

Aus der Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie
(Prof. Dr. med. L. Trümper)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Evaluation der Interaktionen zwischen extrazellulärer Matrix und ausgewählten Tumor- assoziierten Proteinen mittels Nahinfrarot-Antikörpern

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jan-Niklas Wilhelm Eckardt

aus
Marburg (Lahn)

Göttingen 2019

Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Brück
Referent	Prof. Dr. Frauke Alves
Ko-Referent:	Prof. Dr. Freddy Wouters-Bunt
Promotor-Vertretung:	Prof. Dr. Thomas Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 29.10.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Evaluation der Interaktionen zwischen extrazellulärer Matrix und ausgewählten Tumor-assoziierten Proteinen mittels Nahinfrarot-Antikörpern" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, 2019

.....

(Jan Eckardt)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Interaktionen zwischen Tumorzellen und Tumor-assoziiertes extrazelluläres Matrix ..	1
1.2 EZM-relevante Proteine.....	5
1.2.1 EpCAM (CD326).....	5
1.2.2 CD44	6
1.2.3 Lysyloxidase.....	8
1.2.4 Collagen Triple Helix Repeat Containing 1 (CTHRC1).....	9
1.3 Immundefiziente Nacktmäuse mit transplantierten humanen Karzinomzellen als <i>in vivo</i> -Tumormodelle	10
1.4 Optische Bildgebung mit Nahinfrarot-Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern und ihre Rolle in der Tumordiagnostik und -therapie	10
1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Material.....	13
2.1.1 Geräte	13
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	14
2.1.3 Chemikalien	14
2.1.4 Kits	17
2.1.5 Längenstandards.....	18
2.1.6 Software	18
2.1.7 Primärantikörper.....	19
2.1.8 Sekundärantikörper.....	20
2.1.9 Verwendete Zelllinien.....	20
2.1.10 Medien für die Zellkultur	22
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	23
2.2.1.1 Kultivierung adhärent wachsender Zellen.....	23
2.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen.....	23
2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl	24
2.2.1.4 Erstellung von Trockenpelletts in Zellkultur (für Protein- und RNA-Extraktion).....	24
2.2.1.5 Präparation von Zellen für tierexperimentelle Arbeiten.....	25
2.2.1.6 Aussäen von Zellen auf Objektträger mittels Flexiperms	25
2.2.1.7 Färbung der in Flexiperms ausgesäten Zellen mittels Fluorophor-gekoppelter Antikörper	26
2.2.1.8 Tumorzell-Proliferationsassay (2-dimensional) mit Promega Cell Titer	

Aqueous One 96 unter Einfluss von Chemotherapie nach CAF-Schema	27
2.2.1.9 Präparation von Zellen für die Lichtmikroskopie mittels Cytospin	28
2.2.1.10 Tumorzell-Invasionsassay (3-dimensional) mit Cultrex 96 Well Spheroid BME Cell Invasion Assay unter Einfluss von Chemotherapie nach CAF-Schema	29
2.2.2 Methoden zur Gewinnung und Vervielfältigung von Nukleinsäuren.....	30
2.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen	30
2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von RNA	31
2.2.2.3 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	31
2.2.2.4 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen	32
2.2.3 Proteinanalytische-Methoden.....	33
2.2.3.1 Isolierung von Gesamt-Protein aus Zellen	33
2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	33
2.2.3.3 Western-Blot-Analyse	34
2.2.3.4 FACS-Analyse.....	36
2.2.4 Tierexperimentelle Methoden.....	37
2.2.4.1 Tiermodell	37
2.2.4.2 Injektion humaner Karzinomzellen in immunodefiziente Nacktmäuse	37
2.2.4.3 Sektion.....	38
2.2.4.4 Organpräparation.....	38
2.2.5 Histochemie und Immunhistochemie	39
2.2.5.1 Entparaffinierung.....	39
2.2.5.2 Hämalaun-Eosin-Färbung	39
2.2.5.3 CTHRC1-Färbung.....	40
2.2.5.4 EpCAM-Färbung.....	41
2.2.5.5 LoX-Färbung.....	42
2.2.5.6 Vimentin-Färbung	42
2.2.5.7 Färbungen von Cytospins.....	42
2.2.6 Methoden zur optischen Bildgebung.....	43
2.2.6.1 Fluoreszenz-Messungen von NIRF-Antikörpern im Tumormausmodell mittels Optix MX 2	43
2.2.6.2 Fluoreszenz- und Biolumineszenz-Messungen im Tumormausmodell mittels IVIS	45
3 Ergebnisse.....	46
3.1 Expressionsstatus EZM-relevanter Proteine in Zellkultur und Tumorgewebeschnitten.....	46
3.1.1 RNA-Expression von EpCAM und LOX in den kultivierten Zelllinien mittels RT-PCR.....	46

3.1.2	Proteinexpression von EpCAM und LOX in den kultivierten Zelllinien mittels Western-Blot-Analyse	48
3.1.3	Validierung der Proteinexpression von EpCAM und LOX in den Mammakarzinomlinien mittels FACS-Analyse.....	51
3.2	Vergleich der Expressionsmuster von CTHRC1, EpCAM und LOX in Pankreastumor-Gewebeschnitten	52
3.2.1	Orthotopes Pankreaskarzinom im Nacktmausmodell: Asp1.....	53
3.2.2	Orthotopes Pankreaskarzinom im Nacktmausmodell: Panc1	54
3.2.3	Orthotopes Pankreaskarzinom im Nacktmausmodell: BxPC-3.....	55
3.2.4	Orthotopes Pankreaskarzinom im Nacktmausmodell: Capan-1	56
3.2.5	Orthotopes Pankreaskarzinom im Nacktmausmodell: PancTu-I-CBRL.....	57
3.2.6	Murines Modell: Pankreas einer tumorfreien Maus.....	58
3.2.7	Vergleich der Expression von EpCAM, Lox und CTHRC1 mit immunhistochemischen Färbungen von malignen Pankreastumoren	59
3.3	Vergleich des Bindungsverhaltens von NIRF-Proben <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	60
3.3.1	Nachweis der Integrität der verwendeten Antikörper mittels eines Coomassie-Brillant-Blau-gefärbten Polyacrylamid-Gels.....	60
3.3.2	α EpCAM-Vio680 in verschiedenen Konzentrationen bindet <i>in vitro</i> spezifisch membranständiges EpCAM auf EpCAM-positiven Mammakarzinomzellen.....	61
3.3.3	Längere Inkubationszeit von α EpCAM-Vio680 auf EpCAM-positiven Mammakarzinomzellen <i>in vitro</i> führt zu vermehrter Bindung an membranständiges EpCAM	63
3.3.4	Bindungsverhalten der NIRF-Proben α EpCAM-Vio680, α EpCAM-Cy5.5 und α LOX <i>in vivo</i> über die Zeit	65
3.3.4.1	Bindungsverhalten von α EpCAM-Vio680 und α EpCAM-Cy5.5 <i>in vivo</i> im Vergleich	65
3.3.4.2	Nachweis von Lox <i>in vivo</i> mittels α Lox-Cy5.5 in BT474- und MDA-MB-231 Xenografts... ..	72
3.3.5	Analyse der Biodistribution der verwendeten Antikörper und Fluorophore	75
3.4	Invasionsverhalten und EpCAM-Expression von Mammakarzinomzellen <i>in vitro</i> unter Einfluss von Chemotherapie	82
3.4.1	Chemotherapie hemmt die Proliferation von MDA-MB-231, BT474 und MCF-7 und reduziert die Zahl vitaler Zellen in 2D-Zellkultur.....	82
3.4.2	Einfluss von CAF-Chemotherapie auf die Expression von EpCAM in MDA-MB-231-, BT474- und MCF-7-Zellen über die Zeit	83
3.4.3	CAF-Chemotherapie stimuliert das Invasionsverhalten von Mammakarzinomzellen.. in 3D-Zellkultur.....	88
4	Diskussion	95
4.1	Expression von EZM-relevanten Proteinen in Pankreaskarzinomen mittels Immunhistochemie	95
4.2.1	Evaluation der Bindungskinetik von α EpCAM-Vio680 <i>in vitro</i>	96
4.2.2	Lox kann in <i>in vitro</i> kultivierten Mammakarzinomzellen auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden	97

4.3	Evaluation der Bindungskinetik der NIRF-Proben <i>in vivo</i>	98
4.4	Einfluss von Chemotherapie auf das Invasionsverhalten von Mammakarzinomen in 2D- und 3D-Zellkultur und den Expressionsstatus von EpCAM.....	100
5	Zusammenfassung	104
6	Literaturverzeichnis	106

Abkürzungsverzeichnis	
5-FU	5-Fluoruracil
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
BCA	Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
Bidest.	Zweifach destilliert
CAF	Chemotherapie-Schema mit Cyclophosphamid, Adriamycin und 5-Fluoruracil
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
CTHRC1	Collagen Triple Helix Repeat Containing 1
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EpCAM	Epithelial Cellular Adhesion Molecule
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fetales Kälberserum (fetal bovine serum)
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphorribosyl-Transferase
HRPO	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
k-	Kilo
kB	Kilobasen
l	Liter
LOX	Lysyloxidase
M	Molar
m	Meter
m-	milli- (10 ⁻³)
μ-	mikro- (10 ⁻⁶)
MRT	Magnetresonanztomographie
n-	nano (10 ⁻⁹)
NIRF	Nahinfrarot-Fluoreszenz
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate- buffered saline)
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium-dodecylsulfate)
Taq	Thermus aquaticus
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)

1 Einleitung

Daten des Statistischen Bundesamts, des deutschen Krebsregisters und des Robert Koch-Instituts (Stand 2018) zeigen, dass allein in Deutschland derzeit etwa 4 Millionen Menschen leben, die entweder aktuell an einer malignen Tumorerkrankung leiden oder eine solche Erkrankung im Laufe ihres Lebens bereits überlebt haben. Seit 1970 hat sich die Inzidenz der Krebsneuerkrankungen nahezu verdoppelt. Darunter ist das Mammakarzinom der häufigste maligne Tumor der Frau mit einem Anteil von etwa einem Drittel der Krebsneudiagnosen bei Frauen. Das Pankreaskarzinom ist bei Frauen der sechsthäufigste und bei Männern der zehnthäufigste maligne Tumor und weist mit einer 5-Jahresüberlebensrate von knapp 10% eine sehr schlechte Prognose auf. Insgesamt sind Krebserkrankungen für etwa ein Viertel aller Todesfälle in Deutschland verantwortlich. Die Entstehung von Krebs ist ein multifaktorielles Geschehen. Eine bedeutende Rolle neben genetischen, demographischen und biographischen Faktoren spielt dabei nicht zuletzt das Mikromilieu des Tumors selbst. Krebszellen werden von ihrem Umfeld beeinflusst und beeinflussen wiederum ihr Umfeld. Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist ein wichtiger Bestandteil dieses Mikromilieus. Sie beeinflusst die Biomechanik und Zellphysiologie gesunder sowie maligner Zellen (He et al. 2016).

1.1 Interaktionen zwischen Tumorzellen und Tumor-assoziiertes extrazellulärer Matrix

Die EZM ist ein komplexes Netzwerk, das unter anderem aus einer großen Vielzahl an unterschiedlichen Proteinen, Glykoproteinen, Proteoglykanen und Polysacchariden mit verschiedenen physikalischen, biochemischen und biomechanischen Eigenschaften besteht (Ozbek et al. 2010). Entsprechend vielfältig sind ihre physiologischen Funktionen, die beispielsweise die Formgebung von Geweben, die Abgrenzung unterschiedlicher Gewebe, Speicherfunktion für Wasser und Zytokine, Elastizität, direkte und indirekte Signaltransduktion, Verankerung von Zellen, Polaritätsvorgabe und Bildung von Migrationspfaden für Zellen und Beeinflussung der Wundheilung umfassen. Diese Eigenschaften der EZM sind allerdings keinesfalls unabhängig voneinander zu betrachten, sondern beeinflussen sich vielmehr gegenseitig: Wenn beispielsweise die Steifigkeit der EZM erhöht wird, wie es unter anderem bei pathologischen Prozessen der Fall ist, so ändern sich ihre biomechanischen Eigenschaften. Dadurch wird die Homöostase

des Gewebes verändert, was eine Tumorprogression begünstigt (Yu et al. 2011). Die EZM ist eine dynamische Struktur, die konstant abgebaut, umgebaut und reorganisiert wird und dabei die angrenzenden Zellen beeinflusst und umgekehrt von diesen beeinflusst wird (Hynes 2009). Diese Umbauprozesse werden streng reguliert, z. B. mithilfe von Metalloproteinasen (MMPs), welche auf Transkriptions- und Translationsebene, aber auch posttranslational modifiziert und reguliert werden können. Dies ermöglicht eine Anpassung an Krankheitsprozesse wie Verletzungen, Entzündungen und Infektionen (Page-McCaw et al. 2007). So sind MMPs in der Lage, u. a. mit Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator (uPA) Wachstumsfaktoren zu aktivieren, die die vermehrte Einwanderung und Proliferation von Fibroblasten bewirken und so die Zusammensetzung der EZM beeinflussen (Zimowska et al. 2013). Versagen diese Regulationsmechanismen im Rahmen von Alterungs- oder Krankheitsprozessen, verändern sich die Eigenschaften der EZM (Butcher et al. 2009). Eine Dysregulation und Desorganisation der EZM ist Folge solcher Prozesse und kann zur Fibrose des betroffenen Gewebes führen (Frantz et al. 2010). Dadurch erhöht sich das Risiko für eine Tumorentstehung und -progression, indem die EZM-regulierenden Enzyme u. a. durch Tumor-assoziierte Fibroblasten beeinflusst werden (Bhowmick et al. 2004). Beispielsweise bei Mammakarzinomen sind fibrotische Foci mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet (Hasebe et al. 2002). Darüber hinaus verstärkt eine vermehrte Kollageneinlagerung und eine erhöhte Steifheit der EZM den Integrin-Signalweg und kann so die Widerstandsfähigkeit von Tumorzellen gegen apoptotische Einflüsse erhöhen und die Proliferationsrate der Zellen steigern (Paszek et al. 2005). Die Organisation und Struktur der EZM spielt eine wichtige Rolle bei der Migration von Zellen: Während linear angeordnete Kollagenbündel die Migration begünstigen, schränkt ein dichtes Netzwerk von Kollagenbündeln die Migration ein, sofern keine MMPs exprimiert werden (Egeblad et al. 2010a). Tumorzellen können an radiär ausgerichteten Kollagenbündeln leichter invadieren und sind sogar in der Lage, die Ausrichtung der Kollagenfasern zu beeinflussen (Provenzano et al. 2006). Im Tumorgewebe sind die Kollagenfasern eher linear und somit steifer, was eine höhere Steifheit der EZM bewirkt und Einfluss auf die Migration von Zellen nimmt (Zaman et al. 2006). Mithilfe von intravitaler Bildgebung konnte gezeigt werden, dass sowohl Tumorzellen als auch Leukozyten entlang dieser Kollagenbündel in kollagenreichen Regionen migrieren können (Condeelis und Segall 2003). Dabei migrieren Fibroblasten durch die EZM weg von Bereichen hoher oder niedriger Steifheit zu EZM-Bereichen mit intermediärer Steifheit (Park et al. 2016). *In vitro* führt eine erhöhte Steifheit der EZM zu einer vermehrten Migration von MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen (McLane und

Ligon 2016). Die EZM spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation von Stammzellnischen (Raymond et al. 2009). Ein Verlust der EZM (Yamashita et al. 2005) oder eine Reduktion der EZM-Rezeptor-Integrine (Frye et al. 2003) beziehungsweise von EZM-Komponenten wie u. a. Tenascin C (Garcion et al. 2004) reduzieren die Anzahl an Stammzellen in der betroffenen Nische. EZM-Rezeptoren verankern die Stammzellen in ihrer Nische, wo sie parakrin durch Nischenzellen beeinflusst werden, um ihre Stammzellfunktionen aufrechtzuerhalten (Li und Xie 2005). Das sensible Gleichgewicht aus Selbsterneuerung und Differenzierung von Stammzellen zu gewebespezifischen Zellen unterliegt strengen Regulationsmechanismen, welche bei Versagen zu tumorinitiierenden Zellen, sogenannten Krebsstammzellen, führen könnten (Peiris-Pagès et al. 2016). In der physiologischen Strukturgebung von Geweben, insbesondere bei epithelialen Organen, gibt die EZM den Zellen Polarität vor, welche von entscheidender Bedeutung für deren normale Funktion ist und deren Dysfunktion eine Tumorgenese begünstigt (Ghajar und Bissell 2008). Ein Verlust dieser Strukturvorgabe führt zu einer eingeschränkten Funktion der Basalmembran und begünstigt epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und vereinfacht so die Infiltration durch Krebszellen (Radisky und Radisky 2010). Die EMT ist entscheidend in der Tumorprogression, da Tumorzellen, die einen mesenchymalen Phänotyp aufweisen, eher zur Bildung von Metastasen neigen (Ye et al. 2017). Brustkrebszellen gering differenzierter Tumore, die EMT durchlaufen und Metastasen bilden, zeigen eine erhöhte Expression von u. a. CD44 und haben eine schlechtere Prognose (Scimeca et al. 2016). In der Tumorprogression spielt die EZM eine entscheidende Rolle bei der Vaskularisierung von Tumorgewebe: EZM-Komponenten spielen eine Rolle bei der Migration von Endothelzellen und folglich bei der Bildung neuer Blutgefäße (Sweet et al. 2012). Die dabei um die Tumorgefäße entstehende Basalmembran ist allerdings poröser als bei gesunden Gefäßen (Hashizume et al. 2000), was eine Metastasierung von Tumorzellen bewirken könnte und gleichzeitig eine Einwanderung von Immunzellen ermöglicht (Ruoslahti 2002). Obwohl die Immunantwort die Tumorprogression bekämpfen sollte, konnte gezeigt werden, dass oftmals Immunzellen im Zuge der Krankheitsprogression von Tumorzellen rekrutiert werden und ein inflammatorisches Milieu schaffen, das eine Tumorprogression bewirken kann (Coussens und Werb 2002). Schreitet die Erkrankung weiter fort, ist eine Vielzahl von malignen Tumoren in der Lage, Metastasen zu bilden. Um dies zu erreichen, bedarf es nicht nur einer lokalen Krebsstammzellnische am Ort des Primarius, die konstant für Nachschub an Tumorzellen sorgt, sondern auch einer sogenannten metastatischen Nische in einem entfernten Gewebe, wo die Metastase wächst und die es den Tumorzellen ermöglicht, dort

zu überleben, zu proliferieren und zu expandieren (Psaila und Lyden 2009). Krebszellen sind in der Lage, mithilfe von u. a. hämatopoetischen Progenitorzellen entfernte Gewebe zu modifizieren und so vor der Metastasierung eine prämetastatische Nische zu schaffen (McAllister und Weinberg 2010). Dies kann beispielsweise erreicht werden, indem Krebszellen des Primarius Osteopontin produzieren, das Granulin-exprimierende hämatopoietische Progenitorzellen rekrutiert, welche wiederum die Funktionen von entfernt gelegenen Fibroblasten deregulieren (Elkabets et al. 2011). EZM-Komponenten können die Metastasierung auch direkt beeinflussen: Hyaluronan und sein Rezeptor CD44 fördern den CXCR4-Signalweg und seinen Liganden SDF1 (Avigdor et al. 2004), was eine spezifische Metastasierung von Tumorzellen in den Knochen zur Folge haben kann (Jones et al. 2006). In der Therapie von Tumorerkrankungen spielen nicht nur zelluläre Abwehrmechanismen, sondern auch das Mikromilieu im Tumorgewebe - und somit die EZM - eine wichtige Rolle bei der Wirksamkeit der Therapie und Resistenz gegen die Therapeutika (Egeblad et al. 2010b). Beispielsweise korreliert eine vermehrte Expression von Typ-I-Kollagen bei Pankreaskarzinomen mit erhöhter Chemosensitivität (Armstrong et al. 2004). Umgekehrt kann eine Verminderung der tumorassoziierten Fibroblasten und der EZM zu einer verbesserten Aufnahme von Chemotherapeutika im Tumorgewebe führen (Loeffler et al. 2006). Eine Behandlung von Tumorgewebe mit Typ-I-Kollagenase vermindert den interstitiellen Druck und bewirkt so eine bessere Wirkstoffaufnahme von Chemotherapie ins Zielgewebe (Gade et al. 2009). Bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Hyaluronan und seinem Rezeptor CD44 mit einer vermehrten Resistenz der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika korreliert (Bourguignon et al. 2017). Inwiefern eine Modulation der EZM die Tumorthherapie und die Prognose verbessern kann, ist Gegenstand aktueller Forschung. Zusammenfassend zeigt sich, dass eine normale Zusammensetzung und Funktion der EZM wichtig für die Aufrechterhaltung physiologischer Prozesse ist und eine Dysregulation der EZM mit veränderter Struktur und Funktion ein Mikromilieu schafft, welches die Tumorgenese, -progression, -invasion und Metastasierung begünstigen kann.

1.2 EZM-relevante Proteine

1.2.1 EpCAM (CD326)

Das Epithelial Cellular Adhesion Molecule EpCAM (andere Bezeichnungen u. a. CD326, 17-1A Antigen oder TACSTD1 [*tumor-associated calcium signal transducer 1*]) wurde erstmals 1979 als Oberflächenantigen bei Kolonkarzinomen beschrieben (Herlyn et al. 1979). Seitdem konnte EpCAM bei einer Vielzahl von Karzinomen nachgewiesen werden, was seine Bedeutung in Diagnostik und Therapie von malignen Tumorerkrankungen unterstreicht (Baeuerle und Gires 2007). Molekularbiologisch handelt es sich bei EpCAM um ein 40 kDa schweres membranständiges Glykoprotein, das nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in gesunden Epithelien (mit Ausnahme von Plattenepithel) vorkommt (Balzar et al. 1999). Außerdem findet es sich in normalen Stammzellen, aber auch in Krebsstammzellen. Demnach wird ihm eine Rolle in der Tumorgenese zugesprochen (Imrich et al. 2012). Es besteht aus einer extrazellulären Domäne aus 224 Aminosäuren, die EGF- und Thyroglobulin-ähnliche Abschnitte enthält, sowie einer kurzen, nur aus 23 Aminosäuren bestehenden intrazellulären Domäne (Armstrong und Eck 2003). Durch Proteolyse werden die beiden Domänen gespalten und dann als EpEX (extrazellulär) und EpICD (intrazellulär) bezeichnet (Denzel et al. 2009). EpICD wird nach Proteolyse in den Zellkern transloziert und wirkt dort als Teil eines an der Transkription beteiligten Komplexes, der bei immunodefizienten Mäusen onkogen wirkt (Maetzel et al. 2009). Mithilfe der EpEX-Domänen schafft EpCAM schwache homophile Zell-Zell-Kontakte (Litvinov et al. 1994). Andererseits schwächt es die E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion, indem es die Verbindung zwischen alpha-Catenin und F-Aktin löst. So wird eine Migration und Metastasierung der Tumorzellen begünstigt (Winter et al. 2003). Bei Mammakarzinomzellen führt eine N-Glykierung von EpCAM zu einer verminderten Adhäsion der Tumorzellen untereinander (Xue Liu et al. 2017). Eine Herabregulation von EpCAM wird mit EMT in Verbindung gebracht (Santisteban et al. 2009). Brustkrebszellen, die EMT durchlaufen, zeigen eine stark verminderte Expression von EpCAM bei gleichzeitig erhöhter Expression von Stammzellmarkern und vermehrter Tendenz zur Metastasenbildung (Hyun et al. 2016). Dabei hemmt eine erhöhte Expression von EpCAM den ERK-Signalweg und vermindert so die Migration und Invasion von Tumorzellen (Sankpal et al. 2017). Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* die Expression von EpCAM von der Konfluenz der Zellen in Monolayer-Zellkultur abhängt. Eng aneinander liegende Zellen exprimieren EpCAM stärker als separierte Zellen (Sterzynska et al. 2012). Insgesamt unterscheidet sich die Rolle von

EpCAM in der Tumorprogression zwischen verschiedenen Tumorentitäten: In klarzelligen Nierenkarzinomen und Schilddrüsenkarzinomen korreliert eine starke Expression mit einer besseren Prognose, während in vielen anderen Karzinomtypen wie u. a. Brustkrebs eine Überexpression von EpCAM mit einer schlechten Prognose einhergeht (van der Gun et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass EpCAM in vielen primären und metastasierten Mammakarzinomen überexprimiert wird (teils um das Hundertfache im Vergleich zu gesundem Brustgewebe). Ein „Silencing“ (Stilllegung) des EpCAM-Gens vermindert Proliferation und Migration von Mammakarzinomzellen (Osta et al. 2004). Eine Analyse der EpCAM-Expression bei 1715 Patientinnen mit lymphatisch metastasiertem Brustkrebs zeigte ein signifikant vermindertes Langzeitüberleben bei Überexpression von EpCAM (Spizzo et al. 2011). Eine weitere Studie zeigt eine schlechte Prognose auch für Patientinnen mit nicht lymphatisch metastasiertem Brustkrebs bei EpCAM-Überexpression (Schmidt et al. 2008). EpCAM wird ebenfalls auf im Blut zirkulierenden Tumorzellen gefunden. Zur Identifizierung solcher zirkulierenden Tumorzellen (CTC) können Antikörper genutzt werden, die sich gegen EpCAM richten (Mostert et al. 2009). Bei Patientinnen mit EpCAM-positiven Mammakarzinomen können zur Frühdiagnostik vor Metastasierung Blutproben auf EpCAM-positive CTCs untersucht werden (Schneck et al. 2015). Auch bei Pankreaskarzinomen bedingt eine hohe EpCAM-Expression ein kürzeres progressionsfreies Überleben (Fong et al. 2008). Eine EpCAM-basierte Immuntherapie mit dem Maus-Antikörper Edrecolomab (Riethmüller et al. 1994) zeigte allerdings keinen Vorteil gegenüber konventionellen Therapieschemata bei Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium III (Punt et al. 2002). Eine Kombination aus Adecatumumab, einem monoklonalen humanen EpCAM-Antikörper, und Docetaxel bei Patientinnen mit therapierefraktärem Brustkrebs zeigte jedoch eine klinische Besserung in 63% der Fälle bei EpCAM-positiven Tumoren (Schmidt et al. 2012). Catumaxomab, ein trifunktionaler Antikörper mit u. a. EpCAM als Zielstruktur, ist zur Behandlung von Patienten mit malignem Aszites bei EpCAM-positiven Malignomen auf dem europäischen Markt zugelassen (Zhang et al. 2017).

1.2.2 CD44

Bei CD44 (alternativ u. a. Hermes-Antigen, *homing cell adhesion molecule* oder HUTCH-1) handelt es sich um ein transmembranes Glykoprotein, welches durch das CD44-Gen auf Chromosom 11 kodiert wird (Spring et al. 1988). Die Genprodukte werden alternativ gespleißt und so entstehen CD44-Isoformen mit unterschiedlichen Funktionen (Erb et al.

2014). Die Standard-Isoform von CD44 wird auf einer Vielzahl von Zellen gefunden (Misra et al. 2011), während CD44v vor allem auf Zellen im Kontext einer Entzündungsreaktion oder auf Tumorzellen exprimiert wird (Ponta et al. 2003). CD44 nimmt Funktionen in sowohl physiologischen als auch pathologischen Prozessen wahr: Ursprünglich wurde CD44 als Hyaluronan-Rezeptor und Homing-Rezeptor für Lymphozyten entdeckt (Naor et al. 1997). CD44 übernimmt außerdem Funktionen in Zelladhäsion, Angiogenese, Entzündung und Tumorentstehung (Nagano und Saya 2004). Bei Pankreaskarzinomen korreliert eine hohe Expression von CD44v mit vermehrter Metastasierung und schlechterer Prognose, während eine Inhibition von CD44v in Ratten zu einem verminderten Tumorwachstum und geringerer Ausbildung von Metastasen führt (Matzke-Ogi et al. 2016). Auch bei Mammakarzinomen korreliert eine hohe CD44-Expression mit einer vermehrten Bildung von Metastasen (Senbanjo und Chellaiah 2017). CD44 kommt ebenfalls eine Rolle in EMT zu: Mesenchymale Marker wie TWIST1 (Li und Zhou 2011) und SLUG (Bhat-Nakshatri et al. 2010) sind positiv mit vermehrter Expression von CD44 korreliert. Außerdem fördert CD44 die EMT, indem es mesenchymale Marker herauf- und epitheliale Marker herunterreguliert, so z. B. beim Pankreaskarzinom (Jiang et al. 2015). Eine hohe CD44-Expression geht mit einer verminderten Expression von E-Cadherin und vermehrten Expression von Vimentin und Stammzellmarkern einher (Fabregat et al. 2016). Klinische Bedeutung gewinnt CD44 unter anderem dadurch, dass es die Widerstandsfähigkeit von Krebszellen gegen Therapeutika erhöht: CD44-positive/CD24-negative Krebsstammzellen von Mammakarzinomen sprechen schlechter auf Chemotherapie, Radiotherapie oder Hormontherapie an als CD44-negative, stärker differenzierte Krebszellen (Nicolini et al. 2011). CD44 ist ein vielversprechender prognostischer Marker für viele solide Tumoren wie z. B. Brustkrebs (Brown et al. 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des Isotyps CD44v6 positiv mit dem Grad der Lymphknoten-Metastasierung bei Brustkrebs korreliert (Wu et al. 2015). CD44 stellt sich darüber hinaus als möglicher Angriffspunkt für neue, molekulare Therapien dar. Der Abbau von CD44 von der Zelloberfläche von MCF-7 Brustkrebszellen durch einen monoklonalen Antikörper konnte die Zellmigration und Invasion der Krebszellen signifikant senken (Uchino et al. 2010). Ein „Silencing“ von CD44 in Blasenkarzinomzellen konnte die Angiogenese sowie die Migration und Invasion der Tumorzellen vermindern (Yu et al. 2014). Eine Blockade von CD44 durch Antikörper in Kombination mit Chemo- und Radiotherapie führt bei einer Vielzahl von Tumoren zu einer verlangsamten Tumorprogression mit geringerer Metastasierung (Thapa und Wilson 2016).

1.2.3 Lysyloxidase

Lysyloxidase (Lox) und die zur gleichen Familie gehörigen Lox-like-enzymes 1-4 (Loxl 1-4) sind kupferabhängige Aminooxidasen, die eine wichtige Rolle in der Vernetzung von Kollagen und Elastin, Remodellierung der EZM und der Tumorprogression und Metastasierung spielen (Mayorca-Guiliani und Erler 2013). Während das C-terminale Ende sich zwischen den einzelnen Mitgliedern der Lox-Familie kaum unterscheidet, variiert das N-terminale Ende stark: Loxl-1 verfügt über eine Prolin-reiche Sequenz; Loxl 2-4 beinhalten Scavenger Receptor Cystein-reiche Domänen (Lucero und Kagan 2006). Die Rolle, die Lox in der Remodellierung der EZM spielt, legt auch seine pathophysiologische Bedeutung nahe: Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression von Lox mit der Fibrosierung verschiedener menschlicher Gewebe einhergeht, so z. B. Leberfibrose, Adriamycin-induzierte Nierenfibrose und Fibrosierung von Arterien (Mäki 2009). LOX ist in der Lage, Kollagenfibrillen zu vernetzen und in der EZM auszurichten, was einen direkten Einfluss auf die Tumorgenese durch Alteration der EZM bewirken kann (Grossman et al. 2016). Ein Mangel an Lox wirkt sich fatal auf die Entwicklung der bindegewebigen Strukturen des Respirationstraktes, Kreislaufsystems und der Haut aus: Lox-defiziente Mäuse zeigen Defekte in der Vernetzung von Kollagen und Elastin, welche schon bei Geburt zum Multiorganversagen und frühen Tod der Tiere führten (Mäki et al. 2005). Lox und Loxl-2 induzieren EMT und verstärken die Invasion von Tumorzellen (Cano et al. 2012). Außerdem wird Lox durch den Hypoxie-induzierten Faktor 1 (HIF-1), der unter hypoxischen Bedingungen, wie sie u. a. häufig in Tumorgeweben vorherrschen, exprimiert wird, induziert (Erler et al. 2006). Lox erhöht dann die Steifigkeit der EZM und bewirkt so einen Verlust des epithelialen Phänotyps von Tumorzellen, welche daraufhin einen invasiven Phänotyp zeigen und Metastasen bilden (Levental et al. 2009). Umgekehrt induziert Lox auch eine erhöhte Expression von HIF-1, was so eine gegenseitige Potenzierung des tumorigenen Effektes bewirkt (Pez et al. 2011). Eine Inhibierung von Loxl-2 reduziert signifikant die Anzahl an Tumorzellen, die durch die EZM migrieren (Brekman und Neufeld 2009) und bewirkt eine verminderte Aktivierung von Fibroblasten und Endothelzellen sowie eine geringere Produktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Barry-Hamilton et al. 2010). Durch Herunterregulation von Lox wird Kollagen vermindert vernetzt und so die Tumorprogression verzögert (Gao et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung von Lox die durch TGF-beta-1 gesteuerte EMT bei Brustkrebszellen beeinträchtigt, was eine Funktion von Lox als Mediator zwischen Mechanotransduktion und

dem TGF-beta-Signalweg nahelegt (Taylor et al. 2011). Die Inhibition des TGF-beta-Signalwegs durch Lox bewirkt über HTRA1 und Matrillin2 eine vermehrte Bindung von EGFR an der Oberfläche von Tumorzellen und erzeugt so eine vermehrte Tumorphiliferation (Tang et al. 2017). Lox wird stärker in invasiven als in nicht-invasiven Brusttumoren exprimiert (Kirschmann et al. 1999) und in Fernmetastasen von invasiven Brusttumoren ist die Lox-Expression höher als in den Primärtumoren (Payne et al. 2005). Eine hohe Expression von Lox bei hormonnegativen Mammakarzinomen korreliert mit einer vermehrten ossären Metastasierung (Cox et al. 2016). Eine hohe Expression von Lox kann als ungünstiger prognostischer Marker z. B. bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (Liu et al. 2014), Magenkarzinom nach kurativ intendierter Operation (Zhang et al. 2013), Adenokarzinom der Lunge (Wilgus et al. 2011) und Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich (Le et al. 2009) gewertet werden.

1.2.4 Collagen Triple Helix Repeat Containing 1 (CTHRC1)

Collagen Triple Helix Repeat Containing 1 (CTHRC1) ist ein Protein, welches eine Rolle in der Morphogenese, der Knochenbildung und dem Remodelling von Gefäßen spielt: CTHRC1 wird beispielsweise in verletzten Arterien exprimiert und ist involviert beim Remodelling der Adventitia, indem es Zellmigration induziert und die Kollagensynthese durch Fibroblasten inhibiert (Pyagay et al. 2005). Es kommt in einer Vielzahl solider Tumoren des Menschen vor und spielt eine Rolle in der Invasion von Tumorzellen und im Prozess der Metastasierung (Tang et al. 2006). Vor allem in Pankreaskarzinomen wird CTHRC1 stark exprimiert. Hier korreliert eine Überexpression mit einer verstärkten Invasion und Metastasierung, während ein „Silencing“ von CTHRC1 die Ausbreitung der Tumoren vermindert (Park et al. 2013). Ein Knockout von CTHRC1 in Glioblastomzellen bewirkt eine verringerte Migration und Proliferation der Tumorzellen (Jiang et al. 2017). Eine hohe Expression von CTHRC1 in Pankreaskarzinomen korreliert mit einer frühen Metastasierung und einer stark reduzierten Lebenserwartung bei Patienten mit CTHRC1-positivem Bauchspeicheldrüsenkrebs (Liu et al. 2016). Für Brustkrebs konnte gezeigt werden, dass CTHRC1 im Vergleich zu gesundem Brustgewebe im Tumorgewebe stärker exprimiert wird und das Risiko für Knochenmetastasen mit hoher Expression von CTHRC1 steigt (Kharaishvili et al. 2011). Die Induktion von CTHRC1 erfolgt unter anderem über den TGF-beta-Signalweg (Jiang et al. 2016). Darüber hinaus gilt CTHRC1 als prognostischer Marker für einen schlechten Krankheitsverlauf bei Patienten mit gastrointestinalen

Stromatumoren (Ma et al. 2014), nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinomen (Ke et al. 2014), Kolonkarzinomen (Kim et al. 2014) und Magenkarzinomen (Gu et al. 2014).

1.3 Immundefiziente Nacktmäuse mit transplantierten humanen Karzinomzellen als *in vivo* Tumormodelle

Die Komplexität, die die Interaktion von Tumorgeweben mit ihrer Umgebung birgt, kann nicht allein durch in-vitro-Versuche abgebildet werden. Viele Einflüsse und Interaktionen sind bis dato nicht hinreichend verstanden und nur ein in-vivo-Modell erlaubt es, die Wechselwirkungen zwischen Tumor und EZM abzubilden. Ein solches Tiermodell sollte ähnliche Bedingungen bieten, wie sie auch bei der Entstehung von Tumoren im Menschen herrschen, um eine Übertragung der Erkenntnisse auf klinische Zusammenhänge zu ermöglichen. In der präklinischen onkologischen Forschung werden dazu unter anderem NMRI-Foxn1^{nu/nu} Nacktmäuse für in-vivo-Versuche genutzt. Das FOXN1-Gen spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Thymus als auch der Körperbehaarung dieser Mäuse (Flanagan 1966). Ohne Thymus weisen diese Mäuse eine Immuninsuffizienz auf. Diese Immunschwäche kann genutzt werden, um den Mäusen humane Tumorzellen orthotop, d. h. in das jeweilige Organ, dem der Primärtumor entstammt (z. B. Zellen eines humanen Brusttumors in die Brustdrüse der Maus), zu transplantieren, ohne dass das Immunsystem der Maus in der Lage wäre, den Tumor zu bekämpfen (Kubota 1994).

1.4 Optische Bildgebung mit Nahinfrarot-Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern und ihre Rolle in der Tumordiagnostik und -therapie

In der präklinischen Forschung kann eine nicht-invasive Darstellung von Prozessen im lebenden Organismus mithilfe von optischer Bildgebung mit Nahinfrarot-Fluoreszenz erfolgen (Hilderbrand und Weissleder 2010). Geräte zur optischen Bildgebung messen dabei die Emission von Photonen, die durch Fluoreszenz oder Biolumineszenz z. B. durch Nahinfrarot-Fluoreszenz-Proben (NIRF-Proben) emittiert werden (Müller et al. 2013). Dabei werden fluoreszierende Proben eingesetzt, welche Licht im Nahinfrarot-Bereich (650 – 900 nm) emittieren. In diesem Bereich ist sowohl die Autofluoreszenz des Gewebes als auch die Fluoreszenz-Extinktion besonders gering, was ein deutlicheres Signal mit minimaler Hintergrund-Interferenz erzeugt (Würth et al. 2011). Bei den fluoreszierenden Proben handelt es sich u. a. um gegen bestimmte Epitope gerichtete Antikörper, die mit

Fluorophoren konjugiert sind (Cheng und Cheng 2012). Diese NIRF-Proben sind sowohl in der Lage, physiologische Prozesse als auch pathologische Prozesse, u. a. in der Tumorgenese und -progression, darzustellen (Armentero et al. 2013). Beispielhaft sind sie in der Lage, eine Veränderung des pH-Werts (Fan et al. 2012), Hypoxie (Xu et al. 2013) sowie Apoptose und Nekrose (Thakur et al. 2012) abzubilden. Potentielle klinische Anwendungsbereiche von Nahinfrarot-Fluoreszenz-basierten Methoden sind die Diagnostik von Tumorerkrankungen, die Verbesserung intraoperativer Bildgebung zur genaueren Resektion von Tumorgewebe und die zielgerichtete Tumorthherapie. Mit dieser Methode kann im Nahinfrarot-Spektrum spezifisch zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe unterschieden werden (Luo et al. 2011). Beispielsweise ist das Fluorophor Indocyaningrün in der Lage, Tumorzellen eines hepatozellulären Karzinoms (Morita et al. 2013) oder hepatischer Metastasen eines kolorektalen Karzinoms (van der Vorst et al. 2012) von gesundem Lebergewebe abzugrenzen, was eine genauere intraoperative Lokalisation der Tumormasse ermöglicht. Dieses Prinzip hilft letztlich bei einer präziseren Resektion von Tumorgewebe mit exakter gewählten Resektionsrändern und somit einer Minimierung des Risikos einer inkompletten Resektion (Schaafsma et al. 2011), was wiederum das Risiko eines lokalen Rezidivs vermindert (Pleijhuis et al. 2009). Die sogenannte die photodynamische Therapie (PTD) sowie die photothermale Therapie (PTT) stellen zielgerichtete antikörperbasierte Therapieansätze in Kombination mit Infrarot-Lasertechnik dar. Bei der PTD tragen die spezifisch im Tumorgewebe akkumulierenden Antikörper sogenannte Photosensitizer, die bei Bestrahlung mit (meistens) Infrarotlicht freie Radikale generieren, welche die Tumorzellen schädigen (Yuan et al. 2013). Außerdem sorgt eine so initiierte lokale Inflammation ebenfalls für ein Absterben von Tumorgewebe (Qian et al. 2012). Bei der PTT werden diese an tumorproteinspezifische Antikörper gekoppelten Photosensitizer durch die Bestrahlung mit Infrarotlicht so stark erhitzt, dass das Tumorgewebe lokal thermisch geschädigt wird (Lai und Chen 2013). Bei der Chemotherapie von Krebserkrankungen stellt die fehlende Selektivität der Therapeutika, einhergehend mit systemischen Nebenwirkungen, eine große Hürde dar. Ein Ziel antikörperbasierter Therapie ist es, Chemotherapie selektiv an das Tumorgewebe zu transportieren und somit die lokale Wirksamkeit der Therapeutika zu erhöhen, während gleichzeitig die systemischen Nebenwirkungen minimiert werden (Ganesh et al. 2013). Gegen spezifische Tumorproteine gerichtete Antikörper könnten eine vielversprechende Funktion in Diagnostik (in Kombination mit NIRF-Proben) und Therapie (u. a. in Kombination mit Chemo- oder Radiotherapeutika) von Krebserkrankungen erfüllen. Das Potential gegen Tumorantigene

gerichteter NIRF-Antikörper in der Diagnostik von Krebserkrankungen konnte bereits durch zahlreiche Studien verdeutlicht werden, so z. B. bei Ovarialkarzinomen (Xu et al. 2012), Plattenepithelkarzinomen der Haut (Day et al. 2013) und Brustkrebs (Gong et al. 2012).

1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit war demnach:

1. Den Expressionstatus der EZM-relevanten Proteine EpCAM, Lox und CTHRC1 in verschiedenen Karzinomen (Mamma und Pankreas) mit unterschiedlicher Aggressivität und Invasionstendenz zu erheben, miteinander zu vergleichen und Zusammenhänge zwischen dem Verhalten maligner Zellen und dem Expressionsstatus EZM-relevanter Proteine zu identifizieren.
2. NIRF-Proben sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu evaluieren, indem verschiedene Antikörper und Farbstoffkonjugate *in vitro* hinsichtlich ihrer spezifischen Bindung an Karzinomzellen und *in vivo* in Bezug auf ihre Biodistribution im Tumormodell in Nacktmäusen verglichen wurden.
3. Die Änderungen im Expressionsverhalten des EZM-relevanten Proteins EpCAM in Mammakarzinomzellen unter dem Einfluss von Chemotherapie *in vitro* zu untersuchen, um Unterschiede im Expressionsstatus nach erfolgter Chemotherapie zu identifizieren, welche Einfluss auf die Wirksamkeit einer potentiellen begleitenden Antikörpertherapie haben könnten.
4. Das Invasionsverhalten von Mammakarzinomzellen *in vitro* unter dem Einfluss von Chemotherapie anhand eines neuen dreidimensionalen Tumorzellsphäroid-Modells zu erheben, um Aussagen über eine mögliche Änderung der Invasivität von Tumorzellen nach Chemotherapie treffen zu können, die mit konventionellen zweidimensionalen Modellen *in vitro* nicht möglich sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden werden alle verwendeten Geräte, Utensilien, Chemikalien und deren Hersteller aufgeführt.

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller	Standort des Herstellers
Absorptionsfilter (Inhalationsnarkose) VaporGuard	VetEquip	Livermore, CA, USA
Autoklav HST 32/25	Zirbus	Burladingen, Deutschland
Blotting Chamber Criterion Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Cytospin Shandon 4	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Elektrophorese E734 Stromversorgung	Consort	Ottawa, Ontario, Kanada
Fluoreszenz-Imager ImageQuant LAS 4000 mini	GE Healthcare	Chalfont St Giles, Vereinigtes Königreich
Fluoreszenz-Mikroskop Leica DM1000	Leica	Wetzlar, Deutschland
Formalin Dispenser	Brand	Wertheim, Deutschland
Gel Documentation BDA Digital	Biometra	Göttingen, Deutschland
Gelelektrophorese-Kammer Compact M Horizontal	Biometra	Göttingen, Deutschland
Inkubator BBD6220	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
IVIS Spectrum IVISSPE	PerkinElmer	Waltham, MA, USA
Kamera AxioCam Erc 5s (Mikroskop Zellkultur)	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Kamera Leica DC 100 (Mikroskop Labor)	Leica	Wetzlar, Deutschland
Kamera Leica DFC 350 FX (Fluoreszenzmikroskop)	Leica	Wetzlar, Deutschland
Kleintierwaage CP4235	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Kryostat CM 1950	Leica	Wetzlar, Deutschland

Laborschüttler Rocky	Schütt Labortechnik	Göttingen, Deutschland
Magnetrührer RH Basic	IKA Labortechnik	Staufen, Deutschland
Microm HM340E	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Mikroskop (Labor) Axioskop 2	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Mikroskop (Zellkultur) Zeiss Primo Vert	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Multipette plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Narkose-Einheit XGI-8 Gas-Anaesthesia System	PerkinElmer	Waltham, MA, USA
Optix MX2	GE Healthcare	Chalfont St Giles, Vereinigtes Königreich
Photometer Tristar LB 941	Berthold Technologies	Gütersloh, Deutschland
Pipetus	Hirschmann	Eberstadt, Deutschland
Reinstwassersystem Milli-Q Direct	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
Schüttelwasserbad GFL 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH	Burgwedel, Deutschland
Spectrophotometer NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
SterilGARD Hood Class 2 Type A/B3	The Baker Company, Inc.	Sanford, ME, USA
Thermocycler T3000	Biometra	Göttingen, Deutschland
Wärmeplatte OTS 40	Medite	Burgdorf, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Multifuge	Thermo	Waltham, MA, USA
Zählkammer Neubauer-Kammer	LO – Laboroptik	Lancing, Vereinigtes Königreich

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Augensalbe Bepanthen	Bayer AG	Leverkusen, Deutschland
Blotting Marker Glow Writer	Diversified Biotech	West Chester, PA, USA
Facs-Tubes (5ml)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Flexiperms	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Isofluran Forene B506	AbbVie	Ludwigshafen, Deutschland
Kanülen Sterican 0,45 x 12 mm	Braun	Kronberg im Taunus, Deutschland
KryoTube Vials (1,5 ml)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Mikroreaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplatten Falcon Corning	Omnilab	Bremen, Deutschland
Multipettenspitzen, steril (1;5 ml)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Mundschutz	Farstar Medical	Barsbüttel, Deutschland
Nitrozellulose Amersham Protran Blotting Membran	GE Healthcare	Chalfont St Giles, Vereinigtes Königreich
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Pipetten (0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen SafeSeal SurPhob	Biozym	Wien, Österreich
Pipetten, serologisch (5;10;25;50 ml)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen (25; 75; 175 ml)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

3-Amino-9-Ethylcarbazol	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
5-Fluoruracil	Medac	Wedel, Deutschland
Aceton	Th. Geyer	Renningen, Deutschland
Acrylamid/Bisacrylamid 30%	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Agarose	peqlab	Erlangen, Deutschland

Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Antikörper-Diluent	Dako	Hamburg, Deutschland
Aquatex	Merck	Darmstadt, Deutschland
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Coomassie Brillant Blue	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Cyclophosphamid	Endoxan	Baxter, IL, USA
Dapi	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Depex Mounting Medium	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Doxorubicin	CellPharma	Hannover, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
EDTA	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Eosin	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
FBS	Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
Gel Red Nucleic Acid	Biotium	Hayward, CA, USA
Glutamin	Merck	Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Merck	Darmstadt, Deutschland
Glycin	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Hämalaun	Merck	Darmstadt, Deutschland
Insulin	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Isopropanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kodan Tinktur Forte	Schülke & Mayr GmbH	Norderstedt, Deutschland
Luminata Forte HRP	Merck	Darmstadt, Deutschland
Lysepuffer NP40	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA

Meliseptol	Braun	Kronberg im Taunus, Deutschland
Metamizol	Zentiva	Frankfurt, Deutschland
Methanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Merck	Darmstadt, Deutschland
Mowiol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge	Merck	Darmstadt, Deutschland
Paraffin	Süsse	Guxhagen, Deutschland
PBS	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Phosphatase-Inhibitor	Sigma- Aldrich	St. Louis, MO, USA
Ponceau-S	Sigma- Aldrich	St. Louis, MO, USA
Protease-Inhibitor	Roche	Basel, Schweiz
Re-Blot Plus Mild	Merck	Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	Merck	Darmstadt, Deutschland
Sea Block	Dako	Hamburg, Deutschland
SDS	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Target Retrieval Solution (pH6; pH9)	Dako	Hamburg, Deutschland
Temed	Sigma- Aldrich	St. Louis, MO, USA
Tris	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Sigma- Aldrich	St. Louis, MO, USA
Xylol	Merck	Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Kits

BCA-Test	Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Proliferations-Assay	Cell Titer AQueous One 96	Promega, Mannheim, Deutschland
RNA-Extraktion	RNeasy Micro Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande

RT-PCR-Kit	OneStep RT-PCR	Qiagen, Venlo, Niederlande
Sphäroid-Assay	Cultrex 96 Well 3D BME Cell Invasion Assay	Trevigen, Gaithersburg, MD, USA

2.1.5 Längenstandards

DNA	1 kb DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Protein	Rainbow Marker	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Vereinigtes Königreich
	Magic Marker	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.6 Software

Software	Anwendungsgebiet
Adobe Photoshop C2 Adobe, Mountain View, CA, USA	Bildbearbeitung
BioDocAnalyse Analytik-Jena, Jena, Deutschland	Gel-Dokumentation
Image J National Institute of Health, Bethesda, MD, USA	Bildanalyse
Leica Application Suite Advanced Fluorescence Leica, Wetzlar, Deutschland	Bilddokumentation (Fluoreszenzmikroskopie)
Optiview GE Healthcare, Chalfont St Giles, Vereinigtes Königreich	Optix MX2 Auswertung
Microsoft Excel 2007 Microsoft, Redmond, WA, USA	Statistik
Mikrowin 2000 Mikrotek Laborsysteme, Overath, Deutschland	Photometer-Anwendungssoftware
Prism 6 GraphPad, La Jolla, CA, USA	Statistik
Zen 2012 (blue edition) Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	Bilddokumentation (Zellkultur)

2.1.7 Primärantikörper

Antikörper	Eigenschaften	Quelle
Anti-CD44-Cy5.5	Maus, monoklonal	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-CD44-Vio680	Maus, monoklonal	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-CTHRC1 (ungekoppelt)	Kaninchen, polyklonal	Abcam, Milton, Vereinigtes Königreich
Anti-EpCAM (ungekoppelt)	Maus Isotyp IgG1, Klon HEA-125, monoklonal	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-EpCAM (ungekoppelt)	Maus Isotyp IgG1, Klon 323- A3, monoklonal	Abcam, Milton, Vereinigtes Königreich
Anti-EpCAM-Cy5.5	Maus Isotyp IgG1, Klon HEA-125, monoklonal	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-EpCAM-Vio680	Maus Isotyp IgG1, Klon HEA-125, monoklonal	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-Lox (ungekoppelt)	Maus, monoklonal	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-Lox (ungekoppelt)	Maus Isotyp IgG2 _a monoklonal	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
Anti-Lox-Cy5.5	Maus, monoklonal	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-Vimentin	Maus, monoklonal, Klon 3B4	Dako, Hamburg, Deutschland

2.1.8 Sekundärantikörper

Antikörper	Eigenschaften	Quelle
Goat-anti-Mouse	HRPO-konjugiert	Bio-Rad Hercules, CA, USA
Goat-anti-Rabbit	HRPO-konjugiert	Nichirei, Tokio, Japan
Protein-G	AlexaFluor-488-konjugiert	LifeTechnologies, Darmstadt, Deutschland
Rabbit-anti-Rat	HRPO-konjugiert, polyklonal	Dako Hamburg, Deutschland

2.1.9 Verwendete Zelllinien

Mammakarzinome:

SkBr3:

Zellen eines humanen invasiv duktales Karzinoms mit epithelialer Morphologie, die in immundefizienten Mäusen in der Lage sind, undifferenzierte Tumore zu erzeugen mit gering invasivem Wachstum. Die Zellen entstammen einem malignen Pleuraerguss, p53-mutiert.

T47D

Zellen eines humanen invasiv duktales Karzinoms mit epithelialer Morphologie, die in immundefizienten Mäusen undifferenzierte Tumore erzeugen mit gering invasivem Wachstum. Die Zellen entstammen einem malignen Pleuraerguss, p53-mutiert.

MCF-7

Zellen eines humanen invasiv duktales Karzinoms mit epithelialer Morphologie, die in immundefizienten Mäusen undifferenzierte Tumore erzeugen mit mäßig invasivem Wachstum. Die Zellen entstammen einem malignen Pleuraerguss, p53-Wildtyp.

MDA-MB-231

Zellen eines humanen invasiv duktales Karzinoms mit epithelialer Morphologie, die in immundefizienten Mäusen undifferenzierte Tumore erzeugen mit stark invasivem Wachstum. Die Zellen entstammen einem malignen Pleuraerguss, p53-mutiert.

BT474

Zellen eines humanen invasiv duktales Karzinoms mit epithelialer Morphologie, die in immundefizienten Mäusen undifferenzierte Tumore erzeugen mit wenig invasivem Wachstum. Die Zellen entstammen einem Primärtumor, p53-mutiert.

Pankreaskarzinome:

BxPC-3

Zellen eines humanen muzinbildenden Adenokarzinom des Pankreas mit epithelialer Morphologie, die in immundefizienten Mäusen undifferenzierte Tumore erzeugen mit mäßig invasivem Wachstum. Die Zellen entstammen einem Primärtumor.

Aspc1

Zellen eines humanen Adenokarzinom des Pankreas, die aus malignem Aszites gewonnen wurden und in immundefizienten Mäusen undifferenzierte Tumoren erzeugen mit invasivem Wachstum. Die Zellen sind in der Lage, unter anderem CEA (karzinoembryonales Antigen) und Muzin zu bilden.

Capan-1

Zellen eines humanen Adenokarzinoms des Pankreas, die aus einer Lebermetastase gewonnen wurden und in immundefizienten Mäusen undifferenzierte Tumore erzeugen mit mäßig invasivem Wachstum. Die Zellen sind in der Lage, Muzin zu bilden.

PancTu-I-CBRL

Zellen eines humanen Adenokarzinoms des Pankreas. Die Zellen wurden mit Click Beetle Red Luciferase (CBRL), einem Luciferin-spaltenden Enzym, transfiziert, mit dem beispielsweise Glühwürmchen Biolumineszenz erzeugen. Dies dient der spezifischen Darstellung von Tumorzellen mit Biolumineszenz-Detektoren wie dem IVIS.

Alle Zellen wurden erworben von American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA. Für vergleichende histologische Schnitte der Pankreaskarzinome wurden ebenfalls Tumoren der Zelllinien Capan-1 und Panc1 (Quelle ebenfalls ATCC) verwendet. Diese Proben wurden mit freundlicher Genehmigung von Mara Saccomano (AG Alves, MPI für experimentelle Medizin, Göttingen) bereitgestellt.

2.1.10 Medien für die Zellkultur

Die für die Kultivierung eukaryotischer Zellen verwendeten Medien wurden käuflich erworben (s.u.) und vor Gebrauch je nach entsprechender Zelllinie mit FBS, Glutamin und/oder Insulin versetzt. Den Medien wurden keine Antibiotika hinzugesetzt, um das Verhalten der Tumorzellen nicht zu beeinflussen. Folgende Medien wurden für die Kultivierung verwendet:

Bezeichnung	Zusammensetzung	Zelllinie
DME-Vollmedium (Lonza, Basel, Schweiz)	10% FBS in DME- Vollmedium 1% L-Glutamin	MCF-7 MDA-MB-231
RPMI (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA)	10% FBS in RPMI 1% L-Glutamin	Aspc1 BxPC-3 PancTu-I-CBRL
	15% FBS in RPMI 1% L-Glutamin 5 mg bovines Insulin (0.2 U/ml)	SKBR3 T47D
	20% FBS in RPMI 1% L-Glutamin 5 mg bovines Insulin (0.2 U/ml)	BT474

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

2.2.1.1 Kultivierung adhärent wachsender Zellen

Die Kultivierung der Mamma- und Pankreastumor-Zelllinien erfolgte im Brutschrank unter standardisierten Bedingungen bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Alle Arbeiten an den Zellen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank mit sterilem Material durchgeführt. Die Zellen wurden als Monolayer-Kulturen in sterilen Kulturflaschen kultiviert und mit entsprechendem Medium und den entsprechenden Zusätzen genährt. In Abhängigkeit von der Zell-spezifischen individuellen Teilungsrate wurden die Zellen etwa 1-2 Mal pro Woche bei etwa 75-90% Konfluenz passagiert und, ebenfalls in Abhängigkeit von der Teilungsrate, im Verhältnis 1:8 (schnelle Teilungsrate), 1:4 (mittlere Teilungsrate) und 1:2 (langsame Teilungsrate) umgesetzt. Um die Zellen zu passagieren, wurde zunächst einmalig mit PBS (*phosphate-buffered saline*) gewaschen, und anschließend wurden die Zellen mit einer 1% EDTA (*Ethylendiamin-tetra-Acetat*) in PBS-Lösung für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Mikroskop geprüft und letzte adhärente Zellverbände durch Klopfen gelöst. Die Zelllösung wurde mit entsprechendem Medium auf 10 ml aufgefüllt und in 15 ml Falcons überführt, die bei 800 x g und 19°C für 5 Minuten zentrifugiert wurden. Anschließend wurde der Überstand bis auf das Zellpellett abgesaugt, die Zellen wurden resuspendiert und im gewünschten Verhältnis in neue Kulturflaschen umgesetzt.

2.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryovials auf Eis zur Zellkultur transportiert und anschließend im Schüttelwasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut, um die Zellen nicht länger als nötig dem Einfriermedium (10% DMSO in FBS) auszusetzen. Die Zellsuspension wurde mit 10 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen, mit 800 x g bei 19 °C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand bis auf das Pellett abgesaugt. Die Zellen wurden im gewünschten Volumen des entsprechenden Mediums aufgenommen und in Kulturflaschen überführt. Zellen mit niedriger Passagezahl (maximal vierte Passage) wurden nach Kultivierung wieder eingefroren. Dazu wurde das Medium vollständig abgesaugt, die Flasche mit PBS gespült und die Zellen mit 1% EDTA in PBS bei 37 °C für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert, um sie abzulösen. Anschließend wurde das Volumen mit Medium auf

10 ml aufgefüllt und die Suspension bei 800 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellett mit 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert, in Kryovials überführt und in einem Isopropan-isolierten Behälter auf -80 °C gekühlt und dann kurzfristig bei – 80 °C oder langfristig bei – 150 °C gelagert.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer. Zwischen Zählkammer und einem Deckglas befindet sich ein definiertes Volumen einer Zellsuspension, mit dem die Gesamtzellzahl errechnet werden kann. Zunächst wurde das Medium aus den Kulturflaschen abgesaugt, die Zellen einmalig mit PBS gespült und anschließend mit 1% EDTA in PBS bei 37 °C für 10 Minuten im Brutschrank abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit entsprechendem Medium auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt und sofort wurde mit einer Pipette ein definiertes Volumen entnommen und zwischen Deckglas und Zählkammer gegeben. Die Kammer besteht aus neun Quadraten, die jeweils 1 mm² groß sind. Bei einer Tiefe von 0,1 mm ergibt sich so ein Volumen von 0,1 µl. Die Quadrate in den Ecken der Kammer beinhalten jeweils 16 kleinere Quadrate zum Zählen der Zellen. Es wurde dabei besonders darauf geachtet, dass Zellen, die sich auf den Linien zwischen den kleinen Quadraten befinden, nicht doppelt gezählt wurden. Um das zu gewährleisten, wurden pro Quadrat nur die Linien links und unten vom Betrachter aus mit in die Zählung einbezogen. Alle vier Eckquadrate wurden ausgezählt und die Gesamtzahl durch vier dividiert, um ein möglichst valides Zählergebnis zu erhalten. Anschließend wurde die Zahl mit 10⁴ multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu ermitteln.

2.2.1.4 Erstellung von Trockenpelletts in Zellkultur (für Protein- und RNA-Extraktion)

Das Medium wurde vollständig abgesaugt, die Kulturflasche mit PBS gespült und die Zellen mit 1% EDTA in PBS bei 37 °C für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert, um sie abzulösen. Die Suspension wurde mit PBS auf 10 ml aufgefüllt und bei 800 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Die folgenden Arbeiten erfolgten auf Eis. Der Überstand wurde vollständig bis auf das Pellett abgesaugt und die Pelletts in Eppendorf Cups bei – 80 °C gelagert.

2.2.1.5 Präparation von Zellen für tierexperimentelle Arbeiten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane Mamma- und Pankreaskarzinomzellen orthotop oder subkutan in immundefiziente Nacktmäuse implantiert. Die zur Implantation vorgesehenen Zellen wurden, wie unter 2.2.1.1 beschrieben, kultiviert und einen Tag vor Implantation verdünnt ausgesät, um ein exponentielles Wachstum bei Implantation zu gewährleisten. Am Tag der Implantation wurden die Zellen, wie bereits beschrieben, mit 1% EDTA in PBS abgelöst und die Zellzahl, wie unter 2.2.1.3 beschrieben, bestimmt. Die erforderliche Zellzahl wurde resuspendiert und in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, bei 800 x g und 19 °C für 5 Minuten zentrifugiert, und der Überstand wurde bis auf das Pellett entfernt. Die Zellen wurden in einem definierten Volumen von sterilem PBS aufgenommen und innerhalb von 30 Minuten mittels Injektion implantiert.

2.2.1.6 Aussähen von Zellen auf Objektträger mittels Flexiperms

Die Flexiperms wurden jeweils 15 Minuten in zunächst 70% Ethanol, 100% Ethanol und zuletzt destilliertem Wasser sterilisiert. Das Medium wurde vollständig abgesaugt und die Kulturflaschen einmalig mit PBS gespült. Die Zellen wurden mit 1% EDTA in PBS bei 37 °C für 10 Minuten im Brutschrank abgelöst, mit entsprechendem Medium auf 10ml Volumen aufgefüllt, und wie unter 2.2.1.3 beschrieben, gezählt. Anschließend wurde bei 800 x g und 19 °C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand bis auf das Pellett abgesaugt. Die Zellen wurden mit einem definierten Volumen resuspendiert, sodass 10^6 Zellen pro ml Suspension vorlagen. Die Objektträger wurden in sterilen Petrischalen platziert, und die sterilen Flexiperms wurden durch Druck mit einer Pinzette luftdicht auf den Objektträgern platziert. Sowohl die Petrischale als auch die Objektträger wurden mit Zellart und Zellzahl sowie den für etwaige Färbungen (siehe 2.2.1.7) verwendeten NIRF-Proben beschriftet. Pro Kammer der Flexiperms wurden 250 μ l Medium für die entsprechenden Zellen vorgelegt. Es wurden pro Kammer 10^5 Zellen (entspricht 100 μ l der Zellsuspension) ausgesät. Der gesamte Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C im Brutschrank gelagert, um ein Anhaften der Zellen auf den Objektträgern zu gewährleisten. Für jedes Experiment wurde ein Schema angefertigt, in dem eingesehen werden konnte, in welcher Kammer sich welche Zellen bzw. welche NIRF-Proben befanden.

2.2.1.7 Färbung der in Flexiperms ausgesähten Zellen mittels Fluorophor-gekoppelter Antikörper

Die mittels Flexiperms auf Objektträgern ausgesähten und adhärent angewachsenen Zellen (siehe 2.2.1.6) wurden mit NIRF-Proben angefärbt. Nach einem vorher definierten Schema wurden die Kammern der Flexiperms in Gruppen eingeteilt. Diese bestanden aus den NIRF-Proben, einer Kontrollgruppe, der nur Medium und keinerlei Antikörper zugesetzt wurde und einer Kontrollgruppe, der IgG-Vio747 zugesetzt wurde, um etwaige unspezifische Bindungen zu erkennen. Die Arbeit mit NIRF-Proben erfolgte stets verdunkelt. Dazu wurde zunächst das Medium vollständig aus den Kammern der Flexiperms abgesaugt. Um nicht versehentlich die Zellen mit zu entfernen, wurden die Objektträger leicht gekippt und die Glaspipette zum Absaugen in den untersten Rand der Kammer gehalten, ohne mit ihr den Boden zu berühren. Die NIRF-Proben wurden auf 5 µg/ml in Medium verdünnt und zu den entsprechenden Gruppen gegeben. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde das Medium vollständig abgesaugt und die Kammern wurden dreimalig mit PBS gewaschen. Die Flexiperms wurden vorsichtig mit einer Pinzette von den Objektträgern gelöst. Die Objektträger wurden mit 100µl/Objektträger Mowiol, welches mit 2 mg/ml DAPI (1,6µl Dapi/ml Mowiol) versetzt wurde, eingedeckelt. Luftblasen zwischen Objektträger und Deckglas wurden durch vorsichtiges Drücken mit einer Pinzette entfernt. Die Objektträger wurden bei 4 °C und verdunkelt gelagert. Die optische Begutachtung der Färbung erfolgte mit dem Leica DM1000 Fluoreszenzmikroskop. Fotografisch festgehalten wurden die Ergebnisse mit der aufmontierten Leica DFC 350 FX Kamera. Die Arbeit erfolgte stets verdunkelt. Der Farbstoff DAPI, der zum Anfärben der Zellkerne genutzt wurde, besitzt ein Emissionssmaximum bei kurzer Wellenlänge (461 nm, blau). Das ermöglicht eine gleichzeitige Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen, die im langwelligen Bereich emittieren, ohne dass es zu Signalüberschneidungen kommt. Eingesetzt wurden hierfür Cy5.5- und Vio680-gekoppelte Antikörper. Um Hintergrundrauschen zu eliminieren, wurde für Dapi ein Schwellenwert BG (background) 100 und für alle anderen Farbstoffe ein Schwellenwert BG 250 festgesetzt. Generell wurde darauf geachtet, das Signal so rein wie möglich zu belassen, jedoch musste, abhängig von der Stärke des Signals, in gewissem Maße mit Signalverstärkung (Binning und Gain) gearbeitet werden. Binning fasst mehrere signalarme Bildpunkte zu einem signalstärkeren Pixel zusammen. Dadurch ändert sich die Auflösung des Bildes und die durch Binning optimierte Sequenz erscheint unschärfer. Gain verstärkt das Signal, indem die Sensitivität der optischen Detektoren erhöht wird. Die Bildqualität

wird dadurch im Normalfall nicht beeinträchtigt. Es wurde besonders darauf geachtet, für alle Proben einer Versuchsreihe die gleichen Einstellungen (Background, Gain, Binning, Belichtungszeit) zu wählen, um eine optimale Vergleichbarkeit der Proben untereinander zu gewährleisten. Bei allen in dieser Arbeit gezeigten Bildern, die mit dieser Technik aufgenommen wurden, werden jeweils diese Einstellungen angegeben.

2.2.1.8 Tumorzell-Proliferationsassay (2-dimensional) mit Promega Cell Titer Aqueous One 96 unter Einfluss von Chemotherapie nach CAF-Schema

Für die Bestimmung des Proliferationsverhaltens der Tumorzellen unter Einfluss von Chemotherapie wurden drei geeignete Zelllinien ausgewählt: MDA-MB-231, MCF-7 und BT474 (alle Zelllinien entstammen Mammakarzinomen). Die Wahl fiel auf exakt diese drei Zelllinien, da es sich bei MDA-MB-231 um eine schnell und invasiv wachsende, bei MCF-7 um eine wenig invasive und bei BT474 um eine nicht-invasive Zelllinie handelt und so Unterschiede im Verhalten der Mammakarzinomzellen unter Chemotherapie antizipiert werden konnten. Innerhalb jeder Zelllinie wurden Wells Gruppen zugeteilt. Eine Gruppe erhielt keinerlei Chemotherapie und wurde als Kontrolle verwendet. Eine Gruppe erhielt über 72 Stunden, eine über 48 Stunden und eine über 24 Stunden Chemotherapie. Die Chemotherapie bestand aus Cyclophosphamid (2 µg/Well), Adriamycin (0,2 µg/Well) und 5-Fluoruracil (1 µg/Well). Die Zellen wurden am ersten Tag des Experiments in eine flat-bottom-96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Dazu wurde das Medium vollständig abgesaugt, die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und anschließend mit 1% EDTA in PBS bei 37 °C für 10 Minuten im Brutschrank abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit Medium auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt und die Zellen wurden gezählt. Die Zielzellzahl pro Well wurde auf 10000 Zellen festgelegt. Pro Well der Mikrotiterplatte wurden 250 µl des entsprechenden Mediums vorgelegt und die 10000 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank gelagert, um adhärent an den Boden der Mikrotiterplatte anwachsen zu können. Am zweiten Tag erhielt die 72-Stunden-Gruppe die Chemotherapie gemäß CAF-Schema. Am dritten Tag wurde ein Mediumwechsel in allen Wells durchgeführt, die keine Chemotherapie erhalten hatten (d. h. Kontrolle, 48-Stunden-Gruppe und 24-Stunden-Gruppe, nicht die 72-Stunden-Gruppe). Anschließend erhielt die 48-Stunden-Gruppe die Chemotherapie, und am vierten Tag erhielt letztlich die 24-Stunden-Gruppe die Chemotherapie. Am fünften Tag konnte die Proliferationsaktivität aller Zellen in allen Wells gleichzeitig bestimmt werden. Dazu wurde das Proliferationsassay Cell Titer Aqueous One 96 von Promega verwendet. Das Kit misst die Proliferationsaktivität lebender

Zellen durch Reduktion von [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] (MTS) zu einem chromogenen Formazan. Das Medium mit Chemotherapie und das Medium der Kontrollgruppe wurde vollständig abgesaugt und durch 100 µl/Well frisches Medium ersetzt. 20 µl des Cell Titer Aqueous One 96 Reagenz wurden pro Well hinzugesetzt. Dabei wurde stets verdunkelt gearbeitet, um ein vorzeitiges Ausbleichen des Farbstoffs zu verhindern. Die Mikrotiterplatte wurde für 2 Stunden bei 37 °C im Brutschrank mit dem Cell Titer Aqueous One 96 Reagenz inkubiert, und anschließend wurde die Extinktion in einem Photometer bei 490 nm bestimmt, um Rückschlüsse auf das Proliferationsverhalten der Zellen zu erhalten. Die Daten wurden statistisch mit GraphPad Prism 6 ausgewertet.

2.2.1.9 Präparation von Zellen für die Lichtmikroskopie mittels Cytospin

Zellen des zuvor beschriebenen Tumorzell-Proliferationsassay, die nicht mit dem Promega Cell Titer Aqueous One 96 untersucht wurden, wurden mithilfe der Cytospin-Technik auf Objektträger transferriert, um in einem Folgeversuch mit Antikörpern gefärbt zu werden. Dazu wurde den Zellen 20 µl/Well 1% EDTA in PBS hinzugefügt und für 10 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl PBS in die Wells gegeben und die Zellen in sterile Eppendorf-Mikroreaktionsgefäße überführt. Dabei wurde pro Well ein Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß verwendet. Diese wurden bei 800 x g und 19 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Da die Zellen sedimentiert am Boden der Gefäße vorlagen, konnte der Überstand vorsichtig dekantiert werden. Die Zellen wurden mit 100 µl PBS resuspendiert.

Die Cytospins erfolgten mit der Shandon 4 Cytospin Zentrifuge. Dazu wurden Objektträger mit dem Namen der Zelllinie und ihrer Zugehörigkeit zu einer vorher festgelegten Untergruppe beschriftet. Die Objektträger wurden in die Metall-Halterungen eingefasst, sodass die Beschriftung nach außen, also von der Klammer weg, zeigte. Über den Objektträgern wurde jeweils ein Filterpapier platziert. Darüber wurde letztlich der Trichter platziert und die Klammer der Halterung fest verschlossen. Es wurde besonders darauf geachtet, dass alle Einzelteile deckungsgleich am unteren Ende der Halterung lagen, sodass die Zellsuspension nicht auslaufen konnte. Die Halterungen wurden in der Zentrifuge platziert, sodass die Trichter nach oben zeigten und mit der Zellsuspension aus den Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen befüllt werden konnten. Es wurde bei 800 x g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Objektträger aus den

Halterungen entfernt und über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf den Objektträgern mit -20 °C kaltem Aceton für 10 Minuten fixiert. Die Objektträger wurden bis zur Verwendung in Folgeversuchen bei -20 °C gelagert.

2.2.1.10 Tumorzell-Invasionsassay (3-dimensional) mit Cultrex 96 Well Spheroid BME Cell Invasion Assay unter Einfluss von Chemotherapie nach CAF-Schema

Es wurde das Cultrex 96 Well Spheroid BME Cell Invasion Assay verwendet. Das Kit enthält eine round-bottom-96-Well-Mikrotiterplatte, ein Reagenz zur Formation von Zell-Sphäroiden (10x Spheroid Formation ECM) und eine Invasionsmatrix. Das Kit wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Zunächst werden Zellen in der Spheroid Formation ECM in der 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Anschließend formieren sich die Zellen zu einem dreidimensionalen Sphäroid. Das Sphäroid wird dann von der Invasionsmatrix eingeschlossen, und die Zellen werden durch Attractants (FBS in Medium) zur Invasion durch die Matrix angeregt. Die Zelllinien wurden in Untergruppen eingeteilt. Es wurden zwei Kontrollgruppen und drei Versuchsgruppen festgelegt: Die Kontrollgruppen erhielten allesamt keine Chemotherapie. Die erste Kontrollgruppe erhielt Attractants (Medium und FBS), aber keine Invasionsmatrix. Die zweite Kontrollgruppe erhielt sowohl Attractants als auch Invasionsmatrix. Die Versuchsgruppen erhielten allesamt Chemotherapie nach CAF-Schema. Die Chemotherapie bestand aus Cyclophosphamid ($2\text{ }\mu\text{g/Well}$), Doxorubicin (= Adriamycin, $0,2\text{ }\mu\text{g/Well}$) und 5-Fluoruracil ($1\text{ }\mu\text{g/Well}$), wie unter 2.2.1.8. Die erste Versuchsgruppe stand 72 Stunden unter dem Einfluss der Chemotherapie, die zweite 48 Stunden und die dritte 24 Stunden. Die Chemotherapie wurde so verabreicht, dass die Zeitintervalle gemeinsam am letzten Tag beendet wurden. Es wurde wie folgt vorgegangen: Zunächst wurde die 10x Spheroid Formation ECM über Nacht bei 4 °C auf Eis aufgetaut. Am Vorbereitungstag (Tag 0) wurde das Medium aus den Kulturflaschen der verwendeten Zellen vollständig abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und mit 1% EDTA in PBS für 10 Minuten bei 37 °C im Brutschrank abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit Medium auf 10 ml Volumen aufgefüllt, die Zellen gezählt und anschließend bei $800 \times g$ und 19 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden so mit Medium resuspendiert, dass eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml vorlag. Pro Well wurden 5000 Zellen ausgesät, d. h. $5\text{ }\mu\text{l}$ der Zellsuspension wurden pro Well verwendet. Für jede Zelllinie wurde ein Gemisch aus der Spheroid Formation ECM, der Zellsuspension und dem entsprechenden Medium erstellt:

Reagenz	Volumen pro Well
10x Spheroid Formation ECM	5 μ l
Medium	$45\mu\text{l} - X = 45\mu\text{l} - 5\mu\text{l} = 40\mu\text{l}$
Zellsuspension	$X = 5 \mu\text{l}$
Total	50 μ l

Die gewünschte Menge wurde in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen gemischt und mittels Vortex verrührt. Anschließend wurden jeweils 50 μ l pro Well verteilt. Die Mikrotiterplatte wurde daraufhin bei 300 x g und 19 °C für 3 Minuten zentrifugiert und anschließend über 3 Nächte bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, damit sich die Zellsphäroide bilden konnten. Am dritten Tag wurde die Mikrotiterplatte für 15 Minuten auf Eis gekühlt und die weiteren Arbeiten an diesem Versuchstag wurden ebenfalls auf Eis durchgeführt. Pro Well wurden 50 μ l der Invasionsmatrix (4 °C) blasenfrei hinzugegeben (Ausnahme erste Kontrollgruppe) und zwar so, dass diese oberhalb des Flüssigkeitsspiegels lag. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte bei 300 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert, sodass die Invasionsmatrix in den Wells nach unten und somit um die Sphäroide gedrückt wurde. Ebenfalls noch am dritten Versuchstag wurde Versuchsgruppe 1 die Chemotherapie nach CAF-Schema verabreicht. An Versuchstag 4 erhielt Versuchsgruppe 2 und an Versuchstag 5 erhielt Versuchsgruppe 3 die Chemotherapie nach CAF-Schema. Das Wachsen der Sphäroide und der Einfluss der Chemotherapie wurden an den Versuchstagen 3 (vor Hinzufügen der Invasionsmatrix und des Mediums mit bzw. ohne chemoattractants), 4, 5 und 6 fotografisch festgehalten. Die Auswertung der Bilder erfolgte mittels ImageJ.

2.2.2 Methoden zur Gewinnung und Vervielfältigung von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Die gewonnenen Zellpelletts wurden weiter für die Extraktion von Gesamt-RNA und Gesamt-Protein verwendet. Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde das Rneasy Micro Kit von Qiagen, sowie ausschließlich Pipettenspitzen mit Filter verwendet. Die Zellen (maximal 1×10^7) wurden mit 350 μ l Puffer RLT, der pro ml 10 μ l beta-Mercaptoethanol enthielt, mechanisch mithilfe einer sterilen Injektionsnadel auf einer 1 ml Spritze homogenisiert. Das Lysat wurde auf QiaShredder-Columns gegeben und bei 10.000 x g und 10 °C kurzzeitig zentrifugiert. Die QiaShredder-Column wurde verworfen und der Durchfluss wurde auf gDNA-Eliminator-Columns gegeben, die bei 10.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert

wurden. Erneut wurde die Column verworfen und dem Durchfluss wurden nun jeweils 350µl RNase-freier 70% Ethanol zugesetzt. Die Suspension wurde auf Rneasy-Spin-Columns gegeben und für 15 Sekunden bei 10.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen und der Column wurden 700µl (Verhältnis zu Probe 1:1) Puffer RW1 hinzugesetzt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde wieder der Durchfluss verworfen und der Probe wurden 500µl RPE-Puffer hinzugesetzt. Wieder wurde zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Columns wurden nun in 2 ml Collection Tubes platziert und für 5 Minuten bei 13.000 x g und Raumtemperatur mit geöffnetem Deckel trocken zentrifugiert. Zur Elution der RNA wurden die Columns in 1,5 ml Collection Tubes platziert und die Membran der Columns wurde mit 14 µl Rnase-freiem Wasser benetzt. Es wurde für eine Minute bei 13.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend wie zuvor 8 µl Rnase-freies Wasser hinzugegeben. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Proben sofort auf Eis platziert und nach dem Messen der RNA-Konzentration (siehe unten) kurzzeitig bei – 20 °C und längerfristig bei –80 °C gelagert.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mithilfe des Photometers NanoDrop. Nach Bestimmung der Nullwerte durch eine Probe destillierten Wassers wurde das Absorptionsmaximum der gemessenen Nukleinsäuren (bei 260 nm) bestimmt und gleichzeitig etwaige Verunreinigungen durch Proteine (bei 280 nm) und/oder Salze (bei 230 nm) detektiert. Zur Berechnung der Nukleinsäurekonzentration wurde folgende Formel verwendet:

$$C [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (E_{260} - E_{320}) \times f \times c$$

E = Extinktion

f = Verdünnungsfaktor

c = nukleinsäurespezifischer Koeffizient (für RNA c = 0.04 µg/µl)

Der Quotient E_{260}/E_{280} ist ein Maß für die Reinheit der RNA und sollte etwa 2.0 ± 0.2 betragen.

2.2.2.3 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Die isolierte RNA aus den kultivierten Tumorzelllinien wurde in der RT-PCR weiter genutzt. Die Arbeiten erfolgten stets auf Eis und alle Proben wurde vor Versuchsbeginn langsam bei

4 °C auf Eis aufgetaut. Für die RT-PCRs wurden das Qiagen OneStep Kit verwendet. Alle eingesetzten Materialien waren frei von Rnase. Gemäß dem Protokoll des OneStep Kits wurde ein Reaktionsansatz erstellt:

80 µl Rnase/Dnase-freies H₂O

30 µl Puffer (5x)

3 µl dNTPs (10 mM)

3 µl Rnase Out

9 µl Primer (sense, 10 pmol/µl)

9 µl Primer (antisense, 10 pmol/µl)

6 µl Enzym-Mix (Taq-Polymerase)

Jeweils 14 µl dieses Reaktionsansatzes wurde in sterile Eppendorf-Mikroreaktionsgefäße gegeben. Je 1 µl der entsprechenden RNA (etwa 1 µg/µl) wurde hinzugefügt sowie eine Kontrollprobe mit 1 µl H₂O statt RNA. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 50 °C erfolgte eine einmalige Denaturierung bei 95 °C für 15 Minuten. Je nach Protokoll wurde der folgende Zyklus 30 – 35 mal durchlaufen:

Denaturierung 30 Sekunden bei 94 °C

Anlagerung 30 Sekunden bei 54 °C (HPRT), 58 °C (EpCAM) oder 66 °C (Lox)

Synthese 60 Sekunden bei 72 °C

Das Reaktionsprogramm wurde zur Vervollständigung der Doppelstrangsynthese mit einer letzten Inkubation bei 72 °C für 10 Minuten beendet. Die Reaktion wurde mit jeweils 3 µl 6x PP-Puffer, der Ficoll, Tris-EDTA und Bromphenolblau enthielt, gestoppt. Die RT-PCR-Produkte konnten anschließend auf ein 1-2 %-iges Agarosegel aufgetragen und anhand ihrer Fragmentgröße identifiziert werden.

2.2.2.4 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen

Zur optischen Begutachtung wurden die RT-PCR-Produkte auf ein 1-2 %-iges Agarosegel (1-2 g Agarose in 0,5x TBE-Puffer versetzt mit 10 µl GelRed) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V über einen Zeitraum von 60-90 Minuten durchgeführt. Zur Beurteilung der Bandengröße wurde ein DNA-Längenstandard von 1 kb verwendet. Anschließend wurden die Banden unter UV-Licht (Standard Transilluminator bei 302 nm oder 312 nm) sichtbar gemacht und fotografisch als nativ, schwarz-weiß und schwarz-weiß-invert festgehalten.

TBE-Puffer (5x) 54 g Tris
 27,5 g Borsäure
 20 ml EDTA (0,5 M, pH 8)
 auf ein Volumen von 1 l auffüllen mit H₂O bidest.

2.2.3 Proteinanalytische-Methoden

2.2.3.1 Isolierung von Gesamt-Protein aus Zellen

Die, wie unter 2.2.1.4 beschrieben, gewonnenen Zellpelletts wurden ebenfalls zur Isolierung von Gesamt-Protein verwendet. Zur Lyse der Zellen wurde den Pelletts 200-300 µl Lysepuffer zugesetzt.

Lysepuffer 5 ml Cell Lysis Buffer NP40
 ½ Tablette Protease-Inhibitor
 50 µl Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2

Die Zellpelletts wurden 30 Minuten lang bei 4 °C auf Eis mit dem Lysepuffer inkubiert und alle 10 Minuten mittels Vortex durchmischt. Anschließend wurde die Suspension in sterile Eppendorf-Mikroreaktionsgefäße überführt und bei 13.000 x g und 4 °C für 16 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in sterile Eppendorf-Mikroreaktionsgefäße transferriert und bei – 80 °C gelagert.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Bicinchoninsäure-Test mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Als Standard-Eichgerade diente die Absorption von 20 – 2000 µg/ml BSA (2 mg/ml). Die Proben wurden 1:5 mit destilliertem H₂O verdünnt. Das Working Reagent des Pierce Kits wurde gemäß den Herstellerangaben erstellt: 1 Teil Reagent B + 49 Teile Reagent A. Pro Well der Mikrotiterplatte wurden 200 µl des Working Reagents hinzugefügt und für 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Messung erfolgte photometrisch mit dem Tristar LB 941 (Berthold Technologies) bei einer Absorption von 590 nm. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Mikrowin 2000 und Microsoft Excel.

2.2.3.2 Western-Blot-Analyse

Trenngel (10%)		Sammelgel (5%)	
Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	4 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	0,83 ml
Trenngelpuffer	3 ml	Sammelgelpuffer	1,25 ml
H ₂ O bidest.	4,93 ml	H ₂ O bidest.	2,892 ml
Ammoniumpersulfat	48 µl	Ammoniumpersulfat	20 µl
TEMED	15,6 µl	TEMED	8 µl
Trenngelpuffer	Tris Base (1,5 M) 0,2% SDS auffüllen mit H ₂ O bidest. Auf 250 ml mit HCL auf pH 8,8 titrieren		
Sammelgelpuffer	Tris Säure (1,5 M) 0,2% SDS auffüllen mit H ₂ O bidest. Auf 250 ml mit NaOH auf pH 6,8 titrieren		
TBST (10x)	Tris Base (20 mM) NaCl (150 mM) 0,1% Tween 20 mit HCL auf pH 7,6 titrieren auffüllen mit H ₂ O bidest. Auf 1000 ml		
Transferpuffer (10x)	Tris Base (250 mM) Glycin (1,92 M) 0,1 % SDS 15% Methanol auffüllen mit H ₂ O bidest. Auf 1000 ml		
Elektrophoresepuffer (10x)	Tris Base (500 mM) Glycin (1,92 M) 0,1 % SDS mit HCL auf pH 8,3 titrieren auffüllen mit H ₂ O bidest. Auf 1000 ml		

Die Gelelektrophorese der gewonnenen Proteine erfolgte in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel unter Verwendung der Gelelektrophorese-Apparatur Criterion Vertical (Bio-Rad, CA, USA). Das Trenngel wurde während der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet, welches anschließend sorgfältig mit Aqua bidest entfernt wurde. Das Sammelgel wurde darüber gegossen und die Kämme blasenfrei eingesteckt. Die Gele wurden bis zur vollständigen Aushärtung mit Frischhaltefolie umwickelt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Proteinlysate wurden im Verhältnis 1:1 mit 2x Laemmli-Puffer versetzt und bei 96 °C für 5 Minuten denaturiert.

Laemmli-Puffer (2x)

Tris Säure (100 mM)

10% Beta-Mercaptoethanol

4% SDS

20% Glycerol

0,05% Bromphenolblau

Nun wurde das Gel mit den Proben beladen, indem ein Proteinlysate (30 µg) pro Tasche aufgetragen wurde. Zum späteren Vergleich der Banden wurden Protein-Molekulargewichtsstandards (7,5 µl Rainbow Marker, 1 µl Magic Marker) mitgeführt. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 120 V und einer Stromstärke von 40 mA über einen Zeitraum von etwa 90-120 Minuten. Dabei wurde die gesamte Apparatur in einer Styropor-Box auf Eis gekühlt. Sobald die Bromphenolblau-Bande das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde der Gellauf beendet. Der Transfer der Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte mittels Nass-Blot-Verfahren in einer Criterion Blotkammer. Dazu wurde zunächst eine Plastikwanne mit gekühltem Transferpuffer gefüllt. Es wurden pro Blot sechs Filterpapiere zurechtgeschnitten. Die Filterpapiere, die Blotting-Rahmen und deren Schwämme sowie die Membran wurden in den Transferpuffer gelegt. Nun wurde die schwarze Seite der Blotting-Rahmen nach unten gedreht, darüber ein Schwamm und darüber drei Filterpapiere gelegt. Auf das nun oberste Filterpapier wurde vorsichtig das Gel aufgebracht. Darüber wurde die Membran gelegt und erneut mit drei Filterpapieren bedeckt. Um etwaige Luftbleinschlüsse zu entfernen, wurde nun vorsichtig mit einer Glaspipette über die Membran gestrichen. Letztlich wurde ein weiterer Schwamm hinzugefügt und der Rahmen geschlossen. Diese wurden mit ihrer schwarzen Seite zur ebenfalls schwarzen Seite der Box (Kathode) in der Blotkammer platziert. Die Kammer wurde mit gekühltem Transferpuffer gefüllt und wie auch die Gelektrophorese-Kammer zuvor in einer Styropor-Box auf Eis gehalten. Der Blot erfolgte bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 300 mA über einen Zeitraum von 180 Minuten. Nach 90 Minuten wurde gekühlter Transferpuffer nachgefüllt, die Kühlkassetten ausgetauscht sowie gegebenenfalls Eis nachgefüllt. Um den Erfolg des Blots nachzuweisen, wurde die Membran reversibel mit Ponceau S gefärbt, fotografiert und anschließend mit Aqua bidest gespült.

Ponceau S

2 g/l Ponceau S in 2% Trichloressigsäure

Die Membran wurde anschließend mit 5 % Skim Milk Powder in TBST für 45 Minuten geblockt. Die jeweiligen Antikörper wurden in 5ml 1% Skim Milk Powder in TBST verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht auf einem Drehspieß. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 15 Minuten in TBST auf dem Kippschüttler gespült. Nun wurde der Sekundärantikörper in 1% Skim Milk Powder in TBST verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde erneut dreimal für 15 Minuten in TBST gewaschen.

Die Detektion erfolgte mit dem ImageQuant LAS 4000 mini. Dazu wurden die sichtbaren Banden seitlich mittels Glow Writer markiert und die Membran mit 600 µl Luminata Forte Western HRP Substrat benetzt. Die Daten wurden in Form von Rohdaten (Precision-Foto, 2 Sekunden Belichtung) und als Fotoreihe (Increment, 20 Sekunden Intervalldauer) festgehalten.

2.2.3.4 FACS-Analyse

Die Zellen wurden mit 1% EDTA in PBS bei 37 °C für 10 Minuten im Brutschrank abgelöst und mit PBS auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt und die Zellzahl bestimmt. Es wurde bei 800 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand bis auf das Pellett abgesaugt und die Zellen mit einem definierten Volumen resuspendiert, sodass 10^6 Zellen pro ml Suspension vorlagen. Pro FACS-Röhrchen wurde eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen gewählt, was einem Volumen von 500 µl Zellsuspension entsprach. Die nicht benötigte Suspension wurde in neue Kulturflaschen überführt und wieder bei 37 °C kultiviert. Die Zellen in den FACS-Röhrchen wurden 60 Minuten auf Eis mit 2% steril filtriertem BSA in PBS blockiert (Mischverhältnis Suspension zu 2% BSA in PBS 1:1). Gleichzeitig wurden die verwendeten Antikörper auf 10 µg/ml in 2% sterilem BSA in PBS verdünnt. Die FACS-Röhrchen wurden anschließend bei 800 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen wurden mit den Primärantikörpern für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Sollte der Primärantikörper direkt an ein Fluorophor gekoppelt sein, so wurden die Zellen lichtundurchlässig abgedeckt. Anschließend wurden die Zellen dreimalig mit PBS gewaschen, dazwischen wurde wie zuvor zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Waren die Primärantikörper nicht direkt an ein Fluorophor gekoppelt, so wurde ein fluoreszenter Sekundärantikörper (Protein G-Alexa488) hinzugefügt und erneut 60 Minuten (verdunkelt) auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen. Letztlich wurden die Zellen mit 350 µl PBS resuspendiert. Die Durchflusszytometrie wurde mit dem

FACS Aria Cell Sorter und FACSDiva Software durchgeführt und mittels FlowJo Software (v.7.6.5) ausgewertet.

2.2.4 Tierexperimentelle Methoden

2.2.4.1 Tiermodell

Weibliche und männliche immunodefiziente (athymische) Nacktmäuse (NMRI-Foxn1^{nu/nu}) wurden zunächst bei Charles River (Sulzfeld, Deutschland) käuflich erworben. Die Zucht der Tiere erfolgte im Tierstall des Universitätsklinikums Göttingen. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Tierversuche sind unter der Tierversuchsnummer 33.9-42502-04-14/1511 eingetragen und genehmigt.

2.2.4.2 Injektion humaner Karzinomzellen in immunodefiziente Nacktmäuse

Die Zellen wurden, wie beschrieben, kultiviert, und gezählt. Pro Injektion erhielten die Tiere eine Zellzahl von ca. 1×10^6 Zellen suspendiert in sterilem PBS. Die Injektion erfolgte entweder orthotop oder subkutan. Mammakarzinomzellen wurden demnach orthotop nur bei Weibchen in die Brustdrüsen transplantiert. Für die Transplantation von Pankreaskarzinomzellen spielte das Geschlecht der Nacktmäuse keine Rolle. Dazu wurden die Mäuse mit einem Gemisch aus Ketamin und Xylazin intraperitoneal narkotisiert. Es wurden pro Gramm Körpergewicht 0,015 mg Xylazin und 0,075 mg Ketamin verabreicht. Die narkotisierten Mäuse wurden in Rückenlage auf einer mit einem sterilen Tuch abgedeckten Wärmeplatte (39 °C) platziert. Die Haut wurde sorgfältig mit Kodan forte desinfiziert.

Zur orthotopen Implantation von Mammakarzinomzellen wurde die Haut über dem rechten, vierten Mamma-Komplex mittels Hautschnitt eröffnet, der Mamma-Komplex vorsichtig frei präpariert und die Zellen injiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen tatsächlich nur an der Injektionsstelle auf Mausgewebe treffen und nicht seitlich auslaufen. Einige humane Mammakarzinomzellen entwickeln sich im Nacktmausmodell besser, wenn zuvor ein Östrogen-Pellet implantiert wurde. Mäuse, denen BT474 injiziert werden sollte, erhielten zwei Wochen vor Injektion der Tumorzellen nuchal subcutan ein Östrogenpellett, um ein besseres Anwachsen der Tumorzellen zu gewährleisten. Die Implantation von Pankreaskarzinomzellen erfolgte per Hautschnitt kaudal des Sternums und anschließender Eröffnung der Peritonealhöhle. Das Pankreas wurde frei präpariert und die Tumorzellen injiziert. Für den Zeitraum der Operation wurden die Augen der Mäuse mit Bepanthen

Augensalbe behandelt, um ein Austrocknen zu verhindern. Postoperativ verblieben die Käfige für etwa 30-60 Minuten auf einer Wärmeplatte (39 °C), um ein Auskühlen der Tiere in der Aufwachphase nach Narkose zu verhindern. In den Tagen nach der Operation wurde etwa alle zwei bis drei Tage das Gewicht und der Allgemeinzustand der Tiere dokumentiert und die Wunden begutachtet. Um Schmerzen vorzubeugen, wurde das Trinkwasser mit 750 µl Metamizol (Novalgin; Ratiopharm, Ulm, Deutschland) in einer 250-ml-Trinkflasche versetzt.

2.2.4.3 Sektion

Die Tötung der Tiere erfolgte mit Kohlenstoffmonoxid in einem speziell präparierten Käfig. Unmittelbar vor der anschließenden Sektion wurde zur Sicherheit noch eine zervikale Dislokation durchgeführt. Die getöteten Tiere wurden in Rückenlage auf einem sterilen Tuch platziert. Die Sektion erfolgte mit sterilem Sektionsbesteck. Zunächst wurde die Haut zu beiden Seiten des Körpers abgeklappt. Bei Mammakarzinom-implantierten Mäusen erfolgte nun die Präparation des Tumors in der rechten Flanke. Als nächstes wurde das Peritoneum eröffnet und die Leber in toto entnommen. Bei Pankreaskarzinom-implantierten Mäusen wurde nun, in Abhängigkeit von der Invasivität des Tumors, das Pankreas gegebenenfalls mit angrenzenden (Teil-)Strukturen entnommen. Darüberhinaus wurden standardmäßig Magen, Nieren inklusive Nebennieren und Milz entfernt und auf potentielle Makrometastasen untersucht. Abschließend wurde der Thorax eröffnet, Herz und Lunge entnommen und die Lunge mittels trachealer Injektion von 4% Formalin in PBS expandiert. Die Tumoren wurden in 4% Formalin in PBS fixiert.

2.2.4.4 Organpräparation

Die bei Sektion entnommenen Organe und die Primärtumoren wurden über Nacht in 4% Formalin in PBS fixiert. Für spätere histologische Untersuchungen wurden die Gewebe wie folgt präpariert und in Tissue-Tek-Kassetten ausgegossen. Die makroskopischen Befunde beziehungsweise die Schnittflächen wurden dabei jeweils nach unten eingebettet. Die Gewebe wurden für 30 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert und über Nacht maschinell in einem Entwässerungsgerät dehydriert.

Schema der maschinellen Entwässerung

3 x	60 Minuten	75% Ethanol
2 x	90 Minuten	96% Ethanol
3 x	75 Minuten	100% Ethanol
2 x	120 Minuten	Xylol

Anschließend wurden die Präparate in Paraffin eingebettet und bei Raumtemperatur ausgehärtet. Das Anfertigen von Gewebeschnitten aus in Paraffin eingebetteten Proben erfolgte mithilfe eines Rotationsmikrotoms. Dazu wurden die Paraffinblöcke in eine Halterung des Rotationsmikrotoms gespannt und mit einer Schnittdicke von 2 µm auf Superfrost Plus Objektträger übertragen.

2.2.5 Histochemie und Immunhistochemie

2.2.5.1 Entparaffinierung

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden vor jeder Färbung entparaffiniert. Dazu wurden sie zunächst für 30 Minuten bei 60 °C erwärmt, sodass die Gewebe besser an den Objektträgern haften blieben. Die Entparaffinierung erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe nach dem folgendem Schema:

7 Minuten	Xylol
7 Minuten	Xylol
5 Minuten	Propanol
5 Minuten	98% Ethanol
5 Minuten	75% Ethanol
5 Minuten	60% Ethanol
5 Minuten	H ₂ O bidest.

2.2.5.2 Hämalaun-Eosin-Färbung

Zunächst wurden die entparaffinierten Gewebeschnitte für 5 Minuten in Hämalaun gefärbt,

anschließend mit entmineralisiertem Wasser gespült und 5 Minuten unter fließendem, kaltem Leitungswasser gebläut. Daraufhin wurden sie für 5 Minuten in Eosin (5 g Eosin auf 500 ml Aqua dest. 1-2 Tropfen Essigsäure) gefärbt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert:

Wenige Sekunden	H ₂ O bidest.
Wenige Sekunden	60% Ethanol
Wenige Sekunden	75% Ethanol
5 Minuten	98% Ethanol
5 Minuten	Propanol
5 Minuten	Xylol
5 Minuten	Xylol

Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit Depex Mounting Medium eingedeckelt.

2.2.5.3 CTHRC1-Färbung

Die Gewebeschnitte wurden entparaffiniert. Es erfolgte eine erste Vorbehandlung in Target Retrieval Solution (pH 6) 1:10 in H₂O bidest. Die Schnitte wurden in TRS für 20 Minuten in Wasserdampf auf 96 °C erwärmt und anschließend für 5 Minuten in H₂O bidest auf Eis auf Raumtemperatur gekühlt. Anschließend erfolgte ein Waschschriff in Tris (pH 7,6) für 5 Minuten bei Raumtemperatur.

Tris pH 7,6	6,1 g Tris Base
	9,0 g NaCl
	mit H ₂ O bidest auf 1 l auffüllen
	mit Salzsäure auf pH 7,6 titrieren

Die zweite Vorbehandlung erfolgte mit 3%-igem Wasserstoffperoxid (100 µl pro Gewebeschnitt) für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer luftdicht verschlossenen Feuchtkammer. Es folgten drei Waschschriffe mit Tris auf dem Laborschwenker. Die dritte und letzte Vorbehandlung wurde mit Sea Block (100 µl pro Gewebeschnitt) für 20

Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer durchgeführt. Die Schnitte wurden jetzt nicht mit Tris gewaschen. Anschließend wurde der CTHRC1-Antikörper (Ratte) 1:400 in Antikörper-Diluent verdünnt und je 100 µl der Verdünnung pro Gewebeschnitt hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Objektträger zunächst erneut dreimalig in Tris gewaschen und anschließend mit dem Brückenantikörper Goat-anti-Rabbit (Nichirei; 100 µl pro Gewebeschnitt) behandelt und für eine Stunde in der Feuchtkammer inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte in Tris. Als Farbsubstrat wurde 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) verwendet, in welchem die Schnitte für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur auf dem Laborschwenker inkubiert wurden.

AEC-Substrat (60 ml)	39 ml Lösung I (1,36 g Natriumacetat Trihydrat, Merck auf 100 ml H ₂ O bidest)
	17 ml Lösung II (0,549 ml Eisessig auf 100 ml H ₂ O bidest)
	4 ml Lösung III (400 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol auf 100 ml Dimethylformamide)

Die Lösung wurde 30 Minuten vor Benutzung filtriert, und unmittelbar vor Gebrauch wurden ihr 60 µl 30% Wasserstoffperoxid hinzugesetzt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 5 Minuten in H₂O bidest gespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Dazu wurden die Schnitte für etwa 10 Sekunden in Hämalaun getaucht, in entmineralisiertem Wasser abgespült und anschließend für 5 Minuten unter fließendem, kalten Leitungswasser gebläut. Letztlich wurden die Gewebeschnitte mit Aquatex Mounting Medium eingedeckelt.

2.2.5.4 EpCAM-Färbung

Die Färbung erfolgte nach dem prinzipiellen Schema der CTHRC1-Färbung. Die erste Vorbehandlung entfiel jedoch komplett, und es wurde direkt mit der zweiten Vorbehandlung mit 3% Wasserstoffperoxid begonnen, an welche sich die dritte Vorbehandlung mit Sea Block anschloss. Der EpCAM-Antikörper (Maus; Santa Cruz) wurde 1:100 in Antikörper-Diluent verdünnt und ebenfalls bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Der verwendete Brückenantikörper war in diesem Falle goat-anti-mouse (Bio-Rad; 100 µl pro Gewebeschnitt). Als Farbsubstrat wurde ebenfalls AEC verwendet, die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun und die Schnitte wurden mit Aquatex Mounting Medium eingedeckelt.

2.2.5.5 Lox-Färbung

Die Färbung erfolgte nach dem prinzipiellen Schema der CTHRC1-Färbung. Die erste Vorbehandlung erfolgte mit TRS pH9 im Steamer bei 96 °C für 20 Minuten. Die zweite Vorbehandlung ebenfalls mit 3%-igem Wasserstoffperoxid und die dritte Vorbehandlung ebenfalls mit Sea Block. Der Lox-Antikörper (Maus) wurde 1:100 in Antikörper-Diluent verdünnt und ebenfalls bei 4 °C über Nacht inkubiert. Der verwendete Brückenantikörper war in diesem Falle goat-anti-mouse (Bio-Rad; 100 µl pro Gewebeschnitt). Als Farbsubstrat wurde ebenfalls AEC verwendet, die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun und die Schnitte wurden mit Aquatex Mounting Medium eingedeckelt.

2.2.5.6 Vimentin-Färbung

Die Färbung erfolgte nach dem prinzipiellen Schema der CTHRC1-Färbung. Die erste Vorbehandlung erfolgte mit TRS pH6 im Steamer bei 96 °C für 20 Minuten. Die zweite Vorbehandlung ebenfalls mit 3%-igem Wasserstoffperoxid und die dritte Vorbehandlung ebenfalls mit Sea Block. Der Vimentin-Antikörper (Maus; Dako) wurde 1:500 in Antikörper-Diluent verdünnt und ebenfalls bei 4 °C über Nacht inkubiert. Der verwendete Brückenantikörper war in diesem Falle Goat-anti-Mouse (Bio-Rad; 100 µl pro Gewebeschnitt). Als Farbsubstrat wurde ebenfalls AEC verwendet, die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun und die Schnitte wurden mit Aquatex eingedeckelt.

2.2.5.7 Färbungen von Cytospins

Die Cytospins wurden mit 0,3% Wasserstoffperoxid in Methanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur vorbehandelt und anschließend dreimalig in Tris gewaschen. Eine zweite Vorbehandlung mit Sea Block (100 µl pro Objektträger) erfolgte ohne anschließenden Waschschrift. Die Antikörper gegen EpCAM (Maus; Santa Cruz; 0,5 µl auf 100 µl) und Lox (Maus; Miltenyi Biotec; 1 µl auf 100 µl) wurden beide in Antikörper-Diluent verdünnt. Pro Objektträger wurden 100 µl einer Antikörperverdünnung aufgetragen, sodass letztlich auf

einem Objektträger immer nur entweder EpCAM oder Lox gefärbt wurde. Als Brückenantikörper wurde Goat-anti-Mouse (Dako, 100 µl pro Gewebeschnitt) verwendet. Als Farbsubstrat diente wieder AEC. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun und die Schnitte wurden mit Aquatex eingedeckelt.

2.2.6 Methoden zur optischen Bildgebung

2.2.6.1 Fluoreszenz-Messungen von NIRF-Antikörpern im Tumormausmodell mittels Optix MX 2

Sobald die implantierten Tumore im Nacktmausmodell auf eine verwertbare Größe angewachsen waren (2-6 Wochen, abhängig von der verwendeten Zelllinie), wurde den Mäusen eine NIRF-Probe sowie ein ebenfalls IgG-Vio747 als Kontrolle über die Schwanzvene appliziert. Die Mäuse wurden über einen definierten Zeitraum in definierten Zeitintervallen mithilfe des Optix MX2 gemessen und anschließend getötet und sezirt. Das Optix MX2 ist ein System zur optischen Bildgebung, das mit einem Laser einer definierten Wellenlänge eine NIRF-Probe anregt und das emittierte Fluoreszenzsignal mithilfe einer hochsensiblen Kamera detektiert. Es nutzt dabei im Gegensatz zur traditionellen „Continuous Wave“-Methode, bei der nicht zwischen Absorption und Streuung unterschieden werden kann, die sog. „Time-Domain“-Methode. Dabei werden hochfrequente Lichtimpulse ausgesendet, die die fluoreszente Probe anregen. Die dadurch emittierten Photonen werden anhand ihrer time-of-flight von dem System detektiert. Die Verteilung dieser time-of-flight-Daten (auch als temporal point spread function bezeichnet) wird genutzt, um Absorption und Streuung zu unterscheiden. So entsteht ein räumlich hoch aufgelöstes Bild, bei dem ein Signal von einer Fluoreszenzprobe klar von einem bereinigten Hintergrund abgegrenzt werden kann. Dazu wurde vor einer Messreihe für jede Maus ein sog. Prescan-Wert ermittelt. Das bedeutet, dass die Mäuse einmalig noch vor Applikation der NIRF-Probe im Optix MX2 gemessen wurden, um später Rückschlüsse über die tatsächliche Signalintensität zu erhalten. Vor und während jeder Messung wurden die Mäuse mittels Inhalationsnarkose durch Isofluran narkotisiert. Die zu untersuchende Maus wurde in eine an die Narkose-Einheit angeschlossene Box gesetzt und erhielt 1 l/min Sauerstoff und 1 l/min Atemluft. Die Narkose wurde eingeleitet mit 5% Isofluran in Atemluft und, sobald die Maus das Bewusstsein verloren hatte, auf 2,5% Isofluran in Atemluft reduziert. Die Maus wurde dann ins Optix MX2 transferiert, die Narkose dorthin umgeleitet, die Schnauze des Tieres in die Atemmaske gelegt und die Gliedmaßen mit Leukosilk Klebestreifen auf dem Tisch des Systems fixiert.

Die Augen der Mäuse wurden mittels Bepanthen Augensalbe vor Austrocknung geschützt. Die Farbstoffe Cy5.5 und Vio680 wurden mit einer Emissionswellenlänge von 670 nm und der Farbstoff Vio747 (Kontrolle) mit einer Emissionswellenlänge von 730 nm gemessen. Für jeden Scan wurde eine *region of interest* (kurz: ROI) festgelegt. Scans wurden ventral, von der Tumorregion und bei manchem Mammakarzinom-implantierten Mäusen (wenn der Tumor sehr weit in der Flanke angewachsen war) auch seitlich durchgeführt. Für einen ventralen Scan wurde eine ROI über den gesamten Rumpf der Maus gewählt, wobei lediglich Schwanz, Gliedmaßen und Kopf ausgespart wurden. Es wurde mit einer Integrationszeit von 0,2 Sekunden und einer räumlichen Auflösung von 1,5 mm gemessen. Bei Tumorscans wurde die ROI etwas breiter als die sichtbare (Mamma/subkutan) oder erwartete (Pankreas, mittels Vorab-Scan ermittelte Region) gelegt und bei einer Integrationszeit von einer Sekunde und einer räumlichen Auflösung von einem mm gemessen, um noch höher aufgelöste Bilder zu erhalten. Seitliche Scans wurden generell genau wie Tumorscans behandelt. Die Intensität des anregenden Lasers wurde mithilfe der „power-automation“-Funktion des Optix MX2 bestimmt. Generell gilt, dass ein starkes Signal des Fluorophors nur eine niedrige Leistung des Lasers benötigt. Reichert sich also viel Fluorophor-gekoppelter Antikörper beispielsweise in Leber (ventraler Scan) oder Tumor (Tumorscan) an, so wählt die *power-automation*-Funktion eine niedrigere Laserintensität, da der Photonendetektor des Systems zu starke Signalintensitäten der Fluoreszenzproben nicht korrekt integrieren kann. Dabei wurde eine Intensität von 250 μW als Maximalwert festgelegt. Die IgG-Vio747-Kontrolle wurde aufgrund ihres immer schwachen Signals standardmäßig mit dem Maximalwert von 250 μW gemessen. Die anderen Farbstoffe konnten entsprechend ihrer Zeitkinetik mit zum Teil deutlich niedrigeren Werten gemessen werden. Die so ermittelten Daten wurden mithilfe der gerätespezifischen Software Optiview ausgewertet. Dabei wurden die einzelnen Scans einer definierten ROI bei einer definierten Emissionswellenlänge (z. B. ventraler Scan bei 670 nm) nach ihrer zeitlichen Abfolge sortiert. Die zur Bestimmung der Signalintensität erforderlichen, signalstarken Areale (Leber im ventralen Scan, Tumor im seitlichen und Tumorscan) markiert und die Daten durch das Programm erhoben. Um eine einheitliche Skalierung zu gewährleisten, wurde bei den jeweiligen Tumorscans der Tiere der ventrale Scan mit dem stärksten Signal in die Auswertung einbezogen. Die so erhaltenen statistischen Daten zum zeitlichen Ablauf der Signalintensität in den verschiedenen Arealen bei verschiedenen Wellenlängen wurden mittels Excel ausgewertet und grafisch dargestellt.

2.2.6.2 Fluoreszenz- und Biolumineszenz-Messungen im Tumormausmodell mittels IVIS

Analog zu dem zuvor vorgestellten Optix MX2 ist das IVIS Spectrum ebenfalls ein System zur präklinischen optischen Bildgebung. Neben Fluoreszenz-Messungen ist das IVIS außerdem in der Lage, Biolumineszenz zu messen. Letzteres wurde für Tumore der Zelllinie PancTu-I-CBRL angewendet. Diese Zellen waren (vom Hersteller) mit Click Beetle Red Luciferase transfiziert worden. Den Mäusen wurde vor der jeweiligen Biolumineszenz-Bestimmung Luciferin intravenös appliziert. Die Menge an Luciferin richtete sich nach dem Körpergewicht der Maus. Als Faustregel wurde ein Volumen in μl aufgezogen, das dem dreifachen des Körpergewichts der Maus entsprach (Beispiel: 30 g Körpergewicht ergibt 90 μl Luciferin). 5 Minuten nach Applikation wurden die Biolumineszenz bestimmt. Die Narkose wurde dabei eingeleitet und aufrechterhalten sowie im Optix MX2. Die Messungen erfolgten je am letzten Versuchstag. Anschließend wurden die Mäuse getötet und sezirt. Es erfolgte ein Biolumineszenz-Scan ex vivo mit eröffnetem Abdomen, um das Pankreas ohne Weichteilmantel besser darstellen zu können.

3 Ergebnisse

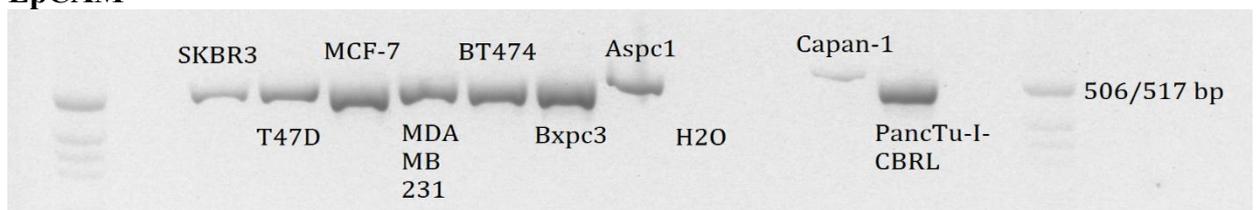
3.1 Expressionsstatus EZM relevanter Proteine in Zellkultur und Tumorgewebeschnitten

Im ersten Schritt wurden ausgewählte Zelllinien von humanen Mamma- und Pankreaskarzinomen hinsichtlich ihres Expressionsstatus für die EZM-relevanten Proteine EpCAM und Lox untersucht. Die dafür ausgewählten Karzinomzellen unterscheiden sich in ihrer Aggressivität bzw. ihrem Invasionsverhalten. Unter den ausgewählten Mammakarzinomen waren Zellen der Linie MDA-MB-231 die aggressivsten mit einem mikroskopisch sichtbar hohen Potential zur Invasion gesunden Gewebes. BT474-Zellen hingegen zeigten kaum Invasivität.

Die Zellen der Mammakarzinome T47D, SkBr3 und MCF-7 zeigten eine intermediäre Invasivität. Unter den Pankreaskarzinomen waren die Zellen der Linie Aspc1 eher invasiv im Vergleich zu den weniger invasiven Linien BxPC-3 und Capan-1. Die Pankreaskarzinomzellen der Linie PancTu-I-CBRL wurden zusätzlich ausgewählt, da sie mit Click beetle red luciferase (CBRL), einem Luciferin-spaltenden Enzym transfiziert waren, welches in Biolumineszenz sichtbar gemacht werden konnte. Dies dient der spezifischen Darstellung von Tumorzellen mit Biolumineszenz-Detektoren wie dem IVIS (siehe 3.3.5).

3.1.1 RNA-Expression von EpCAM und LOX in den kultivierten Zelllinien mittels RT-PCR

EpCAM



HPRT

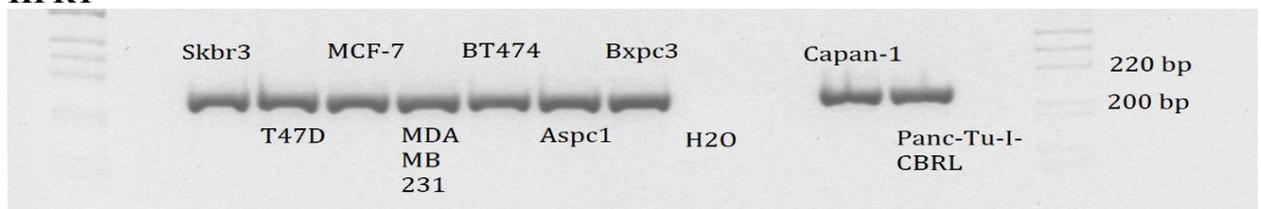
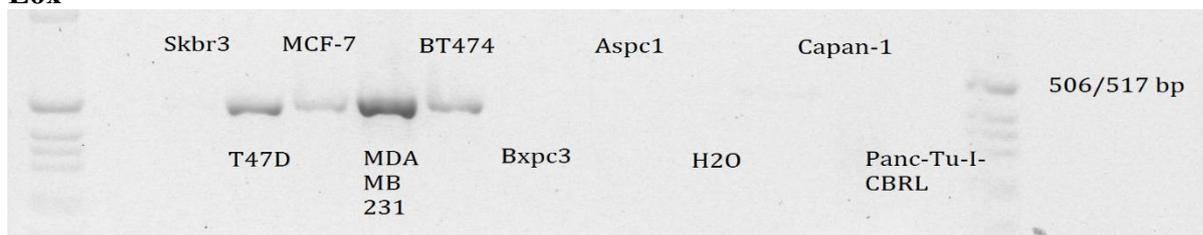


Abb. 3.1.1.1 RT-PCR zum Nachweis von EpCAM in Mamma- und Pankreaskarzinomzellen

Aus *in vitro* kultivierten Zellen der Mamma- und Pankreaskarzinome wurde RNA isoliert und mittels RT-PCR für EpCAM amplifiziert. *Oben*: RT-PCR für EpCAM. *Unten*: Kontrolle mit HPRT. Das Amplifikat bei EpCAM zeigt Banden in Höhe der Leiter bei 506/517 Basenpaaren. Es sind Expressionsunterschiede zu erkennen: Das Amplifikat zeigt sich stark bei MCF-7, BT474, BxPC-3 und PancTu-I-CBRL, moderat bei T47D, MDA-MB-231, Aspc1 und SkBr3 sowie schwach bei Capan-1. 1 Kb DNA-Leiter. Repräsentative Bilder, n=3

Abb.3.1.1.1 zeigt eine repräsentative RT-PCR für EpCAM mit RNA aus *in vitro* kultivierten Zellen der Mamma- und Pankreaskarzinome. Das erwartete Amplifikat zeigte sich in der Gelelektrophorese etwa auf Höhe der 506/517-Doppelbande der 1 Kb DNA-Leiter. Für EpCAM errechnete sich theoretisch ein Wert von 527 Basenpaaren, weswegen hier davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei dem Produkt um EpCAM-kodierende DNA handelte. Als interne Qualitätskontrolle wurde eine PCR für Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) mit denselben RNA-Proben durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Ausgangskonzentrationen an RNA zwischen den Zelllinien gleich waren. Als Kontrolle wurde DNA- und RNA-freies Wasser verwendet. Die EpCAM-Expression der verwendeten Karzinomzelllinien auf RNA-Ebene wies deutliche Unterschiede auf, welche in Tab.3.1.1.1 zusammengefasst werden. EpCAM wird auf RNA-Ebene vor allem stark bei MCF-7, BT474, BxPC-3 und PancTu-I-CBRL exprimiert. Hingegen zeigten MDA-MB-231, Aspc1, SkBr3 nur eine mittelgradige und Capan-1 nur eine geringe Expression von EpCAM auf RNA-Ebene.

Lox



HPRT

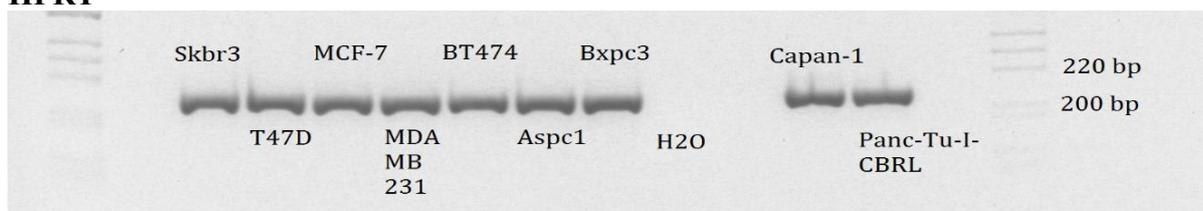


Abb. 3.1.1.2 RT-PCR zum Nachweis von Lox in Mamma- und Pankreaskarzinomzellen

Aus *in vitro* kultivierten Zellen der Mamma- und Pankreaskarzinome wurde RNA isoliert und mittels RT-PCR für Lox amplifiziert. Oben: RT-PCR für Lox. Unten: Kontrolle mit HPRT. Das Amplifikat bei Lox zeigt Banden knapp unterhalb der 506/517 Bande der Leiter. Besonders stark zeigt es sich bei MDA-MB-231, Moderat bei T47D und schwach bei BT474 und MCF-7. Bei den weiteren Proben ist kein Amplifikat nachweisbar. 1 kb DNA-Leiter. Repräsentative Bilder, n=3

Abb. 3.1.1.2 zeigt eine repräsentative RT-PCR für Lox mit RNA aus *in vitro* kultivierten Zellen der Mamma- und Pankreaskarzinome. Das erwartete Amplifikat zeigte sich in der Gelelektrophorese etwas unterhalb der 506/517-Doppelbande der 1 Kb DNA-Leiter. Für Lox errechnete sich theoretisch ein Wert von 492 Basenpaaren. Somit kann auch hier davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem entstandenen Produkt um Lox-kodierende DNA handelte. Auch hier sind Unterschiede festzustellen, die in Tabelle 3.1.1 zusammengefasst

sind. Die stärkste Expression von Lox auf RNA-Ebene erfolgt bei MDA-MB-231. T47D, BT474 und MCF-7 wiesen eine mittelgradige bis schwache Lox-Expression auf. Die Zellen der Pankreaskarzinome zeigten *in vitro* keine Expression von Lox auf RNA-Ebene. Es erfolgte ebenfalls eine Kontrolle mit HPRT.

Tab. 3.1.1.1 Expression von EpCAM und Lox auf RNA-Ebene in *in vitro* kultivierten Karzinomzellen

Mammakarzinome	Lox	EpCAM
MDA-MB-231	+++	++
T47D	++	++
BT474	+	+++
MCF-7	+	+++
SkBr3	-	++
Pankreaskarzinome		
BxPC-3	-	+++
Aspc1	-	++
Capan-1	-	+
PancTu-I-CBRL	-	+++
Kontrolle		
Wasser (DNA-/RNA-frei)	-	-

3.1.2 Proteinexpression von EpCAM und LOX in den kultivierten Zelllinien mittels Western-Blot-Analyse

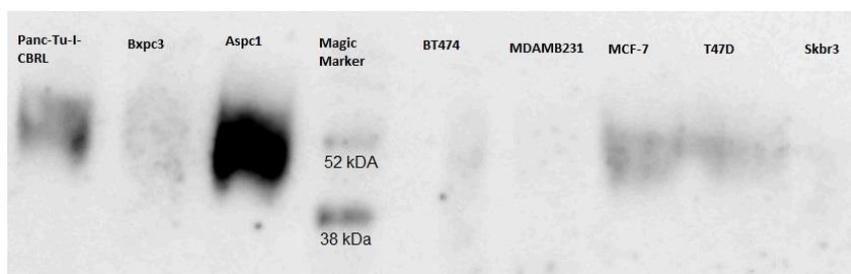


Abb. 3.1.2.1 Western-Blot-Analyse und SDS-Gelelektrophorese zum Nachweis von EpCAM in Mamma- und Pankreaskarzinomzellen

Aus *in vitro* kultivierten Zellen der gezeigten Mamma- und Pankreaskarzinome wurde Protein isoliert. Western-Blot-Analyse in Verbindung mit gegen EpCAM gerichtetem Antikörper zur Darstellung der Expression von EpCAM auf Proteinebene. Die Banden liegen unterhalb der 52kDa-Bande der Leiter. Die Intensität der Banden weist Unterschiede auf: stark bei Aspc1 und PancTu-I-CBRL; moderat für T47D und MCF-7; schwach für BxPC-3 und BT474; Kaum bzw. keine Bande ist bei SkBr3 und MDA-MB-231 zu erkennen. 12-225kDa Leiter. Repräsentatives Bild, n=3

Abb. 3.1.2.1 zeigt eine Western-Blot-Analyse mit dem gegen EpCAM gerichteten Antikörper (Maus Isotyp IgG1, Klon 323-A3, monoclonal, Abcam, UK). EpCAM besitzt ein Molekulargewicht von etwa 40 kDa. Das erwartete Protein wurde unterhalb der 52kDa Bande der Leiter nachgewiesen. Die Expression von EpCAM auf Proteinebene aus *in vitro* kultivierten Karzinomzellen zeigte ebenfalls deutliche Unterschiede der Zelllinien untereinander. Am stärksten wurde EpCAM auf Proteinebene bei Asp1 und nachfolgend bei PancTu-I-CBRL exprimiert. Eine moderate Expression von EpCAM auf Proteinebene zeigten MCF-7 und T47D, eine geringe zeigte sich bei BxPC-3 und BT474. MDA-MB-231 zeigte auf Proteinebene keine Expression von EpCAM (siehe Tab. 3.1.2).

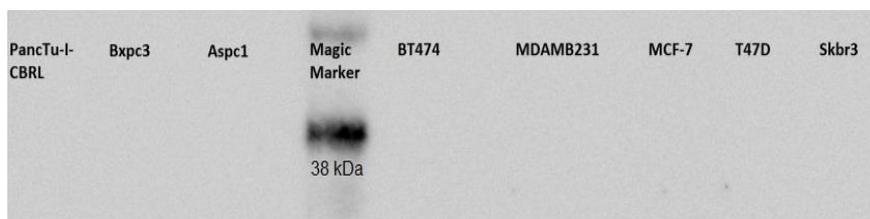


Abb. 3.1.2.2 Western-Blot-Analyse und SDS-Gelelektrophorese zum Nachweis von Lox in Mamma- und Pankreaskarzinomzellen

Aus *in vitro* kultivierten Zellen der gezeigten Mamma- und Pankreaskarzinome wurde Protein isoliert. Western-Blot-Analyse in Verbindung mit gegen Lox gerichteten Antikörpern zur Darstellung der Expression von Lox auf Proteinebene. Gezeigt ist eine repräsentative Aufnahme (n=7). Bei demselben Proteinisolat, das auch für den Nachweis von EpCAM aus *in vitro* kultivierten Karzinomzellen verwendet wurde, konnte Lox auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden. Es wurden zwei verschiedene, ungekoppelte, gegen Lox gerichtete Antikörper verwendet (α Lox, Miltenyi Biotec, DE und α Lox, Santa Cruz, Dallas, USA). Der Versuch wurde sieben Mal mit gleichem Ergebnis wiederholt. 12-225 kDa Leiter

Abb. 3.1.1.2 zeigt eine Western-Blot-Analyse zum Nachweis von Lox auf Proteinebene. Bei einem errechneten Molekulargewicht von ca. 32 kDa ist Lox in Nähe der 38 kDa Bande der Leiter zu erwarten. Zum Nachweis von Lox auf Proteinebene wurde dasselbe Proteinisolat wie zum Nachweis von EpCAM aus *in vitro* kultivierten Karzinomzellen verwendet. Lox konnte dabei auf Proteinebene in keiner der untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden (siehe Tab. 3.1.2). Dieser Nachweis wurde mehrfach unter Modifizierung der Variablen (Antikörper, Membran, Spannung, Stromstärke, Laufzeit) mit gleichem Ergebnis wiederholt.

Dazu wurden zwei verschiedene, gegen Lox gerichtete, ungekoppelte Antikörper verwendet (α Lox, Miltenyi Biotec, DE und α Lox, Santa Cruz, Dallas, USA), ohne dass Lox nachgewiesen wurde.

Tab. 3.1.2 Expression von EpCAM und Lox auf Proteinebene in *in vitro* kultivierten Karzinomzellen

Mammakarzinome	Lox	EpCAM
MDA-MB-231	-	-
T47D	-	++
BT474	-	+
MCF-7	-	++
SkBr3	-	(+)
Pankreaskarzinome		
BxPC-3	-	+
Aspc1	-	+++(+)
Capan-1	-	+
PancTu-I-CBRL	-	+++

3.1.3 Validierung der Proteinexpression von EpCAM und LOX in den Mammakarzinomzelllinien mittels FACS-Analyse

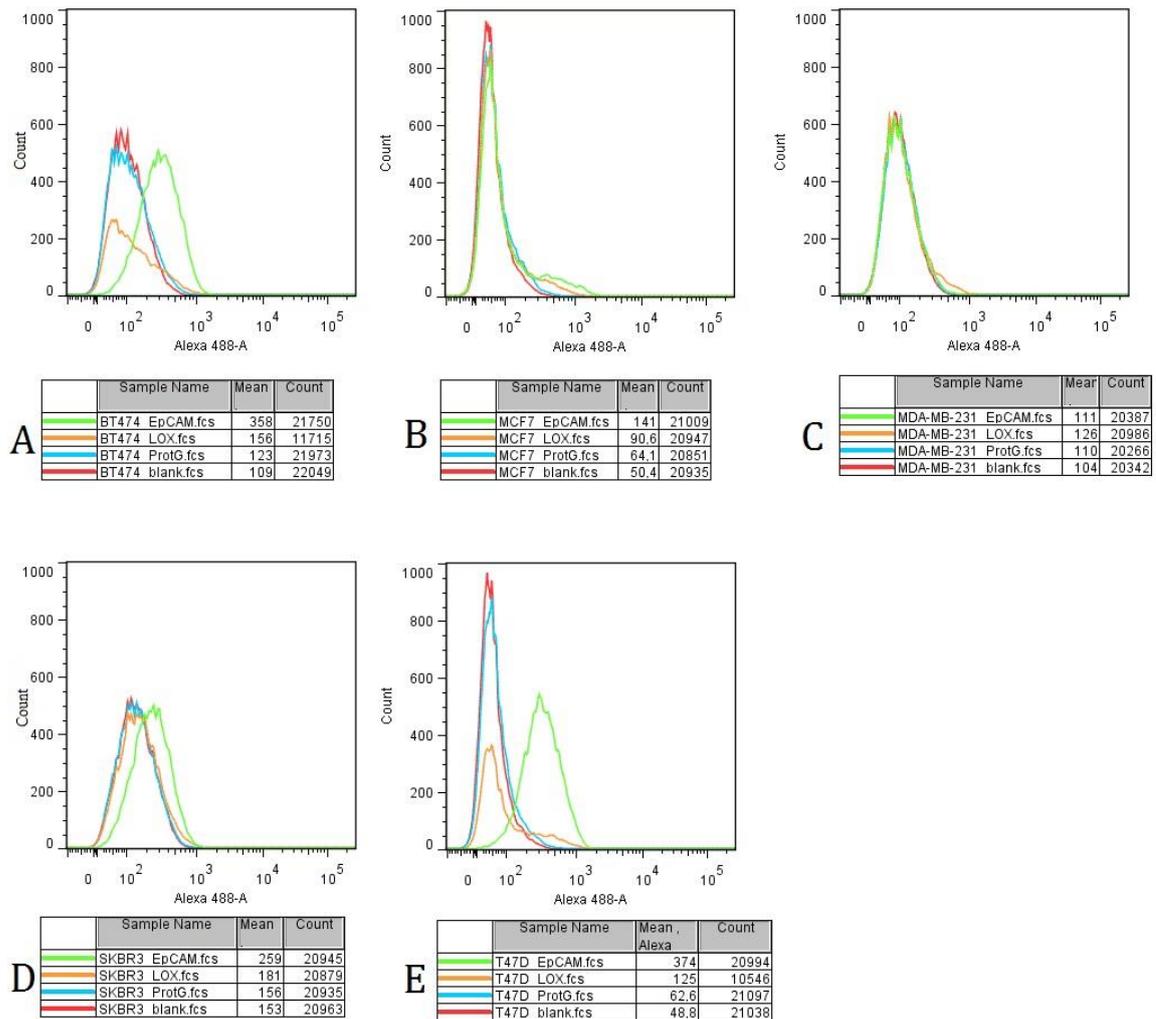


Abb. 3.1.3.1 FACS-Analyse der Proteinexpression von EpCAM und Lox in Mammakarzinomzellen mittels gegen EpCAM bzw. Lox gerichteter Primärantikörper und Protein-G-Alexa-488 als Sekundärantikörper

A: BT474, B: MCF-7, C: MDA-MB-231, D: SkBr3, E: T47D. Eine verstärkte Intensität des Signals für den Farbstoff Alexa-488 findet sich für den gegen EpCAM gerichteten Antikörper (grüner Graph) vor allem bei BT474 und T47D, moderat bei SkBr3 und schwach bei MCF-7; kein nachweisbares Signal bei MDA-MB-231. Ein Anstieg der Signalintensität von Alexa-488 ist für den gegen Lox gerichteten Antikörper (orangener Graph) bei keiner der Zelllinien nachweisbar. Eine Leerkontrolle (roter Graph) sowie eine Kontrolle mit Protein G (blauer Graph) sind dargestellt. n=4

Abb. 3.1.3.1 zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der ausgewählten Zelllinien der Mammakarzinome sowohl auf ihre EpCAM- als auch Lox-Expression. Von jeder der ausgewählten Zelllinien wurden vier Proben untersucht. Als Primärantikörper wurden entsprechend ein ungekoppelter EpCAM-Antikörper beziehungsweise ein ungekoppelter Lox-Antikörper verwendet. Als Sekundärantikörper kam Alexa-488-gekoppeltes Protein G zum Einsatz. Eine Kontrolle wurde nur mit dem Sekundärantikörper (blauer Graph) behandelt, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Eine weitere

Kontrolle wurde ohne Antikörper (roter Graph) inkubiert. Die auf EpCAM (grüner Graph) bzw. Lox (orangener Graph) untersuchten Proben wurden entsprechend Protokoll mit Primär- und Sekundärantikörper behandelt. Die stärkste Expression für EpCAM ließ sich für T47D und BT474 zeigen. Eine moderate Expression lag bei SkBr3, eine schwache bei MCF-7 und keine Expression bei MDA-MB-231 vor. Lox konnte auch mittels FACS-Analyse auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden (siehe Tab. 3.1.3.1). Dies bestätigt die Ergebnisse der Western Blots (siehe Kapitel 3.1.2)

Tab. 3.1.3.1 Expression von EpCAM und Lox anhand durchflusszytometrischer Analysen

Zelllinie	Expressionstatus	
	EpCAM	Lox
T47D	+++	-
BT474	+++	-
SkBr3	++	-
MCF-7	+	-
MDA-MB-231	-	-

3.2 Vergleich der Expressionsmuster von CTHRC1, EpCAM und LOX in Pankreastumor-Gewebeschnitten

Im Folgenden wurden histologische Tumorschnitte von Pankreaskarzinomen verschiedener Zelllinien hinsichtlich ihrer Expression der EZM-relevanten Proteine EpCAM und Lox sowie des Pankreaskarzinom-Markers CTHRC1 verglichen. Dazu wurden immunhistochemische Färbungen mit entsprechenden gegen diese Proteine gerichteten Antikörpern durchgeführt.

Humane Xenografts der Zelllinien Aspc1, Panc1, BxPC-3, Capan-1 und PancTu-I-CBRL wurden aus Nacktmausmodellen gewonnen. Ebenfalls wurde das Pankreas einer gesunden Maus immunhistochemisch für die EZM-relevanten Proteine EpCAM und Lox sowie CTHRC1 untersucht, um die Expression im gesunden Gewebe und Tumorgewebe miteinander zu vergleichen.

3.2.1 Orthotopes Pankreaskarzinom im Nacktmausmodell: Aspc1

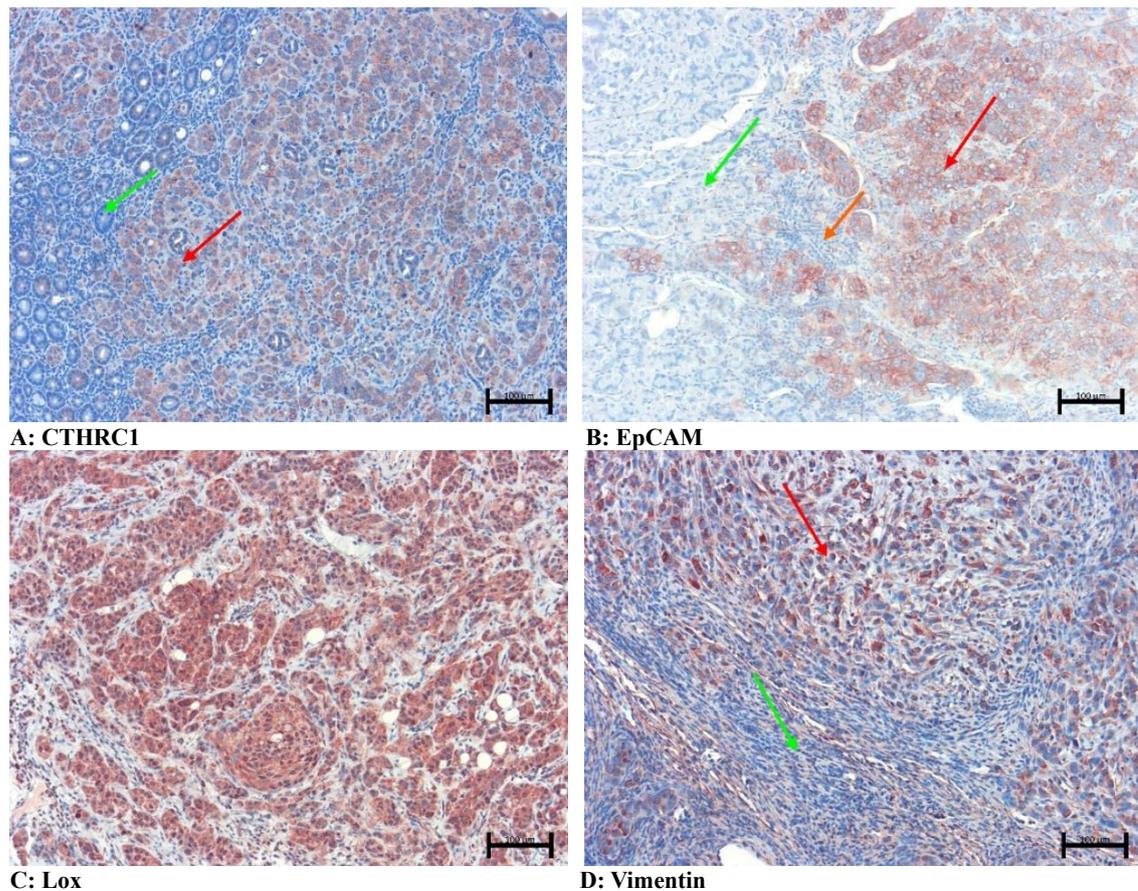


Abb. 3.2.1 Immunhistochemischer Nachweis der EZM-relevanten Proteine in primären Aspc1-Pankreaskarzinomen im Nacktmausmodell Gezeigt sind repräsentative Bilder zentraler Tumorareale von Aspc1-Tumoren. Immunhistochemische Färbungen auf A: CTHRC1, B: EpCAM, C: Lox und D: Vimentin zur Darstellung bindegewebigen Stromas. Die roten Pfeile weisen auf Tumorzellnester, die gesundes Gewebe (grüne Pfeile) infiltrieren, v.a. zu erkennen bei (A) CTHCR1 und (B) EpCAM. Die Lox-Färbung der Tumorzellen (C) ist sehr stark. Die Aspc1-Zellen werden auch in der Vimentin-Färbung mit angefärbt (D). Vereinzelt sind Immunzellen bei (B) EpCAM (orangener Pfeil) zu erkennen, die an der Grenze zwischen Tumorgewebe und gesundem Pankreasgewebe akkumulieren. Bar = 100 µm, n = 2.

Abb. 3.2.1 zeigt repräsentative Bilder immunhistochemischer Färbungen zentraler Bereiche von Aspc1-Tumoren, teils angrenzend an gesundes Pankreas. Zunächst fallen Aspc1-Tumore durch ihr aggressives Infiltrationsmuster auf. Es lässt sich eine Infiltration gesunden Gewebes (grüner Pfeil) Tumorzellen (roter Pfeil) erkennen, v.a. (B). Zellen des Immunsystems sind ebenfalls zu erkennen (orangener Pfeil, B). Die EZM-relevanten Proteine, EpCAM und Lox sowie CTHRC1, wurden stark von Aspc1-Tumorzellen exprimiert. Die Tumoren lassen ebenfalls für Vimentin eine intensive Färbung erkennen.

3.2.2 Orthotopes Pankreaskarzinom im Nacktmausmodell: Panc1

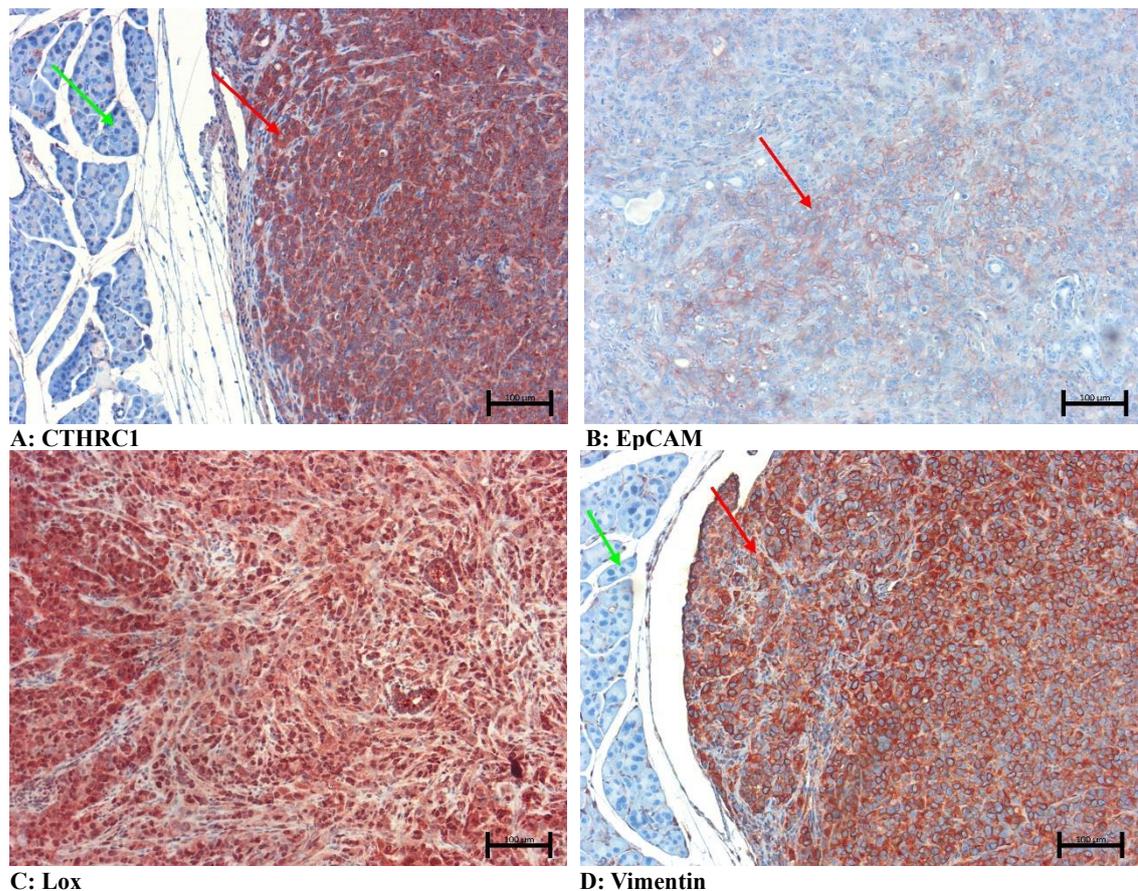


Abb. 3.2.2 Immunhistochemischer Nachweis der EZM-relevanten Proteine in primären Panc1-Pankreaskarzinomen im Nacktmausmodell Gezeigt sind repräsentative Bilder zentraler Tumorareale von Panc1-Tumoren. Immunhistochemische Färbungen auf A: CTHRC1, B: EpCAM, C: Lox und D: Vimentin zur Darstellung bindegewebigen Stromas. Panc1 zeigte ein wenig invasives Wachstum und war von einer bindegewebigen Kapsel umgeben v.a. bei (A) CTHRC1 und (D) Vimentin zu erkennen. Die grünen Pfeile weisen auf gesundes Pankreasgewebe, die roten Pfeile auf Tumorzellen. Die Färbung der Tumorzellen für CTHRC1 und Lox waren stark, die Färbung für EpCAM nur schwach (vereinzelte EpCAM-positive Tumorzellen durch den roten Pfeil in B) gekennzeichnet). Die Tumorzellen wiesen ebenfalls eine starke Färbung für Vimentin auf (D). Bar = 100 µm, n = 2.

Abb. 3.2.2. zeigt repräsentative Bilder immunhistochemischer Färbungen zentraler Bereiche von Panc1-Tumoren. Tumorzellen (roter Pfeil) beziehungsweise, soweit im jeweiligen Schnitt vorhanden, gesundes Pankreas (grüner Pfeil) sind zu erkennen. Die Panc1-Tumoren waren deutlich abgekapselt und zeigten ein lokal verdrängendes Wachstum statt ein invasives Wachstums wie bei Aspc1. CTHRC1 (A) und Lox (C) wurden beide stark in Panc1-Zellen exprimiert, EpCAM (B) hingegen nur dezent.

3.2.3 Orthotopes Pankreaskarzinom im Nacktmausmodell: BxPC-3

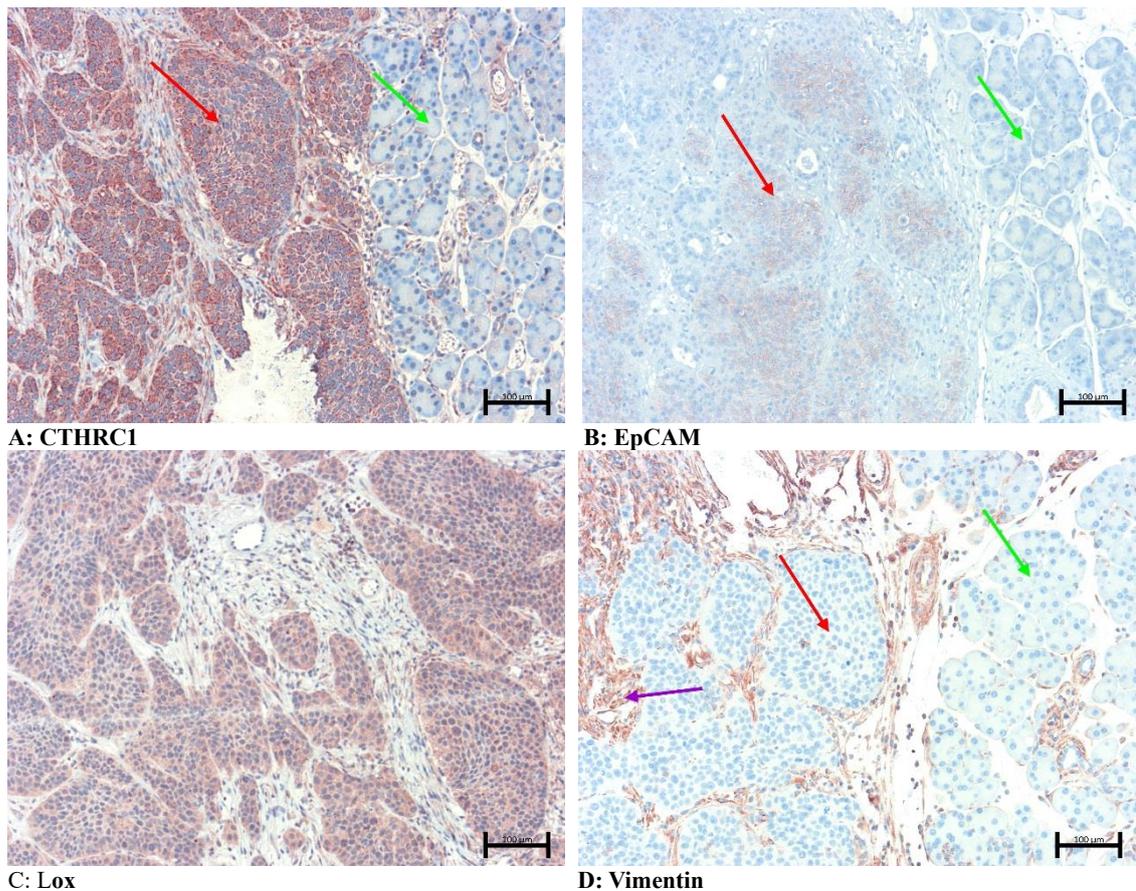


Abb. 3.2.3 Immunhistochemischer Nachweis der EZM-relevanten Proteine in primären BxPC-3-Pankreaskarzinomen im Nacktmausmodell Gezeigt sind repräsentative Bilder zentraler Tumoreale von BxPC-3-Tumoren. Immunhistochemische Färbungen auf A: CTHRC1, B: EpCAM, C: Lox und D: Vimentin zur Darstellung bindegewebigen Stromas. Es lässt sich in den Färbungen für CTHRC1 (A), EpCAM (B) und Vimentin (D) klar eine Invasionsfront von Tumorzellen (rote Pfeile) mit angrenzendem gesundem Pankreasgewebe (grüne Pfeile) erkennen. Die Färbungen der Tumorzellen für CTHRC1 (A) und Lox (C) fielen stark positiv aus, EpCAM (B) hingegen nur schwach positiv. Die Tumorzell-Konglomerate waren von bindegewebigen Septen (lila Pfeil) durchzogen; die Tumorzellen selbst zeigten keine Vimentin-Färbung (D). Bar = 100 µm, n= 2.

Abb. 3.2.3 zeigt repräsentative Bilder immunhistochemischer Färbungen zentraler Bereiche von BxPC-3-Tumoren. Die einzelnen Tumorzellnester (rote Pfeile) wurden von Bindegewebsstraßen durchzogen, am besten zu sehen in der Färbung für Vimentin (D, violetter Pfeil). CTHRC1 (A) und Lox (C) wurden stark von den Tumorzellen exprimiert, EpCAM (B) nur schwach. Insgesamt zeigte sich BxPC-3 als mäßig invasives Pankreaskarzinom. Es zeigte eine Tendenz zur Infiltration von gesundem Gewebe, die jedoch nicht so diffus erschien wie bei Asp1.

3.2.4 Orthotopes Pankreaskarzinom im Nacktmausmodell: Capan-1

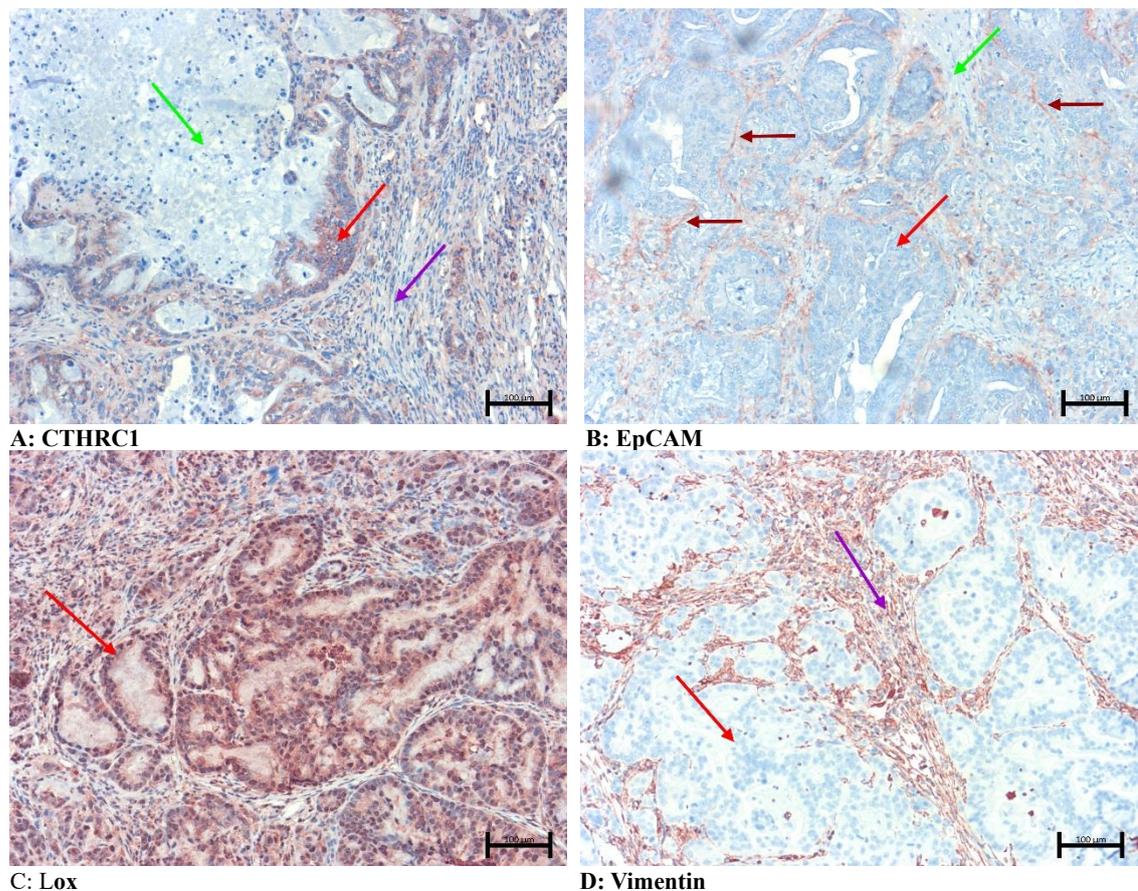


Abb. 3.2.4 Immunohistochemischer Nachweis der EZM-relevanten Proteine in primären Capan-1-Pankreaskarzinomen im Nacktmausmodell Gezeigt sind repräsentative Bilder zentraler Tumoreale von Capan-1-Tumoren. Immunhistochemische Färbungen auf A: CTHRC1, B: EpCAM, C: Lox und D: Vimentin zur Darstellung bindegewebigen Stromas. Die grünen Pfeile weisen diesmal auf nekrotische Areale des Tumors, die für Capan-1 kennzeichnend waren. Gesundes Gewebe war in den Schnitten der vorliegenden Proben kaum vorhanden. Capan-1-Tumorzellen wuchsen in drüsigen Zellverbänden (rote Pfeile) und wurden von reichlich Bindegewebe (violette Pfeile, A, D) umgeben. Auch hier wurden Lox (C) und CTHRC1 (A) stark und EpCAM (B) schwach von den Tumorzellen exprimiert. EpCAM lag vor allem an den Grenzzonen zwischen den drüsigen Tumoranteilen und dem bindegewebigen Stroma (dunkelrote Pfeile, B). Bar = 100 µm, n = 2.

Abb. 3.2.4 zeigt repräsentative Bilder immunhistochemischer Färbungen zentraler Bereiche von Capan-1 Tumoren mit auffallenden Nekrosen (grüne Pfeile) zentral in den drüsenartigen Tumorzellnestern (rote Pfeile). Letztere wurden wie im Fall von BxPC-3 (s.o.) von Bindegewebsstraßen durchzogen. CTHRC1 (A) sowie Lox (C) wurden stark von den Tumorzellen exprimiert, EpCAM hingegen nur schwach, war aber deutlich an der Grenze zwischen Tumorzellnestern und Bindegewebsstraßen zu erkennen (dunkelrote Pfeile, B).

3.2.5 Orthotopes Pankreaskarzinom im Nacktmausmodell: PancTu-I-CBRL

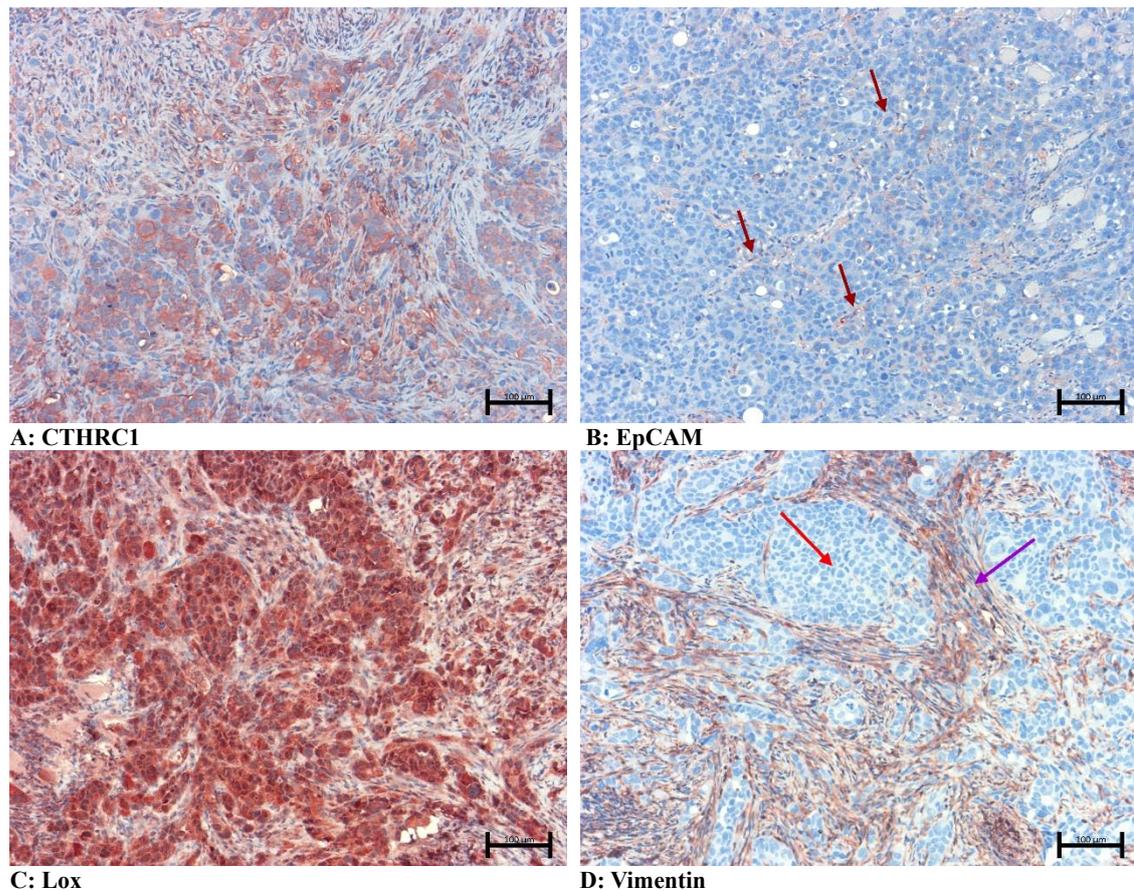


Abb. 3.2.5 Immunhistochemischer Nachweis der EZM-relevanten Proteine in primären PancTu-I-CBRL-Pankreaskarzinomen im Nacktmausmodell Gezeigt sind repräsentative Bilder zentraler Tumorareale von PancTu-I-CBRL-Tumoren. Immunhistochemische Färbungen auf A: CTHRC1, B: EpCAM, C: Lox und D: Vimentin zur Darstellung bindegewebigen Stromas. In den vorliegenden Proben fand sich keinerlei gesundes Pankreasgewebe mehr. Die Färbung der Tumorzellen für Lox (C) fiel stark aus, CTHRC1 (A) moderat, EpCAM (B) schwach. Einzelne Tumorzellen zeigten EpCAM an Zell-Zell-Kontakten (dunkelrote Pfeile, B). Erneut zeigten sich in der Vimentin-Färbung (D) Bindegewebsstraßen (violette Pfeile), die die Tumorzellnester (rote Pfeile) durchziehen (in den anderen Abbildungen schwer abgrenzbar). Bar = 100 µm, n = 2.

Abb. 3.2.5 zeigt repräsentative Bilder immunhistochemischer Färbungen zentraler Bereiche von PancTu-I-CBRL-Tumoren. Die Tumorzellen färben sich für CTHRC1 (A) moderat, für Lox (C) stark an. Die Färbung der Tumorzellen für EpCAM (B) ist schwach. PancTu-I-CBRL zeigte ein infiltrierendes Wachstum mit einzelnen Bindegewebsstraßen (D) zwischen Tumorzellkonglomeraten.

3.2.6 Murines Modell: Pankreas einer tumorfreien Maus

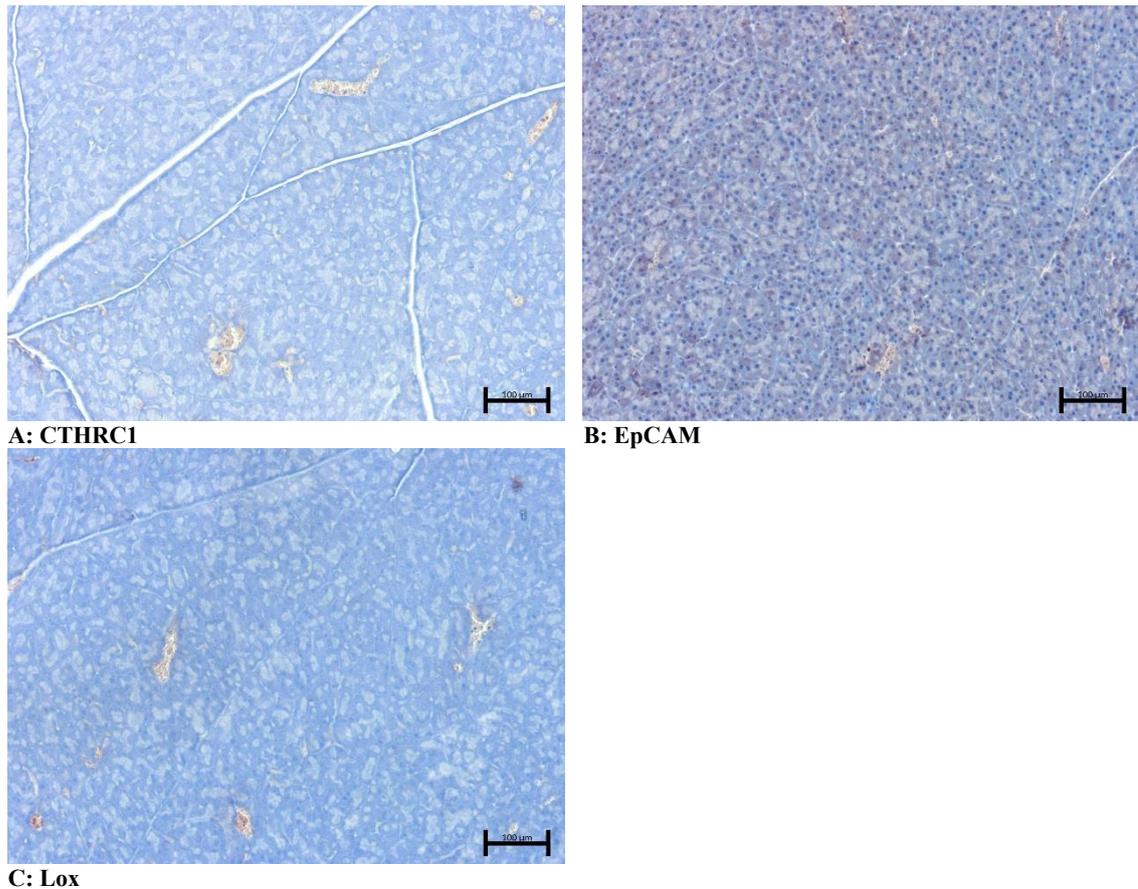


Abb. 3.2.6 Immunhistochemischer Nachweis der EZM-relevanten Proteine im Pankreas einer tumorfreien Maus

Gezeigt sind repräsentative Bilder eines tumorfreien Pankreas einer gesunden Maus. Immunhistochemische Färbungen auf A: CTHRC1, B: EpCAM und C: Lox. Keine der drei Färbungen ließ immunhistochemisch eine Expression der EZM-relevanten Proteine in dem Maß, wie sie bei den zuvor gezeigten Tumoren vorlag, erkennen. Lediglich die Färbung der Pankreaszellen auf EpCAM (B) zeigte eine dezente Färbung. n=1

Abb. 3.2.6 zeigt repräsentative Bilder immunhistochemischer Färbungen des gesunden Pankreas einer Nacktmaus ohne Tumor auf CTHRC1 (A), EpCAM (B) und Lox (C). CTHRC1 und Lox waren histochemisch nicht nachweisbar, EpCAM konnte in geringem Maß nachgewiesen werden.

3.2.7 Vergleich der Expression von EpCAM, Lox und CTHRC1 in immunhistochemischen Färbungen von Pankreastumoren

Es konnte gezeigt werden, dass in allen untersuchten Karzinomlinien die EZM-relevanten Proteine EpCAM und Lox sowie der Pankreaskarzinom-spezifische Marker CTHRC1 exprimiert wurden.

Orthotopes Tumormodell	Expression von EpCAM in Tumorzellen	Expression von Lox in Tumorzellen	Expression von CTHRC1 in Tumorzellen
Aspc1	+++	+++	++
Panc1	+	+++	+++
BxPC-3	+	++	+++
Capan-1	+	++	++
PancTu-I-CBRL	+	+++	++
Gesundes Maus-Pankreas	(+)	-	-

Tab. 3.2.7.1

Vergleich der Intensitäten der histochemischen Färbungen in den ausgewählten Pankreaskarzinomen

Tab. 3.2.7.1 zeigt zusammenfassend, dass die immunhistochemischen Färbungen für die EZM-relevanten Proteine eine starke Expression von EpCAM nur in den Tumorzellen des Modells Aspc1, starke Expression von Lox in den Tumorzellen der Modelle Aspc1, Panc1 und PancTu-I-CBRL sowie eine starke Expression von CTHRC1 in den Tumorzellen der Modelle Panc1, BxPC-3 und PancTu-I-CBRL ergaben. Das gesunde Pankreas einer tumorfreien Maus zeigte keine Färbung für Lox und CTHRC1 und eine sehr schwache Färbung für EpCAM.

Morphologisch imponierten die Karzinome der Zelllinien BxPC-3, Capan-1 und PancTu-I-CBRL durch ein bindegewebsreiches Stroma (vergleiche Abb. 3.2.3, Abb. 3.2.4 und Abb. 3.2.5). Die Tumorzellen der orthotopen Mausmodelle *in vivo* lassen sich immunhistochemisch teils stark für Lox anfärben, während Lox auf Proteinebene *in vitro* nicht nachweisbar war (siehe Kapitel 3.1.2 und 3.1.3).

3.3 Vergleich des Bindungsverhaltens von NIRF-Proben *in vitro* und *in vivo*

Das Bindungsverhalten der NIRF-Proben wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie *in vitro* sowie im Nacktmaus-Xenograft-Modell mittels optischer Bildgebung mit dem Optix MX2 *in vivo* untersucht. Die NIRF-Proben bestanden aus jeweils einem Antikörper gegen EpCAM bzw. gegen Lox und für *in vivo* Versuche zusätzlich einem Antikörper gegen CD44 sowie einem konjugierten Fluorophor, Cy5.5 oder Vio680. Bei Cy5.5 handelt es sich um ein etabliertes Cyanin-Fluorophor, das Anwendung u. a. in der optischen Bildgebung findet. Vio680 ist ein sich in der Entwicklung befindliches Fluorophor (Miltenyi Biotec), das mit Cy5.5 verglichen werden sollte. Beide werden mit einer Wellenlänge von 670nm angeregt.

3.3.1 Nachweis der Integrität der NIRF-Proben mittels eines Coomassie-Brillant-Blau-gefärbten Polyacrylamid-Gels

Bevor *In-vitro*- oder *In-vivo*-Versuche durchgeführt wurden, musste sichergestellt werden, dass die NIRF-Proben auf Proteinebene intakt waren. Dazu wurden α EpCAM-Cy5.5, α EpCAM-Vio680, α Lox-Cy5.5, α Lox-Vio680, α CD44-Cy5.5 und als Kontrolle IgG-Vio680 und IgG-Cy5.5 auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mithilfe von Coomassie-Brillant-Blau angefärbt. Abb. 3.3.1 zeigt, dass alle NIRF-Proben jeweils eine Bande bzw. α Lox-Cy5.5 und α Lox-Vio680 je drei Banden in Höhe der Immunglobuline zwischen 76 kDa und 52 kDa bildeten. Eine Fraktionierung oder Denaturierung der NIRF-Proben lag somit nicht vor.

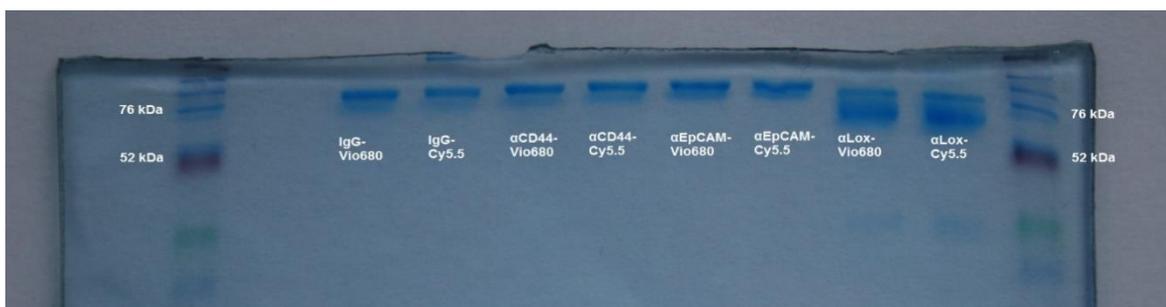


Abb. 3.3.1 Nachweis der Integrität der NIRF-Proben

Dargestellt ist eine Coomassie-Brillant-Blau-Färbung der auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennten NIRF-Proben sowie mit Cy5.5 bzw. Vio680 konjugiertem IgG als Kontrolle. Alle NIRF-Proben bildeten jeweils eine bzw. α Lox-Vio680 und α Lox-Cy5.5 jeweils drei Banden in Höhe der IgG-Kontrollen zwischen 76 kDa und 52 kDa. Eine Fraktionierung oder Denaturierung der NIRF-Proben lag somit nicht vor.

3.3.2 α EpCAM-Vio680 in verschiedenen Konzentrationen bindet *in vitro* spezifisch membranständiges EpCAM auf EpCAM-positiven Mammakarzinomzellen

Zur Evaluation des Bindungsverhaltens von α EpCAM-Vio680 *in vitro* in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration wurden Zellen der Mammakarzinome mit unterschiedlichen Konzentrationen der NIRF-Probe inkubiert. Zellen der Mammakarzinome BT474, MCF-7, SkBr3 und T47D sind gemäß den Ergebnissen von RT-PCR, Western Blot und FACS-Analyse EpCAM-positiv. MDA-MB-231-Zellen zeigten sich in RT-PCR moderat EpCAM-positiv, auf Proteinebene in Western Blot und Durchflusszytometrie jedoch EpCAM-negativ und wurden als Negativ-Kontrolle mitgeführt. Abb. 3.3.2 zeigt repräsentative Bilder der α EpCAM-Vio680-gefärbten Mammakarzinomzellen. Die Zellen wurden auf Objektträgern in Flexiperns für jeweils eine Stunde mit vier verschiedenen Konzentrationen (5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 15 μ g/ml, 20 μ g/ml) der NIRF-Probe inkubiert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskop untersucht. Als Kernfärbung wurde DAPI verwendet (blau). Das Fluorophor Vio680 (magenta) wurde bei einer Anregungswellenlänge von 670 nm erfasst. BT474-, MCF-7-, SkBr3- und T47D-Zellen zeigten bei jeder der gewählten Konzentrationen von α EpCAM-Vio680 eine intensive Färbung im Vergleich zu MDA-MB-231-Zellen, welche unabhängig von der Konzentration von α EpCAM-Vio680 ungefärbt blieben. Somit kann gefolgert werden, dass nur EpCAM-positive Zellen durch α EpCAM-Vio680 gefärbt werden. MCF-7- und BT474-Zellen lassen eine geringe Steigerung der Intensität der Färbung bei graduell steigender Konzentration von α EpCAM-Vio680 erkennen, bei SkBr3- und T47D-Zellen blieb die Intensität der Färbung annähernd gleich. Dabei wurde membranständiges EpCAM im Sinne einer Aufsättigung bei MCF-7- und BT474-Zellen stärker durch die NIRF-Probe gebunden, was zu einer intensiveren Färbung führte. Vor allem die jeweiligen Vergrößerungen (Bild im Bild, untere Reihe) zeigen die Bindung von α EpCAM-Vio680 an membranständiges EpCAM auf den EpCAM-positiven Tumorzellen. Dieser Versuch wurde ebenfalls sowohl für α Lox-Vio680 als auch für α Lox-Cy5.5 durchgeführt. Dabei konnte an *in vitro* kultivierten Tumorzellen keine Bindung von α Lox-Vio680 oder α Lox-Cy5.5 erkannt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

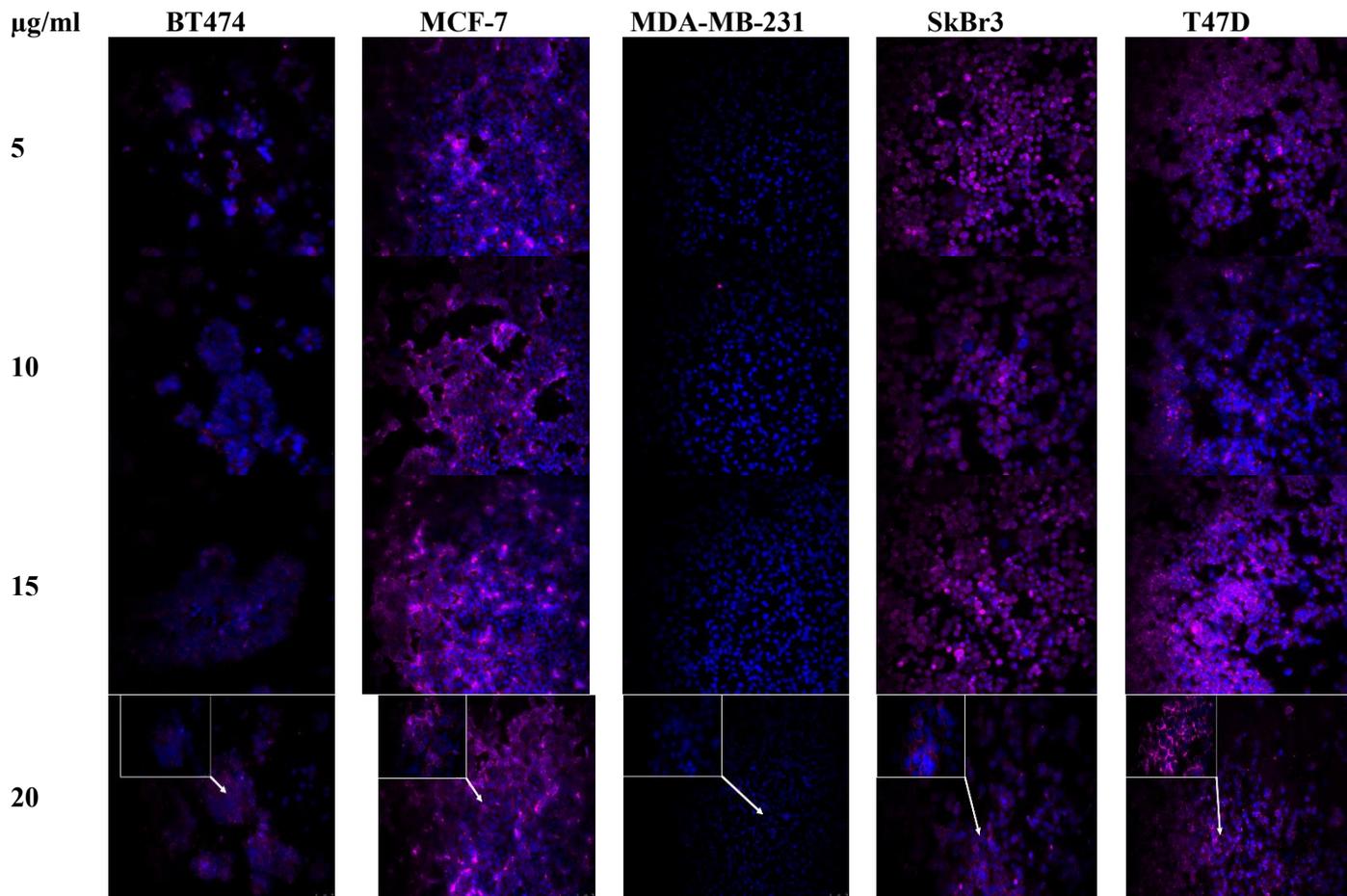


Abb. 3.3.2 α EpCAM-Vio680 in steigender Konzentration bindet spezifisch membranständiges EpCAM auf Mammakarzinomzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

Dargestellt sind repräsentative Bilder von Zellen fünf verschiedener Mammakarzinomlinien (BT474, MCF-7, MDA-MB-231, SkBr3 und T47D), die jeweils für eine Stunde mit α EpCAM-Vio680 inkubiert wurden. Dabei wurde graduell die Konzentration der NIRF-Probe von 5 $\mu\text{g/ml}$ in Fünfer-Schritten bis auf maximal 20 $\mu\text{g/ml}$ gesteigert (links vertikal angezeigt). α EpCAM-Vio680 in magentarot; Kernfärbung mit DAPI (blau). Die Aufnahmen von α EpCAM-Vio680 erfolgten bei einer Anregungswellenlänge von 670 nm. Die Intensität der Färbung war stark für BT474-, MCF-7-, SkBr3- und T47D-Zellen im Vergleich zu nicht gefärbten MDA-MB-231-Zellen als Negativ-Kontrolle. α EpCAM-Vio680 bindet demnach nur an EpCAM-positive Zellen. Nur MCF-7- sowie BT474-Zellen zeigen eine intensivere Färbung bei steigender Konzentration der NIRF-Probe. Dabei zeigten sich die Zell-Zell-Grenzen bei steigender Konzentration stärker gefärbt durch eine vermehrte Bindung membranständigen EpCAMs durch die NIRF-Probe. Bei MDA-MB-231-Zellen lässt sich unabhängig von der Konzentration der NIRF-Probe keine Färbung erkennen. Untere Reihe, Bild im Bild: Vergrößerung der jeweiligen Bildausschnitte durch weiße Pfeile markiert. α EpCAM-Vio680 bindet membranständiges EpCAM. $n = 3$ pro Gruppe. Aufnahmetechnik: Dapi: Binning 0, Belichtungszeit 40 ms, Gain 5,0 Background 100; 670nm-Laser: Binning 2x2, Belichtungszeit 2000 ms Gain 8,0 Background 250

3.3.3 Längere Inkubationszeit von α EpCAM-Vio680 auf EpCAM-positiven Mammakarzinomzellen *in vitro* führt zu vermehrter Bindung an membranständiges EpCAM

Zur Bestimmung der maximalen Zellmembran-Akkumulation von α EpCAM-Vio680 über die Zeit wurde die NIRF-Probe anschließend auf Zellen der Mammakarzinome SkBr3, T47D und MDA-MB-231 (als Negativ-Kontrolle) über einen Zeitraum von insgesamt 24 Stunden mit einer Konzentration von 5 μ g/ml inkubiert. Aufnahmen erfolgten nach zwei, vier, sechs und 24 Stunden. Abb. 3.3.3 zeigt repräsentative Bilder. Zellen der EpCAM-positiven Mammakarzinome SkBr3 und T47D zeigten mit zunehmender Inkubationsdauer eine stärkere Färbung durch eine vermehrte Bindung von α EpCAM-Vio680 (magenta) an EpCAM-positive Tumorzellen. MDA-MB-231-Zellen als Negativ-Kontrolle blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum ungefärbt. α EpCAM-Vio680 bindet spezifisch membranständiges EpCAM (siehe untere Reihe, Vergrößerungen).

Zusammenfassend ließ sich in 3.3.2. und 3.3.3. zeigen, dass α EpCAM-Vio680:

- 1) Membranständiges EpCAM *in vitro* spezifisch bindet
- 2) Keine Bindung an EpCAM-negativen Zellen (MDA-MB-231) erfolgt
- 3) Eine vermehrte Bindung von α EpCAM-Vio680 an membranständiges EpCAM mit zunehmender Inkubationszeit *in vitro* erfolgt
- 4) Eine steigende Konzentration von α EpCAM-Vio680 *in vitro* nur bei MCF-7 und BT474 zu einer vermehrten Bindung an membranständiges EpCAM führte

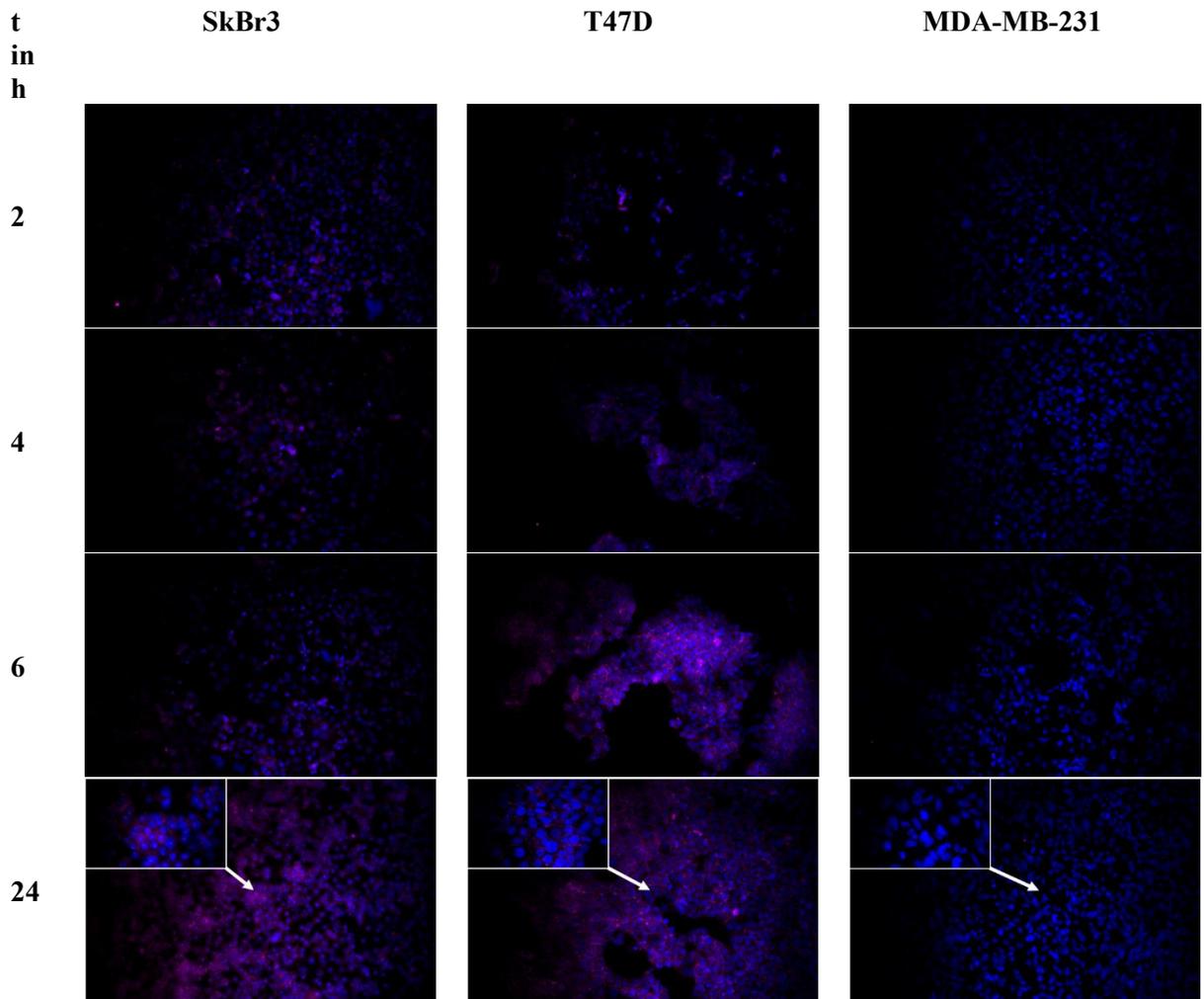


Abb. 3.3.3 Vermehrte Bindung von α EpCAM-Vio680 auf Mammakarzinomzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop über die Zeit

Dargestellt sind repräsentative Bilder von Zellen dreier verschiedener Mammakarzinomlinien (SkBr3, T47D und MDA-MB-231), die jeweils einmalig mit 5 μ g/ml α EpCAM-Vio680 über einen Zeitraum von insgesamt 24 Stunden auf Objektträgern in Flexiperns inkubiert wurden. Aufnahmen erfolgten nach zwei, vier, sechs und 24 Stunden (links vertikal angezeigt). α EpCAM-Vio680 in magenta, Kernfärbung mit Dapi (blau). Die Aufnahmen von α EpCAM-Vio680 erfolgten bei einer Anregungswellenlänge von 670 nm. Mit längerer Inkubationsdauer zeigte sich eine verstärkte Färbung der EpCAM-positiven SkBr3- und T47D-Zellen. EpCAM-negative MDA-MB-231-Zellen zeigten zu keinem Messzeitpunkt eine Färbung. Untere Reihe, Bild im Bild: Vergrößerung der jeweiligen Bildausschnitte durch weiße Pfeile markiert. α EpCAM-Vio680 bindet spezifisch membranständiges EpCAM. n = 3 pro Gruppe. Aufnahmetechnik: Dapi: Binning 0, Belichtungszeit 50 ms, Gain 1,0 Background 100; 670 nm-Laser: Binning 2x2, Belichtungszeit 1000 ms, Gain 5,0 Background 250 (Diese Aufnahmen dürfen hinsichtlich ihrer Intensität bei 670 nm nicht mit Abb. 3.3.2 verglichen werden, da hier andere Einstellungen der Kamera verwendet wurden!)

3.3.4 Bindungsverhalten der NIRF-Proben α EpCAM-Vio680, α EpCAM-Cy5.5 und α LOX-Cy5.5 *in vivo* über die Zeit

Zur Evaluation des Bindungsverhaltens der NIRF-Proben an Tumorzellen *in vivo* wurden MDA-MB-231-Zellen (starke Expression von Lox, schwache Expression von EpCAM) und BT474-Zellen (starke Expression von EpCAM, schwache Expression von Lox) immundefizienten Nacktmäusen entweder orthotop oder subkutan transplantiert. Bei Transplantation von MDA-MB-231-Zellen entstanden etwa nach 2-3 Wochen makroskopisch sichtbare Xenografts. Bei BT474 erfolgte eine zusätzliche Transplantation eines Östrogen-Pellets nuchal. Makroskopisch sichtbare Xenografts entstanden nach etwa 3-4 Wochen.

Zu Beginn des Messzeitraums wurde den tumortragenden Nacktmäusen jeweils eine NIRF-Probe und gleichzeitig zur Kontrolle IgG-Vio747 injiziert. Die Fluoreszenzsignale der NIRF-Proben und der IgG-Kontrolle wurden mithilfe des Optix MX2 erfasst. Dazu nutzt das Gerät einen Laser einer vorher definierten Wellenlänge, um die Fluorophore anzuregen und detektiert so deren Verteilung im Organismus (Biodistribution). Dabei wurden alle NIRF-Proben bei einer Anregungswellenlänge von 670 nm erfasst. Direkt im Anschluss wurde der Laser auf 730 nm umgestellt, um die IgG-Vio747-Kontrolle zu erfassen. Somit kommt es nicht zu Überschneidungen der Signale der NIRF-Proben und der Kontrollen.

3.3.4.1 Bindungsverhalten von α EpCAM-Cy5.5 und α EpCAM-Vio680 *in vivo* im Vergleich

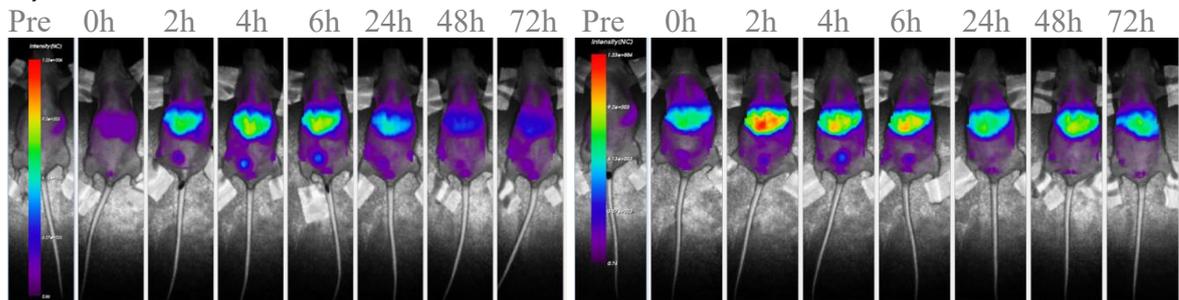
Zunächst wurde das Bindungsverhaltens an Tumorzellen *in vivo* zwischen α EpCAM-Cy5.5 und α EpCAM-Vio680 miteinander verglichen. Dabei wurde untersucht, wie sich das neu entwickelte Fluorophor Vio680 vom etablierten Cy5.5 hinsichtlich seiner zeitlichen Bindungskinetik und Signalintensität im Xenograft unterscheidet. Vier Nacktmäuse erhielten MDA-MB-231-Xenografts. Den Tieren wurde 25 μ g α EpCAM-Cy5.5 oder 25 μ g α EpCAM-Vio680 und zusätzlich jeweils 25 μ g IgG-Vio747 als Kontrolle injiziert. Messungen erfolgten vor Injektion der NIRF-Proben (Pre), direkt nach Injektion (0-Stundenwert, 0h) und anschließend zwei, vier, sechs, 24, 48 bis einschließlich 72 Stunden nach Injektion. Zum jeweiligen Zeitpunkt erfolgte pro Tier jeweils eine Messung des gesamten Rumpfes der Maus von ventral (Ventrolscan), sowie eine hochauflösende Messung des Tumoreals (Tumorscan). Diese Messungen erfolgten bei demselben Tier jeweils einmal bei einer Anregungswellenlänge von 670 nm zur Erfassung der NIRF-Proben und anschließend bei 730 nm zur Erfassung der IgG-Vio747-Kontrolle. Die Skalierung der

gezeigten Bilder pro Abbildung ist jeweils zueinander normalisiert (rot = starkes Signal, violett = schwaches Signal der Proben).

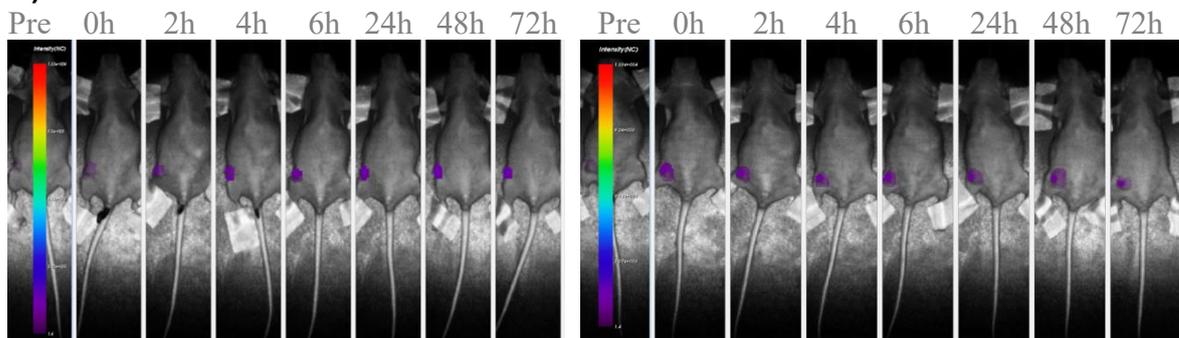
MDA-MB-231-Xenografts mit 25 μg $\alpha\text{EpCAM-Cy5.5}$ bei 670 nm

MDA-MB-231-Xenografts mit 25 μg $\alpha\text{EpCAM-Vio680}$ bei 670 nm

A) Ventralscans



B) Tumorscans



C) Grafische Darstellung der Bindungskinetik der NIRF-Proben über die Zeit

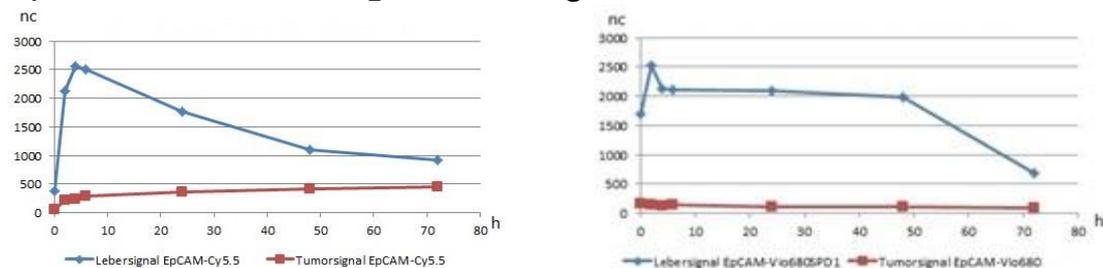


Abb. 3.3.4.1.1 Bindungsverhalten von $\alpha\text{EpCAM-Cy5.5}$ und $\alpha\text{EpCAM-Vio680}$ im MDA-MB-231-Xenograft-Modell über die Zeit

Gezeigt sind repräsentative Bilder. Xenografts orthotop in der Brustdrüse am Rumpf rechts unten der Mäuse.

Linke Hälfte: 25 μg $\alpha\text{EpCAM-Cy5.5}$ in athymischer Nacktmaus (n=2); Rechte Hälfte: 25 μg $\alpha\text{EpCAM-Vio680}$ in athymischer Nacktmaus (n=2).

A): Ventralscans bei 670 nm mit Optix MX2 des gesamten Rumpfes der jeweiligen Maus.

Starkes Signal der Leber; B): Hochauflösender Scan bei 670 nm mit Optix MX2 der Tumorregion. Schwaches Signal aus dem Tumor.

Bar (jeweils links im Scan): Intensität des gemessenen Signals, rot = starkes Signal, violett = schwaches Signal).

Die Skalen aller gezeigten Scans sind zueinander normalisiert. Pre = Prescan, Messung vor Injektion der NIRF-Proben, wurde von folgenden Scans abgezogen.

C): Die Abszisse gibt die Zeit in Stunden an (h), die Ordinate zeigt die gemessene Signalintensität in Normalized Counts (nc). Die einzelnen Messzeitpunkte sind durch Rechtecke markiert.

Das Signal der Leber (blauer Graph) überstieg sowohl für $\alpha\text{EpCAM-Cy5.5}$ als auch für $\alpha\text{EpCAM-Vio680}$ zu jeder Zeit das Tumorsignal (roter Graph).

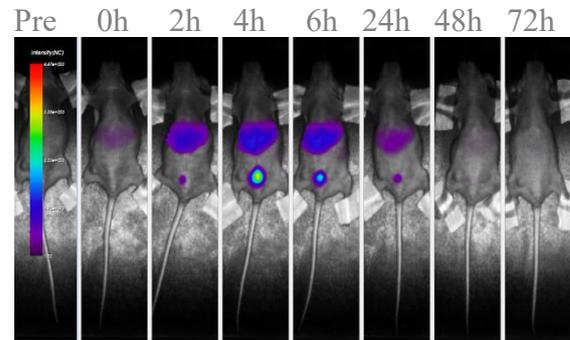
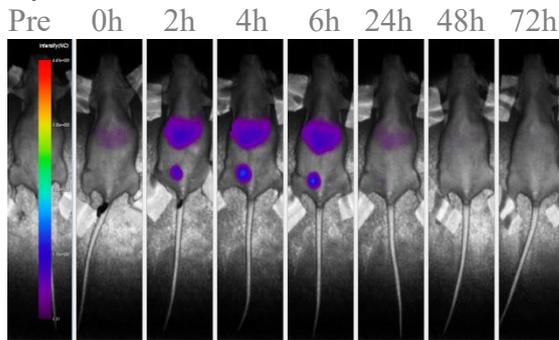
Es erreichte seinen höchsten Wert für $\alpha\text{EpCAM-Cy5.5}$ bei etwa 4-6 Stunden und für $\alpha\text{EpCAM-Vio680}$ bei etwa 2 Stunden und fiel dann kontinuierlich ab.

Das Tumorsignal blieb für beide Farbstoffe während des Messzeitraums in etwa konstant niedrig.

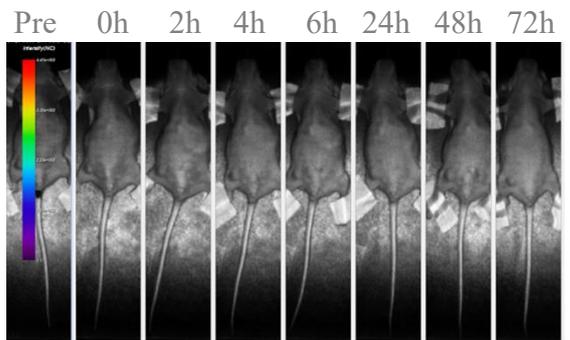
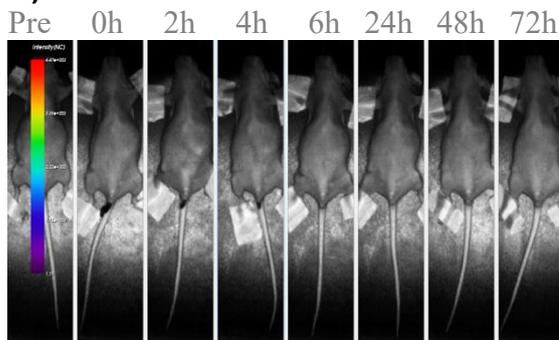
MDA-MB-231-Xenografts mit 25 µg IgG-Vio747 bei 730 nm

MDA-MB-231-Xenografts mit 25 µg IgG-Vio747 bei 730 nm

A) Ventralscans



B) Tumorscans



C) Grafische Darstellung der Bindungskinetik der IgG-Kontrolle über die Zeit

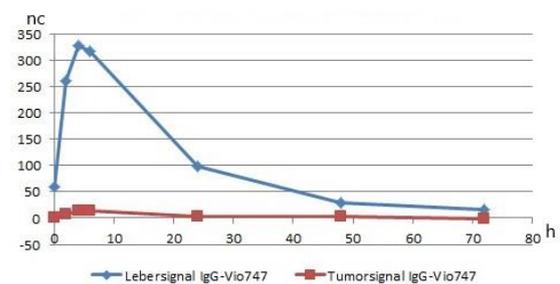
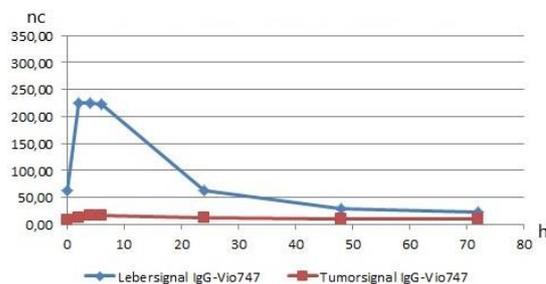


Abb. 3.3.4.1.2 Bindungsverhalten der Kontrolle IgG-Vio747 in MDA-MB-231-Xenograft-Modellen über die Zeit

Gezeigt sind dieselben Mäuse wie in Abb. 3.3.4.1.1 zur selben Zeit. Die Wellenlänge des Lasers wurde von 670 nm auf 730 nm geändert, um die Kontrolle IgG-Vio747 sichtbar zu machen. Diese Messungen erfolgten zum jeweiligen Zeitpunkt direkt im Anschluss zu den in Abb.3.3.4.1.1 dargestellten Messungen. Gezeigt sind repräsentative Bilder. Xenografts orthotop in der Brustdrüse am Rumpf rechts unten der Mäuse. Beide Hälften: jeweils 25 µg IgG-Vio747 A): Ventralscan bei 730 nm mit Optix MX2 des gesamten Rumpfes der jeweiligen Maus, schwaches Signal der Leber, moderates Signal der Blase; B): Hochauflösender Tumorscan bei 730 nm mit Optix MX2 der Tumorregion. Kein Signal im Tumor. Bar (jeweils links im Scan): Intensität des gemessenen Signals, rot = starkes Signal, violett = schwaches Signal) Die Skalen aller gezeigten Scans sind zueinander normalisiert. Pre = Prescan, Messung vor Injektion der NIRF-Proben, wurde von folgenden Scans abgezogen. C): Die Abszisse gibt die Zeit in Stunden (h) an, die Ordinate zeigt die gemessene Signalintensität in Normalized Counts (nc). Die einzelnen Messzeitpunkte sind durch Rechtecke markiert. Die Average Normalized Counts lagen deutlich unter denen der verglichenen NIRF-Proben α EpCAM-Cy5.5 und α EpCAM-Vio680 (Vgl. Abb.3.3.4.1.1C). Somit kann gefolgert werden, dass die NIRF-Proben stärker als die IgG-Kontrolle im jeweiligen Messbereich akkumuliert. Das Lebersignal überstieg auch hier zu jedem Zeitpunkt das Tumorsignal, welches ebenfalls im zeitlichen Verlauf konstant niedrig blieb. n=4

Abb. 3.3.4.1.1 zeigt, dass sowohl α EpCAM-Cy5.5 als auch α EpCAM-Vio680 stark in der Leber und wenig in den MDA-MB-231-Xenografts (MDA-MB-231 ist nur schwach positiv für EpCAM) akkumulierten. Die gesamte Signalintensität der NIRF-Proben gemessen an Normalized Counts (nc) war deutlich höher als die der IgG-Kontrolle (Vgl. Abb.3.3.4.1.1C und Abb. 3.3.4.1.2C) Somit akkumulieren die NIRF-Proben stärker in Leber und Tumor als die IgG-Kontrolle. Bei beiden NIRF-Proben war direkt nach intravenöser Applikation ein Signal in der Leber zu erkennen. Für beide NIRF-Proben galt, dass die Anreicherung im Tumor langsam erfolgte. Zu keinem Zeitpunkt war die Stärke des Fluoreszenzsignals in der Tumorregion höher als die des Signals aus der Leber. Dabei erreichte die Kontrolle IgG-Vio747 in der Tumorregion eine Signalintensität von etwa 50 nc. α EpCAM-Cy5.5 erreichte etwa 500 nc und α EpCAM-Vio680 etwa 200-250 nc in der Tumorregion. Somit ist das Fluoreszenzsignal im Tumor, das durch das konventionelle Fluorophor Cy5.5 erzeugt wird etwa doppelt so stark wie das Signal von Vio680. Abb, 3.3.4.1.3 zeigt diesen Sachverhalt anhand eines direkten Vergleichs der Signalintensitäten aus Leber und Tumor. Das Maximum an Signalintensität in der Leber wurde von α EpCAM-Cy5.5 (grün, Lebersignal = dunkelgrün, Tumorsignal = hellgrün) bei 4-6 Stunden und von α EpCAM-Vio680 (orange, Lebersignal = dunkles orange, Tumorsignal = helles orange) bei etwa 2 Stunden erreicht. Das Lebersignal von α EpCAM-Vio680 stagnierte für zwei Tage bei etwa 2000 nc bevor es abfiel. Bei α EpCAM-Cy5.5 fiel das Lebersignal nach Erreichen seines Maximum direkt kontinuierlich ab. Für beide NIRF-Proben fiel es innerhalb des Messzeitraumes allerdings nicht unter das Tumorsignal.

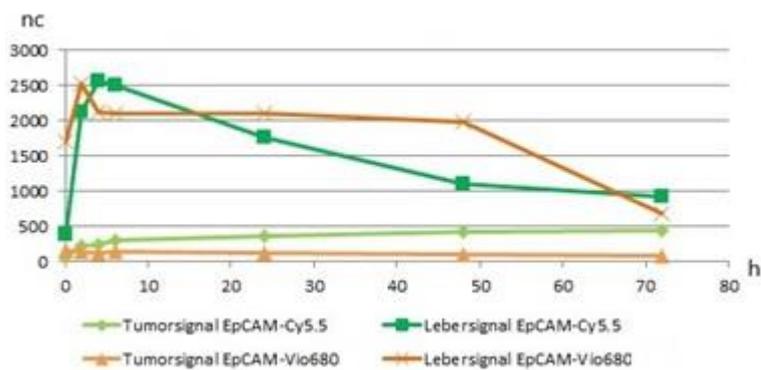


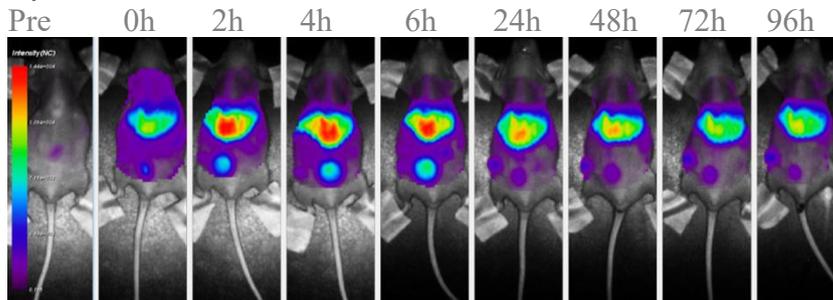
Abb. 3.3.4.1.3 Direkter Vergleich des Bindungsverhalten von α EpCAM-Cy5.5 und α EpCAM-Vio680 im mit MDA-MB-231-Xenograft-Modell über die Zeit

Zusammenfassung von Abb.3.3.4.1.1C und Abb.3.3.4.1.2C. Die Abszisse gibt die Zeit in Stunden (h) an, die Ordinate zeigt die gemessene Signalintensität in Normalized Counts (nc). Die einzelnen Messzeitpunkte sind durch Rechtecke markiert. Beide NIRF-Proben akkumulierten rasch nach Injektion in der Leber. Das Lebersignal für α EpCAM-Cy5.5 (dunkelgrün) sowie für α EpCAM-Vio680 (dunkles Orange) war zu jedem Zeitpunkt stärker als die korrespondierenden Tumorsignale. Dabei lag die maximale Signalintensität in der Leber für α EpCAM-Cy5.5 bei 4-6 Stunden und für α EpCAM-Vio680 bei 2 Stunden. Die Intensitäten der Tumorsignale waren im zeitlichen Verlauf nahezu konstant niedrig, wobei α EpCAM-Cy5.5 (hellgrün) eine höhere Intensität als α EpCAM-Vio680 (helles Orange) erreichte.

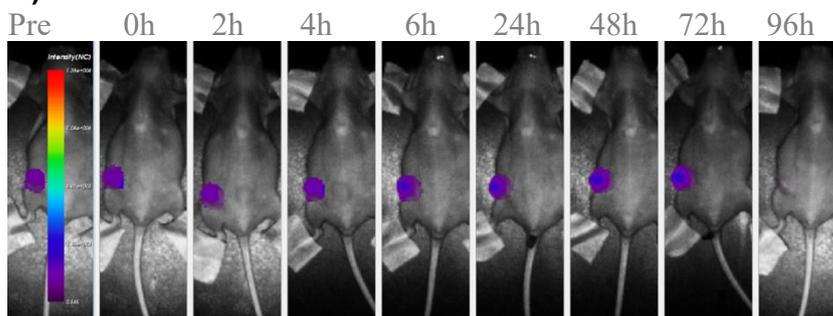
Anschließend wurde die Bindungskinetik von α EpCAM-Vio680 in vivo in einem Xenograft-Modell mit orthotop implantierten BT474-Zellen (stark positiv für EpCAM) untersucht. Die eingesetzte Menge NIRF-Probe wurde von 25 μ g auf 40 μ g erhöht, um zu evaluieren, ob eine Sättigung der Leber möglich ist und so die Signalintensität im Tumor erhöht werden kann. Der Beobachtungszeitraum wurde von 72h auf 96h erweitert, um ein eventuelles Ansteigen des Tumorsignals über das Lebersignal hinaus zu detektieren.

BT474-Xenografts mit 40 μg $\alpha\text{EpCAM-Vio680}$ bei 670 nm

A) Ventralscans



B) Tumorscans



C) Grafische Darstellung der Bindungskinetik der NIRF-Probe über die Zeit

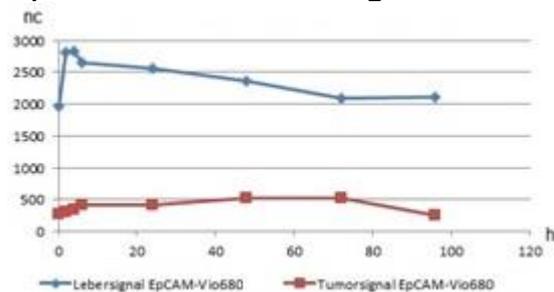
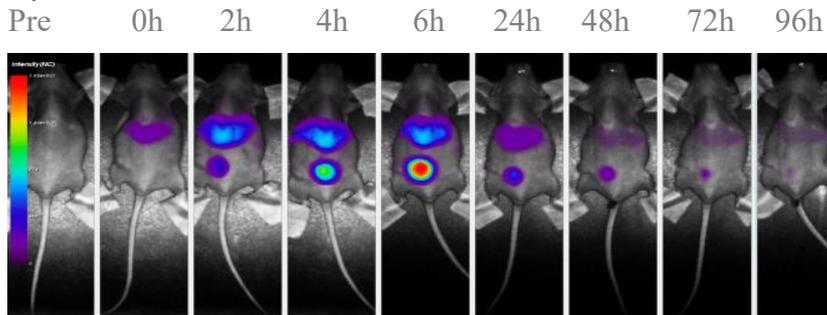


Abb. 3.3.4.1.4 Bindungsverhalten von $\alpha\text{EpCAM-Vio680}$ in BT474-Xenograft-Modell über die Zeit

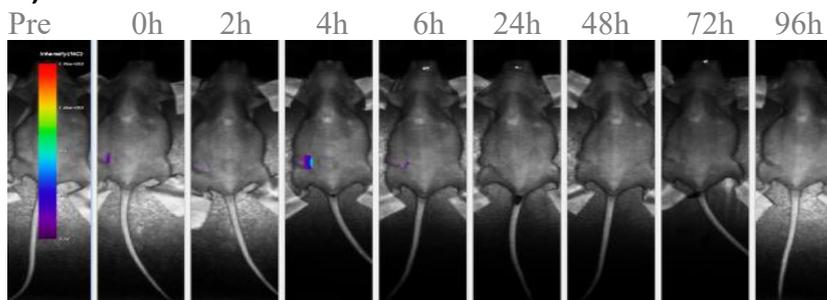
Gezeigt sind repräsentative Bilder. Xenografts orthotop in Brustdrüse am Rumpf rechts unten der Mäuse. 40 μg $\alpha\text{EpCAM-Vio680}$ in BT474-Xenograft-Modell (n=2). A): Ventralscan bei 670 nm mit Optix MX2 des gesamten Rumpfes der Maus, starkes Signal der Leber; B): Hochauflösender Tumorscan bei 670 nm mit Optix MX2 der Tumorregion, schwaches bis moderates Tumorsignal. Bar (jeweils links im Scan): Intensität des gemessenen Signals, rot = starkes Signal, violett = schwaches Signal) Die Skalen aller gezeigten Scans sind zueinander normalisiert. Pre = Prescan, Messung vor Injektion der NIRF-Proben, wurde von folgenden Scans abgezogen. C): Die Abszisse gibt die Zeit in Stunden an (h), die Ordinate zeigt die gemessene Signalintensität in Normalized Counts (nc). Die einzelnen Messzeitpunkte sind durch Rechtecke markiert. Das Lebersignal (blauer Graph) ist zu jedem Zeitpunkt höher als das Tumorsignal (roter Graph). $\alpha\text{EpCAM-Vio680}$ erreicht auch bei BT474-Xenografts seine maximale Signalintensität in der Leber bei 2-4 Stunden. Die Signalintensität in der Leber bei 40 μg der NIRF-Probe liegt dabei etwa 500 nc höher als bei 25 μg $\alpha\text{EpCAM-Vio680}$ im MDA-MB-231-Xenograft-Modell (vergleiche Abb. 3.3.4.1.1). $\alpha\text{EpCAM-Vio680}$ erzeugt jedoch auch bei stark EpCAM-positiven BT474-Xenografts zu keinem Zeitpunkt ein Tumorsignal, das das Lebersignal überschreitet.

BT474-Xenografts mit 25 µg IgGVio747 bei 730 nm

A) Ventral-scans



B) Tumorscans



C) Grafische Darstellung der Bindungskinetik der IgG-Kontrolle über die Zeit

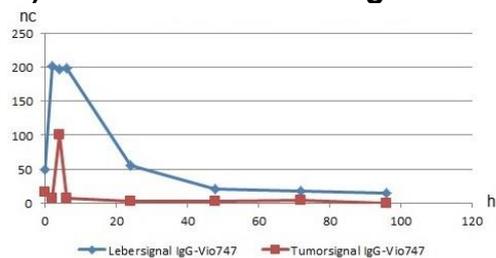


Abb. 3.3.4.1.5 Bindungsverhalten der Kontrolle IgG-Vio747 im BT474-Xenograft-Modell über die Zeit

Gezeigt ist dieselbe Maus wie in Abb. 3.3.4.1.4 zur selben Zeit. Die Wellenlänge des Lasers wurde von 670 nm auf 730 nm geändert, um die Kontrolle IgG-Vio747 sichtbar zu machen. Diese Messungen erfolgten zum jeweiligen Zeitpunkt direkt im Anschluss zu den in Abb.3.3.4.1.4 dargestellten Messungen. Gezeigt sind repräsentative Bilder (n=2). Xenografts orthotop in der Brustdrüse am Rumpf rechts unten der Mäuse. Es wurden 25 µg IgG-Vio747 injiziert. A): Ventral-Scan bei 730 nm mit Optix MX2 des gesamten Rumpfes der Maus; Moderate Anreicherung in der Leber, starke Anreicherung in der Harnblase B): Hochauflösender Tumorscan bei 730 nm mit Optix MX2 der Tumorregion; keine Anreicherung von IgG-Vio747 im Tumor (falsch positiver Wert durch Anschnitt der Harnblase bei 4h). Bar (jeweils links im Scan): Intensität des gemessenen Signals, rot = starkes Signal, violett = schwaches Signal). Die Skalen aller gezeigten Scans sind zueinander normalisiert. Pre = Prescan, Messung vor Injektion der NIRF-Proben, wurde von folgenden Scans abgezogen. C): Die Abszisse gibt die Zeit in Stunden (h) an, die Ordinate zeigt die gemessene Signalintensität in Normalized Counts (nc). Die einzelnen Messzeitpunkte sind durch Rechtecke markiert. Die Normalized Counts lagen deutlich unter denen für αEpCAM-Vio680. Somit kann gefolgert werden, dass auch beim BT474-Xenograft-Modell die NIRF-Probe EpCAM-Vio680 spezifisch im Tumor akkumuliert, während die Kontrolle IgG-Vio747 keine Akkumulation im Tumor zeigt.

Abb. 3.3.4.1.5 zeigt, dass α EpCAM-Vio680 auch im BT474-Xenograft-Modell spezifisch im Tumor bindet, da IgG-Vio747 im Tumor nicht detektiert werden konnte. Vergleicht man die Bindungskinetik von α EpCAM-Vio680 im BT474-Xenograft-Modell (Abb. 3.3.4.1.4) mit dem MDA-MB-231-Xenograft-Modell (Abb. 3.3.4.1.1) über die Zeit, so lässt sich für beide Modelle feststellen, dass die NIRF-Probe rasch in der Leber akkumulierte (0h-Wert). Das Maximum an Signalintensität lag dort für α EpCAM-Vio680 unabhängig vom Tumormodell und der eingesetzten Antikörpermenge bei 2-4 Stunden und fiel dann erst langsam im Verlauf von Tagen ab. Die Signalintensität im Tumor war bei α EpCAM-Vio680 unabhängig vom Tumormodell niedriger als in der Leber und überschritt diese zu keinem Zeitpunkt. Eine Aufsättigung der Leber durch eine größere Menge injizierter NIRF-Probe zugunsten erhöhter Signalintensität im Tumor war nicht möglich.

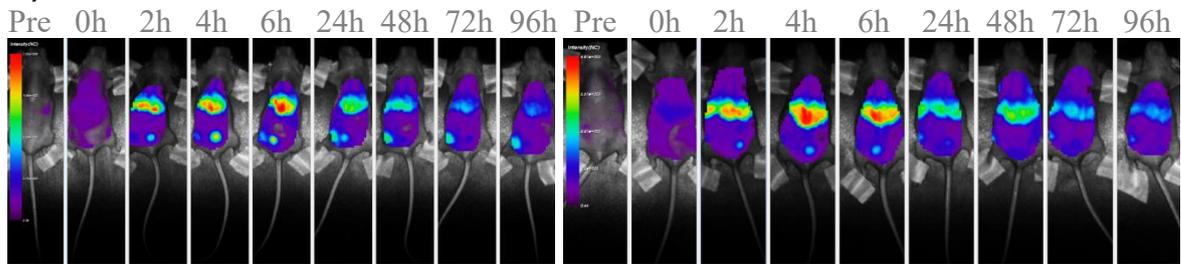
3.3.4.2 Nachweis von Lox *in vivo* mittels α Lox-Cy5.5 in BT474- und MDA-MB-231-Xenografts

Wie bisher gezeigt werden konnte, exprimieren die untersuchten Mammakarzinomzellen Lox *in vitro* nicht auf Proteinebene (Vgl. 3.1.2, 3.1.3 und 3.3.3). In den untersuchten Pankreaskarzinomzellen konnte Lox immunhistochemisch nachgewiesen werden (Vgl. 3.2). Um Lox auch in Mammakarzinomzellen *in vivo* nachzuweisen, wurde Nacktmäusen mit BT474- (Vgl. 3.1.1, schwach positiv für Lox in RT-PCR) bzw. MDA-MB-231-Xenografts (stark positiv für Lox in RT-PCR) je 25 μ g α Lox-Cy5.5 injiziert. Es wurde wie oben IgG-Vio747 als Kontrolle verwendet.

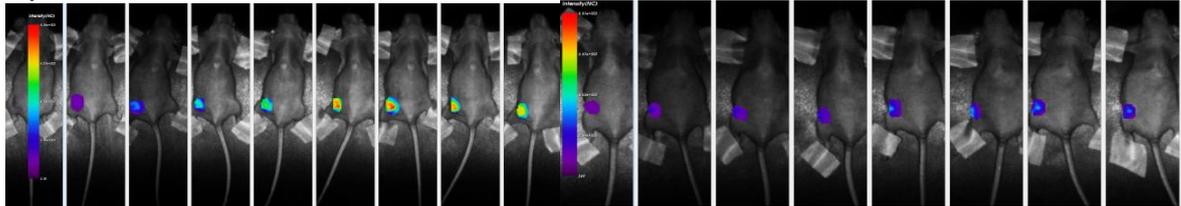
MDA-MB-231-Xenografts mit 25 µg αLox-Cy5.5 bei 670 nm

BT474-Xenografts mit 25 µg αLox-Cy5.5 bei 670 nm

A) Ventral-scans



B) Tumorscans



C) Grafische Darstellung der Bindungskinetik der NIRF-Probe über die Zeit

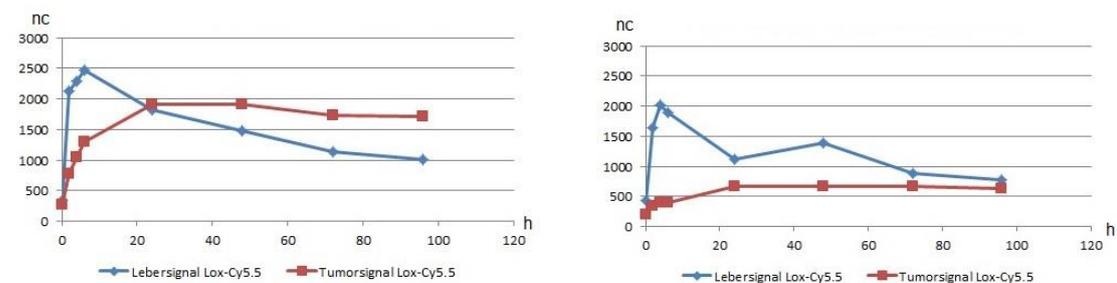


Abb.3.3.4.2.1

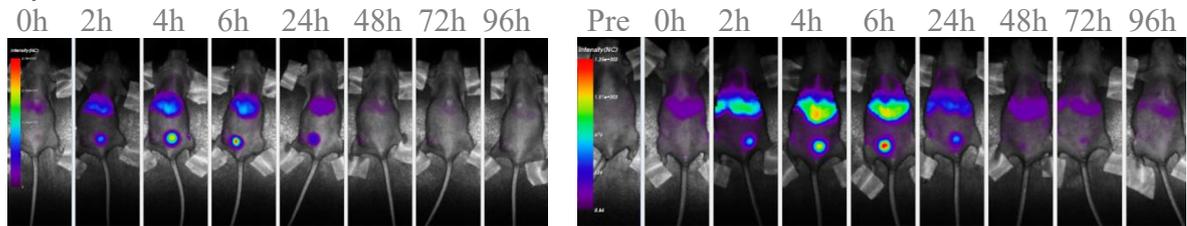
Bindungsverhalten von αLox-Cy5.5 in MDA-MB-231-Xenografts bzw. in BT474-Xenografts über die Zeit

Gezeigt sind repräsentative Bilder. Xenografts orthotop in der Brustdrüse am Rumpf rechts unten der Mäuse. Linke Hälfte: 25µg αLox-Cy5.5 in athymischer Nacktmaus mit MDA-MB-231-Xenograft (n=2); Rechte Hälfte: 25 µg αLox-Cy5.5 in athymischer Nacktmaus mit BT474-Xenograft (n=2). A): Ventral-scans bei 670 nm mit Optix MX2 des gesamten Rumpfes der jeweiligen Maus; B): Hochauflösender Scan bei 670 nm mit Optix MX2 der Tumorregion. Bar (jeweils links im Scan): Intensität des gemessenen Signals, rot = starkes Signal, violett = schwaches Signal). Die Skalen aller gezeigten Scans sind zueinander normalisiert. Pre = Prescan, Messung vor Injektion der NIRF-Proben, wurde von folgenden Scans abgezogen. C): Die Abszisse gibt die Zeit in Stunden an (h), die Ordinate zeigt die gemessene Signalintensität in Normalized Counts (nc). Die einzelnen Messzeitpunkte sind durch Rechtecke markiert. Das Lebersignal erreichte sowohl im MDA-MB-231-Modell als auch im BT474-Modell sein Maximum bei 4-6 Stunden. Das Tumorsignal stieg zunächst an und hielt sich dann in beiden Tumormodellen nach 24 Stunden nahezu konstant. Im Falle der stark Lox-exprimierenden MDA-MB-231-Tumore überstieg das Tumorsignal nach 24 Stunden das Lebersignal und hielt sich für den übrigen Messzeitraum bei etwa 1700-2000 nc. Bei den schwach Lox-exprimierenden BT474 war dies zu keinem Zeitpunkt der Fall. Die Intensität des Tumorsignals bei BT474-Xenografts lag bei höchstens etwa 600 nc. Lox konnte demnach *in vivo* stark in MDA-MB-231-Xenografts und schwach in BT474-Xenografts nachgewiesen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der RT-PCR (Vgl. 3.1.1).

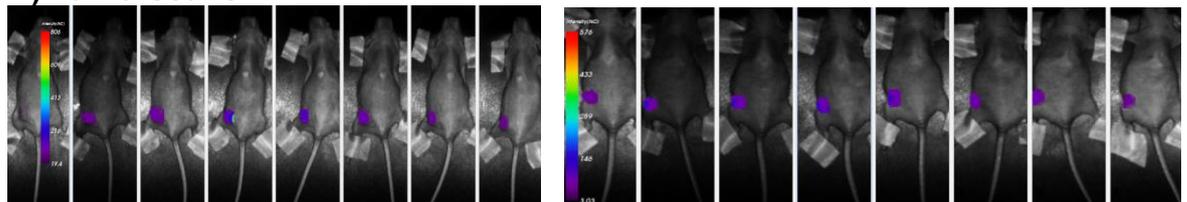
MDA-MB-231-Xenografts mit 25 µg IgG-Vio747 bei 730 nm

BT474-Xenografts mit 25 µg IgG-Vio747 bei 730 nm

A) Ventralscans



B) Tumorscans



C) Grafische Darstellung der Bindungskinetik der NIRF-Probe über die Zeit

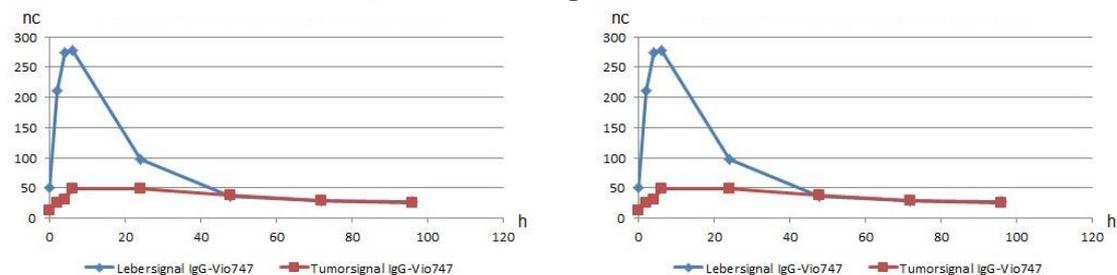


Abb. 3.3.4.2.2 Bindungsverhalten von IgG-Vio747 in MDA-MB-231-Xenografts (links) bzw. BT474-Xenografts (rechts) über die Zeit zur Kontrolle

Gezeigt sind dieselben Mäuse wie in Abb. 3.3.4.2.1 zur selben Zeit. Die Wellenlänge des Lasers wurde von 670 nm auf 730 nm geändert, um die Kontrolle IgG-Vio747 sichtbar zu machen. Diese Messungen erfolgten zum jeweiligen Zeitpunkt direkt im Anschluss zu den in Abb.3.3.4.2.1 dargestellten Messungen. Gezeigt sind repräsentative Bilder (n=2 pro Gruppe). Xenografts orthotop in der Brustdrüse am Rumpf rechts unten der Mäuse. Es wurden 25 µg IgG-Vio747 injiziert. A): Ventralscan bei 730 nm mit Optix MX2 des gesamten Rumpfes der Maus; Moderate Anreicherung in der Leber, starke Anreicherung in der Harnblase in beiden Modellen B): Hochauflösender Tumorscan bei 730 nm mit Optix MX2 der Tumorregion; keine Anreicherung von IgG-Vio747 in beiden Tumormodellen. Bar (jeweils links im Scan): Intensität des gemessenen Signals, rot = starkes Signal, violett = schwaches Signal). Die Skalen aller gezeigten Scans sind zueinander normalisiert. Pre = Prescan, Messung vor Injektion der NIRF-Proben, wurde von folgenden Scans abgezogen. C): Die Abszisse gibt die Zeit in Stunden (h) an, die Ordinate zeigt die gemessene Signalintensität in Normalized Counts (nc). Die einzelnen Messzeitpunkte sind durch Rechtecke markiert. Mit etwa 50 nc lag die Signalintensität der IgG-Kontrolle in beiden Tumormodellen deutlich unter der Signalintensität von α Lox-Cy5.5. Somit ist die Bindung von α Lox-Cy5.5 in beiden Tumormodellen spezifisch.

Abb. 3.3.4.2.1 zeigt, dass Lox *in vivo* in Mammakarzinomzellen mit α Lox-Cy5.5 nachweisbar ist. Dabei liegt die maximale Signalintensität von α Lox-Cy5.5 im Tumor bei MDA-MB-231-Xenografts bei etwa 2000 nc und bei BT474-Xenografts bei etwa 500 nc. Die IgG-Vio747-Kontrolle erreicht im Tumor maximal nur 50 nc in beiden Tumormodellen

(Abb. 3.3.4.2.2). Somit ist die Bindung von α Lox-Cy5.5 an Lox-exprimierende Tumorzellen spezifisch. Abb.3.3.4.2.1C zeigt, dass die Intensität des Tumorsignals von α Lox-Cy5.5 in MDA-MB-231-Xenografts ab 24 Stunden die Intensität des Lebersignals überschreitet. Für α EpCAM-Cy5.5 und α EpCAM-Vio680 war dies in keinem Tumormodell der Fall (Vgl. 3.3.4.1). Das Lebersignal erreichte in beiden Tumormodellen sein Maximum nach 4-6 Stunden, was mit α EpCAM-Cy5.5 und α EpCAM-Vio680 vergleichbar ist.

3.3.5 Analyse der Biodistribution der verwendeten Antikörper und Fluorophore

Wie Kapitel 3.3.4 gezeigt hat, akkumulieren NIRF-Proben in hohem Maß in der Leber. Außer bei α Lox-Cy5.5 in MDA-MB-231-Xenografts (Abb.3.3.4.2.1) lag die Signalintensität der NIRF-Proben in der Leber immer über der Signalintensität der NIRF-Proben im Tumor. Nun wurde die Verteilung der NIRF-Proben in Leber bzw. Tumorgewebe systematisch untersucht, um einen Index zur Biodistribution der NIRF-Proben zu erstellen. Es sollte herausgearbeitet werden, ob es Abhängigkeiten zwischen der Biodistribution der NIRF-Proben und dem Tumormodell (Mammakarzinom oder Pankreaskarzinom), dem Transplantationsbereich (orthotop oder subkutan) und der jeweiligen NIRF-Probe gibt. Dabei erwies sich als problematisch, dass die anatomische Nähe des Pankreas zur Leber bei orthotop transplantierten Pankreaskarzinomzellen zu Signalüberschneidungen der NIRF-Proben in Tumor und Leber führt. Im subkutanen Pankreaskarzinommodell bzw. im Mammakarzinommodell unabhängig vom Transplantationsort liegen Tumor und Leber weit genug auseinander, sodass es nicht zu Signalüberschneidungen kommt. Diese Problematik macht eine Analyse der Bindungskinetik in lebernahen Tumoren wie dem orthotopen Pankreaskarzinom mittels NIRF-Proben in der optischen Bildgebung bei tumortragenden Nacktmäusen unmöglich.

Abb.3.3.5.1.1 veranschaulicht die dargestellte Problematik. Gezeigt sind repräsentative Bilder zweier tumortragender Nacktmäuse mit PancTu-I-CBRL-Xenografts im IVIS. Das IVIS detektiert ähnlich wie das Optix MX2 die Fluoreszenzsignale (Flu) von NIRF-Proben. Zusätzlich detektiert das IVIS über einen anderen Kanal Biolumineszenz (BL). PancTu-I-CBRL-Zellen exprimieren Luciferase. Dieses Enzym spaltet Luciferin, welches vor der Messung injiziert wurde, und erzeugt so ein Signal, das mithilfe der Biolumineszenz-Kamera des IVIS detektiert werden kann. Der Maus in A) wurden 40 μ g α EpCAM-Cy5.5 intravenös injiziert. Der Maus in B) wurde 25 μ g α CD44-Cy5.5 injiziert. α CD44-Cy5.5 wurde in Versuchen der Arbeitsgruppe (nicht gezeigt, unveröffentlicht) zur optischen Bildgebung im

PancTu-I-CBRL-Tumormodell etabliert. Die Overlays *in vivo* bzw. *ex vivo* zeigen gleichzeitig Fluoreszenz- und Biolumineszenzsignale. Durch die Aufnahme der NIRF-Proben in die Leber war es allein mithilfe der Fluoreszenz-Kamera nicht möglich, den Tumor zu lokalisieren, da das Signal der NIRF-Proben in Leber und Tumor verschmolzen und somit eine Abgrenzung der beiden nicht möglich war. Nur durch Hinzuschalten des Biolumineszenzsignals der Luciferase-exprimierenden PancTu-I-CBRL Zellen (siehe Overlay) war eine Abgrenzung zwischen Tumor und Leber möglich.

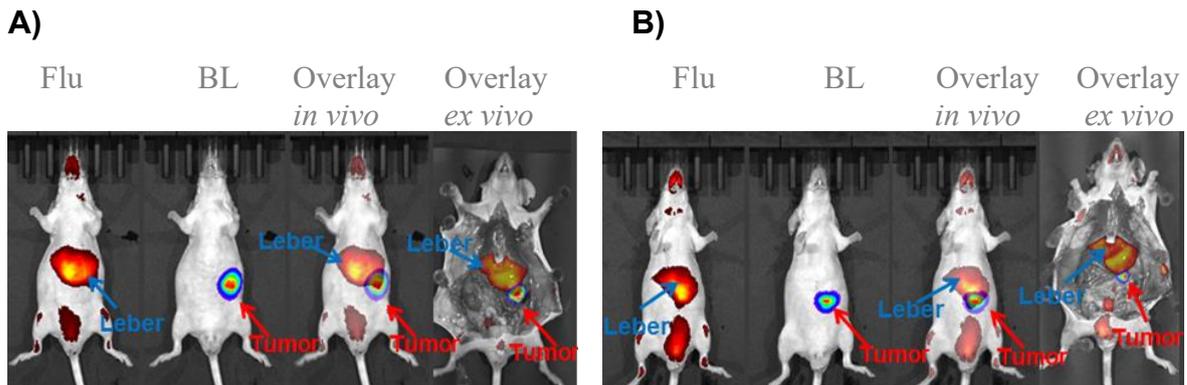
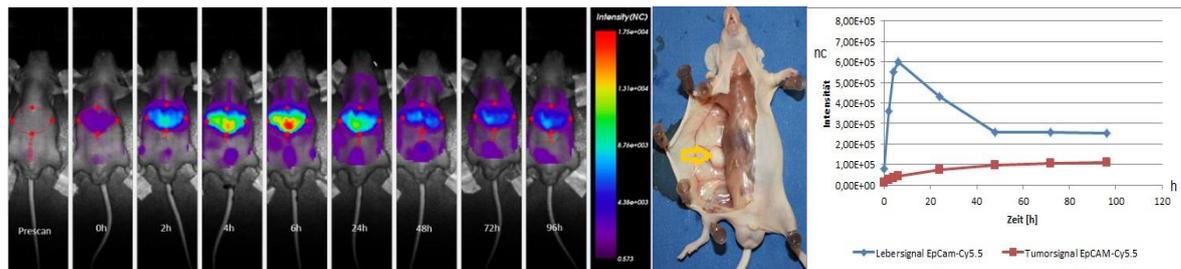


Abb. 3.3.5.1.1 Überlagerung Fluoreszenzsignale der NIRF-Proben aus Tumor und Leber im orthotopen PancTu-I-CBRL-Xenograft-Modell 96 Stunden nach Injektion

Gezeigt sind repräsentative Bilder zweier Nacktmäuse mit orthotopen PancTu-I-CBRL-Pankreaskarzinom-Xenografts im IVIS. Die Messung erfolgte 96h nach Injektion von 40 μg $\alpha\text{EpCAM-Cy5.5}$ (A) bzw. 25 μg $\alpha\text{CD44-Cy5.5}$ (B) in Fluoreszenz (Flu) zur Detektion des Signals der NIRF-Proben. Mittels Fluoreszenz alleine ist keine Unterscheidung der Signale der NIRF-Proben aus der Leber bzw. aus den orthotopen Pankreaskarzinom-Xenografts zu erkennen. Da PancTu-I-CBRL-Zellen Luciferase exprimieren, können die Tumorzellen nach Injektion von Luciferin mit der Biolumineszenz-Kamera (BL) des IVIS detektiert werden. Die Overlays zeigen gleichzeitig Biolumineszenz- und Fluoreszenzsignale. Dabei wird deutlich, dass sich das Biolumineszenz-Signal der PancTu-I-CBRL-Zellen mit dem Signal der NIRF-Proben aus Leber und Tumor überschneidet. Ohne das Biolumineszenzsignal wäre eine Differenzierung von Tumorgewebe und Leber im orthotopen Pankreaskarzinommodell mittels NIRF-Proben in Fluoreszenz-Bildgebung alleine nicht möglich.

Um Abhängigkeiten der jeweiligen NIRF-Probe bezüglich der Bindungskinetik in Tumor und Leber zu identifizieren, wurde $\alpha\text{EpCAM-Cy5.5}$ und $\alpha\text{CD44-Cy5.5}$ im subkutanen PancTu-I-CBRL-Xenograft-Modell miteinander verglichen (Gleiches Xenograft-Modell, unterschiedliche NIRF-Probe). Der Transplantationsort war eine subkutane Stelle am Rumpf der Mäuse in hinreichender Entfernung zur Leber. Als Kontrolle wurde gleichzeitig IgG-Vio747 injiziert. Dieser wies die Bindung der NIRF-Proben als spezifisch aus (Bilder nicht gezeigt). Abb.3.3.5.1.2 zeigt, dass im selben Tumormodell mit subkutanen PancTu-I-CBRL-Xenografts beide NIRF-Proben, $\alpha\text{EpCAM-Cy5.5}$ und $\alpha\text{CD44-Cy5.5}$, das Maximum ihrer Signalintensität in der Leber bei 4-6 Stunden erreichen. Für beide NIRF-Proben gilt, dass das Signal aus dem Tumor das Lebersignal zu keinem Zeitpunkt überschreitet.

A) α EpCAM-Cy5.5 in subkutanem PancTu-I-CBRL-Xenograft



B) α CD44-Cy5.5 in subkutanem PancTu-I-CBRL-Xenograft

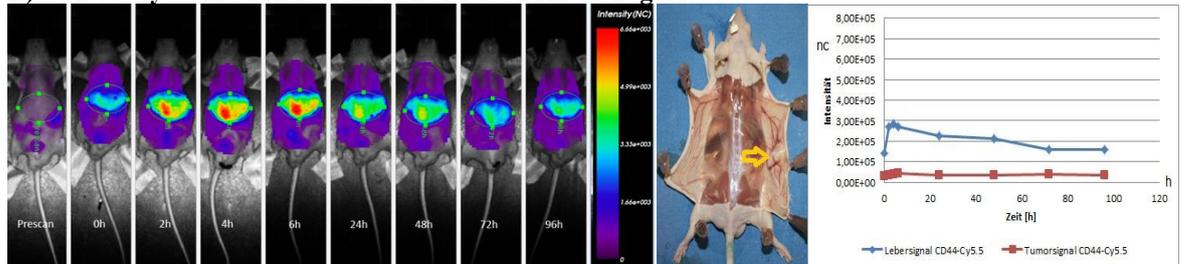


Abb. 3.3.5.1.2 Vergleich des Bindungsverhaltens von α EpCAM-Cy5.5 und α CD44-Cy5.5 *in vivo* in subkutanen PancTu-I-CBRL-Xenografts über die Zeit

Gezeigt sind repräsentative Bilder. Dargestellt sind Ventralscans gesamten Rumpfes der tumortragenden Nacktmäuse mit PancTu-I-CBRL-Xenografts bei 670nm mit dem Optix MX 2 zur Detektion des Signals der NIRF-Proben über die Zeit. A): 40 μ g α EpCAM-Cy5.5 (n=4) B): 25 μ g α CD44-Cy5.5 (n=4). Bar: Intensität des gemessenen Signals, rot = starkes Signal, violett = schwaches Signal). Die Skalen aller gezeigten Scans sind zueinander normalisiert. Prescan: Messung vor Injektion der NIRF-Proben, wurde von folgenden Scans abgezogen. Foto, Mitte: Der gelbe Pfeil zeigt jeweils auf den subkutanen Tumor im Sektionspräparat. Koordinatensysteme, rechts: Die Abszisse gibt die Zeit in Stunden (h) an. Die Ordinate zeigt die Signalintensität in Normalized Counts (nc). Das Lebersignal (blauer Graph) überstieg zu jedem Zeitpunkt das Tumorsignal (roter Graph) und hatte sein Maximum bei etwa 4-6 Stunden unabhängig von der verwendeten NIRF-Probe.

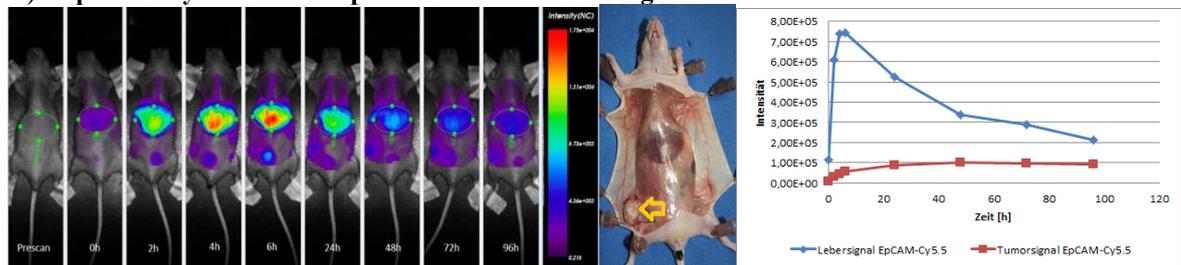
Um Abhängigkeiten des Tumormodells (Mammakarzinom bzw. Pankreaskarzinom) und des Transplantationsmodus (orthotop bzw. subkutan) auf die Bindungskinetik der NIRF-Proben zu identifizieren, wurden vier verschiedene Xenograft-Modelle untersucht:

A) MDA-MB-231	Mammakarzinom	Orthotop transplantiert
B) PancTu-I-CBRL	Pankreaskarzinom	Subkutan transplantiert
C) PancTu-I-CBRL	Pankreaskarzinom	Orthotop transplantiert
D) Apsc1	Pankreaskarzinom	Orthotop transplantiert

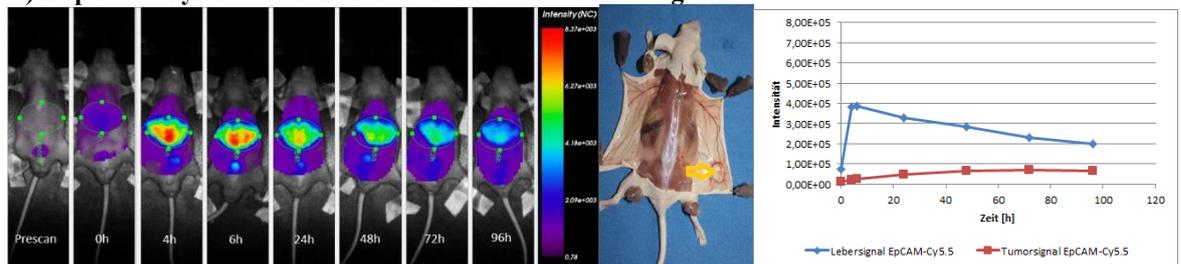
Dabei wurde jeweils die gleiche NIRF-Probe α EpCAM-Cy5.5 in allen Modellen verwendet (Gleiche NIRF-Probe, unterschiedliche Xenografts). Abb.3.3.5.1.3 zeigt repräsentative Bilder der Bindungskinetik von α EpCAM-Cy5.5 in den vier verschiedenen Xenograft-Modellen. Die gezeigten Daten sind alle zueinander normalisiert. α EpCAM-Cy5.5 akkumuliert unabhängig vom Xenograft-Modell rasch nach Injektion in der Leber und erreicht dort seine maximale Signalintensität nach 4-6 Stunden. Für die Leber-fernen Tumoren, A) und B), überschreitet das Signal der NIRF-Probe aus dem Tumor zu keinem Zeitpunkt das Signal aus der Leber. Für die orthotopen Pankreastumoren lässt sich, wie zuvor

beschrieben, das Signal aus dem Tumor nicht von dem aus der Leber differenzieren. Dadurch konnten die gemessenen Normalized Counts für C) und D) statistisch nicht korrekt ausgewertet werden, was sich in den Graphen der Tumorsignale (rot, C und D) zeigt.

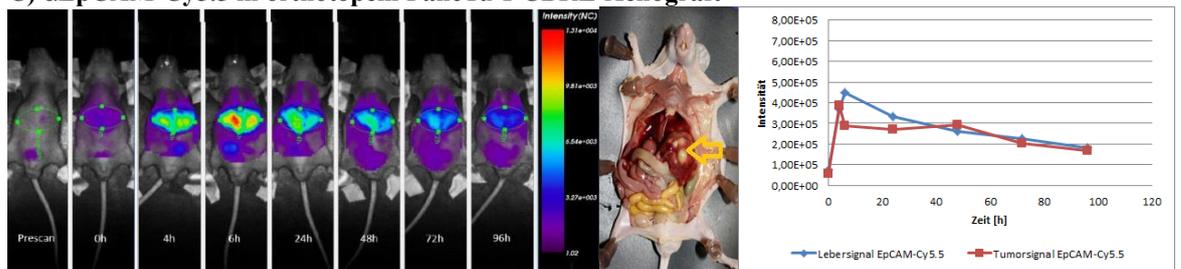
A) α EpCAM-Cy5.5 in orthotopem MDA-MB-231-Xenograft



B) α EpCAM-Cy5.5 in subkutanem PancTu-I-CBRL-Xenograft



C) α EpCAM-Cy5.5 in orthotopem PancTu-I-CBRL-Xenograft



D) α EpCAM-Cy5.5 in orthotopem Aspc1-Xenograft



Abb. 3.3.5.1.3 Vergleich der Bindungskinetik von α EpCAM-Cy5.5 in vier verschiedenen Xenograft-Modellen

Gezeigt sind repräsentative Bilder. Ventral-scans des gesamten Rumpfes der tumortragenden Nacktmäuse, denen jeweils 40 μ g α EpCAM-Cy5.5 injiziert wurde. Aufnahmen mit Optix MX2 bei 670nm über 96 Stunden. A) orthotopes MDA-MB-231-Xenograft (n=4) B) subkutaner PancTu-I-CBRL-Xenograft (n=4) C) orthotopes PancTu-I-CBRL-Xenograft (n=2) D) orthotopes Aspc1-Xenograft (n=2) Bar: Intensität des gemessenen Signals, rot = starkes Signal, violett = schwaches Signal). Die Skalen aller gezeigten Scans sind zueinander normalisiert. Prescan: Messung vor Injektion der NIRF-Proben, wurde von folgenden Scans abgezogen. Foto, Mitte: Der gelbe Pfeil zeigt jeweils auf den subkutanen Tumor im Sektionspräparat. Koordinatensysteme, rechts: Die Abszisse gibt die Zeit in Stunden (h) an. Die Ordinate zeigt die Signalintensität in Normalized Counts (nc). Für A) und B) gilt: Die NIRF-Probe α EpCAM-Cy5.5 akkumuliert rasch nach Injektion in der Leber und erreichte seine maximale Signalintensität dort nach 4-6 Stunden. Das Signal aus dem Tumor überschreitet zu keinem Zeitpunkt das Lebersignal. C) und D): Die anatomische Nähe der orthotopen Pankreaskarzinom-Xenografts zur Leber machte bei beiden orthotopen Modellen eine Trennung zwischen Lebersignal und Tumorsignal unmöglich.

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass alle untersuchten NIRF-Proben unabhängig vom gewählten Tumormodell (Mamma- oder Pankreaskarzinom), Transplantationsmodus (orthotop oder subkutan) und der injizierten Menge rasch in der Leber akkumulieren und dort ihr maximales Signal nach 4-6 Stunden erreichen. Abb. 3.3.5.1.4 zeigt den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzsignale der NIRF-Proben in der Leber in allen verwendeten Tumormodellen. Auch eine Variation des konjugierten Fluorophors, Vio680 oder Cy5.5, änderte die Aufnahme der NIRF-Proben in die Leber nicht (Vgl. 3.3.4.1). Die Applikation einer größeren Menge der NIRF-Proben ließ zwar die Signalintensität insgesamt steigen, dadurch konnte aber keine Sättigung der Leber zugunsten einer höheren Signalintensität im Tumoreal erreicht werden.

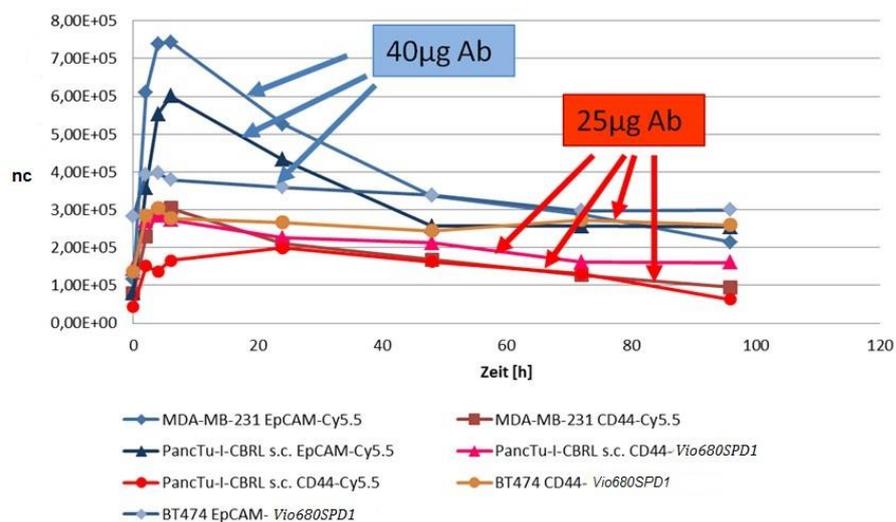


Abb. 3.3.5.1.4 Zeitlicher Verlauf des Lebersignals von NIRF-Proben in allen untersuchten Tumormodellen

Die Grafik fasst die bisher gezeigten Ergebnisse zur Bindungskinetik für α EpCAM-Cy5.5 bzw. α EpCAM-Vio680 und α CD44-Cy5.5 bzw. α CD44-Vio680 zusammen. Die Abszisse gibt die Zeit in Stunden (h) an, die Ordinate zeigt die Signalintensität in Normalized counts (nc). Unabhängig vom verwendeten Antikörper (α EpCAM oder α CD44), dem konjugierten Fluorophor (Cy5.5 oder Vio680), dem zugrundeliegenden Tumormodell (Mamma- oder Pankreaskarzinom), der verwendeten Karzinomzelllinie oder dem Transplantationsmodus (orthotop bzw. subkutan) erreichte die Signalintensität der NIRF-Proben in der Leber immer bei 4-6 Stunden ihr Maximum und fiel dann kontinuierlich über den Beobachtungszeitraum ab.

Basierend auf den Daten zur Verteilung der NIRF-Proben zwischen Tumor und Leber wurde ein Index erstellt, der anzeigt, wieviel Prozent der jeweiligen NIRF-Probe zu einem bestimmten Zeitpunkt in Leber bzw. im Tumor vorliegen. Die Biodistribution der NIRF-Proben wurde so zum Zeitpunkt der maximalen Signalintensität in der Leber und der maximalen Signalintensität im Tumorgewebe rechnerisch bestimmt. Dazu diente folgende Formel:

$$\frac{A}{A + B} * 100\% = x\%$$

A: Signalintensität der NIRF-Probe im Tumor in nc – Prescan des Tumorareals in nc

B: Signalintensität der NIRF-Probe in der Leber in nc – Prescan der Leber in nc

A+B: Gesamtes Signal der NIRF-Probe in einer tumortragenden Nacktmaus in nc

X: prozentualer Anteil des Signals der NIRF-Probe im Tumor am gesamten Signal

1-X: prozentualer Anteil des Signals der NIRF-Probe in der Leber am gesamten Signal

Die maximale Signalintensität von Tumorgewebe und Leber wurde jeweils durch Subtrahieren des Prescan-Wertes bereinigt, um Hintergrundrauschen zu eliminieren. Die Summe aus der maximalen Signalintensität der NIRF-Probe in der Leber und des Tumorgewebes zu einem definierten Zeitpunkt ergibt die totale Signalintensität der NIRF-Probe im Versuchstier. Der Quotient aus Signalintensität des Tumors und totaler Signalintensität ergibt dann den prozentualen Anteil der Signalintensität des Tumors an der totalen Signalintensität. Abb. 3.3.5.1.5 zeigt die Biodistribution der NIRF-Proben α EpCAM-Cy5.5 und α CD44-Cy5.5. Die Signalintensität der NIRF-Proben in der Leber war jederzeit höher als die der NIRF-Proben im Tumorgewebe, selbst zum Zeitpunkt des stärksten Tumorsignals. Zum Zeitpunkt des stärksten Lebersignals, 4-6 Stunden nach intravenöser Injektion der NIRF-Proben, akkumulierten 90% der NIRF-Proben in der Leber. Zum Zeitpunkt des stärksten Tumorsignals akkumulierten etwa 22-28% der NIRF-Proben im Tumorgewebe. Dies galt, wie zuvor gezeigt, unabhängig von hier genutzten Tumormodellen, Art der Implantation oder den genutzten NIRF-Proben.

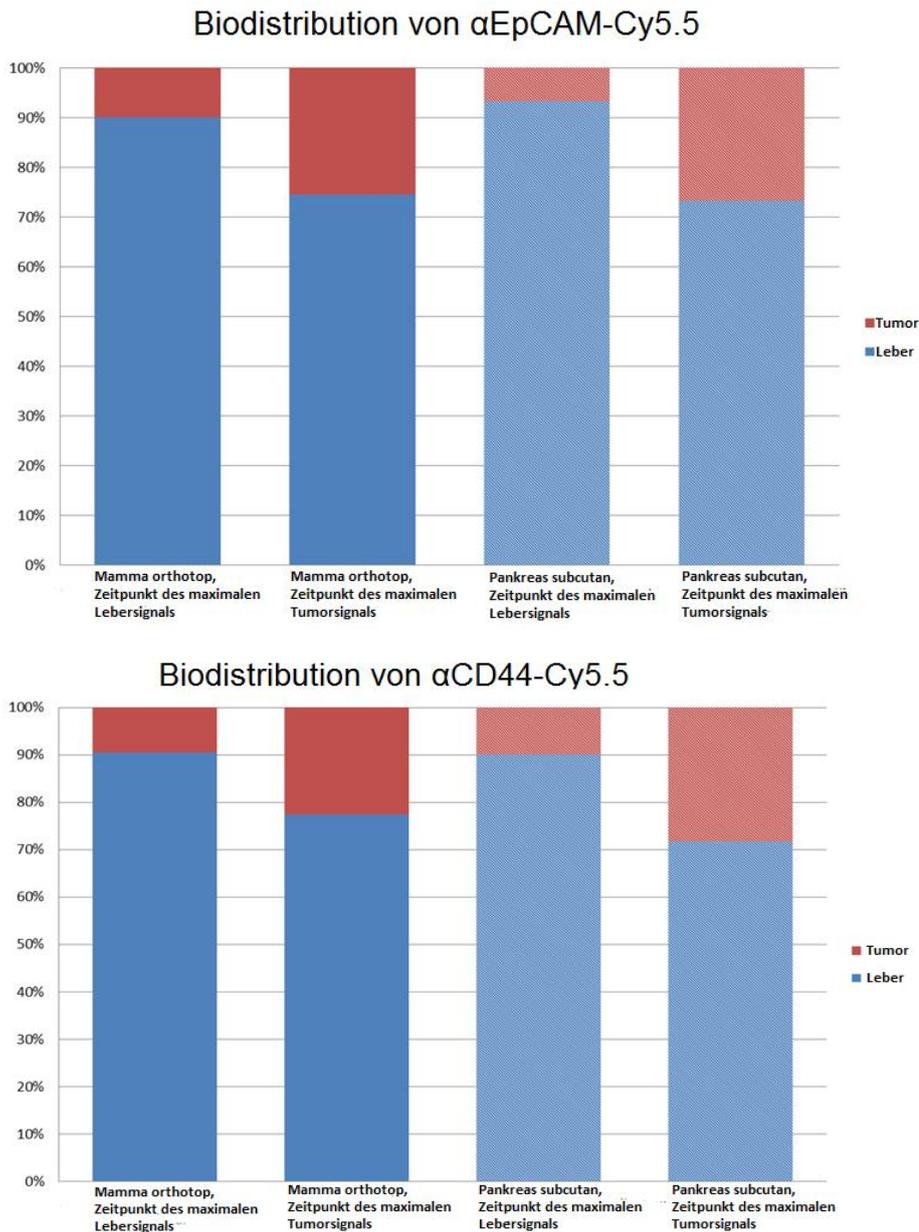


Abb. 3.3.5.1.5 Biodistribution von α EpCAM-Cy5.5 und α CD44-Cy5.5 im Vergleich

Die Grafik zeigt die Verteilung von α EpCAM-Cy5.5 (oben) und α CD44-Cy5.5 (unten) entweder im orthotopen Mammakarzinommodell oder im subkutanen Pankreaskarzinommodell zum Zeitpunkt des maximalen Lebersignals (4-6 Stunden nach intravenöser Applikation der NIRF-Proben) und zum Zeitpunkt des maximalen Tumorsignals (24 Stunden nach Applikation). Es ist zu erkennen, dass das Signal der NIRF-Proben in der Leber stets höher war als das Signal im Tumor, auch zu dem Zeitpunkt, an dem das Tumorsignal seine maximale Intensität erreicht hatte. Zum Zeitpunkt der maximalen Signalintensität der NIRF-Proben in der Leber akkumulierten dort mindestens 90% der NIRF-Proben und nur maximal 10% im Tumor. Zum Zeitpunkt der maximalen Signalintensität der NIRF-Proben im Tumor akkumulierten dort maximal 22-28% der NIRF-Proben.

3.4 Invasionsverhalten und EpCAM-Expression von Mammakarzinomzellen *in vitro* unter Einfluss von Chemotherapie

3.4.1 Chemotherapie hemmt die Proliferation von MDA-MB-231, BT474 und MCF-7 und reduziert die Zahl vitaler Tumorzellen in 2D-Zellkultur

Um das Wachstum und den EpCAM-Expressionsstatus von Mammakarzinomzellen *in vitro* in einer 2D-Zellkultur unter Einfluss von Chemotherapie zu beobachten, wurden drei Zelllinien ausgewählt, die sich in ihrer Teilungsrate und EpCAM-Expression auf Proteinebene unterscheiden: MDA-MB-231-Zellen (hohe Teilungsrate, keine EpCAM-Expression), MCF-7-Zellen (mittlere Teilungsrate, mittlere EpCAM-Expression) und BT474-Zellen (niedrige Teilungsrate, hohe EpCAM-Expression). Diese Karzinomzellen wurden in Wells ausgesät. Jeweils eine Gruppe erhielt Chemotherapie nach CAF-Schema (s.u.) über 24 Stunden, eine über 48 Stunden, eine über 72 Stunden. Eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Anschließend wurde die Zahl vitaler Zellen pro Well bestimmt. Die Chemotherapie erfolgte mit Cyclophosphamid (2µg/Well), Adriamycin (0,2µg/Well) und 5-Fluoruracil (1µg/Well) und wurde einmalig pro Well verabreicht. Abb. 3.4.1.1 zeigt, dass Karzinomzellen mit einer hohen Teilungsrate (MDA-MB-231 > MCF-7 > BT474) initial höhere Zahlen vitaler Zellen erreichten, allerdings auch durch die in den Zellzyklus eingreifende CAF-Chemotherapie stärker beeinflusst wurden. Das zeigte sich vor allem im Vergleich zwischen den unbehandelten Kontrollen von MDA-MB-231-Zellen (A, blau) und MDA-MB-231-Zellen, die über 72 Stunden mit Chemotherapie behandelt wurden (A, gelb, CAF-72h). Die Zahl vitaler MDA-MB-231-Karzinomzellen war nach vollen 72 Stunden Inkubation mit CAF-Chemotherapie um etwa die Hälfte reduziert im Vergleich zur Kontrolle. Bei den langsam wachsenden BT474 (C) war dies nicht der Fall, da die Zellen den Zellzyklus langsamer durchschreiten (Verdopplungszeit etwa 90 Stunden) und somit der CAF-Chemotherapie weniger Möglichkeit zur Wirkungsentfaltung gaben. MCF-7 (B) nahm eine Zwischenstellung mit einer moderaten Teilungsrate ein und zeigte wie MDA-MB-231 eine Reduktion vitaler Karzinomzellen um die Hälfte der Zahl nach 72h CAF-Chemotherapie. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und lieferte jedes Mal das gleiche Ergebnis. In 2D-Zellkultur bewirkt eine Chemotherapie nach CAF-Schema in der gewählten Dosierung in allen drei Karzinomzelllinien eine Reduktion der Anzahl vitaler Zellen, die mit steigender Inkubationsdauer zunimmt.

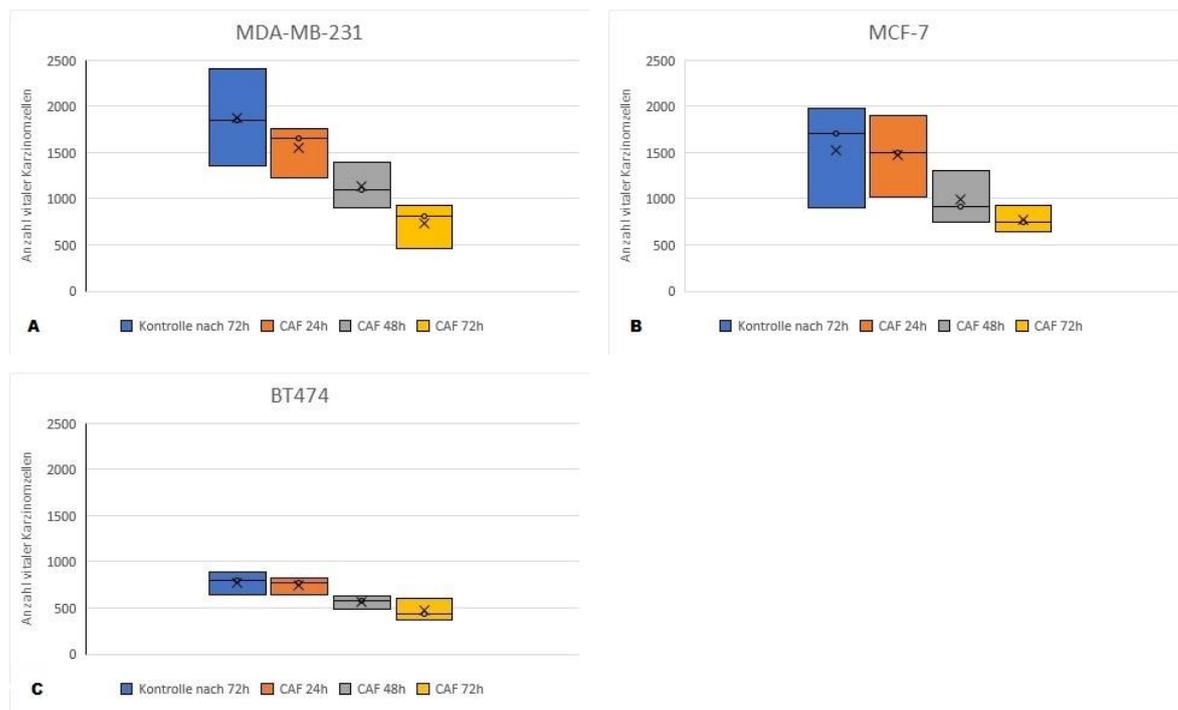


Abb. 3.4.1.1 Reduktion der Anzahl vitaler Karzinomzellen der Mammakarzinomzelllinien BT474, MCF-7 und MDA-MB-231 durch CAF-Chemotherapie über die Zeit in 2D Zellkultur

Die Grafiken zeigen schematisch die Reduktion vitaler Tumorzellen durch CAF-Chemotherapie über einen Beobachtungszeitraum von 72 Stunden in absoluten Zellzahlen gemittelt aus dreimaligem Durchführen des Versuchs. A: MDA-MB-231, B: MCF-7, C: BT474. Dabei erhielt jeweils eine Gruppe CAF-Chemotherapie einmalig mit einer Einwirkzeit von 24 Stunden (orange) bzw. 48 Stunden (grau) bzw. 72 Stunden (gelb). Jeweils eine nicht mit CAF-Chemotherapie behandelte Kontrollgruppe (blau) wurde zum Ende des Beobachtungszeitraums von 72 Stunden ausgezählt. Alle drei Modelle zeigten einen Verlust vitaler Tumorzellen durch die CAF-Chemotherapie über den Beobachtungszeitraum. Die Anzahl vitaler Tumorzellen wurde nach 72 Stunden Inkubation mit CAF-Chemotherapie in allen drei Zelllinien um etwa die Hälfte reduziert im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe nach 72 Stunden. n=3

3.4.2 Einfluss von CAF-Chemotherapie auf die Expression von EpCAM in MDA-MB-231-, BT474- und MCF-7-Zellen über die Zeit

Die verbliebenen vitalen Karzinomzellen aus dem vorherigen Versuch wurden aus den Wells mittels Cytospin auf Objektträger übertragen und immunhistochemisch auf EpCAM bzw. Lox gefärbt. Dazu wurde ein ungekoppelter EpCAM-Antikörper (Maus, Klon 323-A3, Abcam) sowie AEC als Farbsubstrat verwendet. Die Gegenfärbung der Zellen erfolgte mit Hämalaun. Abb. 3.4.2.1 zeigt repräsentative Aufnahmen der Färbung von BT474-Zellen. Diese wuchsen in Zellhaufen, in welchen EpCAM stark exprimiert wurde. Die Intensität der EpCAM-Färbung auf BT474-Mammakarzinomzellen nahm mit der Dauer der Chemotherapie zu. Während die Kontrollgruppe eine schwache bis moderate Färbung zeigte (A), war eine graduelle Steigerung der Intensität der Färbung mit steigender Einwirkzeit der CAF-Chemotherapie nach 24 (B), 48 (C) und 72 (D) Stunden zu erkennen.

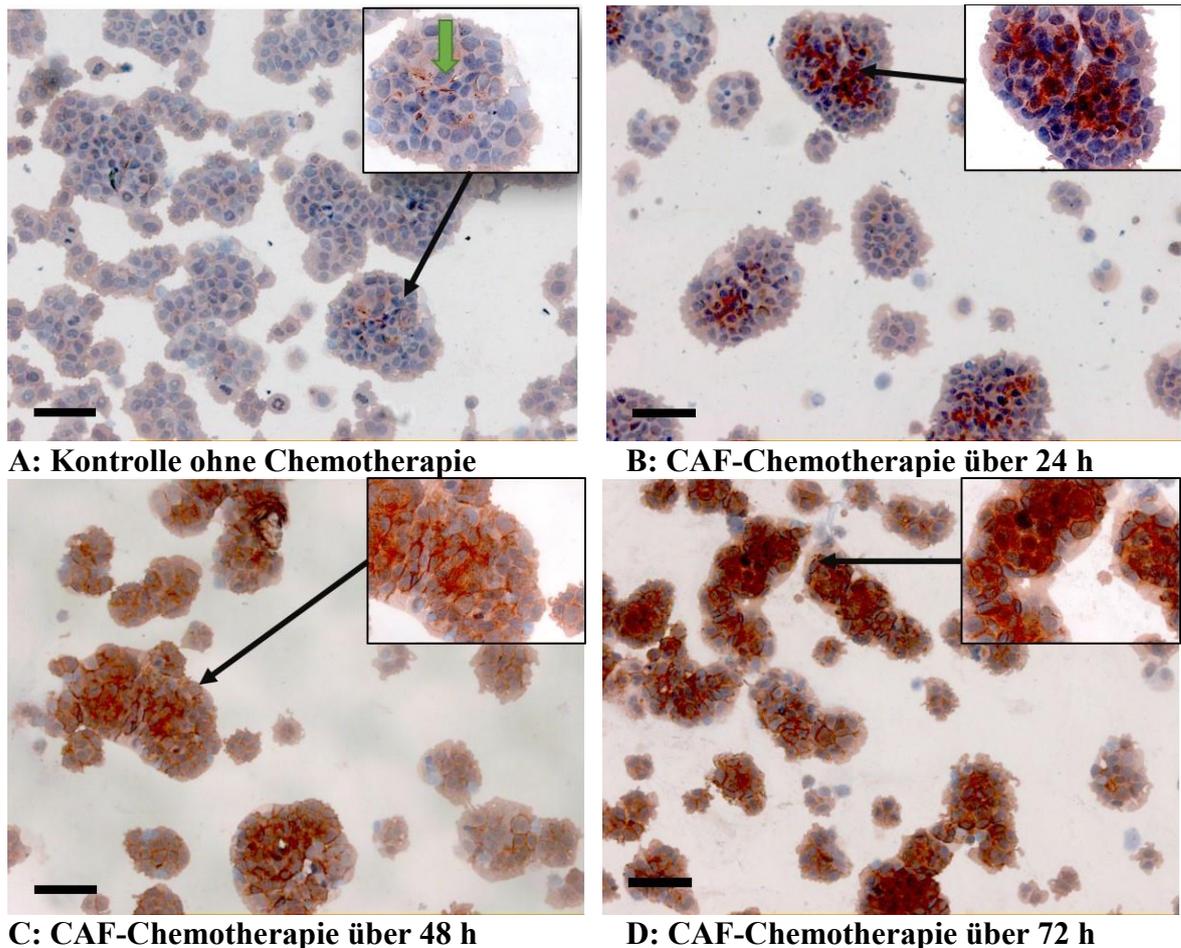


Abb. 3.4.2.1 Expressionsverhalten für EpCAM von BT474-Mammakarzinomzellen unter dem Einfluss von CAF-Chemotherapie über die Zeit

Gezeigt sind repräsentative Bilder vitaler BT474-Mammakarzinomzellen aus Versuchen unter Kapitel 3.4.1. IHC mit einem ungekoppelten EpCAM-Antikörper, AEC-Farbsubstrat und Gegenfärbung durch Hämalaun. A: Kontrolle ohne Chemotherapie; B: CAF-Chemotherapie einmalig gegeben und über 24 Stunden eingewirkt; C: CAF-Chemotherapie einmalig gegeben und über 48 Stunden eingewirkt; D: CAF-Chemotherapie einmalig gegeben und über 72 Stunden eingewirkt. Bild im Bild: 40-fache Vergrößerung. Die schwarzen Pfeile zeigen auf den Ausschnitt, der vergrößert wurde. Die Intensität der Färbung für EpCAM bei BT474-Mammakarzinomzellen nahm bei Gabe von CAF-Chemotherapie über die Zeit graduell zu. Die Kontrollgruppe (A) zeigte eine schwache bis moderate Färbung. Der grüne Pfeil weist exemplarisch auf Zell-Zell-Kontakte, an denen EpCAM stark exprimiert wird. Die Gruppen unter Chemotherapie-Einfluss (B, C, D) ließen eine Steigerung der Expression von EpCAM in Abhängigkeit von der Einwirkzeit der CAF-Chemotherapie bei BT474-Tumorzellen erkennen. Der grüne Pfeil in der vergrößerten Abbildung bei A zeigt auf Zell-Zell-Kontakte mit starker Anfärbung für EpCAM. Bar: 100 μ m; n=3

Abb. 3.4.2.2 zeigt die Ergebnisse der Färbung von MCF-7-Zellen auf EpCAM. Auch MCF-7-Tumorzellen zeigten eine Färbung für EpCAM. Dabei fiel auf, dass nicht alle Zellen angefärbt wurden. Es gab Zellgruppen, die in Kontakt mit ihren Nachbarzellen eine Färbung für EpCAM zeigten, während andere Zellgruppen dieses Verhalten nicht zeigten. Es zeigte sich im Vergleich der Untergruppen, dass die EpCAM-Expression von der Konfluenz der Zellen abhing. Vor allem nach 72 Stunden Einwirkzeit der CAF-Chemotherapie als nur noch wenige vitale MCF-7-Zellen verblieben waren und dementsprechend die Konfluenz des Zellrasens gering war mit nur wenigen Zell-Zell-Kontakten, war die Färbung für EpCAM schwach.

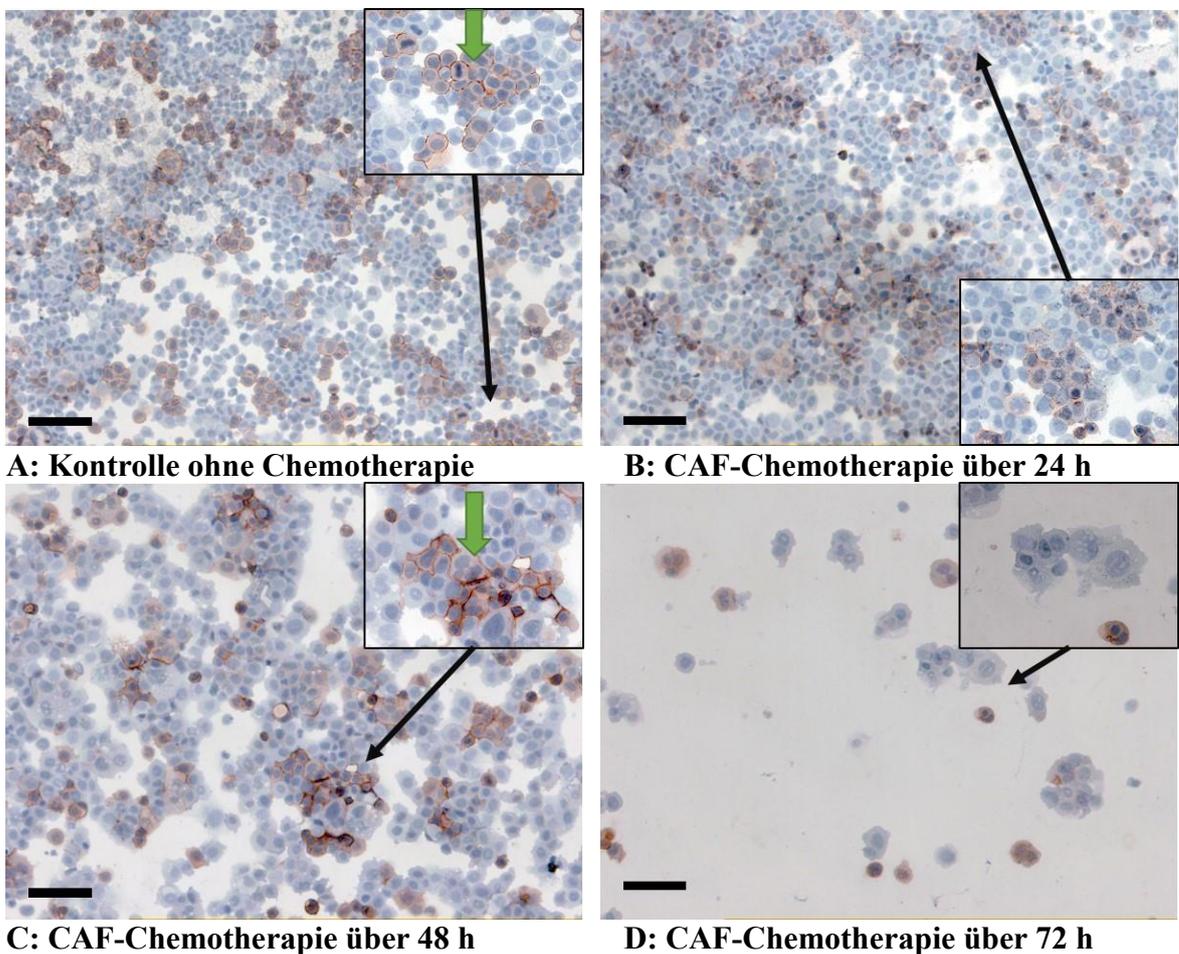


Abb. 3.4.2.2 Expressionsverhalten für EpCAM von MCF-7-Mammakarzinomzellen unter dem Einfluss von CAF-Chemotherapie über die Zeit

Gezeigt sind repräsentative Bilder vitaler MCF-7-Mammakarzinomzellen aus Versuchen unter Kapitel 3.4.1. IHC mit einem ungekoppelten EpCAM-Antikörper, AEC-Farbsubstrat und Gegenfärbung durch Hämalaun. A: Kontrolle ohne Chemotherapie; B: CAF-Chemotherapie einmalig gegeben und über 24 Stunden eingewirkt; C: CAF-Chemotherapie einmalig gegeben und über 48 Stunden eingewirkt; D: CAF-Chemotherapie einmalig gegeben und über 72 Stunden eingewirkt. Bild im Bild: 40-fache Vergrößerung. Die schwarzen Pfeile zeigen auf den Ausschnitt, der vergrößert wurde. MCF-7-Tumorzellen zeigten eine Färbung für EpCAM, die im Vergleich zu BT474-Tumorzellen schwächer ausfiel. Bei MCF-7-Tumorzellen zeigten nur einzelne Zellverbände eine Färbung für EpCAM, während andere ungefärbt blieben. War

der Zellrasen dicht (A, B) entstanden mehr Zell-Zell-Kontakte und somit mehr zeigten mehr Tumorzellen eine Färbung für EpCAM. Die grünen Pfeile weisen exemplarisch auf Zell-Zell-Kontakte, an denen EpCAM stark exprimiert wird. Bei aufgelockertem Zellrasen (C) durch das Absterben von Tumorzellen unter Chemotherapie über die Zeit nahmen auch die Zell-Zell-Kontakte, an denen eine EpCAM-Färbung entstehen konnte, ab; bei gänzlichem Verlust eines konfluierenden Zellrasens (D) zeigte sich nur noch eine geringe Färbung für EpCAM. Die Zellen erschienen hier lytisch, das Muster der EpCAM-Färbung war nicht mehr an Zell-Zell-Kontakten zu erkennen. Bar: 100 μm , n=3

Abb. 3.4.2.3 zeigt die Färbung von MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen für EpCAM. MDA-MB-231-Tumorzellen dienten hier als Kontrolle, da sie nur eine sehr schwache Expression von EpCAM aufwiesen. Eine Färbung für EpCAM ließ sich nur an sehr wenigen Stellen erkennen (beispielsweise Vergrößerung in B und C). Wie bei MCF-7-Tumorzellen nahm auch hier im Verlauf durch das Einwirken der CAF-Chemotherapie die Konfluenz des Zellrasens graduell ab. Bei D sind nach 72 Stunden lytische Tumorzellen mit pyknotischen Zellkernen zu erkennen.

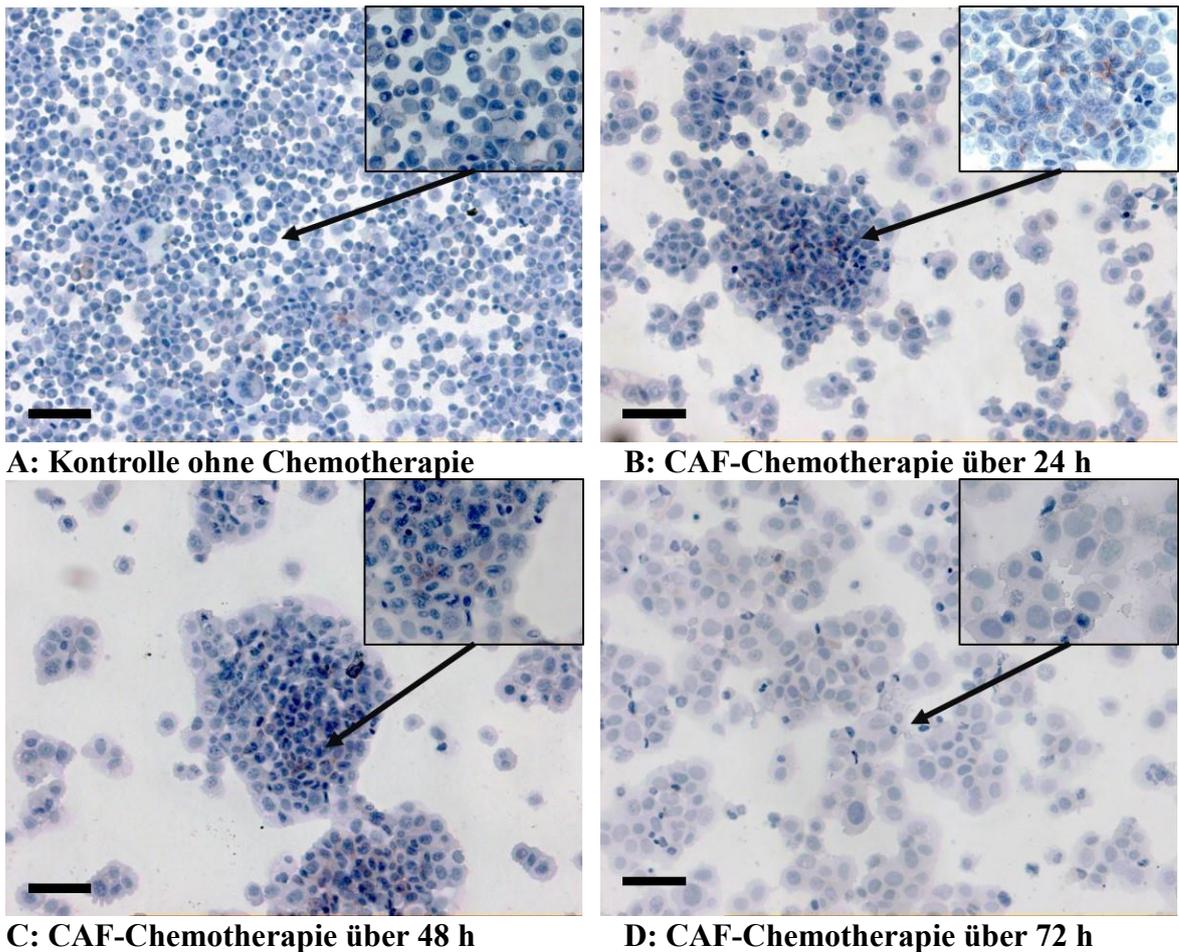


Abb. 3.4.2.3 Expressionsverhalten für EpCAM von MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen unter dem Einfluss von CAF-Chemotherapie über die Zeit

Gezeigt sind repräsentative Bilder vitaler MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen aus Versuchen unter Kapitel 3.4.1 IHC mit einem ungekoppelten EpCAM-Antikörper, AEC-Farbsubstrat und Gegenfärbung durch Hämalaun. A: Kontrolle ohne Chemotherapie; B: CAF-Chemotherapie einmalig gegeben und über 24 Stunden eingewirkt; C: CAF-Chemotherapie einmalig gegeben und über 48 Stunden eingewirkt; D: CAF-Chemotherapie einmalig gegeben und über 72 Stunden eingewirkt. Bild im Bild: 40-fache Vergrößerung. Die schwarzen Pfeile zeigen auf den Ausschnitt, der vergrößert wurde. MDA-MB-231-Tumorzellen zeigten keine Färbungen für EpCAM (Vergrößerung in B und C). Mit längerer Einwirkzeit der CAF-Chemotherapie nahm die Konfluenz des Zellrasens graduell ab. Bei D sind lytische Tumorzellen zu erkennen. Bar: 100 μm , n=3

3.4.3 CAF-Chemotherapie stimuliert das Invasionsverhalten von Mammakarzinomzellen in 3D-Zellkultur

Wie aus der klinischen Praxis bekannt ist, wachsen Tumore *in vivo* in dreidimensionalen statt zweidimensionalen Formationen. Um den Einfluss von Chemotherapie auf Zellen der Mammakarzinome MDA-MB-231, MCF-7 und BT474 dreidimensional zu beobachten und mit dem zweidimensionalen Modell zu vergleichen, wurden Zellen dieser Zelllinien im Cultrex 96 Well Sphäroid BME Cell Invasion Assay kultiviert und unter dem Mikroskop fotografiert.

Die Tumorzellen wurden dazu in eine dem Assay beiliegende Sphäroid-bildende Kollagen-Matrix eingefasst und von einer ebenfalls dem Assay entstammenden Invasionsmatrix umgeben. Innerhalb von drei Tagen formten die Tumorzellen dreidimensionale Sphäroide. Am vierten Tag wurde den Wells Medium und FBS hinzugefügt, um die Zellen zur Invasion durch die Matrix zu stimulieren und somit eine Invasion in vitalem Gewebe nachzuahmen. Pro Zelllinie erhielten jeweils drei Gruppen CAF-Chemotherapie mit einer Inkubationszeit über 24 (C), 48 (D) bzw. 72 (E) Stunden (s.u.). Als Kontrollen diente eine Gruppe ohne Chemotherapie (B) sowie eine Gruppe ohne Invasionsmatrix (A). Gemessen wurde die maximale Ausdehnung der Ausläufer der Tumorzellsphäroide (schwarze Linien in Abb.3.4.3.1-3.4.1.3) sowie die Kernfläche des Sphäroids (rote Linien in Abb.3.4.3.1-3.4.1.3). Abb. 3.4.3.1 zeigt repräsentative Bilder der Tumorzellsphäroide der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231. MDA-MB-231-Tumorzellen zeigten ein stark invasives Verhalten. Nur ein Fehlen der Invasionsmatrix (A) verhinderte die Ausbildung von Ausläufern bei MDA-MB-231-Sphäroiden. Die Chemotherapie war weder in der Lage, das Sphäroid in seiner Gesamtgröße zu verkleinern, noch die Invasion der Tumorzellen durch die Matrix zu unterbinden. Abb. 3.4.3.3 zeigt repräsentative Bilder der Tumorzellsphäroide der Mammakarzinomzelllinie MCF-7. MCF-7-Tumorzellsphäroide bildeten weniger Ausläufer als MDA-MB-231-Sphäroide. Auch bei MCF-7-Tumorzellsphäroiden war die Chemotherapie nach CAF-Schema nicht in der Lage, die Sphäroide zu verkleinern oder die Ausbildung von Ausläufern zu verhindern. Abb. 3.4.3.5 zeigt repräsentative Bilder der Tumorzellsphäroide der Mammakarzinomzelllinie BT474. Eine Bildung von Ausläufern der Tumorzellsphäroide war hier nicht zu beobachten. Nach Gabe von CAF-Chemotherapie über einen Zeitraum von 48 bzw. 72 Stunden verloren die BT474-Tumorzellsphäroide ihre gleichmäßige kugelförmige Oberfläche.

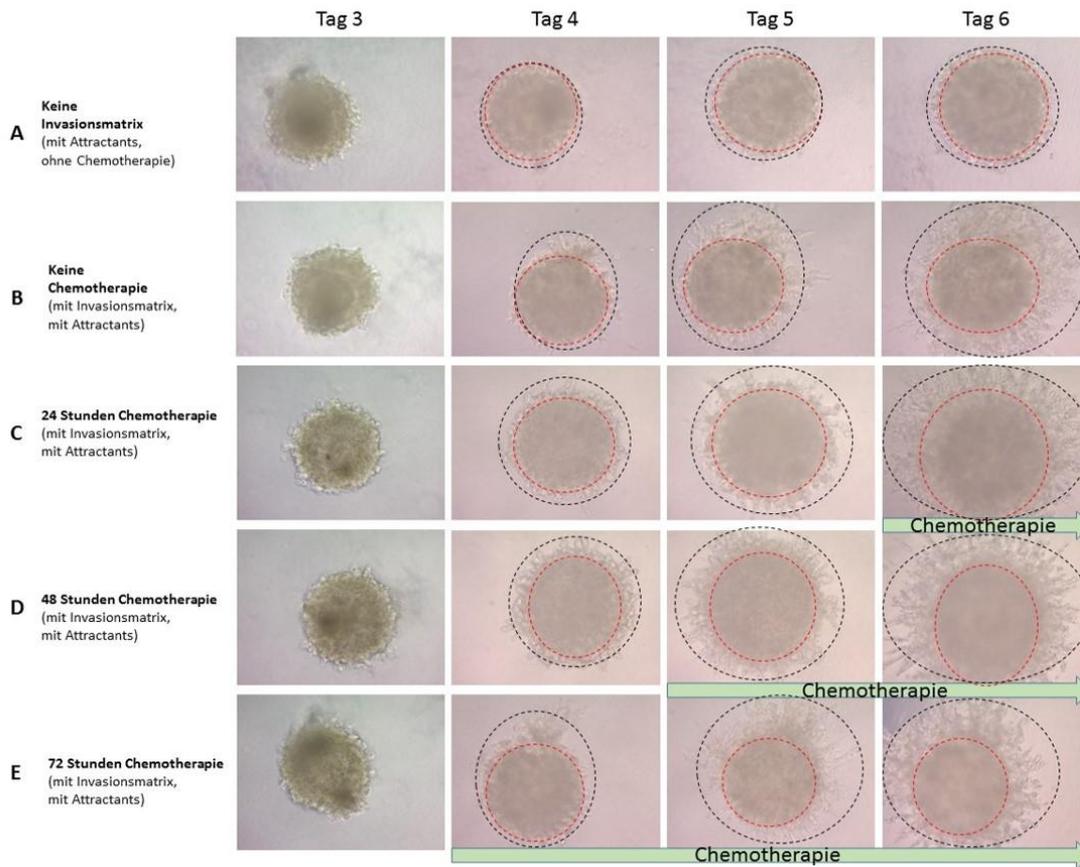


Abb. 3.4.3.1 Einfluss von CAF-Chemotherapie auf das Wachstum von MDA-MB-231-Tumorzellsphäroiden und die Ausbildung von Zellausläufern über die Zeit

Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen von MDA-MB-231-Tumorzellsphäroiden in einer kollagenhaltigen Matrix zu verschiedenen Zeiten. Den Sphäroiden wurde teilweise (B-E) eine Invasionsmatrix zugesetzt, die als Leitstruktur für die Ausbildung von Zellausläufern dienen sollte. Alle Gruppen (A-E) erhielten an Tag 4 Medium und FBS (Attractants), um ein Wachstum von Zellausläufern durch die Invasionmatrix zu stimulieren. Die grünen Pfeile zeigen die Einwirkdauer der einmalig gegebenen CAF-Chemotherapie an. Die roten Linien zeigen die Kernflächen der Tumorzellsphäroide. Die schwarzen Linien zeigen die maximale Ausdehnung der Zellausläufer der Tumorzellsphäroide. A: Kontrollgruppe ohne Chemotherapie und ohne Invasionsmatrix. Die Invasionsmatrix war minimal ohne Leitstruktur. B: Kontrollgruppe ohne Chemotherapie, aber mit Invasionsmatrix. Die Sphäroide bildeten Zellausläufer. C: CAF-Chemotherapie über die letzten 24 Stunden, D: Chemotherapie über die letzten 48 Stunden, E: Chemotherapie über die letzten 72 Stunden; C-E: Die CAF-Chemotherapie war nicht in der Lage, ein Wachstum des Sphäroidkerns oder die Ausbildung von Zellausläufern zu verhindern. Nach Gabe von Chemotherapie änderte sich das Verhältnis von Zellausläufern zu Kernfläche zugunsten der Zellausläufer (siehe Abb. 3.4.3.4). n=3

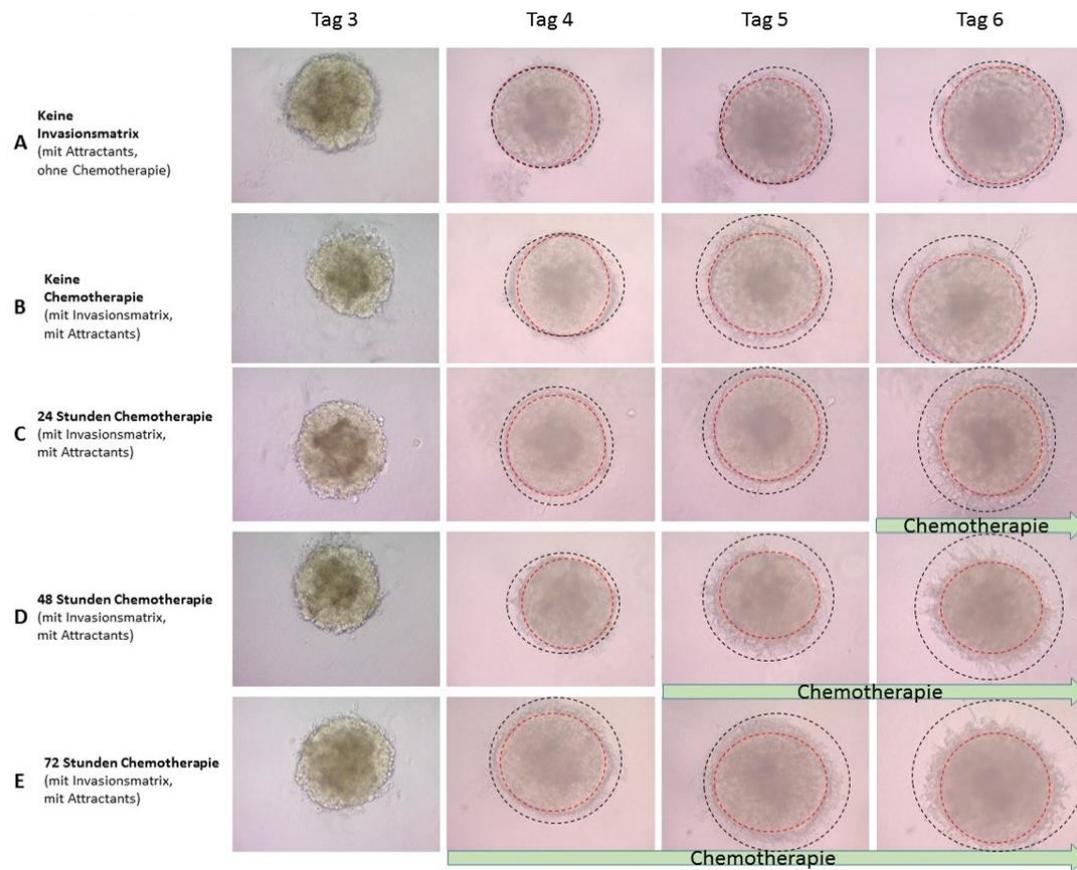


Abb. 3.4.3.2 Einfluss von CAF-Chemotherapie auf das Wachstum von MCF-7-Tumorzellsphäroiden und die Ausbildung von Zellausläufern über die Zeit

Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen von MCF-7-Tumorzellsphäroiden in einer kollagenhaltigen Matrix zu verschiedenen Zeiten. Den Sphäroiden wurde teilweise (B-E) eine Invasionsmatrix zugesetzt, die als Leitstruktur für die Ausbildung von Zellausläufern dienen sollte. Alle Gruppen (A-E) erhielten an Tag 4 Medium und FBS (Attractants), um ein Wachstum von Zellausläufern durch die Invasionmatrix zu stimulieren. Die grünen Pfeile zeigen die Einwirkdauer der einmalig gegebenen CAF-Chemotherapie an. Die roten Linien zeigen die Kernflächen der Tumorzellsphäroide. Die schwarzen Linien zeigen die maximale Ausdehnung der Zellausläufer der Tumorzellsphäroide. A: Kontrollgruppe ohne Chemotherapie und ohne Invasionsmatrix. Die Invasionsmatrix war minimal ohne Leitstruktur. B: Kontrollgruppe ohne Chemotherapie, aber mit Invasionsmatrix. Die Sphäroide bildeten Zellausläufer. Im Vergleich mit MDA-MB-231-Tumorzellsphäroiden (Abb. 3.4.3.1) war die Invasionsmatrix von MCF-7-Zellen geringer. C: CAF-Chemotherapie über die letzten 24 Stunden, D: Chemotherapie über die letzten 48 Stunden, E: Chemotherapie über die letzten 72 Stunden; C-E: Die CAF-Chemotherapie war nicht in der Lage, ein Wachstum des Sphäroidkerns oder die Ausbildung von Zellausläufern zu verhindern. Nach Gabe von Chemotherapie änderte sich das Verhältnis von Zellausläufern zu Kernfläche zugunsten der Zellausläufer so wie bei MDA-MB-231-Sphäroiden (siehe Abb. 3.4.3.5). n=3

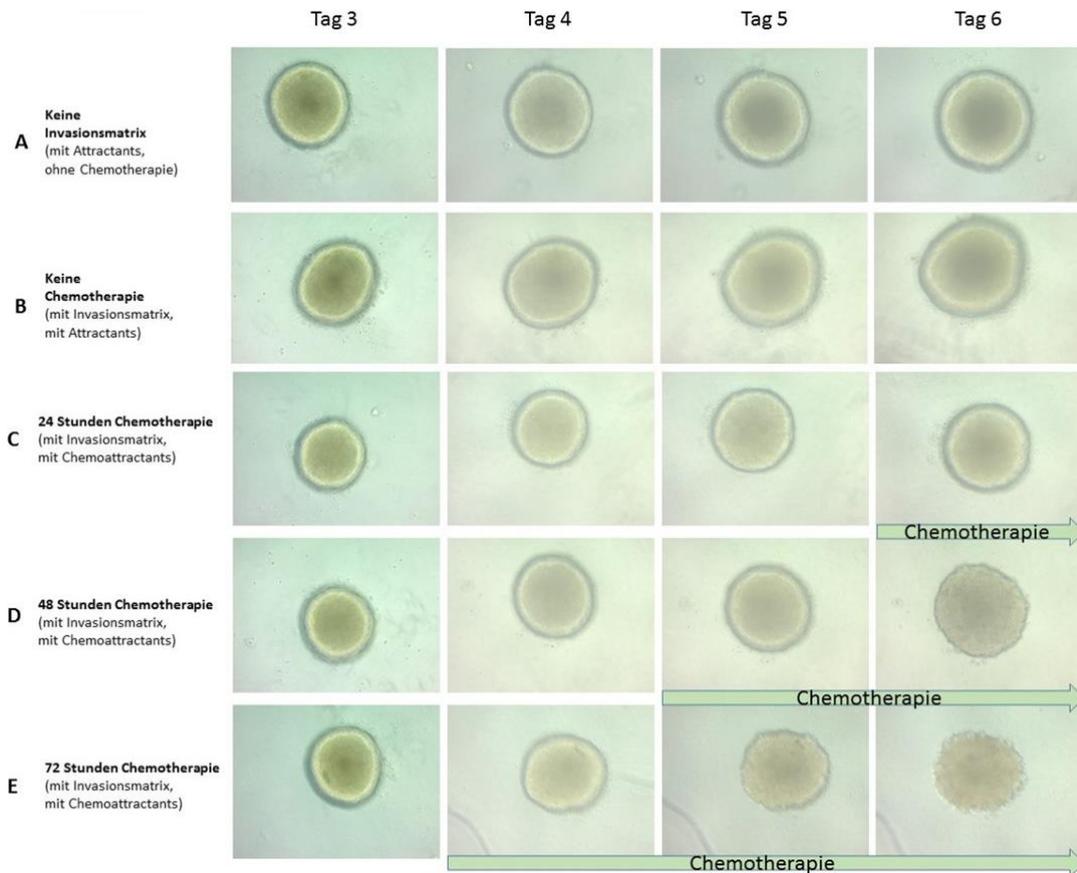


Abb. 3.4.3.3 Einfluss von CAF-Chemotherapie auf das Wachstum von BT474-Tumorzellsphäroiden und die Ausbildung von Zellausläufern über die Zeit

Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen von BT474-Tumorzellsphäroiden in einer kollagenhaltigen Matrix zu verschiedenen Zeiten. Den Sphäroiden wurde teilweise (B-E) eine Invasionsmatrix zugesetzt, die als Leitstruktur für die Ausbildung von Zellausläufern dienen sollte. Alle Gruppen (A-E) erhielten an Tag 4 Medium und FBS (Attractants), um ein Wachstum von Zellausläufern durch die Invasionmatrix zu stimulieren. Die grünen Pfeile zeigen die Einwirkdauer der einmalig gegebenen CAF-Chemotherapie an. BT474 zeigte keine Invasionstendenz und wurde als Negativkontrolle verwendet. A: Kontrollgruppe ohne Chemotherapie und ohne Invasionsmatrix. B: Kontrollgruppe ohne Chemotherapie, aber mit Invasionsmatrix. C: CAF-Chemotherapie über die letzten 24 Stunden, D: Chemotherapie über die letzten 48 Stunden, E: Chemotherapie über die letzten 72 Stunden; A-E: Es ließ sich bei keinem der Tumorzellsphäroide eine Invasionstendenz beobachten. Demnach wurde hier auf einen Vergleich der Verhältnisse zwischen Invasionsfläche und Kernfläche verzichtet. Nach längerem Einwirken von CAF-Chemotherapie (D, Tag 6; E Tage 5 und 6) verloren die BT474-Sphäroide ihre gleichmäßige runde Oberfläche. n=3

Die maximale Ausdehnung der Ausläufer der Tumorzellsphäroide (schwarze Linien) wurde in ein Verhältnis zur Kernfläche der Sphäroide (rote Linien) gesetzt, um einen Invasionsindex zu ermitteln. Damit lässt sich darstellen, wie invasiv die Tumorzellen vom

ursprünglichen Sphäroid aus die kollagenhaltige Matrix infiltrierten. Zur Berechnung wurde ein Quotient aus der Gesamtfläche, die durch dem Sphäroid zugehörige Zellen gebildet wurde, und der Kernfläche des Sphäroids bestimmt:

$$A(\text{gesamt}) / A(\text{Kernfläche}) = \text{Invasionsindex}$$

Dabei bedeutet ein Wert von 1, dass die Ausdehnung des Sphäroids gleich stark ansteigt wie sein Kern wächst bzw. dass keine Ausläufer der Tumorzellsphäroide gebildet werden. Ein Wert über 1 bedeutet, dass die Ausdehnung des Sphäroids mittels Ausläufern stärker steigt als der Kern des Sphäroids selbst wächst, d. h. dass die Tumorzellen eine vermehrte Invasionstendenz durch die Matrix zeigen. Da die Gesamtfläche des Sphäroids niemals kleiner als sein Kern sein kann, sind Werte unter 1 nicht möglich. Abb.3.4.3.4 zeigt die Invasionsindices der MDA-MB-231-Tumorzellsphäroide zu den jeweiligen Messzeitpunkten. Es konnte gezeigt werden, dass die Steigung der Graphen und damit der Invasionsindex nach Gabe von CAF-Chemotherapie zunahm (Abb. 3.4.3.4, rote Kästen). Dabei gilt es zu beachten, dass die gezeigten Werte Verhältnisse und nicht absolute Größen darstellen. Aufgetragen sind die Verhältnisse der Gesamtfläche der Sphäroide zu den Sphäroidkernen (Invasionsindex). In der Datentabelle ist dieser Effekt ersichtlich, indem man den Unterschied der Invasionsindices vor Chemotherapie und unmittelbar nach Gabe der Chemotherapie vergleicht (links und rechts der roten Grenze). Bei 24 Stunden Chemotherapie ergibt sich eine Änderung des Invasionsindex um 1,06 von 2,27 auf 3,33; bei 48 Stunden um 0,51 von ehemals konstanten 1,51 auf 2,02; bei 72 Stunden um 0,62 von 1,51 auf 2,13. Die größten Differenzen der Invasionsindices zeigten sich also jeweils direkt nach Gabe der Chemotherapie. So große Differenzen der Indices zwischen den einzelnen Messzeitpunkten waren sowohl vor der Gabe von Chemotherapie als auch nach längerem Einwirken der Therapie in den jeweiligen Reihen nicht zu beobachten. Abb.3.4.3.5 zeigt die Invasionsindices der MCF-7-Tumorzellsphäroide zu den jeweiligen Messzeitpunkten. Auch bei MCF-7-Sphäroiden zeigten sich die größten Differenzen zwischen den Invasionsindices direkt nach Gabe von Chemotherapie. Für die MCF-7-Tumorzellsphäroide ergaben sich die folgenden Differenzen: Bei 24 Stunden Chemotherapie ergibt sich eine Änderung des Invasionsindex von 1,52 um 0,28 auf 1,8. Bei 48 Stunden Inkubationszeit steigt der Invasionsindex von 1,43 um 0,314 auf 1,744, bei 72 Stunden von 1,36 um 0,31 auf 1,67. Differenzen der Invasionsindices ähnlicher Größe waren sowohl vor der Gabe von Chemotherapie als auch nach längerem Einwirken der CAF-Chemotherapie in den

entsprechenden Datenreihen nicht mehr zu beobachten. Da BT474-Tumorzellsphäroide keine Zellausläufer bildeten, konnte kein Invasionsindex gebildet werden. Zusammenfassend zeigte sich für MDA-MB-231- sowie MCF-7-Zellen, dass die Gabe von CAF-Chemotherapie in derselben Dosis, die in 2D-Zellkultur die Anzahl vitaler Tumorzellen signifikant reduzieren konnte, in 3D-Zellkultur nicht in der Lage war, das Wachstum der Sphäroide zu hemmen oder die Ausbildung von Zellausläufern durch die kollagenhaltige Matrix zu verhindern. Im Gegenteil: Die Auswertung der Invasionsindices vor und nach Gabe der Chemotherapie zeigt anhand der Differenzen zwischen den Indices, dass die Invasionstendenz von MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen durch die CAF-Therapie zunimmt. Lediglich das Fehlen der Invasionsmatrix verhinderte eine Ausbildung von Zellausläufern der Sphäroide. Das unterstreicht die Wichtigkeit von kollagenen Leitstrukturen bei der Gewebeinvasion von Tumorzellen.

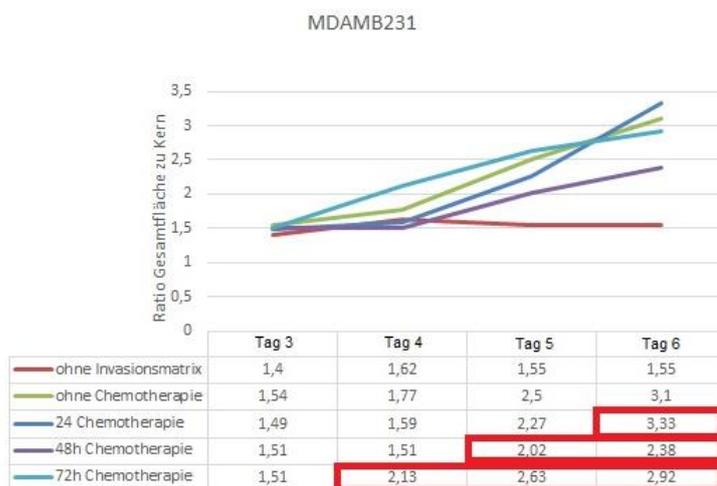


Abb. 3.4.3.4 Verhältnis der Gesamtausbreitung der Tumorzellsphäroide mittels Zellausläufern zur Kernfläche von MDA-MB-231-Tumorzellsphäroiden (Invasionsindex) unter Einfluss von CAF-Chemotherapie über die Zeit

Die Grafik zeigt die Invasionsindices von MDA-MB-231-Tumorzellsphäroiden zu den jeweiligen Messzeitpunkten. Dabei ist wichtig zu beachten, dass es hier um die Änderung von Verhältnissen statt um absolutes Größenwachstum geht. Die Datentabelle gibt diese Relationen numerisch wieder. Ohne Invasionsmatrix (orange) ändert sich das Verhältnis zwischen Gesamtausbreitung und Kernfläche nur gering, d. h. die Sphäroide ohne Invasionsmatrix zeigten kaum Tendenz zur Bildung von Zellausläufern. Ohne Chemotherapie (grün) stieg der Invasionsindex kontinuierlich an, d. h. die Sphäroide bildeten Zellausläufer. Mit Chemotherapie über 24 Stunden (dunkelblau), 48 Stunden (violett) und 72 Stunden (türkis) kam es ebenfalls zu einem Anstieg des Invasionsindex und somit zu einer Bildung von Invasionsstraßen. Dabei zeigte sich, dass die Differenzen der Invasionsindices zu den jeweiligen Messzeitpunkten dann am größten waren, wenn gerade Chemotherapie gegeben wurde (Inkubationszeit der Chemotherapie durch rote Kästen in Datentabelle gezeigt). Die Gabe von CAF-Chemotherapie bewirkte bei MDA-MB-231-Tumorzellsphäroiden also eine vermehrte Ausbildung von Zellausläufern der Sphäroide. n=3

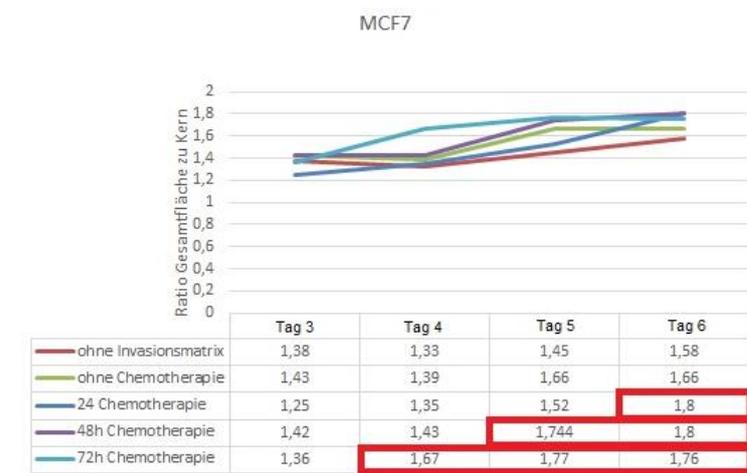


Abb. 3.4.3.5 Verhältnis der Gesamtausbreitung der Invasionsfläche der Tumorzellsphäroide zur Kernfläche für MCF-7-Tumorzellsphäroiden (Invasionsindex) unter Einfluss von CAF-Chemotherapie über die Zeit

Die Grafik zeigt die Invasionsindices von MCF-7-Tumorzellsphäroiden zu den jeweiligen Messzeitpunkten. Die Datentabelle gibt diese Relationen numerisch wieder. Ohne Invasionsmatrix (orange) ändert sich auch hier der Invasionsindex zwischen Gesamtausbreitung und Kernfläche nur gering, d. h. die Sphäroide ohne Invasionsmatrix zeigten kaum Tendenz zur Bildung von Zellausläufern. Ohne Chemotherapie (grün) stieg der Invasionsindex kontinuierlich an bis er bei 1,66 stagnierte, d. h. die Sphäroide bildeten Zellausläufer. Mit Chemotherapie über 24 Stunden (dunkelblau), 48 Stunden (violett) und 72 Stunden (türkis) kam es ebenfalls zu einem Anstieg des Invasionsindex und somit zu einer Bildung von Zellausläufern. Dabei zeigte sich auch hier, dass die Differenzen der Invasionsindices zu den jeweiligen Messzeitpunkten dann am größten waren, wenn gerade Chemotherapie gegeben wurde (Inkubationszeit der Chemotherapie durch rote Kästen in Datentabelle gezeigt). Die Gabe von CAF-Chemotherapie bewirkte bei MCF-7-Tumorzellsphäroiden also eine vermehrte Ausbildung von Tumorzellausläufern wie schon bei MDA-MB-231-Tumorzellsphäroiden beobachtet wurde. n=3

4 Diskussion

4.1 Expression von EZM-relevanten Proteinen in Pankreaskarzinomen mittels Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung auf die EZM-relevanten Proteine EpCAM, Lox und CTHRC1 sowie auf Vimentin zeigte deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Pankreaskarzinomen auf (Vgl. Tab. 3.2.8.1). Dabei korrelierte eine hohe Expression von Lox und CTHRC1 mit der Invasivität der Tumoren. So zeigten die stark invasiven Aspc1-Tumoren eine starke Expression aller untersuchten EZM-relevanten Proteine sowie von Vimentin, was Rückschlüsse auf einen eher mesenchymalen Phänotyp des Tumors zulässt. Ebenfalls PancTu-I-CBRL-Tumoren zeigten mit einer hohen Expression von Lox und CTHRC1 eine starke Invasivität, allerdings bei schwacher Expression von EpCAM. Mit einer moderaten Expression von Lox und CTHRC1 sowie einer schwachen Expression von EpCAM zeigten BxPC-3-Tumoren nur eine geringe Invasivität. Sie bildeten Tumorzellnester, welche von Vimentin-positiven Bindegewebsstraßen durchzogen wurden. Ein ähnliches Wachstumsmuster weisen Capan-1-Tumoren auf. Sie bildeten ebenfalls Tumorzellnester, allerdings mit nekrotischem Kern, die von Vimentin-positiven Bindegewebsstraßen umgeben waren. Lox und CTHRC1 wurden moderat exprimiert, EpCAM nur schwach und vor allem an den Grenzen der Tumorzellnester zum umliegenden Bindegewebe. Panc1-Tumoren zeigten im Kontrast zu den anderen untersuchten Tumormodellen trotz hoher Expression von Lox und CTHRC1 und geringer EpCAM-Expression kaum invasives Tumorwachstum. Es kann also festgehalten werden, dass bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Pankreastumoren eine hohe Expression von Lox und CTHRC1 bis auf Panc1-Tumoren eine hohe Invasionstendenz und Migration der Tumorzellen in umliegendes gesundes Pankeasgewebe und Gewebe der angrenzenden Nachbarorgane bedingte. Eine ähnliche Korrelation kann für die Expression von EpCAM nicht gefunden werden, da invasive Tumoren gleichsam eine starke Expression (z. B. Aspc1) oder eine schwache (z. B. PancTu-I-CBRL) aufweisen konnten. Park konnte zeigen, dass eine hohe Expression von CTHRC1 in Pankreaskarzinomen mit einer starken Migration von Tumorzellen und einer vermehrten Metastasierung einhergeht (Park et al. 2013). Eine hohe Expression von Lox korreliert mit einer starken Invasivität von Pankreaskarzinomen durch EMT (Cano et al. 2012). Eine Herabregulation von Lox resultiert in einer verminderten Vernetzung von Bindegewebsfasern und hemmt so eine Tumorprogression (Gao et al. 2010). Eine verminderte Expression des Zelladhäsionsmoleküls EpCAM bewirkt ebenfalls eine

EMT (Santisteban et al. 2009). Van der Gun konnte allerdings darstellen, dass eine hohe Expression von EpCAM einerseits mit einer guten, andererseits aber ebenfalls mit einer schlechten Prognose in Abhängigkeit von der vorliegenden Tumorentität einhergehen kann (van der Gun et al. 2010). Der dargestellte Unterschied in der Expression von EpCAM zwischen Asp1 und Panc-Tu-I unterstreicht die Aussage van der Guns. Eine hohe Expression von EpCAM im Falle von Asp1 geht mit einer stärkeren Invasion und Migration einher. Allerdings zeigt auch Panc-Tu-I mit einer schwachen EpCAM-Expression ebenfalls starke Tendenz zu Invasion und Migration. Die quantitative Expression von EpCAM auch in derselben Tumorentität vermag also keine definitive Aussage über das Invasionsverhalten zu treffen. Für Capan-1 konnte Stefani zeigen, dass die Adhäsion an die EZM über Zytokine moduliert wird (Stefani et al. 1999). Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete vermehrte Expression von EpCAM an den Grenzen zwischen Capan-1-Tumorzellnestern und EZM könnte Ausdruck dessen sein. Für Panc1 konnte Stähle im Vergleich mit BxPC-3 *in vitro* im Transwell-Migrationsassay eine fünffach höhere Motilität der Tumorzellen nachweisen, die eher als singuläre Zellen statt als Zellverband migrieren (Stähle et al. 2003). Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Panc1-Tumoren *ex vivo* konnte allerdings keine Invasionstendenz nachgewiesen werden.

4.2.1 Evaluation der Bindungskinetik von α EpCAM-Vio680 *in vitro*

Die NIRF-Probe α EpCAM-Vio680 bindet spezifisch in unterschiedlichen Konzentrationen an die Oberfläche von EpCAM-positiven Mammakarzinomzellen. Eine Steigerung der Konzentration der NIRF-Probe über 5 μ g/ml trägt dabei nicht wesentlich zu einer besseren Färbung von membranständigem EpCAM bei. Eine längere Inkubationszeit jedoch führt zu einer vermehrten Bindung an membranständiges EpCAM. Dabei hängt diese Membranfärbung für EpCAM von der Konfluenz der Zellen ab: Ein dichter Zellrasen zeigt mehr membranständige Fluoreszenz durch vermehrte Bindung der NIRF-Probe an membranständiges EpCAM als ein lockerer Zellrasen. Diese Beobachtung machte auch Sterzynska: In der Nahinfrarot-Bildgebung *in vitro* konnte Sterzynska ebenfalls zeigen, dass EpCAM in Monolayer-Zellkulturen stärker exprimiert wird, wenn der Zellrasen eine hohe Konfluenz aufweist und es demnach viele Zell-Zell-Kontakte gibt (Sterzynska et al. 2012). Diese Annahme erscheint durchaus sinnvoll, da eine der Hauptfunktion der extrazellulären Domäne EpCAMs die Verankerung von Zellen aneinander in Epithelverbänden ist (Litvinov et al. 1994).

4.2.2 Lox kann in *in vitro* kultivierten Mammakarzinomzellen auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass trotz vorhandener Expression auf RNA-Ebene (Abb.3.1.1.2) eine Lox-Expression auf Proteinebene weder mittels Western Blot (Kap. 3.1.2) noch mittels Durchflusszytometrie (Abb. 3.1.3.1) oder Nahinfrarot-Fluoreszenz-Bildgebung (Kap. 3.3) in *in vitro* kultivierten Karzinomzellen nachgewiesen werden konnte. Besonders die auf RNA-Ebene stark Lox-exprimierenden MDA-MB-231-Zellen hätten eine entsprechende Expression auf Proteinebene erwarten lassen. Diese Ergebnisse waren auch unter Variation aller relevanten Variablen (Antikörper, Versuchsbedingungen, Versuchsaufbau) reproduzierbar. Die Immunhistochemie an Pankreastumorschnitten und die Untersuchungen zu α Lox-Cy5.5 *in vivo* zeigen, dass Lox von den untersuchten Tumorzellen durchaus exprimiert wird und die NIRF-Probe *in vivo* spezifisch im Tumorgewebe bindet. Die Zusammenschau der hier vorgestellten Ergebnisse lässt den Schluss zu, dass Lox *in vitro* ohne EZM, die die Tumorzellen umgibt, auf Proteinebene gar nicht exprimiert wird. Den Zellen in Monolayer-Zellkultur, die für die gezeigten Versuche *in vitro* kultiviert wurden, wurde nur ihr jeweiliges Nährmedium ohne EZM oder Kollagen hinzugefügt. Es stellt sich die Frage, warum eine Tumorzelle ein Enzym auf Proteinebene ausbilden sollte, das Einfluss auf die Vernetzung von Kollagen nimmt und die EZM moduliert (Mayorca-Guiliani und Erler 2013), wenn ein solches Mikromilieu gar nicht vorliegt und die Zelle selbst kein Kollagen produziert. Diese Diskrepanz im Expressionsverhalten von Lox in Zellkultur im Vergleich mit der Immunhistochemie der Pankreas- und Mammakarzinome im Nacktmausmodell zeigt die Grenze zwischen *In-vitro*- und *In-vivo*-Modellen in der Tumorforschung. Eine Möglichkeit, diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen, wäre ein Versuchsansatz, der neben Lox-positiven Karzinomzellen (z. B. MDA-MB-231) ebenfalls extrazelluläre Matrix und Tumor-assoziierte Fibroblasten beinhaltet. Pickup und Kollegen konnten zeigen, dass vom Stroma gebildete Lysyloxidase bei TGF- β -defizienten Mäusen mit Mammakarzinomen zu verstärkter Metastasierung führte (Pickup et al. 2013). Dabei waren aktivierte Fibroblasten in der Tumorumgebung die primäre Quelle für Lox. Durch die Gabe von TGF- β konnten diese Fibroblasten zu einer gesteigerten Lox-Expression stimuliert werden. Diese Beobachtung von Pickup legt ein enges Zusammenspiel zwischen Tumorzellen und Tumor-assoziierten Fibroblasten bezüglich der Expression von Lox nahe. Zu diesem Schluss kommen auch Barker und Kollegen. Sie konnten zeigen, dass Lox-L2 direkt Fibroblasten im Stroma aktivieren kann und *in vitro* dazu in der Lage ist, Fibroblasten zu einer Migration durch eine Kollagenmatrix zu stimulieren

und darüber hinaus die Fibroblasten anregt, die Steifheit der EZM zu erhöhen. Sie folgern, dass eine Inhibierung von Lox-L2 nicht nur die Tumorzellinvasion hemmt, sondern außerdem die Aktivierung von gesunden Gewebszellen im Gewebe um den Tumor reduziert (Barker et al. 2013).

4.3 Evaluation der Bindungskinetik der NIRF-Proben *in vivo*

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten NIRF-Proben α EpCAM-Cy5.5, α EpCAM-Vio680, α Lox-Cy5.5 und α CD44-Cy5.5 binden alle spezifisch an ihre jeweiligen Zielantigene an Mamma- bzw. Pankreaskarzinomzellen *in vivo*. Alle NIRF-Proben wurden stark in der Leber metabolisiert. Daraus resultierte bei lebernahen Tumoren eine Überschneidung des Fluoreszenzsignals der NIRF-Proben in Tumor und Leber, sodass beide Signale nicht voneinander zu trennen waren. Insgesamt zeigten alle NIRF-Proben, unabhängig von ihrem konjugierten Fluorophor (Vio680 oder Cy5.5) oder ihrem Zielantigen (EpCAM, Lox, CD44) sowie dem verwendeten Tumormodell (Mamma- oder Pankreaskarzinom) und Implantationsmodus (orthotop oder subkutan) eine ähnliche Biodistribution zwischen Leber und Tumor über die Zeit. Alle NIRF-Proben wurden nach intravenöser Injektion schnell in die Leber aufgenommen und erreichten dort ihr maximales Fluoreszenzsignal nach etwa vier bis sechs Stunden. Alle NIRF-Proben akkumulierten langsam im Tumorgewebe, bis nach etwa 24 Stunden ein Fluoreszenzsignal erreicht wurde, welches für den restlichen Beobachtungszeitraum nahezu konstant blieb. Außer bei α Lox-Cy5.5 in den stark Lox-positiven MDA-MB-231-Tumoren konnte bei keiner anderen NIRF-Probe das Fluoreszenzsignal der NIRF-Proben im Tumorgewebe über den Beobachtungszeitraum das Fluoreszenzsignal der in der Leber akkumulierten NIRF-Proben überschreiten. Eine Steigerung der applizierten Menge der jeweiligen NIRF-Probe erreichte keine Aufsättigung der Leber zugunsten eines verstärkten Fluoreszenzsignals im Tumorgewebe. Ein Großteil der Menge der applizierten NIRF-Proben erreicht also gar nicht erst das Tumorgewebe und kann dort demnach weder für diagnostische noch therapeutische Zwecke genutzt werden. Somit sind NIRF-Proben, die in der Leber metabolisiert werden, für die optische Bildgebung von intrabdominellen Tumoren in Lebernähe ungeeignet, sofern die NIRF-Proben wie die hier verwendeten ein konstantes Fluoreszenzsignal bei Anregung durch einen Laser abgeben. Ogawa und Kollegen adressierten dieses Problem, indem sie eine NIRF-Probe entwickelten, die erst durch Proteolyse im Zielgewebe aktiviert wurde (Ogawa et al. 2009). Sie konjugierten Trastuzumab, einen Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktor HER2/neu, mit Cy5.5 oder Alexa680. Die konjugierten Fluorophore der

NIRF-Probe wurden erst dann aktiviert, sobald der Antikörper sein Substrat gebunden und der Komplex in die Tumorzellen internalisiert wurde. Das Fluoreszenzsignal der NIRF-Proben konnte dementsprechend nur dann detektiert werden, wenn die NIRF-Probe das Zielgewebe erreicht hatte. Inwiefern dieser Mechanismus auf andere Antikörper übertragbar ist, ist fraglich. Die Praktikabilität dieser Methode ist abhängig von der Expression des Zielantigens der NIRF-Probe. EpCAM beispielsweise findet sich außer seiner Überexpression in diversen Tumoren auch in nahezu allen physiologischen Epithelverbänden (Schnell et al. 2013). Eine entsprechende auto-aktivierende α EpCAM-NIRF-Probe würde somit auch Fluoreszenzsignale in gesundem Gewebe erzeugen. Vasquez und Kollegen untersuchten die Biodistribution verschiedener Proben, die zur optischen Bildgebung genutzt werden, auf ihre Akkumulation in verschiedenen Geweben (Vasquez et al. 2011). Dabei konjugierten sie Nahinfrarot-Fluorophore an Immunglobuline, 20-50 nm kleine Nanopartikel und einen niedermolekularen Integrin-Antagonist. Nanopartikel und Immunglobuline akkumulierten in Leber und Niere. Der niedermolekulare Integrin-Antagonist wurde schnell renal eliminiert und zeigte dementsprechend früh ein Fluoreszenzsignal in der Harnblase. Daraus kann gefolgert werden, dass die Struktur und Größe der NIRF-Probe Einfluss auf die Elimination nimmt. Eine entsprechende Anpassung des Eliminationsmodus könnte demnach interferierende Signale minimieren. So könnte man bei der gezielten Suche nach einem Pankreastumor ein kleines spezifisches Substrat an das verwendete Fluorophor konjugieren, um eine eher renale als hepatische Elimination zu gewährleisten. Die EZM-relevanten Proteine EpCAM, Lox und CD44 können auch für therapeutische Zwecke genutzt werden. Im Rahmen der photodynamischen Therapie (PDT) werden NIRF-Proben genutzt, die spezifisch im Tumor akkumulieren, und mit einem Laser angeregt, sodass sie Sauerstoffradikale bilden, die zur Apoptose von Krebszellen führen können (Hamblin 2018). Bei dreifach negativem Brustkrebs konnte eine PDT mit einer Kombination aus NIRF-Proben gegen EpCAM, EGFR und Chondroitinsulfat-Proteoglycan 4 (CSPG4) die therapeutische Effektivität einer Chemotherapie um 40% steigern (Amoury et al. 2016). Schmidt und Kollegen konnten für therapierefraktäre Mammakarzinome eine klinische Besserung durch eine Kombination aus Docetaxel und dem EpCAM-Antikörper Adecatumumab in über der Hälfte der Fälle zeigen (Schmidt et al. 2012). Im April 2009 erhielt Catumaxomab, ein bivalenter Antikörper gegen EpCAM und CD3, seine Zulassung in Europa zur Behandlung von malignem Aszites bei EpCAM-positiven Karzinomen (Seimetz et al. 2010). Liao und Kollegen konnten die Therapieeffektivität von Leukovorin, Irinotecan und 5-Fluoruracil bei Kolonkarzinomen sowie von Gemcitabine bei

Pankreaskarzinomen durch einen EpCAM-Antikörper im Mausmodell steigern und so die effektive Überlebenszeit der Mäuse verlängern (Liao et al. 2015). CD44 bietet ebenfalls ein Ziel für Antikörper-basierte Krebstherapie (Heider et al. 2004). Uchino und Kollegen konnten eine signifikante Minderung der Migration und Invasion von Tumorzellen durch den Einsatz eines gegen CD44 gerichteten Antikörpers nachweisen (Uchino et al. 2010). Jin und Kollegen behandelten an akuter myeloischer Leukämie erkrankte SCID-Mäuse mit einem CD44-Antikörper und berichten über ein vermindertes Wiederauftreten von Leukämiezellen nach Therapie. Sie folgern, dass CD44 eine Schlüsselrolle in der Funktion der Stammzellnische von Krebszellen einnimmt (Jin et al. 2006). Letztlich bietet auch die Therapie mit Lox-Antikörpern eine neue Möglichkeit der zielgerichteten Tumorthherapie (Ricciuti et al. 2017). Görögh und Kollegen testeten den Effekt einer Antikörpertherapie gegen Lox-L4 bei Lox-L4-überexprimierenden Plattenepithelkarzinomen des Kopfhalsbereichs in SCID-Mäusen und berichten, dass 12 von 15 Mäusen mit einem signifikant reduzierten Tumorwachstum ansprachen (Görögh et al. 2016).

4.4 Einfluss von Chemotherapie auf das Invasionsverhalten von Mammakarzinomen in 2D- und 3D-Zellkultur und den Expressionsstatus von EpCAM

Es konnte gezeigt werden, dass Chemotherapie nach CAF-Schema auf Zellen der drei untersuchten Mammakarzinome MDA-MB-231, MCF-7 und BT474 in 2D-Zellkultur zytoreduktiv wirksam war. Auffällig dabei sind die Unterschiede zwischen den schnell proliferierenden Zellen (MDA-MB-231 und MCF-7) und langsam proliferierenden Zellen (BT474). Die Chemotherapie bewirkt bei MDA-MB-231 und MCF-7 einen schnellen Abfall der Zellzahl, der auch durch die hohe Proliferationsrate in 2D-Zellkultur nicht kompensiert werden kann. Bei beiden Zelllinien waren nach 72 Stunden Inkubationszeit nur noch etwa 50% vitale Zellen vorhanden. Bei BT474 hingegen ist der Abfall der Zellzahl weniger stark und der Anteil der überlebenden Zellen am Ende des Beobachtungszeitraums noch deutlich über 50% der Ausgangszellzahl. Dieser Effekt liegt womöglich daran, dass die CAF-Chemotherapie in den Zellzyklus eingreift und dieser bei BT474-Zellen langsamer durchschritten wird als bei den schneller proliferierenden MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen. Immunhistochemische Färbungen auf EpCAM an den mit CAF-Chemotherapie behandelten Mammakarzinomzellen zeigten zwischen den einzelnen Zelllinien deutliche Unterschiede. Bei BT474 nahm die EpCAM-Expression mit der Inkubationszeit der

Chemotherapie zu. Während die Kontrolle ohne Chemotherapie zwar wie erwartet stark EpCAM exprimiert, lässt sich für die chemotherapierten Zellen eine graduelle Steigerung der Expression mit zunehmender Inkubationszeit erkennen (Abb. 3.4.2.1). Diese Steigerung der EpCAM-Expression unter Einwirkung von Chemotherapie könnte als Mechanismus gewertet werden, um den Zellverband zu stabilisieren. Litvinov konnte zeigen, dass EpCAM homophile Zell-Zell-Kontakte knüpft (Litvinov et al. 1994). Möglicherweise exprimieren die BT474-Zellen vermehrt EpCAM, um auf den Stress der Chemotherapie zu reagieren, indem sie die Adhäsion der Zellen im Zellverbund erhöhen, da sie keine Möglichkeit haben, der Noxe durch Migration zu entgehen. Bei MCF-7-Zellen zeigt sich erneut, dass die Expression von EpCAM von der Konfluenz der Zellen im Monolayer abhängt. Je dichter die Zellen liegen, desto stärker wird EpCAM an den Zellgrenzen exprimiert und je weniger konfluent die Zellen sind, z. B. nach Gabe von Chemotherapie, die die Zellzahl reduziert und den Monolayer ausdünn, desto weniger stark zeigt sich die EpCAM-Färbung. Dabei fiel auf, dass selbst bei hoher Konfluenz einzelne Zellgruppen stark EpCAM-positiv sind, während andere benachbarte Zellgruppen kein EpCAM exprimieren. Diese Beobachtung weist auf die Heterogenität von Tumorgeweben hin. Selbst einzelne Zellen derselben Tumorzelllinie können sich im Verbund anders als Nachbarzellen verhalten. Bei ohnehin niedriger Expression von EpCAM zeigten MDA-MB-231-Zellen keine weitere Steigerung der Expression im Verlauf. Mehrere immunhistochemische Färbungen der CAF-behandelten Karzinomzellen auf Lox wurden zwar durchgeführt, erbrachten aber wie erwartet *in vitro* keinen Nachweis von Lox. Eine zweidimensionale Zellkultur ist nicht in der Lage, *in vitro* die Bedingungen optimal abzubilden, denen Tumorzellen im lebendigen Organismus ausgesetzt sind, da sie einerseits den Zellen nur eine Ausbreitung im Monolayer ermöglicht, andererseits wichtige Einflüsse der Tumorumgebung, so z. B. der extrazellulären Matrix, auf die Tumorzellen entfallen (Bielecka et al. 2016). Um *in vitro* dennoch möglichst die Gegebenheiten einer Tumorumgebung, wie sie im lebendigen Organismus vorherrscht, zu simulieren, empfiehlt sich die Nutzung von dreidimensionalen Ansätzen zur Kultivierung von Tumorzellen, möglichst unter gleichzeitigem Einsatz von Komponenten der extrazellulären Matrix. In der Evaluation von Tumortheraeutika eignen sich besonders Tumorzellsphäroide, eine realitätsnahe Simulation von Tumorgewebe und Tumorumgebung zu erzeugen (Chatzinikolaidou 2016). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Tumorzellsphäroide der Mammakarzinome MDA-MB-231, MCF-7 und BT474 kultiviert, um den Einfluss von Chemotherapie auf das Invasionsverhalten dieser Tumorzellen in 3D-Zellkultur zu untersuchen. Um das Invasionsverhalten mathematisch zu charakterisieren wurde ein

Invasionsindex erstellt, der die gesamte Ausdehnung des Tumorzellsphäroids in Relation zu der Kernfläche des Sphäroids darstellt. Die Sphäroide wurden ebenfalls mit Chemotherapie nach CAF-Schema in derselben Dosierung behandelt. Während zuvor in zweidimensionaler Monolayer-Zellkultur allerdings eine deutliche Zytoreduktion bis zu etwa 50% der Ausgangszellzahl durch die Chemotherapie erzielt werden konnte, so zeigte sich in dreidimensionaler Sphäroid-Zellkultur quantitativ kein zytoreduktiver Effekt. Die schnell proliferierenden Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 wuchsen auch unter Chemotherapie, lediglich die BT474-Sphäroide wurden nach längerer Inkubationszeit in ihrer Morphologie verändert. Es fiel auf, dass MDA-MB-231- Tumorzellsphäroide eine hohe Invasionstendenz mit Ausbildung von Tumorzellausläufern zeigten und diese Eigenschaft nur durch einen Mangel an Kollagen-haltiger Invasionsmatrix beschränkt wurde. Daraus kann gefolgert werden, dass kollagene Leitstrukturen der EZM eine wichtige Rolle bei der Tumordinvasion spielen. MCF-7-Tumorzellsphäroide bildeten spärlicher als MDA-MB-231-Zellen Tumorzellausläufer, BT474-Sphäroide bildeten keinerlei Tumorzellausläufer. Es fiel auf, dass unmittelbar nach Gabe von Chemotherapie sowohl bei MDA-MB-231- als auch bei MCF-7-Sphäroiden die Anzahl und Reichweite der Tumorzellausläufer zunahm, was sich in einem erhöhten Invasionsindex bzw. in einer steileren Steigung der Indexgraphen darstellt (Abb. 3.4.3.5). Vor allem bei MCF-7-Sphäroiden scheint die Gabe von Chemotherapie die Invasionstendenz überhaupt erst zu begünstigen (Abb.3.4.3.2). Während die Kontrollen nur wenige kurze Tumorzellausläufer ausbildeten, zeigten die Sphäroide unter Einfluss von Chemotherapie eine deutlich erhöhte Anzahl von Tumorzellausläufern kurzer und mittlerer Länge. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die Chemotherapie nach CAF-Schema eine Selektion von Tumorzellen bewirkt: Wenig invasive Zellen werden abgetötet und widerstandsfähigere, aggressive Tumorzellen proliferieren. Somit ändert das Tumorzellsphäroid unter Chemotherapie seine Eigenschaften zu einem noch invasiveren Phänotyp bei ohnehin invasiven Tumorzellen wie MDA-MB-231 und MCF-7. Bei Zellen, die von vornherein nicht invasiv sind wie BT474, lässt sich dieser Effekt nicht beobachten. Jannasch und Kollegen untersuchten maligne Brusttumore aus G-2-Mammakarzinomzellen, die orthotop WAP-T-(*whey acidic protein* T)-Mäusen implantiert und mit Chemotherapie nach CAF-Schema behandelt wurden, auf Veränderungen im Phänotyp der Tumoren nach Therapie bzw. bei einem Rückfall der Tumorerkrankung (Jannasch et al. 2015). Die CAF-Chemotherapie führte *in vivo* zwar zu einer signifikanten Reduktion der Tumormasse, allerdings kam es etwa 20 Tage nach erfolgter Therapie zu einem Rückfall, der mit einem eher mesenchymalen Phänotyp und vermehrten disseminierten Tumorzellen im Organismus

einherging. Diese Ergebnisse führten die Autoren auf eine verstärkte epithelial-mesenchymale-Transition nach Chemotherapie zurück, welche sich durch eine vermehrte Vimentin-Expression und eine verminderte E-Cadherin-Expression in CAF-behandelten Tumorgeweben im Vergleich zu Kontrollen zeigte. Ein eher durch EMT-bedingter mesenchymaler Phänotyp bei epithelialen Tumoren geht mit einer höheren Aggressivität und schlechteren Prognose einher (Taube et al. 2010). Die Ausbildung von Tumorzellausläufern sowohl bei den hier gezeigten MDA-MB-231- als auch MCF-7-Sphäroiden konnte nur durch das Fehlen von einer Kollagen-haltigen EZM (Invasionsmatrix) verhindert werden kann. Eine erhöhte Steifheit der kollagenen Matrix begünstigt die Tumorinitiation und -progression bei Brustkrebs (Provenzano et al. 2008) und eine Reorganisation der EZM erhöht die Invasivität von Tumorzellen (Provenzano et al. 2006). Diese Erkenntnisse haben klinisch große Bedeutung, da sie zu dem Verständnis eines Rückfalls von Krebserkrankungen nach Chemotherapie beitragen können. EMT in Tumoren kann Krebszellen Stammzelleigenschaften verleihen und somit ein kontinuierliches Wachstum des Tumors gewährleisten (Mani et al. 2008). Symmans und Kollegen konnten zeigen, dass die Prognose von Brustkrebs-Patientinnen, die mit CAF-Chemotherapie behandelt wurden, direkt von der nach Therapie verbliebenen Tumorzelllast (residual cancer burden, RCB) abhängig ist (Symmans et al. 2007). Patientinnen mit niedriger RCB zeigten wenige Rückfälle und insgesamt ein langes krebsfreies Überleben. Eine extensive Resterkrankung (hohe RCB) nach Chemotherapie korrelierte mit einer schlechten Prognose bei 5-Jahres-Rückfallraten von etwa 40% trotz Chemo- und Hormontherapie. Wenn nun davon ausgegangen werden kann, wie Jannasch und Kollegen *in vivo* zeigten, dass nach CAF-Chemotherapie mehr EMT im Tumorgewebe stattfindet und wie im Rahmen dieser Arbeit dreidimensional *in vitro* gezeigt wurde, dass eine Selektion von aggressiveren Tumorzellen durch Chemotherapie stattfindet, dann zeigt sich darin ein Ansatz zum Verständnis von Rückfällen bei Tumorerkrankungen. Somit bestünden Mammakarzinome nach erfolgter Chemotherapie, sofern die Tumorzellen nicht beseitigt werden konnten, aus aggressiveren, invasiveren Zellen, die einen Rückfall begünstigen würden. Das unterstreicht die Wichtigkeit multimodaler Therapiekonzepte in der Krebstherapie, z. B. im Falle von Brustkrebs durch Operation, Bestrahlung, Chemotherapie, Hormontherapie und Antikörpertherapie.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Expressionsstatus EZM-relevanter Proteine (EpCAM, Lox, CD44 und CTHRC1) in Mamma- und Pankreaskarzinomen erhoben und NIRF-Proben *in vitro* und *in vivo* hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften evaluiert. Zusätzlich wurde das Invasionsverhalten von Mammakarzinomzellen im 3D-Sphäroid-Modell unter Einfluss von Chemotherapie beobachtet. Anhand immunhistochemischer Färbungen von Pankreaskarzinomen wurde gezeigt, dass alle untersuchten Tumoren CTHRC1 moderat bis stark exprimierten. Eine gleichzeitige hohe Expression von Lox bedingte einen invasiven Phänotyp, während die EpCAM-Expression keine Aussage über die Invasivität der Karzinomzellen erlaubte. Obwohl Lox-kodierende RNA in *in vitro* kultivierten Mamma- und Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen wurde und Lox auch *in vivo* nachweisbar war, zeigten dieselben Zellen sowohl im Western Blot, der Durchflusszytometrie als auch der optischen Bildgebung mit NIRF-Proben *in vitro* keine Expression von Lox auf Proteinebene. *In vitro* zeigten die α EpCAM-NIRF-Proben eine spezifische Bindung an EpCAM-positive Mammakarzinomzellen. Eine längere Inkubationszeit verstärkte diese Bindungen quantitativ. *In vivo* zeigten alle NIRF-Proben eine ähnliche Biodistribution: Ein Großteil der NIRF-Proben akkumulierte in der Leber, während nur ein kleiner Teil im Tumorgewebe akkumulierte. Mit Ausnahme von α Lox-Cy5.5 in MDA-MB-231 war das Signal der NIRF-Proben in der Leber jederzeit stärker als das der NIRF-Proben im Tumorgewebe. Die maximale Signalintensität gemessen in Normalized Counts der NIRF-Proben in der Leber wurde nach vier bis sechs Stunden erreicht und fiel dann kontinuierlich über den Beobachtungszeitraum ab. Im Tumorgewebe erreichten sie nach 24 Stunden eine Signalintensität, die im zeitlichen Verlauf nahezu konstant blieb. Je höher die verwendete Menge an NIRF-Probe, desto höher die Signalintensität. Eine Sättigung der Leber zugunsten einer verstärkten Signalintensität der NIRF-Proben im Tumorgewebe war nicht möglich. Daraus ergab sich die Problematik der Detektion von intrabdominellen lebernahen Tumoren mittels NIRF-Proben bei gleichzeitiger starker Aufnahme der NIRF-Proben in die Leber mit resultierendem Fluoreszenzsignal der Leber, welches das Tumorsignal maskiert. Dabei war die Aufnahme der NIRF-Proben in die Leber unabhängig vom gewählten Tumormodell, dem Implantationsmodus, der NIRF-Probe und dem konjugierten Fluorophor. Untersuchungen zum Invasionsverhalten von Mammakarzinomzellen unter Chemotherapie *in vitro* zeigten, dass CAF-Chemotherapie im zweidimensionalen Modell die Anzahl vitaler Tumorzellen nach 72 Stunden etwa halbiert, während im dreidimensionalen Sphäroidmodell eine solche

Wirksamkeit der Therapie bei gleicher Dosierung nicht erreicht wurde. Unter Einfluss von Chemotherapie wurde die EpCAM-Expression bei stark EpCAM-exprimierenden Zellen weiter gesteigert, sofern die Zellen hinreichend Zell-Zell-Kontakte ausbildeten. Im dreidimensionalen Sphäroidmodell reagierten Tumorzellsphäroide invasiv wachsender Mammakarzinome auf die Gabe von CAF-Chemotherapie mit einem verstärkten Ausbilden von Tumorzellausläufern durch eine kollagenhaltige Matrix. Die Gabe der CAF-Chemotherapie bewirkte also eine Steigerung der Invasivität dieser Tumorzellsphäroide.

6. Literaturverzeichnis

Amoury M, Bauerschlag D, Zeppernick F, von Felbert V, Berges N, Di Fiore S, Mintert I, Bleilevens A, Maass N, Bräutigam K, et al. (2016): Photoimmunotheranostic agents for triple-negative breast cancer diagnosis and therapy that can be activated on demand. *Oncotarget* 7, 54925–54936

Armentero M-T, Bossolasco P, Cova L (2013): Labeling and tracking of human mesenchymal stem cells using near-infrared technology. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1052, 13–28

Armstrong A, Eck SL (2003): EpCAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen. *Cancer Biol Ther* 2, 320–326

Armstrong T, Packham G, Murphy LB, Bateman AC, Conti JA, Fine DR, Johnson CD, Benyon RC, Iredale JP (2004): Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 10, 7427–7437

Avigdor A, Goichberg P, Shivtiel S, Dar A, Peled A, Samira S, Kollet O, HersHKoviz R, Alon R, Hardan I (2004): CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow. *Blood* 103, 2981–2989

Baeuerle PA, Gires O (2007): EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer* 96, 417–423

Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV (1999): The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med* 77, 699–712

Barker HE, Bird D, Lang G, Erler JT (2013): Tumor-secreted LOXL2 activates fibroblasts through FAK signaling. *Mol Cancer Res MCR* 11, 1425–1436

Barry-Hamilton V, Spangler R, Marshall D, McCauley S, Rodriguez HM, Oyasu M, Mikels A, Vaysberg M, Ghermazien H, Wai C (2010): Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat Med* 16, 1009–1017

Bhat-Nakshatri P, Appaiah H, Ballas C, Pick-Franke P, Goulet R, Badve S, Srour EF, Nakshatri H (2010): SLUG/SNAI2 and tumor necrosis factor generate breast cells with CD44+/CD24- phenotype. *BMC Cancer* 10, 411

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004): Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332–337

Bielecka ZF, Maliszewska-Olejniczak K, Safir IJ, Szczylik C, Czarnecka AM (2016): Three-dimensional cell culture model utilization in cancer stem cell research. *Biol Rev* 92, 1505–1520

Bourguignon LYW, Earle C, Shiina M (2017): Activation of Matrix Hyaluronan-Mediated CD44 Signaling, Epigenetic Regulation and Chemoresistance in Head and Neck Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci* 18, 1849

Brekhman V, Neufeld G (2009): A novel asymmetric 3D in-vitro assay for the study of tumor cell invasion. *BMC Cancer* 9, 415

Brown RL, Reinke LM, Damerow MS, Perez D, Chodosh LA, Yang J, Cheng C (2011): CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *J Clin Invest* 121, 1064–1074

Butcher DT, Alliston T, Weaver VM (2009): A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer* 9, 108–122

Cano A, Santamaría PG, Moreno-Bueno G (2012): LOXL2 in epithelial cell plasticity and tumor progression. *Future Oncol* 8, 1095–1108

Chatzinikolaidou M (2016): Cell spheroids: the new frontiers in in vitro models for cancer drug validation. *Drug Discov Today* 21, 1553–1560

Cheng K, Cheng Z (2012): Near infrared receptor-targeted nanoprobes for early diagnosis of cancers. *Curr Med Chem* 19, 4767–4785

Condeelis J, Segall JE (2003): Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* 3, 921–930

Coussens LM, Werb Z (2002): Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867

Cox TR, Gartland A, Erler JT (2016): Lysyl Oxidase, a Targetable Secreted Molecule Involved in Cancer Metastasis. *Cancer Res* 76, 188–192

- Day KE, Beck LN, Heath CH, Huang CC, Zinn KR, Rosenthal EL (2013): Identification of the optimal therapeutic antibody for fluorescent imaging of cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther* 14, 271–277
- Denzel S, Maetzel D, Mack B, Eggert C, Bähr G, Gires O (2009): Initial activation of EpCAM cleavage via cell-to-cell contact. *BMC Cancer* 9, 402
- Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM (2010a): Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr Opin Cell Biol* 22, 697–706
- Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z (2010b): Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* 18, 884–901
- Elkabets M, Gifford AM, Scheel C, Nilsson B, Reinhardt F, Bray M-A, Carpenter AE, Jirstrom K, Magnusson K, Ebert BL (2011): Human tumors instigate granulysin-expressing hematopoietic cells that promote malignancy by activating stromal fibroblasts in mice. *J Clin Invest* 121, 784–799
- Erb U, Megaptche AP, Gu X, Büchler MW, Zöller M (2014): CD44 standard and CD44v10 isoform expression on leukemia cells distinctly influences niche embedding of hematopoietic stem cells. *J Hematol Oncol* 7, 29
- Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, Le Q-T, Chi J-TA, Jeffrey SS, Giaccia AJ (2006): Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 440, 1222–1226
- Fabregat I, Malfettone A, Soukupova J (2016): New Insights into the Crossroads between EMT and Stemness in the Context of Cancer. *J Clin Med* 5, 37
- Fan L, Fu Y J, Liu Q L, Lu D T, Dong C, Shuang S M (2012): Novel far-visible and near-infrared pH probes based on styrylcyanine for imaging intracellular pH in live cells. *Chem Commun* 48, 11202–11204
- Flanagan SP (1966): „Nude“, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res* 8, 295–309
- Fong D, Steurer M, Obrist P, Barbieri V, Margreiter R, Amberger A, Laimer K, Gastl G, Tzankov A, Spizzo G (2008): Ep-CAM expression in pancreatic and ampullary

carcinomas: frequency and prognostic relevance. *J Clin Pathol* 61, 31–35

Frantz C, Stewart KM, Weaver VM (2010): The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 123, 4195–4200

Frye M, Gardner C, Li ER, Arnold I, Watt FM (2003): Evidence that Myc activation depletes the epidermal stem cell compartment by modulating adhesive interactions with the local microenvironment. *Development* 130, 2793–2808

Gade TPF, Buchanan IM, Motley MW, Mazaheri Y, Spees WM, Koutcher JA (2009): Imaging intratumoral convection: pressure-dependent enhancement in chemotherapeutic delivery to solid tumors. *Clin Cancer Res* 15, 247–255

Ganesh S, Iyer AK, Gattacceca F, Morrissey DV, Amiji MM (2013): In vivo biodistribution of siRNA and cisplatin administered using CD44-targeted hyaluronic acid nanoparticles. *J Control Release* 172, 699–706

Gao Y, Xiao Q, Ma H, Li L, Liu J, Feng Y, Fang Z, Wu J, Han X, Zhang J (2010): LKB1 inhibits lung cancer progression through lysyl oxidase and extracellular matrix remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18892–18897

Garcion E, Halilagic A, Faissner A, French-Constant C (2004): Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development* 131, 3423–3432

Ghajar CM, Bissell MJ (2008): Extracellular matrix control of mammary gland morphogenesis and tumorigenesis: insights from imaging. *Histochem Cell Biol* 130, 1105–1118

Gong H, Kovar JL, Baker B, Zhang A, Cheung L, Draney DR, Corrêa IR, Xu M-Q, Olive DM (2012): Near-infrared fluorescence imaging of mammalian cells and xenograft tumors with SNAP-tag. *PloS One* 7, e34003

Görögh T, Quabius ES, Heidebrecht H, Nagy A, Muffels T, Haag J, Ambrosch P, Hoffmann M (2016): Lysyl oxidase like-4 monoclonal antibody demonstrates therapeutic effect against head and neck squamous cell carcinoma cells and xenografts. *Int J Cancer* 138, 2529–2538

Grossman M, Ben-Chetrit N, Zhuravlev A, Afik R, Bassat E, Solomonov I, Yarden Y, Sagi I

(2016): Tumor Cell Invasion Can Be Blocked by Modulators of Collagen Fibril Alignment That Control Assembly of the Extracellular Matrix. *Cancer Res* 76, 4249–4258

Gu L, Liu L, Zhong L, Bai Y, Sui H, Wei X, Zhang W, Huang P, Gao D, Kong Y, Lou G (2014): Cthrc1 overexpression is an independent prognostic marker in gastric cancer. *Hum Pathol* 45, 1031–1038

Hamblin MR (2018): Upconversion in photodynamic therapy: plumbing the depths. *Dalton Trans* 2003 47, 8571-8580

Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, Mukai K, Yokose T, Ochiai A (2002): Prognostic significance of fibrotic focus in invasive ductal carcinoma of the breast: a prospective observational study. *Mod Pathol* 15, 502–516

Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM (2000): Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 156, 1363–1380

He X, Lee B, Jiang Y (2016): Cell-ECM Interactions in Tumor Invasion. *Adv Exp Med Biol* 936, 73–91

Heider K-H, Kuthan H, Stehle G, Munzert G (2004): CD44v6: a target for antibody-based cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53, 567–579

Herlyn D, Herlyn M, Steplewski Z, Koprowski H (1979): Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human melanoma and colorectal carcinoma. *Eur J Immunol* 9, 657–659

Hilderbrand SA, Weissleder R (2010): Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging. *Curr Opin Chem Biol* 14, 71–79

Hynes RO (2009): The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326, 1216–1219

Hyun K-A, Koo G-B, Han H, Sohn J, Choi W, Kim S-I, Jung H-I, Kim Y-S (2016): Epithelial-to-mesenchymal transition leads to loss of EpCAM and different physical properties in circulating tumor cells from metastatic breast cancer. *Oncotarget* 7, 24677–24687

Imrich S, Hachmeister M, Gires O (2012): EpCAM and its potential role in tumor-initiating

cells. *Cell Adhes Migr* 6, 30–38

Jannasch K, Wegwitz F, Lenfert E, Maenz C, Deppert W, Alves F (2015): Chemotherapy of WAP-T mouse mammary carcinomas aggravates tumor phenotype and enhances tumor cell dissemination. *Int J Cancer* 137, 25–36

Jiang N, Cui Y, Liu J, Zhu X, Wu H, Yang Z, Ke Z (2016): Multidimensional Roles of Collagen Triple Helix Repeat Containing 1 (CTHRC1) in Malignant Cancers. *J Cancer* 7, 2213–2220

Jiang W, Zhang Y, Kane KT, Collins MA, Simeone DM, di Magliano MP, Nguyen KT (2015): CD44 regulates pancreatic cancer invasion through MT1-MMP. *Mol Cancer Res MCR* 13, 9-15

Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE (2006): Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med* 12, 1167–1174

Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, Morony S, Rubin E, Sarao R, Hojilla CV (2006): Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 440, 692–696

Ke Z, He W, Lai Y, Guo X, Chen S, Li S, Wang Y, Wang L (2014): Overexpression of collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1) is associated with tumour aggressiveness and poor prognosis in human non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 5, 9410–9424

Kharaishvili G, Cizkova M, Bouchalova K, Mgebrishvili G, Kolar Z, Bouchal J (2011): Collagen triple helix repeat containing 1 protein, periostin and versican in primary and metastatic breast cancer: an immunohistochemical study. *J Clin Pathol* 64, 977–982

Kim HC, Kim YS, Oh H-W, Kim K, Oh S-S, Kim J-T, Kim BY, Lee S-J, Choe Y-K, Kim DH (2014): Collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1) acts via ERK-dependent induction of MMP9 to promote invasion of colorectal cancer cells. *Oncotarget* 5, 519–529

Kirschmann DA, Seftor EA, Nieva DR, Mariano EA, Hendrix MJ (1999): Differentially expressed genes associated with the metastatic phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 55, 127–136

Lai B-H, Chen D-H (2013): LaB6 nanoparticles with carbon-doped silica coating for

fluorescence imaging and near-IR photothermal therapy of cancer cells. *Acta Biomater* 9, 7556–7563

Le Q-T, Harris J, Magliocco AM, Kong CS, Diaz R, Shin B, Cao H, Trotti A, Erler JT, Chung CH (2009): Validation of lysyl oxidase as a prognostic marker for metastasis and survival in head and neck squamous cell carcinoma: Radiation Therapy Oncology Group trial 90-03. *J Clin Oncol* 27, 4281–4286

Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SFT, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W (2009): Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139, 891–906

Li J, Zhou BP (2011): Activation of β -catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. *BMC Cancer* 11, 49

Li L, Xie T (2005): Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 605–631

Liao M-Y, Lai J-K, Kuo MY-P, Lu R-M, Lin C-W, Cheng P-C, Liang K-H, Wu H-C (2015): An anti-EpCAM antibody EpAb2-6 for the treatment of colon cancer. *Oncotarget* 6, 24947–24968

Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO (1994): Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 125, 437–446

Liu J, Ping W, Zu Y, Sun W (2014): Correlations of lysyl oxidase with MMP2/MMP9 expression and its prognostic value in non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 7, 6040–6047

Liu J, Li W, Liu S, Zheng X, Shi L, Zhang W, Yang H (2017): Knockdown of Collagen Triple Helix Repeat Containing 1 (CTHRC1) Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition and Cellular Migration in Glioblastoma Cells. *Oncol Res* 25, 225–232

Liu W, Fu X-L, Yang J-Y, Yang M-W, Tao L-Y, Liu D-J, Huo Y-M, Zhang J-F, Hua R, Sun Y-W (2016): Elevated expression of CTHRC1 predicts unfavorable prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Cancer Res* 6, 1820–1827

Loeffler M, Krüger JA, Niethammer AG, Reisfeld RA (2006): Targeting tumor-associated

fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J Clin Invest* 116, 1955–1962

Lucero HA, Kagan HM (2006): Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci* 63, 2304–2316

Luo S, Zhang E, Su Y, Cheng T, Shi C (2011): A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging. *Biomaterials* 32, 7127–7138

Ma M Z, Zhuang C, Yang X M, Zhang Z Z, Ma H, Zhang W M, You H, Qin W, Gu J, Yang S (2014): CTHRC1 acts as a prognostic factor and promotes invasiveness of gastrointestinal stromal tumors by activating Wnt/PCP-Rho signaling. *Neoplasia N Y N* 16, 265–278,

Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, Kieu C, Papior P, Baeuerle PA, Munz M, Gires O (2009): Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol* 11, 162–171

Mäki JM (2009): Lysyl oxidases in mammalian development and certain pathological conditions. *Histol Histopathol* 24, 651–660

Mäki JM, Sormunen R, Lippo S, Kaarteenaho-Wiik R, Soininen R, Myllyharju J (2005): Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues. *Am J Pathol* 167, 927–936

Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M (2008): The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704–715

Matzke-Ogi A, Jannasch K, Shatirishvili M, Fuchs B, Chiblak S, Morton J, Tawk B, Lindner T, Sansom O, Alves F (2016): Inhibition of Tumor Growth and Metastasis in Pancreatic Cancer Models by Interference With CD44v6 Signaling. *Gastroenterology* 150, 513–525.e10

Mayorca-Guiliani A, Erler JT (2013): The potential for targeting extracellular LOX proteins in human malignancy. *OncoTargets Ther* 6, 1729–1735

McAllister SS, Weinberg RA (2010): Tumor-host interactions: a far-reaching relationship. *J Clin Oncol* 28, 4022–4028

McLane JS, Ligon LA (2016): Stiffened Extracellular Matrix and Signaling from Stromal Fibroblasts via Osteoprotegerin Regulate Tumor Cell Invasion in a 3-D Tumor in Situ Model. *Cancer Microenviron* 9, 127–139

Minchinton AI, Tannock IF (2006): Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* 6, 583–592

Misra S, Heldin P, Hascall VC, Karamanos NK, Skandalis SS, Markwald RR, Ghatak S (2011): Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS J* 278, 1429–1443

Morita Y, Sakaguchi T, Unno N, Shibasaki Y, Suzuki A, Fukumoto K, Inaba K, Baba S, Takehara Y, Suzuki S, Konno H (2013): Detection of hepatocellular carcinomas with near-infrared fluorescence imaging using indocyanine green: its usefulness and limitation. *Int J Clin Oncol* 18, 232–241

Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA, Gratama JW (2009): Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 35, 463–474

Müller J, Wunder A, Licha K (2013): Optical imaging. *Recent Results Cancer Res* 187, 221–246

Nagano O, Saya H (2004): Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci* 95, 930–935

Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D (1997): CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 71, 241–319

Nicolini A, Ferrari P, Fini M, Borsari V, Fallahi P, Antonelli A, Berti P, Carpi A, Miccoli P (2011): Stem cells: their role in breast cancer development and resistance to treatment. *Curr Pharm Biotechnol* 12, 196–205

Ogawa M, Regino CA, Choyke PL, Kobayashi H (2009): In vivo target-specific activatable near infrared optical labeling of humanized monoclonal antibodies. *Mol Cancer Ther* 8, 232–239

Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA, Cole DJ, Gillanders WE

(2004): EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res* 64, 5818–5824

Ozbek S, Balasubramanian PG, Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP, Adams JC (2010): The evolution of extracellular matrix. *Mol Biol Cell* 21, 4300–4305

Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z (2007): Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 221–233

Park EH, Kim S, Jo JY, Kim SJ, Hwang Y, Kim J-M, Song SY, Lee D-K, Koh SS (2013): Collagen triple helix repeat containing-1 promotes pancreatic cancer progression by regulating migration and adhesion of tumor cells. *Carcinogenesis* 34, 694–702

Park J, Kim D-H, Kim H-N, Wang CJ, Kwak MK, Hur E, Suh K-Y, An SS, Levchenko A (2016): Directed migration of cancer cells by the graded texture of the underlying matrix. *Nat Mater* 15, 792–801

Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, Reinhart-King CA, Margulies SS, Dembo M, Boettiger D (2005): Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8, 241–254

Payne SL, Fogelgren B, Hess AR, Seftor EA, Wiley EL, Fong SFT, Csiszar K, Hendrix MJC, Kirschmann DA (2005): Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Res* 65, 11429–11436

Peiris-Pagès M, Martinez-Outschoorn UE, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP (2016): Cancer stem cell metabolism. *Breast Cancer Res BCR* 18, 55

Pez F, Dayan F, Durivault J, Kaniewski B, Aimond G, Le Provost GS, Deux B, Clézardin P, Sommer P, Pouysségur J, Reynaud C (2011): The HIF-1-inducible lysyl oxidase activates HIF-1 via the Akt pathway in a positive regulation loop and synergizes with HIF-1 in promoting tumor cell growth. *Cancer Res* 71, 1647–1657

Pickup MW, Laklai H, Acerbi I, Owens P, Gorska AE, Chytil A, Aakre M, Weaver VM, Moses HL (2013): Stromally derived lysyl oxidase promotes metastasis of transforming growth factor- β -deficient mouse mammary carcinomas. *Cancer Res* 73, 5336–5346

Pleijhuis RG, Graafland M, de Vries J, Bart J, de Jong JS, van Dam GM (2009): Obtaining

adequate surgical margins in breast-conserving therapy for patients with early-stage breast cancer: current modalities and future directions. *Ann Surg Oncol* 16, 2717–2730

Ponta H, Sherman L, Herrlich PA (2003): CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 33–45

Provenzano PP, Eliceiri KW, Campbell JM, Inman DR, White JG, Keely PJ (2006): Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med* 4, 38

Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Knittel JG, Yan L, Rueden CT, White JG, Keely PJ (2008): Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med* 6, 11

Psaila B, Lyden D (2009): The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* 9, 285–293

Punt CJA, Nagy A, Douillard J-Y, Figier A, Skovsgaard T, Monson J, Barone C, Fountzilas G, Riess H, Moylan E (2002): Edrecolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomised study. *Lancet* 360, 671–677

Pyagay P, Heroult M, Wang Q, Lehnert W, Belden J, Liaw L, Friesel RE, Lindner V (2005): Collagen triple helix repeat containing 1, a novel secreted protein in injured and diseased arteries, inhibits collagen expression and promotes cell migration. *Circ Res* 96, 261–268

Qian J, Wang D, Cai F, Zhan Q, Wang Y, He S (2012): Photosensitizer encapsulated organically modified silica nanoparticles for direct two-photon photodynamic therapy and in vivo functional imaging. *Biomaterials* 33, 4851–4860

Radisky ES, Radisky DC (2010): Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15, 201–212

Raymond K, Deugnier M-A, Faraldo MM, Glukhova MA (2009): Adhesion within the stem cell niches. *Curr Opin Cell Biol* 21, 623–629

Ricciuti B, Foglietta J, Chiari R, Sahebkar A, Banach M, Bianconi V, Pirro M (2017): Emerging enzymatic targets controlling angiogenesis in cancer: preclinical evidence and potential clinical applications. *Med Oncol* 35, 4

Riethmüller G, Schneider-Gädicke E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Höffken K, Gruber R, Pichlmaier H, Hirche H, Pichlmayr R (1994): Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group. *Lancet* 343, 1177–1183

Ruoslahti E (2002): Specialization of tumour vasculature. *Nat Rev Cancer* 2, 83–90

Sankpal NV, Fleming TP, Sharma PK, Wiedner HJ, Gillanders WE (2017): A double-negative feedback loop between EpCAM and ERK contributes to the regulation of epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Oncogene* 36, 3706–3717

Santisteban M, Reiman JM, Asiedu MK, Behrens MD, Nassar A, Kalli KR, Haluska P, Ingle JN, Hartmann LC, Manjili MH (2009): Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells. *Cancer Res* 69, 2887–2895

Schaafsma BE, Mieog JSD, Hutteman M, van der Vorst JR, Kuppen PJK, Löwik CWGM, Frangioni JV, van de Velde CJH, Vahrmeijer AL (2011): The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery. *J Surg Oncol* 104, 323–332

Schmidt M, Hasenclever D, Schaeffer M, Boehm D, Cotarelo C, Steiner E, Lebrecht A, Siggelkow W, Weikel W, Schiffer-Petry I (2008): Prognostic effect of epithelial cell adhesion molecule overexpression in untreated node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 14, 5849–5855

Schmidt M, Rüttinger D, Sebastian M, Hanusch CA, Marschner N, Baeuerle PA, Wolf A, Göppel G, Oruzio D, Schlimok G (2012): Phase IB study of the EpCAM antibody adecatumumab combined with docetaxel in patients with EpCAM-positive relapsed or refractory advanced-stage breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO* 23, 2306–2313

Schneck H, Gierke B, Uppenkamp F, Behrens B, Niederacher D, Stoecklein NH, Templin MF, Pawlak M, Fehm T, Neubauer H (2015): EpCAM-Independent Enrichment of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer. *PLoS ONE* 10, e0144535

Schnell U, Cirulli V, Giepmans BN (2013): EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1828, 1989–2001

Scimeca M, Antonacci C, Colombo D, Bonfiglio R, Buonomo OC, Bonanno E (2016): Emerging prognostic markers related to mesenchymal characteristics of poorly differentiated breast cancers. *Tumour Biol* 37, 5427–5435

Seimetz D, Lindhofer H, Bokemeyer C (2010): Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy. *Cancer Treat Rev* 36, 458–467

Senbanjo LT, Chellaiah MA (2017): CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol* 5, 18

Spizzo G, Fong D, Wurm M, Ensinger C, Obrist P, Hofer C, Mazzoleni G, Gastl G, Went P (2011): EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol* 64, 415–420

Spring FA, Dalchau R, Daniels GL, Mallinson G, Judson PA, Parsons SF, Fabre JW, Anstee DJ (1988): The Ina and Inb blood group antigens are located on a glycoprotein of 80,000 MW (the CDw44 glycoprotein) whose expression is influenced by the In(Lu) gene. *Immunology* 64, 37–43

Stähle M, Veit C, Bachfischer U, Schierling K, Skripczynski B, Hall A, Gierschik P, Giehl K (2003): Mechanisms in LPA-induced tumor cell migration: critical role of phosphorylated ERK. *J Cell Sci* 116, 3835–3846

Stefani AL, Basso D, Panozzo MP, Greco E, Mazza S, Zancanaro F, De Franchis G, Plebani M (1999): Cytokines modulate MIA PaCa 2 and CAPAN-1 adhesion to extracellular matrix proteins. *Pancreas* 19, 362–369

Sterzynska K, Kempisty B, Zawierucha P, Zabel M (2012): Analysis of the specificity and selectivity of anti-EpCAM antibodies in breast cancer cell lines. *Folia Histochem Cytobiol* 50, 534–541

Sweet DT, Chen Z, Wiley DM, Bautch VL, Tzima E (2012): The adaptor protein Shc integrates growth factor and ECM signaling during postnatal angiogenesis. *Blood* 119, 1946–1955

Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, Assad L, Poniecka A,

- Hennessy B, Green M (2007): Measurement of Residual Breast Cancer Burden to Predict Survival After Neoadjuvant Chemotherapy. *J Clin Oncol* 25, 4414–4422
- Tang H, Leung L, Saturno G, Viros A, Smith D, Di Leva G, Morrison E, Niculescu-Duvaz D, Lopes F, Johnson L (2017): Lysyl oxidase drives tumour progression by trapping EGF receptors at the cell surface. *Nat Commun* 8, 14909
- Tang L, Dai DL, Su M, Martinka M, Li G, Zhou Y (2006): Aberrant expression of collagen triple helix repeat containing 1 in human solid cancers. *Clin Cancer Res* 12, 3716–3722
- Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, Zhou AY, Gupta S, Yang J, Hartwell K, Onder TT, Gupta PB, Evans KW (2010): Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15449–15454
- Taylor MA, Amin JD, Kirschmann DA, Schiemann WP (2011): Lysyl oxidase contributes to mechanotransduction-mediated regulation of transforming growth factor- β signaling in breast cancer cells. *Neoplasia* 13, 406–418
- Thakur ML, Zhang K, Paudyal B, Devakumar D, Covarrubias MY, Chen C, Cheng C, Gray BD, Wickstrom E, Pak KY (2012): Targeting apoptosis for optical imaging of infection. *Mol Imaging Biol* 14, 163–171
- Thapa R, Wilson GD (2016): The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer. *Stem Cells Int* 2016, 1155-1170
- Uchino M, Kojima H, Wada K, Imada M, Onoda F, Satofuka H, Utsugi T, Murakami Y (2010): Nuclear beta-catenin and CD44 upregulation characterize invasive cell populations in non-aggressive MCF-7 breast cancer cells. *BMC Cancer* 10, 414
- van der Gun BTF, Melchers LJ, Ruiters MHJ, de Leij LFMH, McLaughlin PMJ, Rots MG (2010): EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis* 31, 1913–1921
- van der Vorst JR, Hutteman M, Mieog JSD, de Rooij KE, Kaijzel EL, Löwik CWGM, Putter H, Kuppen PJK, Frangioni JV, van de Velde CJH, Vahrmeijer AL (2012): Near-infrared fluorescence imaging of liver metastases in rats using indocyanine green. *J Surg Res* 174, 266–271

- Vasquez KO, Casavant C, Peterson JD (2011): Quantitative Whole Body Biodistribution of Fluorescent-Labeled Agents by Non-Invasive Tomographic Imaging. *PLoS ONE* 6, e20594
- Wilgus M-L, Borczuk AC, Stoopler M, Ginsburg M, Gorenstein L, Sonett JR, Powell CA (2011): Lysyl oxidase: a lung adenocarcinoma biomarker of invasion and survival. *Cancer* 117, 2186–2191
- Winter MJ, Nagelkerken B, Mertens AEE, Rees-Bakker HAM, Briaire-de Bruijn IH, Litvinov SV (2003): Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res* 285, 50–58
- Wu M, Min C, Wang X, Yu Z, Kirsch KH, Trackman PC, Sonenshein GE (2007): Repression of BCL2 by the tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide inhibits transformed phenotype of lung and pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 67, 6278–6285
- Würth C, Hoffmann K, Behnke T, Ohnesorge M, Resch-Genger U (2011): Polymer-and glass-based fluorescence standards for the near infrared (NIR) spectral region. *J Fluoresc* 21, 953–961
- Xu K, Wang F, Pan X, Liu R, Ma J, Kong F, Tang B (2013): High selectivity imaging of nitroreductase using a near-infrared fluorescence probe in hypoxic tumor. *Chem Commun* 49, 2554–2556
- Xu M, Rettig MP, Sudlow G, Wang B, Akers WJ, Cao D, Mutch DG, DiPersio JF, Achilefu S (2012): Preclinical evaluation of Mab CC188 for ovarian cancer imaging. *Int J Cancer* 131, 1351–1359
- Yamashita YM, Fuller MT, Jones DL (2005): Signaling in stem cell niches: lessons from the *Drosophila* germline. *J Cell Sci* 118, 665–672
- Yu G, Yao W, Xiao W, Li H, Xu H, Lang B (2014): MicroRNA-34a functions as an anti-metastatic microRNA and suppresses angiogenesis in bladder cancer by directly targeting CD44. *J Exp Clin Cancer Res* 33, 779
- Yu H, Mouw JK, Weaver VM (2011): Forcing form and function: biomechanical regulation of tumor evolution. *Trends Cell Biol* 21, 47–56
- Yuan A, Wu J, Tang X, Zhao L, Xu F, Hu Y (2013): Application of near-infrared dyes for

tumor imaging, photothermal, and photodynamic therapies. *J Pharm Sci* 102, 6–28

Zaman MH, Trapani LM, Sieminski AL, Siemeski A, Mackellar D, Gong H, Kamm RD, Wells A, Lauffenburger DA, Matsudaira P (2006): Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10889–10894

Zhang Q, Jin X-S, Yang Z-Y, Wei M, Zhu X-C, Wang P, Liu B-Y, Gu Q-L (2013): Upregulated expression of LOX is a novel independent prognostic marker of worse outcome in gastric cancer patients after curative surgery. *Oncol Lett* 5, 896–902

Zhang X, Yang Y, Fan D, Xiong D (2017): The development of bispecific antibodies and their applications in tumor immune escape. *Exp Hematol Oncol* 6, 40164

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Frauke Alves für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Hämatologie und Medizinischen Onkologie bei ihr durchführen zu können, für das gezeigte Vertrauen in meine Arbeit und ihre herausragende wissenschaftliche Führung. Ebenfalls großer Dank gebührt Dr. rer. nat. Jeannine Missbach-Güntner und Dr. rer. nat. Diana Pinkert-Leetsch, die mir während meiner gesamten Promotionszeit mit ihrer wissenschaftlichen Expertise zur Seite standen. Ganz herzlicher Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe „Molecular Imaging in Oncology“ der Abteilung für Hämatologie und Medizinische Onkologie der Georg-August-Universität Göttingen sowie dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, in deren Umfeld ich nicht nur einen regen wissenschaftlichen Austausch erfahren durfte, sondern freundschaftlich empfangen wurde. Mit einem so aufgeschlossenen und hilfsbereiten Team arbeiten zu können, hat mich jeden Tag aufs Neue motiviert.