

**Untersuchungen zur antiangiogenen  
Aktivität des matrizellulären Proteins  
Thrombospondin-2**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

**Fadi Hussein**

aus Bad Harzburg

Göttingen 2008

D7

Referent: Prof. Dr. R. Hardeland

Korreferent: Prof. Dr. E. A. Wimmer

Tag der mündlichen Prüfung:

*Meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Aufbau von Blutgefäßen.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Tumorangiogenese.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Endogene Angiogeneseinhibitoren und ihre Wirkungen .....</b>	<b>5</b>
1.3.1 Überblick .....	5
1.3.2 Thrombospondine .....	5
1.3.3 Thrombospondin-1 (TSP-1).....	6
1.3.4 Thrombospondin-2 (TSP-2).....	8
<b>1.4 Antiangiogene Therapien .....</b>	<b>9</b>
1.4.1 Antikörper gegen VEGF.....	9
<b>2 Ziel der Arbeit.....</b>	<b>10</b>
<b>3 Material.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Chemikalien .....</b>	<b>11</b>
<b>3.3 Molekularbiologisches Material.....</b>	<b>11</b>
3.3.1 Restriktionsendonukleasen .....	11
3.3.2 Enzyme .....	12
3.3.3 Molekularbiologische Kits.....	12
<b>3.4 Lösungen und Puffer.....</b>	<b>12</b>
<b>3.5 Zelllinien.....</b>	<b>15</b>
<b>3.6 Zellkulturmedien.....</b>	<b>16</b>
3.6.1 Basalmedien .....	16
3.6.2 Wachstumsmedien .....	16
3.6.3 FCS-freie Medien .....	17
<b>3.7 Mausstamm .....</b>	<b>18</b>
<b>3.8 Antikörper .....</b>	<b>18</b>
3.8.1 Primärantikörper .....	18
3.8.2 Sekundärantikörper .....	18
<b>3.9 Real-time PCR.....</b>	<b>19</b>
3.9.1 Puffer und Kits.....	19
3.9.2 Oligonukleotide .....	19
3.9.3 Taqman <sup>®</sup> -Sonden .....	19
<b>3.10 Software.....</b>	<b>19</b>
<b>4 Methoden .....</b>	<b>20</b>

<b>4.1</b>	<b><i>Zellkultivierung adhärenter Zellen</i></b> .....	<b>20</b>
4.1.1	Behandlung der Zelllinien .....	20
4.1.2	Bestimmung der Zellzahl.....	20
4.1.3	Bestimmung der Proliferation von humanen Brustkrebszellen MDA-MB-435 .....	20
4.1.4	Isolierung von HUVEC .....	21
<b>4.2</b>	<b><i>DNA Konzentrationsbestimmung</i></b> .....	<b>21</b>
<b>4.3</b>	<b><i>Rekombinante Herstellung von NTF-TSP-2</i></b> .....	<b>22</b>
4.3.1	Restriktion.....	22
4.3.2	Ligation .....	23
4.3.3	Transformation von E. coli One Shot® TOP10.....	23
4.3.4	Produktion des NTF-TSP-2 Expressionsvektors .....	24
4.3.5	Transfektion .....	24
4.3.6	Kultivierung .....	24
4.3.7	Proteinaufreinigung .....	25
4.3.8	Dialyse .....	25
<b>4.4</b>	<b><i>Proteinkonzentrationsbestimmung</i></b> .....	<b>25</b>
<b>4.5</b>	<b><i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i></b> .....	<b>26</b>
<b>4.6</b>	<b><i>Western Blot</i></b> .....	<b>27</b>
<b>4.7</b>	<b><i>Tube Formation Assay</i></b> .....	<b>28</b>
<b>4.8</b>	<b><i>Tierexperimente</i></b> .....	<b>28</b>
4.8.1	Haltungsbedingungen .....	28
4.8.2	Betäubung .....	29
4.8.3	Präparation und Inokulation von Tumorzellen .....	29
4.8.4	Tumorzellvolumenmessung.....	29
4.8.5	Dosisfindungsversuch.....	30
4.8.6	Tumorwachstumsverlaufsversuch .....	30
4.8.7	Metastasierungsversuch .....	31
4.8.8	Bioverfügbarkeitsversuch .....	31
4.8.9	Sektion .....	31
4.8.10	Serumgewinnung .....	31
4.8.11	Aufbereitung von Mausgewebe .....	32
<b>4.9</b>	<b><i>Immunpräzipitation (IP)</i></b> .....	<b>32</b>
<b>4.10</b>	<b><i>Immunhistochemische Methoden</i></b> .....	<b>33</b>
4.10.1	Darstellung von Blutgefäßen und Auswertung des Gefäßstatus .....	33
4.10.2	Darstellung von Mikrometastasen .....	34
<b>4.11</b>	<b><i>Immunfluoreszenz-Darstellung des CD36-Rezeptors</i></b> .....	<b>34</b>
<b>4.12</b>	<b><i>Inhibitions-ELISA</i></b> .....	<b>34</b>
<b>4.13</b>	<b><i>Real-time PCR</i></b> .....	<b>35</b>
4.13.1	Extraktion genomischer DNA .....	35
4.13.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	36
4.13.3	TaqMan® real-time PCR .....	36
4.13.4	Quantitative TaqMan® real-time PCR .....	37

4.13.5	Quantitative TaqMan <sup>®</sup> real-time PCR einer Standardverdünnungsreihe.....	38
<b>4.14</b>	<b><i>Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Apoptose.....</i></b>	<b>39</b>
4.14.1	Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials .....	39
4.14.2	Durchflusszytometrische Quantifizierung von Apoptose.....	40
4.14.3	Bestimmung von aktiver Caspase-3 mittels Western Blot .....	41
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
<b>5.1</b>	<b><i>Rekombinante Expression des Fusionsproteins NTF-TSP-2 .....</i></b>	<b>42</b>
5.1.1	Isolierung von NTF-TSP-2 .....	42
5.1.2	<i>In vitro</i> Funktionalität von NTF-TSP-2 .....	43
5.1.3	Einfluss von NTF-TSP-2 auf die Proliferation .....	45
<b>5.2</b>	<b><i>Quantitative Evaluierung von Lymphknotenmikrometastasen .....</i></b>	<b>46</b>
5.2.1	Quantitative Bestimmung von Mikrometastasen anhand einer Standardverdünnungsreihe.....	46
5.2.2	Quantitative Evaluierung von Lymphknotenmikrometastasen mittels real-time PCR.....	49
5.2.3	Quantitative Evaluierung von Lymphknotenmikrometastasen mittels immunhistochemischen Nachweis von Zytokeratin-19.....	51
<b>5.3</b>	<b><i>Effekte von NTF-TSP-2 auf das in vivo Tumorwachstum von MDA-MB-435 Brustkrebszellen.....</i></b>	<b>52</b>
5.3.1	Die systemische Gabe von NTF-TSP-2 hemmt das Wachstum von MDA-MB-435 Mammakarzinomen .....	52
5.3.2	Die systemische Gabe von NTF-TSP-2 hemmt das Tumorwachstum über einen Zeitraum von 5 Wochen.....	54
5.3.3	Die systemische Gabe von NTF-TSP-2 hemmt die Angiogenese <i>in vivo</i> .....	55
5.3.4	Die systemische Gabe von NTF-TSP-2 hemmt die lymphogene und pulmonale Metastasierung .....	58
<b>5.4</b>	<b><i>Verteilung von appliziertem NTF-TSP-2 im Mausgewebe .....</i></b>	<b>61</b>
5.4.1	Inhibitions-ELISA .....	61
5.4.2	Untersuchung der Bioverfügbarkeit von NTF-TSP-2 mittels Inhibitions-ELISA.....	61
5.4.3	Nachweis von intraperitoneal appliziertem NTF-TSP-2 im Tumorgewebe .....	63
<b>5.5</b>	<b><i>Einfluss von NTF-TSP-2 auf Endothelzellen in vitro.....</i></b>	<b>64</b>
5.5.1	Nachweis des CD36 Rezeptors auf HDMEC .....	64
5.5.2	Angiogenesehemmung durch NTF-TSP-2 über einen CD36-abhängigen Mechanismus.....	66
<b>5.6</b>	<b><i>Einfluss von NTF-TSP-2 auf die Apoptose von Endothelzellen.....</i></b>	<b>69</b>
5.6.1	Die Behandlung mit NTF-TSP-2 induziert die Apoptose von HDMEC über einen CD36-abhängigen Mechanismus.....	69
5.6.2	Die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 führt zu einem CD36-abhängigen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials .....	72
5.6.3	CD36-abhängige Aktivierung von Caspase-3 durch NTF-TSP-2 .....	74

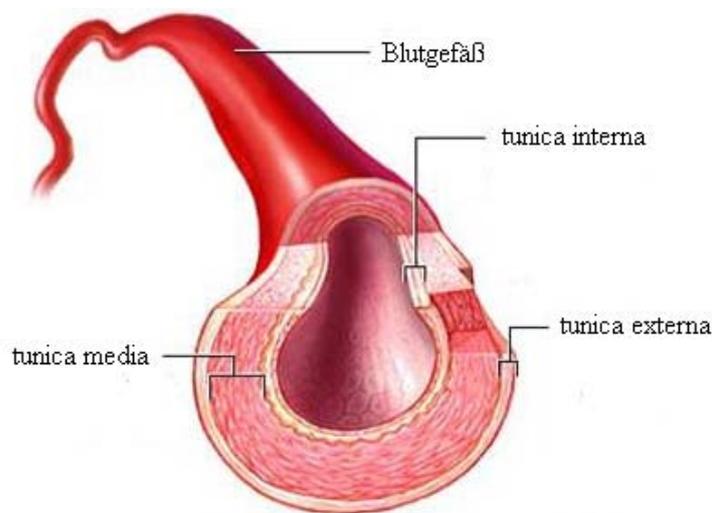
---

<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>89</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>i</b>
	<i>10.1</i> <i>Abkürzungsverzeichnis .....</i>	<i>i</i>
	<i>10.2</i> <i>Aminosäuren .....</i>	<i>ii</i>
	<i>10.3</i> <i>Sequenzen.....</i>	<i>iii</i>
10.3.1	NTF-TSP-2 cDNA .....	iii
10.3.2	NTF-TSP-2 Aminosäuresequenz .....	iii
	<i>10.4</i> <i>Abbildungsverzeichnis .....</i>	<i>iv</i>
	<i>10.5</i> <i>Tabellenverzeichnis.....</i>	<i>vi</i>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>vii</b>
	<b>Wissenschaftliche Beiträge.....</b>	<b>viii</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>x</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau von Blutgefäßen

Blutgefäße bilden ein kontinuierliches System von Kanälen, mit denen das Blut die Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Die Blutgefäße des menschlichen Organismus haben weitgehend einen ähnlichen Aufbau. Sie bestehen aus einem Lumen und drei das Lumen umgebende Wandschichten.



**Abbildung 1.1** Graphische Darstellung eines Blutgefäßes

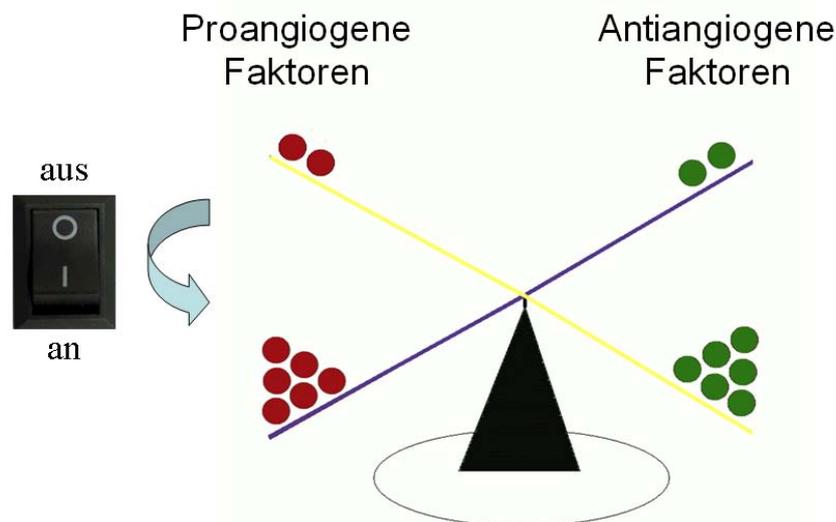
Es wird von außen nach innen die tunica externa, tunica media und die tunica interna dargestellt.

Die innerste Schicht ist die *tunica interna*, die aus einer Monoschicht von Endothelzellen (Endothel) besteht, die auf einer Basalmembran aufgelagert ist. Die Basalmembran wird umgeben von subendotheliales Bindegewebe. Die *tunica interna* ist für den Stoff- und Gasaustausch verantwortlich. Auf die innere folgt die mittlere Schicht, die *tunica media*. Sie besteht aus einer ringförmigen Anordnung von glatten Muskelzellen, Kollagenfasern und elastischen Fasern. Die *tunica media* ist für die Elastizität der Gefäße verantwortlich. Die äußerste Schicht ist die *tunica externa*, die aus einer Matrix von Kollagenfasern und elastischen Faser besteht, die die Gefäße in ihrer Umgebung verankern (Abbildung 1.1)

Kapillaren stellen einen bestimmten Typ von Blutgefäßen dar. Sie bestehen aus muskelfreien Endothelzellröhren, die von einer Basalmembran umgeben sind, auf der Perizyten sitzen. (Zelickson, 1966). Durch die Umlagerung der Kapillaren mit Perizyten wird die Kapillarwand verstärkt. (Hirschi and D'Amore, 1996).

## 1.2 Tumorangiogenese

Aus physiologischer Sicht befinden sich Endothelzellen in einem Monate oder Jahre dauernden Ruhezustand. Die Teilungsrate der vaskulären Epithelien ist dabei niedrig. Dieses Phänomen der Stabilität des Gefäßsystems beruht auf einem ausgewogenen Verhältnis von Angiogenesestimulatoren und –inhibitoren.



**Abbildung 1.2 Graphische Darstellung des „angiogenic switch“**

Durch den Überschuss an proangiogenen Faktoren oder den Mangel an antiangiogenen Faktoren kommt es zur Aktivierung von Angiogenese

Überwiegen aber mehr proangiogene Faktoren, wird die Teilungsrate der Endothelzellen erhöht, was eine Voraussetzung für die Neubildung von Blutgefäßen ist. Die Initiierung dieser Disbalance zugunsten der proangiogenen Faktoren wird als „angiogenic switch“ bezeichnet (Hanahan and Folkman, 1996) (Abbildung 1.2). Die Angiogenese spielt sowohl bei physiologischen (Plazentation, zyklische Veränderungen im Reproduktionsgewebe) (Hyder and Stancel, 1999) (Breier, 2000) als auch bei pathologischen Prozessen wie zum Beispiel Diabetes mellitus (Martin et al., 2003),

rheumatoide Arthritis (Koch, 2003) oder kardiovaskuläre ischämische Komplikationen (Cao et al., 2005) eine wichtige Rolle.

Eine wichtige biologische Bedeutung hat die Neubildung von Blutgefäßen beim Wachstum von Tumoren. Während Tumorzellen zu kleinen Zellklonen von 1-2 Millimetern Durchmesser auswachsen können und mittels Diffusion mit Nährstoffen versorgt werden (prävasculäre Phase), ist für das weitere Wachstum die Ausbildung von Blutgefäßen essentiell, um die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sowie den Abtransport toxischer Metabolite aus dem Tumor zu gewährleisten (Folkman, 2006).

**Tabelle 1.1 Beispiele wichtiger proangiogener Faktoren**

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)
Placental Growth Factor (PlGF)
basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)
Platelet Derived Growth Factor (PDGF)
Epidermal Growth Factor (EGF)
Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )
Angiopoietin-1 (Ang-1)

Der Prozess der Angiogenese läuft in mehreren Schritten ab. Aus bereits existierenden Blutgefäßen der Umgebung werden durch zahlreiche proangiogene Faktoren Endothelzellen aktiviert (Tabelle 1.1) Einer der wichtigsten proangiogenen Faktoren ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF). VEGF ist bereits 1989 als endothelzell-spezifisches Mitogen entdeckt worden (Ferrara and Henzel, 1989). Im Laufe der Jahre sind fünf verschiedene VEGF Gene (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-F) und fünf charakterisierte VEGF-A Isoformen mit 121, 145, 165, 189 und 206 Aminosäuren entdeckt worden. Sie treten in Interaktion mit drei identifizierten Tyrosinkinaserzeptoren (VEGFR-1, -2 und -3) (Ribatti, 2005). VEGF-A bindet an VEGFR-1 und VEGFR-2, die fast ausschließlich auf der Zellmembran von Endothelzellen exprimiert sind. Durch die Bindung von VEGF-A an seine Rezeptoren kommt es intrazellulär durch Autophosphorylierung zur Aktivierung der Tyrosinkinasedomänen (Waltenberger et al., 1994). Dies führt zu einer Destabilisierung der Gefäße mit einer Degradation der extrazellulären Matrix und der Basalmembran. Es kommt zudem zur Lösung gefäßstabilisierender Kontakte der Perizyten oder glatten

Muskelzellen zur vaskulären Basalmembran. Dabei spielen die Angiopoietine, eine weitere Familie gefäßregulierender Proteine, eine wichtige Rolle. Zu den wichtigsten Angiopoietinen gehört Angiopoietin-1 (Ang-1) und Angiopoietin-2 (Ang-2). Angiopoietine sind Liganden für den endothelzell-spezifischen Tyrosinkinase-Rezeptor Tie2 (Dumont et al., 1993). Ang-1 agiert als Agonist zum Tie2-Rezeptor, wobei Ang-2 als natürlich vorkommender Antagonist identifiziert worden ist. Ang-2 blockiert die Tie2-Rezeptor Aktivität, indem es kompetitiv die Bindung von Ang-1 am Tie2-Rezeptor verhindert. Die Bindung von Ang-1 am Tie2-Rezeptor führt zu gefäßstabilisierenden Effekten, indem die Kontakte zwischen Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen verstärkt werden. Im Angiogeneseprozess kommt es zu einer gesteigerten Expression von Ang-2. Dies führt zur Blockade des Effektes von Ang-1 und damit zur Aufhebung der Kontakte zwischen Perizyten oder Gefäßmuskelzellen (Maisonpierre et al., 1997) (Holash et al., 1999). Die Degradation der extrazellulären Matrix erfolgt durch den Einfluss von lokal aktivierten Matrix Metalloproteinasen. Es ist dabei gezeigt worden, dass vor allem die Matrix Metalloproteinase-9 den „angiogenic switch“ während der Karzinogenese triggert (Bergers et al., 2000). Die Destabilisierung erlaubt es, den Endothelzellen in die umliegende Matrix einzudringen, zu proliferieren und abschließend in Richtung des auslösenden Reizes zu migrieren. Viele migrierende Endothelzellen bilden ein Lumen als Vorstufe für ein neues Blutgefäß (Carmeliet, 2000). Der Status dieses Blutgefäßes wird als „unreif“ bezeichnet (Ferrara et al., 2003). Den letzten Schritt bilden die Anlagerung von Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen und damit die Stabilisierung der Gefäße sowie die Bildung der extrazellulären Matrix. Das Gefäßsystem von Tumoren ist durch eine „chaotische“ Struktur mit einem großen Anteil „unreifer“ Gefäße charakterisiert (Jain, 2003). Welche Bedeutung der eher funktionelle Parameter „Gefäßstabilität“ auf das Tumorstadium hat ist noch unklar. In einigen Tumoren führt die Überexpression von Ang-1 zur relativen Zunahme an reifen Blutgefäßen und zu einem verminderten Tumorstadium (Hawighorst et al., 2002b). Mit der Gefäßneubildung ist auch der hämatogene Streifen der Tumorzellen der Weg geebnet, da sie über die feinen Kapillaren den Primärtumor verlassen und sich andernorts als Mikrometastasen ansiedeln können. Die Mikrometastasen können zum Teil über mehrere Jahre in den jeweiligen Organen verbleiben, um später unter Ausbildung neuer Blutgefäße zu wachsen (Holmgren et al., 1995).

## 1.3 Endogene Angiogeneseinhibitoren und ihre Wirkungen

### 1.3.1 Überblick

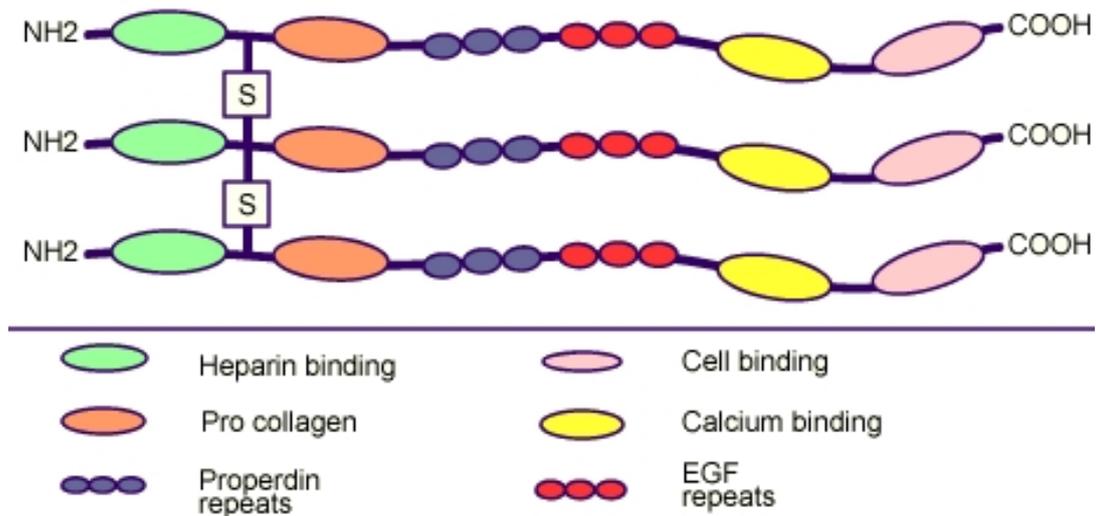
Die Gegenspieler zu den endogenen proangiogenen Faktoren sind die endogenen antiangiogenen Faktoren. Es sind bereits mehrere endogene Inhibitoren wie Angiostatin (O'Reilly et al., 1994), Endostatin (O'Reilly et al., 1997), Vasostatin (Pike et al., 1998), Thrombospondin-1 (Weinstat-Saslow et al., 1994), oder Thrombospondin-2 (Bornstein et al., 1991) identifiziert worden (Tabelle 1.2).

**Tabelle 1.2 Beispiele wichtiger antiangiogener Faktoren**

Angiostatin
Endostatin
Vasostatin
Pigment Epithelium-derived Factor (PEDF)
Tumstatin
Interleukin-18 (IL-18)
Interferon- $\alpha$
Thrombospondin-1 (TSP-1)
Thrombospondin-2 (TSP-2)

### 1.3.2 Thrombospondine

Die Thrombospondine (TSP) können strukturell in zwei unterschiedliche Subgruppen aufgeteilt werden (Adams and Lawler, 1993). Zum einen formen TSP-1 und TSP-2 eine disulfid-gebundene, homotrimere Struktur und zum anderen bilden TSP-3, TSP-4 und TSP-5 eine homopentamere Struktur (Adams, 2001). TSP-1 und TSP-2 sind strukturell verwandt und besitzen ähnliche Domänen. Beide bestehen N-terminal beginnend aus einer Heparin-bindenden Domäne, einer Prokollagen-homologen Domäne, drei Type-1-(Properdin)-Repeat Domänen, drei Type-2-(EGF-ähnlichen)-Repeat Domänen, sieben Type-3-(Calcium-bindenden)-Repeat Domänen und einer globulären C-terminalen Domäne (Adams and Lawler, 2004) (Abbildung 1.3)



**Abbildung 1.3 Strukturelle Darstellung des Grundgerüsts von Thrombospondin-1 und Thrombospondin-2**

Thrombospondin-1 und -2 bestehen N-terminal beginnend aus einer Heparin-bindenden Domäne, einer Prokollagen-homologen Domäne, drei Type-1-(Properdin)-Repeat Domänen, drei Type-2-(EGF-ähnlichen)-Repeat Domänen, sieben Type-3-(Calcium-bindenden)-Repeat Domänen und einer globulären C-terminalen Domäne

### 1.3.3 Thrombospondin-1 (TSP-1)

Über TSP-1 ist am meisten bekannt. TSP-1 lässt sich gut aus Thrombozyten isolieren (Cleazardin et al., 1984) und ist ein Glykoprotein mit einer Größe von 450 kDa. TSP-1 wird von verschiedenen Zellen sezerniert und befindet sich in der extrazellulären Matrix von verschiedenen Geweben (Adams, 1997). TSP-1 selbst bindet an zahlreiche matrizelluläre Proteine und Zelloberflächenrezeptoren. (Esemuede et al., 2004). TSP-1 ist eines der ersten identifizierten Proteine, welches die Angiogenese hemmt (Good et al., 1990). Dabei spielt der CD36 Rezeptor eine wichtige Rolle. Der CD36 Rezeptor ist ein 88 kDa großes transmembranes Glykoprotein mit einer großen extrazellulären Domäne und zahlreichen Bindungspartnern (Greenwalt et al., 1992). Er kommt auf Monozyten, Thrombozyten und mikrovaskulären Endothelzellen vor. Er bindet Plasmodium falciparum befallene Erythrozyten (Oquendo et al., 1989) und dient ebenfalls als „scavenger receptor“ zur Aufnahme von anionischen Phospholipiden (Rigotti et al., 1995) und oxidierten Lipoproteinen mit geringer Dichte (LDL) (Endemann et al., 1993). Durch die Arbeit von Swerlick et. al. ist gezeigt worden, dass CD36 auf humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) vorhanden ist

(Swerlick et al., 1992). Im Gegensatz dazu fehlt CD36 auf großen Gefäßendothelzellen wie humanen venösen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) (Petzelbauer et al., 1993) (Dawson et al., 1997). CD36 spielt eine Rolle in der Angiogenese, bei Atherosklerose, bei Entzündungen und beim Fettstoffwechsel (Febbraio et al., 2001). TSP-1 verfügt innerhalb des zweiten und dritten drei Type-1-Repeat über eine kurze Peptidsequenz (CSVTCG). Diese Sequenz ist für die Bindung am CD36 Rezeptor verantwortlich (Asch et al., 1992) (Leung et al., 1992) (Tuszynski et al., 1993). Es ist weiterhin gezeigt worden, dass TSP-1 *in vitro* die Kapillarbildung, die Proliferation und Migration von Endothelzellen und *in vivo* die Neovaskularisation hemmt (Tolsma et al., 1993). TSP-1 hemmt zudem die Karzinogenese, die Tumorangiogenese und die Metastasierung *in vivo* bei TSP-1 transgenen Mäusen (Hawighorst et al., 2002a). Implantierte Tumoren bei TSP-1-knockout Mäusen werden im Vergleich zu implantierten Tumoren bei Wildtyp-Mäusen ungefähr doppelt so groß (Lawler et al., 2001). TSP-1 ist einer der Hauptaktivatoren für das Zytokin TGF- $\beta$  (Crawford et al., 1998). Die TGF- $\beta$  aktivierenden Sequenzen sind für TSP-1 bereits ermittelt (Murphy-Ullrich and Poczatek, 2000). Zum einen wird durch TGF- $\beta$  die Progression von Tumoren gefördert (Wieser, 2001) (Jennings et al., 1997), zum anderen wird durch die Aktivierung von TGF- $\beta$  durch TSP-1 die Angiogenese und das Tumorstadium gehemmt (Yee et al., 2004). Zahlreiche Studien belegen, dass TSP-1 Fragmente, oder Proteine von TSP-1 die Apoptose in Endothelzellen induzieren (Guo et al., 1997) (Jimenez et al., 2000) (Nor et al., 2000), und dass hierbei dem CD36 Rezeptor eine bedeutende Rolle zukommt (Jimenez et al., 2000) (Volpert et al., 2002). Die Bindung von TSP-1 über seine CD36-bindenden Aminosäuresequenzen führt zur Einleitung von Apoptose bei Endothelzellen (Armstrong and Bornstein, 2003). Es ist festgestellt worden, dass der Einfluss von TSP-1 die Kinasen p38 und JNK aktivieren, die für den proapoptotischen Effekt von TSP-1 nötig sind (Jimenez et al., 2000) (Jimenez et al., 2001). Die Aktivierung von p38 induziert die Hochregulation des Fas Rezeptorliganden FasL, welcher an den Fas Rezeptor von angrenzenden Endothelzellen bindet, was Caspasen aktiviert, DNA fragmentiert und letztendlich zu Apoptose führt (Volpert et al., 2002). TSP-1 hemmt ferner die Angiogenese durch die Antagonisierung von mobilisiertem VEGF aus der extrazellulären Matrix und durch die direkte Bindung an VEGF (Gupta et al., 1999) (Rodriguez-Manzaneque et al., 2001). Die Hemmung von VEGF wird durch die Type-1-Repeats und anderen Domänen von TSP-1 verursacht. Die N-terminale Domäne

von TSP-1 konkurriert mit VEGF um die Bindung an Proteoglykanen von Endothelzellen (Gupta et al., 1999) (Margosio et al., 2003).

#### **1.3.4 Thrombospondin-2 (TSP-2)**

TSP-2 ist strukturell verwandt mit TSP-1 und ist zu 32 % homolog in der N-terminalen und zu 82 % homolog in der C-terminalen Domäne (Bornstein et al., 2000). TSP-2 ist ebenfalls ein homotrimeres Protein mit drei identischen TSP-2 Ketten (O'Rourke et al., 1992). TSP-2 besitzt eine Heparin-bindende Domäne und bindet an Heparin Sepharose (Chen et al., 1996). In der Maus kommt TSP-2 fast ausschließlich in bindegewebehaltigen Komponenten wie Knochen-, Knorpel-, Netzhaut-, Hirnhaut-, Bauchfell-, Herzbeutelgewebe, kleinen oder großen Blutgefäßen vor (Iruela-Arispe et al., 1993) (Tooney et al., 1998). TSP-2-knockout Mäuse entwickeln einen Phänotyp mit Veränderungen im Bindegewebe, einer gesteigerten Gefäßdichte und Blutungsneigung (Kyriakides et al., 1998).

Durch mehrere experimentelle Arbeiten konnte gezeigt werden, dass TSP-2 auch ein potenter Inhibitor der Angiogenese und des Wachstums von malignen Tumoren ist. Die Überexpression von TSP-2 in Plattenepithelkarzinomen führte zur Hemmung des Tumorwachstums in einem Xenotransplantationsmodell. Im Vergleich zu TSP-1 überexprimierenden Plattenepithelkarzinomen erschienen die antiangiogenen Effekte für TSP-2 dabei deutlich stärker zu sein (Streit et al., 1999). Durch ein mit retroviral transfizierten Fibroblasten beschichtetes und in Nacktmäuse transplantiertes Bioimplantat, wodurch *in vivo* eine erhöhte TSP-2 Serumspiegel erzielt werden konnte, wurde das Tumorwachstum von malignen Melanomen, Plattenepithelkarzinomen und Lewis Lunge Bronchiakarzinomen gehemmt (Streit et al., 2002). Während der chemisch induzierten Karzinogenese in der Haut von Mäusen kommt es zur Hochregulation der Expression von TSP-2 im Tumorstroma. Dies könnte ein potentieller Abwehrmechanismus gegen die Entwicklung und Progression von Plattenepithelkarzinomen durch antiangiogene Gegenregulation des Tumorstromas sein (Hawighorst et al., 2001), da das Fehlen von TSP-2 in entsprechenden knock-out Mäusen zu einer gesteigerten Entwicklung und Progression von Tumoren führte. TSP-2 bindet wie TSP-1 latentes TGF- $\beta$ . Dabei kommt es jedoch im Unterschied zu TSP-1 nicht zu einer Aktivierung von TGF- $\beta$ , da TSP-2 die aktivierende Domäne fehlt (Schultz-Cherry et al., 1995).

## **1.4 Antiangiogene Therapien**

### **1.4.1 Antikörper gegen VEGF**

Das Tumorwachstum und die Metastasierung sind abhängig von der Neubildung von Blutgefäßen (Folkman, 1971) (Detmar, 2000) (Carmeliet, 2005). Daher gehen die Forschungsbestrebungen dahin, geeignete Substanzen zur Hemmung der Tumorangio-genese zu entwickeln. Es existieren bereits zahlreiche Untersuchungen über antiangiogene Substanzen. Im Jahr 1993 konnte in Tierversuchen belegt werden, dass ein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen VEGF, dem bedeutendsten proangiogenen Faktor, das Tumorwachstum von xenotransplantierten Rhabdomyosarkomen, Glioblastomen und Leiomyosarkomen in Nacktmäusen hemmt (Kim et al., 1993). Nach intensiver Weiterentwicklung wurde dann im Laufe der Jahre ein humanisierter Antikörper gegen VEGF, das Bevacizumab, entwickelt. In mehreren klinischen Studien (Sandler, 2007) (Hurwitz et al., 2004) (Miller et al., 2007) konnte die Wirksamkeit von Bevacizumab nachgewiesen werden, so dass diese Substanz inzwischen in Kombination mit einer Chemotherapie zur Therapie unter anderem des Kolon- und des Mammakarzinoms zugelassen ist. Im Gegensatz zu einer konventionellen Chemotherapie zeigt sich bei einer Therapie mit Bevacizumab ein ganz neues Nebenwirkungsspektrum wie Hypertonie, Proteinurie, thromboembolische Ereignisse, gastrointestinale Perforation oder Wundheilungsstörungen.

## 2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, rekombinant ein 80 kDa großes N-terminales Proteinfragment des humanen endogenen Angiogeneseinhibitors Thrombospondin-2 herzustellen. Dies enthält N-terminal die Heparin-bindende Domäne, die Prokollagen-homologe Domäne und die drei Type-1-(Properdin)-Repeat Domänen. Das Proteinfragment soll als Fusionsprotein, gekoppelt an den Fc-Teil des humanen Antikörpermoleküls IgG<sub>2</sub>, hergestellt werden und wird nachfolgend in dieser Arbeit als NTF-TSP-2 bezeichnet. Die biologischen Effekte von NTF-TSP-2 sollen sowohl *in vitro* auf Endothelzellen als auch *in vivo* anhand eines etablierten Tumormodells näher analysiert werden. Dabei soll *in vitro* die Wirkung von NTF-TSP-2 auf die VEGF-induzierte Stimulation von Endothelzellen und die funktionelle Bedeutung des CD36 Rezeptors für die antiangiogenen Effekte untersucht werden. Zur Untersuchung des *in vivo* Effektes auf das Wachstum und die Progression von Mammakarzinomen werden Xenotransplantationsstudien mit spontan in die Lymphknoten und Lunge metastasierenden humanen MDA-MB-435 Brustkrebszellen durchgeführt. Im Rahmen dieser Untersuchungen soll in dieser Arbeit auch die Bioverfügbarkeit von NTF-TSP-2 nach intraperitonealer Injektion untersucht werden, indem die Blutserumkonzentrationen von NTF-TSP-2 anhand eines Inhibitions-ELISA ermittelt werden.

## 3 Material

### 3.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Alle Verbrauchsmaterialien wurden aufgrund der Sicherstellung von Reinheit und der Verhinderung von Kontaminationen als Einmalartikel verwendet. Falls sie nicht steril vorlagen, wurden sie vorher 20 Min bei einem Wasserdampfdruck von 2 bar und einer Temperatur von 121 °C mit einem Autoklaven autoklaviert. Alle Verbrauchsmaterialien und Geräte wurden von den Firmen Nunc, Sarstedt, greiner bio-one, Biozym, Tuttnauer, Heraeus, Biorad, Carl Roth, Sigma-Aldrich, Biorad, Kodak, B. Braun, Reichert Jung, BIO-TEK, BD, Optik-Labor, Mettler-Toledo, Schleicher & Schuell, Sartorius, Preisser, Olympus, Applied Biosystems und Eppendorf verwendet, falls nichts Anderes angegeben wird.

### 3.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nichts Anderes vermerkt wird, von den Firmen Merck, Invitrogen, Carl Roth, Sigma-Aldrich, Uptima, BDH, AbD Serotec, Roche, Biorad, Promocell, DAKO, GE Healthcare, R&D Systems, Leica, Alvetra, NEB, Biomol, Cambrex, Bayer und PAA bezogen. Die Chemikalien entsprechen dem höchsten zur Verfügung stehenden Reinheitsgrad, soweit nicht anders angegeben. Alle Chemikalien, die in der Zellkultur verwendet wurden, sind speziell für den Einsatz in der Zellkultur getestet. Alle für die Zellkultur verwendeten Lösungen wurden vor Benutzung durch einen Sterilfilter filtriert.

### 3.3 Molekularbiologisches Material

#### 3.3.1 Restriktionsendonukleasen

Bezeichnung	Erkennungssequenz	Hersteller
BamH I	5' – G↓GATTC – 3'	NEB
Bgl II	5' – A↓GATCT – 3'	NEB
Nhe I	5' – G↓CTAGC – 3'	NEB

### 3.3.2 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas
RNase (7000 U / ml)	Qiagen
T4 DNA Ligase	Roche

### 3.3.3 Molekularbiologische Kits

Bezeichnung	Hersteller
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)-Kit	Dako
BCA Protein Assay Kit	Pierce
ECL-Kit Immobilon™ Western	Millipore
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Fugene6	Roche
JC-1 Mitochondrial Membrane Detection Kit	Cell Technology Inc.
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Rapid DNA Ligation Kit	Roche
SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce

### 3.4 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit bidestilliertem Wasser hergestellt. Alle pH-Wert Messungen erfolgten mit dem pH-Messgerät nach Vorgaben des Herstellers.

#### APS-Lösung

APS	10 % (w / v)
Wasser	ad 10 ml

#### Blocking-Puffer

Magermilchpulver	5 % (w / v)
TBST-Puffer	ad 50 ml

#### Blotting-Puffer

Tris	3,03 g
Glycin	14,41 g
Methanol	20 % (v / v)
Wasser	ad 1000 ml

#### BSA-Lösung

BSA	1 % (w / v)
PBS-Puffer	ad 100 ml

## Dispase-Lösung

Dispase II	0,313 % (w / v)
Wasser	ad 1000 ml

## DNA-Ladepuffer

DNA	10 % (v / v)
Glycerin	50 % (v / v)
Tris-HCl	10 mM
Na-EDTA	1 mM
Bromphenolblau	0,25 % (w / v)
Xylencyanol	0,05 % (w / v)

## Ethidiumbromid-Lösung

Ethidiumbromid	1 % (w / v)
Tris	90 mM
Borsäure	90 mM
Na-EDTA	1 mM
Wasser	ad 100 ml

## Gelatine-Lösung

Gelatine	10 % (v / v)
Salzsäure (0,1 M) in Wasser	50 % (v / v)

## Gewebelysispuffer

Triton X-100	5 % (v / v)
NP40	1 % (v / v)
NaCl	100 mM
Tris-HCl	20 mM
Na-EDTA	2 mM
Protease Inhibitor Cocktail Set III	1 % (v / v)
Wasser	ad 50 ml
eingestellt auf pH = 7,5	

## Gewebeschnitt-Blockpuffer

BSA	10 % (w / v)
FCS	5 % (v / v)
PBS-Puffer	ad 100 ml

## Hanks'-Puffer

Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin 10.000 µg/ml) in 0,85 % NaCl in Wasser	5 % (v / v)
Nystatin (10.000 U/ml) in PBS-Puffer	0,1 % (v / v)
Hanks' BSS Lösung ohne Magnesium, Calcium und Phenolrot	ad 500 ml

## Ladepuffer (20 mM)

Natriumphosphat	3,29 g
Wasser	ad 1000 ml
eingestellt auf pH = 7,0	

## Laemmli-Puffer

Proteinlösung	50 % (v / v)
Glycerin	5 % (v / v)
Tris-HCl	62,5 mM
SDS	4 % (w / v)
Bromphenolblau	0,025 % (w / v)
2-Mercaptoethanol	0,05 % (v / v)

## Ligationspuffer

Vektor DNA	0,5 µg
NTF-TSP-2 cDNA	1,5 µg
DNA Dilution Buffer	10 % (v / v)
DNA Ligation Buffer	10 % (v / v)
T4 DNA Ligase	2 U
Wasser	ad 25 µl

## Nicoletti-Lösung

Triton X-100	0,1 % (v / v)
Na-Citrat	0,1 % (w / v)
Propidiumiodid	0,005 % (w / v)
Wasser	ad 50 ml

## PBS-Puffer

Natriumchlorid	8,01 g
Kaliumchlorid	0,2 g
Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	1,81 g
Kalium-dihydrogenphosphat	0,24 g
Wasser	ad 1000 ml
eingestellt auf pH = 7,4	

## Peroxid-Lösung

Wasserstoffperoxid-Lösung	1 ml
Wasser	ad 50 ml

## PFA-Lösung

Paraformaldehyd	4 % (w / v)
PBS-Puffer	ad 100 ml

## PMSF-Lösung (1M)

PMSF	1,74 g
DMSO	ad 10 ml

## Puromycin-Lösung

Puromycin	2,5 % (w / v)
Wasser	ad 1000 µl

**Restriktionspuffer**

Vektor DNA	2,5 µg
Restriktionsendonukleasen	10 U / Enzym
NEBuffer 2	10 % (v / v)
Wasser	ad 25 µl

**SDS-Elektrophorese-Puffer**

Tris	2,5 mM
Glycin	0,01 % (w / v)
SDS-Lösung	1 % (v / v)
Wasser	ad 500 ml

**SDS-Lösung**

SDS	10 % (w / v)
Wasser	ad 10 ml

**TBE-Puffer**

Tris	90 mM
Borsäure	90 mM
Na-EDTA	1 mM
Wasser	ad 1000 ml
eingestellt auf pH = 8,0	

**TBST-Blockpuffer**

BSA	3 % (w / v)
TBST-Puffer	ad 50 ml

**TBST-Puffer**

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Tris	3 g
Tween 20	5 % (v / v)
Wasser	ad 1000 ml
eingestellt auf pH = 7,4	

**Tris-Lösung**

Tris	1,5 mM
Wasser	ad 10 ml

**Tris-Neutralisationspuffer (1M)**

Tris-HCl	157,60 g
Wasser	ad 1000 ml
eingestellt auf pH = 9,0	

**3.5 Zelllinien**

Bezeichnung	Hersteller
E. coli One Shot® TOP10	Invitrogen
Humane Brustkrebszellen MDA-MB-435 (MDA-MB-435)	ATCC
Humane Dermale Mikrovaskuläre Endothelzellen aus der Vorhaut (HDMEC)	Promocell
Humane Embryonale Nierenzellen 293 (HEK 293)	Invitrogen
Humane Venöse Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)	Eigene Isolierung

Es wurden nur HDMEC und HUVEC verwendet, die nicht länger als 6 Wochen in Kultur waren.

### 3.6 Zellkulturmedien

#### 3.6.1 Basalmedien

Bezeichnung	Hersteller
D-MEM/F-12 (1:1) mit GlutaMAX™	Invitrogen
D-MEM/F-12 (1:1), mit L-Glutamine, ohne Phenolrot	Invitrogen
Endothelial Cell Basal Medium	Promocell
Endothelial Cell Basal Medium MV	Promocell

#### 3.6.2 Wachstumsmedien

##### 293-Selektionssmedium

Puromycin-Lösung	15 µl
Fungizone®	0,3 % (v / v)
HEPES Lösung	0,6 % (v / v)
Penicillin / Streptomycin	1 % (v / v)
FCS (Biochrom)	10 % (v / v)
D-MEM/F-12 (1:1) mit GlutaMAX™	ad 500 ml

##### 293-Transfektionsmedium

Puromycin-Lösung	45 µl
Fungizone®	0,3 % (v / v)
HEPES Lösung	0,6 % (v / v)
Penicillin / Streptomycin	1 % (v / v)
FCS (Biochrom)	10 % (v / v)
D-MEM/F-12 (1:1) mit GlutaMAX™	ad 500 ml

##### 293-Wachstumsmedium

Fungizone®	0,3 % (v / v)
HEPES Lösung	0,6 % (v / v)
Penicillin / Streptomycin	1 % (v / v)
FCS (Biochrom)	10 % (v / v)
D-MEM/F-12 (1:1) mit GlutaMAX™	ad 500 ml

## HDMEC-Wachstumsmedium

Endothelial Cell Growth Supplement / Heparin	0,004 ml / ml
Humaner Epidermal Growth Factor, rekombinant	10 ng / ml
Hydrocortison	1 µg / ml
Phenolrot	0,62 ng / ml
FCS (Promocell)	0,05 ml / ml
Endothelial Cell Basal Medium MV	ad 500 ml

## HUVEC-Wachstumsmedium

Humaner basic Fibroblast Growth Factor, rekombinant	1 ng / ml
Endothelial Cell Growth Supplement / Heparin	0,004 ml / ml
Humaner Epidermal Growth Factor, rekombinant	0,1 ng / ml
Hydrocortison	1 µg / ml
Phenolrot	0,62 ng / ml
FCS (Promocell)	0,02 ml / ml
Endothelial Cell Basal Medium	ad 500 ml

## MDA-Proliferationsmedium

Penicillin / Streptomycin	1 % (v / v)
FCS (Biochrom)	2 % (v / v)
D-MEM/F-12 (1:1), mit L-Glutamine, ohne Phenolrot	ad 500 ml

## MDA-Wachstumsmedium

Penicillin / Streptomycin	1 % (v / v)
FCS (Biochrom)	10 % (v / v)
D-MEM/F-12 (1:1) mit GlutaMAX™	ad 500 ml

**3.6.3 FCS-freie Medien**

## 293-FCS-frei-Selektionssmedium

Puromycin-Lösung	15 µl
Fungizone®	0,3 % (v / v)
HEPES Lösung	0,6 % (v / v)
Penicillin / Streptomycin	1 % (v / v)
D-MEM/F-12 (1:1) mit GlutaMAX™	ad 500 ml

### 3.7 Mausstamm

Bezeichnung	Genotyp	Alter	Produzent
athymische Nacktmaus	Nude-Foxn1 nu	4 bis 8 Wochen	Harlan Winkelmann

### 3.8 Antikörper

#### 3.8.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Konzentration	Herkunft	Anwendung	Hersteller
Anti-Actin (human)	1:1000 in TBST-Blockpuffer	Kaninchen, Serum	Western Blot	Sigma
Anti-aktive Caspase-3 (human)	1:2000 in TBST-Blockpuffer	Kaninchen, polyklonal	Western Blot	BD
Anti-CD31 (murin)	1:50 in Gewebeschnitt-Blockpuffer	Ratte, monoklonal	IHC	BD
Anti-CD36 (human)	10 µg / ml in Gewebeschnitt-Blockpuffer	Maus, monoklonal	IF	Abcam
Anti-TSP-2 (human)	1:30000 in TBST-Blockpuffer	Ziege, polyklonal	Western Blot	Santa Cruz
Anti-TSP-2 (human)	2,5 ng pro Loch	Ziege, polyklonal,	Inhibitions- ELISA	R&D
Anti-TSP-2 (human)	2,5 µg	Ziege, polyklonal,	IP	Santa Cruz
Anti-Zytokeratin- 19 (human)	1:250 in Gewebeschnitt-Blockpuffer	Kaninchen, polyklonal	IHC	Abcam

#### 3.8.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Herkunft	Anwendung	Hersteller
Anti-Kaninchen (HRP-gek.)	1:10000 in TBST-Puffer	Affe	Western Blot	GE
Anti-Kaninchen (HRP-gek.)	1:200 in Gewebeschnitt-Blockpuffer	Affe	IHC	Invitrogen
Anti-Maus (Alexa- gek., Rot, 594)	1:200 in Gewebeschnitt-Blockpuffer	Esel	IF	Invitrogen

Anti-Ratte (HRP-gek.)	1:100 in Gewebeschnitt-Blockpuffer	Maus	IHC	BD
Anti-Ziege (HRP-gek.)	1:20000 in TBST-Puffer	Maus	Western Blot	Sigma
Anti-Ziege (HRP-gek.)	1:2000 in PBS-Puffer	Maus	Inhibitions-ELISA	Sigma
Anti-Ziege (HRP-gek.)	1:100 in Gewebeschnitt-Blockpuffer	Maus	IHC	Sigma

### 3.9 Real-time PCR

#### 3.9.1 Puffer und Kits

Bezeichnung	Hersteller
18S rRNA Control Kit	Eurogentec
TaqMan <sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (2x)	Applied Biosystems

#### 3.9.2 Oligonukleotide

Bezeichnung	Basensequenz	Hersteller
Alu-Fw-Primer	5' - cat ggt gaa acc ccg tct cta -3'	Eurogentec
Alu-Rv-Primer	5' - gcc tca gcc tcc cga gta g -3'	Eurogentec

#### 3.9.3 Taqman<sup>®</sup>-Sonden

Bezeichnung	Basensequenz	Hersteller
Alu-Sonde	5'-[YY]- att agc cgg gcg tgg tgg cg -[BHQ-1]-3'	Eurogentec

### 3.10 Software

Bezeichnung	Hersteller
analySIS getIT (Version 5.0)	Olympus
CellQuest <sup>™</sup> Software (Version 3.0)	BD Biosciences
GraphPad Prism <sup>®</sup> (Version 4.03)	GraphPad Software
IPLab	Scanalytics Inc.
KC4 <sup>™</sup> Synergy HT	BIO-TEK
Kodak Digital Science 1D Image Analyse Software 2.0.3	Kodak
Photoshop CS3 Extended	Adobe
Sequence Detection Systems software 1.9.1	Applied Biosystems
SigmaPlot (Version 8.02)	Systat Software

## 4 Methoden

### 4.1 Zellkultivierung adhärenter Zellen

Alle verwendeten Zellen wurden in ihrem Kulturmedium in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Anteil in Luft kultiviert. Die Kultivierung fand je nach Versuchsreihe in passenden sterilen Zellkulturbehältnissen und speziellen Zellkulturmedien statt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter aseptischen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank.

#### 4.1.1 Behandlung der Zelllinien

Je nach Wachstumseigenschaft der Zelllinie wurden die Zellen für die verschiedenen Versuchsreihen entweder passagiert, expandiert oder in dem entsprechenden Wachstumsmedium mit 5 % DMSO bei -80°C oder bei -196°C in flüssigem Stickstoff je nach Bedarf kurzzeitgelagert. Kultivierte Zellen wurden dabei einmal mit PBS-Puffer gespült und 5 Min. bei 37°C mit Trypsin-Lösung behandelt. Auf der Plastikoberfläche adhärent wachsende Zellen wurden dadurch in ihrer Bindung zur Oberfläche gelöst. Die Aktivität der Trypsin-Lösung wurde durch Zugabe von entsprechendem Wachstumsmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde 5 Min. bei 1200 UPM zentrifugiert, der Mediumüberstand abgenommen und der vorliegende Zellhaufen in entsprechendem Wachstumsmedium suspendiert. Diese Zellsuspension konnte dann für eine Expansion, Passagierung oder zum Einfrieren verwendet werden.

#### 4.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl einer homogenen Zellsuspension erfolgte mit einer Neubauer Zählkammer nach Vorgaben des Herstellers. Die Auszählung von toten Zellen wurde durch die Verwendung von Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:2 verhindert. Durch die Zugabe von Trypanblau-Lösung sind die vitalen Zellen deutlich von den blau gefärbten, toten Zellen zu unterscheiden.

#### 4.1.3 Bestimmung der Proliferation von humanen Brustkrebszellen MDA-MB-435

Zur Untersuchung der Zellproliferation wurden humane MDA-MB-435 Brustkrebszellen in einer 96er-Lochplatte in MDA-Wachstumsmedium kultiviert. Sobald die Zellen die Oberfläche eines Lochs zu 40 % bedeckten, wurde das MDA-

Wachstumsmedium gegen MDA-Proliferationsmedium ausgetauscht und die Zellen damit täglich über 8 Tage stimuliert. Nach 8 Tagen wurde die Zellproliferation unter Zugabe von AlamarBlue™ Lösung nach Vorgaben des Herstellers bestimmt. Dieses Verfahren beruht auf der Methode von Ahmed et al. (Ahmed et al., 1994). Dabei wird der Redox-Indikator Resazurin, der in oxidierten Form blau ist, in seine reduzierte Form (Resorufin), die rot ist, umgewandelt. Eine erhöhte metabolische Aktivität von Zellen führt zu einer vermehrt reduzierten Umgebung als Ursache vermehrter Atmungsaktivität. Das führt bei Inkubation der Zellen mit AlamarBlue™ Lösung zu einer erhöhten Umwandlung des Redox-Indikators in seine reduzierte Form. Je höher die Proliferation und somit die Vitalität der Zellen ist, desto stärker ist der Farbumschlag von blau zu rot. Der Farbunterschied wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm mit dem Multi-Detection Microplate Reader Synergy HT vermessen und dargestellt. Es wurden pro Stimulus 20 Löcher vermessen.

#### **4.1.4 Isolierung von HUVEC**

In beide Enden einer von der Plazentaoberfläche (nach Geburt) entfernten Nabelvene (aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Georg-August-Universität Göttingen) wurde jeweils eine Knopfkanüle mit geschlossenem Discofix Dreiwegehahn eingesetzt und fixiert. Die Vene wurde von innen mit Hanks'-Puffer gespült. Nach dem Spülen wurde die Vene mit Dispase-Lösung befüllt, der Dreiwegehahn geschlossen und für 30 Min. bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden Zellkulturflaschen mit Gelatine-Lösung für 30 Min. bei 37°C inkubiert und danach dreimal mit PBS-Puffer gespült. Die Nabelvene wurde nach der Inkubationszeit mit den Fingern kurz massiert. Die sich in der Vene befindende Dispase-Lösung wurde in ein Einmalröhrchen gefüllt und 5 Min bei 1200 UPM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die verbliebenen Zellen in HUVEC-Wachstumsmedium suspendiert und in den mit Gelatine-Lösung vorbehandelten Zellkulturflaschen kultiviert.

## **4.2 DNA Konzentrationsbestimmung**

Die DNA Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, da Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum zeigen. Je höher die Absorption, desto höher ist die DNA Konzentration. Beträgt der Wert der gemessenen Extinktion 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm, so beträgt die DNA Konzentration 50 µg / ml.

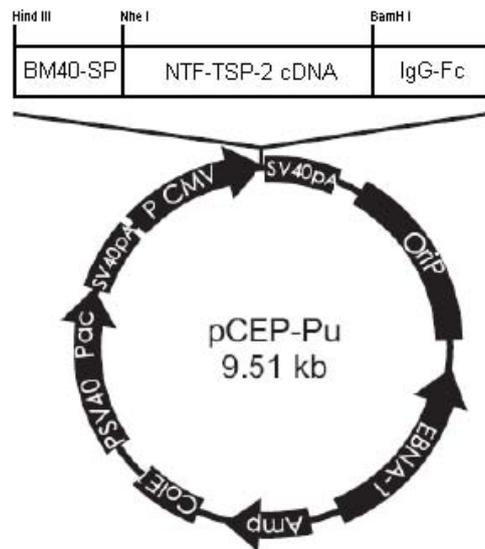
## 4.3 Rekombinante Herstellung von NTF-TSP-2

### 4.3.1 Restriktion

Die DNA Sequenz für die rekombinante Herstellung des 80 kDa großen N-terminalen Proteinfragmentes von humanem Thrombospondin-2 wurde aus einem bereits vorliegenden Vektor (Manuel Koch, Köln) isoliert. Der Vektor wurde in Restriktionspuffer 4 Stunden bei 37°C mit den Restriktionsendonukleasen Bgl II und Nhe I behandelt. Die Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors erfolgte unter Zugabe von 1U alkalischer Phosphatase für 1 h bei 37°C, damit eine Religation des Vektors verhindert wird (Siddiqui, 1982).

Die geschnittene DNA Sequenz des 80 kDa großen N-terminalen Proteinfragmentes von humanem Thrombospondin-2 wurde mit DNA-Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung der DNA Bestandteile erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese nach McDonnell et al. (McDonnell et al., 1977). Das Agarose Gel wurde durch Aufkochen von TBE-Puffer unter Zusatz von 10 % Agarose (w / v) hergestellt. Die Auftrennung erfolgte mit einer Elektrophorese-Apparatur bei 85 V<sub>const</sub> für 45 Min. unter Zusatz von TBE-Puffer und 0,01 % (v / v) Ethidiumbromid-Lösung. Zur Abschätzung der DNA Größe wurde ein DNA-Größenmarker auf das Gel aufgetragen. Die aufgetrennte DNA ließ sich bei einer Wellenlänge von 302 nm in dem Gel als Bande visualisieren und wurde dann mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Vorgaben des Herstellers isoliert.

Für die rekombinante Herstellung stand ein modifizierter pCEP-4 Expressionsvektor zur Verfügung (Kohfeldt et al., 1997). Die Modifikationen beinhalten das Einfügen einer Signalpeptidsequenz, einer Sequenz zur Ausbildung einer Puromycin- und Ampicillin-Resistenz. Der Expressionsvektor wurde 4 Stunden bei 37°C in Restriktionspuffer mit den Restriktionsendonukleasen BamH I und Nhe I behandelt. Dieser Ansatz wurde ebenfalls mit 1 U alkalischer Phosphatase für 1 h bei 37°C behandelt, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Es erfolgte die Isolierung des geschnittenen Vektors mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Vorgaben des Herstellers. Die Restriktion des Expressionsvektors mit BamH I und Nhe I führt zur Spaltung der DNA Sequenz in der Polylinkerregion.



**Abbildung 4.1 Schematische Darstellung des NTF-TSP-2 Expressionsvektors**

Als Grundgerüst wird ein bereits bestehender Expressionsvektor mit einem Cytomegalievirus Promoter (P-CMV), einem Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA-1) und einer Puromycinresistenzsequenz verwendet (Kohfeldt et al., 1997). Hinter der Promotersequenz befindet sich die Sequenz für das Signalpeptid (BM40-SP), gefolgt von der cDNA des 80 kDa TSP-2 Fragmentes und der cDNA für das Fc-Teil von humanem IgG<sub>2</sub> (IgG-Fc).

#### 4.3.2 Ligation

Die oben beschriebene Behandlung des modifizierten pCEP-4 Expressionsvektors und der cDNA des 80 kDa TSP-2 Fragmentes mit den Restriktionsendonukleasen führte zu entsprechenden „sticky ends“, so dass die DNA Sequenz des 80 kDa TSP-2 Fragmentes in den gespaltenen Expressionsvektor durch das Ligationsenzym T4 DNA Ligase bei 37°C und 5 Minuten in Ligationspuffer eingefügt werden konnte. An die cDNA des 80 kDa TSP-2 Fragmentes schließt sich die cDNA von humanem IgG<sub>2</sub>-Fc an. Der neu produzierte NTF-TSP-2 Expressionsvektor, der in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt wird, wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Vorgaben des Herstellers isoliert.

#### 4.3.3 Transformation von E. coli One Shot<sup>®</sup> TOP10

Für die Transformation wurden chemisch kompetente E. coli One Shot<sup>®</sup> TOP10 eingesetzt. Die Zellen wurden mit 5 µl des isolierten NTF-TSP-2 Expressionsvektors nach Ligation versetzt und 5 Min auf Eis inkubiert. Danach folgte eine Inkubation bei 42°C für 2 Min und eine anschließende Inkubation für 5 Min bei 4°C. Dieser Ansatz wurde auf eine LB Agar Platten ausgesät, die das Antibiotikum Ampicillin in einer

Konzentration von 100 µg / ml enthielten. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auf den Platten bildeten sich nach Inkubation an einigen Stellen E. coli Kolonien, die nur wachsen konnten, wenn sie den NTF-TSP-2 Expressionsvektor mit einer DNA Sequenz für eine Ampicillin Resistenz enthielten (Zhao et al., 2007). Zur Vervielfältigung einer einzelnen E. coli Kolonie wurden 100 ml LB Medium mit Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg / ml mit einem Teil der Kolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **4.3.4 Produktion des NTF-TSP-2 Expressionsvektors**

Zur Vervielfältigung des NTF-TSP-2 Expressionsvektors wurde die über Nacht gewachsene E. coli Bakterienkultur mit der Zentrifuge Biofuge pico bei 5000 UPM für 15 Min bei 4°C zentrifugiert und mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit nach Vorgaben des Herstellers isoliert. Die DNA Konzentration des isolierten NTF-TSP-2 Expressionsvektors wurde bestimmt.

#### **4.3.5 Transfektion**

Für die rekombinante Herstellung von NTF-TSP-2 wurden HEK 293 stabil mit 1 µg NTF-TSP-2 Expressionsvektor DNA transfiziert. Dabei wurde das Transfektionsreagenz Fugene6 eingesetzt und die Transfektion nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die Transfektion basiert auf der Arbeit von Felgner et. al. Dabei bilden positiv geladene Lipide Membranvesikel, die DNA binden. Dieser stabile Komplex kann dadurch an negativ geladene Zellmembranen binden und dadurch in die Zielzelle eingeschleust werden (Felgner et al., 1987). Die Kultivierung von HEK 293 fand in 293-Wachstumsmedium statt. Für die Transfektion wurde 293-Transfektionsmedium verwendet.

#### **4.3.6 Kultivierung**

Die Kultivierung der transfizierten HEK 293 fand in großem Maßstab in Dreifachboden-Zellkulturflaschen statt. Die Zellen wurden in 293-Selektionsmedium kultiviert und expandiert. Nach gewünschter Expansion der Zellen wurde das Wachstumsmedium durch FCS-freies Medium ersetzt. Die Zellen wurden nun in 293-FCS-frei-Selektionsmedium kultiviert. Die Zellen konnten durch die Kultivierung in 293-FCS-frei-Selektionsmedium NTF-TSP-2 in den Mediumüberstand abgeben. Nach 48 h wurde der Mediumüberstand durch neu angesetztes 293-FCS-frei-

Selektionsmedium ersetzt und verworfen. Der Mediumüberstand wurde dann jeweils in Abständen von 48 h durch neu angesetztes 293-FCS-frei-Selektionsmedium ersetzt, mit PMSF-Lösung in einem Anteil von 0,05 % versetzt und gesammelt. Der Mediumüberstand wurde sechs Mal gewechselt und bei -20°C gelagert

#### **4.3.7 Proteinaufreinigung**

Der gesammelte eingefrorene Mediumüberstand wurde bei 4°C aufgetaut und zur Beseitigung von Zellresten durch einen Rundfilter filtriert. Das filtrierte Medium wurde nun bei 4°C über zwei in Reihe geschaltete Säulen geleitet. Dabei wurde das Verfahren der Affinitätschromatographie angewendet. Das Medium lief zuerst über eine Vorsäule, die mit Gelatin Sepharose befüllt war. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um im Mediumüberstand enthaltenes Fibronectin zu binden (Zardi et al., 1980). Der Mediumüberstand lief dann durch die Hauptsäule, die mit Protein G Sepharose befüllt war. NTF-TSP-2 konnte durch die Kopplung an den Fc-Teil von humanem IgG<sub>2</sub> an Protein G Sepharose binden (Bjorck and Kronvall, 1984). Nach mehreren Waschschritten mit Ladepuffer wurde das an Protein G Sepharose gebundene NTF-TSP-2 Fusionsprotein durch Behandlung mit Immunopure IgG Elution Buffer gelöst. Die Proteinlösung wurde dann sofort mit Tris-Neutralisationspuffer auf pH = 7,0 neutralisiert.

#### **4.3.8 Dialyse**

Die isolierte NTF-TSP-2 Proteinlösung wurde zur weiteren Verwendung in einem Dialyseschlauch für 48 h bei 4°C in PBS-Puffer inkubiert. Das Volumen an PBS-Puffer entsprach bei der Dialyse der hundertfachen Volumenmenge an Proteinlösung. Der PBS-Puffer wurde zweimal gegen neu angesetzten PBS-Puffer ausgetauscht. Bei dieser Methode nähert sich die Salzkonzentration der NTF-TSP-2 Proteinlösung der Salzkonzentration von PBS-Puffer an. Die NTF-TSP-2 Proteinlösung wurde bei -80°C gelagert.

### **4.4 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit nach Vorgaben des Herstellers. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Methode nach Smith et. al. (Smith et al., 1985). Bei der beschriebenen Reaktion reduzieren Proteine unter alkalischen Bedingungen zweiwertige Kupferionen zu

einwertigen Kupferionen. Reduzierte Kupfer-Ionen bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen blauen, wasserlöslichen Chelatkomplex. Dieser Chelatkomplex hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Proteinlösungen wurden mit dem Chelatkomplex 30 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch mit dem Multi-Detection Microplate Reader Synergy HT bestimmt. Die Proteinkonzentrationen wurden durch einen Vergleich mit der Vermessung einer BSA-Standardverdünnungsreihe im Bereich von 0 bis 500 µg / ml BSA in PBS-Puffer bestimmt. Die Darstellung der Messwerte erfolgte mit der Software KC4™ Synergy HT.

#### 4.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Verschieden große Proteine können in Lösung nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dazu bedient man sich der Methode nach Laemmli (Laemmli, 1970). Die Proteine wurden 5 Min. bei 95°C in Laemmli-Puffer denaturiert und auf 4°C abgekühlt. Der Zusatz des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) führt zur Anlagerung von SDS an das Protein, wodurch dessen Eigenladung überdeckt wird. Dieser negativ geladene SDS-Protein-Komplex kann nun im elektrischen Feld wandern.

**Tabelle 4.1 Sammelgel**

Wasser	3,1 ml
Prosieve 50 Acrylamid Mix Gel Solution	0,5 ml
Tris-Lösung, pH = 8,8	1,3 ml
SDS-Lösung	50 µl
APS-Lösung	50 µl
TEMED	4 µl

**Tabelle 4.2 Trenngel 10 %**

Wasser	5,3 ml
Prosieve 50 Gel Solution	2,0 ml
Tris-Lösung, pH = 6,8	2,5 ml
SDS-Lösung	100 µl
APS-Lösung	100 µl
TEMED	4 µl

**Tabelle 4.3 Trenngel 14 %**

Wasser	4,8 ml
Prosieve 50 Gel Solution	2,5 ml
Tris-Lösung, pH = 6,8	2,5 ml
SDS-Lösung	100 $\mu$ l
APS-Lösung	100 $\mu$ l
TEMED	4 $\mu$ l

Die zu vermessenden SDS-Protein-Komplexe wurden auf ein Sammelgel (Tabelle 4.1) geladen und dann in durch ein Trenngel (Tabelle 4.2) (Tabelle 4.3) aufgetrennt. Zur Abschätzung der Größe der Proteine wurde der Proteinmolekularmassenmarker ebenfalls auf das Trenngel geladen. Die Elektrophorese erfolgte wenn nichts anderes vermerkt wurde für 30 Min. bei 80  $V_{\text{const}}$  und anschließend für 1 h bei 150  $V_{\text{const}}$  in SDS-Elektrophorese-Puffer in einer Elektrophorese-Kammer.

#### 4.6 Western Blot

Die durch das Gel aufgetrennten Proteine wurden in einer Blotting-Kammer bei 4°C und 100  $V_{\text{const}}$  in Blotting-Puffer für 1 h auf eine PVDF-Membran übertragen, um sie dann durch spezifische Antikörperreaktionen nachweisen zu können. Dabei bediente man sich der Methode nach Towbin et. al. (Towbin et al., 1979). Die Membran wurde nach dem Proteintransfer für 5 Min bei 22°C in TBST-Puffer gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation der Membran für 45 Min. bei 22°C in Blocking-Puffer. Dieser Schritt wurde für die Absättigung von Bindungsstellen auf der Membran benötigt, an denen unspezifische Antikörperreaktionen stattfinden konnten. Danach wurde die Membran für 5 Min. bei 22°C in TBST-Puffer gewaschen. Die Membran wurde dann über Nacht bei 4°C mit einem Primärantikörper inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte à 10 Min. bei 22°C in TBST-Puffer. Anschließend erfolgte für 2 h bei 22°C die Inkubation der Membran mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Es folgten 3 Waschschrte à 10 Min. bei 22°C in TBST-Puffer. Zur Detektion der gebundenen Sekundärantikörper wurde die Membranen 5 Min. bei 22°C mit dem ECL-Kit Immobilon™ Western nach Vorgaben des Herstellers behandelt. Das in dem Kit enthaltene Reagenz wurde katalytisch durch Peroxidase umgesetzt, was zu einer Lichtreaktion mit einem Maximum bei 430 nm führt. Durch diese Reaktion wurden Röntgenfilme belichtet und danach für eine dauerhafte

Visualisierung der Lichtsignale mit einer Filmentwicklungsmaschine entwickelt. Für eine erneute Inkubation einer mit Protein beladenen Membran mit Primärantikörper wurde die Membran von bereits gebundenen Antikörpern befreit. Dazu wurde die Membran für 15 Min. bei 22°C mit Antibody Stripping Buffer bei 1000 UPM behandelt. Der Antibody Stripping Buffer löst durch diese Methode die Bindung zwischen Antikörper und Proteinen auf der Membran. Die Membran wurde dann dreimal jeweils für 5 Min. bei 22°C mit Wasser und dann 5 Min. mit TBST-Puffer gewaschen. Es folgte dann erneut die Inkubation in Blocking-Puffer mit anschließender Primär- und Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper Inkubation wie bereits oben beschrieben.

#### **4.7 Tube Formation Assay**

Zur Untersuchung von Angiogenese *in vitro* wurden HDMEC in HDMEC-Wachstumsmedium kultiviert. 50  $\mu$  Matrigel (Timpl et al., 1979) wurden bei 4°C in jeweils ein Loch einer 96er-Lochplatte gegeben. Das Matrigel härtete innerhalb von 30 Min. bei 37°C aus. Die kultivierten HDMEC wurden auf eine Konzentration von 10.000 Zellen in 100  $\mu$ l HDMEC-Wachstumsmedium gebracht und jeweils 100  $\mu$ l dieser Zellsuspension in ein Loch der mit Matrigel behandelten 96er-Lochplatte gegeben und mit 20 ng / ml VEGF<sub>165</sub> stimuliert. Das Endvolumen betrug pro Loch 150  $\mu$ l. Die Auswertung des Versuches erfolgte nach 12 h mit dem Mikroskop IX51 bei einer 4-fachen Vergrößerung. Es wurde die Gesamtlänge der gebildeten Endothelzellröhren pro Bildausschnitt mit Hilfe der Software Photoshop CS3 Extended bestimmt.

#### **4.8 Tierexperimente**

##### **4.8.1 Haltungsbedingungen**

Alle Tierexperimente wurden mit athymischen Nacktmäusen durchgeführt, die unter standardisierten Umweltbedingungen gehalten wurden. Es wurde ein Tag-Nacht-Zyklus eingehalten mit Licht über 12 Stunden und einer Temperatur von 20°C. Das Durchschnittsgewicht der Nacktmäuse betrug 20 Gramm. Die Nacktmäuse wurden in speziellen Käfigen mit Filterhaube gehalten. Die Höchstanzahl pro Käfig betrug 5 Nacktmäuse. Sie wurden mit autoklaviertem Wasser und Vollnahrung ad libitum versorgt. Alle *in vivo* Tumorversuche wurden im Einklang mit den ethischen Richtlinien

und den Anforderungen für den Tierschutz an der Universitätsklinik Göttingen durchgeführt. Eine entsprechende Genehmigung lag vor.

#### 4.8.2 Betäubung

Die Betäubung einer Nacktmaus vor einem Tierexperiment erfolgte durch intraperitoneale Injektion eines Gemisches aus 50 mg / kg KG Ketaminhydrochlorid und 2 mg / kg KG Xylazinhydrochlorid in isotonischer Kochsalzlösung. Vor jeder Injektion wurde die Injektionsstelle mit Softasept N Lösung desinfiziert.

#### 4.8.3 Präparation und Inokulation von Tumorzellen

Humane Brustkrebszellen MDA-MB-435, die spontan in die Lunge und Lymphknoten metastasieren (Price et al., 1990), wurden für die Tierexperimente verwendet. Die Zellen wurden in benötigter Anzahl vor dem Versuch kultiviert und expandiert. Für die Versuche wurden nur Zellen verwendet, die die Oberfläche der Zellkulturbehältnisse in einer Einzelschicht in einem Anteil von nicht mehr als 75 % bedeckten. Die Zellen wurden abgelöst und gezählt. Die Suspendierung der Zellen erfolgte in diesem Fall in dem Basalmedium DMEM/F-12 (1:1) mit GlutaMAX™. Die Zellzahl wurde auf 1.000.000 Zellen in 100 µl Basalmedium eingestellt. Diese Zellsuspension wurde zur weiteren Injektion in eine 1 ml Spritze gefüllt. Nach Betäubung der Nacktmäuse wurde die Zellsuspension in das Fettgewebe der zweiten Brustdrüse auf der linken und rechten Seite injiziert, so dass jeweils 1.000.000 in beide Brustdrüsen inokuliert wurden. Bereits nach 6 Tagen war ein Tumorwachstum in der Brust zu erkennen.

#### 4.8.4 Tumorumfangmessung

Das Volumen der Tumoren (V) wurde mit einem Messschieber nach der Methode von Streit. et al. (Streit et al., 1999) vermessen.

$$V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left(\frac{1}{2} \cdot b\right)^2 \cdot \frac{1}{2} \cdot a$$

##### Formel 4.1 Formel zur Berechnung des Tumorumfangs

V = Tumorumfang, a = größter Längendurchmesser des Tumors, b = größter Breitendurchmesser des Tumors

Dabei wurde der größte Längendurchmesser (a) und im rechten Winkel dazu der größte Breitendurchmesser (b) bestimmt. Das Volumen wurde dann mit Formel 4.1 berechnet (Hawighorst et al., 2002b):

#### **4.8.5 Dosisfindungsversuch**

Die Anzahl an Nacktmäusen betrug 3 Tiere pro Gruppe. An Tag 6 nach Tumorzellinokulation wurden sie im Abstand von 24 h durch intraperitoneale Injektion verschieden therapiert. Drei Gruppen wurden jeweils mit drei unterschiedlichen Dosen an NTF-TSP-2 Proteinlösung therapiert. Die Dosen an NTF-TSP-2 betragen 2,5 mg / kg KG, 5,0 mg / kg KG und 7,5 mg / kg KG. Zur Kontrolle wurde eine Gruppe nur mit PBS-Puffer und eine andere mit dem Fc-Teil von humanem IgG in einer Konzentration von 2,5 mg / kg KG in PBS-Puffer behandelt. Die Versuchsdauer betrug insgesamt 22 Tage nach Tumorzellinokulation. Am Ende des Versuches wurde bei jedem Tumor das Volumen gemessen.

Die Lösungen, die den Nacktmäusen während jedes Versuches injiziert wurden, wurden immer auf das gleiche Volumen eingestellt.

#### **4.8.6 Tumorwachstumsverlaufsversuch**

Die Anzahl an Nacktmäusen betrug 10 Tiere pro Gruppe. An Tag 6 nach Tumorzellinokulation wurden sie im Abstand von 24 h durch intraperitoneale Injektion verschieden therapiert. Gruppe 1 und Gruppe 3 wurden mit der Dosis 5,0 mg / kg KG an NTF-TSP-2 therapiert. Zur Kontrolle wurden Gruppe 2 und Gruppe 4 mit PBS-Puffer behandelt. An Tag 15 nach Tumorzellinokulation wurden die Nacktmäuse von Gruppe 1 und Gruppe 2 aus dem Versuch genommen. Ihnen wurden die Lungen und die axillären Lymphknoten entnommen und bei -80°C gelagert. Pro Maus wurde ein Tumor mit einem Skalpell halbiert und die Hälfte in Jung Einfriermedium für Gefrierschnitte eingebettet. Der Tumor wurde dann kurz in flüssigen Stickstoff gehalten und als Gefrierblock bei -80°C gelagert. Restliches Tumorgewebe wurde bei -80°C gelagert.

An Tag 36 nach Tumorzellinokulation wurden abschließend die Nacktmäuse aus Gruppe 3 und Gruppe 4 aus dem Versuch genommen und das gleiche Mausgewebe wie an Tag 15 entnommen und bearbeitet.

#### **4.8.7 Metastasierungsversuch**

Die Anzahl an Nacktmäusen betrug 10 Tiere pro Gruppe. An Tag 15 nach Tumorzellinokulation wurden die Nacktmäuse aus Gruppe 1 aus dem Versuch genommen und die axillären Lymphknoten entnommen. Die Anzahl der entnommenen Lymphknoten betrug überwiegend vier Stück. Die eine Hälfte der Lymphknoten wurde in Jung Einfriermedium für Gefrierschnitte eingebettet, kurz in flüssigen Stickstoff gehalten und als Gefrierblock bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Aus der anderen Hälfte der Lymphknoten wurde für eine real-time PCR Messung die genomische DNA isoliert. An Tag 36 wurden die Nacktmäuse aus Gruppe 2 aus dem Versuch genommen und ebenfalls wie an Tag 15 die axillären Lymphknoten entnommen und bearbeitet. Während des Versuches wurden fünf unbehandelte Nacktmäuse gehalten, von denen abschließend die Lungen und die axillären Lymphknoten entnommen und wie an Tag 15 bearbeitet wurden. Zusätzlich wurde den Nacktmäusen Blut abgenommen, um daraus das Serum zu gewinnen (siehe Abschnitt 4.8.10). Die Lungen, axillären Lymphknoten und das Serum der unbehandelten Nacktmäuse dienten als Nacktmaus Wildtyp-Gewebe.

#### **4.8.8 Bioverfügbarkeitsversuch**

Die Anzahl an Nacktmäusen betrug 3 Tiere pro Gruppe. An Tag 15 nach Tumorzellinokulation wurden den Nacktmäusen von Gruppe 2 bis einschließlich Gruppe 8 einmalig  $100\ \mu\text{g}$  NTF-TSP-2 intraperitoneal injiziert. Den Nacktmäusen der Gruppe 2 wurde nach 30 Min., der Gruppe 3 nach 1 h, der Gruppe 4 nach 2 h, der Gruppe 5 nach 4 h, der Gruppe 6 nach 6 h, der Gruppe 7 nach 12 h und der Gruppe 8 nach 72 h Blut abgenommen, um daraus das Serum zu gewinnen. Den Nacktmäusen aus Gruppe 1 wurde ebenfalls das Blut abgenommen, um daraus Serum zu gewinnen. Der Unterschied zu den anderen Gruppen war, dass den Nacktmäusen aus Gruppe 1 statt  $100\ \mu\text{g}$  NTF-TSP-2 nur PBS intraperitoneal injiziert wurde.

#### **4.8.9 Sektion**

Am Ende eines jeden Tierexperimentes erfolgte die Tötung der Mäuse durch  $\text{CO}_2$ -Narkose. Die Entnahme des Gewebes erfolgte direkt im Anschluss an die Tötung.

#### **4.8.10 Serumgewinnung**

Für die Blutentnahme aus dem Herzen wurden die Nacktmäuse betäubt, nach Öffnen des Brustkorbes die linke Herzkammer punktiert und das Blut abgenommen. Nachdem

das Blut nach 30 Min. bei 22 °C geronnen war, wurde es für 10 Min bei 4°C und 3000 x g zentrifugiert. Der abgetrennte Serumüberstand konnte dann abgenommen und bei -80°C gelagert werden.

#### **4.8.11 Aufbereitung von Mausgewebe**

Nach der Tötung der Tiere wurde der Tumor entfernt und genau in der Mitte halbiert. Eine Hälfte des Tumors wurde für Gefrierschnitte in Jung Einfriermedium eingebettet und kurz in flüssigen Stickstoff gehalten. Das Tumorgewebe war als Gefrierblock nun von Einfriermedium umgeben. Restliches Tumormaterial wurde bei -80°C gelagert. Zwei der entnommenen Lymphknoten wurden ebenfalls in das Jung Einfriermedium für Gefrierschnitte eingebettet und kurz in flüssigen Stickstoff gehalten. Das Lymphknotengewebe war auch als Gefrierblock von Einfriermedium umgeben. Der Gefrierblock wurde mit Hilfe eines Gefriermikrotoms in mehrere 5 µm dünne Schichten geschnitten. Die Gewebeschnitte wurden auf Objektträger fixiert und bei -28°C gelagert. Die Gewebeschnitte wurden für immunhistochemische Untersuchungen verwendet.

Die Lungen und Lymphknoten wurden nach entsprechender Präparation aus der Maus entfernt. Aus den Lungen wurde die genomische DNA extrahiert. Die eine Hälfte der Lymphknoten wurde in Einfriermedium eingebettet und weiterbehandelt. Aus der anderen Hälfte wurde die genomische DNA extrahiert.

### **4.9 Immunpräzipitation (IP)**

Tumorgewebe wurde mit einem Skalpell in kleine Stück zerteilt und in Gewebelysispuffer in einem Verhältnis von 1:5 (w / v) Gewebe zu Gewebelysispuffer für 30 Min. bei 4°C inkubiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation bei 13.000 UPM für 30 Min. bei 4°C entfernt.

25 µl Protein-G-Sepharose wurden mehrmals mit Wasser gewaschen und 15 Min. bei 4°C in Ladepuffer inkubiert. Danach wurde die Protein-G-Sepharose mit einem Primärantikörper gegen den N-Terminus von humanem TSP-2 (2,5 µg) für 2 h bei 4°C inkubiert. Unbesetzte Bindungsstellen der Protein-G-Sepharose wurden mit 1 ml einer Lösung des Fc-Teils von humanem IgG in PBS-Puffer in einer Konzentration von 1 mg / ml bei 4°C für 2 h abgesättigt. Nach drei Waschschritten mit Ladepuffer wurde die Protein-G-Sepharose mit dem Tumorlysat für 2 h bei 4°C inkubiert. Nach drei

Waschschritten mit Ladepuffer wurde der Überstand abgenommen und die Protein-G-Sepharose mit 50 µl Laemmli-Puffer 5 Min. bei 95°C und 1000 UPM inkubiert. 50 µl der mit Laemmli-Puffer behandelten Lösung wurde auf ein Sammelgel und ein Trenngel (10 %) gegeben und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließendem Western Blot unter Verwendung eines Antikörpers gegen TSP-2 analysiert.

#### **4.10 Immunhistochemische Methoden**

Alle Gewebeschnitte wurden für die Immunhistochemie für 2 Min bei -20°C in Aceton fixiert. Es folgte die Inkubation der Schnitte für 5 Min bei 4°C in Methanol. Zur Beseitigung der Fixationslösungen wurden die Schnitte dreimal für 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen. Nach Hemmung der endogenen Peroxidaseaktivität durch die Behandlung der Schnitte für 15 Min. bei 22°C mit Peroxid-Lösung (Bugelski, 1985) und nachfolgender Blockade der unspezifischen Bindungsstellen mittels Blockpuffer, folgte die Inkubation der Schnitte für 2 h bei 22°C mit dem Primärantikörper. Nach dreimal Waschen mit PBS-Puffer folgte die Behandlung der Schnitte mit einem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper. Zur Visualisierung der Antikörper-Bindungen wurden Schnitte mit dem Farbstoffkit AEC nach Vorgaben des Herstellers behandelt. Die Reaktion mit Meerrettich-Peroxidase führte zu einer Oxidation und dadurch zu einer intensiven Rotfärbung des Farbstoffes. Für eine bessere Darstellung der Zell- und Gewebestrukturen wurden die Schnitte 1 Min. bei 22°C mit Hämatoxylin behandelt. Es folgte eine Bläuung des mit Hämatoxylin behandelten Gewebes für 5 Min. bei 22°C mit Leitungswasser. Zur Konservierung der Färbung wurden die Schnitte mit dem Eindeckmedium Aquamount behandelt, mit einem Deckgläschen überdeckt und bei 22°C gelagert. Die Behandlung der Gewebeschnitte mit den Fixierungs-, Antikörper- und Waschlösungen erfolgte immer unter Schütteln bei 200 UPM.

##### **4.10.1 Darstellung von Blutgefäßen und Auswertung des Gefäßstatus**

Zur immunhistochemischen Darstellung von Blutgefäßen wurde der panendotheliale Antikörper CD31 verwendet (Hawighorst et al., 2001). Die Auswertung der immunhistochemisch dargestellten Blutgefäße erfolgte unter dem Mikroskop IX51 mittels der Software „analySIS getIT“ sowie der Software IPLab (Streit et al., 1999). Der Gefäßstatus wurde durch die Bestimmung der Anzahl der Blutgefäße pro Fläche (Gefäßdichte), der durchschnittlichen Größe der Gefäße sowie des Anteils an Fläche,

die von Blutgefäßen bedeckt war (Gesamtgefäßflächenanteil), ermittelt. Es wurden pro Gewebeschnitt drei unterschiedliche Areale ausgewertet.

#### **4.10.2 Darstellung von Mikrometastasen**

Zur immunhistochemischen Darstellung von in das Lungen- und Lymphknotengewebe metastasierten MDA-MB-435 Brustkrebszellen wurde ein Antikörper gegen Zytokeratin-19 verwendet (Zen et al., 2007). Die immunhistochemisch dargestellten einzelnen Tumorzellen oder mikrometastatischen Tumorzellverbände wurden mit dem Mikroskop IX51 dargestellt und der Software „analySIS getIT“ ausgewertet.

#### **4.11 Immunfluoreszenz-Darstellung des CD36-Rezeptors**

Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Zelloberflächenrezeptors CD36 wurden sowohl HDMEC als auch HUVEC in einer 24er-Lochplatte kultiviert, mit PBS-Puffer gewaschen und für 10 Min. bei 22°C mit PFA-Lösung fixiert. Die Zellen wurden zuerst mit dem Primärantikörper gegen CD36 (Anti-CD36) und dann, nach drei Waschschritten, mit dem entsprechenden fluoreszierenden Sekundärantikörper inkubiert. Gleichzeitig wurde die DNA der Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI in einer Verdünnung von 1:200 in Gewebeschnitt-Blockpuffer angefärbt. Die Zellen wurden mit dem Eindeckmedium Fluorescence Mounting Medium behandelt und bei 4°C dunkel gelagert. Die Auswertung der Immunfluoreszenz erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop IX51 und der Software „analySIS getIT“.

#### **4.12 Inhibitions-ELISA**

Die Inkubation einer konstanten Antikörper-Menge mit Serum führt zur Ausbildung von Antikörper-Proteinkomplexen. Durch die Quantifizierung der freien, nicht als Antikörper-Proteinkomplex vorliegenden Antikörper, kann über den Vergleich mit einer Standardverdünnungsreihe eine Aussage über die in der Probe enthaltene Proteinkonzentration getroffen werden. Dieser Enzym-gekoppelte Immunsorptionsstest beruht auf der Methode von Engvall et al. (Engvall and Perlman, 1971).

Für die Quantifizierung von Antikörpern wurde eine hochadhäsive Luminunc Maxisorb® 96er-Lochplatte als Nachweisplatte für 18 h bei 4°C mit 50 µl NTF-TSP-2 Proteinlösung pro Loch in einer Konzentration von 100 ng / 50 µl beschichtet. Nach einem Waschschriff mit TBST-Puffer erfolgte für 2 Stunden bei 22°C die Blockierung

freier Bindestellen mit 200 µl BSA-Lösung pro Loch. Serumproben in einer Verdünnung von 1:50 und 1:500 in PBS-Puffer und eine Standardverdünnungsreihe von NTF-TSP-2 in PBS-Puffer wurden über Nacht bei 4°C mit je 2,5 ng Anti-TSP-2 Antikörper pro Probe in einer Maxisorb® 96er-Lochplatte inkubiert. Das Endvolumen pro Loch betrug 50 µl. Alle Verdünnungen wurden in BSA-Puffer angesetzt. Die Vermessung der Serumproben wurde mit der Vermessung einer Standardverdünnungsreihe verglichen. Sie bestand aus einer Verdünnung von 1000 ng bis 0,1 pg NTF-TSP-2 pro Loch. Die Proben der Standardverdünnungsreihe wurden ebenfalls über Nacht bei 4°C mit je 2,5 ng Anti-TSP-2 Antikörper inkubiert. Als Kontrollwert diente eine Wildtyp-Serumprobe in einer 1:50 und 1:500 Verdünnung. Nach der Inkubation wurden die Proben auf die geblockte Nachweisplatte übertragen, die kurz vorher zweimal mit TBST-Puffer gewaschen wurde. Nach der Übertragung folgte für 2 h bei 22°C die Inkubation der Proben auf der Nachweisplatte. Nach drei Waschschritten mit TBST-Puffer wurde die Nachweisplatte mit 50 µl des entsprechenden Sekundärantikörpers inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TBST-Puffer erfolgte die Nachweisreaktion. Sie beruht auf der Detektion von Lumineszenzen verschiedener Intensität. Die Vermessung der Proben wurde mit dem SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate Kit nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die Messwerte wurden mit dem Multi-Detection Microplate Reader Synergy HT ausgewertet. Alle Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung und wurden mit einem Leerwert ohne Primärantikörper korrigiert. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der Software SigmaPlot. Die Probenmesswerte wurden mit den Messwerten der Standardverdünnungsreihe verglichen.

## **4.13 Real-time PCR**

### **4.13.1 Extraktion genomischer DNA**

Für die real-time PCR Messung wurde aus den axillären Lymphknoten und den Lungen der Nacktmäuse die genomische DNA gewonnen. Dazu wurde das DNEasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) unter Zugabe von 4 µl RNase nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Bei diesem Verfahren wird das Gewebe mit Guanidiniumhydrochlorid und Proteinase K lysiert. Die genomische DNA kann dadurch an Silikamoleküle binden. Nach mehreren Waschschritten und Fällung mit Ethanol wurde die DNA mit bidestilliertem Wasser extrahiert (Gillespie and Hardman, 1979).

#### 4.13.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur Vervielfältigung von der in jedem Organismus vorliegenden Erbsubstanz DNA. Als Vorlage kann z.B. eine beliebige DNA-Sequenz auf einem Abschnitt eines Gens dienen. Die Sequenz dieses Abschnittes kann durch entsprechende Oligonukleotide (Primer) sowohl am 3'-Ende (Forward-Primer) als auch am 5'-Ende (Reverse-Primer) eingegrenzt werden. Das Verfahren beruht auf der Methode von Mullis et. al. (Mullis et al., 1986).

Die DNA liegt im Organismus als Doppelstrang vor. Bei der PCR wird zunächst dieser Doppelstrang für ein paar Sekunden auf eine Temperatur zwischen 90°C und 95°C erhitzt. In diesem Temperaturbereich werden die Wasserstoffbrückenbindungen, die den Doppelstrang zusammenhalten, gebrochen. Diesen Vorgang nennt man Denaturierung. Danach wird die Temperatur auf einen Bereich zwischen 50°C und 65°C gesenkt, der 2-3°C unter dem Schmelzpunkt der Primer liegt (Annealing-Temperatur). In diesem Bereich lagern sich die entsprechenden Primer an den DNA-Strang an. Das Enzym DNA-Polymerase lagert nun nach und nach die entsprechenden Basen an die getrennten DNA-Einzelstränge von 3' in Richtung 5'-Ende zu einem Doppelstrang an. Diesen Vorgang nennt man Elongation. Der Zyklus von Denaturierung zu Elongation wird nun mehrfach wiederholt. Das führt nach mehreren Zyklen zu mehrfach amplifizierten DNA-Strängen, die aus der Sequenz bestehen, die durch die Primer eingegrenzt werden. Die DNA-Stränge vervielfältigen sich exponentiell.

#### 4.13.3 TaqMan<sup>®</sup> real-time PCR

Die TaqMan<sup>®</sup> real-time PCR beruht auf der oben beschriebenen Methode der PCR. Dabei wird zusätzlich ein dritter Primer (Sonde) eingesetzt. Die Sequenz der Sonde entspricht einer Sequenz zwischen der entsprechenden Forward- und Reverse-Primer Sequenz des zu amplifizierenden DNA-Stranges. An das 3'-Ende der Sonde ist ein fluoreszierender Quencherfarbstoff über ein modifiziertes Nukleotid gebunden. Die Sonde enthält an ihrem 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff, der kovalent gebunden ist. Die Sonde ist außerdem phosphoryliert, um eine Extension des 3'-Endes während der PCR zu vermeiden. Durch die räumliche Nähe des Quencher- und Reporterfarbstoffes wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes, die durch Anregung mit einer spezifischen Wellenlänge entsteht, durch den „Fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) (Förster, 1948) unterdrückt. Bei der real-time PCR nutzt man die Exonukleaseaktivität der eingesetzten Polymerase, um bei der Elongation die

Bindungen der Basen innerhalb der Sonde aufzutrennen. Dabei werden der Quencher und der Reporterfarbstoff räumlich voneinander getrennt, so dass das der Reporterfarbstoff bei Anregung mit einer spezifischen Wellenlänge fluoreszieren kann. Jeder Fluoreszenzfarbstoff erzeugt bei Anregung mit einer für sich spezifischen Wellenlänge ein Fluoreszenzmaximum. Als Quencherfarbstoffe wurden TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) und der nicht-fluoreszierende Black Hole Quencher-1 eingesetzt. Als Reporterfarbstoffe wurden 6-FAM (6-Carboxy-Fluorescein) und Yakima Yellow eingesetzt. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Das Emissionsmaximum liegt für 6-FAM bei 518 nm und für Yakima Yellow bei 552 nm (Heid et al., 1996).

#### 4.13.4 Quantitative TaqMan® real-time PCR

Bei der real-time PCR wurde die Intensität der Fluoreszenz gemessen und das Fluoreszenzsignal detektiert. Die Messung fand in einer 96er-Lochplatte statt. Die Intensität des Fluoreszenzsignals nimmt bei einer real-time PCR typischerweise einen sigmoidalen Verlauf. Bei höherer Zyklenzahl und mehreren Messungen kommt es trotz gleicher Ausgangsmenge von DNA zu einer breiteren Streuung der Intensität aufgrund von Volumenschwankungen und Unterschieden in der Intensität des Quencherfarbstoffes. Um das zu vermeiden wurde die Intensität bei der Messung gegen die Intensität eines passiven Referenzfarbstoffes ROX (6-Carboxyrhodamin) normalisiert. Die Normalisierung wurde folgendermaßen bestimmt:

$$\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$$

#### Formel 4.2 Normalisierung der Emissionsintensitäten der Reporterfarbstoffe gegen die der passiven Referenz

$R_n^+$  = (Emissionsintensität des Reporterfarbstoffes / Emissionsintensität der passiven Referenz) bei der Vermessung einer Probe mit DNA,  $R_n^-$  = (Emissionsintensität des Reporterfarbstoffes / Emissionsintensität der passiven Referenz) bei der Vermessung einer Probe während der ersten PCR-Zyklen

Der Schwellenwert oder  $c_t$ -Wert ist der Zyklus, ab wann das Fluoreszenzsignal  $\Delta R_n$  signifikant ansteigt. Die Detektion und Messung der real-time PCR erfolgte mit dem ABI PRISM™ 7700 Sequence Detector. Dabei wurde nach jedem Zyklus die Intensität

der Fluoreszenz gemessen. Bei jeder einzelnen real-time PCR-Messung wurde zum einen für die Lungen 50 ng und für die Lymphknoten 5 ng an Gesamt-DNA eingesetzt. Wurden bei der Vermessung der Lymphknoten 50 ng an Gesamt-DNA eingesetzt, so wurde die PCR so weit inhibiert, dass keine Fluoreszenz-Signale detektiert wurden. Das konnte verhindert werden, indem 5 ng an Gesamt-DNA eingesetzt wurden.

#### **4.13.5 Quantitative TaqMan<sup>®</sup> real-time PCR einer Standardverdünnungsreihe**

Neben der immunhistochemischen Darstellung wurde zur Detektion von Mikrometastasen die real-time PCR durchgeführt. Dazu wurde der Anteil humaner genomischer DNA (aus den humanen MDA-MB-435 Zellen stammend) in muriner genomischer DNA mittels quantitativer TaqMan<sup>®</sup> real-time PCR humanspezifischer Alu-Sequenzen bestimmt. Alu-Sequenzen sind eine Familie repetitiver DNA Sequenzen, die sich ausschließlich im Genom von Primaten befinden (Batzer and Deininger, 2002). Die Amplifizierung der Alu-Sequenz erfolgte mit spezifischen Primern und einer Sonde (Munoz et al., 2005). Der Reporterfarbstoff war Yakima Yellow und der Quencherfarbstoff der nicht-fluoreszierende Black Hole Quencher-1. Für jede Nacktmaus wurde die DNA der Lungen und der Lymphknoten in einer Dreifachbestimmung vermessen. Die Messwerte wurden mit den Messwerten einer 1:10 Standardverdünnungsreihe von humaner in muriner DNA im Bereich von 100 % - 0,001 % verglichen. Bei der Standardverdünnungsreihe wurde sowohl die DNA aus den axillären Lymphknoten als auch aus der Lunge durch Verdünnung mit Wasser auf eine Konzentration von 5 ng /  $\mu$ l bzw. 50 ng /  $\mu$ l gebracht. Die gleiche Prozedur erfolgte für die DNA der MDA-MB-435 Brustkrebszellen. Die Standardverdünnungsreihe wurde durch 1:10 Verdünnungen von humaner DNA in muriner DNA hergestellt. Es lag dadurch in den Proben der Standardverdünnungsreihe immer eine Gesamt-DNA Konzentration von 5 ng /  $\mu$ l bzw. 50 ng /  $\mu$ l vor. Um Ungenauigkeiten bei der DNA-Konzentrationsbestimmung zu vermeiden, wurde das Alu-Fluoreszenzsignal auf das Fluoreszenzsignal des „Housekeeping-Gens“ 18S rRNA bezogen. Das eingesetzte 18S rRNA Control Kit enthielt spezifische Primer und eine Sonde, durch die die Gensequenz amplifiziert werden konnte. Die Sonde enthielt als Reporterfarbstoff 6-FAM und als Quencherfarbstoff TAMRA. Da die Reporterfarbstoffe unterschiedliche Fluoreszenzmaxima haben, kann die Amplifizierung der Alu-Sequenz und der Sequenz des „Housekeeping-Gens“ 18S rRNA parallel in einer Reaktion ablaufen und

gleichzeitig durch den ABI PRISM™ 7700 Sequence Detector detektiert werden. Der TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x) enthielt das Enzym UNG, um falsche Signale durch PCR Kontaminationen zu vermeiden (Longo et al., 1990). In Tabelle 4.4 ist die Zusammensetzung einer Probe während einer Messung dargestellt.

**Tabelle 4.4 Zusammensetzung der Probe einer real-time PCR Messung**

TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x)	12,5 µl
Alu Fw-Primer	0,9 pM
Alu Rv-Primer	0,9 pM
Alu Sonde	0,25 pM
18S rRNA Primermix	1,5 µl
18S rRNA Sonde	0,5 µl
DNA	1 µl
Wasser	ad 25 µl

Die Inkubation der Proben für 10 Min. bei 50 °C führt zur Aktivierung des Enzyms UNG. Die folgende Behandlung der Proben für 10 Min. bei 95°C aktiviert die Polymerase. Es folgte dann eine Inkubation für 15 Sek. bei 95°C und für 1 Min. bei 60°C, die 39 Mal wiederholt wurde. Die Auswertung der Messung erfolgte mit der Sequence Detection Systems software 1.9.1.

## **4.14 Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Apoptose**

### **4.14.1 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials**

Die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials basiert auf der Methode von Smiley et. al. (Smiley et al., 1991). Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, der durch Porenbildung in der Mitochondrienmembran verursacht wird, ist ein Hinweis auf frühe Apoptose von Zellen über den intrinsischen Weg. Der elektrochemische Gradient kann dabei mit Hilfe des lipophilen, kationischen Fluoreszenzfarbstoffes JC-1 bestimmt werden, da dieser selektiv die Mitochondrienmembran passieren kann. In gesunden Zellen mit hohem Membranpotential formt der Farbstoff spontan Komplexe, die eine intensive rote Fluoreszenz hervorrufen. Bricht das mitochondriale Membranpotential zusammen, so kann der Farbstoff nicht mehr in den Mitochondrien akkumulieren und verbleibt

vermehrt als grün-fluoreszierendes Monomer in dem Zytoplasma. Je kleiner also das Verhältnis der Intensität von roter zu grüner Fluoreszenz ist, desto stärker ist der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentialverlusts wurde das JC-1 Mitochondrial Membran Detection Kit nach Vorgaben des Herstellers verwendet. Zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials wurden HDMEC kultiviert. Die Zellen wurden dann auf eine Konzentration von 100.000 Zellen in 1,5 ml HDMEC-Wachstumsmedium gebracht. 1,5 ml dieser Zellsuspension wurden jeweils in ein Loch einer 6er-Lochplatte gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen und die Zellen in HDMEC-Wachstumsmedium mit 20 ng / ml VEGF<sub>165</sub> über 72 h stimuliert. Das Endvolumen betrug 2 ml pro Loch. Die Messung und Darstellung der Messwerte erfolgte mit dem Multi-Detection Microplate Reader Synergy HT und der Software KC4™ Synergy HT.

#### **4.14.2 Durchflusszytometrische Quantifizierung von Apoptose**

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, bei dem ein Laserstrahl markierte Zellen in einem Flüssigkeitsstrom trifft. Je nach Markierung wird für jede Zelle gemessen, wie viel Licht dabei absorbiert, reflektiert oder welche Fluoreszenzen emittiert werden. Die Licht- und Fluoreszenzeigenschaften können durch verschiedene Detektoren erfasst werden. Die Analyse der Zellen erfolgt nach der Methode von Nicoletti et. al. (Nicoletti et al., 1991). Bei dieser Methode wird die Zellmembran mit dem Detergens Triton X-100 lysiert. Die Zellkernmembran bleibt dabei intakt. Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid kann nun nach mehreren Waschschritten nur DNA des Zellkerns angefärbt werden. Ein typisches Merkmal später Apoptose ist die Fragmentierung chromosomaler DNA in kleine Bruchstücke, die über die Kernporen den Zellkern verlassen können. Der DNA-Gehalt in den Zellkernen nimmt somit mit fortlaufender Apoptose ab, und somit wird auch weniger DNA mit Propidiumiodid angefärbt, was zu einer Verringerung der Fluoreszenz führt.

Zur Quantifizierung von Apoptose wurden HDMEC auf eine Konzentration von 100.000 Zellen in 1,5 ml HDMEC-Wachstumsmedium gebracht. 1,5 ml dieser Zellsuspension wurden jeweils in ein Loch einer 6er-Lochplatte gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen und die Zellen in HDMEC-Wachstumsmedium mit 20 ng / ml VEGF<sub>165</sub> über 72 h stimuliert. Das Endvolumen

betrug 2 ml pro Loch. Die Analyse der Fluoreszenzsignale erfolgte mit dem FACScalibur™ und die Darstellung mit der Software CellQuest™.

#### **4.14.3 Bestimmung von aktiver Caspase-3 mittels Western Blot**

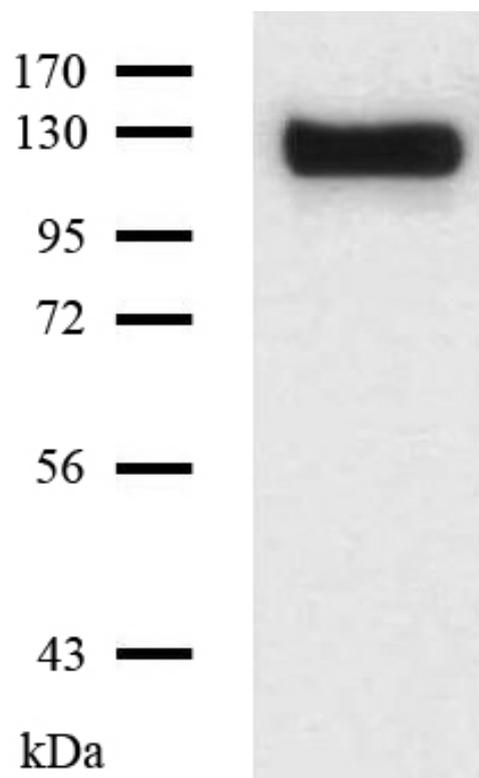
Bei der Einleitung von Apoptose wird sowohl über den intrinsischen Weg (mitochondriale Signalkaskade) als auch über den extrinsischen Weg (Todesrezeptor Signalkaskade) die Effektor-Caspase Caspase-3 freigesetzt (Salvesen and Dixit, 1997). Um die Aktivität von Caspase-3 zu ermitteln wurden HDMEC auf eine Konzentration von 100.000 Zellen in 1,5 ml HDMEC-Wachstumsmedium gebracht. 1,5 ml dieser Zellsuspension wurden jeweils in ein Loch einer 6er-Lochplatte gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen und die Zellen in HDMEC-Wachstumsmedium mit 20 ng / ml VEGF<sub>165</sub> über 72 h stimuliert. Das Endvolumen betrug pro 2 ml Loch. Die Zellen wurden nach der Stimulation gesammelt und mit 100 µl CellLytic™-M Puffer unter Zusatz von 1 % (v /v) Protease Inhibitor Cocktail Set III zur Inhibition von Proteasen lysiert. Die Zellen wurden dabei für 15 min bei 22°C und 800 UPM geschüttelt und anschließend bei 4°C und 20000 x g für 15 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und Bestimmung der Proteinkonzentration wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgte unter Verwendung des Primärantikörpers Anti-aktive Caspase-3 die weitere Analyse mittels Western-Blot Verfahren. Die Intensitäten der Signale durch die Proteine auf der PVDF-Membran wurden mit der Software Kodak Digital Science 1D Image Analyse dargestellt und ausgewertet (Fister et al., 2007a). Die Signalintensitäten wurden mit den Signalintensitäten derselben Proteine nach erneuter Inkubation der PVDF-Membran mit dem Primärantikörper Anti-Actin verglichen. Die Signalintensitäten der Anti-aktive Caspase-3 Messung wurden ins Verhältnis zu den Signalintensitäten der Anti-Actin Messung gesetzt. Je größer das Verhältnis ist, desto höher ist die Aktivität von Caspase-3.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Rekombinante Expression des Fusionsproteins NTF-TSP-2

#### 5.1.1 Isolierung von NTF-TSP-2

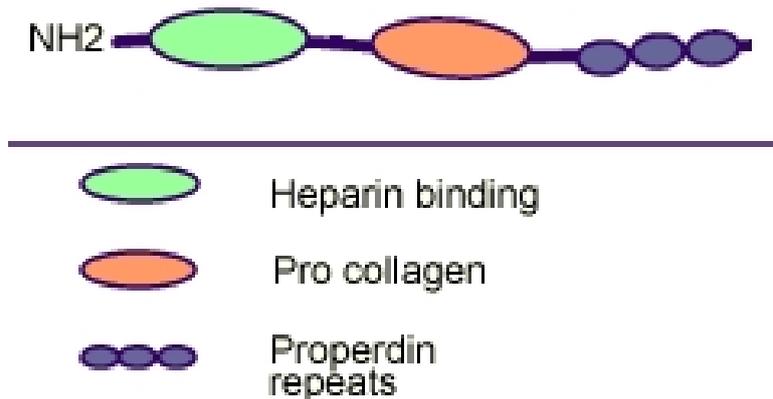
Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) wurden stabil mit einem modifizierten pCEP Expressionsvektor transfiziert, der die cDNA eines N-terminalen Fragmentes von humanem TSP-2 enthält. Puromycin-selektierte Zellklone wurden kultiviert und der Mediumüberstand mittels SDS-Elektrophorese und Western Blot Analyse auf TSP-2 untersucht. Zellklone mit hoher Expression des 110 kDa großen Proteinfragments NTF-TSP-2 wurden in großem Maßstab kultiviert und das Fragment mittels Protein G Sepharose aufgereinigt. Die Größe von 110 kDa wurde mittels SDS-Elektrophorese ermittelt und das Fragment mittels Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen die N-terminale Domäne von TSP-2 nachgewiesen (Abbildung 5.1).



**Abbildung 5.1 Nachweis von NTF-TSP-2 mittels Western Blot**

Der Nachweis der NTF-TSP-2 Proteinlösung erfolgt mit einem spezifischen Antikörper gegen den N-Terminus von humanem TSP-2.

Die Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenz durch das Zentrum für Molekulare Medizin der Universität zu Köln (ZMMK) bestätigte, dass das Proteinfragment Aminosäure 18 bis 550 des N-Terminus von humanem Thrombospondin-2 (LaBell and Byers, 1993) mit der Heparin-bindenden Domäne, der Prokollagen-homologen Domäne und den drei Type-1(Properdin)-Repeats enthält (Abbildung 5.2).



**Abbildung 5.2 Schematische Darstellung des N-terminalen 80 kDa Fragmentes von humanem Thrombospondin-2**

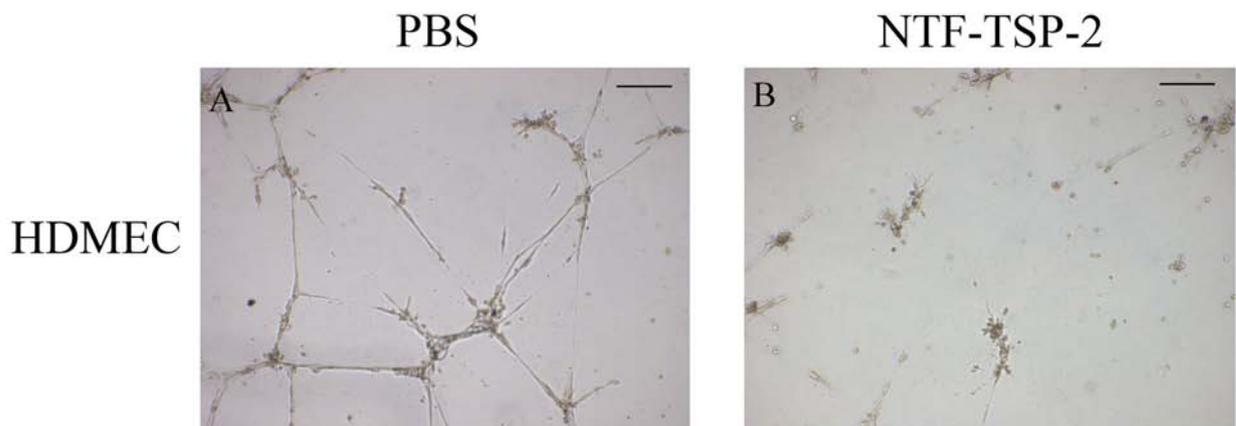
Das Fragment enthält N-terminal beginnend die Heparin-bindende Domäne, die Prokollagen-homologe Domäne und die drei Type-1(Properdin)-Repeats von humanem Thrombospondin-2

Die eigentliche Größe des Fragmentes von 110 kDa entsteht zum einen durch posttranslationale Glykosylierung und zum anderen durch die Kopplung an den Fc-Teil von humanem IgG<sub>2</sub>. Das hat den Vorteil, dass das Fragment durch das Verfahren der Affinitätschromatographie gut zu isolieren ist. Weiterhin wird dadurch das Fusionsprotein stabilisiert (Hinton et al., 2004).

### 5.1.2 *In vitro* Funktionalität von NTF-TSP-2

Zur Überprüfung der antiangiogenen Aktivität von NTF-TSP-2 wurde ein etablierter *in vitro* Angiogeneseassay, der Tube Formation Assay (Kubota et al., 1988), durchgeführt. Die Formation von „röhrenähnlichen“ Strukturen (tubes) in der dreidimensionalen Kultur ist eine typische Eigenschaft von Endothelzellen. Frühere Studien konnten zeigen, dass verschiedene proangiogene Faktoren wie zum Beispiel VEGF die *in vitro* „Tube-Formation“ fördern (Ingber and Folkman, 1989), während die

Behandlung mit Angiogeneseinhibitoren die Formation endothelialer Röhren beeinträchtigt (DiPietro et al., 1994) (Canfield and Schor, 1995). HDMEC wurden in ihrem Wachstumsmedium auf Matrigel ausgesät und die dreidimensionale Ausbildung von Endothelzellröhren durch Zugabe von VEGF<sub>165</sub> unterstützt. Gleichzeitig wurden die Zellen entweder mit PBS oder mit NTF-TSP-2 in einer Endkonzentration von 40 µg / ml behandelt.

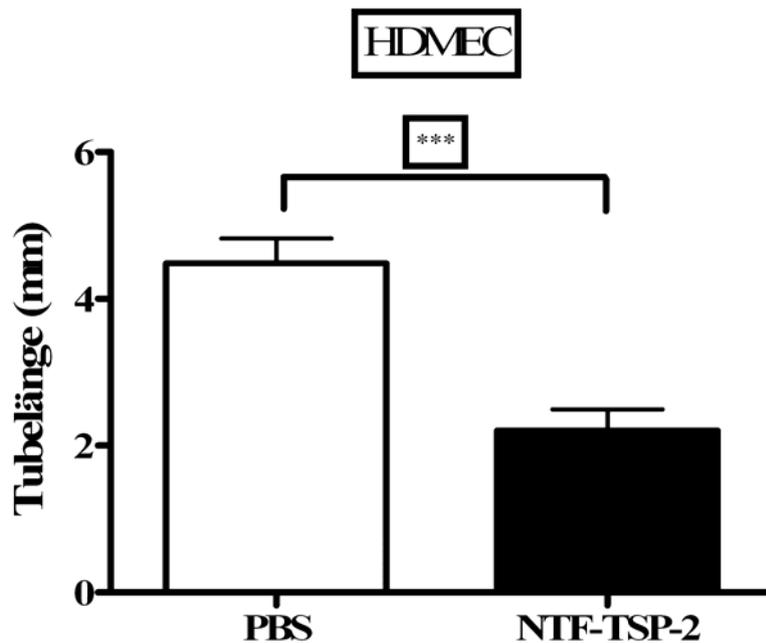


**Abbildung 5.3 Hemmung der VEGF-induzierten Ausbildung von Endothelzellröhren durch die Behandlung mit NTF-TSP-2**

Im Vergleich zur VEGF-induzierten Ausbildung von Endothelzellröhren in den PBS-behandelten Kontrollkulturen (A) führt die Zugabe von NTF-TSP-2 (B) zur deutlichen Hemmung der „Tube Formation“ von HDMEC. (Balken = 200 µm)

Die Stimulation mit VEGF<sub>165</sub> führte zu einer effizienten Formation eines Netzwerks mit Quervernetzungen einer großen Anzahl röhrenähnlicher Strukturen bei PBS-behandelten HDMEC (Abbildung 5.3 A). Im Gegensatz dazu war die Ausbildung des Röhrennetzwerkes durch Zugabe von NTF-TSP-2 in der HDMEC-Kultur deutlich gestört (Abbildung 5.3 B).

Die computerunterstützte Auswertung ergab für die HDMEC Kontrollkulturen eine Tubellänge von 4,488 mm ± 0,340 mm, während die Behandlung mit NTF-TSP-2 zu einer signifikanten Hemmung (51 %) der Ausbildung von Endothelzellröhren mit einer Länge von 2,202 mm ± 0,2911 mm führte (Abbildung 5.4).

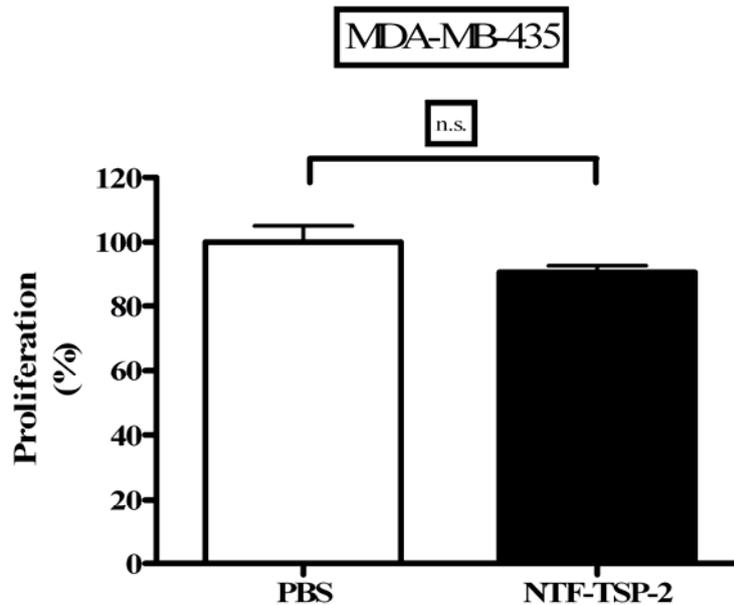


**Abbildung 5.4 NTF-TSP-2 hemmt die VEGF induzierte, „Tube Formation“ von HDMEC**

Die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 führt im Vergleich zur PBS-Kontrolle zu einer signifikanten Hemmung der Ausbildung von Endothelzellröhren ( $p = 0,0005$ , ungepaarter t-Test). Die Anzahl der Messungen beträgt sechs pro Gruppe.

**5.1.3 Einfluss von NTF-TSP-2 auf die Proliferation**

Um direkte Effekte von NTF-TSP-2 auf die Proliferation von MDA-MB-435 Brustkrebszellen zu untersuchen, wurden diese einmal täglich über 8 Tage mit  $40 \mu\text{g} / \text{ml}$  NTF-TSP-2 behandelt. Zur Kontrolle wurden die gleichen Zellen mit PBS-Puffer in gleichem Volumen behandelt. Es zeigte sich, dass am Ende des Versuches die Behandlung mit NTF-TSP-2 zu keiner signifikanten Beeinflussung des Proliferationsverhaltens der Brustkrebszellen im Vergleich zur PBS-Kontrolle führte. Werden die Messwerte der Kontrolle gemittelt und auf 100 % gesetzt, so liegen die Werte für die Behandlung mit NTF-TSP-2 im Mittel bezogen auf die Kontrolle bei  $90,4 \% \pm 2,0 \%$  (Abbildung 5.5).



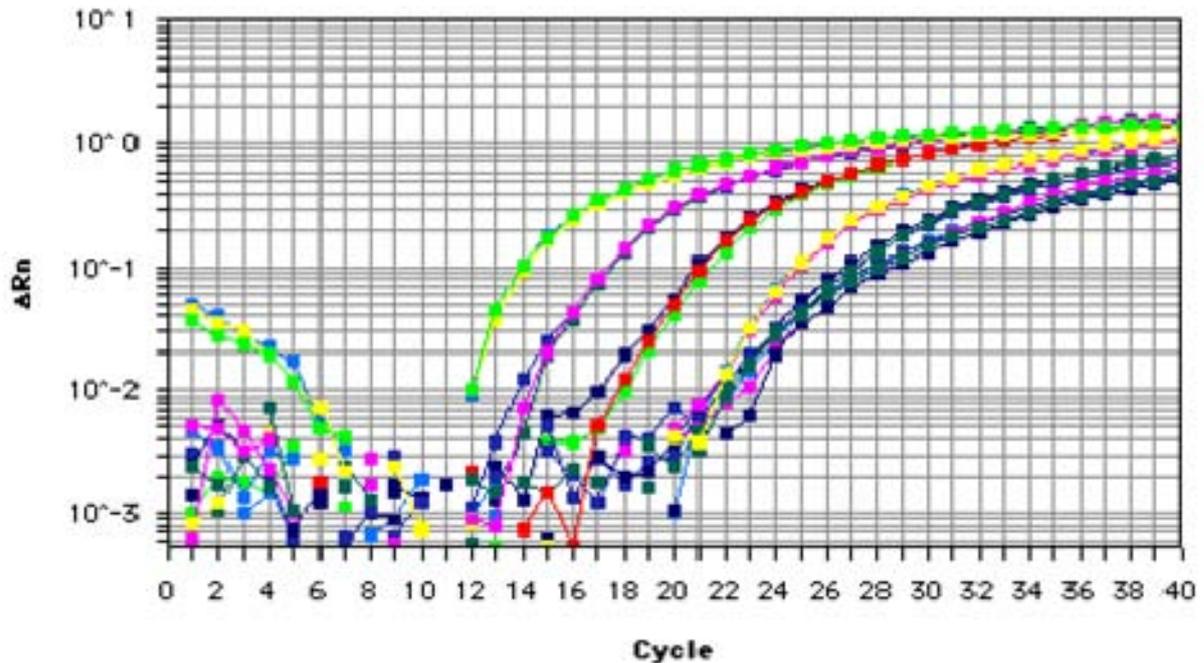
**Abbildung 5.5 Einfluss von NTF-TSP-2 auf die Proliferation von humanen MDA-MB-435 Brustkrebszellen**

Die Behandlung von MDA-MB-435 Zellen mit NTF-TSP-2 führt zu keinem signifikanten Unterschied der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle, bei der nur mit PBS-Puffer behandelt wurde ( $p = 0,0841$ , ungepaarter t-Test).

## 5.2 Quantitative Evaluierung von Lymphknotenmikrometastasen

### 5.2.1 Quantitative Bestimmung von Mikrometastasen anhand einer Standardverdünnungsreihe

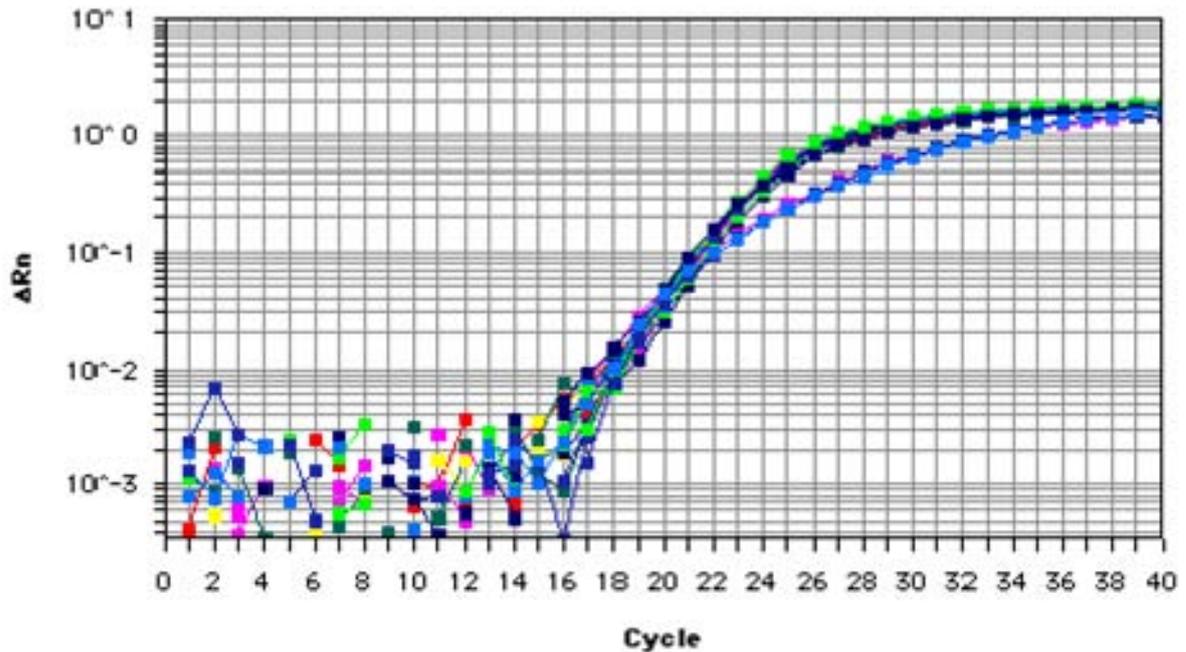
Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Metastasierung von Tumorzellen in andere Organe nachzuweisen. Eine ist der Nachweis von humanen Alu-Sequenzen in murinem Gewebe mittels PCR. Alu-Sequenzen sind humanspezifische Sequenzen, die normalerweise in murinem Gewebe nicht detektierbar sind. In dieser Arbeit wurden die humanen Alu-Sequenzen in Lungen- und Lymphknotengewebe als Ausdruck der Metastasierung mittels real-time PCR quantifiziert. Dabei wurden die Messwerte mit den Messwerten einer 1:10 Standardverdünnungsreihe von humaner DNA in muriner DNA im Bereich von 100 % - 0,001 % verglichen.



**Abbildung 5.6** Beispiel eines Alu-Fluoreszenzsignalverlaufes während einer real-time PCR Messung einer Standardverdünnungsreihe

Dargestellt werden die gegen eine passive Referenz normalisierten Alu-Fluoreszenzsignale einer Standardverdünnungsreihe ( $\Delta R_n$ ) im Verlauf gegen die Zyklanzahl ( $c_t$ ).

In Abbildung 5.6 werden die gegen eine passive Referenz normalisierten Alu-Fluoreszenzsignale einer Standardverdünnungsreihe ( $\Delta R_n$ ) im Verlauf gegen die Anzahl der Zyklen ( $c_t$ ) dargestellt. Als Messwert gilt der  $c_t$ -Wert, der durch einen festgelegten Schwellenwert  $\Delta R_n$  bestimmt wird, bei dem das Signal signifikant ansteigt. Der Schwellenwert ist für alle Messwerte einer Messung gleich. Bei jeder Messung wird immer die gleiche Menge an genomischer DNA eingesetzt. Um Ungenauigkeiten in der photometrischen Bestimmung der DNA Konzentration zu vermeiden, werden die Alu Messwerte ins Verhältnis zu den Messwerten des „Housekeeping-Gens“ 18S rRNA gesetzt. Wird exakt die gleiche Menge an DNA eingesetzt, so bleibt der Messwert für das „Housekeeping-Gen“ 18S rRNA immer gleich (Abbildung 5.7).



**Abbildung 5.7** Beispiel eines 18S rRNA-Fluoreszenzsignalverlaufes während einer real-time PCR Messung einer Standardverdünnungsreihe

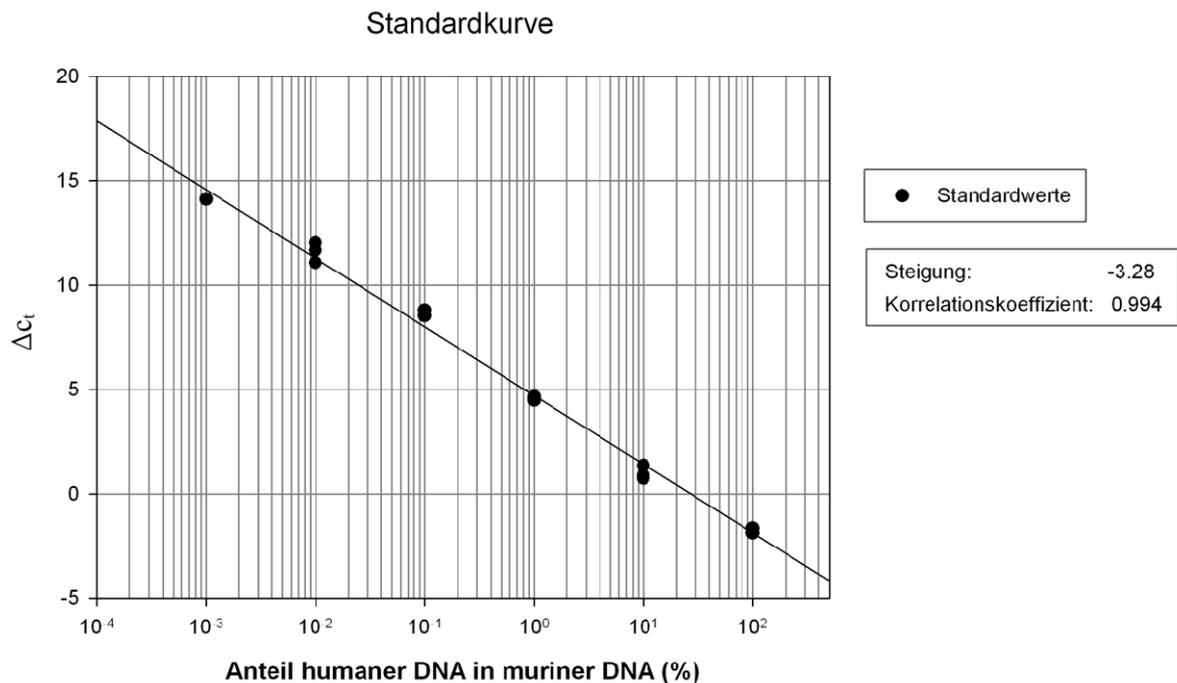
Dargestellt werden die gegen eine passive Referenz normalisierten Fluoreszenzsignale des „Housekeeping-Gen“ 18S rRNA einer Standardverdünnungsreihe ( $\Delta R_n$ ) im Verlauf gegen die Zyklenanzahl ( $c_i$ ).

Zur Messung des Signals des „Housekeeping-Gen“ wird ebenfalls eine speziell fluoreszierende DNA-Sonde eingesetzt, die sowohl die humane als auch murine „Housekeeping-Gen“ 18S rRNA Sequenz erkennt. Sowohl die Vermessung der Alu PCR als auch der 18S rRNA PCR können durch den ABI PRISM™ 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems) in einer Duplex-Reaktion nebeneinander ablaufen. Die beiden jeweiligen Sonden besitzen unterschiedliche Fluoreszenzmaxima, so dass zwei Signale parallel gemessen werden können. Alle Alu Messwerte wurden immer auf die Messwerte des „Housekeeping-Gen“ 18S rRNA bezogen. Das Verhältnis der Alu Messwerte zu den Messwerten des „Housekeeping-Gen“ 18S rRNA wird durch Formel 5.1 ausgedrückt.

$$\Delta c_t = c_t(\text{Alu}) - c_t(18\text{S rRNA})$$

**Formel 5.1** Formel zur Berechnung der auf das Housekeeping-Gen bezogene Messwerte  $\Delta c_t$

Trägt man die Differenz der Zyklenzahl ( $\Delta c_t$ ) halblogarithmisch über den Anteil humaner DNA in muriner DNA (%) auf, so entsteht bei einer 1:10 Standardverdünnungsreihe bei einer 100 % effizienten PCR eine Steigung der Kalibrierungskurve von -3,32. Der Anteil humaner DNA in muriner DNA der zu vermessenden Proben wurde durch die Anwendung der Geradengleichung der Kalibrierungskurve ermittelt (Abbildung 5.8).



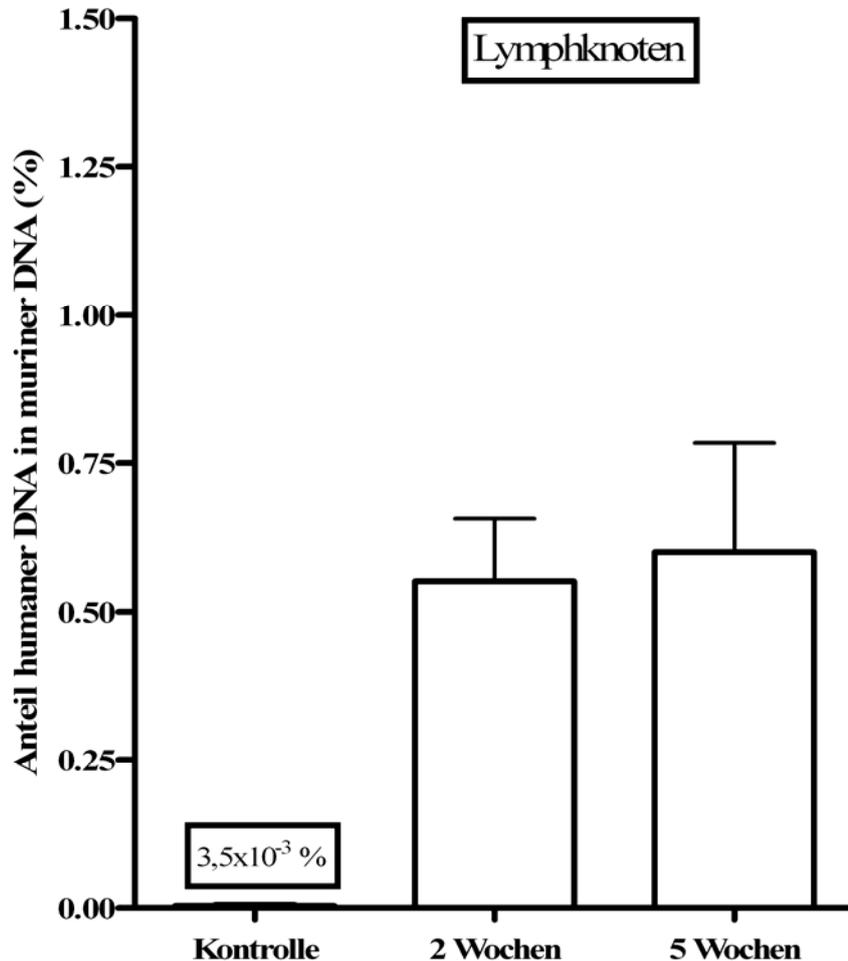
**Abbildung 5.8 Beispiel einer Standardkurve zur Bestimmung des Anteils humaner DNA in muriner DNA**

Dargestellt wird eine Kalibrierungskurve als Standardkurve aus den Messwerten der Standardverdünnungsreihe.

### 5.2.2 Quantitative Evaluierung von Lymphknotenmikrometastasen mittels real-time PCR

Für die quantitative Evaluierung von Lymphknotenmikrometastasen wurden Nacktmäusen für den beschriebenen Metastasierungsversuch MDA-MB-435 Brustkrebszellen xenotransplantiert. Nach 2 bzw. 5 Wochen wurden den Nacktmäusen die axillären Lymphknoten entnommen, um daraus die genomische DNA zu gewinnen.

Mittels real-time PCR wurde für die genomische DNA der Anteil humaner DNA in muriner DNA bestimmt. Als Kontrollwert diente die Analyse des Anteils humaner DNA in muriner DNA von Wildtyp-Lymphknoten DNA (Abbildung 5.9).



**Abbildung 5.9 Frühe Detektion von humanen MDA-MB-435 Brustkrebszellen in axillären Lymphknoten der Maus**

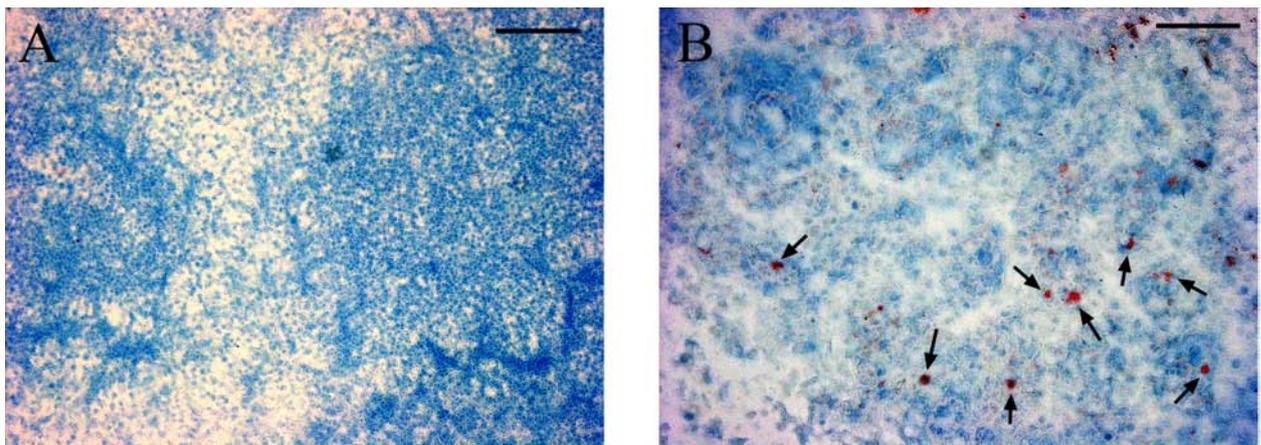
Im Vergleich zu Kontroll-Lymphknoten aus nicht-tumortragenden Mäusen konnte nach 2 Wochen bereits die Ausbreitung orthotop injizierter MDA-MB-435 Brustkrebszellen in den axillären Lymphknoten nachgewiesen werden. Der Anteil von humaner DNA zu muriner DNA in den Lymphknoten beträgt nach 2 Wochen 0.55 % und nach 5 Wochen 0.60 %. Die Anzahl der Nacktmäuse betrug zehn pro Gruppe. Der Anteil humaner DNA in muriner DNA wurde jeweils für jede Nacktmaus in einer Dreifachbestimmung ermittelt.

Der Anteil humaner DNA in muriner DNA in Lymphknotengewebe von Mäusen, denen keine humanen Brustkrebszellen xenotransplantiert wurden, muss eigentlich bei Null Prozent liegen. In dieser Arbeit war der Anteil humaner DNA in muriner DNA der Kontrollmäuse mit  $3,5 \cdot 10^{-3} \% \pm 0,5 \cdot 10^{-3} \%$  extrem gering und muss als Fehler der

Methode interpretiert werden. Im Gegensatz dazu lag der Anteil humaner DNA in muriner DNA 2 Wochen nach Xenotransplantation von MDA-MB-435 Brustkrebszellen um das 157-fache höher und wurde mit  $0,55 \% \pm 0,12 \%$  ermittelt. Im Verlauf kommt es zu einer weiteren Zunahme des Anteils humaner DNA in muriner DNA. mit einem ermittelten Wert von  $0,60 \% \pm 0,18 \%$  5 Wochen nach entsprechender Xenotransplantation.

### 5.2.3 Quantitative Evaluierung von Lymphknotenmikrometastasen mittels immunhistochemischen Nachweis von Zytokeratin-19

Die Ausbreitung von humanen MDA-MB-435 in die regionären Lymphknoten kann auch immunhistochemisch dargestellt werden. Dazu erfolgte die immunhistochemische Darstellung von MDA-MB-435 Brustkrebszellen mit einem Antikörper gegen Zytokeratin-19 (Wu et al., 2001)



#### Abbildung 5.10 Immunhistochemischer Nachweis von Mikrometastasen in Lymphknoten

(A) Die Behandlung mit PBS-Puffer führt zum Nachweis von keiner Zytokeratin-19 positiven Zelle als Mikrometastase in den Lymphknoten (B) Nach einer Behandlung von 2 und 5 Wochen lassen sich Zytokeratin-19 positive Zellen im Lymphknoten immunhistochemisch nachweisen (Pfeile). (Balken = 100 µm)

In dem Lymphknotengewebe von nicht-tumortragenden Mäusen ließen sich keine Zytokeratin-19 positiven Zellen nachweisen. Im Gegensatz dazu fanden sich sowohl 2 als auch 5 Wochen nach Xenotransplantation von MDA-MB-435 Zellen einzelne Zytokeratin-19 positive Zellcluster in den Lymphknoten.

Zusammenfassend belegen die Daten, dass mittels der real-time PCR eine frühzeitige Metastasierung am besten quantifiziert werden kann. Die ermittelten Werte der real-

time PCR können dabei durch den immunhistochemischen Nachweis bestätigt werden (Abbildung 5.10). Der immunhistochemische Nachweis diene ebenfalls als Beweis dafür, dass tatsächlich MDA-MB-435 Zellen in den Lymphknoten vorhanden waren.

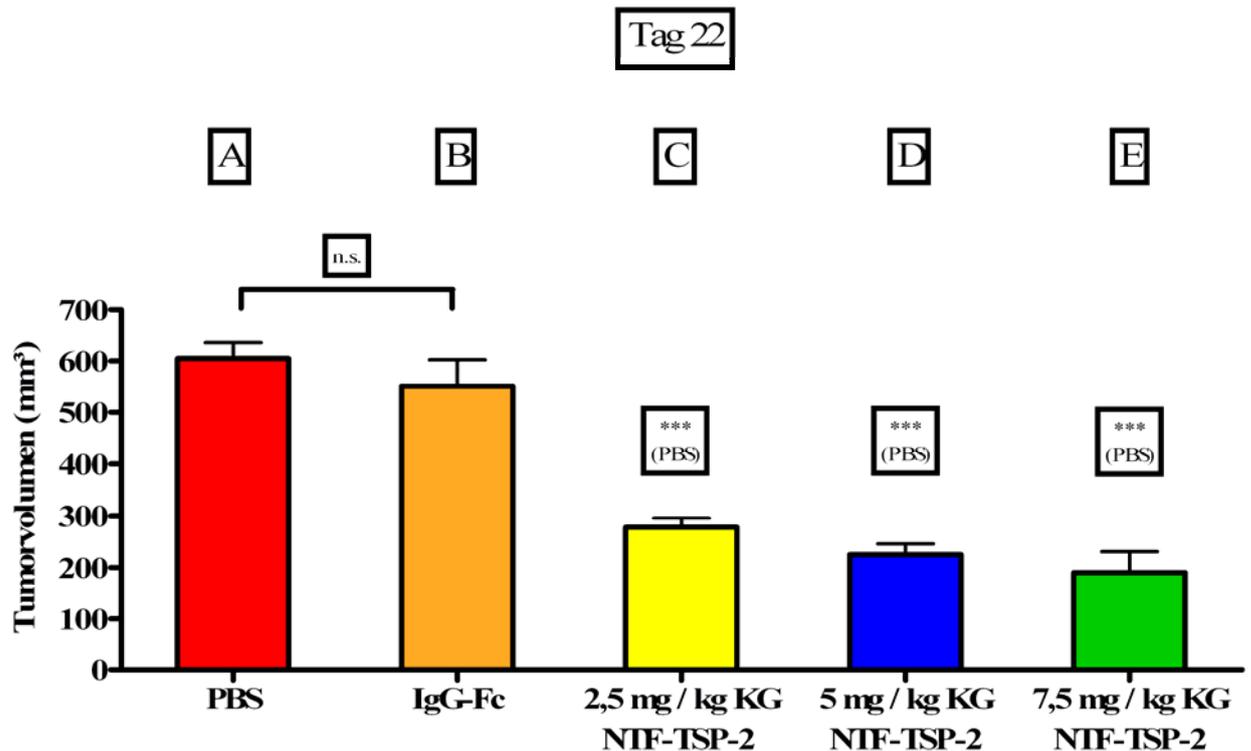
### **5.3 Effekte von NTF-TSP-2 auf das *in vivo* Tumorwachstum von MDA-MB-435 Brustkrebszellen**

Die humane Brustkrebszelllinie MDA-MB-435 ist ein geeignetes Xenotransplantationsmodell für metastasierenden Brustkrebs (Lang et al., 2005) (Lee et al., 2005). Die Zellen metastasieren dabei nach orthotoper Transplantation spontan in die Lunge und Lymphknoten (Price et al., 1990). Dieses Tumormodell wurde eingesetzt, um den Einfluss einer systemischen Gabe von NTF-TSP-2 auf das Brustkrebswachstum und die Lymphknoten- und Lungenmetastasierung *in vivo* zu untersuchen. Die Behandlung der Nacktmäuse erfolgte durch intraperitoneale Injektion. Diese Applikationsart ist etabliert und belastet die Versuchstiere in nur äußerst geringem Umfang (Teng et al., 1993).

#### **5.3.1 Die systemische Gabe von NTF-TSP-2 hemmt das Wachstum von MDA-MB-435 Mammakarzinomen**

Die antiangiogene Aktivität von NTF-TSP-2 *in vitro* gibt noch keinen Hinweis auf dessen *in vivo* Effekte. Um diese zu untersuchen, wurden Nacktmäusen humane MDA-MB-435 Brustkrebszellen beidseits in das Fettgewebe der zweiten Brustdrüse gespritzt. Nachdem die Tumoren 6 Tage nach Tumorzellinokulation soeben sichtbar waren, wurde die systemische Behandlung mit NTF-TSP-2 begonnen. Die Injektion erfolgte im Abstand von 24 h. Es wurden drei Gruppen gebildet, die mit jeweils unterschiedlichen Dosierungen an NTF-TSP-2 Proteinlösung therapiert wurden. Die Konzentrationen betragen 2,5 mg / kg KG, 5,0 mg / kg KG und 7,5 mg / kg KG. Als Kontrolle diente eine Gruppe, der nur PBS-Puffer in dem gleichen Volumen wie bei der NTF-TSP-2 Therapie injiziert wurde. Zum Ausschluss von *in vivo* Effekten, die auf den Fc-Teil des Fusionsproteins zurückzuführen sind, wurde eine weitere Gruppe von Mäusen gebildet, denen der Fc-Teil von humanem IgG ebenfalls täglich in einer Konzentration von 2,5 mg / kg KG injiziert wurde. Die Anzahl der Nacktmäuse betrug 3 Tiere pro Gruppe. An Tag 22 nach Tumorzellinokulation wurde das Volumen der Tumoren gemessen. Es lag für die PBS-Kontrollgruppe bei  $604,7 \text{ mm}^3 \pm 30,99 \text{ mm}^3$ . Im Vergleich zur Kontrollgruppe war das Tumorwachstum in allen Therapiegruppen

signifikant reduziert mit Tumorzvolumina von  $278,2 \text{ mm}^3 \pm 17,43 \text{ mm}^3$  bei einer NTF-TSP-2 Konzentration von  $2,5 \text{ mg / kg KG}$ ,  $225,1 \text{ mm}^3 \pm 20,87 \text{ mm}^3$  bei  $5,0 \text{ mg / kg KG}$  und  $190,0 \text{ mm}^3 \pm 40,84 \text{ mm}^3$  bei  $7,5 \text{ mg / kg KG}$ . Das Tumorzvolumen wurde durch die Behandlung von NTF-TSP-2 um 54 % bis 82 % im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe gehemmt.



#### Abbildung 5.11 Hemmung des Tumorzvolumens von Mammakarzinomen durch NTF-TSP-2

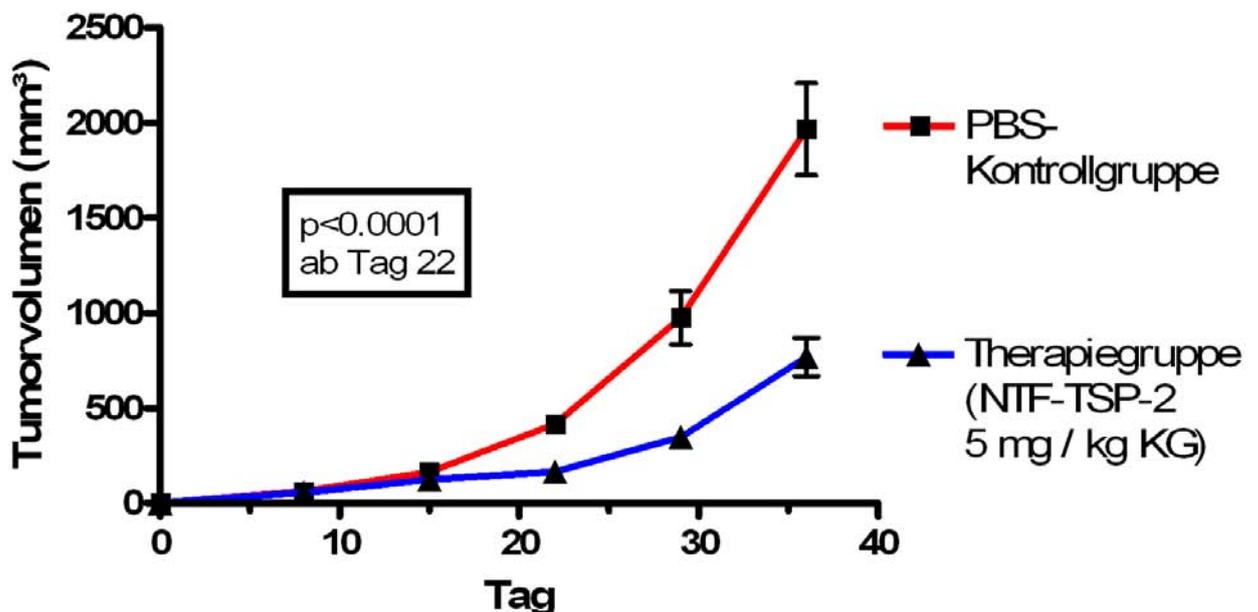
(A, C-E) Nach 16 Behandlungstagen wurde das Tumorzvolumen von xenotransplantierten MDA-MB-435 Mammakarzinomen durch intraperitoneale Applikation von NTF-TSP-2 in den Konzentration von  $2,5$ ,  $5,0$  und  $7,5 \text{ mg / kg KG}$  im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit PBS-Puffer deutlich gehemmt (für alle drei Dosierungen gilt  $p < 0,0001$ , ungepaarter t-Test). Die Tumorzvolumina innerhalb der drei NTF-TSP-2 Behandlungsgruppen ergaben keine signifikanten Unterschiede. (A-B) Die Behandlung mit IgG-Fc hatte im Vergleich zur PBS-Kontrolle keinen wesentlichen Einfluss auf das Tumorzvolumen ( $p = 0,3913$ , ungepaarter t-Test).

Dabei zeigte sich innerhalb der NTF-TSP-2 Behandlungsgruppe ein konzentrationsabhängiger Hemmeffekt, der jedoch statistisch nicht signifikant war. Lediglich gegenüber der Kontrollgruppe, die mit PBS behandelt wurde, ergab sich für alle drei NTF-TSP-2 Konzentrationen eine signifikante Hemmung des Tumorzvolumens. Die Applikation des Fc-Teils hatte keinen wesentlichen Effekt auf

das *in vivo* Tumorwachstum im Vergleich zur PBS-Kontrollbehandlung (Abbildung 5.11).

### 5.3.2 Die systemische Gabe von NTF-TSP-2 hemmt das Tumorwachstum über einen Zeitraum von 5 Wochen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die intraperitoneale Injektion von NTF-TSP-2 das Tumorwachstum von MDA-MB-435 signifikant hemmt, sollte die Wirkung einer intraperitonealen Gabe von NTF-TSP-2 über einen längeren Zeitraum untersucht werden.



**Abbildung 5.12 Die Behandlung von xenotransplantierten Mammakarzinomen mit NTF-TSP-2 führt zu einer deutlichen Hemmung des Tumorwachstums im Verlauf von 5 Wochen**

Die Behandlung von xenotransplantierten MDA-MB-435 Mammakarzinomen mit NTF-TSP-2 führte ab Tag 22 zu einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums (ab Tag 22 gilt  $p < 0,0001$ , ungepaarter t-Test). Nach einer Gesamtdauer von 36 Tagen führte die intraperitoneale Injektion von NTF-TSP-2 (5,0 mg / kg KG) zu einer Wachstumshemmung von 61 % im Vergleich zur Behandlung mit PBS-Puffer.

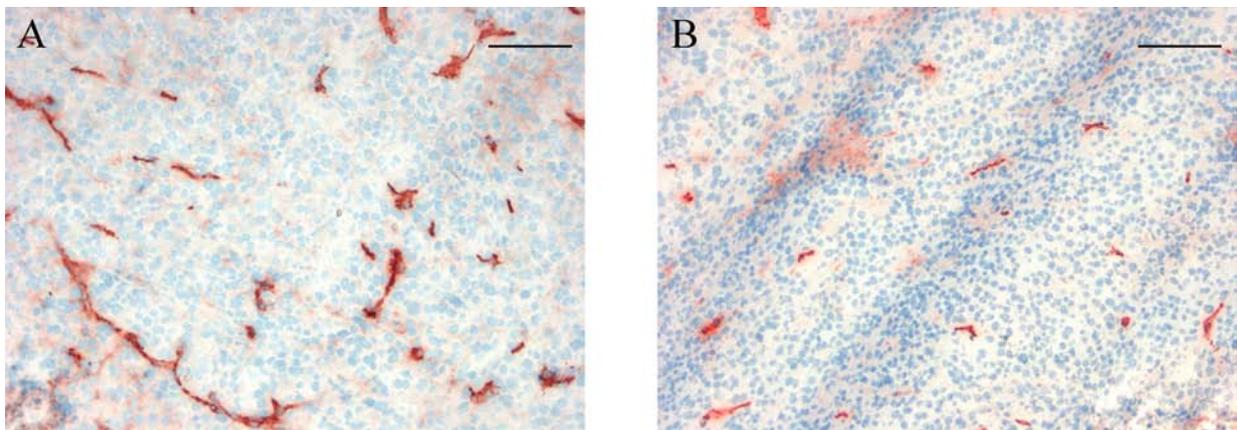
Dazu wurden Nacktmäuse mit MDA-MB-435 Brustkrebszellen orthotop inokuliert und ab Tag 6 in einem Abstand von 24 h mit NTF-TSP-2 in einer Konzentration von 5,0 mg / kg KG behandelt. Der Versuch dauerte ab dem Tag der Tumoringokulation insgesamt 36 Tage. Dabei wurden zwei Gruppen von Nacktmäusen jeweils mit

NTF-TSP-2 und zwei Gruppen zur Kontrolle mit PBS-Puffer in dem gleichen Volumen behandelt. Die Anzahl der Nacktmäuse betrug 10 Tiere pro Gruppe. Das Tumorumfang wurde jeweils an Tag 8, 15, 22, 29 und 36 nach Tumorzellinokulation gemessen.

Bereits nach 8 und 15 Tagen deutete sich eine Wachstumshemmung der Tumoren der Therapiegruppe ( $54,45 \text{ mm}^3 \pm 5,16 \text{ mm}^3$ ,  $124,71 \text{ mm}^3 \pm 12,69 \text{ mm}^3$ ) im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe ( $60,60 \text{ mm}^3 \pm 5,72 \text{ mm}^3$  und  $162,8 \text{ mm}^3 \pm 10,42 \text{ mm}^3$ ) an. Nach 22 Tagen wurde das Tumorumfang der therapierten Nacktmäuse ( $166,21 \text{ mm}^3 \pm 26,40 \text{ mm}^3$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $416,1 \text{ mm}^3 \pm 35,53 \text{ mm}^3$ ) um 40 % gehemmt. Die Hemmung zeigte sich ebenfalls nach 29 Tagen (NTF-TSP-2-Gruppe:  $346,01 \text{ mm}^3 \pm 46,94 \text{ mm}^3$ , PBS-Kontrolle:  $973,7 \text{ mm}^3 \pm 138,9 \text{ mm}^3$ ) und betrug 36 %. An Tag 36 wurde durch die Therapie eine Hemmung von bis zu 61 % erreicht ( $1965 \text{ mm}^3 \pm 241,2 \text{ mm}^3$  zu  $768,41 \text{ mm}^3 \pm 99,93 \text{ mm}^3$ ) (Abbildung 5.12).

### 5.3.3 Die systemische Gabe von NTF-TSP-2 hemmt die Angiogenese *in vivo*

Blutgefäße können durch immunhistochemischen Nachweis des panendothelialen Gefäßmarkers CD31 sichtbar gemacht werden (Dejana et al., 1995).



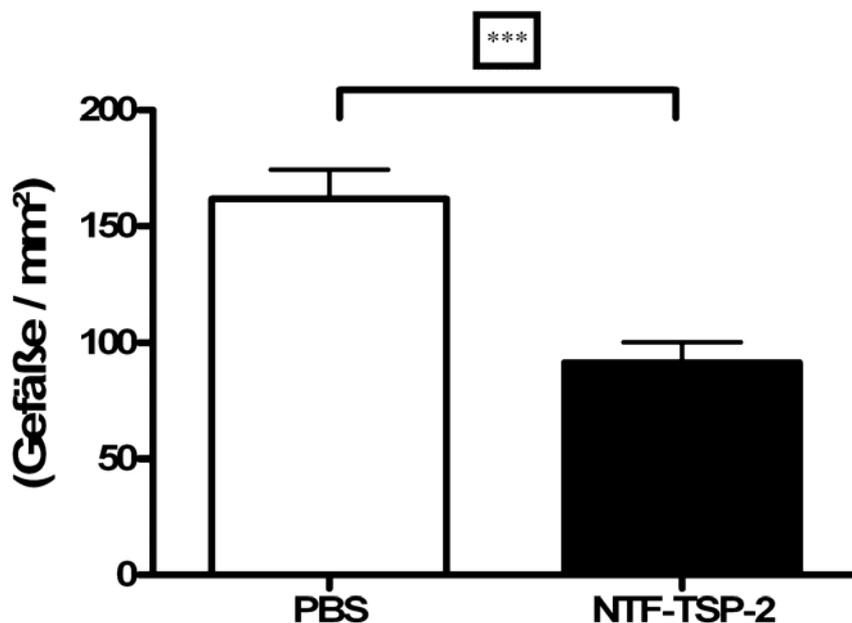
**Abbildung 5.13 Die Gabe von NTF-TSP-2 hemmt die Angiogenese *in vivo***

In dieser Abbildung werden immunhistochemisch gefärbte Gewebeschnitte von Tumoren gezeigt, die mit einem Antikörper gegen den Blutgefäßmarker CD31 behandelt werden. Dabei werden die Blutgefäße in Rot dargestellt. (A) Gewebeschnitt eines Tumors der PBS-Kontrollgruppe. (B) Gewebeschnitt eines Tumors der NTF-TSP-2 Therapiegruppe mit deutlichem Unterschied in der Anzahl, Größe und Fläche der Gefäße im Vergleich zur Kontrolle. (Balken = 100  $\mu\text{m}$ )

An Tag 36 nach Tumorzellinokulation wurden den Nacktmäusen die Tumoren entnommen und diese jeweils halbiert. Die immunhistochemische morphometrische Analyse der

Gefäße im Tumorgewebe wurde unter Verwendung der IP Lab Software durchgeführt. Die Anzahl betrug 10 Tumorgewebeschnitte pro Gruppe. Dabei wurden pro Tumorgewebeschnitt drei unterschiedliche Areale ausgewählt und ausgewertet. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Anzahl der Blutgefäße pro Tumorfläche (Gefäßdichte) in den Tumoren der Mäuse, die intraperitoneal mit NTF TSP 2 behandelt wurden, signifikant vermindert (Abbildung 5.13).

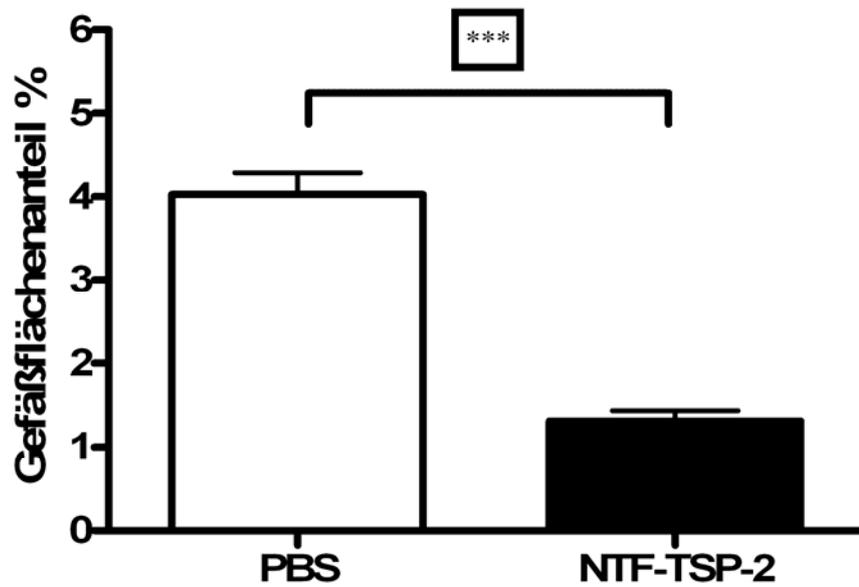
Während die Gefäßdichte in der Kontrollgruppe bei  $161,8 \text{ Gefäße} / \text{mm}^2 \pm 12,22 \text{ Gefäße} / \text{mm}^2$  lag, war diese in der NTF-TSP-2 Gruppe um 43 % reduziert und betrug  $91,60 \text{ Gefäße} / \text{mm}^2 \pm 8,62 \text{ Gefäße} / \text{mm}^2$  (Abbildung 5.14).



**Abbildung 5.14 Hemmung der Gefäßdichte durch NTF-TSP-2**

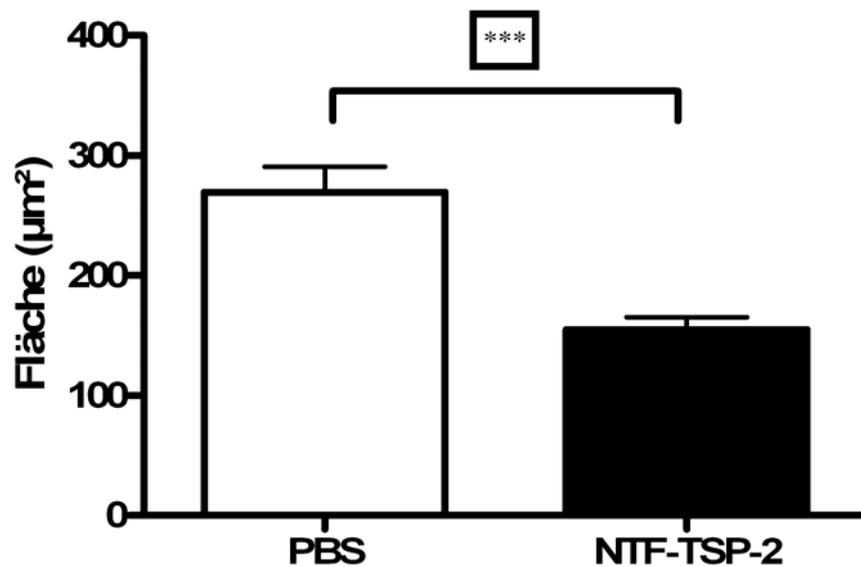
Die Behandlung mit NTF-TSP-2 führt im Vergleich zur PBS-Kontrolle zu einer signifikanten Hemmung der Gefäße pro Fläche ( $p < 0,0001$ , ungepaarter t-Test).

Der Anteil an Fläche, der durch Gefäße eingenommen wird, der sogenannte Gefäßflächenanteil, war ebenfalls durch die Gabe von NTF-TSP-2 ( $1,31 \% \pm 0,1259 \%$ ) im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe ( $4,027 \% \pm 0,262 \%$ ) signifikant kleiner. Insgesamt wird der Gefäßflächenanteil durch die Therapie mit NTF-TSP-2 um 67 % im Vergleich zur Kontrolle vermindert (Abbildung 5.15).



**Abbildung 5.15 Reduzierung des Gefäßflächenanteils durch NTF-TSP-2**

Verglichen mit der PBS-Kontrollgruppe wird der Gefäßflächenanteil durch die Behandlung mit NTF-TSP-2 deutlich gehemmt ( $p < 0,0001$ , ungepaarter t-Test).



**Abbildung 5.16 Verringerung der durchschnittlichen Fläche der Blutgefäße durch NTF-TSP-2**

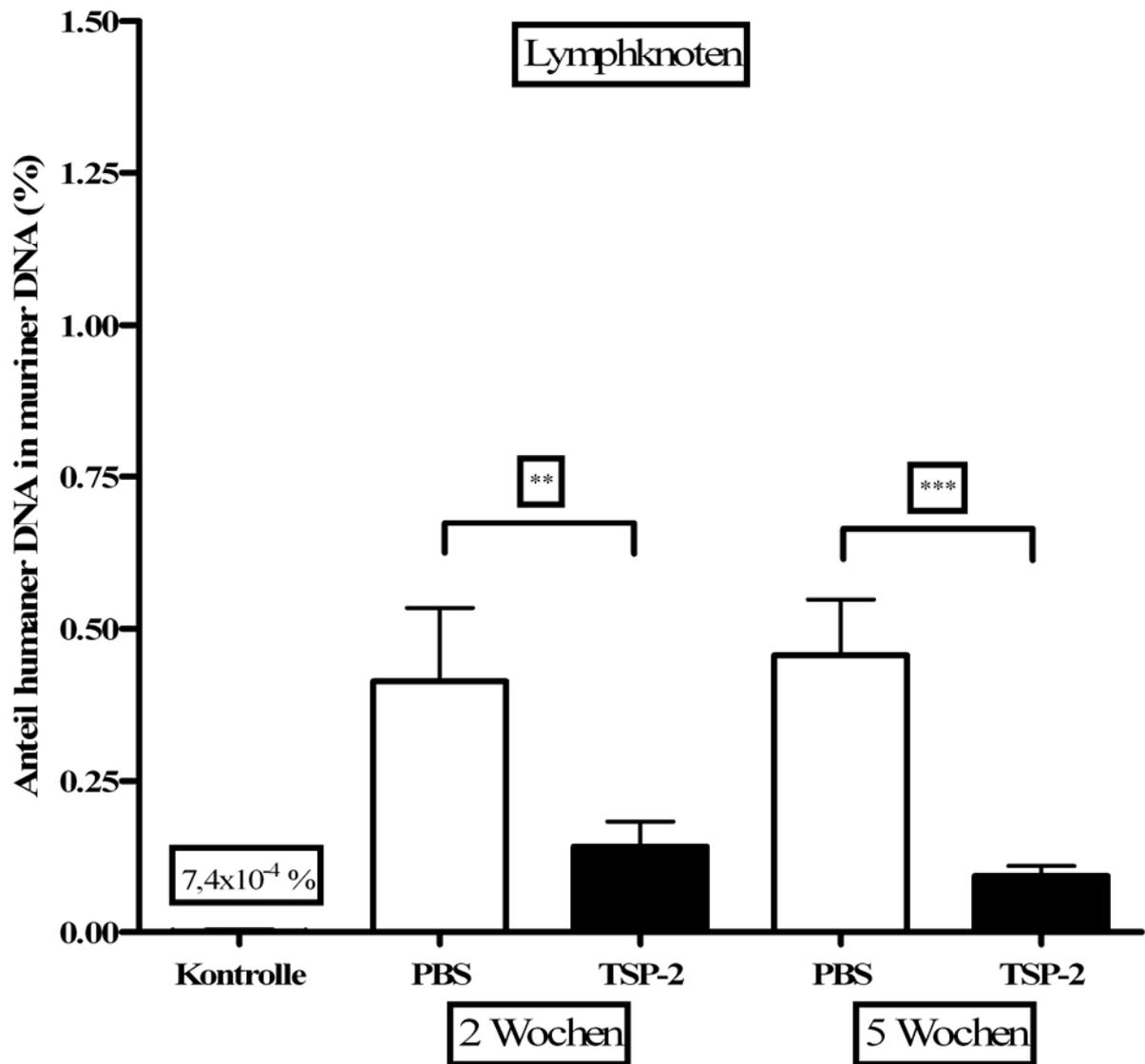
Auch die durchschnittliche Fläche der Blutgefäße wurde durch die Behandlung mit NTF-TSP-2 im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe deutlich reduziert ( $p < 0,0001$ , ungepaarter t-Test).

Die durchschnittliche Fläche der Blutgefäße im Tumorgewebe beträgt nach der Behandlung mit PBS-Puffer  $269,4 \mu\text{m}^2 \pm 21,49 \mu\text{m}^2$ . Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit NTF-TSP-2 zu einer signifikanten Reduzierung der Fläche um 43 % auf einen Wert von  $154,5 \mu\text{m}^2 \pm 10,45 \mu\text{m}^2$  (Abbildung 5.16).

#### **5.3.4 Die systemische Gabe von NTF-TSP-2 hemmt die lymphogene und pulmonale Metastasierung**

Die intraperitoneale Gabe von NTF-TSP-2 hemmt das Tumorstadium und die Angiogenese von humanen Brustkrebszellen *in vivo*. Als nächstes wurde der Einfluss von NTF-TSP-2 auf die Metastasierung von orthotop xenotransplantierten MDA-MB-435 Brustkrebszellen mittels real-time PCR human spezifischer Alu-Sequenzen untersucht. Dazu wurden während des oben beschriebenen Tumorstadiumsverlaufsversuches 2 bzw. 5 Wochen nach Tumorzellinokulation die Lungen und axillären Lymphknoten entnommen und nach Isolierung der genomischen DNA mittels real-time PCR der Anteil humaner in muriner DNA ermittelt.

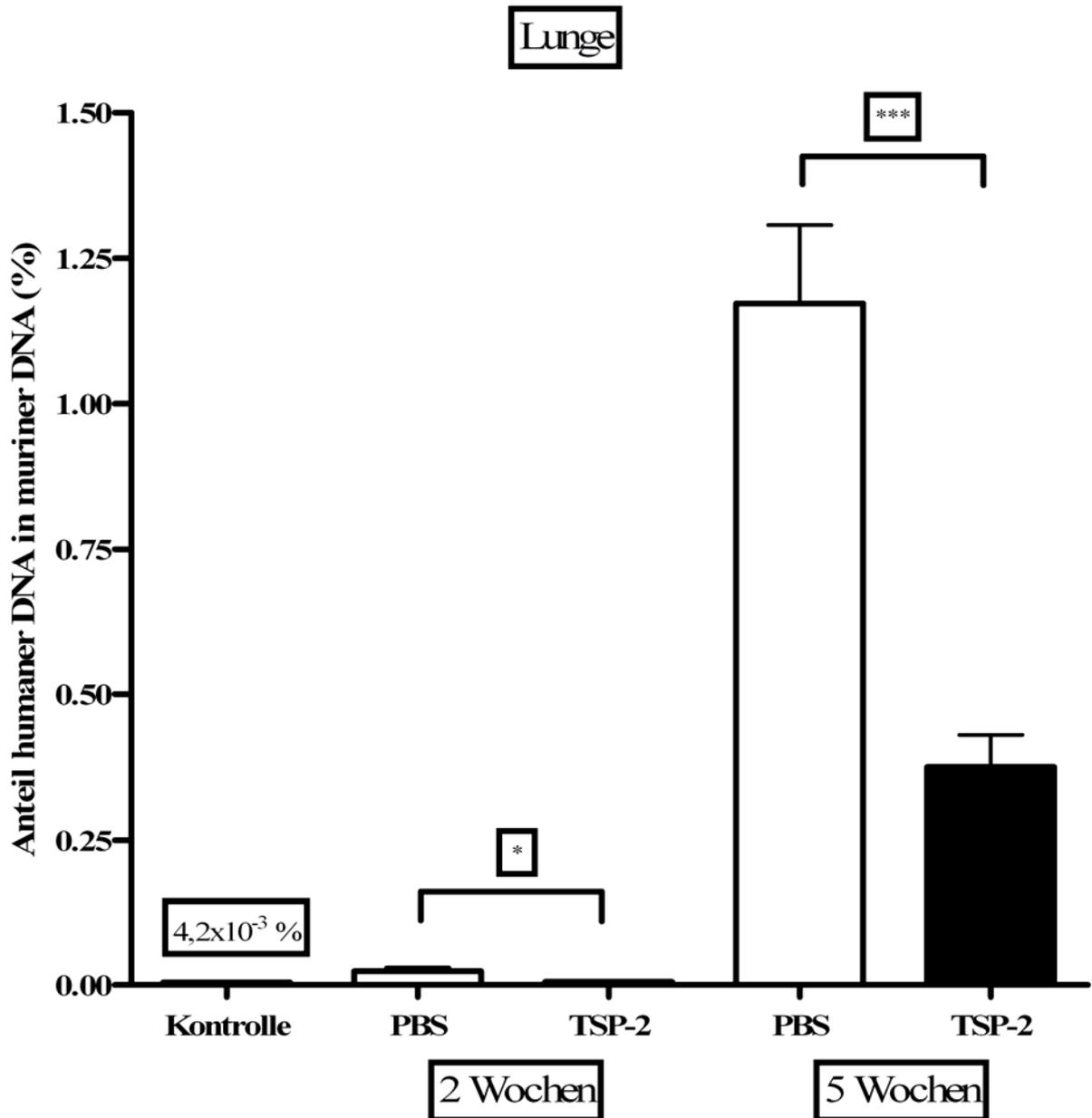
Die Metastasierung in die Lymphknoten wurde durch die Gabe von NTF-TSP-2 sowohl nach 2 Wochen als auch nach 5 Wochen im Vergleich zur Gabe von PBS-Puffer signifikant gehemmt. Vierzehn Tage nach Xenotransplantation betrug der in den Lymphknoten nachgewiesene Anteil humaner DNA in muriner DNA in den NTF-TSP-2 behandelten Mäusen  $0,141 \% \pm 0,041 \%$ . Dieser Anteil war im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $0,413 \% \pm 0,122 \%$ ) um 66 % signifikant reduziert. Nach einem Zeitraum von 5 Wochen war der hemmende Effekt durch die Behandlung mit NTF-TSP-2 ( $0,093 \% \pm 0,016 \%$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $0,456 \pm 0,093 \%$ ) sogar noch deutlicher (80 %) (Abbildung 5.17).



**Abbildung 5.17 Die Gabe von NTF-TSP-2 hemmt die Metastasierung von MDA-MB-435 Brustkrebszellen in die Lymphknoten**

Die Metastasierung von humanen MDA-MB-435 Brustkrebszellen wurde durch die Bestimmung des Anteils humaner DNA in muriner DNA in Lymphknotengewebe mittels quantitativer real-time PCR bestimmt. Bereits nach zwei und auch noch nach 5 Wochen zeigte sich im Vergleich zur PBS-Kontrolle eine signifikante Hemmung der Metastasierung in die Lymphknoten durch systemische Applikation von NTF-TSP-2. ( $p = 0,0017$ , Mann-Whitney-U-Test), ( $p < 0,0001$ , Mann-Whitney-U-Test). In Lymphknotengewebe nicht-tumortragender Mäuse konnte nur ein kaum messbarer Anteil humaner DNA in muriner DNA als sogenannter Messfehler der Methode nachgewiesen werden.

Der Anteil humaner DNA in muriner DNA von Wildtyp-Lymphknoten liegt bei  $7,4 \cdot 10^{-4} \% \pm 1,9 \cdot 10^{-4} \%$  und wird ebenfalls ermittelt, um die Spezifität der Methode zu belegen.



**Abbildung 5.18 Die Gabe von NTF-TSP-2 hemmt die Metastasierung von MDA-MB-435 Brustkrebszellen in die Lunge**

Bereits nach zwei Wochen wird die Metastasierung von MDA-MB-435 Brustkrebszellen in die Lunge gehemmt ( $p = 0,016$ , Mann-Whitney-U-Test). Nach 5 Wochen steigt der Anteil rapide an und wird durch die Gabe von NTF-TSP-2 deutlich gehemmt ( $p < 0,0001$ , Mann-Whitney-U-Test). Als Kontrollwert diente die Vermessung von Wildtyp-DNA aus Lungen.

Die Metastasierung in die Lungen wird ebenfalls durch die Gabe von NTF-TSP-2 sowohl nach 2 Wochen als auch nach 5 Wochen deutlich gehemmt. Nach 2 Wochen liegt der Anteil sowohl bei der Therapiegruppe ( $0,0056 \% \pm 0,9 \cdot 10^{-3} \%$ ) als auch bei der Kontrollgruppe ( $0,0236 \% \pm 0,0064 \%$ ) unter 0,1 %. Der Anteil steigt nach 5 Wochen in der Kontrollgruppe rapide an ( $1,172 \pm 0,135 \%$ ) und wird durch die

Behandlung mit NTF-TSP-2 ( $0,376 \% \pm 0,055 \%$ ) um 68 % vermindert (Abbildung 5.18).

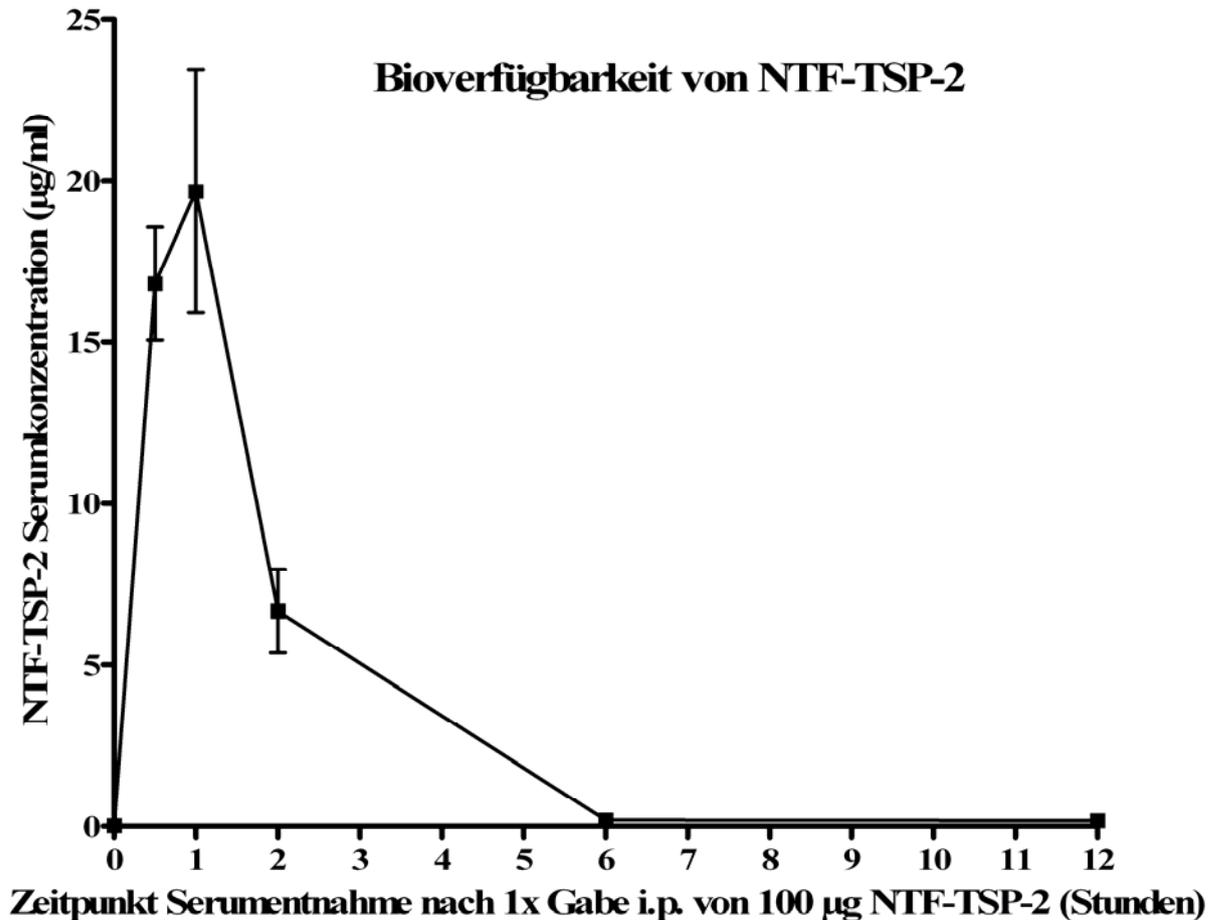
## **5.4 Verteilung von appliziertem NTF-TSP-2 im Mausgewebe**

### **5.4.1 Inhibitions-ELISA**

Zum Nachweis von intraperitoneal injiziertem NTF-TSP-2 im Serum von Mäusen wurde ein Inhibitions-ELISA etabliert. Die zu untersuchende Serumprobe wurde mit einer konstanten Menge des Antikörpers Anti-TSP-2 inkubiert und die Menge der freien Antikörper über eine Nachweisplatte mit dem Fusionsprotein NTF-TSP-2 bestimmt. Die NTF-TSP-2-Menge einer Probe verhält sich dabei reziprok zur Menge der freien Antikörper und kann über eine Standardverdünnungsreihe berechnet werden. Diese bestand aus einer seriellen Verdünnung von NTF-TSP-2 in PBS. Die Auswertung der Messungen erfolgte durch die Software SigmaPlot.

### **5.4.2 Untersuchung der Bioverfügbarkeit von NTF-TSP-2 mittels Inhibitions-ELISA**

24 Nacktmäusen wurden MDA-MB-435 Brustkrebszellen transplantiert und nach 2 Wochen einmalig die Dosis von 5,0 mg / kg KG NTF-TSP-2 intraperitoneal injiziert. Das entspricht bei einem Durchschnittsgewicht der Nacktmäuse von 20 Gramm 100 µg NTF-TSP-2. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde Blut abgenommen und das Serum isoliert. Die Zeitpunkte der Blutentnahmen waren nach 0 Stunden, also ohne vorherige NTF-TSP-2 Injektion, nach 30 Min., 1h, 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 72 h nach intraperitonealer NTF-TSP-2 Injektion. Es wurden pro Zeitpunkt 3 Nacktmäuse verwendet. Zur Bestimmung der NTF-TSP-2 Konzentration im Serum wurde ein Inhibitions-ELISA mit einem Primärantikörper gegen den N-Terminus von humanem TSP-2 (Anti-TSP-2) durchgeführt. Die Ermittlung der Serumkonzentration erfolgte durch Doppelbestimmung. Die Bestimmung der Serumkonzentrationen erfolgte in einer Serumverdünnung von 1:50 in PBS-Puffer und von 1:500 in PBS-Puffer mit je 2,5 ng Anti-TSP-2 Antikörper pro Probe.



**Abbildung 5.19** Untersuchung der Bioverfügbarkeit von NTF-TSP-2

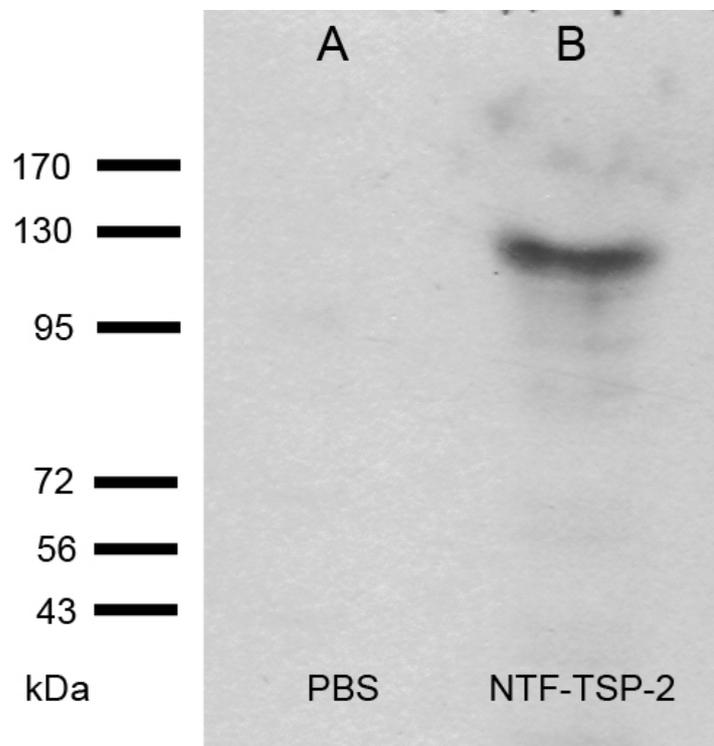
Mit Mammakarzinomen xenotransplantierten Nacktmäusen wurden einmalig 100 µg NTF-TSP-2 intraperitoneal verabreicht. Durch Bestimmung der Serumkonzentrationen von NTF-TSP-2 mittels Inhibitions-ELISA nach unterschiedlichen Zeitpunkten lässt sich eine Bioverfügbarkeitskurve ermitteln. Als Kontrollwert diente Serum von xenotransplantierten Nacktmäusen vor der NTF-TSP-2 Gabe und Serum von Wildtyp-Mäusen.

Die Messwerte der Serumproben wurden auf die Messwerte einer Standardverdünnungsreihe bezogen. Als Kontrollwerte dienten eine Serumverdünnung von Wildtyp-Serum ( $10,1 \text{ ng / ml} \pm 4,1 \text{ ng / ml}$ ) und eine zum Zeitpunkt von 0 Stunden ( $28,4 \text{ ng / ml} \pm 3,6 \text{ ng / ml}$ ). Die Maximalkonzentration von NTF-TSP-2 wurde bereits nach 1 h Stunde ( $19,67 \text{ µg / ml} \pm 3,76 \text{ µg / ml}$ ) erreicht. Die Konzentration von NTF-TSP-2 stieg zunächst nach 30 Minuten an ( $16,81 \text{ µg / ml} \pm 1,75 \text{ µg / ml}$ ) und erreichte nach einer Stunde den Maximalwert mit  $19,67 \text{ µg / ml} \pm 3,76 \text{ µg / ml}$ . Im weiteren Verlauf fiel die NTF-TSP-2 Konzentration im Serum wieder ab. Nach 2 h wurde ein Wert von  $6,67 \text{ µg / ml} \pm 1,29 \text{ µg / ml}$ , nach 6 h  $198,0 \text{ ng / ml} \pm 53,0 \text{ ng / ml}$ , nach 12 h  $178,8 \text{ ng / ml} \pm 42,7 \text{ ng / ml}$ , nach 24 h  $29,0 \text{ ng / ml} \pm 6,3 \text{ ng / ml}$  und nach 72

h  $9,4 \text{ ng / ml} \pm 4,7 \text{ ng / ml}$  ermittelt (Abbildung 5.19). Das Blutvolumen bei Nacktmäusen mit einem Durchschnittsgewicht von 20 Gramm liegt bei 2 ml. Daraus lässt sich die Hälfte an Serum isolieren. Nach intraperitonealer Injektion von  $100 \mu\text{g}$  gingen also maximal  $19,67 \mu\text{g}$  NTF-TSP-2 ins Blut über, was einem Anteil von 19,7 % entspricht.

#### 5.4.3 Nachweis von intraperitoneal appliziertem NTF-TSP-2 im Tumorgewebe

Zum Nachweis von NTF-TSP-2 im Tumor wurden am Ende des Versuches über 5 Wochen Tumoren aus der PBS-Kontrollgruppe und Tumoren aus der NTF-TSP-2 Therapiegruppe mit Gewebelysispuffer lysiert. TSP-2 wurde zunächst mittels eines Antikörpers gegen die N-terminale Domäne von TSP-2 aus dem Tumorlysate immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE des Immunpräzipitates wurde ein Western Blot zur Detektion von TSP-2 durchgeführt. Hierbei ließ sich eine ca. 110 kDa große Proteinbande im Tumorlysate der Tumoren der NTF-TSP-2 Therapiegruppe nachweisen, während in den Kontrolltumoren keine Proteinbande nachweisbar war (Abbildung 5.20).



**Abbildung 5.20 Nachweis von NTF-TSP-2 nach Immunpräzipitation mittels Western Blot**

(A) Ein Western Blot mit Anti-TSP-2 zeigt bei lysierten Tumoren nach Behandlung mit nur PBS-Puffer nach Immunpräzipitation kein sichtbares Signal. (B) Bei lysierten Tumoren nach Behandlung mit NTF-TSP-2 kann vermehrt humanes TSP-2 in einer Größe von 110 kDa nachgewiesen werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass das intraperitoneal injizierte NTF-TSP-2 sowohl im Serum als auch im Tumorgewebe nachweisbar ist.

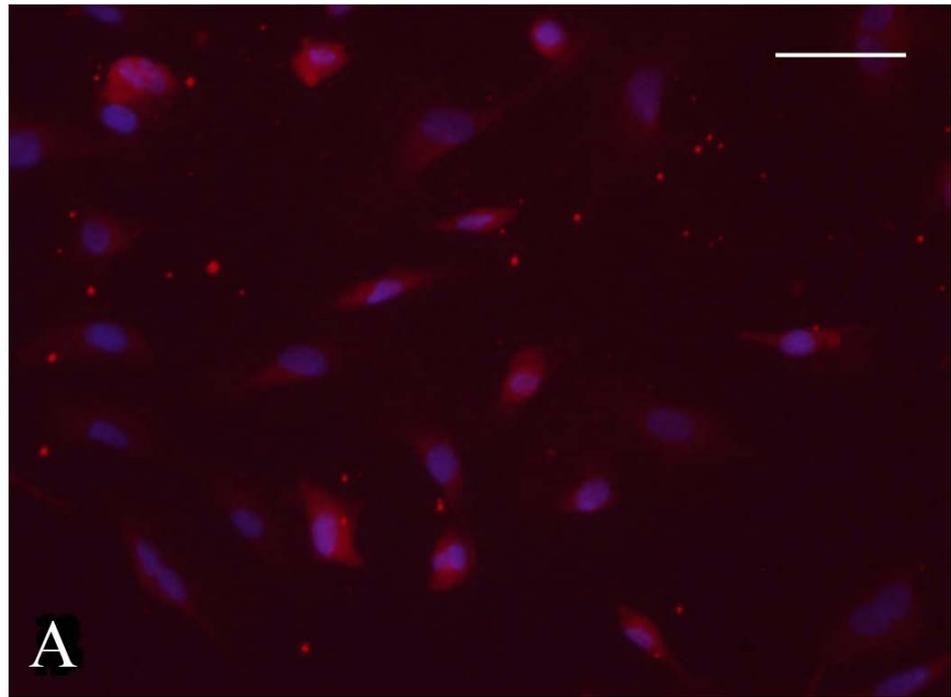
## **5.5 Einfluss von NTF-TSP-2 auf Endothelzellen *in vitro***

Für die Type-1-Repeats von TSP-1 ist bereits gezeigt worden, dass sie an den CD36 Rezeptor von Endothelzellen binden (Asch et al., 1992) (Li et al., 1993). TSP-1 hemmt dabei die Migration von CD36-transfizierten HUVEC über einen CD36-abhängigen Mechanismus (Dawson et al., 1997). TSP-2 besitzt analog zu TSP-1 auch drei Type-1-Repeats (Adams and Lawler, 2004). Über eine direkte Wirkung von TSP-2 auf Endothelzellen ist zurzeit nur wenig bekannt.

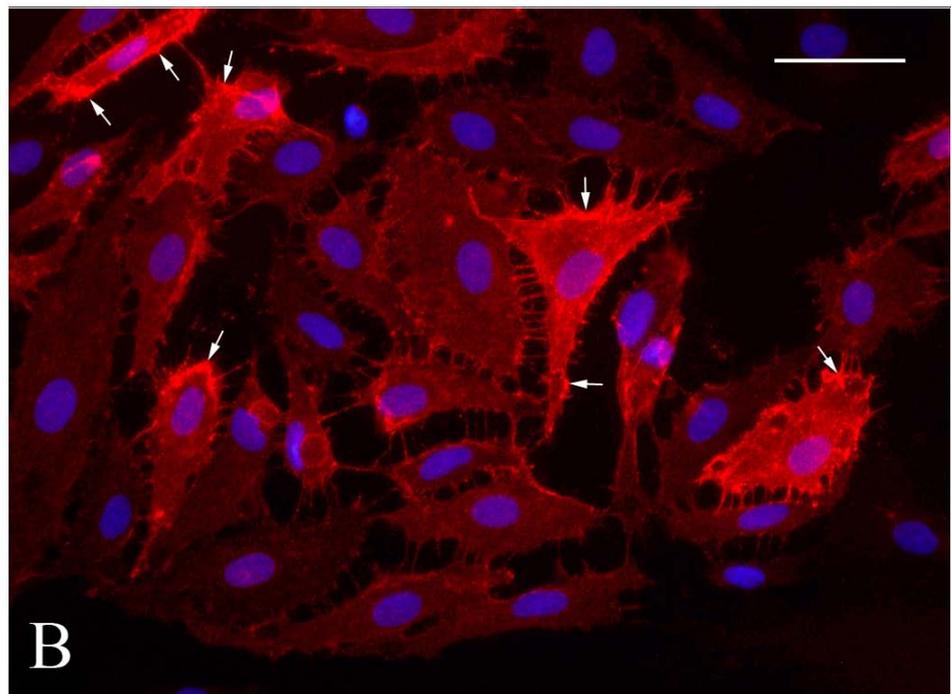
### **5.5.1 Nachweis des CD36 Rezeptors auf HDMEC**

Der CD36 Rezeptor soll auf HDMEC aber nicht auf HUVEC exprimiert sein. Zunächst wurden die für diese Arbeit isolierten HUVEC und kommerziell erworbenen HDMEC hinsichtlich CD36 Expression mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen CD36 untersucht. Zur besseren Darstellung der Zellen wurden die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. Während für HUVEC (Abbildung 5.21 A) mittels Immunfluoreszenzfärbung keine Expression von CD36 nachzuweisen war, konnte für HDMEC (Abbildung 5.21 B) ein deutliches Signal auf der Zellmembran detektiert werden.

HUVEC



HDMEC



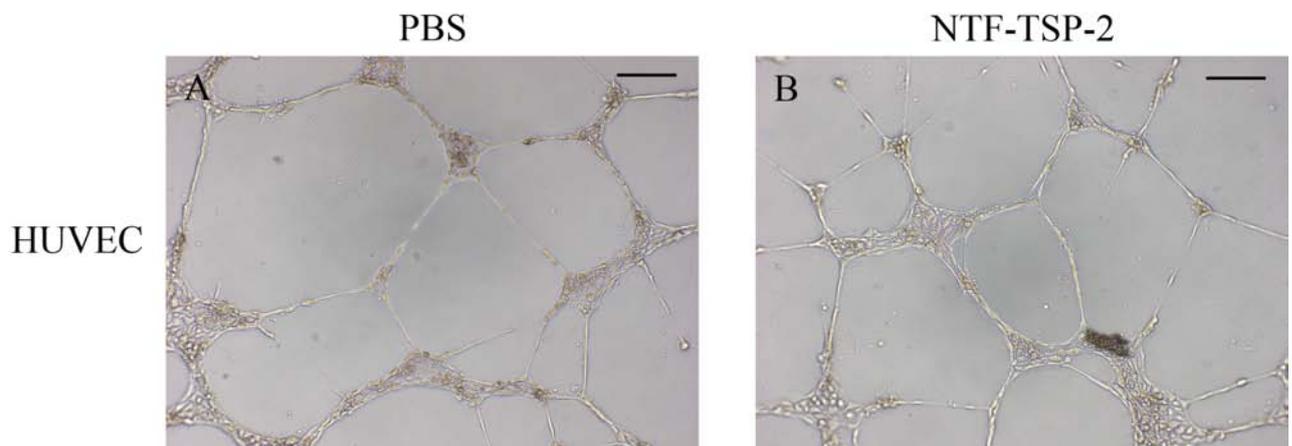
**Abbildung 5.21** Darstellung von immunfluoreszenzgefärbten HDMEC und HUVEC mit einem Antikörper gegen CD36

(A) HUVEC und (B) HDMEC wurden mit einem Antikörper gegen den CD36 Rezeptor inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht (blaue Fluoreszenz). (B) Positive Immunfluoreszenzfärbung für CD36 auf der Zellmembran von HDMEC (Pfeile) (A) Bei HUVEC lassen sich lediglich Zellkerne mit etwas unspezifischer perinukleärer Hintergrundfluoreszenz darstellen. (Balken = 50  $\mu$ m)

### 5.5.2 Angiogenesehemmung durch NTF-TSP-2 über einen CD36-abhängigen Mechanismus

Die Ausbildung der VEGF-stimulierten Ausbildung von Endothelzellröhren konnte durch die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 im Vergleich zur PBS-Kontrolle signifikant gehemmt werden. Für TSP-1 ist gezeigt worden, dass die antiangiogene Wirkung unter anderem über den Rezeptor CD36 erfolgt.

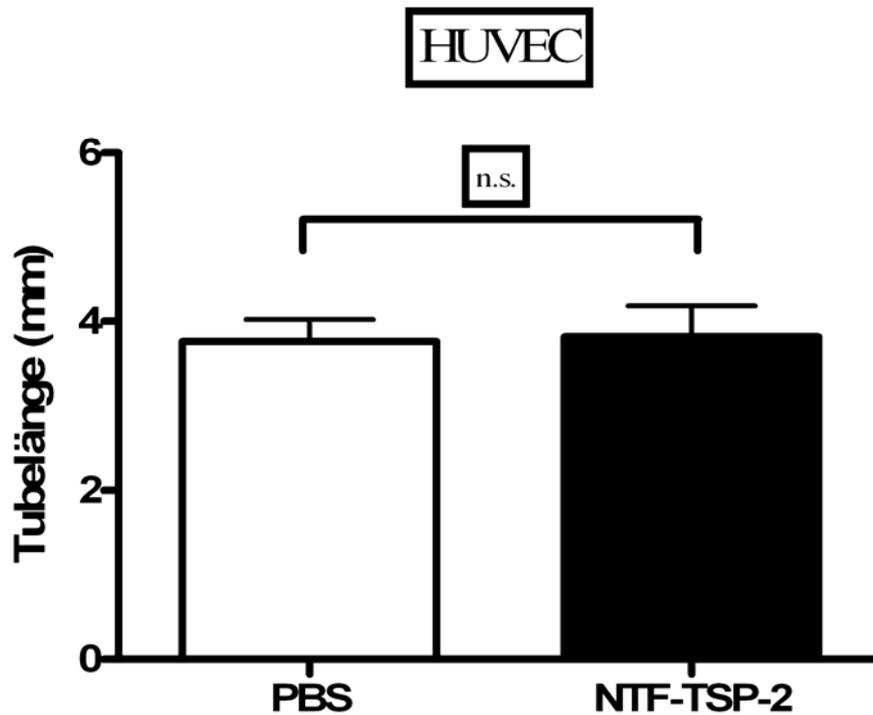
Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung des CD36 Rezeptors für die antiangiogenen Effekte von NTF-TSP-2 wurden zunächst HUVEC, denen der CD36 Rezeptor fehlt (Swerlick et al., 1992), im Tube Formation Assay mit NTF-TSP-2 behandelt (Abbildung 5.22).



**Abbildung 5.22 Die Behandlung von HUVEC mit NTF-TSP-2 hemmt nicht die VEGF-induzierte Ausbildung von Endothelzellröhren**

Im Vergleich zur VEGF-induzierten Ausbildung von Endothelzellröhren in den PBS-behandelten Kontrollkulturen (A) führt die Zugabe von NTF-TSP-2 (B) zur keiner Hemmung der „Tube Formation“ von HUVEC. Die Anzahl der Messungen beträgt sechs pro Gruppe. (Balken = 200 µm)

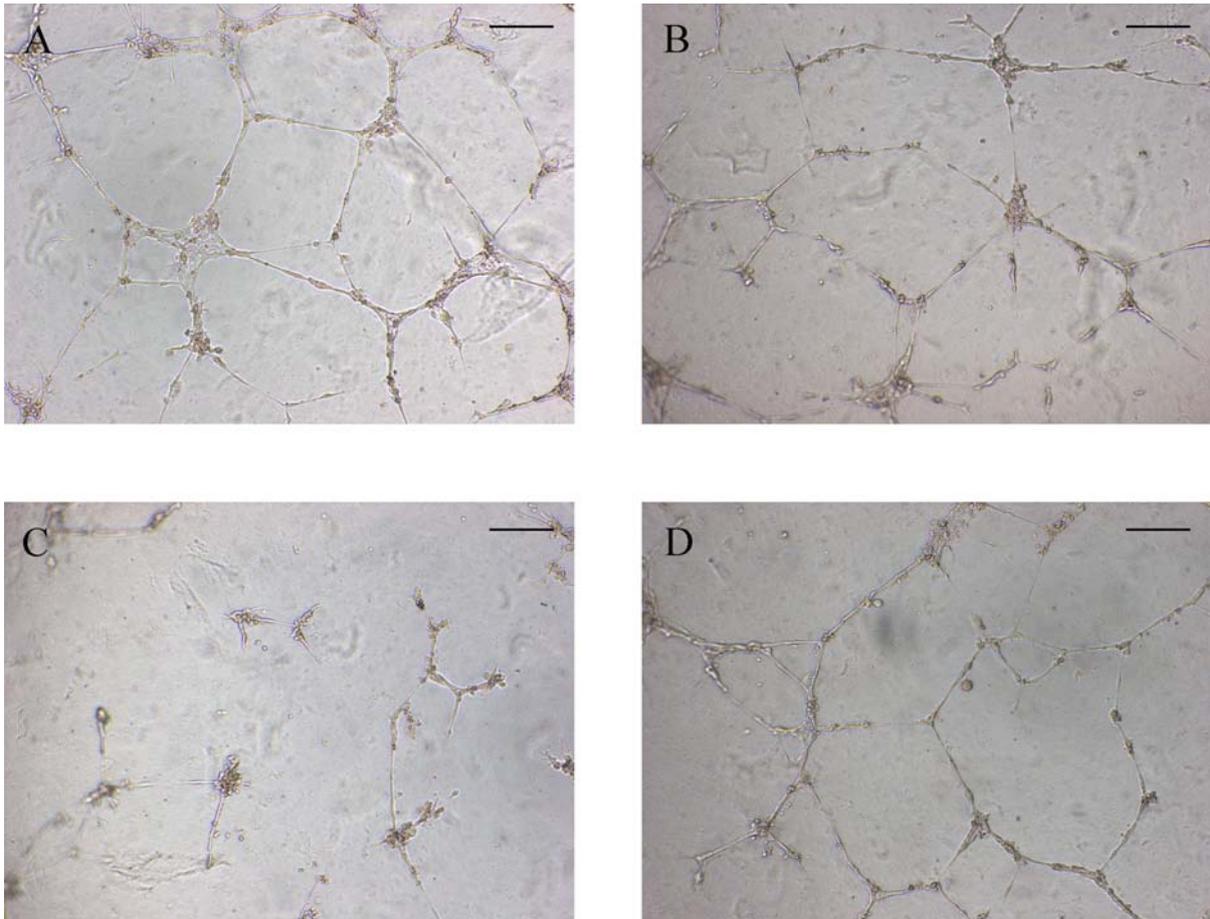
Im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit PBS-Puffer ( $3,761 \text{ mm} \pm 0,263 \text{ mm}$ ) konnte die Ausbildung von Endothelzellröhren durch NTF-TSP-2 ( $3,816 \text{ mm} \pm 0,367 \text{ mm}$ ) nicht gehemmt werden (Abbildung 5.23).



**Abbildung 5.23 NTF-TSP-2 hemmt nicht die VEGF induzierte, „Tube Formation“ von HUVEC**  
Die Behandlung von HUVEC mit NTF-TSP-2 führt im Vergleich zur PBS-Kontrolle zu keiner Hemmung der Ausbildung von Endothelzellröhren ( $p = 0,0005$ , ungepaarter t-Test).

Diese Daten deuten an, dass die antiangiogene Aktivität von NTF-TSP-2 über den CD36 Rezeptor vermittelt wird. Dies sollte durch nachfolgend aufgeführte Experimente weiter analysiert werden.

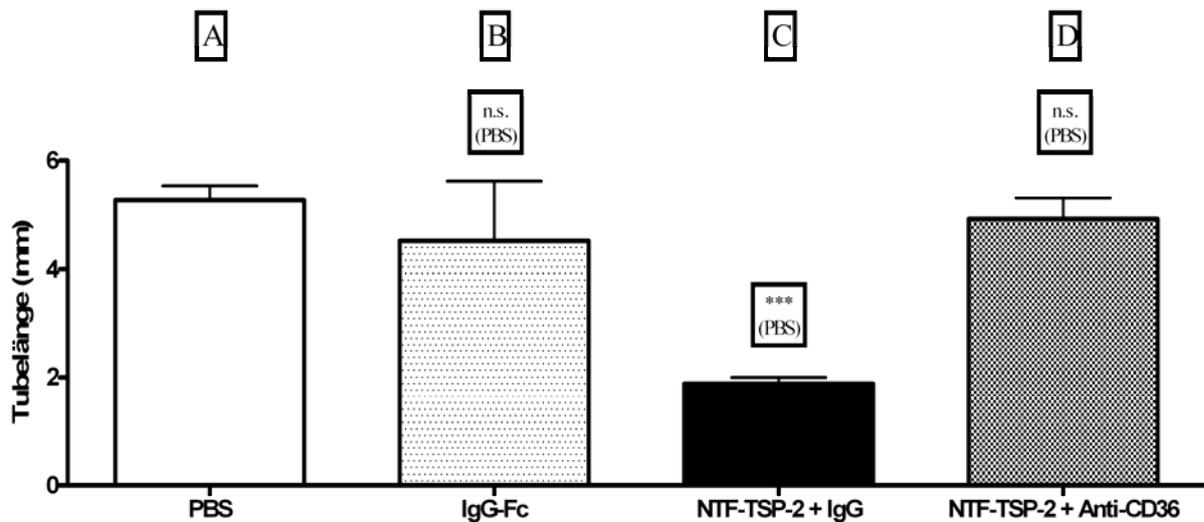
Dazu wurde ein Tube-Formation-Assay mit HDMEC durchgeführt. (Abbildung 5.24). Dabei wurden HDMEC zur Kontrolle nur mit PBS-Puffer, mit NTF-TSP-2 in einer Endkonzentration von  $40 \mu\text{g} / \text{ml}$  in Kombination mit murinem Immunglobulin G in einer Endkonzentration von  $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ , mit NTF-TSP-2 in einer Endkonzentration von  $40 \mu\text{g} / \text{ml}$  plus Anti-CD36 in einer Endkonzentration von  $10 \mu\text{g} / \text{ml}$  und zur weiteren Kontrolle nur mit dem Fc-Teil von humanem IgG in PBS-Puffer in einer Endkonzentration von  $20 \mu\text{g} / \text{ml}$  behandelt. Die Kombination von NTF-TSP-2 mit murinem Immunglobulin G wurde gewählt, um die Effekte des reinen Immunglobulins des Antikörpers Anti-CD36 auszuschließen.



**Abbildung 5.24 Die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 hemmt die Ausbildung von Endothelzellröhren über einen CD36-abhängigen Mechanismus**

Als Kontrolle dient die Behandlung von VEGF-stimulierten HDMEC mit PBS-Puffer (**A**). Die Ausbildung von Endothelzellröhren wird durch die Behandlung mit IgG-Fc (**B**) im Vergleich zur PBS-Kontrolle nicht beeinflusst. Die Behandlung mit NTF-TSP-2 in Kombination mit murinem IgG (**C**) führt im Vergleich zur PBS-Kontrolle zu einer Hemmung der Ausbildung von Endothelzellröhren. In Gegenwart eines CD36-blockierenden Antikörpers (**D**) ist die Hemmung der VEGF-stimulierten HDMEC durch NTF-TSP-2 nicht mehr nachweisbar. (Balken = 200  $\mu\text{m}$ )

Die Behandlung mit NTF-TSP-2 in Kombination mit murinem IgG ( $1,885 \text{ mm} \pm 0,117 \text{ mm}$ ) führte im Vergleich zur Behandlung mit PBS ( $5,280 \text{ mm} \pm 0,271 \text{ mm}$ ) zu einer deutlichen Hemmung der Ausbildung VEGF-stimulierter Endothelzellröhren um 64 %. Die Hemmung der Endothelzellröhrenbildung durch NTF-TSP-2 wurde durch Zugabe eines CD36-blockierenden Antikörpers weitgehend aufgehoben und war im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr signifikant ( $4,932 \text{ mm} \pm 0,393 \text{ mm}$ ). Die Behandlung mit dem Fc-Teil von humanem IgG ( $4,536 \text{ mm} \pm 0,368 \text{ mm}$ ) hatte ebenfalls keinen wesentlichen Einfluss auf die Ausbildung der Endothelzellröhren und wurde nur um 14 % reduziert. (Abbildung 5.25)



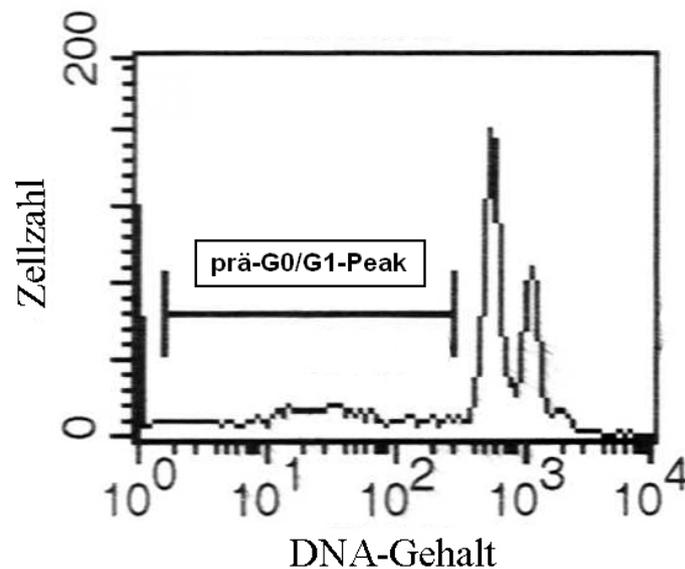
**Abbildung 5.25 CD36-abhängige Hemmung der Angiogenese durch NTF-TSP-2 im „Tube Formation Assay“**

(A und B) Im Vergleich zur PBS-Kontrolle (A) hatte die Behandlung von VEGF-stimulierten HDMEC mit IgG-Fc (B) keinen wesentlichen Einfluss auf die Ausbildung von Endothelzellröhren. ( $p = 0,123$ , ungepaarter t-Test). (A und C) Die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 in Kombination mit murinem IgG (C) führte zu einer signifikanten Hemmung der VEGF-stimulierten Ausbildung von Endothelzellröhren im Vergleich zur PBS-Kontrolle (A) ( $p < 0,0001$ , ungepaarter t-Test). (A und D) Die Ausbildung von VEGF-stimulierten Endothelzellröhren war vergleichbar zu HDMEC die mit PBS (A) und denen, die mit NTF-TSP-2 und einem CD36 blockierenden Antikörper (D) behandelt wurden. ( $p = 0,476$ , ungepaarter t-Test). Der Versuch wird in drei voneinander unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung durchgeführt.

## 5.6 Einfluss von NTF-TSP-2 auf die Apoptose von Endothelzellen

### 5.6.1 Die Behandlung mit NTF-TSP-2 induziert die Apoptose von HDMEC über einen CD36-abhängigen Mechanismus

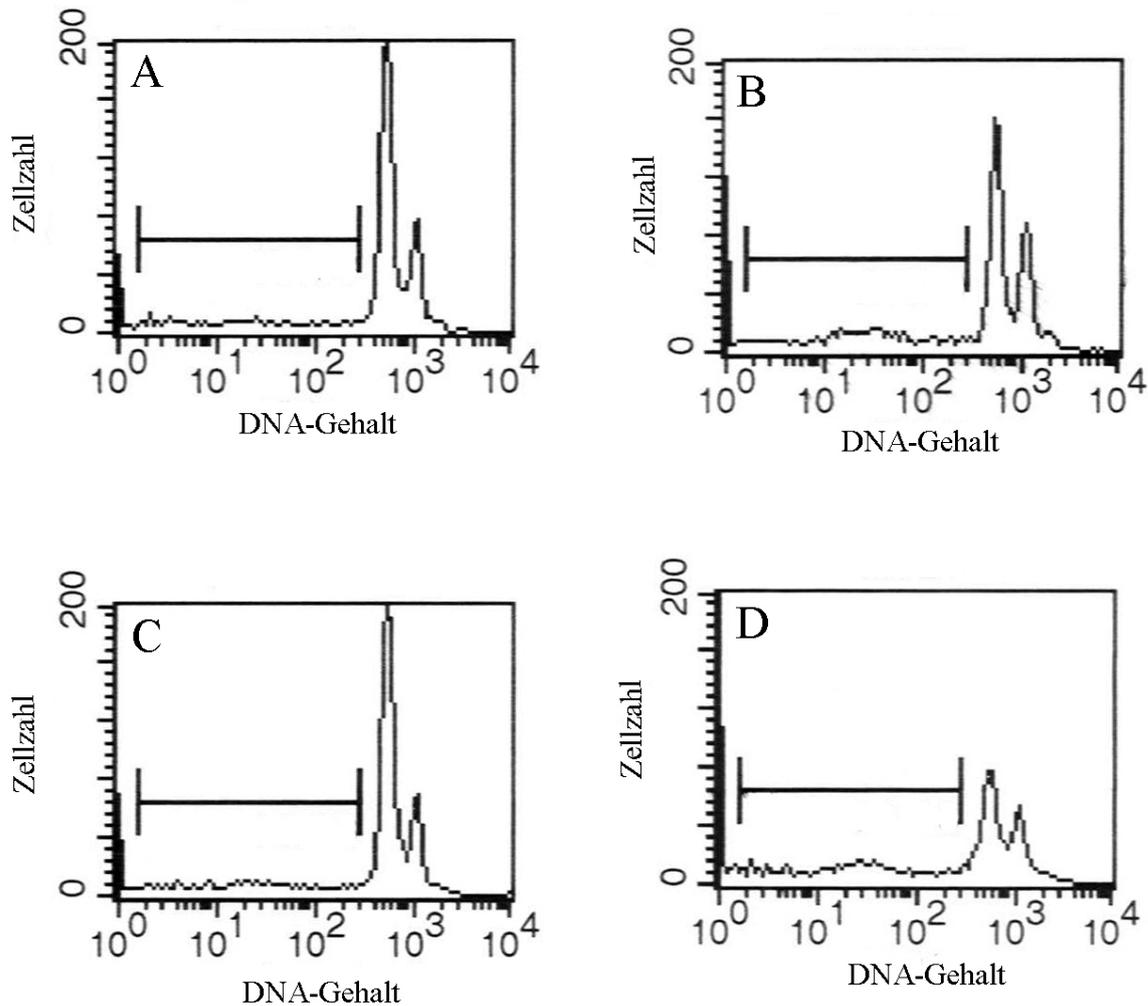
Im Endstadium von Apoptose findet vermehrt die Degradation von DNA in Fragmente durch Endonukleasen statt. Die Fragmente verlassen dann den Zellkern über die Zellkernporen in das Zytoplasma (Wyllie, 1980). Der höhere Anteil an DNA im Zytoplasma kann durchflusszytometrisch mit der Methode nach Nicoletti quantitativ bestimmt werden (Nicoletti et al., 1991). Bei der Vermessung der Proben wird der Zellzyklus in einem Histogramm der Propidiumiodid-Fluoreszenz dargestellt. Der Zyklus teilt sich dabei in prä-G0/G1-, G0/G1-, S- und G2/M-Phase auf. Der Anteil apoptotischer Zellen ist im prä-G0/G1-Peak dargestellt und kann prozentual im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen bestimmt werden (Abbildung 5.26).



**Abbildung 5.26 Graphische Darstellung einer durchflusszytometrischen Messung**

Der Zellzyklus wird in einem Histogramm der Propidiumiodid-Fluoreszenz dargestellt. Der Anteil apoptotischer Zellen ist im prä-G0/G1-Peak dargestellt und wird prozentual bestimmt.

Mit der durchflusszytometrischen Methode nach Nicoletti lässt sich die Apoptose von Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Stimulantien quantitativ bestimmen (Fister et al., 2007a) (Fister et al., 2007b). Dabei lässt sich die Apoptose von HDMEC durch Inkubation mit  $10^{-7}$  M Doxorubicin induzieren. Der Anteil apoptotischer Zellen liegt nach der Behandlung mit Doxorubicin bei  $31,83 \% \pm 1,16 \%$ . Die Methode ist somit zum Nachweis apoptotischer HDMEC geeignet. Es wurde nun untersucht, ob die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 Apoptose induziert. Dazu wurden HDMEC zur Kontrolle mit dem Fc-Teil von humanem IgG in PBS-Puffer in einer Endkonzentration von  $20 \mu\text{g} / \text{ml}$  behandelt. HDMEC wurden weiterhin mit NTF-TSP-2 in einer Endkonzentration von  $40 \mu\text{g} / \text{ml}$  in Kombination mit murinem IgG in einer Endkonzentration von  $10 \mu\text{g} / \text{ml}$  behandelt. Der Anteil apoptotischer HDMEC nach Inkubation mit NTF-TSP-2 in Kombination mit murinem IgG stieg im Vergleich zur Fc-behandelten Kontrollgruppe um 47% signifikant an und lag bei  $26,27 \% \pm 1,57 \%$ , während dieser in der IgG-Fc-Kontrollgruppe mit  $17,83 \% \pm 0,58 \%$  ermittelt wurde.

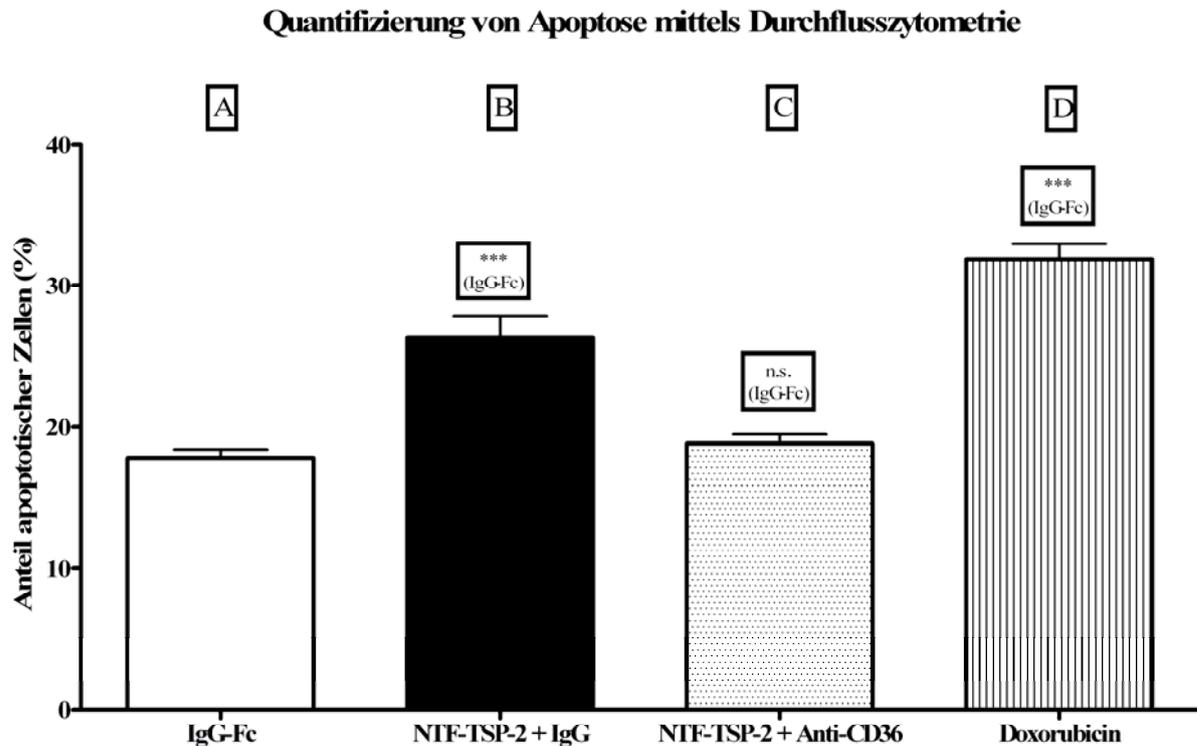


**Abbildung 5.27 Die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 induziert die Apoptose über einen CD36-abhängigen Mechanismus**

HDMEC werden mit IgG-Fc in PBS-Puffer (A), NTF-TSP2 in Kombination mit murinem IgG (B), NTF-TSP-2 in Kombination mit einem CD36-blockierenden Antikörper (C) und mit Doxorubicin (D) behandelt. Sowohl die Behandlung mit NTF-TSP-2 in Kombination mit murinem IgG (B) als auch die Behandlung mit Doxorubicin (D) (dient als Positivkontrolle) zeigen einen deutlich größeren prä-G0/G1-Peak im Vergleich zur Behandlung von HDMEC mit IgG-Fc in PBS-Puffer (A) (dient als Negativkontrolle) und der Behandlung mit NTF-TSP-2 in Kombination mit einem CD36-blockierenden Antikörper (C).

Ferner wurden HDMEC mit NTF-TSP-2 in einer Endkonzentration von 40  $\mu\text{g} / \text{ml}$  in Kombination mit Anti-CD36 in einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{g} / \text{ml}$  behandelt. Dieser hemmende Effekt auf die Endothelzellröhrenbildung war nach Inkubation der HDMEC mit NTF-TSP-2 (40  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) in Gegenwart eines CD36-blockierenden Antikörpers (10  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) nicht mehr nachweisbar. Der Anteil apoptotischer HDMEC

(18,83 %  $\pm$  0,64 %) war vergleichbar mit dem in der IgG-Fc-Kontrollgruppe. Somit scheint die Induktion von Apoptose durch die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 über den CD36 Rezeptor vermittelt zu werden. (Abbildung 5.28).



**Abbildung 5.28 Apoptoseinduktion von HDMEC durch NTF-TSP-2 ist abhängig vom CD36 Rezeptor**

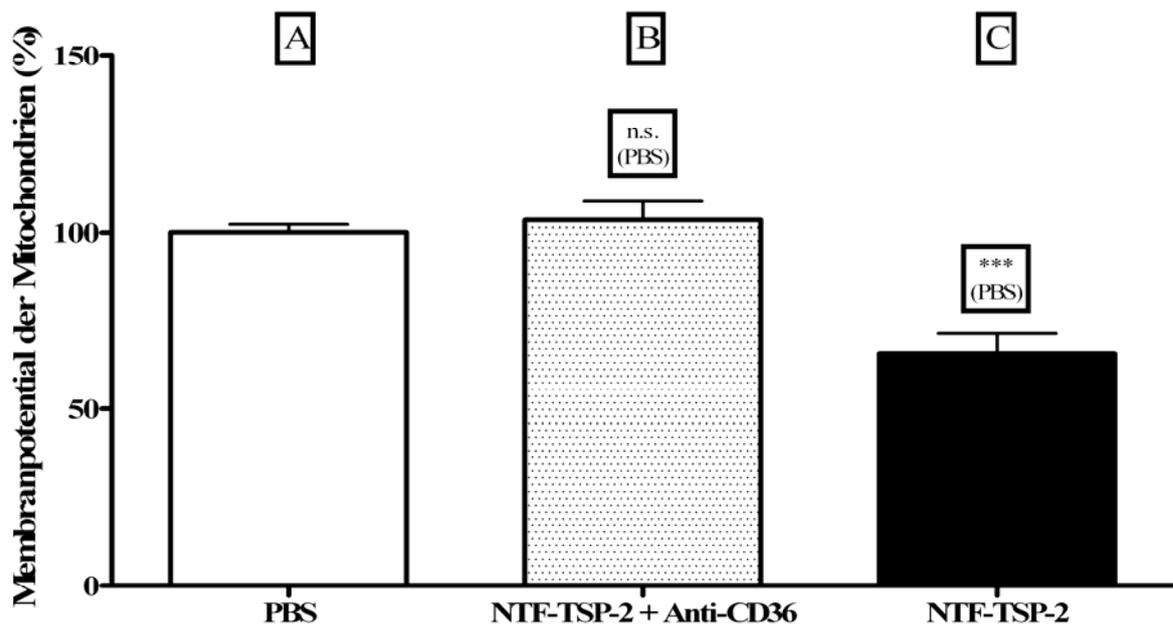
Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil apoptotischer Zellen nach Inkubation mit IgG-Fc (A), NTF-TSP-2 in Kombination mit murinem IgG (B), NTF-TSP-2 + CD36 Antikörper (C) und Doxorubicin (D) analysiert. Im Vergleich zur IgG-Fc-Kontrolle (A) führte die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 in Kombination mit murinem IgG (B) zu einem signifikant höheren Anteil apoptotischer Zellen ( $p < 0,0001$ , ungepaarter t-Test). Im Gegensatz dazu veränderte sich im Vergleich zur IgG-Fc-Kontrollgruppe (A) der Anteil nicht, wenn HDMEC mit NTF-TSP-2 in Kombination mit einem CD36-blockierenden Antikörper (C) inkubiert wurden ( $p = 0,2583$ , ungepaarter t-Test). Die Induktion von Apoptose bei HDMEC durch NTF-TSP-2 ist somit CD36-abhängig. Als Positivkontrolle diente die Inkubation von HDMEC mit Doxorubicin (D) ( $p < 0,0001$ , ungepaarter t-Test). Der Versuch wurde in drei voneinander unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung durchgeführt.

### 5.6.2 Die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 führt zu einem CD36-abhängigen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials

Charakteristisches Merkmal bei der Apoptoseinduktion über den intrinsischen Signalweg ist der schnelle Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, was zu einer Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Proteinen führt

(Goldstein et al., 2000). Durch die Behandlung von Zellen mit verschiedenen Stimulantien lässt sich ein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials nachweisen (Fister et al., 2007a).

Zur Kontrolle des mitochondrialen Membranpotentials wurden HDMEC nur mit PBS-Puffer behandelt. Dabei wurden die Messwerte der PBS-Kontrolle im Mittel auf 100 % festgelegt und die anderen Messwerte auf diesen Mittelwert bezogen und ebenfalls als prozentualer Anteil dargestellt.



**Abbildung 5.29 Die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 führt zu einem CD36-abhängigen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials**

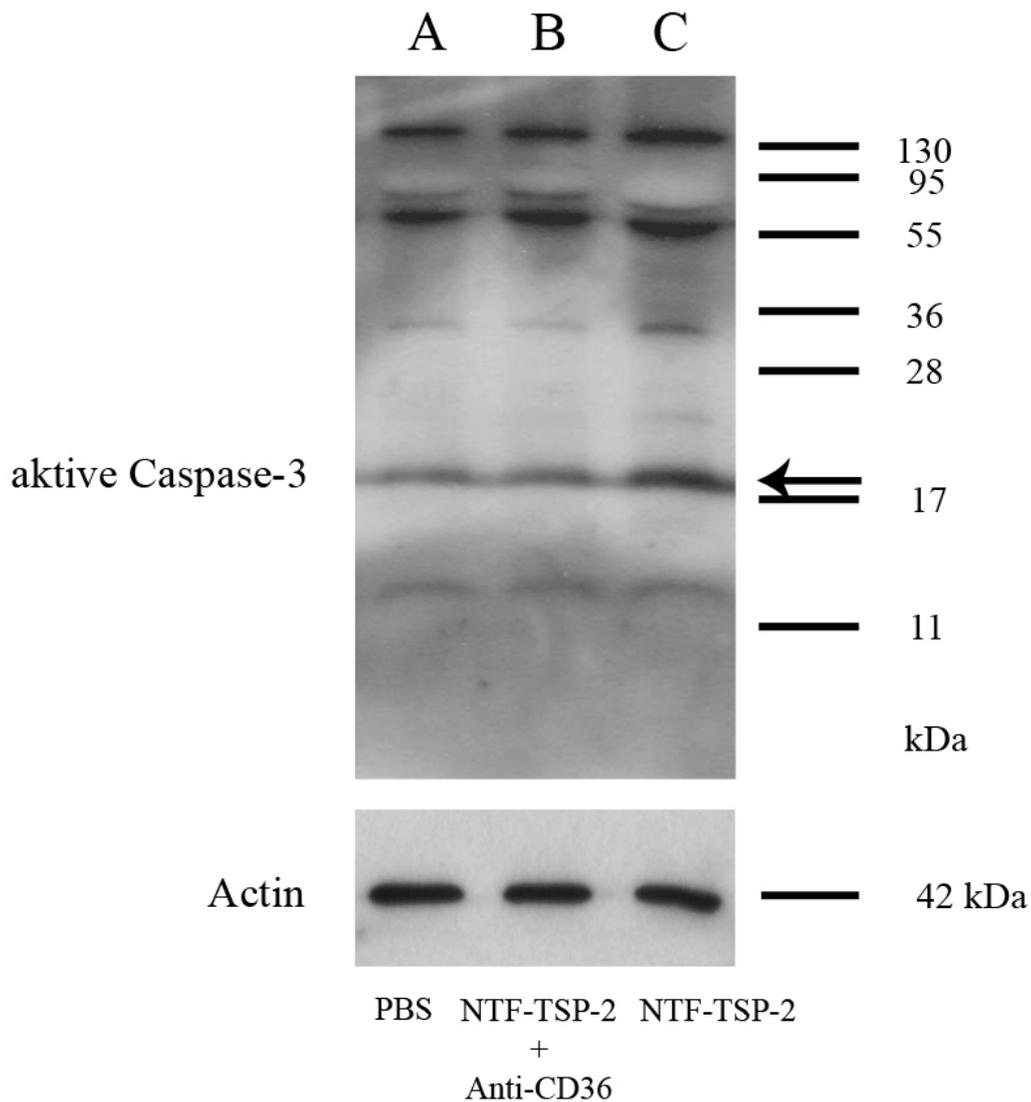
Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials wird für die Behandlung mit PBS-Puffer (A) auf den Wert 100 % festgelegt. Die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 in Kombination mit einem CD36-blockierenden Antikörper (B) führte im Vergleich zur PBS-Kontrolle (A) zu keinem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ( $p = 0,5673$ , ungepaarter t-Test). Die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 (C) führte im Vergleich zur PBS-Kontrolle (A) zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials von 34 % ( $p < 0,0001$ , ungepaarter t-Test). Der Versuch wurde in drei voneinander unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 in einer Endkonzentration von 40  $\mu\text{g} / \text{ml}$  zeigte im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit PBS-Puffer eine deutliche Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials. Das Membranpotential der Mitochondrien lag bei der PBS-Kontrolle bei 100 %  $\pm 2,19$  %, während es nach der Behandlung mit NTF-TSP-2 nur noch 65,51 %  $\pm 5,79$  % betrug. Die Behandlung mit

NTF-TSP-2 in einer Endkonzentration von 40  $\mu\text{g} / \text{ml}$  in Kombination mit Anti-CD36 (103,5 %  $\pm$  5,34 %) führte im Vergleich zur PBS-Kontrolle zu keiner Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials. Damit konnte gezeigt werden, dass der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials bei HDMEC durch eine Behandlung mit NTF-TSP-2 abhängig vom CD36 Rezeptor ist (Abbildung 5.29).

### **5.6.3 CD36-abhängige Aktivierung von Caspase-3 durch NTF-TSP-2**

Initiator-Caspasen aktivieren sowohl über den extrinsischen als auch über den intrinsischen Signalweg Caspase-3 als Effektor-Caspase (Kumar, 2007). Durch die Behandlung von Zellen mit verschiedenen Stimulantien lässt sich die Aktivierung von Caspase-3 nachweisen (Fister et al., 2007a). Dazu wurden HDMEC lysiert, um die Gesamtmenge an Protein zu extrahieren. Mittels Western Blot wurde die Aktivität von Caspase-3 bestimmt. Dazu wurde die Expression von aktiver Caspase-3 mit einem für aktive Caspase-3 spezifischen Primärantikörper ermittelt. Der Expressionsgrad von aktiver Caspase-3 einer Proteinprobe wurde auf den Expressionsgrad von Actin der gleichen Proteinprobe bezogen und ins Verhältnis gesetzt. Zur Kontrolle wurden HDMEC nur mit PBS-Puffer behandelt. Dabei wurden die Messwerte der PBS-Kontrolle im Mittel auf 100 % festgelegt und die anderen Messwerte auf diesen Mittelwert bezogen und ebenfalls als prozentualer Anteil dargestellt. Weiterhin wurden HDMEC mit NTF-TSP-2 in einer Endkonzentration von 40  $\mu\text{g} / \text{ml}$  behandelt. Zusätzlich wurden HDMEC mit NTF-TSP-2 in einer Endkonzentration von 40  $\mu\text{g} / \text{ml}$  in Kombination mit Anti-CD36 in einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{g} / \text{ml}$  behandelt (Abbildung 5.30).

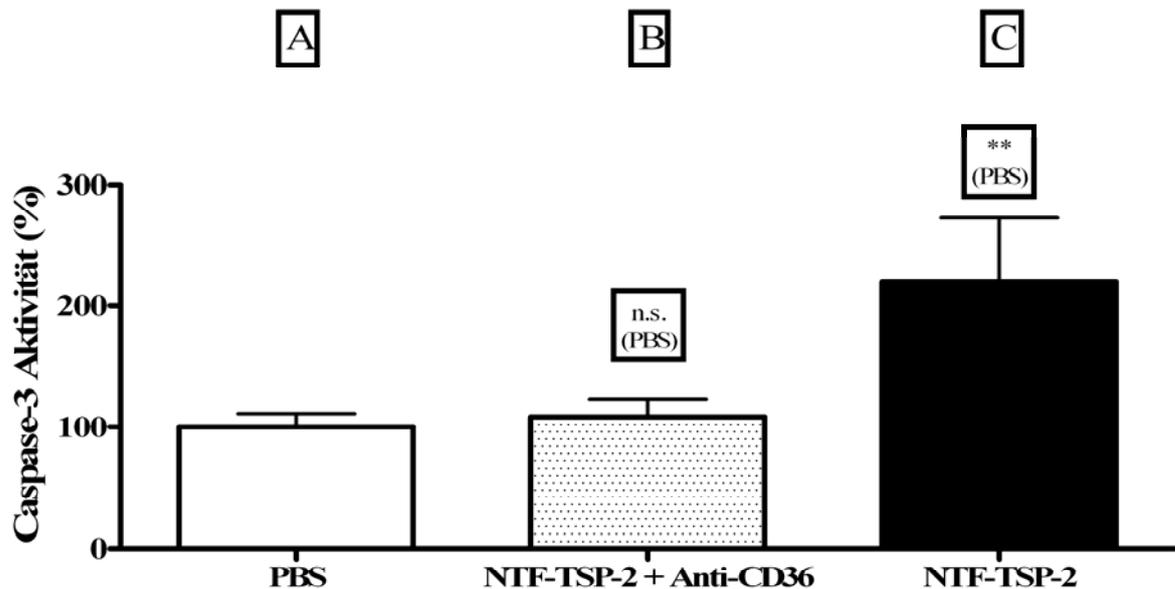


**Abbildung 5.30 CD36-abhängige Aktivierung von Caspase-3 nach Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2**

Der Anteil an aktiver Caspase-3 mit einer Größe von 18 kDa (Pfeil) wurde im Zelllysat von HDMEC mittels Western Blot analysiert und die Intensität der Banden computerunterstützt ermittelt. Zur Kontrolle wurden HDMEC mit PBS-Puffer (A) inkubiert. Die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 (C) führte zu einer stärkeren Aktivierung von Caspase-3 im Vergleich zur PBS-Kontrolle (A). Die Inkubation der HDMEC mit NTF-TSP-2 in Kombination mit einem CD36-blockierenden Antikörper (B) führte zu keiner wesentlichen Änderung der Aktivierung von Caspase-3 im Vergleich zur PBS-Kontrolle. Die Aktivierung von Caspase-3 bei der Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 ist somit CD36-abhängig.

Es zeigte sich, dass es nach der Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 zu einer zweifach höheren Aktivierung von Caspase-3 ( $220,5 \% \pm 52,4 \%$ ) im Vergleich zur PBS-Kontrolle kommt ( $100 \% \pm 11,17 \%$ ). Durch die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 in Kombination mit einem CD36 Rezeptor blockierenden Antikörper kam es zu keiner höheren Aktivierung von Caspase-3 ( $108,5 \% \pm 14,56 \%$ ). Im Vergleich

zur PBS-Kontrolle veränderte sich dabei der Expressionsgrad von aktiver Caspase-3 nur gering. Die Einleitung von Apoptose durch die Aktivierung von Caspase-3 erfolgt demnach bei der Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 über einen CD36 Rezeptor vermittelten Weg (Abbildung 5.31).



**Abbildung 5.31 Quantifizierung der mittels Western Blot ermittelten CD36-abhängigen Aktivierung von Caspase-3 in HDMEC nach Inkubation mit NTF-TSP-2**

Zur Bestimmung der Caspase-3 Aktivität wurde die PBS-Kontrolle (A) auf den Wert 100 % festgelegt. Die Caspase-3 Aktivität konnte durch die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 (C) im Vergleich zur PBS-Kontrolle (A) verdoppelt werden. Der Unterschied war signifikant ( $p = 0,0057$ , Mann-Whitney-U-Test). Dieser Effekt konnte durch die Inkubation von HDMEC mit NTF-TSP-2 in Kombination mit einem CD36-blockierenden Antikörper (B) weitgehend aufgehoben werden. Die Caspase-3 Aktivität nach Inkubation mit NTF-TSP-2 + Anti CD36 Antikörper (B) war vergleichbar mit der PBS-Kontrollgruppe (A) ( $p = 0,7842$ , Mann-Whitney-U-Test). Der Versuch wird in sieben voneinander unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung durchgeführt

## 6 Diskussion

Die Behandlung von malignen Tumoren stellt eine große Herausforderung dar. In den vergangenen Jahren konnte durch eine Vielzahl tumorbiologischer Untersuchungen einschließlich tierexperimenteller Studien nachgewiesen werden, dass das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren abhängig ist von der Neubildung von Blutgefäßen. Studien mit dem Angiogenesehemmer Bevacizumab, einem humanisierten monoklonalen Antikörper gegen den bedeutendsten proangiogenen Faktor VEGF, konnten im Sinne eines „proof of principle“ das Therapieprinzip der Antiangiogenese zur Hemmung des Tumorwachstums klinisch belegen. Die Tumorangiogenese wird durch ein komplexes Zusammenspiel von pro- und antiangiogenen Faktoren geregelt. Ein bedeutender endogener Angiogeneseinhibitor ist das Thrombospondin-2 (TSP-2). TSP-2 hemmt die Proliferation (Armstrong et al., 2002) und die VEGF-induzierte Migration von humanen mikrovaskulären Endothelzellen (Noh et al., 2003). TSP-2 ist im Vergleich zu TSP-1 bis zu 32 % homolog in der N-terminalen und bis zu 82 % homolog in der C-terminalen Domäne (Bornstein et al., 2000), verfügt jedoch im Gegensatz zu TSP-1 nicht über eine TGF- $\beta$  aktivierende Sequenz (Murphy-Ullrich and Poczatek, 2000). Für TSP-1 sind die antiangiogenen Wirkmechanismen wesentlich besser untersucht als für TSP-2. TSP-1 hemmt *in vitro* die Proliferation und Migration von Endothelzellen und *in vivo* die Neovaskularisation (Tolsma et al., 1993). Der antiangiogene Hauptwirkungsmechanismus wird dabei der N-terminalen Domäne zugeschrieben. Innerhalb des zweiten und dritten Type-1-Repeats interagiert eine kurze Peptidsequenz (CSVTCG) mit der Oberfläche von Endothelzellen und leitet deren Apoptose ein (Asch et al., 1992). Ebenso wurden weitere Aminosäuresequenzen innerhalb der Type-1-Repeat Domänen für antiangiogene Effekte verantwortlich gemacht, wie die Sequenz (GVITRIR), die als Peptid die Migration von mikrovaskulären Endothelzellen hemmt (Reiher et al., 2002). Der antiangiogene Effekt von TSP-1 wird aber nicht nur über den N-Terminus bewirkt, sondern auch über die Hemmung der Aktivierung der Matrix Metalloproteinase-2 und -9, was vermutlich die Angiogenese über eine Blockierung der Freisetzung von gefäßspezifischen Wachstumsfaktoren hemmt.

Für TSP-1 konnte in mehreren Studien ein tumorhemmender Effekt gezeigt werden. TSP-1 hemmt die chemisch-induzierte Karzinogenese *in vivo* bei TSP-1 transgenen Mäusen (Hawighorst et al., 2002a). Implantierte Tumoren bei TSP-1-knockout Mäusen werden im Vergleich zu implantierten Tumoren bei Wildtyp-Mäusen ungefähr doppelt so groß (Lawler et al., 2001). Auch TSP-2 zeigt tumorhemmende Effekte. Bei einer chemisch induzierten Karzinogenese führt das Fehlen von TSP-2 zu einer gesteigerten Tumorentwicklung in TSP-2-defizienten Nacktmäusen (Hawighorst et al., 2001). Bei der Arbeit von Streit et al. wurde ein Bioimplantat entwickelt, das kontinuierlich über einen längeren Zeitraum durch retroviral transfizierte Fibroblasten TSP-2 *in vivo* produziert. Dazu wurde ein Polymergerüst mit den Fibroblasten beschichtet und in die Bauchhöhle von Nacktmäusen transplantiert. Ein erhöhter Anteil an TSP-2 konnte nach der Transplantation im Blutserum nachgewiesen werden. Dadurch wurde das Tumorwachstum von malignen Melanomen, Plattenepithelkarzinomen und Lewis Lunge Bronchialkarzinomen deutlich gehemmt (Streit et al., 2002). Die Überexpression von TSP-2 in Plattenepithelkarzinomen führte zur Hemmung des Tumorwachstums in einem Xenotransplantationsmodell. Im Vergleich zu TSP-1 überexprimierenden Plattenepithelkarzinomen schienen die antiangiogenen Effekte für TSP-2 dabei deutlich stärker zu sein (Streit et al., 1999). Aufgrund dieser scheinbar stärkeren Aktivität und aufgrund der Tatsache, dass sich TSP-2 im Gegensatz zu TSP-1, das gut aus Thrombozyten zu gewinnen ist (Cleazardin et al., 1984), nicht in ausreichenden Mengen für *in vitro* und *in vivo* Experimente isolieren lässt, haben wir rekombinant ein 80 kDa Fragment des N-Terminus von humanem TSP-2 hergestellt, das als Fusionsprotein an den Fc-Teil von humanem IgG<sub>2</sub> gekoppelt ist. Dieses Fusionsprotein (NTF-TSP-2) wurde in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293) exprimiert, mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und im Western Blot mit einem für humanes TSP-2 spezifischen Antikörper nachgewiesen. NTF-TSP-2 wurde hergestellt, um einerseits die antiangiogene Effektivität - auch im Hinblick auf die Progressionshemmung von malignen Tumoren - zu untersuchen, und um andererseits einen weiteren Aufschluss über den Wirkmechanismus von TSP-2 hinsichtlich seiner N-terminalen Domänen zu erhalten.

Für die rekombinante Herstellung wurden stabil transfizierte humane embryonale Nierenzellen verwendet. Da es sich hierbei um humane Zellen handelt, wird das Proteinfragment posttranslational glycosyliert. Durch die Kopplung an IgG<sub>2</sub>-Fc konnte

das Protein mittels Protein-G-Sepharose und der Methode der Affinitätschromatographie einfacher aus dem Mediumüberstand isoliert werden (Bjorck and Kronvall, 1984). Dies führt zudem zu einer Stabilisierung des Proteins mit Erhöhung der Halbwertszeit nach systemischer Gabe (Clynes et al., 2000).

Zur Analyse der antiangiogenen Wirksamkeit von NTF-TSP-2 wurde ein etablierter *in vitro* Angiogenese Assay, der sogenannte Tube Formation Assay, durchgeführt. Dabei bilden auf Matrigel kultivierte Endothelzellen nach kurzer Zeit dreidimensionale Röhrenstrukturen, die aus einer Endothelzellschicht bestehen. Die Gesamtlänge der Röhren gilt als Maß für die Angiogenese. Dabei werden nur die Röhren vermessen, die sich aus Endothelzellhaufen gebildet haben. Die Ausbildung der Endothelzellröhren kann durch verschiedene Faktoren wie z.B. durch VEGF verstärkt werden (Grant et al., 1989). Die Ausbildung der Endothelzellröhren wurde in dieser Arbeit durch den Zusatz von VEGF zu den auf Matrigel kultivierten Endothelzellen stimuliert (Lake et al., 2006). Die Daten des „Tube Formation Assays“ zeigen einen deutlichen inhibitorischen Effekt von 51 % auf die Ausbildung von Endothelzellröhren durch die Behandlung mit NTF-TSP-2. Diese Daten stehen in Einklang mit den Daten von Noh et al. (Noh et al., 2003), bei denen die „tube formation“ von HDMEC durch die Behandlung mit einem N-terminalen Fragment von TSP-2 deutlich sichtbar gehemmt wurde. Dabei deuten die in dieser Arbeit durchgeführten Apoptose Versuche darauf hin, dass die Hemmung der „tube formation“ über die Apoptoseinduktion von HDMEC verläuft. Die durchflusszytometrische Quantifizierung von Apoptose zeigt einen deutlich höheren Anteil apoptotischer HDMEC (um 47 % höher) nach der Inkubation mit NTF-TSP-2 im Vergleich zur Kontrolle. Diese Daten belegen den apoptotischen Effekt eines N-terminalen TSP-2 Fragmentes, das in verschiedenen Konzentrationen die Apoptose bei HDMEC im Vergleich zur PBS-Kontrolle um bis zu das 3-fache steigert (Noh et al., 2003). Als Kontrolle diente bei den Versuchen zur „tube formation“ und Apoptose PBS-Puffer. Zum Ausschluss eines Effektes bedingt durch den Fc-Teil des Fusionsproteins, wurden HDMEC als zusätzliche Kontrolle mit dem Fc-Teil von humanem IgG behandelt. Dabei konnte im Vergleich zur PBS-Kontrolle weder die „tube Formation“ gehemmt noch die Apoptose signifikant induziert werden.

Diese Daten belegen, dass das rekombinant hergestellte Fusionsprotein NTF-TSP-2 *in vitro* funktionell ist, indem es die Angiogenese *in vitro* hemmt und die Apoptose von HDMEC induziert.

Zur Untersuchung der biologischen *in vivo* Effekte von NTF-TSP-2 wurden Nacktmäusen spontan in die Lymphknoten und Lungen metastasierende humane MDA-MB-435 Mammakarzinomzellen in das Fettgewebe der Brust xenotransplantiert (Zhang et al., 2004) (Schneider et al., 2002) (Lee et al., 2005). Als oberflächlich ein Tumor zu erkennen war, wurden die Versuchstiere mit NTF-TSP-2 intraperitoneal therapiert. Zur Kontrolle wurde einerseits mit PBS-Puffer und andererseits zum Ausschluss von Effekten des Fc-Teils mit einer IgG-Fc Lösung behandelt. Hierbei zeigte sich, dass 15 Tage nach Behandlungsbeginn durch NTF-TSP-2 in drei verschiedenen Konzentrationen das Wachstum signifikant gehemmt wurde. Es deutete sich dabei gleichzeitig eine Konzentrationsabhängigkeit des Effektes an, obgleich dies nicht signifikant war. Wie auch schon in den *in vitro* Assays gezeigt, hatte das IgG-Fc Fragment keinen Effekt auf das Wachstum der Mammakarzinome. Da somit ein tumorinhibitorischer Effekt des Fc-Teils von humanem IgG sicher ausgeschlossen werden konnte, war es gerechtfertigt aus Gründen der Praktikabilität nun in den weiteren Experimenten PBS-Puffer als Kontrolle zu wählen.

In einem weiteren Experiment konnte der tumorinhibitorische Effekt von NTF-TSP-2 bestätigt werden. Hierbei wurde der Wachstumsverlauf von xenotransplantierten MDA-MB-435 Mammakarzinomen unter intraperitonealer Applikation von PBS als Kontrolle und NTF-TSP-2 in einer Konzentration von 5,0 mg / kg KG über einen Zeitraum von 36 Tagen untersucht. Die Konzentration von 5,0 mg / kg KG NTF-TSP-2 wurde gewählt, da diese bereits einen deutlichen tumorinhibitorischen Effekt im Dosisfindungsexperiment gezeigt hatte. Im Verlauf des Tumorexperimentes kam es bereits nach 22 Tagen zur signifikanten Hemmung des Wachstums der Mammakarzinome. Am Ende des Experimentes, nach 36 Tagen, fand sich im Vergleich zur Kontrolle eine Inhibition des Tumorwachstums um 61 %. Diese Daten unterstreichen den deutlich hemmenden Effekt von TSP-2 (Streit et al., 1999) (Hawighorst et al., 2001) auf das Wachstum von malignen Tumoren und die von Streit et al. (Streit et al., 2002), bei denen durch ein Bioimplantat, das mit retroviral transfizierten Fibroblasten beschichtet war, die kontinuierlich TSP-2 überexprimierten, ein tumorhemmender Effekt von malignen Karzinomen erzielt werden konnte. Die Arbeiten untermauern die Tatsache, dass durch die systemische Anwendung von TSP-2 ein Effekt erzielt wird, der erstmalig durch die N-terminale Domäne von TSP-2 bei der Behandlung von Mammakarzinomen gezeigt werden konnte. Durch intraperitoneale

Applikation einer N-terminalen Domäne von TSP-2 lässt sich auch das Wachstum von xenotransplantierten A431 Plattenepithelkarzinomen hemmen. Dabei wird das Tumorstadium bei einer Dosis von 3 mg / kg KG um 40 % gehemmt (Noh et al., 2003). Im Vergleich dazu war der Effekt in dieser Arbeit bei einer Dosis von 5 mg / kg KG stärker ausgeprägt (60 % Wachstumshemmung). Das könnte einerseits an der höheren Dosierung liegen, andererseits an der Kopplung des Fc-Teils an das N-terminale Fragment von TSP-2, wodurch das Fusionsprotein in einer stabileren Form vorliegt.

Nach orthotoper Xenotransplantation von MDA-MB-435 und einer Behandlungsdauer von 5 Wochen wurden den Nacktmäusen die Tumoren entnommen, halbiert und anhand von Gewebeschnitten die Angiogenese untersucht. Dabei wurden die Blutgefäße spezifisch mit einem Antikörper gegen den panendothelialen Marker CD31 angefärbt und die Angiogenese Software-unterstützt morphometrisch ausgewertet (Hawighorst et al., 2001). Durch die Therapie mit NTF-TSP-2 konnte die Gefäßdichte (Gefäße pro Fläche), der Gefäßflächenanteil (der Anteil an Fläche, der durch Gefäße eingenommen wird) und die durchschnittliche Größe der Gefäße deutlich reduziert werden. Das untermauert die Daten von Streit et al. (Streit et al., 1999) (Streit et al., 2002) bei der die Angiogenese von Plattenepithelkarzinomen durch TSP-2 *in vivo* gehemmt wird. In der Arbeit von Noh et al. (Noh et al., 2003) wird die Gefäßdichte von Plattenepithelkarzinomen bei einer Dosis von 3 mg / kg KG um 30 % gehemmt. Die Hemmung der Gefäßdichte ist in Analogie zur Wachstumshemmung in dieser Arbeit bei der Therapie von Mammakarzinomen in einer Dosis von 5,0 mg / kg KG ebenfalls etwas stärker ausgeprägt (42 %).

Die intraperitoneale Injektion von NTF-TSP-2 führt somit zur Hemmung des Tumorstadiums und der Angiogenese. Mittels Inhibitions-ELISA, einer sensitiven Methode zur spezifischen Bestimmung von Substanzen im Serum (Ishiwata et al., 1995) (Shurley et al., 2005) konnte demonstriert werden, dass 20% des intraperitoneal injizierten NTF-TSP-2 nach 1 Stunde im Blut der Nacktmäuse zirkulieren. Nach 0 Stunden, also vor der Injektion von NTF-TSP-2, wurde eine Konzentration von 28,4 ng / ml  $\pm$  3,6 ng / ml ermittelt. Dieser Wert spiegelt den eigentlichen Nachweis von TSP-2 im Blut wieder und liegt 2 Wochen nach der Xenotransplantation von MDA-MB-435 Mammakarzinomen um das 3-fache höher als bei Wildtyp-Serum (10,1 ng / ml  $\pm$  4,1 ng / ml). Das könnte die Daten von Hawighorst et al. (Hawighorst et

al., 2001) unterstreichen, bei denen die TSP-2 Expression im Tumorstroma von Wildtyp-Mäusen nach chemisch induzierter Karzinogenese als Abwehrmechanismus erhöht ist. Nach der Injektion von 100 µg NTF-TSP-2 kam es zunächst zu einem schnellen Anstieg des NTF-TSP-2 im Serum ( $16,81 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 1,75 \mu\text{g} / \text{ml}$  nach 30 Min) mit Erreichen einer Maximalkonzentration von  $19,67 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 3,76 \mu\text{g} / \text{ml}$  eine Stunde nach Injektion. Zieht man von beiden Werten die vernachlässigbare Konzentration des Wertes von 0 Stunden (Nullwert) ab, so erhält man die eigentliche NTF-TSP-2 Konzentration. Bereits nach 6 Stunden können im Vergleich zur Maximalkonzentration nur noch Spuren von NTF-TSP-2 nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass das NTF-TSP-2 Fusionsprotein mit einer Größe von 110 kDa vom Bauchfell in das Blut übergeht. Diese Methode besitzt somit eine hohe Sensitivität hinsichtlich der Detektion von TSP-2 im Serum. Inwieweit sich durch häufigere Applikation von NTF-TSP-2 die Effektivität der Tumorchemmung verbessern lässt, wäre durch weitere Wachstumsstudien, die Gegenstand geplanter Folgeprojekte sind, zu evaluieren.

Nach intraperitonealer Applikation von NTF-TSP-2 konnte mittels Immunpräzipitation von TSP-2 ein 110 kDa großes TSP-2 Fragment auch im Lysat von MDA-MB-435 Mammakarzinomen detektiert werden. Dass das im Tumor detektierte NTF-TSP-2 auch funktionell aktiv war, zeigte die Hemmung der Angiogenese in der immunhistochemischen Analyse von CD31. Somit konnte erstmalig der Beweis erbracht werden, dass das intraperitoneal injizierte NTF-TSP-2 nicht nur im Blut zirkuliert, sondern auch das Zielgewebe, den Tumor, erreicht und dort seine antiangiogenen und damit antitumorigenen Wirkungen entfalten kann.

Die Metastasierung von Mammakarzinomzellen in die regionären Lymphknoten und / oder die Fernmetastasierung in andere Organe ist entscheidend für die Prognose der Erkrankung und bildet eine wesentliche Grundlage zur Festlegung der weiteren Lokal- und Systemtherapie. Zur Untersuchung des biologischen Einflusses von NTF-TSP-2 auf die Metastasierung wurden Xenotransplantationsstudien durchgeführt, bei denen sowohl eine Analyse der regionären Lymphknoten als auch der Lungen auf disseminierte MDA-MB-435 Mammakarzinomzellen erfolgte. Zum Nachweis dieser disseminierten Tumorzellen wurde der Anteil von humaner DNA in muriner DNA mittels quantitativer real-time PCR in den Lymphknoten bestimmt. Die Quantifizierung humaner DNA erfolgt durch die Bestimmung von spezifischen

Sequenzen, den Alu Sequenzen, die nur im humanem Genom vorkommen (Munoz et al., 2005). Die Probenmesswerte werden auf die Messwerte einer 1:10 Standardverdünnungsreihe aus Wildtyp-DNA bezogen. Die Messung der Standardverdünnungsreihe ist nur dann verwendbar und verwertbar, wenn mindestens fünf Verdünnungen in die Messung eingehen, wenn die Steigung der Kalibrierungskurve bei -3,32 und der Korrelationskoeffizient bei über 0,95 liegen (Mocellin et al., 2003). Diese Voraussetzungen werden bei der in dieser Arbeit beschriebenen Methode erfüllt, so dass diese Methode eine reproduzierbare Bestimmung des Anteils humaner DNA in muriner DNA bis in den Bereich von 0,001 % liefert. Im Gegensatz zu humaner DNA sind in muriner DNA keine Alu-Sequenzen nachzuweisen. Somit können die mittels PCR detektierten Alu-Sequenzen nur aus den humanen MDA-MB-435 Mammakarzinomzellen stammen und die Quantifizierung dieser Alu-Sequenzen bzw. die Berechnung des Anteils humaner DNA in muriner DNA als Ausmaß der Tumorzell dissemination gewertet werden. In das Fettgewebe der Brustdrüse von weiblichen Nacktmäusen wurden MDA-MB-435 Mammakarzinomzellen xenotransplantiert. Nach einem Zeitraum von 2 bzw. 5 Wochen wurden sowohl die regionären Lymphknoten als auch die Lungen entnommen. Die Auswertung mittels real-time PCR ergab, dass durch NTF-TSP-2 auch die regionäre Metastasierung in die Lymphknoten gehemmt wurde. Dieser hemmende Effekt konnte mittels real-time PCR bereits 2 Wochen nach Xenotransplantation demonstriert werden, einem Zeitpunkt zu dem MDA-MB-435 Brustkrebszellen mittels Immunhistochemie gegen Zytokeratin-19, einem Marker für Mammakarzinomzellen (Wu et al., 2001), nur sehr schwierig und ungenau nachzuweisen sind. So betrug der Anteil humaner DNA in den Lymphknoten von Mäusen, die mit NTF-TSP-2 behandelt wurden nach 2 Wochen 0,41 % und nach 5 Wochen 0,47 %, im Vergleich zu 0,14 % und 0,09 % in den PBS-Kontrollgruppen. Diese Werte sind mit den Werten aus der Literatur vergleichbar: Bei der Arbeit von Becker et. al wurde eine konservierte Sequenz des humanem Genoms mittels real-time PCR in muriner DNA quantifiziert. Dabei wurde die DNA aus xenotransplantierten humanen Tumoren in Mäusen isoliert (Becker et al., 2002). Bei der Arbeit von Schneider et al. wurden Alu-Sequenzen in muriner DNA von xenotransplantierten Karzinomen mittels real-time PCR quantifiziert (Schneider et al., 2002). Die immunhistochemischen Analysen für Zytokeratin-19 belegen, dass vereinzelte MDA-MB-435 Brustkrebszellen in die regionären

Lymphknoten metastasiert sind. Auch in den Lungen von Mäusen, die mit NTF-TSP-2 behandelt wurden, war der Anteil humaner DNA nach 2 Wochen und nach 5 Wochen deutlich geringer als in den mit PBS behandelten Kontrollgruppen. .

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die intraperitoneale Anwendung des rekombinant hergestellten NTF-TSP-2 zu systemischen Effekten mit Hemmung des Wachstums, der Angiogenese und der Metastasierung von Mammakarzinomen führt.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten lassen am ehesten darauf schließen, dass die Hemmung der Tumorprogression durch NTF-TSP-2 durch die Hemmung der Tumorangio-genese vermittelt wird. Die computer-unterstützte Auswertung von Tumorgewebsschnitten (Streit et al., 1999) (Hawighorst et al., 2001), die immunhistochemisch hinsichtlich CD31 Expression gefärbt wurden, ergab eine signifikante Reduzierung der Gefäßdichte sowie eine deutlich verminderte Durchschnittsgröße der Gefäße in MDA-MB-435 Mammakarzinomen von Mäusen, die systemisch mit NTF-TSP-2 behandelt wurden. In Übereinstimmung mit der Arbeit von Noh et al. (Noh et al., 2003) konnte ein direkter Effekt von NTF-TSP-2 auf die Tumorzellen durch *in vitro* Proliferationsstudien ausgeschlossen werden. Die tägliche Inkubation von MDA-MB-435 Mammakarzinomzellen mit NTF-TSP-2 ergab keinen wesentlichen Unterschied im *in vitro* Wachstumsverlauf verglichen mit der Inkubation in PBS. Diese Ergebnisse bestätigen die beschriebenen antiangiogenen Effekte von TSP-2 *in vivo* (Streit et al., 1999) (Streit et al., 2002) (Hawighorst et al., 2001) und unterstreichen die Bedeutung der N-terminalen Domäne von TSP-2 für die Vermittlung dieser antiangiogenen Aktivität (Noh et al., 2003).

Die genauen Wirkmechanismen, wie TSP-2 einen Effekt auf die Endothelzelle ausübt, sind im Gegensatz zu TSP-1 weitgehend unbekannt. TSP-1 hemmt die VEGF- und bFGF-induzierte Migration von Endothelzellen. Die Hauptaktivität wird dabei der N-terminalen Domäne und besonders den Type-1-Repeat-Domänen zugesprochen (Lawler and Detmar, 2004). TSP-1 hemmt ferner die Angiogenese durch Antagonisierung von mobilisiertem VEGF aus der extrazellulären Matrix und durch die direkte Bindung an VEGF (Gupta et al., 1999) (Rodriguez-Manzaneque et al., 2001). Die Hemmung von VEGF wird durch die Type-1-Repeats und anderen Domänen von TSP-1 verursacht. Durch die Aktivierung von TGF- $\beta$  durch die N-terminale Domäne von TSP-1 wird die Angiogenese von A413 Plattenepithelkarzinomen gehemmt (Yee et al., 2004). Zahlreiche Studien können belegen, dass TSP-1 Fragmente, oder Proteine

von TSP-1 die Apoptose in Endothelzellen induzieren (Guo et al., 1997) (Jimenez et al., 2000) (Nor et al., 2000). Über eine kurze Peptidsequenz (CSVTCG) innerhalb des zweiten und dritten drei Type-1-Repeat bindet TSP-1 am CD36 Rezeptor von Endothelzellen (Asch et al., 1992) (Leung et al., 1992) (Tuszynski et al., 1993). Dabei kommt es zur Einleitung von Apoptose über den CD36 Rezeptor (Jimenez et al., 2000) (Volpert et al., 2002).

Um auf zellulärer Ebene die Wirkmechanismen aufzuklären, die der durch NTF-TSP-2 induzierten Angiogenesehemmung zugrunde liegen, wurden verschiedene *in vitro* Assays unter Verwendung von HUVEC und HDMEC durchgeführt. Diese beiden Zelllinien unterscheiden sich hinsichtlich der Expression des CD36 Rezeptors (Swerlick et al., 1992) (Petzelbauer et al., 1993). Die Immunfluoreszenzanalyse für CD36 in dieser Arbeit bestätigte die Expressionsunterschiede für die beiden Zelllinien. HDMEC zeigten eine deutliche Expression von CD36 auf der Zellmembran, während für HUVEC keine CD36 Expression nachgewiesen werden konnte.

NTF-TSP-2 hemmt eindeutig die VEGF-induzierte Ausbildung von Endothelzellröhren von HDMEC, die auf Matrigel kultiviert wurden. Dies konnte für HUVEC nicht gezeigt werden. Hier wurde die Ausbildung von Endothelzellröhren durch Inkubation mit NTF-TSP-2 nicht beeinflusst. Dies ist somit ein erster Hinweis, dass der CD36 Rezeptor auch bei der durch NTF-TSP-2 induzierten Angiogenesehemmung eine bedeutende Funktion besitzen könnte. Um dies näher zu analysieren, wurde der sogenannte „Tube Formation Assay“ mit HDMEC unter Verwendung eines CD36 Rezeptor blockierenden Antikörpers durchgeführt. Dabei konnte Ausbildung VEGF-stimulierter Endothelzellröhren durch Behandlung mit NTF-TSP-2 um 64 % im Vergleich zur PBS-Kontrolle gehemmt werden. Diese Hemmung lässt sich durch Zugabe eines CD36-blockierenden Antikörper nicht mehr nachweisen. Diese Daten unterstützen die Arbeit von Dawson et al., bei der TSP-1 die Ausbildung von Endothelzellröhren über einen CD36-abhängigen Mechanismus hemmt. Fragmente von TSP-1 binden an rekombinantes CD36 und Antikörper gegen CD36-blockieren die Fähigkeit von TSP-1, die Migration von Endothelzellen zu hemmen (Dawson et al., 1997). Die Daten untermauern ebenfalls die Überlegung, dass dem CD36 Rezeptor für die antiangiogene Aktivität von TSP-1 und TSP-2 eine bedeutende Funktion zukommt (Silverstein and Febbraio, 2007). Da allerdings auch die Migration von CD36 negativen HUVEC durch die Behandlung mit den Type-1-Repeat Domänen von TSP-1 gehemmt wird (Short et

al., 2005), scheint es noch weitere CD36 Rezeptor unabhängige Wirkmechanismen zu geben, die noch detailliert aufzuklären sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die N-terminalen Domänen von TSP-2 die Angiogenese *in vitro* bei mikrovaskulären Endothelzellen über einen CD36-abhängigen Mechanismus hemmen.

Die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 führte in dieser Arbeit zur Induktion von Apoptose. Durch den Zusatz eines CD36-blockierenden Antikörpers, konnte die Induktion von Apoptose signifikant verhindert werden. Diese Daten stehen im Einklang zu Untersuchungen von verschiedenen Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, dass TSP-1 mit seinen N-terminalen Domänen an CD36 bindet und dabei die Apoptose von Endothelzellen induziert (Silverstein and Febbraio, 2007) (Jimenez et al., 2000) (Jimenez et al., 2001). NTF-TSP-2 verfügt über die gleichen CD36-bindenden Sequenzen wie TSP-1 (Rege et al., 2005), die kurzen Peptidsequenzen (CSVTCG) und (GDGVITRIR) (Noh et al., 2003).

Apoptose wird über zwei bedeutende Hauptsignalwege eingeleitet. Der intrinsische Signalweg beschreibt die Einleitung der Apoptose durch eine erhöhte Permeabilität der Mitochondrienmembran und der Freisetzung von Cytochrom c. Eine Permeabilität der Mitochondrienmembran führt zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Die Höhe des Verlustes des mitochondrialen Membranpotentials kann durch die Behandlung von stimulierten Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 quantifiziert werden (Smiley et al., 1991). Durch die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 kommt es zu einem CD36-abhängigen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Es konnte somit erstmalig gezeigt werden, dass durch NTF-TSP-2 die Induktion der Apoptose von Endothelzellen über den intrinsischen Signalweg verläuft und abhängig von der Gegenwart des CD36 Rezeptors ist. Für TSP-1 ist bereits gezeigt worden, dass durch die Bindung an CD36 die Kinasen JNK und p38 aktiviert werden (Jimenez et al., 2000) (Jimenez et al., 2001), und dass die Aktivierung von JNK und p38 zur Einleitung der Apoptose über den intrinsischen Weg führt. Inwieweit dies auch für NTF-TSP-2 zutrifft ist gegenwärtig noch nicht geklärt.

Die Effektor-Caspase-3 wird bei der Induktion von Apoptose sowohl über den intrinsischen als auch über den extrinsischen Signalweg aktiviert (Degterev et al., 2003). Die Behandlung mit TSP-1 führt zur Apoptose von HDMEC über eine CD36-abhängige

Aktivierung von Caspase-3 (Nor et al., 2000) (Jimenez et al., 2000). Die Quantifizierung von aktiver Caspase-3 kann mittels computerunterstützter Western Blot Analyse von Proteinlösungen lysierter Zellen erfolgen (Fister et al., 2007a). Die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 führte zu einer CD36-abhängigen Aktivierung von Caspase-3. Dabei konnte nicht geklärt werden, ob auch der extrinsische Signalweg eingeleitet wird, da über den intrinsischen Weg ebenfalls Caspase-3 aktiviert wird. Die Arbeit von Volpert et al. zeigt eine Aktivierung des extrinsischen Weges für TSP-1 durch die Aktivierung von JNK und p38, die die Transkription und Expression von FasL stimulieren, was den extrinsischen Signalweg über Todesrezeptoren einleitet (Volpert et al., 2002).

Mit diesen Daten konnte somit der Beweis erbracht werden, dass die NTF-TSP-2 induzierte Hemmung der Angiogenese unter anderem durch eine vom CD36 Rezeptor abhängige Aktivierung der Effektor-Caspase-3 und damit der Apoptose von Endothelzellen bewirkt wird.

Durch die Interaktion des 80 kDa großen Teils der N-terminalen Domäne von TSP-2 mit dem CD36 Rezeptor von mikrovaskulären Endothelzellen kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die antiangiogene Aktivität des Fusionsproteins nicht auch über andere Mechanismen induziert wird. Dazu bedarf es weiterer Aufklärung, insbesondere wie NTF-TSP-2 mit Matrix Metalloproteinasen interagiert (Yang et al., 2001).

Zusammenfassend ist in dieser Arbeit deutlich gezeigt worden, dass das Fusionsprotein NTF-TSP-2, ein N-terminales Fragment von humanem Thrombospondin-2, das an IgG<sub>2</sub>-Fc gekoppelt ist, ein potenter Hemmer des Tumorwachstums, der Angiogenese und der Metastasierung von MDA-MB-435 Mammakarzinomen ist. Dabei konnten Wirkmechanismen aufgeklärt und aufgezeigt werden, indem experimentelle Beweise geliefert wurden, dass NTF-TSP-2 die Apoptose von mikrovaskulären Endothelzellen über einen CD36 Rezeptor abhängigen Mechanismus induziert.

## 7 Zusammenfassung

Die Bildung neuer Gefäße durch Tumoren (Tumorangiogenese) ist ein wichtiger Mechanismus für das Wachstum und die Progression von Tumorgewebe. Tumorangiogenese ist von einem komplexen Zusammenspiel von pro- und antiangiogenen Faktoren abhängig. Thrombospondin-2 (TSP-2) gehört zu den endogenen antiangiogenen Faktoren. TSP-2 hemmt das Tumorwachstum durch Hemmung der Gefäßneubildung, die für die Progression von Tumoren notwendig ist.

Im Gegensatz zu dem strukturell verwandten Thrombospondin-1, sind die Mechanismen der antiangiogenen Wirkung von TSP-2 noch weitgehend unklar. Zur weiteren Untersuchung der biologischen Funktion von TSP-2 und zur Aufklärung der antiangiogenen Mechanismen wurde rekombinant ein humanes 80 kDa N-terminales TSP-2 Fragment (NTF-TSP-2) hergestellt, das als Fusionsprotein an IgG<sub>2</sub>-Fc gekoppelt ist. Die Behandlung von mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) mit NTF-TSP-2 führte zu einer deutlichen Hemmung der VEGF-induzierten Ausbildung von Endothelzellröhren. Durch die systemische Gabe von NTF-TSP-2 wurden das Tumorwachstum und die Angiogenese von xenotransplantierten Mammakarzinomzellen deutlich reduziert. Die Behandlung mit NTF-TSP-2 resultierte dabei in einer signifikanten Hemmung der Metastasierung sowohl in die regionären Lymphknoten als auch in die Lungen.

Nach intraperitonealer Gabe kann das Fusionsprotein NTF-TSP-2 sowohl im Blut mittels Inhibitions-ELISA als auch im Tumor mittels Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Anhand mehrerer *in vitro* Assays konnte belegt werden, dass die CD36 Rezeptor vermittelte Induktion der Apoptose von mikrovaskulären Endothelzellen ein wichtiger Mechanismus zur Hemmung der Angiogenese ist.

## 8 Abstract

The formation of new tumor vessels (tumorangiogenesis) is an important mechanism for the growth and progression of tumors. Tumorangiogenesis depends on a complex interplay between pro- and antiangiogenic factors. Thrombospondin-2 (TSP-2) belongs to the endogenous antiangiogenic factors. TSP-2 inhibits tumor growth through inhibition of angiogenesis, which is necessary for the progression of tumors. Compared to TSP-1, which has similar structures, the exact antiangiogenic mechanisms of TSP-2 remain unclear. To elucidate the biologic functions and antiangiogenic mechanisms of TSP-2 an 80 kDa N-terminal fragment of human TSP-2 (NTF-TSP-2), which is bound as a fusion protein to IgG<sub>2</sub>-Fc, was recombinantly produced. The treatment of microvascular endothelial cells (HDMEC) with NTF-TSP-2 led to a significant inhibition of VEGF-stimulated “tube-like” structures. Tumor growth and angiogenesis of xenotransplanted breast carcinomas were significantly reduced by systemic delivery of NTF-TSP-2. The treatment with NTF-TSP-2 resulted in a considerable inhibition of metastasis both in lymph nodes and lungs.

After intraperitoneal injection the fusion protein NTF-TSP-2 is detectable in the blood using an inhibition-ELISA as well as in the tumor tissue using immunoprecipitation. It is shown with different *in vitro* assays that the CD36 mediated induction of apoptosis of microvascular endothelial cells is an important mechanism for the inhibition of angiogenesis.

## 9 Literaturverzeichnis

- Adams, J. & Lawler, J. (1993). Extracellular matrix: the thrombospondin family. *Curr Biol*, 3, 188-190.
- Adams, J. C. (1997). Thrombospondin-1. *Int J Biochem Cell Biol*, 29, 861-865.
- Adams, J. C. (2001). Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 25-51.
- Adams, J. C. & Lawler, J. (2004). The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 961-968.
- Ahmed, S. A., Gogal, R. M., Jr. & Walsh, J. E. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods*, 170, 211-224.
- Armstrong, L. C., Bjorkblom, B., Hankenson, K. D., Siadak, A. W., Stiles, C. E. & Bornstein, P. (2002). Thrombospondin 2 inhibits microvascular endothelial cell proliferation by a caspase-independent mechanism. *Mol Biol Cell*, 13, 1893-1905.
- Armstrong, L. C. & Bornstein, P. (2003). Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biol*, 22, 63-71.
- Asch, A. S., Silbiger, S., Heimer, E. & Nachman, R. L. (1992). Thrombospondin sequence motif (CSVTCG) is responsible for CD36 binding. *Biochem Biophys Res Commun*, 182, 1208-1217.
- Batzer, M. A. & Deininger, P. L. (2002). Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet*, 3, 370-379.
- Becker, M., Nitsche, A., Neumann, C., Aumann, J., Junghahn, I. & Fichtner, I. (2002). Sensitive PCR method for the detection and real-time quantification of human cells in xenotransplantation systems. *Br J Cancer*, 87, 1328-1335.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z. & Hanahan, D. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*, 2, 737-744.
- Bjorck, L. & Kronvall, G. (1984). Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol*, 133, 969-974.
- Bornstein, P., Armstrong, L. C., Hankenson, K. D., Kyriakides, T. R. & Yang, Z. (2000). Thrombospondin 2, a matricellular protein with diverse functions. *Matrix Biol*, 19, 557-568.
- Bornstein, P., O'Rourke, K., Wikstrom, K., Wolf, F. W., Katz, R., Li, P. & Dixit, V. M. (1991). A second, expressed thrombospondin gene (Thbs2) exists in the mouse genome. *J Biol Chem*, 266, 12821-12824.
- Breier, G. (2000). Angiogenesis in embryonic development--a review. *Placenta*, 21 Suppl A, S11-15.

- Bugelski, P. J. (1985). Sequential histochemical staining for resident and recruited macrophages. *J Leukoc Biol*, 38, 687-696.
- Canfield, A. E. & Schor, A. M. (1995). Evidence that tenascin and thrombospondin-1 modulate sprouting of endothelial cells. *J Cell Sci*, 108 ( Pt 2), 797-809.
- Cao, Y., Hong, A., Schulten, H. & Post, M. J. (2005). Update on therapeutic neovascularization. *Cardiovasc Res*, 65, 639-648.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6, 389-395.
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438, 932-936.
- Chen, H., Strickland, D. K. & Mosher, D. F. (1996). Metabolism of thrombospondin 2. Binding and degradation by 3t3 cells and glycosaminoglycan-variant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 271, 15993-15999.
- Clezardin, P., McGregor, J. L., Manach, M., Robert, F., Dechavanne, M. & Clemetson, K. J. (1984). Isolation of thrombospondin released from thrombin-stimulated human platelets by fast protein liquid chromatography on an anion-exchange Mono-Q column. *J Chromatogr*, 296, 249-256.
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G. & Ravetch, J. V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*, 6, 443-446.
- Crawford, S. E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J. E., Ribeiro, S. M., Lawler, J., Hynes, R. O., Boivin, G. P. & Bouck, N. (1998). Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell*, 93, 1159-1170.
- Dawson, D. W., Pearce, S. F., Zhong, R., Silverstein, R. L., Frazier, W. A. & Bouck, N. P. (1997). CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol*, 138, 707-717.
- Degterev, A., Boyce, M. & Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene*, 22, 8543-8567.
- Dejana, E., Corada, M. & Lampugnani, M. G. (1995). Endothelial cell-to-cell junctions. *Faseb J*, 9, 910-918.
- Detmar, M. (2000). Tumor angiogenesis. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 5, 20-23.
- DiPietro, L. A., Nebgen, D. R. & Polverini, P. J. (1994). Downregulation of endothelial cell thrombospondin 1 enhances in vitro angiogenesis. *J Vasc Res*, 31, 178-185.
- Dumont, D. J., Gradwohl, G. J., Fong, G. H., Auerbach, R. & Breitman, M. L. (1993). The endothelial-specific receptor tyrosine kinase, tek, is a member of a new subfamily of receptors. *Oncogene*, 8, 1293-1301.
- Endemann, G., Stanton, L. W., Madden, K. S., Bryant, C. M., White, R. T. & Protter, A. A. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 268, 11811-11816.
- Engvall, E. & Perlman, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8, 871-874.
- Esemuede, N., Lee, T., Pierre-Paul, D., Sumpio, B. E. & Gahtan, V. (2004). The role of thrombospondin-1 in human disease. *J Surg Res*, 122, 135-142.

- Febbraio, M., Hajjar, D. P. & Silverstein, R. L. (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*, 108, 785-791.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. & Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 7413-7417.
- Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9, 669-676.
- Ferrara, N. & 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.
- Fister, S., Gunthert, A. R., Emons, G. & Grundker, C. (2007a). Gonadotropin-releasing hormone type II antagonists induce apoptotic cell death in human endometrial and ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 67, 1750-1756.
- Fister, S., Schlotawa, L., Gunthert, A. R., Emons, G. & Grundker, C. (2007b). Increase of doxorubicin-induced apoptosis after knock-down of gonadotropin-releasing hormone receptor expression in human endometrial, ovarian and breast cancer cells. *Gynecol Endocrinol*, 1-6.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285, 1182-1186.
- Folkman, J. (2006). Angiogenesis. *Annu Rev Med*, 57, 1-18.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.*, 2, 55-75.
- Gillespie, D. A. & Hardman, N. (1979). Microbubbles in replicating nuclear deoxyribonucleic acid from *Physarum polycephalum*. *Biochem J*, 183, 477-480.
- Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I. & Green, D. R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol*, 2, 156-162.
- Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Frazier, W. A. & Bouck, N. P. (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6624-6628.
- Grant, D. S., Tashiro, K., Segui-Real, B., Yamada, Y., Martin, G. R. & Kleinman, H. K. (1989). Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. *Cell*, 58, 933-943.
- Greenwalt, D. E., Lipsky, R. H., Ockenhouse, C. F., Ikeda, H., Tandon, N. N. & Jamieson, G. A. (1992). Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood*, 80, 1105-1115.

- Guo, N., Krutzsch, H. C., Inman, J. K. & Roberts, D. D. (1997). Thrombospondin 1 and type I repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells. *Cancer Res*, *57*, 1735-1742.
- Gupta, K., Gupta, P., Wild, R., Ramakrishnan, S. & Hebbel, R. P. (1999). Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Angiogenesis*, *3*, 147-158.
- Hanahan, D. & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, *86*, 353-364.
- Hawighorst, T., Oura, H., Streit, M., Janes, L., Nguyen, L., Brown, L. F., Oliver, G., Jackson, D. G. & Detmar, M. (2002a). Thrombospondin-1 selectively inhibits early-stage carcinogenesis and angiogenesis but not tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in transgenic mice. *Oncogene*, *21*, 7945-7956.
- Hawighorst, T., Skobe, M., Streit, M., Hong, Y. K., Velasco, P., Brown, L. F., Riccardi, L., Lange-Asschenfeldt, B. & Detmar, M. (2002b). Activation of the tie2 receptor by angiopoietin-1 enhances tumor vessel maturation and impairs squamous cell carcinoma growth. *Am J Pathol*, *160*, 1381-1392.
- Hawighorst, T., Velasco, P., Streit, M., Hong, Y. K., Kyriakides, T. R., Brown, L. F., Bornstein, P. & Detmar, M. (2001). Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis: a novel host anti-tumor defense mechanism. *Embo J*, *20*, 2631-2640.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res*, *6*, 986-994.
- Hinton, P. R., Johlfs, M. G., Xiong, J. M., Hanestad, K., Ong, K. C., Bullock, C., Keller, S., Tang, M. T., Tso, J. Y., Vasquez, M. & Tsurushita, N. (2004). Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. *J Biol Chem*, *279*, 6213-6216.
- Hirschi, K. K. & D'Amore, P. A. (1996). Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res*, *32*, 687-698.
- Holash, J., Wiegand, S. J. & Yancopoulos, G. D. (1999). New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene*, *18*, 5356-5362.
- Holmgren, L., O'Reilly, M. S. & Folkman, J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med*, *1*, 149-153.
- 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. & Kabbinavar, F. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, *350*, 2335-2342.
- Hyder, S. M. & Stancel, G. M. (1999). Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Mol Endocrinol*, *13*, 806-811.
- Ingber, D. E. & Folkman, J. (1989). How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? *Cell*, *58*, 803-805.

- Iruela-Arispe, M. L., Liska, D. J., Sage, E. H. & Bornstein, P. (1993). Differential expression of thrombospondin 1, 2, and 3 during murine development. *Dev Dyn*, 197, 40-56.
- Ishiwata, S., Itoh, K., Yamaguchi, T., Ishida, N. & Mizugaki, M. (1995). Comparison of serum and urinary levels of modified nucleoside, 1-methyladenosine, in cancer patients using a monoclonal antibody-based inhibition ELISA. *Tohoku J Exp Med*, 176, 61-68.
- Jain, R. K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*, 9, 685-693.
- Jennings, M. T., Hart, C. E., Commers, P. A., Whitlock, J. A., Martincic, D., Maciunas, R. J., Moots, P. L. & Shehab, T. M. (1997). Transforming growth factor beta as a potential tumor progression factor among hyperdiploid glioblastoma cultures: evidence for the role of platelet-derived growth factor. *J Neurooncol*, 31, 233-254.
- Jimenez, B., Volpert, O. V., Crawford, S. E., Febbraio, M., Silverstein, R. L. & Bouck, N. (2000). Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med*, 6, 41-48.
- Jimenez, B., Volpert, O. V., Reiher, F., Chang, L., Munoz, A., Karin, M. & Bouck, N. (2001). c-Jun N-terminal kinase activation is required for the inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Oncogene*, 20, 3443-3448.
- Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S. & Ferrara, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, 362, 841-844.
- Koch, A. E. (2003). Angiogenesis as a target in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 62 Suppl 2, ii60-67.
- Kohfeldt, E., Maurer, P., Vannahme, C. & Timpl, R. (1997). Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS Lett*, 414, 557-561.
- Kubota, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R. & Lawley, T. J. (1988). Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol*, 107, 1589-1598.
- Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*, 14, 32-43.
- Kyriakides, T. R., Zhu, Y. H., Yang, Z. & Bornstein, P. (1998). The distribution of the matricellular protein thrombospondin 2 in tissues of embryonic and adult mice. *J Histochem Cytochem*, 46, 1007-1015.
- LaBell, T. L. & Byers, P. H. (1993). Sequence and characterization of the complete human thrombospondin 2 cDNA: potential regulatory role for the 3' untranslated region. *Genomics*, 17, 225-229.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lake, A. C., Vassy, R., Di Benedetto, M., Lavigne, D., Le Visage, C., Perret, G. Y. & Letourneur, D. (2006). Low molecular weight fucoidan increases VEGF165-induced endothelial cell migration by enhancing VEGF165 binding to VEGFR-2 and NRP1. *J Biol Chem*, 281, 37844-37852.

- Lang, J. Y., Chen, H., Zhou, J., Zhang, Y. X., Zhang, X. W., Li, M. H., Lin, L. P., Zhang, J. S., Waalkes, M. P. & Ding, J. (2005). Antimetastatic effect of salvicine on human breast cancer MDA-MB-435 orthotopic xenograft is closely related to Rho-dependent pathway. *Clin Cancer Res*, *11*, 3455-3464.
- Lawler, J. & Detmar, M. (2004). Tumor progression: the effects of thrombospondin-1 and -2. *Int J Biochem Cell Biol*, *36*, 1038-1045.
- Lawler, J., Miao, W. M., Duquette, M., Bouck, N., Bronson, R. T. & Hynes, R. O. (2001). Thrombospondin-1 gene expression affects survival and tumor spectrum of p53-deficient mice. *Am J Pathol*, *159*, 1949-1956.
- Lee, Y. K., So, I. S., Lee, S. C., Lee, J. H., Lee, C. W., Kim, W. M., Park, M. K., Lee, S. T., Park, D. Y., Shin, D. Y., Park, C. U. & Kim, Y. S. (2005). Suppression of distant pulmonary metastasis of MDA-MB 435 human breast carcinoma established in mammary fat pads of nude mice by retroviral-mediated TIMP-2 gene transfer. *J Gene Med*, *7*, 145-157.
- Leung, L. L., Li, W. X., McGregor, J. L., Albrecht, G. & Howard, R. J. (1992). CD36 peptides enhance or inhibit CD36-thrombospondin binding. A two-step process of ligand-receptor interaction. *J Biol Chem*, *267*, 18244-18250.
- Li, W. X., Howard, R. J. & Leung, L. L. (1993). Identification of SVTCG in thrombospondin as the conformation-dependent, high affinity binding site for its receptor, CD36. *J Biol Chem*, *268*, 16179-16184.
- Longo, M. C., Berninger, M. S. & Hartley, J. L. (1990). Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, *93*, 125-128.
- Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., Daly, T. J., Davis, S., Sato, T. N. & Yancopoulos, G. D. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, *277*, 55-60.
- Margosio, B., Marchetti, D., Vergani, V., Giavazzi, R., Rusnati, M., Presta, M. & Taraboletti, G. (2003). Thrombospondin 1 as a scavenger for matrix-associated fibroblast growth factor 2. *Blood*, *102*, 4399-4406.
- Martin, A., Komada, M. R. & Sane, D. C. (2003). Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Med Res Rev*, *23*, 117-145.
- McDonell, M. W., Simon, M. N. & Studier, F. W. (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol*, *110*, 119-146.
- Miller, K., Wang, M., Gralow, J., Dickler, M., Cobleigh, M., Perez, E. A., Shenkier, T., Cella, D. & Davidson, N. E. (2007). Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, *357*, 2666-2676.
- Mocellin, S., Rossi, C. R., Pilati, P., Nitti, D. & Marincola, F. M. (2003). Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends Mol Med*, *9*, 189-195.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *51 Pt 1*, 263-273.

- Munoz, J. R., Stoutenger, B. R., Robinson, A. P., Spees, J. L. & Prockop, D. J. (2005). Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*, 18171-18176.
- Murphy-Ullrich, J. E. & Poczatek, M. (2000). Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev*, *11*, 59-69.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. & Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, *139*, 271-279.
- Noh, Y. H., Matsuda, K., Hong, Y. K., Kunstfeld, R., Riccardi, L., Koch, M., Oura, H., Dadras, S. S., Streit, M. & Detmar, M. (2003). An N-terminal 80 kDa recombinant fragment of human thrombospondin-2 inhibits vascular endothelial growth factor induced endothelial cell migration in vitro and tumor growth and angiogenesis in vivo. *J Invest Dermatol*, *121*, 1536-1543.
- Nor, J. E., Mitra, R. S., Sutorik, M. M., Mooney, D. J., Castle, V. P. & Polverini, P. J. (2000). Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway. *J Vasc Res*, *37*, 209-218.
- O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. & Folkman, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, *88*, 277-285.
- O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H. & Folkman, J. (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, *79*, 315-328.
- O'Rourke, K. M., Laherty, C. D. & Dixit, V. M. (1992). Thrombospondin 1 and thrombospondin 2 are expressed as both homo- and heterotrimers. *J Biol Chem*, *267*, 24921-24924.
- Oquendo, P., Hundt, E., Lawler, J. & Seed, B. (1989). CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. *Cell*, *58*, 95-101.
- Petzelbauer, P., Bender, J. R., Wilson, J. & Pober, J. S. (1993). Heterogeneity of dermal microvascular endothelial cell antigen expression and cytokine responsiveness in situ and in cell culture. *J Immunol*, *151*, 5062-5072.
- Pike, S. E., Yao, L., Jones, K. D., Cherney, B., Appella, E., Sakaguchi, K., Nakhasi, H., Teruya-Feldstein, J., Wirth, P., Gupta, G. & Tosato, G. (1998). Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med*, *188*, 2349-2356.
- Price, J. E., Polyzos, A., Zhang, R. D. & Daniels, L. M. (1990). Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res*, *50*, 717-721.
- Reiher, F. K., Volpert, O. V., Jimenez, B., Crawford, S. E., Dinney, C. P., Henkin, J., Haviv, F., Bouck, N. P. & Campbell, S. C. (2002). Inhibition of tumor

- growth by systemic treatment with thrombospondin-1 peptide mimetics. *Int J Cancer*, 98, 682-689.
- Ribatti, D. (2005). The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol*, 128, 303-309.
- Rigotti, A., Acton, S. L. & Krieger, M. (1995). The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem*, 270, 16221-16224.
- Rodriguez-Manzaneque, J. C., Lane, T. F., Ortega, M. A., Hynes, R. O., Lawler, J. & Iruela-Arispe, M. L. (2001). Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 12485-12490.
- Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 91, 443-446.
- Sandler, A. (2007). Bevacizumab in non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 13, s4613-4616.
- Schneider, T., Osl, F., Friess, T., Stockinger, H. & Scheuer, W. V. (2002). Quantification of human Alu sequences by real-time PCR--an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenotransplants. *Clin Exp Metastasis*, 19, 571-582.
- Schultz-Cherry, S., Chen, H., Mosher, D. F., Misenheimer, T. M., Krutzsch, H. C., Roberts, D. D. & Murphy-Ullrich, J. E. (1995). Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1. *J Biol Chem*, 270, 7304-7310.
- Short, S. M., Derrien, A., Narsimhan, R. P., Lawler, J., Ingber, D. E. & Zetter, B. R. (2005). Inhibition of endothelial cell migration by thrombospondin-1 type-1 repeats is mediated by beta1 integrins. *J Cell Biol*, 168, 643-653.
- Shurley, J. F., Legendre, A. M. & Scalarone, G. M. (2005). Blastomyces dermatitidis antigen detection in urine specimens from dogs with blastomycosis using a competitive binding inhibition ELISA. *Mycopathologia*, 160, 137-142.
- Siddiqui, M. A. (1982). Recombinant DNA technology and its application to developmental biology. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 2, 75-92.
- Silverstein, R. L. & Febbraio, M. (2007). CD36-TSP-HRGP interactions in the regulation of angiogenesis. *Curr Pharm Des*, 13, 3559-3567.
- Smiley, S. T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T. W., Steele, G. D., Jr. & Chen, L. B. (1991). Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 3671-3675.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.

- Streit, M., Riccardi, L., Velasco, P., Brown, L. F., Hawighorst, T., Bornstein, P. & Detmar, M. (1999). Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*, 14888-14893.
- Streit, M., Stephen, A. E., Hawighorst, T., Matsuda, K., Lange-Asschenfeldt, B., Brown, L. F., Vacanti, J. P. & Detmar, M. (2002). Systemic inhibition of tumor growth and angiogenesis by thrombospondin-2 using cell-based antiangiogenic gene therapy. *Cancer Res*, *62*, 2004-2012.
- Swerlick, R. A., Lee, K. H., Wick, T. M. & Lawley, T. J. (1992). Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *J Immunol*, *148*, 78-83.
- Teng, M. N., Turksen, K., Jacobs, C. A., Fuchs, E. & Schreiber, H. (1993). Prevention of runting and cachexia by a chimeric TNF receptor-Fc protein. *Clin Immunol Immunopathol*, *69*, 215-222.
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P. G., Rennard, S. I., Foidart, J. M. & Martin, G. R. (1979). Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*, *254*, 9933-9937.
- Tolsma, S. S., Volpert, O. V., Good, D. J., Frazier, W. A., Polverini, P. J. & Bouck, N. (1993). Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol*, *122*, 497-511.
- Tooney, P. A., Sakai, T., Sakai, K., Aeschlimann, D. & Mosher, D. F. (1998). Restricted localization of thrombospondin-2 protein during mouse embryogenesis: a comparison to thrombospondin-1. *Matrix Biol*, *17*, 131-143.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *76*, 4350-4354.
- Tuszynski, G. P., Rothman, V. L., Papale, M., Hamilton, B. K. & Eyal, J. (1993). Identification and characterization of a tumor cell receptor for CSVTCG, a thrombospondin adhesive domain. *J Cell Biol*, *120*, 513-521.
- Volpert, O. V., Zaichuk, T., Zhou, W., Reiher, F., Ferguson, T. A., Stuart, P. M., Amin, M. & Bouck, N. P. (2002). Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med*, *8*, 349-357.
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M. & Heldin, C. H. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, *269*, 26988-26995.
- Weinstat-Saslow, D. L., Zabrenetzky, V. S., VanHoutte, K., Frazier, W. A., Roberts, D. D. & Steeg, P. S. (1994). Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis. *Cancer Res*, *54*, 6504-6511.
- Wieser, R. (2001). The transforming growth factor-beta signaling pathway in tumorigenesis. *Curr Opin Oncol*, *13*, 70-77.
- Wu, A., Mazumder, A., Martuza, R. L., Liu, X., Thein, M., Meehan, K. R. & Rabkin, S. D. (2001). Biological purging of breast cancer cells using an

- attenuated replication-competent herpes simplex virus in human hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Res*, 61, 3009-3015.
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284, 555-556.
- Yang, Z., Strickland, D. K. & Bornstein, P. (2001). Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J Biol Chem*, 276, 8403-8408.
- Yee, K. O., Streit, M., Hawighorst, T., Detmar, M. & Lawler, J. (2004). Expression of the type-1 repeats of thrombospondin-1 inhibits tumor growth through activation of transforming growth factor-beta. *Am J Pathol*, 165, 541-552.
- Zardi, L., Siri, A., Carnemolla, B., Cosulich, E., Viale, G. & Santi, L. (1980). A simplified procedure for the preparation of antibodies to serum fibronectin. *J Immunol Methods*, 34, 155-165.
- Zelickson, A. S. (1966). A tubular structure in the endothelial cells and pericytes of human capillaries. *J Invest Dermatol*, 46, 167-185.
- Zen, Y., Fujii, T., Yoshikawa, S., Takamura, H., Tani, T., Ohta, T. & Nakanuma, Y. (2007). Histological and culture studies with respect to ABCG2 expression support the existence of a cancer cell hierarchy in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol*, 170, 1750-1762.
- Zhang, S., Lawson, K. A., Simmons-Menchaca, M., Sun, L., Sanders, B. G. & Kline, K. (2004). Vitamin E analog alpha-TEA and celecoxib alone and together reduce human MDA-MB-435-FL-GFP breast cancer burden and metastasis in nude mice. *Breast Cancer Res Treat*, 87, 111-121.
- Zhao, J. B., Wei, D. Z. & Tong, W. Y. (2007). Identification of Escherichia coli host cell for high plasmid stability and improved production of antihuman ovarian carcinoma x antihuman CD3 single-chain bispecific antibody. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76, 795-800.

## 10 Anhang

### 10.1 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol / Liter
ad	auf
ad libitum	nach Belieben
Alexa-gek.	gekoppelt mit einem Alexa Fluoreszenzfarbstoff
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BHQ-1	Black Hole Quencher-1
BSA	Rinderserumalbumin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HRP-gek.	gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase
IF	Immunfluoreszenzfärbung
IgG	Immunglobulin G
IgG-Fc	Fc-Teil von humanem IgG
IHC	Immunhistochemie
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
M	Mol / Liter
mg	Milligramm
Min.	Minute

ml	Milliliter
Na-Citrat	Natriumcitrat
Na-EDTA	Tetranatriummethylen-diamintetraacetat
NP40	Nonidet-P40
NTF-TSP-2	Rekombinantes humanes N-terminales 80 kDa Thrombospondin-2 Fragment gekoppelt an IgG <sub>2</sub> -Fc
pg	Picogramm
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunden
TEMED	Tetramethylethylen-diamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octoxinol-9
TSP-1	Thrombospondin-1
TSP-2	Thrombospondin-2
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Internationale Einheit
UNG	Uracil N-Glycosylase
UPM	Umdrehungen pro Minute
VEGF <sub>165</sub>	Humaner rekombinanter vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A, Aminosäuren 5 bis 169
YY	Yakima Yellow
z.B.	zum Beispiel

## 10.2 Aminosäuren

A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Aspartat
C	Cystein
E	Glutamat
Q	Glutamin

G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin

P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin

## 10.3 Sequenzen

### 10.3.1 NTF-TSP-2 cDNA

Nachfolgend wird die cDNA Nukleotidsequenz von NTF-TSP-2 ohne die Nukleotidsequenz des Fc-Teils dargestellt. Sie entspricht der Nukleotidsequenz von Basenpaar 291 bis Basenpaar 1886 von humanem Thrombospondin-2 (LaBell and Byers, 1993):

```
gctggtcaccaggacaaagacacgaccttcgacctttcagatcagcaacatcaaccgcaagaccattggcgccaagcagtt
ccgcgggcccgaccccgcggtgccggcttaccgcttcgtgcgcttgactacatcccaccggtgaacgcagatgacctcagc
aagatcaccaagatcatgcggcagaaggagggtcttctctcacggcccagctcaagcaggacggcaagtccaggggac
gctgttggctctggaggggcccgggtctctcccagaggcagttcgagatcgtctccaacggccccgcgacacgctggatctc
acctactggattgacggcaccggcatgtggtctcctggaggacgtcggcctggctgactcgcagtggaagaacgtcaccg
tgcaggtggctggcgagacctacagcttcacgtgggctgcgacctataggaccagttgctctggacgagcccttctacga
gcacctgcaggcggaaaagagccggatgtacgtggccaaaggctctgccagagagagtcacttcagggggttcttcagaa
cgtccacctagtgtttaaactctgtggaagatattctaagcaagaagggttccagcaaggccaggagctgagatcaacg
ccatcagtgagaacacagagacgctgcgctgggtccgcatgtcaccaccgagtacgtgggccccagctcggagaggagg
cccgaggtgtgcaacgctcgtgcgaggagctgggaaacatggtccaggagctctcggggctccacgtcctcgtgaaccag
ctcagcgagaacctcaagagagtgatgcaatgataaccagtttctctgggagctcattggtggcctcctaagacaaggaacat
gtcagcttgetggcaggatggccggtcttgcggaaaatgaaacgtgggtgggacagctgcaccacgtgtacctgcaag
aaatntaaaccatttccaccaaatacctgcccgcctgcaacctgcgccagtcacatccttctggaaggcgaatgtgccctt
cctgcctccactcgggtggacggtgaggagggtggtctccgtgggcagagtggaccagtgctccgtgacgtgtggctctgg
gacccagcagagaggccggtcctgtgacgtcaccagcaacacctgcttggggccctcgatccagacacgggcttgcagtct
gagcaagtgtgacaccgcatccggcaggacggcggctggagccactggtcaccttggcttcatgctctgtgacctgtgga
gttgcaatatcacacgcatccgtctctgcaactccccagtgccccagatggggggcaagaattgcaaaggagtgccggg
gagaccaaagcctgccaggggcggccatgcccgaatgatggcgcctggagcccctggtccccgtggtcggcctgcactgtc
acctgtgccggtgggatccgggagcgcacccgggtctgcaacagccctgagcctcagtagggaggggaaggcctgcgtgg
gggatgtgcaggagcgtcagatgtgcaacaagaggagctgcccc
```

### 10.3.2 NTF-TSP-2 Aminosäuresequenz

Aus der in Abschnitt 10.3.1 dargestellten Nukleotidsequenz resultiert folgende Aminosäuresequenz von NTF-TSP-2 ohne die Aminosäuresequenz des Fc-Teils:

```
AGHQDKDITFDLFSISNINRKTIGAKQFRGPDGPVAYRFRFDYIPPVNADDLS
KITKIMRQKEGFFLTAQLKQDGKSRGTLLEGPGLSQRQFEIVSNGPADTLDLT
YWIDGTRHVVSLEDVGLADSQWKNVTVQVAGETYSLHVGCDLIGPVALDEPF
```

YEHLQAEKSRMYVAKGSARESHFRGLLQNVHLVFENSVEDILSKKGCQQGQG  
AEINAISENTETLRLGPHVTTEYVGPSSERRPEVCERSCEELGNMVQELSGLHVL  
VNQLSENLRVSNDNQFLWELIGGPPKTRNMSACWQDGRFFAENETWVVDSC  
TTCTCKKFKTICHQITCPPATCASPSFVEGECCPSCLHSVDGEEGWSPWAEWTQ  
CSVTCGSGTQQRGRSCDVTSNTCLGPSIQTRACSLSKCDTRIRQDGGWSHWSP  
WSSCSVTCGVGNITRIRLCNSPVPQMGGKNCKGSGRETKACQGAPCPIDGRWS  
PWSPWSACTVTCAGGIRERTRVCNSPEPQYGGKACVGDVQERQMCNKRSCP

#### **10.4 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1.1 Graphische Darstellung eines Blutgefäßes

Abbildung 1.2 Graphische Darstellung des „angiogenic switch“

Abbildung 1.3 Strukturelle Darstellung des Grundgerüsts von Thrombospondin-1 und Thrombospondin-2

Abbildung 4.1 Schematische Darstellung des NTF-TSP-2 Expressionsvektors

Abbildung 5.1 Nachweis von NTF-TSP-2 mittels Western Blot

Abbildung 5.2 Schematische Darstellung des N-terminalen 80 kDa Fragmentes von humanem Thrombospondin-2

Abbildung 5.3 Hemmung der VEGF-induzierten Ausbildung von Endothelzellröhren durch die Behandlung mit NTF-TSP-2

Abbildung 5.4 NTF-TSP-2 hemmt die VEGF induzierte „Tube Formation“ von HDMEC

Abbildung 5.5 Einfluss von NTF-TSP-2 auf die Proliferation von humanen MDA-MB-435 Brustkrebszellen

Abbildung 5.6 Beispiel eines Alu-Fluoreszenzsignalverlaufes während einer real-time PCR Messung einer Standardverdünnungsreihe

Abbildung 5.7 Beispiel eines 18S rRNA-Fluoreszenzsignalverlaufes während einer real-time PCR Messung einer Standardverdünnungsreihe

Abbildung 5.8 Beispiel einer Standardkurve zur Bestimmung des Anteils humaner DNA in muriner DNA

Abbildung 5.9 Frühe Detektion von humanen MDA-MB-435 Brustkrebszellen in axillären Lymphknoten der Maus

Abbildung 5.10 Immunhistochemischer Nachweis von Mikrometastasen in Lymphknoten

Abbildung 5.11 Hemmung des Tumorwachstums von Mammakarzinomen durch NTF-TSP-2

Abbildung 5.12 Die Behandlung von xenotransplantierten Mammakarzinomen mit NTF-TSP-2 führt zu einer deutlichen Hemmung des Tumorwachstums im Verlauf von 5 Wochen

Abbildung 5.13 Die Gabe von NTF-TSP-2 hemmt die Angiogenese *in vivo*

Abbildung 5.14 Hemmung der Gefäßdichte durch NTF-TSP-2

Abbildung 5.15 Reduzierung des Gefäßflächenanteils durch NTF-TSP-2

Abbildung 5.16 Verringerung der durchschnittlichen Fläche der Blutgefäße durch NTF-TSP-2

Abbildung 5.17 Die Gabe von NTF-TSP-2 hemmt die Metastasierung von MDA-MB-435 Brustkrebszellen in die Lymphknoten

Abbildung 5.18 Die Gabe von NTF-TSP-2 hemmt die Metastasierung von MDA-MB-435 Brustkrebszellen in die Lunge

Abbildung 5.19 Untersuchung der Bioverfügbarkeit von NTF-TSP-2

Abbildung 5.20 Nachweis von NTF-TSP-2 nach Immunpräzipitation mittels Western Blot

Abbildung 5.21 Darstellung von immunfluoreszenzgefärbten HDMEC und HUVEC mit einem Antikörper gegen CD36

Abbildung 5.22 Die Behandlung von HUVEC mit NTF-TSP-2 hemmt nicht die VEGF-induzierte Ausbildung von Endothelzellröhren

Abbildung 5.23 NTF-TSP-2 hemmt nicht die VEGF induzierte „Tube Formation“ von HUVEC

Abbildung 5.24 Die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 hemmt die Ausbildung von Endothelzellröhren über einen CD36-abhängigen Mechanismus

Abbildung 5.25 CD36-abhängige Hemmung der Angiogenese durch NTF-TSP-2 im „Tube Formation Assay“

Abbildung 5.26 Graphische Darstellung einer durchflusszytometrischen Messung

Abbildung 5.27 Die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 induziert die Apoptose über einen CD36-abhängigen Mechanismus

Abbildung 5.28 Apoptoseinduktion von HDMEC durch NTF-TSP-2 ist abhängig vom CD36 Rezeptor

Abbildung 5.29 Die Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2 führt zu einem CD36-abhängigen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials

Abbildung 5.30 CD36-abhängige Aktivierung von Caspase-3 nach Behandlung von HDMEC mit NTF-TSP-2

Abbildung 5.31 Quantifizierung der mittels Western Blot ermittelten CD36-abhängigen Aktivierung von Caspase-3 in HDMEC nach Inkubation mit NTF-TSP-2

## **10.5 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1.1 Beispiele wichtiger proangiogener Faktoren

Tabelle 1.2 Beispiele wichtiger antiangiogener Faktoren

Tabelle 4.1 Sammelgel

Tabelle 4.2 Trenngel 10 %

Tabelle 4.3 Trenngel 14 %

Tabelle 4.4 Zusammensetzung der Probe einer real-time PCR Messung

## **Danksagung**

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Rüdiger Hardeland für die Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Ich möchte mich auch für das Interesse an meiner Arbeit und für die stetige Diskussionsbereitschaft bedanken. Ich danke auch der Biologischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Doktorarbeit.

Ich danke Herrn Professor Dr. Ernst A. Wimmer für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Thomas Hawighorst für seine engagierte und aufschlussreiche Betreuung meiner Arbeit. Ich danke ihm außerdem für seinen freundlichen und humorvollen Umgang, der so mancher Besprechung einen angenehmen Rahmen verpasst hat. Dadurch war es mir möglich, meine Arbeit stets mit Spaß, Motivation und positiver Einstellung durchzuführen. Ich danke Ihm außerdem dafür, mir die Gelegenheit ermöglicht zu haben, an dem spannenden Thema meiner Arbeit forschen zu dürfen.

Ich danke Herrn Professor Dr. Manuel Koch, der mir bei einem Großteil meiner Arbeit mit seinem großen Fachwissen zur Seite stand. Ich danke auch ganz besonders Herrn Dr. Andreas Woeste, der mir ebenfalls stets und immer mit vollem Einsatz bei Fragen zu meiner Arbeit geholfen hat.

Ich danke Herrn Professor Dr. Carsten Gründker für seine stetige Hilfsbereitschaft und dafür, dass ich meine Arbeit in dem Forschungslabor Molekulare Gynäkologie der Universitätsfrauenklinik Göttingen anfertigen konnte

Ich danke Herrn Professor Dr. Günter Emons dafür, dass ich meine Arbeit im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Göttingen anfertigen konnte.

Ich danke dem Team des Labors der molekularen Gynäkologie für die Unterstützung der Durchführung meiner Arbeit, insbesondere Renate Dietrich, Franziska Scheve, Matthias Läsche, Hiltrud Schulz, Sonja Blume und Cornelia Kaber.

Ein ganz besonderer Dank geht an Wiebke Hüls, Dr. Stefanie Fister, Martin Block, Antje Schubert, Dr. Christa Hahmann, Dr. Nicola Eicke, Karl Frontzek, Michael Heinz, Sönke Etzel, Björn Etzel, Mark Bartel, Dr. Hendrik Stukenbrock und besonders Murat Aygün, mit denen ich einfach nur eine super Zeit und viel viel Spaß hatte.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung meines Projektes.

Abschließend danke ich meinen Eltern und meinen Geschwistern Fadwa, Najwa, Riem und Amir für Ihre Unterstützung in allen Dingen.

## Wissenschaftliche Beiträge

### Veröffentlichungen

Hawighorst, T., **Hussein, F.**, Stein, W. und Emons, G. Anti-Angiogenese: Von der präklinischen Forschung zur klinischen Anwendung

(Geburtshilfe und Frauenheilkunde, Heft 04, Jahrgang 68, April 2008, S. 397)

### Publizierte Vorträge

**Hussein, F.**, Woeste, A., Hahmann, C., Emons, G., Koch, M. und Hawighorst, T. Wachstumshemmung von humanen Mammakarzinomen durch ein N-terminales 80 kDa rekombinantes Fragment des Angiogeneseinhibitors Thrombospondin-2

(56. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Berlin, 2006, Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 67, 2006)

**Hussein, F.**, Woeste, A., Hahmann, C., Scheve, F., Emons, G., Koch, M. und Hawighorst, T. Inhibition of breast carcinoma growth and metastasis by systemic delivery of an N-terminal 80 kDa recombinant fragment of the angiogenesis inhibitor Thrombospondin-2

(2. Wissenschaftliches Symposium der Kommission Translationale Forschung der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie in der DGGG und DKG, Bergisch Gladbach, Hauptprogramm S. 37, ISBN: 978-3-938669-03-7)

**Hussein, F.**, Emons, G. und Hawighorst, T. Quantitative Evaluierung von Lymphknotenmikrometastasen in einem orthotopen Mammakarzinom Xenotransplantationsmodell mittels real-time PCR human spezifischer Alu-Sequenzen

(123. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Göttingen, 2007, Geburtshilfe und Frauenheilkunde; 68, 2007)

### **Nicht publizierte Kongressbeiträge**

**Hussein, F., Koch, M, Woeste, A., Hahmann, C., Emons, G. und Hawighorst, T.**  
Hemmung des Wachstums und der Metastasierung von humanen Mammakarzinomen  
durch systemische Applikation eines rekombinanten N-terminalen 80 kDa  
Fragmentes des Angiogeneseinhibitors Thrombospondin-2

(123. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe,  
Göttingen, 2007)

**Hussein, F., Koch, M, Emons, G. und Hawighorst, T.** Die systemische Applikation  
eines rekombinanten Proteinfragmentes des Angiogeneseinhibitors Thrombospondin-  
2 hemmt die Progression von Mammakarzinomen

(124. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe,  
Hamburg, 2008)

## Lebenslauf

Name: Hussein  
Vorname: Fadi  
Geburtsdatum: 3. Dezember 1977  
Geburtsort: Bad Harzburg  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Adresse: Rudolf-Huch-Straße 19  
38667 Bad Harzburg

### Schulausbildung

1984 – 1988 Gerhart-Hauptmann Grundschule Bad Harzburg  
1988 – 1990 Orientierungsstufe Bad Harzburg  
1990 – 1997 Werner-von-Siemens Gymnasium Bad Harzburg  
Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

### Werdegang

Juli 1997 – April 1998 Ableistung der allgemeinen Wehrpflicht in Wesel und Ahlen  
April 1998 – Okt. 1998 Studium der Medizin in Hamburg  
Oktober 1998 – Mai 2003 Studium der Pharmazie in Braunschweig  
Juni 2003 – November 2003 Praktikum in der Katharinen Apotheke in Braunschweig  
Dezember 2003 – Mai 2004 Diplomarbeit zum Thema „Einfluss der Herstellungsmethode auf den Dispersitätsgrad und die Stabilität von Hypromellose-stabilisierten O/W-Emulsionen“ am Institut für Pharmazeutische Technologie der TU Braunschweig. Betreuer: Herr Prof. Dr. Rolf Daniels  
28. Juni 2004 Approbation als Apotheker  
Juli 2004 – Dezember 2004 Tätigkeit als Apotheker in der Burgberg Apotheke in Bad Harzburg  
24. Januar 2005 Erwerb des akademischen Grades eines Diplom-Pharmazeuten  
Seit Januar 2005 Promotion zum Thema: „Untersuchungen zur antiangiogenen Aktivität des matrizellulären Proteins Thrombospondin-2“ in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Georg-August-Universität Göttingen. Betreuer: Herr PD Dr. Thomas Hawighorst