

Mechanische Stimuli als Triggerfaktoren epithelialer Tumore

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
in den Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Matthias Hofmann
aus Gründau

Frankfurt am Main 2007

(D 30)

vom Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Herr Prof. Dr. R. Wittig

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. A. Bernd

Datum der Disputation: 06. November 2007

Die vorliegende Dissertation wurde unter Betreuung von
Herrn Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn, AK Kinematische Zellforschung,

extern im Biochemischen Labor des Zentrums der Dermatologie und Venerologie
am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Bernd,

im Rahmen eines Marie Curie Fellowships der Europäischen Union
am Institut für Biomedizin der Universität Bergen, Bergen, Norwegen
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Wiig,

und im Rahmen eines JSPS Fellowships
am Zentrum der Dermatologie der Ehime Universität, Matsuyama, Japan
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Hashimoto
durchgeführt.

En d are kann sp orre mer
enn ti vise kann svare.

(norwegisches Sprichwort)

Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	i
II.	Abbildungsverzeichnis	vii
III.	Abkürzungsverzeichnis	xi
1.	Einleitung	1
1.1.	Mechanische Stimuli in Organsystemen	1
1.2.	Rolle von mechanischen Reizen bei der Tumorentwicklung	3
1.3.	Tumorinterstitieller Flüssigkeitsdruck (TIFP)	4
1.4.	Kolloidosmotischer Druck (COP)	9
1.5.	Das Xenograft-Modell	10
1.6.	Effektoren mechanischer Stimuli	13
1.6.1	Mitogen-activated protein kinases (MAPK)	13
1.6.2	Proliferationsfaktoren	16
1.7.	Arbeitshypothese	17
1.8.	Versuchsdurchführung	18
2.	Material und Methoden	20
2.1.	<i>in vitro</i> -Versuche	20
2.1.1	Zellkultur	20
2.1.1.1.	Materialien und Reagenzien	20
2.1.1.2.	Zellkultur-Medien	21
2.1.1.3.	Zelllinien	22
2.1.1.4.	Zellkulturbedingungen	23
2.1.1.5.	Passagieren der Zellen	24
2.1.2	Applikation von mechanischen Stimuli	25
2.1.3	Abarbeitung der Versuchsproben	26
2.1.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	26
2.1.5	Western Blot	28
2.1.6	Immunhistochemische Färbungen	31
2.1.6.1.	Färbung von Paraffinschnitten	31
2.1.6.2.	Färbung von Gefrierschnitten	33
2.1.7	Immunzytochemische Färbungen	34

2.1.8	Reverse Transkription	34
2.1.9	Semiquantitative PCR	35
2.1.10	Transformation von Bakterienzellen und Plasmidvermehrung	36
2.1.11	Plasmidisolierung	37
2.1.12	Transiente Transfektion von Zellen	38
2.1.13	Zusätzliche Reagenzien	38
2.2.	<i>in vivo</i>-Versuche	39
2.2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	39
2.2.1.1.	Nacktmäuse (NMRI-nu/nu)	39
2.2.1.2.	SCID-Mäuse	39
2.2.1.3.	Nacktratten (Rowett-rnu/rnu)	40
2.2.2	Anästhesie	40
2.2.2.1.	Inhalationsanästhesie	41
2.2.2.2.	Injektionsanästhesie	41
2.2.3	Tumorimplantation und Messung des Tumorwachstums	43
2.2.4	Messung des TIFP	44
2.2.4.1.	<i>Wick-in-needle</i> -Technik	44
2.2.4.2.	<i>Micropuncture</i> -Technik	45
2.2.5	Senkung des TIFP	48
2.2.5.1.	Tumorpunktion	48
2.2.5.2.	Redon-Mini-Drain	48
2.2.5.3.	Senkung des kolloidosmotischen Drucks	49
2.2.6	Intravenöse Injektionen und Intravitalmikroskopie	49
2.2.6.1.	Intravenöse Injektionen	50
2.2.6.2.	Intravitalmikroskopie	51
2.2.7	Legen von Kathetern	52
2.2.8	GE eXploreOptix-Scanner	56
2.2.9	Tötung von Versuchstieren	58
2.2.9.1.	Kriterien zur vorzeitigen Tötung der Versuchstiere	59
2.2.9.2.	Betäubungsmittelrechtliche Erlaubnis zum Einsatz von Pentobarbital-Natrium als Anästhetikum	59
3.	Ergebnisse	60
3.1.	Phosphorylierung von HSP27, Src und PKC nach Druckstimulation	60
3.1.1	Phosphorylierung von HSP27 nach mechanischer Druckbelastung	61
3.1.2	Effekt der funktionellen Inhibierung von Rho-GTPasen auf die druckinduzierte p38 Phosphorylierung	62
3.1.3	Rolle der Src-Kinase in der druckinduzierten p38 Signalkaskade	64

3.1.4	Wirkung von PP2 auf die Phosphorylierung von PKC.....	66
3.1.5	Inhibierung von PKC hemmt die druckvermittelte Phosphorylierung von p38	67
3.2.	Xenograft-Tumormodelle.....	69
3.2.1	Xenograft-Mausmodell	69
3.2.2	Xenograft-Rattenmodell (*)	71
3.3.	Morphologie von epithelialen, monozystischen Tumoren.....	72
3.3.1	Immunhistologische HE-Färbungen	72
3.3.2	Mechanische Dehnung der Tumorzellen.....	73
3.3.3	Einfluss der Punktion auf die Tumormorphologie.....	74
3.4.	Bestimmung von Tumolvolumen und tumorinterstitiellem Flüssigkeitsdruck (TIFP)	75
3.4.1	Messung des Tumolvolumens an A431 Tumoren in NMRI-Nacktmäusen	75
3.4.2	Messung des TIFP an A431 Tumoren in NMRI-Nacktmäusen.....	76
3.4.2.1.	Messung des TIFP mittels Schiötz-Tonometer	76
3.4.2.2.	Messung des TIFP mittels <i>wick-in-needle</i> -Technik.....	76
3.4.3	Verwendung weiterer Tumorentitäten (A549 und G361).....	77
3.4.3.1.	Messungen des Tumolvolumens von A431, A549 und G361 Tumoren	78
3.4.3.2.	Messungen des TIFP an A431, A549 und G361 Tumoren mittels <i>wick-in-needle</i> -Technik	79
3.4.3.3.	Cachexie bei Nacktmäusen mit G361 Tumoren	80
3.5.	TIFP triggert die Phosphorylierung von proliferationsabhängigen MAPK	81
3.5.1	TIFP induziert die Phosphorylierung von ERK1/2 in A431 und A549 Tumoren	81
3.5.2	Kein Einfluss des TIFP auf die Phosphorylierung von p38 in A431 Tumoren	83
3.6.	Permanente Senkung des TIFP	84
3.6.1	Regeneration des TIFP nach Tumorpunktion	84
3.6.2	Reduktion des TIFP über längere Zeiträume mittels Tumordrainage.....	85

3.7. Ki-67 Färbungen	87
3.7.1 Ki-67 Färbungen an unbehandelten und TIFP-reduzierten A431 Tumoren	87
3.7.2 Ki-67 Färbungen an unbehandelten und TIFP-reduzierten A549 Tumoren	88
3.7.3 Vergleich der Ki-67 Expression zwischen A431 und A549 Tumoren (Kontrolle, Punction, Drainage)	89
3.7.4 Einfluss der Tumordrainage auf die Gefäßarchitektur	91
3.8. Untersuchung der Lympharchitektur in A431 und A549 Tumoren (***)	92
3.8.1 Immunhistologische Färbungen gegen Podoplanin und CD31 an A431 und A549 Tumoren (***)	92
3.8.1.1. Immunhistologische Färbungen an Paraffinschnitten (***)	92
3.8.1.2. Immunhistologische Färbungen an Gefrierschnitten (***)	93
3.8.2 Molekularbiologische Untersuchungen zur Expression von VEGF und HIF-1 α in A431 und A549 Tumoren (***)	94
3.9. Senkung des TIFP durch erhöhten kolloidosmotischen Druck (*)	96
3.9.1 Messung des Tumolvolumens an A431 Tumoren in Rowett Nacktratten (*)	96
3.9.2 Messung des TIFP an A431 Tumoren in Rowett Nacktratten mittel <i>micropuncture</i> -Technik (*)	97
3.9.3 Bestimmung des kolloidosmotischen Druckes nach i.v. Infusion von humanem Serumalbumin (*)	98
3.9.4 Bestimmung des TIFP nach i.v. Infusion von humanem Serumalbumin (*)	99
3.10. Aufnahme von Makromolekülen in den Tumor nach Senkung des TIFP	101
3.10.1 Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Dextranen in TIFP-reduzierte Tumore	101
3.10.1.1. Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Dextranen nach Tumorpunction	101
3.10.1.2. Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Dextranen nach HSA-Infusion	104
3.10.2 Quantifizierung der Dextranaufnahme in A431 Tumoren mittels eXploreOptix-Technologie (*)(**)	107
3.10.2.1. Invasive Messung des Blutdruckes nach der Testsubstanz-Injektion (*)(**)	109

3.10.2.2. Bestimmung des TIFP nach i.v. Infusion von HSA bei NMRI-Nacktmäusen	110
3.10.2.3. Aufnahme von Alexa680-markierten Dextranen (10 kD) 30 min nach HSA-Infusion (*)(**)	111
3.10.2.4. Aufnahme von Alexa680-markierten Dextranen (10 kD) 60 min nach HSA-Infusion (*)(**)	114
3.10.2.5. Quantifizierung der Messdaten (*)(**)	116
3.10.2.6. Aufnahme von Alexa680-markiertem Cetuximab nach HSA-Infusion (*)(**)	118
4. Diskussion	120
4.1. Die Rolle von HSP27, Rho-GTPasen, Src und PKC in der druckinduzierten p38 MAPK Signalkaskade	121
4.2. Einfluss von mechanischen Stimuli auf die Tumorgenese <i>in vivo</i>	125
4.2.1 Tiermodell und Tumormorphologie.....	125
4.2.2 Messung des TIFP	127
4.2.3 Einfluss des Tumolvolumens auf den TIFP	129
4.2.4 Mechanische Stimuli als Triggerfaktoren der Tumorzellproliferation	131
4.2.5 Tumore – ein undurchlässiges Gewebe?.....	134
4.3. Einfluss der Lymphgefäße auf den TIFP am Beispiel von A431 und A549 Tumoren	134
4.4. Verbesserung der Aufnahme von Makromolekülen in Tumore durch Reduktion des TIFP	137
4.4.1 Verschiedene Ansätze zur Reduktion des TIFP.....	138
4.4.1.1. Reduktion des TIFP durch Erhöhung des COP	138
4.4.1.2. Reduktion des TIFP durch Beeinflussung der EZM.....	139
4.4.1.3. Reduktion des TIFP durch Normalisierung der Blutgefäße	140
4.4.2 Verbesserte Aufnahme von Makromolekülen in TIFP-reduzierten Tumoren.....	141
4.5. Ausblick	144
5. Zusammenfassung.....	149

6.	Literaturverzeichnis.....	151
7.	Publikationen und wissenschaftliche Vorträge	169
8.	Danksagung	172
9.	Ehrenwörtliche Erklärung	176

Gekennzeichnete Überschriften beziehen sich auf den Ort des Versuches:

(*) = Institut für Biomedizin der Universität Bergen, Bergen, Norwegen

(**) = Institut für Hämatologie der Universität Bergen, Bergen, Norwegen

(***)= Zentrum der Dermatologie der Ehime Universität, Matsuyama, Japan

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Mechanische Stimuli der Epidermis	2
Abb. 1.2: Zelluläre Reaktionen auf mechanische Stimuli.....	2
Abb. 1.3: Schematische Übersicht über einen idealisierten soliden Tumor.....	4
Abb. 1.4: Strukturelle Unterschiede zwischen normalem und Tumorgewebe.....	6
Abb. 1.5: Kräfte, die den transkapillaren Transport regulieren.....	7
Abb. 1.6: NMRI-Nacktmaus und teilrasierte SCID-Maus	11
Abb. 1.7: Normale euthymische Ratte und athymische <i>rnu/rnu</i> Ratte	12
Abb. 1.8: Induktion von MAPK und dem Transkriptionsfaktor NFκB durch mechanische Dehnung	14
Abb. 2.1: Apparatur zur Applikation von mechanischen Druckreizen	25
Abb. 2.2: Lage der subkutane Implantations- oder Injektionsstellen der Versuchstiere	43
Abb. 2.3: Schematische Darstellung des experimentellen Setup zur Messung des TIFP mittels <i>micropuncture</i> -Methode	47
Abb. 2.4: IVM an einer NMRI-Nacktmaus.....	51
Abb. 2.5: Chirurgisches Besteck	53
Abb. 2.6: Legen eines i.v. und i.a. Katheters bei einer Rowett-Nacktratte	55
Abb. 2.7: SCID-Maus auf dem beheizbaren Schlitten des GE eXploreOptix-Scanners	57
Abb. 3.1.1: Effekt der p38-spezifischen Inhibitoren SB203580 und SB202190 auf die druckinduzierte HSP27 Phosphorylierung	61
Abb. 3.1.2: Immunzytochemische Färbung gegen phospho-HSP27 in HaCaT-Zellen nach Druckstimulation oder hyperosmotischem Stress	62
Abb. 3.1.3: Phosphorylierung von p38 nach mechanischer Druckstimulation in Toxin B präinkubierten HaCaT-Zellen	63
Abb. 3.1.4.: Mechanische Druckstimulation an Rac-wt bzw. dn Rac-N17 transient transfizierten HaCaT-Zellen.....	63
Abb. 3.1.5: p38 und JNK1/2 Phosphorylierung in druckstimulierten HaCaT-, Cos7- und HEK 293-Zellen nach 4 h Präinkubation mit PP2 (20 μM)	64
Abb. 3.1.6: p38 und JNK1/2 Phosphorylierung in druckstimulierten HaCaT-Zellen nach 4 h Präinkubation mit unterschiedl. Konzentrationen von PP2	65
Abb. 3.1.7: p38 Phosphorylierung in druckstimulierten HaCaT-Zellen nach 4 h Präinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von PP1, PP2 und PP3.....	65

Abb. 3.1.8: Src, JNK1/2 und p38 Phosphorylierung in druckstim. HaCaT-Zellen nach 4 h Präinkubation mit verschied. Konzentrationen von PP2	66
Abb. 3.1.9: PKC Phosphorylierung in druckstimulierten HaCaT-Zellen nach 4 h Präinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von PP2.....	66
Abb. 3.1.10: Wirkung des PKC-Inhibitors Calphostin C auf die druckinduzierten p38 Phosphorylierung in HaCaT-Zellen	67
Abb. 3.1.11: Rolle von PKC-Isoformen in der druckinduzierten p38 Phosphorylierung	68
Abb. 3.2.1: Wachstum von subkutan inokulierten A431 Tumoren in einem Xenograft-Mausmodell	70
Abb. 3.2.2: Rowett-Nacktratte	71
Abb. 3.3.1: Querschnitte von HE-gefärbten Tumoren.....	72
Abb. 3.3.2: Querschnitt eines HE-gefärbten A431 Tumors.....	73
Abb. 3.3.3: Kortex von A431 Tumoren	73
Abb. 3.3.4: Effekt der Tumorpunktion auf die Tumormorphologie	74
Abb. 3.4.1: Zunahme des Tumolvolumens über die Zeit in A431 Tumoren.....	75
Abb. 3.4.2: Messung des TIFP mittels Schiötz-Tonometer	76
Abb. 3.4.3: Messung des TIFP in A431 Tumoren	77
Abb. 3.4.4: Vergleich der Zunahme des Tumolvolumens über die Zeit zwischen A431, A549 und G361 Tumoren.....	78
Abb. 3.4.5: Vergleich der Zunahme des Tumolvolumens über die Zeit zwischen A431 und A549 Tumoren.....	79
Abb. 3.4.6: Vergleich des TIFP zwischen A431, A549 und G361 Tumoren	80
Abb. 3.4.7: Cachexie bei NMRI-Nacktmäusen nach Inokulation mit G361 Tumoren	80
Abb. 3.5.1: Abnahme des TIFP reduziert die Phosphorylierung von ERK1/2 (1)	82
Abb. 3.5.2: Abnahme des TIFP reduziert die Phosphorylierung von ERK1/2 (2)	82
Abb. 3.5.3: Keine Phosphorylierung von p38 MAPK in A431 Tumoren.....	83
Abb. 3.6.1: Effekt der Tumorpunktion auf den TIFP.....	84
Abb. 3.6.2: Permanente TIFP-Drainage mittels Redon-Mini-Drain.....	85
Abb. 3.6.3: Reduktion des TIFP nach einfacher Tumorpunktion oder permanenter Tumordrainage	86

Abb. 3.7.1: Herabsetzung des TIFP für 24 h reduziert die Ki-67 Expression in A431-Zellen	87
Abb. 3.7.2: Herabsetzung des TIFP für 24 h reduziert die Ki-67 Expression in A549-Zellen	88
Abb. 3.7.3: Tumordrainage reduziert die Ki-67 Expression	89
Abb. 3.7.4: Graphische Übersicht der Ki-67 Expression	90
Abb. 3.7.5: Senkung des TIFP zeigt keinen Einfluss auf die Gefäßarchitektur	91
Abb. 3.8.1: Podoplaninfärbung an Paraffinschnitten	93
Abb. 3.8.2: Podoplaninfärbung an Gefrierschnitten	94
Abb. 3.8.3: VEGF-A und VEGF-C Expression in A431 und A549 Tumoren	95
Abb. 3.8.4: HIF-1 α Expression in A431 und A549 Tumoren	95
Abb. 3.9.1: Zunahme des Tumolvolumens über die Zeit in A431 Tumoren in NMRI-Nacktmäusen und Rowett-Nacktratten	97
Abb. 3.9.2: Messung des TIFP in A431 Tumoren in NMRI-Nacktmäusen und Rowett-Nacktratten	98
Abb. 3.9.3: Messung des COP in A431 Tumoren nach HSA-Infusion	99
Abb. 3.9.4: Messung des TIFP in A431 Tumoren nach HSA-Injektion	100
Abb. 3.9.5: Experimentelles Setup zur Messung des TIFP mittels <i>micropuncture</i> -Technik	100
Abb. 3.10.1: Blutgefäße im Mausohr nach Injektion von TRITC-Dextranen (40 kD)	102
Abb. 3.10.2: Aufnahme von TRITC-Dextranen nach Tumorpunktion in A431 Tumore	103
Abb. 3.10.3: Aufnahme von FITC-Dextranen nach Tumorpunktion in A549 Tumore	104
Abb. 3.10.4: Experimentelles Setup zur Messung des Blutdruckes und der HSA-Infusion	105
Abb. 3.10.5: Aufnahme von Alexa488-Dextranen nach HSA-Infusion in A431 Tumore	106
Abb. 3.10.6: Blutdruckdaten von SCID-Mäusen nach Injektion von 20% HSA, 4%HSA oder 0,9% NaCl-Lösung	109
Abb. 3.10.7: TIFP von NMRI-Mäusen nach Injektion von 20% HSA oder 0,9% NaCl-Lösung	110
Abb. 3.10.8: I.v. Injektion von Alexa680-Dextranen 30 min nach der HSA-Injektion in A431 Tumore von SCID-Mäusen	113/114
Abb. 3.10.9: I.v. Injektion von Alexa680-Dextranen 60 min nach der HSA-Injektion in A431 Tumore von SCID-Mäusen	115/116

Abb. 3.10.10: Messungen der emittierten Photonen	117
Abb. 3.10.11: I.v. Injektion von Alexa680-Cetuximab 30 min nach der HSA-Injektion in A431 Tumore von SCID-Mäusen.....	118
Abb. 4.1: Schematische Übersicht über die an der druckinduzierten Signaltransduktion beteiligten Proteine	125

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung von Trenngel/Sammelgel	27
Tab. 2: Zusammenbau des „Western Blot-Sandwiches“	29
Tab. 3: Übersicht der verwendeten Antikörper	30
Tab. 4: Gasvolumina während der Inhalationsanästhesie.....	41
Tab. 5: Übersichtsschema zum Ablauf der „Dextran-Aufnahme“-Versuche.....	111

Abkürzungsverzeichnis:

<i>A. carotis</i>	<i>Arteria carotis</i>
Abb.	Abbildung(en)
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	bovines Serumalbumin
BtMG	Betäubungsmittelgesetz
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
chirurg.	chirurgische
COP	kolloidosmotischer Druck (<i>colloid osmotic pressure</i>)
d.h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidino-2'-pheyindol-dihydrochlorid
DMBA	7,12-Dimethylbenzanthrazen
DMEM	<i>Dulbeccos modified Eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat (= desoxy-Nukleotid)
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetat</i>)
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGF-R	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
ERK1/2	extrazellulär-regulierte Kinasen 1/2 (<i>extracellular regulated kinases 1/2</i>)
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
Fa.	Firma
FAK	fokale Adhäsionskinase (<i>focal adhesion kinase</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
ff.	folgende
FKS	fötales Kälberserum
GAG	Glycosaminoglycan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GE	General Electric
Ges.	Gesellschaft
GV-Solas	Ges. für Versuchstierkunde – Soc. for Laboratory Animal Science
HaCaT	<i>human adult high calcium high temperature</i>
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung (<i>Hanks buffered salt solution</i>)
H/E	Hämatoxylin/Eosin
HEK293	humane embryonale Nierenzellen 293 (<i>human embryonic kidney cells 293</i>)

HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor-1 α (<i>hypoxia inducible factor-1α</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSA	humanes Serumalbumin
i.a.	intraarteriell
ID	innerer Durchmesser (<i>inner diameter</i>)
IFP	interstitieller Flüssigkeitsdruck (<i>interstitial fluid pressure</i>)
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IR-Lampe	Infrarot-Lampe
i.v.	intravenös
IVM	Intravital-Mikroskopie
JNK	<i>c-jun-NH₂-terminal kinase</i>
JSPS	<i>Japanese Society for the Promotion of Science</i>
Kap.	Kapitel
kD	Kilo-Dalton
Ki-67	Kiel 67
KG	Körpergewicht
LB-Medium	<i>lysogeny broth medium</i>
Lsg.	Lösung
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MAPKAPK	<i>mitogen-activated protein kinase activated protein kinase</i>
max.	maximal
MD	Mega-Dalton
MEM	minimal essential medium
MeOH	Methanol
mind.	mindestens
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MVP	mikrovaskulärer Druck (<i>microvascular pressure</i>)
NMRI	Naval Medical Research Institute
nu/nu	homozygote Nacktmaus
PAGE	Polyamidegelelektrophorese
PAK	<i>p21-activated protein kinase</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PGE ₁	Prostaglandin E ₁
physiol.	physiologisch(e)
PKC	Proteinkinase C
pDNA	Plasmid-DNA

P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
o.ä.	oder ähnliche
OD	äußerer Durchmesser (<i>outer diameter</i>)
rnu/rnu	homozygote Nacktratte (mit Restbehaarung)
rnu ^N /rnu ^N	homozygote Nacktratte (neuseeländische Subspezies, komplett enthaart)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RT-PCR	<i>reverse transkriptase polymerase chain reaction</i>
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase (<i>stress-activated protein kinase</i>)
s.c.	subkutan
SCID	<i>severe combined immunodeficiency mice</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodiumdodecylsulfat</i>)
Ser	Serin
SH	Src Homologie (<i>src homology</i>)
siRNA	kurze interferierende RNA (<i>short interfering RNA</i>)
Soc.	Gesellschaft (<i>society</i>)
Sos	<i>Son of sevenless</i>
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung + Tween20
T/E	Trypsin/EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
TierSchG	Tierschutzgesetz
TIFP	tumorinterstitieller Flüssigkeitsdruck (<i>tumour interstitial fluid pressure</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor (<i>tumour necrosis factor</i>)
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
Tyr	Tyrosin
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
verschied.	verschiedene
VEGF	vaskularer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
<i>V. jugularis</i>	<i>Vena jugularis</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i>
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZDV	Zentrum der Dermatologie und Venerologie

1. Einleitung

1.1 Mechanische Stimuli in Organsystemen

Mechanische Kräfte wirken permanent auf den Organismus. Schon in der Embryonalentwicklung kommt es während der Streckung des Embryos/Fötus zu Dehnungs- und Stauchungsprozessen. Sowohl klinische Beispiele (Applikation von *skin expandern*, Akanthose), als auch *in vitro*-Studien konnten belegen, dass fundamentale zelluläre Prozesse, wie Proliferation und Apoptose, durch mechanische Reize moduliert werden. Dies ist auf elegante Weise von Chen et al. (1997) an Kapillarendothelzellen gezeigt worden. Dehnung von Zellen scheint Prozesse zu initiieren, die das Proliferationsverhalten unterstützen. Ein Beispiel hierfür ist die durch hämodynamische Prozesse induzierte Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen (Hipper und Isenberg, 2000; Li und Xu, 2000). Die durch Hypertonie verursachte Dehnung der Gefäße und der damit verbundene Proliferationsschub wird als eine Ursache für die Entstehung von arteriosklerotischen Erkrankungen angesehen (Newby und Zaltsman, 2000). Die Kausalität zwischen Dehnung und Proliferation wirkt sich wahrscheinlich auch auf die Behandlung von Gefäßstenosen aus. Es wird diskutiert, dass die durch die Ballondilatation verursachte mechanische Dehnung der Stenose ebenfalls ein proliferatives Signal setzt, welches die häufig beobachtete Restenose begünstigt (Stula et al., 2000). Die durch Hypertonie verursachte Dehnung des Gewebes wird auch bei glomerulären Mesangialzellen als mögliche Ursache für hyperproliferative Prozesse betrachtet (Ingram et al., 2000). In Osteoblasten konnte ebenfalls eine gesteigerte Proliferation der Zellen nach mechanischer Dehnung beobachtet werden (Neidlinger-Wilke et al., 1994). Dies passt gut zu den *in vivo*-Befunden, wonach mechanische Belastung zur Zunahme an Knochenmasse und *vice versa* mechanische Entlastung, z.B. unter Schwerelosigkeit, zum Abbau von Knochenmasse führt. Demgegenüber zeigt mechanische Stauchung/mechanischer Druck am Beispiel von Keratinozyten eine differenzierungsfördernde Wirkung. So führt permanente mechanische Druckbelastung zur Synthese von hochmolekularen Keratinfilamenten und Involukrin (Goermer et al., 1990, 1993). Zudem erfolgt bei mechanischer Stauchung die Aktivierung von Signalkaskaden (p38; JNK/SAPK), die verstärkt mit Differenzierungsprozessen und zellulären Stressantworten in Verbindung gebracht werden (Hofmann et al., 2004). Abbildung 1.1 zeigt die unterschiedlichen Qualitäten von mechanischen Reizen am Beispiel der Haut.

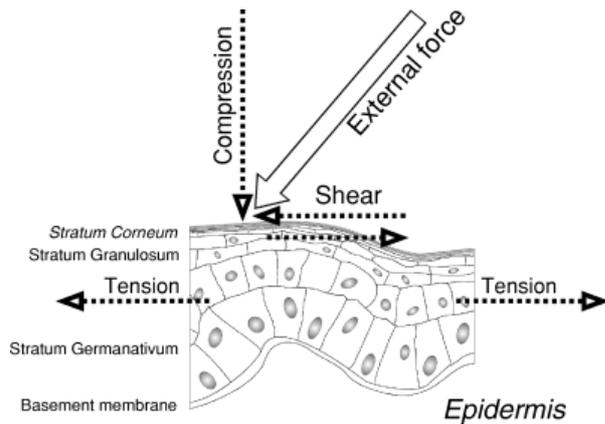


Abb. 1.1: Mechanische Stimuli der Epidermis. Mechanische Kräfte können in Form von mechanischer Dehnung (*stretch/tension/shear*) und mechanischer Stauchung (*compression*) auftreten (aus Silver et al., 2003).

Neben diesen molekularbiologischen Ergebnissen belegen vor allem klinische Daten, dass mechanischer Druck in einer Reihe von Erkrankungen, im Speziellen des Hautorgans, eine zentrale Rolle spielt. Mechanischer Druck führt zu einer Verdickung der Epidermis (Akanthose, Schwielenbildung) an Stellen länger anhaltender Druckexposition. Darüber hinaus kann mechanischer Druck als exogener Faktor zu einem Ausbruch oder einer Verschlechterung eines Krankheitsbildes führen. In der klinischen Diagnostik wird dies als Köbner-Phänomen bezeichnet und kann bei einer Vielzahl von dermatologischen Erkrankungen (*Psoriasis, Lichen ruber, Lichen sclerosus et atrophicus, Vitiligo* und *Lupus erythematoses*) beobachtet werden.

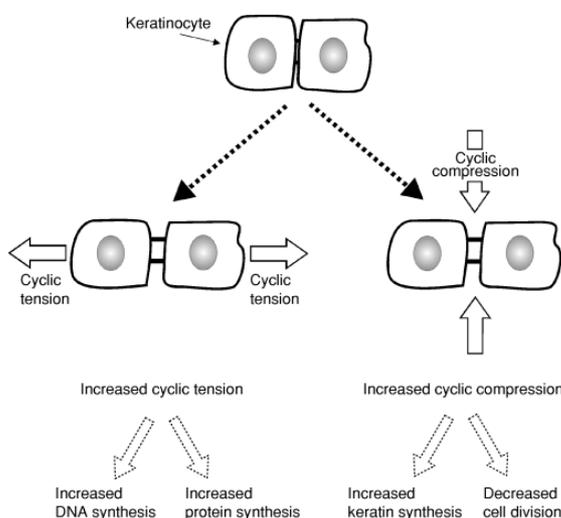


Abb. 1.2: Zelluläre Reaktionen auf mechanische Stimuli. Unterschiedliche Qualitäten von mechanischer Belastung (Dehnung, Druck) führen zu unterschiedlichen zellulären Antwortreaktionen. Am Beispiel von Keratinozyten lässt sich erkennen, dass mechanische Dehnung zu erhöhter Proliferation, mechanischer Druck zu erhöhter Differenzierung der Zellen führt (aus Silver et al., 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mechanische Dehnung offensichtlich ein universeller Stimulus ist, der in unterschiedlichen Zellsystemen die Zellproliferation unterstützt, wobei die Perzeption des Dehnungssignals durchaus verschieden sein kann. Im Gegensatz dazu fördert mechanische Stauchung die Zelldifferenzierung (Goermer et al., 1990, 1993; Hofmann et al., 2004). Die unterschiedlichen zellulären Antworten auf die mechanischen Stimuli Dehnung bzw. Stauchung sind in Abb. 1.2 dargestellt und zusammengefasst.

1.2 Rolle von mechanischen Reizen bei der Tumorentwicklung

Wie im bisherigen Abschnitt dargestellt, ist die Relevanz von mechanischen Reizen für die Physiologie und Pathophysiologie für viele Organe bereits gezeigt worden. Eine bislang relativ unbekannte Rolle spielen mechanische Stimuli jedoch in der Tumorgenese. Dies ist umso überraschender da sich eine große Zahl von Forschern weltweit mit Fragestellungen rund um die Behandlung und Bekämpfung von Krebserkrankungen beschäftigt. Sie stellen ca. 10% alle Todesfälle weltweit dar und im Jahr 2000 starben ca. 6,2 Mio. Patienten an Krebs, was einem Anstieg der Sterbefälle um 22% gegenüber dem Jahr 1990 bedeutete (Allen et al., 2005). Die Mittelzuweisungen für die Grundlagenforschung von Krebs und die Verbesserung der aktuellen Behandlungsmethoden wurden in den letzten Jahren kontinuierlich erhöht. Trotz des erhöhten Einsatzes an verbesserten Techniken, detaillierterem Wissen und verstärktem Forschereinsatz, bleibt Krebs ein Krankheitsbild mit vielen unbeantworteten und offenen Fragen (Franks und Knowles, 2005). Dabei ist der Fokus der Forschung oftmals „Modetrends“ unterworfen und richtet sich auf einzelne Themengebiete, die verstärkt gefördert werden. Andere vielleicht ebenso wichtige Ansätze geraten durch diese Politik ein wenig in das Abseits der allgemeinen Forschungsaufmerksamkeit.

Die Frage, inwieweit die mechanischen Verhältnisse im Tumor in funktionellen Zusammenhang mit der Tumorgenese stehen, ist zur Zeit wissenschaftlich unbeantwortet. Die wenigen bislang existierenden Studien zu diesem Thema belegen allerdings, dass Tumore vielfach einen erhöhten interstitiellen Flüssigkeitsdruck (IFP) aufweisen (Wiig et al., 1982; Jain, 1989, 1998; Boucher et al., 1991; Gutmann et al., 1992; Tufto und Rofstad, 1999; Heldin et al., 2004). Es gibt Überlegungen, dass diese Beobachtung weitreichende Bedeutung für die Tumortherapie und -genese hat. Bei einer medikamentösen Therapie über das Gefäßsystem ist es erforderlich, dass die Therapeutika durch die Gefäßwand in das interstitielle Kompartiment des Tumors übertreten, um dort die Tumorzellen zu schädigen; der tumorinterstitielle Flüssigkeitsdruck (TIFP) steht dem entgegen.

Neben der schlechten therapeutischen Zugänglichkeit des Tumors gibt es Anhaltspunkte dafür, dass die mechanischen Verhältnisse innerhalb des Tumors auch einen direkten Einfluss auf die Tumorgenese haben. Eine aktuelle Studie weist erstmals auf einen möglichen Zusammenhang zwischen interstitiellem Tumordruck und erhöhter Zellproliferation in humanen Osteosarkomatumoren hin (Nathan et al., 2005). Es ist somit denkbar, dass der interstitielle Hypertonus des Tumors zelluläre Effektoren regulieren kann, die das Tumorwachstum beeinflussen. Abb. 1.3 stellt in einer schematischen Übersicht die

mechanischen Verhältnisse in der äußeren Zone des Tumorgewebes eines soliden Tumors dar. Daneben wird die räumliche Unterteilung des Tumors in die drei Bereiche: nekrotisches Zentrum, seminekrotische Übergangszone und vaskularisierte, proliferierende Randzone aufgezeigt.

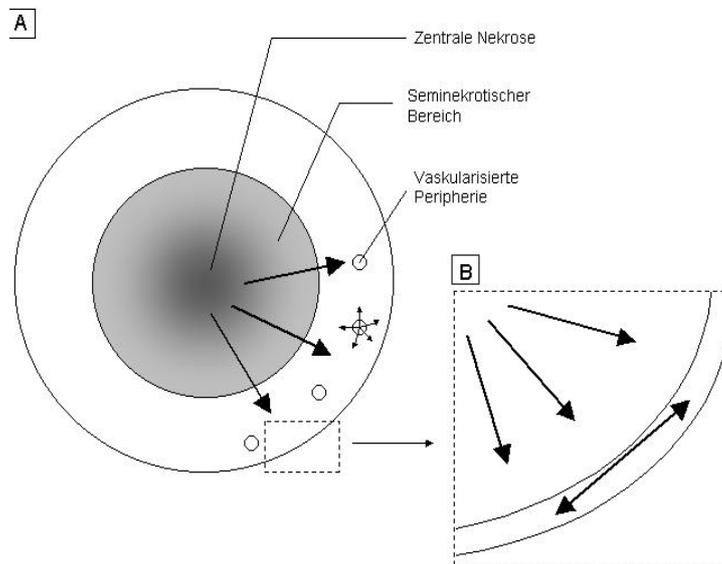


Abb. 1.3: Schematische Übersicht über einen idealisierten soliden Tumor. A) Im Inneren des Tumors liegt der zystische Bereich, in dem sich Tumorflüssigkeit und nekrotische Zellen ansammeln. In der Übergangszone zum viablen Tumorrand folgt der seminekrotische Bereich. Dort befinden sich Tumorzellen, die jedoch aufgrund unzureichender Gefäßversorgung hypoxischem Stress unterliegen. Nur die äußerste Peripherie des Tumors ist von Blutgefäßen durchzogen. In diesem Bereich sind proliferierende Tumorzellen zu finden. B) Hervorhebung des Tumorkortex, der durch den nach außen gerichteten TIFP gedehnt wird. Verändert nach Jain, 2001.

1.3 Tumorinterstitieller Flüssigkeitsdruck (TIFP)

Das Interstitium nimmt ca. 1/6 des Gesamtkörpervolumens eines Menschen ein. Die Hauptaufgabe des Interstitiums liegt in der Vermittlung des Sauerstoffaustausches, des Nährstofftransportes und der Abfallentsorgung zwischen dem Gefäßsystem und den Zellen (Heldin et al., 2004).

Bereits im Jahre 1950 beschrieben Young et al., dass der hydrostatische Druck innerhalb des Interstitiums von Tumoren stark erhöht ist. Erst 37 Jahre später wurde das Thema erneut aufgegriffen und die Hypothese aufgestellt, dass der innerhalb von Tumoren erhöhte interstitielle Flüssigkeitsdruck (IFP) eine Barriere für den effizienten Transport von Therapeutika in den Tumor darstellt (Jain, 1987A, 1987B). In normalem Gewebe liegt der interstitielle Flüssigkeitsdruck bei 0 bis -2 mmHg. In soliden Tumoren ist der Flüssigkeitsdruck jedoch um ein Vielfaches höher und kann sogar Werte bis zu 40 mmHg erreichen (Tufto und Rofstad, 1999). Gezeigt wurde der erhöhte TIFP bereits für eine Vielzahl von unterschiedlichen Tumoren: Mammakarzinome (Nathanson und Nelson, 1994),

Vulvakarzinome (Hofmann et al., 2006, 2007), Lungenkarzinome (Hofmann et al., 2007), metastasierende Melanome (Boucher et al., 1991; Curti et al., 1993), Plattenepithelkarzinome des Hals-, Nasen-, Rachenraumes (Gutmann et al., 1992) und bei Dickdarmkarzinomen (Less et al., 1992). Innerhalb des Tumors hat der TIFP an allen Stellen den gleichen Wert, fällt jedoch zur Peripherie hin sehr stark ab (Boucher et al., 1990).

Die Ursache für das Entstehen der Tumorhypertonie ist durch die Tumorarchitektur begründet. Aufgrund der intensiven und chaotisch organisierten Vaskularisierung des Tumors entsteht eine räumliche und funktionelle Heterogenität innerhalb des Tumorgewebes. Zusätzlich zeigen die tumorversorgenden Gefäße eine stärkere Permeabilität auf (Roberts und Palade, 1997; Hobbs et al., 1998; Hashizume et al., 2000). Eine mögliche Ursache für die hohe Durchlässigkeit von Blutgefäßen in Tumoren könnte in der erhöhten VEGF Produktion der Tumorzellen liegen, wodurch die Permeabilität der tumor-durchziehenden Gefäße erhöht wird (Dvorak et al., 1995). Diese Durchlässigkeit führt zu einem verstärkten Ausstrom von Proteinen aus den Gefäßen in das Interstitium des Tumors und oft zu einer Erhöhung des kolloidosmotischen Druckes (*colloid osmotic pressure*, COP; Abb. 1.5). Der Anstieg des COP wie auch des TIFP wird zudem dadurch gefördert, dass in Tumoren keine Lymphgefäße vorliegen oder ihre Drainagefunktion stark eingeschränkt ist (Alitalo und Carmeliet, 2002; Padera et al., 2002). In Kombination mit der mangelnden lymphatischen Drainage ergibt sich somit ein interstitieller Hypertonus im Tumorgewebe, der (A) dem Übertritt von Makromolekülen aus dem Gefäßsystem in den Tumor entgegen wirkt, und (B) zu einem „Auspressen“ von interstitieller Tumorflüssigkeit in das umgebende Gewebe führt (Jain, 1987B; Carmeliet und Jain, 2000). Beide Prozesse verhindern so das Anreichern von therapeutisch relevanten Substanzen im Tumorgewebe. Erste experimentelle Ergebnisse die auf eine Korrelation zwischen erhöhtem TIFP und der verschlechterten Aufnahmefähigkeit von Therapeutika hinweisen, konnte Salnikov et al. (2003) an *in vivo*-Experimenten belegen. Die Versuche zeigten, dass durch die Reduktion des TIFP mittels PGE₁-Methylester die Aufnahme des Zytostatikums 5-Fluorouracil in den Tumor verbessert wird und es zur Retardierung des Tumorwachstums kommt.

Darüber hinaus scheint auch die erhöhte Kontraktilität der Fibroblasten des Tumorstroma eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung des erhöhten TIFP zu bilden (Heldin et al., 2004). Eine Übersicht über die zur Zeit in der Literatur diskutierten Ursachen für den TIFP zeigt folgende Abbildung 1.4

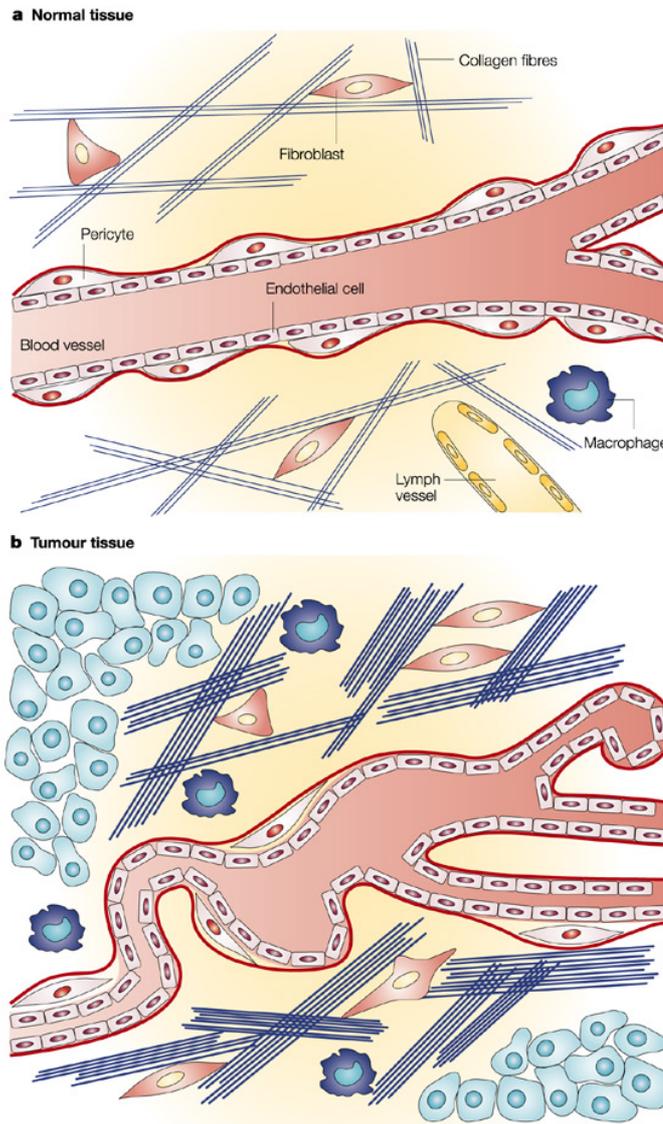


Abb. 1.4: Strukturelle Unterschiede zwischen normalem und Tumorgewebe

A) Normales Gewebe weist reguläre Blutgefäße auf, die von Perizyten umgeben sind. Das Gewebe wird von Lymphgefäßen durchzogen.

B) Das Tumorgewebe ist durch ein irreguläres, chaotisches vaskuläres System gekennzeichnet. Die Gefäße sind durchlässig, da sie nur von wenigen Perizyten umgeben sind. Der Blutfluss wird durch Auswölbungen und blind endende Gefäße ineffizient. Das Fehlen von Lymphgefäßen verhindert die Drainage des Tumorinterstitiums. Ein stark verdichtetes Kollagen-Netzwerk erhöht die Rigidität der EZM des Tumors (aus Heldin et al., 2004).

Die meisten Therapeutika in der Krebsbehandlung, speziell Substanzen mit hohem Molekulargewicht (z.B. monoklonale Antikörper wie Cetuximab, u.a.), gelangen mittels konvektionellem Transport aus dem vaskulären System durch das Interstitium zu den Zellen. Diffusionaler Transport spielt bei großen Molekülen nur eine sehr geringe Rolle, im Gegensatz dazu erfolgt die Versorgung der Zellen mit kleinen Molekülen (z.B. O_2 , Glukose, u.a.) hauptsächlich durch Diffusion (Swabb et al., 1974; Baxter und Jain, 1989). Diffusion und Konvektion unterscheiden sich durch die Art des Transportes der Substanzen. Im diffusionalen Transport werden die Moleküle von einem Ort hoher Konzentration zu einem Ort geringer Konzentration transportiert, wobei die Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit in der sich die Moleküle befinden nur eine geringe Rolle spielt. Erfolgt der Transport von Molekülen jedoch mittels Konvektion, so ist die Strömungsgeschwindigkeit der übertragenden Flüssigkeit von entscheidender Bedeutung. Eine geringe Strömungs-

geschwindigkeit bedeutet gleichzeitig einen geringen Eintransport von Molekülen zu einem Zielort (Rippe und Haraldson, 1994). Die Kräfte, die den netto Filtrationsdruck über eine kapillare Wand beschreiben, sind unter dem Namen „*Starling's Forces*“ beschrieben (Aukland und Reed, 1993). Dabei handelt es sich um den hydrostatischen und kolloid-osmotischen Druck der Kapillaren bzw. des Interstitium. Die physikalische Bedeutung der „*Starling's Forces*“ auf die transkapillaren Flüssigkeitsströmung J_v sind von E.H. Starling in der „*Starling Equation*“ zusammengefasst worden:

$$J_v = L_p S [(P_{cap} - P_{if}) - \sigma(\Pi_p - \Pi_{if})] = L_p S \Delta P \quad (\text{Starling, 1896})$$

L_p beschreibt die hydraulische Konduktivität der Kapillarmembran, und S die Größe der Membranoberfläche, die für den Austausch zur Verfügung steht. ΔP ist die Druckdifferenz, die sich aus $[(P_{cap} - P_{if}) - \sigma(\Pi_p - \Pi_{if})]$ ergibt. P_{cap} und P_{if} sind die hydrostatischen Drücke in der Kapillare bzw. im Interstitium, während Π_p und Π_{if} die Werte des kolloidosmotischen Drucks im Plasma bzw. im Interstitium darstellen. σ ist der kapillare Reflektionskoeffizient für Plasmaproteine. Ein Koeffizient von 1 bedeutet die Kapillarmembran ist impermeabel für Proteine, ein Wert von 0 bedeutet, die Membran ist vollständig permeabel (Heldin et al, 2004; Nedrebø, 2004; Iversen, 2005).

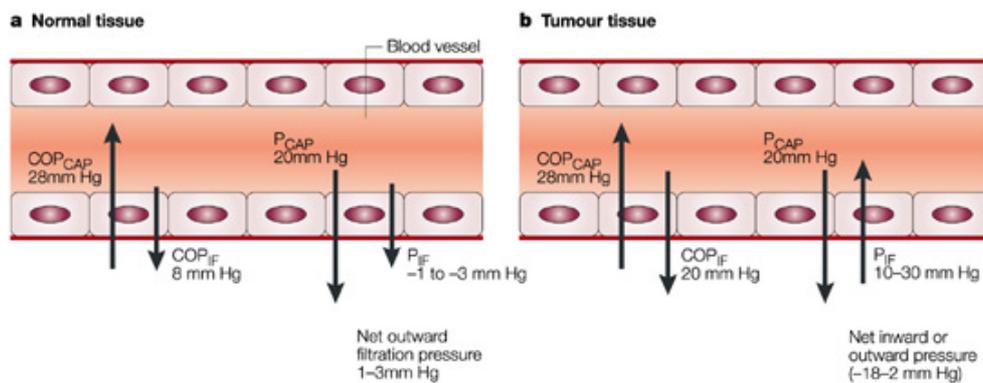


Abb. 1.5: Kräfte, die den transkapillaren Transport regulieren. Die Abbildung zeigt die hydrostatischen und kolloidosmotischen Drücke in Kapillaren (P_{CAP} und COP_{CAP}) und im umgebenden Interstitium (P_{IF} und COP_{IF}) in normalem und Tumorgewebe (aus Heldin et al., 2004).

In der vorherigen Abbildung 1.5 sind die Werte für P_{cap} , P_{if} , Π_p und Π_{if} für normales Gewebe und Tumorgewebe angegeben. Setzt man diese Werte in die „*Starling Equation*“ ein, lässt sich die transkapillare Flüssigkeitsströmung/Filtrationsrate berechnen. In normalem Gewebe liegt generell eine aus den Kapillaren in das Interstitium gerichtete Flüssigkeitsströmung vor. Der Filtrationsdruck liegt zumeist zwischen 1-3 mmHg. Eine solche Flüssigkeitsströmung

begünstigt den Transport von großen Molekülen aus dem Gefäßsystem durch das Interstitium zu den Zellen (Chary und Jain, 1989).

Betrachtet man die Werte für das Tumorgewebe, so stellt man fest, dass sich der hydrostatische Druck und der COP der Kapillaren nicht von jenen in normalem Gewebe unterscheiden. Der COP im Tumor liegt jedoch höher als jener von normalem Gewebe. Eine noch größere Differenz zeigt sich zwischen normalem und Tumorgewebe, sobald man die jeweiligen Messwerte für den hydrostatischen Druck betrachtet. Liegt der P_{if} im normalen Gewebe zwischen 0 und -2 mmHg, so erreicht der P_{if} im Tumorgewebe Werte von 5-40 mmHg. Dies bedeutet, dass der Wert für J_v negativ werden kann. Im physiologischen System bedeutet dies, dass die Flüssigkeitsströmung aus dem Tumor heraus in Richtung Kapillarsystem verläuft. Unter solchen physikalischen Voraussetzungen ist der Eintransport von Therapeutika in den Tumor mittels konvektionellem Transport nur sehr begrenzt bzw. überhaupt nicht möglich. Eine Senkung des TIFP könnte somit zu einer verbesserten Aufnahmefähigkeit des Tumors für Makromoleküle führen.

Eine Anzahl von Studien konnte zeigen, dass eine Beeinflussung des TIFP möglich ist und z.T. auch zu einer erhöhten Aufnahme von Makromolekülen führt. Zu den getesteten Substanzen, welche eine Senkung des TIFP induzieren, gehören VEGF- bzw. PDGF-Antagonisten. Eine Behandlung mit VEGF-Inhibitoren führt zu einer Normalisierung des tumorversorgenden vaskulären Systems, und die Durchlässigkeit der Gefäße wird stark verringert (Willett et al., 2004). Die Wirkung von PDGF-Inhibitoren richtet sich gegen die starke Kontraktion der Fibroblasten des Tumorstromas wie auch deren Interaktion mit der EZM (Pietras et al., 2002; Baranowska-Kortylewicz et al., 2005). Eine den PDGF-Antagonisten ähnliche Wirkung zeigt die Injektion von PGE_1 im Bereich des Tumors. Sie führt ebenfalls zu einer verringerten Kontraktilität der stromalen Fibroblasten, die den Tumor umgeben. Dadurch wird die Rigidität des Tumorstroma reduziert und es kommt zu einer Erniedrigung des TIFP (Salnikov et al., 2003). I.p. Injektionen von Nicotinamid zeigten durch die induzierte Reduzierung des mikrovaskulären Blutdruckes in den Kapillargefäßen eine TIFP-senkende Wirkung in Tiermodellen (Lee et al., 1992).

1.4 Kolloidosmotischer Druck (COP)

Den Anteil des osmotischen Drucks, der durch Proteine hervorgerufen wird, bezeichnet man als kolloidosmotischen oder onkotischen Druck. Obwohl er wegen der geringen molekularen Konzentration der Proteine nur relativ klein ist, spielt er für die Flüssigkeitsverteilung im Organismus eine große Rolle, da die Proteine nicht einfach durch die Gefäßwand diffundieren können. In den Blutgefäßen ist der Proteingehalt höher als in der interstitiellen Flüssigkeit. Wie aus Abb. 1.5 zu ersehen ist, beträgt der COP innerhalb der Blutgefäße ca. 28 mmHg im Vergleich zu 8 mmHg im Interstitium. So wird also ein hoher Flüssigkeitsverlust aus den Gefäßen verhindert, indem der hohe COP die Flüssigkeit im Gefäßsystem hält. Die Höhe des COP wird primär durch die Albuminkonzentration im Plasma bestimmt. Daneben sind Globuline und Fibrinogen kolloid-osmotisch wirksame Bestandteile des Plasmas (Ahlqvist, 2004). Bei einem Durchschnittswert des humanen COP von 28 mmHg entfallen ca. 21,8 mmHg einzig auf den partiellen COP, der durch Albumine erzeugt wird (Roberts und Bratton, 1998). Sinkt die Proteinkonzentration im Plasma, so tritt vermehrt Wasser aus dem Gefäßsystem in den interstitiellen Raum.

Die Verwendung von Volumenexpandern ist im klinischen Alltag zumeist auf Anwendungen beschränkt, die dazu dienen den Flüssigkeitsverlust des Körpers nach Brandverletzungen, Schädigungen der Gefäße oder einer Sepsis zu reduzieren. Der Einsatz von kolloidosmotisch aktiven Substanzen bindet das Wasser in den Gefäßen und führt zudem zu einer Volumenzunahme aufgrund der zusätzlich in die Gefäße einströmenden Gewebsflüssigkeit (Berg et al., 2002). Im klinischen Alltag wird in der Regel eine der folgenden vier Substanzen (Albumine, Dextrane, Hydroxyethylstärke oder Gelatine) eingesetzt, um den COP zu beeinflussen (Roberts und Bratton, 1998). Routinemäßig findet humanes Serumalbumin (HSA) als Volumenexpander in der Klinik Anwendung. Im Gegensatz zu den anderen Substanzen liegt Albumin in einer monodispersen Lösung vor. Das Protein ist mit einem Molekulargewicht von 69 kD im Vergleich zu den anderen Plasmaproteinen Globulin und Fibrinogen relativ klein. Aus diesem Grund ist seine kolloidosmotische Wirkung stärker als die von Globulinen, denn in einer Lösung mit 1 g Albumin befinden sich viel mehr Moleküle im Vergleich zu einer Lösung mit 1 g an Globulinen. Die große Menge an Albumin-Molekülen induziert dadurch auch einen höheren COP als die Globulinlösung. Der Volumeneffekt nach der Injektion von Albumin hängt von der Konzentration und dem injizierten Gesamtvolumen des Albumins ab. Die Gabe von 5%iger Albuminlösung (COP = 19 mmHg) führt zu einer Zunahme des intravaskulären Flüssigkeitsvolumen um das Volumen der injizierten Lösung. Im Gegensatz dazu kommt es nach der Gabe einer 25%igen

Albuminlösung (COP = 100 mmHg) zu einer Erhöhung des intravaskulären Volumens um den Faktor 2,5-3, d.h. die Injektion von 5 ml Albumin induziert einen Anstieg des intravaskulären Volumens um 15-25 ml (Roberts und Bratton, 1998).

Neben Albumin werden Dextrane als Volumenexpander eingesetzt. Sie sind Glukosepolymere unterschiedlicher Längen und können in verschiedenen Molekulargewichten eingesetzt werden. Im Vergleich zu Albuminen ist ihr Einsatz finanziell günstiger, jedoch besteht das Risiko von allergischen Reaktionen bis hin zu anaphylaktischen Schocks nach der Gabe von (speziell hochmolekularen) Dextranen (Roberts und Bratton, 1998). Hydroxyethylstärke sowie Gelatine sind weitere Plasmaexpander, die jedoch eine geringere Bedeutung in der klinischen Praxis besitzen.

1.5 Das Xenograft-Modell

Die ersten Berichte über die Verwendung von Mäusen in der biomedizinischen Forschung stammen aus dem 17. Jahrhundert. Seit dieser Zeit hat die Bedeutung der Maus in der biomedizinischen Forschung sehr stark und kontinuierlich zugenommen. Über 90% aller in der Forschung stattfindenden Tierversuche werden heute an Mäusen durchgeführt (Malakoff, 2000). Ihren ersten Einsatz in der onkologischen Forschung fanden Mäuse in den 20er Jahren des vorigen Jahrhunderts. Hierbei wurden spezielle Mäusestämme eingesetzt, die eine besonders hohe Inzidenz für die spontane Entstehung von Tumoren (z.B. *Bagg Albino* für Lungen- und Mammatumore bzw. *Strain 129* für Hodentumore) hatten. Zeitgleich wurden auch erste Versuche mit Mäusen durchgeführt, deren Tumore durch die Behandlung mit Chemikalien induziert wurden (Malakoff, 2000). Eine auch heute noch sehr häufig eingesetzte Chemikalie zur Induktion von Mammakarzinomen ist Dimethylbezanthracen (DMBA). Der entscheidende Durchbruch in der onkologischen Forschung gelang jedoch erst Anfang der siebziger Jahre durch den Einsatz von immunsupprimierten Nacktmäusen und aufgrund der Möglichkeit, diesen Mäusen humane Tumorzelllinien zu transplantieren bzw. zu injizieren (Povlsen und Rygaard, 1971). Zuvor wurden humane Tumore auf künstlich immunsupprimierte Tiere (Mäuse, Ratten) mit nur mäßigem Erfolg transplantiert. Die künstliche Immunsupprimierung erfolgte zumeist durch subletale Bestrahlungen (Greiner, 2004).

Bereits im Jahre 1961 entstanden infolge einer Spontanmutation innerhalb eines Albinostammes (NMRI) thymusaplastische, unbehaarte Mäuse. Die Mutation unterliegt

einem autosomal-rezessiven Erbgang, denn nur homozygote Tiere tragen das Allel und weisen Thymusaplasie wie auch Haarlosigkeit auf. Haarlosigkeit und Thymusaplasie sind bei dieser Mausmutante untrennbar miteinander verbundene Eigenschaften (Panterlouris, 1968). Fortlaufende Untersuchungen in den nachfolgenden Jahren zeigten, dass sich diese Tiere für heterologe Transplantationen eignen. Sie bilden zwar B-Lymphozyten, jedoch können aufgrund der Thymusaplasie keine reifen und funktionellen T-Lymphozyten gebildet werden (Sprent, 1971). Die Nacktmaus eignet sich daher als idealer Wirt für xenografte Transplantate, d.h. humane Gewebeproben oder Tumore können transplantiert werden, ohne dass mit immunologischen Komplikationen bzw. Abstoßungsreaktionen der Transplantate gerechnet werden muss. Zudem erleichtert die Haarlosigkeit der Tiere das Beobachten und Vermessen des Tumors. Die subkutan wachsenden Tumore sind bereits in frühen Entwicklungsstadien sehr gut unter der Haut des Tieres zu erkennen.

Heute gibt es neben den NMRI- und Balb/c-Nacktmäusen noch weitere Arten von immunsupprimierten Mäusen. SCID-Mäuse sind nicht haarlos, finden jedoch häufige Verwendung in der Forschung, da sie durch das Fehlen von B- und T-Lymphozyten eine noch stärkere Immunsupprimierung aufweisen. Aus diesem Grund ist die Metastasierungskapazität von Tumoren in SCID-Mäusen im Vergleich zu Nacktmäusen erhöht (Xie et al., 1992). Daneben gibt es heute auch eine Vielzahl von neugezüchteten Nacktmaus-Subspezies, die z.B. eine starke Verminderung an NK-Zellen (*low-NK beige nude mice*) bzw. die über keine B- und T-Zellen verfügen und zudem noch eine starke Reduktion an NK-Zellen (*triple mutant nude-beige-xid mice*) aufweisen (Xie et al., 1992). Nachfolgende Abbildung 1.6 zeigt das Bild einer NMRI-Nacktmaus sowie das einer teilrasierten SCID-Maus.



Abb. 1.6: NMRI-Nacktmaus und teilrasierte SCID-Maus (mit s.c. A431 Tumoren)

Neben Nacktmäusen finden in der onkologischen Forschung auch Versuche an Rowett-Nacktratten statt. Diese Tiere wurden erstmals 1953 in einer Rattenkolonie des Rowett Research Institutes in Aberdeen beschrieben. Zur damaligen Zeit war noch nichts über die

immunologische Bedeutung des Thymus bekannt und die schwere Immundefizienz der Tiere wurde zunächst nicht erkannt (Schuurmann et al., 1992). Das wiederholte Auftreten der Mutation in derselben Auszuchtcolonie im Jahre 1977 ließ vermuten, dass die Mutation in der Kolonie autosomal rezessiv vererbt wurde (May et al., 1977; Festing et al., 1978). Diese Mutation wird mit dem Kürzel *rnu* beschrieben. Eine zweite thymusaplastische Rattenlinie wurde nur wenig später in Wellington in Neuseeland entdeckt (Berridge et al., 1979). Um die leicht unterschiedliche Mutation dieser Tiere von der schottischen Ratte zu unterscheiden wurde sie mit *rnu^N* abgekürzt. Das Erscheinungsbild der thymusaplastischen neuseeländischen Ratten ähnelt dem der Nacktmäuse. Neben dem vollständigen Fehlen von T-Lymphozyten, weisen diese Tiere (*rnu^N/rnu^N*) Haarlosigkeit auf. Im Unterschied dazu haben die schottischen *rnu/rnu* Ratten eine Behaarung mit sehr dünnen und kurzen Haaren (Abb. 1.7; Vos et al., 1980).

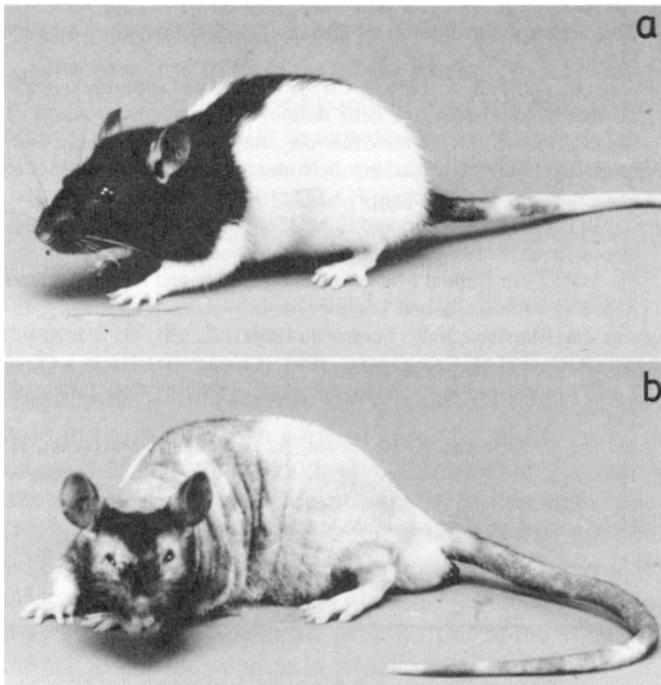


Abb. 1.7: Normale euthymische Ratte (a), und athymische *rnu/rnu* Ratte (b). Abbildung modifiziert nach Schuurmann et al., 1992

Ein erwähnenswerter Faktor ist die sehr stark reduzierte Invasivität der Tumore in den Xenograft-Modellen (Sharkey und Fogh, 1979). Die meisten systemischen Metastasen, die in solchen Modellen auftreten, sind artifiziellen Ursprungs, z.B. durch i.v. Injektionen von Tumorzellen (Hanna et al., 1982). Dies bedeutet, dass die Beobachtung und Erforschung von metastasierenden Tumoren auch in einem Xenograft-Modell nicht *in generalis* funktioniert. Die meisten bisherigen Metastasierungsmodelle arbeiten daher mit i.v. injizierten Tumorzellen. Allerdings stellen diese Modelle nur die Vorgänge der Metastasierung dar, die nach dem Übertritt der metastasierenden Tumorzellen in die Blutgefäße erfolgen. Die Lösung

der Tumorzellen aus dem Tumorverband und der Übertritt in das vaskuläre System lässt sich damit nicht hinreichend untersuchen. Ein Vorteil der ausbleibenden Metastasierung im Xenograft-Modell ist allerdings, dass das Tumorwachstum über einen relativ langen Zeitraum verfolgt werden kann, und die Tiere nicht durch Tumormetastasen zusätzlich geschwächt werden.

1.6 Effektoren mechanischer Stimuli

1.6.1 Mitogen-activated protein kinases (MAPK)

Zahlreiche Arbeiten deuten darauf hin, dass mechanische Stimuli zu einer Aktivierung der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Familie führen. Die MAPK-Proteinfamilie setzt sich aus unterschiedlichen Threonin-Tyrosin-Proteinkinasen zusammen, die sowohl proliferative als auch stress-assoziierte Signalwege aktivieren können. Die MAPK Signalkaskaden sind über die Evolution konserviert und ubiquitär in allen eukaryotischen Lebensformen nachzuweisen (Schaefer und Weber, 1999). Zu den am besten charakterisierten MAPK gehören die *extracellular signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2) und die *stress-activated protein kinase/c-JUN NH2-terminal kinase* (SAPK/JNK) (Boulton et al., 1990, 1991; Kyriakis et al., 1994). Daneben spielen in der Übertragung von stress-induzierten Signalen zwei weitere MAPK Familien a) p38/HOG1 und b) ERK5/BMK eine essentielle Rolle (Han et al., 1994; Cobb und Goldsmith, 1995).

MAPK unterscheiden sich sowohl in den extrazellulären Stimuli, die zur Aktivierung der Signalkaskaden führen, als auch in der Zellantwort auf ihre Aktivierung. Die Aktivierung von ERK1/2 und JNK kann durch Integrine (sowohl β_1 als β_4) erfolgen (Abb. 1.8; Dans et al. 2001; Faraldo et al. 2001). Weiter ist eine Aktivierung von MAPK auch über die Liganden-induzierte Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) möglich (Abb. 1.8; Peraldi et al., 1993). Besonders interessant in dem hier diskutierten Zusammenhang ist die Kooperation von Integrinen mit RTK, die möglicherweise zu einer Integrin-medierten Transaktivierung von RTK führt (Moro et al., 1998).

Alternativ zu diesem Mechanismus deuten neue Befunde darauf hin, dass Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) EGF-ähnliche Epitope präsentieren, die vom EGF-Rezeptor (EGF-R) gebunden werden können und so zu einer EGF-R abhängigen Signaltransduktion

führen (Swindle et al., 2001). Stressfaktoren und inflammatorische Zytokine weisen hingegen nur einen geringen Effekt auf die ERK1/2 Aktivierung auf (Whitmarsh et al., 1995; Xia et al., 1995). Im Gegensatz dazu werden JNK und p38 MAPK vor allem durch externe Stressfaktoren wie Hyperosmolarität, Hitzestress, UV-Bestrahlung, Chemikalien sowie interne inflammatorische Prozesse (Ausschüttung von Cytokinen) und den *Tumor necrosis factor* (TNF) aktiviert (Raingeaud et al., 1996; Canman und Kastan, 1996).

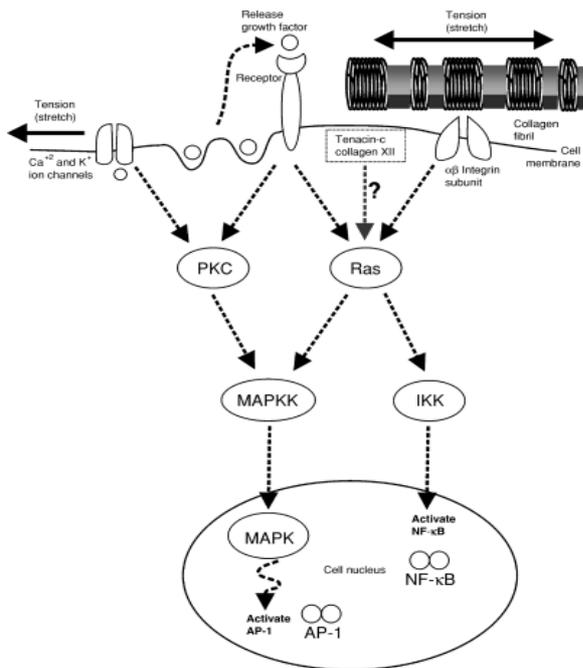


Abb.1.8: Induktion von MAPK und dem Transkriptionsfaktor NFκB durch mechanische Dehnung. Verschiedene Signaltransduktionswege sind in der Vermittlung der mechanischen Stimuli involviert. Die mechanische Dehnung der extrazellulären Matrix kann z.B. Integrine aktivieren, welche ihrerseits über die GTPase Ras die MAPK Signalkaskade aktiviert. Ein weiterer Weg zur Aktivierung der MAPK führt über die Proteinkinase C nach mechanisch induzierter Öffnung von Ionenkanälen bzw. der Aktivierung von RTKs (aus Silver et al., 2003).

Die zentrale Bedeutung von MAPK bei mechanisch induzierten Vorgängen ist u.a. für Herzfibroblasten, Endothelzellen sowie Skelett- und Herzmuskelzellen belegt (Li et al., 1996; Aronson et al., 1997A/B; Mackenna et al., 1998; Seko et al., 1999). Die Aktivierbarkeit der Kinasen sowie die Reaktionskinetik kann zwischen den Zellspezies erheblich variieren. Trotz dieser Unterschiede kann im simplifizierten Modell angenommen werden, dass die mechanisch induzierte Integrinaktivierung zur Autophosphorylierung der *focal adhesion kinase* (FAK) am Tyrosin 397 führt. Dadurch entsteht eine SH2-Domäne, welche die Bindung zu Src vermittelt. Es kommt zur Phosphorylierung von FAK am Tyrosin 925 und zur Entstehung einer weiteren SH2 Domäne, die eine Bindung mit dem Adaptorprotein GRB2 ermöglicht. GRB2 aktiviert Ras über das rasGDP/GTP Austauschprotein SOS. Aktiviertes Ras kann über nachgeschaltete Kinasekaskaden die MAPK ERK1/2 und SAPK/JNK aktivieren. Obwohl über die Signalkaskade zwischen Integrinen und MAPK viele Einzelheiten bereits geklärt sind, ergeben sich immer wieder Abweichungen von bestehenden Erfahrungen (Chen et al., 1996; Lin et al., 1997).

Innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurde die MAPK Signaltransduktionskette am Hautorgan nach mechanischer Dehnung an epidermalen Keratinozyten, Melanozyten bzw. epidermalen A431-Tumorzellen untersucht. Mit Hilfe von *in vitro*-Kinase-Assays konnte gezeigt werden, dass mechanische Dehnung zu einer differentiellen Aktivierung von ERK1/2 und SAPK/JNK führt (Kippenberger et al., 2000A/B). Darüber hinaus konnte der Nachweis erbracht werden, dass Oberflächenrezeptoren aus der Integrinfamilie an der dehnungsinduzierten Signaltransduktion in Keratinozyten beteiligt sind. Diese experimentellen Daten untermauern die Ergebnisse anderer Gruppen, die in zahlreiche Untersuchungen – vor allem an vaskulären Endothelzellen und Fibroblasten – Hinweise finden konnten, dass Oberflächenrezeptoren aus der Integrinfamilie als mögliche Mechanotransduktoren fungieren (Chen et al., 1997; Maniotis et al., 1997; Glogauer et al., 1998; Chen et al., 1999).

Es konnte demonstriert werden, dass mechanischer Zug bei *in vitro* kultivierten Epithelzellen zu einer starken Induktion von PKB/Akt mit gleichzeitiger Suppression von Apoptosemarkern (Caspase 8 u. 3) führt (Kippenberger et al., 2005B). Diese Ergebnisse legen einen Zusammenhang zwischen mechanischer Dehnung und der Hemmung von Apoptose nahe. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, wonach Dehnung nicht nur zur Proliferation beiträgt, sondern *vice versa* auch vor Apoptose schützt.

In einem weiteren Modell, wurde mechanische Dehnung der Zellmembran durch hypoosmolaren Stress ausgelöst (Kippenberger et al., 2005A). Hierbei konnte die Induktion von E-Cadherin, einem Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, gezeigt werden. Der physiologische Bezug könnte in einer Stabilisierung des Gewebsverbands unter mechanischer Dehnung gegeben sein. Auch hier konnte die Relevanz von Signalproteinen aus der MAPK-Familie nachgewiesen werden; eine Blockierung von p38 führte zu einer erniedrigten E-Cadherin-Induktion nach hypoosmotischem Stress.

Unter Verwendung einer mechanischen Druckapparatur konnte gezeigt werden, dass die mechanische Druckstimulation von epithelialen Zellen zu einer differentiellen Aktivierung der MAPK Signalkaskade führt. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Dehnungsexperimenten konnte nach der Applikation von mechanischen Druckstimuli eine funktionelle Aktivierung des p38 MAPK Signaltransduktionsweges unter Beteiligung der Src-Kinase und Protein Kinase C nachgewiesen werden (Hofmann et al., 2004).

1.6.2 Proliferationsfaktoren

Mechanische Stimuli können auch zu einer verstärkten Expression von zellulären Proliferationsfaktoren wie Ki-67 oder *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) führen. Die proliferationsfördernde Eigenschaft von mechanischen Dehnungsreizen lässt sich somit auch über das Expressionsverhalten von Proliferationsfaktoren überprüfen. Ki-67 ist ein zellzyklusabhängiges Protein, das nur in proliferierenden Zellen nachweisbar ist (Scholzen und Gerdes, 2000). PCNA ist wie Ki-67 ein zellzyklusabhängiges Protein (Zykluslin) und Co-Faktor der DNA-Polymerase δ . In Zellen, die sich in der G_0 -Phase befinden lassen sich diese Antigene nicht nachweisen. Über die funktionelle Rolle des Ki-67 Protein gibt es bislang nur sehr wenige Daten. Es liegt jedoch nahe, dass Ki-67 eine wichtige Rolle im Zellzyklus spielen dürfte. Darauf deuten die wenigen zu diesem Thema vorliegenden Studien hin. So konnte gezeigt werden, dass die Blockierung von Ki-67 durch spezifische Antikörper zu einer stark verminderten und verlangsamten Zellteilung der betroffenen Zellen führt (Starborg et al., 1996). Proliferationsmarker wie Ki-67 können in allen aktiven Phasen des Zellzyklus nachgewiesen werden. Diese Tatsache hat dazu geführt, dass sie einen hohen Stellenwert in der Tumordiagnostik bekommen haben (Gerdes et al., 1983, 1984). Immunhistochemische Färbungen gegen Proliferationsmarker sind schnell und relativ einfach an Gewebeproben von Tumorpatienten durchzuführen. Im Laufe der Jahre hat sich der Einsatz von diesen Markersubstanzen zum Standard in der Tumorthherapie entwickelt (Scholzen und Gerdes, 2000). In den letzten Jahren ist der Einsatz von PCNA in der Tumordiagnostik allerdings zugunsten des Ki-67 Antikörpers stark zurückgegangen. Diese Entwicklung begründet sich in neueren Untersuchungen. Sie konnten zeigen, dass PCNA nicht nur eine Rolle in der DNA-Replikation, sondern auch in der DNA-Reparatur spielt und somit auch in nicht-proliferierenden Zellen nachgewiesen werden kann (Prosperi, 1997).

Für Ki-67 konnte an Muskelzellen die direkte Verbindung zwischen mechanischer Dehnung und einer daraus folgenden erhöhten Ki-67 Expression bereits gezeigt werden (Kauhanen et al., 1998). Neuere Studien haben auch bestätigt, dass in einigen hyperproliferativen Krankheiten die Ki-67 Expression und die Aktivierung von proliferations-assoziierten Kinasen wie ERK1/2 in einem direkten Zusammenhang zueinander stehen (Handra-Luca et al., 2003; Staber et al., 2004).

1.7 Arbeitshypothese

Mechanische Stimuli modulieren sowohl die Zellproliferation als auch die Zelldifferenzierung in einer Vielzahl von Geweben. *In vitro*-Studien konnten nachweisen, dass mechanischer Druck die Differenzierung von Zellen induziert, während mechanische Dehnung die Zellproliferation in epithelialen, endothelialen Zellen sowie glatten Muskelzellen induziert (Takei et al., 1997; Kippenberger et al., 1999, 2000A/B, 2005; Hofmann et al., 2004; Kawabe et al., 2004; Li et al., 2005).

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, sowohl in *in vitro*-Modellen, als auch in *in vivo*-Xenograft-Modellen die Aktivierung von tumorrelevanten Signalkaskaden zu untersuchen. Im Besonderen soll in den *in vivo*-Versuchen auf die Phosphorylierung von MAPK, die bei verschiedenen Zellspezies bereits als mechanosensitive Enzyme charakterisiert wurden, und auf die Expression von Proliferationsfaktoren fokussiert werden. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen sollen zu einem verbesserten Verständnis der molekularbiologischen Prozesse führen, welche von mechanischen Kräften in Tumoren induziert werden. Bislang liegen auf diesem Gebiet noch keine relevanten Forschungsergebnisse vor. Durch die Identifizierung der Mechanotransduktion im Tumorgewebe können möglicherweise neue molekulare Zielstrukturen identifiziert werden, die in zukünftigen Tumortherapien berücksichtigt werden können.

Zudem wird am Beispiel von A431 und A549 Tumoren die Distribution von Lymphgefäßen in unterschiedlichen Tumoren untersucht, um festzustellen inwieweit man aus der Zahl der intratumoralen Lymphgefäße Rückschlüsse auf die Höhe des TIFP ziehen kann.

Des Weiteren führt TIFP nicht nur zur mechanischen Dehnung des Tumors und damit zur möglichen Dehnungsinduzierten Aktivierung von MAPK, sondern er behindert auch stark die Aufnahme von Makromolekülen in den Tumor (Jain, 1998). Ein weiterer zentraler Punkt der Arbeitshypothese bestand darin, experimentelle Wege zu finden den TIFP zu senken und dadurch die Aufnahmefähigkeit des Tumors für Makromoleküle zu verbessern. Die Aufnahme von Makromolekülen in den Tumor ist von Interesse, da sich eine Vielzahl von monoklonalen Antikörpern unter den aktuellen Therapeutika befinden, die gegen Krebserkrankungen eingesetzt oder in Zukunft eingesetzt werden sollen. Die Etablierung einer Methode, welche den TIFP senkt und die Aufnahme von Zytostatika in den Tumor bzw. deren Verweildauer im Tumor erhöht, hätte vermutlich einen verstärkten Anti-Tumor-Effekt und wäre somit auch von hoher klinischer Relevanz.

1.8 Versuchsdurchführung

Zu Beginn der Dissertation lag der Schwerpunkt der Arbeit in der Etablierung eines Xenograft-Tumor-Modells, welches als Grundlage für alle weiterführenden Versuche auf dem Gebiet der Tumorphysiologie dienen kann. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Tumorzelllinien (A431, A549, G361) in NMRI-Nacktmäuse inokkuliert. Parallel dazu wurden *in vitro*-Versuche durchgeführt, um die Beteiligung weiterer Proteine an dem druck-induzierten p38 Signalweg aufzuklären und die Ergebnisse der vorangegangenen Diplomarbeit somit zu vervollständigen (Hofmann, 2002). Hierbei wurden besonders die Rolle von Rac, Src und PKC innerhalb des druck-induzierten p38 MAPK Signalweges untersucht. Diese Untersuchungen wurden mit molekularbiologischen Methoden (SDS-PAGE, Western Blot, Immunzytochemie, Transfektionen, u.a.) durchgeführt.

Als Zielproteine meiner Untersuchungen am Xenograft-Modell standen die MAPK (ERK1/2, und p38) sowie der Ki-67 Tumorphiliferationsfaktor im Vordergrund des Interesses. Aus vorangegangenen *in vitro*-Studien unserer Gruppe ist bekannt, dass z.B. ERK1/2 bzw. JNK durch mechanische Dehnung phosphoryliert und auch aktiviert werden können (Kippenberger et al., 2000A). Diese MAPK spielen eine wichtige Rolle in proliferations-assoziierten Signaltransduktionswegen. Vor dem Hintergrund dieser *in vitro*-Ergebnisse lag es nahe auch im *in vivo*-Modell den Fokus auf die verschiedenen Proteine der MAPK Familie zu richten. Hierzu war es notwendig Gewebeproben des Tumors für immunhistologische Untersuchungen, und gesondert davon, Proben für molekularbiologische Untersuchungen zu entnehmen. Die letztgenannten Proben wurden proteinchemisch aufbereitet, so dass sie anschließend mit den gängigen molekularbiologischen Techniken (Western Blot, ELISA) untersucht werden konnten. Tumormaterial, das für immunhistochemische Analysen bestimmt war, wurde in Paraformaldehyd fixiert oder in Einbettmedium für Kryoschnitte eingefroren.

Im Rahmen eines Gastaufenthaltes am Zentrum der Dermatologie der Ehime Universität in Japan wurden immunhistochemische Färbungen gegen lymphatische sowie vaskuläre Marker an unterschiedlichen Tumorgeweben (A431/A549) durchgeführt und analysiert. Darüber hinaus wurden molekularbiologische Untersuchungen zur Expression von VEGF-A, VEGF-C und HIF-1 α durchgeführt. Diese Proteine spielen eine zentrale Rolle in der Angio- und Lymphangiogenese. Die Untersuchungen dienten zur Aufklärung der Frage, ob sich die im

Rahmen der Dissertation gemessenen TIFP-Differenzen zwischen A431 und A549 Tumore durch eine unterschiedliche Architektur der Lymph- bzw. Blutgefäße erklären lassen.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde untersucht, inwieweit eine Senkung des TIFP zu einer erhöhten Aufnahmefähigkeit von Makromolekülen in den Tumor führt. Hierzu wurde eine Vielzahl operativer Techniken (Implantation Redon-Mini-Drain, i.v und i.a. Katheterisierung, Schwanzvenen-Injektion, u.a.) erlernt und etabliert. Durch die Zusammenarbeit mit dem Institut für Biomedizin an der Universität Bergen konnten zudem weitere Messmethoden (*wick-in-needle*, *micropuncture*) zur Messung des TIFP herangezogen werden. Zur Auswertung der gewonnenen Daten konnten immunhistochemische Methoden sowie moderne optische Bildgebungsverfahren (eXploreOptix; in Kooperation mit dem Institut für Biomedizin, Universität Bergen) angewendet werden.

2. Material und Methoden

2.1 *in vitro*-Versuche

2.1.1 Zellkultur

2.1.1.1 Materialien und Reagenzien

Zellkulturgefäße:

Petrischalen 60 mm	(Fa. Renner, Dannstadt)
6well Platten	(Fa. Nunc, Wiesbaden)
24well Platten	(Fa. Nunc, Wiesbaden)
Zellkulturflaschen (150 cm ²)	(Fa. BD Falcon, Erembodegem, Belgien)
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	(Fa. Greiner Bio-one, Frickenhausen)
Zellkulturflaschen (25 cm ²)	(Fa. Greiner Bio-one, Frickenhausen)
Pipetten (1000 µl-0,5 µl)	(Fa. Eppendorf, Hamburg)
Pipettenspitzen (1000 µl-0,5 µl)	(Fa. Starlab, Ahrensburg)
Multipette	(Fa. Eppendorf, Hamburg)
Zentrifugationsgefäße (50 ml/15 ml)	(Fa. Greiner Bio-one, Frickenhausen)
Reaktionsgefäße (2 ml/1,5 ml)	(Fa. Sarstedt, Nürtingen)
Pasteurpipetten	(Fa. Brandt, Wertheim)
Einmalpipetten (25 ml/10 ml/5 ml)	(Fa. Corning, Wiesbaden)
begasbare Brutschränke	(Fa. Heraeus, Hanau) (Fa. Nunc, Wiesbaden) (Fa. Thermo Electron, Langenselbold)
Biofuge fresco	(Fa. Thermo Electron, Langenselbold)

Allgemeine Zellkulturreagenzien:

EDTA-Disodium	(Fa. Gerbu Biotechnik, Gaiberg)
Trypsin 2,5% (1:250)	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
PBS + Ca ²⁺ /Mg ²⁺	(Fa. PAA, Cölbe)
PBS - Ca ²⁺ /Mg ²⁺	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.1.2 Zellkultur-Medien

HaCaT-Medium

- Hanks-Salzlösung (HBSS) ohne NaHCO_3 (Fa. Biochrom, Berlin)
- Aqua ad iniectabilia (Fa. Braun, Melsungen)
- MEM-Vitamic (100x) (Fa. Biochrom, Berlin)
- MEM essentielle Aminosäuren (Fa. Biochrom, Berlin)
- MEM nicht-essentielle Aminosäuren (Fa. Biochrom, Berlin)
- Natriumbicarbonat 7,5% (Fa. Biochrom, Berlin)
- FKS (5%) (Fa. PAA, Cölbe)
- Penicillin/Streptomycin (1% in Lsg) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- L-Glutamin (100x) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

A431-Medium

- DMEM (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- FKS (10%) (Fa. PAA, Cölbe)
- Penicillin/Streptomycin (1% in Lsg) (Fa. Biochrom, Berlin)
- L-Glutamin (100x) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

A549-Medium

- DMEM (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- FKS (10%) (Fa. PAA, Cölbe)
- Penicillin/Streptomycin (1% in Lsg) (Fa. Biochrom, Berlin)
- L-Glutamin (100x) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

Cos7-Medium

- DMEM (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- FKS (10%) (Fa. PAA, Cölbe)
- Penicillin/Streptomycin (1% in Lsg) (Fa. Biochrom, Berlin)
- L-Glutamin (100x) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

G361-Medium

- RPMI (Fa. Biochrom, Berlin)
- FKS (5%) (Fa. PAA, Cölbe)
- Penicillin/Streptomycin (1% in Lsg) (Fa. Biochrom, Berlin)
- L-Glutamin (100x) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

HEK293-Medium

- DMEM (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- FKS (10%) (Fa. PAA, Cölbe)
- Penicillin/Streptomycin (1% in Lsg) (Fa. Biochrom, Berlin)
- L-Glutamin (100x) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.1.3 Zelllinien

Im Rahmen meiner Dissertation sind die folgenden Zelllinien verwendet worden: HaCaT-, A431-, A549-, Cos7-, G361- und HEK293 Zellen.

HaCaT-Zelllinie:

Die HaCaT-Zelllinie ist aus einer spontan immortalisierten humanen Epithelzelllinie eines 62jährigen männlichen Patienten hervorgegangen. Die Zellisolierung erfolgte 1988 in der Forschungsgruppe um Norbert E. Fusenig (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg). Die HaCaT-Zelllinie ist immortal. Dies haben Testreihen mit mehr als 140 Passagen gezeigt. Sie besitzt einen transformierten Phänotypen *in vitro*, verhält sich jedoch nicht tumorinduzierend. Das wichtigste Merkmal, welches HaCaT-Zellen aufweisen, ist der vollständige Erhalt der Fähigkeit zur epidermalen Differenzierung (Breitkreutz et al., 1989). Der Name HaCaT = *Human adult low Calcium high Temperature* leitet sich aus Zellkulturbedingungen während der erstmaligen Zellisolation ab (Boukamp et al., 1988). Die optimalen Wachstumsbedingungen finden sich jedoch entgegen der Namensgebung in *minimal essential medium* (MEM) mit einer hohen Kalzium-Ionenkonzentration von 2 mM. Bei dieser Kalziumkonzentration bleibt die Differenzierungsfähigkeit der Zelllinie erhalten. Die HaCaT-Zelllinie weist keine individuellen Unterschiede auf, wie sie bei primären Keratinozyten zu finden sind, so dass sie eine gute Versuchszelllinie zur Untersuchung von zellbiologischen Vorgängen an Hautmodellen ist. Die meisten Experimente im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit sind an HaCaT-Zellen durchgeführt worden.

A431-Zelllinie:

Die A431-Zelllinie entstammt einem Vulvakarzinom. Es handelt sich um eine epidermoide invasive Tumorzelllinie. Die Zelllinie wurde einer 85jährigen Patientin entnommen (Giard et al., 1973). A431-Zellen weisen eine sehr hohe Dichte an EGF-Rezeptoren auf. Diese Zelllinie wurde primär in allen Tierversuchen eingesetzt und zeichnet sich durch einen hohen tumorinterstitiellen Flüssigkeitsdruck aus. Im Tiermodell zeigt sie ein monozystisches Wachstum.

A549-Zelllinie:

A549-Zellen wurden ebenfalls erstmalig von Giard (1973) charakterisiert und entstammen aus einem Lungenkarzinom eines 58jährigen männlichen Patienten. Die hypotriploide Zelllinie

wurde ebenfalls im Tiermodell eingesetzt. Im Vergleich zu A431 Tumoren weisen Tumore von A549-Zellen generell einen niedrigeren tumorinterstitiellen Flüssigkeitsdruck auf.

Cos7-Zelllinie:

Die Cos7-Zelllinie ist aus einer CV-1-Zelllinie abgeleitet, die mit einer defekten SV40 Mutante transformiert wurde. Das SV40-Konstrukt codiert das wt T-Antigen. Die Zelllinie ist epithelialen Ursprungs und wurde aus Nierengewebe isoliert (Gluzman, 1981).

G361-Zelllinie:

G361-Zellen sind aus einem malignen Melanom eines 31jährigen Patienten kaukasischer Abstammung isoliert worden (Peebles et al., 1978).

HEK293-Zelllinie:

Die HEK293-Zelllinie entstammen aus einer humanen Nierenepithelzelllinie. Die Zellen sind mit der DNA des Adenovirus 5 transformiert. Ein Segment der Virus-DNA ist in das Chromosom 19 der HEK-Zellen stabil integriert. Die Zellen weisen außerdem eine Überexpression des Vitronektin Rezeptors auf (Graham et al., 1977; Shaw et al., 2002).

2.1.1.4 Zellkulturbedingungen

Alle die Zellkultivierung betreffenden Arbeitsschritte werden unter einer Sterilbench durchgeführt, um eine Kontamination der Zellen durch Bakterien und Pilze zu verhindern. Für die Zellkultivierung werden 125 ml Flaschen verwendet. Als Kulturmedium für HaCaT-Zellen wird Hanks Medium (500 ml) unter Zusatz von 5% FKS (Fetales Kälber Serum) sowie 5 ml L-Glutamin benutzt. Als pH-Indikator des Mediums dient der Farbstoff Phenolrot, der bereits im Ausgangsmedium (HBSS) enthalten ist. Bei einer Ansäuerung des Mediums kommt es zu einer Verschiebung des Farbspektrums von Rot zu Magenta. Der Ansäuerung entgegen wirkt die Begasung der Zellen mit CO₂. Der Calciumgehalt des Hanks-Mediums beträgt 0,9 mM, der relativ hohe Ca²⁺ erhält die Differenzierungsfähigkeit der HaCaT-Zellen aufrecht, weswegen Hanks-Medium MEM-Medium ersetzt hat.

A431-Zellen, A549-Zellen und Cos7-Zellen werden mit DMEM + 10% FKS + 1% L-Glutamin + 1% P/S versorgt. Das eingesetzte DMEM besitzt einen Glucosegehalt von 1000 mg/l.

Zur Kultivierung der Melanomzelllinie G361 wird RPMI-Medium eingesetzt. Das Medium wird mit 10% FKS, 1% L-Glutamin und 1% P/S eingesetzt.

Die Kultivierung der HaCaT-Zellen erfolgt in einem mit 5% CO₂ begasten und 37 °C warmen Wärmeschrank. Für alle anderen Zelllinien wird ein mit 7,5% CO₂ begaster und 37 °C warmer Brutschrank verwendet.

2.1.1.5 Passagieren der Zellen

Passagieren von HaCaT-, A431- und Cos7-Zellen

(Volumina beziehen sich auf das Passagieren von Zellen in großen Zellkulturflaschen 125 cm³)

Zu Beginn des Passagiervorgangs wird das alte Medium aus den Zellkulturflaschen abgegossen. Zur Entfernung von alten Mediumsresten werden die Zellen mit 10 ml PBS⁻ gewaschen. PBS⁻ wird abgegossen und die Zellen werden mit 5 ml 0,2% EDTA für ca. 5 min bei 37 °C in einem unbegasten Brutschrank inkubiert. EDTA ist ein extrazellulärer Calcium- und Magnesiumchelator. Durch das „Wegfangen“ der Ionen können die Zellen die über Cadherine und Integrine vermittelte Zelladhäsion nicht mehr aufrechterhalten und lassen sich leichter vom Boden ablösen. Danach wird die EDTA-Lösung ebenfalls verworfen und es werden 4 ml Trypsin 0,125% / EDTA 0,1%-Lösung (T/E-Lösung) auf die Zellen pipettiert. Es folgt eine erneute Inkubation für ca. 5 min im unbegasten Brutschrank bei 37 °C. Das Ablösen der Zellen lässt sich mit den Augen oder mikroskopisch kontrollieren. Sind alle Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, wird die T/E-Lösung mit dem gleichen Volumen an zellspezifischem Medium inaktiviert. Die Zellen werden suspendiert, die Zellsuspension kann in gleichen Teilen auf neue Zellkulturflaschen verteilt und mit Medium auf 25 ml aufgefüllt werden. Die Zellkulturflaschen werden für 24 h mit leicht geöffneten Deckeln in begaste Brutschränke (37 °C) gestellt.

Sollen die Zellen nach der Inaktivierung des Trypsins in einer bestimmten Zelldichte ausgesät werden, so wird die Zellsuspension bei 1200 Upm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet wird mit einer bestimmten Menge Medium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mittels einer Neubauer-Zählkammer.

Passagieren von A549-, G361- und HEK293-Zellen:

Der Passagiervorgang der drei anderen Zelllinien unterscheidet sich nur in einem Punkt von jenem der HaCaT-, A431- und Cos7-Zellen. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS⁻ werden diese Zellen sofort mit 4 ml T/E für 5 min bei 37° C inkubiert. Die vorherige Inkubation mit EDTA 0,2% entfällt bei diesen Zelllinien.

2.1.2 Applikation von mechanischen Druckstimuli

Um den Effekt von mechanischen Druckstimuli auf Zellen zu untersuchen wurde eine Apparatur verwandt, die sowohl von Frank Görmär (Goermar et al., 1990, 1993), Pablo Beltran (Beltran, 2000) und mir (Hofmann, 2002) zur Untersuchung der Wirkung von mechanischen Druckreizen auf die Differenzierung von Keratinfilamenten und die Aktivierung des p38 Signaltransduktionswegs benutzt worden ist. Die Apparatur besteht aus runden Teflengewichten mit Eisenkernen ($m = 22,2 \text{ g} \pm 0,1$), welche zur Druckstimulierung auf in Petrischalen ausgesäte Zellen gelegt werden (Abb. 2.1A). Mittels eines Elektromagneten ist es möglich diese Gewichte um 2 mm zu heben und zu senken, so dass eine zyklische Druckbelastung der Zellen möglich ist (Abb. 2.1B).

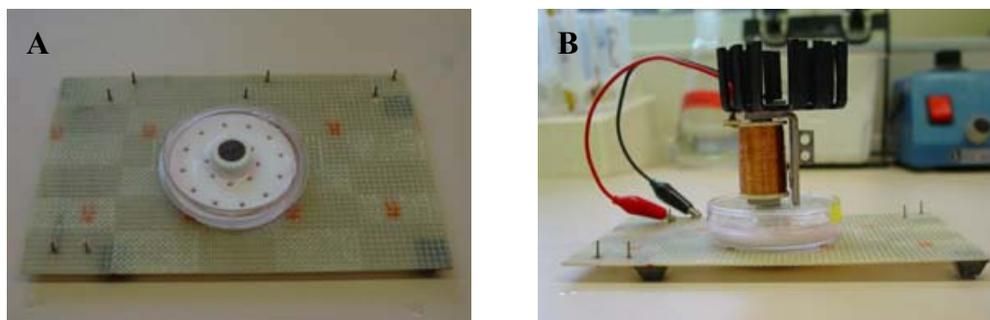


Abb. 2.1: Apparatur zur Applikation von mechanischen Druckreizen.

A) Teflengewicht zur Druckstimulation; optimale Passform für Petrischalen ($\varnothing 6 \text{ cm}$; $m = 22,2 \text{ g} \pm 0,1$ pro Gewicht); B) zyklische Steuerung des Teflengewichtes über einen Elektromagneten

2.1.3 Abarbeitung der Versuchspuben

Materialien:

3x SDS Sample Buffer (100 ml)

187,5 mM Tris-HCl pH 6,8	2,27 g	(Fa. Sigma, Taufkirchen)
6% SDS (Na-dodecylsulfat)	6,0 g	(Fa. AppliChem, Darmstadt)
30% Glycerol (wasserfrei)		(Fa. Merck, Darmstadt)
150 mM DTT (Dithiothreitol)	2,3 g	(Fa. AppliChem, Darmstadt)
0,3% Bromphenolblau-Na	0,3 g	(Fa. Roth, Karlsruhe)

Cell Scraper (Fa. Renner, Dannstadt)

Ultrathurax (Fa. Ika, Staufen)

Zur Gewinnung der Proteine wird nach einem Versuch das Medium mittels Vakuumpumpe aus der Petrischale abgesaugt und der Zellrasen mit PBS⁻ gewaschen. Anschließend erfolgt die Zugabe von 80-100 µl 3x Sample Buffer-Lösung. Mit einem Zellschaber wird der Sample Buffer innerhalb der Petrischale verteilt und danach werden die Zellen durch Kratzen vom Boden der Petrischale abgelöst. Die visköse Flüssigkeit wird in ein Cup überführt und kurz abzentrifugiert. Im nächsten Schritt werden die Zellen mit Ultraschall behandelt, wodurch es zur Scherung der DNA kommt. Danach wird die Sample Buffer Lösung für 5 min auf 96 °C erhitzt. Es kommt zur Denaturierung der Proteine und die Reagenzien Natriumdodecylsulfat (SDS) und Dithiotreitol (DTT) können ihre Wirkung entfalten. Vor dem Beladen der Geltaschen werden die Proben nochmals gevortext und abzentrifugiert.

Zur Gewinnung von Probenmaterial aus Tumoren werden diese exzidiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in Lysispuffer mittels Ultrathurax homogenisiert. Im nächsten Arbeitsschritt wird die Proteinkonzentration der Proben bestimmt. Diese Messwerte bestimmen den Verdünnungsfaktor, mit welchem die Proben auf eine Proteinkonzentration von 10 µg verdünnt werden, bevor sie abschließend für die SDS-PAGE eingesetzt werden.

2.1.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Materialien:

5x Laemmli Running-Buffer (Laemmli, 1970)

25 mM Tris	15,1 g / l	(Fa. Sigma, Taufkirchen)
250 mM Glycin	94,0 g / l	(Fa. Roth, Karlsruhe)
0,1% SDS	5,0 g / l	(Fa. AppliChem, Darmstadt)

4x Tris / HCl / SDS pH 6,8

0,5 M Tris	6,05 g / 100 ml	(Fa. Sigma, Taufkirchen)
0,4% SDS	0,4 g / 100 ml	(Fa. AppliChem, Darmstadt)
5 N HCl		(Fa. AppliChem, Darmstadt)

4x Tris / HCl / SDS pH 8,8

0,5 M Tris 18,2 g / 100 ml

0,4% SDS 0,4 g / 100 ml

5 N HCl

(Fa. Sigma, Taufkirchen)

(Fa. AppliChem, Darmstadt)

(Fa. AppliChem, Darmstadt)

TEMED (N, N, N', N'-Tetrametylendiamin)

(Fa. Merck, Darmstadt)

APS (Ammoniumperoxidsulfat)

(Fa. Roth, Karlsruhe)

Rotiphorese-Gel (Acrylamid-Lösung)

(Fa. Roth, Karlsruhe)

Gel Casting System Joey™

(Fa. Peqlab, Erlangen)

Penguin™ Doppelgelsystem P8DS

(Fa. Peqlab, Erlangen)

Perfect Blue™ Doppelgelsystem Twin S

(Fa. Peqlab, Erlangen)

Glasplatten, Spacer und Kämmе

(Fa. Peqlab, Erlangen)

Prestained SDS PAGE Standards, Low Range

(Fa. Bio-Rad, München)

Prestained SDS-PAGE Standards, High Range

(Fa. Bio-Rad, München)

	6%iges Gel	12%iges Gel	Sammelgel
Rotiphorese Gel	3,0 ml	6,0 ml	1,3 ml
4x Tris / HCl / SDS pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	/
4x Tris / HCl / SDS pH 6,8	/	/	2,5 ml
Aqua ad iniectabilia	8,25 ml	5,25 ml	6,1 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl

Tab. 1: Zusammensetzung von Trenngel/Sammelgel (Volumenangabe für zwei Gele)

Mit Hilfe von Polyacrylamidgelen lassen sich unter denaturierenden Bedingungen Proteine aufgrund ihrer Masse elektrophoretisch auftrennen. Die Proteine wandern bei der SDS-PAGE in einem elektrischen Feld durch eine inerte Matrix aus einem stark vernetzten Polyacrylamidgel. Die Gele werden vor Beginn des Versuches aus Monomeren hergestellt. Dabei kann die Porengröße des Gels durch die Menge der eingesetzten Acrylamid/Methylenbisacrylamid-Lösung so gewählt werden, dass sie besonders „engmaschig“ zum Auffinden von kleinen Proteinen (30 kD) oder „grobmaschig“ zur Darstellung großer Proteine (180 kD) dient. Die in eine SDS-PAGE aufgetragenen Proteine befinden sich in der Sample Buffer-Lösung, die das stark negativ geladene Detergenz SDS beinhaltet. Das anionische SDS zerstört in nativen Proteinen nahezu alle nichtkovalenten Bindungen, bindet an hydrophobe Bereiche der Proteine und führt zu einer Streckung der Polypeptidkette. Durch diese Streckung kommt es zur Trennung der Proteine von anderen Proteinen oder Lipiden. Durch die stark negative Ladung des SDS-Moleküls wird die ursprüngliche Ladung des Proteins vernachlässigbar. Im Durchschnitt bindet jeder zweite

Aminosäurerest ein SDS-Molekül. Die negative Ladung des SDS gebundenen Proteins ist proportional zur Masse des Proteins. Je größer ein Protein, umso mehr SDS-Moleküle können daran binden, und umso größer ist die negative Ladung. Neben SDS befindet sich in der Sample Buffer-Lösung DTT, welches die Disulfidbrücken zwischen den schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein spaltet. Die anderen Bestandteile der Sample Buffer-Lösung dienen der Aufrechterhaltung des pH-Wertes (Tris/HCl), dem erleichterten Beladen der Geltaschen (Glycerol) sowie zur Färbung der Proben (Bromphenolblau-Na⁺).

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um ein diskontinuierliches Gel, da es sich aus zwei unterschiedlich stark vernetzten Gelen zusammensetzt, dem Trenngel und dem Sammelgel. Im Trenngel findet die Proteinauftrennung statt, je nach Versuchsbedingungen wird die Konzentration an Acrylamid den Erfordernissen angepasst. Das Sammelgel ist in allen SDS-PAGE-Ansätzen von gleicher Konsistenz. Es enthält nur eine sehr geringe Menge an Acrylamid und dient dazu die Proteinproben an der Grenzfläche zwischen Trenn- und Sammelgel zu sammeln, um anschließend bei höherer Spannung einen gleichzeitigen Übergang der Proben in das Trenngel zu gewährleisten.

In die Geltaschen der SDS-PAGE werden 10-15 µl der Proben pipettiert, zusätzlich wird je Gel eine gefärbte Proteinleiter aufgetragen. Auf dieser Proteinleiter sind verschiedene Proteine mit bekannten Molekulargewichten aufgetragen. Damit lassen sich die Banden der Proben bestimmten Molekulargewichten zuordnen. Nach dem Beladen der Geltaschen wird zunächst eine Spannung von 80 V angelegt, und die Proteine wandern in dieser Zeit zur Grenzfläche zwischen Trenngel und Sammelgel. Im nächsten Schritt wird die Spannung auf 120 V erhöht und die Proteine wandern in das Trenngel ein. Die SDS-PAGE wird gestoppt sobald die Bromphenolblau-markierte Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hat.

2.1.5 Western Blot

Materialien:

Towbin Blotting-Buffer

25 mM Tris	12,10 g / 4 l	(Fa. Sigma, Taufkirchen)
192 mM Glycin	57,65 g / 4 l	(Fa. Roth, Karlsruhe)
10% Methanol	400 ml	(Fa. Riedel de Haen, Seelze)

zur Auftrennung von hochmolekularen Proteinen wird 20% Methanol eingesetzt

10x TBS

Tris	24,2 g / 1 l	(Fa. Sigma, Taufkirchen)
NaCl	80,0 g / 1 l	(Fa. Merck, Darmstadt)
5 N HCl		(Fa. AppliChem, Darmstadt)

Mit HCl auf pH 7,6 einstellen

TBS-T

1x TBS

0,1% Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonalaureat)

(Fa. Bio-Rad, München)

Blocking Buffer

1x TBS-T

5% Bovines Serum Albumin (BSA) / 5% Milchpulver

(Fa. Roth, Karlsruhe)

Mini Trans Blot® Cell

(Fa. Bio-Rad, München)

Power Pac 200

(Fa. Bio-Rad, München)

PVDF-Transfermembran

(Fa. Roth, Karlsruhe)

Hyperfilm ECL

(Fa. Amersham, Little Chalfont, UK)

LumiGlo-Reagent

(Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main)

Um die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen, müssen die Proteinbanden des Gels auf eine PVDF-Membran übertragen werden. Dies geschieht nach dem Western Blot-Verfahren. Die Übertragung der Proteine auf eine Membran bietet den Vorteil, dass die Membran längere Zeit gelagert werden kann und einfacher zu handhaben ist als ein Gel. Um den Western Blot durchzuführen muss das Gel in eine Art Sandwich gepackt werden. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Abfolge der Lagen von oben (Kathode) nach unten (Anode):

Transfer-Pad	in Transfer-Puffer inkubiert
Filterpapier	in Methanol/Transfer-Puffer inkubiert
PVDF-Membran	in Methanol/Transfer-Puffer inkubiert
Gel	in Transfer-Puffer inkubiert
Filterpapier	in Methanol/Transfer-Puffer inkubiert
Transfer-Pad	in Transfer-Puffer inkubiert

Tab. 2: Zusammenbau des „Western Blot-Sandwiches“

Im Anschluss daran wird das „Transfer-Sandwich“ in eine mit Towbin Blotting-Buffer gefüllte Blotting-Kammer eingespannt und es wird für 45-50 min eine Spannung von 50 V angelegt. In diesem Zeitraum wandern die negativgeladenen Proteine aus dem Gel in die PVDF-Membran (liegt an der Kathode). Das Filterpapier sowie das Gel werden entfernt. Anschließend wird die Membran für 1 h in eine 5%ige BSA- oder Magermilchpulver-Lösung gelegt. Beide Lösungen blocken alle unspezifischen Antikörperbindestellen der Proteine ab. Zur genauen Bestimmung der auf die Membran übertragenen Proteine verwendet man spezifische monoklonale Antikörper. Alle in den Experimenten eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 3 aufgelistet.

1. Antikörper	2. Antikörper	Hersteller
CD31	Rabbit	Acris Antibodies, Hiddenhausen
HSP27	Rabbit	Biogenesis, Poole, UK
phospho-HSP27 (Ser 82)	Rabbit	Cell Signaling, Frankfurt/Main
JNK/SAPK	Rabbit	Cell Signaling, Frankfurt/Main
phospho-JNK/SAPK (Thr183/Tyr185)	Rabbit	Cell Signaling, Frankfurt/Main
Ki-67 (Tec3)	Rat	Dako Cytomation, Hamburg
Ki-67 (Ki-S5)	Mouse	Dako Cytomation, Hamburg
p38 MAPK	Rabbit	Cell Signaling, Frankfurt/Main
phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Rabbit	Cell Signaling, Frankfurt/Main
p44/42 MAPK	Rabbit	Cell Signaling, Frankfurt/Main
phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Rabbit	Cell Signaling, Frankfurt/Main
phospho-PKC pan	Rabbit	Cell Signaling, Frankfurt/Main
phospho-PKC α (Thr638/641)	Rabbit	Cell Signaling, Frankfurt/Main
phospho-PKC δ (Ser643)	Rabbit	Cell Signaling, Frankfurt/Main
Podoplanin	Hamster	zur Verfügung gestellt von Dr. Hirakawa, Matsuyama, Japan
phospho-Src	Rabbit	Cell Signaling, Frankfurt/Main
	Anti-Rabbit IgG	Cell Signaling, Frankfurt/Main
	Anti-Mouse IgG	Cell Signaling, Frankfurt/Main

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Antikörper

Die spezifischen 1. Antikörper werden über Nacht in einer Blocking-Buffer-Lösung auf der Membran inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran mit TBS-T gewaschen und danach für 1 h mit dem 2. Antikörper inkubiert. Der 2. Antikörper ist an Meerretich-Peroxidase (HRP) gekoppelt. Nach der Inkubation des 2. Antikörpers wird die Membran erneut mit TBS-T gewaschen. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden werden LumiGlo-Reagenzien eingesetzt. Durch die enzymatische Wirkung der HRP wird ein Bestandteil dieser Entwicklerlösung unter dem Austritt von Licht zersetzt. Diese Reaktion lässt sich mit einem Röntgenfilm sichtbar machen. Nur dort, wo sich die durch den 1. Antikörper detektierten Proteine befinden, ist eine Schwärzung des Films zu sehen.

2.1.6 Immunhistochemische Färbungen

2.1.6.1 Färbung von Paraffinschnitten

Materialien:

Formaldehyd	(Fa. Roth, Karlsruhe)
Citratpuffer	(Fa. Dako Cytomation, Hamburg)
Wasserstoffperoxid (30%)	(Fa. AppliChem, Darmstadt)
Methanol	(Fa. Fluka, Seelze)
UltraTech HRP Kit	(Fa. Beckman Coulter, Krefeld)
AEC Staining Kit	(Fa. Linaris, Wertheim-Bettingen)
Meyer's Hämatoxylin	(Fa. AppliChem, Darmstadt)
Zitratpuffer	(Fa. Dako Cytomation, Hamburg)
LeicaRM2125 Rotationsmikrotom	(Fa. Leica Microsystems, Wetzlar)
Shandon Hypercenter XP	(Fa. Thermo Fisher, Langenselbold)
Gewebe-Einbett-Station	(Fa. Vogel, Gießen)
Zeiss Axioskop	(Fa. Zeiss, Oberkochen)
Olympus BX5	(Fa. Olympus, Hamburg)
Sony Cyber Shot 3.3	(Fa. Sony Deutschland, Köln)
Nikon Coolpix	(Fa. Nikon Deutschland, Düsseldorf)
CellExplorer2000 Software	(Fa. BioSciTec, Frankfurt/Main)
Objektträger/Deckgläser	(Fa. Marienfeld, Lauda)
Aquatex-Einbettmedium	(Fa. Merck, Darmstadt)

Zur Vorbereitung der immunhistochemischen Färbungen werden Tumorproben entnommen und in 4%igem Formaldehyd fixiert. Die Fixierung des Tumorgewebes sollte über mindestens 12 h erfolgen. Im nächsten Arbeitsschritt werden die Tumore in Einbettkassetten überführt und im Shandon Hypercenter entwässert. Die entwässerten Proben werden anschließend in flüssigem Paraffin eingebettet. In den Paraffinblocks können die Proben über Monate/Jahre sicher aufbewahrt werden.

Für immunhistochemische Färbungen werden die Paraffinblöcke mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms in dünne Gewebeschnitte von 6-10 µm Dicke geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Bevor der Prozess der immunhistochemischen Färbung beginnen kann, müssen die Gewebeschnitte entparaffiniert und rehydriert werden. Dazu werden die Gewebeschnitte zunächst für 15 min in einem Wärmeschrank bei 65 °C erwärmt und

anschließend in einer Alkoholreihe inkubiert. Die Proben werden für jeweils 5 min in Xylol (4x), Isopropanol (2x) und in 95%igem Ethanol (2x) gebadet. Darauffolgend werden die Tumorschnitte in Aqua dest. gewaschen. Im nächsten Arbeitsschritt erfolgt die hitze-induzierte Epitop-Demaskierung, wofür die Tumorschnitte in Küvetten mit Zitratpuffer überführt werden. Die Küvetten werden in einer Mikrowelle bis zu 6 mal für drei Minuten erhitzt. Es ist dabei darauf zu achten, dass die Tumorschnitte nicht austrocknen und verdampfte Flüssigkeit immer wieder durch Nachfüllen mit Aqua dest. ausgeglichen wird. Nach der Mikrowellenbehandlung werden die Gewebeschnitte für 20 min bei RT stehen gelassen, um abzukühlen. Nachfolgend werden die Schnitte erneut in Aqua dest. gespült und dann für 5 min in PBS inkubiert. Danach erfolgt eine 15minütige Inkubation in einer 3%igen Wasserstoffperoxid-Lösung. Diese setzt sich aus 20 ml 30% Wasserstoffperoxid und 180 ml MeOH zusammen. Bevor die eigentliche Färbung der Tumorschnitte beginnt, werden die Proben für 5 min mit Leitungswasser, 4 min mit 0,1% Triton-PBS, 5 min mit PBS und zuletzt 3 min mit 2% Glycin-PBS inkubiert. Die immunhistochemische Färbung der Proben beginnt mit der 10 minütigen Inkubation der Gewebeschnitte mit einer Protein-Blocking-Lösung. Dieser Arbeitsschritt dient, wie auch beim Western Blot (Einsatz von BSA oder Magermilchpulver), zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen. Um die Verdunstung der auf die Proben aufgeträufelten Lösungen und ein Austrocknen der Gewebeproben zu verhindern, werden die folgenden Arbeitsschritte in einer „feuchten Kammer“ durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine einfache Plastikbox mit Deckel, welche zuvor mit in Aqua dest. getränkten Tüchern ausgelegt wird. Nach der 10 minütigen Inkubation wird die Protein-Blocking-Lösung von den Proben abgekippt. Hierbei ist zu beachten, dass die Schnitte vor der nachfolgenden Primärantikörperinkubation nicht gewaschen werden. Der Primärantikörper wird in den vom Hersteller für immunhistochemische Färbungen angegebenen Konzentrationen in PBS eingesetzt. Zumeist erfolgt die Inkubation des Primärantikörpers über einen Zeitraum von 60 min bei RT. Nach dieser Zeit werden die Gewebeschnitte dreimal für 2 min mit PBS inkubiert, um die nicht gebundenen Primärantikörper abzuwaschen. Im nachfolgenden Schritt erfolgt für 30 min die Inkubation der Proben mit einem biotinylierten Sekundärantikörper. Der Sekundärantikörper ist ebenfalls in PBS verdünnt. Nach diesem Schritt werden die Proben erneut in PBS gewaschen (3 mal 2 min) und für 45 min mit alkalischer Streptavidinperoxidase inkubiert. Diese bindet an die Sekundärantikörper und ist für die Farbreaktion im nachfolgenden Inkubationsschritt mit der AEC-Färbelösung notwendig. Vorab werden die Gewebeschnitte aber erneut 3 mal für 2 min in PBS gewaschen. Nachdem die AEC-Färbelösung auf die

Proben aufgebracht worden ist, werden sie für 15-20 min im Dunkeln inkubiert. Nach diesem Zeitraum sollte eine Farbreaktion bereits mit bloßem Auge zu beobachten sein. Die Gewebeproben sind anschließend noch für 2 min mit Aqua dest. zu waschen und können bei Bedarf noch mit Hämatoxylin gegengefärbt werden. Zum Abschluss werden sie mit Aquatex-Einbettmedium beträufelt und mit einem Deckgläschen versehen.

2.1.6.2 Färbung von Gefrierschnitten

Materialien:

Acteton	(Fa. Fluka, Seelze)
Methanol	(Fa. Fluka, Seelze)
TissueTek-Einbettmedium	(Fa. Jung, Heidelberg)
Cryomold Einbettschälchen	(Fa. Sakura, Zoeterwoude, Niederlande)
Leica Kryostat	(Fa. Leica Microsystems, Wetzlar)
Zeiss Axioskop	(Fa. Zeiss, Oberkochen)
Olympus BX5	(Fa. Olympus, Hamburg)
Sony Cyber Shot 3.3	(Fa. Sony Deutschland, Köln)
Nikon Coolpix	(Fa. Nikon Deutschland, Düsseldorf)
Objektträger/Deckgläser	(Fa. Marienfeld, Lauda)
Vectorshield Mounting Medium	(Fa. Vector Lab., Burlingame, CA)

Zur Herstellung von Gefrierschnitten aus Gewebeproben müssen diese direkt nach der Entnahme in TissueTek-Medium eingebettet und sofort schockgefroren werden. In diesem Zustand sind die Proben kryokonserviert und können für lange Zeiträume bei minus 80 °C gelagert werden. Um solche Gewebeproben zu färben, müssen diese zunächst mittels eines Kryostats in 8-12 µm dünne Gewebeproben geschnitten werden. Die dünnen Gefrierschnitte werden auf einen Objektträger aufgebracht und zunächst für jeweils 5 min mit -20 °C kaltem Acteon und kühlem Methanol fixiert. Nachfolgend kann sofort mit der Färbung der Gefrierschnitte begonnen werden. Dazu werden die Gewebeschnitte zunächst für 10 min mit Protein-Blocking-Lösung inkubiert, anschließend erfolgt die Zugabe des Primärantikörpers. Nach einer Inkubation von 2 h wird der ungebundene AK durch Waschen in PBS entfernt und die Proben werden für 45 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Bei den im Rahmen der Dissertation durchgeführten Gefrierschnitten waren die 2. AK bereits mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Phycoerythrin, Alexa488, FITC oder TRITC) gekoppelt. Die zeitaufwendige Inkubation der Proben mit einer Färbelösung, wie sie für die Paraffinschnitte

durchgeführt werden muss, entfällt hierbei. Die Schnitte werden abschließend mit einem speziellen Einbettmedium überschichtet. Es weist keine Eigenfluoreszenz auf und beeinflusst daher auch nicht die Fluoreszenz der gefärbten Proben.

2.1.7 Immunzytochemische Färbungen

Materialien:

Formaldehyd	(Fa. Roth, Karlsruhe)
UltraTech HRP Kit	(Fa. Beckman Coulter, Krefeld)
AEC Staining Kit	(Fa. Linaris, Wertheim-Bettingen)
Meyer's Hämatoxylin	(Fa. AppliChem, Darmstadt)
Labteks	(Fa. Nunc, Wiesbaden)

Zur Durchführung der immunzytochemischen Färbungen müssen die Zellen in Labtek-Kammern kultiviert werden. Nach Durchführung der Experimente in der Zellkultur werden die Zellen in den Labtek-Kammern für 10 min mit 4% Formaldehyd-Lösung fixiert. Anschließend werden die Zellen wie bei den immunhistochemischen Färbungen in einer 3%igen Wasserstoffperoxid-Lösung inkubiert, gefolgt von kurzen Inkubationen in 0,1% Triton-PBS und 2% Glycin PBS. Das weitere Vorgehen entspricht ebenfalls dem Protokoll der immunhistochemischen Färbungen. Die Zellen werden nacheinander mit Protein-Blocking-Lösung, dem Primärantikörper, dem biotinyliertem Sekundärantikörper und der Streptavidinperoxidase-Lösung inkubiert. Anschließend erfolgt die Färbung unter Verwendung der AEC-Färbelösung. Wie auch bei den immunhistochemischen Proben können die immunzytochemischen Proben mit Hämatoxylin abschließend gegengefärbt werden. Kontrollfärbungen zur Überprüfung der Färbung wurden unter Ausschluss des Primär- oder des Sekundärantikörpers durchgeführt.

2.1.8 Reverse Transkription

Materialien:

M-MLV Reverse Transkriptase	(Fa. Promega, Mannheim)
M-MLV Reverse Transkriptase Puffer	(Fa. Promega, Mannheim)
dNTP (5mM je Nukleotid)	(Fa. Promega, Mannheim)
Random Primer	(Fa. Promega, Mannheim)
RNAsin	(Fa. Promega, Mannheim)
T3 Thermocycler	(Fa. Biometra, Göttingen)

Bei der reversen Transkription nutzt man die Eigenschaft des Enzyms Reverse Transkriptase, welches in der Lage ist, anhand einer RNA-Vorlage die komplementäre DNA (cDNA) zu synthetisieren. Die Reverse Transkriptase benötigt für ihre in 5'-3'-Richtung verlaufende cDNA-Synthese einen Primer (kurzes DNA-Oligonukleotid) als Startermolekül, welcher ein freies 3'-Ende besitzt und komplementär zur RNA sein muss. Da eukaryotische mRNAs am 3'-Ende polyadenyliert sind, benutzt man als Primer Oligonukleotide aus Thymin-Basen, so genannte Oligo(dT)-Primer. Diese binden an die Poly-(A)-Enden der mRNAs, so dass von dort aus die Synthese der cDNA beginnen kann. Als Enzym wurde die *M-MLV Reverse Transcriptase* verwendet.

Pro Ansatz wird für die *M-MLV Reverse Transcriptase* auf Eis zusammengegeben:

- 1 µl *Random Primer*
- 3 µl dNTPs (5mM pro Nukleotid)
- 0,75 µl RNAsin (RNase-Inhibitor)
- 6 µl 5 × Reaktions-Mix
- 2 µl *M-MLV Reverse Transcriptase*

Anschließend werden pro Versuchsansatz 17,25 µl RNA (2 µg) und A. bidest 5 Minuten bei 70-80 °C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Es erfolgt die Zugabe von 12,75 µl der Enzym-Puffer-Mixtur. Nach einer Inkubation für 10 min bei 25 °C wird anschließend 60 min bei 42 °C inkubiert. Die Terminierung der Reaktion erfolgt bei 70-80 °C für 10 Minuten, worauf eine Abkühlung auf 4 °C folgt.

2.1.9 Semiquantitative PCR

Materialien:

Taq Polymerase		(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
10x PCR Puffer		(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
dNTP		(Fa. Promega, Mannheim)
MgCl₂ (50 mM)		(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
T3 Thermocycler		(Fa. Biometra, Göttingen)
Ethidiumbromid		(Fa. Roth, Karlsruhe)
Agarose		(Fa. Sigma, Taufkirchen)
5x TBE Buffer		
Tris	54 g / l	(Fa. Sigma, Taufkirchen)
Borsäure	27,5 g / l	(Fa. AppliChem, Darmstadt)
EDTA 0,5 M	20 ml / l	(Fa. Gerbu Biotechnik, Gaiberg)

Mit Hilfe der RT-PCR kann man die Genexpression auf der Ebene der mRNA untersuchen und eine relative Abschätzung der mRNA-Expression spezifischer Gene treffen. Bei der hier verwendeten semiquantitativen RT-PCR werden in einem Reaktionsansatz jeweils ein spezifisches Gen und das in jeder Zelle konstitutiv exprimierte Gen für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) zusammen amplifiziert, wobei die Intensität der GAPDH-Produktbande als interner Standard fungiert. Durch Vergleich der Bandenintensitäten „*Gen of interest*“ kontra GAPDH-Produkt kann eine relative Aussage über die mRNA-Expression getroffen werden.

Für die M-MLV RT-PCR wurde folgender Reaktionsansatz verwendet (1-fach):

- 5 µl 10 × PCR-Puffer
- 1 µl dNTPs (5mM pro Nukleotid)
- 1,5 µl 50mM MgCl₂
- 1 µl cDNA-Vorlage
- 0,25 µl *Taq*-Polymerase
- 39,25 µl aqua dest.
- 2 µl Primer-Mix (1 µl Sense, 1 µl Antisense)

Nach Beendigung der RT-PCR werden 10 µl der PCR-Produkte mit 2 µl DNA-Ladepuffer vermischt und in einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (100 V, ca. 90 min). Die Agarose wird durch Aufkochen im TBE-Puffer gelöst und anschließend unter Rühren mit Ethidiumbromid versetzt. Das Agarosegel wird in die dafür vorgesehene Form gegossen und nach Polymerisierung in die Elektrophorese-Apparatur gelegt. Anschließend erfolgt das Auftragen der DNA-Proben und die elektrophoretische Auftrennung bei einer Spannung von 110 V.

Die Betrachtung der Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung erfolgt auf einem UV-Transilluminator.

2.1.10 Transformation von Bakterienzellen und Plasmidvermehrung

Materialien:

One Shot[®] MAX Efficiency[®] DH5α-T1^R Comp. Cells	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
Luria Agar	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
LB Broth Medium	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
Schüttelinkubator	(Fa. Fisher Scientific, Schwerte)

Die Transformation der DH5 α -T1^R kompetenten *Escherichia coli* Bakterien mit Plasmid-DNA erfolgt mittels eines 30 s dauernden Hitzeschocks bei 42 °C. Durch den Hitzestress kommt es kurzzeitig zur Öffnung von kleinen Poren in der Bakterienzellwand, durch die die Plasmide in das Bakterium aufgenommen werden können. Nach der Transformation werden die Bakterien auf antibiotikahaltige Agar-Platten ausplattiert. Die Wahl des Antibiotikums, das auf die Agar-Platten aufgebracht wird, hängt von dem Resistenzgen ab, das sich auf dem transformiertem Plasmid befindet. In den von mir durchgeführten Versuchen handelt es sich immer um das Antibiotikum Ampicillin. Nach der Ausplattierung werden die Bakterien bei 37 °C im Schüttelinkubator über Nacht gelagert. Am nächsten Tag werden die gewachsenen Kolonien mit einer Pipettenspitze gepickt und in 10 ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführt. Die Bakterienkolonien werden für 6-8 h im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Aus den mit Bakterien bewachsenen Vorkulturen wird ein Teil als „Stammhalter“ bei -70 °C eingefroren, aus der übrigen Bakteriensuspension werden 500 μ l in 100 ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführt und über Nacht im Inkubator für die nachfolgende Plasmidisolierung herangezogen.

2.1.11 Plasmidisolierung:

Materialien:

Nucleobond AX	(Fa. Macherey-Nagel, Düren)
Isopropanol (70%)	(Fa. Riedel de Haen, Seelze)
Ethanol (70%)	(Fa. AppliChem, Darmstadt)
UV-Photometer	(Fa. Amersham, Little Chalfont, UK)

Die Präparation von Plasmid-DNA (pDNA) erfolgt mit dem Nucleobond AX-Kit der Fa. Macherey-Nagel. Das Kit basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und der Isolierung der pDNA durch Bindung an eine mit Diethylaminoethanol equilibrierte Filtermembran. Während die pDNA an den Filter gebunden ist, werden Proteine, RNA, mögliche Farbstoffe und andere Verunreinigungen durch verschiedene Waschschrte mit niedrigkonzentrierten Salzlösungen aus dem Filter herausgewaschen. Die pDNA wird durch die Verwendung einer hochkonzentrierten Salzlösung am Ende aus dem Filter gelöst und mit 70% Isopropanol präzipitiert. Das Pellet der pDNA wird danach noch in 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Danach kann es in TE-Puffer aufgenommen werden und mit einem UV-Photometer kann die Reinheit und Konzentration der pDNA nachgewiesen werden. Die genaue Durchführung der Plasmidisolierung richtet sich nach den Angaben der Herstellerfirma.

2.1.12 Transiente Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA

Materialien:

Lipofectamin™ 2000 Reagent (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

OptiMEM Medium (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

Die Transfektion der Zellen wird in Petrischalen bzw. in 6well Multischalen durchgeführt. Je well werden 10 µg plDNA eingesetzt. Die Plasmide werden zunächst für 5 min mit 500 µl OptiMEM inkubiert. Zeitgleich werden pro well 7,5 µl der kationischen Reagenz Lipofectamin™ 2000 mit 500 µl OptiMEM für 5 min inkubiert. Anschließend wird die Plasmidlösung mit der Lipofectaminlösung vereinigt und für 20 min inkubiert. In diesem Zeitraum kommt es zur Bildung von Lipofectamin-DNA Komplexen. Nach diesen Vorbereitungsschritten wird das alte Medium über den Zellen abgesaugt und durch 500 µl Plasmid-Lipofectamin-Lösung je well ersetzt. Zusätzlich werden in jedes well 1500 µl OptiMEM pipettiert. Der Transfektionsansatz wird für ca. 6 h auf den Zellen belassen, bevor die Transfektionslösung abgesaugt und gegen Medium ausgetauscht wird.

2.1.13 zusätzliche Reagenzien

DMSO (Dimethylsulfoxid)	(Fa. Merck, Darmstadt)
Gö6976 (PKC α Inhibitor)	(Fa. Calbiochem, Nottingham, UK)
Natriumchlorid	(Fa. AppliChem, Darmstadt)
PP1 Analog (4-Amino-1-tert-butyl-3-(1'-naphtoyl)pyrazolo(3,4-d)pyrimidine)	(Fa. Calbiochem, Nottingham, UK)
PP2 (Src Kinase Inhibitor) (4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo(3,4-d)pyrimidine)	(Fa. Calbiochem, Nottingham, UK)
PP3 (Src Kinase Inhibitor) (4-Amino-7-phenylpyrazolo(3,4-d)pyrimidine)	(Fa. Calbiochem, Nottingham, UK)
Rottlerin (PKC δ Inhibitor)	(Fa. Calbiochem, Nottingham, UK)
SB 202190 (p38 MAPK Inhibitor) (4-(4-Fluorphenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole)	(Fa. Calbiochem, La Jolla, CA, USA)
SB 203580 (p38 MAPK Inhibitor) (4-(4-Fluorphenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole)	(Fa. Calbiochem, La Jolla, CA, USA)
Wasserstoffperoxid 30%	(Fa. AppliChem, Darmstadt)

2.2 *in vivo*-Versuche

2.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Versuchstiere:

NMRI-Nacktmäuse	(Fa. Janvier Elevage, Le Genest St. Isle, Frankreich) (Fa. Harlan Winkelmann, Borcheln)
Rowett-Nacktratten	(Gades Institut, H'landsjokehus, Bergen, Norwegen) (Fa. Harlan Winkelmann, Borcheln)
SCID-Mäuse	(Fa. Møllegard, Skensved, Dänemark)

Materialien:

Ratten-Mäuse-Haltungsfutter	(Fa. Sniff Spezialdiäten, Soest)
Staubfreier Einstreu	(Fa. Sniff Spezialdiäten, Soest)
Macrolonkäfige	(Fa. Tecniplast, Hohenpeißenberg) (Fa. Scanbur, Karlsruhe, Dänemark)

2.2.1.1 Nacktmäuse (NMRI-nu/nu)

Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Nacktmäuse (Naval Medical Research Institute-nude/nude, NMRI-nu/nu) sind kommerziell von den Firmen Janvier Elevage und Harlan Winkelmann (Stamm: HsdCpb:NMRI) erworben worden. Alle Nacktmäusen sind aus Auszuchtstämmen. Bei den Tieren handelt es sich um weibliche Mäuse, die im Alter von 5-7 Wochen in die Versuche eingebracht wurden. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet. Diese weisen im Vergleich zu männlichen Artgenossen generell ein stark verringertes Aggressionspotential auf. Das Risiko des gegenseitigen Verbisses ist bei den weiblichen Tieren dadurch stark gesenkt. Das Körpergewicht der NMRI-nu/nu Mäuse lag zum Zeitpunkt der Tumorinokulationen zwischen 20 und 22 g.

2.2.1.2 SCID-Mäuse

Neben den NMRI-nu/nu Mäusen sind bei den Untersuchungen zur Aufnahme von fluoreszenzgekoppelten Dextranen in Tumore SCID-Mäuse eingesetzt worden. Diese Tiere stammen aus der kommerziellen Zucht der Firma Møllegard. Bei den Tieren handelt es sich ebenfalls ausschließlich um weibliche Mäuse, die im Alter von 6-8 Wochen erworben wurden. Das Körpergewicht der SCID-Mäuse betrug zum Zeitpunkt der Tumorinokulationen 16-20 g. Vor den Versuchen wurden die Tiere rasiert und mit Enthaarungscreme behandelt. Dies ist zum Scannen der Tiere notwendig, denn das Fell der Mäuse weist eine sehr starke Eigenfluoreszenz auf und kann das Ergebnis der Untersuchungen stark beeinflussen. Die Volumenbestimmung der Tumore wurde durch die Enthaarung vereinfacht.

2.2.1.3 Nacktratten (Rowett-rnu/rnu)

Darüber hinaus sind in den Versuchen Rowett-rnu/rnu Nacktratten zum Einsatz gekommen. Die Tieren stammten z.T. aus einer Zuchtlinie des Gades Instituts (Dr. Raa, Haukelandsykehus, Bergen, Norwegen) sowie aus kommerziellen Zuchtbetrieben (Stamm: Hsd:RH-nu; Harlan Winkelmann) und waren alle aus Auszuchtprogrammen. Die Tiere sind im Alter von 5-6 Wochen mit Tumorzellen inokuliert worden. Zu diesem Zeitpunkt lag das Gewicht der Ratten bei 150 bis 170 g. Ebenso wie bei den Nacktmäusen wurden ausschließlich weibliche Tiere in den Versuchen eingesetzt.

Bei allen Versuchstieren wurde zweimal pro Woche das Futter, das Wasser und der staubfreie Einstreu gewechselt. Futter und Wasser erhielten alle Tiere *ad libitum*. Sowohl NMRI-nu/nu Mäuse als auch Rowett-rnu/rnu Ratten wurden in Macrolon Typ 3-Käfigen gehalten, welche mit Filterhauben versehen waren, um das Infektionsrisiko der immunsupprimierten Tiere zu reduzieren. Es wurden maximal 5 Nacktmäuse bzw. 2 Nacktratten pro Käfig gehalten. In allen Haltungsräumen fand ein automatischer 12stündiger Tag-Nachtwechsel statt. Zusätzlich erhielten die Tieren Pappboxen als Rückzugs- und Spielmöglichkeiten. Alle durchgeführten Tierversuche waren genehmigt und wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG Fassung vom 25. Mai 1998) durchgeführt. Tierversuche an der Universität Bergen wurden nach den Leitlinien der *Norwegian State Commission for Laboratory Animals* durchgeführt und waren von der Ethikkommission der Universität Bergen genehmigt.

2.2.2 Anästhesie

Materialien:

Forene® (Wirkstoff Isofluran (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyldifluoromethylether))	(Fa. Abbott, Wiesbaden)
Ketavet® (100mg) (Wirkstoff: Ketamin (2-(2-Chlorphenyl)-2-methylaminocyclohexanon))	(Fa. Pharmacia, Karlsruhe)
Rompun® 2% (Wirkstoff: Xylazin (2-(2,6-dimethylphenylamino)-4H-5,6-dihydro-1,3-thiazin))	(Fa. BayerVital, Leverkusen)
Mebumal (Wirkstoff: Pentobarbital-Natrium)	(Svåne Apotek, Bergen, Norwegen)
Pentobarbital-Natrium (Wirkstoff: 5-Ethyl-5-[1-methylbutyl]2,4,6-trioxohexahydropyrimidine)	(Fa. Sigma, Taufkirchen)
Xylocain® 1% (Wirkstoff: Lidocain (2-(diethylamino)-N-(2,6-dimethyl-phenyl)-acetamid))	(Fa. AstraZeneca, Wedel)

Alle Versuchstiere werden vor den Experimenten anästhesiert. Im Generellen ist zwischen dem Einsatz von Inhalationsanästhetika und Narkotika zur Injektion zu unterscheiden.

2.2.2.1 Inhalationsanästhesie

Die Narkotisierung der Versuchstiere mittels Inhalationsanästhetika erfolgt während der Inokulation der Tumorzellen, der Messung der Tumorgroße und der Messung des TIFP (nur am Institut für Biomedizin, Universität Bergen). In allen Versuchen wird Isofluran als Inhalationsnarkotikum verwendet. Isofluran ist ein Inhalationsanästhetikum aus der Gruppe der halogenierten Kohlenwasserstoffe. Es löst, abhängig von der Dosierung, eine reversible Ausschaltung des Bewusstseins, Analgesie, die Dämpfung vegetativer Reflexe und die Unterdrückung der Willkür-Motorik aus. Die Aufnahme des Narkotikums erfolgt über die Lungenalveolen. Isofluran wird zum überwiegenden Teil (> 99,8%) in unveränderter Form mit der Expirationsluft über die Lunge ausgeschieden.

Zur Narkotisierung werden die Tiere in Narkosetöpfe überführt, die mit Isofluran-getränkten Wattetupfern bestückt sind. Die Tiere verbleiben solange in einem Narkosetopf bis sie eine tiefe Betäubung und gleichmäßige Atemfrequenz aufweisen. Anschließend können sie behandelt werden. Die tiefe Narkose ist oftmals bereits nach 45-60 s beendet und es kommt zum Aufwachen der Versuchstiere. Am Institut für Biomedizin der Universität Bergen sind die Tiere in Acrylboxen, welche an ein Isofluran-Verdampfer angeschlossen sind, zunächst anästhesiert und anschließend über ein Mundstück auch während der TIFP-Messung narkotisiert worden. Die Einstellung des Verdampfers während der Messung bzw. der primären Anästhesie ist der nachfolgenden Tab. 5 zu entnehmen.

	O ₂	N ₂ O	Isofluran
Anästhesie	0,5 l/min	0,5 l/min	3%
Messung	0,5 l/min	0,2 l/min	1,5%

Tab. 5: Gasvolumina während der Inhalationsanästhesie

2.2.2.2 Injektionsanästhesie

Zur Messung des TIFP (am Zentrum der Dermatologie und Venerologie), der Implantation des Redon-Mini-Drain Systems und der finalen Exzision der Tumore werden die Mäuse mit einer Kombination aus Ketavet® (100 mg/kg KG) und Rompun® 2% (10 mg/kg KG) behandelt.

Die klinische Hauptwirkung von Ketaminhydrochlorid besteht in einer schnell eintretenden, starken Analgesie der Körperhülle. Die Analgesie geht einer ebenfalls eintretenden, mäßig tiefen Hypnose voraus und überdauert diese. Dabei werden die Schutzreflexe des Tieres jedoch nicht beeinträchtigt. Ketaminhydrochlorid ist ein in Endhirn und Zwischenhirn angreifendes Hypnoanalgetikum, welches den Cortex und Teile des Thalamus lähmt sowie den Hirnstamm stimuliert. Die Analgesie wird durch die Ketaminhydrochlorid-vermittelte Hemmung der thalamischen Nervenfasern verursacht.

Xylazin, der Wirkstoff von Rompun® 2%, ist ein α -2-Rezeptoragonist, der einen schlafähnlichen (sedativ-hypnotischen) Zustand erzeugt, verbunden mit einer allgemeinen Muskelrelaxation und von Tierart zu Tierart individuell unterschiedlich stark ausgeprägten Schmerzfreiheit (Analgesie/Anästhesie).

Den Mäusen werden 200 μ l Narkoselösung (150 μ l Ketavet® + 150 μ l Rompun® 2% + 900 μ l physiologische Kochsalzlösung) zur Anästhesie intraperitoneal injiziert. Die Dauer der Narkose ist über mehrere Stunden anhaltend. Die Tiefe der Anästhesie wird regelmäßig anhand des Fuß-Rückzieh-Reflexes überprüft. Dazu werden die Versuchstiere mit einer Pinzette an der dünnen Haut zwischen den Fußzehen gereizt. Im Falle einer Reflexreaktion des Versuchstieres auf den Reiz werden zwischen 50-100 μ l Narkoselösung i.p. nachinjiziert. In Experimenten, welche eine mehrstündige Narkose des Versuchstieres erfordern, werden die Tiere durch i.p. Injektion von Mebumal bzw. Pentobarbital-Natrium-Lösung (60 mg/kg KG) anästhesiert. Zu diesen Versuchen zählen die Implantation von Kathetern, die anschließende Verabreichung von humanem Serumalbumin (HSA) und die Gabe von Dextranen bzw. Cetuximab zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der HSA-Injektion. Barbiturate haben vor allem eine depressive Wirkung auf den sensorischen Anteil des Cortex, den Thalamus und die motorischen Zentren des Gehirns. Pentobarbital bewirkt bei geringer Dosierung eine Sedation (Plumb, 1999; Branson 2001). Eine analgetische Wirkung tritt erst bei sehr hohen Dosierungen auf, bei welchen mit Nebenwirkungen gerechnet werden muss (Branson, 2001). Aus diesem Grund wird während der operativen Eingriffe, zur Katheterisierung der *Vena jugularis* und *Arteria carotis*, zusätzlich das Lokalanästhetikum Xylocain® 1% eingesetzt, um eine lokale Analgesie zu induzieren. Die Verwendung von Pentobarbital-Natrium als Anästhetikum erfolgte unter Genehmigung der zuständigen Behörde (Bundesopiumstelle).

2.2.3 Tumorimplantation und Messung des Tumorwachstums

Zur Induktion von humanen Tumoren in einem immunsupprimierten Versuchstier werden ca. 10 mm^3 große Proben von Tumorgewebe subkutan implantiert bzw. es werden $1 \cdot 10^7$ Tumorzellen in PBS-Lösung subkutan bei den Nacktmäusen wie auch den Nacktratten injiziert. In beiden Fällen werden die Versuchstiere mittels Inhalationsanästhesie für die Dauer der Behandlung betäubt. Die subkutanen Injektions- oder Implantationsstellen liegen in den durchgeführten Versuchen an den Flanken der Tiere (Abb. 2.2A; NMRI und SCID, je 2 Tumore pro Tier) oder im dorsalen Halsbereich (Abb. 2.2B; Nacktratten, 1 Tumor pro Tier). Die Injektionen selbst werden in einem möglichst gleichmäßigem Tempo durchgeführt, wobei darauf zu achten ist, dass die Tumorzellsuspension nicht zu schnell injiziert wird. Für den Fall, dass es zu einer kleinen Blutung im Bereich der Injektionsstelle kommt, liegen Wattetupfer bereit.

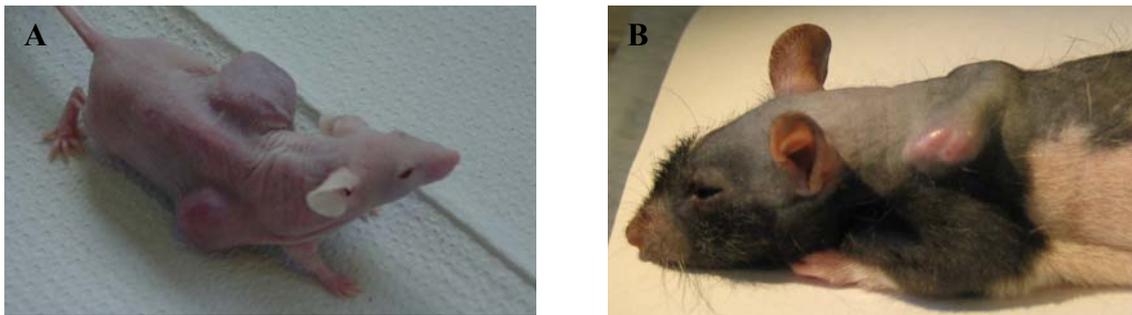


Abb. 2.2: Lage der subkutane Implantations- oder Injektionsstellen der Versuchstiere. A) NMRI-Maus mit lateralen A431 Tumoren; B) Rowett Nacktratte mit dorsalem A431 Tumor im Nackenbereich.

Im Verlaufe dieser Dissertation sind beide Verfahren zur Generierung von Xenograft-Modellen angewandt worden. Dabei hat die Art der Induktion (Injektion bzw. Implantation) keinerlei Auswirkung auf die Geschwindigkeit des späteren Tumorwachstums. Ein großer Vorteil der Injektionstechnik ist jedoch, dass das Tier nur für eine sehr kurze Zeitspanne (ca. 20-30 s) anästhesiert sein muss und damit geringerem Stress ausgesetzt ist. Im Gegensatz hierzu erfordert die Implantation von Tumorfragmenten einen höheren Zeitaufwand, zudem muss die Implantationsöffnung geklammert oder genäht werden. Das Tier ist in diesem Fall einem verstärkten Stress ausgesetzt. Die Versuchstiere wurden während der Tumordinokulation auch markiert, um später eine korrekte Zuordnung der Tumorgrößen bzw. des TIFP zu den jeweiligen Tieren machen zu können. Zu diesem Zweck wurden die Nacktmäuse mit nummerierten Ohrclips versehen, während die Nacktratten durch Buchstabenmarkierungen auf ihrem Schwanz markiert worden sind.

Ungefähr 1-2 Wochen nach der Injektion der Tumorzellen bzw. der Implantation des Tumorgewebes wird der wachsende Tumor unter der Haut der Versuchstiere sichtbar. Hat der Tumor ein Ausgangsvolumen von ca. 14 mm^3 (dies entspricht einer Seitenlänge des Tumors von 3 mal 3 mm) erreicht, lässt sich die Tumorgröße mittels einer Schieblehre messen und das Volumen des Tumors berechnen. Zur Berechnung des Tumolvolumens ist die Formel $\Pi/6 \cdot a \cdot b^2$ (wobei b immer der kleinere Messwert ist) verwendet worden (Baumann et al., 2001). Die Messungen der Tumorgröße erfolgt alle drei Tage, wobei die Tiere in einem Narkosetopf überführt und kurzzeitig (ca. 30 s) für die Messung mit Isofluran betäubt werden.

2.2.4 Messung des TIFP

2.2.4.1 Wick-in-needle-Technik (Fadnes et al., 1977)

Materialien:

SensoNor840 medizinischer Drucksensor	(Fa. SensoNor, Horten, Norwegen)
Differentialmanometer	(Fa. Fisher Scientific, Schwerte)
Verstärker und Schreiber	(Fa. Gould (LDS), Ismaning)
Katheterschlauch (PE50)	(Fa. VWR, Darmstadt)
Kanülen (23G)	(Fa. Dispomed, Gelnhausen)

Die Technik beruht auf dem Prinzip, den TIFP über einen flüssigkeitsgefüllten Schlauch, verbunden mit einem Differentialmanometer, mittels einer Kanüle zu messen. Für die Messungen werden Kanülen der Größe 23G verwendet, in die unter mikroskopischer Kontrolle auf der geschlossenen Seite ein ca. 5 mm großes Loch gebohrt wird. Das Ende der Kanüle wird anschließend abgeschnitten und in einen Katheterschlauch geschoben. Der Katheter wird luftfrei mit heparinisierter physiologischer Kochsalzlösung gefüllt und an einen Drucksensor (Typ SensoNor840) angeschlossen. Die Aufzeichnung der Messergebnisse erfolgt über einen angeschlossenen Verstärker mit Schreiber. Vor Beginn der Messung wird die Messapparatur gegen Luft sowie eine Flüssigkeitssäule (bekannter Höhe) geeicht, um die späteren Messwerte korrekt zuordnen zu können. Die Messung des TIFP erfolgt nach erfolgreicher Eichung durch Insertion der Messkanüle in den Tumor. Nach dem Erreichen eines stabilen TIFP-Messwertes wird der Katheterschlauch mittels einer Schraubklemme abgeklemmt. So kann überprüft werden ob die Kanüle möglicherweise durch koaguliertes Blut verstopft ist. Sollte die Flüssigkeitskommunikation zwischen tumorinterstitieller Flüssigkeit und jener in der Kanüle bzw. im Katheter nicht unterbrochen sein, führt das Abklemmen des Katheters zu einem, vom Schreiber aufgezeichneten, starken Druckanstieg.

Das anschließende Öffnen der Klemme muss zu einem rapiden Druckabfall führen, der sich letztlich wieder auf den Messwert des TIFP einpendeln muss. Führt das Abklemmen des Katheters zu keiner Druckerhöhung bzw. das Öffnen der Klemme zu keinem Druckabfall, ist davon auszugehen, dass die Kanüle bzw. der Katheter verstopft ist. Eine Messung ist somit nicht ohne vorherige Reinigung und Durchspülen des Messsystems möglich. Die TIFP-Messungen werden akzeptiert, sofern die Abweichungen, vor und nach dem Abklemmen des Katheters gemessen, weniger als 0,5 mmHg betragen.

Die Vorteile der *wick-in-needle*-Technik gegenüber der nachfolgend beschriebenen *micropuncture*-Technik ist das relativ einfache experimentelle Setup und die Möglichkeit auch in tieferen Gewebeschichten interstitielle Flüssigkeitsdrücke zu messen.

2.2.4.2 *Micropuncture*-Technik (Intaglietta et al., 1979; Wiig et al., 1981)

Materialien:

SensoNor840 medizinischer Drucksensor	(Fa. SensoNor, Horten, Norwegen)
Differentialmanometer	(Fa. Fisher Scientific, Schwerte)
Verstärker und Schreiber	(Fa. Gould (LDS), Ismaning)
Katheterschlauch (PE50)	(Fa. VWR, Darmstadt)
Kanülen (23G)	(Fa. Dispomed, Gelnhausen)
Borosilikatglas Kapillaren (GC100-15)	(Fa. Harvard Apparatus, Edenbridge, UK)
Pipettenziehgerät P87	(Fa. Shutter Instruments, Novato, USA)
Microbeveller	(Fa. World Precision Instr., Sarasota, USA)
Mikromanipulator	(Fa. Leitz, Wetzlar)
Evans-Blue	(Fa. Merck, Darmstadt)

Bei dieser Technik wird der TIFP mittels Mikropipetten gemessen, welche über ein servo-kontrolliertes Gegendrucksystem mit einem Drucksensor verbunden sind. Die Vorteile dieser Messmethode im Vergleich zur *wick-in-needle*-Technik liegen darin begründet, dass die *micropuncture*-Technik a) nur geringe Flüssigkeitsvolumina benötigt, b) nur minimale Schäden im Gewebe verursacht, c) ein schnelle Antwort des Systems auf Druckschwankungen aufzeigt und d) sehr gut reproduzierbare Messungen generiert.

Aus Borosilikatglas-Kapillaren (1 mm OD / 0,58 mm ID) werden unter Verwendung eines horizontalen Pipettenziehgerätes (P-87) Mikropipetten hergestellt. Die Pipetten werden anschließend unter mikroskopischer Kontrolle an einem Microbeveller beschnitten und

angeschliffen. Die fertigen Pipetten haben an der Spitze einen Durchmesser von ca. 5-20 μm und werden vor dem Messeinsatz über einen dünnen PE-Schlauch mit filtrierter Evans-Blue-Lösung luftfrei befüllt.

Zur TIFP-Messung wird die Mikropipette an einem Mikromanipulator befestigt und an ein Gegendrucksystem mit servo-kontrollierter Steuerungseinheit angeschlossen. Die Steuerung beinhaltet eine Wheatstone-Brücken-Schaltung und überwacht eine Pumpe, welche einen Gegendruck zum interstitiellen Flüssigkeitsdrucks generiert. Der erzeugte Gegendruck wird während der Messung von einem Drucksensor, der an einem Verstärker und Schreiber angeschlossen ist, gemessen.

Die servo-kontrollierte Steuerungseinheit misst die Konduktivität der Flüssigkeit in der Spitze der Mikropipette, welche höher ist als die Konduktivität von Plasma oder interstitieller Flüssigkeit. Das gesamte Messsystem basiert auf dem Prinzip, dass eine Veränderung der Elektrolytzusammensetzung innerhalb der Spitze der Mikropipette zu einem messbaren Unterschied des elektrischen Widerstandes führt. Wird die Mikropipette in physiologische Kochsalzlösung getaucht und die Pumpe induziert einen geringen Unterdruck an der Spitze, so wird der elektrische Widerstand zunehmen, da die Kochsalzlösung in die Mikropipette hineingesaugt wird. Nach dem gleichen Prinzip erfolgt die Messung im Gewebe. Wird die Mikropipette in ein Blutgefäß eingebracht, kommt es aufgrund des hohen Drucks im Gefäß zum Eindringen von Serum in die Spitze und ein erhöhter elektrischer Widerstand ist messbar. Im Messmodus verhindert das Gegendrucksystem aktiv das Eindringen von Gewebeflüssigkeit oder Serum, so dass der elektrische Widerstand in der Pipette konstant bleibt. Da die Mikropipette einen Teil eines Arms der Wheatstone-Brücken-Schaltung bildet, induziert eine Verschiebung des elektrischen Widerstandes in der Pipettenspitze eine Fehlerspannung. Der interstitielle Flüssigkeitsdruck, der vom Messsystem aufgezeichnet wird, ist in Realität der Gegendruck, der von der Pumpe erzeugt wird, um den elektrischen Widerstand in der Pipettenspitze durch das Eindringen von Gewebeflüssigkeit wiederherzustellen. Der Druck wird von einem auf die Pumpe montierten Drucksensor gemessen und ist an einen Verstärker mit Schreiber angeschlossen. Der in der Pumpe erzeugte Gegendruck wird über ein System von paraffinölgefüllten Silikonschläuchen auf die Flüssigkeit in der Mikropipette übertragen. Paraffinöl verwendet man, da es eine nur sehr geringe elektrische Leitfähigkeit besitzt. Nachfolgende Abbildung 2.3 gibt eine Übersicht über das gesamte Setup der *micropuncture* TIFP-Messung.

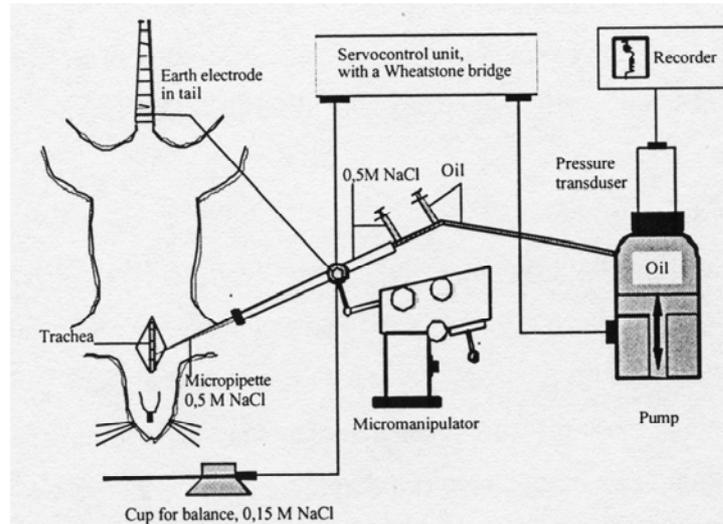


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des experimentellen Setup zur Messung des TIFP mittels *micropuncture*-Methode. Das dargestellte Beispiel zeigt eine Messung an der Trachea. Die von mir durchgeführten Messungen des TIFP wurden an Tumoren durchgeführt, bedingten aber keine Änderungen dieses Versuchsaufbaus. Entnommen aus Gjerde, 2001.

Während der Messung ist darauf zu achten, dass es beim Einstechen der Mikropipette in das Gewebe zu keiner Kompression kommt. Eine Kompression könnte interstitielle Flüssigkeit in die Spitze der Mikropipette pressen und einen verfälschten Messwert erzeugen. Der umgekehrte Fall kann auftreten, wenn die Mikropipette aus dem Gewebe gezogen wird. Aus diesem Grund erfolgt die Platzierung und genaue Justierung der Mikropipette mittels Mikromanipulator unter permanenter stereoskopischer Kontrolle. Hierbei zeigt sich auch der große Nachteil dieser Technik. Es ist leider nicht möglich Messungen in tieferen Gewebeschichten durchzuführen, sondern maximal einige Millimeter tief. Eine weitere Schwierigkeit dieser Methode ist die Atmung des narkotisierten Versuchstieres. Wie sich auch in meinen Versuchen gezeigt hat, ist eine Beeinflussung der Messergebnisse nicht immer vollständig ausgeschlossen. Durch die Atmung bewegt sich der gesamte Tumor, die Mikropipette wird passiv durch das Auf und Ab des Tumors bewegt und Flüssigkeit kann in die Spitze hinein oder heraus gepresst werden.

2.2.5 Senkung des TIFP

Materialien:

Redon-Mini-Drain	(Fa. pfm, Köln)
Kraneinheit	(Fa. CMA Microdialysis, Solna, Schweden)
Kanülen	(Fa. Dispomed, Gelnhausen)

Zur Untersuchung, des TIFP-Einflusses auf die Zellphysiologie der Tumorzellen muss der TIFP in Tumoren reduziert werden können, um sie mit unbehandelten Kontrolltumoren zu vergleichen. Im Rahmen dieser Dissertation sind verschiedene Verfahren angewandt worden, um den TIFP zu senken:

2.2.5.1 Tumorpunktion:

Zur Reduktion des TIFP werden die Versuchstiere (nur Nacktmäuse) mit Isofluran narkotisiert und es wird eine Kanüle in den Tumor eingeführt. Durch den hohen TIFP kann es zur selbstständigen Entleerung des Tumors kommen. Aus der Kanüle bzw. der Öffnung, welche durch die Kanüle in den Tumor gestochen ist, strömt interstitielle Flüssigkeit. In Folge dessen kommt es zu einer sofortigen mechanischen Entlastung des Tumors und er fällt z.T. komplett in sich zusammen, da die stabilisierende Wirkung des TIFP weggefallen ist. Am Ende kann durch kurzzeitiges Zusammenpressen des Tumors auch noch der verbleibende Rest an interstitieller Flüssigkeit aus dem Tumor herausgepresst werden.

2.2.5.2 Redon-Mini-Drain:

Die Reduktion des TIFP über einen längeren Zeitraum wird an den Nacktmäusen durch die intratumorale Implantation eines Redon-Mini-Drain erreicht. Der Redon-Mini-Drain besteht aus einem kleinen Saugball und einem sich daran anschließenden Schlauch. Das Funktionsprinzip des Drains beruht darauf, dass durch Unterdruck innerhalb des Saugballs die tumorinterstitielle Flüssigkeit über den Drainageschlauch abgesaugt und der TIFP gesenkt wird. Im ersten Arbeitsschritt muss der Drainageschlauch in der zentralen Zyste des Tumors implantiert werden. Hierzu wird die Haut über dem Tumor des anästhesierten Versuchstieres aufgeschnitten und eine Kanüle in den Tumor geschoben und unmittelbar danach wieder herausgezogen. Durch die entstandene Öffnung kann anschließend der Drainageschlauch in die Zyste des Tumors eingeführt werden. Direkt oberhalb des Eintrittspunkts des Drainageschlauches in den Tumor wird ein Klebestreifen befestigt. Die Wunde wird anschließend mit chirurgischem Nahtmaterial zugenäht, wobei der Drainageschlauch dadurch

fixiert wird, dass der am Schlauch befestigte Klebestreifen mit der Haut vernäht wird. Darauf folgend wird der Saugball im zusammengepressten Zustand an den Drainageschlauch angeschlossen. Dies ist notwendig, da die Erzeugung des Unterdrucks durch das Zusammendrücken des Saugballs erfolgt. Nach dem Anschließen des Saugball an den Drainageschlauch kann der Saugball losgelassen werden und es wird tumorinterstitielle Flüssigkeit aus dem Tumor abgesaugt und im Saugball aufgefangen. Dieser Prozess stoppt sobald die Zyste geleert ist. Sammelt sich im Laufe der Zeit erneut interstitielle Flüssigkeit in der Zyste wird sie sofort abgesaugt. Dadurch wird es ermöglicht den Tumor über mehrere Stunden vom TIFP zu entlasten und die Auswirkung dieser länger andauernden Tumorentlastung zu untersuchen. Um die Versuchstiere während des Versuches nicht für längere Zeiträume in Narkose belassen zu müssen, ist der Saugball an einem um 360° drehbaren Kranarm befestigt, so dass die aktiven Tiere trotz des Drainageschlauches in ihrem Käfig herumlaufen und Futter sowie Wasser zu sich nehmen können. Einzig auf eine Pappschachtel als Unterstand muss verzichtet werden, da der Drainageschlauch an dieser hängen bleiben und aus dem Tumor gezogen werden könnte.

2.2.5.3 Senkung des kolloidosmotischen Drucks

Die dritte Möglichkeit zur Senkung des TIFP besteht in der intravenösen Applikation von humanem Serumalbumin (HSA), um eine Beeinflussung des Tumorgewebes durch Punktion zu vermeiden. Durch die i.v. Injektion von HSA kommt es im vaskulären System der Versuchstiere zu einem starkem Anstieg des kolloidosmotischen Flüssigkeitsdruckes (COP). Zum Ausgleich dieses hohen osmotischen Gradienten wird Wasser aus dem gesamten Gewebe und Tumor des Tieres in das Gefäßsystem abgegeben. In Folge der Flüssigkeitsabgabe reduziert sich der TIFP im Tumor.

2.2.6 Intravenöse Injektionen und Intravitalmikroskopie

Materialien:

Intravital-Mikroskop (mit HBO100 Fluoreszenzlampe)	(Fa. Zeiss MicroImaging, Göttingen)
Sony DXC-390 P CCD-Kamera	(Fa. AVT-Horn, Aalen)
IR-Lampe (Solilux)	(Fa. Heraeus, Hanau)
Kanülen (30G)	(Fa. DispoMed, Gelnhausen)
Perfusor	(Fa. B. Braun, Melsungen)
Perfusorspritze (50 ml)	(Fa. B. Braun, Melsungen)
Dextrane (FITC, TRITC, Alexa488, Alexa680)	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

humanes Serumalbumin (20%, 200 g/l)	(Fa. Baxter, Unterschleißheim)
Ultraschallgel	(Fa. Blutspendedienst, Frankfurt) (Fa. Tüshaus, Velen-Ramsdorf)
Objektträger/Deckgläser	(Fa. Marienfeld, Lauda)
mikroskop. Immersionsöl	(Fa. Merck, Darmstadt)

2.2.6.1 Intravenöse Injektionen

In den tierexperimentellen Versuchen zur Fragestellung, ob ein reduzierter TIFP die Aufnahme von makromolekularen Markersubstanzen in den Tumor erhöht, müssen intravenöse Injektionen an den Versuchstieren durchgeführt werden.

Es wurden zwei verschiedene Techniken zur i.v. Applikation von Substanzen im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt: a) *tail-vein-injection* (Schwanzvenen-Injektion) und b) i.v. Injektion über Katheter.

a) *Tail-vein-injection* (nur Nacktmäuse)

Bei dieser Methode wird dem Versuchstier die Markersubstanz direkt über eine Kanüle in die Schwanzvene injiziert. Vor der Injektion wird der Schwanz der Maus mit einer IR-Lampe bestrahlt, so dass es zu einer Vasodilation aufgrund der Wärmeeinwirkung kommt. Die Chance einer erfolgreichen Injektion wird erhöht, da auf diese Weise das Venenvolumen vergrößert und dadurch die Vene besser sichtbar wird. Die Schwanzvenen-Injektion kann sowohl an nicht anästhesierten Tieren mittels einer selbstgebauten Apparatur (bestehend aus einem Falcon-Röhrchen und einer Halterung) als auch an anästhesierten Tieren durchgeführt werden. Bei den Experimenten in Frankfurt erfolgen die Injektionen ausschließlich an narkotisierten Tieren. Im betäubten Zustand ist die Bestrahlung mit der IR-Lampe von noch größerer Bedeutung, denn die venösen Gefäße verkleinern sich aufgrund der reduzierten Stoffwechselaktivität während der Betäubung. Es muss jedoch darauf geachtet werden, dass die Bestrahlung nicht zu lange erfolgt und das Versuchstier keine Schäden durch eine Hyperthermie davonträgt. Durch die Betäubung sind auch die natürlichen Schutz- und Reflexmechanismen unterbunden. Injektionen an nicht-narkotisierten Tieren wurden nur zum Erlernen der Technik und während der Dextran-Aufnahme-Studien an der Universität Bergen durchgeführt.

b) Injektion über Katheter (nur Nacktratten)

In den späteren Versuchen, in welchen den Versuchstieren nicht nur die Markersubstanz, sondern zur Senkung des TIFP humanes Serumalbumin i.v. verabreicht wird, erfolgt die i.v.

Applikation über einen Katheter in der *V. jugularis* (siehe Kap. 2.2.9). Die Injektion der Substanzen erfolgt über eine direkt an den Katheter angeschlossene Tuberkulinspritze (für Dextrane) bzw. über einen Perfusor (für HSA). Vor dem Anschließen der Spritze oder des Perfusors muss der Katheter mit einem Nadelhalter abgeklemmt werden. Beim Anschließen des Katheters ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen bilden, welche in die Vene des Versuchstieres injiziert werden könnten. Über einen Zeitraum von 1 h werden 5 ml HSA injiziert, was einem Volumen von 83,3 $\mu\text{l}/\text{min}$ entspricht. Zur Injektion wird das HSA in eine Perfusorspritze aufgezogen und diese wird über einen Schlauch mit Dreiwegehahn an den Katheter zur i.v. Applikation angeschlossen.

2.2.6.2 Intravitalmikroskopie

Zur Kontrolle, ob die i.v. Injektion der fluoreszenzgekoppelten Dextrane erfolgreich verläuft, werden die Versuchstieren mittels Intravitalmikroskopie (IVM) untersucht. Dabei werden die Blutgefäße eines Ohres der narkotisierten Nacktmäuse während der Injektion der Dextrane mikroskopiert. Dies ist jedoch nur an Nacktmäusen aufgrund der geringen Dicke und fehlenden Behaarung der Ohren möglich. Die Ohren der Ratten sind zu dick, um eine IVM durchzuführen. Das Ohr wird zum Mikroskopieren auf einen Objektträger gelegt, einem Tropfen Immersionsöl benetzt und mit einem Deckgläschen bedeckt. Auf das Deckgläschen wird noch eine geringe Menge Ultraschallgel aufgetragen. Anschließend kann unter visueller Kontrolle, sowohl über das Okular als auch über einen mit einer CCD-Kamera verbundenen Computer, das Objektiv des Mikroskops eingestellt werden, so dass die Ohrgefäße klar dargestellt werden. Das Objektiv muss dabei in das Ultraschallgel eingetaucht sein, um ein gutes mikroskopisches Bild anzeigen zu können (Abb. 2.4). Die Injektion der fluoreszenten Dextrane ist mittels IVM-Kontrolle sehr gut und einfach zu sehen, da sich alle Gefäße in kurzer Zeit mit dem Fluoreszenzmarker färben.

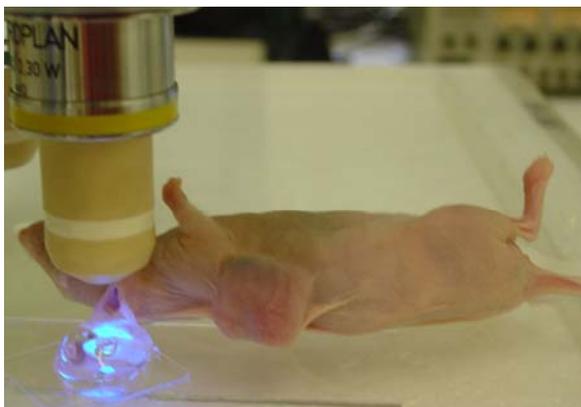


Abb. 2.4: IVM an einer NMRI-Nacktmaus.

Das Ohr der Maus befindet sich unter einem Deckgläschen. Das Objektiv des Fluoreszenzmikroskops muss bis auf das Deckgläschen heruntergefahren werden.

2.2.7 Legen von Kathetern

Materialien:

Vannas-Schere	(Fa. Aeskulap, Tuttlingen)
Präparier-Schere	(Fa. FST, Heidelberg)
div. Pinzetten	(Fa. FST, Heidelberg)
Bulldog-Klemmen	(Fa. FST, Heidelberg)
Nadelhalter	(Fa. FST, Heidelberg)
Kanülen (23G)	(Fa. DispoMed, Gelnhausen)
Katheterschläuche	(Fa. VWR, Darmstadt)
chirurg. Nahtmaterial (Vicryl Ethicon)	(Fa. Johnson & Johnson, Düsseldorf)
Temperatur-kontrollierte Heizmatte	(Fa. Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) (Fa. Provet, Lyssach, Schweiz)
physiol. Kochsalzlösung	(Fa. B. Braun, Melsungen)
Heparin (Liquimin N®)	(Fa. Hoffmann-La Roche, Grenz.-Whylen)
Mebumal (Wirkstoff: Pentobarbital-Natrium)	(Svåne Apotek, Bergen, Norwegen)
Pentobarbital-Natrium (Wirkstoff: 5-Ethyl-5-1-[1-methylbutyl]2,4,6-trioxohexahydropyrimidine)	(Fa. Sigma, Taufkirchen)
Xylocain® 1% (Wirkstoff: Lidocain (2-(diethylamino)-N-(2,6-dimethyl-phenyl)-acetamid))	(Fa. AstraZeneca, Wedel)
Tuberkulinspritzen (1 ml)	(Fa. Codan, Lensahn)
Wattetupfer	(Fa. Paul Hartmann, Heidenheim)
Leukosilk	(Fa. Beiersdorff, Hamburg)
Perfusor	(Fa. B. Braun, Melsungen)
Blutdruckmessgerät	(Fa. MicroMed, Louisville, USA)

Für eine intravenöse Injektion von HSA über einen Zeitraum von 1 h zur Reduktion des TIFP ist das Legen eines intravenösen Katheters unabdingbar. In Testexperimenten hat sich die *Vena jugularis* als günstigste Zugangsstelle zum Einführen des i.v. Katheters gezeigt. Der Zugang zur *V. jugularis* erfolgt über die chirurgische Öffnung des ventralen Halses. Daneben bietet diese Öffnung auch die Möglichkeit einen zweiten Katheter intraarteriell in die *Arteria carotis* zu legen, über welchen invasiv der Blutdruck des Versuchstieres gemessen und überwacht werden kann.

Vor Versuchsbeginn erfolgt die Vorbereitung der Katheter. Hierzu werden die Katheterschläuche vorsichtig auf die Kanülen aufgeschoben und anschließend auf Tuberkulinspritzen aufgesteckt. Die Katheter werden mit physiologischer Kochsalzlösung durchspült und gefüllt. Um eine Verstopfung der Katheter durch agglutinierendes Blut zu verhindern und dadurch die Gewährleistung der Funktion aufrecht zu erhalten, muss die physiologische Kochsalzlösung mit Heparin versetzt sein. Die offenen Enden der Katheter werden mit einem Skalpell schräg angeschnitten, um das spätere Einschleiben in die Vene bzw. Arterie zu erleichtern. Hierbei ist jedoch darauf zu achten, dass das angeschnittene Ende nicht zu spitz zuläuft, da dies die Gefahr des Durchstechens der Gefäße erhöht. Um ein zügiges Arbeiten zu ermöglichen, empfiehlt es sich vor Versuchsbeginn alle benötigten chirurgischen Bestecke gut sortiert und griffbereit zu platzieren (Abb. 2.5).



Abb. 2.5: Chirurgisches Besteck.

Alle dargestellten Substanzen und Gerätschaften werden zur Katheterimplantation benötigt.

Der chirurgische Eingriff beginnt mit der Anästhesie des Versuchstieres durch i.p. Injektion von Mebumal bzw. Pentobarbital-Natrium Lösung (60 mg/kg KG). Anschließend wird das Versuchstier auf dem Rücken liegend auf die mit Papiertüchern abgedeckte Heizmatte gelegt. Um eine Überhitzung bzw. Unterkühlung des Versuchstieres zu verhindern, wird die Temperatur der Heizmatte über eine Rektalsonde abhängig von der Körpertemperatur des Versuchstieres reguliert. Die Rektalsonde wird mit einem Klebestreifen am Schwanz des Tieres fixiert. Zur Überprüfung, ob sich das Versuchstier bereits in tiefer Betäubung befindet wird mit einer Pinzette die Interdigitalhaut gereizt. Kommt es dabei noch zu einem Beinrückziehreflex, so ist die Anästhesie des Tieres noch nicht ausreichend. Bleibt der Reflex hingegen aus, so kann mit dem Eingriff begonnen werden.

Zunächst erfolgt die Eröffnung der Haut durch einen kleinen Einschnitt auf der Höhe des Kehlkopfes. Mit der Präparierschere wird das Binde- und Fettgewebe von der darüber

liegenden Haut getrennt. Anschließend wird mit der Schere die Öffnung beidseitig zu den Flanken hin vergrößert (Abb. 2.6A). Dies erfolgt nicht durch Aufschneiden der Haut, sondern durch subkutanes Spreizen der Präparierschere. Um zu verhindern, dass bei der weiteren Eröffnung des Binde- und Fettgewebes vermehrt Blutgefäße beschädigt werden, wird anstatt der Präparierschere ein Nadelhalter verwendet. Mit dem Nadelhalter wird das Gewebe solange eröffnet, bis die *V. jugularis* zu erkennen ist (Abb. 2.6B). Es folgt die komplette Freilegung der *V. jugularis* unter Verwendung von Pinzetten. Dabei ist darauf zu achten, dass sich möglichst kein Bindegewebe mehr an der Vene befindet, da dies das spätere Eröffnen der Vene erschweren würde. Zur Lokalanästhesie wird in unregelmäßigen Abständen immer wieder Xylocain® 1% in die Wunde geträufelt. Die *V. jugularis* wird im nächsten Schritt in Strömungsrichtung des Blutes möglichst weit distal mit einem Faden abgebunden. In Strömungsrichtung, am proximalen Ende der freigelegten *V. jugularis*, wird mit einem zweiten Faden ein Knoten vorbereitet (Abb. 2.6C). Dieser Knoten dient nach dem Einschleiben zur Fixierung des Katheters. Vor dem Einbringen des Katheters ist darauf zu achten, dass sowohl der i.v. als auch der i.a. Katheter mit Heparin-haltiger physiologischer Kochsalzlösung befüllt worden ist. Mit der Vannas-Schere wird anschließend in Strömungsrichtung distal der Ligatur ein kleines Loch in die Vene geschnitten, durch welches der Katheter vorsichtig, bei leichter Dehnung der Vene, eingeschoben wird. Anschließend erfolgt die Fixierung durch das Zuziehen des zweiten Fadens (Abb. 2.6D). Durch vorsichtiges Aufziehen der angeschlossenen Tuberkulinspritze lässt sich überprüfen ob der Katheter korrekt sitzt. Bei richtiger Einbringung des Katheters muss sich venöses Blut in den Katheter ziehen lassen. Der Katheter wird an der Unterlage, auf der die Ratte liegt, mit einem Klebestreifen fixiert, so dass er sich nicht durch Bewegungen, die im weiteren Verlauf der Operationen auftreten können, lösen kann. Im nächsten Schritt erfolgt das Legen eines zweiten Katheters in die *A. carotis*. Hierzu muss die *A. carotis* im Muskelgewebe, das die Trachea umgibt, freigelegt werden. Zunächst wird durch Spreizen mit dem Nadelhalter eine Eröffnung des Muskelgewebes vorgenommen, ehe die *A. carotis* mit Hilfe der Pinzetten freigelegt wird. Die Arterie wird vom umgebenden Bindegewebe und den engangliegenden Nervenfasern mittels Pinzetten freipräpariert (Abb. 2.6D). Danach erfolgt auch hier das Setzen einer Ligatur, in Strömungsrichtung, am proximalen Ende der *A. carotis* ebenso wie das Vorbereiten eines zweiten chirurgischen Knotens, in Strömungsrichtung, am distalen Ende der freigelegten Arterie zur späteren Sicherung des Katheters. Im Gegensatz zur Vene muss die Arterie vor dem Aufschneiden einer kleinen Öffnung, die zum Einschleiben des Katheters dient, mit einer Bulldog-Klemme in Strömungsrichtung distal abgeklemmt werden

(Abb. 2.6E). Danach kann mittels Vannas-Schere proximal der Ligatur eine kleine Öffnung in die *A. carotis* geschnitten werden. Durch diese Öffnung entleert sich zunächst das Blut, welches sich im abgeklemmten Bereich der Arterie befunden hat. Im folgenden Schritt wird der Katheter bis zur Bulldog-Klemme in die *A. carotis* vorgeschoben. Der Katheter wird nun mit einer Pinzette fixiert, die Bulldog-Klemme entfernt und in Strömungsrichtung distal ihrer vorherigen Position nochmals auf die Arterie gesetzt. Der Katheter kann jetzt noch tiefer in die *A. carotis* eingeschoben und mit dem zweiten Faden in der Arterie fixiert werden. Danach wird die Bulldog-Klemme gelöst und das arterielle Blut sollte ungehindert von selbst in den vorderen Bereich des Katheters strömen (Abb. 2.6F).

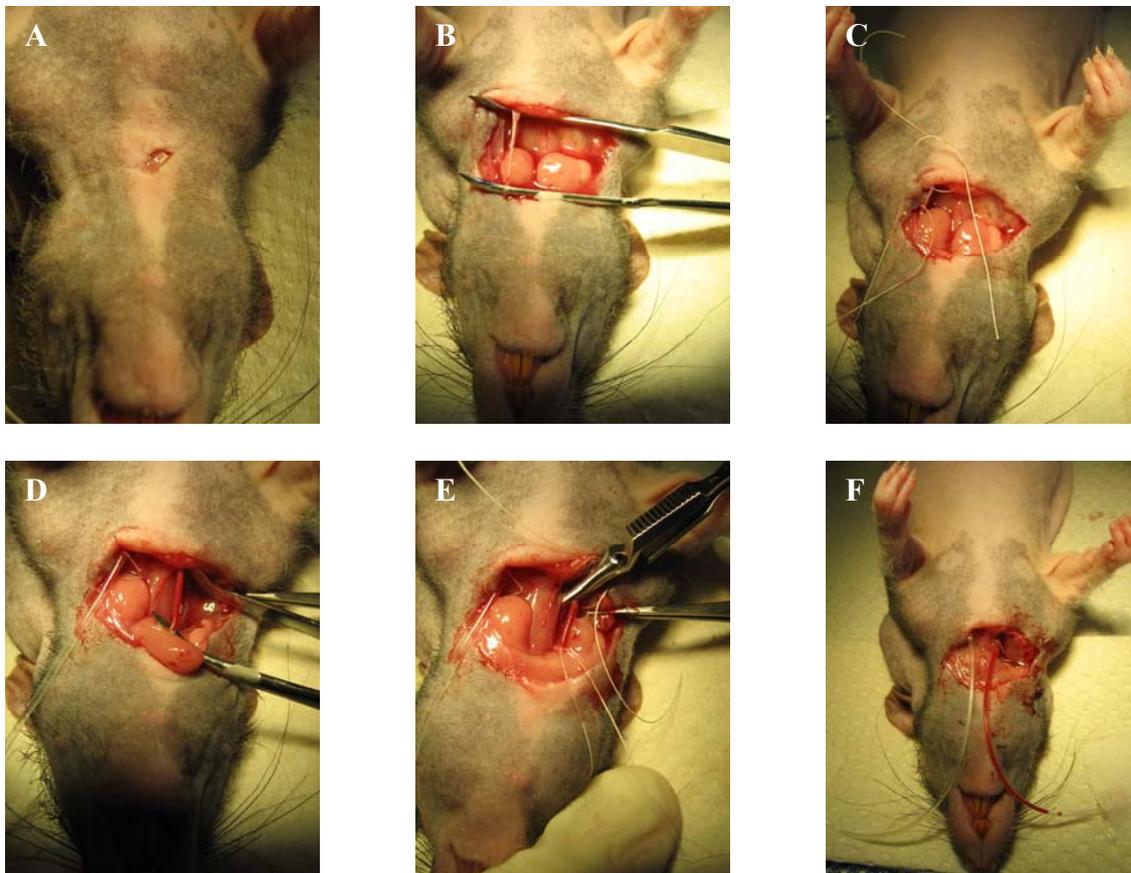


Abb. 2.6: Legen eines i.v. und i.a. Katheters bei einer Rowett-Nacktratte. A) Eröffnung der Haut durch einen Einschnitt auf Höhe des Kehlkopfes; B) Freilegen der *V. jugularis*. C) Vorbereiten der hinteren Ligatur an der *V. jugularis*; D) Fixierter i.v. Katheter in der *V. jugularis* und Freilegung der *A. carotis*; E) Abklemmen der distalen *A. carotis* mittels Bulldog-Klemme nach dem Setzen der vorderen Ligatur; F) fixierte i.v. und i.a. Katheter in *V. jugularis* und *A. carotis*

Sind beide Katheter gelegt, werden sie an das invasive Blutdruckmessgerät (i.a. Katheter) bzw. an den Perfusor (i.v. Katheter) zur Infusion von HSA angeschlossen. Dazu werden die Katheter mit dem Nadelhalter abgeklemmt, die Spritzen entfernt und über die Kanülen an den

Katheterenden an die jeweiligen Geräte angeschlossen. Zuvor muss aber der Perfusor vorbereitet und das Blutdruckmessgerät vor dem Anschließen des i.a. Katheters kalibriert worden sein.

2.2.8 GE eXploreOptix-Scanner

Materialien:

GE eXploreOptix-Scanner	(Fa. ART, Saint Laurent, Kanada)
Dextrane (Alexa680; 10 kD)	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
humanes Serumalbumin (20%, 200 g/l; 4%, 40 g/l)	(Fa. Octapharm, Lachen, Schweiz)

Zur Untersuchung der Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Dextranen in den Tumor konnte in Kooperation mit dem Institut für Biomedizin und dem Zentrum der Hämatologie des Instituts für Innere Medizin der Universität Bergen das eXploreOptix Imaging-System der Fa. ART eingesetzt werden. Die Funktion des Gerätes basiert auf dem *time-domain optical imaging* und dient zur Charakterisierung, Visualisierung sowie Quantifizierung von zellulären, wie auch molekularen Vorgängen in lebenden Tieren. Voraussetzung für die Anwendung dieser Technik ist die Injektion von fluoreszenzmarkierten Proben in die Versuchstiere. Die Verteilung dieser Substanzen in den Tieren kann durch das Scannen bestimmt werden. Alle Vorgänge können in Echtzeit aufgezeichnet werden. Die Aussagekraft der so gewonnenen Information ist gegenüber den immunhistochemischen Methoden stark erhöht. Zum Einen kann der ganze Tumor betrachtet werden, nicht nur ein Ausschnitt, zum Anderen wird durch die Untersuchung nicht in die Physiologie des Tieres eingegriffen.

Im Rahmen meiner Versuche wurden SCID-Mäuse s.c. mit A431 Tumoren inokuliert. Die Experimente zur Aufnahme der fluoreszenzmarkierten Dextrane fanden bei einer Tumorgroße von 150 bis 200 mm³ statt. Bei größerem Tumolvolumen verlangsamt sich die Verteilung der aufgenommenen Dextrane und erfolgt auch nicht mehr homogen. Bei sehr großen Tumoren würde zudem die Messauflösung des Gerätes stark reduziert, da die Laserleistung mit zunehmender Gewebetiefe schwächer wird. Vor der ersten Messung müssen die Tiere rasiert und mit Enthaarungscreme behandelt werden. Da das Fell der SCID-Mäuse eine starke Eigenfluoreszenz aufweist, hätte ein unrasiertes Tier eine erhebliche Beeinträchtigung der Messergebnisse bedeutet. Die Enthaarungscreme ist notwendig damit auch kleinste Haare noch entfernt werden. Bevor die Tiere mit den jeweiligen Testsubstanzen mittels Schwanzvenen-Injektion i.v. behandelt werden, erfolgt zu Beginn des Versuches ein Hintergrundabgleich. Dafür, wie auch bei allen anderen Messungen, werden die Mäuse auf

einen beheizten Schlitten gelegt. Zur Anästhesie wird den Tieren während der gesamten Untersuchung über eine Maske ein Inhalationsanästhetikum verabreicht (Abb. 2.7). Innerhalb des Geräts kann die Maus zunächst noch per Videokamera überwacht werden. Ist die Einstellung der Messparameter (Messbereich, Laserleistung, Integrationszeit) beendet, bewegt sich der Schlitten mit dem Versuchstier in die Laserkammer. Dort wird das Versuchstier gescannt. Nach Abschluss der Messung fährt der Schlitten in die Ausgangsposition zurück und das Tier kann aus dem Gerät entnommen werden. Ein großer Vorteil in der Anwendung dieses Gerätes besteht nicht nur in der sehr detaillierten Messung der Verteilung der fluoreszenzmarkierten Dextranen im Körper des Versuchstieres, sondern auch in der Reduktion von benötigten Versuchstieren. An einer Maus können zu verschiedenen Zeitpunkten immer wieder Messungen durchgeführt werden, da die Tiere während dieser Zeitspanne mit der gut verträglichen Gasanästhesie narkotisiert sind. Mit einem Tier lässt sich die Verteilung der Dextrane zu verschiedenen Zeitpunkten über mehrere Stunden genau bestimmen.

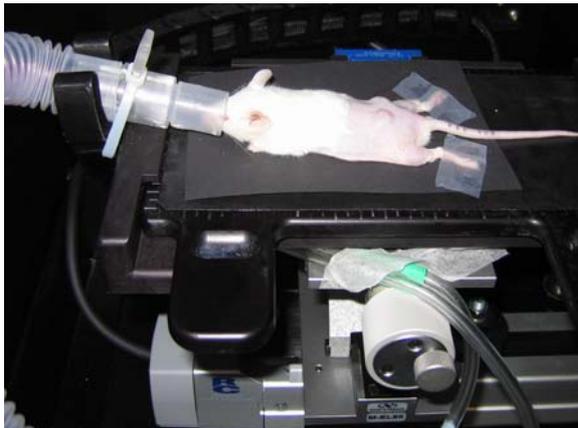


Abb. 2.7: SCID-Maus auf dem beheizbaren Schlitten des GE eXploreOptix-Scanners. Leicht erkennbar die Anästhesiemaske über der Schnauze des Tieres.

Zur Messung der Aufnahmezeit wurden in unserem Fall Alexa680-gekoppelte Dextrane eingesetzt. Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, deren Wellenlänge sich im Nah-Infrarotbereich befindet, ist bei *in vivo* Beobachtungen von Vorteil, da das Gewebe eine nur sehr geringe Absorptionsrate in diesem Wellenlängenbereich aufweist. Der zur Messung innerhalb des Spektralbandes zwischen 650 und 1100 nm eingesetzte Laser kann mehrere Zentimeter tief in das Gewebe eindringen. Das Licht wird dabei nicht sehr stark vom Gewebe absorbiert. Das bedeutet, dass der Laser des Scanners auch noch in tieferen Gewebeschichten den an die Dextrane gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff (Alexa680) anregen kann. Die langwelligen, emittierten Photonen durchdringen erneut die Gewebeschichten und werden anschließend von einem Photodetektor registriert. Die Zeitdifferenz zwischen dem

anregenden Laserpuls und der Detektion der vom Fluoreszenzfarbstoff emittierten Photonen gibt Aufschluss über die Tiefe in der sich die Probe befindet. Im Gegensatz zur Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen im Nah-Infrarotbereich würde der Einsatz von blau-markierten Proben (430-470 nm) keine genauen Messergebnisse liefern. Das Licht des zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzten Lasers würde nur wenige Millimeter tief in das Gewebe vordringen und dort auch zum größten Teil absorbiert werden. Dementsprechend könnten nur solche fluoreszente Proben aufgespürt werden, die sich in der Haut des Tieres befinden. Tieferliegende Organe (Niere, Leber, u.a.) bzw. Tumore könnten nur sehr unzureichend auf die Verteilung der fluoreszenten Farbstoffe hin untersucht werden.

2.2.9 Tötung von Versuchstieren

Nach Beendigung der experimentellen Tierversuche sind die Versuchstiere entsprechend § 9 Abs. 2 Punkt 8 des Tierschutzgesetzes (TierSchG), „unverzüglich schmerzlos zu töten“. Im nachfolgenden Abschnitt sind die angewandten Methoden zur Tötung der anästhesierten Versuchstiere aufgeführt.

Die Tötung der Nacktmäuse/SCID-Mäuse erfolgt ausschließlich durch cervikale Dislokation, wobei den Tieren eine geschlossene Schere bzw. ein anderer fester länglicher Gegenstand in den Nacken gelegt und das Tier dadurch fixiert wird. Anschließend wird die Wirbelsäule des Tieres durch das Ziehen des Schwanzes überdehnt und das Tier dadurch getötet.

Im Gegensatz zu den Nacktmäusen werden die anästhesierten Nacktratten durch die i.a. Gabe von gesättigter Kaliumchlorid (KCl)-Lösung über einen i.a. Katheter (vorher zur Messung des Blutdrucks benutzt) getötet. Diese Injektion führt ebenfalls in kürzester Zeit zum Tod des Versuchstieres. Im Falle von Komplikationen während des operativen Eingriffes, bei dem noch kein i.a. Zugang gelegt worden ist, werden die Nacktratten durch die intrakardiale Injektion von gesättigter KCl-Lösung getötet. Hierzu wird die KCl-Lösung über eine Kanüle direkt in das Herz des Tieres injiziert.

Alle im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Tierversuche an lebenden Wirbeltieren wurden gemäß §8 des TierSchG (Fassung vom 25. Mai 1998) durch die zuständige Aufsichtsbehörde (Regierungspräsidium Darmstadt) genehmigt: Genehmigungsnummern F79/18 und F79/24. Bei allen Experimenten, in denen operative Eingriffe erforderlich waren, wurden die Empfehlungen der GV-SOLAS „Operative Eingriffe bei Versuchstieren“ (Stand Mai 2001) eingehalten.

2.2.9.1 Kriterien zur vorzeitigen Tötung der Versuchstiere

Die Tierversuche wurden vorzeitig abgebrochen, sobald eines der nachfolgend aufgelisteten Kriterien während eines Experimentes aufgetreten ist:

1. Ulzeration des Tumors
2. Auftreten von Cachexie
3. Apathie
4. stark verringerte Futter- und Wasseraufnahme
5. abnormale Körperhaltung
6. Ascites mit deutlich aufgewölbter Bauchdecke
7. motorische Ausfallserscheinungen
8. auffällige Atemstörungen
9. Ausbildung von Ödemen
10. Volumen des Tumors $> 2500 \text{ mm}^3$

Beim Feststellen eines oder mehrerer dieser Kriterien wurden die Versuchstiere unverzüglich getötet.

2.2.9.2 Betäubungsmittelrechtliche Erlaubnis zum Einsatz von Pentobarbital-Natrium als Anästhetikum

Die Verwendung von Pentobarbital-Natrium als Anästhetikum in Tierversuchen ist im Rahmen dieser Dissertation durch die zuständige Aufsichtsbehörde (Bundesopiumstelle im Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Bonn) genehmigt. Die erforderliche Erlaubnis zur Teilnahme am Betäubungsmittelverkehr (§3 Betäubungsmittelgesetz, BtMG) wurde unter der Betäubungsmittelnummer 3200478 erteilt.

3. Ergebnisse

Die Gliederung des Ergebnisteils entspricht einer thematischen Zuordnung der Ergebnisse in zehn Abschnitte. Der Abschnitt 3.1 stellt die Ergebnisse der *in vitro*-Versuche dar. Die Kapitel 3.2 bis 3.10 beschäftigen sich mit den Resultaten der *in vivo*-Experimente, die in Frankfurt, Bergen und Matsuyama durchgeführt wurden. Die Abfolge der Ergebnisse unterliegt keiner strikten chronologischen Auflistung, sondern ergibt sich aus der thematischen Zuordnung der Versuchsergebnisse. Die Darstellung der *in vitro*-Ergebnisse vor den *in vivo*-Versuchen erscheint zweckmäßig, da die Ergebnisse der *in vitro*-Versuche die experimentelle Grundlage für die Etablierung von *in vivo*-Modellen darstellen. Im Verlauf der Dissertation sind *in vitro* als auch *in vivo*-Versuche z.T. simultan durchgeführt worden.

Ergebnisse, welche aus Auslandsaufenthalten stammen, sind speziell gekennzeichnet:

- (*) = Institut für Biomedizin der Universität Bergen, Bergen, Norwegen;
- (**) = Institut für Hämatologie der Universität Bergen, Bergen, Norwegen und
- (***) = Zentrum der Dermatologie der Ehime Universität, Matsuyama, Japan.

Nicht gekennzeichnete Ergebnisse wurden im Biochemischen Labor des Zentrums der Dermatologie und Venerologie in Frankfurt gewonnen.

3.1 Phosphorylierung von HSP27, Src und PKC nach mechanischer Druckbelastung

Die durchgeführten *in vitro*-Versuche sind eine direkte Fortführung der Experimente, welche im Rahmen meiner Diplomarbeit (Hofmann, 2002) begonnen wurden. In allen *in vitro*-Versuchen ist vor den jeweiligen Experimenten das serumhaltige Medium durch serumfreies Medium ersetzt worden. Damit wurde die Aktivierung von Proteinen, die an der Signalperzeption und -transduktion beteiligt sind, durch im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren u.a. vermieden. Aufbauend auf dem Ergebnis der vorangegangenen Diplomarbeit, dass mechanischer Druck zu einer Phosphorylierung von p38 MAPK und den nachfolgenden Zielproteinen MAPKAPK-2 und HSP27 führt, gilt das Interesse von weiteren Untersuchungen der Identifikation von Proteinen, die innerhalb des druckinduzierten Signaltransduktionsweg vor p38 bzw. MKK3/6 liegen.

3.1.1 Phosphorylierung von HSP27 nach mechanischer Druckbelastung

Um zu belegen, dass die durch mechanische Druckstimulation phosphorylierte p38 MAPK eine funktionelle Aktivität aufweist, wurde die Phosphorylierung des kleinen Hitzeschockproteins HSP27 in Abhängigkeit von mechanischer Druckstimulation untersucht. HSP27 ist ein bekanntes Zielprotein des p38 Signaltransduktionsweges (Ono und Han, 2000).

In Abb. 3.1.1 ist zu erkennen, dass bereits nach 10 min permanenter Druckbelastung die Phosphorylierung von HSP27 im Western Blot nachzuweisen ist. Nach einer 20minütigen Druckstimulation ist das phosphospezifische Signal von HSP27 noch stärker zu erkennen. Als Positivkontrolle für die Aktivierung des p38 MAPK Signaltransduktionsweges wurde in allen Versuchen 600 mOsm Sorbitollösung eingesetzt. Nach der Inkubation von HaCaT-Zellen mit dieser Lösung konnte eine starke Phosphorylierung von p38 MAPK und HSP27 im Western Blot nachgewiesen werden. Durch die Präinkubation der Zellen für 1 h mit den p38 MAPK spezifischen Inhibitoren (SB203580; SB 202190; 10 μ M) konnte die Phosphorylierung von HSP27 nach der permanenten Druckstimulation vollständig blockiert werden. Auf die Phosphorylierung der p38 MAPK selbst haben die Inhibitorsubstanzen jedoch keine Auswirkungen.

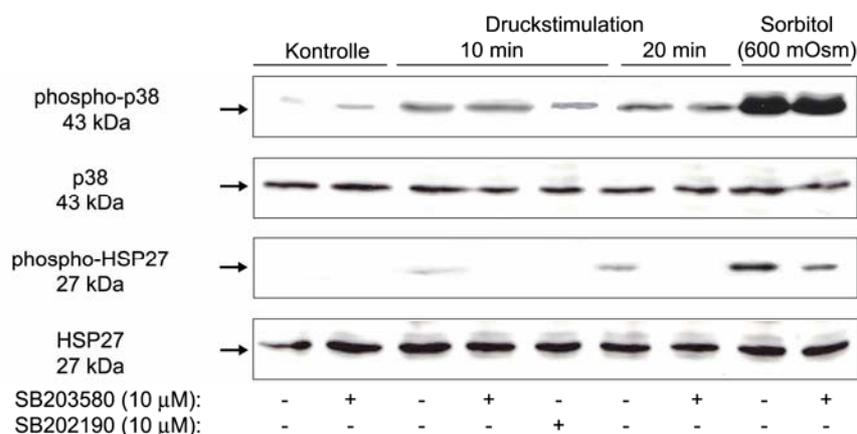


Abb. 3.1.1: Effekt der p38-spezifischen Inhibitoren SB203580 und SB202190 auf die druckinduzierte HSP27 Phosphorylierung. HaCaT-Zellen mit oder ohne Präinkubation mit p38 Inhibitoren wurden für 10 bzw. 20 min mechanischer Druckstimulation ausgesetzt. Als Positivkontrolle für die Phosphorylierung von p38 und HSP27 sind hyperosmotisch behandelte HaCaT-Zellen eingesetzt worden.

Die Ergebnisse der Western Blot Versuche konnten durch immunzytochemische Färbungen von druckstimulierten HaCaT-Zellen bestätigt werden (Abb. 3.1.2). HaCaT-Zellen wurden hierzu in Labtek-Kammern ausgesät und mit speziell auf die Größenverhältnisse der Kammern angepassten Druckgewichten mechanisch stimuliert. Im Anschluss an die Versuche wurden die Zellen für 10 min mit Paraformaldehyd fixiert und mit phospho-HSP27 Antikörpern inkubiert. Die für 10 bzw. 20 min druckbehandelten Zellen wiesen eine starke

Anfärbung des Zytosols auf (Abb. 3.1.2B/C). Die unbehandelten Zellen zeigten hingegen keine Farbreaktion und nur eine sehr geringe Hintergrundfärbung (Abb. 3.1.2A). Bei den hyperosmotisch gestressten Kontrollzellen konnte vor allem im Bereich von Zellclustern die phosphospezifische HSP27-Färbung nachgewiesen werden (Abb. 3.1.2B/C). Bei diesen Proben ist in der immunzytochemischen Färbung ebenfalls eine sehr starke Rotfärbung des Zytosols zu sehen. Die Spezifität der Farbreaktion wurde mit Zellen kontrolliert, die keine Inkubation des 1. Antikörpers bzw. des 2. Antikörpers erhielten (Abb. 3.1.2E/F). Wie zu erwarten war, weisen diese Proben überhaupt keine bzw. nur eine sehr schwache Färbung auf.

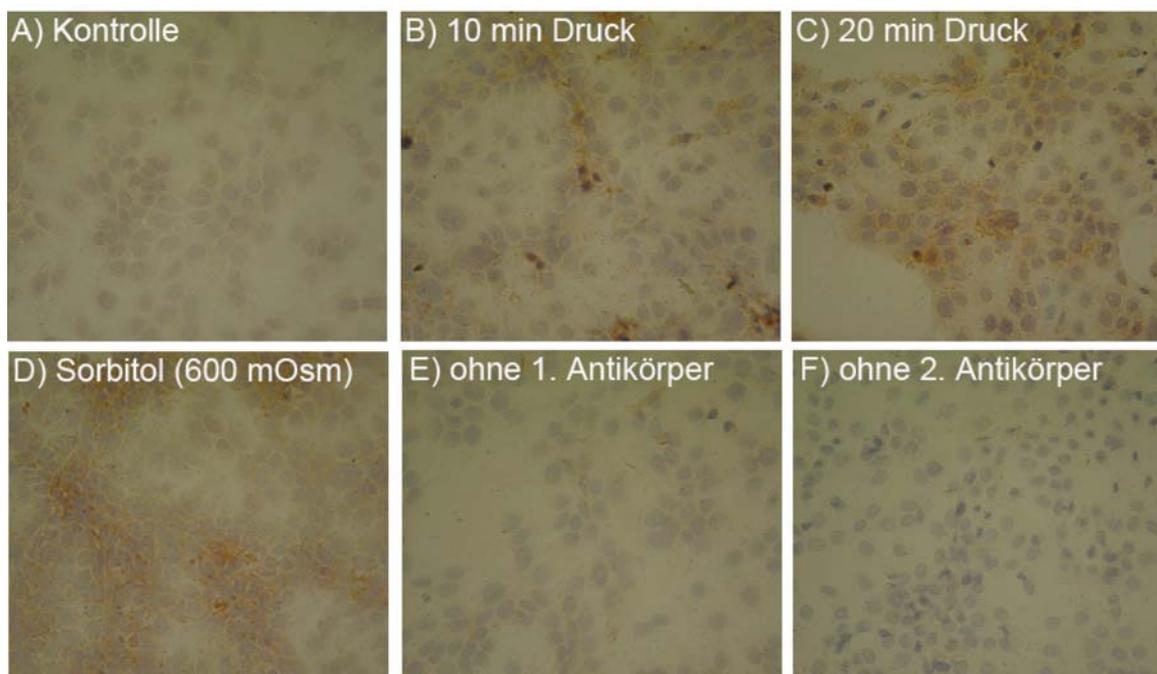


Abb. 3.1.2: Immunzytochemische Färbung gegen phospho-HSP27 in HaCaT-Zellen nach Druckstimulation oder hyperosmotischem Stress. A) unbehandelte Kontrolle; B) 10 min Druckstimulation; C) 20 min Druckstimulation; D) Inkubation mit 600 mOsm Sorbitol; E) unbehandelte Kontrolle ohne 1. AK und F) unbehandelte Kontrolle ohne 2. AK

3.1.2 Effekt der funktionellen Inhibierung von Rho-GTPasen auf die druckinduzierte p38 Phosphorylierung

Neben Effektoren wie HSP27, die in der p38 Signalkaskade *downstream* von p38 liegen, lag das Hauptinteresse der Versuche darin, Signalproteine zu identifizieren, die *upstream* von p38 eine Rolle in der Transduktionskette der mechanischen Druckreize spielen. Zunächst wurde hierzu die Rolle der Rho-GTPasen mittels Inhibitorstudien untersucht. In den Experimenten wurden HaCaT-Zellen mit dem spezifischen Rho-GTPase Inhibitor Toxin B für 2 h präinkubiert und anschließend mechanischer Druckbelastung ausgesetzt. Der Inhibitor Toxin B glykosiliert spezifisch kleine GTPasen der Rho-Familie, während Mitglieder der

Ras-GTPasen nicht beeinflusst werden (Hofmann et al., 1997). Die Ergebnisse des Western Blots (Abb. 3.1.3) demonstrieren, dass die Präinkubation der Zellen mit Toxin B keinen Effekt auf die basale und die druckinduzierte Phosphorylierung von p38 MAPK aufzeigt. Ebenso ist keine Reduktion der p38 Phosphorylierung nach Behandlung der Zellen mit 600 mOsm Sorbitol zu erkennen.

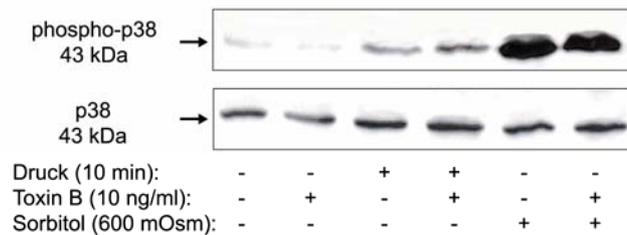


Abb. 3.1.3: Phosphorylierung von p38 nach mechanischer Druckstimulation in Toxin B präinkubierten HaCaT-Zellen. HaCaT-Zellen wurden für 2 h mit dem Rho-GTPase Inhibitor Toxin B (10 ng/ml) präinkubiert und anschließend mechanischer Belastung oder hyperosmotischem Stress (600 mOsmol Sorbitol) ausgesetzt.

Dieses Ergebnis wurde durch eine Transfektionsstudie noch erhärtet. HaCaT-Zellen wurden dazu transient mit dominant-negativen Rac-N17- oder Wildtyp-Konstrukten (Rac-wt) transfiziert. Der Expressionsvektor enthielt ein Myc-Tag. Dadurch war es möglich die Transfektionseffizienz des Versuches zu kontrollieren. Der Einsatz eines anti-Myc-Antikörpers im Western Blot konnte zeigen, ob das Konstrukt in die Zellen aufgenommen und transkribiert wurde. Die Western Blot-Ergebnisse (Abb. 3.1.4) der Transfektionsstudien weisen auf keine Beeinflussung der druckinduzierten p38 MAPK Phosphorylierung nach der Überexpression des dominant-negativen Konstrukts Rac-N17 hin. Die Ergebnisse von Rac-N17 als auch Rac-wt zeigen keine Unterschiede auf. Die starke Expression des Myc-Tags belegt hingegen eine hohe Transfektionseffizienz in den HaCaT-Zellen.

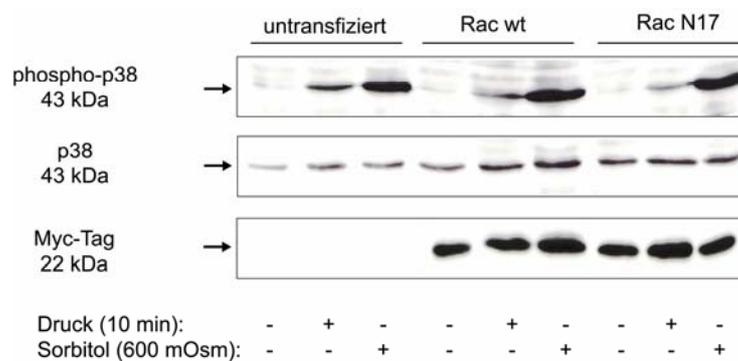


Abb. 3.1.4: Mechanische Druckstimulation an Rac-wt bzw. dn Rac-N17 transient transfizierten HaCaT-Zellen. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz sind die Rac-wt und dn Rac-N17-Konstrukte mit dem Myc-Epitop markiert.

3.1.3 Rolle der Src-Kinase in der druckinduzierten p38 Signalkaskade

Da die vorangegangenen Versuche sehr stark gegen eine Beteiligung von Rho-GTPasen in der druckinduzierten p38 MAPK Signaltransduktionskette sprachen, wurden die Experimente auf eine mögliche Beteiligung der Src-Kinase als *upstream* Mediator von p38 ausgeweitet. Bei den durchgeführten Untersuchungen handelte es sich erneut um Inhibitorstudien. Hierbei wurde die Inhibitorsubstanz PP2 eingesetzt. PP2 ist ein potenter und selektiver Inhibitor von Mitgliedern der Src-Kinase Familie (Hanke et al., 1996). Im ersten Versuch wurden drei verschiedenen Zelllinien (HaCaT, Cos7 und HEK293) für 10 min druckstimuliert bzw. vor der Druckstimulation für 4 h mit PP2 präinkubiert. Zellen, die nur druckstimuliert wurden zeigten eine Phosphorylierung von p38 (nur sehr schwach bei Cos7) sowie JNK1/2. Die Inkubation mit dem Inhibitor PP2 führte in allen drei getesteten Zelllinien zu einer Abnahme der druckinduzierten Phosphorylierung von p38 und JNK1/2 (Abb. 3.5).

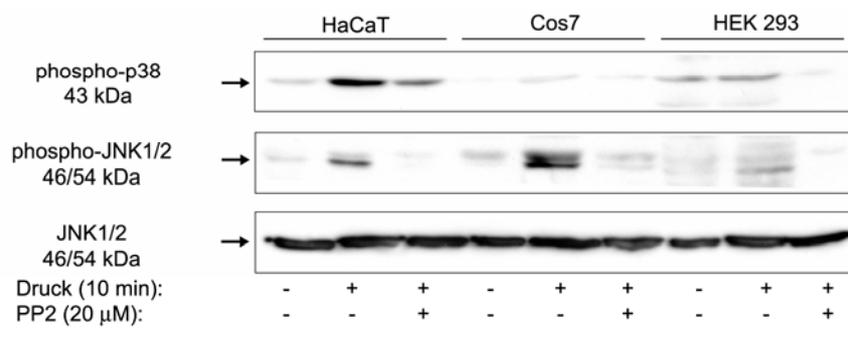


Abb. 3.1.5: p38 und JNK1/2 Phosphorylierung in druckstimulierten HaCaT-, Cos7- und HEK 293-Zellen nach 4 h Präinkubation mit PP2 (20 µM).

Der Anschlussversuch verdeutlichte, dass es sich bei der Inhibierung der p38 bzw. JNK Phosphorylierung um einen konzentrationsabhängigen Prozess handelte. HaCaT-Zellen wurden vor der Druckstimulierung mit 5 oder 10 µM PP2 inkubiert. Eine Konzentration von 20 µM PP2 wurde nicht mitgetestet, da im vorherigen Versuch bereits gezeigt wurde, dass bei dieser Konzentration eine Inhibierung der p38 sowie JNK Phosphorylierung stattfindet. Die druckinduzierte Phosphorylierung von JNK1/2 konnte bereits bei einer PP2-Konzentration von 5 µM inhibiert werden. Nur einen geringen Einfluss schien diese Konzentration von PP2 auf die p38 Phosphorylierung zu haben. Im Gegensatz dazu führte die Präinkubation der Zellen mit 10 µM PP2 sowohl bei JNK1/2 als auch p38 zu einer fast vollständigen Hemmung der druckinduzierten Phosphorylierung (Abb. 3.1.6).

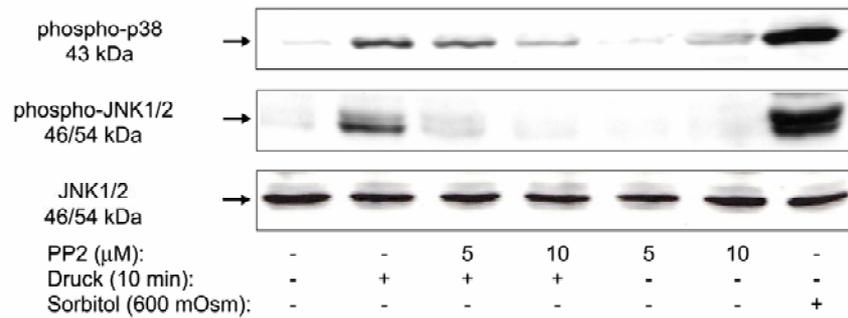


Abb. 3.1.6: p38 und JNK1/2 Phosphorylierung in druckstimulierten HaCaT-Zellen nach 4 h Präinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von PP2. Konzentrationsabhängige Inhibierung der druckinduzierten p38 und JNK Phosphorylierung durch den Src-Kinase Inhibitor PP2.

Zur Bestätigung der vorangegangenen Ergebnisse waren im nachfolgenden Versuch HaCaT-Zellen mit einem weiteren, selektiven Inhibitor (PP1) der Src-Kinase Familie behandelt worden. Als Negativkontrolle wurden die Zellen zusätzlich mit dem unwirksamen PP2-Analogon PP3 behandelt (Abb. 3.1.7). Auch dieser Versuch konnte die konzentrationsabhängige Inhibierung der Phosphorylierung von p38 durch PP1 bzw. PP2 bestätigen.

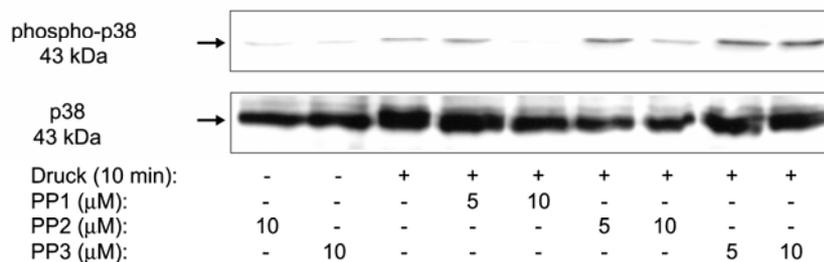


Abb. 3.1.7: p38 Phosphorylierung in druckstimulierten HaCaT-Zellen nach 4 h Präinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von PP1, PP2 und PP3. Die druckinduzierte p38 Phosphorylierung wird konzentrationsabhängig durch PP1 und PP2 inhibiert.

Der abschließende Versuch (Abb. 3.1.8), der unter dem Einfluss des PP2-Inhibitors durchgeführt wurde, veranschaulicht die Inhibierung der druckinduzierten Phosphorylierung auf verschiedenen Ebenen der p38 Signaltransduktionskaskade. PP2 inhibiert die druckinduzierte Phosphorylierung von Src, p38 sowie HSP27. Des Weiteren ist auch die Inhibierung der Stresskinase JNK nach Präinkubation mit PP2 nachweisbar. Diese Ergebnisse scheinen auf eine direkte Beteiligung der Src-Kinase an der Perzeption von mechanischen Druckreizen hinzudeuten.

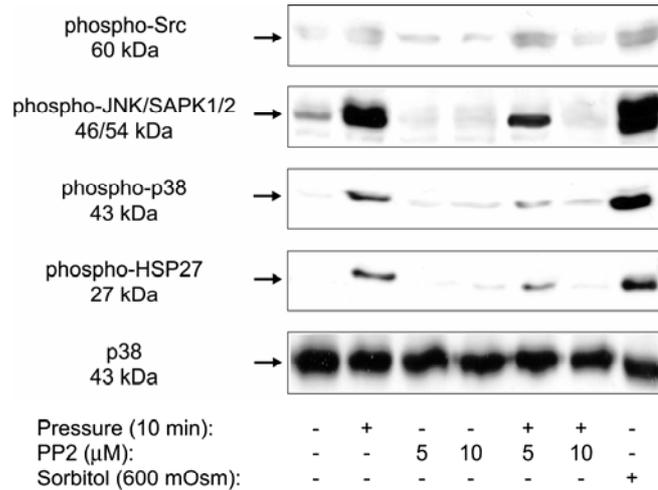


Abb. 3.1.8: Src, JNK1/2 und p38 Phosphorylierung in druckstimulierten HaCaT-Zellen nach 4 h Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von PP2. Der Einsatz des Src-Kinase Inhibitor blockiert nicht nur die Phosphorylierung von Src, sondern dadurch auch die Phosphorylierung der nachfolgenden Proteine JNK, p38 und HSP27.

3.1.4 Wirkung von PP2 auf die Phosphorylierung von PKC

Aus anderen Studien ist bekannt, dass neben der Src-Kinase auch die PKC eine wichtige Funktion in der p38 Signalkette einnimmt (Nagao et al., 1998). Da eine Beteiligung beider Kinasen in einem Signaltransduktionsweg möglich ist, wurde die Rolle der PKC in der druckvermittelten Signaltransduktion mit Hilfe des Src-Kinase Inhibitors PP2 untersucht. Zunächst wurde die Wirkung von PP2 auf die Phosphorylierung von PKC pan untersucht. Abb. 3.1.9 zeigt, dass PKC durch die mechanischen Druckreize stark phosphoryliert wurde. Nach der Inkubation mit PP2 unterblieb die druckinduzierte Phosphorylierung von PKC, und nur die Basisphosphorylierung war nachweisbar.

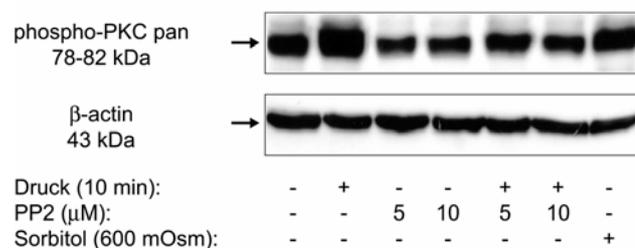


Abb. 3.1.9: PKC Phosphorylierung in druckstimulierten HaCaT-Zellen nach 4 h Präinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von PP2. Schwache Inhibierung der PKC nach Behandlung mit dem Src Kinase Inhibitor PP2.

3.1.5 Inhibierung von PKC hemmt die druckvermittelte Phosphorylierung von p38

Die Ergebnisse des vorigen Versuches eröffneten die neue Hypothese, dass auch PKC bzw. Isoformen der PKC eine wichtige Rolle in der druckinduzierten Signaltransduktion spielen könnten. Dies erschien umso wahrscheinlicher, da eine Beteiligung von PKC bei der dehnungsinduzierten MAPK Phosphorylierung bereits nachgewiesen wurde (Li und Xu, 2000). Die Abbildung 3.1.10 zeigt, dass die Inkubation von HaCaT-Zellen mit Calphostin C, einem PKC-spezifischen Inhibitor, konzentrationsabhängig zu einer Unterdrückung der druckinduzierten p38 Phosphorylierung führt. Ab einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ wird die p38 Phosphorylierung in den Druckexperimenten inhibiert. Der Einsatz von niedrigeren Konzentrationen an Calphostin C lässt hingegen noch keine Inhibierung der Signaltransduktionskette erkennen (Abb. 3.1.10).

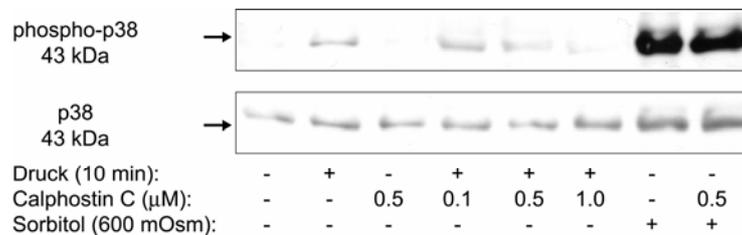


Abb. 3.1.10: Wirkung des PKC-Inhibitors Calphostin C auf die druckinduzierten p38 Phosphorylierung in HaCaT-Zellen. Konzentrationsabhängige Inhibition der druckinduzierten p38 Phosphorylierung durch Calphostin C.

Die Ergebnisse aus Abb. 3.1.10 beweisen, dass die PKC eine wichtige Rolle in der druckvermittelten p38 Phosphorylierungskaskade spielt. Die nächsten Versuche zielten darauf hin, genauere Aussagen zu finden, welche spezifischen Isoformen der PKC an der druckinduzierten Signaltransduktionskaskade beteiligt sein könnten. Für diese Experimente wurden Inhibitorsubstanzen eingesetzt, die spezifisch bestimmte Isozyme der PKC ausschalten. Wie aus den Abbildungen 3.1.11 zu erkennen ist, führte die Präinkubation von HaCaT-Zellen mit dem PKC α -spezifischen Inhibitor Gö6976 zu einer Reduktion der druckinduzierten p38 Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu zeigten HaCaT-Zellen, welche mit dem PKC δ -spezifischen Inhibitor Rottlerin präinkubiert worden waren, keinerlei Beeinflussung der druckinduzierten p38 Phosphorylierung auf. Im Gegenteil, die ansteigenden Konzentrationen an Rottlerin schienen die Phosphorylierung von p38 sogar zu verstärken.

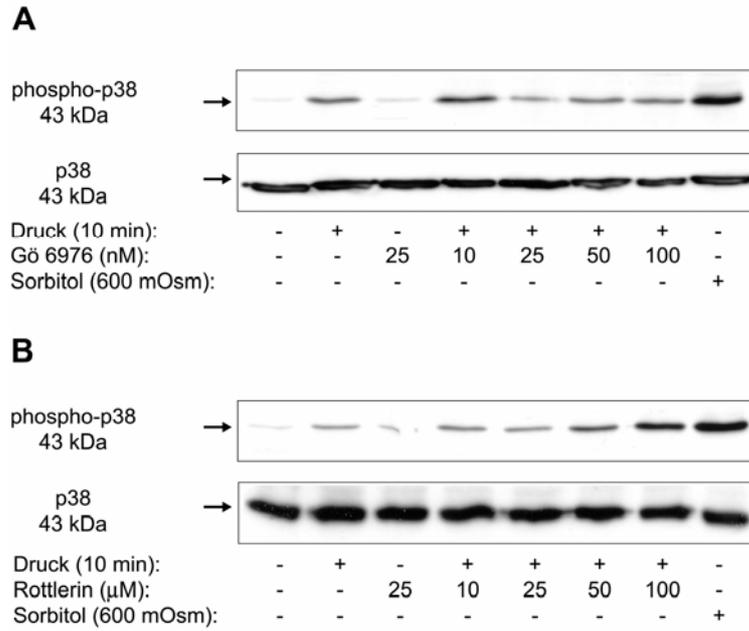


Abb. 3.1.11: Rolle von PKC-Isoformen in der druckinduzierten p38 Phosphorylierung A) Teilweise Inhibierung der druckvermittelten p38 Phosphorylierung nach der Inkubation von HaCaT-Zellen mit dem PKC α -spezifischen Inhibitor Gö6976. B) Präinkubation mit dem PKC δ -spezifischen Inhibitor Rottlerin zeigt keine sichtbare Inhibitionseffekte auf die p38 Phosphorylierung.

3.2 Xenograft-Tumormodelle

Im Rahmen dieser Dissertation wurden in den *in vivo*-Versuchen NMRI-Nacktmäuse bzw. Rowett-Nacktratten eingesetzt. SCID-Mäuse wurden nur im Rahmen der *Uptake*-Studien von fluoreszenzmarkierten Dextranen und Cetuximab-Antikörpern verwendet.

Aus den vielfältigen *in vitro*-Untersuchungen unserer und anderer Gruppen geht eindeutig hervor, dass mechanische Stimuli die Zellproliferation bzw. die Zelldifferenzierung beeinflussen können. Auf den ersten Blick überraschend erscheint allerdings die Aussage, dass mechanische Stimuli auch an epithelialen Tumoren auftreten und möglicherweise sogar das Tumorwachstum beeinflussen können. In dem zuvor gezeigten Tumormodell (Abb. 1.3) werden die mechanischen Stimuli, die im Tumorgewebe auftreten können, zusammengefasst. Der hohe TIFP führt zu einer permanenten mechanische Dehnung der äußersten Tumorzellschicht, indem er einen hydrostatischen Druck mit nach außen gerichtetem Vektor aufbaut.

Für die Durchführung molekularbiologischer Untersuchungen, welche zur Aufklärung der Wirkung von mechanischen Stimuli auf die Tumorzellproliferation beitragen sollten, musste ein passendes *in vivo*-Modell etabliert werden. Die Ergebnisse der *in vivo*-Versuche sollten auch mit den bisherigen *in vitro*-Studien vergleichbar sein. Es war daher naheliegend, für die *in vivo*-Experimente humane epitheliale Tumorzelllinien zu verwenden, die bereits in *in vitro*-Untersuchungen eingesetzt worden waren. Diese Tatsache erforderte die Etablierung eines Xenograft-Tumormodells unter Verwendung von immunsupprimierten Tieren.

3.2.1 Xenograft-Mausmodell

Als *in vivo*-Modell wurden homozygote, thymusaplastische NMRI-Nacktmäuse eingeführt. Diese Tiere eigneten sich in hohem Maße für Xenotransplantationen, da die genetisch bedingte Thymusaplasie der Tiere zu immunologischen Defizienzen führt. Dadurch konnten Abstoßungsreaktionen nach der Injektion von humanen Tumorzellen verhindert werden. Ein weiterer Vorteil der NMRI-Nacktmäuse gegenüber den ebenfalls immunsupprimierten SCID-Mäusen liegt in ihrer Haarlosigkeit. Durch das Fehlen eines dichten Fellkleides konnten die Vermessung der Tumore sowie operative Eingriffe an den Tieren einfacher durchgeführt werden.

Die Generierung des Xenograft-Tumormodells erfolgte durch die s.c. Injektion von epithelialen A431-Vulvakarzinom-, A549-Lungenkarzinom- oder G361-Melanomzellen. Der Vorteil dieser Tumorzelllinien bestand darin, dass sie in unserem Labor bereits in *in vitro*-Experimenten etabliert waren, sie *in vitro* sehr schnell wachsen und ihre Verwendung in Xenograft-Modellen durch eine Reihe von Veröffentlichungen bereits gezeigt worden ist (Kanazawa et al., 2000; Tei et al., 2002; Jounaidi und Waxman, 2004; Huber et al., 2005). Zur Induktion von A431 Tumoren wurden die NMRI-Nacktmäuse kurzzeitig mit Isofluran betäubt und subkutan mit 1×10^7 Zellen in 150-200 μ l PBS pro Flanke inokuliert. Die Tumorzellen wurden zuvor in der Zellkultur kultiviert, trypsiniert, abzentrifugiert und in PBS zur Injektion aufgenommen. Nach der Inokulation der Tumorzellen vergingen ca. 8-10 d bis die ersten Umriss der Tumore sichtbar wurden. Die anderen Tumorentitäten wurden nach dem gleichen Schema den Versuchstieren inokuliert. Zu Beginn der *in vivo*-Experimente wurde noch eine weitere Methode zur Induktion der Tumore angewandt. Dazu wurde ein A431 Tumor mit dem Skalpell zerkleinert und einzelne Tumorfragmente (ca. 2 mm³) in die Flanken der anästhesierten Tiere implantiert. Diese Methode wurde zugunsten der zuvor beschriebenen Technik aufgegeben, da die Tiere bei diesem Eingriff nicht per Inhalationsanästhesie narkotisiert werden konnten. Die Gesamtbelastung der Versuchstiere ist, durch die Narkose und den chirurgischen Eingriff zur Implantation des Tumorfragments, gegenüber der Injektionstechnik erhöht. Die Wachstumsgeschwindigkeit der A431 Tumore zeigte keinen signifikanten Unterschied gegenüber der gewählten Methode zur Induktion der Tumore. Die nachfolgende Bilderreihe (Abb. 3.2.1) dokumentiert die Zunahme des Tumolvolumens von s.c. inokulierten A431 Tumoren. Die Tumoren sind dabei an beiden Flanken des Tieres injiziert worden.



Abb. 3.2.1: Wachstum von subkutan inokulierten A431 Tumoren in einem Xenograft-Mausmodell. A) Tumorgroße 14d nach Tumor-Inokulation; B) Tumorgroße 21d nach Tumor-Inokulation und C) Tumorgroße 28d nach Tumor-Inokulation.

3.2.2 Xenograft-Rattenmodell (*)

Versuche, welche im Rahmen des Aufenthaltes am Institut für Biomedizin der Universität Bergen, Norwegen, durchgeführt wurden, mussten aufgrund der Nichtverfügbarkeit von NMRI-Nacktmäusen an einem anderen Tiermodell durchgeführt werden. Als Alternative zum NMRI-Mausmodell boten sich Rowett-Nacktratten an. Der Hauptgrund für die Verwendung der Nacktratten lag allerdings darin begründet, dass für diese Tiere bereits ein genehmigter Tierversuchsantrag auf norwegischer Seite vorlag, der die s.c. Inokulation mit Tumorzellen genehmigte. Zur Induktion der Tumore wurden die Nacktratten mit 1×10^7 Tumorzellen injiziert. Im Gegensatz zu den Nacktmäusen wurde den Nacktratten nur ein Tumor im Nackenbereich inokuliert (Abb. 3.2.2). Ein weiterer Vorteil in der Verwendung von Ratten bestand in der erleichterten Katheterisierung der Tiere aufgrund der größeren Arterien und Venen.



Abb. 3.2.2: Rowett-Nacktratte. 21 d nach der dorsalen Inokulation mit A431 Zellen

3.3 Morphologie von epithelialen, monozytischen Tumoren

In den nachfolgenden Abschnitten werden immunhistologische Färbungen von verschiedenen Tumorentitäten dargestellt. Aufgrund morphologischer Veränderungen, die in den immunhistologischen Färbungen sichtbar wurden, konnte auf eine mechanische Dehnung des Tumorgewebes geschlossen werden. Im folgenden Kapitel werden Übersichts- und Detailaufnahmen der Tumore dargestellt.

3.3.1 Immunhistologische HE-Färbungen

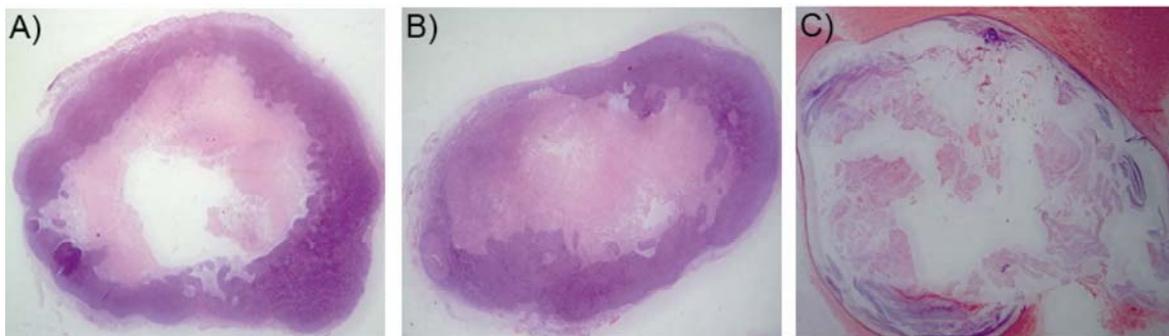


Abb. 3.3.1: Querschnitte von HE-gefärbten Tumoren. A) A431 Tumor; deutlich sind die Bereiche Tumorkapsel, proliferierende Wachstumszone und zentrale Zyste mit nekrotischen Zellen zu erkennen. B) A549 Tumor (Beschreibung siehe A); C) humanes Akanthom, starke mechanische Dehnung der Zellen im Randbereich der Zyste (violette Färbung = nach innen abschilfernde Keratinozyten); Vergrößerung: 16fach

Viele Tumore zeigen im Laufe ihres Wachstum eine charakteristische Morphologie, welche eine hohe Übereinstimmung mit dem im Einleitungsteil vorgestellten Tumormodell aufweist. Abb. 3.3.1A zeigt den Querschnitt eines H&E gefärbten A431 Tumors. Deutlich zu erkennen ist die zentrale zystische Region, die von einem schmalen Kortex von Tumorzellen umgeben ist. Die Zyste ist mit nekrotischen Zellen und interstitieller Flüssigkeit gefüllt und nimmt einen beträchtlichen Teil des Gesamtvolumens des Tumors ein. An Abb. 3.3.1B kann man erkennen, dass die aus epithelialen A549 Lungenkarzinomzellen entstandenen Tumore ebenfalls eine morphologische Struktur aufweisen, die mit dem theoretischen Modell vergleichbar ist. Ähnlich den A431 Tumoren umgibt bei den A549 Tumoren eine vergleichsweise schmale Hülle aus Tumorzellen einen großen, mit nekrotischen Zellen gefüllten, zystischen Innenraum. Das „Negativ“ zu den vorherigen Abbildungen stellt ein Akanthom (Abb. 3.3.1C), ein humaner benigner Tumor der Epidermis, dar. Im Beispiel des Akanthoms kommt es zur Ausbildung einer Zyste im dermalen Gewebe, welche jedoch von Keratinozyten ausgekleidet ist. Solche Tumore können sich an den tief in der Dermis liegenden Haarwurzeln bilden. Trotz der morphologischen Unterschiede zu den Tumoren im

Xenograftmodell ist die starke mechanische Dehnung der Zellen, welche die Zyste auskleiden, deutlich zu erkennen.

Die nachfolgenden Abbildung (Abb. 3.3.2) zeigt die immunhistologische HE-Färbung eines A431 Tumor bei 40facher Vergrößerung. Sehr deutlich ist die Tumor-umgebende Kapsel, das vaskularisierte Tumorgewebe sowie die zentrale, zystische Region des Tumors zu erkennen.

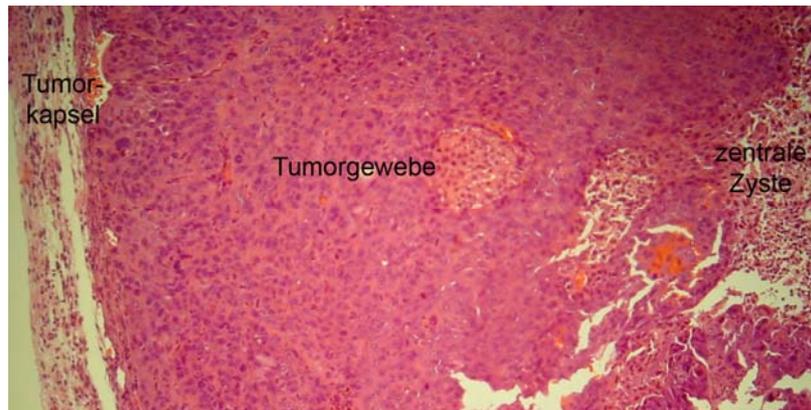


Abb. 3.3.2: Querschnitt eines HE-gefärbten A431 Tumors. Sichtbare Unterscheidung zwischen Tumorkapsel, Tumorgewebe und zentraler Zyste im immunhistologischen Schnitt. Vergrößerung: 40fach

3.3.2 Mechanische Dehnung der Tumorzellen

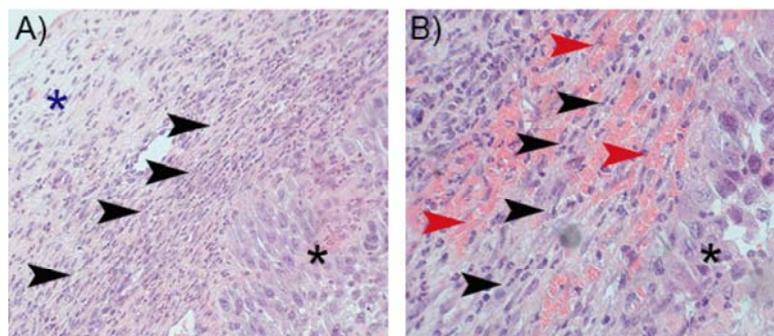


Abb. 3.3.3: Kortex von A431 Tumoren. A) schwarze Pfeilspitzen markieren gedehnte Tumorzellen im äußeren Kortex. Der schwarzer Stern markiert Tumorzellen des inneren Kortex und der blaue Stern markiert murine Fibroblasten der Tumorkapsel. Vergrößerung: 200fach; B) schwarze Pfeilspitzen markieren gedehnte Tumorzellen im vaskularisierten äußeren Kortex, rote Pfeilspitzen markieren Blutgefäße. Vergrößerung: 400fach

Fotografien immunhistologischer Schnitte bei hohen Vergrößerungsfaktoren zeigen, dass speziell im Übergangsbereich zwischen Tumorgewebe und Tumorkapsel die Tumorzellen einer starken mechanischen Dehnung ausgesetzt sind. In Abbildung 3.3.3A sind die gedehnten Zellen (schwarze Pfeilspitzen) hervorgehoben. Die näher zum Tumorzentrum liegenden Zellen weisen rein optisch eine geringere mechanische Tension (schwarzer Stern) auf. Im Gegensatz dazu sind die Zellen der Tumorkapsel ebenfalls gedehnt. Die Tumorkapsel

besteht aus Zellen der tumorumgebenden EZM, d.h. in diesem Fall aus murinen Fibroblasten (blauer Stern). Es ist zu erkennen, dass die Zellen der Kapsel, im Vergleich zu den Zellen des Tumorkortex, nicht so dicht aneinander liegen. Die zweite Abbildung (Abb. 3.3.3B) fokussiert darauf, dass sich die mechanisch gedehnten Tumorzellen (schwarze Pfeilspitzen) in den stark vaskularisierten Bereichen des Tumors befinden. Blutgefäße sind durch rote Pfeilspitzen in der Abbildung gekennzeichnet. Ihre Lage in den äußersten Randzonen des Tumors entspricht dem Tumormodell.

3.3.3 Einfluss der Punktion auf die Tumormorphologie

Die A431 Tumore erreichten nach ca. 21-28 d ein Volumen von ca. 2000 mm³. Schon die äußere Morphologie des Tumors zeigt, dass die Tumorzellen unter einer starken mechanischen Spannung stehen müssen. Der Kortex eines exzidierten Tumors erscheint wie aufgeblasen (Abb. 3.3.4.A).

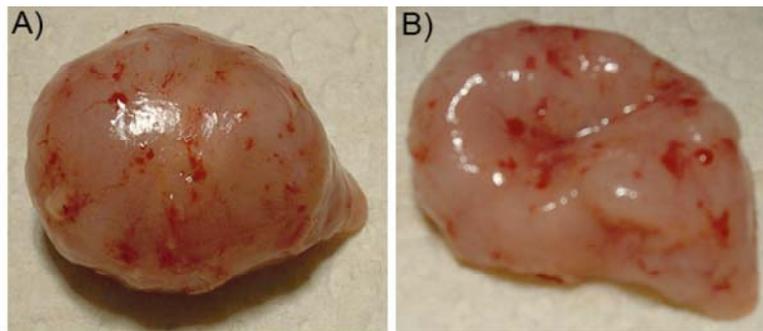


Abb. 3.3.4: Effekt der Tumorpunktion auf die Tumormorphologie. A) unbehandelter A431 Tumor zeigt eine „aufgeblasene“ Struktur und eine unter Spannung stehende Oberfläche auf; B) punktierter A431 Tumor weist die eingefallenen zentrale Zyste auf. Die mechanische Oberflächenspannung des Tumors ist nicht mehr zu erkennen.

Die mechanischen Kräfte, welche auf die Zellen des Tumors wirken, lassen sich gut an einem Tumor erkennen, der mit einer Kanüle punktiert wurde. Die Punktion führt zu einem starken Ausstrom an interstitieller Flüssigkeit und dem Verlust von mechanischer Spannung im äußeren Bereich des Tumors (Abb. 3.3.4B). In Folge dieses Wegfalls an mechanischer Dehnung und dem Entleeren der zentralen Zyste kollabiert diese. Nach dem Kollaps der Zyste zeigt das Tumorgewebe keine starke mechanische Spannung mehr auf und wirkt im Vergleich zu dem stramm gedehnten Gewebe eines nicht punktierten Tumors schlaff.

3.4 Bestimmung von Tumorzellen und tumorinterstitiellem Flüssigkeitsdruck (TIFP)

In allen nachfolgenden Tierversuchen sind die Parameter Tumorzellen und TIFP bestimmt worden. Die nächsten Kapitel stellen die mit z.T. unterschiedlichen Messmethoden erzielten Ergebnisse dar. Der Fokus richtet sich zu Beginn auf die an unterschiedlichen Zelllinien (A431, A549 und G361) gewonnenen Daten. Diese Versuche wurden alle an NMRI-Nacktmäusen durchgeführt.

3.4.1 Messung des Tumorzellen an A431 Tumoren in NMRI-Nacktmäusen

Während der Etablierung des A431 Xenograft-Tumormodells in NMRI-Nacktmäusen ist in regelmäßigen Abständen (3x pro Woche) die Länge und Breite des Tumors vermessen worden. Aus diesen Messwerten der Tumorzellen kann mit der Formel zur Berechnung eines Ellipsoids ($\Pi/6 \times a \times b^2$) das Tumorzellen berechnet werden. Jedoch ist zu beachten, dass „a“ immer die längere und „b“ immer die kürzer Tumorzellen darstellen muss (Baumann et al., 2001). Zur Vermessung des Tumors wurden die Mäuse gasanästhesiert und anschließend mit einer Schieblehre vermessen. Die Tumorzellen wurde erstmalig sieben Tage nach der Inokulation der Tiere gemessen. Ab diesem Zeitpunkt waren erste Ansätze eines Tumors sichtbar und auch messbar. Abb. 3.4.1 zeigt die Volumenzunahme eines A431 Tumors im Xenograft-Mausmodell.

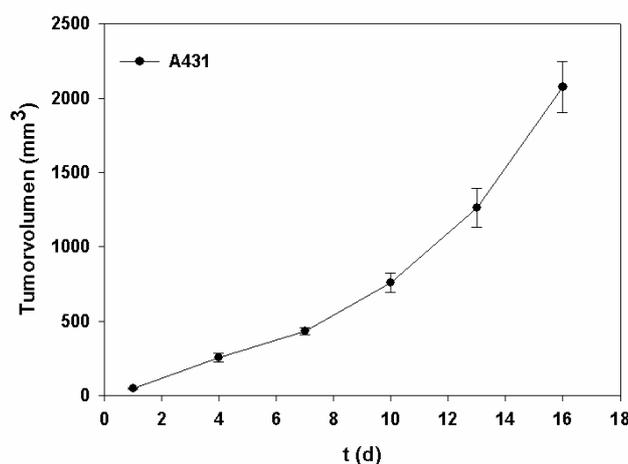


Abb. 3.4.1: Zunahme des Tumorzellen über die Zeit in A431 Tumoren. Der Graph zeigt die Zunahme des Tumorzellen von A431 Tumoren im Verlauf von 16 Tagen. Tag 0 entspricht Tag 7 nach Inokulation der Tumorzellen. Daten sind Mittelwerte \pm SE; n = 10.

3.4.2 Messung des TIFP an A431 Tumoren in NMRI Nacktmäusen

3.4.2.1 Messung des TIFP mittels Schiötz Tonometer

Zu Beginn der *in vivo*-Versuche ist ein Schiötz Tonometer zur Messung des TIFP eingesetzt worden. Normalerweise wird dieses Messinstrument in der Augenheilkunde zur Bestimmung des intraokulären Augendruckes eingesetzt. In diesem Fall wurde das Tonometer zur Messung des TIFP in den Experimenten benutzt. Dazu wird das Instrument auf die Tumore gestellt und ein Stahlstift drückt sich je nach „Gegendruck“ der Unterlage unterschiedlich weit nach oben. Je nach Höhe des Ausschlages kann auf einer dazugehörigen Skala ein Messwert abgelesen werden (Abb. 3.4.2). Diese Messwerte müssen anschließend unter Verwendung einer Umrechnungsformel in mmHg umgerechnet werden. Die Verwendung des Tonometers in den ersten Tierversuchen zeigte sehr schnell, dass sich das Schiötz-Tonometer zur Bestimmung des TIFP als untauglich erwies.



Abb. 3.4.2: Messung des TIFP mittels Schiötz-Tonometer. Der Stempel des Schiötz-Tonometers wird auf die Oberfläche des Tumors gestellt. Am oberen Ende kann der TIFP anhand einer Skala abgelesen werden.

3.4.2.2 Messung des TIFP mittels *wick-in-needle*-Technik

Als Alternative zur Verwendung des Tonometers bietet sich die *wick-in-needle*-Technik an, welche 1977 erstmals von Fadnes et al. beschrieben worden ist (siehe M & M, S. 44ff). Bei den Versuchen in Frankfurt wurde für die Messungen ein vereinfachtes Setup eingesetzt. Eine Kanüle wurde über einen mit physiologischer NaCl-Lösung gefüllten Schlauch an ein Differentialmanometer angeschlossen. Bevor der TIFP intratumoral gemessen werden konnte, ist vor jedem Versuch eine Eichung des Manometers durchgeführt worden. Die Gefahr, dass die Flüssigkeitssäule im Schlauch die Ergebnisse beeinflusst, konnte dadurch ausgeschlossen werden. Vor der Messung wurden die Nacktmäuse durch i.p. Injektion mit Ketavet/Rompun narkotisiert. Anschließend erfolgte nach dem Einstechen der Kanüle in den Tumor der

eigentliche Messvorgang. Über das Flüssigkeitssystem, bestehend aus Tumorflüssigkeit und physiologischer NaCl-Lösung, kann der TIFP auf die Membran innerhalb des Manometers übertragen und gemessen werden. Ab einem Tumolvolumen von ca. 500 mm³ wurde der TIFP alle drei Tage, bis zu einer Größe von max. 2500 mm³, gemessen. Bei diesem Volumen war die körperliche Belastung für das Tier nicht mehr vertretbar und die Versuche wurden beendet. Die nachfolgende Abbildung 3.4.3 zeigt das Ergebnis der TIFP-Messungen an A431 Tumoren von 10 Tieren (entspricht 20 Tumoren). Es ist deutlich zu sehen, dass der TIFP mit dem zunehmenden Tumolvolumen stetig ansteigt.

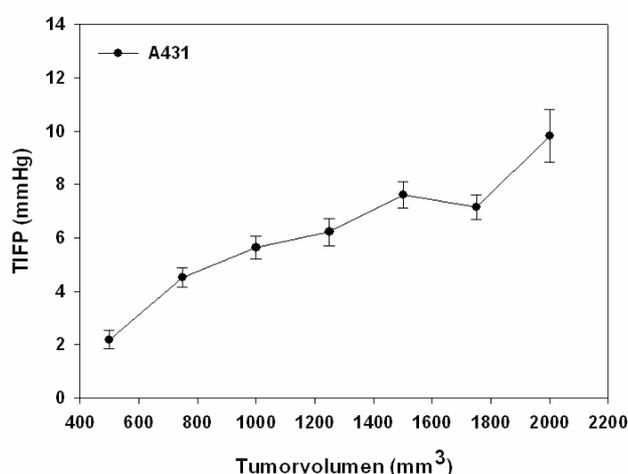


Abb. 3.4.3: Messung des TIFP in A431 Tumoren. Die Abbildung stellt die Zunahme des TIFP in Zusammenhang mit dem sich vergrößernden Tumolvolumen dar. TIFP-Messungen wurden mit der *wick-in-needle*-Technik durchgeführt. Daten sind Mittelwerte +/-SE; n = 20.

3.4.3 Verwendung weiterer Tumorentitäten (A549 und G361)

In einer Vielzahl von veröffentlichten Studien (Boucher et al., 1991; Curti et al., 1993; Kristensen et al., 1996; Tufto und Rofstad, 1995; Tufto und Rofstad, 1999) konnte gezeigt werden, dass sich unterschiedliche Tumorentitäten sehr stark in ihren TIFP-Werten unterscheiden. Aus diesem Grund etablierte ich zwei weitere Xenograft-Modelle. Bei den zusätzlich eingesetzten Tumorzelllinien handelte es sich um die humane epitheliale Lungenkarzinomzelllinie A549 sowie die Melanomzelllinie G361. Das Ziel war es die bereits gewonnenen Messergebnisse der A431 Tumore bzgl. Tumolvolumen und TIFP besser in den Kontext hoher oder niedriger TIFP bzw. schnell oder langsam wachsende Tumore einstufen zu können.

3.4.3.1 Messungen des Tumorzvolumens von A431, A549 und G361 Tumoren

Eine Zellzahl von 1×10^7 Zellen der jeweiligen Tumorzelllinie wurden in beide Flanken von NMRI-Nacktmäusen inokuliert. Nach ca. sieben Tagen waren die ersten Tumore zu erkennen und mit der regelmäßigen Vermessung des Tumorzvolumens konnte begonnen werden. Die Bestimmung der Tumorzvolumina mittels Schieblehre wurde nach der ersten Messung über einen Zeitraum von ungefähr drei Wochen fortgesetzt. Wie Abb. 3.4.4 zeigt, war die Wachstumsgeschwindigkeit der A549 Karzinome sowie der G361 Melanome geringer als jene der A431 Tumore.

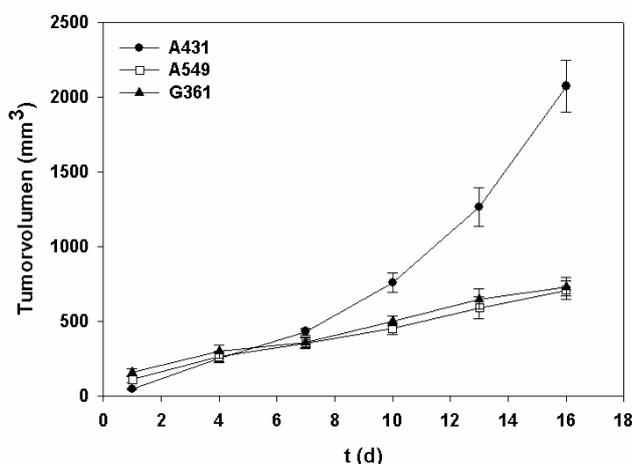


Abb. 3.4.4: Vergleich der Zunahme des Tumorzvolumens über die Zeit zwischen A431, A549 und G361 Tumoren. Die graphische Darstellung gibt die Zunahme des Tumorzvolumens in den drei Tumorentitäten im Verlauf von 16 Tagen wieder. Tag 0 entspricht Tag 7 nach Inokulation der Tumorzellen. Daten sind Mittelwerte \pm SE; $n = 20$ je Tumorzelllinie.

Nach dem anfänglich gleichmäßigem Wachstum aller drei Tumorentitäten, nimmt das Volumen der A431 Tumore ab dem zehnten Tag nach Beginn der Messungen im Vergleich zu den beiden anderen Tumorentitäten erheblich schneller zu. Verfolgt man die Zunahme des Volumens nur an A549 und G361 Tumoren, so zeigt sich zwischen diesen beiden Tumorentitäten nahezu kein Unterschied in der Geschwindigkeit der Zunahme der Volumina.

Betrachtet man die Zunahme des Tumorzvolumens bei A549 Tumoren jedoch über einen längeren Zeitraum, lässt sich erkennen, dass auch diese Tumorzelllinie ein Volumen von ca. 2000 mm^3 erreichen kann. Im Vergleich zu A431 Tumoren, welche dieses Tumorzvolumen bereits nach 16 Tage aufwiesen, dauert es bei den A549 Tumoren bis zu 30 Tage um ein Tumorzvolumen von 2000 mm^3 zu erreichen (Abb. 3.4.5).

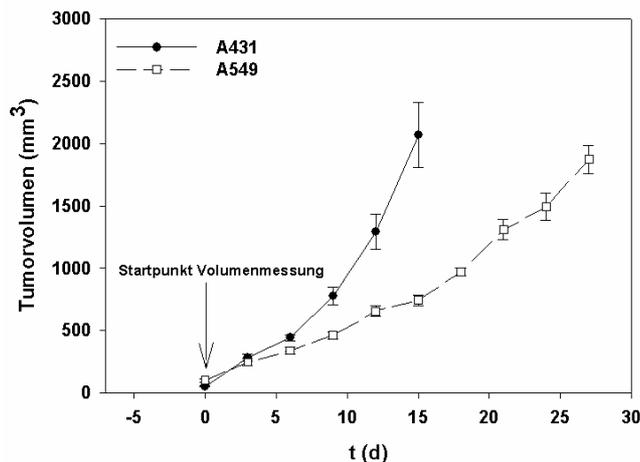


Abb. 3.4.5: Vergleich der Zunahme des Tumolvolumens über die Zeit zwischen A431 und A549 Tumoren. Der Graph zeigt die Zunahme des Tumolvolumens von A431 und A549 Tumoren im Verlauf von bis zu 28 Tagen. Daten sind Mittelwerte +/-SE; n = 10 je Tumorzelllinie.

3.4.3.2 Messung des TIFP an A431, A549 und G361 Tumoren mittels *wick-in-needle-Technik*

Wie zuvor an den A431 Tumoren ist auch an A549 und G361 Tumoren der TIFP mit Hilfe der *wick-in-needle*-Methode gemessen worden. Die graphische Darstellung der Messergebnisse von 20 Tumoren pro eingesetzter Tumorzelllinie zeigt, dass sowohl A549 als auch G361 Tumore deutlich niedrigere Werte für den TIFP im Vergleich zu A431 Tumoren aufweisen. Aus Abbildung 3.4.6 wird ersichtlich, dass der durchschnittliche TIFP-Wert der A549 Tumore bei einem Volumen von 2000 mm³ bei 5 mmHg liegt. Der höchste gemessene TIFP-Wert der A549 Tumore ist 6 mmHg. Im Vergleich dazu liegt der TIFP in A431 Tumoren bei gleichem Tumolvolumen bei 11-12 mmHg. Die Untersuchungen an 10 Tieren, welche mit G361 Melanomzellen inokuliert wurden, zeigten im Vergleich zu den A549 Tumoren noch niedrigere TIFP-Messwerte auf. Bei einem Tumolvolumen von 1300 mm³ betrug der TIFP in den Melanomtumoren nur max. 2 mmHg im Gegensatz zu TIFP-Werten von max. 7 mmHg bei A431 Tumoren mit dem gleichen Tumolvolumen. Die Versuche an Nacktmäusen, die mit G361 Tumoren inokulierte waren, mussten jedoch aus tierschutzrechtlichen Gründen (siehe Kap. 3.4.3.3) vorzeitig abgebrochen werden, so dass für diese Tumorentität keine weiteren TIFP-Messungen bei größeren Tumolvolumina durchgeführt werden konnten.

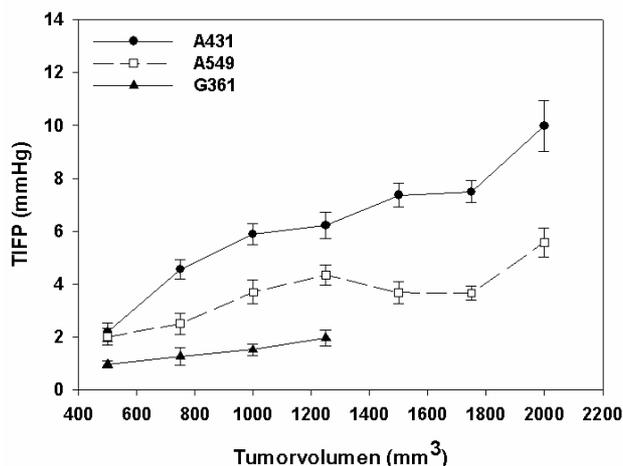


Abb. 3.4.6: Vergleich des TIFP zwischen A431, A549 und G361 Tumoren. Starker Anstieg des TIFP in A431 Tumoren bei Zunahme des Tumorvolumens. Relativ geringer Anstieg bei A549 und G361 Tumoren. TIFP-Messungen wurden mit der *wick-in-needle*-Technik durchgeführt. Daten sind Mittelwerte \pm SE; n = 20 je Tumorzelllinie.

3.4.3.3 Cachexie bei Nacktmäusen mit G361 Tumoren

Versuche an Nacktmäusen, welche mit G361 Tumore inokuliert waren, wurden bereits nach der Verwendung von 10 Tieren und einem Zeitraum von 16 Tagen (Tumorvolumen bei 1300 mm³) eingestellt. Alle Tiere waren zu diesem Zeitpunkt bereits stark cachexisch (Abb. 3.4.7) und mussten gemäß Tierschutzgesetz getötet werden (siehe M&M., S. 59). Alle weiteren *in vivo*-Versuche mit dieser Tumorzelllinie wurden ausgesetzt.



Abb. 3.4.7: Cachexie bei NMRI-Nacktmäusen nach Inokulation mit G361 Tumoren. Schwere Cachexie bei NMRI-Nacktmäusen, die mit G361-Zellen inokuliert wurden. Weitere Tierversuche mit dieser Zelllinie wurden daraufhin nicht mehr durchgeführt.

3.5 TIFP triggert die Phosphorylierung von proliferationsabhängigen MAPK

3.5.1 TIFP induziert die Phosphorylierung von ERK1/2 in A431 und A549 Tumoren

Die ersten *in vivo*-Versuche konnten zeigen, dass in A431 und A549 Tumoren ein erhöhter TIFP vorliegt. Darüber hinaus ließ sich anhand der äußeren Tumormorphologie eine erhöhte Dehnung des Tumorkortex feststellen. Punktierte Tumore wiesen hingegen keine mechanische Dehnung des Tumorkortexes auf (siehe Abb. 3.3.4).

Aus *in vitro*-Versuchen ist bekannt, dass Dehnung zur Aktivierung von ERK1/2 führt. Das Ziel der folgenden molekularbiologischen Untersuchungen war es zu prüfen, ob auch im *in vivo*-Tumormodell eine dehnungsabhängige Komponente die Phosphorylierung von ERK1/2 beeinflusst. Im Xenograft-Modell entspricht der unbeeinflusste Tumor den mechanisch gedehnten Zellen. Diese Tumore weisen einen hohen TIFP auf und zeigen eine hohe mechanische Tension der Tumorkapsel bei der Entnahme. Im Gegensatz dazu entsprechen punktierte Tumore relaxierten Zellen, die nach einem permanenten mechanischen Dehnungsreiz entlastet worden sind. Zur Durchführung der Versuche wurde ein Teil der Tumore punktiert und 30 min, 60 min oder 360 min nach der Punktion aus dem Tier entnommen. Die Tumore wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend für die nachfolgenden molekularbiologischen Untersuchungen aufgearbeitet. Für diesen Versuch wurden sowohl A431 als auch A549 Tumore eingesetzt. Der Western Blot wurde gegen phospho-ERK1/2 durchgeführt. Unbehandelte Tumore dienten als Positivkontrollen für den Western Blot und die ERK1/2 Phosphorylierung. Die Ergebnisse der Western Blot Untersuchung zeigen eine reduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 in den Tumoren gegenüber den nicht punktierten Kontrolltumoren. Die verringerte Phosphorylierung von ERK1/2 ist nur in den Gewebeproben zu sehen, welche 30 bzw. 60 min nach der Tumorpunktion entnommen wurden. Tumore, die 360 min nach der Punktion entnommen wurden, zeigten ein Phosphorylierungsmuster, welches jenem der nicht-punktierten Tumore entsprach (Abb. 3.5.1). Dieses Muster, eine starke Abnahme der ERK1/2-Phosphorylierung in den 30 und 60 min nach Punktion entnommen Gewebeproben, steht im Gegensatz zu einer unverändert starken Phosphorylierung in den Proben, die nach 360 min exzidiert wurden. Das gleiche Phosphorylierungsmuster zeigte sich auch in A549 Tumoren. Als Ladungskontrolle für den Western Blot ist neben dem nicht-phosphospezifischen ERK1/2-Antikörper der Antikörper gegen β -Aktin verwendet worden.

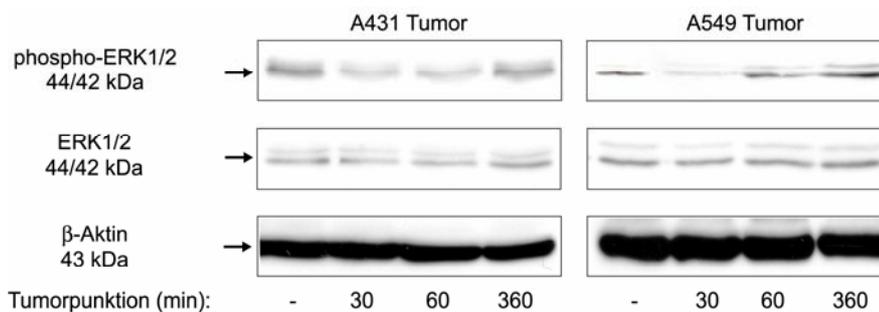


Abb. 3.5.1: Abnahme des TIFP reduziert die Phosphorylierung von ERK1/2. Die Western Blot-Banden zeigen den Zeitverlauf der ERK1/2 Phosphorylierung in A431 und A549 Tumoren im Vergleich zwischen unbehandelten und punktierten Tumoren. Die Zeitangaben beziehen sich auf den Zeitpunkt der Tumorentnahme nach Punktion (z.B. 30 = dieser Tumor wurde 30 min nach Punktion exzidiert).

Die quantitative Analyse von fünf unabhängigen Experimenten ist in der nachstehenden Graphik (Abb. 3.5.2) dargestellt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die ERK1/2 Phosphorylierung in 30 bzw. 60 min nach der Punktion entfernten Tumoren auf ca. 40% (A431) bzw. ca. 35-50% (A549) des Ausgangswertes von unbehandelten Kontrolltumoren sinkt. Tumore, welche erst 6 h nach der Punktion für die molekularbiologischen Untersuchungen aus den Tieren exzidiert wurden, weisen hingegen ca. 80% (A431) und ca. 90-95% (A549) des Phosphorylierungsstatus der unbehandelten Kontrolltumore auf. Die beiden Tumorentitäten unterscheiden sich untereinander nicht signifikant. Der Rückgang der prozentualen ERK1/2 Phosphorylierung ist bei beiden Tumoren nach der Punktion für die jeweiligen Messzeitpunkte relativ ähnlich.

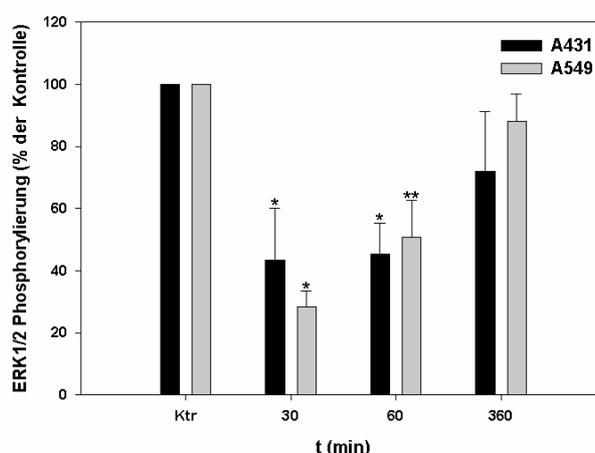


Abb. 3.5.2: Abnahme des TIFP reduziert die Phosphorylierung von ERK1/2 (2). Quantitative Darstellung der Ergebnisse aus Abb. 3.6.1. Prozentuale Phosphorylierung der TIFP reduzierten Tumore im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltumoren. Die Daten sind Mittelwerte \pm SE (* p < 0.001 vs. unbehandelte Kontrolltumore; ** p < 0.01 vs. unbehandelte Kontrolltumore) für fünf unabhängige Experimente.

3.5.2 Kein Einfluss des TIFP auf die Phosphorylierung von p38 in A431 Tumoren

Neben ERK1/2 sollte auch die Phosphorylierung von p38 in A431 Tumoren mittels Western Blot-Analysen nachgewiesen werden. Bei den für diesen Versuch eingesetzten Proteinproben handelt es sich um die gleichen, welche für die Bestimmung der ERK1/2 Phosphorylierung benutzt worden waren (Abb. 3.5.3).

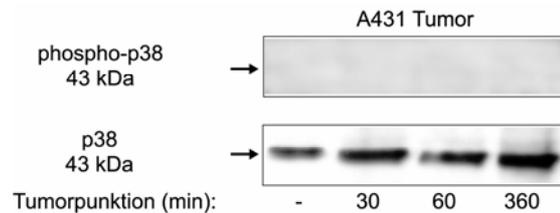


Abb. 3.5.3: Keine Phosphorylierung von p38 MAPK in A431 Tumoren. In allen Tumorproben konnte p38 detektiert werden, es waren jedoch keine Banden für phospho-p38 im Western Blot nachweisbar.

In keiner der Tumorproben konnte der Nachweis der Phosphorylierung von p38 MAPK im Western Blot festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte das Protein p38 mittels Gesamtantikörper in allen Proben detektiert werden. Aufgrund des überraschenden Ergebnisses wurde dieser Versuch mehrfach durchgeführt. Das Ergebnis blieb jedoch konstant. Es war keine p38 Phosphorylierung in A431 Tumoren nachweisbar. Die Funktion des phospho-p38-Antikörpers wurde von Kollegen in anderen Versuchen überprüft. In diesen Experimenten zeigte der Antikörper im Western Blot die erwarteten Ergebnisse auf.

3.6 Permanente Senkung des TIFP

3.6.1 Regeneration des TIFP nach Tumorpunktion

Die vorhergehenden Versuche zeigen, dass nach der Punktion der Tumore die Phosphorylierung von ERK1/2 reduziert wurde. 6 h nach der Tumorpunktion war jedoch erneut das von den unbehandelten Tumoren bekannte Phosphorylierungsmuster der ERK1/2 nachzuweisen. Die nächsten Versuche sollten klären, ob die wiederholte Phosphorylierung von ERK1/2 in Zusammenhang mit dem TIFP stehen könnte. Zu diesem Zeitpunkt waren noch keine TIFP-Messungen nach der Punktion der Tumore durchgeführt wurden. Im Rahmen dieses Versuches wurde der TIFP in A431 Tumoren mittels *wick-in-needle*-Technik 6 h vor, während und 6 h nach der Punktion gemessen. Insgesamt wurden die Untersuchungen an fünf NMRI-Nacktmäusen durchgeführt. Die nachfolgende graphische Abbildung belegt, dass die Tumorpunktion zu einer signifikanten Reduktion des TIFP führt. Bereits 6 h nach der Punktion beträgt der TIFP jedoch erneut 80-90% des vor dem Eingriff gemessenen Ausgangswertes. Dies lässt vermuten, dass sich der Tumor nach der Punktion sehr schnell erneut mit interstitieller Flüssigkeit füllt. Die Tumorzellen sind den regenerierten mechanischen Dehnungsreizen somit erneut ausgesetzt und zeigen das für den Ausgangsbefund typische Phosphorylierungsmuster der proliferationsassoziierten MAPK.

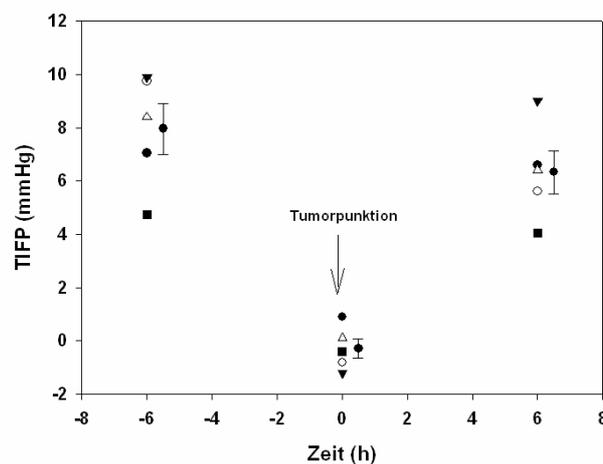


Abb. 3.6.1: Effekt der Tumorpunktion auf den TIFP. Der Graph zeigt die TIFP-Werte von fünf individuellen Tieren 6 h vor, während und 6 h nach der Punktion von A431 Tumoren.

3.6.2 Reduktion des TIFP über längere Zeiträume mittels Tumordrainage

Zum Nachweis ob die mechanische Dehnung der Tumorzellen auch die Expression des Tumorproliferationsmarkers Ki-67 beeinflusst, war es notwendig den TIFP für eine längere Zeitspanne zu reduzieren und den Tumor mechanisch zu entlasten. Wie die vorangegangenen Experimente zeigen, reicht eine einmalige Tumorpunktion hierfür nicht aus, da sich die zystische Zentralregion nach Beendigung der Punktion erneut mit interstitieller Flüssigkeit füllt.

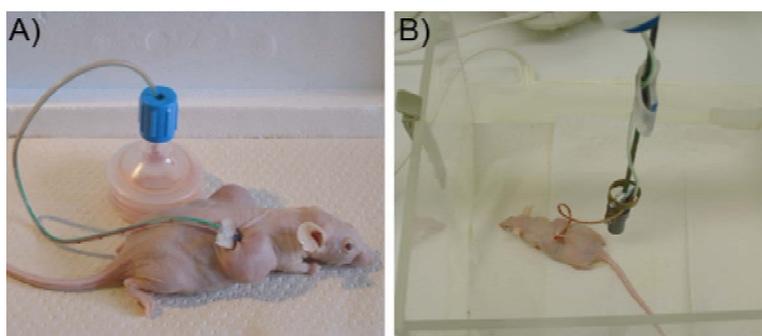


Abb. 3.6.2: Permanente TIFP-Drainage mittels Redon-Mini-Drain. A) NMRI-Nacktmaus mit intratumoral implantiertem Redon-Mini-Drain. Abgesaugte Tumorflüssigkeit ist innerhalb des Drainageschlauchs und des Saugballes sichtbar. B) Die Befestigung des Redon-Mini-Drains an einem um 360° beweglichen Kran, ermöglicht dem Versuchstier Beweglichkeit und freien Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum*.

Als Lösungsmöglichkeit bot sich die operative Implantation eines Redon-Mini-Drain in den Tumor an. Dadurch konnte das erneute Füllen der Tumorzyste verhindert werden. Die in die Zyste strömende interstitielle Flüssigkeit wird durch Unterdruck in den implantierten Drainageschlauch gesaugt und in einen Sammelbehälter geleitet (Abb. 3.6.2A). Durch das Anbringen des Redon-Mini-Drain-Sets an einem freibeweglichen Kran können die Versuchstiere trotz des implantierten Drainageschlauchs aus der Operationsnarkose aufwachen und in ihrem Käfig herumlaufen ohne den Schlauch aus dem Tumor herauszuziehen (Abb. 3.6.2B). Nach 24 h wurden die Tiere erneut anästhesiert und das Drainage-Set wurde entfernt. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte ebenfalls die operative Entfernung der Tumore für die nachfolgenden immunhistochemischen Versuche.

Vor den Versuchen zur Messung der Ki-67 Expression in permanent TIFP reduzierten Tumoren wurde die Effektivität der Tumordrainage durch die Messung des TIFP an A431 und A549 Tumoren mittels *wick-in-needle*-Technik überprüft. Hierzu musste der TIFP 6 h vor, während und 6 h nach der Punktion bestimmt werden. Der Unterschied zum vorangegangenen Experiment lag darin, dass eine einmalige Tumorpunktion mit permanenter

Tumordrainage verglichen wurde. Zudem wurden die Versuche auch an A549 Tumoren durchgeführt. Wie Abb. 3.6.3 zeigt, steigt der TIFP bei beiden Zelllinien nach einer einmaligen Tumorpunktion wieder an und erreicht 6 h nach der Punktion nahezu die Ausgangswerte. Die Implantation eines Redon-Mini-Drain verhindert den erneuten Anstieg des TIFP sowohl in A431 als auch A549 Tumoren. Durch dieses experimentelle Setup (Redon-Mini-Drain) ist es möglich den TIFP über einen längeren Zeitraum zu senken. Dadurch ist es möglich gewesen Untersuchungen an Proteinen durchzuführen, die erst bei einer langanhaltenden Reduktion des TIFP Veränderungen in ihrem Expressionsmuster aufweisen.

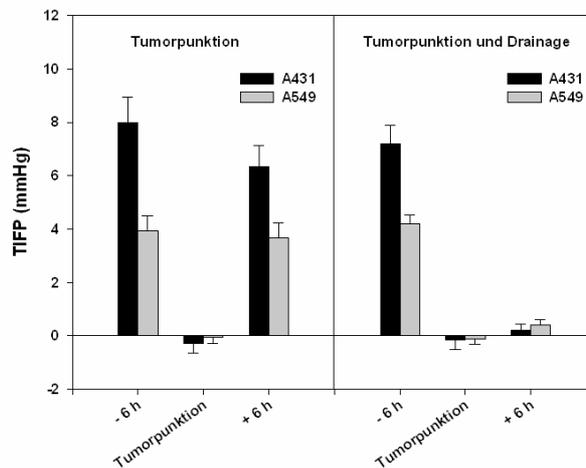


Abb. 3.6.3: Reduktion des TIFP nach einfacher Tumorpunktion oder permanenter Tumordrainage. Die graphische Darstellung vergleicht den TIFP in NMRI-Nacktmäusen mit oder ohne Tumordrainage nach einer Tumorpunktion. Die Messungen erfolgten mittels *wick-in-needle*-Technik zu bestimmten Zeitpunkten (6 h vor, während und 6 h nach der Punktion). n = 5 (A431 und A549) für jede Gruppe.

3.7 Ki-67 Färbungen

Zur Untersuchung von weiteren Proteinen, welche Hinweise auf eine proliferationsfördernde Wirkung der TIFP induzierten mechanischen Dehnung geben könnten, bot sich der Tumorphiliferationsmarkers Ki-67 an. Mittlerweile hat sich der Nachweis von Ki-67 als „Goldstandard“ in der Tumordiagnostik etabliert. Das Ki-67 Protein wird nur in proliferierenden Zellen gebildet, so dass über die Ki-67 Expression direkte Rückschlüsse auf die Proliferation von Zellen gezogen werden können. Schnell wachsende Tumorzellen weisen dementsprechend eine sehr hohe Ki-67 Expression auf.

In den durchgeführten Versuchen wurden Gewebeschnitte von A431 und A549 Tumoren aus unbehandelten Kontrolltumoren und aus TIFP reduzierten Tumoren mit Ki-67 Antikörpern inkubiert und anschließend mit AEC-Substrat gefärbt. Der TIFP wurde in den Tumoren zuvor durch einen implantierten Redon-Mini-Drain für 24 h gesenkt. Anschließend wurden sie exzidiert und in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert, gefolgt von einer dauerhaften Einbettung in Paraffin. Für die immunhistochemische Färbung sind sie anschließend in dünne Gewebesektionen geschnitten und entparaffinisiert worden.

3.7.1 Ki-67 Färbungen an unbehandelten und TIFP-reduzierten A431 Tumoren

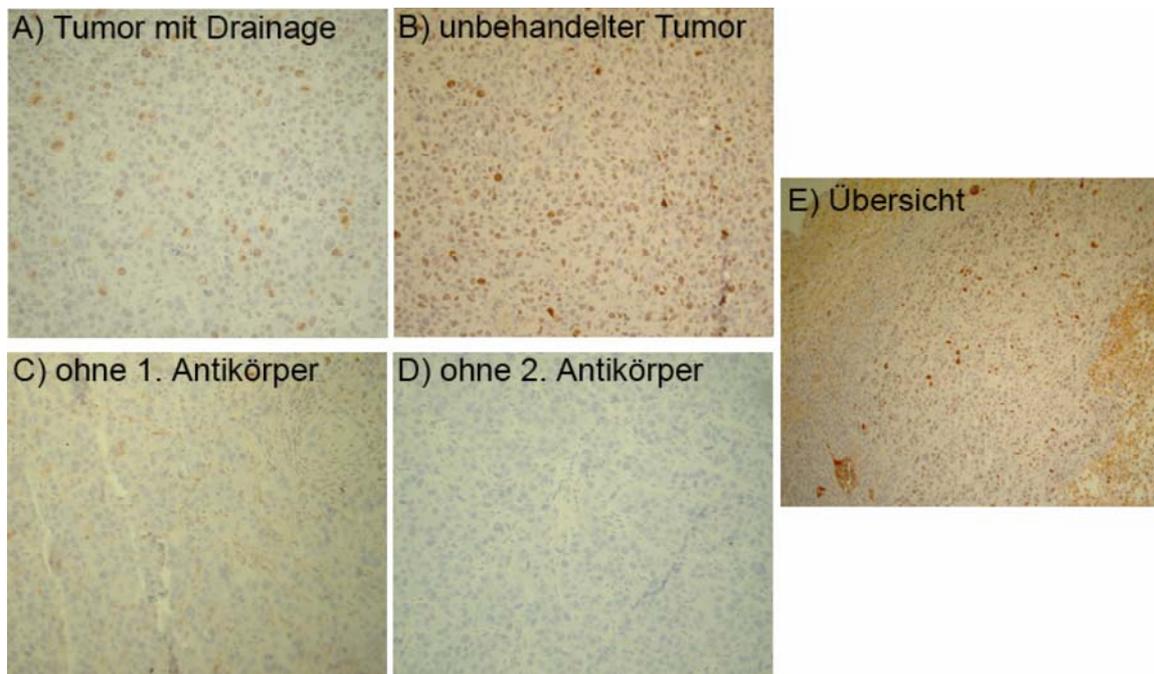


Abb. 3.7.1: Herabsetzung des TIFP für 24 h reduziert die Ki-67 Expression in A431-Zellen. Immunhistochemische Ki-67 Färbung an A431 Gewebeschnitten aus Tumoren mit verringertem TIFP (A; C-E) und einem unbehandelten Kontrolltumor (B). Vergrößerungsfaktor: 100fach (A-D); 20fach (E)

Abbildung 3.7.1 stellt das repräsentative Ergebnis einer immunhistochemischen Ki-67 Färbung an Gewebeschnitten von A431 Tumoren dar. Das erste Foto (A) zeigt die Ki-67 Färbung an einem Gewebeschnitt eines A431 Tumors, der zuvor für 24 h mittels implantiertem Redon-Mini-Drain TIFP entlastet wurde. Ki-67 positive Zellen sind als rötliche braune Zellen in den Aufnahmen zu erkennen. Vergleicht man Aufnahme A mit Aufnahme B, welche die Ki-67 Färbung am Gewebeschnitt eines unbehandelten Kontrolltumors zeigt, so erkennt man eine Abnahme an Ki-67 positiv gefärbten Zellen in Aufnahme A. Die permanente Reduktion des TIFP scheint eine geringere Expression von Ki-67 positiven Zellen zur Folge zu haben. Um zu untersuchen inwieweit eine mögliche Hintergrundfärbung die Ergebnisse beeinflusst, ist das Tumorgewebe sowohl ohne 1. AK (C) bzw. 2. AK (D) behandelt worden. Es zeigt sich, dass der 2. AK allein eine minimale Färbung des Hintergrundes hervorrufen kann (C). Eine spezifische Zellfärbung ist jedoch nicht ersichtlich. Eine Färbung ohne 2. AK führt zu keiner Hintergrundfärbung und beeinflusst die Färbung überhaupt nicht (D). In Aufnahme E ist in einer Übersicht dargestellt, dass nur Zellen aus dem Bereich des vitalen Tumorkortex für die Bestimmung des Ki-67 Index einbezogen wurden. Zellen aus dem nekrotischen Zentrum des Tumors wurden bei der Auszählung der Ki-67 positiven Zellen nicht mit eingeschlossen.

3.7.2 Ki-67 Färbungen an unbehandelten und TIFP-reduzierten A549 Tumoren

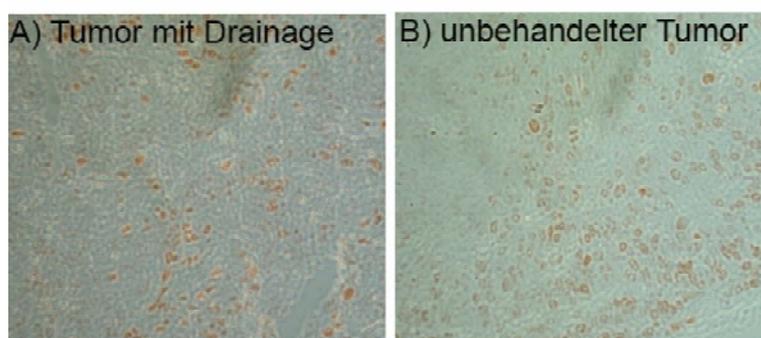


Abb. 3.7.2: Herabsetzung des TIFP für 24 h reduziert die Ki-67 Expression in A549-Zellen. Immunhistochemische Ki-67 Färbung an A549 Gewebeschnitten aus Tumoren mit verringertem TIFP (A) und unbehandelten Kontrolltumoren (B). Vergrößerungsfaktor: 100fach

Um die an A431 Tumoren gewonnenen Ergebnisse zu untermauern, wurde das gleiche experimentelle Setup auch auf A549 Tumore übertragen. Wie die obige Abbildung 3.7.2 zeigt, führt die Ki-67 Färbung an A549 Tumoren zu einem ähnlichen Bild wie es zuvor bei den A431 Tumoren zu sehen gewesen ist. Die Gewebeschnitte, welche aus TIFP reduzierten Tumoren stammen (I), weisen im Vergleich mit den Proben aus unbehandelten

Kontrolltumoren (II) eine verringerte Ki-67 Expression auf. Auch in den Experimenten mit A549 Tumoren wurde der TIFP durch die Implantation eines Redon-Mini-Drains für 24 h gesenkt.

3.7.3 Vergleich der Ki-67 Expression zwischen A431 und A549 Tumoren (Kontrolle, Punktion, Drainage)

Zur Bestätigung, dass nicht eine einzelne Tumorpunktion, sondern die permanente Entlastung des Tumors Ursache für die Reduktion der Ki-67 Expression ist, wurden die immunhistochemischen Ki-67 Färbungen nochmals an A431 und A549 Tumoren wiederholt. Die zur Färbung verwendeten Gewebeschnitte stammen bei diesem Versuch aus unbehandelten Kontrolltumoren (Abb. 3.7.3 A-D), sowie Tumoren, die einmal 24 h vor der Exzidierung des Tumors mit einer Kanüle punktiert wurden (Abb. 3.7.3 E-H) oder die für 24 h mit einem Redon-Mini-Drain implantiert waren.

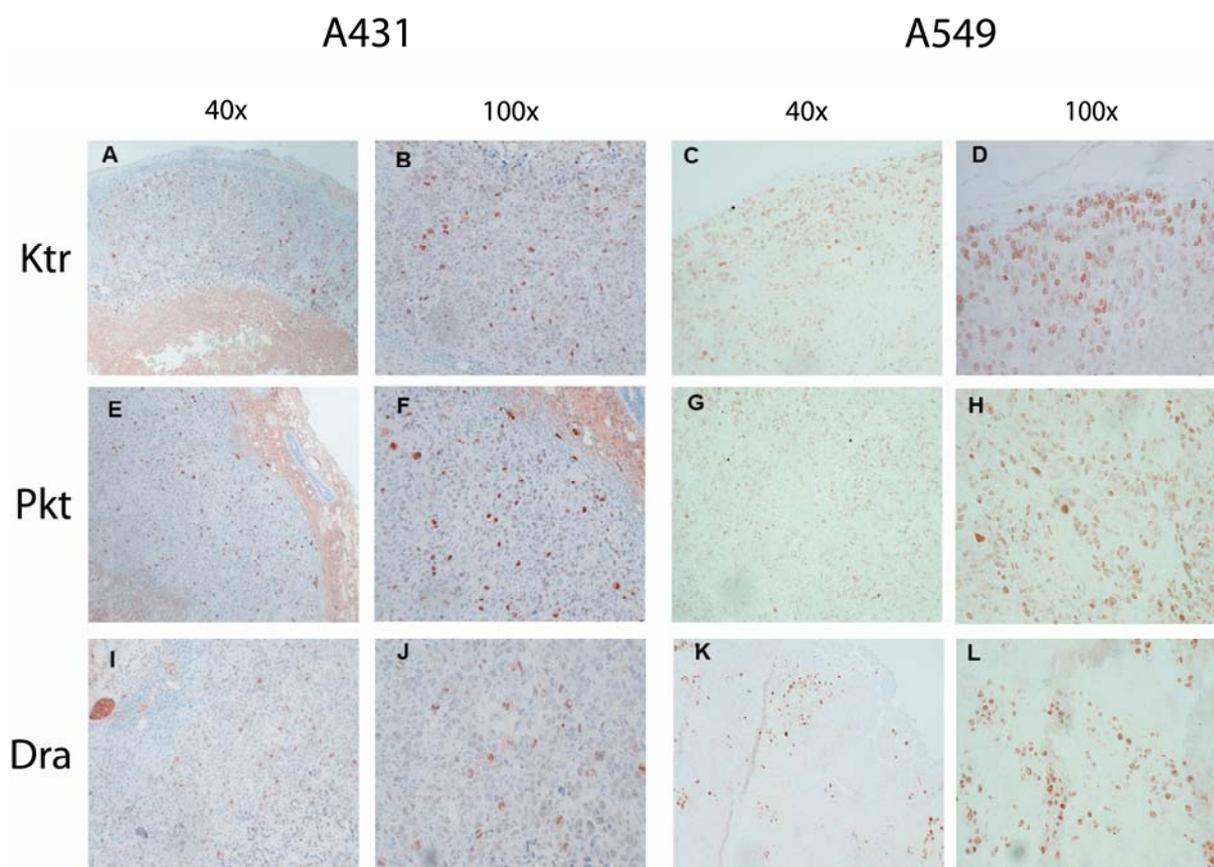


Abb. 3.7.3: Tumordrainage reduziert die Ki-67 Expression. Immunhistochemische Ki-67 Färbung an A431 und A549 Gewebeschnitten aus Tumoren nach einfacher Punktion oder permanenter Drainage. Ktr = Kontrolle; Pkt = Punktion und Dra = Drainage

Die vorab dargestellten Aufnahmen zeigen, dass es keinen Unterschied zwischen den unbehandelten Kontrolltumoren und den punktierten Tumoren hinsichtlich der Expression

von Ki-67 gibt. Ebenso ist kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Tumorzelllinien zu erkennen. Vergleicht man die Gewebeschnitte der unbehandelten bzw. punktierten Tumore mit denen, deren TIFP durch Drainage für 24 h permanent abgesenkt war (Abb. 3.7.3 I-L), weisen diese Schnitte eine signifikante Abnahme an Ki-67 positiven Zellen auf. Dies trifft sowohl auf die A431 als auch A549 Tumore zu. Die Aufnahmen mit 40facher Vergrößerung zeigen, dass die Ki-67 positiven Zellen nur im Bereich des Tumorkortex vorkommen. In einigen Aufnahmen ist zu erkennen, dass sich die Ki-67 positiven Zellen verstärkt im äußersten Bereich des Kortex befinden. Dies ist der Bereich, welcher am stärksten durch mechanische Dehnungsreize stimuliert wird.

Die nachfolgende graphische Abbildung 3.7.4 stellt die Ergebnisse der Ki-67 Färbung quantitativ dar. Sie dokumentiert, dass in unbehandelten bzw. einfach punktierten A431 Tumoren ca. 27-33% der Tumorzellen Ki-67 positiv sind. Im Vergleich dazu sind nach einer permanenten Tumordrainage nur rund 8-12% der Zellen Ki-67 positiv gefärbt. Dieses Ergebnis zeigt somit einen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten Kontrollen und punktierten Tumoren auf der einen und der Tumordrainage auf der anderen Seite. Für A549 Tumore ergibt sich ein ähnliches Bild. Generell liegen die Werte der unbehandelten und punktierten Tumore etwas niedriger als bei den A431 Tumoren. Es ergeben sich ca. 23-28% positive Ki-67 Zellen für die unbehandelten und punktierten Tumore. Der prozentuale Wert für die Ki-67 positiven Zellen nach der Tumordrainage liegt bei ca. 13-16%.

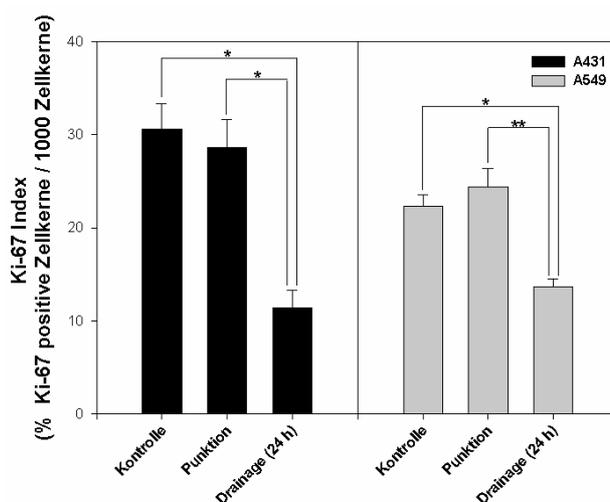


Abb. 3.7.4: Graphische Übersicht der Ki-67 Expression. Ki-67 Expression in unbehandelten A431 und A549 Tumoren bzw. nach einmaliger Tumorpunktion bzw. Tumordrainage (24 h). Die Ergebnisse zeigen die Messergebnisse der Auszählung von jeweils fünf Gewebeschnitten für jedes Experiment +/- SE (* $p < 0,05$ und ** $p < 0,001$). Die Auszählung erfolgte mittels Cell Explorer 2000 Software.

3.7.4 Einfluss der Tumordrainage auf die Gefäßarchitektur

Es besteht die Gefahr, dass der bei der Tumordrainage entstehende geringe Unterdruck die tumorversorgenden Blutgefäße kollabieren lassen könnte. Der Tumor würde eventuell schlechter mit Nährstoffen versorgt und die Abnahme der Ki-67 Expression wäre somit eine Reaktion auf die verringerte Nährstoffsituation des Tumors und nicht auf den reduzierte TIFP. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden Kryoschnitte von unbehandelten Kontrolltumoren mit dem Endothelzellmarker CD31 inkubiert. CD31 färbt spezifisch vaskuläre Endothelzellen, so dass Zellen des tumoralen Blutgefäßsystem angefärbt wurden. Die Schnitte der Kontrolltumoren wurden mit Präparaten verglichen, die von Tumoren stammten, an denen eine Drainage durchgeführt worden war. Die Aufnahmen in Abb. 3.7.5 zeigen, dass sowohl in Probenmaterial von Kontrolltumoren wie auch Tumoren mit Drainage offene, großlumige Blutgefäße nachgewiesen werden konnten. Es ist keine signifikant erhöhte Zahl an kollabierten Gefäße in Tumoren mit Drainage gegenüber den unbehandelten Kontrollen festzustellen.

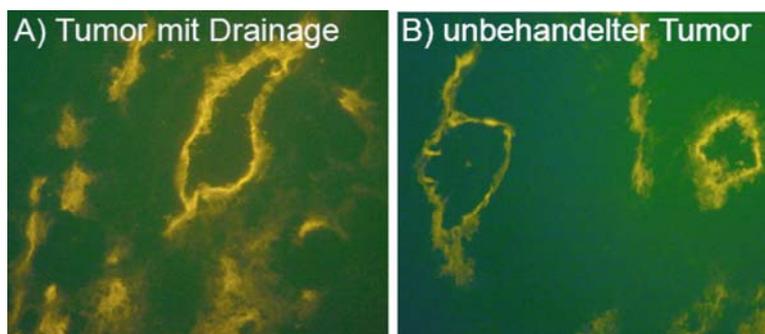


Abb. 3.7.5: Senkung des TIFP zeigt keinen Einfluss auf die Gefäßarchitektur. Immunhistochemische Färbung von Blutgefäßen mit CD31-PE gekoppelten Antikörpern. A) Kryoschnitt von einem Tumor mit Drainage; B) Kryoschnitt von einem unbehandeltem Kontrolltumor Vergrößerungsfaktor: 320fach.

3.8 Untersuchung der Lympharchitektur in A431 und A549 Tumoren (*)**

Die bisherigen Versuche bestätigen, dass sich der TIFP zwischen verschiedenen Tumorentitäten stark voneinander unterscheidet. In den Xenograft-Modellen weisen A431 Tumore im Vergleich zu A549 oder auch G361 Tumoren immer einen höheren TIFP auf. Über die Ursachen dieser sehr großen Unterschiede im TIFP ist wenig bekannt. Wie bereits im Einleitungsabschnitt angesprochen gibt es etliche Faktoren, die einen hohen TIFP begünstigen. Einer der zentralen Faktoren ist die sehr stark eingeschränkte lymphatische Drainage der Tumore. Dadurch kommt es zu einer Stauung von interstitieller Flüssigkeit im Tumorgewebe, welche direkten Einfluss auf den TIFP hat. Durch einen Gastaufenthalt in der Gruppe von Dr. S. Hirakawa, einem Experten auf dem Gebiet der Lymphangiogenese, am Zentrum der Dermatologie der Ehime Universität, hat sich mir die Möglichkeit geboten immunhistologische und molekularbiologische Untersuchungen an Gewebeproben von A431 und A549 Tumoren vorzunehmen. Diese Versuche hatten das Ziel auf experimentellem Wege herauszufinden, ob sich die Lympharchitektur zwischen beiden Tumorentitäten unterscheidet. Möglicherweise können diese Ergebnisse auch Antworten auf die Fragestellung liefern, warum sich A431 und A549 Tumore in ihrem TIFP unterscheiden.

3.8.1 Immunhistologische Färbungen gegen Podoplanin und CD31 an A431 und A549 Tumoren

Alle in Japan durchgeführten Experimente wurden an Probenmaterial durchgeführt, welches zuvor in Frankfurt gewonnen wurde und als Paraffinschnitt bzw. als tiefgefrorene Kryoprobe vorlag. Aus diesem Grund mussten vor Ort keine zusätzlichen Tierversuche durchgeführt werden.

3.8.1.1 Immunhistologische Färbungen an Paraffinschnitten

In den ersten Versuchen wurden in paraffin-eingebettete Gewebeschnitte von A431 und A549 Tumoren gegen Podoplanin gefärbt. Podoplanin ist ein transmembranes Glykoprotein, das speziell in lymphatischen Endothelzellen exprimiert wird und somit einen sehr guten Marker für die Lymphgefäße darstellt. Zusätzlich wurden die Zellkerne in den Gewebeschnitten mit dem nukleären Marker DAPI angefärbt. In Abb. 3.8.1 ist eine solche Doppelfärbung am Beispiel von A431 und A549 Tumoren gezeigt. Die Podoplanin positiven Arealen erscheinen in den Fluoreszenzaufnahmen rot. Die blaue Färbung resultiert aus der DAPI-Färbung und macht die Zellkerne der Tumorzellen sichtbar. Die Aufnahmen 3.8.1A und B wurden an A431 Geweben gemacht, das Gewebe in Aufnahme 3.8.1C stammt aus einem A549 Tumor. Es fällt

auf, dass nur bei den an A431 Tumoren durchgeführten Färbungen eine Färbung von Podoplanin-positiven Strukturen auftritt. Hingegen ist bei den A549 Proben nur eine leichte, rötliche Hintergrundfärbung zu sehen aber keine Färbung von Strukturen, die als Lymphgefäße identifiziert werden konnten.

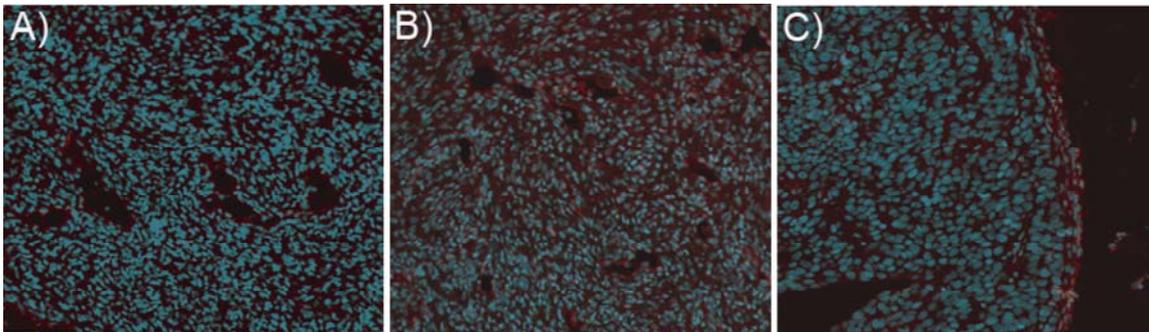


Abb. 3.8.1 Podoplaninfärbung an Paraffinschnitten. A) A431 Tumor. Podoplanin-positive Strukturen (rot) mit offenen Lumen sind innerhalb des Tumorgewebes zu erkennen. DAPI-Kernfärbung (blau); B) A431 Tumor. Siehe Beschreibung zu A; C) A549 Tumor. Keine Färbung von Lymphgefäß-ähnlichen Strukturen. Schwache Hintergrundfärbung durch Podoplanin (rot). DAPI-Kernfärbung (blau); Vergrößerungsfaktor für alle Aufnahmen: 200fach

3.8.1.2 Immunhistologische Färbungen an Gefrierschnitten

Den Färbungen an Paraffinschnitten folgten weitere an Kryogewebeproben von A431 und A549 Tumoren. Bei diesen Untersuchungen wurden Dreifachfärbungen durchgeführt. Neben Podoplanin und DAPI wurde zusätzlich CD31 eingesetzt. CD31 ist ein Marker für vaskuläre Endothelzellen im Vergleich zu Podoplanin, welches sehr spezifisch für lymphatische Endothelzellen ist. Bei den durchgeführten Färbungen ist zu beachten, dass in den nachfolgenden Aufnahmen (Abb. 3.8.2) CD31 rot und Podoplanin grün dargestellt ist. Bei den A431 Tumoren sind CD31-positive Gefäße von Podoplanin positiven Bereichen umgeben. Die Gefäße, welche von CD31-positiven Zellen ausgekleidet sind, weisen weite, offene Lumina auf (Abb. 3.8.2A). Im Gegensatz dazu ist bei A549 Tumoren eine viel höhere Anzahl an Gefäßen durch die CD31-Färbung nachweisbar. Diese sind generell sehr viel kleiner als bei den A431 Tumoren und sehen z.T. kollabiert aus. Auch bei den Kryoschnitten können an den A549 Tumoren keine Podoplanin-positiven Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 3.8.2B).

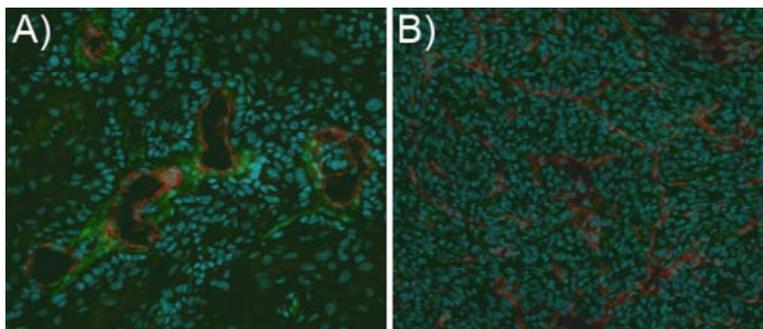


Abb. 3.8.2 Podoplaninfärbung an Gefrierschnitten. A) A431 Tumor. Großlumige Gefäße, die mit CD31-positiven Zellen (rot) ausgekleidet sind, umgeben von Podoplanin gefärbten Bereiche (grün, unstrukturiert). DAPI-Kernfärbung (blau); B) A549 Tumor. Eine Vielzahl von kleinen CD31-positiven Strukturen (rot) durchziehen das Tumorgewebe, keine Areale mit Podoplanin-spezifischer Färbung (grün). DAPI-Kernfärbung (blau); Vergrößerungsfaktor beider Aufnahmen: 200fach

3.8.2 Molekularbiologische Untersuchungen zur Expression von VEGF und HIF-1 α in A431 und A549 Tumoren

Neben den immunhistologischen Experimenten fanden molekularbiologische Versuche zur Prüfung der Expression von Proteinen statt, die in der Lymphangiogenese involviert sind. Die Untersuchungen wurden mittels RT-PCR durchgeführt. Als Zielproteinen wurden VEGF-A, VEGF-C und HIF-1 α näher untersucht. Alle drei Proteine sind hinreichend dafür bekannt die Lymphangiogenese zu fördern. Die Isolierung der RNA erfolgte direkt aus dem zu diesem Zweck aufgetauten Kryogewebeproben der A431 und A549 Tumore. Die zur Durchführung der Experimente notwendigen Primersequenzen sind untenstehend aufgelistet:

hVEGF-A (Dr. S. Hirakawa, Ehime Universität)

sense: 5'-TGG CAG AAG GAG GAG GGC AGA AT-3'

antisense: 5'-GCA GCA GCC CCC GCA TCG CAT CA-3'

hVEGF-C (Dr. S. Hirakawa, Ehime Universität)

sense: 5'-AGG AAA GGA GGC TGG CAA CAT AAC A-3'

antisense: 5'-CAT GGC TGG GGA AGA GTT TGT TTT-3'

hHIF-1 α (Frede et al, *Biochem J*, 396:517-27, 2006)

sense: 5'-GCT GGC CCC AGC CGC TGG AG-3'

antisense: 5'-GAG TGC AGG GTC AGC ACT AC-3'

GAPDH (Dr. S. Hirakawa, Ehime Universität)

sense: 5'-TCA CTG GCA TGG CCT TCC-3'

antisense: 5'-GGC GGG CAC GTC AGA TCC A-3'

Die nachfolgende Abbildung 3.8.3 zeigt die Ergebnisse der RT-PCR bzgl. der Expression von VEGF-A und VEGF-C in den beiden Tumorentitäten. An den starken Banden ist erkennbar, dass nur A431 Tumorzellen VEGF-A exprimieren. A549 Tumore zeigen keinerlei Hinweise

auf VEGF-A. Für beide Tumore gilt, dass VEGF-C in den zur Verfügung stehenden Proben nicht nachweisbar ist. Um auszuschließen, dass die isolierte RNA möglicherweise nicht ausreichend oder degradiert ist, ist auch die Expression des Haushaltsgens GAPDH getestet worden. Bei beiden Tumoren ist dort eine kräftige Bande zu erkennen, so dass davon auszugehen ist, dass intakte RNA für die RT-PCR Reaktionen zur Verfügung gestanden hat.

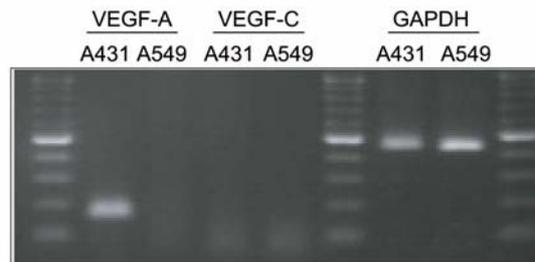


Abb. 3.8.3 VEGF-A und VEGF-C Expression in A431 und A549 Tumoren. Differentielle Expression von VEGF-A in A431 und A549 Tumoren. Keine Expression von VEGF-C in beiden Tumorentitäten. Als Abgleich dient GAPDH.

Abbildung 3.8.4 stellt das Versuchsergebnisse für die mRNA Expression von HIF-1 α in A431 und A549 Tumoren dar. Auch hier sind deutliche Unterschiede zwischen beiden Tumorentitäten feststellbar. Die A431 Tumore zeigen eine deutliche Expression von HIF-1 α mRNA auf, während in den A549 Tumorproben keine HIF-1 α Expression nachzuweisen ist.

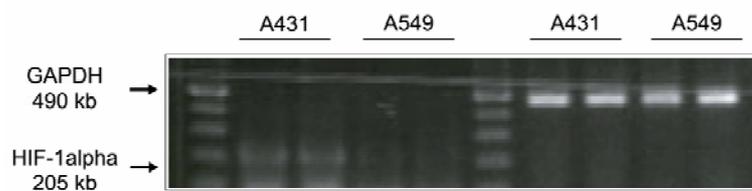


Abb. 3.8.4 HIF-1 α Expression in A431 und A549 Tumoren. Differentielle Expression von HIF-1 α in A431 und A549 Tumoren. Als Abgleich dient GAPDH.

3.9 Senkung des TIFP durch erhöhten kolloidosmotischen Druck

3.9.1 Messung des Tumolvolumens an A431 Tumoren in Rowett Nacktratten (*)

Im Rahmen eines Marie Curie Fellowships der Europäischen Union konnte ein Teil der Dissertation am Institut für Biomedizin der Universität Bergen, Bergen, Norwegen durchgeführt werden. Die dortige Arbeitsgruppe um Prof. Dr. H. Wiig verfügt über eine große Expertise in der Messung des IFP/TIFP mittels *wick-in-needle*- bzw. *micropuncture*-Technik. Darüber hinaus konnten dort unter fachkundiger Anleitung weitere Methoden zur Bestimmung physiologischer Parameter (Messung des kolloidosmotischen Drucks, u.a.) erlernt und durchgeführt werden. Die im Verlauf des ersten Aufenthaltes durchgeführten Untersuchungen wurden alle an Rowett-Nacktratten unternommen. Der Hauptgrund für die Verwendung von Ratten anstatt NMRI-Nacktmäusen lag darin begründet, dass am dortigen Institut keine Nacktmäuse vorhanden waren und ein Tierversuchsantrag für die s.c. Injektionen von Tumorzellen in Ratten vor Ort vorlag.

Alle Versuche am Institut für Biomedizin der Universität Bergen wurden an A431-Tumorzellen durchgeführt. Die Zellen entstammen dem Frankfurter Labor und wurden auf Trockeneis nach Norwegen geschickt. Zur Haltung der Zellen wurden die gleichen Medien und Zusätze wie in Deutschland eingesetzt. Insgesamt sind für jede Ratte 1×10^7 Tumorzellen zur Induktion eines Tumors im Nackenbereich benötigt worden. Wie schon bei den Nacktmäusen wurde das Tumorstadium über die Zeit verfolgt und die Tumore alle drei Tage mit einer Schieblehre vermessen, um das Tumorstadium berechnen zu können. Der erste Tag der Vermessung fand jeweils eine Woche nach der Inokulation der Tumorzellen statt. Zur Berechnung wurde auch hier die bereits in Kapitel 3.4.1 angeführte Formel verwandt. Die nachfolgende Abbildung 3.9.1 stellt die Wachstumskurve der A431 Tumore in Rowett-Nacktratten und zum Vergleich in NMRI-Nacktmäusen über einen Zeitraum von 16 Tagen dar. Es lässt sich erkennen, dass die Wachstumsgeschwindigkeit bis zum Tag 10 bei den A431 Tumoren in Maus und Ratte keinen Unterschied aufweist. Danach ist allerdings eine Verlangsamung des Tumorstadium bei den Nacktratten festzustellen, so dass die Tumorstadien am Tag 16 bei ca. 2000 mm^3 in der Maus und bei ca. 1200 mm^3 in der Ratte liegen.

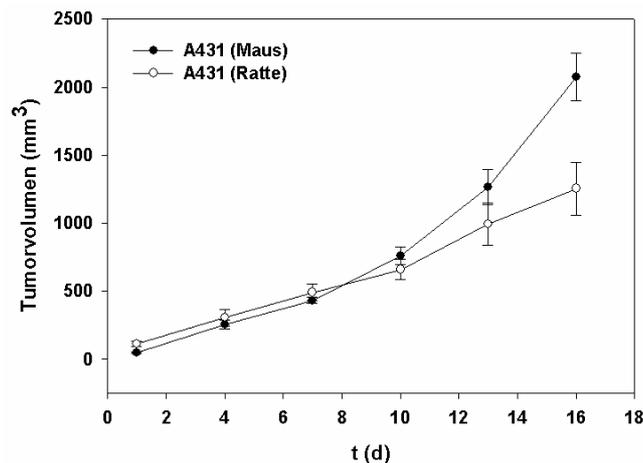


Abb. 3.9.1: Zunahme des Tumorstadiums über die Zeit in A431 Tumoren in NMRI-Nacktmäusen und Rowett-Nacktratten. Der Graph zeigt die Zunahme des Tumorstadiums von A431 Tumoren im Verlauf von 16 Tagen. Tag 0 entspricht Tag 7 nach Inokulation der Tumorzellen. Daten sind Mittelwerte \pm SE; $n = 10$ je Spezies.

3.9.2 Messung des TIFP an A431 Tumoren in Rowett Nacktratten mittels *micropuncture* Technik (*)

Der TIFP wurde in den A431 Tumoren der Nacktratten zu Beginn mittels *wick-in-needle*-Technik bestimmt. Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurden weitere TIFP-Messungen mit der *micropuncture*-Methode durchgeführt. Die Ergebnisse beider Messmethoden korrelierten in der Mehrzahl der durchgeführten Experimente, so dass sie in einer Abbildung zusammengefasst wurden (Abb. 3.9.2). Zur Klärung inwieweit eine Senkung des TIFP Einfluss auf die Aufnahme von Substanzen in den Tumor hat, musste diese Messtechnik für die nachfolgenden Versuche aus praktikablen Gründen angewandt werden. Der große Vorteil der *micropuncture*-Methode besteht darin eine Messung durchführen zu können, ohne den TIFP direkt zu beeinflussen. Bei der *wick-in-needle*-Methode kann man nach einer Messung die Kanüle nicht aus dem Tumor ziehen, ohne dass es zu einem Austritt von Tumorfüssigkeit kommt. Bei einer Messreihe, die z.B. jede Stunde eine Messung des TIFP erforderte, würde dieser Flüssigkeitsverlust zu einer starken Beeinträchtigung des Messergebnisses führen. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Entwicklung des TIFP im Verhältnis zum Tumorstadium bei Rowett-Nacktratten und NMRI-Nacktmäusen. Es fällt auf, dass die TIFP-Messwerte in den Mäusetumoren gegenüber den Werten von Rattentumoren gleichen Volumens leicht erhöht sind. Mäusetumore, die ein Volumen von ca. 2000 mm³ aufweisen, sind ca. 24 Tage nach der Inokulation entnommen worden. Die etwas geringere Wachstumsgeschwindigkeit der Tumore in den Nacktratten hat zur Folge (siehe Abb. 3.9.1), dass Tumore mit Tumorstadiumen von 2000 mm³ erst nach ungefähr 32-34 Tagen auftreten.

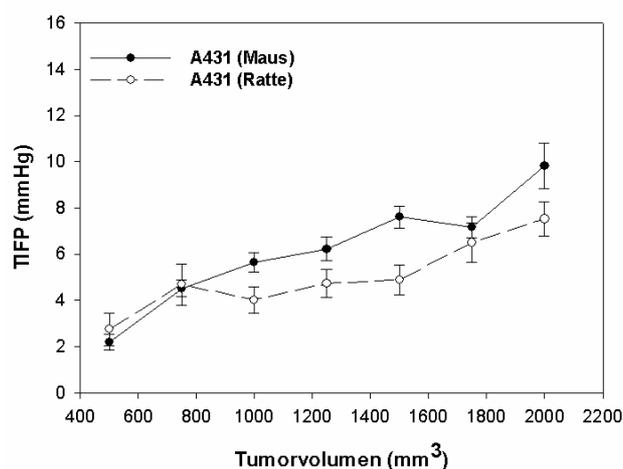


Abb. 3.9.2: Messung des TIFP in A431 Tumoren in NMRI-Nacktmäusen und Rowett-Nacktratten. Die Abbildung zeigt den Anstieg des TIFP bei gleichzeitiger Zunahme des Tumorvolumens. TIFP-Messungen wurden mit der *wick-in-needle*- und *micropuncture*-Technik durchgeführt. Daten sind Mittelwerte \pm SE; n = 10 je Spezies.

3.9.3 Bestimmung des kolloidosmotischen Druckes nach i.v. Infusion von humanem Serumalbumin (*)

Nach erfolgreicher Etablierung der *micropuncture*-Technik konnten die Versuche beginnen, die der Frage nachgingen, ob die i.v. Gabe von kolloidosmotisch wirksamen Substanzen einen Einfluss auf den TIFP hat. Plasmaexpander, die im Rahmen dieser Versuche eingesetzt werden konnten, waren Dextrane, Hydroxyethylstärke oder Albumine. Jedoch schied die Infusion von großen Volumina an Dextranlösungen im Voraus aus, da bekannt ist, dass Ratten auf die i.v. Dextrangabe mit der Ausbildung von Ödemen reagieren (Brønstad et al., 2002). In den Versuchen wurde durchgehend 20%ige HSA-Lösung als Plasmaexpander eingesetzt. Mit einer Beeinflussung des kolloidosmotischen Druckes (COP) ist bei dieser HSA-Konzentration mit hoher Wahrscheinlichkeit zu rechnen.

Für die Versuche selbst wurden den anästhesierten Nacktratten i.v. (*V. jugularis*) und i.a. (*A. carotis*) Katheter gesetzt. Der i.v. Katheter diente zur Verabreichung der 20%igen HSA-Lösung. Diese wurde über einen Zeitraum von 1 h kontinuierlich über einen Perfusor in das Tier injiziert. Das Gesamtvolumen der HSA-Injektion betrug 5 ml und entsprach einer Perfusionsrate von 83,3 μ l/min. Der i.a. Katheter wurde zur Überwachung des arteriellen Blutdruckes des Versuchstieres sowie zur Abnahme von kleinen Blutproben benutzt. Zur Bestimmung des kolloidosmotischen Druckes mussten vor Beginn, während und nach der HSA-Infusion Blutproben des Versuchstieres abgenommen werden. Zu diesem Zweck bestand der i.a. Katheter aus zwei dünnen Schläuchen, welche über einen etwas größeren

Silikonschlauch miteinander verbunden waren. Zur Blutentnahme wurde der Silikonschlauch abgeklemmt, der vom Tier fortführende Katheter abgezogen, ein Röhrchen zum Auffangen der Blutprobe bereit gestellt und die Schlauchklemme geöffnet. Jetzt konnte eine geringe Blutmenge gesammelt werden. Danach wurde der Schlauch erneut abgeklemmt und der Katheter wieder in den Silikonschlauch eingeschoben, so dass nach dem Lösen der Klemme der Blutdruck wieder gemessen werden konnte. 20 min nach der Entnahme wurden die Blutproben zur Gewinnung von Serum abzentrifugiert. Anschließend wurde das Serum zur Bestimmung des COP in ein Osmometer pipettiert. Abbildung 3.9.3 zeigt den starken Anstieg des COP in Rowett-Nacktratten während und nach der Injektion von 5 ml 20% HSA-Lösung. Die höchsten COP-Messwerte (23 mmHg) erhält man 1 h nach dem Ende der HSA-Infusion. Gegenüber dem Ausgangswert von ca. 12 mmHg ist dies eine Steigerung von fast 100%. 2 h nach Beendigung der Injektion beginnt der erhöhte COP langsam auf den Ausgangswert zu fallen.

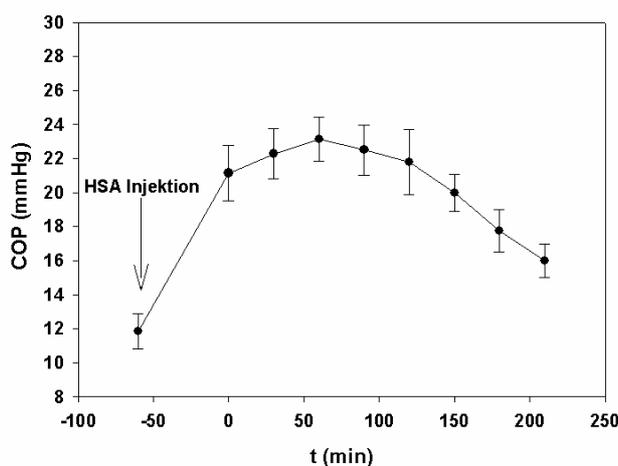


Abb. 3.9.3: Messung des COP in A431 Tumoren nach HSA-Infusion. Starker Anstieg des COP nach der i.v. Infusion von 20% HSA (5 ml über 1 h). Die Bestimmung des COP erfolgt aus Serumproben mittels eines Osmometers. Daten sind Mittelwerte \pm SE; n = 10.

3.9.4 Bestimmung des TIFP nach i.v. Infusion von humanem Serumalbumin (*)

Parallel zur i.v. Applikation von HSA wurde der TIFP der Versuchstiere mit der *micropuncture*-Methode gemessen. Die Haut über den subkutan gelegenen Tumoren wurde entfernt, so dass direkt mit den Messkapillaren in das Tumorgewebe eingedrungen werden konnte. Die Messungen des TIFP starteten zu dem Zeitpunkt als die HSA-Infusion beendet worden war und wurden ab diesem Zeitpunkt stündlich wiederholt. Der Graph in Abb. 3.9.4 zeigt, dass der TIFP nach der Gabe von 20% HSA kontinuierlich von anfangs ca. 8 mmHg auf ca. 3 mmHg fällt. Zu späteren Zeitpunkten liegen leider keine Messergebnisse vor, da die

Tiere zu diesem Zeitpunkt schon für ca. 5 h anästhesiert waren (1 h Katheterimplantation, 1 h HSA-Injektion und 3 h TIFP-Messung). Die Nachdosierung der sedierten Tiere erwies sich als schwierig und wurde daher nicht angewandt.

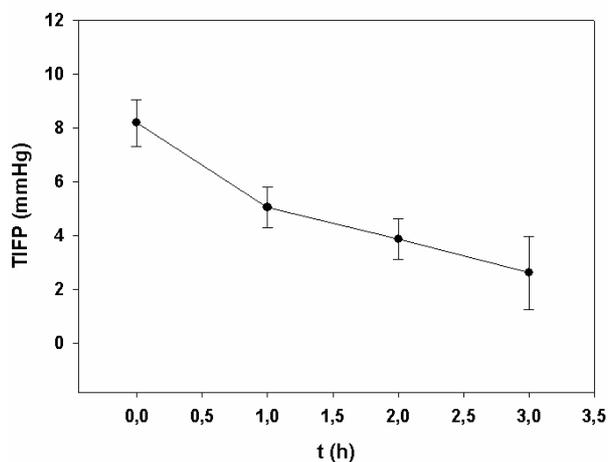


Abb. 3.9.4: Messung des TIFP in A431 Tumoren nach HSA-Injektion. Reduktion des TIFP nach der i.v. Injektion von 20% HSA (5 ml über 1 h). Die erste TIFP Messung zum Zeitpunkt 0 erfolgt nach Beendigung der HSA-Infusion. Daten sind Mittelwerte +/-SE; n = 10.

Zur besseren Vorstellung wie die HSA-Infusion und die parallel dazu stattfindende TIFP-Messung durchgeführt wurden, zeigt die Abbildung 3.9.5 das experimentellen Setup, das zur Ausrichtung dieser Versuche notwendig gewesen ist.

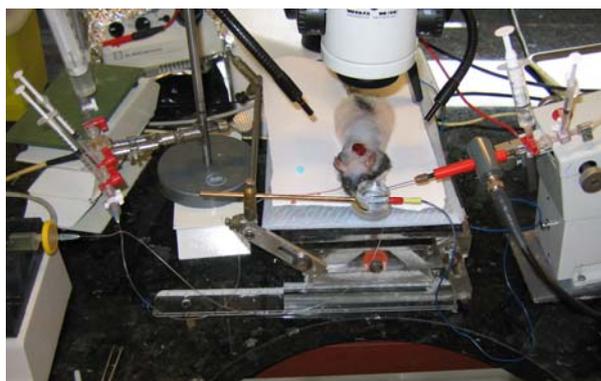


Abb. 3.9.5 Experimentelles Setup zur Messung des TIFP mittels *micropuncture*-Technik. Linke Bildhälfte: HSA-Spritze. Das HSA wird durch einen Filter (gelb) in den i.v. Katheter geleitet. Der zweite Katheter (i.a.) endet am Blutdruckmesssystem (rote Drei-Wege-Hähne); Zentral: narkotisiertes Versuchstier, mit freipräpariertem Tumor im Nacken. Rechte Bildhälfte: Mikromanipulator mit Messkapillare (am Ende des roten Kapillarhalters)

3.10 Aufnahme von Makromolekülen in den Tumor nach Senkung des TIFP

3.10.1 Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Dextranen in TIFP-reduzierte Tumore

Die Möglichkeit den TIFP durch die Infusion von HSA zu senken, bewirkt die mechanische Belastung der Tumorzellen zu senken und dadurch den TIFP-induzierten Anteil an der Tumorpheriferation zu verringern. Das Wachstum der Tumore könnte somit verlangsamt oder gar gestoppt werden. Darüber hinaus sollte der reduzierte TIFP theoretisch den Eintransport von Makromolekülen in den Tumor erleichtern. Wie bereits im Kapitel 1.2 beschrieben, stellt der hohe TIFP eine Barriere des konvektionellen Transports von großen Molekülen dar. Eine Senkung des TIFP würde somit zum Wegfall bzw. zur Erniedrigung dieser physikalischen Barriere führen und es könnten in erhöhtem Umfang Makromoleküle in den Tumor eintransportiert werden. In Bezug auf Therapeutika könnte eine verstärkte Substanzaufnahme die antitumorale Wirksamkeit eines Medikamentes verbessern. Die folgenden Versuche beschäftigten sich mit dieser Problematik und untersuchen die Aufnahme von Makromolekülen in A431 Tumore nach der Senkung des TIFP.

3.10.1.1 Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Dextranen nach Tumorpunktion

In einem Vorversuch sollte zunächst herausgefunden werden, ob eine Reduktion des TIFP überhaupt eine Auswirkung auf die Aufnahme von Makromolekülen besitzt. Zu Beginn dieses Versuches musste das Problem gelöst werden, welche Substanz als Markermolekül für die Aufnahmestudien verwendet wird und wie der Nachweis der Aufnahme erfolgen sollte. Die Wahl fiel auf Dextrane, hydrophile Polysaccharide, die durch ihr hohes Molekulargewicht, die gute Wasserlöslichkeit, geringe Toxizität und relativ hohe Inertität charakterisiert sind. Eine Reihe von Publikationen belegt zudem den Einsatz von Dextranen in *in vivo*-Versuchen und die gute Verträglichkeit der Substanz in Versuchstieren (Jeltsch et al., 1997; Mehvar, R., 1991). Die genannten Vorteile machen Dextrane zu idealen Markermolekülen für die *in vivo*-Versuche. Zudem bieten sie den entscheidenden Vorteil, dass sie kommerziell an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt und in unterschiedlichsten Molekülgrößen (3 kD bis zu 2 MD) erhältlich sind. Dadurch ist es möglich die Dextrane nach der i.v. Injektion in immunhistologischen Präparaten der Tumore mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopen nachzuweisen. Die Tumore werden nach der i.v. Injektion der Dextrane zu unterschiedlichen Zeiten entfernt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend werden sie mit einem Kryostaten in dünne Gefrierpräparate geschnitten. Abschließend erfolgt der Nachweis der

fluoreszenzmarkierten Dextrane umgehend unter einem Fluoreszenzmikroskop und kann mittels Fotoaufnahmen dokumentiert werden.

Bei der Durchführung der Vorversuche musste eine NMRI-Nacktmaus mit zwei A431 Tumoren anästhesiert werden. Anschließend wurde einer der beiden Tumore durch Punktion entleert und der TIFP reduziert. Der nicht punktierte Tumor diente als Kontrolle. Diese Routine wurde allerdings recht bald geändert und die Versuche wurden an zwei Tieren durchgeführt. Der Grund für diesen Wechsel war, dass die Tumore möglichst zeitgleich 30 min nach der Dextran-Injektion entfernt werden mussten. Dies bedeutet, dass zunächst ein Tumor und danach der andere herausoperiert werden musste. Je nach Größe und Verwachsung der Tumore konnte dies einige Minuten in Anspruch nehmen. Dadurch bestand die Gefahr, dass möglicherweise Ergebnisse des zweiten Tumors durch die operative Entfernung des ersten Tumors beeinträchtigt werden könnten. Bei Versuchstumoren in unterschiedlichen Tieren konnte man zunächst die erste Maus mit den Dextranen spritzen und z.B. 15 min später die zweite Maus. Die Exzision erfolgte dann ebenfalls mit 15 min Zeitdifferenz jedoch exakt zum Zeitpunkt 30 min nach Injektion. Zur Überwachung ob die Injektion der Dextrane erfolgreich verlief wurden die aurikularen Kapillaren der Versuchstiere unter intravitalmikroskopischer Kontrolle beobachtet. Bei einer erfolgreichen i.v. Injektion konnte man umgehend den Durchfluss der fluoreszenzmarkierten Dextrane durch die arteriellen und venösen Kapillaren erkennen (Abb. 3.10.1).

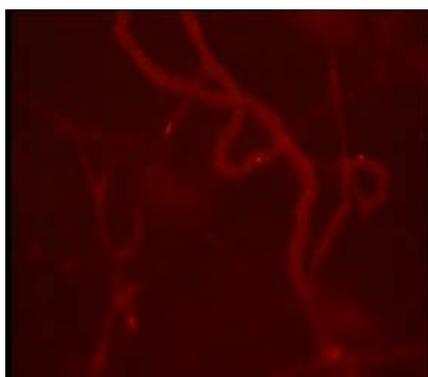


Abb. 3.10.1: Blutgefäße im Mausohr nach Injektion von TRITC-Dextranen (40 kD). Aufnahme mittels Intravital-Mikroskopie, Vergrößerung: 200fach

Die vorherige Aufnahme zeigt eine homogene Verteilung der fluoreszenzmarkierten Dextranen in den Kapillaren des Mausohres. Die Dextrane, die in den Versuchen eingesetzt wurden, hatten eine Molekülgröße von 10 kD oder 40 kD und waren mit FITC bzw. TRITC gekoppelt. In den Vorversuchen wurden die Tumore 30 min oder 1 h nach der i.v. Injektion der Dextrane exzidiert und weggefroren. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie sind in den nachfolgenden Abbildungen 3.10.2 und 3.10.3 dargestellt.

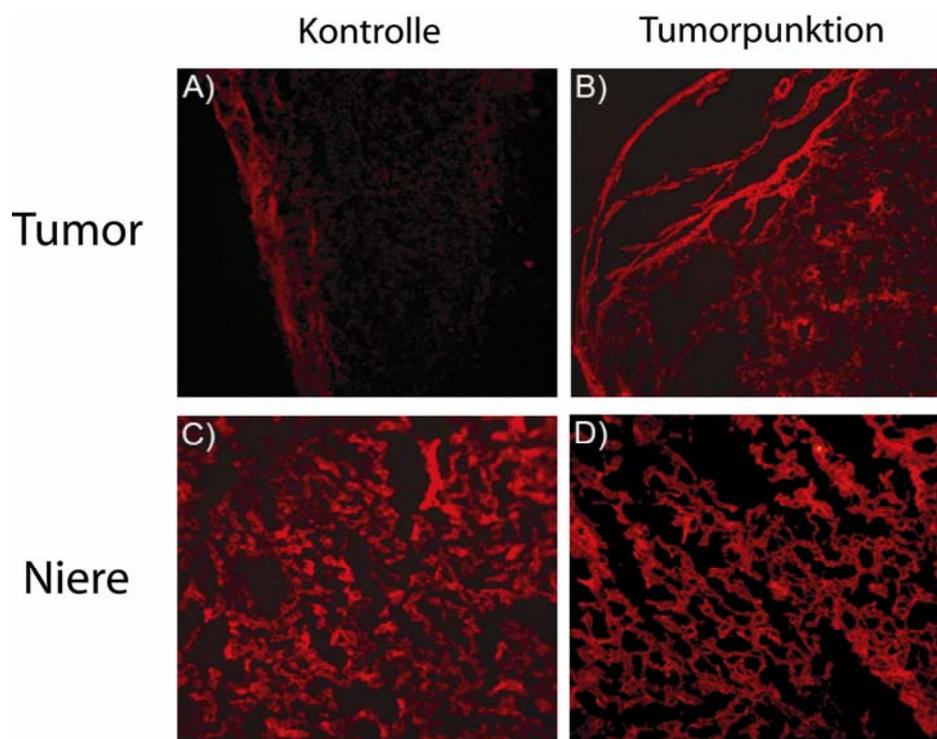


Abb. 3.10.2: Aufnahme von TRITC-Dextranen nach Tumorpunktion in A431 Tumore. Alle Gewebeproben wurden 30 min nach der i.v. Injektion von TRITC-Dextranen (40 kD) entnommen; A) un behandelter Kontrolltumor; B) punktierter Tumor; C) Nierengewebe aus dem un behandeltem Tier; D) Nierengewebe aus dem punktiertem Tier; Vergrößerung: 40 fach (A/B); 200fach (C/D)

Bei den in Abbildung 3.10.2 gezeigten Kryoschnitten handelt es sich um Gewebeproben aus A431 Tumoren. In Aufnahme A ist ein un behandelter Tumor zu sehen, während Abbildung B einen punktierten Tumor zeigt. Die i.v. Injektion der TRITC-gekoppelten Dextrane (40 kD) erfolgte durch Schwanzveneninjektion. Bei den punktierten Tumoren wurden die Dextrane direkt im Anschluss an die Punktion verabreicht. In allen Fällen wurde 30 min später der A431 Tumor aus dem Tier freipräpariert. Zur Kontrolle, ob in beiden Tieren die Verteilung der Dextrane gleichmäßig erfolgte, wurde auch die Niere oder ein anderes Organ des Tieres entfernt und zur Herstellung von Kryoschnitten eingefroren.

Aus Abbildung 3.10.2 geht hervor, dass der punktierte Tumor im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine verstärkte Fluoreszenz im Kortex aufweist. Im Gegensatz dazu ist beim Kontrolltumor lediglich eine Färbung im Randbereich sichtbar. Dies bedeutet eine verstärkte Aufnahme von fluoreszenten Dextranen im punktierten Tumor. Die Tumorpunktion zeigt keine Auswirkungen auf die Verteilung der Dextrane im Nierengewebe.

In einem weiteren Versuch wurde der gleiche Versuchsaufbau an A549 Tumoren durchgeführt. Das Hauptaugenmerk lag auch bei diesem Versuch auf der Aufnahme von Dextranen in den Tumor. Die dargestellten Bilder zeigen Kryoschnitte von unbehandelten (A) und punktierten (B) A549 Tumoren 30 min nach Dextraninjektion (Abb. 3.10.3). Als Kontrolle zur gleichmäßigen Injektion diente in diesem Versuch das Herzmuskelgewebe. Ein weiterer Unterschied besteht in der Verwendung von FITC-gekoppelten Dextranen, welche mit einem Molekulargewicht von 10 kD merklich kleiner sind als die im vorherigen Versuch eingesetzten Dextrane.

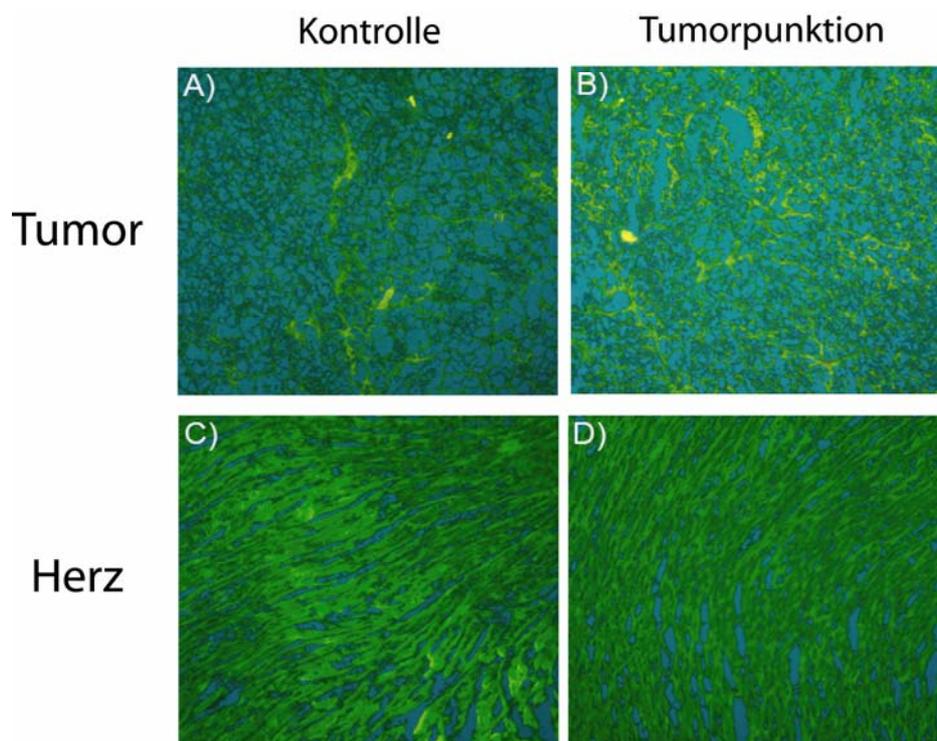


Abb. 3.10.3: Aufnahme von FITC-Dextranen nach Tumorpunktion in A549 Tumore. Alle Gewebeproben wurden 30 min nach der i.v. Injektion von FITC-Dextranen (10 kD) entnommen; A) unbehandelter Kontrolltumor; B) punktierte Tumor; C) Herzmuskelgewebe aus dem unbehandeltem Tier; D) Herzmuskelgewebe aus dem punktiertem Tier. Vergrößerung: 200fach

3.10.1.2 Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Dextranen nach HSA-Infusion

Die positiven Ergebnisse der Vorversuche ermutigten im nächsten Schritt, die Versuchstiere vor der Injektion mit Dextranen i.v. mit HSA zu behandeln. Rückblickend auf die in

Norwegen erzielten Ergebnisse, dass die Infusion von 20% HSA-Lösung zu einer signifikanten Abnahme des TIFP führen, ist es naheliegend zu vermuten, dass fluoreszenzgekoppelte Dextrane, nach vorangegangener HSA-Behandlung, verstärkt in die Tumore aufgenommen werden können. Leider konnte in der Zentralen Forschungseinrichtung des Universitätsklinikums während und nach der HSA-Infusion der TIFP nicht gleichzeitig gemessen werden. Es gab keine Anwendungsmöglichkeit der *micropuncture*-Technik. Die Messung des TIFP mittels *wick-in-needle*-Methode schied aus den bereits genannten Gründen aus. Die Durchführung der Versuche basierte daher auf den in Norwegen generierten Ergebnissen und der Hypothese, dass eine zuvor in Norwegen nach HSA-Infusion gemessene Senkung des TIFP, bei gleichem Versuchsaufbau, auch in Deutschland zu derselben Reaktion an den Versuchstieren führen sollte.

Die Durchführung der Versuche erfolgte gemäß dem norwegischen Protokoll. Den anästhesierten Nacktratten wurde ein Katheter in die *A. carotis* und ein weiterer in die *V. jugularis* gelegt. Der arterielle Katheter wurde einzig zur Messung und Überwachung des Blutdruckes verwendet. Über den venösen Katheter konnte die Infusion der 20%igen HSA-Lösung (5 ml über 1 h) eingeleitet und anschließend, nach einer Pause, die Injektion der fluoreszenzmarkierten Dextrane durchgeführt werden. Das experimentelle Setup des Versuchsaufbaus ist in der folgenden Abbildung zu sehen.



Abb. 3.10.4: Experimentelles Setup zur Messung des Blutdruckes und der HSA-Infusion. Der i.a. Katheter führt über den Drucksensor (im Vordergrund auf einer blauen Platte) direkt zum Blutdruckmessgerät. Die HSA-Infusion läuft über den Perfusor, der rechts im Bild zu sehen ist. Insgesamt werden 5 ml HSA über einen Zeitraum von 1 h injiziert. Der gleiche Katheter wurde anschließend für die i.v. Injektion der Dextrane benutzt.

Die zuvor erzielten TIFP-Messergebnisse (Kap. 3.9.4) zeigen, dass mit einer leicht zeitversetzten Reduktion des TIFP zu rechnen ist, d.h. die HSA-Injektion führt zunächst zu einem Anstieg des COP, in Folge dessen es zur Senkung des TIFP kommt. Vor dem Hintergrund dieser Überlegung lag es nahe, die i.v. Injektion der fluoreszenzmarkierten

Dextrane nicht unmittelbar nach der HSA-Infusion, sondern mit einem zeitlichem Abstand von 1 h durchzuführen. Nach der Injektion von 200 µl fluoreszenter Dextranlösung (Konzentration 2,5 mg/ml) wurde in allen Versuchen bis zur operativen Entfernung der Tumore 30 min gewartet. Diese Zeitspanne war notwendig, um die Aufnahme der Dextrane, sofern es die physiologischen Rahmenbedingungen zuließen, in den Tumoren nachweisen zu können. Zur Verbesserung der Auswertung der Proben am Fluoreszenzmikroskop wurden in diesen Versuchen keine FITC-gekoppelten Dextrane, sondern Alexa488-markierte Dextrane verwendet. Die Stabilität des Alexa488-Fluoreszenzfarbstoffes ist im Vergleich zu FITC erhöht, so dass die Fluoreszenz der Aufnahmen nicht so schnell verblasst.

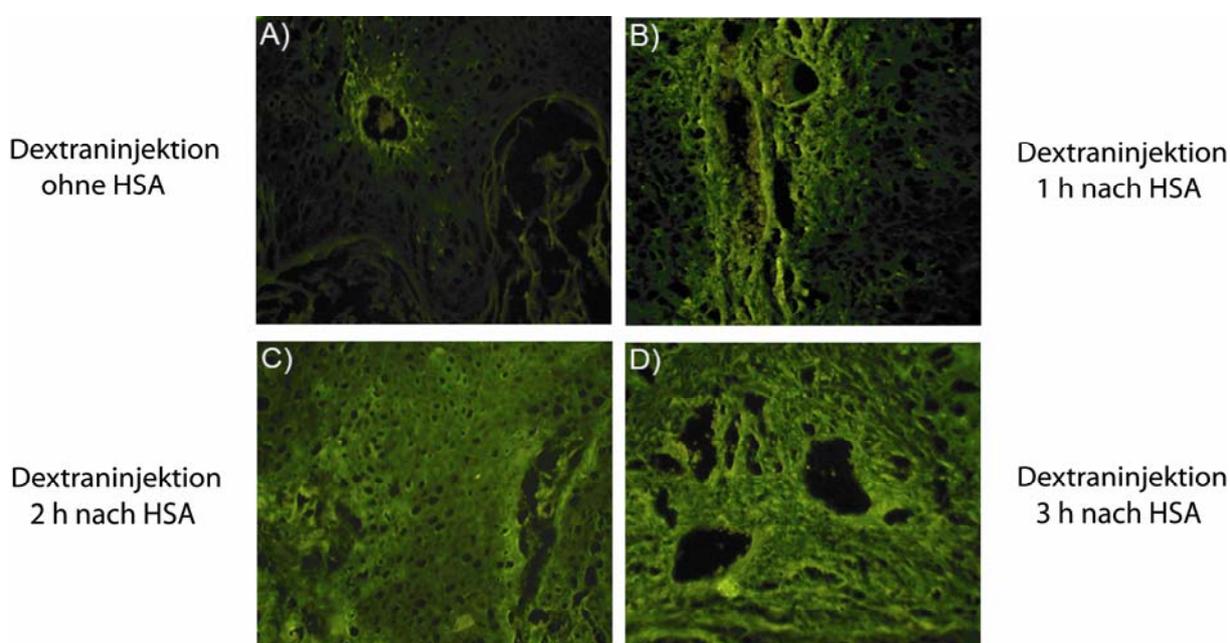


Abb. 3.10.5: Aufnahme von Alexa488-Dextranen nach HSA-Infusion in A431 Tumore. Alle Gewebeprobeen wurden 30 min nach der i.v. Injektion von Alexa488-Dextranen (10 kD) entnommen; A) unbehandelter Kontrolltumor ohne HSA-Infusion; B) Dextran-Injektion 1 h nach HSA-Infusion; C) Dextran-Injektion 2 h nach HSA-Infusion; D) Dextran-Injektion 3 h nach HSA-Infusion. Vergrößerung: 200fach

In der obigen Abbildung 3.10.5 sind vier Aufnahmen von A431 Tumoren zu sehen, die nach unterschiedlichen Versuchsprotokollen behandelt wurden. In Aufnahme A) ist der Kryoschnitt eines unbehandelten A431 Tumors zu sehen, d.h. dieses Tier ist vor der Dextran-Injektion nicht mit HSA behandelt worden. Die Abbildung zeigt eine starke Färbung des Tumorgewebes lediglich im direkten Umfeld des versorgenden Blutgefäßes. In Bereichen des Tumorgewebes, die in größerem Abstand zum Gefäß liegen, ist nur eine schwache Hintergrundfärbung nachweisbar. Aufnahme B) entstammt einem Tumor, dessen Wirtstier mit 5 ml HSA behandelt worden ist und 1 h nach der Infusion die Injektion der fluoreszenten Dextrane erhalten hat. In diesem Beispiel ist eine stärkere Fluoreszenz rund um Blutgefäße zu

erkennen. Im Vergleich zu Aufnahme A) erstreckt sich die Verteilung der Dextrane über ein größeres Areal. Die Aufnahmen C) und D) zeigen Kryoschnitte, die aus Tumoren stammen, welche 2 bzw. 3 h nach der HSA Infusion mit fluoreszenzgekoppelten Dextranen i.v. injiziert wurden. In beiden Aufnahmen ist zu erkennen, dass die Dextrane unter diesen Versuchsbedingungen im kompletten Tumorgewebe nachweisbar sind. Die fluoreszenten Dextrane waren nicht nur rund um die Blutgefäße, sondern im gesamten Tumorgewebe sichtbar. Die Verteilung erschien auch über große Bereiche des Tumorkortex homogen und nicht „flickenteppichhaft“ wie es in den Aufnahmen A) und B) der Fall gewesen ist. Abschließend sei nochmals darauf hingewiesen, dass alle Tumorproben jeweils 30 min nach der i.v. Injektion von 200 µl Alexa488-Dextran entfernt und kryokonserviert wurden.

3.10.2 Quantifizierung der Dextranaufnahme in A431 Tumoren mittels eXploreOptix-Technologie (*)()**

Die vorangegangenen Ergebnisse bestätigen, dass die Infusion von HSA die Aufnahme von Dextranen in Tumore fördert. Ein großer Nachteil der bislang angewandten Methode zur Beurteilung der Messdaten lag darin, dass einzig histologische Bilder als Grundlage zur Auswertung der Dextranaufnahme in den Tumor dienten. Diese Daten waren nur sehr schwer zu quantifizieren. Dynamische und kinetische Veränderungen in der Aufnahme der fluoreszenzmarkierten Dextrane ließen sich durch die Gefrierschnitte nicht nachweisen. Eine mögliche Lösung zur Klärung dieser Fragestellungen lag in der Möglichkeit, Tumorproben zu homogenisieren und mittels HPLC die Menge an aufgenommenen Dextranen zu quantifizieren.

Durch gute Kontakte zum Institut für Biomedizin in Bergen bot sich jedoch ein weiterer Lösungsweg für dieses Problems an. Das dortige Institut für Hämatologie verfügt über einen *in vivo*-Scanner mit welchem die Verteilung von Fluoreszenzfarbstoffen im narkotisierten Tier in Echtzeit beobachtet werden kann. Dieses Gerät ermöglicht es, die Verteilung der fluoreszenten Dextrane zu beliebig vielen Zeitpunkten innerhalb des kompletten Tieres bzw. spezifisch im Tumor oder anderen Organen nachzuweisen. Zudem erlaubt die umfangreiche Software eine genaue Quantifizierung der Menge an aufgenommenen Dextranen. Ein weiterer großer Vorteil in der Anwendung dieser Technik besteht darin, den Tierverbrauch drastisch zu senken. Für die Analyse der Kryoschnitte musste bislang für jeden Zeitpunkt, der untersucht werden sollte, ein Versuchstier eingesetzt werden. Sollte die Verteilung der Dextrane im Tier z.B. 1 h, 3 h und 6 h nach Injektion untersucht werden, wurden

dementsprechend drei Tiere benötigt. Mit dem Scanner können diese Daten an einem einzigen Tier gewonnen werden. Dadurch ist es auch möglich erste Aussagen über die Kinetik der aufgenommenen Substanzen zu treffen. Darüber hinaus wurden die Versuche in dem Sinne erweitert, als dass die Tiere vor der Dextran-Injektion nicht nur mit 20% HSA, sondern auch mit 4% HSA bzw. physiologischer NaCl-Lösung behandelt wurden. Durch die Verwendung der NaCl-Kontrolllösung sollte untersucht werden, inwieweit das Volumen der vor der Dextran-Injektion stattfindenden Infusion Einfluss auf die Aufnahme der Dextrane hat. Der Einsatz der 4%igen HSA-Lösung diente zur Klärung der Fragestellung, ob das Proteine Albumin oder die Konzentration der Albumin-Lösung den entscheidenden Faktor für die erhöhte Aufnahme an Dextranen bildet.

Leider konnten die in Norwegen gewonnenen Daten nicht direkt mit den zuvor erstellten histologischen Schnitten verglichen werden. Die bislang eingesetzten Nacktratten waren zu groß für den Scanner und die Quantifizierungs-Studien mussten an teilrasierten SCID-Mäusen durchgeführt werden. Die Tiere wurden mit A431 Tumoren inokuliert und bei einem Tumolvolumen von 150-200 mm³ für die Scans eingesetzt. Das relativ geringe Tumolvolumen war eine Kompromisslösung. Bei einem großen Tumor mit hohem TIFP wäre der erhoffte Effekt der TIFP-Senkung besser messbar gewesen. Ein großer Tumor beeinträchtigt aber gleichzeitig die Scan-Ergebnisse, da die Intensität des Lasers in zunehmender Gewebetiefe drastisch abnimmt. Die eingesetzten Tumore wiesen dahergehend noch relativ niedrige TIFP Werte (2-3 mmHg, siehe Abb. 3.10.7) auf. Zu diesem Zweck musste auch das HSA-Infusionsprotokoll geändert werden. Anstatt einer Infusion von 5 ml HSA über 1 h wie bei den Rowett-Nacktratten erfolgte die HSA-Gabe bei den Mäusen durch eine Bolus-Injektion von 500 µl HSA bzw. NaCl in die Schwanzvene. Anschließend erfolgte wie im bisherigen Protokoll die Injektion der Dextrane zu verschiedenen Zeitpunkten nach der HSA-Infusion. Bei den SCID-Mäusen lag das Dextranvolumen bei nur noch 50 µl im Vergleich zu 200 µl bei den Nacktratten. Zur besseren Detektion der fluoreszenzgekoppelten Dextrane in tiefer liegenden Schichten (Tumor, Niere, Magen und Leber) wurden langwellige Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Diese werden in viel geringerem Maße beim Durchdringen der Haut und Gewebeschichten absorbiert als kurzwelliges blaues Licht. Dahergehend wurden in diesen Versuchen Alexa680-gekoppelte Dextrane (10 kD) als makromolekulare Markerproteine eingesetzt.

3.10.2.1 Invasive Messung des Blutdruckes nach der Testsubstanz-Injektion (*)(**)

Zur Untersuchung, inwieweit die Injektion der drei Testsubstanzen (20% HSA, 4% HSA und 0,9% NaCl) den Blutdruck der Versuchstiere verändert, wurde dieser bei den Versuchstieren invasiv gemessen. Dazu wurde den SCID-Mäusen ein Katheter in die *A. carotis* und *V. jugularis* implantiert. Der arterielle Katheter war über einen Drucksensor mit einem digitalen Blutdruckmessgerät verbunden, so dass der Blutdruck kontinuierlich über einen Zeitraum von 3 h gemessen werden konnte. Nach der Bestimmung des Normblutdruckes wurden den Tieren 50 µl der jeweiligen Testsubstanz über den venösen Katheter injiziert. Danach folgte die Überwachung der Messung und die Notierung von Messwerten im Abstand von 30 min. Die in diesen Versuchen eingesetzten Tiere waren z.T. mehrere Tage vor dem Versuch bereits bei den Scan-Experimenten eingesetzt worden. Durch diese „Zweitverwendung“ konnte die Anzahl an eingesetzten Tieren gering gehalten werden. Es gab keinerlei Auffälligkeiten zwischen den Messwerten von Tieren, die für diesen Versuch erstmalig eingesetzt wurden oder solchen die bereits ein Scan-Experiment durchlaufen hatten. Die graphische Darstellung der Messergebnisse (Abb. 3.10.6) zeigt, dass die Injektion von 20%iger HSA Lösung bei den SCID-Mäusen zu einem Anstieg des Blutdruckes innerhalb der ersten Stunde nach Injektion führt. Allerdings ist dieser Anstieg nur zum Zeitpunkt 1 h nach HSA Injektion signifikant gegenüber den beiden anderen Behandlungssträngen. 2 h nach der 20% HSA Injektion ist der Blutdruck weiter gesunken und zum Zeitpunkt 3 h nach der HSA Injektion befindet er sich wieder nahezu auf dem Level des Ausgangswertes. Die Injektion von 4% HSA bzw. 0,9% NaCl-Lösung führt zu keinem Zeitpunkt nach der Injektion zu einer signifikanten Veränderung des Blutdruckes.

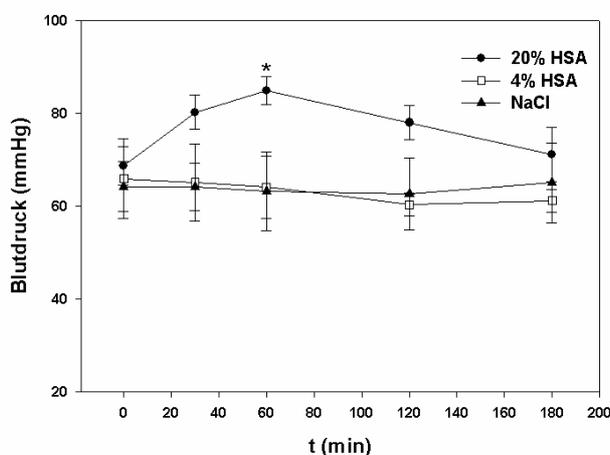


Abb. 3.10.6: Blutdruckdaten von SCID-Mäusen nach Injektion von 20% HSA, 4% HSA oder 0,9% NaCl-Lösung. Den Tieren wurden zum Zeitpunkt $t=0$ 50 µl der jeweiligen Testsubstanz i.v. injiziert. Daten sind Mittelwerte \pm SE (* $p < 0,05$); $n = 4$ pro Behandlungsgruppe

3.10.2.2 Bestimmung des TIFP nach i.v. Infusion von HSA bei NMRI-Nacktmäusen

Die folgenden Versuche zur Messung des TIFP an Mäusen nach der i.v. Applikation von HSA wurden zeitlich nach den Untersuchungen zum *Uptake* von fluoreszenten Dextranen durchgeführt. Die Platzierung der Ergebnisse dieser Tests vor den nachfolgenden Scan-Experimenten erleichtert jedoch deren Verständnis. Der Aufbau der Versuche basierte auf dem an Rowett-Nacktratten gewonnenen Ergebnis, dass die i.v. Infusion der Versuchstiere mit 20%iger HSA-Lösung eine Senkung des TIFP induziert (siehe Kap. 3.9.4). Die aktuellen Versuche wurden allerdings an Mäusen durchgeführt, weshalb geklärt werden musste, ob die Injektion von HSA auch bei Mäusen zu einer Senkung des TIFP führt. Zu diesem Zweck wurden NMRI-Nacktmäuse mit 50 µl 20% HSA bzw. 0,9% NaCl-Lösung i.v. injiziert. Anschließend wurde mittels *wick-in-needle*-Technik der TIFP bestimmt. Zur Vermeidung des Verlusts an interstitieller Flüssigkeit wurde die Messkanüle über die Dauer des Versuches in den Tumoren der narkotisierten Tiere belassen. Durch Abklemmen des Katheterschlauchs, der die Kanüle mit dem Druckmessgerät verbindet, konnte überprüft werden, dass es zu keiner Verstopfung des Messsystems kam. Das in Abb. 3.10.7 dargestellte Ergebnis zeigt, dass die Injektion von 20% HSA bereits nach 30 min zu einer signifikanten Reduktion des TIFP führte. Zum Zeitpunkt 60 min nach HSA-Injektion war die Abnahme des TIFP noch stärker ausgeprägt. Die Injektion von NaCl-Lösung wies hingegen in allen Tieren keinen Effekt auf den TIFP auf. Aufgrund des geringen Tumolvolumens von 150-200 mm³ lagen die Messwerte leider generell in niedrigen Bereichen.

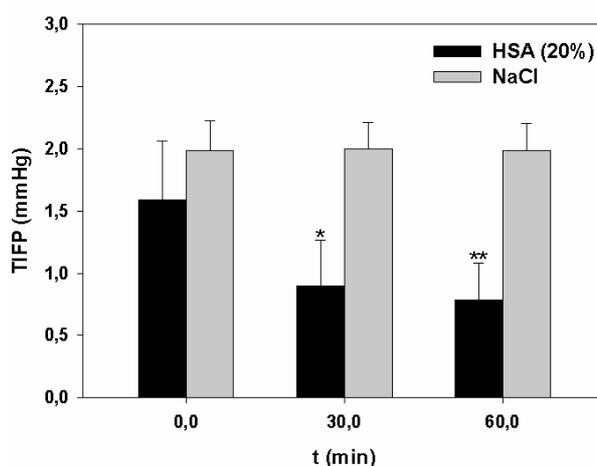


Abb. 3.10.7: TIFP von NMRI-Mäusen nach Injektion von 20% HSA oder 0,9% NaCl-Lösung. Den Tieren wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ 50 µl der jeweiligen Testsubstanz i.v. injiziert. Daten sind Mittelwerte \pm SE (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$); $n = 3$ pro Behandlungsgruppe

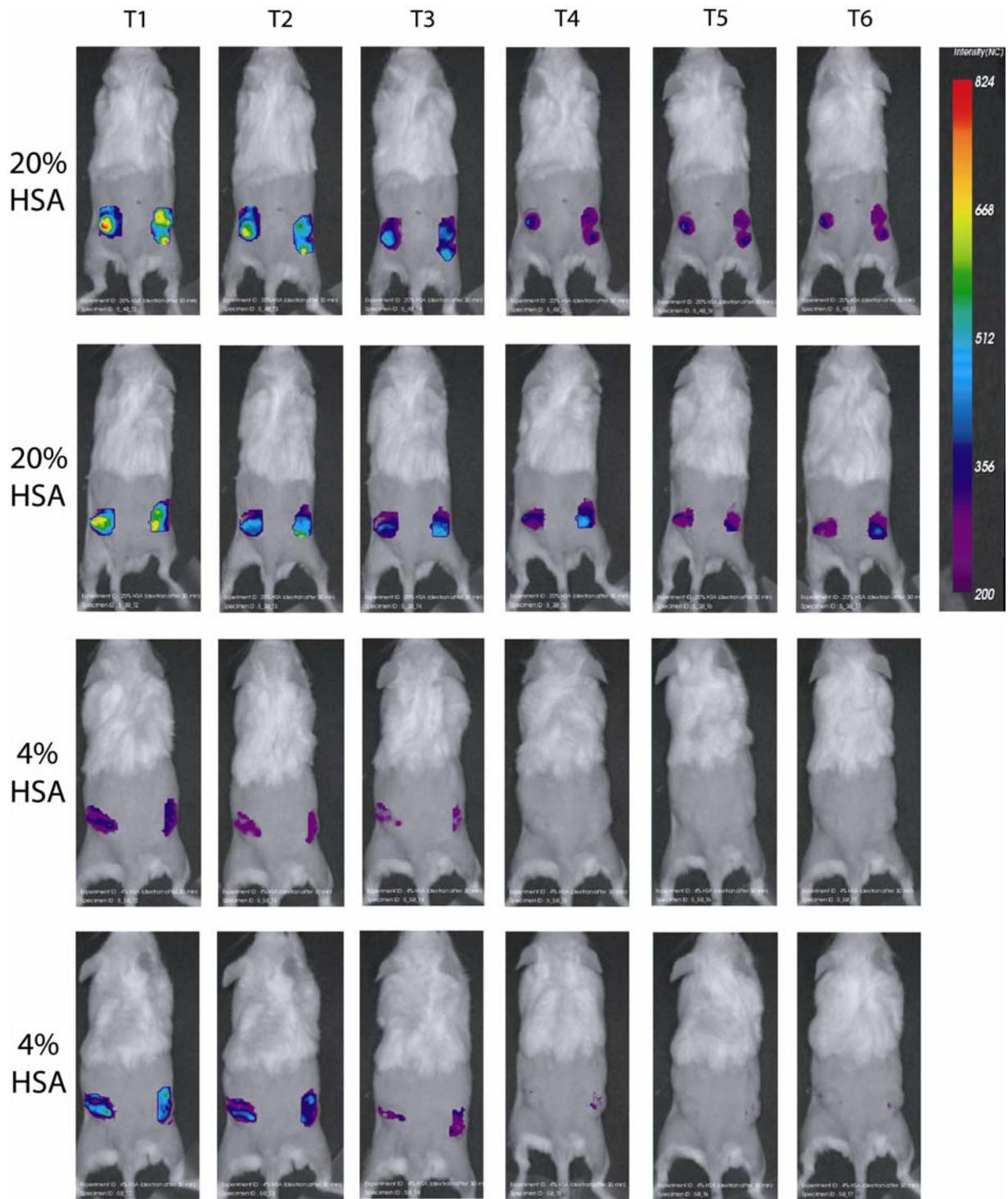
3.10.2.3 Aufnahme von Alexa680-markierten Dextranen (10 kD) 30 min nach HSA-Infusion (*)(**)

Die genaue Beschreibung der Handhabung der Tiere und des Scanvorgangs ist im Material- und Methoden-Abschnitt 2.2.8 erklärt. Daher steht die Darstellung der Messergebnisse im Vordergrund der nächsten Kapitel. Die in den Experimenten eingesetzten Tiere hatten an beiden Flanken A431 Tumore. An allen Tieren wurde vor Beginn der Experimente eine Messung der Hintergrundfluoreszenz durchgeführt. Die dort gewonnenen Daten wurden bei der Datenanalyse von den jeweiligen Messwerten abgezogen. Dadurch ist es möglich gewesen einige Tiere drei Tage nach dem ersten Versuch in einem weiterem Experiment einzusetzen. Es war davon auszugehen, dass keine Beeinträchtigungen der Messergebnisse durch die vorherigen Versuchen zu erwarten waren. Mehrfach eingesetzte Tiere wiesen allerdings immer eine erhöhte Hintergrundfluoreszenz auf, die auf die einige Tage zuvor injizierten Dextrane zurückzuführen war. Durch den Hintergrundscan sind diese Daten vor dem eigentlichen Versuchsbeginn aufgezeichnet und können aus den späteren Messergebnissen herausgerechnet werden. Nach dem Hintergrundabgleich erfolgte die Injektion der Testsubstanzen, d.h. 500 µl 20% HSA oder 500 µl 4% HSA oder 500 µl 0,9% NaCl-Lösung, über die Schwanzvene. 30 min danach wurden den Versuchstieren weitere 50 µl Alexa680-Dextranlösung i.v. verabreicht. Direkt im Anschluss daran wurde ein erster Scan durchgeführt. Weitere Scans erfolgten zu den Zeitpunkten 30 min, 1 h, 2 h, 3 h und 6 h nach Dextran-Injektion. Tabelle 5 stellt in einer Übersicht das genaue Versuchsprogramm dar.

Ablauf	Aktion	Zeitpunkt der Handlung	
1.	Scan T ₀ (Hintergrundscan)	Prä-Testsubstanzeinjektion	
2.	Injektion der Testsubstanzen (20% HSA oder 4% HSA oder NaCl)	Versuchsbeginn (T _x)	
3.	Injektion der Dextrane	30 min post T _x	60 min post T _x
4.	Scan T ₁	direkt nach Dextran-Injektion	
5.	Scan T ₂	30 min nach Dextran-Injektion	
6.	Scan T ₃	1 h nach Dextran-Injektion	
7.	Scan T ₄	2 h nach Dextran-Injektion	
8.	Scan T ₅	3 h nach Dextran-Injektion	
9.	Scan T ₆	6 h nach Dextran-Injektion	

Tab. 5: Übersichtsschema zum Ablauf der „Dextran-Aufnahme“-Versuche. Übersicht über den zeitlichen Verlauf des Versuchsprogramms mit SCID-Mäusen zur Aufnahme von Dextranen in A431 Tumoren nach Injektion von 20% HSA oder 4% HSA oder NaCl.

Die nachfolgenden Aufnahmen (Abb. 3.10.8, S. 114/115) zeigen die Ergebnisse von zwei SCID-Mäusen für jede der getesteten Substanzen (20% HSA, 4% HSA und 0,9% NaCl). Die Abbildungen stellen die Verteilung der Dextrane dar und geben in der Falschfarbenanzeige eine Quantifizierung der Menge an aufgenommenen Dextranen an. Bei den Aufnahmen handelt es sich um die hintergrundbereinigten und *life-time* bereinigten Enddaten, d.h. bei allen Fotos wurden die Werte der vor dem Versuchsbeginn durchgeführten Hintergrundmessung herausgerechnet. Darüber hinaus wurde eine sogenannte *life-time* Bereinigung durchgeführt. Nach den durchgeführten Messungen wurde mit der Analyse-Software die *life-time* der fluoreszenzgekoppelten Dextrane bestimmt. Diese liegt zwischen 2,6-2,9 ns. Durch das Eingrenzen der Daten auf einen engen Bereich von 2,5-3,0 ns können alle übrigen Messwerte herausgefiltert werden. Im Laufe des Experiments sind die Alexa680-Fluorophoren verstärkt durch enzymatische Prozesse von den Dextrane abgespalten und die freien Fluorophoren durch den Scanner detektiert worden. Da einzelne Alexa680-Moleküle aber eine *life-time* von nur 1,7-1,9 ns aufweisen, entgegen 2,5-3,0 ns bei Kopplung an Dextrane, können die Signale der freien Fluorophoren durch die Analyse-Software herausgefiltert werden. Dies bedeutet, dass die in den Aufnahmen dargestellten Fluoreszenzverteilungen einzig von Alexa680-gekoppelten Dextranen stammen und nicht durch freie Fluorophore oder fluoreszente Bestandteile des Tierfutters beeinträchtigt werden.



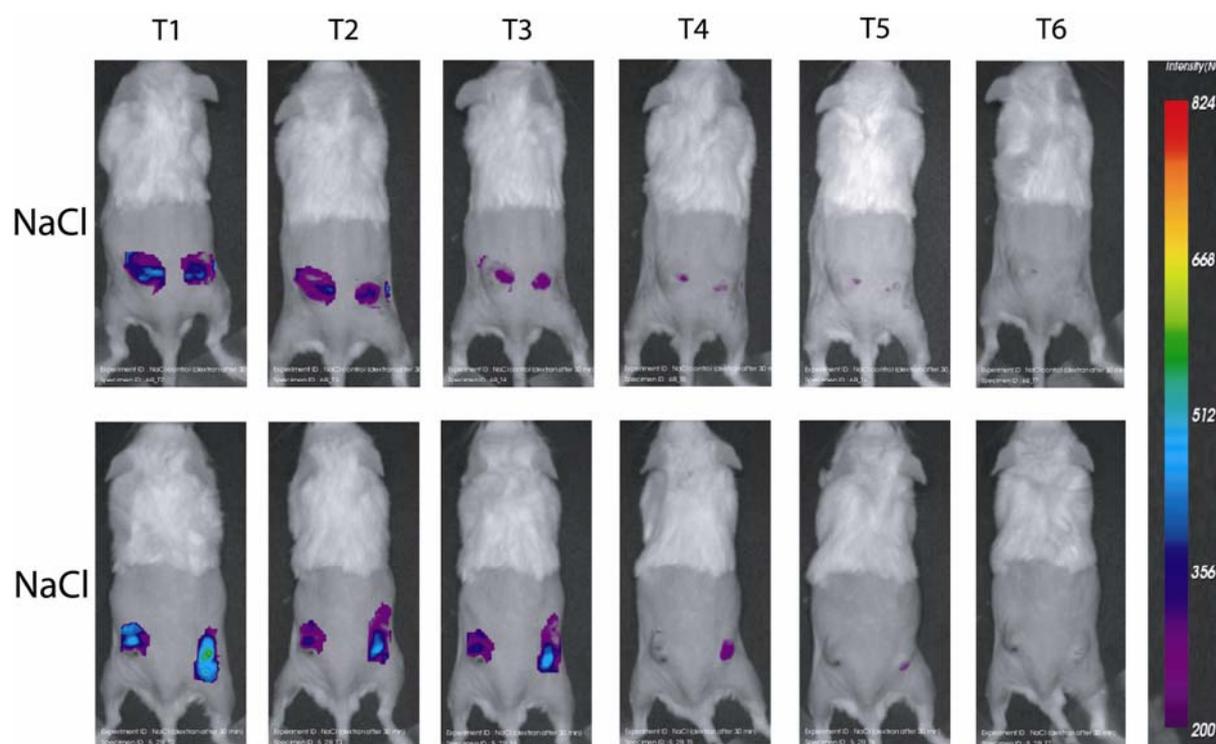
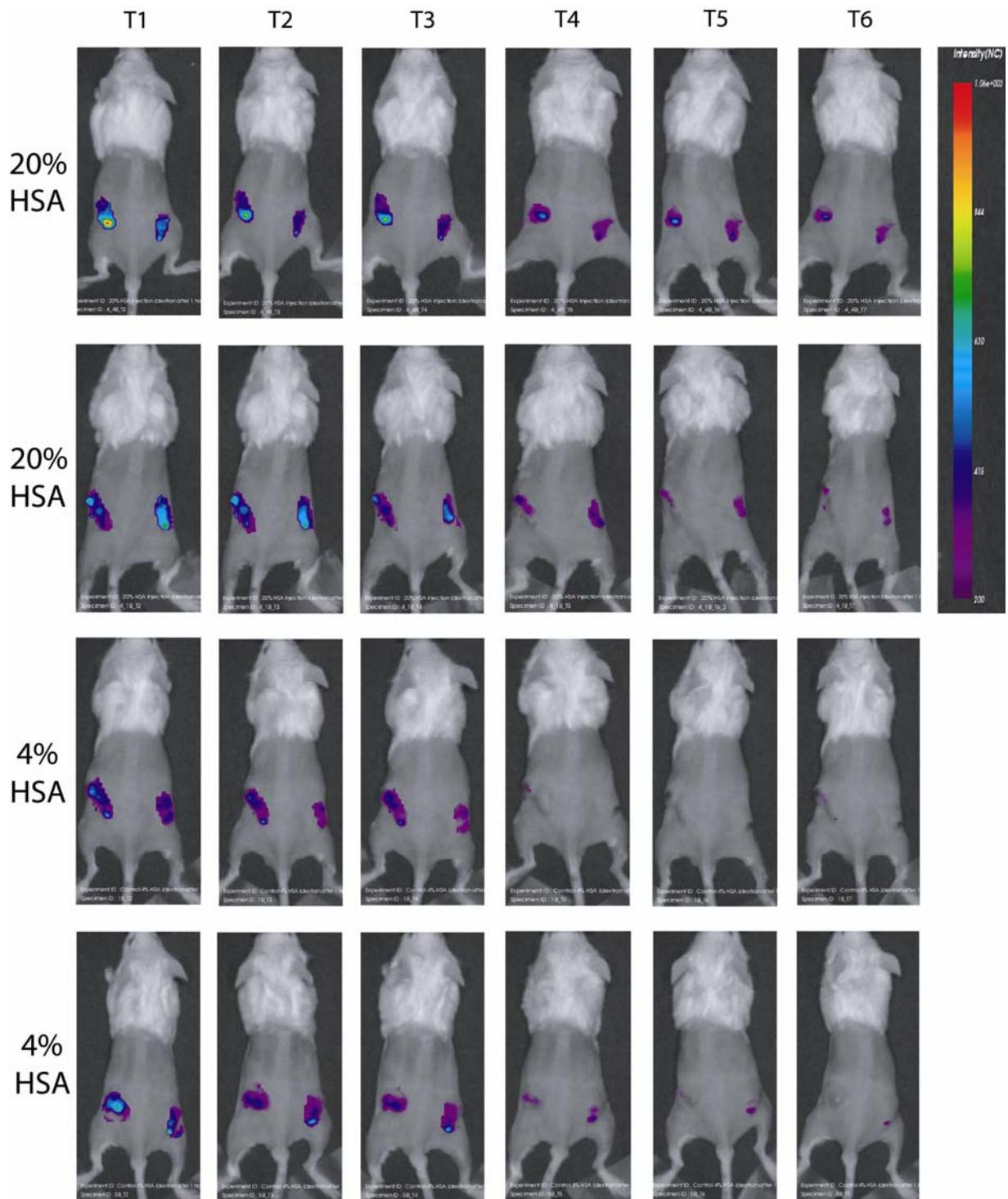


Abb. 3.10.8: I.v. Injektion von Alexa680-Dextranen 30 min nach der HSA-Injektion in A431 Tumore von SCID-Mäusen. Die Aufnahmen (über zwei Seiten) zeigen für jedes Behandlungsschema (20% HSA, 4% HS oder NaCl; Darstellung in den Reihen) jeweils zwei verschiedene Tiere. Die Spalten geben die unterschiedlichen Zeitpunkte der Messungen wieder T₁-T₆. Für die Aufnahmen ist speziell das Tumoreareal gescannt worden. Die Falschfarbenwerte sind für alle Tiere gültig. Die rechts stehende Farbskala gibt die gemessenen Intensität wieder. Rot bedeutet dabei höchste Intensität = stärkste Aufnahme von Dextranen. Die dargestellten Messwerte sind Hintergrund und *life-time* bereinigt. Alle Messungen wurden gegen die höchste gemessenen Intensität normalisiert. n = 3 pro Behandlungsgruppe

3.10.2.4 Aufnahme von Alexa680-markierten Dextranen (10 kD) 60 min nach HSA-Infusion (*)(**)

Die nachfolgenden Aufnahmen (Abb. 3.10.9, S. 116/117) zeigen die Scanergebnisse von Tieren, welche die Injektion der Dextranlösung 1 h nach der Injektion von 20% HSA, 4% HSA oder NaCl bekommen haben. Zur Verdeutlichung sei nochmals darauf hingewiesen, dass die vorherigen Abbildungen Scans von Tieren sind, deren Dextran-Injektion nur 30 min nach der Testsubstanz Injektion stattgefunden hat. Ansonsten ist in der Abfolge der Aufnahmen kein Unterschied zu den vorherigen gemacht worden. Die Fotos zeigen jeweils 2 Tiere für die jeweiligen Testsubstanzen und die Bilder der Zeitpunkte T₂-T₆.



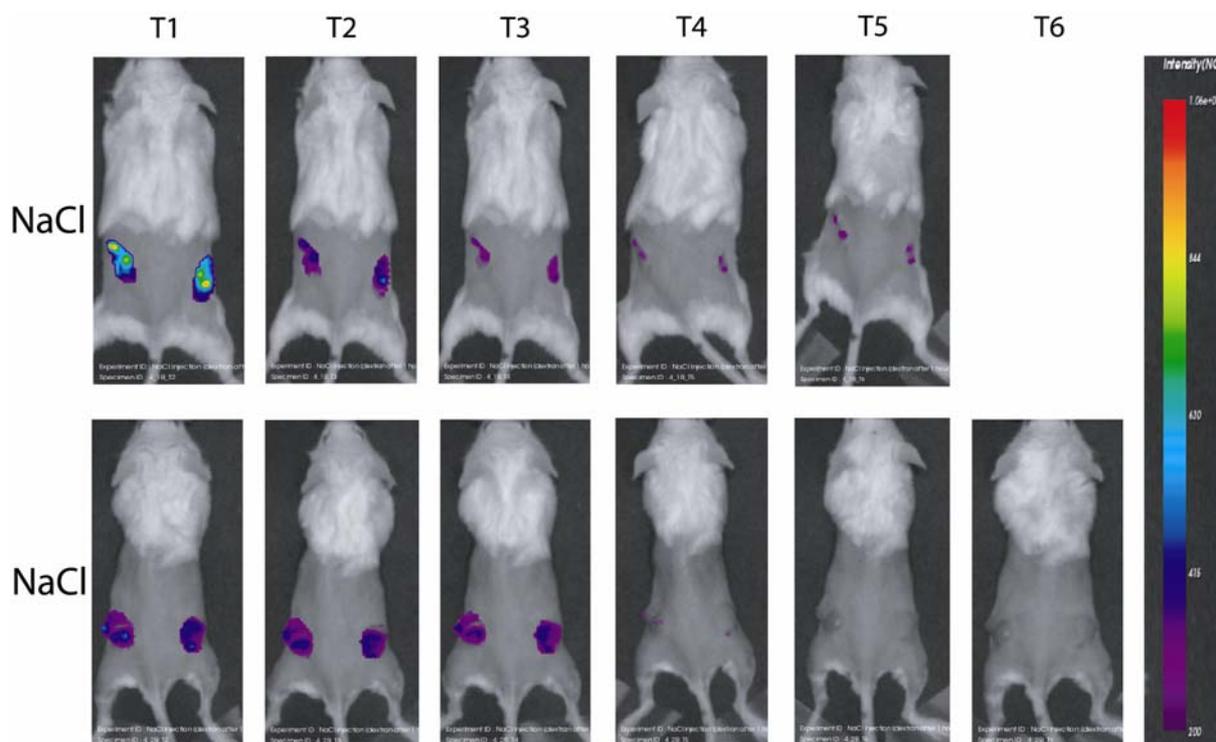


Abb. 3.10.9: I.v. Injektion von Alexa680-Dextranen 60 min nach der HSA-Injektion in A431 Tumore von SCID-Mäusen. Die Aufnahmen (über zwei Seiten) zeigen für jedes Behandlungsschema (20% HSA, 4% HSA oder NaCl; Darstellung in den Reihen) jeweils zwei verschiedene Tiere. Die Spalten geben die unterschiedlichen Zeitpunkte der Messungen wieder T₁-T₆. Für die Aufnahmen ist speziell das Tumoreareal gescannt worden. Die Falschfarbenwerte sind für alle Tiere gültig. Die rechts stehende Farbskala gibt die gemessenen Intensität wieder. Rot bedeutet dabei höchste Intensität = stärkste Aufnahme von Dextranen. Die dargestellten Messwerte sind Hintergrund und *life-time* bereinigt. Alle Messungen wurden gegen die höchste gemessenen Intensität normalisiert. n = 3 pro Behandlungsgruppe; ein Tier (NaCl-Gruppe) verstarb zwischen den Messungen T₅ und T₆

3.10.2.5 Quantifizierung der Messdaten (*)(**)

Die nachfolgenden Graphen zeigen die Auswertungsergebnisse der Scanaufnahmen, die mit der eXploreOptix-Analysensoftware durchgeführt wurde. Die auf der y-Achse aufgetragenen *average counts* geben die aus dem Tumor emittierten und registrierten Photonen wieder. Die Daten wurden bei dieser Analyse auch normalisiert. Messungen zum Zeitpunkt T₆ wurden mit einer höheren Laserleistung durchgeführt als Messungen zum Zeitpunkt T₂. Die Laserleistung wurde während der Scanphase immer wieder neu angepasst, um die bestmögliche Auflösung zu erreichen. Um die einzelnen Messergebnisse aber miteinander vergleichen zu können, ist es notwendig diese Daten zu normalisieren. Dies wurde mit allen gemessenen Datensätzen durchgeführt. Die vom Scanner registrierten Daten wurden, nach Durchführung der Hintergrundbereinigung, *life-time*-Filterung und Normalisierung der Datensätze, in zwei Graphen für die Versuche a) Dextran-Injektionen 30 min nach Testsubstanjinjektion und b) Dextran-Injektionen 1 h nach Testsubstanjinjektion eingesetzt (Abb. 3.10.10).

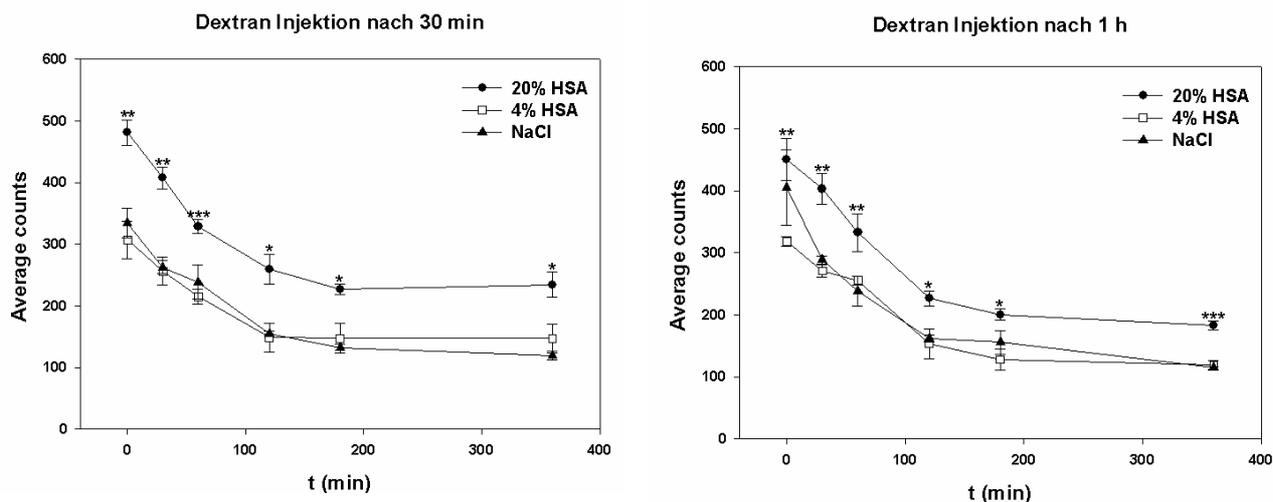


Abb. 3.10.10: Messungen der emittierten Photonen. Links: Dextran-Injektion 30 min nach Injektion von 20% HSA, 4% HSA oder NaCl; Rechts: Dextran-Injektion 1 h nach Injektion von 20% HSA, 4% HSA oder NaCl. Daten sind Mittelwerte +/-SE (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$); $n = 3$ pro Behandlungsgruppe

Beide Graphen zeigen eindeutig, dass es in den Versuchstieren, welche mit 20%igem HSA behandelt worden sind, zu einer signifikant erhöhten Aufnahme von fluoreszenten Dextranen in den Tumoren gekommen ist. Mit Ausnahme des ersten NaCl-Wertes im zweiten Graphen lag die Anzahl der aus dem Tumor emittierten Photonen höher als bei den beiden Kontrollsubstanzen 4% HSA und physiologische NaCl-Lösung. Die beiden Kontrollen weisen, wie schon bei der Bestimmung des Blutdruckes, in ihren Messergebnissen keinen signifikanten Unterschied untereinander auf. Für alle Messungen gilt gleichermaßen, dass zum Zeitpunkt T_2 in allen Gruppen die höchsten Werte angezeigt wurden. Dies ist auch zu erwarten, da direkt nach der Dextran-Injektion die größte Menge an fluoreszenten Dextranen in den Tumor gelangt. Im Laufe der Zeit ist die Gesamtmenge der Dextrane innerhalb des Tumors geringer geworden. Dies ist aber in allen drei Behandlungsgruppen in gleichem Ausmaß messbar. Auffallend ist, dass sich die Messwerte zum Zeitpunkt T_4 hin stabilisieren und bis T_6 nur noch minimal abfallen. Versuche, bei denen die Dextrane 30 min nach der Testsubstanz-Injektion verabreicht wurden, zeigen, dass die mit 20% HSA behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren zum Zeitpunkt T_6 die doppelte Menge an Dextranen aufgenommen haben.

3.10.2.6 Aufnahme von Alexa680-markiertem Cetuximab nach HSA-Infusion (*)(**)

Im nächsten Schritt wurde die Aufnahme eines bereits in der klinischen Praxis eingesetzten Therapeutikums in A431 Tumore untersucht. Die Auswahl fiel auf den monoklonalen Antikörper Cetuximab (Erbix®). Dieser Antikörper inhibiert EGF-Rezeptor vermittelte Signaltransduktionswege. Da A431-Zellen eine starke Überexpression des EGF-Rezeptors aufweisen, bot es sich an, die Zellen mit diesem Antikörper zu behandeln. Es ist aber darauf hinzuweisen, dass das Ziel dieses Versuches zuvorderst darin besteht, die Aufnahme von Cetuximab in den Tumor nachzuweisen und nicht darin, die zytotoxische Wirksamkeit des Antikörpers zu bestimmen. Vor dem Versuch ist der Farbstoff Alexa680 an Cetuximab gekoppelt worden, so dass die Aufnahme des markierten Antikörpers im Tumor durch den Scanner detektiert werden konnte.

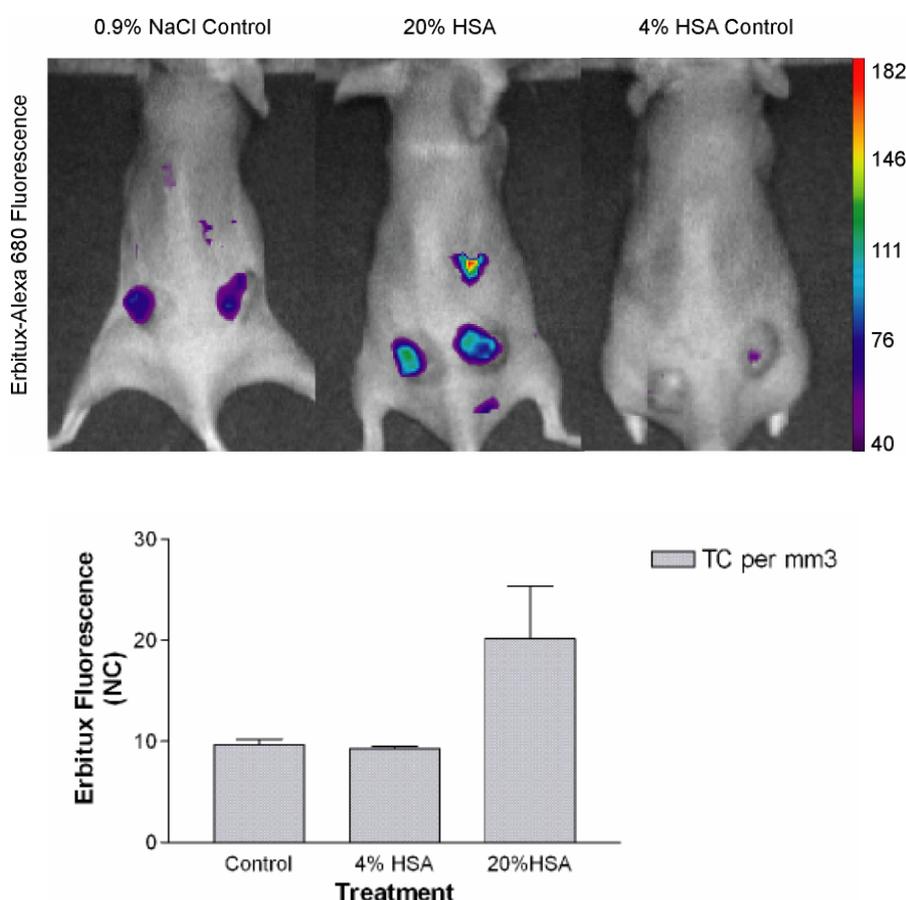


Abb. 3.10.11: I.v. Injektion von Alexa680-Cetuximab 30 min nach der HSA-Injektion in A431 Tumore von SCID-Mäusen. Die Aufnahmen zeigen für jedes Behandlungsschema (20% HSA, 4% HS oder NaCl;) ein Tier. Alle Aufnahmen sind zum Zeitpunkt T_6 (6 h post Cetuximab-Injektion) gemacht worden. Für die Aufnahmen ist speziell das Tumorareal gescannt. Die Falschfarbenwerte sind für alle Tiere gültig. Die rechts stehende Farbskala gibt die gemessenen Intensität wieder. Rot bedeutet dabei höchste Intensität = stärkste Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem Cetuximab. Die dargestellten Messwerte sind Hintergrund und *life-time* bereinigt. Alle Messungen wurden gegen die höchste gemessenen Intensität normalisiert. $n = 2$ pro Behandlungsgruppe. Die Aufnahmen sowie die statistische Auswertung wurden dankenswerterweise von Dr. Emmet Mc Cormack (Zentrum der Hämatologie, Universität Bergen) zur Verfügung gestellt.

Das Versuchsprotokoll entsprach bei diesen Experimenten demjenigen, welches zuvor in den Versuchen zur Aufnahme von fluoreszenten Dextranen Anwendung gefunden hat. Die ersten vorläufigen Messergebnisse aus diesen Untersuchungen zeigen, dass eine erhöhte Aufnahme an fluoreszenzmarkiertem Cetuximab in den Tumoren der SCID-Mäuse nachgewiesen werden kann, die vor der Cetuximab-Applikation eine Injektion mit 20%iger HSA-Lösung bekommen haben (Abb. 3.10.11). Die beiden Kontrollgruppen, welche 4% HSA bzw. NaCl vor der Cetuximab-Injektion erhalten haben, zeigen eine verringerte Aufnahme des Therapeutikums in den Tumor. Die Ergebnisse beider Kontrollgruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander und bestätigen die Ergebnisse der vorherigen Versuche zur Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Dextranen.

4. Diskussion

Die Bedeutung von mechanischen Kräften auf den Organismus ist in den vergangenen Jahren an einer Vielzahl von zellulären Modellsystemen beschrieben worden. Versuche, die ich im Rahmen meiner Diplomarbeit zur Aufklärung der Transduktion von mechanischen Druckreizen durchgeführt habe, bilden die wissenschaftliche Grundlage dieser Dissertation. Der Hintergrund für die damaligen Untersuchungen war die klinische Beobachtung, dass mechanischer Druck zu einer Verdickung der Epidermis (Akanthose) an Stellen länger anhaltender Druckexposition führen kann. Zudem kann mechanischer Druck als exogener Faktor zu einem Ausbruch oder einer Verschlechterung von verschiedenen Krankheitsbildern führen. In der klinischen Diagnostik wird dieser Effekt als Köbner-Phänomen bezeichnet und kann z.B. bei *Psoriasis*, *Lichen ruber*, *Vitiligo*, u.a. Hauterkrankungen beobachtet werden (Fritsch, 1998; Rassner, 2000). Ich konnte in meiner Diplomarbeit nachweisen, dass die Transduktion der mechanischen Druckreize in epithelialen Zellen über die Phosphorylierung von p38 MAPK erfolgt. Zu Beginn der Dissertation lag es nahe, aufbauend auf diesen Ergebnissen weitere Proteine zu identifizieren, die an der Übertragung mechanischer Druckreize beteiligt sind. Das Ziel war es, ein möglichst detailliertes Abbild der druckinduzierten Signalkaskade wiedergeben zu können. Zu diesem Zweck wurden *in vitro*-Experimente zur Beteiligung von HSP27, Rho-GTPasen, Src-Kinase und PKC am druckstimulierten p38 Signalweg durchgeführt. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob sich die Ergebnisse dieser Versuche auch auf andere Organe außerhalb des Hautorgans übertragen lassen können. Die Überlegungen zu dieser Fragestellung ergaben, dass auch in humanen soliden Tumoren eine mechanische Stimulation von Tumorzellen durch den erhöhten tumorinterstitiellen Flüssigkeitsdruck (TIFP) ausgelöst werden könnte. Versuche zur Aufklärung der Rolle von mechanischen Stimuli in *in vivo*-Tumormodellen waren bislang noch nicht durchgeführt worden. Der Fokus der Dissertation richtete sich auf die Aufklärung und die Bedeutung mechanischer Reize in der Tumorgenese. Zu Beginn war es hierfür notwendig ein Xenograft-Tumormodel zu etablieren, um die Grundlage zur Durchführung von *in vivo*-Experimenten zu legen. Zusätzliche Experimente, welche die Bedeutung der Lympharchitektur im Hinblick auf die Ausbildung des TIFP untersuchen, konnten im Rahmen eines Gastaufenthaltes am Zentrum der Dermatologie der Ehime Universität (Matsuyama, Japan) an verschiedenen Tumorentitäten durchgeführt werden. Abschließend wurde in einem weiteren Projekt in Kooperation mit dem Institut für Biomedizin der Universität Bergen (Bergen, Norwegen) eine neue experimentelle Methode zur Beeinflussung des TIFP etabliert. Diese Technik ermöglicht die Effizienz der Aufnahme von Makromolekülen in einen Tumor zu erhöhen.

4.1 Die Rolle von HSP27, Rho-GTPasen, Src und PKC in der druckinduzierten p38 MAPK Signalkaskade

Die Ergebnisse meiner Diplomarbeit konnten für die Transduktion von Druckstimuli die Beteiligung von p38 MAPK sowie MKK3/6 und ATF-2 nachweisen (Hofmann, 2002). Zur Identifizierung von weiteren Proteinen des druckinduzierten p38 Signalwegs, wurde im Rahmen der Dissertation zunächst HSP27 untersucht. HSP27 ist ein hochkonserviertes oligomeres Protein der Hitzeschockprotein-Familie, das durch Stressfaktoren (Hitze, Osmostress, UV, oxidativer Stress, u.a.) über den p38 MAPK Signaltransduktionsweg durch Phosphorylierung an Ser 78 und 82 aktiviert wird (Landry et al., 1992; Wong et al., 2000; Garmyn et al., 2001; Nègre-Aminou et al., 2002). Die Phosphorylierung von HSP27 konnte in zwei unterschiedlichen Experimenten nach einer permanenten Druckstimulation an HaCaT-Zellen mit einem phospho-HSP27 Antikörper nachgewiesen werden. Im ersten Versuch wurde die Phosphorylierung von HSP27 im Western Blot belegt (Abb. 3.1.1). Nach einer 10minütigen Druckstimulation konnte der Nachweis über eine Phosphorylierung von HSP27 erbracht werden. Nach 20 min erreichte sie ihr Maximum. Der zeitliche Verlauf der Aktivierung von HSP27 passte mit der Aktivierung der p38 MAPK zusammen: p38 MAPK war nach 5-10 min phosphoryliert, während das p38 MAPK nachfolgende HSP27 nach 20 min maximal phosphoryliert war. Dass die Phosphorylierung von HSP27 über die p38 MAPK gesteuert wird, konnte durch den Einsatz der spezifischen p38 MAPK-Inhibitoren SB 202190 und SB 203580 belegt werden (Cuenda et al., 1995; Jiang et al., 1996). Als Positivkontrolle wurden die Zellen in den meisten Versuchen hyperosmotischem Stress (1200 mOsm) ausgesetzt. Der Osmostress induzierte eine starke Phosphorylierung von p38 und HSP27 (Hofmann et al., 2004). Zur Verifizierung der Western Blot-Ergebnisse wurden in einem zweiten Experiment immunzytochemische Färbungen gegen HSP27 an HaCaT-Zellen nach mechanischer Druckstimulation bzw. Osmostress durchgeführt. Durch die Bildung von HSP27-Konglomeraten, die sich nach der Phosphorylierung von HSP27 bilden, waren die Zellen in immunzytochemischen Färbungen sehr gut zu identifizieren (Guay et al., 1997). Die Ergebnisse in Abb. 3.1.2 belegen die Akkumulierung von phospho-HSP27 im Zytosol von druckbehandelten bzw. hyperosmotisch stimulierten HaCaT-Zellen. Unbehandelte Kontrollzellen sowie Färbungen ohne Primär- bzw. Sekundärantikörper wiesen keinerlei phospho-HSP27 spezifische Färbungen auf (Hofmann et al., 2004).

Die nachfolgenden Untersuchungen richteten sich auf die Identifizierung von Proteinen, die *upstream* von p38 liegen. Die ersten Versuche dienten dazu eine mögliche Beteiligung von

Mitgliedern der Rho-GTPase Familie im druck-induzierten p38 Signalweg zu überprüfen. Rho-GTPasen nehmen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Signalkaskaden JNK, p38, NF κ B, u.a. ein (Vojtek und Cooper, 1995; Mackay und Hall, 1998; Hall, 2005). Im Speziellen trifft dies für die beiden Proteinfamilien Rac und Cdc42 zu. Für beide GTPasen konnte in einer Reihe von Arbeiten gezeigt werden, dass sie an der Aktivierung der p38 und JNK Signalkaskaden direkt beteiligt sind (Mackay und Hall, 1998). Aufgrund dieser experimentellen Befunde war es wahrscheinlich, dass Rac und Cdc42 auch in dem druckinduzierten p38 Signalweg beteiligt sind. Durch die Präinkubation von HaCaT-Zellen vor der mechanischen Druckstimulation mit dem Rho-GTPasen spezifischen Inhibitor Toxin B, konnte die Rolle von Rac/Cdc42 innerhalb des druckinduzierten Signalweges gezeigt werden. Toxin B ist eine hochmolekulare Glycosyltransferase, die spezifisch Rho-GTPasen inhibiert und keine Effekte auf Ras-GTPasen aufzeigt (Hofmann et al., 1997). Im Experiment ließ sich keine Inhibierung der druckinduzierten p38 Phosphorylierung durch den Einsatz von Toxin B nachweisen. Dies betraf nicht nur die druckbehandelten HaCaT-Zellen, sondern auch die Zellen, welche als Positivkontrolle mit hyperosmolarer Sorbitollösung inkubiert waren. Die Ergebnisse der Inhibitorstudie wurden durch die transiente Transfektion von HaCaT-Zellen mit Rac-wt und dominant-negativen Rac-N17-Konstrukten bestätigt. Mechanische Druckstimulation führte in unbehandelten Kontrollzellen, Rac-wt transfizierten und auch Rac-N17 transfizierten Zellen zur Phosphorylierung von p38. Aus diesen Ergebnissen ließ sich folgern, dass eine Beteiligung der Rho-GTPasen an der druckinduzierten p38 Signalkaskade unwahrscheinlich ist (Abb. 3.1.3/3.1.4).

Neben den Rho-GTPasen ist die Src-Kinase Familie ein bekannter positiver Regulator der Stresskinasen p38 und JNK (Nagao et al., 1998; McMullen et al., 2003). Unter den Proteinfamilien, welche Src aktivieren können, befinden sich heterotrimere G-Proteine, RTKs (z.B. EGF-R) und Integrine (Ma und Huang, 2002). Integrine wurden bereits als Mechanorezeptoren identifiziert (Alenghat und Ingber, 2002; Kippenberger et al., 2000A), weshalb die Untersuchung einer Beteiligung von Src an der Transduktion von mechanischen Druckreizen wahrscheinlich ist. Über eine direkte Verbindung der α_4 - bzw. β_1 -Integrin-Untereinheiten und Src können mechanischen Reize in intrazellulären Signalwege übertragen werden (Giancotti, 1999; Miranti und Brugge, 2002). Des Weiteren gibt es Hinweise auf eine Beteiligung der Src-Kinase an der Transduktion von mechanischen Reizen, die durch Osmostress induziert werden. Hepatozyten, die in hypoosmotischem Medium anschwellen,

phosphorylieren ERK1/2 und p38 MAPK. Die Phosphorylierung von beiden MAPK konnte durch Inhibierung von Src vollständig verhindert werden (vom Dahl et al., 2003).

Um die Rolle der Src-Kinase an der mechanischen Druckstimulation zu untersuchen, wurden verschiedene Inhibitorstudien durchgeführt (Abb. 3.1.5-3.1.8). Dazu wurden HaCaT-Zellen für jeweils 4 h vor den Druckexperimenten mit den Src spezifischen Inhibitoren PP1 oder PP2 behandelt (Hanke et al., 1996). Zur Kontrolle wurde z.T. auch das unwirksame PP2-Analogon PP3 eingesetzt. Die Versuche zeigten eine eindeutige Inhibierung der druckinduzierten Phosphorylierung von p38 nach Präinkubation mit PP1 oder PP2. Diese Ergebnisse konnten an drei Zelllinien (HaCaT, Cos7 und HEK293) bestätigt werden. Die Inhibierung der p38 MAPK aber auch von JNK durch PP2 bzw. PP1 verlief konzentrationsabhängig. Während die Wirkung der Inhibitorsubstanzen bei einer Konzentration von 5 μ M noch keinen Einfluss auf die nachfolgende druckinduzierte Phosphorylierung von p38 und JNK hatte, führte die Präinkubation der Zellen mit 10 μ M PP2 oder PP1 zur vollständigen Blockade der druckinduzierten p38 oder JNK Phosphorylierung. Dass die Inhibierung der p38 Phosphorylierung tatsächlich deren funktionelle Aktivität hemmte, wurde durch einen Versuch belegt, der die Blockierung der HSP27 Phosphorylierung zeigte. Eine Beteiligung der Src-Kinase an der Transduktion von mechanischen Druckreizen konnte durch diese Versuchsergebnisse nachgewiesen werden.

Die dritte Kinasefamilie, die im Rahmen der Dissertation auf eine Beteiligung an der Transduktion von mechanischen Druckreizen hin untersucht wurde, ist die PKC. Zellproliferation und Genexpression können über PKC-vermittelte Signalwege beeinflusst werden (Nishizuka, 1984; Keranen et al., 1995). Die Beteiligung der PKC an der Transduktion von mechanischen Dehnungsreizen ist wiederholt belegt worden, womit eine Beteiligung in druckinduzierten Signalkaskaden nahe lag (Li und Xu, 2000; Pan et al., 2005; Zampetaki et al., 2005; Ali et al., 2006). Wie in Abb. 3.1.9 zu sehen ist, führte die mechanische Druckstimulation zu einer verstärkten Phosphorylierung von PKC. Durch die Präinkubation der Zellen mit dem Src-Kinase Inhibitor PP2 konnte die druckinduzierte Phosphorylierung der PKC unterbunden werden. Das Ergebnis dieses Versuches zeigte jedoch nur, dass mechanischer Druck über einen Src-vermittelten Weg zu einer Phosphorylierung von PKC führt. Eine Beteiligung der PKC am p38 Signalweg war aus diesen Ergebnissen noch nicht ersichtlich. Zur Untersuchung einer Beteiligung der PKC in der p38 Signalkaskade wurden daher Inhibitorstudien mit Calphostin C, einem spezifischen Inhibitor der PKC, durchgeführt (Kobayashi et al., 1989). Die Ergebnisse dieser Experimente

zeigten eine Inhibierung der druckinduzierten p38 Phosphorylierung mit zunehmender Calphostin C-Konzentration (Abb. 3.1.10). Damit konnte der Nachweis erbracht werden, dass die druckinduzierte Phosphorylierung der PKC zur Phosphorylierung von p38 notwendig ist und im p38 Signalweg zwischen Src und MKK3/6 liegen muss. Für die PKC ist jedoch bekannt, dass in vielen zellulären Prozessen nur einzelne Isoformen eine wichtige Rolle spielen und andere z.T. gar nicht aktiviert werden (Inagaki et al., 2002; Obara et al., 2002; Momberger et al., 2006). Aus diesem Grund setzte ich in einem weiteren Versuch zwei PKC-Isoform-spezifische Inhibitorsubstanzen ein: Gö6976 für PKC α und Rottlerin für PKC δ (Qatsha et al., 1993; Gschwendt et al., 1994). Das Ergebnis dieser Untersuchung wies auf eine Beteiligung von PKC α in der druckinduzierten p38 Signalkaskade hin. Nur die Präinkubation mit Gö6976 führte nach mechanischer Druckstimulation zu einer Hemmung der p38 Phosphorylierung. HaCaT-Zellen, die mit der Inhibitorsubstanz Rottlerin behandelt worden waren, zeigten sogar eine verstärkte p38 Phosphorylierung nach mechanischer Druckbelastung (Abb. 3.1.11).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Experimente der vorangegangenen Diplomarbeit und der weiterführenden Versuche im Rahmen der Dissertation eine Vielzahl von Proteinen identifiziert wurde, die an der Transduktion von mechanischem Druck beteiligt sind. Dabei konnten die erzielten Ergebnisse nicht nur an Keratinozyten, sondern auch an weiteren epithelialen Zelllinien bestätigt werden. Das sich dabei ergebende Bild eines Signaltransduktionsweges ist in Abb. 4.1 schematisch dargestellt. Mit Ausnahme der durch Fragezeichen gekennzeichneten Proteine, FAK und Integrine, konnten alle Proteine in den Kontext des druckinduzierten p38 MAPK Signalweges zugeordnet werden. Die Ergebnisse reihen sich auch in vorangegangene Untersuchungen ein, die sich mit dem Differenzierungsmarker Involukrin beschäftigten. In früheren Publikationen ist gezeigt worden, dass die Regulation des humanen Involukrin Promotors über PKC und p38 MAPK erfolgt (Efimova et al., 1998; Efimova und Eckert, 1999). Dies kann insofern einen Hinweis auf die Korrektheit meiner eigenen Ergebnisse darstellen, da bekannt ist, dass Involukrin in humanen Keratinozyten nach mechanischer Druckstimulation verstärkt exprimiert wird (Goermer et al., 1990, 1993).

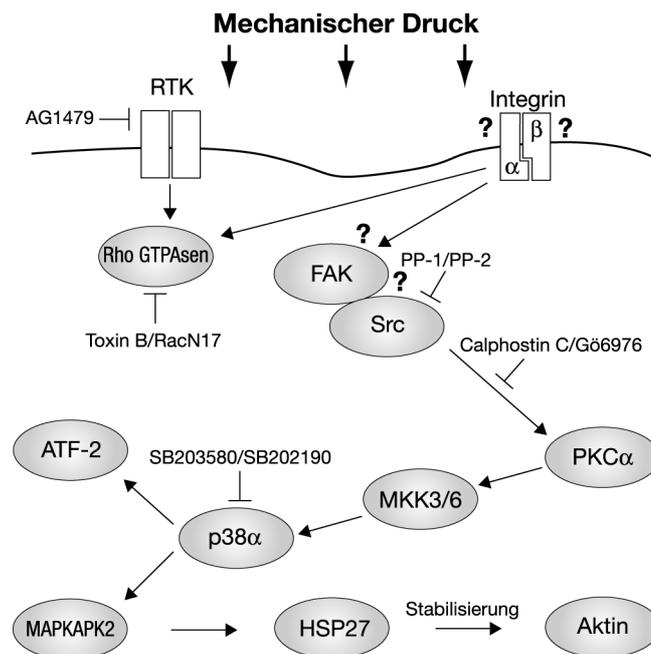


Abb. 4.1: Schematische Übersicht über die an der druckinduzierten Signaltransduktion beteiligten Proteine. Keine Beteiligung der RTKs und Rho-GTPasen am p38 Signalweg. „?“ kennzeichnen die mögliche Beteiligung von Integrinen und FAK an der Perzeption und Transduktion.

4.2 Einfluss von mechanischen Stimuli auf die Tumorgenerese *in vivo*

Neben der weiteren Aufklärung des druckinduzierten p38 Signalweges war das zentrale Thema dieser Dissertation die Klärung der Fragestellung in welchem Umfang mechanische Reize auch in einem *in vivo*-Modell die Tumorgenerese beeinflussen können. Alle bisherigen von unserer Gruppe durchgeführten Versuche beschäftigten sich ausschließlich mit den Wirkungen von mechanischen Reizen in *in vitro*-Systemen.

4.2.1 Tiermodell und Tumormorphologie

Die grundlegende Voraussetzung für die Durchführung der geplanten molekularbiologischen Untersuchungen an Tumoren war die Etablierung eines Xenograft-Tumormodells. Zur besseren Vergleichbarkeit meiner *in vitro*-Daten mit den *in vivo*-Daten war es von Vorteil die geplanten *in vivo*-Versuche an Zelllinien durchzuführen, mit welchen ich bereits in der Zellkultur Erfahrungen gesammelt hatte. Aus diesem Grund bot sich der Einsatz von A431, einer epithelialen Vulvakarzinomzelllinie, und A549, einer epithelialen Lungenkarzinomzelllinie, an. Des Weiteren wurden auch Versuche mit der Melanomzelllinie G361 durchgeführt. Aufgrund der Induktion von Cachexie bei den Versuchstieren, mussten diese Experimente jedoch vorzeitig abgebrochen werden. Auch in der aktuellen Literatur sind

Studien mit den von uns eingesetzten Tumorzelllinien bereits erschienen (Kanazawa et al., 2000; Tei et al., 2002; Jounaidi und Waxman, 2004). Insbesondere A431-Zellen sind zuvor in vielfältigen *in vitro*-Experimenten mechanischen Reizen (Dehnung bzw. Druck) ausgesetzt gewesen. Der Einsatz von humanen Tumorzelllinien implizierte unweigerlich den Einsatz von immunsupprimierten Tieren als Wirt für das Tumormodel. Die von uns eingesetzten Tiere sollten außer der Immunsuppression keine weiteren Mutationen oder *knock-outs* aufweisen, da sich der Fokus unserer Untersuchung auf den Einfluss von mechanischen Stimuli bei „normal“ wachsenden Tumoren bezog. NMRI-Nacktmäuse und Rowett-Nacktratten wurden für die geplanten Versuche als geeignete Tiermodelle ausgewählt. NMRI-Nacktmäuse sind gegenüber den ebenfalls immunsupprimierten SCID-Mäusen von Vorteil, da die Haarlosigkeit der Tiere die Volumen- und TIFP-Messungen der Tumore erleichtert. Der Einsatz der größeren Rowett-Nacktratten ergab sich aus dem experimentellen Setup, welches das Legen von Kathetern mit einschloss. Am Ende der Dissertation kamen zusätzlich SCID-Mäuse bei den Untersuchungen zur Testung der Aufnahme von Makromolekülen zum Einsatz. Der Grund hierfür lag allerdings an fehlenden NMRI-Mäusen am Institut für Biomedizin und der Größe der Rowett-Nacktratten, die für die Scanversuche zu groß waren. Die Induktion der Tumore erfolgte bei Mäusen oder Ratten durch die s.c. Injektion von in 150-200 µl PBS gelösten 1×10^7 Tumorzellen (gilt für alle eingesetzten Zelllinien). Bereits ca. sieben Tage nach der Inokulation der Tumorzellen war der wachsende Tumor mit dem bloßem Auge sichtbar.

Die s.c. Inokulation der Tumorzellen erfolgte bei den NMRI-Nacktmäusen und SCID-Mäusen in die linken und rechten Flanken. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Inokulationsstellen in allen Versuchen möglichst an gleicher Stelle lagen, um eine vergleichbare Wachstumsgeschwindigkeit aller Tumore zu erzielen. Frühere Untersuchungen belegen, dass die Position der Tumorzellinjektion direkten Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumore haben kann (Kyriazis und Kyriazis, 1980; Dipersio, 1981). Dabei ist ein signifikant schnelleres Wachstum von injizierten Tumorzelllinien in den vorderen Flanken im Vergleich zu den hinteren Flanken der Tiere zu beobachten (Kyriazis und Kyriazis, 1980). Bei den Rowett-Nacktratten mussten die einzelnen s.c. Injektionen der Tumorzellen versuchsbedingt in den Nacken der Tiere erfolgen. Der Grund hierfür lag in der, unter mikroskopischer Kontrolle, durchgeführten Platzierung der Mikrokapillaren zur Messung des TIFP mittels *micropuncture*-Methode. Aus räumlichen Gründen wäre eine Messung des TIFP an den Flanken der Tiere schwierig geworden. In allen Versuchen erfolgte aus tierschutzrechtlichen Gründen ein vorzeitiger Abbruch des Experimentes sofern das Tumolvolumen den Wert von

ca. 2500 mm³ überschritten hatte. Die Volumenzunahme der A431 Tumore und ihre Lokalisation bei den unterschiedlichen Tiermodellen sind in den Abb. 3.2.1 und 3.2.2 gut zu erkennen. Mit Hilfe von immunhistochemischen H/E-Färbungen konnte gleich zu Beginn der *in vivo*-Untersuchungen geklärt werden, in welchem Maße die Morphologie der von uns eingesetzten Tumore mit dem theoretischen Modell des monozystischen Tumors (Abb. 1.3) übereinstimmte. Die Aufnahmen zeigen eine hohe Übereinstimmung mit unserem Modell. So weisen A431 und A549 Tumore eine große zentrale Zyste auf, die mit interstitieller Flüssigkeit und nekrotischen Zellen gefüllt ist (Abb. 3.3.1A/B, 3.3.2). Die Tumorzellen befinden sich nur in einen schmalen Rand rund um die Zyste. In der Randzone des Tumors sind unter 200 bzw. 400facher Vergrößerung des Gewebes gedehnte Tumorzellen zu erkennen. Die Tumorzellen der Randzone lassen sich durch die veränderte Morphologie (abgeflacht, langgezogen) relativ leicht von den weiter innen liegenden Zellen unterscheiden (Abb. 3.3.3). Neben diesen ersten immunhistochemischen Belegen für eine mechanische Stimulation von Tumorzellen *in vivo*, bewies die Punktion eines exzidierten A431 Tumors auf eindrucksvolle Weise unter welcher hohen mechanischen Spannung ein monozystischer Tumor steht. Die Aufnahmen in Abb. 3.3.4 zeigen die unter Spannung stehende Oberfläche des Tumors, der dadurch wie „aufgeblasen“ wirkt. Punktierte man den Tumor durch das Einbringen einer Kanüle, so kam es zum Austritt von interstitieller Tumourflüssigkeit und der Tumor kollabierte. Die mechanische Spannung, die das Tumorgewebe vor der Punktion aufwies, war nach der Punktion optisch nicht mehr wahrzunehmen. Diese Ergebnisse deuteten an, dass die Tumorzellen *in vivo* permanent mechanischen Reizen ausgesetzt sind. Inwiefern diese „äußerlich“ sichtbare mechanischen Belastung die zellulären bzw. molekularen Funktionen der Tumorzellen beeinflussen, ließ sich aus diesen Versuchen noch nicht ableiten.

4.2.2 Messung des TIFP

Auslöser für die mechanische Stimulation der Tumorzellen ist der stark erhöhte interstitielle Flüssigkeitsdruck (IFP) innerhalb der Tumore (Jain, 1989; Heldin et al., 2004). Wie in Abb. 3.3.4B zu sehen ist, führt die Punktion der intratumoralen Zyste zu einem Ausstrom interstitieller Flüssigkeit infolge dessen die Tumorkapsel kollabiert. Der erhöhte TIFP ist erkennbar, da nach der Insertion der Punktionskanüle die Tumourflüssigkeit aufgrund des hohen TIFP ohne äußere Einflüsse aus dem Tumor strömt. Es war nicht notwendig die interstitielle Flüssigkeit per Spritze aktiv aus dem Tumor abzusaugen. Um Aussagen machen zu können, welchen Einfluss der TIFP aufgrund der induzierten mechanische Dehnung auf die molekularen Signalwege der Tumorzellen hat, mussten Methoden etabliert werden, um

den TIFP *in vivo* zu bestimmen. Dazu diente zu Beginn der Experimente ein aus der Ophthalmologie bekanntes Messgerät, das Schiötz-Tonometer (Abb. 3.4.2). Mit diesem Messgerät wird normalerweise der intraokulare Augendruck gemessen. Dazu wird der Fuß des Messgerätes auf die Hornhaut des Auges gestellt, ein Stempel wird, je nach Höhe des Augeninnendrucks, nach innen geschoben und auf einer Skala der zugehörigen Messwert angezeigt. Erste Untersuchungen am Tumor zeigten, dass mit dieser Methode eine Bestimmung des intratumoralen Drucks nicht möglich war. Die Druckdifferenzen waren speziell zu Beginn des Tumorwachstums zu niedrig, um sie mit dem Schiötz-Tonometer zu erfassen. Das Gerät ist darauf geeicht, Drücke im Bereich von 15-25 mmHg zu messen. Auch ein standardisiertes Platzieren des Messgerätes auf den Tumoren war nicht durchzuführen.

Als Alternative zur Messung des TIFP mittels Schiötz-Tonometer hat sich die *wick-in-needle*-Technik angeboten (Fadnes et al., 1977; Wiig et al., 1987). Bei dieser Methode wird eine feine Stahlkanüle zur Messung des Flüssigkeitsdrucks eingesetzt, in deren Mitte dünne Baumwollfäden entlang laufen. Die Kanüle wird mit isotoner Kochsalzlösung gefüllt und über einen Schlauch, der ebenfalls flüssigkeitsgefüllt ist, an ein Druckmessgerät angeschlossen. Durch die Verwendung einer Kanüle können Druckmessungen auch in tieferliegenden Gewebeschichten bzw. in der zentralen Zyste des Tumors durchgeführt werden. Die in der Nadel liegenden Fäden führen durch die Vergrößerung der Kontaktfläche zur Verbesserung des Flüssigkeitstransports zwischen Interstitium und Nadel. Ein weiterer Vorteil der Fäden liegt in der Schutzfunktion vor Verstopfung. Bei offenen Kanülen besteht häufig die Gefahr, dass die Kanüle verstopft und es zu fehlerhaften Messungen kommt, da kein kontinuierlicher Flüssigkeitsaustausch mehr zwischen dem Lumen der Kanüle und dem Interstitium stattfinden kann. Probemessungen des TIFP zeigten, dass auch ohne die Fäden, die Messergebnisse nicht beeinflusst waren. Ob eine Obstruktion der Kanüle vorlag konnte dadurch überprüft werden, dass der Schlauch zwischen Kanüle und Messsensor kurzzeitig abgeklemmt wurde. Dadurch kam es zum Anstieg des Flüssigkeitsdrucks. Beim erneuten Öffnen der Klemme stellte sich nach kurzer Zeit wieder der Ausgangswert ein, sofern keine Blockade den Flüssigkeitsaustausch behinderte. Allerdings besteht beim Einsatz der *wick-in-needle*-Technik die Gefahr, dass die wiederholte Anwendung in kurzen Zeitabständen die physiologischen Parameter des Tumors beeinflussen können (Griffon-Etienne et al., 1997). Nach Beendigung einer Messung und dem Entfernen der Kanüle aus dem Tumor wird immer ein geringes Volumen an interstitieller Flüssigkeit austreten. Dadurch sinkt der TIFP für einen kurzen Zeitraum und benötigt eine gewisse Zeitspanne zur Regenerierung. Eine zweite

Messung nach kurzer Zeit würde ein falsches Messergebnis liefern. Eine Vielzahl an Publikationen zeigt, dass mit dieser einfachen Methode bei korrekter Anwendung sehr gute Messergebnisse erzielt werden können. Eine aktuelle Studie beweist das Potential der Methode. Dabei werden die Fäden in der Kanüle gegen einen miniaturisierten Drucksensor ausgetauscht, so dass Druckschwankungen direkt in der Kanülenspitze gemessen werden können (Ozerdem und Hargens, 2005). Alle Messungen des TIFP in Frankfurt wurden mit dieser Methode durchgeführt. Die in den Versuchen gemessenen TIFP-Werte reichten von ca. 1 bis 13 mmHg.

Darüber hinaus kam in den Versuchen an der Universität Bergen die *micropuncture*-Methode zur Messung des TIFP zum Einsatz (Wiig et al., 1981). Der Vorteil dieser Technik bestand darin, dass bei dem Einsatz von Mikrokapillaren geringere Volumina an interstitieller Flüssigkeit zur Messung notwendig waren. Die Messungen mit den Mikrokapillaren bedeuteten weniger traumatische Eingriffe an den Versuchstieren im Vergleich zur Anwendung von Kanülen zur TIFP-Messung. Der große Nachteil hingegen war die geringe Eindringtiefe der Glaskapillaren, so dass die Messungen auf das Hautorgan oder operativ freigelegte Organe bzw. Tumore beschränkt waren (siehe auch Kap. 2.2.4).

4.2.3 Einfluss des Tumorumens auf den TIFP

Eine Vielzahl von Untersuchungen zeigen, dass es keine allgemeingültigen Aussagen darüber gibt, dass ein zunehmendes Tumorumen auch eine Erhöhung des TIFP bedingt. Verschiedenen Arbeiten belegen, dass der TIFP mit dem Wachstum der Tumore zunimmt (Wiig et al., 1982; Boucher et al., 1991; Gutmann et al., 1992; Nathanson und Nelson, 1994; Stohrer et al., 2000). Im Gegensatz dazu zeigen andere Studien, dass auch eine negative Korrelation zwischen Tumorumen und TIFP auftreten kann. In diesen Fällen kommt es zu einer Abnahme des TIFP bei fortschreitender Zunahme des Tumorumens (Boucher et al., 1995; Tufto und Rofstad, 1999). Diese gegensätzlichen Muster sind Tumorentität-spezifisch, jedoch liegen bislang keine Daten vor, die dieses Phänomen hinreichend erklären können. Bekannt ist, dass bei allen Tumoren die Durchmesser der tumorversorgenden Kapillaren mit der Zunahme des Tumorumens anwachsen (Vaupel et al., 1989; Leunig et al., 1992; Tufto und Rofstad, 1999). Jedoch ist der Kapillardurchmesser ebenfalls Tumorentität-spezifisch, und bildet damit eine mögliche Erklärung, für die Unterschiede in den TIFP-Werten zwischen verschiedenen Tumoren. Ein geringerer Kapillardurchmesser führt zu einer direkten Beeinflussung des kapillaren Blutflusses durch die Erhöhung des räumlichen Widerstandes. In Folge dessen kommt es zu einem Anstieg des hydrostatischen mikrokapillaren Druckes

(MVP) (Tufto und Rofstad, 1999). Der MVP stellt seinerseits einen zentralen physikalischen Parameter bei der Regulation des TIFP dar. Basierend auf theoretischen, mathematischen Modellen und experimentellen Messungen konnte gezeigt werden, dass der TIFP immer von einem auf gleichem Niveau liegenden MVP begleitet ist (Boucher und Jain, 1992; Boucher et al., 1996). Ein Anstieg des MVP bedeutet immer auch einen Anstieg des TIFP. Neben dem Kapillardurchmesser können auch noch andere Faktoren den MVP beeinflussen, z.B. führt die Blockade von abfließenden venösen Gefäßen unmittelbar zu einem Anstieg von MVP und TIFP (Wiig und Gadeholt, 1985). Im experimentellen System kann solch eine Blockade durch das Abklemmen eines Gefäßes simuliert werden aber auch *in vivo* kommt es z.T. durch schnellwachsende Tumorzellen zu einer Komprimierung bzw. Blockade der tumorversorgenden Gefäße (Padera et al., 2004). Zusammenfassend lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass Tumore, welche von Kapillaren mit geringem Durchmesser versorgt werden, höhere TIFP-Werte aufweisen, als Tumore, deren versorgende Gefäße einen größeren Durchmesser besitzen. Mit dieser Hypothese lässt sich erklären warum in manchen Tumoren bei Zunahme des Tumolvolumens der TIFP sinkt. Die vergrößerten Gefäße bedeuten eine Verringerung des Widerstandes des Blutflusses und somit eine Reduktion des MVP. Wie bereits erwähnt trifft dies nur auf einen Teil der Tumore zu. Bei einer Vielzahl von Tumoren steigt der TIFP mit der Zunahme des Tumolvolumens an. Auch wenn der MVP aufgrund der sich vergrößerten Kapillardurchmesser theoretisch sinken müsste, könnte dieser Effekt durch die gleichzeitig einsetzende Neoangiogenese des Tumorgewebes aufgehoben und sogar noch übertroffen werden (Boucher et al., 1996). Ein Grund für diesen Anstieg könnte darin liegen, dass sich aufgrund der chaotischen Neubildung von Gefäßen, mit Aussackungen und blindendenden Gefäßen, der Blutfluss staut und es zu einem Anstieg des MVP kommt. Zudem kann durch die vermehrten Gefäße, deren Permeabilität im Bereich der Tumore stark erhöht ist, mehr Flüssigkeit in den Tumor übertreten und zu einem weiteren Anstieg des TIFP führen (Jain, 2003).

Aufgrund der bekannten Heterogenität der TIFP-Werte von unterschiedlichen Tumorentitäten waren TIFP-Bestimmungen im Vorfeld der molekularen Untersuchungen notwendig. Die Messungen bestätigten sehr schnell, dass sich die eingesetzten Tumorzelllinien sehr deutlich in ihren TIFP-Werten unterschieden. Messungen des Tumolvolumens und des TIFP mittels *wick-in-needle-* bzw. *micropuncture-*Methoden an A431 und A549 Tumoren ergaben, dass in den von mir eingesetzten Xenograft-Modellen der TIFP mit Zunahme des Tumolvolumens anstieg (Abb. 3.4.3 und 3.4.6; Hofmann et al., 2006). Der Vergleich der beiden Tumorentitäten wies große Unterschied im TIFP auf. So wurden in A431 Tumoren TIFP-

Werte von bis zu 12 mmHg gemessen, während A549 Tumore von gleichem Volumen nur Werte um die 5-6 mmHg aufzeigten. Die ebenfalls eingesetzten G361 Tumore zeigten nahezu keine Beeinflussung des TIFP durch das zunehmende Tumolvolumen (Abb. 3.4.6). Da sie in der Wachstumsgeschwindigkeit sehr gut mit den A549 Tumoren zu vergleichen waren, wäre es bei G361 Tumoren sicherlich von Interesse gewesen die TIFP-Werte von bis zu 2000 mm³ großen Tumoren zu messen (Abb. 3.4.4). Leider konnten diese Daten jedoch nicht erhoben werden, da die Tiere ca. 15-17 Tage nach der Inokulation mit G361 Tumorzellen eine starke Cachexie entwickelten und die Versuche aus Gründen des Tierschutzes abgebrochen werden mussten (Abb. 3.4.7).

4.2.4 Mechanische Stimuli als Triggerfaktoren der Tumorzellproliferation

Für die Ursachen von Krebserkrankungen ist eine Vielzahl Risikofaktoren beschrieben, die zu einem Auslösen der Krankheit beitragen können. Stellvertretend möchte ich hier nur einen Auszug aus den bekannten Risikofaktoren nennen: a) Tabakkonsum; b) Infektionskrankheiten, z.B. mit humanem Papillomavirus, Eppstein-Barr-Virus, u.a.; c) ernährungsbedingte Faktoren, z.B. Übergewicht, Alkoholkonsum; d) hormonelle Faktoren; e) UV Strahlung; f) Exposition von kanzerogenen Substanzen; g) medizinische Kanzerogene, wie Cyclophosphamid (Chemotherapeutikum, das seinerseits das Risiko von Blasenkrebs erheblich steigert); h) Umweltverschmutzung, wie Feinstaub; i) genetische Prädisposition und j) Mutagene (Allen et al., 2005). Bei einer solchen Vielzahl an unterschiedlichen Faktoren, die Krebserkrankungen auslösen können, liegt es nahe, dass es auch eine Vielzahl von molekularen Mechanismen gibt, die Krebserkrankungen induzieren und das Tumorwachstum beeinflussen können. Zu diesen Mechanismen zählen z.B. die Überexpression von Onkogenen, die Herabregulierung von Tumorsuppressorgenen, fehlerhafte Kontrollmechanismen des Zellzyklus, fehlerhafte zelluläre Reparaturmechanismen, Inhibierung der Apoptose, Überexpression von Wachstumsfaktoren, uvm. (Knowles und Selby, 2005).

Ein Ziel dieser Dissertation war es die Auswirkungen von mechanischen Reizen auf die Proliferation der Tumorzellen zu untersuchen, da die Rolle von mechanischen Stimuli als Triggerfaktoren für die *in vivo* Tumorzellproliferation bislang unbekannt war. Nach meiner Hypothese ist der Auslöser für die mechanische Dehnung der Zellen der erhöhte TIFP der in allen soliden humanen Tumoren nachzuweisen ist. Zur Validierung dieser Hypothese wurde die Phosphorylierung der proliferationsassoziierten MAPK ERK1/2 sowie die Expression des Proliferationsfaktors Ki-67 an unbehandelten Kontrolltumoren und TIFP-reduzierten

Tumoren untersucht. Die Abnahme des TIFP erfolgte bei den Untersuchungen zur MAPK-Phosphorylierung durch das Punktieren der zentralen Zyste der Tumore. Die Tumore wurden nach der Punktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten entfernt und für die proteinchemische Aufreinigung vorbereitet. Die Ergebnisse der Western Blot-Untersuchungen an A431 und A549 Tumoren zeigten, dass eine Abnahme des TIFP zu einer raschen Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 führt. Dies war jedoch nur in Tumoren festzustellen, welche 30 bzw. 60 min nach der Punktion entfernt wurden (Abb. 3.5.1/3.5.2). Wurde die Punktion 6 h vor der Tumorentnahme durchgeführt, so war kein signifikanter Unterschied in der ERK1/2 Phosphorylierung zwischen punktierten und Kontrolltumoren nachzuweisen. Messungen des TIFP ergaben, dass dieser nach der Punktion auf Messwerte zwischen 0 und -1 mmHg absinkt, im Laufe von 5-6 h nach der Punktion allerdings erneut aufgebaut wird und Messwerte nahe dem Ausgangsdruck erreicht (Abb. 3.6.1/3.6.3). Die Durchführung weiterer Untersuchungen bzgl. der Phosphorylierung von p38 zeigten keinerlei Hinweise auf eine Aktivierung dieses MAPK Signalweges. Auf den ersten Blick schienen die Daten somit den in Kap. 4.1 dargestellten *in vitro*-Ergebnissen zu widersprechen. Dort wird belegt, dass mechanischer Druck den p38 Signalweg induziert. Der Widerspruch lässt sich lösen, wenn man bedenkt, dass der TIFP ein Flüssigkeitsdruck in einer hydrostatischen Umwelt ist und eine andere Reizqualität darstellt. Die immunzytochemischen Färbungen zu Beginn zeigten, dass der erhöhte TIFP mechanische Dehnung induziert, so dass mit einer Phosphorylierung von ERK1/2 zu rechnen gewesen ist.

Wie zuvor erwähnt kam es nach einer einmaligen Punktion des Tumors nur zu einem zeitlich begrenzten Abfall des TIFP. Die vorangegangenen Ergebnisse zeigen, dass mit dem bisherigen Punktionsmodell Veränderungen in den Phosphorylierungsmustern von proliferationsassoziierten MAPK festgestellt werden konnten. Es war jedoch nicht möglich die Expression von Proliferationsmarkern wie dem Tumorentigen Ki-67 zu bestimmen. Ein für nur 1 h reduzierter TIFP hatte auf solche Faktoren keinen Einfluss. Zur Lösung des Problems wurde von mir ein Redon-Mini-Drain in den Tumor implantiert, so dass der TIFP für über 24 h auf einen Wert von 0-1 mmHg abgesenkt werden konnte (Abb. 3.6.2/3.6.3). Die Einführung dieser Technik war Voraussetzung, um überhaupt *in vivo*-Versuche durchführen zu können, in welchen der TIFP für bis zu 36 h reduziert wurde.

Neben den MAPK ist der Proliferationsmarkers Ki-67 verwendet worden, um die Auswirkungen von mechanischen Stimuli auf die Proliferation der Tumorzellen zu untersuchen. Die Versuche erfolgten an Tumorgewebe, das für mindestens 24 h TIFP-

reduziert war. Wie im vorherigen Abschnitt erläutert, wurde dazu ein Redon-Mini-Drain zur permanenten Drainage in den Tumor implantiert. Für diese Experimente eignete sich Ki-67 besonders gut, da es bereits einige Veröffentlichungen gibt, die eine erhöhte Expression von Ki-67 mit einer verstärkten Phosphorylierung von ERK1/2 in Zusammenhang stellen (Handra-Luca et al., 2003; Staber et al., 2004). Ki-67 Färbungen wurden sowohl an A431 als auch A549 Tumoren durchgeführt. Trotz der unterschiedlichen TIFP-Werte zwischen beiden Tumorentitäten korrelierten die Ergebnisse der Ki-67 Expression in beiden Fällen sehr gut. Unbehandelte Kontrolltumore, sowie solche mit nur einer einmaligen Punktion, wiesen 24 h nach der Punktion eine höhere Expression von Ki-67 auf, als Tumore, die ein Redon-Mini-Drain implantiert bekommen hatten (Abb. 3.7.1-3). Dies traf für beide Tumorentitäten gleichermaßen zu. Um Fehlinterpretationen bei der computerunterstützten Auszählung von Ki-67 positiven Zellen zu vermeiden, wurden ausschließlich die äußeren, viablen Tumorregionen untersucht. Im inneren, nekrotischen Bereich des Tumors sind keine Untersuchungen zur Ki-67 Expression vorgenommen worden. Zusätzlich sind Gewebeschnitte von TIFP-reduzierten und unbehandelten A431 Tumoren gegen den vaskulären Endothelzellmarker CD31 immunhistochemisch angefärbt worden. Durch die Färbung kann überprüft werden ob der geringe Unterdruck, der durch die Drainage innerhalb des Tumors vorliegt, zu einem Kollabieren der tumorversorgenden Blutgefäße führt. In diesem Fall hätte dies bedeutet, dass der Tumor nur noch sehr schlecht mit Nährstoffen versorgt werden konnte. Die beobachtete Abnahme der Ki-67 Expression wäre dann möglicherweise nicht auf eine Abnahme des TIFP, sondern auf das reduzierte Nährstoffangebot zurückzuführen. Wie aus der Abb. 3.7.5 zu ersehen, ist kein Unterschied in den Gefäßdurchmessern zwischen TIFP-entlasteten und unbehandelten A431 Tumoren zu erkennen. Die TIFP-reduzierten Tumore zeigten keine kollabierten Gefäße auf, und es ist davon auszugehen, dass die Drainage keinen gravierenden Einfluss auf die Nährstoffversorgung der Tumore hatte. Die beschriebenen Effekte der signifikant verringerten Ki-67 Expression lassen sich somit auf die dadurch reduzierte mechanische Dehnung der Zellen in Tumoren mit erniedrigtem TIFP zurückführen. Dieser Effekt war an beiden Tumorzelllinien (A431 und A549) unabhängig voneinander nachweisbar (Abb. 3.7.4). Des Weiteren untermauern meine Ergebnisse die Daten von DiResta et al. (2005) und Nathan et al. (2005) die *in vitro* zeigen konnten, dass Tumorzellen, die unter physiologischen Bedingungen gehalten werden, d.h. auch einem erhöhten hydrostatischen Druck im *in vitro*-Experiment ausgesetzt sind, eine erhöhte Proliferation gegenüber Zellen des gleichen Typs aufweisen, welche ohne Druckbehandlung gehalten werden.

4.2.5 Tumore – ein undurchlässiges Gewebe?

Tumore sind keine undurchlässigen „Ballons“, die sich durch den permanenten Einstrom von Flüssigkeiten aufblähen und aufgrund des Gegendruckes der äußeren Hüllen, einen erhöhten TIFP aufweisen. Im Gegenteil, die meisten soliden Tumore sind für Flüssigkeiten in einem bestimmten Umfang permeabel. Eine vollständige Retention der intratumoralen Flüssigkeit ist daher ausgeschlossen (Baxter und Jain, 1989). Vielmehr kann es zu einem wenn auch sehr geringen kontinuierlichen Ausfluss von interstitieller Flüssigkeit kommen. Dieser Flüssigkeitsverlust führt seinerseits im äußersten Tumorgewebe zu einem rapiden Abfall des TIFP. Die niedrigen TIFP-Werte sind jedoch nur in den Bereichen des Tumors zu finden, die weniger als 0,8-1 mm Abstand zur Tumoroberfläche aufweisen (Boucher und Jain, 1992). Der starke Abfall des TIFP nach außen hin kann auch ein Grund für die starke mechanische Dehnung der äußersten Tumorzellen darstellen. Innerhalb des Tumors ist der TIFP homogen, zum Rand hin fällt er drastisch ab und die Zellen können dort durch den nach außen gerichteten Flüssigkeitsdruck gedehnt werden. Auslöser für den Flüssigkeitsstrom vom Inneren des Tumors nach außen ist der hohe TIFP im Zentrum, der den konvektiven Flüssigkeitsstrom fördert, sowie die hohe hydraulische Konduktivität des Tumorgewebes (Swabb et al., 1974; Baxter und Jain, 1989; Boucher et al., 1990). Die hydraulische Konduktivität berechnet sich aus der Filtration (Volumen/Zeit) pro Oberfläche pro hydrostatischer Druckdifferenz. Zwei zentrale Faktoren führen in Tumoren dazu, dass die hydraulische Konduktivität des Gewebes erhöht ist. Dies ist zum einen der erhöhte TIFP, der die Flüssigkeit nach außen „presst“, zum anderen die geringe Menge an Glycosaminoglycan (GAG), die innerhalb der Tumor-EZM keinen Widerstand gegenüber der Flüssigkeitsströmung „aufbaut“. Der Gehalt an GAG liegt in der Tumor-EZM zwischen 10^{-2} - 10^{-1} g pro 100 g Gewebe. Im Vergleich dazu liegt er in Aortagewebe bei 1-6 g/100 g (Swabb et al., 1974). Die hydraulische Konduktivität ist dementsprechend um ein Vielfaches geringer als jene von Tumorproben.

4.3 Einfluss der Lymphgefäße auf den TIFP am Beispiel von A431 und A549 Tumoren

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln erläutert, führt das Fehlen bzw. die geringe Anzahl an intratumoralen Lymphgefäßen zu einer verminderten Drainage von interstitieller Flüssigkeit. Aus diesem Grund stellen Lymphgefäße einen wesentlichen Faktor dar, der zur Entstehung des erhöhten TIFP beiträgt (Leu et al., 2000; Alitalo und Carmeliet, 2002; Padera et al., 2002;

Heldin et al., 2004). Die Ergebnisse aus den vorliegenden Versuchen bestätigten, dass A431 Tumore im Vergleich zu A549 Tumoren einen höheren TIFP aufweisen. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob die Unterschiede im TIFP zwischen diesen beiden Tumorentitäten auf eine unterschiedliche Lympharchitektur zurückzuführen sind. Zusammenfassend kumulierten die Überlegungen in der Frage: Besitzen A431 Tumore weniger Lymphgefäße im Vergleich zu A549 Tumoren, so dass eine geringere Drainage von interstitieller Flüssigkeit in A431 Tumoren zu einem höheren TIFP führt? Um diese Frage zu beantworten, konnte ich glücklicherweise auf die Expertise von Dr. Satoshi Hirakawa und seiner Gruppe am Zentrum der Dermatologie der Ehime Universität in Matsuyama zurückgreifen. Mit der Möglichkeit Tumorproben mit unterschiedlichen lymphatischen Markern immunhistochemisch zu färben, ließ sich sehr gut die unterschiedliche Lympharchitektur in A431 und A549 Tumoren nachweisen. Die Ergebnisse der Färbungen an Paraffin- sowie an Kryoschnitten zeigten jedoch ein sehr überraschendes Bild auf. In A431 Tumoren konnten durch Färbung mit dem lymphspezifischen Marker Podoplanin offene, intratumorale Lymphgefäße dargestellt werden. Diese Gefäße umgeben vielfach die den Tumor durchziehenden Blutgefäße wie anhand von Doppelfärbungen gegen Podoplanin und CD31, einem spezifischen Marker von vaskulären Endothelzellen, nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.8.1/3.8.2). In den Proben von A549 Tumoren waren hingegen keine Podoplanin-positiv gefärbten Strukturen nachweisbar, einzig ein dichtes Netz aus relativ kleinvolumigen Blutgefäßen durchzog das Tumorgewebe.

Zur Verifizierung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen sind molekularbiologische Untersuchungen zur Expression von VEGF-A, -C und HIF-1 α an den Gewebeproben der A431 und A549 Tumore durchgeführt worden. Das Protein VEGF wurde erstmals 1989 von Ferrara und Henzel als ein noch unbekanntes Protein, das eine starke wachstumsfördernde Wirkung ausschließlich auf vaskuläre Endothelzellen aufweist, identifiziert. Bereits drei Jahre später konnte nachgewiesen werden, dass VEGF eine zentrale Rolle in der embryonalen Angiogenese spielt. Des Weiteren wird es aber auch in hypoxischen Bereichen von Tumoren besonders stark exprimiert (Breier et al., 1992; Plate et al., 1992; Shweiki et al., 1992). Mittlerweile ist eine ganze VEGF-Proteinfamilie bekannt, die aus VEGF-A, -B, -C, -D, -E und dem *placenta growth factor* (PGF) besteht (Ferrara, 2002; Yang et al., 2005). VEGF-A und -B sind die Schlüsselfaktoren, welche „Sauerstoff-hungrige“ Tumorzellen zur Induzierung der Angiogenese ausschütten (Ferrara et al., 2003; Goodsell, 2003). Im Gegensatz dazu sind VEGF-C und -D spezifische Wachstumsfaktoren, welche die Lymphangiogenese über die Aktivierung des VEGF-Rezeptors 3 fördern (Jusiila und Alitalo,

2002; Karkkainen et al., 2002). Aktuelle Untersuchungen scheinen aber auch auf eine Beteiligung von VEGF-A in der frühen Lymphangiogenese hinzudeuten (Hirakawa et al., 2005; Kajiya et al., 2005; Liersch et al., 2006). Die Ergebnisse von RT-PCR Versuchen an Proben von A431 und A549 Tumoren bestätigen diese neuen Vermutungen. Die Proben von A431 Tumoren weisen eine starke Expression von VEGF-A auf. Keine VEGF-A Expression ist hingegen in den Proben der A549 Tumore feststellbar, gleiches gilt auch für den Wachstumsfaktor VEGF-C, der in den Gewebeproben von A431 Tumoren nicht detektierbar war (Abb. 3.8.3). In einem abschließenden Versuch ist die Expression von HIF-1 α ebenfalls mittels RT-PCR untersucht worden. HIF-1 α ist ein zentraler Aktivator von VEGF-A, steuert aber auch die Transkription vieler Gene, welche die Glykolyse, den Glukosetransport oder die Erythropoese kontrollieren. Die durch HIF-1 α induzierte VEGF-A Aktivierung ist unabhängig von anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (Pagès und Pouyssegur, 2005). Da nur in A431 Tumoren VEGF-A zuvor nachweisbar gewesen ist, sollte auch die HIF-1 α Expression nur in diesen Tumoren zu detektieren sein. Das Ergebnis der RT-PCR bestätigte diese Vermutung. Einzig die A431 Tumore zeigten die Expression von HIF-1 α (Abb. 3.8.4).

Zusammenfassend betrachtet stimmen die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen und der immunhistochemischen Färbungen überein. Intratumorale Lymphgefäße sowie die Expression von HIF-1 α und VEGF-A konnten nur in A431 Tumoren nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis untermauert die neuesten Erkenntnisse, dass VEGF-A auch in der Lymphangiogenese eine Rolle spielt. Überraschend ist hingegen, dass kein Nachweis von VEGF-C, dem zentralen Faktor zur Induktion der Lymphangiogenese, möglich gewesen ist. Stellt man abschließend das Ergebnis dieser Versuche in Zusammenhang mit der Ausgangsfrage, ob A431 Tumore weniger intratumorale Lymphgefäße besitzen als A549 Tumore, so ist diese Frage zu verneinen. Gerade die A431 Tumore mit erhöhtem TIFP besitzen intratumorale Lymphgefäße im Vergleich zu A549 Tumoren, die in den immunhistochemischen Färbungen keine Lymphgefäße aufwiesen. Fortführenden Untersuchungen zur Funktionalität der nachgewiesenen Lymphgefäße konnten aus technischen Gründen leider nicht durchgeführt werden. In den von mir untersuchten Beispielen der A431 und A549 Tumore scheint die Lympharchitektur keinen direkten Einfluss auf den TIFP zu haben. Zu Bedenken ist auch, dass die Lymphgefäße nur ein Faktor unter mehreren sind, die den TIFP beeinflussen können. Womöglich sind in den von mir untersuchten A431 und A549 Tumoren andere Faktoren, wie die erhöhte Rigidität der EZM oder das fenestrierte Gefäßsystem, die ausschlaggebenden Größen, welche die Unterschiede in den TIFP-Werten zwischen A431 und A549 Tumoren hervorrufen.

4.4 Verbesserung der Aufnahme von Makromolekülen in Tumore durch Reduktion des TIFP

Eine Vielzahl neuartiger Krebsmedikamente ist in den vergangenen Jahren in klinischen Prüfungen und auch in der Klinik eingesetzt worden. Unter diesen Medikamenten befinden sich in großer Zahl neuentwickelte, hochspezifische monoklonale Antikörper, die auf unterschiedlichsten Wegen die Entwicklung der Tumore hemmen sollen. Als Beispiele für diese neuen Medikamente stehen Cetuximab und Trastuzumab, welche die Tumorzellproliferation durch Blockade des EGF-R im Falle von Cetuximab und des HER2-Rezeptors im Falle von Trastuzumab inhibieren. Neuentwickelte Antikörper wie Bevacizumab inhibieren VEGF und sollen die Ausbildung neuer Blutgefäße zu den Tumoren verhindern, damit diese aufgrund reduzierter Nährstoffzufuhr in ihrem Wachstum gehemmt werden. Ob neue, hochspezifische Antikörper oder herkömmliche Chemotherapeutika, alle in der klinischen Krebsforschung verwendeten Medikamente müssen zwei einfache Erfordernisse erfüllen, um effizient gegen Krebserkrankungen eingesetzt werden zu können: A) Die Präparate müssen spezifisch an den Zielstrukturen der Tumorzellen (oder sezernierten Wachstumsfaktoren, wie VEGF) wirken und B) die Wirkstoffe müssen die Tumorzellen *in vivo* in quantitativ ausreichenden Mengen erreichen (Jain, 2001). Betrachtet man den Aufwand, der in die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe zur Krebsbekämpfung investiert wird, so lässt sich feststellen, dass sich dieser größtenteils auf die Lösung der unter Punkt A gestellten Forderung bezieht. Anhand von *in vitro*-Daten zeigt sich, dass die meisten neuartigen Krebsmedikamente eine hohe Zielstrukturspezifität haben. Im Gegensatz zu den vielfältigen Bestrebungen neue Wirkstoffe mit hoher Spezifität zu entwickeln, werden die wissenschaftlichen Ansätze, die zur Lösung der zweiten Forderung notwendig sind, nur von einem relativ kleinen wissenschaftlichen Kollektiv bearbeitet. Auf den ersten Blick erscheint Forderung B trivial. Natürlich ist es für ein Medikament nicht nur essentiell wichtig genau die richtigen Zielstrukturen zu erreichen, sondern zunächst auch zu ihnen transportiert zu werden. Der zentrale Faktor, der die Aufnahme der Wirkstoffe in die Tumore aber erschwert ist der erhöhte TIFP. Die Therapeutika müssen aus den Blutgefäßen über das Interstitium des Tumors zu den Tumorzellen, den Wirkorten, gelangen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, spielt bei diesem Transport die Größe der Moleküle eine wesentliche Rolle. Während für kleine Moleküle diffusionale Transportprozesse ablaufen, erfolgt der Transport größerer Moleküle durch Konvektion. Bei den verstärkt in die klinische Anwendung gelangenden neuen, monoklonalen Antikörpern handelt es sich um Makromoleküle. Für diese stellt der erhöhte TIFP eine Barriere im transkapillaren Transport dar, infolgedessen es zu

einer Reduktion des konvektionellen Transportes und somit einer unzureichenden Aufnahme dieser Makromolekülen kommt (Jain, 1998, 2001; Heldin et al., 2004).

4.4.1 Verschiedene Ansätze zur Reduktion des TIFP

Um die Forderung nach einer quantitativ hohen Aufnahme von Makromolekülen in Tumore erfüllen zu können, muss der erhöhte TIFP gesenkt werden. Es gibt bislang eine Reihe von experimentellen Ansätzen, die über unterschiedliche molekulare Signalwege zu dem Ziel der Reduktion des TIFP führen. In den nachfolgenden Kapitel sollen diese verschiedenen Wege dargestellt und miteinander verglichen werden. Es soll verdeutlicht werden, warum trotz dieser vielfältigen Möglichkeiten zur Senkung des TIFP weiterhin die Notwendigkeit zur experimentellen Suche nach einer weiteren Methode notwendig ist. Des Weiteren sollen die Vorteile der auf HSA-Applikation basierenden Senkung des TIFP verdeutlicht werden.

4.4.1.1 Reduktion des TIFP durch Erhöhung des COP

Der von mir verfolgte Ansatz basiert auf der Hypothese, dass die Erhöhung des COP zu einem verstärkten Efflux von Wasser aus dem Gewebe in das vaskuläre Gefäßsystem führt. Aufgrund des erhöhten TIFP sollte aus dem Tumor mehr interstitielle Flüssigkeit in das Gefäßsystem abfließen als aus den umliegenden Geweben, da der hohe TIFP den Efflux an Flüssigkeit begünstigt. Dabei ist zu beachten, dass der COP auf einen Wert angehoben werden muss, der größer ist als der COP des Tumors, damit aus diesem Flüssigkeit in das Gefäßsystem abfließen kann. Mit dem Abfluss von Flüssigkeit aus dem Tumor würde der TIFP sinken, bis sich ein erneutes osmotisches Gleichgewicht eingestellt hat und keine Flüssigkeit mehr aus dem Tumor strömt.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden A431-Tumorzellen s.c in den Nackenbereich von Rowett nu/nu Ratten inokuliert. Bei einem Tumolvolumen von ca. 1800 mm³ lagen die TIFP-Messwerte der A431 Tumore bei ca. 7-8 mmHg und somit etwas unterhalb der TIFP-Werte von NMRI-Nacktmäusen (Abb. 3.9.2). Zur Erhöhung des COP wurden den Ratten 20%iges HSA als Plasmaexpander über einen Zeitraum von 1 h in einem Gesamtvolumen von 5 ml i.v. injiziert. Diese Injektionsdauer und -volumen sind nach einer Reihe von Vorversuchen als sehr günstige Parameter ausgewählt worden, die den Blutdruck und die allgemeine Physiologie am Geringsten belasten, aber dennoch einen hohen Anstieg des COP vermitteln. Gleichzeitig wurden alle 30 min Blutproben über einen i.a. Katheter zur COP Messung entnommen. Der TIFP wurde ebenfalls zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels *micropuncture*-Technik wiederholt gemessen. Die Resultate der Versuche zeigten, dass die

Gabe von HSA zu einem rapiden und signifikanten Anstieg des COP im Gefäßsystem der Versuchstiere, von unbehandelt 12 mmHg auf bis zu 24 mmHg 1 h nach Beendigung der Injektion, führte (Abb. 3.9.3). Durch die einsetzende renale Ausscheidung, begann der COP ca. 2 h nach Beendigung der HSA-Gabe wieder zu sinken. Bereits 4 h nach der eingestellten HSA-Injektion betrug der COP nur noch 16 mmHg. Längere Messungen wurden hierbei weder für den COP noch für den TIFP durchgeführt. Die Tiere waren zu diesem Zeitpunkt bereits für ca. 6-7 h narkotisiert und durch eine Nachinjektion von Anästhetika wären die physiologischen Parameter der Versuchstiere erneut stark beeinflusst worden. Die parallel zur COP-Bestimmung durchgeführte Messung des TIFP wies 3 h nach Beendigung der HSA-Injektion auf eine Abnahme der TIFP-Werte von anfangs 8 mmHg auf 2 mmHg hin (Abb. 3.9.4). Die Abnahme des TIFP stimmte dabei zeitlich mit dem Maximum des COP überein. Auch wenn es keine Messdaten für Zeitpunkte 3 h post HSA-Injektionen aus den zuvor genannten Gründen gab, war davon auszugehen, dass der TIFP für eine oder zwei Stunden weiterhin leicht gesunken wäre. Für spätere Zeitpunkte wäre zu vermuten, dass der TIFP wieder auf seinen Ausgangswert ansteigt, da der COP sich im Laufe der Zeit normalisiert. In Folge dessen wäre auch mit einem Anstieg des intratumoralen COP zu rechnen und einer Retention der interstitiellen Flüssigkeit im Tumor.

4.4.1.2 Reduktion des TIFP durch Beeinflussung der EZM

In der Ausbildung des erhöhten TIFP spielt die EZM eine zentrale Rolle. Fibroblasten des Tumorstromas weisen oftmals eine erhöhte Kontraktilität auf, wodurch sich auch die erhöhte Rigidität des Tumors erklären lässt (Gabbiani, 2003). Durch den Einsatz von Wirkstoffen, welche Einfluss auf die Struktur der EZM haben, kann der TIFP beeinflusst werden. In normalem konnektiven Gewebe kann der IFP über den Wachstumsfaktor PDGF reguliert werden. PDGF begünstigt die IFP-Kontrolle durch die Stimulierung der Kontraktilität der Fibroblasten bzw. über die Unterstützung der Interaktion zwischen den Integrinen der Fibroblasten und EZM-Molekülen. Der Einsatz von PDGF-Antagonisten kann diese Wechselwirkungen blockieren und dadurch den TIFP beeinflussen (Heldin et al., 2004). So konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von PDGF-Antagonisten der TIFP in KAT-4 Thyroidkarzinomen und PROb-Kolonkarzinomen gesenkt werden kann. Als PDGF-Antagonisten sind die niedermolekulare Substanz Imatinib, ein Inhibitor der PDGF-Rezeptorkinasen, und DNA-Aptamere, die spezifisch die PDGF B-Ketten inhibieren, eingesetzt worden (Pietras et al., 2001). Eine Herabsetzung der Kontraktilität der Fibroblasten kann aber nicht nur durch PDGF-Antagonisten induziert werden, sondern auch durch die

Applikation von PGE_1 erreicht worden. An PROb Karzinomen konnte nachgewiesen werden, dass die s.c. Injektion von PGE_1 zu einer rapiden Reduktion des TIFP führt (Rubin et al., 2000). Die Verwendung von TGF β -Inhibitoren zur Senkung des TIFP zeigt hingegen keinen Einfluss auf die Kontraktilität der Fibroblasten. Die TIFP-senkende Wirkung der TGF β -Inhibitoren erklärt sich aus der Abnahme des Kollagengehalts der EZM (Lammerts et al., 2002). Die Abnahme erfolgt jedoch nicht aktiv, sondern durch die verringerte Neubildung von Kollagen nach der Applikation von TGF β -Inhibitoren. Eine Abnahme des TIFP ist bei dieser Methode erst nach einigen Tagen und nicht nach wenigen Stunden (PDGF-Inhibitoren) oder sogar Minuten (PGE_1) zu erwarten (Jacobson et al., 2003). Ebenfalls über die Abnahme an Matrixmolekülen lässt sich die Senkung des TIFP nach der i.p. Applikation von Dexamethason an LSI74T-Kolonkarzinomen erklären (Kristjansen et al., 1993). Durch die Injektion von Hyaluronidase in humane Osteosarkoma-Tumore kann der TIFP ebenfalls gesenkt werden. Die Abnahme des TIFP beträgt bereits 1h nach der Injektion nur noch 30% des Ausgangswertes (Brekken und de Lange Davies, 1998; Brekken et al., 2000A, 2000B). Es wird vermutet, dass der Abbau des hochmolekularen Polysaccharids Hyaluronan in der EZM durch die Hyaluronidase zu einer Änderung der EZM-Konfiguration führt. Dadurch nimmt die Rigidität der EZM ab und in Folge dessen kommt es zu einer Abnahme des TIFP.

4.4.1.3 Reduktion des TIFP durch Normalisierung der Blutgefäße

Der Einsatz von VEGF-Antagonisten kann in Tumoren ebenfalls zu einer Abnahme des TIFP führen (Lee et al., 2000). Als Ursache für die Senkung des TIFP wird die Normalisierung der Blutgefäße des Tumors angenommen. Durch die geringere Konzentration an freien VEGF-Molekülen im Interstitium kommt es zu einer Rückbildung der stark ausgebildeten Fenestrierung der Tumorgefäße. Zudem verbessert sich der transvaskuläre Transport (Inai et al., 2004; Tong et al., 2004). Neben VEGF-Antagonisten kann auch TNF α durch die Abnahme des arteriellen Blutdruckes oder Nicotinamide durch die Senkung des MVP zu einer Reduktion des TIFP führen. Beide Substanzen führen bereits 1 h nach der Applikation zu einer TIFP-Senkung zwischen 40% und 70% (Lee et al., 1992; Kristensen et al., 1996). Eine weitere Substanzgruppe, deren TIFP-reduzierende Wirkung nachgewiesen ist, sind Bradykinin-Agonisten. Das Peptid Bradykinin induziert die Vasodilatation und eine erhöhte Permeabilität der Blutgefäße. Die Abnahme des TIFP erfolgt sehr rasch und hält nur kurzzeitig an (Emerich et al., 2001). Neue Substanzen wie Combretastatin-Derivate (AC7700 und LY80), Patupilone oder ZD6126 (Tubulin-bindende Reagenzien), die das vaskuläre System des Tumors zerstören können, zeigen keine einheitlichen Ergebnisse in Hinsicht auf

eine Senkung des TIFP (Eikesdal et al., 2002; Hori und Saito, 2003; Ferretti et al., 2005; Skliarenko et al., 2006). Das Problem bei diesen Ansätzen besteht darin, dass die Zerstörung der gefäßauskleidenden Endothelzellen zu einer verbesserten kapillaren Permeabilität führen kann, in deren Folge der TIFP steigt (Eikesdal et al., 2002). Andererseits können diese Substanzen Nekrosen innerhalb des Tumorgewebes induzieren, in deren Verlauf die interstitielle hydraulische Konduktivität des Tumorgewebes steigt und somit der TIFP sinkt (Baxter und Jain, 1989).

4.4.2 Verbesserte Aufnahme von Makromolekülen in TIFP-reduzierten Tumoren

Aufbauend auf den Ergebnissen, dass die i.v. Injektion von HSA zu einer Abnahme des TIFP führt, war es naheliegend zu prüfen, ob der verringerte TIFP in meinem experimentellen Setup auch einen Einfluss auf die Aufnahme von Makromolekülen in den Tumor aufzeigt. Von einigen im vorangegangenen Kapitel genannten TIFP-senkenden Substanzen ist aus publizierten Arbeiten bekannt, dass sie die Aufnahme von Substanzen in den Tumor durch Senkung des TIFP verbessern können. Salnikov et al. (2003) zeigt die verstärkte Aufnahme von 5-Fluorouracil (5-FU) nach der peritumoralen Injektion von PGE₁ in PROb Tumoren. Durch die verbesserte Aufnahme kommt es zu einem verstärkten Anti-Tumor-Effekt von 5-FU. Des Weiteren ist auch eine erhöhte Aufnahme von Doxorubicin nach systemischer TNF α -Gabe in Melanomen bzw. von Carboplatin in Cereport-behandelten (Bradykinin Agonist) Tumoren beschrieben worden (Emerich et al., 2001; Curnis et al., 2002). Die meisten Untersuchungen zur erleichterten Aufnahme von chemotherapeutischen Präparaten sind bislang aber mit PDGF- bzw. VEGF-Antagonisten an *in vivo*-Modellen durchgeführt worden (Pietras et al., 2002, 2003, 2004; Wildiers et al., 2003; Willett et al., 2004).

Zum Test, ob die Senkung des TIFP tatsächlich die Aufnahme von Makromolekülen in A431 oder A549 Tumoren verbessert, sind Vorversuche an punktierten Tumoren durchgeführt worden. Frühere Messungen haben ergeben, dass die Punktion zu einem vollständigen Abfall des TIFP führt. Substanzen, die nach der Punktion i.v. in die Tiere injiziert werden, sollten im Vergleich zu Tieren mit unbehandelten Tumoren verstärkt in die Tumore aufgenommen werden. Als Testsubstanzen sind fluoreszenzmarkierte Dextrane unterschiedlicher Molekulargewichte (10 und 40 kD) eingesetzt worden. Die Injektion der makromolekularen Marker-substanzen hatte in den Versuchen 30 min nach den Punktionen stattgefunden. In diesen Versuchen konnte eine erhöhte Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Dextranen in die punktierten A431 und A549 Tumore im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen

nachgewiesen werden. Diese Daten bestätigten die Theorie, dass der erhöhte TIFP ein Hindernis bei der Aufnahme von Makromolekülen darstellt (Abb. 3.10.2/3.10.3).

Als „*proof of principle*“ meiner Hypothese, dass ein erhöhter COP zur Senkung des TIFP führt und dadurch die Aufnahme von Makromolekülen verbessert wird, sind Rowett-Nacktratten i.v. mit HSA und zeitversetzt mit fluoreszenzmarkierten Dextranen injiziert worden. Der Ablauf der HSA- und Dextran-Injektionen ist dabei nach den zuvor in Norwegen ermittelten Parametern durchgeführt worden. Allen Versuchstieren, mit Ausnahme der unbehandelten Kontrolltiere, wurde 5 ml HSA über einen Zeitraum von 1 h i.v. appliziert. Die nachfolgenden Injektionen von 200 µl fluoreszenzmarkierter Dextrane erfolgten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der HSA Injektion (post 1, 2 oder 3 h). Jedoch sind alle Tumore jeweils 30 min nach der Dextran Injektion exzidiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen vorbereitet worden. Die in Abb. 3.10.5 gezeigten Aufnahmen bestätigen nicht nur die TIFP-reduzierende Wirkung der HSA-Injektionen durch die verstärkte Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Dextranen. Sie belegen auch durch die erhöhte Aufnahme von Dextranen, dass der TIFP wie zuvor in Abb. 3.9.4 dargestellt, zu den Zeitpunkten 2 und 3 h post HSA-Injektion stärker abgesenkt war als nach nur 1 h. Um die Menge an aufgenommenen Dextranen besser quantifizieren zu können, wurden die Versuche in Kooperation mit dem Institut für Biomedizin und dem Zentrum für Hämatologie der Universität Bergen an SCID-Mäusen wiederholt. Aus technischen Gründen mussten die Versuche an teilrasierten SCID-Mäusen durchgeführt werden. Diese sind nicht nur mit 20% HSA, sondern auch mit 4% HSA und 0,9% NaCl-Lösungen vor den Dextran-Injektionen behandelt worden. Die zusätzlichen Lösungen dienten als Kontrollen, um nachzuweisen, ob möglicherweise das Volumen der injizierten Flüssigkeiten die Aufnahme der Dextrane beeinflusst (NaCl-Lösung) bzw. ob die HSA-Konzentration eine Rolle bei der verstärkten Dextranaufnahme spielt (4% HSA-Lösung). In den Bildreihen von Abb. 3.10.8/3.10.9 sind die mittels GE eXploreOptix-Scanner erzielten Messergebnisse von je zwei SCID-Mäusen in den verschiedenen Behandlungsarmen (20% HSA, 4% HSA und NaCl) dargestellt. Einziger Unterschied zwischen Abb. 3.10.8 und 3.10.9 ist der Zeitpunkt der Dextran-Injektion nach der Vorbehandlung mit 20% HSA, 4% HSA oder NaCl. Die Auswertungen der Scanergebnisse zeigen eine signifikant erhöhte Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Dextranen nur in den Tumoren der Mäuse, welche vor der Dextran-Injektion mit 20%iger HSA-Lösung behandelt worden waren. Die Abbildungen verdeutlichen, die erhöhte Aufnahme und Verweildauer der fluoreszenzmarkierten Dextrane in den Tumoren der Tiere, welche die i.v. Injektion der 20%igen HSA-Lösungen erhalten

haben. In den Tumoren, der mit 20% HSA behandelten Mäusen liegen die zu den Zeitpunkten T_1 - T_6 gemessenen Fluoreszenzwerte um ca. 50-60% über den Werten der beiden Vergleichsgruppen 4% HSA und NaCl (Abb. 3.10.10.) In diesem Versuch wurden die Dextrane 30 min nach den HSA und NaCl-Lösungen appliziert. Bei einer Injektion der Dextrane 1 h nach den Test-Lösungen liegen die in den Tumoren gemessenen Fluoreszenzwerte bei Tieren, die mit 20% HSA behandelt worden waren, immer noch 30-40% über den Werten der beiden Kontrollgruppen (Abb. 3.10.10.). Darüber hinaus konnten Blutdruckmessungen zeigen, dass die Injektionen von NaCl und 4% HSA den Blutdruck in SCID-Mäusen wie erwartet nicht beeinflussen. Nach der Injektion der 20% HSA-Lösung blieb ein starker Anstieg des Blutdruckes erfreulicherweise ebenfalls aus. Es kam einzig zu einem kurzen Anstieg im Laufe der ersten Stunde nach der Injektion des konzentrierten Plasmaexpanders (Abb. 3.10.6). Messungen des TIFP in den A431 Tumore der SCID-Mäusen bestätigten das zuvor an Rowett Nacktratten erzielte Ergebnis, dass die Gabe einer 20%ige HSA-Lösung zu einer Reduktion des TIFP führt (Abb. 3.10.7). Erste Voruntersuchungen zur Etablierung eines funktionellen Ansatzes, basierend auf der Senkung des TIFP durch HSA und der verbesserten Aufnahme von Zytostatika, erfolgten an SCID-Mäusen, die anstelle fluoreszenzmarkierter Dextrane mit Alexa680-markiertem Cetuximab behandelt wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche bestätigten die vorangegangenen Ergebnisse und konnten eine erhöhte Cetuximab-Aufnahme in den Tumoren der Tieren, die durch Applikation von 20% HSA einen erhöhten COP hatten, aufweisen. SCID-Mäuse, die vor der Cetuximab-Injektion mit den beiden Kontrollsubstanzen 4% HSA und NaCl behandelt wurden, zeigten eine verringerte Aufnahme der Wirksubstanz Cetuximab (Abb. 3.10.11). Damit konnte die verbesserte Aufnahme von Substanzen nach der HSA-induzierten TIFP Senkung an zwei unterschiedlichen Makromolekülen (Dextrane und Cetuximab) erfolgreich nachgewiesen werden.

Eine Reihe von Molekülen hat in den zuvor dargestellten *in vivo*-Modellen zwar eine TIFP-senkende Wirkung gezeigt, jedoch konnten nur wenige Substanzen auch zu einer verbesserten Aufnahme von Makromolekülen in die Tumore führen. Mit meinem Ansatz konnte ich sowohl den TIFP senken, als auch eine verbesserte Aufnahme von Makromolekülen nachweisen. Ein weiterer Vorteile gegenüber den anderen experimentellen Setups liegt in der Verwendung der Substanz HSA. Diese ist bereits im klinischen Gebrauch und das Nebenwirkungsrisiko ist als relativ gering einzuschätzen. Im Gegensatz zu den meisten anderen Substanzen, die den TIFP reduzieren können, ist der Wirkstoff Albumin äußerst inert.

Es besteht nur ein geringes Risiko, dass HSA-Injektionen zu einer Störung von molekularen Signalwegen führen. Der Einsatz monoklonaler Antikörpern, die z.B. VEGF oder PDGF inhibieren, können den TIFP beeinflussen, allerdings mit z.T. erheblichen systemischen Risiken. Zudem liegen aus Tierversuchen oder klinischen Studien bislang noch keine Daten vor, welche Auswirkungen die Einnahme dieser Substanzen über einen längeren Zeitraum haben. Ein zweiter Vorteil der HSA-Applikation besteht in der zeitlich gut berechenbaren Abnahme des TIFP innerhalb von 1-3 h. Im Gegensatz dazu stehen Anwendungen von TGFβ und Dexamethason, bei welchen der TIFP erst einige Tage nach der Applikation der Wirkstoffe abnimmt bzw. PGE₁ oder Bradykinin, wo es bereits nach Minuten zu einer Senkung aber auch sehr schnell wieder zur Regeneration des TIFP kommt. Die Wiederherstellung des TIFP liegt vermutlich bei 8-10 h nach der HSA Applikation. Für eine zukünftige Anwendung von Substanzen zur TIFP-Senkung bei gleichzeitiger Applikation eines Reagenz, das in den Tumor aufgenommen werden soll, ist ein Zeitfenster einer gewissen Größe bedeutsam, um die zweite Substanz nicht auf die Minute genau verabreichen zu müssen. Im Rahmen einer klinischen Anwendbarkeit ist es auch von Vorteil wenn eine zweite Injektion nach einer moderaten Zeitspanne am selben Tag durchgeführt werden kann. Die Regeneration des TIFP ist jedoch auch wichtig. Eine längerfristige Senkung kann zwar zur verbesserten Aufnahme von Therapeutika führen, aber auch die allgemeine Nährstoffversorgung des Tumors kann verbessert werden. Regenerationszeiten des TIFP von 24-48 h wie sie nach der Gabe von TNFα oder Hyaluronidase bekannt sind, könnten die Anti-Tumor-Effekte der aufgenommenen Makromoleküle durch verbesserte Versorgung des Tumors aufheben.

4.5 Ausblick

Die vorliegenden *in vitro*-Ergebnisse geben in Verbindung mit den Ergebnissen meiner Diplomarbeit ein sehr detailliertes Abbild der Transduktion mechanischer Druckreize über den p38 Signalweg (Hofmann, 2002; Hofmann et al., 2004). Ungeklärt bleibt allerdings nach wie vor die Frage, über welchen Mechanismus Druckreize von epithelialen Zellen perzipiert werden. Eine Vielzahl von Studien belegt, dass Integrine eine zentrale Rolle bei der Perzeption mechanischer Reize einnehmen (Ingber, 1991; Alenghat und Ingber, 2002). Für mechanische Dehnungsreize ist die Beteiligung der Integrine an der Signalperzeption an unterschiedlichen Zelllinien bereits nachgewiesen worden (Knies et al., 2006; Sanchez-Esteban et al., 2006). Unsere bisherigen Ergebnisse der Aktivierung des druckinduzierten p38

Signaltransduktionsweg lassen eine Beteiligung von Integrinen an der Perzeption von Druckreizen als wahrscheinlich erscheinen. Zur weiteren Aufklärung sollten hierzu zukünftige Versuche mittels siRNA oder Inhibitorstudien die Rolle der Integrine als mögliche Mechanosensoren für Druckreize näher untersuchen. Die Ergebnisse dieser Versuche könnten möglicherweise auch neue Ansatzpunkte für eine medikamentöse Beeinflussung des *Integrinsignalling* in Tumoren aufzeigen. Dort induziert mechanische Dehnung die Aktivierung von Integrinen, welche die Bildung von Fokalkontakten fördern und über den Rho-Signaltransduktionsweg die Zellkontraktilität verstärken. Der Anstieg der Kontraktilität führt seinerseits zu einer erhöhten mechanischen Dehnung der Zellen (Huang und Ingber, 2005). Durch die Hemmung der Integrin-vermittelten Stimulation dieses hochregulierenden autokrinen Kreislaufes ließe sich die mechanische Dehnung der Tumorzellen und die Rigidität der Tumor-EZM senken. Die klinische Relevanz dieser Aussage lässt sich im Kontext der Promotionsarbeit gut erkennen: Eine reduzierte mechanische Dehnung der Tumorzellen kann zu einer verminderten Tumorphiliferation führen, während eine Abnahme der Rigidität der Tumormatrix eine Senkung des TIFP vermitteln könnte.

Zentrales Thema meiner Dissertation ist allerdings die erstmalige Identifizierung von mechanischer Dehnung als ein Triggerfaktor der Tumorphiliferation im *in vivo* Xenograft-Modell (Hofmann et al., 2006; 2007). Dies verdeutlicht die wichtige Rolle biophysikalischer Prozesse in der Tumorgenese. Gleichfalls eröffnet sich dadurch ein neuer Ansatzpunkt für mögliche medikamentöse Therapien bei Tumorerkrankungen. Die therapeutisch induzierte Reduktion der mechanischen Dehnung von Tumorzellen könnte somit zu einem verringerten Tumorstadium führen. Die Ergebnisse der Promotionsarbeit identifizieren den stark erhöhten TIFP als Auslöser für die hohe mechanische Dehnung der Zellen im Randbereich des Tumors. Therapeutische Strategien, die auf Medikamente mit einer TIFP-reduzierende Wirkung setzen, verringern die mechanische Dehnung der Tumorzellen und in Folge dessen kommt es zu einer Abnahme der Tumorphiliferation. Zusätzlich kann es durch die Absenkung des TIFP zu einer verbesserten Aufnahme von Therapeutika kommen. Paradoxe Weise induziert der gesenkte TIFP aber auch eine verbesserte Gesamtversorgung des Tumors mit Nährstoffen. Die gesteigerte Nährstoffzufuhr kann aber wiederum eine erhöhte Proliferation der Tumorzellen bedeuten. Zur Lösung dieses Paradoxons kann die verbesserte Aufnahme von schnellwirksamen Antitumor-Therapeutika beitragen. Diese Medikamente können die Tumorzellen schnell und zielgenau angreifen, so dass sie zerstört werden können, bevor die erhöhte Nährstoffversorgung zu einem verstärktem Wachstum der Tumorzellen führen kann.

Die Möglichkeit den TIFP über eine Erhöhung des COP zu senken, bietet damit erstmals neue therapeutische Optionen zur Verbesserung der Aufnahme von Therapeutika in Tumore. Die Hoffnung liegt dabei auf den bekannten Eigenschaften des Wirkstoffes Albumin. Es ist ein sehr inertes Molekül und verbleibt während der Anwendung innerhalb des vaskulären Systems, um die Senkung des TIFP durch die Erhöhung des COP zu induzieren. Außerdem ist ein geringeres Nebenwirkungsrisiko bei einer auf HSA-basierenden Therapie zur Senkung des TIFP ebenfalls zu erwarten. Die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Daten konnten belegen, dass die i.v. Injektion einer 20%igen HSA-Lösung zu einer Erhöhung des COP führte und in Folge dessen eine signifikante Abnahme des TIFP nachweisbar war. Diese Abnahme des TIFP stellt die Grundvoraussetzung für die in den Versuchen gezeigte verbesserte Aufnahme von Markersubstanzen (Dextranen) aber auch Therapeutika (Cetuximab) in die Tumore dar. Das sich daraus ergebende Ziel für zukünftige Untersuchungen liegt in der klinischen Anwendbarkeit der vorgestellten Methode den TIFP durch eine hochkonzentrierte HSA-Applikation zu senken. Vor diesem Hintergrund macht eine Doppelstrategie Sinn, welche die Senkung des TIFP bei zeitnaher Applikation eines Chemotherapeutikums verfolgt. Dadurch würde der proliferationsförderende Faktor „mechanische Dehnung“ reduziert und gleichzeitig die Aufnahme hochmolekularer zytostatisch-wirksamer Therapeutika erleichtert. Bislang gibt es noch keinen klinischen Therapieansatz, der die Absenkung des TIFP zur einer Verbesserung der Aufnahme von Therapeutika verfolgt.

Zur Zeit wird nur bei dem klinischen Einsatz von Bevacizumab (Avastin®) bzw. Imatinib (Glivec®) vermutet, dass diese Antikörper als Nebeneffekt eine Absenkung des TIFP induzieren können. Der VEGF-Inhibitor Bevacizumab wird im Rahmen einer antiangiogenen Tumorthherapie eingesetzt und soll die Nährstoffversorgung von Tumoren durch die reduzierte Gefäßneubildung unterbinden. Durch die Blockierung von VEGF kommt es aber ebenfalls zur Normalisierung der Gefäßarchitektur, wodurch es zu einer Reduktion des TIFP kommen kann. Bevacizumab ist für etliche Indikationen (Kolonkarzinom, u.a.) in Kombination mit Chemotherapeutika (z.B. 5-FU) bereits zugelassen. Die Kombinationstherapie Zytostatikum plus Bevacizumab zeigt einen verbesserten Antitumoreffekt im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Bevacizumab bzw. mit einem Zytostatikum (Hurwitz et al., 2004; Cohen et al., 2007; Giantonio et al., 2007). Als Ursache für die verbesserte Wirksamkeit wird die erhöhte Aufnahme der Zytostatika aufgrund der Bevacizumab-vermittelten Senkung des TIFP in den Tumor vermutet (Willet et al., 2004). Der Wirkstoff Imatinib, zugelassen für die

Behandlung von chronisch myeloischer Leukämie und gastrointestinalen Stromatumoren, ist ein Tyrosinkinaseinhibitor. Der Wirkmechanismus von Imatinib in Stromatumoren basiert auf einer Hemmung der Tumorzellproliferation durch die Blockade des PDGF-Rezeptors. Wie bereits in Kap. 4.4.1.2 beschrieben, führt die Inhibition des PDGF aber auch zu einer reduzierten Kontraktilität von Fibroblasten, wodurch es zu einer Absenkung des TIFP kommen kann. In klinischen Studien konnte bei Kombination von Imatinib mit Chemotherapeutika eine verbesserte Aufnahme dieser Substanzen in Tumore nachgewiesen werden (Vlahovic et al., 2006). Dieser Effekt könnte auf die Senkung des TIFP zurückzuführen sein (Baranowska-Kortylewicz et al., 2005, 2007). Am Beispiel von Imatinib kann aber auch verdeutlicht werden, dass der Einsatz von monoklonalen Antikörpern eine Vielzahl an Risiken in Form von Nebenwirkungen nach sich zieht (Ugurel et al., 2003). Außerdem konnte Imatinib im Tiermodell eine Wachstumshemmung von metastasierenden Melanomen induzieren, in einer nachfolgenden klinischen Studie der Phase II hingegen war keine proliferationshemmende Wirkung von Imatinib nachweisbar (Redondo et al. 2004; Ugurel et al., 2005).

Eine Vielzahl von weiteren präklinischen Untersuchungen sind notwendig, um das hochgesteckte Ziel einer klinisch anwendbaren Therapie, die auf der Senkung des TIFP basiert, zu erreichen. Ein Teil noch offener Fragen soll daher im nachfolgenden Abschnitt diskutiert werden. Als nächster „Meilenstein“ gilt der experimentelle Nachweis, ob die HSA-induzierte erhöhte Aufnahme des Wirkstoffes Cetuximab auch eine verminderte Progression oder sogar eine Regression des Tumorwachstums bewirkt. Für den klinischen Alltag könnte dies bedeuten, dass durch die Senkung des TIFP eine geringere Menge an Cetuximab notwendig wäre, um den gleichen Anti-Tumoreffekt zu erreichen, wie er mit den heutigen Behandlungsschemata erzielt wird. Die reduzierte Cetuximab-Applikation würde das Nebenwirkungsrisiko der Chemotherapie mindern. Des Weiteren würde der geringere Cetuximab-Verbrauch auch einen erheblichen Kostenvorteil gegenüber den aktuellen Behandlungsoptionen bedeuten. Aber auch für den Fall, dass die Cetuximab-Dosis nicht reduziert wird, führt die Abnahme des TIFP zur verbesserten Aufnahme und kann den Anti-Tumoreffekt verstärken. Die Folge dieser verbesserten Wirkung könnte in einer verkürzten Behandlungsdauer des Patienten resultieren. Dies wäre sowohl für den Patienten von privatem als auch für die Klinik von wirtschaftlichem Vorteil. Darüber hinaus sind an weiteren Tumoren (z.B. Saos-Tumore) Untersuchungen geplant, um zu überprüfen, ob die Applikation der hochkonzentrierten HSA-Lösung auch in anderen Tumorentitäten zu einer Senkung des

TIFP beiträgt und somit die Aufnahme von Substanzen in die Tumore erleichtern könnte. Von hohem Interesse werden ebenfalls Experimente sein, die den *Uptake* von weiteren in der Chemotherapie angewandten Substanzen nach HSA-induzierter TIFP-Senkung zeigen. Aktuelle Studien belegen, dass auch kleine Moleküle, wie z.B. 5-FU, Carboplatin, Cisplatin oder der neue Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib (eingesetzt bei HER2/NEU überexprimierenden metastasierenden Mammakarzinomen), durch eine Senkung des TIFP in erhöhtem Maße in den Tumor aufgenommen werden können (Hassid et al., 2006; Heldin et al., 2004; Salnikov et al., 2004). Unter diesen Gesichtspunkten konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht nur zum ersten Mal die proliferationsfördernde Wirkung von mechanischen Reizen auf die Tumorgenese nachgewiesen werden, sondern auch eine neue klinisch-relevante Methode zur Verbesserung der Aufnahme von Makromolekülen in solide Tumoren etabliert werden.

5. Zusammenfassung

Der menschliche Körper ist permanent mechanischen Reizen in Form von Dehnung oder Druck ausgesetzt. Diese Stimuli können vielfältige zelluläre Prozesse induzieren. Dehnungsreize erhöhen die Zellproliferation in allen bisher untersuchten Zellspezies, inklusive Endothel- und Epithelzellen. Im Gegensatz dazu scheinen mechanische Druckbelastungen zu zellulärer Differenzierung zu führen. Die Relevanz dieser mechanischen Reize für die Physiologie und Pathophysiologie ist für viele Organe nachgewiesen worden. Jedoch gibt es bislang keine hinreichenden Untersuchungen, die belegen, dass mechanische Reize ebenso eine Rolle bei der Tumorphiliferation spielen könnten. Im Fokus dieser Promotionsarbeit steht die Fragestellung, inwieweit die mechanischen Verhältnisse in Tumoren in einem funktionellen Zusammenhang mit der Tumorgenese stehen.

Zur Klärung dieser Fragestellung ist ein Xenograft-Tumormodell etabliert worden, das es erlaubt *in vivo*-Untersuchungen an humanen epithelialen Tumoren durchzuführen. Um Erfahrungen aus vorherigen *in vitro*-Versuchen nutzen zu können, wurden humane epitheliale A431-Vulvakarzinom- und humane epitheliale A549-Lungenkarzinomzellen für das Tumormodell verwendet. Mit diesem Modell konnte erstmals *in vivo* gezeigt werden, dass solide humane Tumore einer permanenten mechanischen Dehnung ausgesetzt sind, die direkten Einfluss auf die Proliferation der Tumorzellen hat. Als zentraler Auslöser für die mechanische Dehnung der Tumorzellen konnte der erhöhte tumorinterstitielle Flüssigkeitsdruck (TIFP) identifiziert werden. Der Einfluss der mechanischen Dehnung auf die Proliferation der Tumorzellen wurde anhand der Phosphorylierung der *extracellular regulated kinase 1/2* (ERK1/2) bzw. der Ki-67 Expression gezeigt. Durch die Punktion bzw. Drainage von Tumoren konnte der TIFP experimentell abgesenkt werden und in Folge dessen kam es zu einer reduzierten mechanischen Dehnung der Tumorzellen. In allen Versuchen war die Abnahme der mechanischen Dehnung von einer verringerten Phosphorylierung der ERK1/2 bzw. reduzierten Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 begleitet.

Der TIFP induziert aber nicht nur mechanische Dehnungsreize, sondern er stellt darüber hinaus eine physikalische Barriere für den effizienten Transport von Therapeutika in den Tumor dar. Der gegenüber dem umliegenden Gewebe erhöhte TIFP behindert den interstitiellen Transport und die Aufnahme von Molekülen aus dem Gefäßsystem in die Tumorzellen. Die Etablierung einer neuen experimentellen Technik zur Senkung des TIFP, durch i.v. Injektion von konzentriertem humanem Serumalbumin, führte zu einer signifikanten Verbesserung der Aufnahme und einer Verlängerung der Verweildauer von

Makromolekülen/Therapeutika innerhalb von Tumoren. Des Weiteren konnten immunhistochemische Färbungen gegen lymphspezifische Marker in Gewebeproben von A431 und A549 Tumoren keinen direkten Zusammenhang zwischen Lympharchitektur und TIFP zeigen. Dies bedeutet, dass in den untersuchten Tumoren die Ausbildung des hohen TIFP eher auf eine erhöhte Rigidität der extrazellulären Matrix bzw. die hohe Permeabilität des tumorversorgenden vaskulären Gefäßsystems zurückzuführen ist. Parallel zu den *in vivo*-Untersuchungen durchgeführte *in vitro*-Versuche konnten Proteine identifizieren, die an der druckinduzierten p38 Signaltransduktionskaskade beteiligt sind. Diese Ergebnisse untermauern die bisherigen *in vitro*-Daten bzgl. der differentiellen Reaktionen von Zellen auf mechanische Druckreize.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der *in vivo*-Versuche die Bedeutung und die klinische Relevanz des biophysikalischen Parameters TIFP hervorgehoben haben. Die Zukunft der Krebstherapie liegt nicht alleine in der Entwicklung neuer hochspezifischer Wirkstoffe, sondern auch in der Lösung des Transports der Wirkstoffe an den Zielort. Die vorgestellten Ergebnisse dieser Promotionsarbeit weisen eine beträchtliche klinische Relevanz auf, denn sie zeigen, dass die experimentelle Absenkung des TIFP zu einer verbesserten Aufnahme von Therapeutika beiträgt. Gleichzeitig wird die Proliferationsrate von Tumorzellen durch die reduzierte mechanische Dehnung signifikant verringert. Dieser Doppeleffekt könnte zu einer effizienteren Krebstherapie führen in Folge derer es zu einer verlängerten Überlebensrate sowie einer Verbesserung der Lebensqualität von Krebspatienten kommen könnte.

6. Literaturverzeichnis

- AHLQVIST, J. (2004) Equation for osmotic pressure of serum protein (fractions). *J Apply Physiol* **96**, 762-764
- ALENGHAT, F.J. und INGBER, D.E. (2002) Mechanotransduction: all signals point to cytoskeleton, matrix and integrins. *Science STKE* **119**, PE 6
- ALI, M.H., MUNGAI, P.T. und SCHUMACKER, P.T. (2006) Stretch-induced phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells: role of mitochondrial oxidants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**, L38-L45
- ALITALO, K. und CARMELIET, P. (2002) Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* **1**, 219-227
- ALLEN, N., NEWTON, R., BERRINGTON DE GONZALEZ, A., GREEN, J., BANKS, E. und KEY, T.J. (2005) The causes of cancer. In: KNOWLES, M. und SELBY, P. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. 4th Edition, Oxford University Press, Oxford, UK
- ARONSON, D., DUFRESNE, S.D. und GOODYEAR, L.J. (1997A) Contractile activity stimulates the c-Jun NH2-terminal kinase pathway in rat skeletal muscle. *J Biol Chem* **272**, 25636-25640
- ARONSON, D., VIOLAN, M.A., DUFRESNE, S.D., ZANGEN, D., FIELDING, R.A. und GOODYEAR, L.J. (1997B) Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle. *J Clin Invest* **99**, 1251-1257
- AUKLAND, K. und REED, R.K. (1993) Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. *Physiol Rev* **73**, 1-78
- BARANOWSKA-KORTYLEWICZ, J., ABE, M., NEARMAN, J. und ENKE, C.A. (2007) Emerging role of platelet-derived growth factor receptor- β inhibition in radioimmunotherapy of experimental pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **13**, 299-306
- BARANOWSKA-KORTYLEWICZ, J., ABE, M., PIETRAS, K., KORTYLEWICZ, Z.P., KURIZAKI, T., NEARMAN, J., PAULSSON, J., MOSLEY, R.L., ENKE, C.A. und ÖSTMAN, A. (2005) Effect of platelet-derived growth factor receptor- β inhibition with STI571 on radioimmunotherapy. *Cancer Res* **65**, 7824-7831
- BAUMANN, M., APPOLD, S., ZIMMER, J., SCHARF, M., BEUTHIEN-BAUMANN, B., DUBBEN, H.-H., ENGHARDT, W., SCHREIBER, A., EICHELER, W. und PETERSEN, C. (2001) Radiobiological hypoxia, oxygen tension, interstitial fluid pressure and relative viable tumour area in two human squamous cell carcinomas in nude mice during fractionated radiotherapy. *Acta Oncol* **40**, 519-528
- BAXTER, L.T. und JAIN, R.K. (1989) Transport of fluid and macromolecules in tumors. I) Role of interstitial pressure and convection. *Microvasc Res* **37**, 77-104
- BELTRAN, P. (2000) Wirkung von Druckreizen auf menschliche Epidermiszellen. Diplomarbeit im FB Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

- BERG, S., GOLSTER, M. und LISANDER, B. (2002) Albumin extravasation and tissue washout of hyaluronan after plasma volume expansion with crystalloid or hypooncotic colloid solutions. *Acta Anaesthesiol Scand* **46**, 166-172
- BERRIDGE, M.V., O'KECH, N., McNEILAGE, L.J., HESLOP, B.F. und MOORE, R. (1979) Rat mutant (NZNU) showing "nude" characteristics. *Transplantation* **27**, 410-413
- BOUCHER, Y., BAXTER, L.T. und JAIN, R.K. (1990) Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors: implications for therapy. *Cancer Res* **50**, 4478-84
- BOUCHER, Y. und JAIN, R.K. (1992) Microvascular pressure is the principal driving force for interstitial hypertension in solid tumors: implications for vascular collapse. *Cancer Res* **52**, 5110-5114
- BOUCHER, Y., KIRKWOOD, J.M., OPACIC, D., DESANTIS, M. und JAIN, R.K. (1991) Interstitial hypertension in superficial metastatic melanomas in humans. *Cancer Res* **50**, 6691-6694
- BOUCHER, Y., LEE, I. und JAIN, R.K. (1995) Lack of general correlation between interstitial fluid pressure and oxygen partial pressure in solid tumors. *Microvasc Res* **50**, 175-182
- BOUCHER, Y., LEUNIG, M. und JAIN, R.K. (1996) Tumor angiogenesis and interstitial hypertension. *Cancer Res* **56**, 4264-4266
- BOUKAMP, P., PETRUSSEVSKA, R.T., BREITKREUTZ, D., HORNUNG, J., MARKHAM, A. und FUSENIG, N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106**, 761-771
- BOULTON, T.G., NYE, S.H., ROBBINS, D.J., IP, N.Y., RADZIEJEWSKA, E., MORGENBESSER, S.D., DePINHO, R.A., PANAYOTATOS, N., COBB, M.H. und YANCOPOULOS, G.D. (1991) ERKs: a family of protein-serin/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**, 663-675
- BOULTON, T.G., YANCOPOULOS, G.D., GREGORY, J.S., SLAUGHTER, C., MOOMAW, C., HSU, J. und COBB, M.H. (1990) An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* **249**, 64-67
- BRANSON, K.R. (2001) Injectable anesthetics In: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (Adams HR, ed.) Iowa State University Press, Ames (USA) 8: 213-267
- BREIER, G., ALBRECHT, U., STERRER, S. und RISAU, W. (1992) Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* **114**, 521-532
- BREITKREUTZ, D., BOUKAMP, P., STARK, H.J., RYLE, C. und FUSENIG, N.E. (1989) Response of established keratinocyte lines to modulators of epidermal differentiation. *Pharmacology and the skin*, Krager, Basel, 3. Auflage

- BREKKEN, C., BRULAND, O.S. und DE LANGE DAVIES, C. (2000A) Interstitial fluid pressure in human osteosarcoma xenografts: significance of implantation site and the response to intratumoral injection of hyaluronidase. *Anticancer Res* **20**, 3503-3512
- BREKKEN, C. und DE LANGE DAVIES, C. (1998) Hyaluronidase reduces the interstitial fluid pressure in solid tumours in a non-linear concentration-dependent manner. *Cancer Lett* **131**, 65-70
- BREKKEN, C., HJELSTUEN, M.H., BRULAND, O.S. und DE LANGE DAVIES, C. (2000B) Hyaluronidase-induced periodic modulation of the interstitial fluid pressure increases selective antibody uptake in human osteosarcoma xenografts. *Anticancer Res* **20**, 3513-3519
- BRØNSTAD, A., REITH, A., BERG, A. und REED, R.-K. (2002) Effect of the cytoskeletal fixation agent phalloidin on transcapillary albumin transport and interstitial fluid pressure in anaphylaxis in the wistar rat. *Microcirculation* **9**, 197-205
- CANMAN, C.E. und KASTAN, M.B. (1996) Signal transduction: Three paths to stress relief. *Nature* **384**, 213-214
- CARMELIET, P. und JAIN, R.K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **14**, 249-257
- CHARY, S.R. und JAIN, R.K. (1989) Direct measurement of interstitial convection and diffusion of albumin in normal and neoplastic tissues by fluorescence photobleaching. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5385-5389
- CHEN, K.D., LI, Y.S., KIM, M., LI, S., YUAN, S., CHIEN, S. und SHYY, J.Y. (1999) Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc. *J Biol Chem* **274**, 18393-18400
- CHEN, Q., LIN, T.H., DER, C.J. und JULIANO, R.L. (1996) Integrin-mediated activation of MEK and mitogen-activated protein kinase is independent of Ras. *J Biol Chem* **271**, 18122-18127
- CHEN, C.S., MRKSICH, M., HUANG, S., WHITESIDES, G.M. und INGBER, D.E. (1997) Geometric control of cell life and death. *Science* **276**, 1425-1428
- COBB, M.H. und GOLDSMITH, E.J. (1995) How MAP kinases are regulated *J Biol Chem* **270**, 14843-14846
- COHEN, M.H., GOOTENBERG, J., KEEGAN, P. und PAZDUR, R. (2007) FDA drug approval summary: bevacizumab plus FOLFOX4 as second-line treatment of colorectal cancer. *Oncologist* **12**, 356-361
- CUENDA, A., ROUSE, J., DOZA, Y.N., MEIER, R., COHEN, P., GALLAGHER, P.F., YOUNG, P.R. und LEE, J.C. (1995) SB203580 is a specific inhibitor of MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* **364**, 229-233
- CURNIS, F., SACCHI, A. und CORTI, A. (2002) Improving chemotherapeutic drug penetration in tumors by vascular targeting and barrier alteration. *J Clin Invest* **110**, 475-482

- CURTI, B.D., URBA, W.J., ALVORD, W.J., JANIK, J.E., SMITH, J.W., MADARA, K. und LONGO, D.L. (1993) Interstitial pressure of subcutaneous nodules in melanoma and lymphoma patients: changes during treatment. *Cancer Res* **53**, 2204-2207
- DANS, M., GAGNOUX-PALACIOS, L., BLAIKIE, P., KLEIN, S., MARIOTTI, A. und GIANCOTTI, F.G. (2001) Tyrosine phosphorylation of the beta 4 integrin cytoplasmic domain mediates Shc signaling to extracellular signal-regulated kinase and antagonizes formation of hemidesmosomes. *J Biol Chem* **276**, 1494-1502
- DIPERSIO, L.P. (1981) Regional growth differences of human tumour xenografts in nude mice. *Lab Anim* **15**, 179-180
- DI RESTA, G.R., NATHAN, S.M., MANOSO, M.W., CASAS-GANEM, J., WYATT, C., KUBO, T., BOLAND, P.J., ATHANASIAN, E.A., MIODOWNIK, J., GORLICK, R. und HEALEY, J.H. (2005) Cell proliferation of cultured human cancer cells are affected by the elevated tumor pressures that exists in vivo. *Ann Biomed Eng* **33**, 1270-1280
- DVORAK, H.F., BROWN, L.F., DETMAR, M. und DVORAK, A.M. (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* **146**, 1029-1039
- EIKESDAL, H.P., LANDUYT, W. und DAHL, O. (2002) The influence of combretastatin A-4 and vinblastine on interstitial fluid pressure in BT4An rat gliomas. *Cancer Lett* **178**, 209-217
- EFIMOVA, T. und ECKERT, R.L. (1999) Regulation of human involucrin promoter activity by novel protein kinase C isoforms. *J Biol Chem* **275**, 1601-1607
- EFIMOVA, T., LA CELLE, P., WELTER, J.F. und ECKERT, R.L. (1998) Regulation of human involucrin promoter activity by a protein kinase C, Ras, MEKK1, MEK3, p38/RK, AP1 signal transduction pathway. *J Biol Chem* **273**, 24387-24395
- EMERICH, D.F., DEAN, R.L., SNODGRASS, P., LAFRENIERE, D., AGOSTINO, M., WIENS, T., XIONG, H., HASLER, B., MARSH, J., PINK, M., KIM, B.S., PERDOMO, B. und BARTUS, R.T. (2001) Bradykinin modulation of tumor vasculature: II. activation of nitric oxide and phospholipase A2/prostaglandin signaling pathways synergistically modifies vascular physiology and morphology to enhance delivery of chemotherapeutic agents to tumors. *J Pharmacol Exp Ther* **296**, 632-641
- FADNES, H.O., REED, R.-K. und AUKLAND, K. (1977) Interstitial fluid pressure in rats measured with a modified wick technique. *Microvasc Res* **14**, 27-36
- FARALDO, M.M., DEUGNIER, M.A., THIERY, J.P. und GLUKHOVA, M.A. (2001) Growth defects induced by perturbation of beta1-integrin function in the mammary gland epithelium result from a lack of MAPK activation via the Shc and Akt pathways. *EMBO Rep* **2**, 431-437
- FERRARA, N. (2002) VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* **2**, 795-803

- FERRARA, N., GERBER, H.-P. und LECOUTER, J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nature Med* **9**, 669-676
- FERRARA, N. und HENZEL, W.J. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **161**, 851-858
- FERRETTI, S., ALLEGRINI, P.R., O'REILLY, T., SCHNELL, C., STUMM, M., WARTMANN, M., WOOD, J. und McSHEEHY, P.M.J. (2005) Patupilone induced vascular disruption in orthotopic rodent tumor models detected by magnetic resonance imaging and interstitial fluid pressure. *Clin Cancer Res* **11**, 7773-7784
- FESTING, M.F.W., MAY, D., CONNORS, T.A., LOVELL, D. und SPARROW, S. (1978) An athymic nude mutation in the rat. *Nature* **274**, 365-366
- FRANKS, L.M. und KNOWLES, M.A. (2005) What is cancer? In: Knowles, M. und Selby, P. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. Oxford University Press, Oxford, UK, 1-23
- FREDE, S., STOCKMANN, C., FREITAG, P. und FANDREY, J. (2006) Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J* **396**, 517-527
- FRITSCH, P. (1998) Dermatologie und Venerologie. Lehrbuch und Atlas. Springer Verlag, Berlin
- GABBIANI, G. (2003) The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* **200**, 500-503
- GARMYN, M., MAMMONE, T., PUPE, A., GAN, D., DECLERQ, L. und MAES, D. (2001) Human keratinocytes respond to osmotic stress by p38 MAP kinase regulated induction of HSP70 and HSP27. *J Invest Dermatol* **117**, 1290-1295
- GERDES, J., SCHWAB, U., LEMKE, H. und STEIN, H. (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* **31**, 13-20
- GERDES, J., LEMKE, H., BAISCH, H., WACKER, H.-H., SCHWAB, U. und STEIN, H. (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* **133**, 1710-1715
- GIANCOTTI, F.G. (1999) Complexity and specificity of integrin signalling. *Nature Cell Biol* **2**, E13-E14
- GIANTONIO, B.J., CATALANO, P.J., MEROPOL, N.J., O'DWYER, P.J., MITCHELL, E.P., ALBERTS, S.R., SCHWARTZ, M.A. und BENSON III, A.B. (2007) Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* **25**, 1539-1544

- GIARD, D.J., AARONSON, S.A., TODARO, G.J., ARNSTEIN, P., Kersey, J.H., DOSIK, H. und PARKS W.P. (1973) In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**(5), 1417-1423
- GJERDE, E.-A.B. (2001) Modulation of interstitial fluid pressure in rat tracheal tissue by neuropeptides. Dissertation im Fachbereich Medizin der Universität Bergen, Bergen, Norwegen
- GLOGAUER, M., ARORA, P., CHOU, D., JANMEY, P.A., DOWNEY, G.P. und McCULLOCH, C.A. (1998) The role of actin-binding protein 280 in integrin-dependent mechanoprotection. *J Biol Chem* **273**, 1689-1698
- GLUZMAN, Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-182
- GOERMAR, F.E., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., HOLZMANN, H. (1990) A new model of epidermal differentiation: Induction by mechanical stimulation. *Arch Dermatol Res* **282**, 22-32
- GOERMAR, F.E., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., HOLZMANN, H. (1993) Mechanical stimulation enhances human keratinocyte differentiation in culture: induction of cytokeratin 9 synthesis. In: BERND, A., BEREITER-HAHN, J., HEVERT, F. und HOLZMANN, H. Cell and tissue culture models in dermatological research. Springer Verlag, Heidelberg 87-97
- GOODSELL, D.S. (2003) The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Stem Cells* **21**, 118-119
- GRAHAM, F.L., SMILEY, J., RUSSELL, W.C. und NAIRN, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74
- GREINER, T.D. (2004) Entwicklung eines Tumormodells zur in vivo Untersuchung neuartiger Substanzen (Naturstoffe) auf antineoplastische Eigenschaften unter Einsparung von Versuchstieren. Inaugural-Dissertation im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität, Gießen
- GRIFFON-ETIENNE, G., BOUCHER, Y., JAIN, R.K. und SUIT, H.D. (1997) Effects of needle insertion in tumors on interstitial fluid pressure. *Microvasc Res* **54**, 174-177
- GSCHWENDT, M., MULLER, H.J., KIELBASSA, K., ZANG, R., KITTSTEIN, W., RINCKE, G. und MARKS, F. (1994) Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* **199**, 93-98
- GUAY, J., LAMBERT, H., GINGRAS-BRETON, G., LAVOIE, J.N., HUOT, J. und LANDRY, J (1997) Regulation of actin filament dynamics by p38 MAP kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci* **110**, 357-368
- GUTMANN, R., LEUNIG, F., FEYH, J., GOETZ, A.E., MESSMER, K., KASTENBAUER, E. und JAIN, R.K. (1992) Interstitial hypertension in head and neck tumors in patients: correlation with tumor size. *Cancer Res* **52**(7), 1993-1995

- HALL, A. (2005) Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* **33**, 891-895
- HAN, J., LEE, J.-D., BIBBS, L. und ULEVITCH, R.J. (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**, 808-811
- HANDRA-LUCA, A., BILAL, H., BERTRAND, J.-C. und FOURET, P. (2003) Extra-cellular signal-regulated ERK-1/ERK-2 pathway activation in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *Am J Pathol* **163**, 957-967
- HANKE, J.H., GARDNER, J.P., DOW, R.L., CHANGELIAN, P.S., BRISETTE, W.H., WERINGER, E.J., POLLOCK, B.H. und CONNELLY, P.A. (1996) Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* **271**, 695-701
- HANNA, N., DAVIS, T.W. und FIDLER, I.J. (1982) Environmental and genetic factors determine the level of NK activity of nude mice and affect their suitability as models for experimental metastasis. *Int J Cancer* **30**, 371-376
- HASHIZUME, H., BALUK, P., MORIKAWA, S., McLEAN, J.W., THURSTON, G., ROBERGE, S., JAIN, R.K. und McDONALD, D.M. (2000) Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* **156**, 1363-1380
- HASSID, Y., FURMAN-HARAN, E., MARGALIT, R., EILAM, R. und DEGANI, H. (2006) Noninvasive magnetic resonance imaging of transport and interstitial fluid pressure in ectopic human lung tumors. *Cancer Res* **66**, 4156-4166
- HELDIN, C.-H., RUBIN, K., PIETRAS, K. und ÖSTMAN, A. (2004) High interstitial fluid pressure – an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**, 806-813
- HIPPER, A. und ISENBERG, G. (2000) Cyclic mechanical strain decreases the DNA synthesis of vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch* **440**, 19-27
- HIRAKAWA, S., KODAMA, S., KUNSTFELD, R., KAJIYA, K., BROWN, L.F. und DETMAR, M. (2005) VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med* **201**, 1089-1099
- HOBBS, S.K., MONSKY, W.L., YUAN, F., ROBERTS, W.G., GRIFFITH, L., TORCHILIN, V.P. und JAIN, R.K. (1998) Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 4607-4612
- HOFMANN, F., BUSCH C., PREPENS, U., JUST, I. und AKTORIES, K. (1997) Localization of the glucosyltransferase activity of *Clostridium difficile* toxin B to the N-terminal part of the holotoxin. *J Biol Chem* **272**, 11074-11078
- HOFMANN, M. (2002) Perzeption und Transduktion mechanischer Reize in Kulturen menschlicher Keratinozyten. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

- HOFMANN, M., GUSCHEL, M., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R., TANDI, C., WIIG, H. und KIPPENBERGER, S. (2006) Lowering of tumor interstitial fluid pressure reduces tumor cell proliferation in a xenograft tumor model. *Neoplasia* **8**(2), 89-95
- HOFMANN, M., SCHULTZ, M., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R. und KIPPENBERGER, S. (2007) Long-term lowering of tumor interstitial fluid pressure reduces Ki-67 expression. *J Biomech* **40**, 2324-2329
- HOFMANN, M., ŽAPER, J., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R. und KIPPENBERGER, S. (2004) Mechanical pressure-induced phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase in epithelial cells via Src and protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* **316**, 673-679
- HORI, K. und SAITO, S. (2003) Microvascular mechanisms by which the combretastatin A-4 derivative AC7700 (AVE8062) induces tumour blood flow stasis. *Br J Cancer* **89**, 1334-1344
- HUANG, S. und INGBER, D.E. (2005) Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. *Cancer Cell* **8**, 175/176
- HUBER, P.E., BISCHOF, M., JENNE, J., HEILAND, S., PESCHKE, P., SAFFRICH, R., GRÖNE, H.-J., DEBUS, J., LIPSON, K.E. und ABDOLLAHI, A. (2005) Trimodal cancer treatment: beneficial effects of combined antiangiogenesis, radiation and chemotherapy. *Cancer Res* **65**, 3643-3655
- HURWITZ, H., FEHRENBACHER, L., NOVOTNY, W., CARTWRIGHT, T., HAINSWORTH, J., HEIM, W., BERLIN, J., BARON, A., GRIFFING, S., HOLMGREN, E., FERRARA, N., FYFE, G., ROGERS, B., ROSS, R. und KABBINAVAR, F. (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **350**, 2335-2342
- INAGAKI, K., IWANAGA, Y., SARAI, N., ONOZAWA, Y., TAKENAKA, H., MOCHLY-ROSEN, D. und KIHARA, Y. (2002) Tissue angiotensin II during progression or ventricular hypertrophy to heart failure in hypertensive rats; differential effects on PKC epsilon and PKC beta. *J Mol Cell Cardiol* **34**, 1377-85
- INAI, T., MANCUSO, M., HAHIZUME, H., BAFFERT, F., HASKELL, A., BALUK, P., HU-LOWE, D.D., SHALINSKY, D.R., THURSTON, G., YANCOPOULOS, G.D. und MC DONALD, D.M. (2004) Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am J Pathol* **165**, 35-52
- INGBER, D.E. (1991) Integrins as mechanochemical transducer. *Curr Opin Cell Biol* **3**, 841-848
- INGRAM, A.J., JAMES, L., LY, H., THAI, K., CAI, L. und SCHOLEY, J.W. (2000) Nitric oxide modulates stretch activation of mitogen-activated protein kinases in mesangial cells. *Kidney Int* **58**, 1067-1077
- INTAGLIETTA, M. und ENDRICH, B.A. (1979) Experimental and quantitative analysis of microcirculatory water exchange. *Acta Physiol Scand Suppl* **463**, 59-66

- IVERSEN, V.V. (2005) Continuous measurements of capillary exchange using microdialysis. Dissertation im Fachbereich Medizin der Universität Bergen, Bergen, Norwegen
- JACOBSON, A., SALNIKOV, A., LAMMERTS, E., ROSWALL, P., SUNDBERG, C., HELDIN, P., RUBIN, K und HELDIN, N.-E. (2003) Hyaluronan content in experimental carcinoma is not correlated to interstitial fluid pressure. *Biochem Biophys Res Commun* **305**, 1017-1023
- JAIN, R.K. (1987A) Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer Metastasis Rev* **6**, 559-593
- JAIN, R.K. (1987B) Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res* **47**, 3039-3051
- JAIN, R.K. (1989) Delivery of novel therapeutic agents in tumors: physiological barriers and strategies. *J Natl Cancer Inst* **81**, 570-576
- JAIN, R.K. (1998) The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. *Nature Med* **4**, 655-657
- JAIN, R.K. (2001) Delivery of molecular medicine to solid tumors: lessons from in vivo imaging of gene expression and function. *J Control Release* **74**, 7-25
- JAIN, R.K. (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Med* **9**, 685-693
- JELTSCH, M., KAIPAINEN, A., JOUKOV, V., MENG, X., LAKSO, M., RAUVALA, H., SWATZ, M., FUKUMURA, D., JAIN, R.K. und ALITALO, K. (1997) Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* **276**, 1423-1425
- JIANG, Y., CHEN, C., LI, Z., GUO, W., GEGNER, J.A., LIN, S. und HAN, J. (1996) Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38 β) *J Biol Chem* **271**, 17920-17926
- JOUNAIDI, Y. und WAXMAN, D.J. (2004) Use of replication-conditional adenovirus as a helper system to enhance delivery of p450 prodrug-activation genes for cancer therapy. *Cancer Res* **64**, 292-303
- JUSSILA, L. und ALITALO, K. (2002) Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* **82**, 673-700
- KAJIYA, K., HIRAKAWA, S. und DETMAR, M. (2006) Vascular endothelial growth factor-A mediates ultraviolet B-induced impairment of lymphatic vessel function. *Am J Pathol* **169**, 1496-1503
- KANAZAWA, J., OHTA, S., SHITARA, K., FUJITA, F., FUJITA, M., HANAI, N., AKINAGA, S. und OKABE, M. (2000) Therapeutic potential of chimeric anti-(ganglioside GD3) antibody KM871: antitumor activity in xenograft mode of melanoma and effector function analysis. *Cancer Immunol Immunother* **49**, 253-258
- KARKKAINEN, M.J., MAKINEN, T. und ALITALO, K. (2002) Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nature Cell Biol* **4**, E2-E5

- KAUHANEN, S., VON BOGUSLAWSKY, K. und MICELSSON, J.-E. (1998) Satellite cell proliferation in rabbit hindlimb muscle following immobilization and remobilization: an immunohistochemical study using MIB1 antibody. *Acta Neuropathol* **95**, 165-170
- KAWABE, J., OKUMURA, S., LEE, M.C., SADOSHIMA, J. und ISHIKAWA, Y. (2004) Translocation of caveolin regulates stretch-induced ERK activity in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**, H1845-1852
- KERANEN, L.M., DUTIL, E.M. und NEWTON, A.C. (1995) Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol* **5**, 1394-1403
- KIPPENBERGER, S., BERND, A., LOITSCH, S.M., GUSCHEL, M., MÜLLER, J., BEREITER-HAHN, J. und KAUFMANN, R. (2000A) Signaling of mechanical stretch in human keratinocytes via MAP kinases. *J Invest Dermatol* **114**, 408-412
- KIPPENBERGER, S., BERND, A., LOITSCH, S.M., MÜLLER, J., GUSCHEL, M. und KAUFMANN, R. (1999) Cyclic stretch up-regulates proliferation and heat shock protein 90 expression in human melanocytes. *Pigment Cell Res* **12**, 246-251
- KIPPENBERGER, S., LOITSCH, S.M., GUSCHEL, M., MÜLLER, J., KAUFMANN, R. und BERND, A. (2005A) Hypotonic stress induces E-cadherin expression in cultured human keratinocytes. *FEBS lett* **579**, 207-214
- KIPPENBERGER, S., LOITSCH, S.M., GUSCHEL, M., MÜLLER, J., KNIES, Y., KAUFMANN, R. und BERND, A. (2005B) Mechanical stretch stimulates protein kinase B/Akt phosphorylation in epidermal cells via angiotensin II type 1 receptor and epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **280**, 3060-7
- KIPPENBERGER, S., LOITSCH, S.M., MÜLLER, J., GUSCHEL, M., RAMIREZ-BOSCA, A., KAUFMANN, R. und BERND, A. (2000B) Melanocytes respond to mechanical stretch by activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK). *Pigment Cell Res* **13**, 278-280
- KNIES, Y., BERND, A., KAUFMANN, R., BEREITER-HAHN, J. und KIPPENBERGER, S. (2006) Mechanical stretch induces clustering of β_1 -integrins and facilitates adhesion. *Exp Dermatol* **15**, 347-355
- KNOWLES, M. und SELBY, P. (2005) Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. 4th Edition, Oxford University Press, Oxford, UK
- KOBAYASHI, E., NAKANO, H., MORIMOTO, M. und TAMAOKI, T. (1989) Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* **159**, 548-553
- KRISTENSEN, C.A., NOZUE, M., BOUCHER, Y. und JAIN, R.K. (1996) Reduction of interstitial fluid pressure after TNF- α treatment of three human melanoma xenografts. *Br J Cancer* **74**, 533-536
- KRISTJANSEN, P.E.G., BOUCHER, Y. und JAIN, R.K. (1993) Dexamethasone reduces the interstitial fluid pressure in a human colon adenocarcinoma xenograft. *Cancer Res* **53**, 4764-4766

- KYRIAKIS, J.M., BANERJEE, P., NIKOLAKAKI, E., DAI, T., RUBIE, E.A., AHMAD, M.F., AVRUCH, J. und WOODGETT, J.R. (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**, 156-160
- KYRIAZIS, A.A. und KYRIAZIS, A.P. (1980) Preferential sites of growth of human tumors in nude mice following subcutaneous transplantation. *Cancer Res* **40**, 4509-4511
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- LAMMERTS, E., ROSWALL, P., SUNDBERG, C., GOTWALS, P.J., KOTELIANSKY, V.E., REED, R.-K., HELDIN, N.-E. und RUBIN, K. (2002) Interference with TGF-beta1 and -beta3 in tumor stroma lowers tumor interstitial fluid pressure independently of growth in experimental carcinoma. *Int J Cancer* **102**, 453-462
- LANDRY, J., LAMBERT, H., ZHOU, M., LAVOIE, J.N., HICKEY, E., WEBER, L.A. und ANDERSON, C.W. (1992) Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *J Biol Chem* **267**, 794-803
- LEE, I., BOUCHER, Y. und JAIN, R.K. (1992) Nicotinamide can lower tumor interstitial fluid pressure: mechanistic and therapeutic implications. *Cancer Res* **52**, 3237-3240
- LEE, C.G., HEIJN, M., DI TOMASO, E., GRIFFON-ETIENNE, C., ANKUKIEWICZ, M., KOIKE, C., PARK, K.R. FERRARA, N., JAIN, R.K., SUIT, H.D. und BOUCHER, Y. (2000) Anti-vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res* **60**, 5565-5570
- LESS, J.R., POSNER, M.C., BOUCHER, Y., BOROCHOVITZ, D., WOLMARK, N. und JAIN, R.K. (1992) Interstitial hypertension in human breast and colorectal tumours. *Cancer Res* **52**, 6371-6374
- LEU, A.J., BERK, D.A., LYMBOUSSAKI, A., ALITALO, K. und JAIN, R.K. (2000) Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res* **60**, 4324-4327
- LEUNIG, M., YUAN, F., MENGER, M.D., BOUCHER, Y., GOETZ, A.E., MESSMER, K. und JAIN, R.K. (1992) Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice. *Cancer Res* **52**, 6553-6560
- LI, Y.S., HAGA, J.H. und CHIEN, S. (2005) Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J Biomech* **38**, 1949-1971
- LI, S., PIOTROWICZ, R.S., LEVIN, E.G., SHYY, J.Y. und CHIEN, S. (1996) Fluid shear stress induces the phosphorylation of small heat shock proteins in vascular endothelial cells. *Am J Physiol* **271**, 994-1000
- LI, C. und Xu, Q. (2000) Mechanical-stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal* **12**, 435-445

- LIERSCH, R., NAY, F., LU, L. und DETMAR, M. (2006) Induction of lymphatic endothelial cell differentiation in embryoid bodies. *Blood* **107**, 1214-1216
- LIN, T.H., APLIN, A.E., SHEN, Y., CHEN, Q., SCHALLER, M., ROMER, L., AUKHIL, I. und JULIANO, R.L. (1997) Integrin-mediated activation of MAP kinase is independent of FAK: evidence for dual integrin signaling pathways in fibroblasts. *J Cell Biol* **136**, 1385-1395
- MA, Y.-C. und HUANG, X.-Y. (2002) Novel regulation and function of Src tyrosine kinase. *Cell Mol Life Sci* **59**, 456-462
- MACKAY, D.J.G. und HALL, A. (1998) Rho GTPases. *J Biol Chem* **273**, 20685-20688
- MACKENNA, D.A., DOLFI, F., VUORI, K. und RUOSLAHTI, E. (1998) Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrin-dependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts. *J Clin Invest* **101**, 301-310
- MALAKOFF, D. (2000) The rise of the mouse. Biomedicine's model mammal. *Science* **288**, 248-253
- MANIOTIS, A.J., CHEN, C.S. und INGBER, D.E. (1997) Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 849-854
- MAY, D., FESTING, M.F.W., FORD, W.L. und SMITH, M.E. (1977) More on the nude rat. *Rat News Lett* **2**, 14-16
- McMULLEN, M., KELLER, R., SUSSMAN, M. und PUMIGLIA, K. (2004) Vascular endothelial growth factor-mediated activation of p38 is dependent upon Src and RAFTK/Pyk2. *Oncogene* **23**, 1275-1282
- MEHVAR, R., REYNOLDS, J.M. und SHEPARD, T.L. (1991) Disposition of fluorescein-labelled dextran (150 kDa) in isolated perfused livers from control and diabetic rats. *Life Sci* **49**, 1699-1706
- MIRANTI, C.K. und BRUGGE, J.S. (2002) Sensing the environment: a historical perspective on the integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* **4**, 83-90
- MOMBERGER, T.S., LEVICK, J.R. und MASON, R.M. (2006) Mechanosensitive synoviocytes: a Ca²⁺-PKCalpha-MAP kinase pathway contributes to stretch-induced hyaluronan synthesis in vitro. *Matrix Biol* **25**, 306-316
- MORO, L., VENTURINO, M., BOZZO, C., SILENGO, L., ALTRUDA, F., BEGUINOT, L., TARONE, G. und DEFILIPPI, P. (1998) Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J* **17**, 6622-6632
- NAGAO, M., YAMAUCHI, J., KAZIRO, Y. und ITOH, H. (1998) Involvement of protein kinase C and Src family tyrosine kinase in G $\alpha_{q/11}$ -induced activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **273**, 22892-22898

- NATHAN, S.M., DI RESTA, G.R., CASAS-GANEM, J.E., HOANG, B.H., SOWERS, R., YANG, R., HUVOS, A.G., GORLICK, R. und HEALEY, J.H. (2005) Elevated physiologic tumor pressure promotes proliferation and chemosensitivity in human osteosarcoma. *Clin Cancer Res* **11**, 2389-2397
- NATHANSON, S.D. und NELSON, L. (1994) Interstitial fluid pressure in breast cancer, benign breast conditions, and breast parenchyma. *Ann Surg Oncol* **1**(4), 333-338
- NEDREBØ, T. (2004) The effect of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β on interstitial fluid pressure and microvascular exchange in acute inflammation. Dissertation im Fachbereich Medizin der Universität Bergen, Bergen, Norwegen
- NÈGRE-AMINOU, P., VAN LEEUWEN, R.E.W., VAN THIEL, G.C.F., VAN DEN IJSSEL, P., DE JONG, W.W., QUINLAN, R.A. und COHEN, L.A. (2002) Differential effect of simvastatin on activation of Rac₁ vs. activation of the heat shock protein 27-mediated pathway upon oxidative stress in human smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* **64**, 1483-1491
- NEIDLINGER-WILKE, C., WILKE, H.J. und CLAES, L. (1994) Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application. *J Orthop Res* **12**, 70-78
- NEWBY, A.C. und ZALTSMAN, A.B. (2000) Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol* **190**, 300-309
- NISHIZUKA, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**, 693-698
- OBARA, K., KOIDE, M. und NAKAYAMA, K. (2002) 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid potentiates stretch-induced contraction of canine basilar artery via PKC α -mediated inhibition of K_{Ca} channel. *Br J Pharmacol* **137**, 1362-1370
- ONO, K. und HAN, J. (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* **12**, 1-13
- OZERDEM, U. und HARGENS, A.R. (2005) A simple method for measuring interstitial fluid pressure in cancer tissues. *Microv Res* **70**, 116-120
- PADERA, T.P., KADAMBI, A., DI TOMASO, E., CARREIRA, C.M., BROWN, E.B., BOUCHER, Y., CHOI, N.C., MATHISEN, D., WAIN, J., MARK, E.J., MUNN, L.L. und JAIN, R.K. (2002) Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* **296**, 1883-1886
- PADERA, T.P., STOLL, B.R., TOOREDMAN, J.B., CAPEN, D., DI TOMASO, E. und JAIN, R.K. (2004) Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature* **427**, 695
- PAGÈS, G. und POUYSSÉGUR, J. (2005) Transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene – a concert of activating factors. *Cardiovasc Res* **65**, 564-573

- PAN, J., SINGH, U.S., TAKAHASHI, T., OKA, Y., PALM-LEIS, A., HERBELIN, B.S. und BAKER, K.M. (2005) PKC mediates cyclic stretch-induced cardiac hypertrophy through Rho family GTPases and mitogen-activated protein kinases in cardiomyocytes. *J Cell Physiol* **202**, 536-553
- PANTELOURIS, E.M. (1968) Absence of the thymus in a mouse mutant. *Nature* **217**, 370
- PEEBLES, P.T., STRAND, M. und AUGUST, J.T. (1978) Further evidence for deletion of envelope glycoprotein (gp69/71) sequences in formation of Moloney-murine sarcoma virus. *J Gen Virol* **40**, 503-510
- PERALDI, P., SCIMECA, J.C., FILLOUX, C. und VAN OBBERGHEN, E. (1993) Regulation of extracellular signal-regulated protein kinase-1 (ERK-1; pp44/mitogen-activated protein kinase) by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells: implication of ERK1 inhibitory activities. *Endocrinology* **132**, 2578-2585
- PIETRAS, K. (2004) Increasing tumor uptake of anticancer drugs with imatinib. *Semin Oncol* **31**, 18-23
- PIETRAS, K., ÖSTMAN, A., SJÖQUIST, M., BUCHDUNGER, E., REED, R.-K., HELDIN, C.-H. und RUBIN, K. (2001) Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumors. *Cancer Res* **61**, 2929-2934
- PIETRAS, K., RUBIN, K., SJÖBLOM, T., BUCHDUNGER, E., SJÖQUIST, M., HELDIN, C.-H. und ÖSTMAN, A. (2002) Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy. *Cancer Res* **62**, 5476-5484
- PIETRAS, K., STUMM, M., HUBERT, M., BUCHDUNGER, E., RUBIN, K., HELDIN, C.-H., MC SHEEHY, P., WARTMANN, M. und ÖSTMAN, A. (2003) STI571 enhances the therapeutic index of epothilone B by a tumor-selective increase of drug uptake. *Clin Cancer Res* **9**, 3779-3787
- PLATE, K.-H., BREIER, G., WEICH, H.A. und RISAU, W. (1992) Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* **359**, 845-848
- PLUMB, D.C. (1999) Veterinary Drug Handbook. PharmaVet Publishing, White Bear Lake (USA); 853 ff
- POVLSEN, C.O. und RYGAARD, J. (1971) Heterotransplantation of human adenoma-carcinoma of the colon and rectum to the mouse of the mutant nude. A study of nine consecutive transplantations. *Acta Pathol Microbiol Scand* **79**, 159-169
- PROSPERI, E. (1997) Multiple roles of the proliferating cell nuclear antigen: DNA replication, repair and cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* **3**, 193-210
- QATSHA, K.A., RUDOLPH, C., MARME, D., SCHACHTELE, C. und MAY, W.S. (1993) Gö 6976, a selective inhibitor of protein kinase C, is a potent antagonist of human immunodeficiency virus 1 induction from latent/low-level-producing reservoir cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 4674-8

- RAINGEAUD, J., WHITMARSH, A.J., BARRETT, B., DERIJARD, B. und DAVIS, R.J. (1996) MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* **16**, 1247-1255
- RASSNER, G. (2000) Dermatologie. Lehrbuch und Atlas (6. Auflage), Urban & Fischer Verlag, München
- REDONDO, P., LLORET, P., ANDREU, E.J. und INOGES, S. (2004) Imatinib mesylate in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* **123**, 1208-1209
- RIPPE, B. und HARALDSON, B. (1994) Transport of macromolecules across microvascular walls: the two-pore theory. *Physiol Rev* **74**, 163-219
- ROBERTS, J.S. und BRATTON, S.L. (1998) Colloid volume expanders: problems, pitfalls and possibilities. *Drugs* **55**, 621-630
- ROBERTS, W.G. und PALADE, G.E. (1997) Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res* **57**, 765-772
- RUBIN, K., SJÖQUIST, M., GUSTAVSSON, A.M., ISAKSSON, B., SALVESSEN, G.S. und REED, R.K. (2000) Lowering of tumoral interstitial fluid pressure by prostaglandin E(1) is paralleled by an increased uptake of (51)Cr-EDTA. *Int J Cancer* **86**, 636-643
- SALNIKOV, A.V., IVERSEN, V.V., KOISTI, M., SUNDBERG, C., JOHANSSON, L., STUHR, L.B., SJÖQUIST, M., AHLSTRÖM, H., REED, R.K. und RUBIN, K. (2003) Lowering of tumor interstitial fluid pressure specifically augments efficacy of chemotherapy. *Faseb J* **17**, 1756-1758
- SANCHEZ-ESTEBAN, J. WANG, Y., FILARDO, E.J., RUBIN, L.P. und INGBER, D.E. (2006) Integrin β_1 , α_1 , and α_6 contribute to mechanical strain-induced differentiation of fetal lung type II epithelial cells via distinct mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**, L343-L350
- SCHAEFER, H.J. und WEBER, M.J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**, 2435-2444
- SCHOLZEN, T. und GERDES, J. (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* **182**, 311-322
- SCHUURMAN, H.-J., HOUGEN, H.P. und VAN LOVEREN, H. (1992) The *rmu* (Rowett Nude) and *rmu^N* (*nznu*, New Zealand Nude) Rat: An Update. *ILAR J* **V34**, 1/2
- SEKO, Y., TAKAHASHI, N., TOBE, K., KADOWAKI, T. und YAZAKI, Y. (1999) Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase (p125(FAK)) in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **259**, 8-14
- SHARKEY, F.E. und FOGH, J. (1979) Metastasis of human tumors in athymic nude mice. *Int J Cancer* **24**, 733-738

- SHAW, G., MORSE, S., ARARAT, M. und GRAHAM, F.L. (2002) Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *Faseb J* **16**, 869-871
- SHWEIKI, D., ITIN, A., SOFFER, D. und KESHET, E. (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**, 843-845
- SILVER, F.H., SIPERKO, L.M. und SEEHRA, G.P. (2003) Mechanobiology of force transduction in dermal tissue. *Skin Res Technol* **9**, 3-23
- SKLIARENKO, J.V., LUNT, S.J., GORDON, M.L., VITKIN, A., MILOSEVIC, M. und HILL, R.P. (2006) Effects of the vascular disrupting agent ZD6126 on interstitial fluid pressure and cell survival in tumors. *Cancer Res* **66**, 2074-2080
- SPRENT, J.F. (1971) Speciation and development in the genus *Lagochilascaris*. *Parasitology* **62**, 71-112
- STABER, P.B., LINKESCH, W., ZAUNER, D., BEHAM-SCHMID, C., GUELLY, C., SCHAUER, S., SILL, H. und HOEFLER, G. (2004) Common alterations in gene expression and increased proliferation in recurrent acute myeloid leukemia. *Oncogene* **23**, 894-904
- STARBORG, M., GELL, K., BRUNDELL, E. und HÖÖG, C. (1996) The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci* **109**, 143-153
- STARLING, E.H. (1896) On absorption of fluids from connective tissue spaces. *J Physiol* **19**, 312-26
- STOHRER, M., BOUCHER, Y., STANGASSINGER, M. und JAIN, R.K. (2000) Oncotic pressure in solid tumors is elevated. *Cancer Res* **60**, 4251-4255
- STULA, M., ORZECZOWSKI, H.D., GSCHWEND, S., VETTER, R., VON HARSDORF, R., DIETZ, R. und PAUL, M. (2000) Influence of sustained mechanical stress on Egr-1 mRNA expression in cultured human endothelial cells. *Mol Cell Biochem* **210**, 101-108
- SWABB, E.A., WEI, J. und GULLINO, P.M. (1974) Diffusion and convection in normal and neoplastic tissue. *Cancer Res* **34**, 2814-2822
- SWINDLE, C.S., TRAN, K.T., JOHNSON, T.D., BANERJEE, P., MAYES, A.M., GRIFFITH, L. und WELLS, A. (2001) Epidermal growth factor (EGF)-like repeats of human tenascin-C as ligands for EGF receptor. *J Cell Biol* **154**, 459-468
- TAKEI, T., RIVAS-GOTZ, C., DELLING, C.A., KOO, T.J., MILLS, I., MCCARTHY, T.L., CENTRELLA, M. und SUMPIO, B.E. (1997) Effect of strain on human keratinocytes in vitro. *J Cell Physiol* **173**, 64-72
- TEI, K., KAWAKAMI-KIMURA, N., TAGUCHI, O., KUMAMOTO, K., HIGASHIYAMA, S., TANIGUCHI, N., TODA, K., KAWATA, R., HISA, Y. und KANNAGI, R. (2002) Roles of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis induced by cotransplantation of cancer and endothelial cells to Nude rats. *Cancer Res* **62**, 6289-6296
- TONG, R.T., BOUCHER, Y.,

- KOZIN, S.V., WINKLER, F., HICKLIN, D.J. und JAIN, R.K. (2004) Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res* **64**, 3731-3736
- TUFTO, I. und ROFSTAD, E.K. (1995) Interstitial fluid pressure in human melanoma xenografts: relationship to fractional tumor water content, tumor size, and tumor volume-doubling time. *Acta Oncol* **34**, 361-365
- TUFTO, I. und ROFSTAD, E.K. (1999) Interstitial fluid pressure and capillary diameter distribution in human melanoma xenografts. *Microvasc Res* **58**, 205-214
- UGUREL, S., HILDENBRAND, R., DIPPEL, E., HOCHHAUS, A. und SCHADENDORF, D. (2003) Dose-dependent severe cutaneous reactions to imatinib. *Brit J Cancer* **88**, 1157-1159
- UGUREL, S., HILDENBRAND, R., ZIMPFER, A., LA ROSEE, P., PASCHKA, P., SUCKER, A., KEIKAVOUSSI, P., BECKER, J.C., RITTGEN, W., HOCHHAUS, A. und SCHADENDORF, D. (2005) Lack of clinical efficacy of imatinib in metastatic melanoma. *Brit J Cancer* **92**, 1398-1405
- VAUPEL, P., KALLINOWSKI, F. und OKUNIEFF, P. (1989) Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* **49**, 6449-6465
- VLAHOVIC, G., RABBANI, Z.N., HERNDON II, J.E., DEWHIRSTZ, M.W. und VUJASKOVIC, Z. (2006) Treatment with imatinib in NSCLC is associated with the decrease of phosphorylated PDGFR- β and VEGF expression, decrease in interstitial fluid pressure and improvement of oxygenation. *Brit J Cancer* **95**, 1013-1019
- VOJTEK, A.B. und COOPER, J.A. Rho family members: Activators of MAP kinase cascades. *Cell* **82**, 527-529
- VOM DAHL, S., SCHLIESS, F., REISSMANN, R., GÖRG, B., WEIERGRÄBER, O., KOCALKOVA, M., DOMBROWSKI, F. und HÄUSSINGER, D. (2003) Involvement of integrins in osmosensing and signaling toward autophagic proteolysis in rat liver. *J Biol Chem* **278**, 27088-27095
- VOS, J.G., BERKVEN, J.M. und KRUIJT, B.C. (1980). The athymic nude rat. I. Morphology of lymphoid and endocrine organs. *Clin Immunol Immunopathol* **15**, 13-228
- WHITMARSH, A.J., SHORE, P., SHARROCKS, A.D. und DAVIS, R.J. (1995) Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* **269**, 403-407
- WIIG, H. und GADEHOLT, G. (1985) Interstitial fluid pressure and hemodynamics in a sarcoma implanted in the rat tail. *Microvasc Res* **29**, 176-189
- WIIG, H., REED, R.K. und AUKLAND, K. (1987) Measurement of interstitial fluid pressure in dogs: evaluation of methods. *Am J Physiol* **253**, H283-H290

- WIIG, H., REED, R.K. und AUKLAND, K. (1981) Micropuncture measurement of interstitial fluid pressure in rat subcutis and skeletal muscle: comparison to wick-in-needle technique. *Microvasc Res* **21**, 308-319
- WIIG, H., TVEIT E., HULTBORN R., REED R.K. und WEISS, L. (1982) Interstitial fluid pressure in DMBA-induced rat mammary tumours. *Scan J Clin Lab Invest* **42**, 159-164
- WILDIERS, H., GUETENS, G., DE BOECK, G., VERBEKEN, E., LANDUYT, B., LANDUYT, W., DE BRUIJN, E.A. und VAN OOSTEROM, A.T. (2003) Effect of antivasular endothelial growth factor treatment on the intratumoral uptake of CPT-11. *Brit J Cancer* **88**, 1979-1986
- WILLETT, C.G., BOUCHER, Y., DI TOMASO, E., DUDA, D.G., MUNN, L.L., TONG, R.T., CHUNG, D.C., SAHANI, D.V., KALVA, S.P., KOZIN, S.V., MINO, M., COHEN, K.S., SCADDEN, D.T., HARTFORD, A.C., FISCHMAN, A.J., CLARK, J.W., RYAN, D.P., ZHU, A.X., BLASZKOWSKY, L.S., CHEN, H.X., SHELLITO, P.C., LAUWERS, G.Y. und JAIN, R.K. (2004) Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. *Nature Med* **10**, 145-147
- WONG, J.W., SHI, B., FARBOUD, B., McCLAREN, M., SHIBAMOTO, T., CROSS, C.E., und ISSEROFF R.R. (2000) Ultraviolet B-mediated phosphorylation of the small heat shock protein HSP27 in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **115**, 427-434
- XIA, Z., DICKENS, M., RAINGEAUD, J., DAVIS, R.J. und GRENNBERG, M.E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**, 1326-1331
- XIE, X., BRÜNNER, N., JENSEN, G., ALBRECHTSEN, J., GOTTHARDSSEN, B. und RYGAARD, J. (1992) Comparative studies between nude and scid mice on the growth and metastatic behavior of xenografted human tumors. *Clin Exp Metastasis* **10**, 201-210
- YANG, A.D., BAUER, T.W., CAMP, E.R., SOMCIO, R., LIU, W., FAN, F. und ELLIS, L.M. (2005) Improving delivery of antineoplastic agents with anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Cancer* **103**, 1561-1570
- YOUNG, J.S., LUMSDEN, C.E. und STALKER, A.L. (1950) The significance of the tissue pressure of normal testicular and of neoplastic (Brown-Pearce carcinoma) tissue in rabbit. *J Pathol Bacteriol* **62**, 313-333
- ZAMPETAKI, A., ZHANG, Z., HU, Y. und XU, Q. (2005) Biomechanical stress induces IL-6 expression in smooth muscle cells via Ras/Rac1-p38 MAPK-NF-kappaB signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H2946-54

7. Publikationen und wissenschaftliche Vorträge

Publikationen

HOFMANN, M., ŽAPER, J., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R. und KIPPENBERGER, S. (2004) Mechanical pressure-induced phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase in epithelial cells via Src and protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* **316**, 673-679

HOFMANN, M., GUSCHEL, M., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R., TANDI, C., WIIG, H. und KIPPENBERGER, S. (2006) Lowering of tumor interstitial fluid pressure reduces tumor cell proliferation in a xenograft tumor model. *Neoplasia* **8**, 89-95

HOFMANN, M., SCHULTZ, M., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R. und KIPPENBERGER, S. (2007) Long-term lowering of tumor interstitial fluid pressure reduces Ki-67 expression. *J Biomech* **40**, 2324-2329

SALBER, J., GRÄTER, S., HARWARDT, M., **HOFMANN, M.**, KLEE, D., DUJIC, J., JINGHUAN, H., DING, J., KIPPENBERGER, S., BERND, A., GROLL, J., SPATZ, J.P. und MÖLLER, M. (2007) Influence of different ECM mimetic peptide sequences embedded in a nonfouling environment on the specific adhesion of human-skin keratinocytes and fibroblasts on deformable substrates. *Small*, doi: 10.1002/sml.200600596, in press

Poster/Abstracts

HOFMANN, M., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R. und KIPPENBERGER, S. (2002) Mechanical pressure induces p38 phosphorylation in human keratinocytes. 32. ESDR Meeting, Genf, Schweiz, *J Invest Dermatol* **119**, 755

HOFMANN, M., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R. und KIPPENBERGER, S. (2003) p38 MAP kinase and HSP27 are induced by mechanical pressure in human keratinocytes. XXX. ADF Tagung, Frankfurt/Main, *Arch Dermatol Res* **294**, 512

HOFMANN, M., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R. und KIPPENBERGER, S. (2003) Human keratinocytes respond to mechanical stimulation by activation of p38 mitogen-activated protein kinase and heat shock protein 27 (HSP27). DGZ Jahrestagung, Bonn, *Eur J Cell Biol* **82**, 49

HOFMANN, M., ŽAPER, J., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R. und KIPPENBERGER, S. (2004) Mechanical pressure-induced p38 phosphorylation is mediated by protein kinase C in epithelial cells. XXXI. ADF Tagung, Dresden, *Arch Dermatol Res* **295**, 383

KIPPENBERGER, S., GUSCHEL, M., MÜLLER, J., **HOFMANN, M.**, KAUFMANN, R. und BERND, A. (2004) Hypoosmotic stress induces E-cadherin expression in cultured human keratinocytes. XXXI. ADF Tagung, Dresden, *Arch Dermatol Res* **295**, 383

HOFMANN, M., GUSCHEL, M., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R., TANDI, C. und KIPPENBERGER, S. (2004) Intratumoural-pressure release reduced the phosphorylation of p44/42 mitogen-activated protein kinases (MAPK) in a xenograft tumour model. DGZ Jahrestagung, Berlin, *Eur J Cell Biol* **83**, 27

HOFMANN, M., ŽAPER, J., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R. und KIPPENBERGER, S. (2004) Mechanical pressure-induced phosphorylation of p38 and c-jun NH₂-terminal kinase in epithelial cells. SID Meeting, Providence, Rhode Island, USA, *J Invest Dermatol* **112**, A93

ŽAPER, J., **HOFMANN, M.**, BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R. und KIPPENBERGER, S. (2004) Effects of mechanical stimuli on mitogen-activated protein kinases (MAPKs) phosphorylation. SID Meeting, Providence, Rhode Island, USA, *J Invest Dermatol* **112**, A96

HOFMANN, M., ŽAPER, J., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R. und KIPPENBERGER, S. (2004) Src and PKC-mediated phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) in response to mechanical pressure. FEBS Lecture Course, Dubrovnik, Kroatien in: Đikić I, Husnjak K, FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4th Dubrovnik Signaling Conference p.87/88

ŽAPER, J., **HOFMANN, M.**, BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R. und KIPPENBERGER, S. (2004) Mechanical stimuli induce phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs). FEBS Lecture Course, Dubrovnik, Kroatien in: Đikić I, Husnjak K, FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4th Dubrovnik Signaling Conference p.123/124

HOFMANN, M., GUSCHEL, M., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R., TANDI, C. und KIPPENBERGER, S. (2005) Lowering of tumour-interstitial fluid pressure in squamous carcinoma and melanomas enhances the uptake of therapeutics in a xenograft tumour model. XXXII. ADF Tagung, Innsbruck, Österreich, *Arch Dermatol Res* **296**, 436

HOFMANN, M., JANACZYK, B. und WIIG, H. (2005) Interstitial fluid composition, volume and pressure; possibilities of isolation and measurement. 6th EMBL Predoc Symposium "Animal models - tips and tricks from nature", Rom, Italien

HOFMANN, M., GUSCHEL, M., SALVESEN, G.S., RAA, A., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R., WIIG, H. und KIPPENBERGER, S. (2005) Reduced tumour-interstitial fluid pressure enhances the uptake of therapeutics in a xenograft tumour model. 35. ESDR Meeting, Tübingen, *J Invest Dermatol* **125**, A60

KIPPENBERGER, S., MÜLLER, J., GUSCHEL, M., **HOFMANN, M.**, KAUFMANN, R., BERND, A. (2005) Ligation of β_4 integrins activates PKB/Akt and ERK1/2 by distinct pathways. 35. ESDR Meeting, Tübingen, *J Invest Dermatol* **125**, A66

HOFMANN, M., GUSCHEL, M., SALVESEN, G.S., RAA, A., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R., WIIG, H. und KIPPENBERGER, S. (2006) Increased colloid osmotic pressure enhances the uptake of macromolecules in a xenograft tumour model. XXXIII. ADF Tagung, Aachen, *Exp Dermatol* **15**, 238

HOFMANN, M., GUSCHEL, M., SALVESEN, G.S., RAA, A., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R., WIIG, H. und KIPPENBERGER, S. (2006) Enhanced colloid osmotic pressure reduces tumor interstitial fluid pressure and facilitates the uptake of macromolecules in a xenograft tumor model. 67. SID Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA, *J Invest Dermatol* 126(S4), 15

HOFMANN, M., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., HASHIMOTO, K., KAUFMANN, R., KIPPENBERGER, S. und HIRAKAWA, S. (2006) Does the density of lymphatic vessels affects tumour interstitial fluid pressure? JSPS Summer Program, Hayama, Kanagawa, Japan

HOFMANN, M., LENZ, L.-S., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., HIRAKAWA, S., KAUFMANN, R. und KIPPENBERGER, S. (2007) Lymphatic vessel architecture in A431 and A549 tumours. XXXIV. ADF Tagung, Freiburg, *Exp Dermatol* 16, 256

HOFMANN, M., Mc CORMACK, E., WIIG, H., RAA, A., BERND, A., BEREITER-HAHN, J., KAUFMANN, R. und KIPPENBERGER, S. (2007) Enhanced colloid osmotic pressure facilitates the uptake of macromolecules in a xenograft tumour model. DGZ Jahrestagung, Frankfurt/Main, *Eur J Cell Biol* 86S1, 11

Vorträge

HOFMANN, M. (2003) Mechanische Stimuli als Triggerfaktoren epithelialer Tumore, 2. Frankfurter Doktoranden Symposium, Frankfurt/Main

Mc CORMACK, E., JANACZYK, B. und **HOFMANN, M.** (2005) Animal studies and *in vivo* imaging, Seminar on Leukemia Research, Zentrum der Hämatologie, Universität Bergen, Bergen, Norwegen

HOFMANN, M. (2005) Mechanische Stimuli als Triggerfaktoren epithelialer Tumore, Ärztliches Fort- und Weiterbildungsseminar im ZDV, Frankfurt/Main

HOFMANN, M. (2006) Mechanical stimuli as trigger-factors of epithelial tumors, Seminar des Institut für Molekularbiologie und Biochemie, Universität Okayama, Okayama, Japan

HOFMANN, M. (2006) Enhanced colloid osmotic pressure reduces tumour interstitial fluid pressure and facilitates the uptake of macromolecules in a xenograft tumour model, 8. Nachwuchswissenschaftler-Tagung "Cell Biology of Cancer" der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Heidelberg

HOFMANN, M. (2006) Enhanced colloid osmotic pressure facilitates the uptake of macromolecules in a xenograft tumour model, Seminar on Leukemia Research "Molecular Imaging of Cancer and implications for AML research", Institut für Biomedizin, Universität Bergen, Bergen, Norwegen

HOFMANN, M. (2007) Erhöhter kolloid-osmotischer Druck erleichtert die Aufnahme von Makromolekülen in Tumore, Seminar der Dermatoonkologischen Arbeitsgruppe, ADF Tagung, Freiburg

8. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Bereiter-Hahn für die Erstellung des Gutachtens und die persönliche Unterstützung während der gesamten Promotionszeit. Trotz der starken Inanspruchnahme durch das Amt des Vizepräsidenten fand er immer die Zeit Probleme und aktuelle Ergebnisse meiner Doktorarbeit zu besprechen. Zu besonderem Dank bin ich ihm für seine vorbehaltlose Unterstützung meiner Auslandsaufenthalte verpflichtet.

Ich danke Herrn Prof. Dr. August Bernd für die sorgfältige Betreuung meiner Arbeit, für seine bei Fragen und Problemen stets offene Tür und für die Erstellung des Zweitgutachtens. Für die Möglichkeit mich meinen eigenen Projekten widmen und meine Ergebnisse auf internationaler Ebene präsentieren zu können möchte ich mich auf das Herzlichste bedanken.

Für die Bereitstellung des Laborplatzes und der Förderung meiner Auslandsaufenthalte sei Herrn Prof. Dr. Roland Kaufmann gedankt.

Besonders danken möchte ich Herrn PD Dr. Stefan Kippenberger, der mir im Verlauf dieser Promotionsarbeit immer wieder neue Denkanstöße gegeben hat. Er hat mich auch während der schwierigen Phasen der Promotion mit seiner ruhigen Art stets motiviert und den Glauben in mir aufrecht gehalten, dass es nach dem Erreichen der „Talsohle“ immer wieder bergauf geht. Ich möchte ihm herzlichst dafür danken mir die Freiheiten gegeben zu haben meine Auslandsprojekte verwirklichen zu können. Als Ansprechpartner für Probleme „aller Art“ gebührt ihm darüber hinaus mein größter Dank!

Für die finanzielle Unterstützung meiner Promotion und die Möglichkeit nachfolgend in der Klinischen Forschung tätig zu sein danke ich Herrn Dr. Diamant Thaci.

Mein Dank gilt allen aktiven aber auch ausgeschiedenen Kolleginnen des B-Labors für ihre Unterstützung meiner Arbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Vielen herzlichen Dank: Helga Büttner, Kerstin Görg, Tsige Hailemariam-Jahn, Stephanie „Steff“ Hoffmann, Kugheta Kugarajan, Jutta Müller, Maila Rossberg und Gerlinde Schley.

Insbesondere möchte ich mich aber bei Maike Schultz für ihr Engagement, ihre Hilfe bei der Durchführung vieler Versuche und ihre auch über den Laboralltag hinausgehende persönliche Unterstützung während der letzten Jahre bedanken.

Meine biologischen Mitdotorandinnen Annette Dorn, Jadranka Dujić, Julijana Ivošević-Žaper und Nadja Zöller seien mit Dank bedacht für die gute Zusammenarbeit, die wissenschaftlichen Diskussionen und vielen gemeinsamen Erlebnisse auf Tagungen und um das Labor herum. Ein herzliches „Danke Schön“ für die gute Zusammenarbeit sei auch dem medizinischen Doktoranden Michael Schuster und den Diplomandinnen Vesselina Laubach und Lena-Solveig Lenz angedacht.

Des weiteren gilt mein Dank den aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern aus der Gruppe von Herrn Prof. Dr. Jens Gille: Barbara Berlinski, Carolin Fischer, Despina Michailidou, Julja Naidenow, Monika Stein, Sybille Mayer, Veronika König, Andreas Pinter, Igor Hrgović und Herrn Dr. Markus Meisner.

Für die Abwechselung im Laboralltag bedanke ich mich bei allen Praktikanten, die ich im Laufe meiner Promotion betreuen durfte. Ich hoffe nicht nur mir hat es viel Spaß gemacht, sondern gleichermaßen auch Belinda und Sanaz, Matthias und Sylvie, Nejla, Lena-Solveig und Vesselina sowie Vanessa und Konstantinos.

Ich danke den neuen Kollegen aus der Klinischen Forschung für ihr Verständnis beim finalen Zusammenstellen meiner Dissertation. Vielen Dank: Frau Dr. Domenika Varwig, Rebekka Salgo, Heike Beschmann, Janine Bitterberg, Sandra Diehl, Annette Gaul und Kerstin Peter.

Den Mitarbeiterinnen der Zentralen Forschungseinrichtung (Kirsten Frank, Christa Tandi) und den Tierärztinnen Frau Dr. Jeanette Pfeffer und Petra Schulze-Johann gebührt mein Dank für ihre fachliche Hilfe bei der Durchführung meiner Projekte und der Versorgung der Tiere.

Für die Eröffnung der Möglichkeit, einen Teil meiner Promotion im Institut für Biomedizin der Universität Bergen in Norwegen durchführen zu können, möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Helge Wiig bedanken. Tusen takk på hjelp. Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Emmet Mc Cormack und seinem Team (Maja, Lars-Erik), die mir die Möglichkeit und Unterstützung boten den eXploreOptix-Scanner im Rahmen meiner Promotion zu verwenden.

Für die freundliche Aufnahme in „meiner“ norwegischen Arbeitsgruppe danke ich Gerd Signe Salvesen, Odd Kolmannskog, Tine Karlsen, Anette Raa und Monica Bivol. Im Besonderen aber meinem „Weggefährten“ Bartłomiej „Bartek“ Janaczyk, der mir während des Auslands-

aufenthaltes zu einem guten Freund geworden ist. Den Bewohnern von Haukelandsbakken 45 (Agnieska, Brita, Daiva, Girstaute, Paulina, Merel, Sjoukje, Wendy, Angel, Bert, Christoph, Ole, Tilo, Urban, Yngve) sei für Spiel, Spaß und internationale Atmosphäre gedankt.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Satoshi Hirakawa, der es ermöglichte, dass ich ein Teilprojekt meiner Promotion am Zentrum der Dermatologie der Ehime Universität in Matsuyama, Japan durchführen konnte. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Koji Hashimoto, Herrn Prof. Dr. Yoshifumi Ninomiya, Herrn Dr. Lubjun Yang und Eriko Tsuda, sowie meiner Gastfamilie Rieko und Seiji Kataoka. Domo arigato gozaimasu!

Masae Kurosaki hat mir mit ihrem Lachen und ihrer Liebe die schönste Zeit in diesen Jahren bereitet. Auch wenn uns mehr als tausend Kilometer voneinander trennen, so spüre ich ihre Nähe und Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Promotion. Daisuki Masae!

Den weiteren Teilnehmer des *JSPS-Summerprograms* 2006 danke ich für Freundschaften und eine Menge gemeinsamer Erlebnisse. Danke an Benessa, Arnim, Christian und Thomas.

Ein besonderer Dankesgruß gilt meinem Freund Herrn Dr. Sven Kappel. Er war nicht nur während der Promotion, sondern während des gesamten gemeinsamen Studiums ein stets greifbarer Ansprechpartner in fachlichen wie auch privaten Belangen. Ihm sei gedankt für regelmäßige abendliche Aktivitäten am Ende eines Arbeitstages (Calli's Pizza und Co) und das gute Gefühl einen sehr guten Freund im Nachbarhaus sitzen zu haben.

Auch meinem Freund Andreas Runkel soll mit Dank gewürdigt werden für seine unermüdliche Korrektur meiner Publikationen und dieses Dissertationstextes.

Größter Dank gebührt meinen Eltern, die mein Studium immer befürwortet haben und mir auch in den oftmals schwierigen Zeiten den Rücken gestärkt haben. Ihre große Unterstützung, die selbst bis ins ferne Japan reichte, ist einer der entscheidenden Faktoren, die zum Abschluss dieser Promotion beigetragen haben.

Herzlichen Dank möchte ich abschließend allen Freunden und Bekannten gegenüber aussprechen, die mit ihren Unternehmungen und ihrer Anwesenheit immer wieder dafür sorgten das Labor auch einmal zu verlassen.

Meine Forschung im B-Labor wurde dankenswerterweise von der Volkswagenstiftung unterstützt. Für die finanzielle Unterstützung meiner Auslandsaufenthalte danke ich der Europäischen Union für die Gewährung des Marie-Curie Fellowships an der Universität Bergen und der *Japan Society for the Promotion of Science* (JSPS) zur Durchführung des *Summerprograms* an der Ehime Universität. Der August Scheidel Stiftung danke ich für die Bereitstellung von finanziellen Mitteln zur Durchführung meiner experimentellen Arbeit.

9. Ehrenwörtliche Erklärung

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Promotionsprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main / Gründau, den 19.07.2007

Matthias Hofmann

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die im Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität angefertigte Dissertation über

Mechanische Stimuli als Triggerfaktoren epithelialer Tumore

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main / Gründau, den 19.07.2007

Matthias Hofmann

Matthias Hofmann

Curriculum vitae

Persönliche Angaben:

Name: Matthias Hofmann
Geburtstag: 07. April, 1977
Geburtsort: Hanau/Main
Nationalität: deutsch
Konfession: evangelisch
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung:

1983-1987 Grund- und Hauptschule Gründau-Rothenbergen
1987-1996 Grimmelshausen Gymnasium Gelnhausen
Juni 1996 Abitur

Zivildienst:

1996-1997 Martinsschule, Schule für Praktisch Bildbare, Linsengericht

Universitäre Ausbildung:

1997-1999 Grundstudium der Biologie (Grundlagen der Botanik und Zoologie)
an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main
August 1999 Vordiplom (Note 1)
1999-2001 Hauptstudium der Biologie
an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main
Sept./Okt. 2000 Ökologisches Praktikum
Jatun Sacha Foundation, Quito, Ecuador
September 2001 Diplomprüfung in den Schwerpunktfächern Neurobiologie, Zell- und
Entwicklungsbiologie und Tierphysiologie
2001-2002 Diplomarbeit: „Perzeption und Transduktion von mechanischen
Stimuli in Kulturen von humanen Keratinozyten“ im Zentrum der
Dermatologie und Venerologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität,
Frankfurt/Main
Juli 2002 Diplom (Note 1,2)

-
- seit Nov. 2002 Doktorand im Biochemischen Labor des Zentrum der Dermatologie und Venerologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main (Prof. Dr. A. Bernd; PD Dr. S. Kippenberger);
Thema der Promotion „Mechanische Stimuli als Triggerfaktoren epithelialer Tumore“
- Nov. 2004-Juli 2005 Marie Curie Fellowship der Europäischen Union im Institut für Biomedizin der Universität Bergen, Bergen, Norwegen (Prof. Dr. H. Wiig)
- Jun.-Aug. 2006 Fellowship der JSPS (*Japan Society for the Promotion of Science*) am Zentrum der Dermatologie der Ehime Universität, Matsuyama, Japan (Prof. Dr. K. Hashimoto, Dr. S. Hirakawa)
- Okt./Nov. 2006 wissenschaftlicher Aufenthalt im Institut für Biomedizin der Universität Bergen, Bergen, Norwegen (Prof. Dr. H. Wiig)

Stipendien:

- Februar 2004 Reisestipendium der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie
- Juli 2004 Stiftungsmittel der Dr. August Scheidel Stiftung
- Nov. 2004-Juli 2005 Marie Curie Fellowship der Europäischen Union im Institut für Biomedizin an der Universität von Bergen, Bergen, Norwegen
- Sep. 2005 Reisestipendium der *European Society for Dermatological Research*
- Juni-Aug. 2006 Fellowship der JSPS (*Japan Society for the Promotion of Science*) am Zentrum der Dermatologie an der Ehime Universität, Matsuyama, Japan
- Dez. 2006 Reisestipendium des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität

Wissenschaftliche Nebentätigkeiten:

- 2000-2002 studentischer Hilfswissenschaftler im Praktikumskurs „Funktion und Struktur der Organismen“
- 2001-2003 studentischer Hilfswissenschaftler im „Tierphysiol. Praktikum“
- Nov. 2002-Feb. 2003 wissenschaftl. Mitarbeiter in der Klinischen Forschung des Zentrums der Dermatologie und Venerologie, J.W. Goethe-Universität
- Jan. 2007- Studienkoordinator in der Klinischen Forschung des Zentrums der Dermatologie und Venerologie, J.W. Goethe-Universität, Frankfurt