohl ganze Tumorschnitte als auch 3D-MTS der jeweiligen Zelllinien zur Verfügung. Bei den Genexpressionsanalysen wurden zusätzlich 2D-Zellkulturen untersucht. Alle Versuche mit ektopischer Überexpression von LOX bzw. LOXL2 wurden an 4T1-Zellen durchgeführt.

3.1 Korrelation von Tumorwachstum mit Zellproliferation und -apoptose nach LOX(L)-Inhibierung

Wie bereits in Kapitel 1.5.1 beschrieben, reagierten die fünf untersuchten Tumore nach einer β APN-Behandlung nicht einheitlich hinsichtlich ihrer Wachstumsrate. Um den Hintergrund des divergierenden Wachstums nach der LOX(L)-Inhibierung mittels β APN näher zu untersuchen, wurden die behandelten Tumore auf deren Proliferations- und Apoptoserate getestet.

Zuerst wurden IHC-Färbungen für den Proliferationsmarker Ki-67 an Gewebeschnitten von allen fünf Tumortypen (4T1, MT6, EMT6, E0771, LLC) durchgeführt. Die Quantifizierung Ki-67-positiver Zellen erfolgte mittels automatischer Bildanalyse von digitalisierten Aufnahmen der gefärbten Gesamttumorschnitte. Dabei wurden die fünf Tumorklinien sowohl unbehandelt als auch mit β APN behandelt betrachtet. Beim Vergleich der beiden Behandlungsgruppen konnte nach β APN-Behandlung eine reduzierte Dichte an proliferierenden Zellen in den 4T1-Tumoren festgestellt werden. Bei den MT6-, EMT6- und E0771-Tumoren zeigten sich, wie beim Wachstum auch, in der Anzahl proliferierender Zellen keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abb. 10).

Ergebnisse

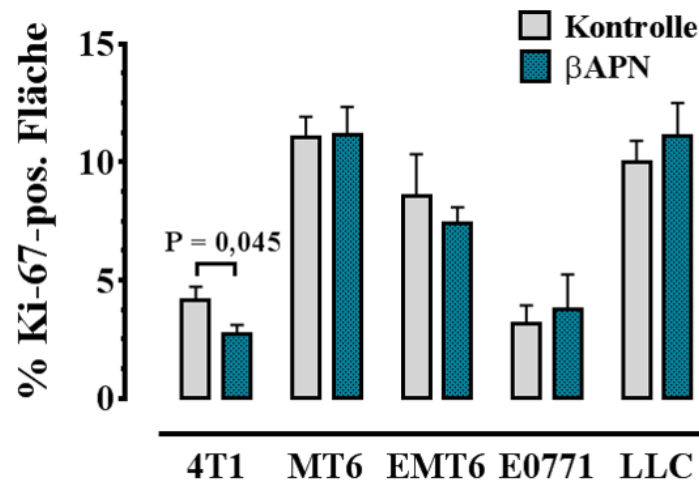


Abbildung 10: Quantifizierung der proliferierenden Zellen mit Ki-67 in allen fünf Tumorklinen. Nach der Inhibierung von LOX(L) mittels β APN zeigt sich in den 4T1-Tumoren eine signifikant verringerte Proliferationsrate im Vergleich zu deren Kontrollgruppe. In den vier anderen untersuchten Tumortypen (MT6-, EMT6-, E0771- und LLC-Tumore) können keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl proliferierender Zellen zwischen β APN-behandelten und unbehandelten Tumoren festgestellt werden. $n = 4 - 10$. Fehlerbalken \pm SEM.

Auch die im Wachstum positiv auf die LOX(L)-Inhibierung reagierenden LLC-Tumore wiesen zunächst keine signifikanten Unterschiede zu deren Kontrollgruppe auf (vgl. Abb. 10). Auffällig war jedoch, dass die proliferierenden Zellen nicht gleichmäßig über das gesamte Tumorgewebe verteilt waren (vgl. Abb. 11). Vergleich man die Dichte der proliferierenden Zellen am Tumorrand mit denen des Tumorzentrums, war eine deutlich erhöhte Proliferationszone am Rand des Tumors erkennbar (vgl. Abb. 12). Ausgehend vom Tumorrand wurden daher mehrere Linien durch den Tumormassenschwerpunkt gezogen und die jeweilige Färbungsintensität entlang dieser Linie gemessen. Um den Masseschwerpunkt zu bestimmen, wurde der jeweilige Tumorgewebeschnitt mithilfe des Bildverarbeitungsprogrammes *ImageJ* umfahren und anschließend das Tumormassezentrum ermittelt.

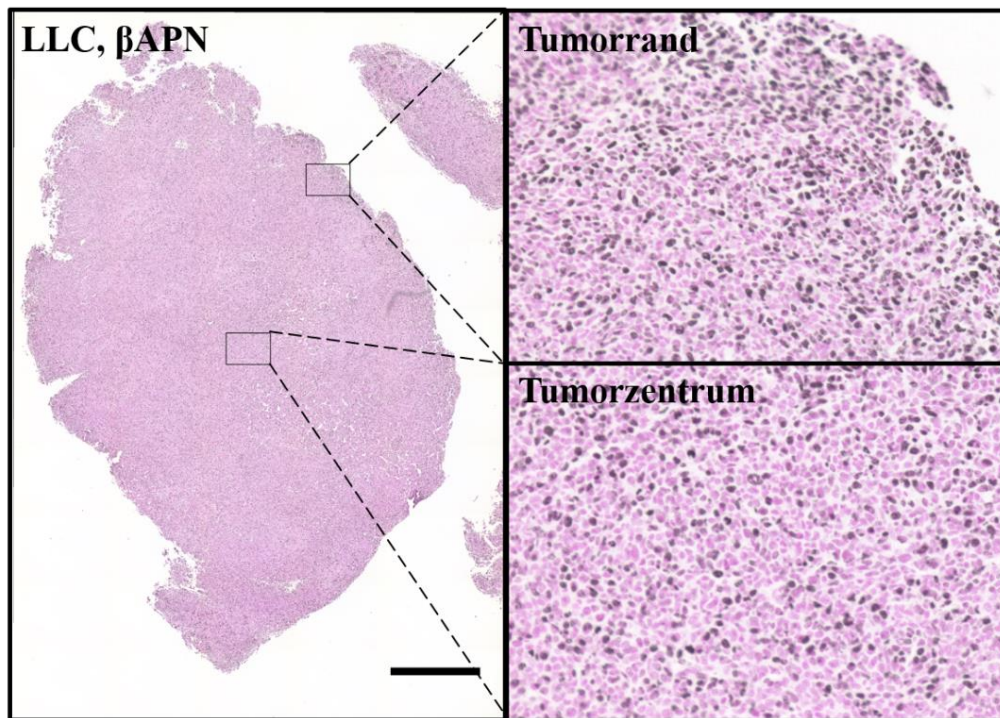


Abbildung 11: Vergleich von Tumorzentrum und Tumorrand Ki-67-gefärbter LLC-Tumore. Links ist ein ganzer Gewebeschnitt eines β APN-behandelten LLC-Tumors dargestellt, rechts jeweils ein Ausschnitt des Tumors aus dem Randbereich bzw. aus dem Zentrum. Am Tumorrand ist eine erhöhte Dichte an proliferierenden (schwarzen) Zellen im Vergleich zum Tumorzentrum erkennbar. Skala = 1000 μ m.

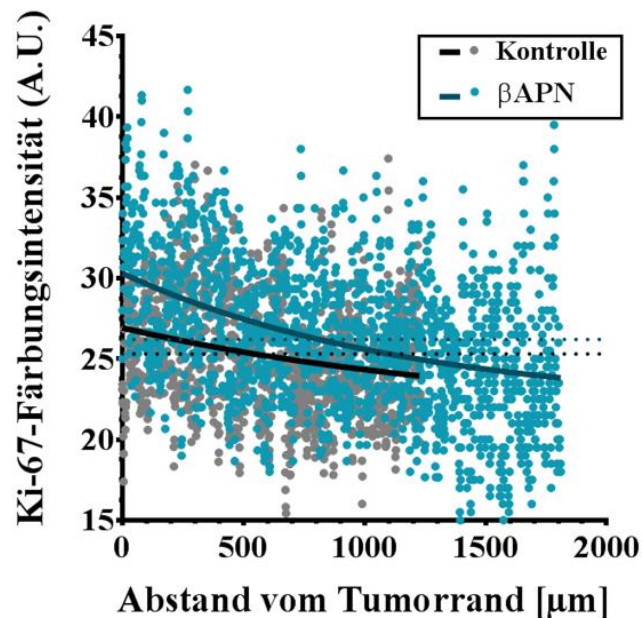


Abbildung 12: Räumliche Aufteilung der Ki-67-gefärbten Intensität in unbehandelten und β APN-behandelten LLC-Tumoren. Am Tumorrand ist die Ki-67-Färbungsintensität in β APN-behandelten Tumoren im Vergleich zum Tumorzentrum deutlich erhöht. $n = 4$.

Ergebnisse

Die bisherigen Ergebnisse weisen auf eine Korrelation zwischen einer veränderten Dichte an proliferierenden Zellen und dem veränderten Tumorwachstum nach LOX(L)-Inhibierung hin. Um diese Aussage noch weiter zu untermauern, wurden zunächst 4T1-3D-MTS für den Proliferationsmarker Ki-67 getestet. Durch die Untersuchung von MTS konnten Effekte von Tumor-assoziierten Zellen auf die Proliferationsrate der Tumorzellen ausgeschlossen werden. Dabei wurden die 4T1-MTS-Gewebeschnitte ebenfalls sowohl unbehandelt als auch mit β APN behandelt betrachtet. Für die Auswertung wurde die Anzahl der gefärbten (schwarzen) Zellen ermittelt und ins Verhältnis zur Anzahl der Gesamtzellen gesetzt. Anschließend wurde der Mittelwert der Kontrollen mit dem der β APN-behandelten 4T1-MTS verglichen. Die Analyse ergab einen signifikanten Rückgang an Ki-67-positiven Zellen nach β APN-Behandlung (vgl. Abb. 13, 14).

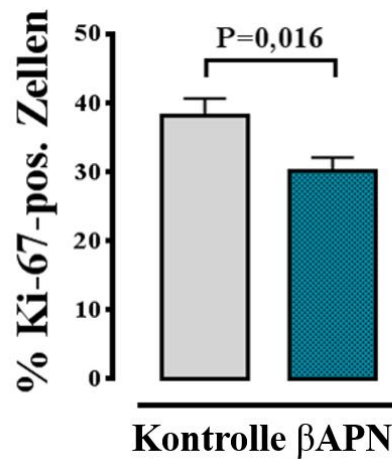


Abbildung 13: Quantifizierung der Ki-67-positiven Zellen in 4T1-MTS. Nach einer β APN-Behandlung ist ein signifikanter Rückgang der Ki-67-positiven Zellen erkennbar. $n = 11$. Fehlerbalken \pm SEM.

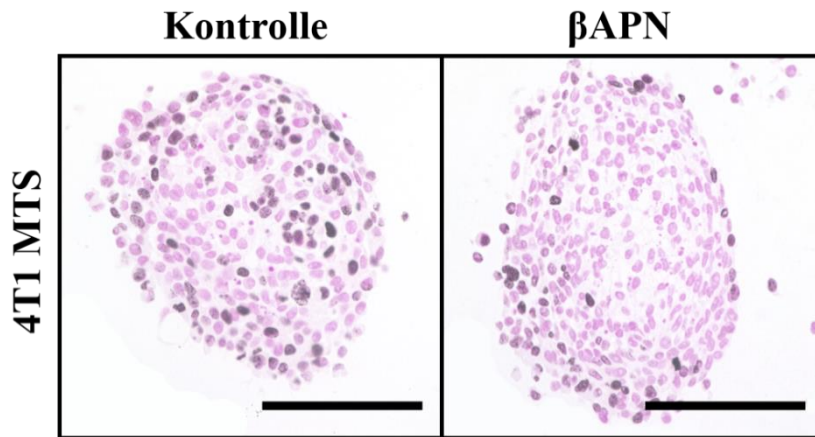


Abbildung 14: IHC-Färbung von 4T1-MTS-Gewebeschnitten mit dem Proliferationsmarker Ki-67. Links ist ein unbehandelter, rechts ein β APN-behandelter 4T1-MTS-Gewebeschnitt dargestellt. Die β APN-behandelten 4T1-MTS weisen deutlich weniger Ki-67-positive Zellen als die unbehandelten 4T1-MTS auf. Skala = 100 μ m.

Anschließend wurden 4T1-Tumorschnitte mit dem Apoptosemarker ClCasp-3 gefärbt. Die quantitative Auswertung der ClCasp-3-positiven Zellen ergab keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl positiver Zellen zwischen unbehandelten und β APN-behandelten 4T1-Tumoren (vgl. Abb. 15, 16). Folglich konnten damit ein zusätzlicher apoptotischer Effekt oder Einflüsse Tumor-assoziiertes Zellen als Gründe für das geringere Wachstum nach β APN-Behandlung in 4T1-Tumoren ausgeschlossen werden.

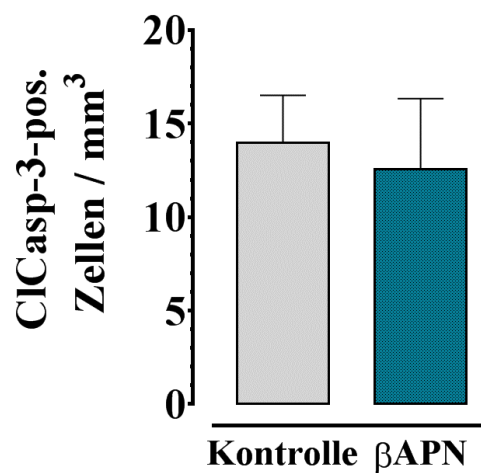


Abbildung 15: Quantifizierung der ClCasp-3-positiven Zellen in 4T1-Tumorschnitten. Zwischen den unbehandelten und β APN-behandelten 4T1-Tumoren sind keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl ClCasp-3-positiven Zellen zu sehen. $n = 8$. Fehlerbalken \pm SEM.

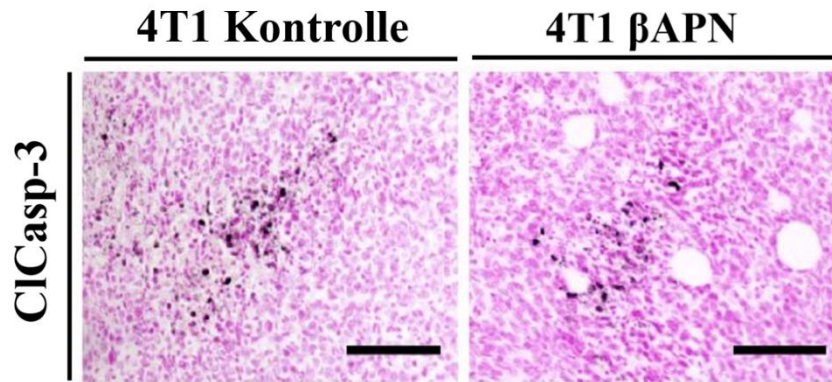


Abbildung 16: IHC-Färbung von 4T1-Tumorschnitten mit dem Apoptosemarker CICasp-3. Links ist ein Ausschnitt eines unbehandelten Tumors, rechts ein Ausschnitt eines β APN-behandelten Tumors zu sehen. Es sind keine Unterschiede in der Anzahl CICasp-3-positiver Zellen erkennbar. Skala = 100 μ m.

3.2 Tumorversorgung nach LOX(L)-Inhibierung

Trotz des divergierenden Wachstums nach β APN-Behandlung konnte sowohl in den 4T1- als auch in den MT6-Tumoren eine Reduzierung der zentralen Nekroseflächen gezeigt werden [24]. Diese Erkenntnisse lassen auf eine verbesserte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung in den behandelten Tumoren schließen. Die Analyse der noch zu untersuchenden Tumormodelle (LLC-, E0771-, EMT6-Tumore) ergab ein ähnliches Ergebnis. Für die quantitative Auswertung wurde die Fläche der nekrotischen Gewebeareale HE-gefärbter Tumorschnitte gemessen und ins Verhältnis zur Gesamttumorfläche gesetzt. Anschließend wurden die Mittelwerte der β APN-behandelten Tumore mit ihrer jeweiligen Kontrollgruppe verglichen. Die Tumorschnitte zeigten nach β APN-Behandlung bei den LLC-, E0771- und EMT6-Tumoren ebenfalls eine reduzierte zentrale Nekrose, wobei sich die Ergebnisse der LLC- und E0771-Tumore im Vergleich zwischen β APN-behandelt und unbehandelt als signifikant erwiesen (vgl. Abb. 17, 18).

Ergebnisse

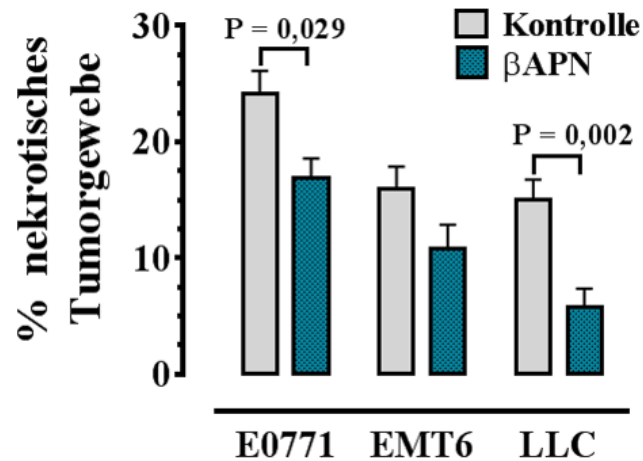


Abbildung 17: Quantifizierung des nekrotischen Tumorgewebes in E0771-, EMT6- und LLC-Tumoren. Nach β APN-Behandlung kommt es zu einer verringerten Fläche des nekrotischen Gewebes in den drei untersuchten Tumoren, wobei die Ergebnisse der E0771- und LLC-Tumoren signifikant sind. $n = 6 - 10$. Fehlerbalken \pm SEM.

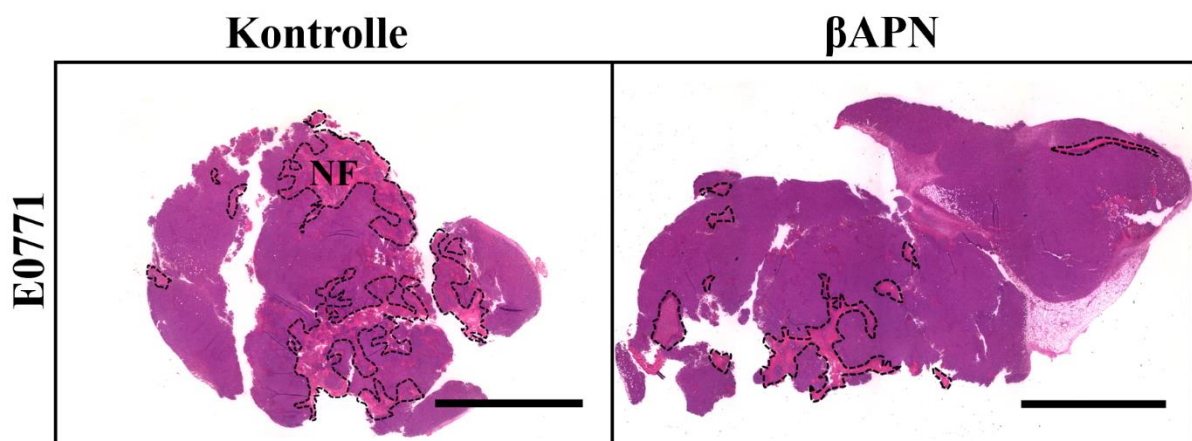


Abbildung 18: HE-Färbung eines unbehandelten bzw. β APN-behandelten E0771-Tumors. Links ist ein unbehandelter, rechts ein β APN-behandelter Tumorschnitt dargestellt. Die nekrotischen Flächen (NF = nekrotische Flächenareale) sind gekennzeichnet. Nach der LOX(L)-Inhibierung mittels β APN-Behandlung ist ein deutlicher Rückgang nekrotischen Tumorgewebes im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Skala = 5000 μ m.

Verglich man diese drei Tumorguppen mit den bereits untersuchten 4T1- und MT6-Tumoren [24], wurde in vier von den fünf Tumormodellen ein signifikanter Rückgang der zentralen Nekrose nach β APN-Behandlung deutlich (vgl. Abb. 19). Diese Ergebnisse lassen auf einen verminderten hypoxischen Zustand und reduzierten metabolischen Stress in den Tumoren schließen. Trotz der unterschiedlichen Wachstumsraten als Reaktion auf die LOX(L)-Inhibierung konnte nach Behandlung somit eine insgesamt verbesserte Versorgung in allen fünf Tumormodellen beobachtet werden.

Ergebnisse

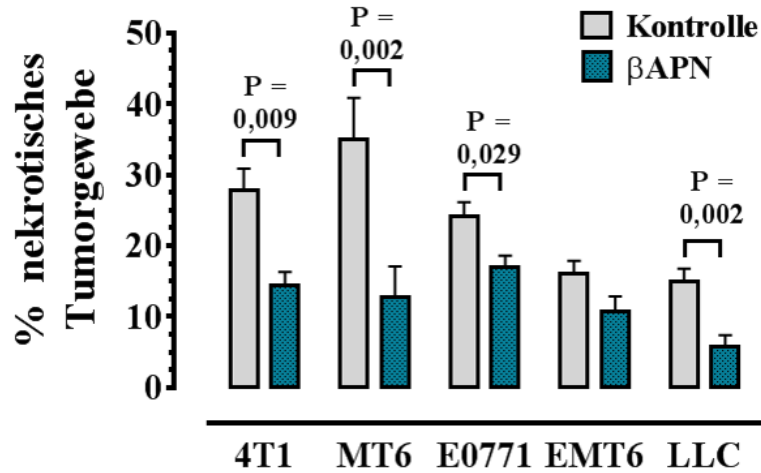


Abbildung 19: Quantifizierung des nekrotischen Tumorgewebes in allen fünf Tumorkonstruktionen. Nach β APN-Behandlung ist in allen fünf Tumormodellen ein Rückgang des nekrotischen Gewebeanteils zu sehen. Die Ergebnisse der 4T1-, MT6-, E0771- und LLC-Tumoren sind signifikant. $n = 6 - 10$. Fehlerbalken \pm SEM.

3.3 4T1-Tumorversorgung bei LOX-/LOXL2-Überexpression

Die beobachtete Verbesserung der Tumorversorgung nach β APN-Behandlung könnte die direkte Folge der LOX(L)-Inhibierung auf die EZM sein. Allerdings können Off-Target- oder sekundäre Effekte der β APN-Behandlung bei der eingeschränkten Spezifität des Inhibitors nicht ausgeschlossen werden. Schütze *et al.* (2015) zeigten vor Kurzem, dass die erhöhte Kollagenquervernetzung eine physikalische Diffusionsbarriere für kleine Moleküle bildet und Tumorzellen in 3D-Kulturen effektiv vor der Exposition mit Chemotherapeutika bewahrt [11]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine gesteigerte LOX(L)-Aktivität durch eine erhöhte Matrixquervernetzung die Diffusion im Tumor reduziert und dadurch die Versorgung von Tumorzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie ihre Exposition mit Medikamenten verringert. Um zu testen, ob tatsächlich die LOX(L)-Familie diese chemoprotektive Modifikation der EZM vermittelt, wurden 4T1-Zellen untersucht, welche LOX bzw. LOXL2 ektopisch überexprimieren. 4T1-Zellen wurden gewählt, da bereits gezeigt werden konnte, dass diese Tumorzelllinie signifikant geringere Mengen der beiden Enzyme exprimiert als die vier anderen Tumorzelllinien, jedoch einen bedeutenden Kollagenanteil aufweist [11]. Die resultierenden Folgen der Überexpression können daher auf die durch die erhöhte Aktivität von LOX-/LOXL2-bedingten veränderten Eigenschaften der EZM zurückgeführt werden.

Ergebnisse

Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe demonstrierten, dass LOX- bzw. LOXL2-überexprimierende 4T1-Tumore zuerst schneller wuchsen, ihre Wachstumsrate dann jedoch allmählich hinter das der Kontrollgruppe zurückfiel (vgl. Abb. 20) [49].

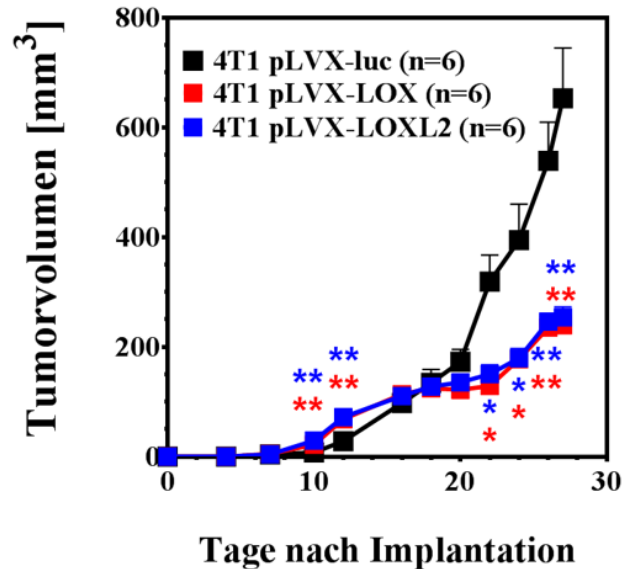


Abbildung 20: Tumorwachstumskurven von 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren. Die Wachstumskurve der Kontrollen ist schwarz dargestellt, die der LOX-überexprimierenden Tumore rot und die der LOXL2-überexprimierenden Tumore blau. Bei LOX- bzw. LOXL2-Überexpression wachsen die Tumore zunächst schneller als die Kontrollgruppe. Ab dem 18. Tag überwiegt jedoch das Wachstum der Kontrollen. $n = 6$. [49].

Vor diesem Hintergrund wurde zunächst die Auswirkung der LOX-/LOXL2-Überexpression auf die Nekrotisierung des 4T1-Tumorgewebes untersucht. Die Analysen erfolgten 27 Tage nach der Tumorzellimplantation. Zur Auswertung wurden wieder die nekrotischen Flächen HE-gefärbter Tumorschnitte gemessen und ins Verhältnis zur Gesamttumorfläche gesetzt. Anschließend wurden jeweils die LOX- bzw. die LOXL2-überexprimierenden Tumore mit der Kontrollgruppe verglichen. Die Quantifizierung der Tumorschnitte ergab eine massive Zunahme des nekrotischen Gewebeanteils sowohl bei LOX- als auch bei LOXL2-Überexpression im Vergleich zu deren Kontrollgruppe (vgl. Abb. 21, 22). Die Aktivität der LOX(L)-Enzyme korrelierte also mit zunehmender Nekrose in den Tumoren. Eine gesteigerte LOX(L)-Aktivität könnte durch eine verstärkte Matrixquervernetzung die physikalische Diffusionsbarriere im Tumor erhöhen. Dadurch könnte dann die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung einzelner Tumorzellen sinken, wodurch immer mehr Bereiche im Tumor nekrotisch werden.

Ergebnisse

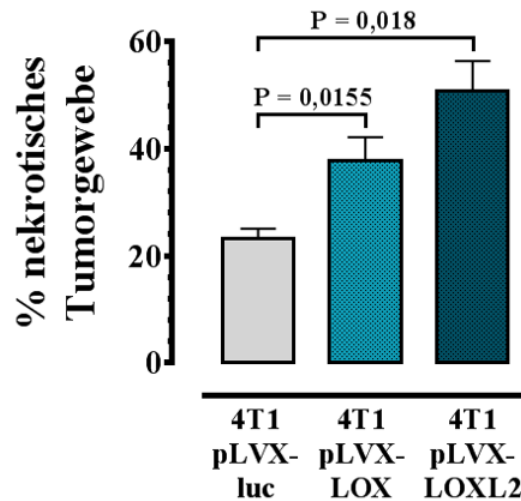


Abbildung 21: Quantifizierung der nekrotischen Gewebeflächen in 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren. Es kommt zu einer deutlichen Zunahme der zentralen Nekroseflächen bei LOX-/LOXL2-Überexpression im Vergleich zur Kontrolle. $n = 5$. Fehlerbalken \pm SEM.

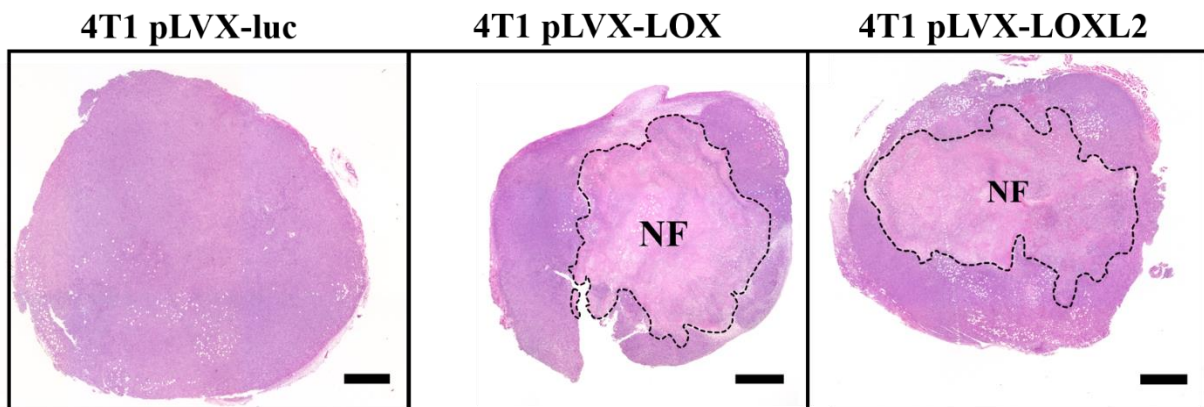


Abbildung 22: HE-Färbung von 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren. Die nekrotischen Flächen (NF = nekrotische Flächenareale) sind gekennzeichnet. Die Abbildung verdeutlicht eine vermehrte zentrale Nekrose in LOX-/LOXL2-überexprimierenden 4T1-Tumoren. Skala = 1000 μ m.

Im Anschluss wurden Veränderungen in der Proliferationsrate und des Kollagenanteils bei LOX-/LOXL2-Überexpression untersucht.

Eine IHC-Färbung auf Ki-67 unter Verwendung von DAB ergab eine vermehrte Anzahl proliferierender Zellen bei LOX-/LOXL2-Überexpression. Diese Ki-67-positiven Zellen waren in hoher Dichte vor allem an den Tumorgrenzen bzw. an deren invasiven Front am Übergang zu nicht-malignen Geweben innerhalb eines schmalen Saums von ca. 250 μ m zu beobachten.

Ergebnisse

In Richtung der zentralen Tumorregion, wo bereits einzelne nekrotische Flächenbereiche erkennbar waren, nahm die Anzahl der Ki-67-positiven Zellen stark ab (vgl. Abb. 23).

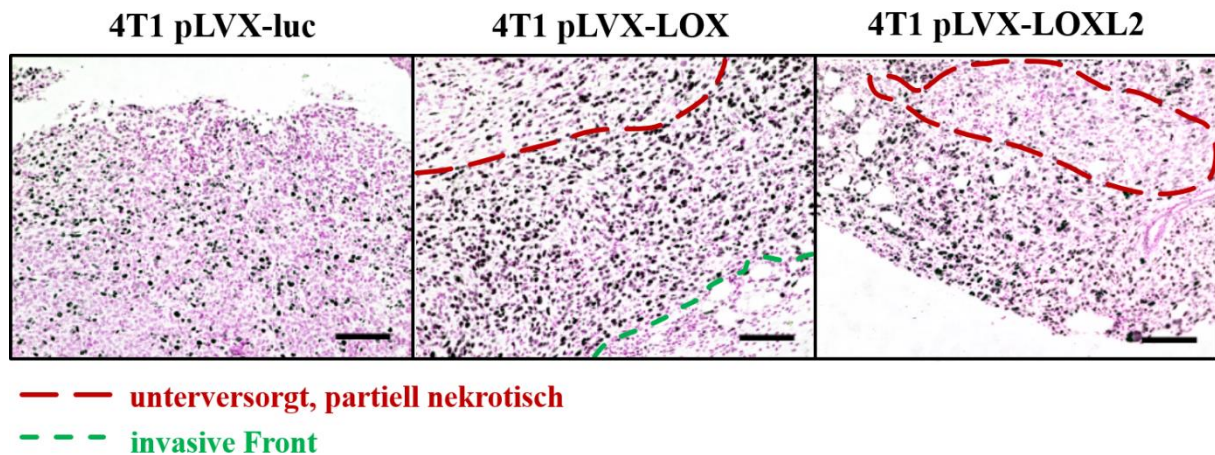


Abbildung 23: IHC-Färbung mit Ki-67 an der Grenze von 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren. Die rote Linie grenzt unterversorgte Bereiche vom normal versorgten Gewebe im Tumor ab. Die grüne Linie stellt den Übergang der Tumore zu nicht-malignen Geweben/Organen dar. Am Tumorrand bzw. an dessen invasiven Front der LOX-/LOXL2-überexprimierenden Tumore ist eine erhöhte Ansammlung proliferierender Zellen innerhalb eines schmalen Saums von ca. 250 μm erkennbar. In Richtung der zentralen, unterversorgten Bereiche verringert sich die Anzahl der KI-67-positiven Zellen. Skala = 100 μm .

Danach wurde das Verteilungsmuster der EZM innerhalb des Tumorgewebes näher analysiert. Dafür wurden die LOX-/LOXL2-überexprimierende 4T1-Tumorschnitte mit dem Farbstoff PSR gefärbt und nachfolgend von jeder Gruppe einzelne Tumorausschnitte in 20-facher Vergrößerung mithilfe eines Keyence Mikroskops BZ-9000 aufgenommen. Im Anschluss wurde die PSR-positive Fläche mittels automatischer Bildanalyse quantifiziert. Diese Analysen ließen erkennen, dass die erhöhte LOX-/LOXL2-Expression zu einem deutlich dichteren Kollagennetzwerk führte. Die Abbildungen 24 und 25 veranschaulichen, dass bei LOX-/LOXL2-Überexpression nicht nur mehr Kollagenfaserbündel zu sehen waren, sondern diese auch wesentlich verdrillter wirkten. Außerdem konnte beobachtet werden, dass kleine Ansammlungen von Tumorzellen von einzelnen Kollagenfaserbündeln „eingemauert“ wurden, was die Barrierefunktion des Kollagennetzwerks weiter unterstreicht. Die LOX-/LOXL2-Überexpression führte also nicht nur zu einem vermehrten Kollagenbestand, sondern veränderte auch deutlich das Erscheinungsbild der einzelnen Kollagenfaserbündel.

Ergebnisse

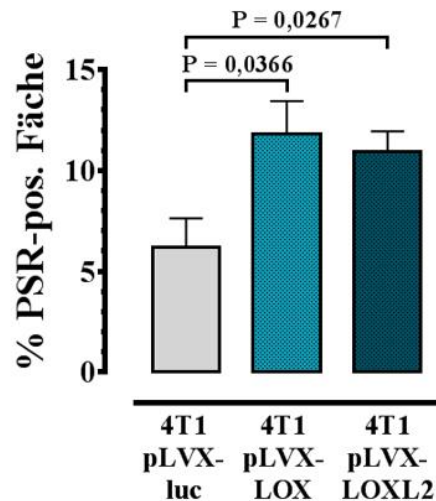


Abbildung 24: Quantifizierung der fibrillären Kollagenanteile in PSR-gefärbten 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren. Die PSR-positive Fläche ist bei LOX-/LOXL2-Überexpression deutlich höher im Vergleich zur Kontrollgruppe. $n = 5$. Fehlerbalken \pm SEM.

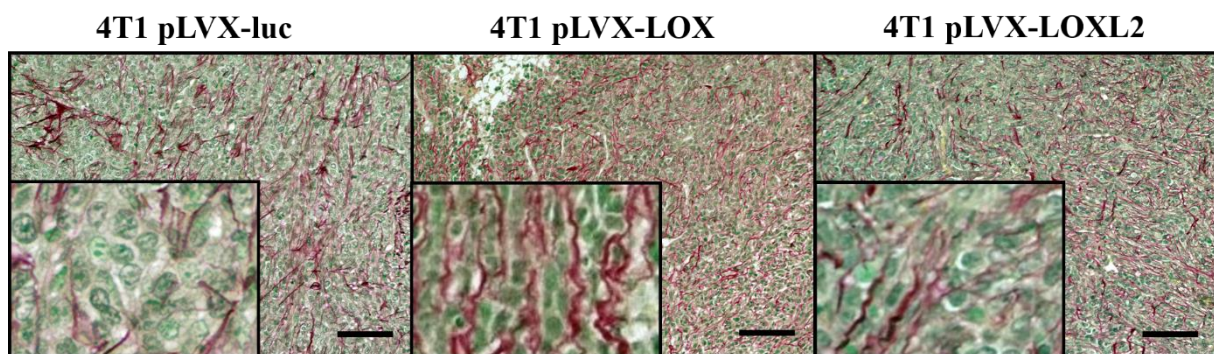


Abbildung 25: PSR-Färbung von 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren. Es sind jeweils zwei Ausschnitte eines unbehandelten 4T1-Tumors sowie jeweils zwei Ausschnitte eines LOX- bzw. LOXL2-überexprimierenden 4T1-Tumors dargestellt. Das Bindegewebe (vor allem Kollagen und Elastin) wird rot angefärbt, das Zytoplasma und die nicht-bindegewebigen Anteile grün. Bei LOX- und LOXL2-Überexpression ist ein dichteres Kollagennetzwerk im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Des Weiteren erscheinen die Kollagenfaserbündel bei LOX-/LOXL2-Überexpression wesentlich verdrillter. Skala = 100 μ m.

Um zu prüfen, ob eine LOX- bzw. LOXL2-Überexpression auch die Medikamenteneinbringung in das 4T1-Tumorgewebe beeinflusst, wurden durch die eigene Arbeitsgruppe analog zu den in Kapitel 1.5.3 beschriebenen, durch Röhrig (2015) getesteten β APN-behandelten Tumoren [46], die Akkumulation von Doxorubicin und die Penetration von H333342 untersucht. Beide Parameter zeigten sich bei LOX-/LOXL2-Überexpression signifikant verringert (vgl. Abb. 26, 27) [49].

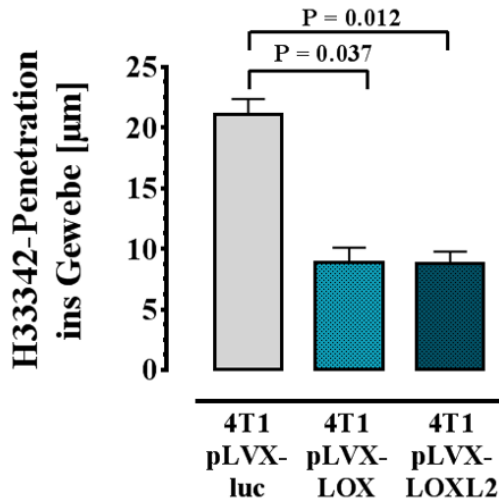


Abbildung 26: Quantifizierung der H33342-Gewebepenetration in 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren. Der Farbstoff H33342 penetriert bei LOX-/LOXL2-Überexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger in das die Blutgefäße umgebende Tumorgewebe. $n = 4$. Fehlerbalken \pm SEM. [49].

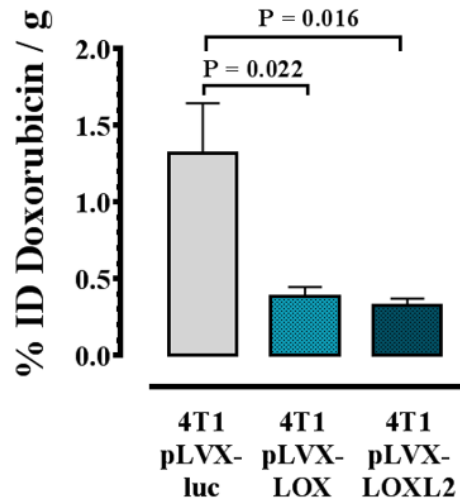


Abbildung 27: Quantifizierung der Doxorubicin-Akkumulation in 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren zwei Stunden nach der Injektion. Bei LOX-/LOXL2-Überexpression ist die Doxorubicin-Akkumulation im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduziert. $n = 9$. Fehlerbalken \pm SEM. [49].

3.4 Auswirkungen der LOX(L)-Aktivität auf die Blutgefäßdichte

Auch die Qualität und Dichte der Blutgefäße spielen in der Verteilung von Zytostatika im Tumorgewebe und somit in der therapeutischen Effektivität eine bedeutende Rolle [23, 24]. Aus diesem Grund wurde als weiterer, die Medikamentendiffusion beeinflussender Parameter, die Verteilung der Blutgefäße bei LOX-/LOXL2-Überexpression untersucht.

Wie in Kapitel 1.5.5 beschrieben, führte eine β APN-Behandlung in 4T1-, MT6- und EMT6-Tumoren zu einer reduzierten Anzahl von CD34- bzw. CD31-positiven Zellen, das heißt zu einer verringerten Kapazität zu Gefäßneubildungen.

Für die Untersuchung der LOX-/LOXL2-überexprimierenden 4T1-Tumore wurden IHC-gefärbte Tumorgewebeschnitte analysiert. Die quantitative Auswertung erfolgte analog jener der Ki-67-IHC-Färbungen. Die Analyse ergab bei LOX-/LOXL2-Überexpression eine Zunahme der MVD um mehr als das Doppelte (vgl. Abb. 28, 29). Die LOX-/LOXL2-Aktivität korrelierte also auch mit der MVD in Tumoren.

Ergebnisse

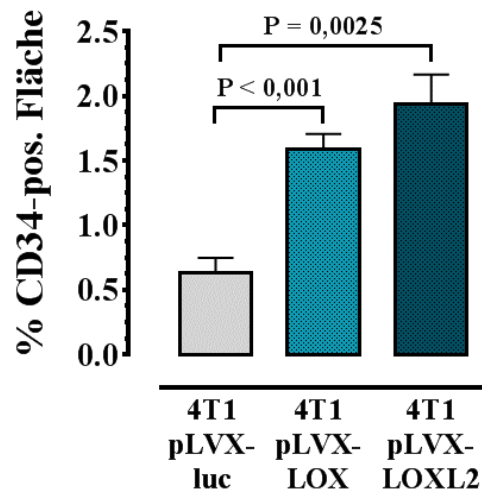


Abbildung 28: Quantifizierung der MVD mit CD34 in 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren. Es kommt zu einer deutlichen Zunahme der MVD bei LOX-/LOXL2-Überexpression. $n = 5$. Fehlerbalken \pm SEM.

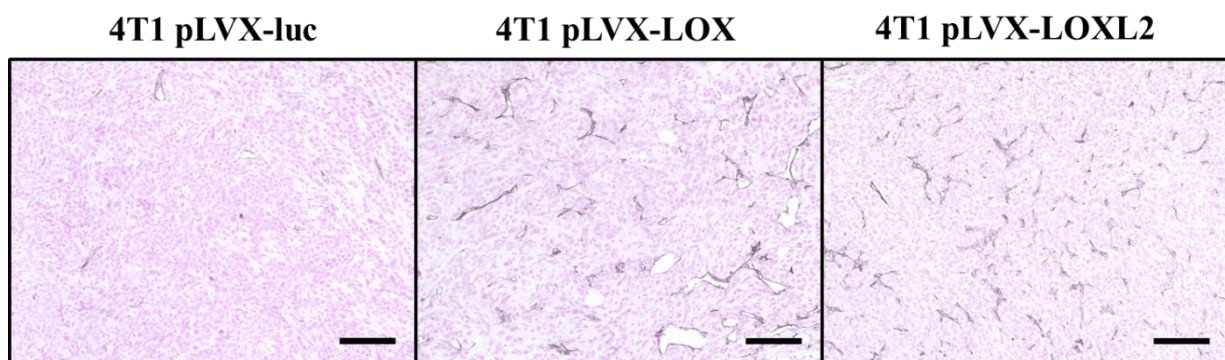


Abbildung 29: CD34-IHC-Färbung in 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-Tumoren: Es ist jeweils ein Ausschnitt eines unbehandelten 4T1-Tumors sowie jeweils ein Ausschnitt eines LOX- bzw. LOXL2-überexprimierenden 4T1-Tumors dargestellt. Die Überexpression von LOX-/LOXL2 führt in 4T1-Tumoren zu einer deutlich erhöhten MVD. Skala = 100 μ m.

3.5 Korrelation von Tumorversorgung und EZM nach LOX(L)-Inhibierung

Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine erhöhte LOX(L)-Aktivität durch eine verstärkte Matrixquervernetzung den Tumor vor einer adäquaten Sauerstoffversorgung abschirmt. Die resultierende Hypoxie könnte eine starke Hochregulierung pro-angiogenetischer Signale bewirken, was wiederum zu einem funktionsgestörten, stark durchlässigen Blutgefäßsystem führen könnte. Daher wurde angenommen, dass die resultierende unkontrollierte Angiogenese zumindest teilweise eine direkte Folge der LOX(L)-katalysierten

Ergebnisse

Matrixquervernetzung sein könnte. Allerdings können Nebenwirkungen einer β APN-Behandlung oder sekundäre bzw. tertiäre Effekte, beispielsweise durch veränderte Eigenschaften von Tumor-assoziierten Zellen, nicht ausgeschlossen werden. Vaskuläre Effekte, wie eine bereits durch Zaffryar-Eilot *et al.* (2013) nachgewiesene erhöhte Endothelzellinfiltration in Abhängigkeit der erhöhten GewebestEIFheit durch LOX(L) [48], könnten Auswirkungen auf die Versorgung im Tumor haben. Um daher unmittelbare Auswirkungen der zunehmend dichten und rigiden EZM von sekundären Folgen, vermittelt über vaskuläre Effekte, auf die Versorgung im Tumor zu unterscheiden, wurde der Hypoxiegrad in spontanen murinen 4T1-Lungenmetastasen untersucht. Die Untersuchung wurde auf kleine, nicht-vaskularisierte Metastasen beschränkt, um jeglichen vaskulären Einfluss auf den Oxygenierungsstatus der Metastasen auszuschließen. Dafür wurden die 4T1-Lungenmetastasen zuerst mit den Gefäßmarkern CD31 und CD34 untersucht. Bei CD31 stellte sich heraus, dass Kapillaren in den Lungengefäßen nicht angefärbt wurden. Demgegenüber zeigte sich, dass im Lungengewebe, außer klar unterscheidbaren Endothelzellen, eine Vielzahl weiterer Zellen CD34-positiv war. Beide Marker erwiesen sich somit als ungeeignet für die Untersuchung von Vaskularisierung im Lungengewebe. Aus diesem Grund wurde die Untersuchung auf Metastasen mit einer Größe unter 200 μ m limitiert, bei denen noch keine Vaskularisierung stattgefunden hat [58].

Zur Analyse wurden hochauflösende Bilder einzelner 4T1-Metastasen im Lungengewebe angefertigt und die Anzahl der Hif1 α -positiven Zellen in den Metastasen beider Gruppen verglichen. Nach einer zwölf-tägigen β APN-Behandlung wiesen die 4T1-Lungenmetastasen einen Rückgang um ca. 50 % an Hif1 α -positiven Zellen auf. Für die Auswertung wurden die Zellen mit nukleärer Hif1 α -Färbung in den einzelnen Metastasen beider Gruppen gezählt. Anschließend wurden die Mittelwerte miteinander verglichen (vgl. Abb. 30, 31).

Ergebnisse

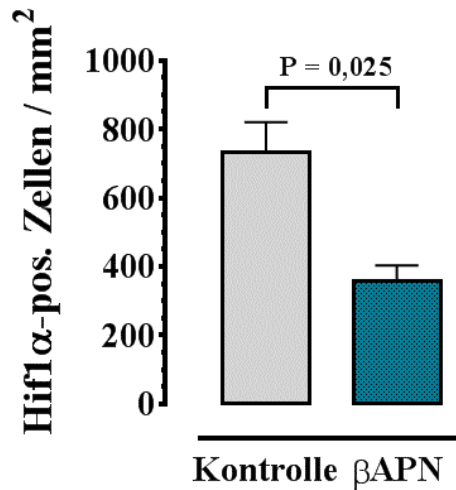


Abbildung 30: Quantifizierung von Tumorzellen mit nukleärer Hif1 α -Immunreaktivität in nicht-vaskularisierten spontanen 4T1-Lungenmetastasen. Nach β APN-Behandlung ist eine signifikant verringerte Anzahl an Hif1 α -positiven Zellen erkennbar. $n = 4$. Fehlerbalken \pm SEM.

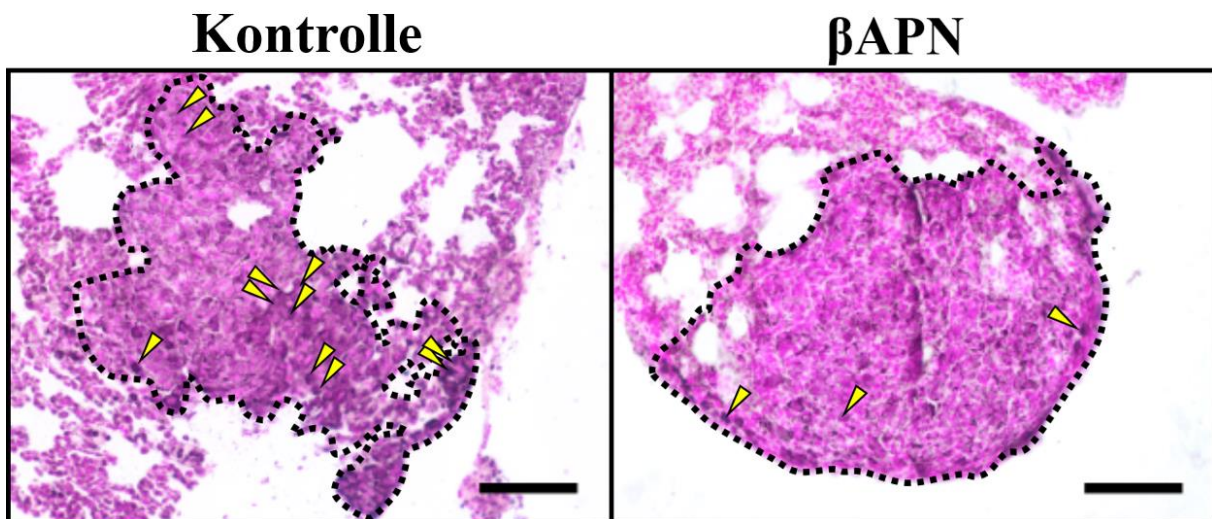


Abbildung 31: IHC-Färbung mit Hif1 α in nicht-vaskularisierten spontanen 4T1-Lungenmetastasen (umrandet): Links ist eine Lungenmetastase der Kontrollgruppe dargestellt, rechts aus der β APN-Behandlungsgruppe. Die gelben Pfeile zeigen auf Zellen mit nukleärer Hif1 α -Immunreaktivität. Nach der Behandlung mit β APN ist eine geringere Anzahl an Hif1 α -positiven Zellen erkennbar. Skala = 100 μ m.

Da Hif1 α ein positiver Regulator für VEGF-A ist [59, 60], lag nahe, dass nach einer verringerten Anzahl Hif1 α -positiver Zellen in den β APN-behandelten 4T1-Lungenmetastasen auch die Expression von VEGF-A reduziert sein müsste. Eine IHC-Färbung mit VEGF-A konnte jedoch nicht zuverlässig ausgewertet werden, da alle Metastasen am Rand deutlich intensiver gefärbt waren als die aus dem Inneren des Lungengewebes, ungeachtet aus welcher Behandlungsgruppe.

Ergebnisse

Außerdem wurden LOX-/LOXL2-überexprimierende 4T1-MTS untersucht. Durch die Untersuchung der MTS können jegliche Einflüsse von Tumor-assoziierten Zellen und somit auch der Vaskulatur ausgeschlossen werden. Es wurde eine verringerte MTS-Größe bei LOX-/LOXL2-Überexpression festgestellt (vgl. Abb. 32).

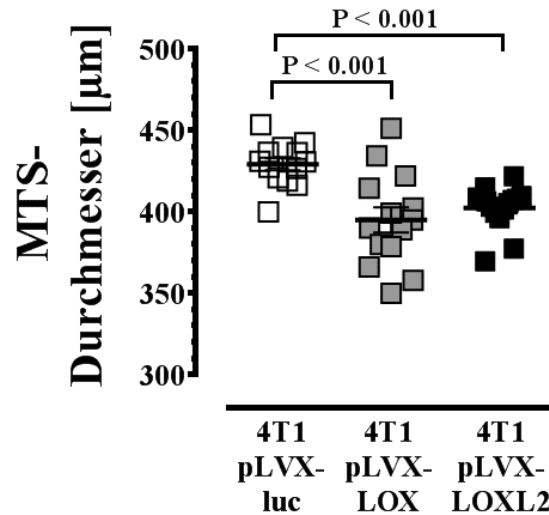


Abbildung 32: Größenverteilung der 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-MTS nach sechs Tagen Kultivierung. Die MTS weisen bei LOX- bzw. LOXL2-Überexpression eine signifikant verringerte Größe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. $n = 13$.

Die reduzierte Größe kann vermutlich einer verminderten Diffusion zugeschrieben werden, da die LOX-/LOXL2-überexprimierenden MTS einen nekrotischen, unterversorgten inneren Teil aufwiesen, welcher bei den Kontroll-MTS nicht zu sehen war. Des Weiteren lag eine verstärkte Färbungsintensität für den Hypoxiemarker CA IX bei erhöhter LOX- bzw. LOXL2-Aktivität vor. CA IX ist ein Hypoxie-reguliertes, membranassoziiertes Enzym, welches reversibel die Hydratisierung von Kohlenstoff zu Kohlensäure katalysiert. Eine erhöhte Expression von CA IX in Tumoren wird mit einer schlechten Prognose verknüpft [61, 62]. Eine IHC-Färbung für Ki-67 zeigte eine erhöhte Anzahl an proliferierenden Zellen in dem nicht-nekrotischen Randbereich. Somit kann ein anti-proliferativer Effekt für die verringerte Größe der MTS ausgeschlossen werden (vgl. Abb. 33 – 35).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass im Tumor eine verbesserte Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff nach LOX(L)-Inhibierung wahrscheinlich ein direkter Effekt der verbesserten Diffusion ist, welche durch die geringere Kollagenquervernetzung und -stabilisierung entsteht und nicht einen sekundärer Effekt der veränderten Vaskularisierung.

Ergebnisse

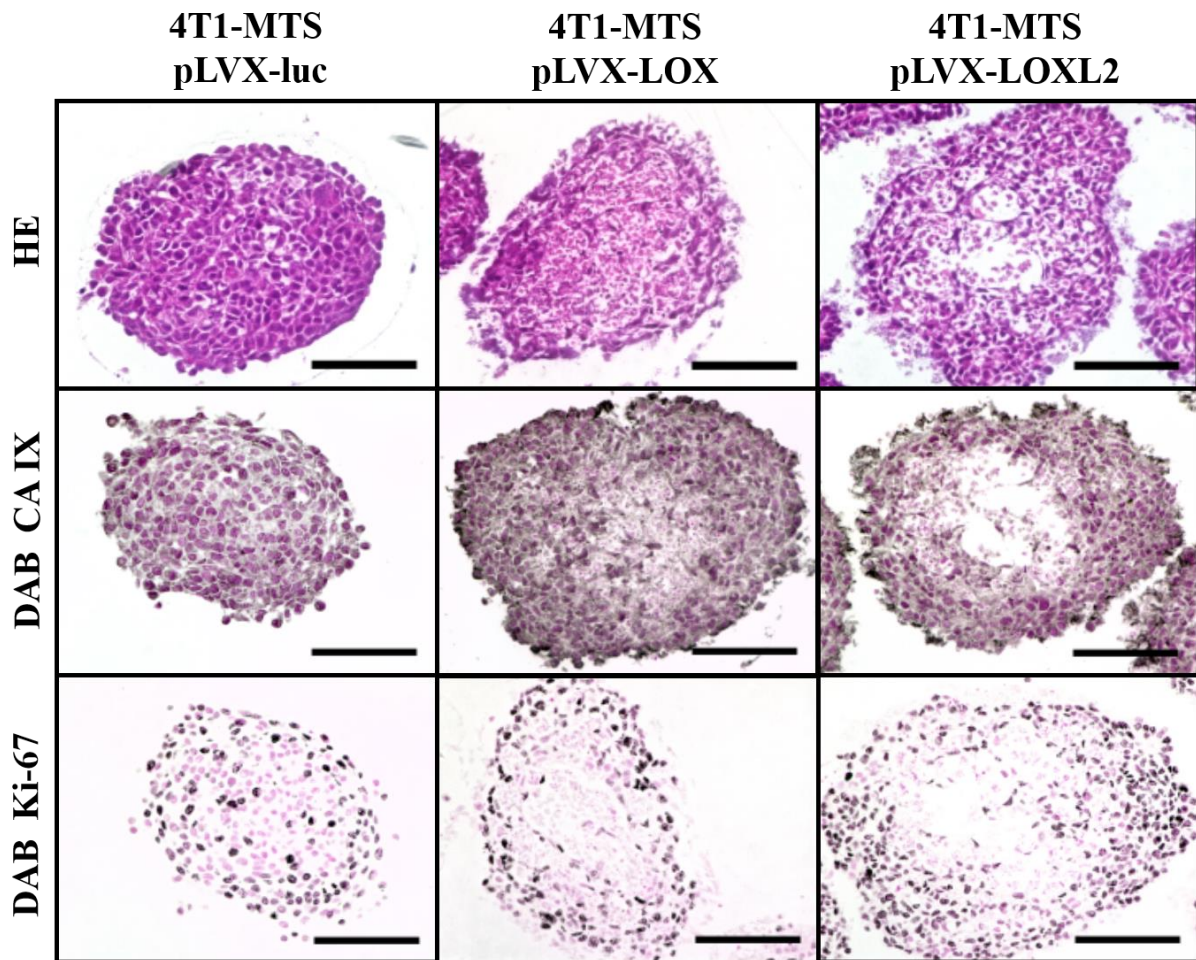


Abbildung 33: HE-Färbung bzw. IHC-Färbung mit CA IX und Ki-67 von 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-MTS. Die Abbildungen verdeutlichen bei LOX-/LOXL2-Überexpression eine Zunahme des nekrotischen Gewebes in den 4T1-MTS. Des Weiteren ist bei LOX-/LOXL2-Überexpression eine verstärkte Färbungsintensität für CA IX (Hypoxiemarker) sowie eine vermehrte Anzahl an Ki-67(Proliferationsmarker)-positiven Zellen erkennbar. Skala = 100 µm.

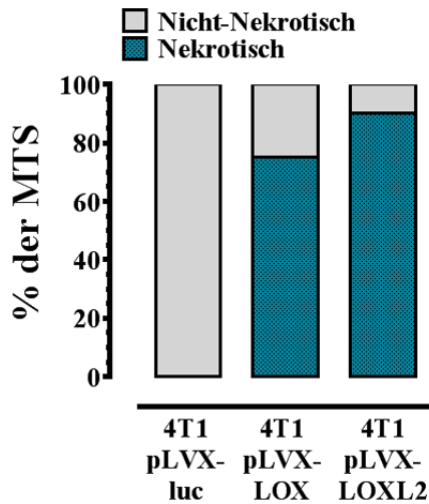


Abbildung 34: Quantifizierung der zentralen Nekroseflächen in 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-MTS. Bei LOX-/LOXL2-Überexpression ist ein großer Bereich im Inneren der MTS nekrotisch, während die Kontroll-MTS keine nekrotischen Areale aufweisen. $n = 8$.

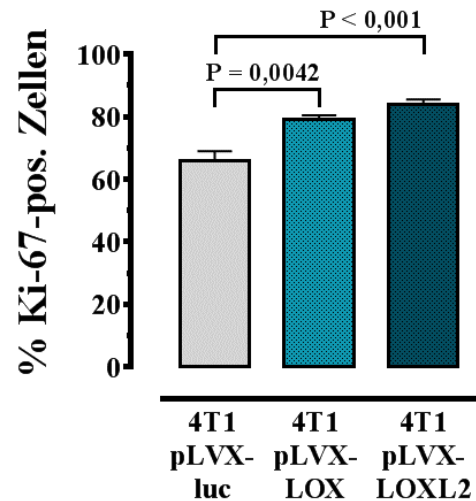


Abbildung 35: Quantifizierung der Ki-67-positiven Zellen in 4T1-pLVX-luc-, 4T1-pLVX-luc-LOX- und 4T1-pLVX-luc-LOXL2-MTS. Bei LOX-/LOXL2-Überexpression ist eine signifikant erhöhte Anzahl an Ki-67-positiven Zellen erkennbar. $n = 8$. Fehlerbalken \pm SEM.

3.6 mRNA-Expressionsanalyse in 2D-Zellkulturen, 3D-MTS und Tumoren

Die bisherigen Ergebnisse verdeutlichen den starken Einfluss der LOX(L)-Aktivität auf die Tumorangio-genese. Um ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen zu erhalten, wurde die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren/Zytokine mittels RT-PCR-Analysen bei veränderter LOX(L)-Aktivität untersucht. Diese spielen eine wichtige Rolle im Tumormetabolismus und in der -angiogenese. Die Vorgehensweise ist in Kapitel 2.12 beschrieben.

Eine veränderte LOX(L)-Aktivität kann primäre, sekundäre oder tertiäre Effekte im Tumor ausüben. Aus diesem Grund wurde die mRNA-Expressionsanalyse anhand 2D-Zellkulturen, 3D-MTS und Tumoren durchgeführt (vgl. Abb. 36). Dabei wurden β APN-behandelte 4T1- und MT6-2D-Zellkulturen untersucht sowie LOX-/LOXL2-überexprimierende 4T1-2D-Zellkulturen, 4T1-MTS und 4T1-Tumore. Veränderungen in 2D-Zellkulturen weisen auf direkte Effekte der veränderten LOX(L)-Aktivität auf Tumorzellen hin. Bei den 3D-MTS spielen zusätzlich die EZM und Diffusionseffekte eine Rolle. In den Tumoren wiederum können Tumor-assoziierte Zellen noch weitere Einflüsse ausüben. Dadurch sollen die beobachteten

Ergebnisse

Mechanismen weiter differenziert werden können. Eine veränderte mRNA-Expression um den Faktor 1,5 gilt als relevant.

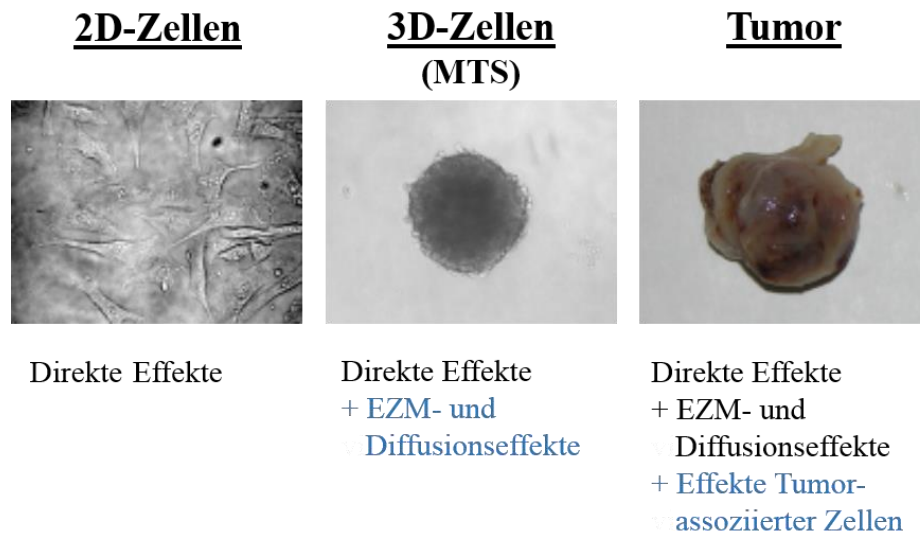


Abbildung 36: Übersicht der verschiedenen Effekte einer veränderten LOX(L)-Aktivität in 2D-Zellkulturen, 3D-MTS und Tumoren: In 2D-Zellkulturen führt eine veränderte LOX(L)-Aktivität zu direkten Effekten auf die Tumorzellen. In 3D-MTS müssen weiterhin zu den direkten Effekten noch Auswirkungen der EZM sowie Diffusionseffekte berücksichtigt werden. Im Tumor wiederum kann eine veränderte LOX(L)-Aktivität, zusätzlich zu den genannten Effekten, Auswirkungen auf Tumor-assoziierte Zellen ausüben und dadurch zu veränderten Eigenschaften im Tumor führen.

In den β APN-behandelten 2D-Zellkulturen stieg allein die Expression von PDGF-A in 4T1-Zellen (vgl. Abb. 37). In 4T1-2D-Zellkulturen änderte sich bei LOX-Überexpression lediglich die Transkription von Angpt1 (stieg) und Angpt2 (sank) signifikant. In LOXL2-überexprimierenden 4T1-2D-Zellkulturen wurde die Expression von Angpt1 ebenfalls erhöht, während die von Angpt2 vermindert wurde. Jedoch waren diese Ergebnisse knapp nicht signifikant (jeweils $P = 0,052$). In den LOXL2-überexprimierenden 4T1-2D-Zellkulturen wurde außerdem die Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor(G-CSF)-Expression signifikant verringert. Eine veränderte mRNA-Expression in 2D-Zellkulturen weist auf direkte Folgen der LOX- bzw. LOXL2-Aktivität hin.

In den LOX-/LOXL2-überexprimierenden 4T1-3D-MTS waren zusätzlich signifikante Transkriptionsveränderungen von PDGF-A, VEGF-A, VEGF-C und transforming-growth-factor- β 2 (TGF- β 2) zu beobachten. Dabei wurde die Expression der über den Transkriptionsfaktor HIF1 α gesteuerten Wachstumsfaktoren VEGF-A und VEGF-C erhöht.

Ergebnisse

In den LOX-/LOXL2-überexprimierenden 4T1-Tumoren kam es zu einer signifikant gesteigerten Expression fast aller Wachstumsfaktoren. Im Allgemeinen war erkennbar, dass eine LOX-/LOXL2-Überexpression zu einem maligneren, hypoxiegesteuerten Tumorprofil führte (vgl. Abb. 38). Im Gegensatz dazu ließ sich in den bereits untersuchten β APN-behandelten Tumorkulturen, vor allem bei den 4T1-Tumoren, ein insgesamt weniger malignes Genexpressionsprofil verzeichnen [47, 49].

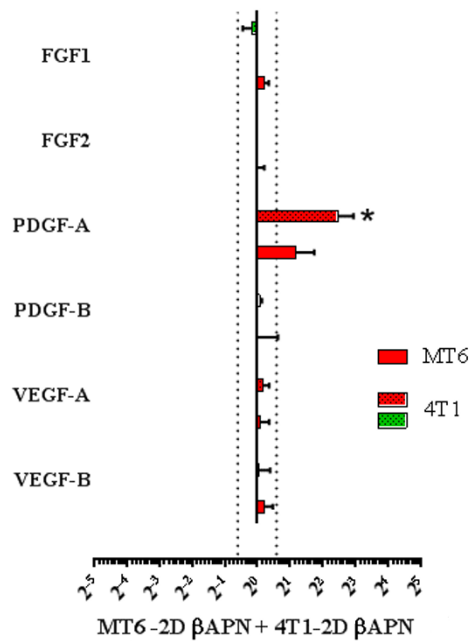


Abbildung 37: mRNA-Expressionsanalyse verschiedener Wachstumsfaktoren/Zytokine nach β APN-Behandlung in MT6- und 4T1-2D-Zellkulturen. Die Analyse wurde mittels einer Multiplex RT-PCR durchgeführt. Eine veränderte Expression um den Faktor 1,5 wird als relevant erachtet. Rot = erhöhte Expression, grün = verminderte Expression. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. $n = 3$. Fehlerbalken \pm SEM.

Ergebnisse

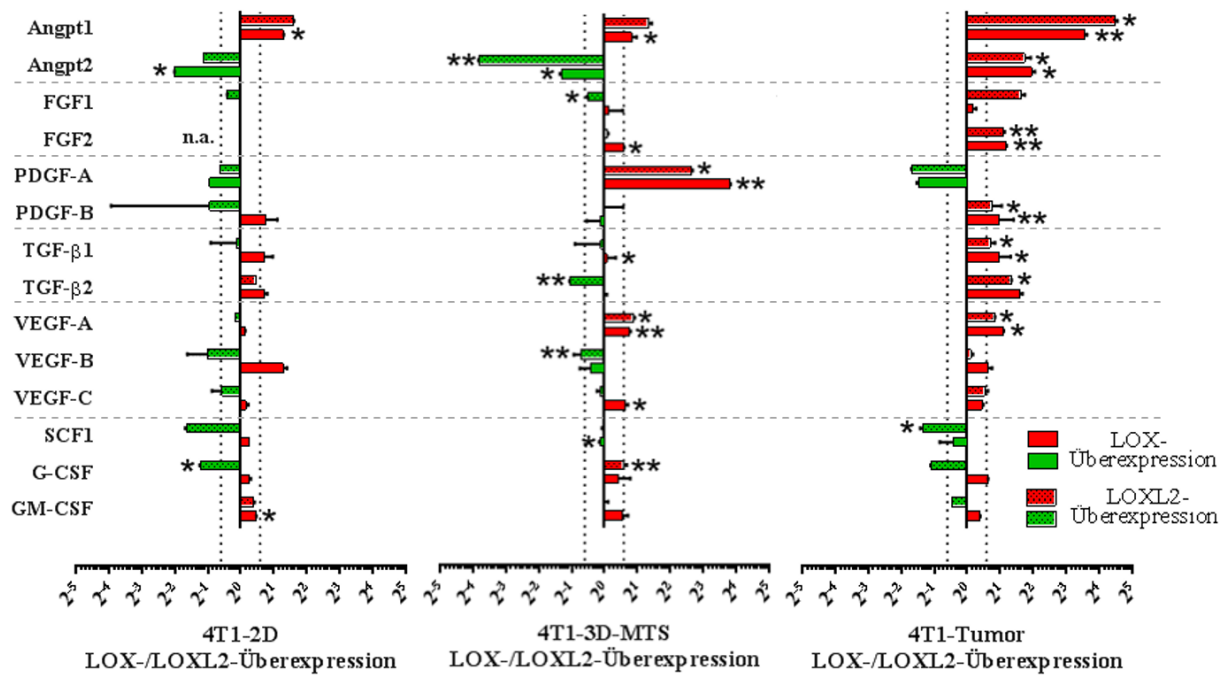


Abbildung 38: mRNA-Expressionsanalyse verschiedener Wachstumsfaktoren/Zytokine bei LOX-/LOXL2-Überexpression in 4T1-2D-Zellkulturen, 4T1-MTS und 4T1-Tumoren. Die Analyse wurde mittels einer Multiplex RT-PCR durchgeführt. Eine veränderte Expression um den Faktor 1,5 wird als relevant erachtet. Rot = erhöhte Expression, grün = verminderte Expression. n.a. = nicht auffindbar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. $n = 3$ (2D-Zellkultur), $n = 4$ (MTS, Tumore). Fehlerbalken \pm SEM.

3.7 Tumor-assoziierte Makrophagen

Wie in Kapitel 1.5.4 beschrieben, wurde in vier der fünf Tumormodellen nach LOX(L)-Inhibierung eine veränderte Dichte aller Makrophagen beobachtet. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine LOX(L)-Inhibierung auch zu einer Verschiebung innerhalb der Makrophagenpopulationen führen würde. Es wurde bereits gezeigt, dass in malignen Tumoren vor allem Makrophagen des M2-Subtyps vorhanden sind [22]. Für den Nachweis der einzelnen Makrophagensubtypen wurden IHC-Färbungen durchgeführt, mit einem inducible nitric oxide synthase(iNOS)-Antikörper zum Nachweis der M1-Makrophagen und einem Arginase-1(Arg-1)-Antikörper zum Nachweis der M2-Makrophagen [20]. Ziel der Versuche war es, den Anteil der M1- und M2-Makrophagen an der Gesamtmakrophagenzahl innerhalb der Tumore nach LOX(L)-Inhibierung herauszufinden. Zum einen wurden die Versuche jedoch dadurch erschwert, dass es auch Makrophagen geben könnte, die sich in einer Art Zwischentyp befinden. Durch die Möglichkeit den Phänotyp zu wechseln, ist es nicht ausgeschlossen, dass sich M1-Makrophagen in M2-Makrophagen umwandeln und umgekehrt. Makrophagen, die

Ergebnisse

sich gerade im Übergang befinden, können dann mittels IHC-Färbungen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Andererseits erwiesen sich die Makrophagenmarker als nicht-selektiv oder zeigten nur wenig Antikörpersignal. Eine zuverlässige Auswertung der IHC-Färbungen war daher nicht möglich. Diese Herangehensweise für die Evaluierung der M1- und M2-Makrophagen wurde daher als nicht zielführend verworfen. Für bessere Erkenntnisse sollte eine andere Methodik gewählt werden.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der LOX(L)-katalysierten Matrixquervernetzung in fünf verschiedenen Tumormodellen (4T1, MT6, E0771, EMT6, LLC) untersucht. Dabei wurden Änderungen der Zellproliferation und -apoptose, Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, MVD, Hypoxie, Makrophageninfiltration und Expression einiger Wachstumsfaktoren näher analysiert.

Wie im Ergebnisabschnitt durch neue Befunde belegt, beeinflusst die LOX(L)-Aktivität das Tumorwachstum über die Proliferationsrate der Tumorzellen. Frühere Studien berichteten von einem reproduzierbaren Anti-Tumor-Effekt in mehreren verschiedenen murinen Tumormodellen nach der Inhibierung von LOX(L) [18, 33, 44, 48]. In den hier beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von LOX(L) mittels einer β APN-Behandlung in den 4T1-Tumoren sowohl in einer reduzierten Proliferation, als auch in einem verringerten Tumorwachstum resultierte. Dahingegen blieben diese beiden Parameter in den MT6-, EMT6- und E0771-Tumoren nach einer β APN-Behandlung unbeeinflusst. In den LLC-Tumoren, welche ein verstärktes Tumorwachstum nach der β APN-Behandlung zeigten, konnte eine erhöhte Dichte an proliferierenden Zellen insbesondere am Tumorrand beobachtet werden. Es wurde dargelegt, dass die Hemmung von LOX(L) mittels β APN abhängig von den hier untersuchten Tumoren die Proliferation und das Tumorwachstum sowohl positiv als auch negativ beeinflussen kann. Für eine klinische Verwendung der LOX(L)-Inhibitoren haben die unterschiedlichen Folgen auf diese beiden Parameter beträchtliche Auswirkungen. Daher stellte sich die Frage, wie diese gegensätzlichen proliferativen Effekte zustande kommen. Baker *et al.* (2013) zeigten, dass ein rigideres Gewebe die Tumorzellproliferation beeinflussen kann. Sie erklären den proliferativen Effekt infolge einer gesteigerten LOX-Expression durch eine erhöhte Gewebesteifheit und folglich durch eine Aktivierung des fokalen Adhäsionskinase(FAK)-Signalweges [63]. Die Sensitivität gegenüber Veränderungen der Substrat- bzw. der Gewebesteifheit variiert jedoch sowohl in Tumorzellen, als auch in Normalzellen stark [64]. Zudem spricht die überwiegende Mehrheit von Tumorzellen nicht auf eine FAK-Hemmung an [65]. Ein positiver Effekt einer erhöhten LOX(L)-Expression auf die Proliferation sollte daher auf die wenigen FAK-sensitiven Zelllinien beschränkt sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass eine LOX(L)-Inhibierung zu einer verminderten zentralen Nekrose in allen fünf Tumormodellen führte. Weniger Nekrose im Tumorgewebe lässt auf eine verbesserte Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen schließen.

In Übereinstimmung mit diesem Befund konnte bei LOX-/LOXL2-Überexpression eine deutliche Zunahme nekrotischen Gewebes in 4T1-Tumoren festgestellt werden. Folglich kann angenommen werden, dass bei erhöhter LOX(L)-Aktivität die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen verringert werden kann, was die Proliferation der Tumorzellen beeinträchtigen könnte. Diese Ergebnisse deuten an, dass die Inhibierung von LOX(L) nicht zu einem generellen anti-proliferativen Effekt auf die Tumorzellen führt. Daher wurde angenommen, dass eine unterschiedliche Sensitivität der Tumorzellen gegenüber der Gewebesteifheit bzw. einer Aktivierung des FAK-Signalweges einerseits und einem Sauerstoff- und Nährstoffmangel andererseits die verschiedenen Effekte der LOX(L)-Inhibierung auf das Tumorwachstum und Zellproliferation erklären könnten. Das bedeutet, Tumore, welche mit einem erhöhten Wachstum nach der Hemmung von LOX(L) reagieren, könnten von einer verbesserten Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen profitieren, wodurch die Zellproliferation begünstigt werden würde. Dahingegen könnte eine reduzierte Geweberigidität infolge der LOX(L)-Inhibierung das Wachstum entsprechend sensibler Zellen über eine verringerte Aktivierung Integrin-abhängiger Signalwege beeinträchtigen. Folglich ist es möglich, dass die LOX(L)-Aktivität das Tumorwachstum auf zwei gegenläufigen Wegen beeinflusst (vgl. Abb. 39).

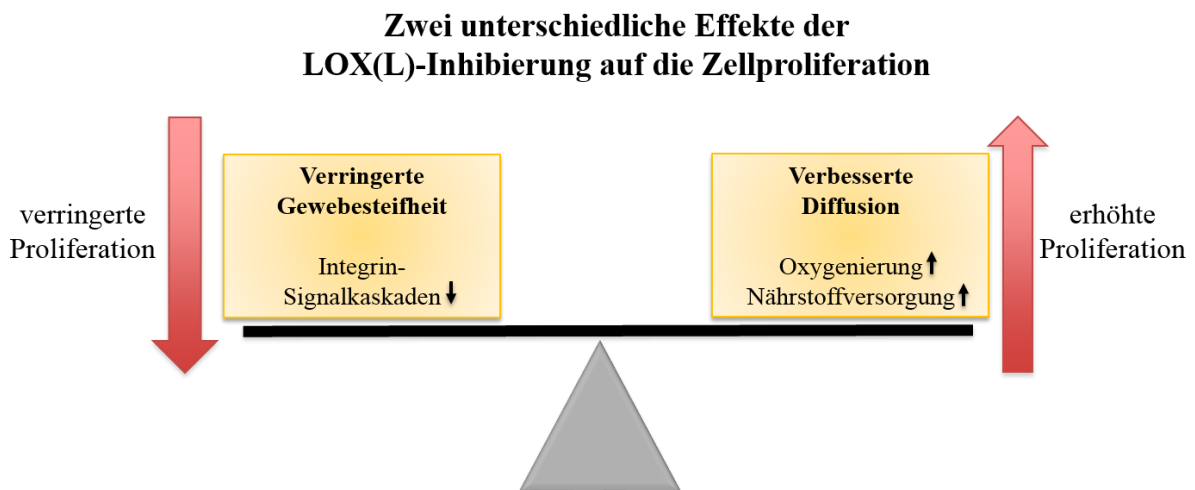


Abbildung 39: Hypothese: Die LOX(L)-Inhibierung könnte die Zellproliferation und damit das Tumorwachstum auf zwei unterschiedlichen Wegen beeinflussen. In Tumoren, in denen ein verringertes Wachstum nach LOX(L)-Inhibierung beobachtet wurde, könnte eine verminderte Aktivierung Integrin-abhängiger Signalwege infolge einer reduzierten Gewebesteifheit die Zellproliferation beeinträchtigen. Dahingegen könnte in Tumoren, welche nach LOX(L)-Hemmung ein erhöhtes Wachstum zeigten, eine bessere Oxygenierung infolge einer verbesserten Diffusion die Proliferation der Zellen positiv beeinflussen. Eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber der Gewebesteifheit einerseits bzw. gegenüber einer Nährstoffversorgung andererseits könnte daher die unterschiedlichen Proliferationsraten der Tumore nach LOX(L)-Inhibierung mittels β APN erklären.

Analysen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass unter den fünf untersuchten Tumoren lediglich die Proliferationsrate von 4T1-Zellen auf eine *in-vitro*-Änderung der Substratsteifheit innerhalb des normalerweise in soliden Tumoren beobachteten physiologisch relevanten Bereiches, reagierte. Außerdem sprachen nur 4T1-Zellen auf die FAK-Hemmung mit PF-573228 an. Weiterhin wurde die Proliferationsrate der jeweiligen Tumorzellen bei 20 % und 2 % Sauerstoff analysiert, um die Abhängigkeit der Tumorzellen von der Sauerstoffversorgung zu untersuchen. Die Proliferationsrate der LLC-Zellen veränderte sich bei Reduzierung des Sauerstoffangebots auf 2 % am stärksten [49]. Das bedeutet, dass übereinstimmend mit der oben erwähnten Hypothese das Tumorwachstum nach β APN-Behandlung nur in jenen Tumoren verringert wurde, deren Zellen sensitiv gegenüber der Substratsteifheit und FAK-Inhibition waren (4T1). Ein gesteigertes Tumorwachstum erfolgte in Tumoren, deren Zellen als stark Hypoxie-sensitiv beobachtet wurden. Tumore, deren Wachstum offensichtlich durch die Versorgung limitiert wurde (LLC), reagierten mit einem Wachstumsschub nach LOX(L)-Inhibierung.

Interessanterweise wurde das Wachstum von 4T1-Tumoren bei LOX-/LOXL2-Überexpression, wie auch nach LOX(L)-Hemmung, verringert. Zwar wurde das 4T1-Tumorwachstum bei LOX-/LOXL2-Überexpression zunächst beschleunigt, ab dem 18. Tag fiel die Wachstumsrate jedoch deutlich hinter die der Kontrollen zurück. Die LOX-/LOXL2-Expression ist in 4T1-Tumoren gering, die Expression von Kollagen I und II jedoch hoch [11]. Durch die Überexpression von LOX/LOXL2 wurde die EZM dieser Tumore umgeformt, wodurch ein höherer Kollagenanteil und ein dichter vernetztes Kollagennetzwerk entstanden. Das zuerst schnelle 4T1-Tumorwachstum bei LOX-/LOXL2-Überexpression wurde durch die gehemmte Diffusion aufgrund der dichter werdenden EZM eingeschränkt, sodass das Wachstum allmählich hinter das der Kontrollgruppe zurückfiel.

Eine LOX(L)-Inhibierung mittels β APN führte in allen fünf untersuchten Tumormodellen zu einer Reduzierung nekrotischer Gewebeanteile, welche sich in vier der fünf Tumormodelle als statistisch signifikant erwies. Diese Beobachtungen lassen auf eine insgesamt verbesserte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung in β APN-behandelten Tumoren schließen. Zudem konnte eine erhöhte Einbringung von Doxorubicin sowie eine verstärkte Penetration und gleichmäßigere Verteilung des Farbstoffes H33342 in das Gewebe β APN-behandelter Tumore beobachtet werden [46]. Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche veranschaulichen, dass eine ektopische Überexpression von LOX bzw. LOXL2 gegensätzliche Effekte auslösen kann. Eine LOX-/LOXL2-Überexpression führte in den untersuchten 4T1-Tumoren zu einem

Diskussion

deutlich dichteren und verdrillter wirkenden Kollagenetzwerk. Zudem konnte in den LOX-/LOXL2-überexprimierenden Tumoren eine deutliche Zunahme des nekrotischen Tumorgewebes verzeichnet werden. Das beobachtete reduzierte 4T1-Tumorwachstum bei LOX-/LOXL2-Überexpression schien daher durch eine eingeschränkte Versorgung des Tumorgewebes bedingt zu sein. Diese eingeschränkte Versorgung lässt sich auf das höher organisierte Kollagenetzwerk durch die LOX-/LOXL2-Überexpression zurückführen. Die bei LOX-/LOXL2-Überexpression erhöhte EZM-Quervernetzung könnte die physikalische Diffusion im Tumor weiter reduzieren. Infolgedessen könnte die Versorgung einzelner Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen so weit verringert werden, dass dieser Mangel zu einer Nekrotisierung einzelner Gewebeareale führt. Ferner konnte durch die eigene Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass sowohl die Akkumulation von Doxorubicin als auch die Penetration von H33342 bei LOX-/LOXL2-Überexpression verringert wurden [49]. Diese Ergebnisse verdeutlichen das Potenzial von LOX(L)-Inhibitoren als unterstützende Anti-Tumor-Medikamente mit dem Ziel, die Einbringung und damit das therapeutische Ansprechen von Zytostatika zu verbessern.

Weitere Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigten, dass die Inhibierung von LOX(L) mittels β APN die therapeutische Antwort auf Doxorubicin und Cisplatin wesentlich verbessert. EMT6- und LLC-Tumore wurden in einer initialen β APN-Phase vorbehandelt, um die Diffusionsrate im Tumor zu verbessern. Während in den EMT6-Tumoren β APN allein das Wachstum nicht beeinflusste, verbesserte β APN jedoch das therapeutische Ansprechen auf Doxorubicin. In LLC-Tumoren waren weder β APN noch Cisplatin als Einzelwirkstoff effektiv. Die Kombination beider Wirkstoffe resultierte jedoch in einer verbesserten therapeutischen Antwort [49]. In der Behandlung aufkommender 4T1-Metastasen war dieser Effekt der LOX(L)-Inhibition, die Effektivität der Zytostatika zu verbessern, sogar noch stärker. Die Therapie mit β APN beließ Makrometastasen in einem unreifen Status, während deren Wachstum jedoch nicht komplett inhibiert wurde: Sowohl β APN als auch Doxorubicin allein reduzierten die Größe von Metastasen, aber nur β APN konnte als alleinige Therapie auch deren Anzahl verringern. Die Kombination der beiden Wirkstoffe führte ebenfalls zu einer deutlich reduzierten Anzahl von Metastasen. Für eine aussagekräftige statistische Analyse war die Anzahl der Metastasen in der kombinierten Behandlungsgruppe jedoch zu gering. Dahingegen zeigten neuere Ergebnisse der Arbeitsgruppe, dass die Überexpression von LOX-/LOXL2 in 4T1-Tumoren zu einer kompletten Chemoresistenz führte, während die Kontrollgruppe auf die Behandlung mit Doxorubicin mit einer signifikanten Wachstumsverringerung reagierte [49].

Schütze *et al.* (2015) zeigten bereits, dass in diesem unreifen Status ohne schützende Kollagenbarriere, die Tumorzellen anfälliger gegenüber Chemotherapeutika bleiben und höheren Medikamentenkonzentrationen ausgesetzt werden [11].

Die positiven Effekte der LOX(L)-Aktivität auf die Tumorangio-genese sind gut untersucht [33, 48, 66]. Zaffryar-Eilot *et al.* (2013) beschrieben als Ursache einer erhöhten Blutgefäßdichte eine vermehrte Migration endothelialer Zellen in das rigidere Tumorgewebe [48]. Folglich sollte eine LOX(L)-Inhibierung den Medikamententransport auch über einen sekundären Effekt, die Angiogenese, beeinflussen können. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse demonstrierten dahingegen einen weiteren Mechanismus, der die beobachtete Reduktion der MVD nach der LOX(L)-Inhibition mittels einer β APN-Behandlung erklären könnte. Die Inhibierung von LOX(L) führte zu einer geringeren Quervernetzung der EZM und folglich zu einer reduzierten Gewebesteifheit im Tumor. Infolgedessen wurde die Diffusion innerhalb des Tumorgewebes verbessert und die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen erhöht. Die verbesserte Diffusion im Tumor führte vermutlich zu weniger Hypoxie und zu einer weniger malignen Tumormikroumgebung. Durch den reduzierten Hypoxiegrad kann es zu einer verringerten Expression hypoxieregulierter, pro-angiogenetischer Signale kommen und somit zu einer Drosselung der Angiogenese. Dadurch würde wiederum die MVD verringert werden (vgl. Abb. 40). Röhrig *et al.* (2015) zeigten bereits durch mRNA-Expressionsanalysen, dass nach β APN-Behandlung eine reduzierte VEGF-A-Expression in 4T1- und MT6-Tumoren zu beobachten war [24]. Durch ergänzende Versuche der eigenen Arbeitsgruppe mit den drei anderen Tumormodellen (LLC-, EMT6- und E0771-Tumore) konnte dargelegt werden, dass es in den EMT6-Tumoren ebenfalls zu einer verringerten VEGF-A-Expression nach β APN-Behandlung kam [49]. Eine Abnahme der MVD konnte also nur in Tumoren beobachtet werden, bei deren mRNA-Expressionsanalyse auch eine reduzierte VEGF-A-Expression zu sehen war (vgl. Abb. 41). In prä-vaskularisierten 4T1-Mikrometastasen wurde nach einer β APN-Behandlung eine deutlich verringerte Hypoxie beobachtet. Es kam also zu einer verbesserten Versorgung mit Sauerstoff, das heißt zu einer verbesserten Oxygenierung der 4T1-Lungenmetastasen. Dahingegen zeigte eine LOX-/LOXL2-Überexpression in 4T1-MTS eine stärkere Intensität für den Hypoxiemarker CA IX im Vergleich zu deren Kontrollgruppe. Da sowohl in MTS als auch in nicht-vaskularisierten Metastasen jegliche Einflüsse Tumorassoziiertes Zellen und somit auch vaskuläre Effekte ausgeschlossen werden können, zeigt dies, dass die beobachtete verbesserte Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen nach LOX(L)-Inhibierung vermutlich ein direkter Effekt der verbesserten Diffusion im Tumorgewebe ist.

Diese ist durch eine geringere und weniger stabile Quervernetzung der EZM bedingt. Der verringerte Hypoxiegrad nach der LOX(L)-Inhibierung ist daher wahrscheinlich die Ursache und nicht ein Resultat der reduzierten Angiogenese. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse widersprechen somit der Erklärung von Zaffryar-Eilot *et al.* (2013), die den verringerten Hypoxiegrad als Folge einer besseren Vaskularisierung, induziert durch eine vermehrte Infiltration endothelialer Zellen in Abhängigkeit eines steiferen Tumorgewebes, beschrieben [48].

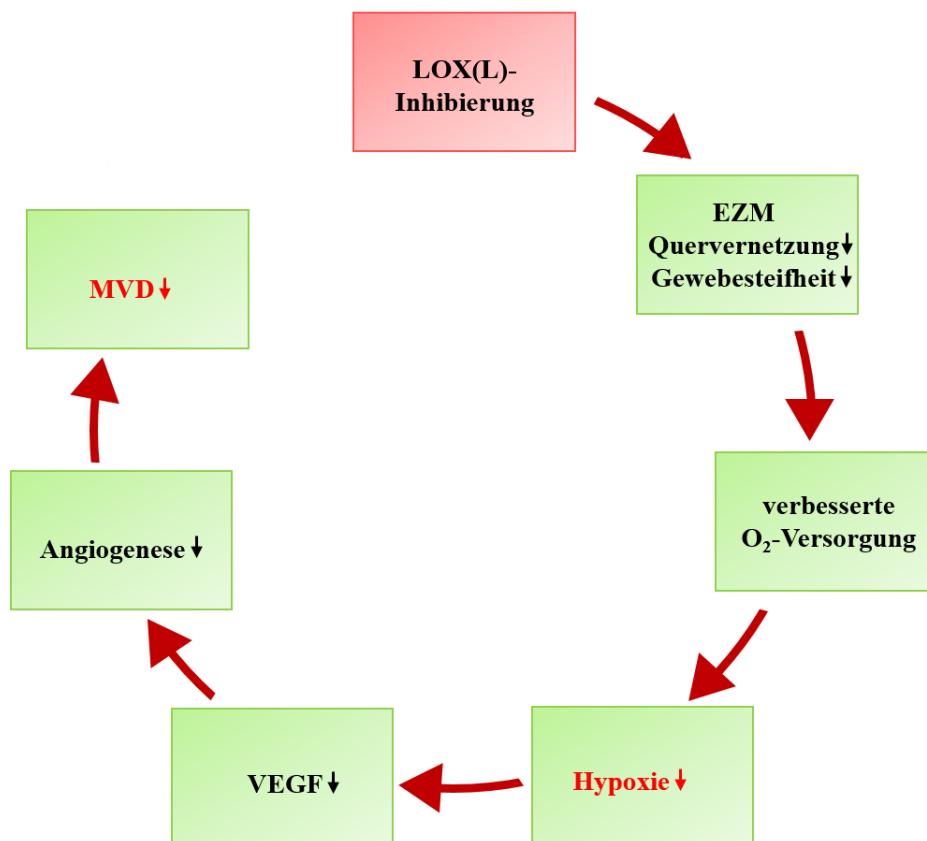


Abbildung 40: Auswirkungen der LOX(L)-Inhibierung auf die MVD im Tumor. Durch die Inhibierung von LOX(L) kommt es aufgrund einer geringeren EZM-Quervernetzung und somit reduzierten Gewebesteifheit zu einer verbesserten Diffusion im Tumorgewebe. Dadurch wird die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen erhöht, was wiederum den Hypoxiegrad im Tumor reduzieren kann. Infolge der verringerten Hypoxie könnte die Expression pro-angiogenetischer Zytokine, wie VEGF, vermindert werden und somit die Angiogenese gedrosselt werden. Daraufhin würde die MVD reduziert werden.

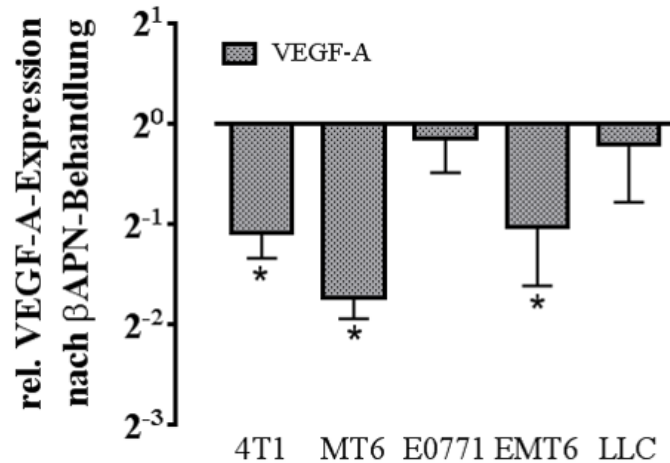


Abbildung 41: mRNA-Expressionsanalyse von VEGF-A in 4T1-, MT6-, E0771-, EMT6- und LLC-Tumoren nach β APN-Behandlung. In den 4T1-, MT6- und E0771-Tumoren ist ein signifikanter Rückgang der VEGF-A-Expression nach β APN-Behandlung zu sehen. * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$. $n = 4$. Fehlerbalken \pm SEM. [24, 49].

Weder eine ektopische LOX-/LOXL2-Überexpression, noch eine β APN-Behandlung konnten die Expression von VEGF-A oder fibroblast growth factor-2 (FGF2) in 2D-Zellkulturen beeinflussen. Dies legt nahe, dass die LOX(L)-Proteine oder ihre katalytische Aktivität keinen direkten Effekt auf die Expression dieser Zytokine ausüben. Diese Ergebnisse stünden somit in Kontrast zu früheren Studien, welche berichten, dass LOX direkt die Expression von VEGF-A oder Hif1 α (transkriptionaler Aktivator von VEGF-A und FGF2) beeinflusst [66, 67]. Eine veränderte VEGF-A-Expression wurde nur in LOX-/LOXL2-überexprimierenden 4T1-MTS und in LOX-/LOXL2-überexprimierenden 4T1-Tumoren festgestellt. Die FGF2-Expression änderte sich lediglich in LOX-/LOXL2-überexprimierenden 4T1-Tumoren. Eine veränderte Expression der Transkriptionsfaktoren konnte also nur in Systemen beobachtet werden, in denen die LOX(L)-Aktivität auch für eine reduzierte Oxygenierung ursächlich war. Ein Großteil der Veränderungen in der Expression der Wachstumsfaktoren und Zytokine nach LOX(L)-Inhibierung könnten durch sekundäre oder tertiäre Effekte verursacht werden, da in 3D-Zellkulturen und Tumoren die meisten Transkriptionsänderungen beobachtet wurden. Sekundäre Effekte können beispielsweise Veränderungen Integrin-abhängiger Signalwege oder des Hypoxiegrades sein. Tertiäre Effekte können unter anderem durch eine veränderte Zusammensetzung oder Infiltration Tumor-assoziierten Zellen bedingt sein [48]. Es wurden jedoch auch wenige direkte Zielproteine der LOX(L)-Aktivität identifiziert: Bei LOX-/LOXL2-Überexpression änderte sich in 4T1-2D-Zellkulturen die Expression von Angpt1, Angpt2 und G-CSF. In den β APN-behandelten 4T1-2D-Zellkulturen stieg die PDGF-A-Expression. Direkte

Diskussion

Effekte der LOX(L)-Aktivität auf den Tumor können beispielsweise über die Oxidation von Oberflächenproteinen entstehen [66, 68]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass LOX(L) den PDGF-Rezeptor- β oxidiert, was in einer Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden resultiert [68]. Eine Stimulierung des PDGF-Rezeptors bewirkt eine vermehrte Expression der Angiogenese-fördernden Zytokine Angpt1, Angpt2, VEGF-A und PDGF-A [69, 70]. Dies würde in den LOX-/LOXL2-überexprimierenden 4T1-2D-Zellkulturen die erhöhte Angpt1-Expression erklären, jedoch nicht die reduzierte Angpt2-Expression oder die unveränderte Expression von VEGF-A. Des Weiteren begründet dies nicht die gemessene erhöhte PDGF-A-Expression in β APN-behandelten 2D-Zellkulturen. Die Mechanismen, durch welche LOX(L) die Expression dieser Zytokine beeinflusst, müssen daher noch weiter untersucht werden. Wie in 2D-Zellkulturen, wurde die Angpt2-Expression auch in MTS bei LOX-/LOXL2-Überexpression verringert. In LOX-/LOXL2-überexprimierenden 4T1-Tumoren wurde dagegen eine erhöhte Angpt2-Expression gemessen. In β APN-behandelten 4T1-Tumoren wurde in Übereinstimmung damit eine reduzierte Angpt2-Expression beobachtet [47, 49]. Die Expression von Angpt2 könnte also durch Tumor-assoziierte Zellen beeinflusst werden. Angpt2 fördert über Wechselwirkungen mit dem Tie2-Rezeptor die Endothelzellproliferation und -migration und spielt dadurch eine bedeutsame Rolle in der Tumorangio-genese [71]. Eine LOXL2-Überexpression führte in 2D-Zellkulturen zu einer verringerten G-CSF-Expression. Im Gegensatz dazu führte die LOXL2-Überexpression in MTS zu einer erhöhten Expression dieses Wachstumsfaktors. In Tumoren wiederum wurde weder durch β APN [47, 49], noch durch eine LOX-/LOXL2-Überexpression die G-CSF-Expression beeinflusst. Die zugrundeliegenden Mechanismen können noch nicht gedeutet werden und müssen durch weitere Untersuchungen näher analysiert werden.

Zwei hauptsächliche Folgen einer hohen LOX(L)-Aktivität bzw. eines hohen Kollagengehalts können in Tumoren beobachtet werden: Eine erhöhte EZM-Rigidität sowie eine reduzierte Versorgung des Tumors mit Sauerstoff, Nährstoffen und Medikamenten. Als dessen sofortige Konsequenz resultieren im Tumor ein erhöhter Hypoxiegrad und eine erhöhte Wahrscheinlichkeit intrinsischer Therapieresistenz. Sekundäre Folgen, wie Veränderungen des Tumorwachstums, Invasivität und Aktivierung von Zytokin-Signalkaskaden, hängen vom jeweiligen Tumor und dessen maligner Mikroumgebung ab. Tumore, deren Wachstum bereits durch eine reduzierte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung limitiert wird, könnten bei erhöhter LOX(L)-Aktivität bzw. in Folge des hohen Kollagengehalts noch stärker gehemmt werden.

Diskussion

Dahingegen könnte das Wachstum von Tumoren, welche in Folge einer erhöhten Geweberigidität FAK-abhängig eine erhöhte Zellproliferation aufweisen, noch stärker gefördert werden. Da in den fünf untersuchten Tumormodellen die mRNA-Expression verschiedener Wachstumsfaktoren nicht einheitlich war, ist es nicht überraschend, dass Abweichungen bezüglich deren Tumormikroumgebung resultieren, beispielsweise Änderungen der MVD oder Makrophageninfiltration. Je tiefer die Änderungen in der Effektkaskade auftreten, desto variabler erscheinen sie. Das bedeutet, dass in unterschiedlichen Tumoren die Art und der Umfang ihrer Ausprägung nicht mehr vorherzusagen sind.

Methoden, welche die Medikamenteneinbringung und die homogene Medikamentenverteilung im Tumorgewebe steigern, könnten die Effektivität von Zytostatika unmittelbar verbessern. Die EZM-Zusammensetzung und ihre Rigidität beeinflussen Tumorzellüberleben und -proliferation sowie Malignität, dadurch wiederum Tumorprogression und Therapieerfolg [28-30]. Die beschriebenen Ergebnisse demonstrieren eine direkte Verbindung zwischen EZM-Komponenten und einer intrinsischen Therapieresistenz. Der hohe Kollagengehalt und die erhöhte LOX(L)-Expression, welche in soliden Tumoren beobachtet werden, starten einen Circulus vitiosus einer sich selbst verstärkenden Hypoxie, fehlgeleiteten Angiogenese und malignen Signalkaskaden. Dieser Teufelskreis könnte durch einen geeigneten Therapieansatz unterbrochen werden. Es wurde gezeigt, dass eine Modifikation der EZM ein möglicher Weg ist, um die Sensitivität gegenüber Zytostatika zu verbessern und die Tumormalignität zu reduzieren. Im Gegensatz dazu fördert eine LOX-/LOXL2-Überexpression die Wahrscheinlichkeit einer intrinsischen Therapieresistenz. Die hier vorgelegten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine therapeutische Modifizierung der EZM das Potenzial birgt, die maligne Tumormikroumgebung in einen weniger malignen Zustand zu überführen sowie die Medikamenteneinbringung und -verteilung innerhalb des Tumorgewebes zu verbessern. Dies könnte den Weg zu einer neuen strategischen Herangehensweise in der systemischen Therapie maligner Erkrankungen öffnen: Zuerst wird der Tumor durch die Inhibierung von LOX(L) in einen weniger malignen und leichter angreifbareren Status versetzt, um ihn nachfolgend effektiv mit Zytostatika zu bekämpfen.

5 Zusammenfassung/Summary

Die EZM bildet ein Netzwerk quervernetzter Proteine, welches alle Zellen im Tumor umgibt. Sie übt direkte Effekte auf die Medikamenteneinbringung und -verteilung aus und somit auch auf die therapeutische Effizienz von Chemotherapeutika. Die LOX(L)-Proteinfamilie katalysiert die oxidative Desaminierung von Lysinresten in Elastin und Kollagenfasern und ermöglicht dadurch eine intra- und intermolekulare Quervernetzung. Diese wird für die Reifung und Stabilisierung der Kollagene in der EZM benötigt. Eine erhöhte LOX(L)-Expression steigert durch eine verstärkte EZM-Quervernetzung die Gewebesteifheit im Tumor und bildet so eine physikalische Diffusionsbarriere. Durch diese Barriere wird die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen reduziert. Die resultierende Hypoxie im Tumor kann eine fehlgeleitete Angiogenese triggern und zu einer Aktivierung maligner Signalkaskaden führen. In dieser Arbeit wurden durch eine LOX(L)-Inhibierung mittels β APN einerseits und eine ektopische LOX-/LOXL2-Überexpression andererseits Auswirkungen solcher Eingriffe auf verschiedene Indikatoren wie Zellproliferation und -apoptose, Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, Angiogenese, Hypoxie, Makrophageninfiltration und die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren analysiert. Die Versuche wurden an fünf verschiedenen Tumoren (4T1-, E0771- und EMT6-Brustkarzinome, LLC-Lungenkarzinome und MT6-Fibrosarkome) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren eine direkte Verbindung zwischen der EZM und einer Therapieresistenz. Nach β APN-Behandlung konnte eine verbesserte Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen beobachtet werden, welches in einer Verringerung maligner Signalkaskaden und folglich auch in einer verbesserten Vaskularisierung resultierte. Als Konsequenz wurde die therapeutische Effizienz von Chemotherapeutika verbessert. Im Gegensatz dazu führte eine LOX-/LOXL2-Überexpression zu einer erhöhten Therapieresistenz. Die vorliegende Studie zeigt, dass die Modifizierung der EZM durch eine Hemmung von LOX(L) das Potenzial birgt, das Ansprechen von Chemotherapeutika in der Behandlung von Krebserkrankungen zu verbessern.

The extracellular matrix (ECM) forms a network of cross-linked proteins, which surrounds all cells in the tumor. The ECM has direct effects on the accumulation and distribution of drugs and therefore also on the therapeutic efficacy of chemotherapeutics. The LOX protein family catalyzes the oxidative deamination of lysin-residues in elastins and collagen fibers and as a consequence allows an intra- and intermolecular crosslinking. This is necessary for the maturation and stabilization of the collagens in the ECM. An elevated LOX(L)-expression increases the stiffness through a higher cross-linked ECM and thus builds a physical diffusion barrier. Because of this barrier the oxygen and nutritional supply is limited. The resulting hypoxia in the tumor could promote errant angiogenesis and lead to an activation of malign signal cascades. In this dissertation, effects on different influences were examined on the one hand through a LOX(L)-inhibition with β APN and on the other hand through an ectopic LOX-/LOXL2-overexpression. These influences were cell proliferation and -apoptosis, supply with oxygen and nutrients, angiogenesis, hypoxia, infiltration of macrophages and the expression of various growth factors. The experiments were performed on five different tumor models (4T1, E0771, EMT6 breast carcinomas, LLC lung carcinomas and MT6 fibrosarcomas). The results of this work demonstrate a direct link between the ECM and a therapeutic resistance of tumors. After β APN-treatment a better supply with oxygen and nutrients could be determined, which ended up in a reduction of malign signal cascades and thus in a better vascularization. As a consequence the therapeutic efficacy of chemotherapeutics was improved. In contrast, LOX-/LOXL2-overexpression lead to a higher therapeutic resistance. This dissertation shows that modification of the ECM through LOX(L)-inhibition has the potential to improve response of chemotherapeutics in the treatment of cancer.

Literaturverzeichnis

1. Ferlay, J., et al., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 2015. **136**(5): p. E359-86.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
3. Grizzi, F., et al., Cancer initiation and progression: an unsimplifiable complexity. *Theor Biol Med Model*, 2006. **3**: p. 37.
4. Cooper, G.M. and R.E. Hausman, Cancer, in *The Cell: A Molecular Approach*. 2013, Sinauer Associates: Sunderland. p. 713-714.
5. Bishop, J.M., Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 1991. **64**(2): p. 235-48.
6. Lee, E.Y. and W.J. Muller, Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. **2**(10).
7. Anand, P., et al., Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res*, 2008. **25**(9): p. 2097-116.
8. Nelson, H., et al., Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst*, 2001. **93**(8): p. 583-96.
9. Luqmani, Y.A., Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract*, 2005. **14 Suppl 1**: p. 35-48.
10. Hiddemann, W., H. Huber, and C. Bartram, Die zytostatische Chemotherapie, in *Die Onkologie*. 2004, Springer: Berlin. p. 401-412.
11. Schutze, F., et al., Inhibition of Lysyl Oxidases Improves Drug Diffusion and Increases Efficacy of Cytotoxic Treatment in 3D Tumor Models. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 17576.
12. Memon, A.A., et al., Positron emission tomography (PET) imaging with [11C]-labeled erlotinib: a micro-PET study on mice with lung tumor xenografts. *Cancer Res*, 2009. **69**(3): p. 873-8.
13. Gangloff, A., et al., Estimation of paclitaxel biodistribution and uptake in human-derived xenografts in vivo with (18)F-fluoropaclitaxel. *J Nucl Med*, 2005. **46**(11): p. 1866-71.
14. Cretu, A. and P.C. Brooks, Impact of the non-cellular tumor microenvironment on metastasis: potential therapeutic and imaging opportunities. *J Cell Physiol*, 2007. **213**(2): p. 391-402.
15. Balkwill, F.R., M. Capasso, and T. Hagemann, The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 23): p. 5591-6.
16. Caino, M.C., et al., Metabolic stress regulates cytoskeletal dynamics and metastasis of cancer cells. *J Clin Invest*, 2013. **123**(7): p. 2907-20.
17. Eisinger-Mathason, T.S., et al., Hypoxia-dependent modification of collagen networks promotes sarcoma metastasis. *Cancer Discov*, 2013. **3**(10): p. 1190-205.
18. Erler, J.T. and A.J. Giaccia, Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer Res*, 2006. **66**(21): p. 10238-41.
19. Hanahan, D. and L.M. Coussens, Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 2012. **21**(3): p. 309-22.
20. Redente, E.F., et al., Tumor signaling to the bone marrow changes the phenotype of monocytes and pulmonary macrophages during urethane-induced primary lung tumorigenesis in A/J mice. *Am J Pathol*, 2007. **170**(2): p. 693-708.
21. Genin, M., et al., M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*, 2015. **15**: p. 577.
22. Mantovani, A., et al., Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*, 2002. **23**(11): p. 549-55.

23. Escorcía, F.E., et al., Selective killing of tumor neovasculature paradoxically improves chemotherapy delivery to tumors. *Cancer Res*, 2010. **70**(22): p. 9277-86.
24. Rohrig, F., et al., VEGF-ablation therapy reduces drug delivery and therapeutic response in ECM-dense tumors. *Oncogene*, 2017. **36**(1): p. 1-12.
25. Jain, R.K. and T. Stylianopoulos, Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010. **7**(11): p. 653-64.
26. Reinacher-Schick, A., M. Pohl, and W. Schmiegel, Drug insight: antiangiogenic therapies for gastrointestinal cancers--focus on monoclonal antibodies. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2008. **5**(5): p. 250-67.
27. Naba, A., et al., The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Mol Cell Proteomics*, 2012. **11**(4): p. M111.014647.
28. Naba, A., et al., Extracellular matrix signatures of human primary metastatic colon cancers and their metastases to liver. *BMC Cancer*, 2014. **14**: p. 518.
29. Levental, K.R., et al., Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, 2009. **139**(5): p. 891-906.
30. Chaudhuri, O., et al., Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium. *Nat Mater*, 2014. **13**(10): p. 970-8.
31. Ishida, T. and H. Kiwada, Alteration of tumor microenvironment for improved delivery and intratumor distribution of nanocarriers. *Biol Pharm Bull*, 2013. **36**(5): p. 692-7.
32. Netti, P.A., et al., Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res*, 2000. **60**(9): p. 2497-503.
33. Barry-Hamilton, V., et al., Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat Med*, 2010. **16**(9): p. 1009-17.
34. Thompson, E.W., D.F. Newgreen, and D. Tarin, Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res*, 2005. **65**(14): p. 5991-5; discussion 5995.
35. Barker, H.E., T.R. Cox, and J.T. Erler, The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(8): p. 540-52.
36. Kagan, H.M. and W. Li, Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem*, 2003. **88**(4): p. 660-72.
37. Lucero, H.A. and H.M. Kagan, Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci*, 2006. **63**(19-20): p. 2304-16.
38. Chen, L.C., et al., Human breast cancer cell metastasis is attenuated by lysyl oxidase inhibitors through down-regulation of focal adhesion kinase and the paxillin-signaling pathway. *Breast Cancer Res Treat*, 2012. **134**(3): p. 989-1004.
39. Smith-Mungo, L.I. and H.M. Kagan, Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol*, 1998. **16**(7): p. 387-98.
40. Bais, M.V., et al., Effects of Tumor Suppressor Lysyl Oxidase Propeptide on Prostate Cancer Xenograft Growth and Its Direct Interactions with DNA Repair Pathways. *Oncogene*, 2015. **34**(15): p. 1928-37.
41. Trackman, P.C., et al., Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor. *J Biol Chem*, 1992. **267**(12): p. 8666-71.
42. Payne, S.L., M.J. Hendrix, and D.A. Kirschmann, Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer-a prospect. *J Cell Biochem*, 2007. **101**(6): p. 1338-54.
43. Hornstra, I.K., et al., Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice. *J Biol Chem*, 2003. **278**(16): p. 14387-93.
44. Baker, A.M., et al., The role of lysyl oxidase in SRC-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2011. **103**(5): p. 407-24.

45. Bondareva, A., et al., The lysyl oxidase inhibitor, beta-aminopropionitrile, diminishes the metastatic colonization potential of circulating breast cancer cells. *PLoS One*, 2009. **4**(5): p. e5620.
46. Röhrig, F., Verbesserung der Medikamenteneinbringung in solide Tumoren durch Modifikation der extrazellulären Matrix, in *Institut für Anatomie und Zellbiologie*. 2015, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
47. Veitl, S., Veränderungen im Tumorstroma nach chronischer Inhibierung von Lysyloxidasen. 2015, Technische Hochschule Nürnberg.
48. Zaffryar-Eilot, S., et al., Lysyl oxidase-like-2 promotes tumour angiogenesis and is a potential therapeutic target in angiogenic tumours. *Carcinogenesis*, 2013. **34**(10): p. 2370-9.
49. Rossow, L., et al., Mechanisms of chemoprotection by high collagen expression and stabilization in solid tumors. *Cancer Research*, eingereicht am 05.11.2017.
50. Walser, R., et al., Generation of co-culture spheroids as vascularisation units for bone tissue engineering. *Eur Cell Mater*, 2013. **26**: p. 222-33.
51. Lang, G., Histologische Färbung, in *Histotechnik*. 2012, Springer. p. 169-250.
52. Lang, G., Immunhistochemie, in *Histotechnik*. 2012, Springer. p. 269-304.
53. Puchtler, H., F.S. Waldrop, and L.S. Valentine, Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beitr Pathol*, 1973. **150**(2): p. 174-87.
54. Cooper, G.M. and T. Hagemann, Protein Synthesis, Processing, and Regulation, in *The Cell: A Molecular Approach*. 2013, Sinauer Associates: Sunderland. p. 297.
55. Saiki, R.K., et al., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
56. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 1987. **155**: p. 335-50.
57. de Jonge, H.J.M., et al., Evidence Based Selection of Housekeeping Genes. *PLoS ONE*, 2007. **2**(9).
58. Haugeberg, G., et al., The vascularization of liver metastases. Histological investigation of gelatine-injected liver specimens with special regard to the vascularization of micrometastases. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1988. **114**(4): p. 415-9.
59. Dery, M.A., M.D. Michaud, and D.E. Richard, Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. **37**(3): p. 535-40.
60. Hewitson, K.S. and C.J. Schofield, The HIF pathway as a therapeutic target. *Drug Discov Today*, 2004. **9**(16): p. 704-11.
61. Robertson, N., C. Potter, and A.L. Harris, Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion. *Cancer Res*, 2004. **64**(17): p. 6160-5.
62. Benej, M., S. Pastorekova, and J. Pastorek, Carbonic anhydrase IX: regulation and role in cancer. *Subcell Biochem*, 2014. **75**: p. 199-219.
63. Baker, A.M., et al., Lysyl oxidase enzymatic function increases stiffness to drive colorectal cancer progression through FAK. *Oncogene*, 2013. **32**(14): p. 1863-8.
64. Mih, J.D., et al., A multiwell platform for studying stiffness-dependent cell biology. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e19929.
65. Shah, N.R., et al., Analyses of merlin/NF2 connection to FAK inhibitor responsiveness in serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2014. **134**(1): p. 104-11.
66. Baker, A.M., et al., Lysyl oxidase plays a critical role in endothelial cell stimulation to drive tumor angiogenesis. *Cancer Res*, 2013. **73**(2): p. 583-94.
67. Pez, F., et al., The HIF-1-inducible lysyl oxidase activates HIF-1 via the Akt pathway in a positive regulation loop and synergizes with HIF-1 in promoting tumor cell growth. *Cancer Res*, 2011. **71**(5): p. 1647-57.

Literaturverzeichnis

68. Eliades, A., et al., Control of megakaryocyte expansion and bone marrow fibrosis by lysyl oxidase. *J Biol Chem*, 2011. **286**(31): p. 27630-8.
69. Dell, S., et al., The role of PDGF receptor inhibitors and PI3-kinase signaling in the pathogenesis of corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006. **47**(5): p. 1928-37.
70. Xaymardan, M., et al., Senescent impairment in synergistic cytokine pathways that provide rapid cardioprotection in the rat heart. *J Exp Med*, 2004. **199**(6): p. 797-804.
71. Maisonpierre, P.C., et al., Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 1997. **277**(5322): p. 55-60.

Danksagung

Hiermit bedanke ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. med. Süleyman Ergün, Leiter des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg, für die Möglichkeit diese Arbeit unter seiner Direktion durchführen zu dürfen sowie die große Hilfe und vielen Ratschläge während der Erarbeitung meiner Dissertation.

Ganz besonderen Dank gilt ebenfalls Dr. Erik Henke für die Themenstellung, die wirklich tolle Betreuung und vielseitige Unterstützung während meiner Labor- und Schreibaarbeit.

Auch möchte ich allen anderen Mitarbeitern der Anatomie für die Hilfe und Ratschläge danken.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Danke Mama, dass du mir mein Studium ermöglicht hast, mich immer in allem unterstützt und immer für mich da bist. Danke auch an meine Geschwister Florian, Jessica und Nicolai, die immer ein offenes Ohr haben und auch ebenfalls immer für mich da sind. Ich liebe euch.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation eigenständig, d. h. insbesondere selbständig 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, 08.05.2019

Ort, Datum

Leonie Rossow