

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

**Veränderung der Tumorumgebung muriner Mamma-Karzinome durch
Inhibierung der Kollagensynthese**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von
Marie Höhn
aus Tirschenreuth

Würzburg, Juni 2022



Referent/Referentin: Professor Dr. med. Süleyman Ergün

Koreferent/Koreferentin: Univ.-Prof. Dr. Dr. med. univ. Andreas Beilhack

Dekan: Professor Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2022

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Das Mamma-Karzinom – Fakten und Epidemiologie	1
1.2 Wechselwirkungen zwischen Tumor und Immunsystem.....	3
1.3 Die Tumormikroumgebung	4
1.3.1 Das Gefäßsystem des Tumors.....	5
1.3.2 Die Tumor-assoziierten Zellen (TAZ)	6
1.3.3 Die Extrazellulärmatrix (EZM)	10
1.4 Kollagen – Synthese und Inhibierung	11
1.4.1 Die Familie der Prolylhydroxylasen und deren Inhibitor 1,4-DPCA.....	13
1.4.2 Die Familie der Lysylhydroxylasen und deren Inhibitor Minoxidil.....	14
1.4.3 Die Familie der Lysyloxidasen und deren Inhibitor β APN.....	15
1.5 Vorarbeiten.....	16
1.5.1 LOX – Tumorbezogene Auswirkungen von Inhibierung und Überexpression	16
1.5.2 Veränderungen der pharmakologischen EZM-Destabilisierung auf die Immunumgebung.....	18
1.6 Zielsetzung.....	19
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Material	21
2.1.1 Tumorzelllinie.....	21
2.1.2 Antikörper	21
2.1.3 Medikamente / Inhibitoren.....	23
2.1.4 Chemikalien	23
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	24
2.1.5 Kits.....	25
2.1.6 Zellkultur	25
2.1.7 Geräte.....	25
2.1.8 Software	26
2.2 Methoden	26
2.2.1 Tierversuche	26

2.2.2 Kultivierung der Tumorzelllinien	27
2.2.3 Tumorzellimplantierung.....	27
2.2.4 Medikamentöse Behandlung der Mäuse	28
2.2.5 Tumorentnahme und Gewebeverdau (FACS)	28
2.2.6 RNA-Isolierung	29
2.2.7 Färbemethoden	30
2.2.7.1 Immunhistochemisch: Diaminobenzidin (DAB)	30
2.2.7.2 Immunhistochemisch: Immunfluoreszenz	32
2.2.7.3 Histologisch: Pikro-Siriusrot.....	32
2.2.7.4 FACS.....	32
2.2.8 Mikroskopie.....	34
2.2.9 Elektronische Bildverarbeitung und -auswertung.....	34
2.2.10 Genexpressionsanalyse.....	35
2.2.10.1 Principal Component Analysis (PCA).....	35
2.2.10.2 Gene Set Enrichment Analyse (GSEA).....	35
2.2.10.3 Cibersort-Analyse	36
2.2.11 Statistische Auswertung.....	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Auswirkungen der Kollageninhibition auf das Tumorwachstum	37
3.2 Auswirkungen auf den Kollagengehalt der Tumoren	38
3.3 Analyse der Blutgefäßdichte mittels CD31-Färbung	40
3.4 Immunfluoreszenzfärbung von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Lymphozyten	42
3.5 Ergebnisse der FACS-Analyse	43
3.6 Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse	46
3.6.1 Principal Component Analyse (PCA).....	46
3.6.2 Gene Set Enrichment Analyse (GSEA)	47
3.6.3 Cibersort-Analyse	51
4 Diskussion	54
5 Zusammenfassung/Summary	61
6 Literaturverzeichnis	63

7. Appendix	73
I Abkürzungsverzeichnis	73
II Abbildungsverzeichnis	76
III Tabellenverzeichnis	76
IV Anhang.....	77
V Danksagung	81
VI Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

1.1 Das Mamma-Karzinom – Fakten und Epidemiologie

Weltweit gesehen stellt Brustkrebs die häufigste Tumorerkrankung bei Frauen dar. Durchschnittlich erkranken 12,3 % der US-amerikanischen Frauen, also etwa jede achte Frau, im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs (DeSantis et al. 2014). Dank der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten lag die 5-Jahres-Überlebensrate im Zeitraum von 2005 bis 2011 bei 89% (Howlader N 2015). Laut GLOBOCAN-Statistiken für 2012 hingegen war die Zahl der Frauen, bei denen die Diagnose Brustkrebs gestellt wurde, 1,7 Millionen, verknüpft mit einer Anzahl von 522.000 Todesfällen – was im Vergleich zu den Zahlen von 2008 einen Anstieg der Inzidenz und einhergehender Mortalität von nahezu 18 % bedeutet (DeSantis et al. 2014).

Studien belegen eine Vielzahl an Risikofaktoren unterschiedlichster Art. Dazu zählen unter anderem Adipositas, regelmäßiger Konsum von Nikotin und Alkohol, eine Vielzahl von Röntgen-Thoraxaufnahmen sowie eine erhöhte Dichte des Brustgewebes (Rojas and Stuckey 2016). Auch können hormonelle Faktoren wie überdurchschnittliche Ausschüttung von Östrogen oder Progesteron oder späte Schwangerschaft ein erhöhtes Risiko provozieren. Darüber hinaus werden circa 10% der Brustkrebsfälle auf eine vererbte genetische Mutation der Tumorsuppressorgene BRCA1 und -2 zurückgeführt (Rojas and Stuckey 2016).

Allgemein ist die Inzidenz je nach Ethnie stark variierend. Die Lebenserwartung hängt zum einen von dem wissenschaftlichen Fortschritt und der Modernisierung des Landes ab (Iqbal et al. 2015). Die Anzahl der Betroffenen hingegen ist in höher entwickelten Ländern größer, was vermutlich auf den „westlichen“ Lebensstil (durchschnittlich höheres Körpergewicht aufgrund geringerer physischer Aktivität, höheres Alter der Gebärenden, etc.) zurückzuführen ist. Dagegen ist die Mortalität in weniger entwickelten Ländern bis zu 17% höher (Tao et al. 2015; McCormack and Boffetta 2011; Toriola and Colditz 2013).

Die Ätiologie und Pathologie des Mamma-Karzinoms ist stark heterogen, in einigen Fällen langsam wachsend mit sehr guter Prognose, in anderen Fällen klinisch aggressiv verlaufend mit geringer Überlebenswahrscheinlichkeit je nach histologischer, hormoneller und morphologischer Klassifizierung (Verma et al. 2012; Tao et al. 2015). Eine gemeinsame Eigenschaft dieser verschiedenen Subtypen stellt die Desmoplasie dar (Walker 2001).

Einleitung

Der Begriff beschreibt eine erhöhte Infiltration von Bindegewebszellen wie Fibroblasten und Myofibroblasten in den Tumor und daraus folgend eine starke Akkumulation von extrazellulärer Matrix. Dies beeinträchtigt insbesondere die Wirkungsweise systemischer Therapien, was sich in einer deutlich negativeren Prognose manifestiert (Conti et al. 2008; Schober et al. 2014).

Allgemein stehen als Therapieoptionen die operative Entfernung sowie Strahlen- und medikamentöse Behandlung (Chemo-, Antikörper-, Hormon- und Immuntherapie) zur Verfügung. Insbesondere die Immuntherapie hatte in den vergangenen Jahrzehnten zunehmend Erfolge zu verzeichnen. Die Wirksamkeit ist jedoch bei den verschiedenen Tumorarten unterschiedlich erfolgreich. So ist bei der Behandlung des Mamma-Karzinoms nur ein sehr schwacher Einfluss zu beobachten.

Der Begriff der Immuntherapie wird für eine Vielzahl von therapeutischen Ansätzen verwendet, welche alle darauf abzielen, das Immunsystem des Patienten auf den Tumor zu fokussieren. Eine Methode stellt der adoptive T-Zell-Transfer dar. Hierbei werden vom Patienten stammende Lymphozyten vermehrt, genetisch modifiziert bzw. *ex vivo* aktiviert und nach diesen Vorgängen dem Patienten wieder zugeführt (Robbins et al. 2015; Velcheti and Schalper 2016; Helmy et al. 2013).

Ein weiterer Forschungsansatz sind Anti-Tumor-Impfungen. Hierbei bilden Tumorspezifische Antigene, sogenannte Neoantigene, das Target (Peng et al. 2019).

In der Klinik vielfach angewendet und verbreitet ist die Behandlung mit Checkpoint-Inhibitoren, welche vor allem bei der Behandlung des malignen Melanoms und des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (non-small cell lung carcinoma; NSCLC) erfolgreich wirkte (Gandhi et al. 2018; Eggermont et al. 2018). Dabei handelt es sich um Arzneistoffe, die speziell die Immun-Checkpoints hemmen. Die Immun-Checkpoints stellen wichtige Kontrollpunkte des Immunsystems dar, deren Aufgabe eine Verhinderung überschießender und letztlich den Organismus schädigender Immunantworten ist.

Ein Beispiel für einen solchen Checkpoint stellt zum Beispiel der inhibitorisch wirkende T-Zell-Rezeptor PD-1 und dessen Liganden PD-L1 und -L2 dar. Durch Bindung dieser Liganden an die Rezeptoren der T-Zelle wird die zelltoxische Antwort unterdrückt. Das Immunsystem wird somit „gebremst“. Bei vielen malignen Tumoren sind ebendiese Liganden hochreguliert, sodass eine starke Überexpression von PD-L1 besteht. Auf diese Weise entziehen sich die Tumoren unerkannt den Angriffen des Immunsystems. Dieser Vorgang wird auch als Immunevasion bezeichnet (Schvartsman, Ferrarotto, and Massarelli 2016; Delecluse et al. 2020).

Checkpoint-Inhibitoren aber blockieren diese Immun-Checkpoints und verhindern dadurch eine Immunevasion. Pharmakologisch handelt es sich um monoklonale Antikörper, welche sich entweder gegen einen Rezeptor oder seinen Liganden richten können.

Alle Formen der Immuntherapie zeigen bei bestimmten Tumoren nur eingeschränkte Wirksamkeit. Dazu zählt das Mamma-Karzinom. Man verzeichnet beim Mamma-Karzinom nur eine mangelhafte Infiltration durch T-Lymphozyten, was die Prognose signifikant verschlechtert (Issa-Nummer et al. 2013). Grund dafür sind verschiedene Strategien des Tumors selbst, allen voran die immunsupprimierende Tumormikroumgebung sowie die erhöhte Expression und Stabilisierung der Extrazellulärmatrix im Tumor (Seager et al. 2017).

1.2 Wechselwirkungen zwischen Tumor und Immunsystem

Allgemein hat das Immunsystem in Hinsicht auf die Tumorumgebung drei Strategien zur Tumorprävention. Zum einen wird durch die Unterdrückung viraler Infekte der Schutz des Organismus vor virus-induzierten Tumoren gewährleistet. Des Weiteren wird durch die rechtzeitige Eliminierung von Pathogenen und Entzündungsherden die Etablierung einer entzündlichen Umgebung verhindert, welche der Tumorentwicklung bzw. dem Tumorwachstum zuträglich wäre. Darüber hinaus kann das Immunsystem mutierte Tumorzellen aufgrund deren Expression tumor-spezifischer Antigene identifizieren und eliminieren. Dieser Prozess wird als Immunüberwachung oder „tumor immune surveillance“ bezeichnet (Vesely et al. 2011).

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Betrachtungsweise durch weitere Kenntnisse über die bivalenten Funktionen der Immunzellen im Tumor gewandelt. Dabei wurde der Begriff des „tumor immune editing“ geprägt. Nicht nur die schützende, sondern auch die umarbeitende („editing“) Funktion des Immunsystems entsprechend der jeweiligen Tumor-Immunogenität soll dadurch zum Ausdruck gebracht werden (Dunn, Old, and Schreiber 2004). Das tumor immune editing besteht aus drei Phasen: die Eliminierungs-, Equilibriums- und Escape-Phase. Diese können unabhängig voneinander oder aufeinander folgend in Kraft treten.

Die Eliminierungsphase verkörpert die moderne Sicht auf die Immunüberwachung.

Die Moleküle und Zellen von adaptivem und erworbenem Immunsystem arbeiten zusammen, um einen sich formierenden Tumor zu erkennen und zerstören, bevor dieser klinisch wahrnehmbar wird. Hierbei entwickelt sich das Gewebe in seinen physiologisch gesunden Ausgangszustand zurück. Manche mutierenden Zellen werden jedoch nicht komplett eliminiert, was zur nächsten Phase führen kann.

In der Equilibriumsphase wird von den Zellen des adaptiven Immunsystems nur der Tumorauswuchs kontrolliert, wobei die Tumorzellen funktionell inaktiv werden und klinisch unauffällig bleiben können (Vesely et al. 2011; Dunn, Koebel, and Schreiber 2006).

Unterbunden werden kann diese Inaktivität entweder durch Veränderungen der Tumorzellpopulation aufgrund eines aktiven Immunoediting-Prozesses oder durch Veränderungen im Immunsystem des Wirts. Letztere können aus einer erhöhten Tumor-induzierten Immunsuppression oder aus einem Zusammenbruch des IS aufgrund des natürlichen Alterungsprozesses resultieren. In diesem Fall begeben sich die Zellen in die Escape-Phase. Hier kann sich der Tumor ohne immunologische Hindernisse unkontrolliert vergrößern, bis er sich schließlich in einem klinisch diagnostizierbaren Zustand etabliert (Schreiber, Old, and Smyth 2011; Dunn et al. 2002).

1.3 Die Tumormikroumgebung

Bestandteil eines Tumors sind keineswegs ausschließlich die Tumorzellen selbst, sondern eine Vielzahl anderer Komponenten, welche unter dem Begriff „Tumormikroumgebung“ (TMU) zusammengefasst werden. Dazu gehören das Gefäßsystem des Tumors, die sogenannten Tumor-assoziierten Zellen, eine Vielzahl an Signalmolekülen sowie die extrazelluläre Matrix (EZM) (Balkwill, Capasso, and Hagemann 2012) (s. Abbildung 1).

Die TMU unterscheidet sich nicht nur in der Zusammensetzung, Dichte und Funktionsweise deutlich von der Mikroumgebung in normalem Gewebe, sondern variiert auch zwischen verschiedenen Tumorarten. Es ergeben sich klinische Auswirkungen durch Einflussnahme auf den Verlauf und die Therapiemöglichkeiten von Tumorerkrankungen (Wu and Dai 2017; Junttila and de Sauvage 2013). So ist die maligne veränderte Umgebung des Tumors Grund für die reduzierte und heterogene Nährstoffversorgung, was zur Förderung sowohl von Hypoxie und metabolischem Stress als auch von Invasivität und Metastasierung führt (Hui and Chen 2015; Cretu and Brooks 2007; Caino et al. 2013).

Alle Bestandteile der TMU sind miteinander verknüpft und stehen in direkter Interaktion. Sie sorgen in ihrer Gesamtheit dafür, dass die Malignität des Tumors stabilisiert und intensiviert wird.

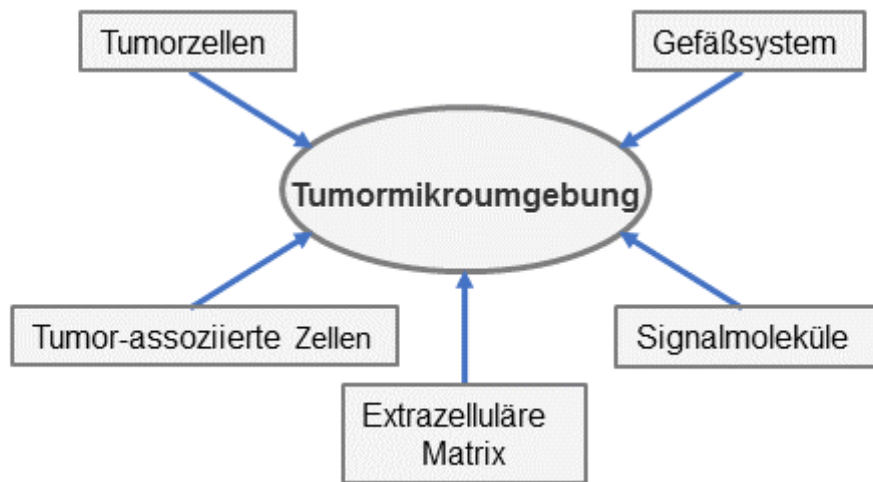


Abbildung 1: Bestandteile der Tumormikroumgebung

Neben den Tumorzellen werden sowohl die Tumor-assoziierten Zellen, das Gefäßsystem, die extrazelluläre Matrix sowie Signalmoleküle zur Tumormikroumgebung gezählt.

1.3.1 Das Gefäßsystem des Tumors

Das Gefäßsystem eines Tumors unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von dem Gefäßsystem nicht-neoplastischer Gewebe. Es zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass die Gefäße keiner hierarchischen Gliederung unterliegen, sondern eher einem unregelmäßigen, stark verzweigtem Netzwerk mit erhöhter Permeabilität gleichen (Baish et al. 1996; Jain 2005). Auch auf mikroskopischer Ebene zeigen sich Abweichungen von der Beschaffenheit physiologischer Blutgefäße. Gefäßen in malignen Geweben fehlt es an einem Besatz aus stabilisierenden Perizyten, sie gelten daher als unreif (Balkwill, Capasso, and Hagemann 2012). Durch diese defiziente Struktur der Gefäße entsteht ein insuffizienter und ungleicher Blutfluss, welcher eine heterogene Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen bewirkt (Baish et al. 1996).

Ab einer gewissen Tumorgöße wird die Nährstoffversorgung sowie die Diffusion von Stoffwechselprodukten ineffektiv, wodurch im Zentrum des Tumors eine Hypoxie entsteht. Die hypoxischen Zellen sezernieren Proteine, welche als Stimulatoren der Angiogenese gelten, wie z.B. VEGF-A (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor). Über Bindung dieses Faktors an die Rezeptoren der Blutgefäße werden die Migration und Proliferation von Endothelzellen stimuliert. Dies hat eine erhöhte Permeabilität der Gefäße zu Folge. Die Endothelzellen bewirken die Sekretion von Matrix-

Metalloproteasen, welche für einen lokalen Abbau der Endothelzell-Basalmembran und der EZM sorgen.

Durch diese Stimuli verschiebt sich das Gleichgewicht der intratumoralen Signalwege zugunsten der Angiogenese. Dadurch befinden sich alle vaskulären endothelialen Zellen in einem konstant aktivierten Zustand, woraus eine ständige Umformung der Blutgefäße resultiert (Jain 2005; Reinacher-Schick, Pohl, and Schmiegel 2008).

1.3.2 Die Tumor-assoziierten Zellen (TAZ)

Betrachtet man die zellulären Bestandteile eines Tumors, so wird ersichtlich, dass nicht nur Tumorzellen, sondern eine Vielzahl andersartiger Zellen vorhanden sind, welche unter dem Begriff der Tumor-assoziierten Zellen zusammengefasst werden. Herkunft dieser Zellen sind nicht nur das Immun-, Gefäß- und Lymphsystem, sondern auch das Stroma. Im Folgenden werden die für dieses Forschungsthema signifikanten Zellarten genauer erläutert.

Die Tumor-assoziierten Fibroblasten (Carcinoma associated fibroblasts; CAFs)

Hauptquelle der Tumor-EZM stellen die Tumor-assoziierten Fibroblasten dar. Diese sind in allen soliden Tumoren zu finden (Bagordakis et al. 2016; Zhao et al. 2018). Sie unterscheiden sich deutlich von den Fibroblasten normaler Bindegewebe, die als ruhend und metabolisch inaktiv beschrieben werden (Kalluri 2016). Im Gegensatz dazu sind CAFs migratorisch und synthetisch aktiv. Sie verstärken das Wachstum und die Immunabwehr. Diese Eigenschaften sind konsistent bei allen CAFs zu finden, auch wenn sie sich je nach Tumorart als heterogene Zellpopulation mit deutlichen Unterschieden in Morphologie und Expressionsprofil darstellen (Kalluri 2016).

Neben der Produktion komplexer EZM, durch deren Barrierefunktion therapeutische Ansätze abgewehrt werden, verfügen die CAFs über weitere Mechanismen, mit denen sie zur Chemoresistenz beitragen: Zum einen produzieren sie Interleukin-6, das die Expression des Resistenz-vermittelnden Chemokins CXCR7 in Tumorzellen induziert (Qiao et al. 2018). Zum anderen stellen sie vor allem unter hypoxischen Bedingungen große Mengen an transforming-growth-factor (TGF β) her, welches in den Tumorzellen Stammzell-ähnliche Eigenschaften hervorruft, so auch eine Resistenz gegenüber der Chemotherapie bewirkt (Tang et al. 2018).

Ein weiteres Produkt der CAFs ist das Zytokin PAI-1. Dieses aktiviert den Erk/Akt-Signalweg, welcher die für die Apoptose von Tumorzellen notwendige Casp2-Aktivierung supprimiert (Che et al. 2018).

Durch detailliertere Erforschung der CAFs wurden jedoch weitere Eigenschaften festgestellt, welche eine eher ambivalente Rolle vermuten lassen. So zeigen

Experimente mit einer Depletion von CAFs - beispielsweise an murinen Pankreaskarzinomen (Ozdemir *et al.*) - eine dadurch induzierte Immunsuppression mit deutlich negativen Auswirkungen auf das Überleben der Tiere (Ozdemir *et al.* 2014). Letztlich sind aufgrund der großen Heterogenität der Population mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Funktionen in der TMU weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der Subtypen notwendig, bis CAFs als Ansatzpunkt weiterer Therapieoptionen möglich werden.

Die Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs)

Den Hauptanteil der Immunzellen in der Mikroumgebung machen die Tumor-assoziierten Makrophagen aus. Es handelt sich um eine Untergruppe von Makrophagen, welche durch von Tumorzellen sezernierten Chemokinen zum Tumor rekrutiert werden und sich dort vor allem in hypoxischen Arealen und an der Tumor-Gewebe-Grenze ansammeln (Pollard 2004; Balkwill, Capasso, and Hagemann 2012).

Dabei unterscheidet man je nach Aktivierungsweg im Phänotyp zwischen M1- und M2-Makrophagen. Diese Typen besitzen vollkommen konträre Funktionen und differieren im Allgemeinen bezüglich Rezeptorexpression, Effektorfunktion sowie Zytokin- und Chemokinproduktion. Eingeleitet werden diese jeweiligen Aktivierungswege durch Vermittlung verschiedener Zytokine und unterschiedlicher Oxygenierungslevels.

M1-Makrophagen werden klassisch aktiviert, das heißt durch mikrobielle Produkte wie Lipopolysaccharid (LPS) oder durch Ausschüttung von Interferon- γ und TNF α (Zamarron and Chen 2011). Ihnen wird aufgrund ihrer Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen eine zytotoxische Rolle zugeschrieben. Zudem sezernieren sie spezifische Chemokine, welche zur Rekrutierung von Th1-Helferzellen, CD8+ zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen führen. Diese wirken in ihrer Gesamtheit destruktiv auf die Tumorzellen und erleichtern deren Bekämpfung.

Die Polarisierung zum M2-Phänotyp wird vor allem durch die Interleukine -4, -13 und -10 über den sogenannten alternativen Aktivierungsweg ausgelöst. M2-Makrophagen sezernieren anti-inflammatorische Zytokine und Chemokine, die T_{regs} und Th2-Zellen rekrutieren und somit eine immunsuppressive Umgebung erzeugen. Zusätzlich wird durch Sekretion von VEGF-A und anderen Wachstumsfaktoren die Tumorangiogenese und dadurch Wachstum und Metastasierung gefördert (Genin *et al.* 2015; Mantovani *et al.* 2002; Martinez, Helming, and Gordon 2009; Mantovani *et al.* 2004).

Die T-Lymphozyten

Innerhalb der TMU gibt es eine Vielzahl verschiedener T-Zell-Populationen, welche vor allem am invasiven Tumorrand und in den drainierenden Lymphknoten zu finden sind (Balkwill, Capasso, and Hagemann 2012) (s. Abbildung 2).

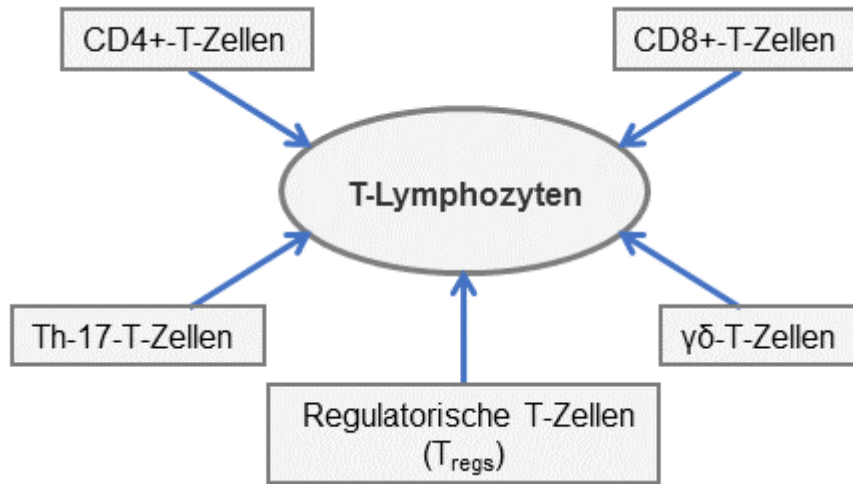


Abbildung 2: Übersicht über einen Teil der Subpopulationen von T-Lymphozyten.

Hohe Zahlen an CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen sind laut Fridman *et al.* mit einer guten Prognose assoziiert (Fridman et al. 2012). Sie vermitteln über eine direkte zytotoxische Aktivität eine lytische Immunantwort und haben daher eine suppressive Wirkung auf Immunzellen.

CD4⁺ T-Zellen besitzen je nach Subtyp kontroverse Aufgabengebiete. Th1-CD4⁺ T-Zellen unterstützen die zytotoxischen T-Zellen durch Sekretion von IFN γ und TNF α und haben somit eine indirekt tumorsupprimierende Wirkung. Th2-CD4⁺ Helferzellen hingegen aktivieren die B-Zell-Immunantwort und sezernieren unter anderem Interleukin-4, -5 und -13, welche über negative Rückkopplung die Th1-Antwort inhibieren (Romagnani et al. 1997).

Eine weitere Untergruppe stellen die Th17-Helferzellen dar, deren Hauptaufgabe die Abwehr von extrazellulären Mikroorganismen darstellt. So wird im Zuge dessen die Einwanderung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten gefördert und die Expression von inflammatorischen Mediatoren in den Gewebszellen aktiviert. Prognostisch nehmen die Th17-Helferzellen durch ihre Fähigkeit zur Transdifferenzierung zu Th1 bzw. regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) eine bivalente Rolle ein (Lee 2018).

T_{regs} sind eine Untergruppe, die durch Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 charakterisiert wird. Ihre Hauptaufgabe stellt die unterdrückende Regulierung der Immunantwort, die sogenannte Immunhomöostase, dar, welche unter anderem über die

negative Rückkopplung zur Th1- und Th2-Immunantwort aufrechterhalten wird. Diese immunsupprimierende Funktion wird beispielsweise über die Produktion von IL-10, TGF β und *via* Zell-vermittelten Kontakt über das zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen 4 (CTLA4) induziert (Campbell and Koch 2011). Durch Unterdrückung der Anti-Tumor-Immunität wird im Rückschluss die Immuntoleranz des Tumors gefördert, wodurch eine für den Tumor vorteilhafte Mikroumgebung geschaffen wird (Liu et al. 2011).

Folglich sind erhöhte Zahlen von T_{regs} mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Bates et al. 2006; Curiel et al. 2004; Hiraoka et al. 2006).

Mit zwei bis drei Prozent der gesamten T-Zell-Population stellen die $\gamma\delta$ -T-Zellen eine vergleichsweise kleine Untergruppe dar. Namensgebend sind dabei eine γ - und eine δ -T-Zell-Rezeptor-Kette (TCR), welche von ihnen exprimiert werden. Auch sie nehmen eine bivalente Rolle ein, da sie sowohl Charakteristiken der angeborenen Immunabwehr zeigen als auch eine regulatorische Rolle hinsichtlich der Immunantwort einnehmen (Peng et al. 2007). So ist einerseits zytotoxische Aktivität gegenüber malignen Zellen wie Tumor-Stammzellen beschrieben (Hannani et al. 2012; Gomes, Martins, and Silva-Santos 2010), andererseits wurde von Peng *et al.* ihre Fähigkeit bewiesen, naive und effektorische T-Zell-Antworten zu unterdrücken sowie die Reifung und Funktion von dendritischen Zellen zu blockieren (Peng et al. 2007). Es obliegt weiteren Untersuchungen zu bestimmen, welche exakte Rolle sie hinsichtlich der Prognose einnehmen.

Die Natürlichen Killerzellen

Die Natürlichen Killerzellen (NKs) haben die Aufgabe der Tumorzellerkennung und -lyse. Diese wird durch ein komplexes Zusammenspiel aus inhibitorischen und aktivierenden Signalen reguliert. Die Mechanismen der NKs zur Destruktion von Tumorzellen sind verschieden. Neben der durch Perforin und Granzym vermittelten Zytotoxizität gibt es auch die vom Todesrezeptor induzierte Apoptose, bei der Liganden der Tumor-Nekrose-Familie (TNF) eine Rolle spielen (Langers et al. 2012). Zudem besitzen sie die Eigenschaft nach Aktivierung Interferon- γ (IFN γ) zu sezernieren, welches die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber der Zytotoxizität erhöht (Biron et al. 1999). Mittels dieser IFN γ -Sekretion wird die Interaktion von dendritischen und T-Zellen stimuliert, wodurch die CD8⁺-vermittelte Anti-Tumor-Reaktion unterstützt wird (Adam et al. 2005).

Trotz all ihrer Tumor-bekämpfenden Funktionen scheinen sie diese innerhalb der Tumormikroumgebung nicht immer einsetzen zu können. So wurden NK-Zellen im Tumorstroma teilweise mit anergem Phänotyp verknüpft. Dieser wird durch den von malignen Zellen exprimierten TGF β hervorgerufen (Fridman et al. 2012).

Die dendritischen Zellen

Dendritische Zellen (DZ) gehören zu den Antigen-präsentierenden Zellen. Von ihnen werden pathogene Strukturen, sogenannte pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), erkannt und zu Antigenen prozessiert. Letztere werden den naiven Zellen oder den Gedächtnis-T-Zellen auf den MHC-I/II-Oberflächenmolekülen präsentiert. Sie aktivieren T-Zellen und induzieren somit eine gezielte Immunantwort. Es gibt allerdings diverse Studien, die beweisen, dass mit der TMU assoziierte DZ aufgrund von fehlerhaften Entwicklungs- und Reifungsprozessen nicht adäquat Immunantworten stimulieren können (Gabrilovich, Ostrand-Rosenberg, and Bronte 2012). So wurden bei diversen Tumorarten, unter anderem beim Mamma-Karzinom, verringerte Zahlen an DZ sowie deren eingeschränkte Funktionalität festgestellt (Pinzon-Charry et al. 2007). Dies wird sowohl durch die zahlreichen von Tumoren sezernierten Faktoren wie VEGF, M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) und Interleukin-6 als auch durch die Beschaffenheit der TMU bedingt. Hypoxie und erhöhte Akkumulation von extrazellulärem Adenosin hemmen signifikant die Migration und Funktion dendritischen Zellen (Mancino et al. 2008; Elia et al. 2008).

1.3.3 Die Extrazellulärmatrix (EZM)

Die extrazelluläre Matrix bezeichnet den nicht-zellulären Bestandteil jeglicher Gewebe und Organe. Sie dient nicht nur als physisches Gerüst für zelluläre Komponenten, sondern induziert auch entscheidende biochemische und biomechanische Reize, welche für Morphogenese, Differenzierung und Homöostase notwendig sind (Manou et al. 2019). Die Hauptbestandteile der physiologischen EZM sind Wasser, Proteine und Polysaccharide. Des Weiteren finden sich auch diverse Wachstumsfaktoren, Zytokine und EZM-editierende Enzyme, wobei je nach Gewebeart eine individuelle Zusammensetzung besteht. Zelladhäsion wird über Transmembranrezeptoren vermittelt, von denen vor allem die sogenannten Integrine bekannt sind. Über diese Zell-Matrix-Interaktionen werden verschiedene Signalwege stimuliert und somit Proliferation, Überleben, Differenzierung und Migration kontrolliert (Frantz, Stewart, and Weaver 2010; Naba et al. 2012).

Die Tumor-EZM hingegen unterscheidet sich davon wesentlich. Hinsichtlich der Zusammensetzung sind erhöhte Anteile von EZM-Molekülen wie Kollagen, Laminin, Elastin und Hyaluronsäuren zu verzeichnen (Insua-Rodríguez and Oskarsson 2016). Des Weiteren zeigen Enzyme wie Metalloproteasen oder Lysyloxidasen (LOX), welche die Matrix modifizieren, stabilisieren und abbauen, eine deutliche Dysregulation. Diese wird durch eine erhöhte Expression ersichtlich (Naba et al. 2012).

Der wesentliche Unterschied besteht allerdings in der gesteigerten Masse im Vergleich zur EZM normaler Gewebe. So nimmt die Tumor-EZM oftmals 30-60% des Tumolvolumens ein und ist wesentlich rigider (Casey et al. 2009). Durch diese exzessive Akkumulation wirkt sie als eine Art physikalische Barriere, welche sich oftmals auch als Einkapsulierung von Tumorzellen darstellt. Dies führt zu einer deutlich eingeschränkten Versorgung mit Sauerstoff, Nährstoffen und Metaboliten. Aufgrund der daraus hervorgehenden verstärkten Hypoxie und des metabolischen Stresses werden anti-apoptotische sowie chemoresistente Signalwege aktiviert.

Alle genannten Faktoren bedingen eine heterogene Verteilung der verschiedenen Therapeutika. Das führt letztlich dazu, dass vernachlässigbar wenige Tumorzellen einer therapeutisch effizienten Dosis ausgesetzt sind (Rohrig et al. 2017; Netti et al. 2000).

Diese Barrierefunktion wirkt nicht nur auf medikamentöse Wirkstoffe, sondern auch auf Immunzellen (Hallmann et al. 2015; Raave, van Kuppevelt, and Daamen 2018), wodurch der mangelhafte Erfolg von Immuntherapeutika bei desmoplastischen Tumoren, wie dem Mamma-Karzinom, ersichtlich wird.

Für eine effiziente Wirkung müssten sowohl das Medikament als auch die T-Lymphozyten weit in den Tumor eindringen. Die EZM stellt hierbei eine Art Schutzschild dar. Immunzellen, die zuerst aufgrund von Zytokingradienten (Chemotaxis) zu den Bereichen des Tumorwachstums geleitet werden, werden nun durch die die Tumorzellverbände umgebende EZM-reiche Kapsel wieder „abgeworben“. So migrieren die Zellen jetzt entlang des Gradienten der zunehmenden Rigidität und entlang der von der EZM zur Verfügung gestellten Adhäsionsstellen (Henke, Nandigama, and Ergun 2019).

Diese Faktoren zeigen deutlich auf, dass die maligne veränderte EZM nicht nur die Möglichkeiten, Tumoren zu behandeln, vereitelt, sondern auch auf direktem Weg wesentlichen Einfluss auf Tumorentwicklung, Krankheitsprogression und Prognose hat (Cukierman and Bassi 2010).

1.4 Kollagen – Synthese und Inhibierung

Das am häufigsten vorkommenden Gerüstprotein der EZM stellt Kollagen dar. Dieses setzt sich zusammen aus einer rechtsgängigen über Wasserstoffbrücken zusammengehaltene Tripelhelix, gebildet von drei linksgängigen Kollagen- α -Ketten, welche auch als Tropokollagen bezeichnet werden. Durch Kombination von unterschiedlichen Kollagen- α -Ketten erhält man verschiedene Kollagene, von denen heute 28 bekannt sind. Die charakteristische Aminosäuresequenz der Kollagen- α -Ketten ergibt sich aus der wiederholenden Glycin-X-Y-Einheit. Hierbei wird die Position X meist

Einleitung

von Prolin und Y von Hydroxyprolin, Lysin oder Hydroxylysin eingenommen (Shoulders and Raines 2009).

Beginn der Biosynthese der Kollagen- α -Kette stellt die Synthetisierung des Vorläufermoleküls Prokollagen am Endoplasmatischen Retikulum dar. Dieses wandert von dort zum Golgi-Apparat und wird modifiziert: ungefähr die Hälfte der Proline und mehrere Lysine werden durch Prolyl-4- bzw. Lysylhydroxylasen (PH, LH) hydroxyliert (Gelse, Pöschl, and Aigner 2003). Dieser Schritt ist notwendig für die Formierung der Tripel-Helix-Moleküle aus den neu synthetisierten Prokollagen-Polypeptid-Ketten sowie für deren extrazelluläre Sekretion und somit für die Reifung der Kollagenfasern zu einem funktionellen Netzwerk.

Im extrazellulären Bereich schließt sich die Abspaltung der Propeptide an, wodurch das Tropokollagen entsteht. Die Quervernetzung der Tropokollagenmoleküle von fibrillären Kollagenen zu Kollagenfibrillen erfolgt durch die Oxidierung von Lysinresten zu Aldehydgruppen, welche durch das Enzym Lysyloxidase katalysiert wird. Durch Zusammenlagerung mehrerer Kollagenfibrillen bilden sich anschließend Kollagenfasern oder -bündel (Hauser 2012) (s. Abbildung 3).

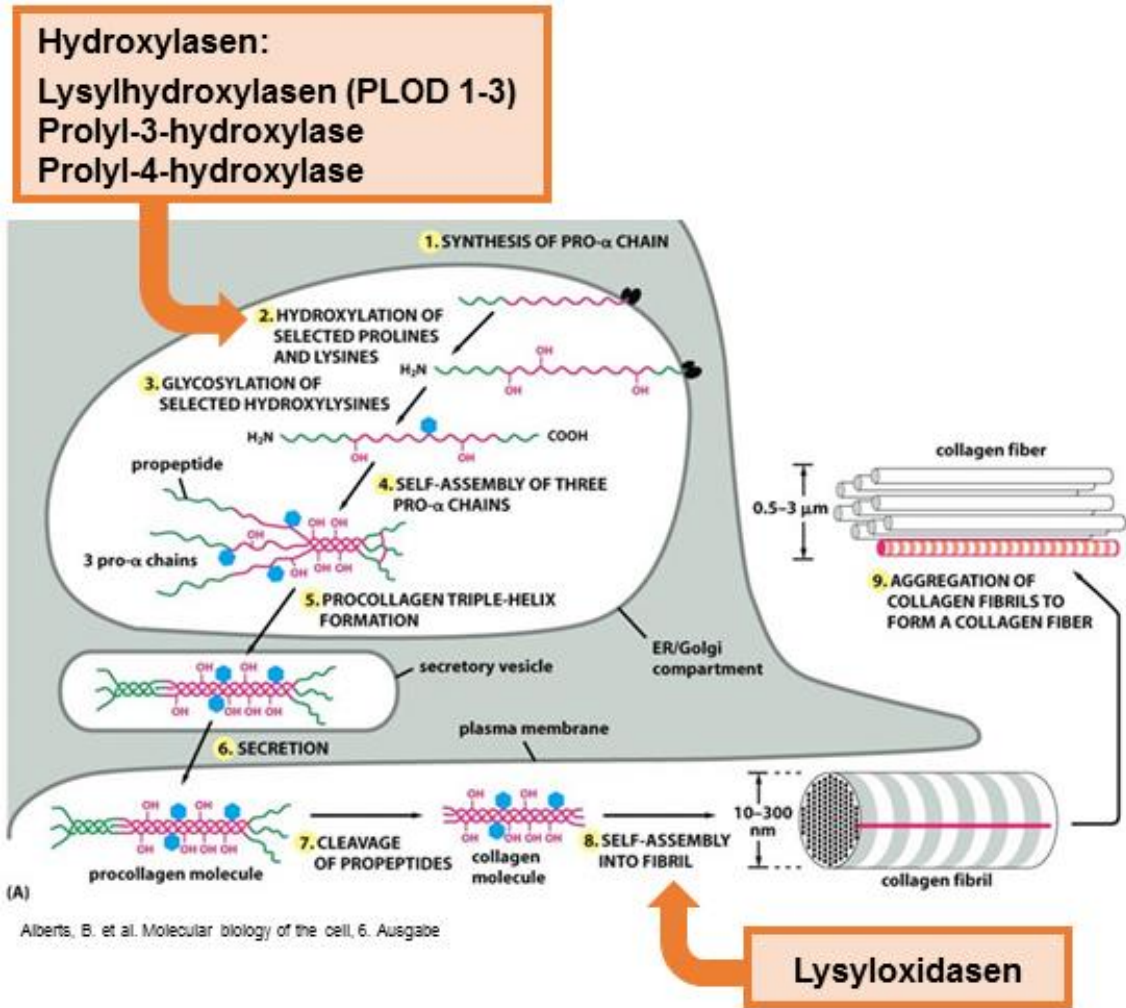


Abbildung 3: Kollagensynthese mit Ansatzpunkten der Inhibitoren.

Lysyl- und Prolylhydroxylasen erfüllen ihre Funktion der Katalysation der Hydroxylierung von Prolin- und Lysinresten bereits im Endoplasmatischen Retikulum als zweiten Schritt der Kollagensynthese. Die Inhibitoren Minoxidil und 1,4-DPCA finden hier ihren Angriffspunkt. Erst später - bereits im extrazellulären Raum - sind die Lysyloxidasen von Nöten zur Quervernetzung des fibrillären Kollagens zu Kollagenfibrillen. Hier wirkt β APN inhibitorisch.

1.4.1 Die Familie der Prolylhydroxylasen und deren Inhibitor 1,4-DPCA

Alle bisher bekannten Kollagen-Prolyl-4-Hydroxylasen sind $\alpha_2\beta_2$ Tetramere, die aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten bestehen. Jede α -Untereinheit beinhaltet die Peptid-Substrat-Bindungsstelle und zwei katalytische Zentren des Enzyms, wohingegen die β -Untereinheit als Protein-Disulfid-Isomerase identifiziert wurde. Im menschlichen Gewebe wurden bisher drei verschiedene α -Isoformen entdeckt: P4HA1, P4HA2 und P4HA3. P4HA1 wird in den meisten Zelltypen, P4HA2 vor allem in Chondrozyten, Osteoblasten und kapillären Endothelzellen, die P4HA3 wird im Vergleich zu ersteren beiden nur sehr gering exprimiert (Gorres and Raines 2010). Eine erhöhte P4HA2-Expression wurde in

verschiedenen soliden Tumoren, so auch im Mamma-Karzinom, festgestellt (Vasta and Raines 2018).

Neben Prolyl-4-Hydroxylasen gibt es noch die Gruppe der Prolyl-Hydroxylasen-Domäne-Proteine (PHD), von denen eine Untergruppe eine wichtige Rolle im Sauerstoffhaushalt spielt.

Allgemein ist die Versorgung einer Zelle mit Sauerstoff über den sogenannten Hypoxie-induzierten-Faktor (HIF) geregelt, welcher aus einer α -Untereinheit mit drei Isoformen sowie einer β -Untereinheit besteht. Unter normoxischen Bedingungen ist das HIF1 α -Protein recht schnelllebig im Zytoplasma, da es kontinuierlich von der oben genannten Gruppe der PH hydroxyliert, anschließend vom sogenannten von-Hippel-Lindau Tumorsuppressor-Protein (pVHL) gebunden und über Ubiquitinylierung abgebaut wird. Bei Hypoxie hingegen wird die Hydroxylierung gehemmt und das HIF1 α -Protein nicht abgebaut, sondern in den Nukleus transloziert, wo es mit HIF1 β ein Dimer bildet und als Transkriptionsfaktor wirkt (Zhang et al. 2015).

Ein Inhibitor der Prolyl-Hydroxylasen stellt das klinisch noch relativ unbekanntes 1,4-DPCA (1,4-Dihydrophenonhtholin-4-one-3-carboxylic acid) dar. Es hemmt die P4HA2- und die PHD-Gruppe und verringert somit einerseits die Kollagenformation und -sekretion und stabilisiert andererseits die konstitutive Expression des HIF1 α -Proteins.

1.4.2 Die Familie der Lysylhydroxylasen und deren Inhibitor Minoxidil

Die Aufgabe der Lysylhydroxylasen ist, wie vorweg beschrieben, die Katalysierung der Hydroxylierung von Lysin zu Hydroxylysin, wodurch die Vernetzung und Reifung der Kollagenfasern zu einem funktionellen Netzwerk unterstützt wird. Codiert werden LH-1, -2a, -2b und -3 von den Prokollagen-lysin-5-dioxygenasen (PLOD) 1 bis 3.

PLOD1 katalysiert hierbei die Hydroxylierung von Lysinresten in der α -helikalen und zentralen Domäne der Tripelhelix und PLOD2 die der Lysinreste im Telopeptid des Prokollagens. PLOD3 besitzt ein bisher noch unbekanntes Substrat (Qi and Xu 2018).

Verschiedene Studien beschreiben die Zusammenhänge von PLOD2 und der Progression des humanen Mamma-Karzinoms. So ist die Expression von PLOD2 während metastatischer Kolonialisierung der Tumorzellen sequenziell hochreguliert (Du et al. 2017). Eine verringerte Expression wirkt der Invasivität der Tumorzellen entgegen und verhindert Metastasenbildung (Gilkes, Chaturvedi, et al. 2013).

Durch Knockdown von PLOD2, wie er von Gilkes *et al.* durchgeführt wurde, konnte eine Reduktion der Tumorrigidität sowie der Formierung des fibrillären Kollagens erreicht werden (Gilkes, Bajpai, et al. 2013). Dies führte zu verminderter lokaler Invasion in das

umliegende Gewebe sowie zu verringerter lymphogener und hämatogener Metastasierung.

Eine Analyse von Fallzahlen in diversen Datenbanken bestätigte zudem die Korrelation von erhöhtem Expressionslevel von PLOD2-mRNA mit einer schlechteren Prognose insbesondere hinsichtlich Mortalität (Gilkes, Bajpai, et al. 2013; Du et al. 2017).

Minoxidil ist ein Medikament, welches klinisch langjährig zur Therapie von Alopezie (Barbareschi 2018) und Hypertension (Sica 2004; 'Minoxidil' 2012) eingesetzt wurde. Es besitzt einen nachgewiesenen inhibitorischen Effekt auf die LH-Genexpression, welcher sich in einer Verringerung des PLOD2-mRNA-Levels auf posttranskriptioneller Ebene zeigt (Zuurmond et al. 2005). Die Auswirkung des Inhibitors auf die Mikroumgebung von fibrotischen Tumoren ist größtenteils unbekannt.

1.4.3 Die Familie der Lysyloxidasen und deren Inhibitor β APN

Die Familie der Lysyloxidasen (LOX) besteht aus LOX selbst sowie vier homologen Proteinen (LOXL 1-4: Lysyl Oxidase Like).

Die Hauptfunktion der Lysyloxidasen ist die posttranslationale Quervernetzung des Kollagens und Elastins in der EZM über die oxidative Desaminierung von Lysinresten (Kagan and Li 2003). Dies hat Auswirkungen auf Stärke und Reißfestigkeit der EZM. So bewirkt diese kovalente Quervernetzung nicht nur eine Stabilisierung eben jener Proteine, sondern auch eine Erhöhung der Gewebesteifheit. Dadurch wird Medikamenteneinbringung deutlich vermindert (Schutze et al. 2015). Diese Erkenntnis steht im Einklang mit dem Nachweis einer überdurchschnittlichen Aktivität von LOX(L) bei diversen soliden Tumorarten, wie auch dem Mamma-Karzinom (Baker et al. 2011; Buchinger et al. 2008). Zudem besteht eine positive Korrelation zwischen LOX-Überexpression und Invasivität, Metastasierungsneigung und Mortalität (Kirschmann et al. 2002; Erler et al. 2006).

Als etablierter Inhibitor der gesamten LOX(L)-Familie ist β -Aminopropionitril (β APN) zu nennen, welcher in präklinischen Brustkrebsmodellen eine Verringerung der Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen bewirkte (Bondareva et al. 2009). Das Aufgabengebiet der LOX ist allerdings für die physiologische Funktion des Bindegewebes und der elastischen Anteile der Arterienwände essenziell. Dadurch besteht bei längerer Inhibierung mittels Wirkstoffen wie beispielsweise β APN das Risiko einer Erkrankung an Osteo- oder Angiolathyrismus, was bis zur Aortenruptur führen kann (Barrow, Simpson, and Miller 1974). Die Gruppe um Mäki *et al.* bestätigte dies durch eine detaillierte Analyse der vaskulären Defekte von LOX-Knockout-Mäusen. (Maki et al. 2002).

1.5 Vorarbeiten

Die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konzentrieren sich besonders auf die Familie der Lysyloxidasen. Untersucht wurden die Auswirkungen von deren Überexpression bzw. Inhibierung durch β APN anhand von fünf verschiedenen murinen Tumormodellen: 4T1-, EMT6- und E0771-Mammakarzinome, LLC-Lungenkarzinome sowie MT6-Fibrosarkome.

Es wurden Veränderungen von Parametern wie Tumorwachstum und -versorgung, Medikamenteneinbringung sowie Blutgefäßdichte analysiert. Zudem wurden Effekte auf die Zytokinumgebung und Signalwege mittels Expressionsanalyse betrachtet.

Weitere Vorarbeiten galten der Immunumgebung von Tumoren. Hierbei wurden Immunzellpopulationen von verschiedenen murinen Tumorlinien analysiert und Veränderungen von deren Zusammensetzung durch pharmakologische Destabilisierung der EZM mittels Inhibierung von LOX und PLOD2 untersucht.

1.5.1 LOX – Tumorbezogene Auswirkungen von Inhibierung und Überexpression

Verbesserung der Tumorversorgung sowie Oxygenierung durch EZM-Destabilisierung

Nach Evaluierung von Microarray-Expressionsdaten von Mamma-, Ovar- und Kolorektal-Karzinomen wurde bei einer Teilmenge der chemoresistenten Tumoren eine konsistente Hochregulation der LOX-Expression festgestellt. Eine Überexpression von LOX führte im 4T1-Modell zu einem deutlichen Anstieg des Kollagengehalts im Tumor und somit zu einer Blockierung der Nährstoffversorgung und der Medikamentendiffusion in den Tumor.

Die Inhibierung mittels β APN führte zu einer Destabilisierung der extrazellulären Matrix einhergehend mit verringerter Quervernetzung von Kollagen. Daraus resultierte bei allen fünf Tumorarten eine homogenere Verteilung zytotoxischer Medikamente. Darüber hinaus wurde die Ausdehnung nekrotischer Areale in Primärtumoren vermindert und die Anzahl an Lungenmetastasen verringert.

Auch hinsichtlich der Proliferationsrate zeigten sich konträre Ergebnisse in allen fünf Gruppen nach Inhibierung von LOX, welche mittels Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 überprüft wurde. Im Gegensatz zu den unbehandelten Gruppen ergab sich bei den behandelten Tumoren der 4T1-Linie eine Reduktion der Anzahl von proliferierenden Zellen. Bei den übrigen behandelten Tumorarten konnte keine signifikante Veränderung festgestellt werden.

Konträre Auswirkungen der LOX-Inhibierung hinsichtlich des Tumorwachstums

Das Wachstumsverhalten war je nach Tumorart sehr verschieden. Während sich das Tumorwachstum im 4T1-Modell verringerte, nahm es beim LLC (Lewis Lung Carcinoma) zu, zeigte aber bei den übrigen Tumorklinen keine Veränderung.

Rossow *et al.* konnten nachweisen, dass die Gegenläufigkeit im Ansprechen durch die unterschiedliche Sensitivität in Bezug auf Hypoxie einerseits und durch die Abhängigkeit vom FAK-Signalweg andererseits bestimmt wird.

Die LOX können das Wachstum auf zwei verschiedene Arten beeinflussen: einerseits führen sie zu einer Erhöhung der Kollagen-Quervernetzung, wodurch Nährstoffversorgung und Diffusion herabgesetzt werden und die Proliferation hypoxiesensitiver Tumore begrenzt wird. Andererseits steigern sie die Geweberigidität, was zu einem pro-proliferativen Effekt bei FAK-abhängigen Tumoren führt.

Versorgungslimitierte Tumorarten, wie das LLC, zeigen daher nach LOX-Inhibierung durch die Erhöhung der Diffusion und damit verbesserten Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, eine erhöhte Proliferation.

Im Gegensatz dazu reagieren FAK-sensitiven-Tumoren, wie die der 4T1-Linie, mit herabgesetzter Proliferation, Invasivität und Metastasierung und letztlich auch mit herabgesetztem Wachstum.

Veränderung des Expressionsprofils durch EZM-Destabilisierung

Alle fünf Tumormodelle wurden hinsichtlich der mRNA-Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen nach Inhibierung und die 4T1-Mamma-Karzinome zusätzlich auch nach Überexpression von LOX(L2) untersucht. Die β APN-Behandlung führte zu einer deutlichen Reduktion maligner Signalkaskaden, was sich durch eine verminderte Expression von Wachstumsfaktoren wie VEGF, FGF (Fibroblast Growth Factor) und TGF β (Transforming Growth Factor) bemerkbar machte. Die 4T1-Tumoren zeigten durch die Überexpression von LOX(L2) genau gegenteilige Veränderung.

Normalisierung defektiver Tumolvaskulatur durch EZM-Destabilisierung

Das Gefäßsystem der Tumoren nach β APN-Behandlung wurde mittels 3D-Angiographie sowie histologischer Färbungen auf Tumorschnitten untersucht. Im Allgemeinen zeigte sich eine verminderte Blutgefäßdichte, eine Reduktion von vaskulären Verzweigungen und von Gefäß-Gefäß-Verbindungen.

Darüber hinaus zeigten die Tumorgefäße nach Inhibierung eine deutlich gesteigerte und homogenere Ummantelung mit Perizyten. Diese „Normalisierung“ des Gefäßsystems wird nachweislich durch die verbesserte Sauerstoffversorgung und durch vermindertes angiogenes Signaling hervorgerufen und folgt nicht als direkter Effekt aus der LOX-Inhibierung (Rossow *et al.* 2018; Rossow 2019).

1.5.2 Veränderungen der pharmakologischen EZM-Destabilisierung auf die Immunumgebung

Die beobachteten Veränderungen hinsichtlich Hypoxie und Signalkaskaden in Kombination mit einer permeableren und weniger rigiden EZM nach LOX(L)-Inhibierung zeigten die Möglichkeit auf, dass eine Remodellierung der EZM auch Auswirkungen auf die Immunzellinfiltration haben könnte.

Mithilfe einer F4/80-Färbung auf histologischen Schnitten der bereits erwähnten Tumorzelllinien wurde die Beeinflussung der Infiltration von TAMs durch β APN-Behandlung untersucht. Hierbei gab es deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Tumormodellen. Tumorzelllinien, die bereits durch eine erhöhte Infiltration von TAMs charakterisiert waren (EMT6, MT6), wiesen eine verringerte Inhibierung der TAM-Rekrutierung auf. Bei weniger immunogenen Tumorzelllinien (4T1, E0771) zeigte sich eine Erhöhung der TAM-Anzahl. Diese Gegenläufigkeit bietet Anlass zu weiteren Untersuchungen, insbesondere bezüglich der Polarisierung der Subpopulationen von TAMs (M1 vs. M2).

Darüber hinaus wurden nach LOX-Inhibierung deutliche Effekte auf die Infiltration von Zellen des adaptiven Immunsystems festgestellt. Dabei zeigten LLC eine Zunahme an CD4⁺ T-Helfer- sowie CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen. Bei MT6-Tumoren kam es ebenfalls in beiden Gruppen zu einer leichten Zellzunahme, jedoch zugunsten der CD8⁺-Zellen. Diese Erkenntnisse sind insbesondere in Bezug auf die Aussagen von DeNardo *et al.* essenziell. Diesem zufolge sind Tumoren, welche eine geringe Infiltration von TAMs und CD4⁺, sowie eine hohe Anzahl von CD8⁺-T-Zellen aufweisen, mit einer besseren Prognose verknüpft (DeNardo *et al.* 2011).

Da die Inhibierung von LOX klinisch aufgrund der gesundheitlichen Risiken nicht umzusetzen ist, wurde von unserer Arbeitsgruppe Minoxidil als weiteres Target hinzugezogen. Minoxidil dient als PLOD2-Inhibitor und weist wie erwähnt eine positive therapeutische Resonanz auf. (s. Kapitel 1.4.2).

Eine vergleichende Gegenüberstellung der Wirkung von LOX- und PLOD2-Inhibierung auf die Immunumgebung wurde mittels FACS-Analyse von AT3- und E0771-Tumoren sowie LLC durchgeführt. Auch hierbei waren je nach Tumorzelllinie deutlich differente Effekte hinsichtlich der quantitativen Analyse von Immunzellpopulationen ersichtlich. So zeigten die AT3-Tumoren nach Behandlung eine Verschiebung des Immunprofils in tumorsupprimierende und immunstimulatorische Richtung, wobei beide Medikamente (β APN und Minoxidil) ähnliche Effekte aufwiesen (Stölting 2018).

1.6 Zielsetzung

Zielsetzung der Arbeit war es, aufbauend auf den Erkenntnissen der beschriebenen Vorarbeiten, die Zusammensetzung der Immunumgebung von murinen Mamma-Karzinomen weitergehend zu analysieren und der Frage nachzugehen, inwiefern diese durch pharmakologische Veränderung der EZM beeinflusst wird.

Dabei wurden folgende bereits vorgestellte Wirkstoffe eingesetzt, welche an unterschiedlichen Punkten in die Kollagensynthese bzw. -reifung eingreifen: β APN (LOX-Inhibitor), Minoxidil (PLOD2-Inhibitor) und 1,4-DPCA (PH-Inhibitor).

Wir nehmen an, dass durch die Beeinträchtigung der Kollagensynthese Einschränkungen im Sinne einer Destabilisierung in der EZM entstehen, welche eine bessere Infiltration sowohl von Immunzellen als auch von Medikamenten ermöglichen.

Diesem Sachverhalt sollte durch detaillierte Analyse des Immunmilieus nachgegangen werden. Der Fokus liegt hierbei auf 4T1-Tumoren, welche ein verlässliches Modell für Mamma-Karzinome im späteren Stadium darstellen (Tao et al. 2008).

Tumoren dieser Zelllinie sollen mit verschiedenen Methoden detailliert analysiert werden, wobei die Effekte der unterschiedlichen Behandlungsmethoden gegenübergestellt werden sollen.

Grundlage bildete die histologische Analyse der Tumorschnitte einerseits mittels Immunfluoreszenz-Färbung, welche die Prognose-bestimmenden CD4+ und CD8+ Zellen und deren Verteilung darstellt. Andererseits sollen durch immunhistochemische Färbungen Auswirkungen der unterschiedlichen Inhibition auf Kollagengehalt und Blutgefäßdichte untersucht werden.

Eine weitere wichtige Methodik stellte die quantitative Analyse von Immunzellpopulationen mittels FACS dar, wodurch Auswirkungen auf die Zusammensetzung eben jener Populationen untersucht werden sollen.

In Ergänzung dazu wurden mRNA-Expressionsanalysen durchgeführt. Hierbei sollen durch gezielte Analyse von Gensets die Veränderungen hinsichtlich Zellpopulationen und Signalwegen anhand von Expressionslevels bestimmt werden.

Als weitere Methodik diente die Proteom- und Lipid-Analyse, deren Ergebnisse jedoch noch nicht vollständig vorliegen und somit in dieser Arbeit nicht zugrunde gelegt werden können. Eine Übersicht über den Experimentverlauf und die nachfolgende Methodik ist in Abbildung 4 dargestellt.

Einleitung

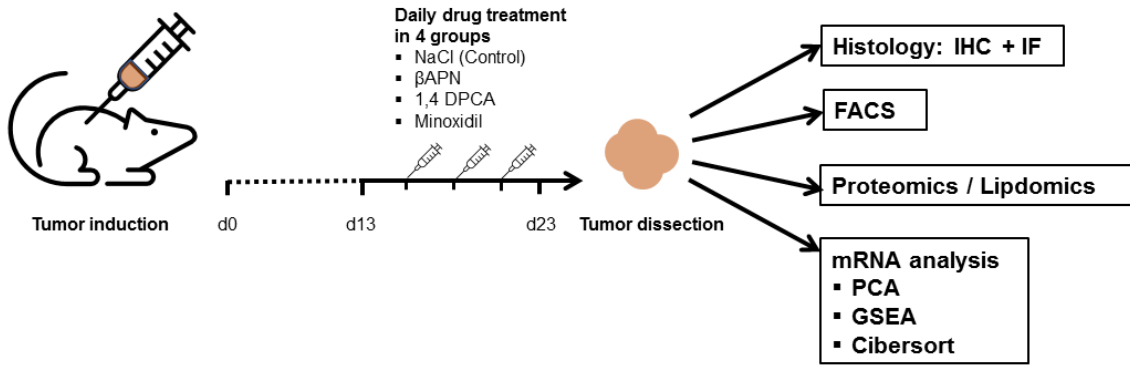


Abbildung 4: Übersicht über den Experimentverlauf und die nachfolgende Methodik. Nach Implantierung der Tumorzellen wurde nach 13 Tagen die tägliche Behandlung der Tiere in 4 Gruppen begonnen mit folgenden Wirkstoffen: NaCl (Kontrolle), β APN, 1,4-DPCA, Minoxidil. Die entnommenen Tumoren wurden auf verschiedene Weisen analysiert. Einerseits mittels Histologie gemäß Immunhistochemie und Immunfluoreszenz, andererseits mittels FACS-Analyse. Weiterhin wurden Proteomik- und Lipidomik-Untersuchungen durchgeführt und detaillierte Analysen anhand der Tumor-mRNA.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tumorzelllinie

Tabelle 1: Zelllinie

Zelllinie	Kultivierungs- medium	Tumorart	Gewebe	Maus- stamm	Injektionsort
4T1	DMEM + 10% FCS + 1% P/S	Karzinom	Brustdrüse	Balb/c	Brustfettpolster

2.1.2 Antikörper

Tabelle 2: Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Ursprung	Hersteller	Target
CD4 Ab	1:250	Rabbit	Abcam	CD4+T- Lymphozyten
CD8 mAb	1:100	Rat	Ebioscience	CD8+T- Lymphozyten
CD31 Ab	1:50	Rabbit	Abcam	Endothelzellen

Tabelle 3: Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Ursprung	Hersteller	Markierung
Goat-anti- rabbit-biotin	1:250	Goat	Dianova	Biotinylierter Antikörper
Goat-anti-rat- cy3	1:600	Goat	Dianova	Fluorophor- gekoppelter Antikörper
Goat-anti- rabbit-cy5	1:200	Goat	Dianova	Fluorophor- gekoppelter Antikörper

Tabelle 4: FACS-Antikörper

Name	Farbstoff	Verdünnung	Klon	Firma	Target
Arginase1	PE-Cy7	1:100	A1exF5	ThermoFisher	M2- Makrophagen

Material und Methoden

CD3	APC	1:300	17A2	ThermoFisher	T-Zellen
CD3	PerCP-Cy5.5	1:300	145-2C11	ThermoFisher	T-Zellen
CD4	PE	1:300	RM4-5	ThermoFisher	CD4+ T-Zellen
CD4	AmCyan	1:300	RM4-5	Invitrogen	CD4+ T-Zellen
CD8	AmCyan	1:300	56-6.7 BD	Biosciences	CD8+ T-Zellen
CD8	PE-Cy7	1:300	56-6.7	ThermoFisher	CD8+ T-Zellen
CD11b	PerCP-Cy5.5	1:300	M1/70	ThermoFisher	Myeloide Zellen
CD25	APC	1:300	PC61.5	ThermoFisher	Tregs
CD45	APC-Cy7	1:300	30-F11 BD	Biosciences	Leukozyten
CD64	APC	1:200	X54-5/7.1 BD	Biosciences	Monozyten / Makrophagen
F4/80	PE	1:300	BM8	ThermoFisher	Makrophagen
FoxP3	PE	1:100	FJK-16S	ThermoFisher	Tregs
IFN- γ	APC	1:100	XMG1.2 BD	Biosciences	Th1-T Zellen
IL-17A	PE	1:100	eBio17BF	ThermoFisher	Th17-T Zellen
iNOS	FITC	1:100	CXNFT	ThermoFisher	M1-Makrophagen
LiveDead	PB	1:1000	L34955	ThermoFisher	Lebende Zellen
NK1.1	Pe-Cy7	1:300	PK136	ThermoFisher	NK/NKT Zellen
TCR- β	PerCP-Cy5.5	1:300	H57-597	ThermoFisher	konventionelle T-Zellen
TCR- $\gamma\delta$	FITC	1:300	eBioGL3	ThermoFisher	$\gamma\delta$ -T Zellen

2.1.3 Medikamente / Inhibitoren

Table 5: Medikamente / Inhibitoren

Name	Inhibitor von	Konzentration	Hersteller
1,4-DPCA	Prolyl-4-Hydroxylase (P4HA)	20 mg/KG	Enzo Life Sciences, Lörrach
βAPN	Lysyloxidase (LOX)	100 mg/KG	Sigma-Aldrich
Minoxidil	Lysylhydroxylase (LHA) →PLOD2-Gen	3 mg/KG	Sigma-Aldrich

2.1.4 Chemikalien

Table 6: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumchlorid	Merck
BSA (Bovine Serum Albumine)	Sigma-Aldrich
Chloroform	Sigma-Aldrich
Collagenase II	Worthington
Depex	Serca
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche
Direct Red	Sigma-Aldrich
Ethanol absolut	Chemikalien Scheller
Ethanol 96% (vergällt mit 1% MEK)	Nordhausen
Fast Green	Sigma-Aldrich
Glucose (10%)	AppliChem
Glucose-Oxidase (1,2mg/ml dest. H2O)	Sigma-Aldrich
Hämatoxylin (nach Weigert)	Carl Roth
Isopropyl Alkohol	Sigma-Aldrich
Kernechtrot	Merck
Mowiol	DABCO ROTH

Normal-Goat-Serum (NGS)	Sigma-Aldrich
Nickelsulfat	Merck
PAP-Rabbit	Dianova 323-005-024
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich
Dulbeccos's Phospate Buffered Saline (PBS)	Sigma Aldrich
Tris-EDTA	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
TRizol Reagenz	Thermo Fisher
Xylol 100%	Sigma Aldrich

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Blockierlösung	5% NGS/PBS
Citratpuffer 10mM ph 6,0	1000 ml dest. H ₂ O 21 g/L 0,1M Zitronensäure 29,4 g/L 0,1M Tri-Natriumcitrat
DAB-Entwicklungslösung	67,5 ml Phosphatpuffer 1,35 ml NiSO ₄ 1,35 ml Glucose (10%) 150 µl NH ₄ Cl 1,5 ml DAB 225 µl Glukose-Oxidase
Essigsäure (0,5%)	5 ml Essigsäure mit dest. H ₂ O auf 1000 ml auffüllen
H ₂ O ₂ (3%)	30% H ₂ O ₂ Stocklösung in dest. H ₂ O
Kernechtrot	1000 ml dest. H ₂ O 50 g Al ₂ (SO ₄) ₃ x 18 H ₂ O 1 g Kernechtrot
Löslichkeitspuffer (Proteomik)	1,92 g Urea (8 mol/l) 0,61 g Thiourea (2 mol/l) Mit dest. H ₂ O auf 4 ml auffüllen

Material und Methoden

Nickelsulfat-Lösung (DAB)	1,3 g NiSO ₄ in 100ml dest. H ₂ O
Stimulationsmedium (FACS)	50 ng/ml PMA 1 µg/ml Ionomycin 2,5 µg/ml Brefeldin in DC Medium
PBS 0,1 M, 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 dest. H ₂ O auf Volumen von 5 l auffüllen pH 7,4: Einstellung mit HCl
Phosphatpuffer 0,1 M	4,9 g KH ₂ PO ₄ (wasserfrei) 29,2 g Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O

2.1.5 Kits

Tabelle 8: Kits

VECTASTATIN Elite ABC Standard Kit (PK_6100)-Peroxidase:

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

2.1.6 Zellkultur

Tabelle 9: Zellkulturmedien

Medium/Zusatz	Hersteller
Dulbeccos Modified Eagle Medium 1x (DMEM)	Gibco
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma Aldrich
Trypsin EDTA Solution	Sigma Aldrich

2.1.7 Geräte

Tabelle 10: Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Cell Strainer 70µm	93070 SPL	LifeSciences

FACS	FACSCelesta	BD Biosciences
Inkubator	HERA Cell 240i CO ₂ Inkubator	Thermo Scientific
Mikroskope: Durchlichtmikroskop Keyence-Lichtmikroskop Konfokalmikroskop	BZ-9000 Leica SP8	Carl Zeiss Keyence Leica
Mikrowelle	VIP20	Phillips
Neubauer Zählkammer	Improved 0, 100mm Tiefe	Assistent
PCR Thermocycler		Biometra
Präzisionswaage	Kern PLJ-G	Kern
RNA-Messgerät	Nanodrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Scientific
Schüttler	Duomax 1013	Heidolph
Sequenzierer	CEQTM 8000	Beckman Coulter
Vortexmischer	VortexGenie2	Bender & Hobein
Waage	AB104	Mettler Toledo
Wärmeblock	CERTOMAT IS	Braun Biotech
Zentrifuge	Biofuge 28RS	Heraeus Sepatech
Zentrifuge	Allegra X-30R	Beckman Coulter

2.1.8 Software

Tabelle 11: Software

Software	Firma	Homepage
Excel	Microsoft Corp.	https://products.office.com/de-de/excel
Fiji	Open Source	https://fiji.sc
FlowJo	Beckton Dickinson	https://www.flowjo.com/

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuche

Die durchgeführten Tierversuche wurden im Vorfeld von der zuständigen Aufsichtsbehörde, der Regierung von Unterfranken, begutachtet und genehmigt (AZ 55.2-2531.01-02/17).

2.2.2 Kultivierung der Tumorzelllinien

Alle Tumorzelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Inkubator kultiviert. Jegliche Arbeitsschritte bis zur Injektion wurden unter sterilen Verhältnissen in einer separaten Zellkultur-Werkbank durchgeführt. Lösungen und Medien wurden vor der Verwendung stets im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Die Konfluenz der Tumorzellen wurde in regelmäßigen Abständen mit einem invertierten Lichtmikroskop überprüft und bei Bedarf wurde im Verhältnis von 1:10 gesplittet.

Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurde Trypsin EDTA hinzugegeben, um die adhärenen Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Die Flasche wurde in den Inkubator gestellt und der Ablösungsprozess nach wenigen Minuten mittels des Mikroskops überprüft. Nachfolgend wurden die Zellen mit Medium von dem Flaschenboden gewaschen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren Zellagglutinationen gelöst.

Langfristig wurden die Zellen im flüssigen Stickstoff gelagert. Hierfür wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst und 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und das verbliebene Pellet mit DMEM (10% FCS, 1% P/S) mit 10% DMSO resuspendiert und in Kryogefäße überführt. Letztere wurden für 2 bis 3 Tage bei -80°C gelagert und dann in den Stickstofftank überführt.

Zum Wiederauftauen von eingefrorenen Zellen wurden diese nach Entnahme aus flüssigem Stickstoff im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Um das toxische DMSO zu verdünnen und Debris zu entfernen, wurde die Zellsuspension anschließend rasch mit Medium verdünnt.

2.2.3 Tumorzellimplantierung

Die Zellen der geplanten Tumorzelllinie wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin behandelt und in Medium aufgenommen. Anschließend wurde bei 1000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und in PBS resuspendiert. Es folgte erneut fünfminütiges Zentrifugieren bei 1000 rpm und die Resuspension in 10 ml PBS. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Dabei wurden circa 20 µl der Zellsuspension entnommen und in die Zählkammer gefüllt. Dann wurden die Zellen in so vielen Großquadraten (4x4 Kleinquadrate) gezählt, bis die Anzahl 100 überschritten wurde. Diese Zellzahl, dividiert durch die Menge der gezählten Großquadrate hoch 10, entsprach den Zellen/ml. Nun wurde so verdünnt bzw. durch erneutes Zentrifugieren und Aufnehmen im gewünschten Volumen an PBS konzentriert, dass in 50 µl der Suspension die benötigte Anzahl an Tumorzellen vorlag. Beim 4T1-

Tumor waren dies 500.000 Zellen, bei LLC und E0771-Tumor waren es 1.000.000 Zellen.

Am Tag 0 der jeweiligen Experimentreihen wurden den mit Diethylether betäubten 8-12 Wochen alten Mäusen jeweils links und rechts 50 µl der Tumorzelllösung am entsprechenden Injektionsort (s. Tab. 1) injiziert.

2.2.4 Medikamentöse Behandlung der Mäuse

Vor Behandlungsbeginn erfolgte zunächst ein Abwiegen aller Mäuse, um das durchschnittliche Gewicht und somit die ideale Behandlungsdosis zu ermitteln. An Tag 14 nach der Tumorzellinjektion startete die Behandlung der 20 Balb/c-Mäuse nach Randomisierung und Unterteilung in vier Gruppen à 5 Mäusen. Die genaue Aufteilung der Behandlungsgruppen ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Übersicht der Versuchstierzahl je Behandlungsgruppe

Gesamtzahl	Anzahl pro Behandlungsgruppe			
	Kontrolle	1,4 DPCA	Minoxidil	βAPN
20	5	5	5	4

Peritoneal wurden täglich jeweils 200µl an Lösung (einzelne Zusammensetzung siehe Tabelle 13) injiziert, die Größe der Tumoren wurde jeden zweiten Tag mit einem Messschieber gemessen und notiert. Behandelt wurde insgesamt für 10 Tage.

Aufgrund der begrenzten Löslichkeit von 1,4 DPCA wurde eine Mischung aus Ethanol und Kolliphor zugesetzt, um eine adäquate Lösung des Medikaments zu gewährleisten. Damit alle Mäuse unter gleichen Umständen behandelt werden konnten, wurden den restlichen Gruppen ebenso derselbe Betrag an Ethanol-Kolliphor-Lösung verabreicht. Vor Injektion wurden die zuvor aliquotierten und bei -20°C gelagerten Medikamente auf 70°C aufgewärmt.

Tabelle 13: Zusammensetzungen der Medikamente pro Einzeldosis

	Dosis (mg/KG)	Stock (ml)	PBS (ml)	EtOH/Kolliphor (ml)
Kontrolle	-	-	0,16	0,04
1,4 DPCA	20	0,04	0,16	0
βAPN	100	0,16	0	0,04
Minoxidil	3	0,16	0	0,04

2.2.5 Tumorentnahme und Gewebeverdau (FACS)

Nach abgeschlossener Behandlung erfolgte die Tötung der Mäuse mittels CO₂ und die Perfusion über die linke Herzkammer mit circa 10 ml PBS.

Anschließend wurden die Tumoren entnommen und wie folgt weiter prozessiert:

Zur histologischen Betrachtung wurden die Gewebe mit ausreichender Menge (10-faches Eigenvolumen) an 4% PFA fixiert.

Bei starker Verfärbung wurde nach circa 4 Stunden das PFA gewechselt.

Insgesamt sollte die Fixierungszeit mindestens 24 Stunden betragen. Im Anschluss wurden Paraffinschnitte erstellt.

Für die RNA-Analyse wurden Teile der Tumoren in Eppendorf-Tubes mit je 1 ml TRIzol überführt sowie bei -80°C eingefroren. Die weiteren Schritte der RNA-Isolation sind unter Kapitel 2.2.5 nachzulesen.

Zudem wurden weitere Teile der Tumoren für spätere Proteomik- sowie Lipidomik-Analysen sichergestellt.

Für die FACS-Analyse wurde das restliche Tumorgewebe mit einem Skalpell so weit zerkleinert, bis nur noch eine zähe Zellmasse vorhanden war. Anschließend wurde einmalig mit circa 10 ml PBS gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 4 mg/ml Collagenase II für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, wodurch extrazelluläre Proteine verdaut und eine saubere Isolation der Tumorzellen ermöglicht wurde. Nachfolgend wurde zentrifugiert und mit 1% FBS in PBS gewaschen sowie erneut zentrifugiert und gewaschen. Anschließend wurde durch ein 70µm Zellsieb gefiltert, die Zellen mithilfe der Neubauer Zählkammer gezählt und auf eine Anzahl von 10^7 eingestellt. Bis zur Antikörperfärbung (s. 2.2.6.3) wurden die Zellen auf Eis aufbewahrt.

2.2.6 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte nach dem TRIzol-Hersteller-Protokoll. Nach Wiederauftauen der Proben wurde das Gewebe mittels Glasstößeln homogenisiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur, um eine komplette Dissoziation des Nukleoprotein-Komplexes zu ermöglichen. Dann wurden pro Probe je 0,2 ml Chloroform hinzugegeben, 15 Sekunden lang kräftig geschüttelt und erneut für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauffolgend wurden die Proben bei 12.000 x g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert, wodurch sich das Gemisch in eine niedrige rote Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine farblos obere wässrige Phase trennte. Die RNA befand sich hierbei ausschließlich in der wässrigen Phase, welche durch Halten der Tube in einem 45°-Winkel abpipettiert und in eine neue Tube überführt wurde.

Nun erfolgte die RNA-Präzipitation:

Nach Zugabe von je 0,5ml von 100% Isopropanol wurden die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 12.000 x g 10 Minuten lang bei 4°C

zentrifugiert. Die RNA bildete nun ein gelartiges Pellet an der Seite und dem Boden der Tube.

Es schloss sich die RNA-Waschung an:

Der Überstand wurde abpipettiert und nur das Pellet belassen, welches mit 0,5 ml 75% Ethanol gewaschen wurde. Anschließend wurde kurz gevortext, dann 5 Minuten bei 7500 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet für 5-10 Minuten luftgetrocknet.

Nun folgte die RNA-Resuspension:

Das Pellet wurde mit RNase freiem Wasser resuspendiert, indem mehrmals auf- und abpipettiert wurde. Dann wurden die Proben 10-15 Minuten in einem Wärmeblock bei 55-60°C inkubiert.

Die Proteinkonzentrationen wurden sowohl mittels Nanodrop-Messung als auch durch das Bradford Assay überprüft.

2.2.7 Färbemethoden

2.2.7.1 Immunhistochemisch: Diaminobenzidin (DAB)

Zu Beginn erfolgt die Entparaffinierung der eingebetteten Schnitte durch Xylol II und Xylol I für je 10 Minuten. Mithilfe der absteigenden Ethanolreihe (EtOH 100% II, EtOH 100% I, EtOH 96%, EtOH 70%, destilliertes H₂O) von je 5 Minuten wird rehydriert. Danach schließt sich die Blockierung der endogenen Peroxidase mittels einer 3% H₂O₂-Stocklösung für 10 Minuten an sowie zweimaliges Waschen à 5 Minuten in VE-Wasser. Darauf folgt die Antigen-Demaskierung, welche sauer mit Citratpuffer oder basisch mit Tris-EDTA durchgeführt werden kann. In der vorliegenden Experimentreihe erfolgte eine saure Antigen-Demaskierung. Hierbei werden die Schnitte in 10mM Citratpuffer mit einem pH von 6,0 in einer Mikrowelle für 10 Sekunden zum Kochen gebracht. Nach 50 Sekunden Abkühlzeit wird dieser Schritt 6 Mal wiederholt. Es folgt eine 30-minütige Abkühlung der Schnitte im Citratpuffer, welche abgelöst wird durch fließendes VE-Wasser für 5 Minuten.

Bei der basischen Antigen-Demaskierung werden die Objektträger in Tris-EDTA in der Mikrowelle zweimal für jeweils zehn Sekunden aufgekocht und 30 Sekunden abgekühlt sowie anschließend für 30 Minuten bei 95 °C in den Trockenofen gestellt.

Daraufhin werden die Präparate drei Mal je 5 Minuten in PBS auf dem Schüttler gewaschen. Nun wird eine circa 2-stündige Blockierung unspezifischer Bindungen mit 5% NGS/PBS bei Raumtemperatur durchgeführt. Pro Tumorschnitt werden circa 100 µl verwendet.

Material und Methoden

Bei allen Inkubationsvorgängen der IHC-Färbung befinden sich die Proben in einer Feuchtkammer, um die Austrocknung der Schnitte zu verhindern. Anschließend erfolgt die Inkubation des Primärantikörpers über Nacht bei 4 °C. Dazu wird der jeweilige Antikörper im vorgesehenen Verhältnis mit 0,2% BSA und 1% NGS in PBS verdünnt. Zur Überprüfung der Antikörperspezifität werden Negativkontrollen mit 0,2% BSA und 1% NGS in PBS ohne Primärantikörper durchgeführt.

Am nächsten Tag werden die Gewebeschnitte 3 Mal für 5 Minuten in PBS gewaschen und danach mit biotinyliertem Sekundärantikörper (hier meist goat-anti-rabbit-biotin) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser ist gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet, wird aber selbst aus einer anderen gewonnen. Der jeweilige Sekundärantikörper wird im vorgesehenen Verhältnis (meist 1:250) mit 1% NGS in PBS verdünnt.

Ab diesem Punkt müssen alle künftigen Waschschritte im Dunklen erfolgen. Es folgt erneut 3-maliges Waschen à 5 Minuten. 15 Minuten vor Ende der Inkubationszeit wird der Antikörper-Komplex hergestellt, indem Reagenz A und B des VECTASTATIN Elite ABC Standard Kits 1:250 in PBS verdünnt werden.

Nach der einstündigen Inkubation des Sekundärantikörpers wiederholt sich das dreimalige Waschen von je 5 Minuten. Daraufhin wird der zuvor angesetzte Antikörper-Komplex auf die Tumorschnitte pipettiert und für circa 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wird erst mit PBS und danach mit PB-Puffer (0,1 M, pH 7,4) zweimal für je 5 Minuten gewaschen. Währenddessen wird die DAB-Entwicklungslösung (67,5 ml PB-Puffer, 1350 µl Nickelsulfat, 1350µl 10%-Glucose, 150µl Ammoniumchlorid, 1,5ml DAB, 225 µl Glucose-Oxidase) hergestellt, wobei die Glucose-Oxidase als Starter der Reaktion erst kurz vor Ende des Waschschrittes hinzugegeben wird.

Die Entwicklungsreaktion wird alle 5 Minuten mithilfe eines Durchlichtmikroskops überprüft und je nach Intensität der Färbung bzw. Menge an Hintergrundfärbung durch PBS abgestoppt.

Dann werden die Präparate 3 Mal 5 Minuten lang in PBS gewaschen, im Anschluss kurz in VE-H₂O gebracht und für 3 Minuten mit Kernechtrot gefärbt.

Nach kurzem Tauchen der Schnitte in VE-H₂O erfolgt die Dehydrierung mittels aufsteigender Reihe (EtOH 70 % 1 min, EtOH 80% 1 min, EtOH 96% 1 min, EtOH 100% I 3 min, EtOH 100% II 3 min, Xylol I 5 min, Xylol II 5min) und das Eindeckeln mit DePex.

2.2.7.2 Immunhistochemisch: Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzfärbung gleicht in ihrem Ablauf der DAB-Färbung, jedoch ohne Blockierung der endogenen Peroxidase. Zudem liegen weitere Differenzen nach der Inkubation des Zweitantikörpers vor:

Die Präparate werden zunächst zweimal je 5 Minuten in PBS gewaschen. Daraufhin werden die Kerne mit 1:5000 verdünnter DAPI-Lösung angefärbt und für 10 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgt 6-maliges Waschen à 3 Minuten und die Eindeckelung mit jeweils circa 70 µl Mowiol.

2.2.7.3 Histologisch: Pikro-Siriusrot

Mithilfe dieser Methode können Bindegewebsanteile rot angefärbt werden, da sich der Farbstoff vor allem an kollagenen (I, III, (IV)) und retikulären Fasern anlagert (Puchtler, Waldrop, and Valentine 1973).

Zu Beginn erfolgt eine Entparaffinierung analog zu dem DAB-Protokoll (vgl. Kapitel 2.2.5.1.1) sowie eine Rehydrierung für jeweils zwei Minuten durch die absteigende Alkoholreihe (100% II EtOH, 100% I EtOH, 96% EtOH, 80% EtOH, 70% EtOH, Aquadest).

Anschließend werden die Proben für 8 Minuten in Weigerts Eisenhämatoxylin gefärbt, kurz in Aquadest gewaschen, 10 Minuten lang unter fließendes Leitungswasser gestellt und erneut kurz in Aquadest gewaschen.

Nun erfolgt die eigentliche Pikro-Siriusrotfärbung, indem die Schnitte für 1 Stunde in 0,1% Direct Red 80 gelöst in gesättigter Pikrinsäure gestellt werden.

Danach werden sie drei Mal für jeweils zwei Minuten mit 0,5% Essigsäure gewaschen (0,5% Essigsäure I-III), mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (2' 100% ETOH I, 5' 100% EtOH II, 5' 100% EtOH III) und für je 2,5 Minuten in Xylol I und II und 5 Minuten in Xylol III gestellt.

Abschließend wurden die Schnitte mit Depex eingedeckelt.

2.2.7.4 FACS

Die FACS-Analyse wurde in Zusammenarbeit mit der AG Zernecké der Universität Würzburg durchgeführt.

Alle Antikörperfärbungen erfolgten nach optimiertem Standardprotokoll.

Für die Oberflächenfärbung wird die Zellsuspension mit einer maximalen Zellzahl von 100 Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte pipettiert.

An dieser Stelle werden die Zellen für die Th1/Th17-Färbung vier Stunden lang mit dem Stimulationsmedium bei 37°C stimuliert und anschließend wird weiter nach dem folgenden Protokoll vorgegangen.

Material und Methoden

Bei allen anderen Färbungen wird direkt für 5 Minuten bei 400Gs und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Für die Makrophagen-Färbung ist hier als Zwischenschritt die 30-minütige Inkubation des FC-Blocks nötig (50µl/Well, 1:50 in FCS/PBS).

Anschließend werden jeweils 50 µl (1:1 Verdünnung aus 1% FCS in PBS und FACS staining buffer) des Antikörper-Cocktails (Tab. 12) in jedes Well gegeben und die Pellets werden resuspendiert.

Es folgt eine Inkubation von 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln.

Nun werden die Zellen einmalig mit 150 µL 1% FCS/PBS gewaschen und erneut 5 Minuten bei 400Gs und 4°C zentrifugiert.

Ist keine intrazelluläre Färbung nötig (T-Zellen), kann der Überstand verworfen und die Zellen können in 200 µL 1% FCS/PBS resuspendiert werden.

Bis zur FACS Messung sollten die Zellen im Dunkeln und auf Eis gelagert werden.

Bei anschließender intrazellulärer Färbung wird der Überstand ebenfalls verworfen und die Zellen werden im ersten Schritt fixiert und permeabilisiert.

Für intrazelluläre Zytokine wurde das BD Kit verwendet, für die Färbung von FoxP3 wurde das eBiosciences Kit verwendet.

Die Zellen werden mit der Fixierungs- und Permeabilisierungslösung beider Kits (FixPer, Cytotfix/Cytoperm) fixiert und permeabilisiert und im Anschluss mehrmals mit den entsprechenden Waschpuffern gewaschen.

Nun folgt die Färbung der Zellen mit den entsprechenden in Waschpuffer gelösten Antikörpern für 30 bzw. 10 Minuten bei 4°C im Dunkeln und ein erneuter Waschschrift. Abschließend werden die Zellen in 1%FCS/PBS für die anschließende FACS-Messung resuspendiert, wobei auch hier die Lagerung bis dahin im Dunkeln und auf Eis stattfinden sollte.

Für das detaillierte Färbungsprotokoll siehe Handbuch der Färbekits. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten FACS-Antikörpercocktails stellt Tabelle 14 dar.

Tabelle 14: FACS-Antikörpercocktails

<u>T-Zellen</u>	Verdünnung	<u>T_{regs}</u>	Verdünnung
CD45 – AP Cy7	1:300	CD45 – APC-Cy7	1:300
Live/Dead – PB	1:1000	Live/Dead – PB	1:1000
CD3 – APC	1:300	CD25 – APC	1:300
NK11 – Pe-Cy7	1:300	FoxP3 – PE	1:100
TCRβ – PerCP-Cy5.5	1:300	CD4 – AmCyan	1:300
CD4 – PE	1:300	CD3 – PerCP-Cy5.5	1:300

CD8 – AmCyan	1:300	CD8 – Pe-Cy7	1:300
TCR $\gamma\delta$ – FITC	1:300		
<u>Th1/Th17</u>	Verdünnung	<u>Makrophagen</u>	Verdünnung
CD45 – APC-Cy7	1:300	CD45 – APC-Cy7	1.300
Live/Dead – PB	1:1000	Live/Dead – PB	1:1000
IL-17A – PE	1:100	F4/80 – PE	1:300
IFN γ – APC	1:100	CD11b – PerCP-Cy5.5	1:300
CD3 – PerCP-Cy5.5	1:300	CD64 – APC	1:200
CD4 – AmCyan	1:300	iNOS – FITC	1:100
CD8 – PE-Cy7	1:300	Arg1 – Pe-Cyz	1.100

2.2.8 Mikroskopie

Für die Aufnahme der HE-, IHC- und PSR-gefärbten Proben wurde das Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop Keyence BZ-9000 verwendet. Hierbei wird mithilfe der Bildzusammensetzungsfunktion nach Aufnahme vieler Teilbilder des Schnittes ein Gesamtbild erzeugt, wodurch die Auswertung des ganzen Tumorschnittes möglich wird. Die Immunfluoreszenz-gefärbten Schnitte wurden mit dem Konfokalmikroskop Leica SP8 unter Verwendung der Filter cy3 und cy5 aufgenommen.

2.2.9 Elektronische Bildverarbeitung und -auswertung

Zur detaillierten Auswertung der Aufnahmen der histologischen Schnitte wurde die Software ImageJ verwendet.

Nach Festlegung der auszuwertenden Bereiche wurde mithilfe dieser Software eine sogenannte Colour Deconvolution durchgeführt. Diese ermöglicht ein Aufspalten des aufgenommenen Bildes anhand selbst bestimmter Farbvektoren in unterschiedliche Farbanteile.

Im Falle der Piko-Siriusrotfärbung ließen sich somit exakt die Piko-Siriusrot gefärbten Areale – also die Kollagenanteile – von dem Hintergrund subtrahieren und quantifizieren. Im nächsten Schritt wurden Histogramme von den jeweiligen Aufnahmen erstellt. Hierbei wird die Färbintensität anhand des Grauwerts auf Werte zwischen 0 und 255 aufgeteilt. Das Histogramm selbst gibt an, wie häufig jeder Wert vorkommt. Je mehr höhere Werte vorhanden sind, desto weniger intensiv ist die Färbung. So ließ sich anhand der unterschiedlichen Intensitäten der Kollagengehalt in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen bestimmen und gegenüberstellen.

Hinsichtlich der CD-31-Färbung bietet die Software auch Vorlagen von Farbvektoren aus gängigen histologischen Färbungen. In diesem Fall wurde das Modul „Fast Red Fast Blue DAB“ ausgewählt, mit welchem man exakt den Bereich der CD31-positiven Fläche separat darstellen und berechnen kann.

Die Daten aus den Analysen mit ImageJ wurden zur weiteren Bearbeitung in Excel-Dateien übernommen.

Alle Graphen wurden mit dem Programm *Prism 6* erstellt. Die mit dem *Keyence BZ-9000* aufgenommenen Bilder wurden mit dem Programm *PowerPoint 2016* bearbeitet.

2.2.10 Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse wurde in Zusammenarbeit mit der Core Unit SysMed der Systemmedizin der Universität Würzburg durchgeführt. Verwendet wurde dafür die isolierte mRNA aus den nicht-nekrotischen Anteilen der behandelten 4T1-Tumoren.

2.2.10.1 Principal Component Analysis (PCA)

Die PCA stellt einen mathematischen Algorithmus dar, welcher die Dimensionen großer Datenmengen reduziert, wobei die größte Varianz des Datensets beibehalten wird.

Ziel ist die Strukturierung, Vereinfachung und Veranschaulichung umfangreicher Datensätze hinsichtlich ihrer individuellen Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten. Dazu müssen Linearkombinationen (Hauptkomponenten; =principal components) identifiziert werden, entlang derer die Varianz maximal ist.

Im vorliegenden Fall wurden anhand der mRNA-Analyse-Daten Datensets auf ihre individuellen Varianzen untersucht. Ziel war, hierdurch festzustellen, ob durch die Behandlung Veränderungen beobachtet werden konnten.

Zudem sollte betrachtet werden, ob die verschiedenen Behandlungsarten zu Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen führen.

2.2.10.2 Gene Set Enrichment Analyse (GSEA)

Die GSEA ist eine rechnerische Methode, um gewisse Genklassen zu identifizieren, welche in einem großem Datenset überexprimiert werden. Hierbei werden Microarray-Daten evaluiert. Die einzelnen Genklassen werden definiert basierend auf Hintergrundwissen bezüglich der jeweiligen gemeinsamen biologischen bzw. biochemischen Signalwege. So ergeben sich Gruppen, welche mit einem gemeinsamen spezifischen Merkmal, beispielsweise der Hypoxie-Regulation, assoziiert sind.

Diese Gengruppen wurden von den GSEA-Herstellern nach aktuellem Stand der Wissenschaft festgelegt und sind auf deren Webseite einsehbar.

Die mRNA der behandelten Proben werden also auf die speziellen Datensets hin untersucht. Veränderungen der Expression werden zusammengefasst im Enrichment

Score. Dieser bezeichnet den Betrag, um welchen die Gene überexprimiert werden und wird anschließend auf statistische Signifikanz geprüft (Subramanian et al. 2005; Mootha et al. 2003).

2.2.10.3 Cibersort-Analyse

Die Cibersort-Analyse beschreibt eine Methodik zur Bestimmung der Anzahl an Zellen einer gewissen Population mittels derer Expressionsdaten. Die Fragestellung ähnelt der einer FACS-Analyse, basiert jedoch auf unterschiedlichen Ansätzen.

Für die Quantifizierung von Zellfraktionen aus den Genexpressionsprofilen des Gesamtgewebes ist eine sogenannte „signature matrix“ nötig. Hierbei handelt es sich um spezifisches Hintergrundwissen bezüglich der individuellen Genexpressionssignaturen der unterschiedlichen Populationen zu deren akkuraten Unterscheidung. Als Anhaltspunkt dienen Gensets, die in den entsprechenden Populationen hoch exprimiert werden.

Verbessert werden die Analysedaten durch mathematische Optimierungstechniken wie die sogenannte „support vector regression“, welche auf einem spezifischen Dekonvolutions-Algorithmus basiert (Chen et al. 2018).

2.2.11 Statistische Auswertung

Für die statistischen Analysen wurde entweder *Excel 2016* oder *Prism 6* verwendet. Alle Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung (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

Alle Experimentreihen wurden an murinen Tumoren der 4T1-Zelllinie durchgeführt. Diese wurden zuvor mit den drei unterschiedlichen EZM-destabilisierenden Kollageninhibitoren - β APN, Minoxidil und 1,4-DPCA - behandelt.

Die detaillierte Vorgehensweise zur Tumorzellkultivierung und Versuchsplanung sowie Medikamentendosen und Versuchstierzahl der einzelnen Behandlungsgruppen werden ab Kapitel 2.2.1 beschrieben.

3.1 Auswirkungen der Kollageninhibition auf das Tumorwachstum

Zur allgemeinen Beurteilung wurde täglich das Tumorwachstum mithilfe eines Messschiebers überprüft und dokumentiert. Wie in Abbildung 5 ersichtlich, war das Wachstum der Tumoren nach Destabilisierung der extrazellulären Matrix deutlich reduziert. Bis Tag 13 nach Implantation der Tumorzellen verliefen die Wachstumskurven nahezu deckungsgleich. Danach, d.h. ab Behandlungsbeginn, zeigte sich allerdings eine deutliche Diskrepanz zwischen behandelten und Tumoren der Kontrollgruppe. Das deutlich verlangsamte Wachstum nach Behandlung weist darauf hin, dass eine Kollageninhibition repressive Auswirkungen auf das Tumorwachstum hat.

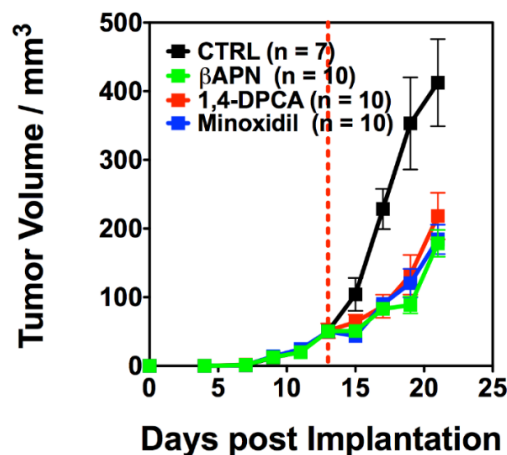


Abbildung 5: Tumorwachstumskurven der unterschiedlichen Behandlungsgruppen. Die Wachstumskurven der Kontrollgruppe ist in schwarz dargestellt, die der Behandlungsgruppe mit β APN in grün, mit 1,4-DPCA in rot und mit Minoxidil in blau. Ab Behandlungsbeginn ist ersichtlich, dass die behandelten Tumoren deutlich langsamer wachsen. $n=7/10$. Fehlerbalken \pm SEM.

3.2 Auswirkungen auf den Kollagengehalt der Tumoren

Um Veränderungen des Kollagengehalts und der Organisation der einzelnen Kollagenfibrillen nach Behandlung zu überprüfen, wurden die histologischen Schnitte einer Picro-Siriusrot-Färbung unterzogen. Diese dient, wie bereits erwähnt, zum Nachweis sowohl von Kollagen- wie auch retikulären Fasern (Puchtler, Waldrop, and Valentine 1973).

Nach Färbung der histologischen Schnitte wurden ebenjene in 10- und 20-facher Vergrößerung mithilfe eines Keyence Mikroskops BZ-9000 aufgenommen. Die Auswertung erfolgte, wie unter Kapitel 2.2.8 beschrieben, mit der Software ImageJ.

Die Abbildung 5 zeigt eine Übersicht von Bereichen aus Picro-Siriusrot-gefärbten Tumoren der jeweiligen Behandlungsgruppe. Darin ist ersichtlich, dass sich die Kollagenstrukturen innerhalb der Kontrollgruppe deutlich desorganisierter und stark verzweigt darstellen - als inhomogene Netzwerke. Die Behandlungsgruppen zeigen im Vergleich dazu deutlich geordnetere Hierarchien. Hier stellen sich die Kollagenanteile eher als Tumorzellen umgebende Stränge dar und sind homogener verteilt als in der Kontrollgruppe.

Im Rahmen der Auswertung wurden Histogramme der jeweiligen Aufnahmen erstellt. Hierbei wird die Färbeintensität anhand des Grauwertes bestimmt, wobei bei einem 8-bit Bild eine Skala von 256 Grauwerten zwischen 0 (schwarz) und 255 (weiß) zugrunde liegt. Daraus folgt, dass je höher der Grauwert ist, desto weniger intensiv ist die Färbung und desto geringer damit der Kollagengehalt. Im Histogramm wird die Häufigkeit der einzelnen Grauwerte dargestellt.

Die mit β APN behandelten Tumoren wiesen die größte Häufigkeit hoher Grauwerte auf. Dieser Effekt war nach Behandlung mit Minoxidil nicht so ausgeprägt, unterschied sich dennoch sichtbar von den Werten der Kontroll- und der 1,4-DPCA-Gruppe (s. Abbildung 7).

Darüber hinaus zeigten die Aufnahmen der Tumorschnitte eindeutige strukturelle Unterschiede (s. Abbildung 6). Die bereits beschriebene Inhomogenität der fibrillären Kollagennetze wurde gehäuft bei Kontrollgruppen-Tumoren, aber bei keiner der behandelten Tumoren sichtbar.

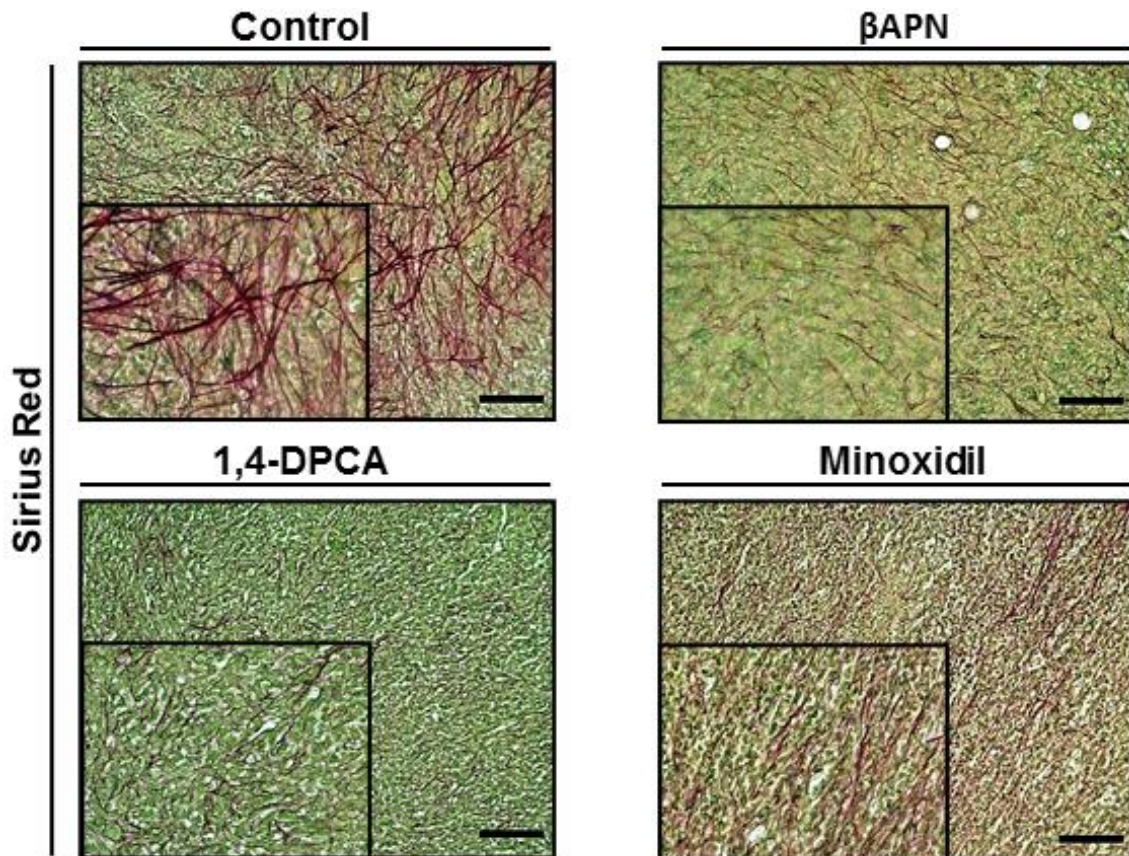


Abbildung 6: Piko-Siriusrotfärbung der Tumorschnitte aus unterschiedlichen Behandlungsgruppen im Vergleich.

Dargestellt sind Ausschnitte mit Vergrößerung einzelner Strukturen im linken Bildrand. Sämtliches Bindegewebe (vor allem Kollagen und Elastin) wird rot angefärbt, das Zytoplasma und nicht-bindegewebigen Anteile grün. Bei der Kontrolle wird die desorganisierte und stark verzweigte Struktur der Kollagenfibrillen deutlich, wohingegen die Hierarchie nach Behandlung deutlich geordneter erscheint. Die Kollagenfasern zeigen sich hier als Stränge, welche die Tumorzellen umschließen. Skala = 100 μ m.

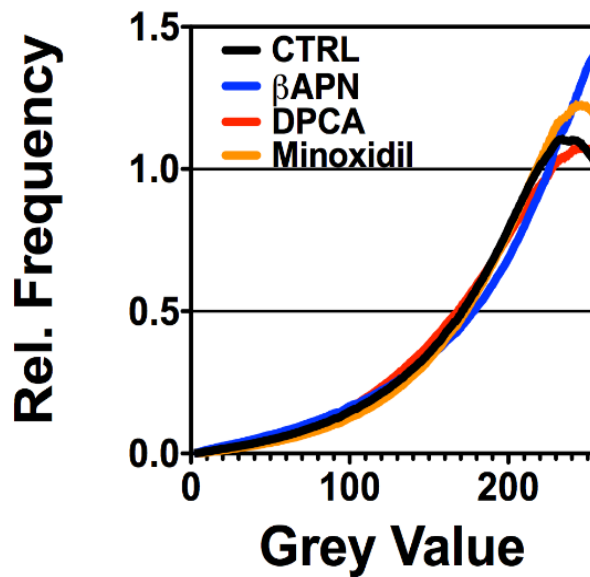


Abbildung 7: Histogramm erstellt aus den Aufnahmen der Piko-Siriusrot-gefärbten Tumorschnitte.

Die relative Häufigkeit der Grauwerte darstellende Kurve der Kontrollgruppen-Tumoren in schwarz, von β APN in blau, 1,4-DPCA in rot und Minoxidil in orange. Ersichtlich sind im Vergleich zur Kontrollgruppe nach vertikal verschobene Kurven nach β APN und Minoxidil-Behandlung gemäß einer höheren Anzahl von helleren Grauwerten im Sinne eines geringeren Kollagengehalts. Nach DPCA-Behandlung kam es zu einer horizontalen Verschiebung der Kurve der Kontrollgruppe zu einer gleichbleibenden Häufigkeit von höheren bzw. helleren Grauwerten.

3.3 Analyse der Blutgefäßdichte mittels CD31-Färbung

In früheren Arbeiten wurde bereits eine Reduktion der Blutgefäßdichte nach Behandlung von 4T1-Tumoren mit β APN beschrieben. Unser Ziel war es, den Einfluss weiterer Kollageninhibitoren auf die Blutgefäßdichte zu untersuchen.

Hierfür wurde eine Färbung von histologischen Schnitten der 4T1-Tumoren mit einem CD31-Antikörper durchgeführt. CD31 - auch bekannt unter dem Namen PECAM1 (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule) - ist ein Protein, welches unter anderem an der Oberfläche von frühen und reifen Endothelzellen sowie Thrombozyten exprimiert wird. Im Bereich der Immunhistochemie wird es verwendet, um die Präsenz von Endothelzellen nachzuweisen (Lertkiatmongkol et al. 2016).

Die Aufnahmen erfolgten analog zu denen der Piko-Siriusfärbung, die Auswertung erfolgte ebenfalls mithilfe der Software ImageJ, wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben.

Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Verringerung der CD31-positiven Fläche nach Destabilisierung der EZM. Insbesondere unter DPCA- und Minoxidil-Behandlung ergab sich eine erhebliche Reduktion (s. Abbildung 8 und 9). Auch die β APN-Gruppe zeigte im

Gegensatz zur Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme der CD-31-positiven Fläche, wenn auch nicht so ausgeprägt.

Insgesamt scheint die EZM-Destabilisierung einen deutlich reduzierenden Einfluss auf die Dichte von Blutgefäßen und somit auch auf das Potential der Gefäßneubildung zu haben.

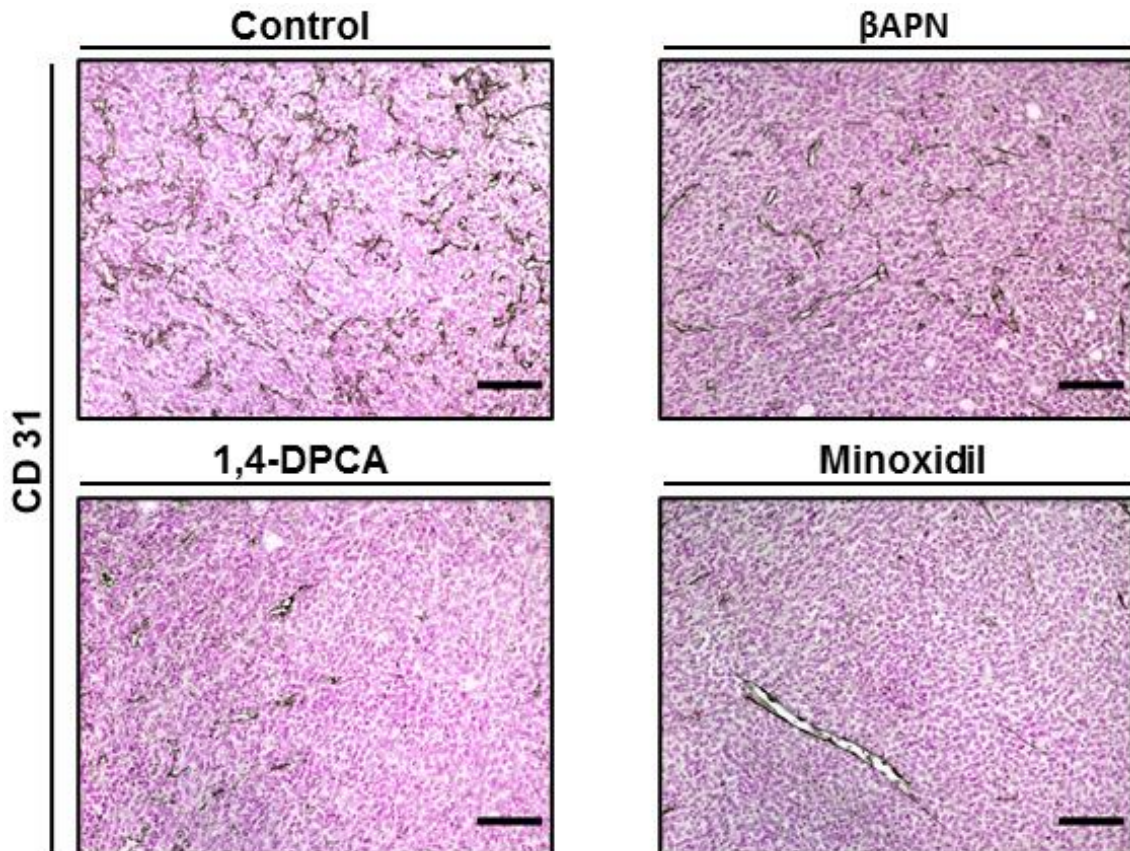


Abbildung 8: CD31-IHC-Färbung von Tumorschnitten aus den verschiedenen Behandlungsgruppen.

Zu sehen sind jeweils Ausschnitte aus den Aufnahmen. Nach Behandlung ist eine deutliche Reduktion der CD31-positiven Fläche ersichtlich. Skala = 100 μ m.

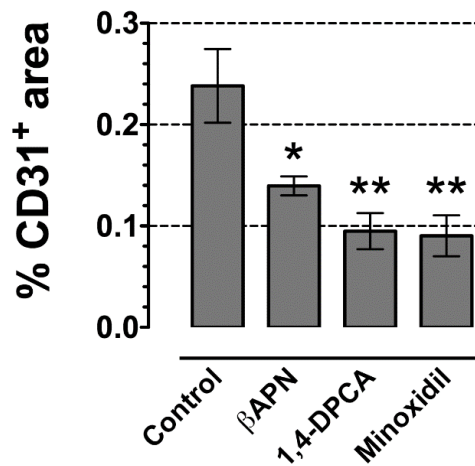


Abbildung 9: Quantifizierung der Blutgefäßdichte mittels CD31.

Es ist eine deutliche Reduktion nach Behandlung ersichtlich, insbesondere bei 1,4 DPCA und Minoxidil. $n=5-6$. Fehlerbalken \pm SEM.

3.4 Immunfluoreszenzfärbung von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten

Zum späteren Vergleich mit quantitativen FACS- und Cibersort-Ergebnissen wurden vorbereitend Immunfluoreszenzfärbungen für CD4⁺- und CD8⁺-Zellen durchgeführt, wobei der Fokus auf die Verteilungshäufigkeit und -ort der Zellen gelegt wurde.

Es wurden nach der Färbung mithilfe des Konfokalmikroskops unterschiedliche Abschnitte des Tumors aufgenommen. Die Verteilung der Zellen sollte zum einen in den unmittelbaren Randgebieten und zum anderen im Zentrum des Tumors untersucht und verglichen werden. Die Analyse erfolgte mittels ImageJ und die Quantifizierung mittels händischen Auszählens der positiven Zellen in den jeweiligen Aufnahmen.

Insgesamt zeigten sich nur wenig signifikante Ergebnisse, unter anderem bedingt durch die geringe Probenzahl.

Bei Gegenüberstellung der Anzahl an CD4⁺-Zellen im Rand- und Zentrumsbereich, ergab sich eine allgemeine Zunahme im Zentrum. Diese war in den jeweiligen Behandlungsgruppen unterschiedlich stark ausgeprägt.

Die CD8⁺-Zellen zeigten eine kontroverse Verteilung. Die überwiegende Ansammlung der Zellen fand sich statistisch signifikant in Randbereichen.

In Übereinstimmung mit den FACS-Ergebnissen ergab sich auch hier nach Behandlung eine Zunahme der CD8⁺-Zellen. Bestätigt wurde dies auch durch das Verhältnis von CD8⁺ zu CD4⁺-Zellen (s. Abbildung 10).

Ergebnisse

Zusammenfassend ist eine relevante Aussage aufgrund der fehlenden Signifikanz nicht möglich. Es ist jedoch erkennbar, dass durch Behandlung mit Kollageninhibitoren eine positive Veränderung des Immunprofils hervorgerufen wird. Dies sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

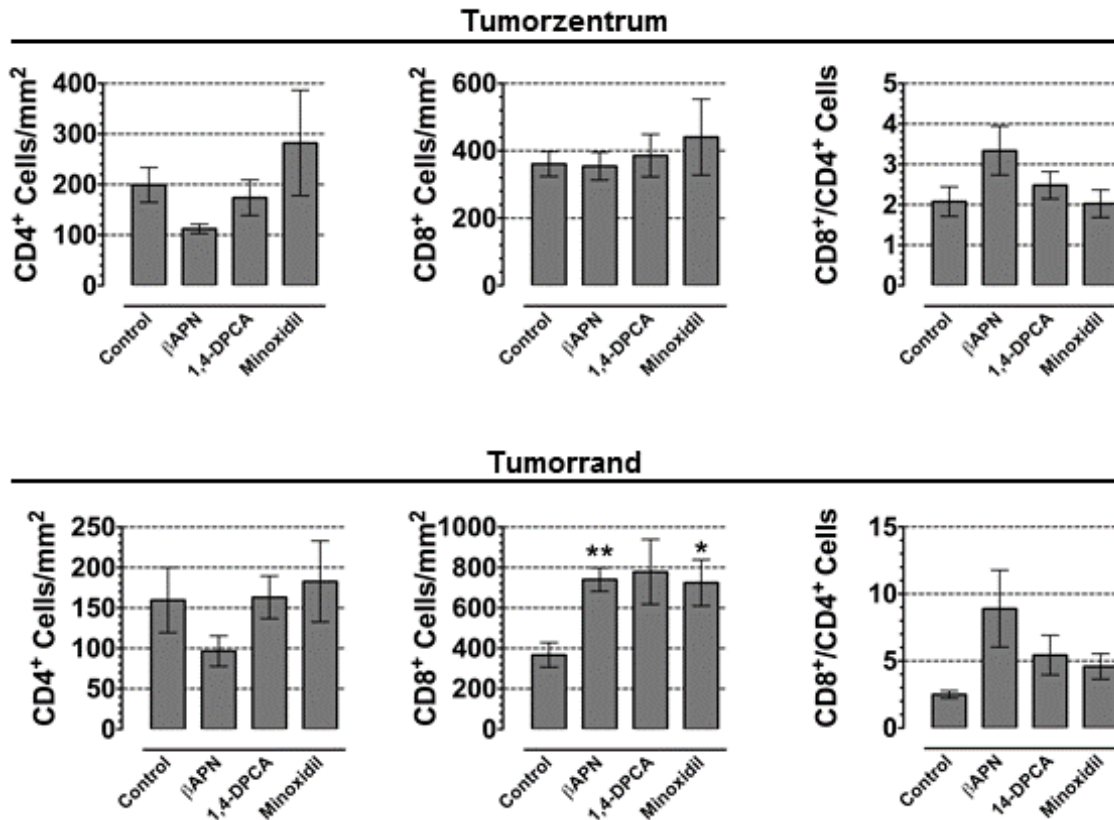


Abbildung 10: Übersicht der Anzahl von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen in Gegenüberstellung der Verteilung im Bereich von Tumorzentrum und -rand.

Aufgrund der geringen Probenzahl sind nur wenige Ergebnisse signifikant. Folgende Tendenzen sind erkennbar: es zeigt sich eine Zunahme der CD4⁺-Zellen zum Zentrum hin. CD8⁺-Zellen waren hingegen vor allem im Randbereich zu finden. Insgesamt ist nach Behandlung bei den meisten Gruppen eine Zunahme der allgemeinen Zellzahl ersichtlich. n=5-6. Fehlerbalken ± SEM.

3.5 Ergebnisse der FACS-Analyse

Anhand der FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) wurde die Auswirkung der Behandlung mit den beschriebenen EZM-destabilisierenden Wirkstoffen (βAPN, Minoxidil, 1,4-DPCA) auf Quantität und Zusammensetzung von Immunzellpopulationen untersucht.

Der Fokus wurde auf verschiedene Subpopulationen von T-Zellen und Makrophagen sowie auf Natürliche Killerzellen gelegt.

Ergebnisse

Eine Übersicht der graphisch dargestellten FACS-Ergebnisse zeigt Abbildung 11. Die Daten bezogen sich auf die Gesamtzahl an lebenden Zellen.

Während bei der Minoxidil-Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ein geringerer Effekt auftrat, zeigten die übrigen zwei Gruppen deutliche Veränderungen der Zellzahl. Diese war besonders in der 1,4 DPCA-Gruppe auffällig. So ergab sich bei allen Populationen durch Behandlung eine Erhöhung der Zellzahl. Dies deutet auf eine bessere Infiltrationsmöglichkeit der Immunzellen nach Destabilisierung der Matrix hin.

Die Gesamtzahl an T-Zellen erhöhte sich bei DPCA-Behandlung um das 8-fache, bei β APN-Behandlung um das 4-fache und bei Minoxidil um das Doppelte im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die CD4⁺- und CD8⁺-Zellzahl erhöhte sich unter DPCA-Behandlung sehr stark. Man beobachtet einen Anstieg des CD4⁺/CD8⁺-Verhältnisses mit einer Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der CD4⁺-Zellen.

Bei Betrachtung der IFN γ ⁺ Subgruppen von CD8⁺- und CD4⁺-Populationen ergab sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg der jeweiligen Zellzahlen.

So führte die β APN- und Minoxidil-Behandlung zu einer Zunahme der IFN γ ⁺-CD4⁺-Zellen um mehr als das Doppelte und stieg bei DPCA-Behandlung sogar auf das Vierfache.

Da IFN γ ⁺-Zellen eine überwiegend immunmodulatorische Wirkung zugeschrieben wird, deutet diese Entwicklung auf eine Erhöhung der Immunogenität nach Behandlung hin. Dies bedeutet eine Verstärkung der Immunantwort.

Auch bei Betrachtung der T_{regs} wurde eine signifikante Zunahme durch DPCA- und β APN-Behandlung beobachtet.

Die $\gamma\delta$ -T-Zellen zeigten eine signifikante Zellzahlerhöhung nach Minoxidil-Behandlung.

Die allgemeine Anzahl der Makrophagen veränderte sich nicht signifikant unter Behandlung. Die Gegenüberstellung der Subgruppen M1 und M2 ließ jedoch teilweise signifikante Unterschiede der Zellzahlen erkennen. Besonders die mit Minoxidil behandelte Gruppe wies einen deutlichen Anstieg des M1/M2-Verhältnisses in Richtung des Anti-Tumor-wirkenden M1-Phänotyps auf.

Der dritte Untersuchungskomplex galt den Natürlichen Killerzellen. Die Anzahl stieg sowohl nach DPCA- als auch nach β APN-Behandlung deutlich. Die Minoxidil-Behandlung führte zu keiner signifikanten Veränderung. Dies deutet auf eine Verstärkung des Anti-Tumor-Effekts in Form einer gesteigerten Zytotoxizität hin.

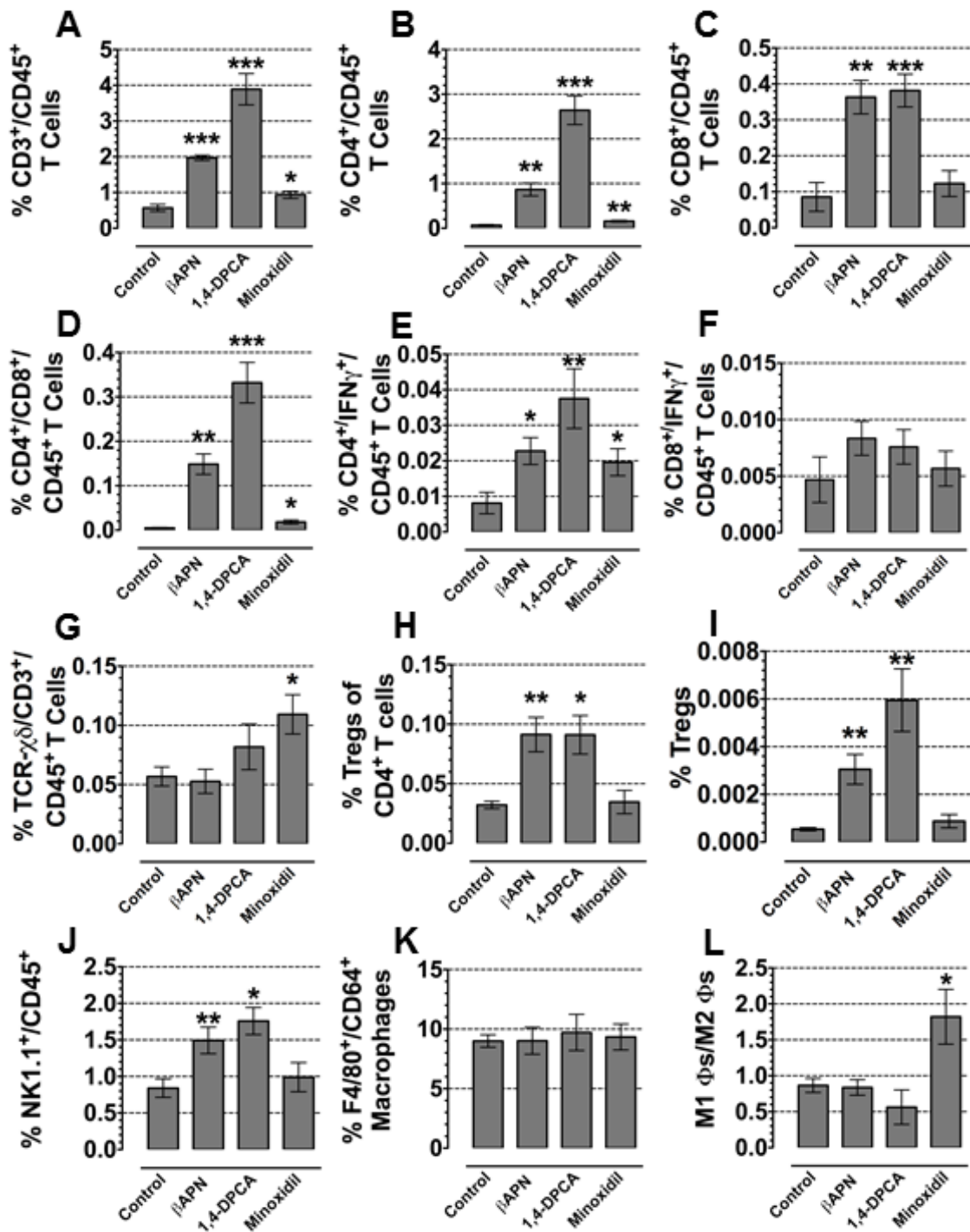


Abbildung 11: Übersicht über die quantitativen Ergebnisse der FACS-Analyse.
A: T-Zellen, **B:** CD4⁺ T-Zellen, **C:** CD8⁺ T-Zellen, **D:** Verhältnis CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen, **E:** IFN γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen, **F:** IFN γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen, **G:** $\gamma\delta$ -T-Zellen, **H:** T_{regs} aus CD4⁺ T-Zellen, **I:** Gesamtzahl T_{regs}, **J:** NK-Zellen, **K:** Makrophagen, **L:** Verhältnis M1-/M2-Subtyp. Insgesamt ist nach Behandlung - insbesondere mit DPCA - eine deutliche Zunahme aller Zellzahlen ersichtlich. So sind vermehrt T-Zellen allgemein, CD4⁺-, CD8⁺-Zellen, T_{regs} und NK-Zellen zu finden. Die Anzahl der Makrophagen bleibt gleich, jedoch ändert sich die Verteilung der M1/M2-Subtypen. n=5-6. Fehlerbalken \pm SEM.

3.6 Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse

Zu der genauen Darstellung molekularer Veränderungen durch die Behandlung mit Kollageninhibitoren wurde eine komplette RNA-Sequenzierung durchgeführt. Dafür wurden aus den entnommenen 4T1-Tumoren die nicht-nekrotischen Anteile separiert und deren gesamte RNA isoliert (s. Kapitel 2.2.6). Die Sequenzierung wurde mithilfe NextSeq500 von Illumina durchgeführt.

Die folgenden Verfahren werden ausführlich in Abschnitt 2.2.10 des Methodik-Kapitels erläutert.

3.6.1 Principal Component Analyse (PCA)

Das primäre Ziel war, eine mögliche Differenz der Expressionsdaten zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe zu untersuchen.

Ein weiteres Augenmerk galt möglichen Unterschieden zwischen den verschiedenen Behandlungsarten.

Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 12 dargestellt. Die Kontrollgruppe positioniert sich auffallend außerhalb der Behandlungsgruppen. Dies deutet auf ein signifikant verändertes Transkriptom durch die verschiedenen Behandlungen hin.

Es ist auch ersichtlich, dass die Behandlungen mit Minoxidil und DPCA hinsichtlich ihres Effekts auf die RNA-Expression sehr starke Differenzen aufweisen. Die β APN-behandelten clustern tendenziell näher an den 1,4-DPCA-Proben, liegen aber insgesamt zwischen diesen und den Minoxidil-behandelten Specimen.

Ergebnisse

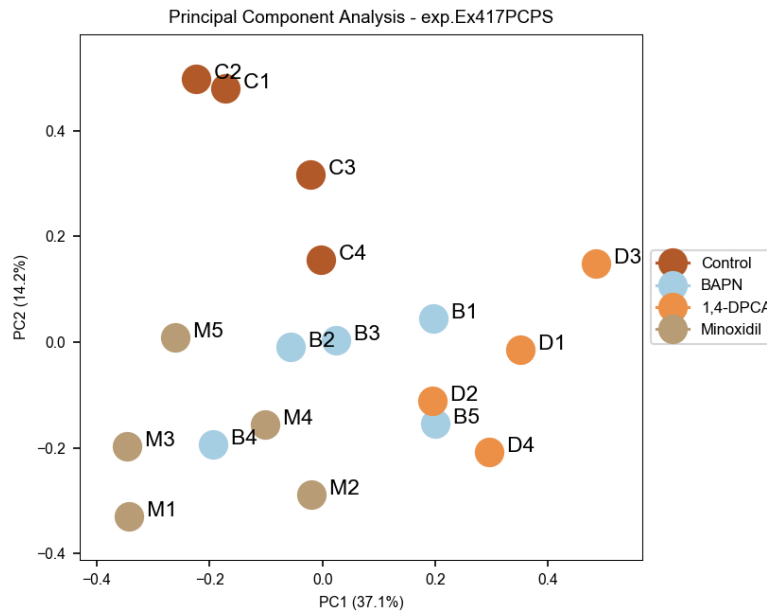


Abbildung 12: Ergebnisse der Principal-Component-Analyse.

Zu sehen sind die Expressionsdaten der verschiedenen Behandlungsgruppen und ihre unterschiedliche Verteilung entlang der größten Varianzen innerhalb der Gruppen. Die Behandlung der Tumoren führt zu einer deutlichen Diskrepanz hinsichtlich der mRNA-Expressionsdaten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Innerhalb der Behandlungsgruppen sind die Unterschiede jedoch marginal, es zeigen sich fließende Übergänge. $n=4$.

3.6.2 Gene Set Enrichment Analyse (GSEA)

Im Folgenden sollte mit der GSEA untersucht werden, in welchen spezifischen Bereichen sich diese Veränderungen zeigen. In Abbildung 13 sind tabellarisch die verschiedenen Enrichment Scores hinsichtlich gewisser tumorbezogener Eigenschaften nach Behandlung aufgeführt. Betrachtet wurden dabei Gene, die laut aktuellem Stand der Wissenschaft mit Angiogenese, Hypoxie, Invasivität, Immunsuppression und der adaptiven Immunantwort assoziiert sind. Darüber hinaus wurden Gene betrachtet, welche mit der Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT) sowie dem WNT-Signalweg in Verbindung gebracht werden können. In der embryonalen Entwicklung bezeichnet EMT den zellulären Prozess, bei welchem es zu einem Verlust von Zellpolarität und -verbindungen der Epithelzellen sowie zur Umwandlung in mesenchymale Zellen kommt. Ein ähnlicher Phänotypwechsel wird auch bei Tumorzellen beobachtet. Die Karzinomzellen epithelialen Ursprungs nehmen unter bestimmten Umständen einen zunehmend mesenchymalen Charakter an. Dies resultiert in erhöhter Invasivität und Migrationsfähigkeit (Roche 2018). Beim WNT-Signalweg kommt es über Inhibierung des β -Catenin-Abbaus zur Aktivierung der Transkription verschiedener Gene, welche die Zellproliferation und somit die Tumorgenese fördern (Zhan, Rindtorff, and Boutros 2017).

Ergebnisse

Wiederum zeigten Tumorproben nach β APN und DPCA-Behandlung in der GSEA ähnliche Veränderungen. Gene, welche mit EMT, WNT und Invasivität verknüpft sind, wurden erheblich herunterreguliert. Eine verminderte Expression zeigten ebenso Gene, die mit Immunsuppression, Angiogenese und Hypoxie korrelieren. Im Gegensatz dazu fand sich eine Anreicherung von Genen der adaptiven Immunantwort.

Zusammenfassend lässt sich anhand der Genanalyse nach Destabilisierung der EZM bei allen drei Behandlungsgruppen eine deutliche Veränderung des Tumorprofils zugunsten eines Phänotyps mit gesteigerter Immunogenität und verminderter Malignität erkennen.

Nach Minoxidil-Behandlung war im Vergleich zu β APN und DPCA zwar eine Überexpression der Invasivitäts- und Angiogenese-Gensets auffällig, dennoch war generell eine Zunahme der adaptiven Immunantwort erkennbar.

	β APN	1,4-DPCA	Minoxidil
EMT	-1.19	-0.82	-0.86
Invasiveness	-1.13	-0.81	1.27
WNT	-1.13	-1.03	-1.03
Angiogenesis	-0.84	-0.99	1.13
Immunsuppression	-0.83	-0.90	-1.27
Hypoxia	-0.68	-0.57	-1.22
Adaptive Immuneresponse	0.95	0.96	0.90

Abbildung 13: Tabellarische Übersicht über die Enrichment-Scores der Tumor-Gensets nach Behandlung hinsichtlich gewisser tumorbezogener Eigenschaften.

Es ist eine deutliche Reduktion der mit EMT, WNT, Immunsuppression und Hypoxie verknüpften Gensets innerhalb aller behandelten Tumoren ersichtlich. Die Invasivität und Angiogenese betreffende Gene werden nach β APN und DPCA-Behandlung herunterreguliert, nach Minoxidil-Behandlung jedoch überexprimiert. Die adaptive Immunantwort ist in allen drei Behandlungsgruppen gesteigert. n=4.

Die Zunahme der Angiogenese unter Minoxidil-Behandlung steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung mit CD31, bei welcher eine Verringerung der Blutgefäßdichte beobachtet wurde.

Zur Klärung dieser Diskrepanz überprüften wir die Zusammensetzung des mit Angiogenese verknüpften Gensets, dabei insbesondere die Rolle des primären Angiogenese-Markers VEGF-A.

Ergebnisse

Der Wachstumsfaktor VEGF-A ist bekannt als einer der wichtigsten Stimulatoren der Angiogenese. Dieser Effekt wird durch eine Vielzahl an Angiogenese fördernden Eigenschaften erreicht, wie zum Beispiel durch Förderung der Migration und Proliferation von Endothelzellen, Apoptose-Inhibition von Selbigen sowie Erhöhung der vaskulären Permeabilität (Melincovici et al. 2018; Matsumoto and Ema 2014).

Bei Überprüfung der vorliegenden Expressionsdaten zeigte sich in allen Behandlungsgruppen eine Verringerung der VEGF-A-Expression (s. Abbildung 14). Auch nach Minoxidil-Behandlung bestanden diese Tendenzen, wenn auch nicht signifikant.

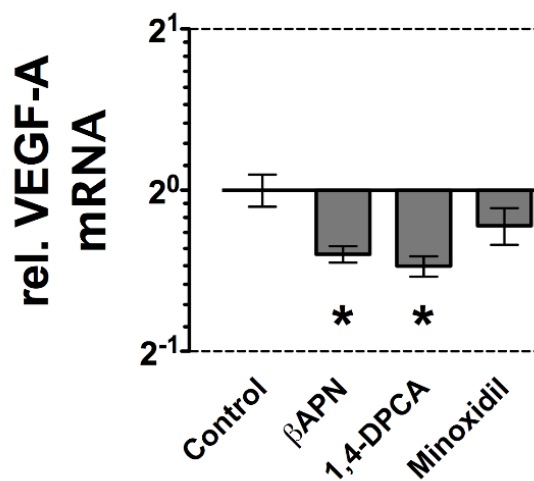


Abbildung 14: Quantifizierung der relativen VEGF-A-mRNA.

Nach Behandlung ergibt sich eine signifikante Reduktion der relativen mRNA-Expression von VEGF-A. Bei βAPN und DPCA-Behandlung signifikant, bei Minoxidil-Behandlung als Tendenz. n=4. Fehlerbalken ± SEM.

Grund für die Diskrepanz von in GSEA verstärkter Angiogenese aber reduzierter VEGF-Expression ist, dass die GSEA-Methode bei den vorgeschriebenen Gensets nicht zwischen der Wichtigkeit der einzelnen Gene für den jeweiligen Prozess unterscheidet. Alle Gene werden gleichgesetzt unabhängig davon, welche Rolle sie zum Beispiel für die Angiogenese spielen. Die graphische Übersicht der die Angiogenese betreffenden Gensets in Abbildung 15 bestätigt diese Annahme.

Ergebnisse

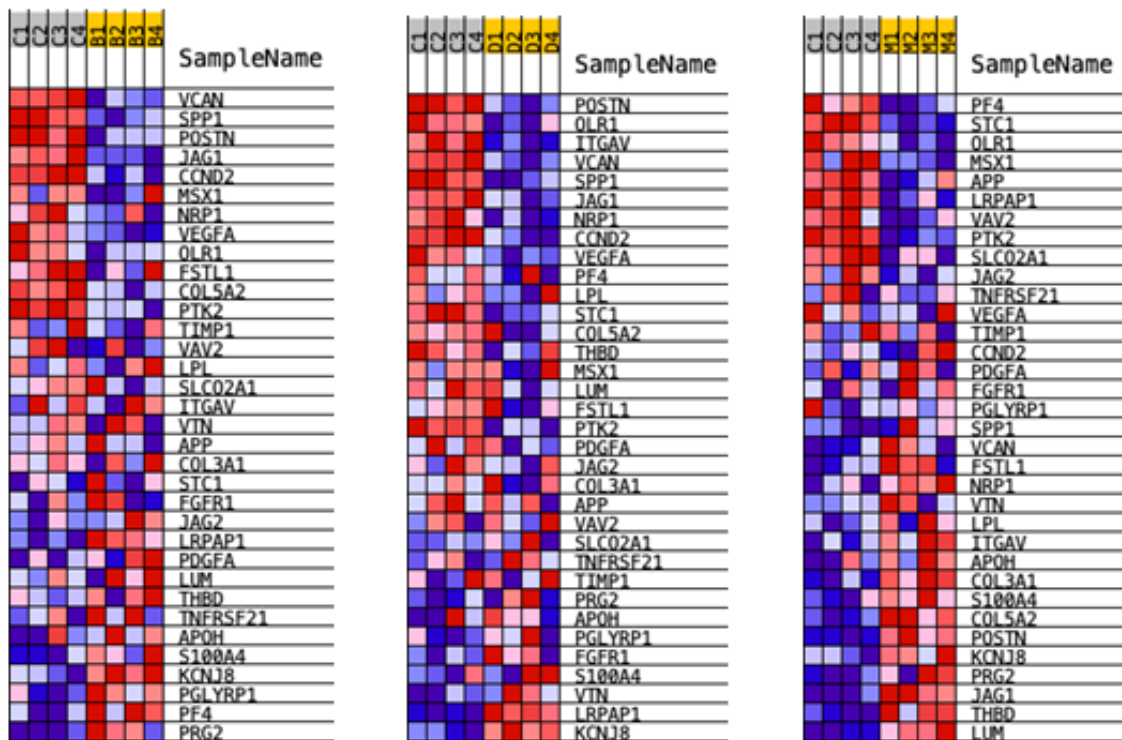


Abbildung 15: Übersicht über Gensets der Angiogenese gegliedert nach Behandlungsgruppen.

Gegenüberstellung von Kontrolle- β APN links, Kontrolle-DPCA mittig, Kontrolle-Minoxidil rechts. Rot bedeutet eine Hoch-, blau eine Herunterregulation. Zu sehen ist, dass alle Inhibitoren auf vollkommen unterschiedliche Gene der Angiogenese wirken. Die Gensets von β APN und Minoxidil zeigen einige Überschneidungen. Ersichtlich ist auch, dass bei diesen beiden Gruppen mehr Gene der Angiogenese herunterreguliert sind als bei DPCA. Zudem zeigt sich, dass alle Marker gleich gewertet werden und keine Abstufung in der Wichtigkeit gemacht wird.

In Ergänzung zu den Ergebnissen des Tumorwachstums (welche durch mechanische Messungen der Tumoren mittels Messschieber durchgeführt wurden) wurde anhand der mRNA die Proliferationsrate der Tumoren untersucht. Als Marker dafür diente das nukleäre Protein Ki-67. Dieses wird von proliferierenden Zellen in allen Phasen des aktiven Zellzyklus (G1-, S-, G2-, M-Phase) exprimiert. Es fehlt in ruhenden G0-Zellen (Scholzen and Gerdes 2000).

Wie in Abbildung 16 ersichtlich zeigt sich in Einklang mit den Messungen eine deutliche Verringerung der relativen Ki-67-mRNA gemäß einer verminderten Proliferationsrate in behandelten Tumoren. Insbesondere nach β APN- und DPCA-Behandlung wird diese Reduktion deutlich. Nach Minoxidil-Behandlung war jedoch nur eine geringe, nicht signifikante reduzierende Tendenz zu erkennen.

Ergebnisse

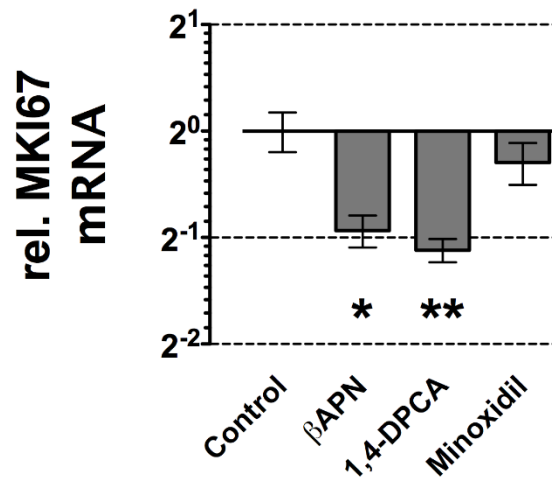


Abbildung 16: Quantifizierung der relativen Ki-67-mRNA.

Die Destabilisierung der EZM durch β APN und DPCA führt zu einer signifikanten Verringerung der Proliferationsrate gemessen anhand der mRNA des Proliferationsmarkers Ki67. Nach Minoxidil-Behandlung zeigt sich nur eine geringe reduzierende Tendenz. $n=4$. Fehlerbalken \pm SEM.

3.6.3 Cibersort-Analyse

In Ergänzung der FACS-Ergebnisse sollten mithilfe dieser Analyse detailliertere Ergebnisse bezüglich der Zusammensetzung der Immunzellpopulationen nach Behandlung erzielt werden. Das Verfahren wird in Kapitel 2.2.10 ausführlich dargestellt. Grundprinzip stellt die Untersuchung der Tumor-mRNA auf gewisse Gensets dar, welche für die jeweiligen Zellpopulationen spezifisch und charakteristisch sind. Bei einer Anreicherung bzw. Überexpression dieser Gensets wird von einer Zunahme der zugehörigen Zellpopulationen ausgegangen.

Im Interessensfeld lagen ähnlich zur FACS-Analyse mehrere T-Zell-Untergruppen, Natürliche Killerzellen und Makrophagen. Zusätzlich wurde Augenmerk auf Dendritische Zellen, B-Zellen und Neutrophile Granulozyten gelegt.

Wie in der Übersicht der Graphen von Abbildung 17 ersichtlich, führte die Behandlung mit Minoxidil zu signifikanten Anstiegen fast aller getesteten Immunzellpopulationen.

Die Behandlung mit β APN und DPCA ließen ebenfalls Veränderungen in diese Richtung erkennen, wenn auch nicht immer signifikant.

Eine Ausnahme stellt die Anzahl an Neutrophilen dar. Hier ist durch Minoxidil eine signifikante Reduktion, nach Behandlung mit β APN sowie DPCA eine Erhöhung der Zellzahl zu verzeichnen.

Die Betrachtung der aktiven CD8⁺-Zellen zeigt die größte Zunahme nach DPCA-Behandlung, analog zu den Ergebnissen der FACS-Analyse.

Ergebnisse

Bei der Untersuchung der Makrophagen-Subpopulationen zeigte die Behandlung mit Minoxidil eine signifikante Verschiebung zum anti-Tumor-wirkenden M1-Subtyp. Auch die β APN- und DPCA-Behandlungsgruppen wiesen Tendenzen in dieser Richtung auf. Minoxidil führte zudem zu einer kleinen, aber trotzdem signifikanten Steigerung der unreifen dendritischen Zellen und ähnlich wie β APN zu einer Zunahme an B-Zellen.

Generell lässt sich durch die Behandlung mit die EZM destabilisierenden Wirkstoffen eine verbesserte Infiltrationsmöglichkeit der Immunzellen nachweisen, was durch eine Zunahme jeglicher Immunzellpopulationen ersichtlich wird. Hieraus lässt sich eine erhöhte Immunogenität durch die Behandlung interpretieren.

Eine detaillierte Interpretation der Diskrepanz der Ergebnisse von FACS- und Cibersort-Analyse sowie eine Gegenüberstellung der unterschiedlichen Methoden erfolgt im Diskussionskapitel.

Ergebnisse

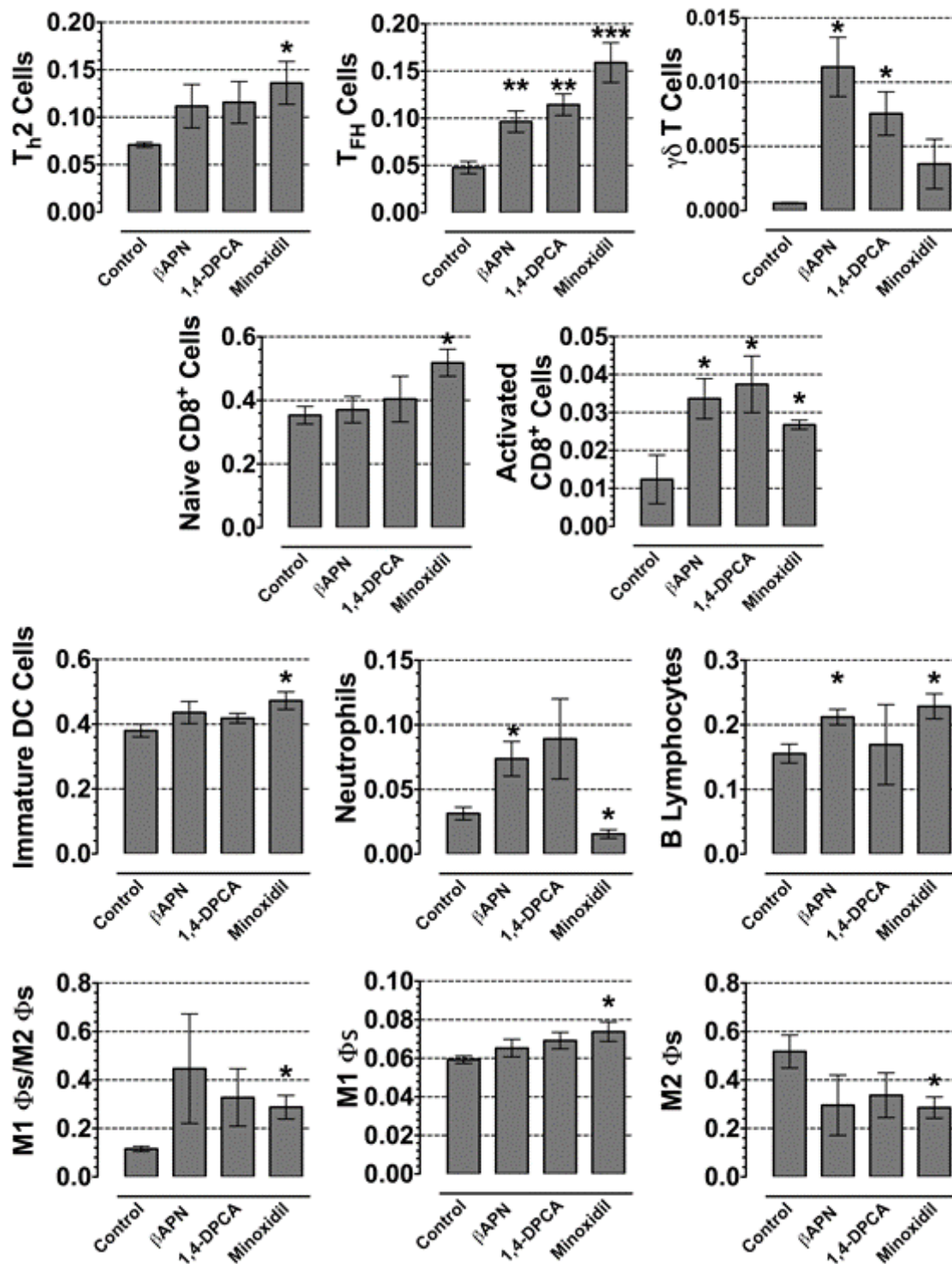


Abbildung 17: Übersicht über die quantitativen Ergebnisse der Zellsort-Analyse.

Nach Behandlung ist eine Überexpression der Gensets aller untersuchten Zellpopulationen ersichtlich mit den signifikantesten Ergebnissen nach Minoxidil-Behandlung. Ausnahme stellen die Anzahl an $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie Neutrophilen dar. Auch die Anzahl an Makrophagen steigt nach Behandlung mit einer Verlagerung des Verhältnisses auf den M1-Subtyp. $n=4$, Fehlerbalken \pm SEM.

4 Diskussion

Das Mamma-Karzinom ist ein Tumor, der sich kaum oder gar nicht durch Immuntherapeutika beeinflussen lässt. Ein Grund dafür könnte die im Vergleich zu physiologisch gesunden Geweben stark akkumulierte extrazelluläre Matrix sein, ein typisches Merkmal desmoplastischer Tumorarten wie dem Mamma-Karzinom.

Ziel der Arbeit war, die Veränderungen in der Tumorumgebung muriner 4T1-Tumoren nach Destabilisierung der extrazellulären Matrix durch verschiedene Inhibitoren der Kollagensynthese, qualitativ und quantitativ zu erfassen.

Es wurden dafür drei Wirkstoffe ausgewählt, welche an verschiedenen Punkten in die Kollagensynthese bzw. -reifung eingreifen: 1,4 DPCA als P4HA-Inhibitor, Minoxidil als PLOD2-Inhibitor und β APN als LOX-Inhibitor.

Nach Behandlung mit diesen Wirkstoffen wurden die entnommenen Tumoren folgenden Analysen unterzogen:

- Histologische Untersuchung zur Beurteilung möglicher Veränderungen der Blutgefäßdichte und des Kollagengehalts nach Kollageninhibition
- FACS-Analyse zur Bestimmung quantitativer Ergebnisse der unterschiedlichen Immunzellpopulationen
- mRNA-Expressionsanalyse zur Beurteilung möglicher Veränderungen des Transkriptoms mittels Genset Enrichment Analysis (GSEA) sowie zur Quantifizierung der Immunzellpopulationen ergänzend zur FACS-Analyse (Cibersort).

Zusammenfassend zeigte die Behandlung mit Kollageninhibitoren eine deutliche Reduktion der Blutgefäßdichte und des Tumorwachstums sowie erhebliche Veränderungen der Immunumgebung.

Des Weiteren konnte eine Verminderung der Expression von typischerweise mit Tumoren verknüpften malignen Genen nachgewiesen werden. Zudem war eine signifikant gesteigerte Infiltration aller Immunzellpopulationen feststellbar.

In soliden Tumoren herrschen gesteigerte Hypoxie und ein erhöhter metabolischer Stress aufgrund der eingeschränkten Versorgung des Tumors. Tumorzellen setzen pro-angiogene Faktoren frei, wie beispielsweise IL-10, TGF β oder VEGF-A als Hif1 α reguliertes Protein. Diese Faktoren verursachen eine unproduktive Angiogenese und unterstützen Tumorwachstum und Metastasierung (Schaaf, Garg, and Agostinis 2018; Xue and Shah 2013).

Durch Destabilisierung der EZM konnten wir anhand von mRNA-Analysen der Tumoren mit allen drei Kollageninhibitoren eine verminderte Expression von Genen, welche die zelluläre Antwort auf Hypoxie, Metastasierungsneigung und Immunsuppression steuern, nachweisen. Ergänzend dazu wurde die adaptive Immunantwort deutlich gesteigert. Die Minderung des physisch gemessenen Tumorwachstums konnte zusätzlich durch Bestimmung der mRNA-Expression von Ki-67 nachgewiesen werden. Hieraus lässt sich eine Verringerung der Proliferationsrate der Tumorzellen folgern.

Bei Betrachtung der Angiogenese zeigte sich bei Minoxidil ein scheinbarer Widerspruch. Innerhalb der GSEA war eine Steigerung der Angiogenese zu verzeichnen, die anschließende Überprüfung der VEGF-A-Expression ließ jedoch eine Verringerung feststellen. Zudem wurde auch unter der histologischen CD31-Färbung eine Reduktion der Blutgefäßdichte bei allen drei Behandlungsgruppen beobachtet. Der Grund für diese Diskrepanz ist darin zu sehen, dass der Algorithmus der GSEA-Software keine Funktion beinhaltet, die Gene des Sets unterschiedlich zu gewichten. In der Aufschlüsselung der einzelnen Gene ist erkennbar, dass β APN und DPCA in einer größeren Breite Einfluss auf die Expression Angiogenese-relevanter Gene nehmen als Minoxidil (s. Abbildung 15). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer detaillierten Analyse der Ergebnisse, die durch GSEA gewonnen werden, insbesondere hinsichtlich der Bestandteile der jeweiligen Gensets.

Maligne Tumore zeigen häufig gesteigerte Hypoxie und vermehrte aber ungleichmäßige Angiogenese, was unter anderem zu einer Nekrosenbildung und infiltrierendem Wachstum führt. Darüber hinaus entwickelt sich unter Hypoxie ein immunsuppressives Milieu mit verringerter Immuneinfiltration.

Unsere Behandlung zielte auf eine Destabilisierung der extrazellulären Matrix ab. Dies führte zu einer verbesserten Versorgung der Tumorzellen und damit zu Verringerung der Hypoxie und Angiogenese. Frühere Ergebnisse bestätigten das: So wiesen beispielsweise Rossow *et al.* bei 4T1-Tumoren nach LOX-Inhibierung mittels β APN eine Reduzierung der Hypoxie über Quantifizierung der Hif1-positiven Fläche nach. Darüber hinaus fanden sie ähnliche Veränderungen im Expressionsprofil gemäß einer Reduktion von VEGF-A und anderer Angiogenese-regulierender Faktoren wie Angiopoetin, FGF oder TGF. Wie auch in unseren Experimentreihen wies die Arbeitsgruppe ein verringertes Tumorwachstum nach (Rossow *et al.* 2018). Auch Xiong *et al.* haben die Reduzierung der P4HA-Expression bzw. Inhibierung der P4HA-Aktivität zum Gegenstand ihrer Arbeit erhoben. Die Ergebnisse stehen im Einklang zu denen unserer Untersuchungen. Die Gruppe wies bei verschiedenen Brustkrebszelllinien in der 3D-

Kultur nach Knockdown von P4HA2 eine Reduzierung der Zellproliferation mittels EdU-Färbung sowie eine verringerte Invasivität anhand der Polarisierung der Zellen nach. Kollagenablagerungen wurden erheblich reduziert, maligne Phänotypen supprimiert und das Tumorstadium reduziert. Zur Inhibierung wurde ebenfalls 1,4-DPCA verwendet, welcher in der 3D-Kultur eine verringerte Koloniegröße, verminderte Invasivität und Lungenmetastasierung bewirkte (Xiong et al. 2014).

Gilkes *et al.* stellten ebenfalls eine Abnahme von Kollagenablagerung nach Knockdown von P4HA1 und -2 bei der Tumorzelllinie MDA-MB-231 *in vivo* fest. Auch bei dieser Arbeitsgruppe wurde eine Verringerung von Tumorstadium und Metastasierung nachgewiesen. Zur Inhibierung von P4HA2 wurde Ethyl-3,4-Dihydroxybenzoat (EDHB) als Hydroxylase-Inhibitor verwendet.

Eine weitere markante Veränderung der Tumorumgebung nach Destabilisierung der EZM war die signifikant gesteigerte Anzahl von Immunzellen in den Tumoren, was sowohl durch die FACS- als auch die Zellsort-Analyse bestätigt wurde. Dies könnte entweder auf eine Verbesserung der Infiltrationsmöglichkeit von Immunzellen oder auf eine erhöhte Immunogenität des Tumors hindeuten. Den einzelnen Immunzellpopulationen werden, wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, unterschiedliche Rollen und bivalente Auswirkungen bezüglich der Prognose des Tumorstadiums zugeordnet. Es gibt nach aktuellem Kenntnisstand nur sehr wenige Populationen, welche in der Literatur als „ausschließlich gut“ oder „ausschließlich schlecht“ im Tumorstadium charakterisiert werden.

Exemplarisch soll dies an der Rolle der IFN γ ⁺-Zellen erläutert werden: Während sich die Anzahl IFN γ ⁺ CD8⁺-Zellen kaum veränderte, nahm die Anzahl der IFN γ ⁺ CD4⁺-Zellen nach Behandlung mit allen Kollageninhibitoren deutlich zu. IFN γ ist ein Zytokin aus der Familie der Interferone, welches als einer der wichtigsten Regulatoren von innatem und adaptivem Immunsystem sowie von Entzündungsreaktionen gilt. Dieses proinflammatorische Zytokin wird von einer Vielzahl an Zellen produziert, unter anderem von Natürlichen Killerzellen, CD4⁺ und CD8⁺-Zellen. Der klassischen Sichtweise zufolge gilt IFN γ als das Haupt-Anti-Tumor-Zytokin, indem es einerseits direkt suppressiv auf Tumorzellen wirkt, andererseits positiv modulierende tumorbezogene Immuneffektoren wie Dendritische Zellen, T-Zellen oder NK-Zellen unterstützt (Ikeda, Old, and Schreiber 2002). Nach neueren Ergebnissen kann IFN γ aber unter bestimmten Umständen auch pro-Tumor-Effekte gemäß eines tolerogenen immunologischen Phänotyps hervorrufen (Zaidi and Merlino 2011; Lin et al. 2017). Insgesamt ist die paradoxe und bivalente Rolle der IFN γ vermittelten Effekte noch nicht vollständig klar. Rožman *et al.* zufolge hat es

die Fähigkeit, die Balance der Immunhomöostase in positive bzw. negative Richtung zu beeinflussen (Rožman and Švajger 2018). Ausschlaggebend für die Weise der IFN γ -Funktion scheint demzufolge der jeweilige molekulare Kontext hinsichtlich Tumorspezifität, immunologischem Setting und Signalintensität sowie der Zeitpunkt der Immunabwehr zu sein.

Auch hinsichtlich der CD4 $^+$ Zellen bestehen kontroverse Ansichten. Gemäß Hung *et al.* ist neben den CD8 $^+$ -Zellen auch ihnen eine Verstärkung der Wirtsantwort gegen den Tumor zuzuschreiben (Hung et al. 1998). Die Gruppe um Huang *et al.* haben bei 4T1-Tumoren eine unterschiedliche Verteilung der T-Zellen zu verschiedenen Tumor-Stadien festgestellt: die im Anfangsstadium zu findenden Th1-CD4 $^+$ -Zellen entwickelten sich in fortgeschrittenen Stadien zu T $_{reg}$ und Th17-T-Zellen. Den CD8 $^+$ -Zellen wird hierbei die Schlüsselrolle für Anti-Tumor-Immunität zugeschrieben. Die gesteigerte Anzahl von CD8 $^+$ -Zellen wird mit einer erheblichen Verbesserung der Prognose assoziiert. CD4 $^+$ -Zellen werden dagegen mit negativen prognostischen Effekten, zum Beispiel verminderter Lebenserwartung, verknüpft. Eine niedrige CD4/CD8-Ratio wird dahingehend mit einer positiven Prognose im Sinne verringerter Mortalität und Rezidiv-Wahrscheinlichkeit belegt (Huang et al. 2015).

Den $\gamma\delta$ -T-Zellen und B-Zellen werden ebenso sowohl den Tumor supprimierende als auch unterstützende Funktionen zugeschrieben (Gomes, Martins, and Silva-Santos 2010; Hannani et al. 2012; Coronella-Wood and Hersh 2003; Mantovani 2011).

Auch aus den Ergebnissen unserer Experimente lassen sich keine eindeutigen Aussagen hinsichtlich der Prognose treffen. Wir konnten nachweisen, dass die Destabilisierung der EZM zu einer signifikanten Zunahme der Immunzellen führte. Die Zunahme der T-Zellen sowie der Natürlichen Killerzellen verweist auf einen Anstieg der Zytotoxizität und damit der Immunogenität. Auch die Verschiebung des Makrophagen-Gleichgewichts zugunsten des M1-Subtyps und die erhöhte Anzahl an Dendritischen Zellen unterstreichen die verstärkte Zytotoxizität und Anti-Tumor-Wirkung.

Die generelle Zunahme der Immunzellen ist in jedem Fall als positiver Effekt zu werten: so zeigen einige Forschungsgruppen anhand von Immunsignaturen, dass eine ausgeprägtere Immunzellkomponente zu einer verbesserten Wirksamkeit von Chemotherapie bei Mamma-Karzinomen führt (Desmedt et al. 2008; Iwamoto et al. 2011; Sotiropoulos and Pusztai 2009). Das Mamma-Karzinom gilt als Tumorart, bei der eine hohe Lymphozyten-Infiltration mit besserer Wirksamkeit neoadjuvanter Therapien verknüpft ist (Denkert et al. 2010). Auch bei der Immuntherapie ist die Lymphozyten-

Infiltrationsrate ausschlaggebend für das Ansprechen der Behandlung (Issa-Nummer et al. 2013).

Bei Betrachtung der absoluten Zahlen zeigt 1,4-DPCA in der FACS-Analyse und Minoxidil in der Cibersort Analyse jeweils den größten Effekt. Die tendenziellen Unterschiede der Ergebnisse der FACS- gegenüber der Cibersort-Analyse erklären sich unter anderem durch individuelle Unterschiede in Versuchsaufbau und Durchführung.

Die FACS-Analyse ist durch einen langwierigen Experimentverlauf gekennzeichnet, welcher absolut akkurate Durchführung erfordert, um möglichst fehlerfreie Ergebnisse generieren zu können. Zudem sind Artefakte aus zellulärer Dissoziation möglich. Fragile Zelltypen können durch die Prozessierung verloren gehen und eine detaillierte Aufgliederung in diverse Untergruppen bleibt aufgrund der Limitierung der Marker verwehrt (Adan et al. 2017; Baron et al. 2019).

Die Cibersort-Analyse bestimmt hingegen die Zellzahl anhand des Expressionsverhältnisses bestimmter Marker. Diese sind von anderen Arbeitsgruppen nach zahlreichen Untersuchungen als Definitionsmatrix für die unterschiedlichen Populationen festgelegt und zur Verfügung gestellt worden (Chen et al. 2018). Insgesamt kann folgendes konkludiert werden: Die FACS-Analyse stellt eine solide und etablierte Methodik dar. Da mögliche Schwierigkeiten allgemein bekannt sind, können diese berücksichtigt und mittels gezielter Experimentführung umgangen werden. Cibersort hingegen ist noch nicht in gleichem Maße etabliert wie das FACS. Durch gezielte Überprüfung und Vergleich unserer Ergebnisse aus beiden Methoden lassen sich in Ergänzung signifikante und zuverlässige Aussagen treffen. Beide Methoden bergen individuelle Vorzüge, welche durch Kombination zu genaueren und detaillierteren Ergebnissen führen.

Eine Einschränkung der Methodik kann darin gesehen werden, dass sowohl für FACS- als auch mRNA-Analysen nur Teile der Tumoren verwendet wurden. Daher bleibt insbesondere hinsichtlich der Tumoheterogenität die Frage offen, wie repräsentativ die Ergebnisse für den Gesamttumor sind. Wie Fridman *et al.* beschrieben, ist die Verteilung der Immunzellen ganz individuell angeordnet (Fridman et al. 2012). So infiltrieren Makrophagen und Mastzellen beispielsweise sowohl Areale im Bereich des Tumorkerns als auch an der invasiven Front. B-Zellen halten sich vor allem am invasiven Randbereich auf. CD8⁺-T-Zellen finden sich überwiegend auch dort, jedoch zudem teilweise im Kernbereich und in tertiären lymphatischen Strukturen. Somit sollte bei nachfolgenden Experimenten die Versuchsdurchführung mit Gesamttumorgewebe in Betracht gezogen werden. Künftig sollte auch eine Optimierung des Versuchsaufbaus

durch höhere Versuchstierzahlen angestrebt werden, um zum Beispiel hinsichtlich der IF-Färbungen repräsentative Ergebnisse zu erzielen. Außerdem sind Experimentreihen mit identischem Versuchsaufbau aber unterschiedlichen Tumorzelllinien mit anderem genetischen Hintergrund denkbar.

Die Gegenüberstellung der verwendeten Wirkstoffe ließ experimentell deutliche Unterschiede erkennen. Allerdings wirkten alle drei Präparate gleich vermindern auf das Tumorwachstum ein. Minoxidil zeigte bei der Cibersort-Analyse die stärksten Effekte. Hinsichtlich der Reduzierung der Blutgefäßdichte waren Minoxidil und DPCA gleich wirksam. DPCA führte mit β APN zusammen bei FACS und GSEA zu den deutlichsten Auswirkungen.

Es muss beachtet werden, dass alle drei Präparate völlig diverse Anwendungsgebiete aber auch unterschiedliche Level der klinischen Erprobung haben. DPCA ist von diesen drei Präparaten der unbekannteste Wirkstoff. Es liegen bisher keine oder nur geringe pharmakologische Daten vor. β APN dagegen weist erhebliche Nebenwirkungen auf. So kann es nach langfristiger Gabe aufgrund der LOX-Inhibierung unter anderem zu einem Osteo- und Angiolathyrismus führen. Minoxidil ist ein bereits langjährig bekanntes Medikament, welches klinisch als Antihypertonikum Anwendung findet. In diesem Fall wäre nach einer entsprechenden Wirksamkeitsstudie eine Off-Label-Verwendung möglich. In künftigen Experimenten sollte eine Dosiserhöhung von Minoxidil und die Kombination mit einem PD-1-Inhibitor als Immuntherapeutikum zur Forschungsgrundlage werden.

Wir konnten mittels verschiedener verlässlicher und geeigneter Methoden unsere Annahme bestätigen, dass durch Behandlung von murinen 4T1-Tumoren mithilfe spezifischer Inhibitoren der Kollagensynthese die extrazelluläre Matrix so weit destabilisiert werden kann, dass sich deutliche Veränderungen in der Immunumgebung zeigen. So ist in allen Populationen ein Anstieg der Immunzellzahlen erkennbar, welcher auf eine bessere Infiltrationsmöglichkeit schließen lässt. Signalwege, die mit erhöhter Malignität in Zusammenhang stehen, werden herunterreguliert. Signalwege der adaptiven Immunantwort werden deutlich hochreguliert. Das Tumorwachstum wird vermindert.

Die Behandlung mit allen drei Kollageninhibitoren schafft ein ideales Milieu für die Wirkung der Therapeutika. Durch die Destabilisierung der EZM folgt eine Reduzierung der Hypoxie und verbesserte Versorgung des Tumors. Dies sorgt für verstärkte Infiltration von Immunzellen und Erhöhung der Immunogenität. Je mehr Immunzellen vorhanden, desto besser sprechen Therapeutika an. Es ist davon auszugehen, dass

Diskussion

auch eine verstärkte Infiltration von Medikamenten erreichbar ist, da die Barrierewirkung vermindert wird.

Besonders im Hinblick auf die bei Mamma-Karzinomen aufgrund eingeschränkter Infiltrationsmöglichkeit ungenügend wirksamen Immuntherapeutika, offenbart sich das vielversprechende Potential der Kollageninhibitoren. So wären Kombinationstherapieformen beider Wirkstoffe denkbar, um die Effizienz zu erhöhen.

5 Zusammenfassung/Summary

Das Mamma-Karzinom gehört zu den sogenannten desmoplastischen Tumorarten. Hierbei handelt es sich um Tumoren mit erhöhter Ansammlung von Bindegewebszellen und einer Akkumulation von Extrazellulärer Matrix (EZM). Diese verdichtete EZM wirkt sowohl auf mechanischer als auch auf Signalweg-vermittelter Ebene als eine Barriere, welche die therapeutische Wirksamkeit erheblich vermindert.

Einer der Hauptbestandteile der EZM ist Kollagen. Durch Anwendung von Präparaten, welche die Kollagensynthese und -reifung inhibieren, kann die rigide Struktur aufgelockert werden. Daraus ergibt sich eine verbesserte Versorgung mit Nährstoffen und eine verbesserte Infiltrationsmöglichkeit für Immunzellen. Dies ist für die Effizienz der Immuntherapie, welche sich in den letzten Jahren als vielversprechende Alternative zu den Grundsäulen der Krebstherapie entwickelt hat, unabdinglich.

In der vorliegenden Arbeit wurden murine Mamma-Karzinome der 4T1-Linie nach Behandlung mit EZM-destabilisierenden Kollageninhibitoren auf ihre Immunumgebung hin untersucht.

Verwendet wurden drei Wirkstoffe, welche an unterschiedlichen Punkten in die Kollagensynthese und -reifung eingreifen: β APN als LOX(L)-Inhibitor, 1,4-DPCA als P4HA-Inhibitor und Minoxidil als LH-Inhibitor. Die Behandlung führte zu einem deutlichen Anstieg aller untersuchten Immunzellen und deutet somit auf eine verbesserte Infiltrationsmöglichkeit hin. Zudem wurde die Expression maligner Signalwege, wie die der Angiogenese, Hypoxie, Metastasierungsneigung, Invasivität und Immunsuppression, verringert und tumorsuppressive Immunantworten verstärkt.

Die Kollageninhibition hatte zusätzlich ein verringertes Tumorwachstum und eine Reduktion der Blutgefäßdichte zufolge.

Als Fazit gilt es festzuhalten, dass die Verwendung von Kollageninhibitoren in der Immuntherapie eine vielversprechende Option zur Verbesserung der Effizienz dieser Therapeutika darstellt. Dieses Erkenntnis gilt es im Rahmen künftiger wissenschaftlicher Untersuchungen weiterzuentwickeln.

The mamma carcinoma is a desmoplastic tumor which shows an accumulation of fibrotic tissue and of extracellular matrix (ECM). This highly dense ECM acts as a physical and signaling-mediated barrier reducing the efficacy of various therapeutic approaches. One of the main components of the ECM is collagen. The rigid structure can be loosened by drugs which inhibit collagen synthesis and maturation. This potentially leads to improved infiltration with nutrients and a better access for immune cells. These are absolutely necessary for the effectiveness of the immune therapy that has been established as a promising alternative approach in the last years in addition to the classical cancer therapy options. In this dissertation murine mamma carcinomas of the 4T1-tumor cell line were treated with collagen inhibitors, with the aim to destabilize the rigid ECM and analyze following changes of the immune environment.

The drugs, that were used, inhibit at different stages collagen synthesis and maturation: β APN as a LOX(L)-inhibitor, 1,4-DPCA as a P4HA-inhibitor and Minoxidil as a LH-inhibitor. The treatment led to an accumulation of different kinds of immune cells which shows the improved infiltration. Furthermore, malignant pathways concerning angiogenesis, hypoxia, invasiveness, metastasis, and immunosuppression are reduced. Tumor suppressive immune responses are enhanced.

Moreover, we could ascertain a reduced tumor growth and microvessel density after treatment.

All in all, the tumors show, because of the changed quantity and constellation of immune cells, a stronger immune stimulating function. This embodies the promising potential of the usage of collagen inhibitors as an additional treatment to immune therapy to facilitate its efficacy, which has to be examined by further studies.

6 Literaturverzeichnis

- Adam, C., S. King, T. Allgeier, H. Braumuller, C. Luking, J. Mysliwietz, A. Kriegeskorte, D. H. Busch, M. Rocken, and R. Mocikat. 2005. 'DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction', *Blood*, 106: 338-44.
- Adan, A., G. Alizada, Y. Kiraz, Y. Baran, and A. Nalbant. 2017. 'Flow cytometry: basic principles and applications', *Crit Rev Biotechnol*, 37: 163-76.
- Bagordakis, E., I. Sawazaki-Calone, C. C. Macedo, C. M. Carnielli, C. E. de Oliveira, P. C. Rodrigues, A. L. Rangel, J. N. Dos Santos, J. Risteli, E. Graner, T. Salo, A. F. Paes Leme, and R. D. Coletta. 2016. 'Secretome profiling of oral squamous cell carcinoma-associated fibroblasts reveals organization and disassembly of extracellular matrix and collagen metabolic process signatures', *Tumour Biol*, 37: 9045-57.
- Baish, J. W., Y. Gazit, D. A. Berk, M. Nozue, L. T. Baxter, and R. K. Jain. 1996. 'Role of tumor vascular architecture in nutrient and drug delivery: an invasion percolation-based network model', *Microvasc Res*, 51: 327-46.
- Baker, A. M., T. R. Cox, D. Bird, G. Lang, G. I. Murray, X. F. Sun, S. M. Southall, J. R. Wilson, and J. T. Erler. 2011. 'The role of lysyl oxidase in SRC-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer', *J Natl Cancer Inst*, 103: 407-24.
- Balkwill, F. R., M. Capasso, and T. Hagemann. 2012. 'The tumor microenvironment at a glance', *J Cell Sci*, 125: 5591-6.
- Barbareschi, M. 2018. 'The use of minoxidil in the treatment of male and female androgenetic alopecia: a story of more than 30 years', *G Ital Dermatol Venereol*, 153: 102-06.
- Baron, C. S., A. Barve, M. J. Muraro, R. van der Linden, G. Dharmadhikari, A. Lyubimova, E. J. P. de Koning, and A. van Oudenaarden. 2019. 'Cell Type Purification by Single-Cell Transcriptome-Trained Sorting', *Cell*, 179: 527-42.e19.
- Barrow, Mark V., Charles F. Simpson, and Edward J. Miller. 1974. 'Lathyrism: A Review', 49: 101-28.
- Bates, Gaynor J., Stephen B. Fox, Cheng Han, Russell D. Leek, José F. Garcia, Adrian L. Harris, and Alison H. Banham. 2006. 'Quantification of Regulatory T Cells Enables the Identification of High-Risk Breast Cancer Patients and Those at Risk of Late Relapse', 24: 5373-80.
- Biron, C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens, and T. P. Salazar-Mather. 1999. 'Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines', *Annu Rev Immunol*, 17: 189-220.
- Bondareva, A., C. M. Downey, F. Ayres, W. Liu, S. K. Boyd, B. Hallgrimsson, and F. R. Jirik. 2009. 'The lysyl oxidase inhibitor, beta-aminopropionitrile, diminishes the metastatic colonization potential of circulating breast cancer cells', *PLoS One*, 4: e5620.
- Buchinger, B., S. Spitzer, H. Karlic, K. Klaushofer, and F. Varga. 2008. 'Lysyl oxidase (LOX) mRNA expression and genes of the differentiated

- osteoblastic phenotype are upregulated in human osteosarcoma cells by suramin', *Cancer Lett*, 265: 45-54.
- Caino, M. C., Y. C. Chae, V. Vaira, S. Ferrero, M. Nosotti, N. M. Martin, A. Weeraratna, M. O'Connell, D. Jernigan, A. Fatatis, L. R. Languino, S. Bosari, and D. C. Altieri. 2013. 'Metabolic stress regulates cytoskeletal dynamics and metastasis of cancer cells', *J Clin Invest*, 123: 2907-20.
- Campbell, D. J., and M. A. Koch. 2011. 'Treg cells: patrolling a dangerous neighborhood', *Nat Med*, 17: 929-30.
- Casey, T., J. Bond, S. Tighe, T. Hunter, L. Lintault, O. Patel, J. Eneman, A. Crocker, J. White, J. Tessitore, M. Stanley, S. Harlow, D. Weaver, H. Muss, and K. Plaut. 2009. 'Molecular signatures suggest a major role for stromal cells in development of invasive breast cancer', *Breast Cancer Res Treat*, 114: 47-62.
- Che, Y., J. Wang, Y. Li, Z. Lu, J. Huang, S. Sun, S. Mao, Y. Lei, R. Zang, N. Sun, and J. He. 2018. 'Cisplatin-activated PAI-1 secretion in the cancer-associated fibroblasts with paracrine effects promoting esophageal squamous cell carcinoma progression and causing chemoresistance', *Cell Death Dis*, 9: 759.
- Chen, B., M. S. Khodadoust, C. L. Liu, A. M. Newman, and A. A. Alizadeh. 2018. 'Profiling Tumor Infiltrating Immune Cells with CIBERSORT', *Methods Mol Biol*, 1711: 243-59.
- Conti, J. A., T. J. Kendall, A. Bateman, T. A. Armstrong, A. Papa-Adams, Q. Xu, G. Packham, J. N. Primrose, R. C. Benyon, and J. P. Iredale. 2008. 'The desmoplastic reaction surrounding hepatic colorectal adenocarcinoma metastases aids tumor growth and survival via alphav integrin ligation', *Clin Cancer Res*, 14: 6405-13.
- Coronella-Wood, J. A., and E. M. Hersh. 2003. 'Naturally occurring B-cell responses to breast cancer', *Cancer Immunol Immunother*, 52: 715-38.
- Cretu, A., and P. C. Brooks. 2007. 'Impact of the non-cellular tumor microenvironment on metastasis: potential therapeutic and imaging opportunities', *J Cell Physiol*, 213: 391-402.
- Cukierman, E., and D. E. Bassi. 2010. 'Physico-mechanical aspects of extracellular matrix influences on tumorigenic behaviors', *Semin Cancer Biol*, 20: 139-45.
- Curiel, Tyler J., George Coukos, Linhua Zou, Xavier Alvarez, Pui Cheng, Peter Mottram, Melina Evdemon-Hogan, Jose R. Conejo-Garcia, Lin Zhang, Matthew Burow, Yun Zhu, Shuang Wei, Ilona Kryczek, Ben Daniel, Alan Gordon, Leann Myers, Andrew Lackner, Mary L. Disis, Keith L. Knutson, Lieping Chen, and Weiping Zou. 2004. 'Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival', *Nat Med*, 10: 942-49.
- Delecluse, S., S. Zschäbitz, N. R. Neuendorff, and M. Zeier. 2020. 'Einsatz und Nebenwirkungen von Checkpoint-Inhibitoren', *Der Nephrologe*, 15: 87-94.
- DeNardo, D. G., D. J. Brennan, E. Rexhepaj, B. Ruffell, S. L. Shiao, S. F. Madden, W. M. Gallagher, N. Wadhvani, S. D. Keil, S. A. Junaid, H. S. Rugo, E. S. Hwang, K. Jirstrom, B. L. West, and L. M. Coussens. 2011.

- 'Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy', *Cancer Discov*, 1: 54-67.
- Denkert, C., S. Loibl, A. Noske, M. Roller, B. M. Müller, M. Komor, J. Budczies, S. Darb-Esfahani, R. Kronenwett, C. Hanusch, C. von Törne, W. Weichert, K. Engels, C. Solbach, I. Schrader, M. Dietel, and G. von Minckwitz. 2010. 'Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer', *J Clin Oncol*, 28: 105-13.
- DeSantis, C., J. Ma, L. Bryan, and A. Jemal. 2014. 'Breast cancer statistics, 2013', *CA Cancer J Clin*, 64: 52-62.
- Desmedt, C., B. Haibe-Kains, P. Wirapati, M. Buyse, D. Larsimont, G. Bontempi, M. Delorenzi, M. Piccart, and C. Sotiriou. 2008. 'Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes', *Clin Cancer Res*, 14: 5158-65.
- Du, H., M. Pang, X. Hou, S. Yuan, and L. Sun. 2017. 'PLOC2 in cancer research', *Biomed Pharmacother*, 90: 670-76.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, and R. D. Schreiber. 2002. 'Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape', *Nat Immunol*, 3: 991-8.
- Dunn, G. P., C. M. Koebel, and R. D. Schreiber. 2006. 'Interferons, immunity and cancer immunoediting', *Nat Rev Immunol*, 6: 836-48.
- Dunn, G. P., L. J. Old, and R. D. Schreiber. 2004. 'The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting', *Immunity*, 21: 137-48.
- Eggermont, A. M. M., C. U. Blank, M. Mandala, G. V. Long, V. Atkinson, S. Dalle, A. Haydon, M. Lichinitser, A. Khatkhat, M. S. Carlino, S. Sandhu, J. Larkin, S. Puig, P. A. Ascierto, P. Rutkowski, D. Schadendorf, R. Koornstra, L. Hernandez-Aya, M. Maio, A. J. M. van den Eertwegh, J. J. Grob, R. Gutzmer, R. Jamal, P. Lorigan, N. Ibrahim, S. Marreaud, A. C. J. van Akkooi, S. Suci, and C. Robert. 2018. 'Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma', *N Engl J Med*, 378: 1789-801.
- Elia, Angela, Paola Cappello, Maura Puppo, Tiziana Fraone, Cristina Vanni, Alessandra Eva, Tiziana Musso, Francesco Novelli, Luigi Varesio, and Mirella Giovarelli. 2008. 'Human dendritic cells differentiated in hypoxia down-modulate antigen uptake and change their chemokine expression profile', *Journal of leukocyte biology*, 84: 1472-82.
- Erler, J. T., K. L. Bennewith, M. Nicolau, N. Dornhofer, C. Kong, Q. T. Le, J. T. Chi, S. S. Jeffrey, and A. J. Giaccia. 2006. 'Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis', *Nature*, 440: 1222-6.
- Frantz, C., K. M. Stewart, and V. M. Weaver. 2010. 'The extracellular matrix at a glance', *J Cell Sci*, 123: 4195-200.
- Fridman, W. H., F. Pages, C. Sautès-Fridman, and J. Galon. 2012. 'The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome', *Nat Rev Cancer*, 12: 298-306.
- Gabrilovich, D. I., S. Ostrand-Rosenberg, and V. Bronte. 2012. 'Coordinated regulation of myeloid cells by tumours', *Nat Rev Immunol*, 12: 253-68.
- Gandhi, L., D. Rodriguez-Abreu, S. Gadgeel, E. Esteban, E. Felip, F. De Angelis, M. Domine, P. Clingan, M. J. Hochmair, S. F. Powell, S. Y.

- Cheng, H. G. Bischoff, N. Peled, F. Grossi, R. R. Jennens, M. Reck, R. Hui, E. B. Garon, M. Boyer, B. Rubio-Viqueira, S. Novello, T. Kurata, J. E. Gray, J. Vida, Z. Wei, J. Yang, H. Raftopoulos, M. C. Pietanza, and M. C. Garassino. 2018. 'Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer', *N Engl J Med*, 378: 2078-92.
- Gelse, K., E. Pöschl, and T. Aigner. 2003. 'Collagens--structure, function, and biosynthesis', *Adv Drug Deliv Rev*, 55: 1531-46.
- Genin, M., F. Clement, A. Fattaccioli, M. Raes, and C. Michiels. 2015. 'M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide', *BMC Cancer*, 15: 577.
- Gilkes, D. M., S. Bajpai, C. C. Wong, P. Chaturvedi, M. E. Hubbi, D. Wirtz, and G. L. Semenza. 2013. 'Procollagen lysyl hydroxylase 2 is essential for hypoxia-induced breast cancer metastasis', *Mol Cancer Res*, 11: 456-66.
- Gilkes, D. M., P. Chaturvedi, S. Bajpai, C. C. Wong, H. Wei, S. Pitcairn, M. E. Hubbi, D. Wirtz, and G. L. Semenza. 2013. 'Collagen prolyl hydroxylases are essential for breast cancer metastasis', *Cancer Res*, 73: 3285-96.
- Gomes, Anita Q., Duarte S. Martins, and Bruno Silva-Santos. 2010. 'Targeting $\gamma\delta$ T Lymphocytes for Cancer Immunotherapy: From Novel Mechanistic Insight to Clinical Application', 70: 10024-27.
- Gorres, K. L., and R. T. Raines. 2010. 'Prolyl 4-hydroxylase', *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 45: 106-24.
- Hallmann, R., X. Zhang, J. Di Russo, L. Li, J. Song, M. J. Hannocks, and L. Sorokin. 2015. 'The regulation of immune cell trafficking by the extracellular matrix', *Curr Opin Cell Biol*, 36: 54-61.
- Hannani, D., Y. Ma, T. Yamazaki, J. Dechanet-Merville, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2012. 'Harnessing gammadelta T cells in anticancer immunotherapy', *Trends Immunol*, 33: 199-206.
- Hauser, Karin. 2012. 'Komponenten der extrazellulären Matrix.' in Rainer Deutzmann, Karin Hauser, Roland Netzker and Joachim Rassow (eds.), *Duale Reihe Biochemie* (Georg Thieme Verlag).
- Helmy, K. Y., S. A. Patel, G. R. Nahas, and P. Rameshwar. 2013. 'Cancer immunotherapy: accomplishments to date and future promise', *Ther Deliv*, 4: 1307-20.
- Henke, E., R. Nandigama, and S. Ergun. 2019. 'Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy', *Front Mol Biosci*, 6: 160.
- Hiraoka, Nobuyoshi, Kaoru Onozato, Tomoo Kosuge, and Setsuo Hirohashi. 2006. 'Prevalence of FOXP3⁺ Regulatory T Cells Increases During the Progression of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Premalignant Lesions', 12: 5423-34.
- Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA. 2015. 'SEER Cancer Statistic Review, 1975-2013', Accessed 23.01.2020. https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2013/.
- Huang, Y., C. Ma, Q. Zhang, J. Ye, F. Wang, Y. Zhang, P. Hunborg, M. A. Varvares, D. F. Hoft, E. C. Hsueh, and G. Peng. 2015. 'CD4⁺ and CD8⁺ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome', *Oncotarget*, 6: 17462-78.

- Hui, L., and Y. Chen. 2015. 'Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil', *Cancer Lett*, 368: 7-13.
- Hung, K., R. Hayashi, A. Lafond-Walker, C. Lowenstein, D. Pardoll, and H. Levitsky. 1998. 'The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response', *J Exp Med*, 188: 2357-68.
- Ikeda, H., L. J. Old, and R. D. Schreiber. 2002. 'The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting', *Cytokine Growth Factor Rev*, 13: 95-109.
- Insua-Rodríguez, J., and T. Oskarsson. 2016. 'The extracellular matrix in breast cancer', *Adv Drug Deliv Rev*, 97: 41-55.
- Iqbal, J., O. Ginsburg, P. A. Rochon, P. Sun, and S. A. Narod. 2015. 'Differences in breast cancer stage at diagnosis and cancer-specific survival by race and ethnicity in the United States', *Jama*, 313: 165-73.
- Issa-Nummer, Y., S. Darb-Esfahani, S. Loibl, G. Kunz, V. Nekljudova, I. Schrader, B. V. Sinn, H. U. Ulmer, R. Kronenwett, M. Just, T. Kuhn, K. Diebold, M. Untch, F. Holms, J. U. Blohmer, J. O. Habeck, M. Dietel, F. Overkamp, P. Krabisch, G. von Minckwitz, and C. Denkert. 2013. 'Prospective validation of immunological infiltrate for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer - a substudy of the neoadjuvant GeparQuinto trial', *PLoS One*, 8: e79775.
- Iwamoto, T., G. Bianchini, D. Booser, Y. Qi, C. Coutant, C. Y. Shiang, L. Santarpia, J. Matsuoka, G. N. Hortobagyi, W. F. Symmans, F. A. Holmes, J. O'Shaughnessy, B. Hellerstedt, J. Pippen, F. Andre, R. Simon, and L. Pusztai. 2011. 'Gene pathways associated with prognosis and chemotherapy sensitivity in molecular subtypes of breast cancer', *J Natl Cancer Inst*, 103: 264-72.
- Jain, R. K. 2005. 'Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy', *Science*, 307: 58-62.
- Junttila, M. R., and F. J. de Sauvage. 2013. 'Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response', *Nature*, 501: 346-54.
- Kagan, H. M., and W. Li. 2003. 'Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell', *J Cell Biochem*, 88: 660-72.
- Kalluri, R. 2016. 'The biology and function of fibroblasts in cancer', *Nat Rev Cancer*, 16: 582-98.
- Kirschmann, D. A., E. A. Seftor, S. F. Fong, D. R. Nieva, C. M. Sullivan, E. M. Edwards, P. Sommer, K. Csiszar, and M. J. Hendrix. 2002. 'A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion', *Cancer Res*, 62: 4478-83.
- Langers, I., V. M. Renoux, M. Thiry, P. Delvenne, and N. Jacobs. 2012. 'Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis', *Biologics*, 6: 73-82.
- Lee, G. R. 2018. 'The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity', *Int J Mol Sci*, 19.
- Lertkiatmongkol, P., D. Liao, H. Mei, Y. Hu, and P. J. Newman. 2016. 'Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)', *Curr Opin Hematol*, 23: 253-9.

- Lin, C. F., C. M. Lin, K. Y. Lee, S. Y. Wu, P. H. Feng, K. Y. Chen, H. C. Chuang, C. L. Chen, Y. C. Wang, P. C. Tseng, and T. T. Tsai. 2017. 'Escape from IFN- γ -dependent immunosurveillance in tumorigenesis', *J Biomed Sci*, 24: 10.
- Liu, F., R. Lang, J. Zhao, X. Zhang, G. A. Pringle, Y. Fan, D. Yin, F. Gu, Z. Yao, and L. Fu. 2011. 'CD8(+) cytotoxic T cell and FOXP3(+) regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes', *Breast Cancer Res Treat*, 130: 645-55.
- Maki, J. M., J. Rasanen, H. Tikkanen, R. Sormunen, K. Makikallio, K. I. Kivirikko, and R. Soininen. 2002. 'Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice', *Circulation*, 106: 2503-9.
- Mancino, A., T. Schioppa, P. Larghi, F. Pasqualini, M. Nebuloni, I. H. Chen, S. Sozzani, J. M. Austyn, A. Mantovani, and A. Sica. 2008. 'Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions', *Blood*, 112: 3723-34.
- Manou, D., I. Caon, P. Bouris, I. E. Triantaphyllidou, C. Giaroni, A. Passi, N. K. Karamanos, D. Vigetti, and A. D. Theocharis. 2019. 'The Complex Interplay Between Extracellular Matrix and Cells in Tissues', *Methods Mol Biol*, 1952: 1-20.
- Mantovani, A. 2011. 'B cells and macrophages in cancer: yin and yang', *Nat Med*, 17: 285-6.
- Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati. 2004. 'The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization', *Trends Immunol*, 25: 677-86.
- Mantovani, A., S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, and A. Sica. 2002. 'Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes', *Trends Immunol*, 23: 549-55.
- Martinez, F. O., L. Helming, and S. Gordon. 2009. 'Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective', *Annu Rev Immunol*, 27: 451-83.
- Matsumoto, K., and M. Ema. 2014. 'Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours', *J Biochem*, 156: 1-10.
- McCormack, V. A., and P. Boffetta. 2011. 'Today's lifestyles, tomorrow's cancers: trends in lifestyle risk factors for cancer in low- and middle-income countries', *Annals of Oncology*, 22: 2349-57.
- Melincovici, C. S., A. B. Boşca, S. Şuşman, M. Mărginean, C. Mişu, M. Istrate, I. M. Moldovan, A. L. Roman, and C. M. Mişu. 2018. 'Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis', *Rom J Morphol Embryol*, 59: 455-67.
- 'Minoxidil.' in. 2012. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases: Bethesda (MD)).
- Mootha, Vamsi K., Cecilia M. Lindgren, Karl-Fredrik Eriksson, Aravind Subramanian, Smita Sihag, Joseph Lehar, Pere Puigserver, Emma Carlsson, Martin Ridderstråle, Esa Laurila, Nicholas Houstis, Mark J. Daly, Nick Patterson, Jill P. Mesirov, Todd R. Golub, Pablo Tamayo, Bruce Spiegelman, Eric S. Lander, Joel N. Hirschhorn, David Altshuler, and Leif C. Groop. 2003. 'PGC-1 α -responsive genes involved in

- oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes', *Nature Genetics*, 34: 267-73.
- Naba, A., K. R. Clauser, S. Hoersch, H. Liu, S. A. Carr, and R. O. Hynes. 2012. 'The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices', *Mol Cell Proteomics*, 11: M111.014647.
- Netti, P. A., D. A. Berk, M. A. Swartz, A. J. Grodzinsky, and R. K. Jain. 2000. 'Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors', *Cancer Res*, 60: 2497-503.
- Ozdemir, B. C., T. Pentcheva-Hoang, J. L. Carstens, X. Zheng, C. C. Wu, T. R. Simpson, H. Laklai, H. Sugimoto, C. Kahlert, S. V. Novitskiy, A. De Jesus-Acosta, P. Sharma, P. Heidari, U. Mahmood, L. Chin, H. L. Moses, V. M. Weaver, A. Maitra, J. P. Allison, V. S. LeBleu, and R. Kalluri. 2014. 'Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival', *Cancer Cell*, 25: 719-34.
- Peng, G., H. Y. Wang, W. Peng, Y. Kiniwa, K. H. Seo, and R. F. Wang. 2007. 'Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway', *Immunity*, 27: 334-48.
- Peng, M., Y. Mo, Y. Wang, P. Wu, Y. Zhang, F. Xiong, C. Guo, X. Wu, Y. Li, X. Li, G. Li, W. Xiong, and Z. Zeng. 2019. 'Neoantigen vaccine: an emerging tumor immunotherapy', *Mol Cancer*, 18: 128.
- Pinzon-Charry, Alberto, C. Ho, T. Maxwell, Michael McGuckin, C. Schmidt, C. Furnival, Chris Pyke, and J. López. 2007. 'Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer', *British journal of cancer*, 97: 1251-9.
- Pollard, J. W. 2004. 'Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis', *Nat Rev Cancer*, 4: 71-8.
- Puchtler, H., F. S. Waldrop, and L. S. Valentine. 1973. 'Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA', *Beitr Pathol*, 150: 174-87.
- Qi, Y., and R. Xu. 2018. 'Roles of PLODs in Collagen Synthesis and Cancer Progression', *Front Cell Dev Biol*, 6: 66.
- Qiao, Y., C. Zhang, A. Li, D. Wang, Z. Luo, Y. Ping, B. Zhou, S. Liu, H. Li, D. Yue, Z. Zhang, X. Chen, Z. Shen, J. Lian, Y. Li, S. Wang, F. Li, L. Huang, L. Wang, B. Zhang, J. Yu, Z. Qin, and Y. Zhang. 2018. 'IL6 derived from cancer-associated fibroblasts promotes chemoresistance via CXCR7 in esophageal squamous cell carcinoma', *Oncogene*, 37: 873-83.
- Raave, R., T. H. van Kuppevelt, and W. F. Daamen. 2018. 'Chemotherapeutic drug delivery by tumoral extracellular matrix targeting', *J Control Release*, 274: 1-8.
- Reinacher-Schick, A., M. Pohl, and W. Schmiegel. 2008. 'Drug insight: antiangiogenic therapies for gastrointestinal cancers--focus on monoclonal antibodies', *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 5: 250-67.
- Robbins, P. F., S. H. Kassim, T. L. Tran, J. S. Crystal, R. A. Morgan, S. A. Feldman, J. C. Yang, M. E. Dudley, J. R. Wunderlich, R. M. Sherry, U. S. Kammula, M. S. Hughes, N. P. Restifo, M. Raffeld, C. C. Lee, Y. F. Li, M.

- El-Gamil, and S. A. Rosenberg. 2015. 'A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response', *Clin Cancer Res*, 21: 1019-27.
- Roche, J. 2018. 'The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer', *Cancers (Basel)*, 10.
- Rohrig, F., S. Vorlova, H. Hoffmann, M. Wartenberg, F. E. Escorcía, S. Keller, M. Tenspolde, I. Weigand, S. Gatzner, K. Manova, O. Penack, D. A. Scheinberg, A. Rosenwald, S. Ergun, Z. Granot, and E. Henke. 2017. 'VEGF-ablation therapy reduces drug delivery and therapeutic response in ECM-dense tumors', *Oncogene*, 36: 1-12.
- Rojas, K., and A. Stuckey. 2016. 'Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors', *Clin Obstet Gynecol*, 59: 651-72.
- Romagnani, S., P. Parronchi, M. M. D'Elios, P. Romagnani, F. Annunziato, M. P. Piccinni, R. Manetti, S. Sampognaro, C. Mavilia, M. De Carli, E. Maggi, and G. F. Del Prete. 1997. 'An update on human Th1 and Th2 cells', *Int Arch Allergy Immunol*, 113: 153-6.
- Rosow, L. 2019. 'Einfluss der Lysyloxidase-katalysierten Matrix-Quervernetzung auf Tumorwachstum, -metabolismus und -malignität', Universität Würzburg, Medizinische Fakultät.
- Rosow, L., S. Veitl, S. Vorlova, J. K. Wax, A. E. Kuhn, V. Maltzahn, B. Upcin, F. Karl, H. Hoffmann, S. Gatzner, M. Kallius, R. Nandigama, D. Scheld, S. Irmak, S. Herterich, A. Zerneck, S. Ergun, and E. Henke. 2018. 'LOX-catalyzed collagen stabilization is a proximal cause for intrinsic resistance to chemotherapy', *Oncogene*, 37: 4921-40.
- Rožman, P., and U. Švajger. 2018. 'The tolerogenic role of IFN- γ ', *Cytokine Growth Factor Rev*, 41: 40-53.
- Schaaf, M. B., A. D. Garg, and P. Agostinis. 2018. 'Defining the role of the tumor vasculature in antitumor immunity and immunotherapy', *Cell Death Dis*, 9: 115.
- Schober, M., R. Jesenofsky, R. Faissner, C. Weidenauer, W. Hagmann, P. Michl, R. L. Heuchel, S. L. Haas, and J. M. Lohr. 2014. 'Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer', *Cancers (Basel)*, 6: 2137-54.
- Scholzen, T., and J. Gerdes. 2000. 'The Ki-67 protein: from the known and the unknown', *J Cell Physiol*, 182: 311-22.
- Schreiber, R. D., L. J. Old, and M. J. Smyth. 2011. 'Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion', *Science*, 331: 1565-70.
- Schutze, F., F. Rohrig, S. Vorlova, S. Gatzner, A. Kuhn, S. Ergun, and E. Henke. 2015. 'Inhibition of Lysyl Oxidases Improves Drug Diffusion and Increases Efficacy of Cytotoxic Treatment in 3D Tumor Models', *Sci Rep*, 5: 17576.
- Schvartsman, G., R. Ferrarotto, and E. Massarelli. 2016. 'Checkpoint inhibitors in lung cancer: latest developments and clinical potential', *Ther Adv Med Oncol*, 8: 460-73.
- Seager, R. J., C. Hajal, F. Spill, R. D. Kamm, and M. H. Zaman. 2017. 'Dynamic interplay between tumour, stroma and immune system can drive or prevent tumour progression', *Converg Sci Phys Oncol*, 3.

- Shoulders, M. D., and R. T. Raines. 2009. 'Collagen structure and stability', *Annu Rev Biochem*, 78: 929-58.
- Sica, D. A. 2004. 'Minoxidil: an underused vasodilator for resistant or severe hypertension', *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 6: 283-7.
- Sotiriou, C., and L. Pusztai. 2009. 'Gene-expression signatures in breast cancer', *N Engl J Med*, 360: 790-800.
- Stölting, Tim. 2018. 'Veränderung der Tumorumgebung durch pharmakologische Destabilisierung der extrazellulären Matrix', Bachelor Thesis Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Subramanian, A., P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander, and J. P. Mesirov. 2005. 'Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 15545-50.
- Tang, Y. A., Y. F. Chen, Y. Bao, S. Mahara, Smjm Yatim, G. Oguz, P. L. Lee, M. Feng, Y. Cai, E. Y. Tan, S. S. Fong, Z. H. Yang, P. Lan, X. J. Wu, and Q. Yu. 2018. 'Hypoxic tumor microenvironment activates GLI2 via HIF-1alpha and TGF-beta2 to promote chemoresistance in colorectal cancer', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: E5990-e99.
- Tao, K., M. Fang, J. Alroy, and G. G. Sahagian. 2008. 'Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer', *BMC Cancer*, 8: 228.
- Tao, Z., A. Shi, C. Lu, T. Song, Z. Zhang, and J. Zhao. 2015. 'Breast Cancer: Epidemiology and Etiology', *Cell Biochem Biophys*, 72: 333-8.
- Toriola, A. T., and G. A. Colditz. 2013. 'Trends in breast cancer incidence and mortality in the United States: implications for prevention', *Breast Cancer Res Treat*, 138: 665-73.
- Vasta, J. D., and R. T. Raines. 2018. 'Collagen Prolyl 4-Hydroxylase as a Therapeutic Target', *J Med Chem*, 61: 10403-11.
- Velcheti, V., and K. Schalper. 2016. 'Basic Overview of Current Immunotherapy Approaches in Cancer', *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 35: 298-308.
- Verma, R., R. L. Bowen, S. E. Slater, F. Mihaimeed, and J. L. Jones. 2012. 'Pathological and epidemiological factors associated with advanced stage at diagnosis of breast cancer', *Br Med Bull*, 103: 129-45.
- Vesely, M. D., M. H. Kershaw, R. D. Schreiber, and M. J. Smyth. 2011. 'Natural innate and adaptive immunity to cancer', *Annu Rev Immunol*, 29: 235-71.
- Walker, R. A. 2001. 'The complexities of breast cancer desmoplasia', *Breast Cancer Res*, 3: 143-5.
- Wu, T., and Y. Dai. 2017. 'Tumor microenvironment and therapeutic response', *Cancer Lett*, 387: 61-68.
- Xiong, G., L. Deng, J. Zhu, P. G. Rychahou, and R. Xu. 2014. 'Prolyl-4-hydroxylase α subunit 2 promotes breast cancer progression and metastasis by regulating collagen deposition', *BMC Cancer*, 14: 1.
- Xue, X., and Y. M. Shah. 2013. 'Hypoxia-inducible factor-2 α is essential in activating the COX2/mPGES-1/PGE2 signaling axis in colon cancer', *Carcinogenesis*, 34: 163-9.
- Zaidi, M. R., and G. Merlino. 2011. 'The two faces of interferon- γ in cancer', *Clin Cancer Res*, 17: 6118-24.

- Zamarron, B. F., and W. Chen. 2011. 'Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression', *Int J Biol Sci*, 7: 651-8.
- Zhan, T., N. Rindtorff, and M. Boutros. 2017. 'Wnt signaling in cancer', *Oncogene*, 36: 1461-73.
- Zhang, Y., I. Strehin, K. Bedelbaeva, D. Gourevitch, L. Clark, J. Leferovich, P. B. Messersmith, and E. Heber-Katz. 2015. 'Drug-induced regeneration in adult mice', *Sci Transl Med*, 7: 290ra92.
- Zhao, Q., A. Eichten, A. Parveen, C. Adler, Y. Huang, W. Wang, Y. Ding, A. Adler, T. Nevins, M. Ni, Y. Wei, and G. Thurston. 2018. 'Single-Cell Transcriptome Analyses Reveal Endothelial Cell Heterogeneity in Tumors and Changes following Antiangiogenic Treatment', *Cancer Res*, 78: 2370-82.
- Zuurmond, A. M., A. J. van der Slot-Verhoeven, E. A. van Dura, J. De Groot, and R. A. Bank. 2005. 'Minoxidil exerts different inhibitory effects on gene expression of lysyl hydroxylase 1, 2, and 3: implications for collagen cross-linking and treatment of fibrosis', *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 24: 261-70.

7. Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
aqua dest	aqua destillata
Arg-1	Arginase-1
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CAF	Cancer Associated Fibroblasts
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4'-6-Diamidin-2-phenylindol
DPCA	1,4-Dihydrophenonthrolin-4-one-3-Carboxylic acid
DZ	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAK	fokale Adhäsionskinase
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
FoxP3	Forkhead Box Protein 3
g	Gramm
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
Hif	Hypoxie-induzierter Faktor
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O-VE	H ₂ O vollentsalzt
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
INF γ	Interferon gamma
iNOS	inducible nitric oxide synthase
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LH	Lysylhydroxylase

Abkürzungsverzeichnis

LLC	Lewis Lung Carcinoma
LOX	Lysyloxidase
LOX(L)	Lysyloxidasen (LOX + LOXL1-4)
M	Mol
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm ³	Kubikmillimeter
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	messenger RNA
MVD density)	mikrovaskuläre Blutgefäßdichte (microvascular vessel density)
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NGS	Normal Goat Serum
NK	Natürliche Killerzellen
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBS saline)	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCA	Principal Component Analysis
pH Protonenkonzentration	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PH	Prolylhydroxylase
PLOD	Prokollagen-lysin-5-dioxygenase
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
s.	siehe
SEM mean)	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
TGF-β	transforming growth factor-beta
TAM	Tumor assoziierte Makrophagen
TAZ	Tumor assoziierte Zellen
T _{reg}	regulative T-Zellen
TMU	Tumormikroumgebung

Abkürzungsverzeichnis

VEGF endothelial growth factor)	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
vgl.	vergleiche
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
z. B.	zum Beispiel
βAPN	β-Aminopropionitril
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bestandteile der Tumormikroumgebung	5
Abbildung 2: Übersicht über einen Teil der Subpopulationen von T-Lymphozyten	8
Abbildung 3: Kollagensynthese mit Ansatzpunkten der Inhibitoren.	13
Abbildung 4: Übersicht über den Experimentverlauf und die nachfolgende Methodik.	20
Abbildung 5: Tumorwachstumskurven der unterschiedlichen Behandlungsgruppen.	37
Abbildung 6: Pikro-Siriusrotfärbung der Tumorschnitte aus unterschiedlichen Behandlungsgruppen im Vergleich.	39
Abbildung 7: Histogramm erstellt aus den Aufnahmen der Pikro-Siriusrot-gefärbten Tumorschnitte.	40
Abbildung 8: CD31-IHC-Färbung von Tumorschnitten aus den verschiedenen Behandlungsgruppen.	41
Abbildung 9: Quantifizierung der Blutgefäßdichte mittels CD31.	42
Abbildung 10: Übersicht der Anzahl von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Zellen in Gegenüberstellung der Verteilung im Bereich von Tumorzentrum und -rand.	43
Abbildung 11: Übersicht über die quantitativen Ergebnisse der FACS-Analyse.	45
Abbildung 12: Ergebnisse der Principal-Component-Analyse.	47
Abbildung 13: Tabellarische Übersicht über die Enrichment-Scores der Tumor-Gensets nach Behandlung hinsichtlich gewisser tumorbezogener Eigenschaften.	48
Abbildung 14: Quantifizierung der relativen VEGF-A-mRNA.	49
Abbildung 15: Übersicht über Gensets der Angiogenese gegliedert nach Behandlungsgruppen.	50
Abbildung 16: Quantifizierung der relativen Ki-67-mRNA.	51
Abbildung 17: Übersicht über die quantitativen Ergebnisse der Cibersort-Analyse.	53

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinie	21
Tabelle 2: Primärantikörper	21
Tabelle 3: Sekundärantikörper	21
Tabelle 4: FACS-Antikörper	21
Tabelle 5: Medikamente / Inhibitoren	23
Tabelle 6: Chemikalien	23
Tabelle 7: Puffer und Lösungen	24
Tabelle 8: Kits	25
Tabelle 9: Zellkulturmedien	25
Tabelle 10: Geräte	25
Tabelle 11: Software	26
Tabelle 12: Übersicht der Versuchstierzahl je Behandlungsgruppe	28
Tabelle 13: Zusammensetzungen der Medikamente pro Einzeldosis	28
Tabelle 14: FACS-Antikörpercocktails	33

Anhang

IV Anhang

Genset-Tabellen der GSEA

HYPOXIA

ACKR3	CAVIN1	ENO1	GYS1	KLF6	P4HA2	PLIN2	SLC6A6
ADM	CAVIN3	ENO2	HAS1	KLF7	PAM	PNRC1	SRPX
ADORA2B	CCN1	ENO3	HAS2	KLHL24	PCK1	PPARGC1A	STBD1
AK4	CCN2	ERO1A	HAS3	LALBA	PDGFB	PPFIA4	STC1
AKAP12	CCN5	ERRF1	HDLBP	LARGE1	PDK1	PPP1R15A	STC2
ALDOA	CCNG2	ETS1	HEXA	LDHA	PDK3	PPP1R3C	SULT2B1
ALDOB	CDKN1A	EXT1	HK1	LDHC	PFKFB3	PRDX5	TES
ALDOC	CDKN1B	F3	HK2	LOX	PFKL	PRKCA	TGFB3
AMPD3	CDKN1C	FAM162A	HMOX1	LXN	PFKP	PYGM	TGFBI
ANGPTL4	CHST2	FBP1	HOXB9	MAFF	PGAM2	RBPJ	TGM2
ANKZF1	CHST3	FOS	HS3ST1	MAP3K1	PGF	RORA	TIPARP
ANXA2	CITED2	FOSL2	HSPA5	MIF	PGK1	RRAGD	TKTL1
ATF3	COL5A1	FOXO3	IDS	MT1E	PFKFB3	S100A4	TMEM45A
ATP7A	CP	GAA	IER3	MT2A	PFKL	SAP30	TNFAIP3
B3GALT6	CSRP2	GALK1	IGFBP1	MXI1	PFKP	SCARB1	TPBG
B4GALNT2	CXCR4	GAPDH	IGFBP3	MYH9	PGAM2	SDC2	TPD52
BCAN	DCN	GAPDHS	IL6	NAGK	PGF	SDC3	TPI1
BCL2	DDIT3	GBE1	ILVBL	NCAN	PGK1	SDC4	TPST2
BGN	DDIT4	GCK	INHA	NDRG1	PGM1	SELENBP1	UGP2
BHLHE40	DPYSL4	GCNT2	IRS2	NDST1	PGM2	SERPINE1	VEGFA
BNIP3L	DTNA	GLRX	ISG20	NDST2	PHKG1	SIAH2	VHL
BRS3	DUSP1	GPC1	JMJD6	NEDD4L	PIM1	SLC25A1	VLDLR
BTG1	EDN2	GPC3	JUN	NFIL3	PKLR	SLC2A1	WSB1
CA12	EFNA1	GPC4	KDEL3	NOCT	PKP1	SLC2A3	XPNPEP1
CASP6	EFNA3	GPI	KDM3A	NR3C1	PLAC8	SLC2A5	ZFP36
CAV1	EGFR	GRHPR	KIF5A	P4HA1	PLAUR	SLC37A4	ZNF292

Anhang

EMT

ABI3BP	COL3A1	EFEMP2	GPC1	LOXL2	PCOLCE2	SFRP1	TNFRSF11 B
ACTA2	COL4A1	ELN	GPX7	LRP1	PDGFRB	SFRP4	TNFRSF12 A
ADAM12	COL4A2	EMP3	GREM1	LRRC15	PDLIM4	SGCB	TPM1
ANPEP	COL5A1	ENO2	HTRA1	LUM	PFN2	SGCD	TPM2
APLP1	COL5A2	FAP	ID2	MAGEE1	PLAUR	SGCG	TPM4
AREG	COL5A3	FAS	IGFBP2	MATN2	PLOD1	SLC6A8	VCAM1
BASP1	COL6A2	FBLN1	IGFBP3	MATN3	PLOD2	SLIT2	VCAN
BDNF	COL6A3	FBLN2	IGFBP4	MCM7	PLOD3	SLIT3	VEGFA
BGN	COL7A1	FBLN5	IL15	MEST	PMEPA1	SNAI1	VEGFC
BMP1	COL8A2	FBN1	IL32	MFAP5	PMP22	SNAI2	VIM
CADM1	COLGALT1	FBN2	IL6	MGP	POSTN	SNTB1	WIPF1
CALD1	COMP	FERMT2	INHBA	MMP1	PIIB	SPARC	WNT5A
CALU	COPA	FGF2	ITGA2	MMP14	PRRX1	SPOCK1	TWIST1
CAP2	CRLF1	FLNA	ITGA5	MMP2	PRSS2	SPP1	TWIST2
CAPG	CTHRC1	FMOD	ITGAV	MMP3	PTHLH	TAGLN	ZEB1
CCN1	CXCL1	FN1	ITGB1	MSX1	PTX3	TFPI2	ZEB2
CCN2	CXCL12	FOXC2	ITGB3	MXRA5	PVR	TGFB1	
CD44	CXCL6	FSTL1	ITGB5	MYL9	QSOX1	TGFB1	
CD59	CXCL8	FSTL3	JUN	MYLK	RGS4	TGFBR3	
CDH11	DAB2	FUCA1	LAMA1	NID2	RHOB	TGM2	
CDH2	DCN	FZD8	LAMA2	NNMT	SAT1	THBS1	
CDH6	DKK1	GADD45A	LAMA3	NOTCH2	SCG2	THBS2	
COL11A1	DPYSL3	GADD45B	LAMC1	NT5E	SDC1	THY1	
COL12A1	DST	GAS1	LAMC2	NTM	SDC4	TIMP1	
COL16A1	ECM1	GEM	LGALS1	OXTR	SERPINE1	TIMP3	
COL1A1	ECM2	GJA1	LOX	P3H1	SERPINE2	TNC	
COL1A2	EDIL3	GLIPR1	LOXL1	PCOLCE	SERPINH1	TNFAIP3	

Anhang

INVASIVENESS

ACTA2	COL11A1	COMP	FBN1	LOXL2	NOX4	PRRX1	SUGCT
ADAM12	COL1A1	COPZ2	FN1	LRRC15	NTM	RAB31	SULF1
AEBP1	COL1A2	CRISPLD2	GLT8D2	LUM	NUAK1	RCN3	THBS2
ASPEN	COL3A1	CTSK	GREM1	MFAP5	OLFML2B	SERPINF1	THY1
BGN	COL5A1	DCN	INHBA	MMP11	PCOLCE	SFRP4	TIMP3
C1QTNF3	COL5A2	EDNRA	ITGBL1	MMP2	PDGFRB	SNAI2	TMEM158
CDH11	COL6A2	EPYC	LGALS1	MXRA5	PLAU	SPARC	TNFAIP6
COL10A1	COL6A3	FAP	LOX	NID2	POSTN	SPOCK1	VCAN

WNT

ADAM17	CUL1	FZD1	HEY1	MAML1	NOTCH4	SKP2
AXIN1	DKK1	FZD8	HEY2	MYC	NUMB	TCF7
AXIN2	DKK4	GNAI1	JAG1	NCOR2	PPARD	TP53
CCND2	DLL1	HDAC11	JAG2	NCSTN	PSEN2	WNT1
CSNK1E	DVL2	HDAC2	KAT2A	NKD1	PTCH1	WNT5B
CTNNB1	FRAT1	HDAC5	LEF1	NOTCH1	RBPJ	WNT6

ANGIOGENESIS

APOH	FGFR1	LPL	PDGFA	S100A4	TIMP1
APP	FSTL1	LRPAP1	PF4	SERPINA5	TNFRSF21
CCND2	ITGAV	LUM	PGLYRP1	SLCO2A1	VAV2
COL3A1	JAG1	MSX1	POSTN	SPP1	VCAN
COL5A2	JAG2	NRP1	PRG2	STC1	VEGFA
CXCL6	KCNJ8	OLR1	PTK2	THBD	VTN

IMMUNOSUPPRESSION

Anhang

ADIPOR1	CCR4	CD40LG	FUT4	IL10	LGALS1	PRKAA1	TNFRSF6B
ADIPOR2	CD14	CTLA4	GPR68	IL1RL1	LIF	RAF1	TNFRSF8
AHCY	CD200	CX3CR1	HLA-DRB1	IL27	LIPA	RELA	TNFSF9
ANXA1	CD200R1	ENTPD1	HLA-G	IL2RA	MIA	RPS6KB1	VCAM1
C4B	CD209	FAS	ICAM1	IL9	MTHFR	S1PR1	WT1
C4BPA	CD28	FGFR1	ICOSLG	IRAK3	MTOR	SGPL1	CD274
CAV1	CD33	FOXP3	IDO1	ITGAM	NOD2	TGFB1	IDOX
CCL2	CD4	FURIN	IFNG	KMO	NT5E	TNF	PDCD1

ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE

BCL10	CRTAM	IL12B	MALT1	TGFB1
C2	EBI3	IL18	MAP3K7	TLR8
CADM1	FOXP3	IL18BP	PTPRC	TNFSF13
CD40LG	IL10	IL27	SLA2	TRAF2
CD74	IL12A	IL4	SOCS5	TRAF6

ACTIVE IMMUNE RESPONSE

BCAR1	FYN	MALT1	SLA2
C2	IKBKG	MBL2	THY1
CD79A	KRT1	NFAM1	TRAF6
CFHR1	LAT2	PTPRC	TRAT1
			UBE2N

Danksagung

V Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei Professor Dr. med. Süleyman Ergün, Leiter des Instituts für Anatomie und Zellbiologie bedanken für die Möglichkeit diese Arbeit unter seiner Direktion durchführen zu dürfen und seine große Unterstützung während des gesamten Prozesses.

Ganz besonderer Dank gilt Dr. Erik Henke für die Bereitstellung des interessanten und abwechslungsreichen Themas sowie die allumfassende Betreuung sowohl der Labor- als auch der Schreibarbeit.

Ferner möchte ich mich auch bei den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere bei David Ascheid, Dr. Rajender Nandigama, Berin Upcin und Hla Ali bedanken, die stets motivierend und beratend zur Seite standen. Die harmonische, unterstützende und freundschaftliche Atmosphäre unserer Gruppe hat den Arbeitsalltag sehr erleichtert und meine Zeit am Institut zu einer besonderen Erfahrung gemacht.

Großer Dank gilt auch allen technischen Mitarbeitern des Instituts, die bei allen Problemen oder Fragen immer gerne weiterhalfen.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Insbesondere meinen Eltern gebührt größter Dank für immerwährende Unterstützung und Motivation auch in schwierigen Zeiten sowie die stete Hilfe bei jeglicher Problemlösung - unter anderem durch Zuhilfenahme der alten Mainbrücke.

Der letzte Dank geht an Benni - du warst immer da und hast alle Hochs und Tiefs miterlebt - und mich trotzdem nie mir selbst überlassen. Danke für alles.

