

Aus der Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

In vitro und in vivo Untersuchungen zur Wirksamkeit der
Kombinationstherapie aus dem TIMP-1-GPI Fusionsprotein und
Doxorubicin im HT1080-Fibrosarkom Modell

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Daniela Augsburg
aus Nürnberg
Magdeburg 2018

Bibliographische Beschreibung

Augsburger, Daniela: „*In vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus dem TIMP-1-GPI Fusionsprotein und Doxorubicin im HT1080-Fibrosarkom Modell“

- 2018, 57 Seiten, 21 Abbildungen, 14 Tabellen, 86 Literaturquellen, 1 Anlage

Kurzreferat:

Das adulte Fibrosarkom ist ein hochmaligner Tumor mesenchymalen Ursprungs. Die oftmals schlechte Prognose liegt unter anderem in der hohen Rate therapieresistenter Tumorzellen begründet. Zur Verbesserung der Überlebenschancen, ist die Erforschung neuer, resistenzüberwindender Therapiestrategien unabdingbar. Die vorliegende Arbeit leistete einen Beitrag zur Resistenzforschung des adulten Fibrosarkoms. Der Fokus richtete sich hierbei auf das TIMP-1-GPI-Fusionsprotein, das hinsichtlich seines Einflusses auf die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Doxorubicin untersucht wurde. *In vitro* wurde die Wirkung der Kombinationstherapie auf die Zellproliferation, das klonogene Potential der Zellen und die Zellmigration beobachtet. Die Untersuchung der Wirksamkeit *in vivo* erfolgte an tumortragenden Balb/c Nacktmäusen. Die *in vitro*-Zytotoxizitäts- und Migrationsstudien ließen eine, die Chemosensitivität der Zellen wiederherstellende, Wirkung des Fusionsproteins erkennen. Diese Beobachtung konnte am neoadjuvanten Tiermodell bestätigt werden. Darüber zeigte sich *in vitro* ein therapeutischer Nutzen der Kombinationstherapie aus TIMP-1-GPI und Doxorubicin gegenüber TIMP-1-GPI-Monotherapie. Trotz neoadjuvanter Therapiekonzepte und großzügiger Tumorresektionen, kommt es in über 50% der Fälle zur Entstehung lokoregionaler Tumorrezidive. Dies legt die Entwicklung einer wirksamen Rezidivprophylaxe nahe. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das TIMP-1-GPI-Fusionsprotein hinsichtlich der Eignung zur postoperativen Rezidivprophylaxe untersucht. Die Ergebnisse gaben erste Hinweise auf eine rezidivprophylaktische Wirkung des Fusionsproteins.

Schlüsselwörter:

Adultes Fibrosarkom - TIMP-1-GPI - Doxorubicin - Chemotherapie

Inhaltsverzeichnis

Bibliographische Beschreibung	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Das adulte Fibrosarkom	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Therapie	1
1.1.3 Prognose.....	2
1.2 Die Tumormikroumgebung.....	2
1.2.1 Übersicht	2
1.2.2 Zusammensetzung der extrazellulären Tumormatrix	2
1.2.3 Die Rolle der Matrixmetalloproteinasen im Tumorgewebe	3
1.2.4 Metalloproteinase-Inhibitoren	5
1.2.4.1 Physiologische Inhibitoren.....	5
1.2.4.2 Das TIMP-1-GPI-Fusionsprotein	5
1.3 Chemoresistenzen	7
2 Zielsetzung der Arbeit.....	9
3 Materialien.....	10
3.1 <i>In vitro</i>	10
3.1.1 Geräte	10
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	11
3.1.3 Chemikalien, Reagenzien.....	12
3.1.4 Antikörper	12
3.1.4.1 Primäre Antikörper	12
3.1.4.2 Sekundäre Antikörper	13
3.1.5 Zellkultur.....	13
3.1.5.1 Medien, Zusätze, Sonstiges.....	13
3.1.6 Rekombinante Proteine und Peptide	14
3.1.7 Chemotherapeutika	14
3.1.8 Software	15
3.1.9 Kits	15
3.2 <i>In vivo</i>	15
3.2.1 Versuchstiere	15

3.2.2	Verwendetes OP-Instrumentarium.....	16
3.2.3	Injektionsanästhesie	16
4	Methodik.....	17
4.1	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> verwandte Behandlungsgruppen	17
4.2	<i>In vitro</i>	17
4.2.1	Routinearbeiten in der Zellkultur	17
4.2.1.1	Zellkultivierung.....	17
4.2.1.2	Trypsinisierung von Zellen und Subkultivierung	17
4.2.1.3	Zellzahlbestimmung.....	18
4.2.1.4	Kryokonservierung von Zellen	18
4.2.1.5	Rekultivierung eingefrorener Zellen	18
4.2.2	CCK-8-Proliferationsassays	18
4.2.2.1	Zytotoxizitätsbestimmung der Einzelsubstanzen TIMP-1-GPI, bzw. Doxorubicin	19
4.2.2.2	Zytotoxizitätsbestimmung der Kombinationstherapie aus TIMP-1-GPI und Doxorubicin	20
4.2.2.3	Koloniebildungstest	20
4.2.3	Scratch Assay/Wound healing Assay	21
4.3	<i>In vivo</i>	22
4.3.1	Tierhaltung.....	22
4.3.2	Anästhesie und Analgesie.....	22
4.3.3	Generierung der subkutanen Weichteilsarkome.....	22
4.3.4	Kontrolle des Tumorwachstums	23
4.3.5	Berechnung des Tumolvolumens.....	23
4.3.6	Neoadjuvantes Therapiemodell.....	23
4.3.6.1	Tiere	23
4.3.6.2	Ablauf	24
4.3.6.3	Intratumorales Behandlungskonzept.....	25
4.3.6.4	Chemotherapie	26
4.3.7	Modellversuch zur postoperativen Rezidivprophylaxe	26
4.3.7.1	Tiere	26
4.3.7.2	Ablauf	26
4.4	<i>Ex vivo</i>	28
4.4.1	Immunhistologie.....	28
4.4.1.1	Paraffineinbettung.....	28
4.4.1.2	Herstellung von Paraffin-Schnittpräparaten	28
4.4.1.3	Hämatoxylin- und Eosin-Färbung	28

4.4.1.4 Ki-67-, CD31-Färbung	29
4.4.1.5 TUNEL-Färbung	30
4.4.1.6 Mikroskopische Auswertung	30
4.4.1.6.1 CD31- und Ki67-Bildanalyse	30
4.4.1.6.2 TUNEL-Bildanalyse	31
4.5 Statistische Auswertung	31
6 Ergebnisse	32
<i>In vitro</i>	32
6.1 IC ₅₀ -Wertbestimmung für TIMP-1-GPI und Doxorubicin	32
6.2 Zytotoxizität von TIMP-1-GPI kombiniert mit Doxorubicin.....	34
6.3 Hemmung der Klonogenität in Single-Cell-Kolonien.....	35
6.4 Beobachtung der Zellmigration mittels Scratch Assay.....	37
<i>In vivo</i>	40
6.5 <i>In vivo</i> Kombinationsversuche mit TIMP-1-GPI und Doxorubicin.....	40
6.5.1 Bewertung der Körpergewichtsentwicklung.....	41
6.5.2 Tumorwachstum	42
6.5.3 Tumorgewicht und –volumen	44
6.5.4 Immunhistologische Auswertung.....	45
6.6 <i>In vivo</i> Rezidivprophylaxe mit TIMP-1-GPI.....	47
6.6.1 Entwicklung des Körpergewichts	47
6.6.2 Ergebnisse der postoperativen TIMP-1-GPI-Behandlung	48
7 Diskussion.....	50
7.1 Überblick.....	50
7.2 Dosisfindung <i>in vitro</i>	50
7.3 Untersuchung der Zytotoxizität der TIMP-1-GPI-Doxorubicin-Kombinationsbehandlung	51
7.4 Der Einfluss des TIMP-1-GPI-Fusionsproteins und des Doxorubicins auf die proteolyseabhängige und proteolyseunabhängige Zellmigration.....	51
7.5 Versuchsablauf <i>in vivo</i> : Diskussion und Erklärungsansätze	53
7.6 Wirkung der TIMP-1-GPI-Doxorubicin-Kombinationstherapie <i>in vivo</i>	53
7.7 Die tumorprogressive Wirkung der Low-Dose-Doxorubicin-Therapie und die Rolle des p53-Proteins	54
7.8 Untersuchung der Tumorresektate <i>ex vivo</i>	55
7.9 Der Einsatz desTIMP-1-GPI-Fusionsproteins zur Rezidivprophylaxe	56
8 Zusammenfassung	57
Literaturverzeichnis	VIII
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	XIV

Abbildungen.....	XIV
Tabellen.....	XIV
Danksagungen	XV
Ehrenerklärung.....	XVI
Darstellung des Bildungsweges.....	XVII
Anlage.....	XVIII

Abkürzungsverzeichnis

ABC.....	Avidin-Biotin-Komplex
ANOVA	Varianzanalyse, analysis of variance
BSA.....	Rinderserumalbumin, bovine serum albumin
CAM-DR.....	cell adhesion mediated drug resistance
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAB+.....	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI.....	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulphoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA.....	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMDR	environment mediated drug resistance
EtOH	Ethanol
FBS.....	fötales Kälberserum, fetal bovine serum
FCS.....	Fetales Kälberserum, fetal calf serum
FGF.....	Fibroblastenwachstumsfaktor, fibroblast growth factor
FPLC.....	Fast protein liquid chromatography
GSE	genetic suppressor elements
H.E.....	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, high performance liquid chromatography
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IQR.....	Interquartilabstand, interquartile range
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LFA-3	Lymphozytenfunktionsantigen-3
MD.....	Median
MDR.....	Multi-drug-resistance
mg.....	Milligramm
ml.....	Milliliter
mM.....	Millimol

MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MT-MMP	Membrane-type MMP
MW	Mittelwert
NK	Natürliche Killerzelle
n.s.	nicht signifikant
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, Phosphate-buffered saline
pEF	Expressionsfaktor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
SFM-DR	factor mediated drug resistance
TAF	Tumorassoziierter Fibroblast
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TMV	tumor-derived microvesicle
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid
u-PAR	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-Rezeptor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WST-8	Water Soluble Tetrazolium Salt-8

1 Einleitung

1.1 Das adulte Fibrosarkom

1.1.1 Epidemiologie

Das adulte Fibrosarkom ist ein seltener, hoch maligner Tumor mesenchymalen Ursprungs, der laut der aktuellen WHO-Klassifikation zur Gruppe der malignen, fibroblastischen Weichteiltumore zählt [1]. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr. Männer sind im Geschlechtervergleich etwas häufiger betroffen als Frauen [2]. Vor rund 50 Jahren noch stellte das adulte Fibrosarkom den am häufigsten diagnostizierten Weichteiltumor dar, der heutzutage problemlos in mehr als 50 Subtypen klassifiziert werden kann [3]. Die Inzidenz des adulten Fibrosarkoms, gemessen an der Inzidenz aller Weichteiltumore des Erwachsenenalters, liegt bei nunmehr 3,6% [4]. Seine Ursprungszellen sind meist in der Tiefe des Bindegewebes gelegene entartete Fibroblasten mit einer exzessiv hohen Teilungsrate. Die damit einhergehende überschießende Kollagenbildung führt zum Ungleichgewicht in der Zusammensetzung des umliegenden Gewebes. Zu den Prädilektionsstellen zählen die Extremitäten und der Körperstamm, seltener die Kopf-Hals-Region und das Retroperitoneum. Die Diagnostizierung des adulten Fibrosarkoms erfolgt stets nach Ausschluss anderer in Frage kommender Weichteiltumorentitäten. Dies macht eine interdisziplinäre Zusammenarbeit unabdingbar. Neben der gründlichen Anamnese, der körperlichen Untersuchung und der entsprechenden Bildgebung, spielen histopathologische, immunhistochemische und molekulargenetische Untersuchungen bei der Diagnosefindung eine wichtige Rolle.

1.1.2 Therapie

Sofern anatomisch möglich, gilt die chirurgische Tumorentfernung im Gesunden (R0) als Mittel der Wahl. Ein allgemein gültiger intraoperativer Sicherheitsabstand konnte bisher nicht festgelegt werden, begründet durch das Fehlen einer eindeutigen Abgrenzung des malignen Gewebes zur Umgebung. Der Begriff der Pseudokapsel beschreibt die Wachstumsfront des Tumors. Ein Tumorbefall über die Pseudokapsel hinaus, in das angrenzende peritumorale Ödem, ist wahrscheinlich. Oftmals geht das infiltrative Wachstum des adulten Fibrosarkoms mit der Ummauerung anatomisch wichtiger Strukturen, wie beispielsweise nahegelegener Gefäße und Nerven, einher. Da eine R0-Resektion unter Erhalt dieser Strukturen praktisch nicht gewährleistet werden kann, wird in diesen Fällen eine präoperative, neoadjuvante Vorbehandlung der Tumore empfohlen. Hier sind vor allem multimodale Ansätze, wie eine Radiochemotherapie, eine systemische Chemotherapie und/oder Hyperthermie, bzw. eine hypertherme Extremitätenperfusion mit TNF-alpha/Melphalan in Erwägung zu ziehen [5].

Auch im Falle von metastasierten, irresektablen Tumoren kann eine Chemotherapie von Nutzen sein. Die Erstlinien-Chemotherapie erfolgt mit Adriamycin (Doxorubicin) und Ifosfamid [6]. Im Rahmen der adjuvanten Nachbehandlung wird der Strahlentherapie die größte Bedeutung zugeschrieben. Die ausgeprägten Resistenzeigenschaften der Tumorzellen und die damit einhergehenden niedrigen Ansprechraten der Tumore auf Radio- und Chemotherapie, tragen zur oftmals erschwerten Behandlung des adulten Fibrosarkoms bei.

1.1.3 Prognose

Die Prognose eines Fibrosarkom-Patienten hängt von verschiedenen Faktoren ab. Hierzu zählen die Tumorgröße, die Tumorlokalisierung und der histopathologische Differenzierungsgrad (Grading), wobei das Grading als der wichtigste prognostische Faktor gilt. So beträgt die 10-Jahres-Gesamtüberlebensrate der Patienten mit low-grade Tumoren 60%, derjenigen mit high-grade Tumoren lediglich 30% [7]. Rund 80% der diagnostizierten adulten Fibrosarkome werden als hochgradig maligne befundet [8]. Im Mittel treten bei etwa der Hälfte der operativ behandelten adulten Fibrosarkome lokoregionale Tumorrezidive auf. Während eine Metastasierung über die Lymphbahnen eher selten erfolgt, wurden hämatogene Metastasierungen, in hauptsächlich die Lungen und das Achsenskelett, bei 9-63% der Fibrosarkom-Patienten beschrieben [9].

1.2 Die Tumormikroumgebung

1.2.1 Übersicht

Das die Tumorzellen umgebende Gewebe, auch Tumormikroumgebung (engl. tumor microenvironment) genannt, hat in der Krebsforschung während der letzten Jahrzehnte stark an Bedeutung gewonnen. Inzwischen weiß man, dass neben der malignen Zellentartung auch diverse Veränderungen der Tumormikroumgebung einen wichtigen Beitrag zur Krebsentstehung leisten. Die reziproke Interaktion und Kommunikation maligner Tumorzellen mit ihrer Umgebung schafft Bedingungen, die eine Tumorprogression, Invasion und Metastasierung ins umgebende Gewebe erleichtern. Darüber hinaus ist die Tumormikroumgebung an der Entstehung therapieresistenter Tumorzellen beteiligt [10; 11].

1.2.2 Zusammensetzung der extrazellulären Tumormatrix

Die Tumormikroumgebung setzt sich aus einer zellulären, aus Tumorzellen, tumor-assoziierten Fibroblasten (TAFs), glatten Muskelzellen, Adipozyten, Endothel- und

Immunzellen (z.B. tumorassoziierte Makrophagen TAM)- bestehenden Stromakomponente und aus der Extrazellulären Matrix (EZM) zusammen [12]. Der Begriff der extrazellulären Matrix bündelt sämtliche Matrixkomponenten des extrazellulären Raums. Sie ist Bestandteil aller Grundgewebetypen und besteht neben fibrillären Proteinen (90% Kollagen Typ I, III, V) aus einer amorphen Grundsubstanz, die sich ihrerseits wiederum aus Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen, Adhäsionsmolekülen, Proteasen und der extrazellulären Gewebsflüssigkeit (Wasser, Aminosäuren, Ionen, Vitamine, Gase, Hormone, Glukose, Produkte des Metabolismus) zusammensetzt [13; 14]. Unabhängig von der Art des Gewebes, ist es Aufgabe der extrazellulären Matrix, dem Gewebe Stabilität zu verleihen, Zellen zu verankern und die Gewebshomöostase aufrechtzuerhalten. Die extrazelluläre Tumormatrix unterscheidet sich von der extrazellulären Matrix gesunden Gewebes unter anderem darin, dass im Tumorgewebe das Gleichgewicht von auf- und abbauenden Prozessen zu Gunsten letzterer gestört ist [11]. Unter den proteolytischen Enzymen kommt den Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) die größte Bedeutung zu.

1.2.3 Die Rolle der Matrixmetalloproteinasen im Tumorgewebe

Die Gruppe der MMPs ist eine Familie zinkabhängiger Endopeptidasen. Bisweilen sind 23 verschiedene MMPs bekannt, die sich in fünf Gruppen einteilen lassen: Gelatinasen, Kollagenasen, Stromelysine, Membranoelastasen und eine membranverankerte Variante (MT-MMP) [15; 16]. Durch den Abbau fibrillärer Proteine tragen sie in großem Maße zur Reorganisation der EZM bei. Während die Expression der MMPs im gesunden Gewebe relativ gering gehalten wird, ist Tumorgewebe oftmals durch eine erhöhte Konzentration matrixdegradierender Proteasen gekennzeichnet. Dies trifft insbesondere auf die invasive Wachstumsfront, dem Grenzbereich zwischen Tumor- und Normalgewebe, zu. Der vermehrte Matrixabbau verschafft den Krebszellen Raum, um in umliegendes Gewebe vorzudringen. Zusätzlich haben MMPs durch Beseitigung physikalischer Barrieren, wie die der Gefäßmembrane, einen wichtigen Anteil an der Tumorzell-Metastasierung. Durch den proteolytischen Matrixabbau werden wiederum Wachstumsfaktoren und andere Signalmoleküle freigesetzt, die das Tumorstadium durch Stimulation der Tumorzellproliferation, -migration und der Gefäßneubildung weiter vorantreiben (Abb. 1). Die Ursache für den erhöhten Anteil an MMPs im Tumorgewebe liegt zum einen in der tumorzelleigenen MMPs-Produktion begründet. Die von den Tumorzellen sezernierten Proteasen werden beispielsweise direkt durch Exozytose an die Umgebung abgegeben. Darüber hinaus ist auch die Abschnürung Protease-beladener Vesikel, wie der Exosomen, Apoptosekörperchen, Tumormikrovesikel (engl. tumor-derived microvesicles TMV), möglich. Deren Inhalt wird entweder durch Zerfall im sauren Tumormikromilieu oder durch Fusion mit

umliegenden Stromazellen freigesetzt [15; 17]. Der weitaus größere Teil der MMPs stammt jedoch von Bindegewebszellen der Tumormikroumgebung, allen voran der Fibroblasten, bzw. der „versklavten“ tumor-assoziierten Fibroblasten (engl. cancer associated fibroblasts CAFs) [18; 19]. MMPs werden als inaktive Propeptide, sogenannte Zymogene, sezerniert und durch proteolytische Spaltung, bzw. chemische Modifikation aktiviert. Die Zymogenaktivierung erfolgt hauptsächlich extrazellulär durch bereits aktivierte MMPs oder durch Serinproteasen, wie dem Plasmin. Im Falle der MT-MMPs sind auch intrazelluläre, Furin-abhängige Aktivierungsmechanismen möglich [20]. Das MMP-Profil ist tumorspezifisch und abhängig vom Tumorprogressionsstadium. Bei der Tumorinvasion und Metastasierung adulter Weichteilsarkome scheinen insbesondere die beiden Proteasen MMP-2 und MMP-9 eine bedeutende Rolle zu spielen [21; 22]. Die Regulation der MMP-Aktivität erfolgt demnach zum einen auf Ebene der MMP-Genexpression und der Zymogenaktivierung. Darüber hinaus kommt den MMP-Inhibitoren eine wichtige regulierende Funktion zu.

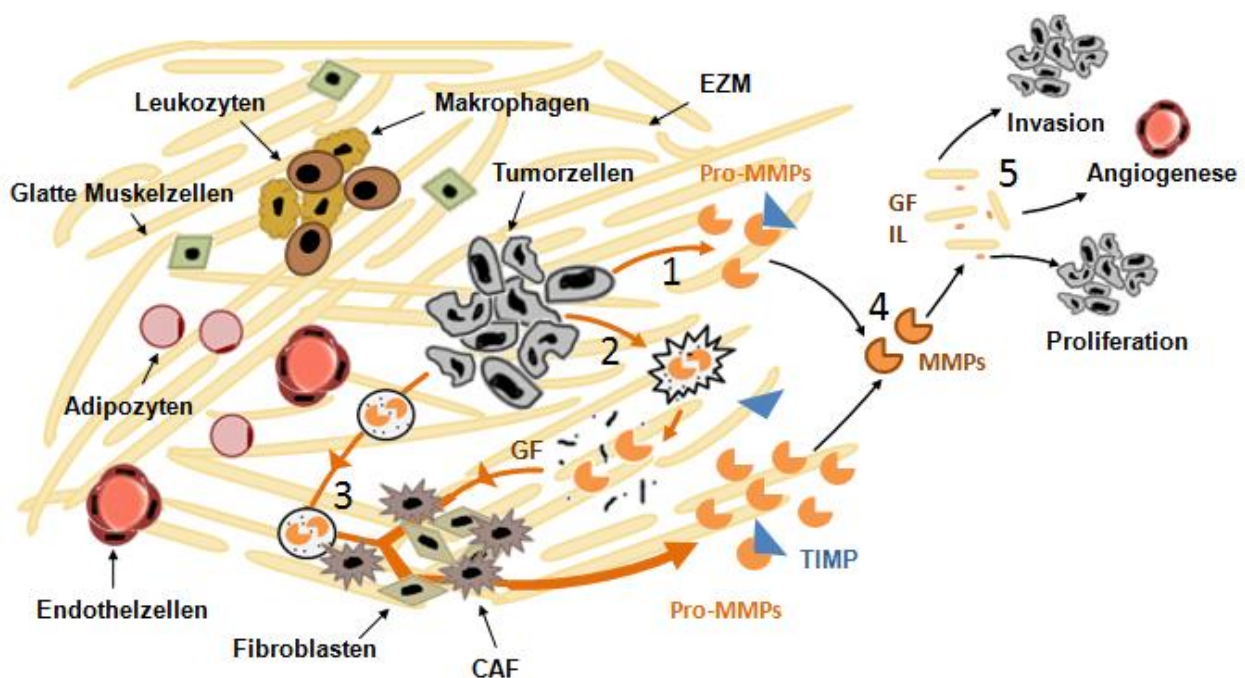


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Tumormikroumgebung

Tumorzellen, Fibroblasten, cancer associated fibroblasts (CAF), Endothelzellen, Adipozyten, glatte Muskelzellen und Immunzellen (u.a. Makrophagen, Leukozyten) sind in die extrazelluläre Matrix (EZM) eingebettet. Die Zahl und Aktivität der extrazellulären Matrix-Metalloproteinasen ist im Tumorgewebe erhöht. (1) Diese werden entweder über Exozytose von den Tumorzellen direkt sezerniert oder via Vesikel abgeschnürt. Die Protease- und Wachstumsfaktoren beladenen Vesikel (2) zerfallen im sauren Milieu oder (3) fusionieren mit benachbarten Stromazellen. Die dadurch aktivierten Stromazellen exprimieren pro-MMPs, die (4) im aktiven Zustand zum Abbau der Matrix beitragen und folglich (5) die Tumorproliferation, -invasion und die Angiogenese vorantreiben.

1.2.4 Metalloproteinase-Inhibitoren

1.2.4.1 Physiologische Inhibitoren

Um einen überschießenden Matrixabbau zu verhindern, unterliegen MMPs einer strengen Kontrolle durch zahlreiche Inhibitoren. In diesem Zusammenhang sind das α 2-Makroglobulin, der wichtigste Plasmainhibitor, und die Gruppe der TIMPs (engl. tissue inhibitors of metalloproteinases) als die wichtigsten Gewebehinhibitoren zu nennen [23; 24]. Das im gesunden Gewebe relativ konstant gehaltene Verhältnis aus Metalloproteinasen und deren Inhibitoren, gerät im Zuge der Tumorprogression oftmals aus dem Gleichgewicht. Dies ist insbesondere in der Grenzregion zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe der Fall. Das gesunde Gewebe reagiert auf die erhöhte Konzentration extrazellulärer Proteasen mit einer gleichzeitigen Steigerung der TIMP-Produktion. Bei fortschreitender Tumorprogression reicht dieser Gegensteuerungsmechanismus jedoch nicht aus, um die überproportionale MMP-Expression auszugleichen. Die Familie der TIMPs mit derzeit 4 bekannten Isoformen (TIMP-1, -2, -3 und -4) zählt zu den wichtigsten Gewebehinhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen. Die Inaktivierung des Substrats erfolgt über eine 1:1 stöchiometrische Bindung des Inhibitors an das jeweilige MMP-Propeptid (pro-MMP). Als Breitspektrum-Inhibitoren besitzen sie die Fähigkeit mehrere MMP-Subklassen zu hemmen, wobei sich die vier Isoformen in ihren Bindungsaffinitäten voneinander unterscheiden [24]. Bei der Erforschung neuer Strategien zur Behandlung der Weichteilsarkome, wird der TIMP-1-Isoform besondere Aufmerksamkeit zuteil. Während eine erhöhte TIMP-1-Konzentration in einigen Tumorentitäten mit einer Tumorprogression in Verbindung gebracht wurde, gaben experimentelle Weichteilsarkom-Studien Hinweise auf eine protektive Funktion des Proteins [25; 26]. Die ambivalente Wirkung des TIMP-1-Proteins ist letztendlich konzentrations- und tumorabhängig [27; 28].

1.2.4.2 Das TIMP-1-GPI-Fusionsprotein

Um das Ungleichgewicht zwischen den Matrix-abbauenden Proteasen und den in der Unterzahl vorhanden Inhibitoren auszugleichen, testete man in der Vergangenheit bereits zahlreiche Breitspektrum-Inhibitoren (u.a. Batimastat, Marimastat). Aufgrund der hohen Rate an Nebenwirkungen, wie dem Muskuloskeletalen Syndrom, und der Tatsache, dass therapeutische Plasmaspiegel häufig nicht erreicht wurden, musste die Mehrzahl der klinischen Phase-III Studien vorzeitig abgebrochen werden [29; 30]. Zur Vermeidung der systemischen Nebenwirkungen, richtet sich der Fokus nun vermehrt auf die lokale Anreicherung der Protease-Inhibitoren im Tumorgewebe. Eine Möglichkeit der gezielt intratumoralen Inhibitorerhöhung stammt von Nelson et al. Seine Arbeitsgruppe verwandte

die Methode des „cell surface engineering“, bei der Proteine mit einem GPI-Anker verknüpft und anschließend in die Zellmembran inkorporiert werden (Abb. 2) [27; 31]. Im Gegensatz zur Gentherapie, die unter anderem mit dem Risiko der Insertionsmutagenese und Karzinogenese behaftet ist, wird eine Manipulation des Erbguts der Zellen beim „cell surface engineering“ umgangen. Zunächst klonierte man die cDNA Sequenz des humanen TIMP-1-Gens unter Verwendung spezifischer Primer und fusionierte diese anschließend mit der GPI-Signalsequenz aus der cDNA des LFA-3-Proteins. Das dadurch erhaltene TIMP-1-GPI-Fusionsgen wurde nun im Expressionsvektor pEF-DHFR (Elongationsfaktor Promotor – Dihydrofolat Reduktase) subkloniert und in DHFR-defiziente Zellen der Zelllinie CHO (engl. Chinese hamster ovary) transfiziert [32]. Nach der sich anschließenden Extraktion aus der Zellmembran des von den CHO Zellen synthetisierten TIMP-1-GPI Fusionsproteins, reinigte man es mittels FPLC (engl. fast protein liquid chromatography). Eine Behandlung humaner Fibrosarkomzellen (HT1080) mit dem Fusionsprotein führte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums [27].

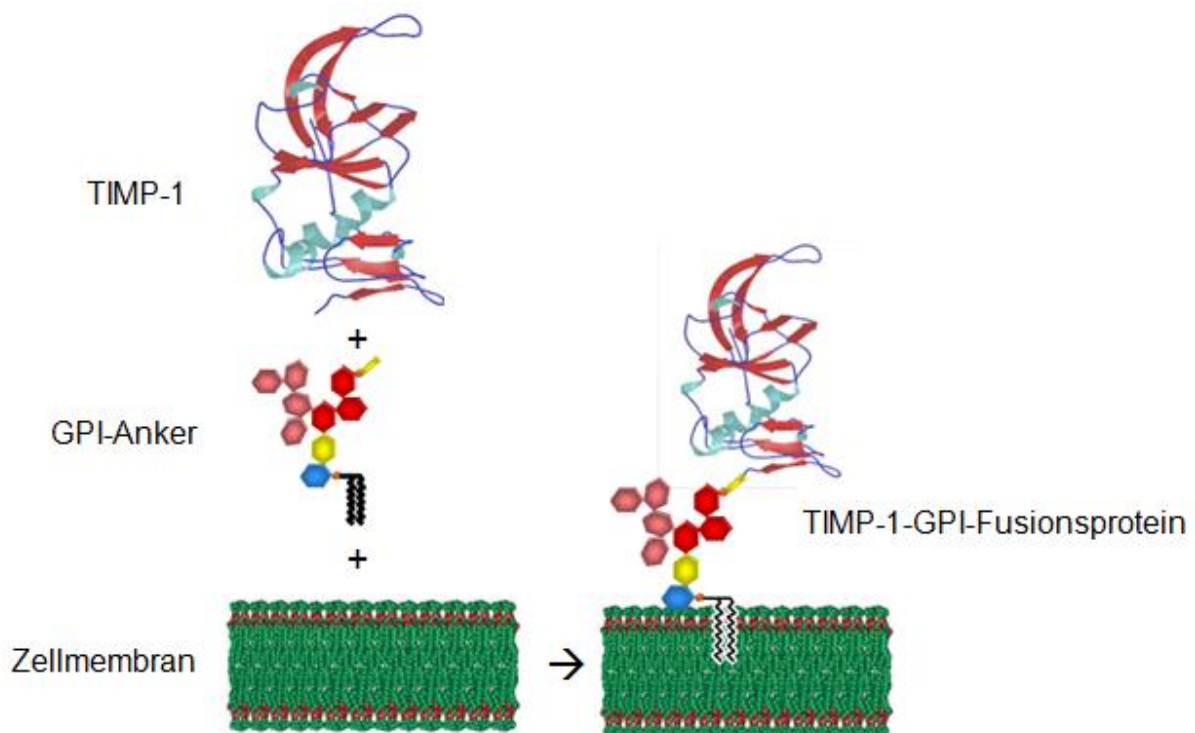


Abb. 2: Cell surface engineering

Die Abbildung zeigt schematisch die Methode des cell surface engineering, bei der Proteine, wie das TIMP-1-Protein, mit einem GPI-Anker verknüpft werden, um diese in die Zellmembran zu inkorporieren.

1.3 Chemoresistenzen

Ein großes Problem in der Weichteilsarkomtherapie, das es zu überwinden gilt, ist das geringe Ansprechen der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika. Die Mechanismen, die zur Entstehung chemotherapieresistenter Zellen führen, sind komplex und Gegenstand der aktuellen Forschung. Auch in diesem Punkt spielt die enge Interaktion der Tumorzellen mit ihrer Mikroumgebung eine wichtige Rolle. Der Begriff der „environment mediated drug resistance“ (EMDR) beschreibt die Beteiligung der Tumormikroumgebung bei der Entstehung primärer Therapieresistenzen [33]. Das Tumorgewebe ist als ein genetisch heterogener Zellverband anzusehen. Die Tumorzellen reagieren sehr unterschiedlich auf eine chemotherapeutische Behandlung. Während sich ein Teil der Zellen aufgrund eines mutationsbedingten Selektionsvorteils weiter teilt, werden andere Zellen via G0/G1-Zellzyklusarrest so lange in einen Ruhezustand versetzt, bis auch sie in Folge genetischer Veränderungen einen resistenten Phänotyp erwerben [34; 35]. Je nach Resistenzgrad des Tumors, geht ein verschieden großer Teil der Zellen infolge der zytotoxischen Wirkung des Agens zugrunde. Bei der EMDR unterscheidet man zwischen der „factor mediated drug resistance“ (SFM-DR) und der „cell adhesion mediated drug resistance“ (CAM-DR) [36]. Zu den Auslösern der SFM-DR gehören zahlreiche Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine der Tumormikroumgebung, die der Zelle auf Transkriptionsebene beispielsweise durch die Überexpression anti-apoptotischer Proteine einen Überlebensvorteil verschaffen [37]. Die Zelladhäsions-vermittelte Medikamentenresistenz (CAM-DR) kommt durch die Bindung von Integrinen der Tumorzelloberfläche an Proteine der EZM wie Kollagene, Fibronektine und Laminine zustande. In diesem Fall führt die Stimulation Integrin-vermittelter Signalwege zur Ausbildung von Therapieresistenzen [38]. Darüber hinaus wurde das chemotherapeutische Agens selbst als Auslöser für die Resistenzentwicklung identifiziert. Diese sogenannten sekundär erworbenen Resistenzen gehen oftmals mit einer erhöhten Expression von Effluxpumpen, wie z.B. den Multi-Drug-Resistance-Proteinen (MDR), einher [39]. Dies hat zur Folge, dass die Zytostatika aus der Zelle transportiert werden, bevor diese ihre Wirkung entfalten konnten [39].

Bei der Behandlung adulter Weichteilsarkome kommt das Doxorubicin, ein Chemotherapeutikum aus der Gruppe der Anthrazykline, standardmäßig zum Einsatz. Auch wenn lediglich 18% bis 29% der behandelten Weichteilsarkome auf eine Monotherapie mit Doxorubicin ansprechen, bleibt es im Vergleich zu anderen Substanzen das therapeutisch effektivste Agens [40]. Die geringe Ansprechrate liegt zum einen daran, dass die hohe systemische Toxizität des Doxorubicins eine therapeutische Dosierung verhindert. Zum anderen wird die zytostatische Wirkung der Substanz durch die ausgeprägten Chemoresistenzen der Tumorzellen limitiert [41]. Die Mechanismen, die zur Doxorubicin-Resistenz führen, sind komplex. Bei der Entstehung primärer Resistenzen wurde eine

Beteiligung des Kollagen-I (CAM-DR) und das Thrombospondin-I (SFM-DR) diskutiert [42]. Auch die in resistenten Zellen vorhandenen genetischen Suppressionselemente (engl. genetic suppressor elements, GSE) scheinen bei der Resistenzentwicklung eine Rolle zu spielen. GSEs sind kurze, biologisch aktive Genfragmente, die sowohl an der Kodierung von Antisense-RNA-Molekülen, als auch an der Kodierung dominant-inhibitorisch wirksamer Peptide beteiligt sind [43]. Die Bindung der Antisense-Sequenzen an den komplementären mRNA-Strang, verhindert die Expression pro-apoptotischer, protektiver, an der Regulation der DNA-Replikation, -Reparatur und Stressantwort beteiligter Gene. Zudem wurde eine GSE-induzierte Niedrig-Expression der Topoisomerase II, der therapeutisch relevanten Zielstruktur des Doxorubicins, beobachtet [43–45].

2 Zielsetzung der Arbeit

Das adulte Fibrosarkom ist durch sein aggressives Wachstumsverhalten, sein geringes therapeutisches Ansprechen und durch eine hohe Rate an Tumorrezidiven gekennzeichnet. Die Tumorprogression scheint unter anderem mit der Aktivität der gewebeabbauenden Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) zu korrelieren. Je höher deren Aktivität, desto fortgeschrittener der Tumor und desto schlechter die Prognose. Die Balance aus den abbauenden Proteasen und ihren spezifischen Inhibitoren, den TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases), ist in Weichteiltumoren zugunsten der matrixdegradierenden Prozesse verschoben. Mit der Entwicklung des TIMP-1-GPI-Fusionsproteins ist es Nelson et al. gelungen, die intratumorale Inhibitorkonzentration zu erhöhen, ohne dabei das Erbgut der Zellen manipulieren zu müssen.

In den von Nelson et al. durchgeführten Untersuchungen zur Erforschung des TIMP-1-GPI-Fusionsproteins, gab es erste Hinweise auf eine positive, die Chemosensitivität der Zellen steigernde Wirkung des Proteins. Diese Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen. Gegenstand und Ziel der Arbeit war es, neue Erkenntnisse bei der Untersuchung der TIMP-1-GPI-Doxorubicin-Kombinationsbehandlung sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* in Bezug auf dessen therapeutische Wirksamkeit, zu gewinnen.

Darüber hinaus wurde das TIMP-1-GPI-Fusionsprotein hinsichtlich seiner Eignung zur postoperativen Rezidivprophylaxe untersucht.

3 Materialien

3.1 *In vitro*

3.1.1 Geräte

Name	Hersteller
CO2-Inkubationsschrank Heracell 150i 12326	ThermoFischer Scientific, Germany
Digitale Analysenwaage R180D-*D1	Sartorius, Göttingen
Feinwaage,CP 225D –OCE	Sartorius AG, Göttingen
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, Hanau, Germany
Gefrierschrank -150°C	Panasonic Healthcare CO. Ltd., Japan
Herasafe KS 12469 2000 Class II Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific Inc, Germany
Infrarotlampe	Philips Consumer Lifestyle, Netherlands
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Labor-Trockenschrank	Kendro Laboratory Products, Osterode, Germany
Leica DFC 450 C-Kamera	Leica Microsystems, Germany
Leica RM2255, Rotationsmikrotom	Leica Microsystems, Germany
Manueller Zellzähler	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Mikroskope - Leica DM IL LED - Olympus CK2	Leica Microsystems, Germany Olympus, Japan
Mikrowelle	Alaska
Multimode microplate reader, Infiniti M200 Pro 200	Tecan Austria GmbH, Austria
Pipetten	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Germany
Thermo Scientific Heraeus Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc, Germany
Vortexgerät	IKA Works, Wilmington, NC, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Germany

Zentrifugen - Heraeus Fresco 17 - Biofuge 13 Heraeus Sepatech - Multi-Spin MSC-3000	ThermoFischer Scientific, Germany Heraeus Instruments GmbH, Germany Kisker Biotech., Steinfurt
--	--

Tabelle 1

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
BD Einmalspritzen Discardt II (5ml, 10ml)	Becton Dickinson S.A., Carretera, Spain
Cell Star tubes 15 ml, 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Germany
Cryoröhrchen (2ml)	Carl Roth GmbH+Co. KG, Germany
DAKO Pen	DAKO, Hamburg
Einbettkassetten	BRAND GmbH + CO., Wertheim, Germany
Einwegpipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Greiner Bio-One GmbH, Germany
Einmalhandschuhe	MaiMed GmbH, Neuenkirchen, Germany
Filter Unit, Millex-OR 0,22 µm	Tullagreen, Ireland
Mikrotiterplatten - 6-well - 24-well - 96-well	Nunc, Roskilde, Danmark Greiner Bio-One GmbH, Germany Sarstedt AG& Co. Nürnberg, Germany
Objektträger	
Pipettenspitzen (0,5-10µl, 2-200µl,50-1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Pasteurpipetten aus Glas	BRAND GmbH + CO., Wertheim, Germany
Sterilfilter 0,2 µm	
Tissue-Tek Cryomolds	NOBA, Wetter, Germany
Wattestäbchen	Sartorius, Göttingen
Zählkammer, Deckgläser	Bürker-Türk, Germany
Zellkulturflaschen - 75 cm ² , 150 cm ² - 25 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Germany TPP, Switzerland
Zellschaber M, Länge 300mm	TPP, Switzerland

Tabelle 2

3.1.3 Chemikalien, Reagenzien

Name	Hersteller
Albumin from bovine serum (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Ethanol 100%	Carl Roth GmbH+Co. KG, Germany
Ethanol 96% mit MEK vegällt	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Germany
Hydrogen peroxide 30% (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt, Germany
Immersionsöl	Carl Roth GmbH+Co. KG, Germany
Kaiser's glycerol gelatine	Merck, Darmstadt, Germany
Liquid DAB+ substrate chromogen system	Dako, CA, USA
Mayer's Hämalunlösung	Merck, Darmstadt, Germany
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Germany
Neo-Clear® (Xylol-Ersatz)	Merck, Darmstadt, Germany
Normales Ziegenserum	Vector Laboratories, CA, USA
Target retrieval solution 10x	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Trizma® Hydrochloride (TRIS HCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Trizma® (TRIS base)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

Tabelle 3

3.1.4 Antikörper

3.1.4.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Herkunft, Klonalität	Verdünnung	Speziesreaktivität	Produkt-Nr.	Hersteller
anti-CD31	Kaninchen, polyklonal	1:50 in TBS	Maus, Mensch, Schwein	ab28364	Abcam, UK
anti-Ki67	Kaninchen, monoklonal	1:50 in TBS	Maus, Ratte, Mensch, Marmosetten	ab16667	Abcam, UK

Tabelle 4

3.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies, Klonalität	Verdünnung	Spezies-reaktivität	Produkt-Nr.	Hersteller
Biotinyliertes Anti-Kaninchen IgG	Ziege, polyklonal	1:100 in TBS	Kaninchen	BA-1000	Vector Laboratories, CA, USA

Tabelle 5

3.1.5 Zellkultur

3.1.5.1 Medien, Zusätze, Sonstiges

Name	Hersteller
Medien	
DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany
DMEM-F12/B27	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany
RPMI 1640 + Glutamax-1	Gibco Invitrogen, Germany
Zusätze	
EGF (rekombinantes, humanes EGF)	PeproTech EC, UK
FGF (rekombinantes, humanes FGF)	PeproTech EC, UK
Fötales Kälberserum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, Germany
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Normocin	InvivoGen, San Diego, USA
Penicillin/Streptomycin 100 ml (10.000 Einheiten Penicillin/mL, 10 mg Streptomycin/ml)	PAN Biotech, Aidenbach, Germany
Transferrin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Sonstige Reagenzien	
DMSO (Dimethylsulphoxide)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Kristallviolettlösung (0,1% Kristallviolett)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
PBS-Puffer (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Biochrom AG, Berlin, Germany
Trypanblau (0.4%)	Gibco Invitrogen, Germany
Trypsin/EDTA	PAN Biotech, Aidenbach, Germany

Tabelle 6

Kryokonservierungsmedium:

90% FBS, 10% DMSO

Pufferlösungen:

Tris-Puffer

1L H₂O (dest.) und 0,9 g/L TRIS base
6,9 g/L TRIS HCl, 8,8 g/L Natriumchlorid
pH 7,5

Tris gepufferte Salzlösung (TBS) (10x)

1 M TrisHCl, 1,5 M NaCl, pH 7,4

PBS Pufferlösung (1x)

140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM
Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, dH₂O, pH 7,4**3.1.5.2 Zelllinie**

Zellen	Herkunft	Bezugsquelle	Zellkulturmedium
HT-1080 (humane Fibrosarkomzelllinie)	Acetabulumnahes Fibrosarkom eines 35-jährigen, männlichen Kaukasiers	ATatCC, USA	500ml DMEM, 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1ml Normocin

Tabelle 7

3.1.6 Rekombinante Proteine und Peptide

rhTIMP-1, TIMP-1-GPI

Arbeitsgruppe Prof. Nelson,
Klinikum der Universität München
[46–48]**3.1.7 Chemotherapeutika**

10mg Doxorubicin-HCl 98.0-102.0% (HPLC)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Germany

3.1.8 Software

Name	Firma
Adobe Acrobat Reader DC	Adobe Systems Inc., USA
Axio Vision 4.9 SE64 Rel.	Carl Zeiss GmbH, Germany
Citavi 5	Swiss Academic Software
i-control™ – Microplate Reader Software	Tecan Trading AG, Switzerland
Image-J software	National Institute of Health, Maryland, USA
ImmunoRatio web application	Jorma Isola & Vilppu Tuominen, Institute of Biomedical Technology, University of Tampere, Finland
Leica LAS V4.6	Leica Microsystems, Germany
Microsoft Word 2007	Microsoft Corporation, USA
Prism 6.0	GraphPad Software, La Jolla, USA

Tabelle 8

3.1.9 Kits

Avidin/Biotin blocking kit	Vector Laboratories, CA, USA
Cell Counting Kit-8	Dojindo Laboratoris, Japan
In Situ Cell Death Detection Kit, POD	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit	Lonza, Rockland, ME USA
Vectastain® ABC kit	Vector Laboratories, CA, USA

3.2 In vivo

3.2.1 Versuchstiere

Tierspezies	Geschlecht	Tierstamm	Anzahl	Alter	
Maus	weiblich	BALB/c nu/nu	27	4 Wochen	Charles River, Sulzfeld, Germany
Maus	männlich	BALB/c nu/nu	6	4 Wochen	Charles River, Sulzfeld, Germany

Tabelle 9

3.2.2 Verwendetes OP-Instrumentarium

Material	Hersteller
Einmalkanüle 23G, BD Microlance	Becton Dickinson S.A., Carretera Mequinenza, Spain
Einmalkanüle 30G, Sterican	B. Braun Melsungen AG, Germany
Einmalskalpell	Feather Safety Razor Co., Japan
Nadelhalter	Dosch GmbH, Heidelberg, Germany
Nahtmaterial, VICRYL 4-0	Johnson & Johnson, Belgium
Pinzette	Dosch GmbH, Heidelberg, Germany
Schere	Dosch GmbH, Heidelberg, Germany
Spritze 1ml, Omnifix-F 1ml	B. Braun Melsungen AG, Germany
Stieltupfer	Lohmann & Rausch International GmbH & Co. KG, Germany

Tabelle 10

3.2.3 Injektionsanästhesie

Ketanest® (Ketaminhydrochlorid, 100mg/ml)	Pfizer Pharmacia GmbH, Berlin Germany
Rompun® (Xylazinhydrochlorid, Sol 2 %)	Bayer Healthcare, Leverkusen, Germany
0,9% Natriumchlorid	B. Braun Melsungen AG, Germany

4 Methodik

4.1 *In vitro* und *in vivo* verwandte Behandlungsgruppen

- Kontrolle/Vehikel (V)
- Doxorubicin (D)
- rekombinantes TIMP-1 (rhT)
- rekombinantes TIMP-1 in Kombination mit Doxorubicin (rhT+D)
- TIMP-1-GPI (T)
- TIMP-1-GPI in Kombination mit Doxorubicin (T+D)

4.2. *In vitro*

4.2.1 Routinearbeiten in der Zellkultur

Bei allen Zellexperimenten und Kulturarbeiten wurde stets auf sterile Arbeitsbedingungen geachtet, um die Zellen vor Kontaminationen zu schützen. Aus diesem Grund wurden sämtliche Zellarbeiten stets unter einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt.

4.2.1.1 Zellkultivierung

Die humane Krebszelllinie HT1080 wurde im dafür vorgesehenen Medium kultiviert und bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Der Mediumwechsel fand jeden zweiten bis dritten Tag statt.

4.2.1.2 Trypsinisierung von Zellen und Subkultivierung

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von etwa 80-90% kultiviert und anschließend passagiert. Hierzu saugte man zunächst das alte Medium ab und wusch die Zellen je nach Größe der Zellkulturflasche (25cm², 75 cm², bzw. 150 cm²) mit 2ml, 5ml, bzw. 10ml PBS. Nun wurden 1ml, 2ml, bzw. 4ml Trypsin/EDTA auf den Zellrasen gegeben. Sobald sich die Zellen vollständig ablösen ließen, wurden zur Inhibition des Trypsins 3ml, 5ml, bzw. 7ml Medium hinzugefügt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nun notierte man das Gesamtvolumen, entnahm 100 µl der Zellsuspension zur Zellzahlbestimmung, zentrifugierte die Zellsuspension (5 min, 1000 rpm) und resuspendierte das Zellsediment. Je nach Bedarf und Größe der Zellkulturflasche, wurden daraufhin 5x10⁵ - 2x10⁶ Zellen neu ausgesät.

4.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Zur Ermittlung der Zellzahl (Anzahl der Zellen pro ml Medium) wurden 100µl Zellsuspension mit Trypanblau (0,4%) im Verhältnis 1:1 verdünnt und angefärbt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte nun unter dem Mikroskop durch Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer. Die Trypanblau-negative Zellen wurden in vier Großquadranten gezählt. Die Gesamtzellzahl bestimmte man mit der folgenden Formel:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{gezählteZellen} \times \text{GesamtvolumenZellsuspension}}{4} \times 10^4 \times 2 (\text{Verdünnungsfaktor})$$

4.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Zellen, resuspendierte man pro Kryoröhrchen 2-4 x 10⁶ Zellen durch Zugabe eines Einfriermediums (90% FCS, 10% DMSO). Es folgte die Überführung der Röhrchen in einen schrittweise von 4°C (30 min) auf -20°C (72h) heruntergekühlenden Isopropylalkohol-Kryokontainer. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Kryoröhrchen anschließend in einen -160°C kalten Stickstofftank überführt.

4.2.1.5 Rekultivierung eingefrorener Zellen

Zur Zell-Rekultivierung wurden die gefrorenen Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und unverzüglich in 37°C warmes Wasserbad überführt. Sobald die Zellsuspension vollständig aufgetaut war, saugte man den Überstand ab, resuspendierte das Zellsediment in Medium und pipettierte die Zellsuspension in die vorbereiteten Zellkulturflaschen.

4.2.2 CCK-8-Proliferationsassays

Beim CCK-8-Assay (Cell Counting Kit) handelt es sich um eine enzymbasierte, kolorimetrische Methode zur Messung der Zellproliferation und -zytotoxizität. Das Assay basiert auf der Quantifizierung stoffwechselaktiver Zellen. In einer, durch intrazelluläre Dehydrogenasen katalysierten, chemischen Reaktion wird das farblose Tetrazoliumsalz WST-8 zum orange-farbenen, wasserlöslichen Formazan reduziert. Die Intensität der Färbung ist hierbei proportional zur Anzahl lebender Zellen und kann spektrophotometrisch bestimmt werden.

Man behandelte die Kontrollgruppe jeweils mit serumfreiem Medium. In jedem der drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche wurden pro untersuchter Konzentration sechs Wiederholungen angesetzt. Die Platten wurden mittels ELISA-Reader (200 PRO Plate

Reader von Tecan) bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzfilter: 650 nm) photometrisch ausgelesen. Die Umrechnung der Messwerte in Prozentwerte erfolgte mittels Microsoft Excel 2007. Die unbehandelten Kontrollen dienten hierbei als Referenzwerte. Aus den drei unabhängigen Messungen wurden sowohl die Mittelwerte als auch Standardabweichungen berechnet. Anschließend stellte man die Prozentwerte in Abhängigkeit von der Konzentration in Graph Prism 6.0 graphisch dar.

4.2.2.1 Zytotoxizitätsbestimmung der Einzelsubstanzen TIMP-1-GPI, bzw. Doxorubicin

Die Zytotoxizität verschiedener Substanzen (Doxorubicin, TIMP-1-GPI) wurde durch die Bestimmung des IC₅₀-Wertes (mittlere inhibitorische Konzentration) mittels CCK-8-Assay entsprechend der Anleitung des Herstellers ermittelt.

Schritt	Vorgehensweise	IC ₅₀ Doxorubicin	IC ₅₀ TIMP-1-GPI
1	Aussaat der Zellen in eine 96 Well-Platte	1x10 ⁴ Zellen/200 µl pro Well	1x10 ⁴ Zellen/200 µl pro Well
2	Inkubation	24h, anschließend Entfernung des Mediums	24h, anschließend Entfernung des Mediums
3	Zur Ermittlung des jeweiligen IC ₅₀ -Wertes, wurden verschiedene Konzentrationen hergestellt (50 µl pro Well)	0,1 ng/ml 1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml 500 ng/ml 1000 ng/ml	2 ng/ml 6 ng/ml 8 ng/ml 10 ng/ml 12 ng/ml 14 ng/ml
4	Behandlungsdauer	24h	4h, anschließend 24-stündige Inkubation im serumfreien Medium (200 µl)
5	Analyse mittels Cell Counting Kit-8		

Tabelle 11

4.2.2.2 Zytotoxizitätsbestimmung der Kombinationstherapie aus TIMP-1-GPI und Doxorubicin

Schritt	
1	Trypsinisierung und Zellentnahme bei 80-90 %er Konfluenz
2	Zellzahlbestimmung
3	Aussaat in 6 x 6 Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte (pro Well: 1×10^4 Zellen/200 μ l)
4	Inkubation über Nacht im Brutschrank
5	Entfernung des Mediums und Einteilung der Platte in 6 Behandlungsgruppen (V, D, rhT, rhT+D, T, T+D) à 6 Wiederholungen
6	4-stündige Behandlung der Zellen mit 50 μ l des entsprechenden Behandlungsmediums: 1 ng/ml Doxorubicin 7 ng/ml rhTIMP-1 +/- 1 ng/ml Doxorubicin 7 ng/ml TIMP-1-GPI +/- 1 ng/ml Doxorubicin
7	Entfernung der Behandlungsmedien und 24-stündige Inkubation mit serumfreiem Medium
8	Auswertung mittels Cell Counting Kit-8 (CCK-8)

Tabelle 12

4.2.2.3 Koloniebildungstest

Unter Klonogenität versteht man die Selbsterneuerungs-, bzw. Teilungsfähigkeit einer Zelle. Der Koloniebildungstest diente dazu, den zytotoxischen Effekt des TIMP-1-GPI Proteins sowohl alleine, als auch in Kombination mit Doxorubicin zu untersuchen. Entsprechend der sechs Behandlungsgruppen (Kontrolle, Doxorubicin, rh-TIMP-1, rh-TIMP-1 + Doxorubicin, TIMP-1-GPI, TIMP-1-GPI + Doxorubicin) wurden zunächst 3×10^5 Zellen pro Well in eine 6-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und im Brutschrank über Nacht inkubiert, das Medium am Folgetag abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Bei der sich anschließenden Behandlung der Zellen wurden für Monotherapien und Kombinationstherapien gleichermaßen folgende Konzentrationen verwendet: 7ng/ml rhTIMP-1, 7ng/ml rhTIMP-1-GPI, 1ng/ml Doxorubicin. Als Kontrolle diente reines, serumfreies Medium. Nach vierstündiger Behandlungsdauer im Brutschrank, wurde das Medium schließlich abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nun wurden die Zellen mit je 500 μ l Trypsin/EDTA pro Well überschichtet. Nachdem sie sich vollständig abgelöst hatten, wurde das Trypsin durch Zusatz von 2ml Medium inaktiviert. Nach Ermittlung der Zellzahl, wurden pro Gruppe erneut 200 Zellen in eine 6-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte einmal wöchentlich. Nach 14 Tagen endete die

Versuchsreihe. Nach der Entfernung des Mediums, wurden die Zellen durch eine 15-minütige Überschichtung mit 4% Paraformaldehyd fixiert, anschließend mit PBS gewaschen und danach durch Zusatz einer 0,1%igen Kristallviolett-Lösung (1ml pro Well) bei Raumtemperatur gefärbt. Nach 25 Minuten wurde die 6-Well-Mikrotiterplatte unter laufendem Wasserhahn gereinigt und an der Luft getrocknet. Die sich anschließende Auswertung geschah durch Auszählung derjenigen Zellkolonien mit mindestens 0,5 mm. Aus den Triplikaten wurden Mittelwerte bestimmt. Die Berechnung des Prozentsatzes überlebender Kolonien erfolgte mit der Formel:

$$\frac{(\text{Mittelwert der überlebenden Kolonien der behandelten Zellen}) \times 100}{\text{Mittelwert der überlebenden Kolonien der Kontrollgruppe}}$$

4.2.3 Scratch Assay/Wound healing Assay

Den Einfluss des TIMP1-GPI Proteins auf die Zellmigration untersuchte man mittels Scratch Assay. Hierzu wurden 24 Wells einer 24-Well-Mikrotiterplatte mit jeweils 1×10^5 Zellen/ml (HT1080) besät und in 6 Gruppen (Kontrolle, Doxorubicin, rhTIMP-1, rhTIMP-1 + Doxorubicin, TIMP-1-GPI, TIMP-1-GPI + Doxorubicin) á 4 Wells eingeteilt. Sobald eine Konfluenz der Zellen von 70-80 % erreicht worden war (nach ca. 24h), tauschte man das normale Nährmedium gegen serumfreies Hungermedium (DMEM, bzw. RPMI). Nach weiteren 24h wurde mithilfe einer sterilen 200µl-Pipettierspitze eine gerade Linie mittig durch den Zellrasen gezogen („scratch“), sodass an dieser Stelle ein etwa 1mm breiter Graben zwischen den Zellen entstand. Anschließend saugte man das Medium ab und wusch die Mulden mit PBS, um die abgelösten Zellen zu entfernen. Je nach Gruppe, wurden die Wells nun mit 1 ml des entsprechenden serumfreien Behandlungsmediums (7 ng/ml rhTIMP-1, 7ng/ml rhTIMP-1-GPI, 1 ng/ml Doxorubicin), bzw. mit 1 ml reinem serumfreiem Medium als Negativkontrolle erneut befüllt und 4h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde anschließend abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und 1 ml serumfreies Medium in die Vertiefungen pipettiert. Zu drei Zeitpunkten (0h, 8h und 24h) beobachtete man nun am Mikroskop bei 50-facher Vergrößerung die Zellmigration und hielt dies photographisch fest. Im Zuge der Auswertung wurden in allen 6 Gruppen die Defektbreiten zweier Zeitpunkte (0h und 24h) miteinander verglichen und das Ausmaß der Zellmigration in Prozentwerten wiedergegeben.

4.3 In vivo

Alle Tierexperimente erfolgten auf Grundlage des vom Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt genehmigten Tierversuchsantrags mit dem Aktenzeichen no.42502-2-1266 uniMD.

4.3.1 Tierhaltung

Die Mäuse wurden in einzelbelüfteten IVC-Käfigen (HxBxL:130x199x379 mm) mit maximal fünf Tieren unter kontrollierten Bedingungen (20°C Raumtemperatur, 64% Luftfeuchtigkeit, 12 h-Hell-Dunkel-Rhythmus) gehalten. Die Tiere hatten stets freien Zugang zu Futter und Wasser. Der Versuch begann nach einer 7-tägigen Eingewöhnungsphase. Während des Experiments wurden die Tiere hinsichtlich ihres Wohlbefindens in Kooperation mit den Tierpflegern intensiv beobachtet. Sämtliche Arbeiten an und mit den Tieren führte man zu jeder Zeit in einer Sterilbank unter keimfreien Bedingungen durch.

4.3.2 Anästhesie und Analgesie

Das Setzen der Ohrmarken, die Durchführung der subkutanen Zellinjektionen (HT1080) sowie die im weiteren Verlauf des Experimentes durchgeführten operativen Eingriffe, erfolgten stets an zuvor narkotisierten Tieren. Als Anästhetikum diente eine mit 0,9% NaCl verdünnte Injektionslösung aus Ketanest® (Ketamin, 100mg/ml) und Rompun® (Xylazin 2 %). Rompun®, Ketanest® und 0,9 % NaCl wurden im Verhältnis 1:9:90 miteinander kombiniert und die Mäuse mit je 200µl-250 µl anschließend intraperitoneal narkotisiert.

4.3.3 Generierung der subkutanen Weichteilsarkome

In Vorbereitung auf die s.c. Zellinjektion wurden Zellen der Zelllinie HT1080 (Passage 6), wie unter 4.1.1 beschrieben, kultiviert, trypsinisiert, gezählt, im Mikroskop auf ihre Viabilität hin überprüft und abzentrifugiert, die Zellen anschließend mit der berechneten Menge PBS resuspendiert, in Eppendorf Gefäße überführt und bis zur Injektion auf Eis gelagert gekühlt. Zunächst notierte man das aktuelle Körpergewicht der Tiere. Die sich anschließende s.c. Tumorzellinjektion erfolgte mittels einer 1 ml-Einwegspritze und einer 30-Gauge Nadel an zuvor narkotisierten Tieren. Als Injektionsorte dienten jeweils die linke Schulter- und die rechte Hüftregion (Abb. 3). Die Zellkonzentration pro Injektionsstelle betrug 2 Mio Zellen/200 µl PBS (rechte Hüftregion) bzw. 4 Mio Zellen/200 µl PBS (linke Schulterpartie). Im Anschluss an die Injektion färbte man die überschüssigen Zellen mit Trypanblau, um sicher zu gehen, dass viable Tumorzellen injiziert wurden.



Abb. 3: Durchführung der s.c. Tumorzellinjektion

Die subkutane Injektion humaner Fibrosarkomzellen der Zelllinie HT1080 erfolgte zunächst in die rechte Hüftregion, später in die linke Schulterpartie narkotisierter Balb/c Nacktmäuse.

4.3.4 Kontrolle des Tumorwachstums

Die Ermittlung der Tumurlänge (L) als auch Tumorbreite (B) erfolgte jeden zweiten bis dritten Tag mittels eines digitalen Messschiebers. Aus diesen Messdaten errechnete sich der mittlere Tumordurchmesser (d).

$$d = \frac{L + B}{2}$$

Das Körpergewicht der Tiere wurde parallel dokumentiert.

4.3.5 Berechnung des Tumolvolumens

Das Tumolvolumen (V) wurde durch die Formel $V = \frac{L \times B \times H \times \pi}{6}$ berechnet, wobei L, B und H entsprechend die Tumurlänge, -breite und -höhe repräsentieren.

4.3.6 Neoadjuvantes Therapiemodell

4.3.6.1 Tiere

Bei den im Versuch verwendeten Tieren handelte es sich um fünf Wochen alte, weibliche, homozygote Nacktmäuse des Stammes Balb/c nu/nu von Charles River. Ein Gendefekt im FOXP1-Gen führt sowohl zum Ausbleiben der Körperbehaarung als auch zur Fehlentwicklung des Thymus. Die verminderte Anzahl an T-Lymphozyten erklärt die Immundefizienz dieser Tiere.

4.3.6.2 Ablauf

Die Implantation der s.c. Weichteiltumore erfolgte wie unter 4.3.3 beschrieben. Der errechnete mittlere Tumordurchmesser von 4 mm markierte den Behandlungsbeginn. Die Tiere wurden nun unter Berücksichtigung ihres Körpergewichtes in sechs Behandlungsgruppen randomisiert (Abb. 4).

Die Therapie erfolgte wie unter 4.3.6.3, bzw. 4.3.6.4 beschrieben. Die Gesamtbehandlungsdauer betrug 14 Tage (vier Doxorubicin-, bzw. acht intratumorale Behandlungen). Sowohl das Tumorwachstum als auch das Körpergewicht wurden daraufhin für weitere neun Tage kontrolliert und dokumentiert, die Tiere anschließend durch Genickbruch geopfert (Abb. 5). Nachdem man die Tumore aus den euthanasierten Tieren entnommen hatte, wurde das Tumolvolumen entsprechend 4.3.5 ermittelt und die Tumore in 4%igem Formaldehyd fixiert.

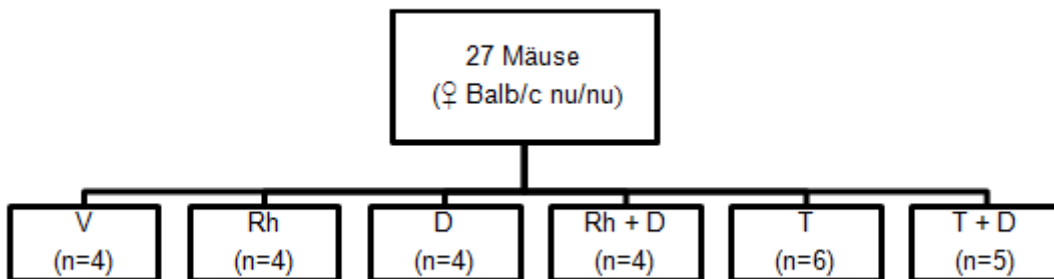


Abb. 4: Gruppendesign des neoadjuvanten Therapiemodells

Wie die obige Grafik zeigt, teilte man die 27 in den Versuch genommenen Tiere in 6 Behandlungsgruppen (V, rhT, D, rhT+D, T, T+D) auf. Die Gruppengröße betrug n Tiere.

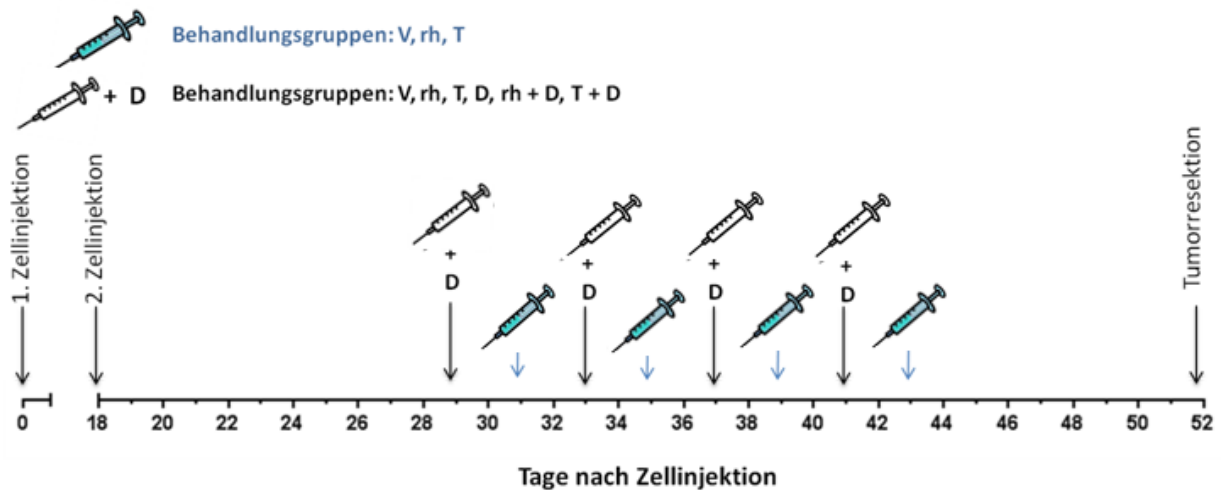


Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

Die subkutane Injektion humaner Fibrosarkomzellen der Zelllinie HT1080 markierte den Beginn des Experiments (Tag 0). Da das Tumorstadium jedoch bei einem Großteil der Versuchstiere (Balb/c Nacktmäuse) ausblieb, folgte 18 Tage später eine zweite Zellinjektion. 29 Tage nach Versuchsbeginn begann man mit der 14-tägigen Behandlung. Während V (Vehikel), rhT (rekombinantes TIMP-1) und T (TIMP-1-GPI) jeden zweiten Tag appliziert wurden, erfolgte die intravenöse Therapie mit Doxorubicin jeden vierten Tag. Das Experiment endete mit der Tumorresektion am Tag 52.

4.3.6.3 Intratumorales Behandlungskonzept

Im Zuge der intratumoralen Applikation (TIMP-1-GPI, rhTIMP-1, Vehikel/PBS) wurde besagte 200 µl Gesamtmenge auf vier zirkulär um den Tumor liegende Injektionspunkte zu je 50 µl aufgeteilt. Dies ermöglichte eine gleichmäßige Behandlung des Tumorgewebes von allen vier Seiten (Abb. 6).

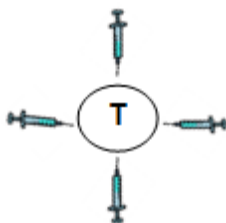


Abb. 6: Injektionsschema

Die Behandlung der Tumore mit TIMP-1-GPI, rhTIMP-1, bzw. Vehikel/PBS erfolgte an vier um den Tumor verteilt liegenden Injektionsorten.

4.3.6.4 Chemotherapie

Die Ausgangskonzentration des Doxorubicin-Hydrochlorids betrug 2mg/ml, das man im Verhältnis 1:20 mit NaCl 0,9% weiter verdünnte, sodass schließlich eine Endkonzentration der Injektionslösung von 100 µg/ml erreicht wurde. Aufgrund der starken Toxizität des Chemotherapeutikums, erfolgte die intravenöse Injektion stets in gewichtsadaptierter Dosis (1,2 mg/kg Körpergewicht). Pro Gramm Körpergewicht wurden 12 µl der Injektionslösung appliziert.

	TIMP-1-GPI	Rekombinantes TIMP-1	Doxorubicin-Hydrochlorid	Kontrolle/Vehikel
Applikationsform	intratumoral	intratumoral	Intravenös (Schwanzvene)	intratumoral
Injektionsmenge pro Tumor	200 µl	200 µl	-	200 µl
Konzentration	7 ng/ml	7 ng/ml	1,2 mg/kg	reine Pufferlösung
Turnus	jeden 2. Tag	jeden 2. Tag	2x wöchentlich	jeden 2. Tag

Tabelle 13

4.3.7 Modellversuch zur postoperativen Rezidivprophylaxe

4.3.7.1 Tiere

Für diesen Versuch wurden vier Wochen alte, männliche, homozygote Nacktmäuse des Stammes Balb/c nu/nu verwendet.

4.3.7.2 Ablauf

Die Weichteiltumore wurden wie unter 4.3.3 beschrieben generiert. Sobald die Tumore einen mittleren Durchmesser von 4 mm erreicht hatten, randomisierte man die Tiere unter Berücksichtigung ihres Körpergewichts in zwei Behandlungsgruppen (Kontrolle/Vehikel (V), TIMP-1-GPI (T)) und resezierte die Tumore (Abb. 7). Nach dem Wundverschluss mittels chirurgischer Naht wurde in den darauffolgenden Tagen besonderes Augenmerk auf das Wohlbefinden der Tiere gelegt. Alle Tiere vertrugen den Eingriff gut. Über eine Zeitspanne von 14 Tagen wurden anschließend die Vehikel-, bzw. TIMP-1-GPI Injektionslösungen

(Tabelle 3) auf vier Injektionspunkte zu je 50 µl verteilt in und um das Läsionsareal herum injiziert. Die Behandlung erfolgte jeden zweiten Tag. Die Beobachtung der Läsionen erstreckte sich über weitere neun Tage, bevor die Tiere durch Genickbruch geopfert wurden (Abb. 8). Die an den euthanasierten Mäusen entnommenen Rezidivtumore wurden anschließend zur Berechnung des Tumolvolumens (siehe 4.3.5) ausgemessen und in 4% Formaldehyd-Lösung überführt. Man achtete während der gesamten 23 Tage auf Tumorrezidive und deren Wachstum, wie unter 4.3.4 beschrieben.

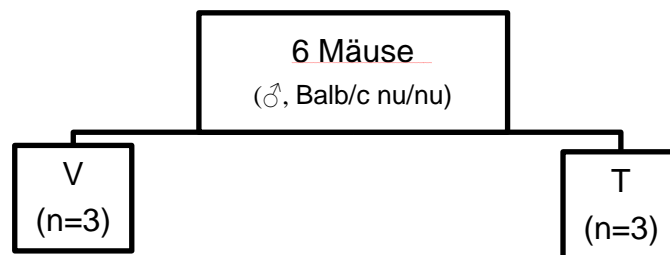


Abb. 7: Einteilung in die Behandlungsgruppen

Zur Untersuchung der postoperativen Rezidivprophylaxe wurden die sechs in den Versuch genommenen Tiere in zwei Gruppen (n Tiere/Gruppe) aufgeteilt.

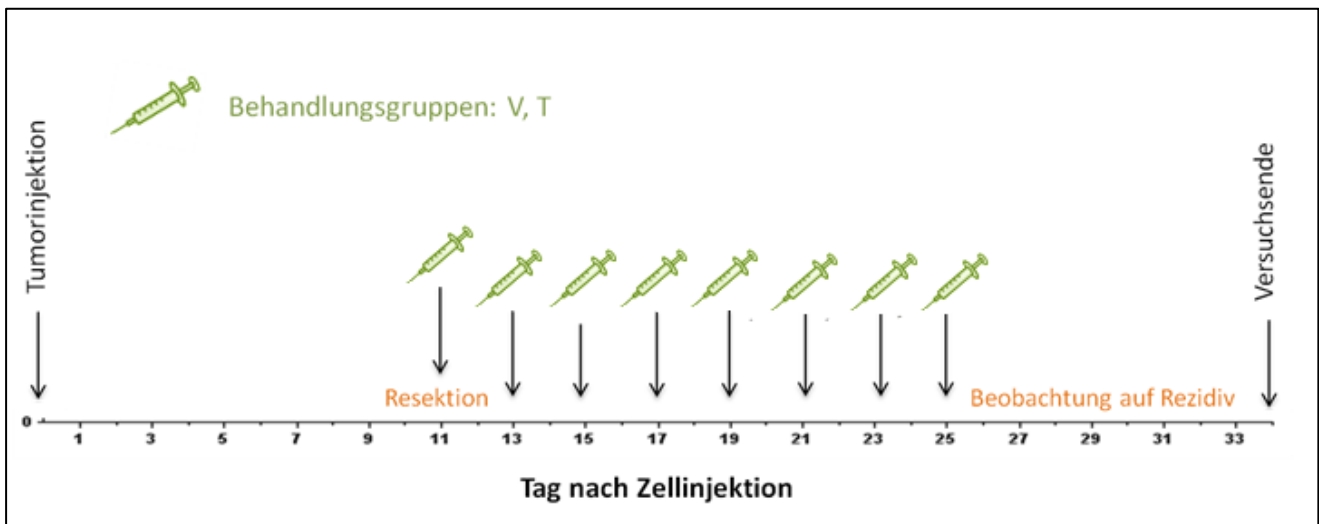


Abb. 8: Versuchsdesign

Wie aus obiger Abbildung hervorgeht, wurden die subkutan generierten Weichteiltumore 11 Tage nach Versuchsbeginn reseziert. Noch am gleichen Tag begann man die chirurgisch verschlossenen Wunden mit PBS (V) bzw. TIMP-1-GPI (T) zu behandeln. Die Therapie wurde im zweitägigen Rhythmus über einen Zeitraum von zwei Wochen fortgeführt. Es schloss sich eine neuntägige Beobachtungsphase an, innerhalb derer man gezielt auf ein Tumorrezidivwachstum achtete.

4.4. Ex vivo

4.4.1 Immunhistologie

4.4.1.1 Paraffineinbettung

Nach Opferung der Tiere wurde das Tumorgewebe zunächst in kleine Stücke zerteilt, in beschriftete Einbettkassetten gegeben und in 4% Formaldehyd-Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Das Auswaschen des Fixiermediums 48h später erfolgte durch einstündiges Wässern. Die weitere Verarbeitung fand im Institut für Neuropathologie am Klinikum der Universität Magdeburg statt. Hier dehydrierte man die Proben im Histomaten in aufsteigender Ethanolreihe (70 %, 96 %, 100 %) und tränkte sie mit Xylol und Paraffin. Anschließend wurden die gehärteten Gewebeprobe unter Zuhilfenahme einer Gießstation mit flüssigem Paraffin zu Blöcken gegossen.

4.4.1.2 Herstellung von Paraffin-Schnittpräparaten

Nach erfolgreichem Abkühlen und Aushärten der Paraffinblöcke, wurden diese zunächst auf einem Gefrierblock gekühlt, bevor man sie zum Schneiden ins Rotationsmikrotom einspannte. Die 3 µM dicken Schnitte wurden in ein Warmwasserbad übertragen, auf Objektträger aufgezogen, pro Objektträger 2-3 Schnitte aufgenommen und dann über Nacht bei 37°C zum Trocknen im Brutschrank aufbewahrt.

4.4.1.3 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Die H.E.-Färbung, eine Übersichtsfärbung, diente zur histologischen Sicherung der entnommenen Tumore. Der erste Schritt diente der Deparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 60°C im Brutschrank, wurden die Objektträger zunächst für 2 x 15 Min in Xylol inkubiert und anschließend in absteigender Alkoholreihe für 2 x 5 Min in 100% Ethanol, dann für je 3 Min in 90% Ethanol, 80% Ethanol und 70 % Ethanol gegeben. Dem schloss sich ein 5-minütiges Waschen der Objektträger in Milliporewasser an. Der nächste Schritt, die progressive Färbung, diente nun der Anfärbung der Zellkerne. Dazu entnahm man die Träger dem Milliporewasser und benetzte sie unter Zuhilfenahme einer Pipette mit Mayers Hämalaun. Die Einwirkzeit betrug 8 Min. Die Objektträger wurden anschließend mit ihrer Rückseite nach oben unter fließendes Wasser gehalten, bis Farbrückstände jenseits der zu färbenden Schnitte entfernt waren. Als nächstes wurde eine Lösung aus 50ml 100% EtOH und 0,5 ml 37% HCl schräg über die Schnitte pipettiert, die man anschließend in Leitungswasser überführte. Nun folgte der Schritt der regressiven Färbung mittels 0,1% Eosinlösung. Die Einwirkzeit betrug 6 Min. Farbrückstände

wurden, entsprechend der Färbung mit Hämalaun, unter fließendem Wasser von unerwünschten Farbresten gereinigt. Auf die noch feuchten Schnitte gab man anschließend je einen Tropfen Dako Faramount Aqueous Mounting Medium und deckte sie mit Deckgläschen ab.

4.4.1.4 Ki-67-, CD31-Färbung

Das Ki-67-Antigen wird klassischerweise von zellzyklusaktiven, sich teilenden Zellen gebildet. Ruhende, sich in der G₀-Phase des Zellzyklus befindende Zellen, exprimieren dieses Antigen hingegen nicht. Die Färbung für Ki-67 gibt also Aufschluss über die Proliferationsrate eines Gewebes und dient zudem der Beurteilung der Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors. Die Antigene Ki-67 und CD31 wurden mittels der Avidin-Biotin-Komplex-(ABC-)Technik dargestellt.

Der Deparaffinierungs- und Rehydrierungsschritt erfolgte wie unter 6.3 beschrieben. Im Zuge der Antigendemaskierung wurden die in einer 1:10 verdünnten Dako Target Retrieval Solution inkubierten Schnitte mittels Mikrowelle für 1x30 Minuten zum Kochen gebracht. Nach entsprechender Abkühlung der Pufferlösung folgte eine 2x3-minütige Inkubation in Tris-HCl-Puffer. Im Gegensatz zur CD31-Färbung, erforderte die Ki-67-Färbung eine Permeabilisierung der Zellmembranen, wozu die Schnitte 10 Minuten lang mit 0,25% Triton X-100 + 3% Tris-HCl-Puffer bei RT inkubiert und anschließend mit TBS gewaschen wurden. Es folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität durch 10-minütiges Eintauchen der Schnitte in eine 7,5%ige Wasserstoffperoxidlösung. Dem schlossen sich ein 10-minütiger Waschschrift unter fließendem Leitungswasser, eine 2x5-minütige Inkubation in TBS-Lösung sowie ein 20-minütiger Serumblock mit 8% Ziegenerum an. Die Blockierlösung wurde nun abgegossen und der im Verhältnis 1:50 in PBS und 3% BSA verdünnte primäre Antikörper (anti-CD31, bzw. anti-Ki-67) bei 4°C über Nacht appliziert. Die Schnitte wurden nun 2x5 Minuten in TBS gewaschen und anschließend dem Avidin/Biotin Block (15-minütige Inkubation mit Avidin, bzw. Biotin) unterzogen. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit TBS. Die Schnitte wurden nun für 30 Minuten mit dem in PBS und 3% BSA im Verhältnis 1:100 verdünnten sekundären biotinylierten Ziege-anti-Kaninchen Antikörper versehen und anschließend mit TBS gewaschen. Zur Signalverstärkung gab man nun den ABC-Komplex (Verdünnung von Avidin, bzw. Biotin im Verhältnis 1:5 mit PBS) hinzu. Nach 30 Minuten wurden die Schnitte mit TBS gewaschen, 15 Minuten lang mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) gefärbt und anschließend unter fließendem Leitungswasser (10 Minuten) und TBS (2x3 Minuten) gereinigt. Die sich anschließende Gegenfärbung erfolgte mittels Hämalaun. Die Schnitte wurden nun ein weiteres Mal unter fließendem Leitungswasser gespült und die noch feuchten Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine

eingedeckt. Nach ausreichender Erhärtung der Glyceringelatine schloss sich die mikroskopische Auswertung der Schnitte, wie unter 4.4.1.6.1 beschrieben, an.

4.4.1.5 TUNEL-Färbung

Die sogenannte „terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labelling“- (TUNEL-) Methode diente dem Nachweis apoptotischer Zellen. Hierbei wurde mit dem „In Situ Cell Death Detection Kit, POD“, den Herstellerangaben folgend, gearbeitet. Im Anschluss an die Entparaffinierung- und Dehydrierung (siehe 6.3) folgten die Permeabilisation mittels 8-minütiger Inkubation mit 0,1% Triton X-100 + 0,1 % Natriumcitrat-Puffer bei RT und eine einstündige Inkubation mit Pepsinlösung bei 37°C. Nach der anschließenden Antigendemaskierung durch 5-minütiges Kochen des 0,1M Citrat-Puffers und der darin eingetauchten Schnitte in der Mikrowelle, wurden diese durch zweimaliges Waschen mit PBS gereinigt. Jede Positivkontrolle wurde nun mit 30 µl des zuvor vorbereiteten TUNEL-Reaktionsmix (Verdünnung der Enzyme Solution mit der Label Solution im Verhältnis 1:10) versehen und auf die Negativkontrollen jeweils 30 µl der Label Solution aufgetragen. Die Objektträger wurden nun für eine Stunde bei 37°C in einer dunklen Feuchtkammer inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Nun wurden die Schnitte 15 Minuten lang mit der zuvor im Verhältnis 1:1000 verdünnten DAPI-Lösung im Dunkeln inkubiert, die Objektträger eingedeckelt und bis zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse bei 4°C im Dunkeln gelagert.

4.4.1.6 Mikroskopische Auswertung

Zur Auswertung wurden die immunhistochemisch markierten Schnitte mittels digitaler Kamera eines Fluoreszenzmikroskops in 50-facher und 200-facher Vergrößerung abfotografiert und im Computer gespeichert.

4.4.1.6.1 CD31- und Ki67-Bildanalyse

Die Auswertung der CD31-Färbung erfolgte durch Ermittlung der Gefäßdichte (Anzahl der Gefäße pro Sehfeldfläche) nach der Methode von Weidner et al. [49] Die Schnitte wurden zunächst bei 50-facher Vergrößerung auf die am stärksten vaskularisierten Tumoreale („hot spots“) hin durchmustert. Im Anschluss wurden pro Schnitt drei solcher „hot spots“ ausgewählt. Nun wurden die positiv gefärbten Mikrogefäße dreier Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung manuell ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Bei der Auswertung der mit Ki-67 markierten Schnittpräparate wurden ebenfalls pro Schnitt drei „hot spots“ ausgewählt und in 200-facher Vergrößerung fotografiert. Die Ermittlung des Ki-67-Index

(Anteil Ki-67 positiver Tumorzellen) erfolgte mit dem Programm ImmunoRatio web application [50; 51].

4.4.1.6.2 TUNEL-Bildanalyse

Die zunächst separat erstellten Bilder zweier Farbkanäle (365 nm, bzw. 470 nm) wurden durch die LAS Image Overlay-Option überlagert. Man zog zur Auswertung jeweils die am stärksten positiv gefärbten Tumorareale heran. Hierbei wurde in jeweils drei Gesichtsfeldern bei 200-facher Vergrößerung der Anteil TUNEL-positiver Zellen, im Sinne einer Überschneidung der TUNEL-Färbung mit der DAPI-Zellkernfärbung, bestimmt. Während die Ermittlung der Gesamtzellzahl mittels Image-J erfolgte, wurden die TUNEL-positiven Zellen manuell ausgezählt. Mithilfe Prism 6.0 bestimmte man schließlich die Mittelwerte und stellte die Ergebnisse graphisch dar.

4.5 Statistische Auswertung

Für die deskriptive statistische Auswertung und die Signifikanzberechnung kam das Statistikprogramm "GraphPad Prism", Version 6.00, GraphPad Software, La Jolla, USA, zur Anwendung. Die Auswertung der *in vitro* Daten erfolgte mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA). Der Verlauf des Tumordurchmessers wurde mit dem Zweistichproben-t-Test analysiert. Zur Auswertung der vergleichenden Gegenüberstellung der Tumorgewichte und –volumina, bzw. der immunhistochemischen Färbungen wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test, bzw. Mann-Whitney-Test herangezogen. Werte von $p \leq 0,05$ betrachtete man als statistisch signifikant.

6 Ergebnisse

In vitro

6.1 IC₅₀-Wertbestimmung für TIMP-1-GPI und Doxorubicin

In Vorbereitung auf die Versuche zur Untersuchung der Kombinationstherapie aus dem TIMP-1-GPI-Fusionsprotein und Doxorubicin, wurde zunächst nach der geeigneten Behandlungsdosis, sowie der optimalen Behandlungsdauer der beiden Substanzen gesucht. Mit Hilfe des CCK8-Assays ermittelte man für das TIMP-1-GPI und das Doxorubicin jeweils die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀).

Zur Bestimmung des IC₅₀- Wertes des Doxorubicins, wurden die Zellen zuvor 24h lang mit Doxorubicin unterschiedlicher Konzentrationen (0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml, bzw. 1000 ng/ml) behandelt. Der Anteil vitaler Zellen betrug nach 24-stündiger Inkubation mit 1 ng/ml Doxorubicin 80,13 % ± 8,06% (Abb. 9). Die ermittelte IC₅₀-Konzentration betrug 500 ng/ml (54,17% ± 7,44%).

Auch für das TIMP-1-GPI-Fusionsprotein wurde der IC₅₀-Werte ermittelt. Dies erfolgte in Anlehnung an den Versuchsaufbau von Nelson et al. [27]. Die Zellen wurden hierfür 2h, bzw. 4h mit TIMP-1-GPI unterschiedlicher Konzentration (2 ng/ml, 4 ng/ml, 6 ng/ml, 8 ng/ml, 10 ng/ml, 12 ng/ml und 14 ng/ml) behandelt (Abb. 10). Zur Behandlung der Zellen mit dem rekombinanten TIMP-1 (rhTIMP-1) Protein wählte man die Konzentration von 7 ng/ml [27]. Erwartungsgemäß konnten weder in den Kontroll- noch in den rhTIMP-1-Behandlungsgruppen zytotoxische Effekte nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich mit steigender Konzentration des Fusionsproteins und einer vierstündigen Behandlungsdauer eine Zunahme der Zytotoxizität. Während der Anteil vitaler Zellen nach einer 2-stündigen Behandlung mit 14 ng/ml TIMP-1-GPI noch 75,75% ± 7,53% betrug, waren nach 4-stündiger Behandlung lediglich 55,05% ± 14,35% der Zellen stoffwechselaktiv, was annäherungsweise der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀-Wert) entspricht. Da die vorliegende Arbeit auf Experimenten von Nelson et. al [27] aufbaut, sollte insbesondere überprüft werden, ob die in seinen Versuchen verwendete Konzentration des TIMP-1-GPI-Fusionsproteins (7 ng/ml) übernommen werden kann. Entsprechend der Ergebnisse dieser Arbeit, liegt der 4-Stunden-Zytotoxizitätswert der 7ng/ml-Behandlungsdosis im Bereich zwischen 86,22% ± 4,37% (6 ng/ml), bzw. 82,87% ± 3,11% (8 ng/ml). Wie aus Abb. 10 hervorgeht, erwies sich das TIMP-1-GPI-Fusionsprotein in Konzentrationen zwischen 6 ng/ml und 8 ng/ml hinsichtlich der Zytotoxizität als statistisch hoch signifikant. Da das Ziel der Arbeit darin bestand, die Wirksamkeit des TIMP-1-GPI-Proteins in Kombination mit dem ebenfalls zytotoxisch wirksamen Doxorubicin zu untersuchen, wurde die Dosis beider Medikamente nicht zu hoch gewählt (7 ng/ml TIMP-1-GPI, 1ng/ml Doxorubicin).

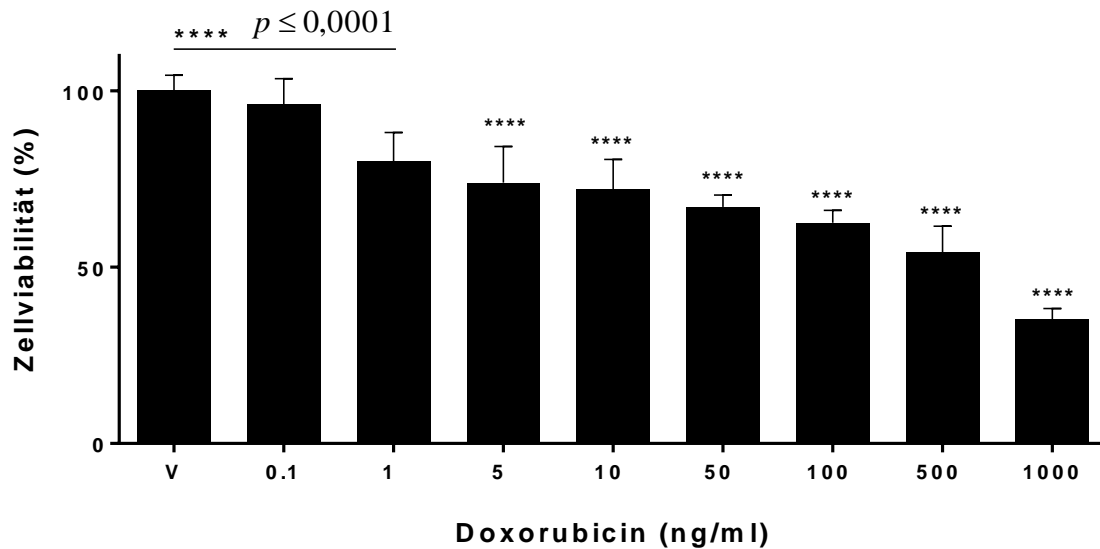


Abb. 9: Proliferationsassay zur IC₅₀-Wertbestimmung für Doxorubicin (MW ± SD)

Zur Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentration inkubierte man humane Fibrosarkomzellen der Zelllinie HT1080 für 24h mit PBS als Kontrolle (V), bzw. Doxorubicin in aufsteigender Konzentration. Bei einer Konzentration von 500ng/ml betrug der Anteil vitaler Zellen 54,17% ± 7,44%, was annäherungsweise dem IC₅₀-Wert entspricht. Bei 1 ng/ml waren noch 80,13 % ± 8,06% der Zellen stoffwechselaktiv. Die zytotoxische Wirkung des Doxorubicins war ab einer Konzentration von 1 ng/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe (V) statistisch signifikant (p≤0,0001).

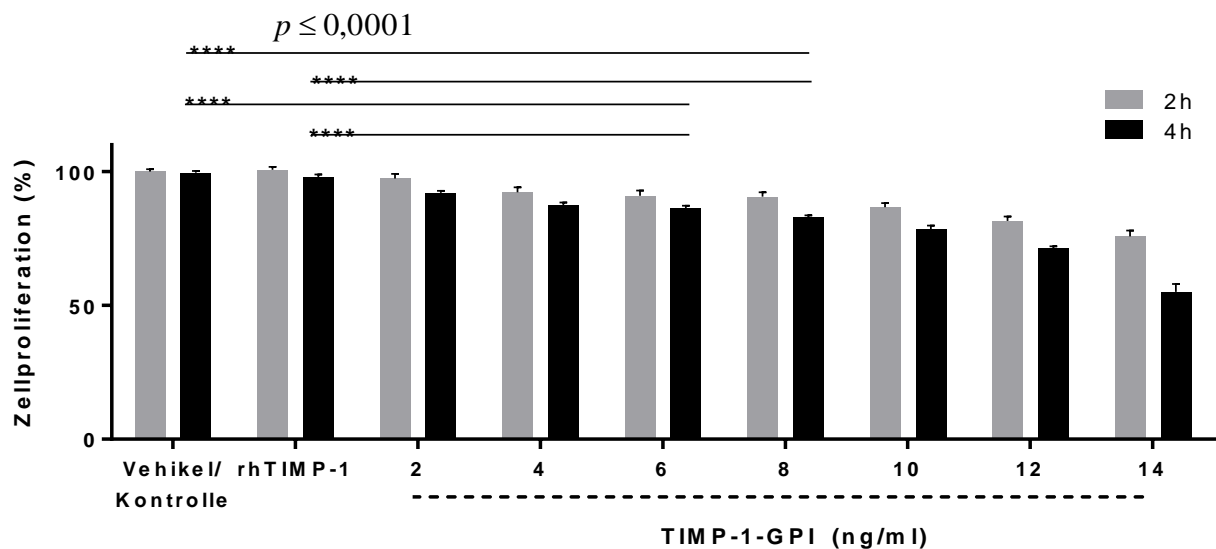


Abb. 10: Proliferationsassay zur IC₅₀-Wertbestimmung des TIMP-1-GPI Fusionsproteins (MW ± SD)

Dargestellt ist die konzentrations- und zeitabhängige Zytotoxizität des Fusionsproteins. Nach 4-stündiger Behandlung mit 14 ng/ml betrug der Anteil stoffwechselaktiver Zellen 55,05% ± 14,35%, was in etwa der mittleren inhibitorischen Konzentration entspricht. Signifikant zytotoxische Effekte traten im Vergleich zur Vehikel- und rhT-Gruppe sowohl bei der Behandlung mit 6ng/ml (p<0,0001) als auch mit 8 ng/ml (p≤0,0001) auf.

6.2 Zytotoxizität von TIMP-1-GPI kombiniert mit Doxorubicin

Nachdem der Nachweis der Zytotoxizität der Einzelsubstanzen erfolgt war, galt es als nächstes herauszufinden, welchen Einfluss die Kombinationsbehandlung aus TIMP-1-GPI und Doxorubicin auf die Tumorzellproliferation haben würde. Hierzu wurde ein CCK-8-Assay, wie unter 4.2.2.2 beschrieben, durchgeführt. Man behandelte die Zellen der Zelllinie HT1080 mit Doxorubicin (D), rekombinanten TIMP-1-Protein (rhT) und/oder Doxorubicin (rhT+D) und dem TIMP-1-GPI-Fusionsprotein (T) und/oder Doxorubicin (T+D) (Abb. 11). Weder in der Vehikelgruppe ($100,50\% \pm 3,60\%$), noch in den monotherapeutischen Doxorubicin- ($95,17\% \pm 7,398\%$) und rhTIMP-1-Behandlungsgruppen ($95,17\% \pm 7,40\%$) konnten relevante zytotoxische Effekte nachgewiesen werden. Der im Vergleich zu 6.1 höhere Lebendzellanteil nach der Behandlung mit Doxorubicin ($95,17\% \pm 7,40\%$ vs. $80,13\% \pm 8,06\%$), könnte an den unterschiedlichen Inkubationszeiten (4h bzw. 24h) liegen. Nach erfolgter Behandlung mit TIMP-1-GPI nahm die Zellviabilität auf $76,60\% \pm 8,18\%$ ab. Unter Berücksichtigung der in Kauf zu nehmenden Messabweichungen entspricht dies in etwa dem unter 6.1 erzielten Wert (zwischen $82,87\% \pm 3,11\%$ und $86,22\% \pm 4,37\%$). Der zytotoxische Effekt der Kombinationsbehandlung aus rhTIMP-1 und Doxorubicin war lediglich gering ($93,93\% \pm 4,93\%$). Im Gegensatz dazu wurde der Anteil vitaler Zellen durch das mit Doxorubicin kombinierte TIMP-1-GPI-Fusionsprotein deutlich reduziert ($64,93\% \pm 6,34\%$).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung des TIMP-1-GPI-Proteins durch Kombination mit Doxorubicin gesteigert werden kann (T vs. T+D: $p \leq 0,0001$). Darüber hinaus erhärtete sich der Verdacht eines positiven, die Chemosensitivität der Zellen wiederherstellenden, Effekts des Fusionsproteins. Die beiden Gruppen D und T+D unterschieden sich hinsichtlich der Zellviabilität signifikant ($p \leq 0,0001$).

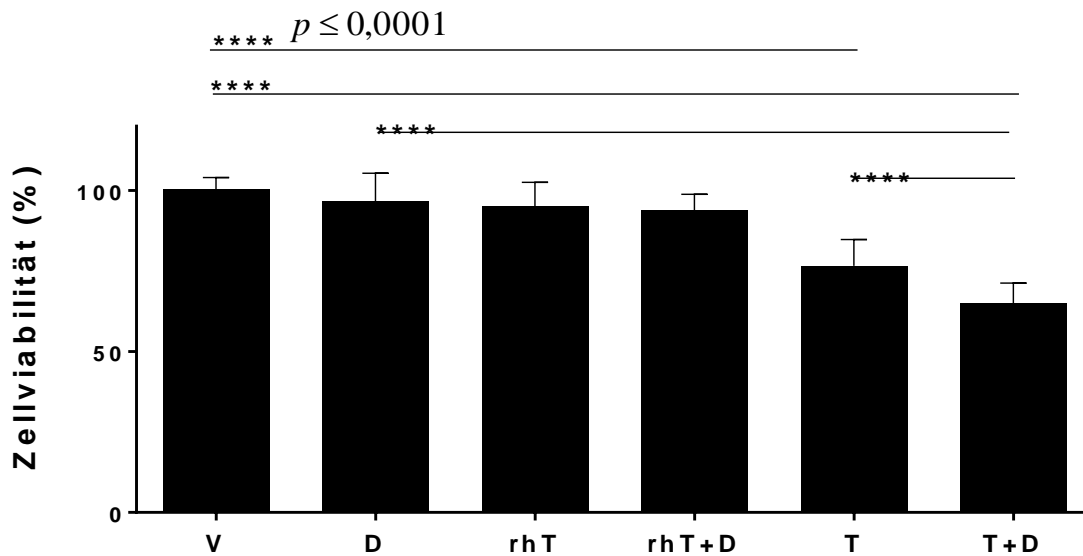


Abb. 21 Vergleichende Darstellung der zytotoxischen Wirkung verschiedener Behandlungsgruppen (MW ± SD)

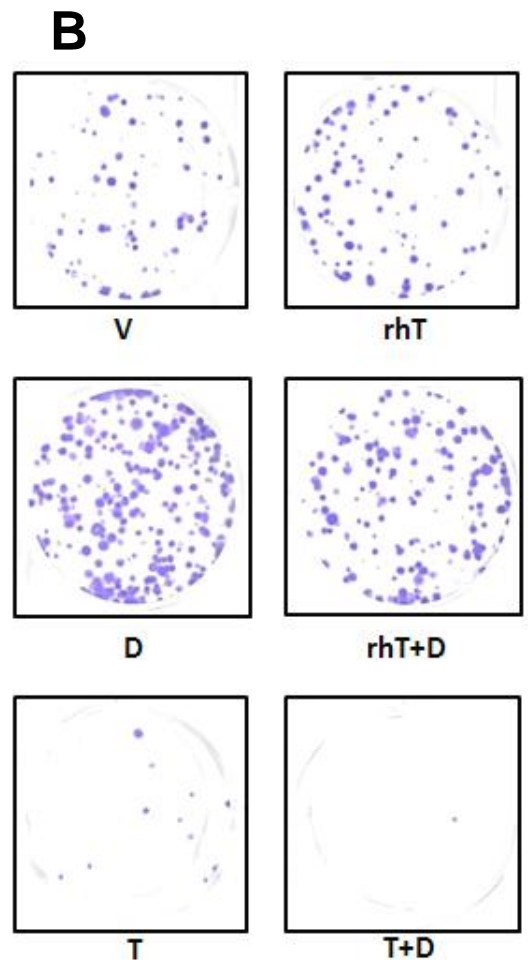
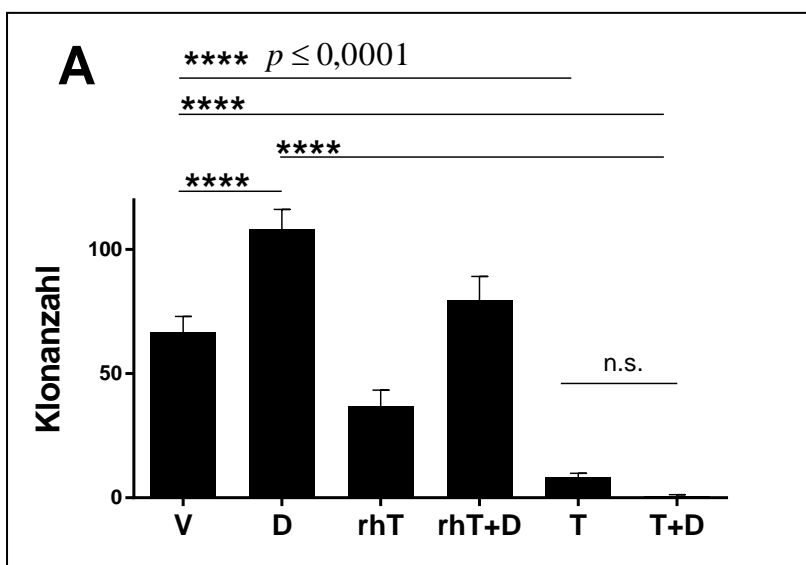
Der Vergleich zur Vehikelgruppe ergab im Ergebnis eine signifikante Hemmung der Zellproliferation, sowohl durch eine monotherapeutische Behandlung mit TIMP-1-GPI (T: $p \leq 0,0001$), als auch in Kombination mit Doxorubicin (T+D: $p \leq 0,0001$), wobei dieser Effekt in der kombiniert behandelten Gruppe stärker ausgeprägt war (vgl. 76,6% ± 8,18% (T) und 64,93% ± 6,34% (T+D)).

6.3 Hemmung der Klonogenität in Single-Cell-Kolonien

Nachdem im unter 6.2 beschriebenen Proliferationsassay ein kurzfristig zytotoxischer Effekt der TIMP-1-GPI-Doxorubicin-Kombinationsbehandlung nachgewiesen wurde, diente das sich anschließende Klonogenitätsassay nun dazu, den Langzeiteffekt der Kombinationsbehandlung zu untersuchen. Die Untersuchung zielte darauf ab, herauszufinden, ob singuläre Zellen die Fähigkeit besitzen, klonale Zellkolonien (Sphären) zu bilden. Die zuvor behandelten Zellen, wurden unter adhärennten Bedingungen in geringer Dichte (200 Zellen/9.61cm²) ausgesät. Dadurch konnte die Teilungsfähigkeit der Zellen, unabhängig von äußeren Faktoren, wie der parakrinen Zellkommunikation, untersucht werden. Nach 14 Tagen erfolgte das manuelle Auszählen der Anzahl der mindestens 0,5 cm großen Zellkolonien.

Die in Abb. 12 dargestellten Daten zeigen, dass die Fähigkeit zur Ausbildung klonaler Zellkolonien durch eine TIMP-1-GPI-Doxorubicin Kombinationsbehandlung (T+D), verglichen mit der Vehikelgruppe (V), bzw. TIMP-1-GPI-Gruppe (T) reduziert wurde (0,67 ± 0,58 (T+D)

vs. $66,67 \pm 6,43$ (V), $p < 0,0001$, bzw. $0,67 \pm 0,58$ (T+D) vs. $8,33 \pm 1,53$ (T), n.s.). Darüber hinaus zeigte die Behandlung mit TIMP-1-GPI eine chemosensitivierende Wirkung ($108,0 \pm 8,18$ (D) vs. $0,67 \pm 0,58$ (T+D), $p < 0,0001$). Eine vorherige monotherapeutische Behandlung der Zellen mit Doxorubicin (D), bzw. eine Kombinationsbehandlung aus rhTIMP-1 und Doxorubicin (rhT+D) führte hingegen zu einer im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe erhöhten Anzahl an Sphären ($108,0 \pm 8,18$ (D), bzw. $79,67 \pm 9,50$ (rhT+D)). Auch die Behandlung mit rhTIMP-1 (rhT) resultierte in einer Abnahme des klonogenen Potentials ($36,67 \pm 6,66$ (rhT)).



v

Abb. 12: Klonogenitätsassay (MW ± SD)

(A) Im Vergleich zur TIMP-1-GPI-Monotherapie bewirkte die Zugabe von Doxorubicin eine zusätzliche Reduktion des klonogenen Potentials. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

(B) Fotografische Darstellung der mit Kristallviolett gefärbten Zellkolonien

6.4 Beobachtung der Zellmigration mittels Scratch Assay

Zur Ermittlung der Wirkung der Kombinationstherapie auf die Zellmigration, wurde der konfluente Zellrasen zunächst mit einer Pipettierspitze verletzt und nach einer 4-stündigen Inkubation der Tumorzellen mit den entsprechenden Behandlungsmedien für weitere 24h im serumfreien Hungermedium kultiviert. Durch das Aushungern der Zellen induzierte man einen Wachstumsarrest, als Voraussetzung für die Beobachtung der Zellmigration in das verletzte Areal. Der Zell-Migrationsprozess wurde zu drei Zeitpunkten (0h, 8h und 24h) fotografisch festgehalten (Abb. 13).

Die angefertigten Fotos ließen bereits nach 8h erkennen, dass die Migration TIMP-1-GPI und TIMP-1-GPI-Doxorubicin behandelter Zellen in den zellfreien Spalt im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen verringert war (Abb. 13). Nach 24h war zudem ein Unterschied zwischen der TIMP-1-GPI- und TIMP-1-GPI-Doxorubicin-Behandlungsgruppe erkennbar. Es folgte eine anschließend weitere Analyse der Bilder. Unter Zuhilfenahme des Programms ImageJ wurden die offenen Wundflächen jeder Behandlungsgruppe zum Zeitpunkt 0h und 24h ermittelt und anschließend die Mittelwerte beider Zeitpunkte in Relation zueinander gesetzt (Abb. 14). Die Auswertung ergab, dass das Wundareal in der Vehikelgruppe nach 24-stündiger Beobachtungszeit zu $59,15\% \pm 2,05\%$ verschlossen war. Der Wert in der mit rhTIMP-1 (rhT), bzw. Doxorubicin (D) behandelten Gruppe, lag bei $44,70\% \pm 0,99\%$, bzw. $58,45\% \pm 17,75\%$. In Anbetracht des großen Schwankungsbereiches der Messwerte, ließ die rhTIMP-1-Behandlung eher einen induktiven, promigratorischen Effekt erkennen. Dieser Hinweis schien sich bei der Kombination des rekombinanten Proteins mit Doxorubicin (rhT+D) zu bestätigen. Im Vergleich zur monotherapeutischen Doxorubicinbehandlung (D), wurde die Zellmigration in Anwesenheit von rhTIMP-1 (rhT+D) auch hier geringfügig induziert ($44,70\% \pm 0,99\%$ (D) vs. $46,60\% \pm 11,17\%$ (rhT+D), n.s.). Sowohl die monotherapeutische Behandlung der Zellen TIMP-1-GPI als auch in Kombination mit Doxorubicin führte verglichen mit der Vehikelgruppe zur deutlichen Reduktion der migratorischen Aktivität der Zellen ($19,85\% \pm 15,63\%$ (T) vs. $59,15\% \pm 2,05\%$ (V), n.s.; $13,05\% \pm 7,71\%$ (T+D) vs. $59,15\% \pm 2,05\%$ (V), $p=0,0428$). So waren im Falle der TIMP-1-GPI-Behandlung (T) nach 24 Stunden $19,85\% \pm 15,63\%$ der Wundfläche verschlossen. Diese deutlich antimigratorische Wirkung des TIMP-1-GPI-Fusionsproteins verstärkte sich in Kombination mit Doxorubicin (T+D) um ein weiteres ($19,85\% \pm 15,63\%$ (T) vs. $13,05\% \pm 7,71\%$ (T+D), n.s.). Zusammenfassend lassen die Ergebnisse eine gesteigerte antimigratorische Wirkung des TIMP-1-GPI Fusionsproteins in Kombination mit Doxorubicin erkennen. Trotz der nichtsignifikanten Ergebnisse, legt die vergleichende Gegenüberstellung der Doxorubicin- (D) und der TIMP-1-GPI-Doxorubicin-Gruppe (T+D), eine chemosensitivitäts-steigernde Wirkung des Fusionsproteins nahe ($44,70\% \pm 0,99\%$ (D) vs. $13,05\% \pm 7,71\%$ (T+D), n.s.).

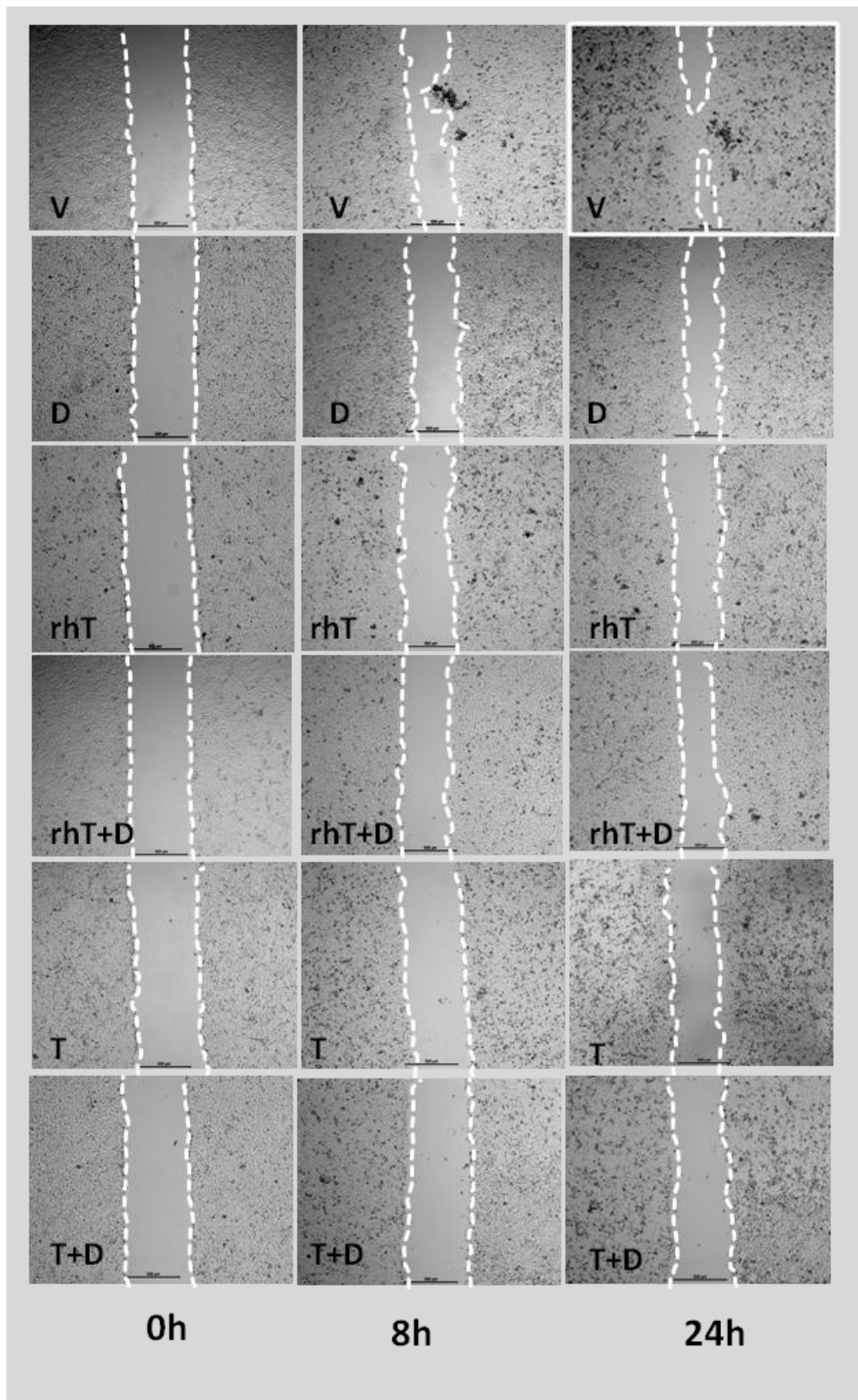


Abb. 13: Mikroskopische Auswertung des Scratch Assays

Vergleichende Darstellung des Zellmigrationsprozesses zu drei Zeitpunkten (0h, 8h, 24h). Nach 24h waren in den TIMP-1-GPI- und TIMP-1-GPI-Doxorubicin-Behandlungsgruppen deutlich antimigratorische Effekte ersichtlich.

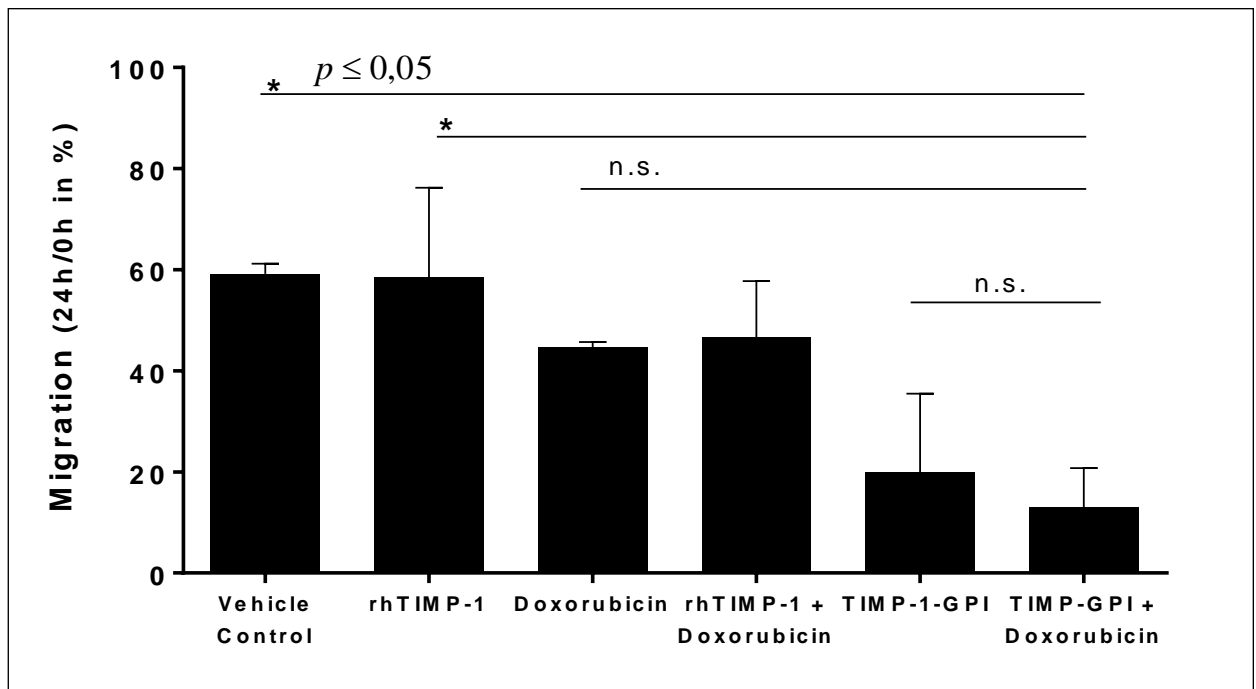


Abb. 14: Graphische Darstellung der Zellmigration (MW ± SD)

Für jede der sechs Behandlungsgruppen wurden die offenen Wundflächen unter Zuhilfenahme des Programms ImageJ zum Zeitpunkt 0h und 24h ermittelt und anschließend die Mittelwerte beider Zeitpunkte in Relation zueinander gesetzt (24h/0h). Sowohl in der Doxoribicingruppe (D), als auch TIMP-1-GPI-Doxorubicin-Gruppe (T+D) konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe (V) eine Hemmung der Zellmigration beobachtet werden. Zudem bewirkte die Kombination des Fusionsproteins mit Doxorubicin einen additiven antimigratorischen Effekt.

In vivo

6.5 *In vivo* Kombinationsversuche mit TIMP-1-GPI und Doxorubicin

Nachdem *in vitro* ein additiver therapeutischer Effekt der TIMP-1-GPI-Doxorubicin Kombinationsbehandlung nachgewiesen wurde, folgte die Erprobung am Tiermodell. In Anlehnung an den Versuchsaufbau von Nelson et al. [27], wurde das Experiment an homozygoten weiblichen Nacktmäusen des Stammes Balb/c nu/nu durchgeführt. Als Injektionsort diente jeweils die rechte Hüftregion der 27 Tiere. Die Einteilung der Tiere in sechs Behandlungsgruppen (V, D, rhT, rhT+D, T, T+D) erfolgte wie in Abb. 4 gezeigt, und ähnelte dem Versuchsaufbau *in vitro*. Zur Erprobung der Kombinationstherapie generierte man Weichteilsarkome mittels subkutaner Injektion humaner Fibrosarkomzellen (HT1080). Die Überprüfung der Tumorzellvitalität vor und nach der Injektion stellte sicher, dass vitale Tumorzellen appliziert worden waren. Sieben Tage nach der Zelinjektion (jeweils 2 Mio Zellen) waren die ersten Tumore palpabel. Die Generierung der s.c. Weichteilsarkome war trotz vitaler Tumorzellen bei lediglich 16 der 27 Tiere erfolgreich. Da man eine statistisch ausreichende Anzahl von Weichteilsarkomen gewährleisten wollte, erhielten alle 27 Tiere am Tag 18 eine zweite Injektion (jeweils 4 Mio Zellen) in die linke Schulterregion. Zusätzlich entschied man sich bei den Mäusen, bei denen bis zu diesem Zeitpunkt keine Tumore in der rechten Hüfte palpiert werden konnten, eine erneute Tumorzellinjektion (4 Mio Zellen) in die rechte Hüftregion durchzuführen. Dies erfolgte ebenfalls 18 Tage nach der ersten Injektion. Im Zuge der zweiten Injektion wurde, im Vergleich zur ersten, die doppelte Anzahl an Zellen (4 Mio vs. 2 Mio) appliziert, um den Wachstumsvorsprung, der nach der ersten Injektion gewachsenen Tumore, auszugleichen. Der 18-tägige Abstand zwischen beiden subkutanen Zellapplikationen lag im langsamen Tumorwachstum begründet. Ab einem mittleren Tumordurchmesser von 4 mm (Tag 29), wurden die insgesamt 27 Nacktmäuse des Stammes Balb/c nu/nu in sechs Gruppen (V, D, rhT, rhT+D, T, T+D) aufgeteilt und wie unter 4.3.6.3 und 4.3.6.4 beschrieben, über zwei Wochen behandelt. Es folgten neun Tage der postinterventionellen Beobachtung, bevor die Tiere geopfert und die Tumore reseziert und konserviert wurden. Während der gesamten Versuchszeit (52 Tage) notierte man sowohl die Tumorgöße, als auch das Körpergewicht der Tiere im zweitägigen Abstand. Trotz mehrmaliger Injektion blieb das Tumorwachstum an acht Injektionsorten aus. Diese wurden bei der Datenanalyse nicht berücksichtigt. Im Gegensatz dazu wiesen drei der Tumore eine überdurchschnittlich hohe Wachstumspotenz auf, die ebenfalls aus der Auswertung fielen. Die Anzahl (n) der in die Bewertung eingehenden Tumore war demnach wie folgt: Vehikelgruppe (n=6), Doxorubicin-Gruppe (n=8), rhTIMP-1-Gruppe (n=4), rhTIMP-1-Doxorubicin-Gruppe (n=6), TIMP-1-GPI-Gruppe (n=11), TIMP-1-GPI-Doxorubicin-Gruppe (n=8).

6.5.1 Bewertung der Körpergewichtsentwicklung

Der Gewichtsverlauf gab Hinweise auf die körperliche Verfassung der Tiere und die Verträglichkeit der Therapie (Abb. 15). Gut toleriert wurden in allen Gruppen sowohl die beiden Zellinjektionen (Tag 0 und Tag 18) als auch die Therapie (Tag 29-43). Dies ist an den in etwa parallel zur Vehikelgruppe verlaufenden Kurven erkennbar. In den ersten zwei Tagen (Tag 29-31) nach Behandlungsbeginn, verloren die Tiere zunächst im Mittel an Gewicht, welches sich im weiteren Verlauf (Tag 31-37) stabilisierte und gegen Ende der Therapie wieder zunahm (Tag 38-42). Dieser wellenartige Gewichtsverlauf wiederholte sich im darauf folgenden behandlungsfreien Beobachtungszeitraum (Tag 43-52). Zusammenfassend ließen sich bezüglich des Gewichtsverlaufes keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen feststellen.

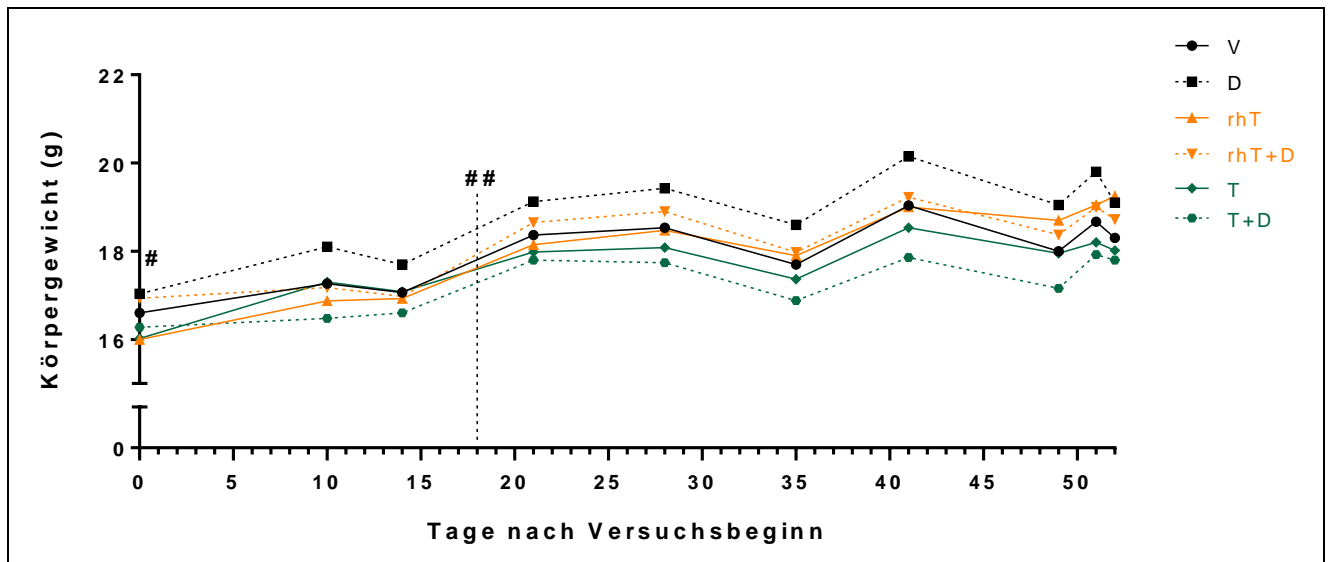


Abb. 15: Körpergewichtsverlauf tumortragender Nacktmäuse

Zur Generierung subkutaner Weichteiltumore wurden Zellen der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 injiziert. 18 Tage nach der ersten Injektion (#) erfolgte aufgrund der geringen Wachstumstendenz einiger Tumore eine zweite Injektion (##). Die Tiere (27 Balb/c nu/nu Nacktmäuse) wurden in 6 Behandlungsgruppen mit n Tieren eingeteilt: V (n=4), D (n=4), rhT (n=4), rhT+D (n=4), T (n=6), T+D (n=5). Am Tag 29 wurde mit der 14-tägigen Therapie begonnen. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte jeder Gruppe in mg Körpergewicht. Die Gewichtskontrolle der Tiere erfolgte jeden zweiten bis dritten Tag. Ein signifikanter Unterschied in der Gewichtsentwicklung der sechs Versuchsgruppen war nicht feststellbar.

6.5.2 Tumorwachstum

Das unter 6.5 näher erläuterte Phänomen des unterschiedlichen Wachstumsverhaltens der Tumore, spiegelt sich im schwankenden Kurvenverlauf der gemessenen Tumordurchmesser der ersten 21 Tage wider (Abb.16). Da die Generierung s.c. Weichteilsarkome bei einigen Tieren fehlschlug, wurden die Tiere einer zweiten Zellinjektion am Tag 18 unterzogen. Wie der Kurvenverlauf in Abb. 16 erkennen lässt, war diese zunächst erfolgreich. Bis zum Tag 21 näherten sich die Tumordurchmesser der sechs Behandlungsgruppen auf im Mittel 5,58 mm (Tag 21) an. Bis zum Therapiebeginn (Tag 29) hatte die Schwankungsbreite wieder zugenommen. Da zur Auswertung der therapeutischen Wirksamkeit der verschiedenen Substanzen insbesondere die Veränderungen der Tumordurchmesser vor dem Therapiebeginn und nach Therapieende entscheidend sind, soll im Folgenden auf den Zeitraum zwischen einem Tag vor Therapiebeginn (Tag 28) und dem Versuchsende (Tag 51) näher eingegangen werden (Tabelle 14). Die insgesamt geringe Aggressivität der in diesem Versuch generierten Tumore, wird bei der Betrachtung der Kontrollgruppe (V) deutlich. Die mittlere relative Größenzunahme der Tumore (Tag 28/51) dieser Gruppe belief sich am Versuchsende auf lediglich 16,94% (Tabelle 14). Im Vergleich wies die mit Doxorubicin monotherapeutisch behandelte Gruppe ein kontinuierliches Tumorwachstum auf. Während das Doxorubicin in den ersten 10 Tagen noch einen bremsenden Einfluss auf das Tumorwachstum zu haben schien, ließ diese Wirkung ab Tag 39 nach, was mit einem starken Anstieg des Tumordurchmessers einherging. Der mittlere Tumordurchmesser lag hier am Ende (Tag 51) 63,20% über dem Ausgangswert (Tag 28). Die Teststatistik ergab in diesem Fall eine signifikante Zunahme des Tumordurchmessers ($p=0,0038$). Die Wachstumskurve der mit dem rekombinanten TIMP-1-Protein monotherapeutisch behandelten Tumore, zeigte einen schwankenden Verlauf (Abb. 15). Zu Versuchsende hatte der mittlere Tumordurchmesser um 13,67% des Ausgangswertes (Tag 28) zugenommen (Tabelle 14). Die Kombination des rekombinanten TIMP-1-Proteins mit Doxorubicin führte in den ersten sechs Tagen nach Therapiebeginn (Tag 29-35) zunächst zu einer leichten Abnahme des Tumordurchmessers, in den darauffolgenden zehn Tagen blieb der mittlere Tumordurchmesser unbeeinflusst, bevor er zu Versuchsende hin (Tag 46-51) wieder anstieg (Abb. 15). Der mittlere Durchmesser erreichte schließlich 116,39% des am Tag 28 gemessenen Ausgangswertes (Tabelle 14). Im Gegensatz zu den bisher ausgewerteten Gruppen, führte die Behandlung mit dem TIMP-1-GPI Protein alleine, bzw. in Kombination mit Doxorubicin zu einem negativen Wachstumsergebnis. Der mittlere Durchmesser der mit TIMP-1-GPI monotherapeutisch bzw. in Kombination mit Doxorubicin behandelten Tumore nahm vom Behandlungsbeginn bis Versuchsende um 7,47% bzw. 22,25% ab (Tabelle 14). Im Gegensatz zu den Doxorubicin (D)- und rhTIMP-1-Doxorubicin (rhT+D)-Gruppen führte eine Behandlung mit dem TIMP-1-GPI-Fusionsprotein sowohl alleine als auch in

Kombination mit Doxorubicin dazu, dass der mittlere Tumordurchmesser auch nach Beendigung der Therapie nicht anstieg (Abb. 15)

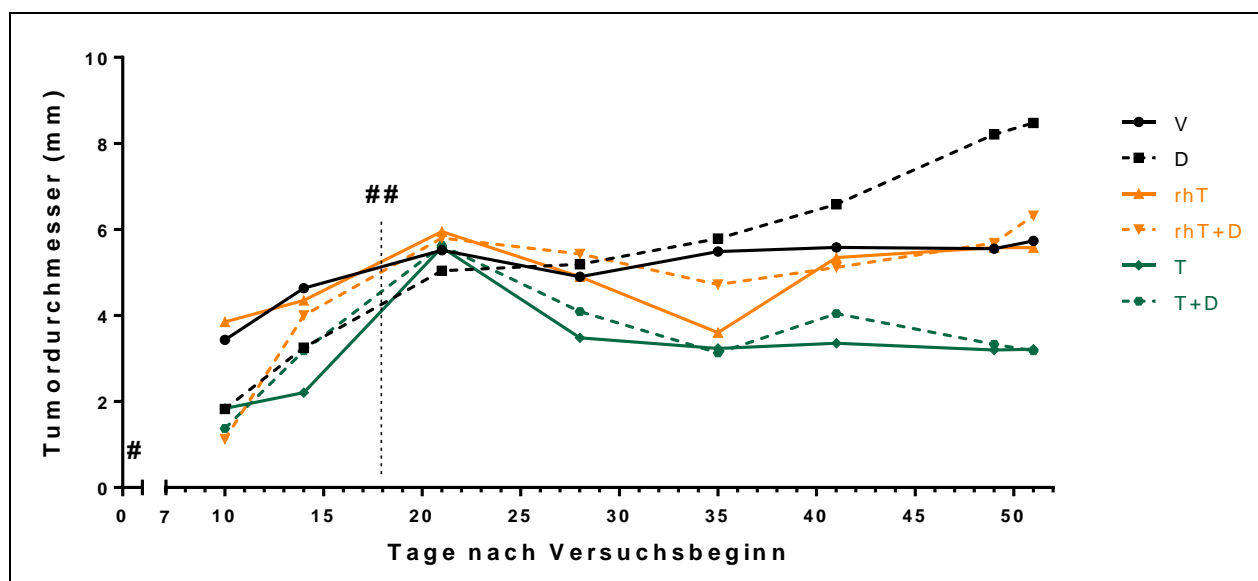


Abb. 16: Vergleichende Darstellung des mittleren Tumordurchmessers (in mm) unterschiedlich behandelter Balb/c Nacktmäuse ab Therapiebeginn (Tag 29)

Im Zuge der Generierung subkutaner Weichteiltumore wurden den Tieren (n=27) humane Fibrosarkomzellen der Zelllinie HT1080 injiziert. Als Injektionsorte dienten jeweils die rechte Hüft- sowie die linke Schulterregion. Letztere erfolgte 18 Tage (##) nach der ersten Injektion in die Hüftregion (#). Die ersten Tumore waren am Tag 7 palpabel. Die Tiere wurden in die folgenden 6 Behandlungsgruppen mit n Tumoren aufgeteilt: V (n=6), D (n=8), rhT (n=4), rhT+D (n=6), T (n=11), T+D (n=9). Im Anschluss an die 14-tägige Tumorbehandlung (Tag 29-43), beobachtete man das Tumorwachstum neun weitere Tage lang.

	V	D	rhT	rhT+D	T	T+D
Tag 28	4,90 ± 0,83	5,19 ± 1,09	4,90 ± 3,61	5,43 ± 1,22	3,48 ± 3,87	4,09 ± 1,79
Tag 51	5,73 ± 1,39	8,47 ± 2,29	5,57 ± 3,74	6,32 ± 2,44	3,22 ± 5,76	3,18 ± 3,31
p-Wert	ns	p=0,0038	ns	ns	ns	ns
Relative Änderung des Tumordurchmessers	+16,94%	+63,20%	+13,67%	+16,39%	-7,47%	-22,25%

Tabelle 14: Vergleich des mittleren Tumordurchmessers vor Beginn der Therapie (Tag 28) und zu Versuchsende (Tag 51)

Zusätzlich zu den Absolutwerten (Mittelwert ± Standardabweichung in mm) ist die relative Änderung des Tumordurchmessers (Tag 28/Tag 51) angegeben. Die statistische Auswertung mittels Zweistichproben-t-Test ergab in der Doxorubicin-Behandlungsgruppe eine signifikante Zunahme des mittleren Tumordurchmessers (p=0,0038).

6.5.3 Tumorgewicht und –volumen

Am Ende des Versuchs wurden die Tiere geopfert und die Tumore entnommen. Die subkutan gewachsenen Tumore stellten sich als solide und abgekapselt dar. Abb. 17 zeigt die sechs Behandlungsgruppen mit ihren gemessenen und gewogenen Tumorresektaten (n) und den dazugehörigen Medianen (MD). Sämtliche vor Behandlungsbeginn getasteten Tumore der Vehikelgruppe, Doxorubicin-Gruppe und rhTIMP-1-Doxorubicin-Gruppe waren auch nach erfolgter Behandlung noch nachweisbar und resezierbar (V: MD 32,50 mg, 52,49 mm³, n=6, D: MD 70,00 mg, 60,80 mm³, n=7 und rhT+D: MD 34,00 mg, 20,23 mm³, n=5). In den anderen Behandlungsgruppen hingegen kam es vor, dass sich Tumore durch die Therapie gänzlich zurückbildeten. So waren in der mit rh-TIMP-1 behandelten Gruppe (MD 70,00 mg, 59,41 mm³, n=4) am Ende noch drei Tumore, in der TIMP-1-GPI-Behandlungsgruppe (MD 0,00 mg, 0,00 mm³, n=8) noch zwei Tumore nachweisbar. Im Falle der mit TIMP-1-GPI und Doxorubicin kombiniert behandelten Gruppe (MD 0,00 mg, 0,00 mm³, n=7) waren zuletzt noch drei Tumore makroskopisch detektierbar. Das mediane Tumolvolumen und Tumorgewicht waren in der mit TIMP-1-GPI behandelten Gruppe gegenüber der Doxorubicin-Behandlungsgruppe signifikant kleiner (Tumolvolumen: p=0,0034, bzw. Tumorgewicht: p=0,0016). Desweiteren zeigte sich in der TIMP-1-GPI-Doxorubicin-Behandlungsgruppe eine im Vergleich zur Doxorubicin-Monotherapie-Gruppe signifikante chemosensitivierende Wirkung des TIMP-1-GPI-Fusionsproteins (Tumolvolumen: p=0,0404; bzw. Tumorgewicht: p=0,0157).

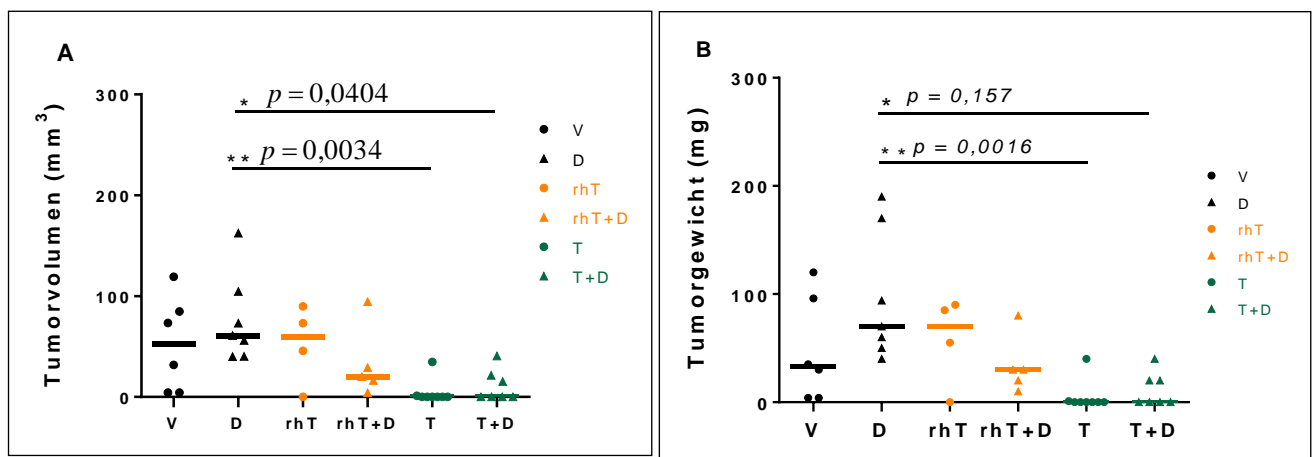


Abb. 17: Vergleich der am Tag 51 resezierten Tumore

Dargestellt sind **(A)** die Tumolvolumina und **(B)** die Tumorgewichte der am Tag 51 resezierten Tumore. In jeder der sechs Behandlungsgruppen sind die Einzelwerte mit dazugehörigem Median angegeben. Sowohl in (A) als auch (B) ist der Unterschied zwischen den Gruppen T und D sowie T+D und D statistisch signifikant (Tumolvolumen: T vs. D: p=0,0034; T+D vs. D: p=0,0404; Tumorgewicht: T vs. D: p=0,0016; T+D vs. D: p=0,0016). Gruppengröße siehe Abb. 4.

6.5.4 Immunhistologische Auswertung

Die resezierten Tumore wurden in Paraffin eingebettet und Schnittpräparate für die sich anschließenden Färbungen erstellt. Die H.E.-Färbung diente zunächst der Sicherstellung des histologischen Phänotyps durch einen örtlichen Pathologen. Darüber hinaus erfolgte eine immunhistologische Analyse der Tumore auf die Mikrogefäßdichte (MVD; CD31), die Proliferation (Ki-67) und Apoptose (TUNEL) hin (Abb. 18). Beim Vergleich der Ki-67-Indices (Prozentsatz der Ki-67-positiven Tumorzellen) der sechs Behandlungsgruppen, fiel auf, dass die mit Doxorubicin behandelten Tumore (D, rhT+D, T+D) im Vergleich zur Kontrollgruppe (V) und den Monotherapiegruppen (rhT, T) eine erhöhte proliferative Aktivität aufwiesen (MD: 49,75, IQR=32,18 (V); 59,20, IQR=14,35 (D); MD: 39,60, IQR=28,90 (rhT); MD: 75,70, IQR=32,10 (rhT+D); MD: 46,40, IQR=43,50 (T); MD: 81,65, IQR=19,30 (T+D)).

Bei der Auswertung der CD31-Färbung wies die TIMP-1-GPI-Behandlungsgruppe die größte Anzahl an gezählten Mikrogefäßen auf (MD: 54,00; IQR=22,00 (T)). Auch das Gewebe der Kontrollgruppe enthielt eine Vielzahl an positiv markierten Gefäßen (MD: 38,00; IQR=34,00 (V)). Während sich die beiden Gruppen rhTIMP-1 (rhT) und rhTIMP-1-Doxorubicin (rhT+D) in der Zahl der neugebildeten Gefäße kaum unterschieden (MD: 28,00; IQR=4,00 (rhT) vs. 25,00; IQR=37,75 (rhT+D)), ließ der Vergleich der TIMP-1-GPI-Behandlungsgruppe mit der TIMP-1-GPI-Doxorubicin-Gruppe eine antineovaskuläre Wirkung der Kombinationstherapie erahnen (MD: 54,00; IQR=22,00 (T) vs. MD: 32,00; IQR=29,75 (T+D), n.s.). Die geringste Anzahl an CD-31-positiven Zellen wurde in der Doxorubicin-Gruppe (D) ermittelt (MD: 7,00; IQR=12,00).

Bei der Auswertung der TUNEL-Färbung ergaben sich in der Kontroll- und rhTIMP-1-Behandlungsgruppe niedrige absolute Apoptosewerte (MD: 10,50, IQR=9,75 (V); MD: 5,00, IQR=6,00 (rhT)). Im Vergleich dazu wurden in der mit TIMP-1-GPI behandelten Gruppe deutlich mehr apoptotische Zellen gezählt (MD: 22,00, IQR=43,00). Die größte Anzahl an apoptotischen Zellen war in der Doxorubicin-Behandlungsgruppe (MD:92,00, IQR=55,75), gefolgt von der rhTIMP-1-Doxorubicin-Gruppe (MD:59,00, IQR=65,00) nachweisbar. Die TIMP-1-GPI-Behandlungsgruppe und die mit TIMP-1-GPI und Doxorubicin kombiniert behandelte Gruppe unterschieden sich hinsichtlich der Anzahl TUNEL-positiver Zellen lediglich geringfügig (MD: 22,00, IQR=43,00 (T) vs. MD: 17,50, IQR=54,25 (T+D), $p=0,0342$).

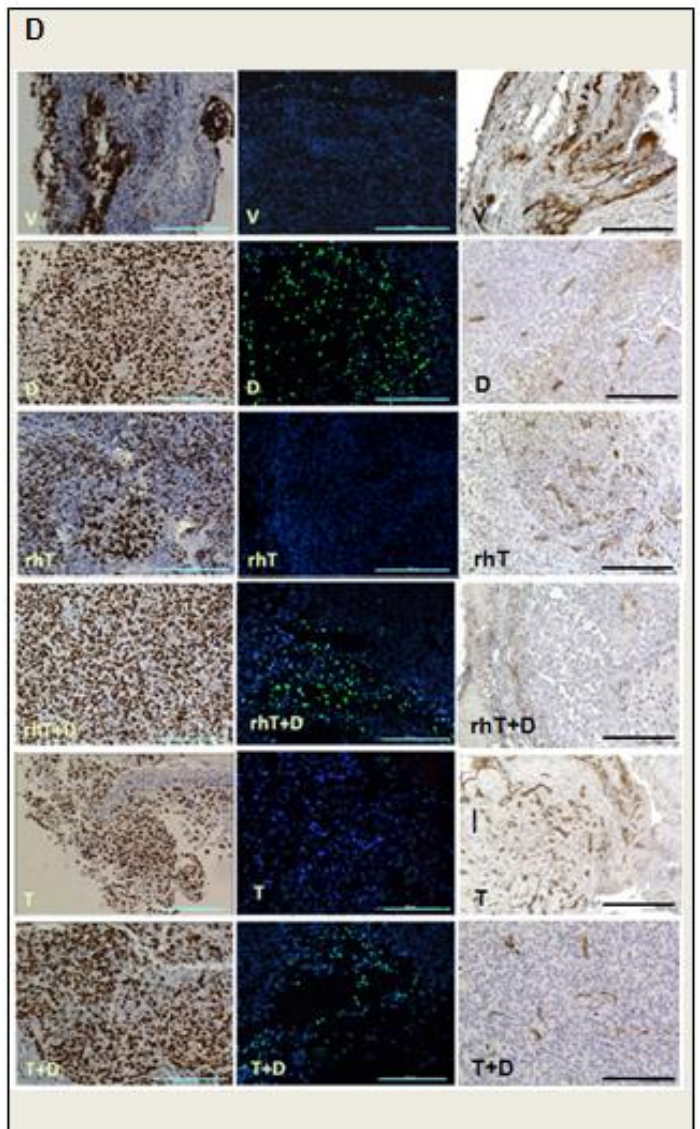
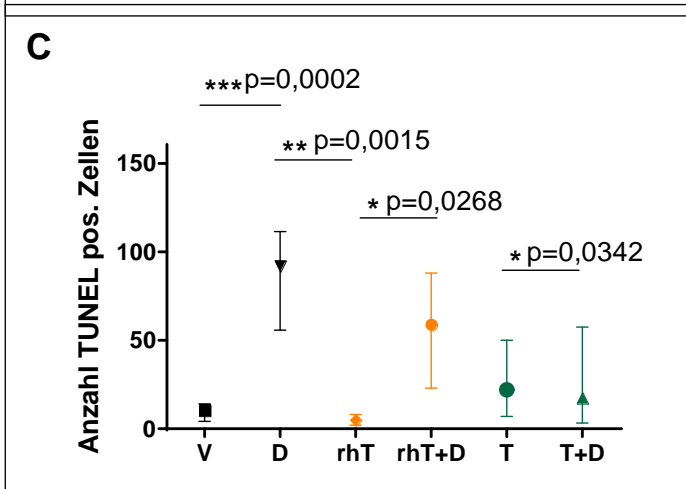
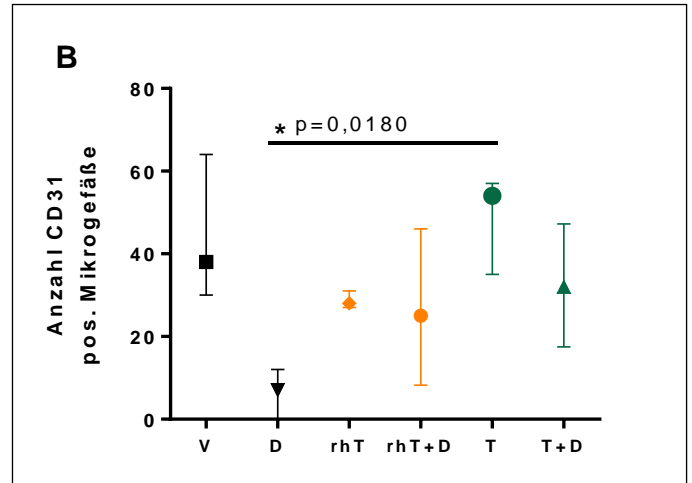
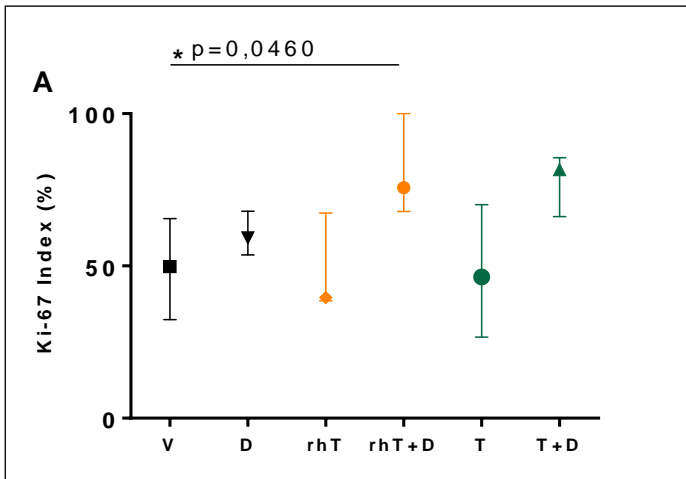


Abb. 18: Vergleichende Darstellung der immunhistologisch gefärbten Schnitte (MD + IQR)

- (A) Ki-67-Index (Ki-67-positive Zellen/Gesamtzahl der Tumorzellen)
- (B) CD-31-Färbung
- (C) TUNEL-Färbung
- (D) Fotografische Dokumentation

6.6 In vivo Rezidivprophylaxe mit TIMP-1-GPI

Neben dem unter 6.5 beschriebenen neoadjuvanten Therapiemodell, das zur Untersuchung der therapeutischen Wirksamkeit der Kombinationstherapie *in vivo* diente, wurde das TIMP-1-GPI-Fusionsprotein auf die Eignung als adjuvantes Agens hin untersucht. Wie unter 4.3.7.2 erläutert, nahm man hierfür sechs männliche Balb/c Nacktmäuse in den Versuch. Man teilte diese in zwei Gruppen (Kontrolle/Vehikel (V), TIMP-1-GPI (T)) mit je drei Tieren ein. Es erfolgten je Tier zwei Tumorzellinjektionen an anatomisch entfernten Körperstellen. Sobald die Tumore einen mittleren Durchmesser von rund 6 mm (Tag 28) erreicht hatten, wurden sie reseziert. Besonders achtete man darauf, dass möglichst kein Restgewebe *in situ* zurückblieb. Die Wunden wurden chirurgisch zugenäht und die Tiere in den darauffolgenden Tagen intensiv beobachtet. Die Tiere tolerierten den Eingriff gut. Die Wundareale wurden nun entsprechend des in Tabelle 13 beschriebenen Vorgehens mit entweder PBS (V), bzw. 7 ng/ml TIMP-1-GPI (T) über einen Zeitraum von 14 Tagen behandelt (Abb. 8). Nach dem Opfern der Tiere am 22. postoperativen Tag erfolgte die Messung und Wiegung der Rezidivtumore.

6.6.1 Entwicklung des Körpergewichts

Der Verlauf des mittleren Körpergewichts (Abb. 19) gab keinen Hinweis auf ein Leiden der Tiere. Nach dem operativen Eingriff (Tag 28), der mit einer kurzzeitigen Abnahme des mittleren Körpergewichts verbunden war, erholten sich die Tiere rasch. Dies wurde durch eine erneute Gewichtszunahme bestätigt.

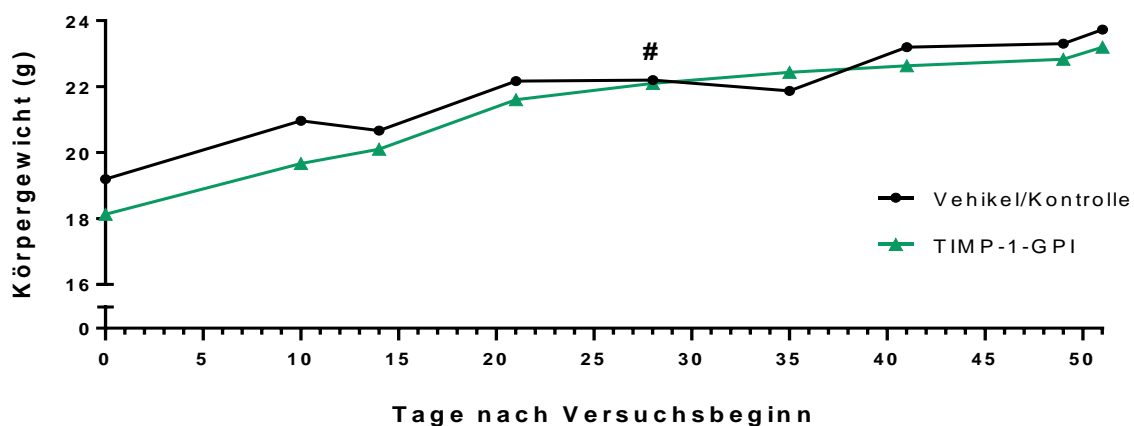


Abb. 19: Körpergewichtsverlauf

Es ist der Verlauf der mittleren Körpergewichte beider Gruppen (Vehikel, TIMP-1-GPI) dargestellt. Die Tumorexzision erfolgte am Tag 28 (#).

6.6.2 Ergebnisse der postoperativen TIMP-1-GPI-Behandlung

Die Generierung subkutaner Weichteiltumore war an n Injektionsorten (V: n=6; T: n=6) erfolgreich. Der in Abb. 20 dargestellte Verlauf des Tumordurchmessers lässt bis zum Tag 28 eine Zunahme des mittleren Tumordurchmessers auf 5,76 mm (V), bzw. 5,93 mm (T) erkennen. Die Tumorresektion erfolgte am Tag 28. Einen Tag später (Tag 29) wurde mit der 14-tägigen Behandlung begonnen. Ein Wundareal der Vehikelgruppe wurde wegen des präoperativ unverhältnismäßig aggressiven Tumorwachstums aus der statistischen Auswertung genommen. Zunächst waren bis zum Tag 35 in keiner der Gruppen Rezidive detektierbar. Ab dem neunten postoperativen Tag (Tag 37) waren in der Vehikelgruppe die ersten Rezidive (n=3) zu tasten, deren Durchmesser bis zum Versuchsende (Tag 51) auf im Mittel 2,14 mm zunahm. An einem Injektionsort blieb ein Tumorwachstum aus. Der Verlauf der mit TIMP-1-GPI behandelten Wundareale zeigt eine verzögerte, nach Therapieende (Tag 43) einsetzende, Rezidivgenese (n=2). Der mittlere gemessene Durchmesser betrug zu Versuchsende (Tag 51) 1,1 mm. Bei zwei Dritteln (n=4) der mit TIMP-1-GPI adjuvant behandelten Operationsgewebe, blieb ein Tumorrezidivwachstum aus. Das Experiment wurde mit dem Opfern der Tiere am Tag 51 und der damit einhergehenden Resektion der gewachsenen Tumorrezidive beendet, welche anschließend ausgemessen und gewogen wurden. Der Vergleich der durchschnittlichen Tumorumfänge und -gewichte (Abb. 21) beider Gruppen (V vs. T) gab trotz der Nicht-Signifikanz der Ergebnisse, Hinweis auf einen prophylaktischen Effekt des TIMP-1-GPI-Fusionsproteins (MD: 4,080 mm³, IQR=6,44 (V) vs. 0,0 mm³, IQR=3,87 (T), p=0,37 bzw. MD: 4,00 g, IQR=20,00 (V) vs. 0,0 g, IQR=5,50 (T), p=0,40).

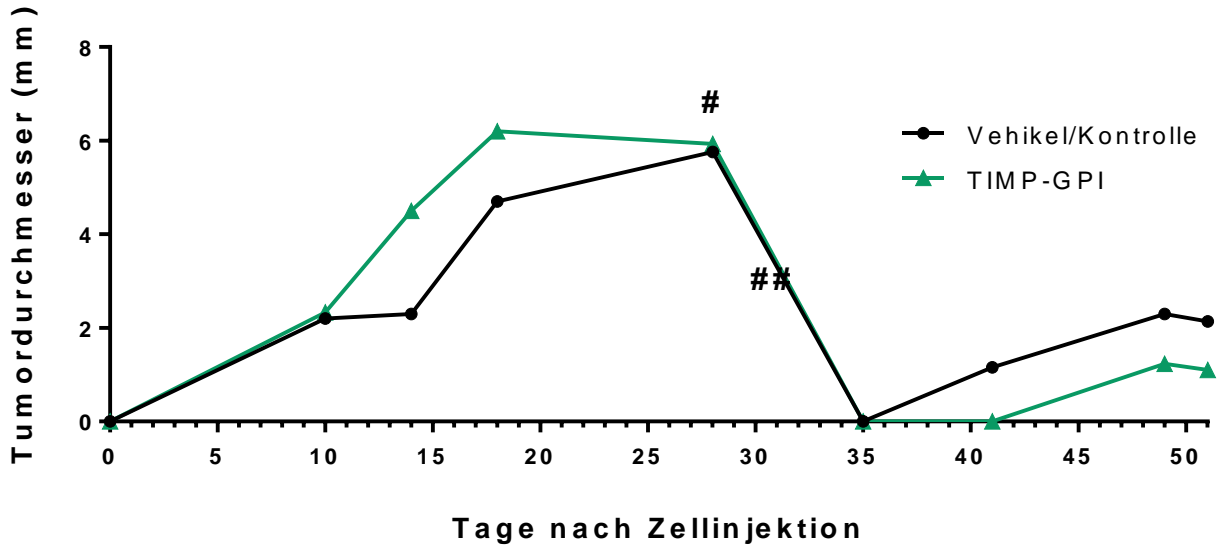


Abb. 20: Verlauf des Tumordurchmessers

Die Abbildung zeigt den Verlauf des mittleren Durchmessers (in mm) der palperten Tumore. Die Tumore wurden 28 Tage (#) nach der subkutanen Zellinjektion (Tag 0) reseziert. Im Anschluss an die chirurgische Wundnaht, behandelte man diese ab dem zweiten postoperativen Tag (##) 14 Tage lang mit PBS (V), bzw. TIMP-1-GPI (T). Der Tag 51 markiert das Ende des Experiments.

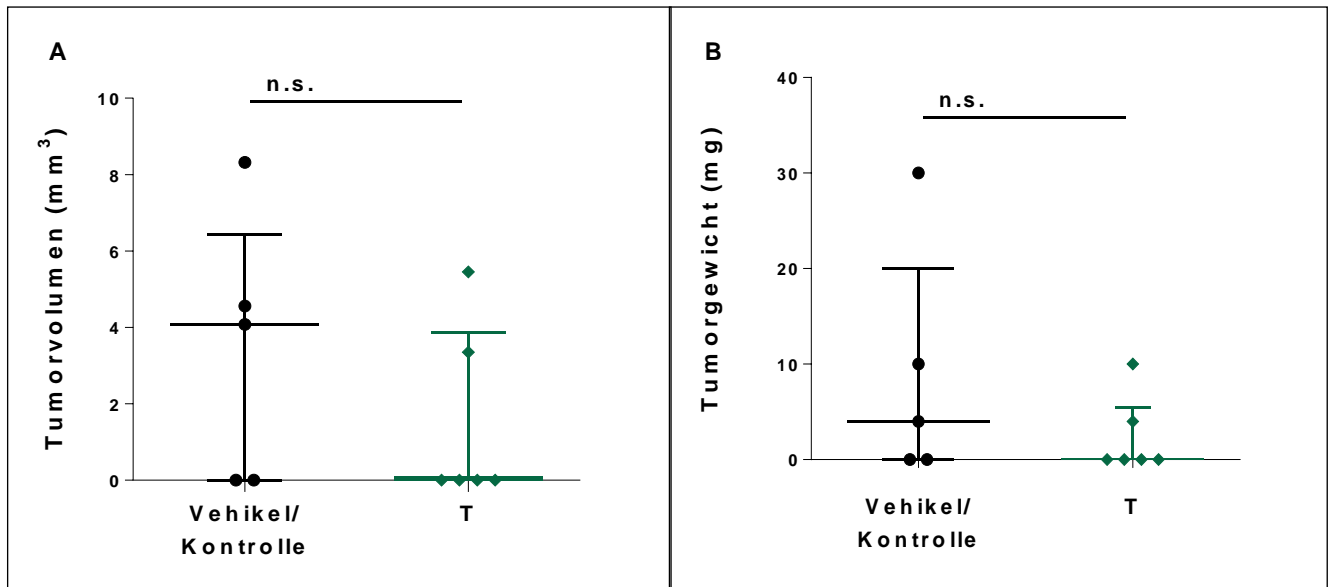


Abb. 21: Vergleich der Rezidiv-Volumina (A) und -gewichte (B) zu Versuchsende

Der Vergleich beider Gruppen (V, T) lässt eine rezidivprophylaktische Wirkung des TIMP-1-GPI-Fusionsproteins erkennen. Beim Vergleich der Mediane beider Gruppen (V vs. T) blieben statistische Signifikanzen aus.

7 Diskussion

7.1 Überblick

Inzwischen weiß man, dass die Tumorprogression nicht alleine auf die maligne Entartung der Zellen zurückzuführen ist. Damit entartetes Gewebe wachsen kann, braucht es darüber hinaus eine tumorfördernde Umgebung [52]. Die enge reziproke Kommunikation der Tumorzellen mit ihrer Mikroumgebung verändert das umliegende Gewebe so, dass es die Zellproliferation, die Invasion in gesundes Gewebe und die Metastasierung in entfernte Gewebe fördert und erleichtert. Jedes Gewebe, ob entartet oder gesund, setzt sich aus der Interzellularsubstanz, der sogenannten extrazellulären Matrix (EZM), und den darin eingebetteten Stromazellen zusammen [13]. Die EZM wiederum besteht aus einer amorphen Grundsubstanz und einem Faseranteil, die unter anderem für die Gewebefestigkeit und -form, für die Zellverankerung und Signaltransduktion verantwortlich sind [13; 14]. Die laufend stattfindenden Umbauprozesse machen sie zu einem sehr dynamischen Gebilde. Während sich die matrixauf- und abbauenden Prozesse im gesunden Gewebe stets die Waage halten, ist dieses Gleichgewicht im Gewebe der Weichteiltumore zugunsten des Matrixabbaus verschoben [53]. Die erhöhte Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und die in der Unterzahl vorhandenen MMP-Inhibitoren gehen mit einer beschleunigten Tumorprogression einher [54]. Demnach rückt die Wiederherstellung der Gewebshomöostase bei der Erforschung neuer Therapiestrategien in den Fokus. Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Prognose von Patienten mit adultem Fibrosarkom liegt darin, die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegen Chemotherapeutika zu erhöhen.

7.2 Dosisfindung *in vitro*

Bei der Wahl geeigneter Behandlungsdosen, wurden die synergistischen zytotoxischen Wirkungen des TIMP-1-GPI-Proteins und des Doxorubicins berücksichtigt. Die Einzeldosen beider Medikamente wurden dementsprechend nicht zu hoch und in Anlehnung an die von Nelson et al. verwendeten Konzentrationen gewählt (7 ng/ml TIMP-1-GPI, 1 ng/ml \cong 1,72 nM Doxorubicin). Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte zytotoxische Wirkung des Fusionsproteins war im Vergleich zu Nelson et al. insgesamt weniger stark ausgeprägt. Die Ursache hierfür kann im genetischen Drift der Zellen begründet liegen. Feine Unterschiede in der Zellkultivierung zwischen Laboratorien, können unter Umständen zu genotypischen Veränderungen innerhalb einer Zelllinie führen [55; 56].

7.3 Untersuchung der Zytotoxizität der TIMP-1-GPI-Doxorubicin-Kombinationsbehandlung

Aufgrund diverser Mutationen in zellzyklusregulierenden Genen, sind Tumorzellen imstande, sich unkontrolliert zu teilen. Tumorzellen gelten erst dann nicht mehr als gefährlich, wenn sie die Fähigkeit der unkontrollierten, unbegrenzten Teilung verloren haben. Die Untersuchung der Zytotoxizität spielt demnach eine entscheidende Rolle bei der Erforschung neuer, antitumoral wirkender Substanzen. Den ersten Hinweis auf einen additiven zytotoxischen Effekt der TIMP-1-GPI-Doxorubicin-Kombinationstherapie, verglichen mit einer monotherapeutischen TIMP-1-GPI-, bzw. Doxorubicin-Behandlung, lieferten Untersuchungen der Zellapoptose [27]. Diese Beobachtung wurde in der hier vorliegenden Arbeit aufgegriffen und weiter untersucht. Zur Bestimmung der zytotoxischen Eigenschaften der TIMP-1-GPI-Doxouribicin-Kombinationsbehandlung wurden zwei Methoden angewandt. Das Proliferationsassay diente zunächst dazu, den kurzfristigen zytotoxischen Effekt der Kombinationsbehandlung zu untersuchen. Da die Proliferationsrate der Tumorzellen eng mit der Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors korreliert, zählt die Zellproliferation zu den prognostisch relevanten Faktoren. Im Vergleich zur monotherapeutischen Behandlung der Zellen mit TIMP-1-GPI, konnte der Anteil stoffwechselaktiver, vitaler Zellen durch die Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin um ein weiteres reduziert werden (vgl. $76,6\% \pm 8,18\%$ vs. $64,93\% \pm 6,34\%$).

Desweiteren gab der klonogene Test zusätzlich Hinweise auf eine längerfristige zytotoxische Wirkung der Kombinationstherapie. Die Fähigkeit einer Zelle, mehrere Zellteilungen zu durchlaufen, und zu einer Zellkolonie zu expandieren, bezeichnet man als klonogenes Potential. Die Kombination des TIMP-1-GPI-Fusionsproteins mit Doxorubicin führte zum fast vollständigen Verlust der Selbsterneuerungsfähigkeit der Zellen.

7.4 Der Einfluss des TIMP-1-GPI-Fusionsproteins und des Doxorubicins auf die proteolyseabhängige und proteolyseunabhängige Zellmigration

Nicht nur die unkontrollierte Proliferation der Tumorzellen, auch deren Migration und Invasion in das umliegende, nicht neoplastische Gewebe zählt zu den prognostisch relevanten Faktoren. Bei der Zellmigration spielen Zell-Zell-Kontakte und die Interaktion der Tumorzellen mit der EZM eine wichtige Rolle [57]. Man unterscheidet hierbei prinzipiell zwischen der proteolyseabhängigen, mesenchymalen und der proteolyseunabhängigen, amöboiden Zellmigration [58–60]. Bei Migrationsuntersuchungen an der humanen Fibrosarkomzelllinie (HT1080), zeigte sich ein mesenchymaler Bewegungstyp, der in der hohen proteolytischen Aktivität dieser Zelllinie begründet liegt [58; 61]. Die Migration umfasst hierbei einen aus mehreren Schritten bestehenden Zyklus und ist durch einen dynamischen

Auf- und Abbau fokaler Adhäsionskontakte gekennzeichnet [62]. Zunächst ist eine Polarisierung der Zelle durch die Ausbildung fingerförmiger, aktin-reicher Zellausläufer erforderlich. Diese, auch als Filopodien, bzw. Lamellipodien bezeichneten Zellfortsätze, binden mit ihren zahlreichen Adhäsionsrezeptoren an Liganden der EZM, wobei den Familien der β 1- und β 3-Integrine in diesem Zusammenhang die größte Bedeutung zukommt [63]. Eine Integrin-vermittelte Aktivierung intrazellulärer Aktinfilamente geht schließlich mit der Ausbildung eines elongierten, spindelförmigen Phänotyps und der Fortbewegung der Zellen einher. Zudem findet eine integrinvermittelte Aktivierung matrixdegradierender Proteasen (α v β 3-Integrin mit MMP-2, β 1-Integrin mit MT1-MMP, β 1-Integrin mit u-PAR) statt, was die Wanderung der Zellen erleichtert [58]. Neben der Migration vom mesenchymalen Typ, gibt es die amöboide Form der Tumorzellmigration, bei der sich die Zelle lediglich durch Verformung fortbewegt [64]. Tumorzellen scheinen imstande zu sein, zwischen diesen beiden Bewegungsformen zu wechseln. Dieses Phänomen wurde beispielsweise bei der Behandlung mit Proteaseinhibitoren beobachtet. *In vitro* ging die Behandlung humaner Fibrosarkomzellen (HT1080) mit Proteaseinhibitoren zwar mit einer Reduktion der Kollagenolyse einher, die Zellmigration blieb jedoch nahezu unbeeinflusst [58]. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die Hemmung der proteolytischen Aktivität der MMPs für die Inhibition der Zellmigration von nicht allzu großer Bedeutung zu sein scheint.

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete antimigratorische Wirkung des TIMP-1-GPI-Proteins steht im Einklang mit den Ergebnissen aus anderen Studien [27; 65]. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine proteolyseunabhängige Hemmung der Zellmigration, deren genauer Mechanismus jedoch noch unerforscht ist [65].

Desweiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich der antimigratorische Effekt des TIMP-1-GPI-Fusionsproteins durch eine Kombination mit Doxorubicin um ein weiteres verstärken lässt. Dadurch, dass die Zellen lediglich einer niedrigdosierten Doxorubicin-Behandlung (1,72 nM) unterzogen wurden, spielten die zytotoxischen Eigenschaften des Doxorubicins eine untergeordnete Rolle. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass sich die hier beobachtete Hemmung der Zellmigration auf eine antimigratorische Wirkung des Doxorubicins zurückführen lässt [66]. Eine Doxorubicin-assoziierte Hemmung der Migration wurde in einer anderen Studie mit der Herunterregulierung der MMP-Genexpression in Verbindung gebracht [67]. Die Tatsache, dass MMPs sowohl die proteolyseabhängige, als auch die proteolyseunabhängige Fortbewegung der Tumorzellen positiv beeinflussen können [68], legt die Vermutung nahe, dass das Doxorubicin imstande ist, beide Formen der Zellmigration zu hemmen.

7.5 Versuchsablauf *in vivo*: Diskussion und Erklärungsansätze

Im Hinblick auf das in der Klinik bevorzugte neoadjuvante Behandlungsschema, wurde für die *in vivo* Untersuchung der Kombinationsbehandlung ein präoperatives, neoadjuvantes Behandlungskonzept gewählt. Die Generierung subkutaner Weichteiltumore gestaltete sich wider Erwarten schwierig. Aufgrund der geringen Erfolgsquote der ersten Zellinjektion, entschied man sich zu einer zweiten. Wie aus anderen Studien hervorgeht, stellt die Generierung von mehr als einem Tumor pro Maus, eine mögliche, wenn auch nicht gängige Xenograft-Modellvariante dar [69–71]. Die Möglichkeit einer lokoregional unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit der Tumore wurde in Kauf genommen [72]. Das hier beobachtete ausbleibende, bzw. langsame Tumorstadium entsprach nicht dem eigentlich erwarteten aggressiven Wachstumsverhalten dieser Zelllinie [73]. Bei der Untersuchung der Zellvitalität vor und nach der Zellinjektion, konnten keine relevanten Auffälligkeiten festgestellt werden. Als mögliche Ursache für ein ausbleibendes Tumorstadium, kommt eine Zellschädigung in Folge des hohen Drucks während des Injektionsvorgangs in Frage [74]. Darüber hinaus wird das Tumorstadium durch den Wirtsorganismus selbst, insbesondere durch dessen Immunabwehr, beeinflusst [75]. Eine erfolgreiche Generierung xenogener Tumore setzt die Abschwächung des Immunsystems der Maus voraus. Das Immunsystem der in dieser Arbeit verwendeten athymen Nacktmäuse, ist durch eine T-Zell-Defizienz gekennzeichnet. Auch wenn dies von einer starken Schwächung der Immunabwehr begleitet ist, bleibt eine, je nach Tier unterschiedlich stark ausgeprägte Restaktivität des Immunsystems, erhalten. Man geht davon aus, dass eine B-Zell-, Makrophagen- und NK-assoziierte Immunabwehr bestehen bleibt. Auch T-Zell-ähnliche Abwehrmechanismen werden diskutiert [74]. Das von Tier zu Tier in unterschiedlichem Maße aktive Immunsystem bedingt die auch in dieser Arbeit beobachtete Heterogenität des Tumorstadiums. Während die Generierung subkutaner Weichteiltumore an acht Lokalisationen fehl schlug, wurde an dreien ein überdurchschnittlich aggressives Wachstumsverhalten beobachtet. Der Grund für die Abnahme des mittleren Tumordurchmessers aller Gruppen kurz vor Therapiebeginn (Tag 21-29), bleibt unklar (Abb. 16).

7.6 Wirkung der TIMP-1-GPI-Doxorubicin-Kombinationstherapie *in vivo*

Die von Nelson et al. beobachtete wachstumshemmende Wirkung des TIMP-1-GPI-Fusionsproteins *in vivo* konnte in dieser Arbeit, trotz des mit Kompromissen behafteten Tumormodells, bestätigt werden [27]. Die s.c. gewachsenen Weichteiltumore wurden mit 7ng/ml TIMP-1-GPI, anstatt 14ng/ml (Nelson et al. [27]), behandelt. Hinsichtlich der Änderung der Tumordurchmesser, wurde der größte antitumorale Effekt durch eine

Kombination der intratumoralen TIMP-1-GPI-Behandlung mit einer systemischen Low-Dose-Doxorubicin-Gabe erzielt (Tabelle 14). Bei der Betrachtung der Tumervolumina, zeigte sich hingegen eine leichte Überlegenheit der TIMP-1-GPI Monotherapie gegenüber der TIMP-1-GPI-Doxorubicin-Kombinationsbehandlung (Abb.17). Aufgrund der nichtsignifikanten Ergebnisse, ist eine zuverlässige und eindeutige Aussage über die *in vivo*-Wirkung der Kombinationsbehandlung in dem hier angewandten Modell nicht möglich. Vor dem Hintergrund der deutlich signifikanten antiproliferativen und antimigratorischen Wirkungen der TIMP-1-GPI-Doxorubicin-Therapie *in vitro*, empfiehlt sich eine Wiederholung des *in vivo*-Versuchs unter gleichzeitiger Optimierung des hier etablierten Modells. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf ein homogenes Tumorwachstum gelegt werden. Sofern machbar, empfiehlt sich eine einmalige Tumorzellinjektion pro Tier. Auch die Anzahl der am Versuch beteiligten Tiere könnte zu statistischen Zwecken erhöht werden.

7.7 Die tumorprogressive Wirkung der Low-Dose-Doxorubicin-Therapie und die Rolle des p53-Proteins

Zusätzlich zu den bereits diskutierten, sehr eindrücklichen Ergebnissen der TIMP-1-GPI-Behandlungsgruppe, sticht die Gruppe der mit Doxorubicin monotherapeutisch behandelten Tumore ins Auge. Die relative Änderung des Tumordurchmessers (Tabelle 14) und die Betrachtung des Tumervolumens (Abb. 17) lassen auf eine tumorprogressive Wirkung der Low-Dose-Doxorubicin-Therapie und demnach auf eine Chemotherapieresistenz des Tumors schließen. Da die Tumore während der ersten 10 Behandlungstage noch auf die zytotoxische, antiproliferative Wirkung des Doxorubicins anzusprechen schienen, liegt der Verdacht einer sekundären, durch das Doxorubicin selbst induzierten, Chemoresistenz nahe. Das Chemotherapeutikum Doxorubicin zählt zur Gruppe der Anthrazykline. Die zytostatische Wirkung dieser Substanzgruppe beruht zum einen auf einer gestörten Transkription und Replikation via Interkalation in die DNA. Darüber hinaus kommt es durch Hemmung der Topoisomerase I und II zu irreversiblen Strangbrüchen der DNA. Ein weiterer Wirkmechanismus dieser Gruppe ist die Bildung freier Radikale, die ebenfalls zu Strangbrüchen der DNA und Schädigungen der Zellmembran führen [76]. Chemosensible Zellen würden auf die Irreparabilität dieser Schäden mit einer Einleitung des programmierten Zelltods reagieren. Wie zahlreiche Studien zeigen, ist ein funktionstüchtiges p53-Protein für den Doxorubicin-induzierten Apoptosevorgang unabdingbar [77–79]. Rund die Hälfte aller Tumore weist jedoch Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen auf, die das Protein in seiner Struktur und Funktion als Transkriptionsfaktor verändern [80]. In diesem Zusammenhang sind die sogenannten Gain-of-Function-Mutationen zu erwähnen, durch die das Protein neue, onkogene Funktionen erhält. Mutationen im p53-Gen wurden mit einer Tumorprogression *in vivo* in Verbindung gebracht [81]. Die in dieser Arbeit beobachtete

Doxorubicin-Resistenz könnte im Zusammenhang mit einem hohen p53-Mutationsstatus der behandelten Tumore stehen [82]. Eine Gain-of-Function-Mutation des p53-Gens würde das im Rahmen dieser Arbeit beobachtete aggressive Tumorstadium unter einer Therapie mit Doxorubicin erklären. Die hier erzielten Ergebnisse legen demnach eine Beteiligung des Doxorubicins beim Erwerb proliferativer Eigenschaften nahe. Zur Bestätigung der Vermutung bedarf es jedoch weiterer Nachforschungen. Die immunhistologische Aufarbeitung der resezierten Tumore scheint diese Annahme dahingehend zu bestärken, dass die mit Doxorubicin behandelten Tumorgewebe im Vergleich zu den anderen Gruppen einen erhöhten Ki-67-Proliferationsindex aufwiesen (Abb. 18). Hinsichtlich der Doxorubicin-Wirkung auf zellulärer Ebene wird eine Aktivierung des NF- κ B-Transkriptionsfaktors und des TGF β -Signalwegs diskutiert [77; 78; 83]. Sowohl bei Tumoren epithelialen Ursprungs als auch bei Weichteiltumoren ging eine erhöhte Aktivität des TGF- β -Signalwegs mit einer Prognoseverschlechterung einher [84].

7.8 Untersuchung der Tumorresektate *ex vivo*

Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen sind aufgrund der oftmals limitierten Tumorschnittflächen bedingt aussagekräftig. Sie lassen jedoch Tendenzen erkennen. In dieser Arbeit konnte weder die von Nelson et al. vermutete antineovaskuläre Wirkung des TIMP-1-GPI-Fusionsproteins bestätigt, noch eine TIMP-1-GPI-assoziierte Reduktion des Ki-67-Indexes beobachtet werden [27]. Die TUNEL-Färbung, bzw. CD31-Färbung gab Hinweis auf eine pro-apoptische ($p \leq 0,0002$), bzw. antineovaskuläre Wirkung der Doxorubicin-Monotherapie. Diese Ergebnisse scheinen auf den ersten Blick im Widerspruch zur weiter oben angestellten Vermutung des tumorprogressiv wirksamen Doxorubicins zu stehen. Die Lösung dieses vermeintlichen Widerspruchs könnte in der simultanen, Doxorubicin-vermittelten Aktivierung pro-apoptischer und tumorprogressiver Proteine liegen, wie es bei Histon-Deacetylase-Hemmern bereits beobachtet werden konnte [85].

7.9 Der Einsatz desTIMP-1-GPI-Fusionsproteins zur Rezidivprophylaxe

Ein großes Problem in der Behandlung adulter Fibrosarkome stellt die hohe Rate der lokoregionalen Tumorrezidive dar. Die postoperative Bestrahlung des Primärtumorareals wird als gängiges Verfahren zur Rezidivprophylaxe der Weichteilsarkome angewandt. Aufgrund der ausgeprägten Therapieresistenzen vieler Tumore, kann das Wachstum eines Rezidivs, trotz adjuvanter Strahlentherapie, in rund 50% der Fälle nicht verhindert werden [86]. Die Entwicklung wirksamer, nebenwirkungsarmer Rezidivprophylaxen, stellt einen weiteren Ansatz zur Verlängerung der Überlebensraten dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das TIMP-1-GPI-Fusionsprotein hinsichtlich der Eignung zur postoperativen Rezidivprophylaxe untersucht. Aufgrund des strapaziösen Behandlungsschemas wurden männliche, körperlich robustere Tiere in den Versuch genommen. Die Ergebnisse gaben erste Hinweise auf eine rezidivprophylaktische Wirkung des TIMP-1-GPI-Fusionsproteins. Für aussagekräftigere Ergebnisse ist die Wiederholung des Versuchs unter Erweiterung der Gruppengröße anzuraten.

8 Zusammenfassung

Das adulte Fibrosarkom ist ein seltener Tumor aus der Gruppe der malignen, fibroblastischen Weichteiltumore. Der oftmals hohe Malignitätsgrad der Tumorzellen, die geringen Ansprechraten der Tumore gegenüber Chemotherapeutischer Behandlung und die hohen Tumorrezidivraten tragen zur schlechten Prognose eines Fibrosarkompatienten bei. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Beitrag zur Erforschung neuer, prognoseverbessernder Substanzen geleistet. Der Fokus richtete sich hierbei auf die TIMP-1-GPI-Doxorubicin-Kombinationstherapie. Sie diente dazu, das Fusionsprotein auf die Fähigkeit hin zu untersuchen, Tumorzellen gegenüber dem in der Weichteilsarkom-Therapie standardmäßig zum Einsatz kommenden Doxorubicin, zu sensitivieren.

Die Wirkung der Kombinationstherapie wurde sowohl *in vitro*- als auch *in vivo* untersucht. Unabhängig von der Art des Experiments verglich man stets sechs Behandlungsgruppen miteinander. Humane Fibrosarkomzellen der Zelllinie HT1080 wurden entweder mit PBS als Kontrolle (V), mit Doxorubicin (D), mit rekombinanten TIMP-1 oder TIMP-1-GPI behandelt, wobei man die letzten beiden Substanzen sowohl monotherapeutisch (rhT, T), als auch in Kombination mit Doxorubicin (rhT+D, T+D) verabreichte. Die *in vivo*-Versuche wurden an tumortragenden Balb/c Nacktmäusen durchgeführt und ein neoadjuvantes Behandlungskonzept nachgeahmt.

Die Ergebnisse aus den Zytotoxizitätsstudien und dem Migrationsassay lassen zweierlei erkennen: Vergleicht man die T und T+D Behandlungsgruppen miteinander, so wird deutlich, dass sich sowohl die zytotoxische (CCK-8: $p < 0,0001$; Klonogenität: n.s.), als auch die antimigratorische ($19,85\% \pm 15,63\%$ (T) vs. $13,05\% \pm 7,71\%$ (T+D), n.s.) Wirkung des TIMP-1-GPI-Fusionsproteins durch Kombination mit Doxorubicin verstärken lässt. Darüber hinaus zeigt die vergleichende Gegenüberstellung der D und T+D -Behandlungsgruppen, dass das Fusionsprotein imstande ist, die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Doxorubicin zu erhöhen (CCK8: $p \leq 0,0001$; Klonogenität: $p \leq 0,0001$; Migration: n.s.). Während die Überlegenheit der TIMP-1-GPI-Doxorubicin Kombinationstherapie im Vergleich zur TIMP-1-GPI-Monotherapie in dem hier angewandten *in vivo*-Modell nicht eindeutig nachzuweisen war, bestätigte sich der bereits *in vitro* gewonnene Eindruck einer chemosensitivierenden Wirkung des Fusionsproteins gegenüber Doxorubicin auch *in vivo*. Die Kombination des Doxorubicins mit dem TIMP-1-GPI-Fusionsprotein bewirkte eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens (D vs. T+D: $p \leq 0,05$).

Darüber hinaus wurde das TIMP-1-GPI-Fusionsprotein hinsichtlich seiner Eignung zur postoperativen Rezidivprophylaxe am Tiermodell untersucht. Die Ergebnisse gaben erste Hinweise auf eine rezidivprophylaktische Wirkung des Fusionsproteins (Rezidivraten: 60% V), 33% (T)).

Literaturverzeichnis

- 1 Doyle, L. A.: Sarcoma classification: an update based on the 2013 World Health Organization Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. *Cancer* 120(12). 1763–1774 (2014)
- 2 Guillou L., Folpe A.L.: Fibroblastic and Fibrohistiocytic Tumors. In: Folpe A.L., Inwards C.Y (eds.). *Bone and Soft Tissue Pathology*. pp. 63-69. Elsevier. Philadelphia 2010
- 3 Eriksson, M.: Histology-driven chemotherapy of soft-tissue sarcoma. *Annals of Oncology* 21(7). vii270-vii276 (2010)
- 4 Toro, J. R., Travis, L. B., Wu, H. J., Zhu, K., Fletcher, C. D.M., Devesa, S. S.: Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the surveillance, epidemiology and end results program, 1978-2001: An analysis of 26,758 cases. *International Journal of Cancer* 119(12). 2922–2930 (2006)
- 5 Schütte, J., Budach, V., Hartmann, J., Thomas, I., Rolf D., R., Peter, T., Per Ulf: Empfehlungen der DGHO für die Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen. Leitlinie: Weichteilsarkome 2011. https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/weichteilsarkome/@_@view/html/index.html. Stand: 17.03.2016
- 6 The ESMO/European Sarcoma Network Working Group: Soft tissue and visceral sarcomas. *Annals of Oncology* 25(3). 102–112 (2014)
- 7 Gambarotti, M.: Fibrosarcoma. In: Picci, P.; Manfrini, M.; Fabbri, N.; Gambarotti, M.; Vanel, D. (eds.). *Atlas of Musculoskeletal Tumors and Tumorlike Lesions*. pp. 307-309. Springer International Publishing. Cham 2014
- 8 Bahrami, A., Folpe, A. L.: Adult-type fibrosarcoma: A reevaluation of 163 putative cases diagnosed at a single institution over a 48-year period. *The American journal of surgical pathology* 34(10). 1504–1513 (2010)
- 9 Fisher C., van den Berg E., Molenaar W.M.: Adult Fibrosarcoma. In: Fletcher C.D.M, Unni K.K., Mertens F. (eds.). *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*. pp. 10-18. IARC Press. Lyon 2002
- 10 Leibovici, J., Itzhaki, O., Huszar, M., Sinai, J.: The tumor microenvironment. *Immunotherapy* 3(11). 1367–1384 (2011)
- 11 Parker, N. N., Siemann, D. W.: The Microenvironment in Cancer. In: Siemann, Dietmar W. (eds.). *Tumor microenvironment*. pp. 1-6. Wiley-Blackwell. Hoboken 2011
- 12 Chaklader, M., Pan, A., Law, A., Chattopadhyay, S., Chatterjee, R., Law, S.: Differential remodeling of cadherins and intermediate cytoskeletal filaments influence microenvironment of solid and ascitic sarcoma. *Molecular and Cellular Biochemistry* 382(1-2). 293–306 (2013)
- 13 Frantz, C., Stewart, K. M., Weaver, V. M.: The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science* 123(Pt 24). 4195–4200 (2010)

- 14 Gilkes, D. M., Semenza, G. L., Wirtz, D.: Hypoxia and the extracellular matrix. *Nature Reviews Cancer* 14(6). 430–439 (2014)
- 15 Heine, H.: *Lehrbuch der biologischen Medizin*. pp. 255. Haug. Stuttgart 2015
- 16 Nagase, H., Visse, R., Murphy, G.: Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research* 69(3). 562–573 (2006)
- 17 D'Souza-Schorey, C., Clancy, J. W.: Tumor-derived microvesicles. *Genes & Development* 26(12). 1287–1299 (2012)
- 18 Kalluri, R., Zeisberg, M.: Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer* 6(5). 392–401 (2006)
- 19 Betof, A. S., Dewhirst, M. W.: Establishing the Tumor Microenvironment. In: Siemann, Dietmar W. (eds.). *Tumor microenvironment*. pp. 7-33. Wiley-Blackwell. Hoboken 2011
- 20 Kessenbrock, K., Plaks, V., Werb, Z.: Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141(1). 52–67 (2010)
- 21 Roomi, M. W., Kalinovsky, T., Monterrey, J., Rath, M., Niedzwiecki, A.: In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in adult human sarcoma cell lines by cytokines, inducers and inhibitors. *International journal of oncology* 43(6). 1787–1798 (2013)
- 22 Niedzwiecki, A.: Modulation of u-PA, MMPs and their inhibitors by a novel nutrient mixture in adult human sarcoma cell lines. *International Journal of Oncology* 43(1). 39–49 (2013)
- 23 Baker, A. H., Edwards, D. R., Murphy, G.: Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of cell science* 115(Pt 19). 3719–3727 (2002)
- 24 Brew, K., Dinakarandian, D., Nagase, H.: Tissue inhibitors of metalloproteinases: Evolution, structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1477(1-2). 267–283 (2000)
- 25 Tanaka, K., Iwamoto, Y., Ito, Y., Ishibashi, T., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M., Sugioka, Y.: Cyclic AMP-regulated synthesis of the tissue inhibitors of metalloproteinases suppresses the invasive potential of the human fibrosarcoma cell line HT1080. *Cancer research* 55(13). 2927–2935 (1995)
- 26 Wu, H.-B.: Gambogic acid inhibits invasion of osteosarcoma via upregulation of TIMP-1. *International Journal of Molecular Medicine*(2012)
- 27 Bao, Q., Niess, H., Djafarzadeh, R., Zhao, Y., Schwarz, B., Angele, M. K., Jauch, K.-W., Nelson, P. J., Bruns, C. J.: Recombinant TIMP-1-GPI inhibits growth of fibrosarcoma and enhances tumor sensitivity to doxorubicin. *Targeted oncology* 9(3). 251–261 (2014)
- 28 Goss, K. J., Brown, P. D., Matrisian, L. M.: Differing effects of endogenous and synthetic inhibitors of metalloproteinases on intestinal tumorigenesis. *International Journal of Cancer* 78(5). 629–635 (1998)
- 29 Fingleton, B.: MMPs as therapeutic targets--still a viable option? *Seminars in cell & developmental biology* 19(1). 61–68 (2008)
- 30 Pavlaki, M., Zucker, S.: Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPi): the beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials. *Cancer metastasis reviews* 22(2-3). 177–203 (2003)

- 31 Djafarzadeh, R., Conrad, C., Notohamiprodjo, S., Hipp, S., Niess, H., Bruns, C. J., Nelson, P. J.: Cell surface engineering using glycosylphosphatidylinositol anchored tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 stimulates cutaneous wound healing. *Wound Repair and Regeneration* 22(1). 70–76 (2014)
- 32 Lucas, B. K., Giere, L. M., DeMarco, R. A., Shen, A., Chisholm, V., Crowley, C. W.: High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector. *Nucleic acids research* 24(9). 1774–1779 (1996)
- 33 Cukierman, E., Bassi, D. E.: The mesenchymal tumor microenvironment: a drug-resistant niche. *Cell adhesion & migration* 6(3). 285–296 (2012)
- 34 Zahreddine, H., Borden, K. L.B.: Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers in Pharmacology* 4(28). (2013)
- 35 Roninson, I. B.: Tumor Cell Senescence in Cancer Treatment. *Cancer Research* 63(11). 2705–2715 (2003)
- 36 Shain, K. H., Dalton, W. S.: Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR. *Molecular cancer therapeutics* 1(1). 69–78 (2001)
- 37 Catlett-Falcone, R., Landowski, T. H., Oshiro, M. M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernández-Luna, J. L., Nuñez, G., Dalton, W. S., Jove, R.: Constitutive Activation of Stat3 Signaling Confers Resistance to Apoptosis in Human U266 Myeloma Cells. *Immunity* 10(1). 105–115 (1999)
- 38 Aoudjit, F., Vuori, K.: Integrin signaling in cancer cell survival and chemoresistance. *Chemotherapy research and practice* 2012(Article ID 283181). 16 pages (2012)
- 39 Gottesman, M. M.: Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual review of medicine* 53(6). 615–627 (2002)
- 40 Liffers, S.-T., Tilkorn, D. J., Stricker, I., Junge, C., Al-Benna, S., Vogt, M., Verdoodt, B., Steinau, H.-U., Tannapfel, A., Tischoff, I., Mirmohammadsadegh, A.: Salinomycin increases chemosensitivity to the effects of doxorubicin in soft tissue sarcomas. *BMC cancer* 13(1). 490 (2013)
- 41 Chlebowski, R. T.: Adriamycin (doxorubicin) cardiotoxicity: a review. *The Western journal of medicine* 131(5). 364–368 (1979)
- 42 Said, G., Guilbert, M., Morjani, H., Garnotel, R., Jeannesson, P., El Btaouri, H.: Extracellular matrix proteins modulate antimigratory and apoptotic effects of Doxorubicin. *Chemotherapy research and practice* 2012(Article ID 268681). 10 pages (2012)
- 43 Gudkov, A. V., Zelnick, C. R., Kazarov, A. R., Thimmapaya, R., Suttle, D. P., Beck, W. T., Roninson, I. B.: Isolation of genetic suppressor elements, inducing resistance to topoisomerase II-interactive cytotoxic drugs, from human topoisomerase II cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(8). 3231–3235 (1993)
- 44 Victor V. Leveonson, Davidovich, I. A., Roninson, I. B.: Pleiotropic Resistance to DNA-interactive Drugs Is Associated with Increased Expression of Genes Involved in DNA Replication, Repair, and Stress Response. *Cancer Research* 60(18). 5027–5030 (2000)

- 45 Davidovich, I. A., Levenson, A. S., Levenson, C. V. V.: Overexpression of DcR1 and survivin in genetically modified cells with pleiotropic drug resistance. *Cancer letters* 211(2). 189–197 (2004)
- 46 Notohamiprodjo, S., Djafarzadeh, R., Rieth, N., Hofstetter, M., Jaeckel, C., Nelson, P. J.: Cell surface engineering of renal cell carcinoma with glycosylphosphatidylinositol-anchored TIMP-1 blocks TGF- β 1 activation and reduces regulatory ID gene expression. *Biological chemistry* 393(12). 1463–1470 (2012)
- 47 Djafarzadeh, R., Notohamiprodjo, S., Rieth, N., Hofstetter, M., Noessner, E., Nelson, P. J.: Treatment of dermal fibroblasts with GPI-anchored human TIMP-1 protein moderates processes linked to scar formation. *The Journal of investigative dermatology* 133(3). 803–811 (2013)
- 48 Raggi, M. C., Djafarzadeh, R., Muenchmeier, N., Hofstetter, M., Jahn, B., Rieth, N., Nelson, P. J.: Peritumoral administration of GPI-anchored TIMP-1 inhibits colon carcinoma growth in Rag-2 gamma chain-deficient mice. *Biological chemistry* 390(9). 893–897 (2009)
- 49 Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R., Folkman, J.: Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *The New England journal of medicine* 324(1). 1–8 (1991)
- 50 Tuominen, V. J., Ruotoistenmaki, S., Viitanen, A., Jumppanen, M., Isola, J.: ImmunoRatio. *Breast Cancer Research* 12(4). R56 (2010)
- 51 Isola, J., Tuominen, V. J.: ImmunoRatio 2010. <http://153.1.200.58:8080/immunoratio/>. Stand: 15.04.2016
- 52 Quail, D. F., Joyce, J. A.: Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine* 19(11). 1423–1437 (2013)
- 53 Yang, H. K., Jeong, K. C., Kim, Y. K., Jung, S. T.: Role of Matrix Metalloproteinase (MMP) 2 and MMP-9 in Soft Tissue Sarcoma. *Clinics in Orthopedic Surgery* 6(4). 443–454 (2014)
- 54 Benassi, M. S., Gamberi, G., Magagnoli, G., Molendini, L., Ragazzini, P., Merli, M., Chiesa, F., Balladelli, A., Manfrini, M., Bertoni, F., Mercuri, M., Picci, P.: Metalloproteinase expression and prognosis in soft tissue sarcomas. *Annals of Oncology* 12(1). 75–80 (2001)
- 55 Bahia, H., Ashman, J. N., Cawkwell, L., Lind, M., Monson, JR, Drew, P. J., Greenman, J.: Karyotypic variation between independently cultured strains of the cell line MCF-7 identified by multicolour fluorescence in situ hybridization. *International journal of oncology* 20(3). 489–494 (2002)
- 56 Osborne, C. K., Hobbs, K., Trent, J. M.: Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast cancer research and treatment* 9(2). 111–121 (1987)
- 57 Baldassarre, G., Belletti, B., Nicoloso, M. S., Schiappacassi, M., Vecchione, A., Spessotto, P., Morrione, A., Canzonieri, V., Colombatti, A.: p27Kip1-stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion. *Cancer cell* 7(1). 51–63 (2005)
- 58 Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., Andrian, U. H. von, Deryugina, E. I., Strongin, A. Y., Bröcker, E.-B., Friedl, P.: Compensation mechanism in tumor cell migration. *The Journal of Cell Biology* 160(2). 267–277 (2003)

- 59 HORINO, K.: Tumor cell invasion of model 3-dimensional matrices. *The FASEB Journal* 15(6). 932–939 (2001)
- 60 Friedl, P., Wolf, K.: Tumour-cell invasion and migration. *Nature Reviews Cancer* 3(5). 362–374 (2003)
- 61 Paňková, K., Rösel, D., Novotný, M., Brábek, J.: The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67(1). 63–71 (2010)
- 62 Ridley, A. J.: Cell Migration. *Science* 302(5651). 1704–1709 (2003)
- 63 Machesky, L. M.: Lamellipodia and filopodia in metastasis and invasion. *FEBS letters* 582(14). 2102–2111 (2008)
- 64 Lambrechts, A., van Troys, M., Ampe, C.: The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36(10). 1890–1909 (2004)
- 65 Rieth, N.: Modulation des proteolytischen Mikromilieus von Tumoren mittels GPI-verankerter TIMP-1-Varianten: von Breitspektrum zum spezifischen Proteaseinhibitor. (unv. Diss.). Ludwig-Maximilians-Universität München. 1–143 (2011)
- 66 Fourre, N., Millerot-Serrurot, E., Garnotel, R., Zahm, J.-M., Bonnet, N., Millot, J.-M., Jeannesson, P.: Extracellular matrix proteins protect human HT1080 cells against the antimigratory effect of doxorubicin. *Cancer science* 99(8). 1699–1705 (2008)
- 67 Park, H. J., Chung, H. J., Min, H. Y., Park, E. J., Hong, J. Y., Kim, W. B., Kim, S. H., Lee, S. K.: Inhibitory effect of DA-125, a new anthracyclin analog antitumor agent, on the invasion of human fibrosarcoma cells by down-regulating the matrix metalloproteinases. *Biochemical pharmacology* 71(1-2). 21–31 (2005)
- 68 Dufour, A., Sampson, N. S., Zucker, S., Cao, J.: Role of the Hemopexin domain of Matrix Metalloproteinases in Cell Migration. *Journal of cellular physiology* 217(3). 643–651 (2008)
- 69 Couture, F., D'Anjou, F., Desjardins, R., Boudreau, F., Day, R.: Role of Proprotein Convertases in Prostate Cancer Progression. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 14(11). 1032–1042 (2012)
- 70 Wang, D., Berglund, A., Kenchappa, R. S., Forsyth, P. A., Mulé, J. J., Etame, A. B.: BIRC3 is a novel driver of therapeutic resistance in Glioblastoma. *Scientific Reports* 6(article number 21710). (2016)
- 71 Miller, B. E., Miller, F. R., Heppner, G. H.: Interactions between Tumor Subpopulations Affecting Their Sensitivity to the Antineoplastic Agents Cyclophosphamide and Methotrexate. *Cancer Research* 41(11 Part 1). 4378–4381 (1981)
- 72 Dipersio, L. P.: Regional growth differences of human tumour xenografts in nude mice. *Laboratory animals* 15(2). 179–180 (1981)
- 73 Rasheed, S., Nelson-Rees, W. A., Toth, E. M., Arnstein, P., Gardner, M. B.: Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* 33(4). 1027–1033 (1974)
- 74 Fodstad, Ø.: Representativity of Xenografts for Clinical Cancer. Tumor and Host Characteristics as Variables of Tumor Take Rate. In: Winograd, B.; Peckham, M.; Pinedo, H.

- M. (eds.). *Human Tumour Xenografts in Anticancer Drug Development*. pp. 15-21. Springer. Berlin Heidelberg 1988
- 75 Rygaard, J.: *Animal Models in Cancer Research*. In: Hau, Jann; van Hoosier, G. L. (eds.). *Animal science*. pp. 199-208. CRC Press. Boca Raton, Fla. 2003
- 76 Tacar, O., Sriamornsak, P., Dass, C. R.: Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 65(2). 157–170 (2013)
- 77 Yifu Sun, Peng Xia, Haipeng Zhang, Biao Liu, Ying Shi: P53 is required for Doxorubicin-induced apoptosis via the TGF-beta signaling pathway in osteosarcoma-derived cells. *American journal of cancer research* 6(1). 114–125 (2016)
- 78 Bandyopadhyay, A., Wang, L., Agyin, J., Tang, Y., Lin, S., Yeh, I.-T., De, K., Sun, L.-Z., Anderson, K.: Doxorubicin in Combination with a Small TGFβ Inhibitor. *PloS one* 5(4). e10365 (2010)
- 79 Dunkern, T. R., Wedemeyer, I., Baumgärtner, M., Fritz, G., Kaina, B.: Resistance of p53 knockout cells to doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling. *DNA repair* 2(1). 49–60 (2003)
- 80 Taubert, H.: *Onkogene und Tumorsuppressorgene*. In: Rath, F. W.; Schönfelder, M. (eds.). *Weichteilsarkome des Erwachsenen: Standards, Molekularbiologie, Perspektiven*. pp. 71-92. Karger. 2002
- 81 Garibaldi, F., Falcone, E., Trisciuglio, D., Colombo, T., Lisek, K., Walerych, D., Sal, G. D., Paci, P., Bossi, G., Piaggio, G., Gurtner, A.: Mutant p53 inhibits miRNA biogenesis by interfering with the microprocessor complex. *Oncogene*(2016)
- 82 Tsang, W.-p., Ho, F. Y. F., Fung, K.-p., Kong, S.-k., Kwok, T.-t.: p53-R175H mutant gains new function in regulation of doxorubicin-induced apoptosis. *International Journal of Cancer* 114(3). 331–336 (2005)
- 83 Bednarski, B. K., Baldwin, A. S., Kim, H. J., Blagosklonny, M. V.: Addressing Reported Pro-Apoptotic Functions of NF-κB. *PloS one* 4(9). e6992 (2009)
- 84 Valkov, A., Sorbye, S. W., Kilvaer, T. K., Donnem, T., Smeland, E., Bremnes, R. M., Busund, L.-T., Najbauer, J.: The Prognostic Impact of TGF-β1, Fascin, NF-κB and PKC-ζ Expression in Soft Tissue Sarcomas. *PloS one* 6(3). e17507 (2011)
- 85 Lin, K.-T., Wang, Y.-W., Chen, C.-T., Ho, C.-M., Su, W.-H., Jou, Y.-S.: HDAC inhibitors augmented cell migration and metastasis through induction of PKCs leading to identification of low toxicity modalities for combination cancer therapy. *Clinical Cancer Research* 18(17). 4691–4701 (2012)
- 86 Hoos, A., Lewis, J. J., Brennan, M. F.: *Weichgewebssarkome--prognostische Faktoren und multimodale Therapie*. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 71(7). 787–794 (2000)

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1: Schematischer Aufbau der Tumormikroumgebung	4
Abb. 2: Cell surface engineering	6
Abb. 3: Durchführung der s.c. Tumorzellinjektion	23
Abb. 4: Gruppendesign des neoadjuvanten Therapiemodells	24
Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.....	25
Abb. 6: Injektionsschema	25
Abb. 7: Einteilung in die Behandlungsgruppen	27
Abb. 8: Versuchsdesign	27
Abb. 9: Proliferationsassay zur IC50-Wertbestimmung für Doxorubicin.....	33
Abb. 10: Proliferationsassay zur IC50-Wertbestimmung des TIMP-1-GPI Fusionsproteins ..	33
Abb. 11: Vergleichende Darstellung der zytotoxischen Wirkung verschiedener Behandlungsgruppen	35
Abb. 12: Klonogenitätsassay	36
Abb. 13: Mikroskopische Auswertung des Scratch Assays.....	38
Abb. 14: Graphische Darstellung der Zellmigration	39
Abb. 15: Körpergewichtsverlauf tumortragender Nacktmäuse	41
Abb. 16: Vergleichende Darstellung des mittleren Tumordurchmessers unterschiedlich behandelter Balb/c Nacktmäuse ab Therapiebeginn (Tag 29)	43
Abb. 17: Vergleich der am Tag 51 resezierten Tumore	44
Abb. 18: Vergleichende Darstellung der immunhistologisch gefärbten Schnitte	46
Abb. 19: Körpergewichtsverlauf.....	47
Abb. 20: Verlauf des Tumordurchmessers	49
Abb. 21: Vergleich der Rezidiv-Volumina und -gewichte zu Versuchsende	49

Tabellen

Tabelle 1: Geräte	11
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	11
Tabelle 3: Chemikalienm Reagenzien	12
Tabelle 4: Primäre Antikörper.....	12
Tabelle 5: Sekundäre Antikörper	13
Tabelle 6: Medien, Zusätze, Sonstiges.....	13
Tabelle 7: Zelllinie	14
Tabelle 8: Software	15
Tabelle 9: Versuchstiere	15
Tabelle 10: Verwendetes OP-Instrumentarium.....	16
Tabelle 11: Zytotoxizitätsbestimmung der Einzelsubstanzen TIMP-1-GPI, bzw. Doxorubicin	19
Tabelle 12: Zytotoxizitätsbestimmung der Kombinationstherapie aus TIMP-1-GPI und Doxorubicin	20
Tabelle 13: Übersicht über den Behandlungsplan in vivo	26
Tabelle 14: Vergleich des mittleren Tumordurchmessers vor Beginn der Therapie und zu Versuchsende	43

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank an nachstehende Personen richten, die mich bei der Erarbeitung der Dissertation auf unterschiedliche Art und Weise unterstützt und einen entscheidenden Anteil am Gelingen der vorliegenden Arbeit haben.

Mein Dank gilt zunächst meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Christiane Bruns, die mir die Möglichkeit zur Anfertigung der Dissertation eröffnete, mich während dieser Zeit fachlich betreute und die Arbeit durch ihre wertvollen Denkanstöße und Ideengebungen vorantrieb. Die Förderung selbstständigen Arbeitens und das Ermöglichen diverser Kongressteilnahmen, erlaubten mir, einen umfangreichen Einblick in die wissenschaftliche Forschung zu gewinnen, wofür ich sehr dankbar bin.

In besonderer Weise möchte ich meiner Betreuerin Berry danken, die mir von Anfang an mit Rat und Tat zur Seite stand und mich mit Geduld und bemerkenswertem Engagement bei der Erarbeitung der Doktorarbeit begleitet hat. Ihre immerwährende Unterstützung in den verschiedenen Phasen des Dissertationsprozesses, verdient meine besondere Wertschätzung. Dass neben dem fachlichen auch ein Austausch auf freundschaftlicher Ebene möglich war, erfreut mich ganz besonders.

Ebenfalls bedanken möchte ich bei Herrn Prof. Peter J. Nelson für die freundliche Zusammenarbeit, das Bereitstellen von Forschungsmaterialien, die konstruktiven und ermutigenden Feedbacks sowie für seine mühevollen lektorischen Arbeit. Der Dank für die hilfsbereite Zusammenarbeit gilt darüber hinaus auch seinem Team.

Ferner danke ich dem gesamten Team der AG Bruns sowie Herrn Dr. Thomas Wartmann, Herrn Prof. Dr. Walter Halangk, Herrn Prof. Dr. Thomas Kalinski und Herrn Dr. Andrej Udelnow für die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft.

Mein außerordentlicher Dank gilt darüber hinaus meinen Freunden und meiner Familie, die sich mitgefremt, mitgefiebert und mich durch Gebet und aufmunternde Worte in den verschiedenen Phasen der Dissertation stets unterstützt haben.

Schließlich möchte ich der tiefen Dankbarkeit, meinen lieben Eltern gegenüber, Ausdruck verleihen. Ihr immerzu offenes Ohr, ihre wertvollen Ratschläge, ihre Anteilnahme und vielfältige Unterstützung weiß ich sehr zu schätzen. Nicht zuletzt waren sie mir im Glauben und Vertrauen auf Gott stets ein Vorbild.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„In vitro und in vivo Untersuchungen zur Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus dem TIMP-1-GPI Fusionsprotein und Doxorubicin im HT1080-Fibrosarkom Modell“

in der Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie

mit Unterstützung durch Frau Prof. Christiane Bruns und Frau Dr. Yue Zhao

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Unterschrift

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Anlage

Publikationen

Daniela Augsburger, Peter J. Nelson, Thomas Kalinski, Andrej Udelnow, Thomas Knösel, Monika Hofstetter, JiWei Qin, Yan Wang, Arvid Sen Gupta, Susanne Bonifatius, Minglun Li, Christiane J. Bruns, Yue Zhao: Current diagnostics and treatment of fibrosarcoma – perspectives for future therapeutic targets and strategies

Jiwei Qin, Yue Zhao, Yan wang, Christopher Betzler, Felix C Popp, Arvid Sen Gupta, **Daniela Augsburg**er, Peter Camaj, Peter J Nelson, Christiane J Bruns: Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in gastrointestinal cancers – current evidence. *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy*. 41–47 (2016)

Abstracts

D. Augsburger, Y. Zhao, M. Hofstetter, J. Qin, A. Udelnow, Q. Bao, Y. Wang, A. Sen Gupta, S. Bonifatius, P.J. Nelson, C.J. Bruns. Therapeutic Effect of Recombinant TIMP-1-GPI with Doxorubicin in a HT1080-Based Human Fibrosarcoma Model-Both in Vitro and in Vivo Evidence. In: 134th Congress of the German Society of Surgery (DGCH). March 21-24, 2017, Munich, Germany: Abstracts. *Eur Surg Res*. 58(1). 24-25 (2017)

Vorträge

Evaluierung der ko-therapeutischen Wirkung von rekombinantem TIMP-1-GPI mit Doxorubicin im in-vitro und in-vivo Modell von HT1080-Tumorzellen des humanen Fibrosarkoms. 134. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie. München (2017)

Posterpräsentationen

Evaluation of mono- and combined therapeutic effect of TIMP-1-GPI with doxorubicin in a HT1080-based human fibrosarcoma model. 32. Deutscher Krebskongress. Berlin (2016)

Evaluation of mono- and combined therapeutic effect of TIMP-1-GPI with doxorubicin in a HT1080-based human fibrosarcoma model. 20. Chirurgische Forschungstage. Universitätsklinikum Magdeburg (2016)