

**Universitätsmedizin  
Rostock**

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz

**Hemmung der Tumorangiogenese durch  
Cisplatin via Hochregulation des  
Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1**

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universität Rostock

**vorgelegt von**

Tilman Schmied, geb. am 30.09.1990 in Würzburg

aus Berlin

Rostock, 24.10.2020

[https://doi.org/10.18453/rosdok\\_id00003149](https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003149)

**Gutachter:** 1. Gutachter: Prof. Dr. Burkhard Hinz  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Junghanß  
Klinik für Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin  
Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. Walter Fiedler  
II. Medizinische Klinik und Poliklinik  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Datum der Einreichung: 24.10.2020

Datum der Verteidigung: 13.07.2021

Teile dieser Arbeit wurden publiziert unter dem Titel „The antiangiogenic action of cisplatin on endothelial cells is mediated through the release of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 from lung cancer cells“ in *Oncotarget*, 9(75), 34038-34055.



## Zusammenfassung

Zusätzlich zur Hemmung der Krebszellproliferation und des Tumorwachstums wurde gezeigt, dass Cisplatin in niedrigen Dosierungen die Tumorangiogenese hemmt. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht entschlüsselt. Die Experimente der vorliegenden Dissertation befassen sich daher mit der antiangiogenen Wirkung von Cisplatin durch eine potenzielle Kommunikation zwischen Tumor- und Endothelzellen. Zu diesem Zweck wurden humane umbilikale Venenendothelzellen (HUVEC) konditionierten Medien (KM) von Lungenkarzinomzellen (A549- und H358-Zellen) ausgesetzt und anschließend in Migrations- und Tubulogenese-Assays untersucht.

Konditionierte Medien von Lungenkarzinomzellen, die nichttoxischen Cisplatin-Konzentrationen ausgesetzt waren, führten zu einer Inhibition der Migration und Tubulogenese von HUVECs im Vergleich zu Vehikel-behandelten Zellen. Die Viabilität von HUVECs blieb unter diesen Bedingungen praktisch unverändert. Durch den Gen-Knockdown des tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) mittels Transfektionen von siRNA (small-interfering-RNA) konnte nachgewiesen werden, dass die Cisplatin-induzierte Expression dieses Faktors in A549- und H358-Zellen kausal mit der beobachteten Inhibition der Migration und Tubulogenese von HUVECs zusammenhängt. Bei HUVECs, die Cisplatin direkt ausgesetzt waren, zeigte sich dagegen keine Inhibition der Migration sowie der Tubulogenese. Eine antiangiogene Wirkung auf HUVECs wurde ebenfalls nicht für konditionierte Medien beobachtet, welche von der Cisplatin-behandelten humanen Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B gewonnen wurden.

Zusammenfassend legen die vorliegenden Daten nahe, dass eine TIMP-1-Freisetzung aus Lungenkarzinomzellen durch Cisplatin eine zentrale Rolle in der Tumor-Endothelzell-Interaktion spielt und somit eine tumorzell-gebundene antiangiogene Wirkung auf Endothelzellen bewirkt.



**Meiner Familie, Freundin und Freunden**





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Theorie .....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Tumorerkrankungen .....</i>	<i>1</i>
1.1.1	Definition.....	1
1.1.2	Epidemiologie von Tumorerkrankungen .....	1
1.1.3	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (non small cell lung carcinoma, NSCLC) .....	3
1.1.4	Therapie .....	4
1.2	<i>Cisplatin (cis-Diammindichloridoplatin(II); cis-DDP) .....</i>	<i>6</i>
1.3	<i>Low-Dose Metronomic Chemotherapy (LDM-Chemotherapie).....</i>	<i>9</i>
1.4	<i>Angiogenese, Vaskulogenese und Tumorangiogenese.....</i>	<i>10</i>
1.4.1	Angiogenese und Vaskulogenese .....	10
1.4.2	Tumorangiogenese.....	12
1.5	<i>Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) .....</i>	<i>15</i>
1.5.1	MMPs und ihre Rolle in der Tumorprogression.....	15
1.5.2	Tissue inhibitor of matrixmetalloproteinasen-1 (TIMP-1) .....	15
1.6	<i>Zielsetzung dieser Arbeit .....</i>	<i>17</i>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1	<i>Material .....</i>	<i>18</i>
2.1.1	Zellkulturmedien .....	18
2.1.2	Zelllinien .....	18
2.1.3	Oligonukleotide .....	19
2.1.4	Antikörper .....	19
2.1.5	Chemikalien.....	19
2.1.6	Puffer und Lösungen .....	21
2.1.7	Geräte .....	22
2.1.8	Software .....	23
2.1.9	Verbrauchsmaterialien .....	23
2.2	<i>Zellbiologische Methoden .....</i>	<i>24</i>
2.2.1	Zellkultivierung.....	24
2.2.2	Stimulierung von Zellen.....	25
2.2.3	WST-1-Assay .....	26
2.2.4	Migrations-Assay mit konditionierten Medien (indirekte Stimulation) .....	27
2.2.5	Migrations-Assay mit unkonditionierten Medien (direkte Stimulation) .....	29
2.2.6	Viabilitäts-Assay mit konditionierten Medien (indirekte Stimulation).....	29
2.2.7	Viabilitäts-Assay mit unkonditionierten Medien (direkte Stimulation) .....	30
2.2.8	Transfektion mit siRNA.....	31
2.2.9	Tube-Formation-Assay .....	32
2.2.10	Auswertung und Statistik.....	33
2.3	<i>Proteinbiochemische Methoden.....</i>	<i>34</i>
2.3.1	Gewinnung der Überstände und Lysate .....	34
2.3.2	Bestimmung des Proteingehaltes .....	34

2.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	35
2.3.4	Western Blot .....	36
2.3.5	Immundetektion und Chemilumineszenz-Analyse .....	36
2.3.6	Konservierung von Membranen .....	38
2.3.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
3.1	<i>Einfluss von Cisplatin auf die Viabilität von Lungenkarzinomzellen und Nicht-Tumor-Epithelzellen.....</i>	<i>39</i>
3.2	<i>Einfluss von Cisplatin auf Migration, Viabilität und Tubulogenese von HUVECs.....</i>	<i>41</i>
3.3	<i>Einfluss von konditionierten Medien von Cisplatin-behandelten Lungenkarzinomzellen auf Migration, Viabilität und Tubulogenese von HUVECs .....</i>	<i>42</i>
3.4	<i>Konzentrationsabhängiger Effekt von Cisplatin auf die TIMP-1-Expression von A549- und H358-Zellen.....</i>	<i>45</i>
3.5	<i>Einfluss von konditionierten Medien von Cisplatin-behandelten Lungenkarzinomzellen auf die Migration, Viabilität und die Tubulogenese von HUVECs in Gegenwart und Abwesenheit von TIMP-1-siRNA.....</i>	<i>47</i>
3.6	<i>Einfluss von konditionierten Medien von Cisplatin-behandelten bronchialen Epithelzellen BEAS-2B auf Migration, Tubulogenese und Viabilität von HUVECs .....</i>	<i>49</i>
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>Fazit .....</b>	<b>57</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>58</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>68</b>
	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>70</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>74</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>76</b>
	<b>Curriculum vitae.....</b>	<b>78</b>
	<b>Thesen .....</b>	<b>80</b>

# 1 Theorie

## 1.1 Tumorerkrankungen

### 1.1.1 Definition

Wenn sich körpereigene Zellen unkontrolliert teilen und ausbreiten, spricht man von einem Tumor (lateinisch für Geschwulst). Ein Synonym aus dem Griechischen ist die Neoplasie. Weiterhin kann man Tumore in gutartige (benigne) und bösartige (maligne) Formen einteilen. Für die Einteilung ist dabei wichtig, ob der Tumor Gewebegrenzen überschreitet, und somit umliegendes Gewebe zerstört und ob es zu einer Metastasen-Bildung kommt, d.h. Bildung von Tochtergeschwülsten durch Verschleppung von Tumorzellen über die Blut- oder Lymphbahn. Wenn ein Tumor gewebeübergreifend wächst oder Metastasen bildet, wird er dementsprechend als maligner Tumor bezeichnet. Maligne Tumore werden zusätzlich nach deren Ursprungsgewebe unterteilt (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2018, 1. Oktober):

**Karzinome** entwickeln sich aus Gewebe, welches innere und äußere Oberflächen bedeckt, d.h. alle Schleimhäute im Körper oder die den Menschen bedeckende Haut. Beispiele sind das Bronchialkarzinom oder das Mammakarzinom.

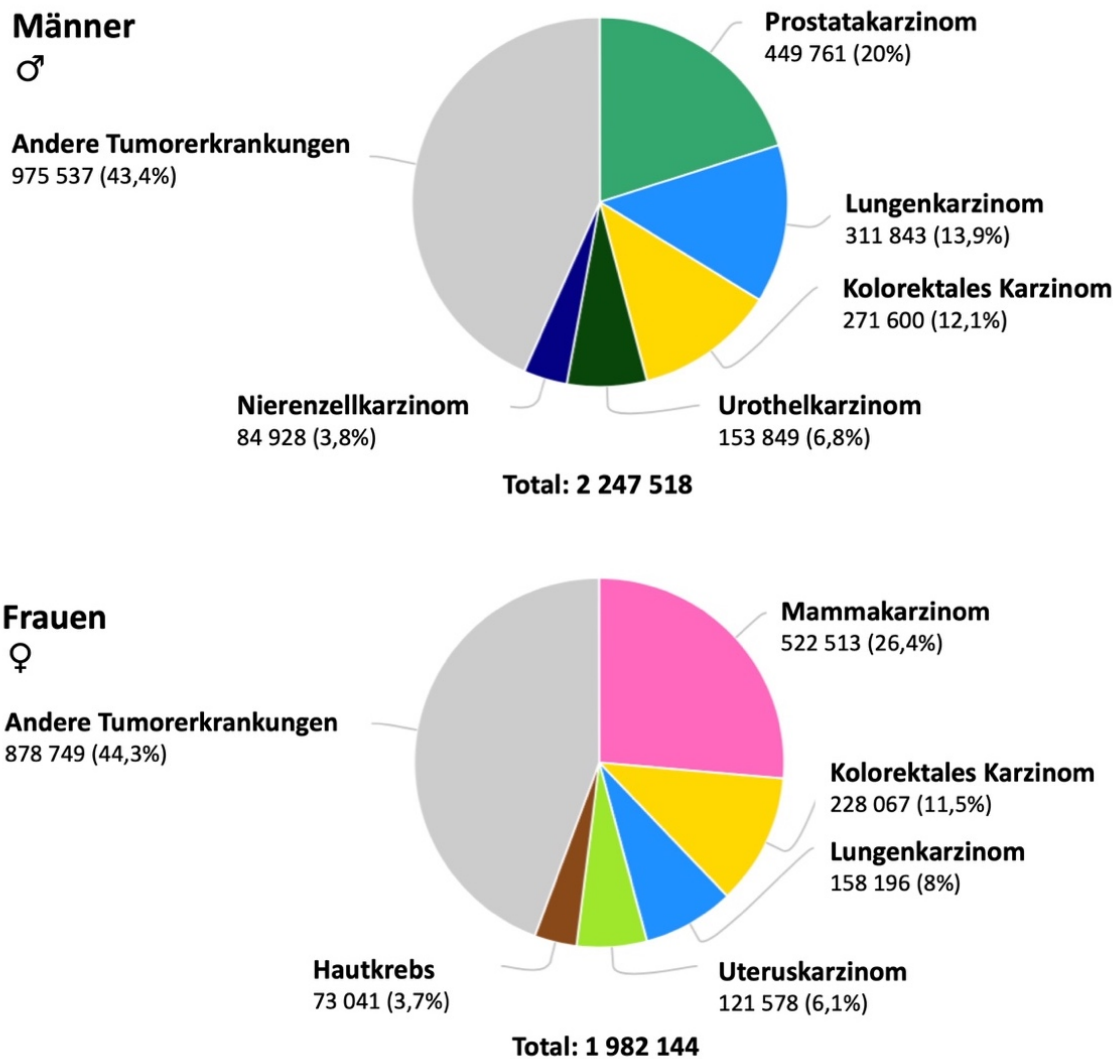
**Sarkome** entstehen aus Binde- und Stützgewebe, d.h. Fettgewebe, Muskelgewebe, Sehnen oder Knochen. Ein Beispiel ist das Osteosarkom, ein bösartiger Knochentumor.

**Blastome** werden Tumore genannt, die bereits während der Entwicklung von Gewebe oder Organen entstehen und sind deshalb vor allem eine Krebsform des Kindesalters.

### 1.1.2 Epidemiologie von Tumorerkrankungen

Nach der weltweiten Krebsstatistik *Globocan 2018*, veröffentlicht von der *International Agency for Research on Cancer (IARC)* – einer Einrichtung der Weltgesundheitsorganisation – soll die Anzahl der neu aufgetretenen Krebsdiagnosen im Jahr 2018 weltweit auf ca. 18 Millionen angestiegen sein, 9,6 Millionen Menschen sollen an ihrer Krebserkrankung verstorben sein (Bray et al., 2018). Im Vergleich zu einer weltweiten Krebsstatistik für das Jahr 2012 von Torre et al. (2015) ist die Zahl der neu aufgetretenen Krebserkrankungen um 4 Millionen und die Zahl der Krebstodesfälle um 1,4 Millionen angestiegen. Zudem soll weltweit jede sechste Frau und jeder fünfte Mann Zeit ihres Lebens eine Krebsdiagnose erhalten. Die meisten Krebstodesfälle werden verursacht durch Lungen-, Darm-, Magen-, Leber- und

Brustkrebs (Bray et al., 2018). Gründe für den Anstieg der Krebsdiagnosen sind verbesserte Diagnosemöglichkeiten, ein stetiges Bevölkerungswachstum und die steigende menschliche Lebenserwartung. Die häufigsten Krebsdiagnosen bei Männern und Frauen in Europa im Jahr 2018 sind:



**Abb. 1. Häufigkeiten der Krebsdiagnosen für Männer und Frauen in Europa im Jahr 2018.**  
(modifiziert nach International Agency for Research on Cancer, 2018, 12. September).

Zudem zeigt der Statistikreport der **IARC** auf, dass in Europa 23,4% der weltweiten Krebsdiagnosen gestellt werden obwohl in Europa nur 9% der Weltbevölkerung lebt. Diese Diskrepanz kann zum einen daran liegen, dass Menschen in Europa einen besseren Zugang zu medizinischer Versorgung haben, zum anderen daran, dass in reicheren Ländern

Risikofaktoren, wie Tabakkonsum oder Adipositas, häufiger sind (Theurich et al., 2015). Das Deutsche Krebsforschungszentrum (**DKFZ**) gibt in einer Pressemitteilung aus dem Jahr 2018 diesbezüglich an, dass in Deutschland 37% der Krebsfälle durch vermeidbare Risikofaktoren verursacht werden (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2018, 3. September).

### 1.1.3 Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (non small cell lung carcinoma, NSCLC)

Für den Großteil der Experimente der vorliegenden Arbeit wurden Tumorzellen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) verwendet, welches rund 75-85% der Lungenkarzinomfälle ausmacht (Herbst et al., 2008). Das kleinzellige Lungenkarzinom ist seltener, hat jedoch aufgrund seines rasanten Wachstums (Tumorverdopplungszeit von 10-50 Tagen) die schlechteste Prognose. Da Symptome des Lungenkarzinoms, wie chronischer Husten, häufige Erkältungskrankheiten oder Bluthusten, meistens erst im späten Stadium auftreten, sind ca. 65% der Lungenkarzinomfälle zum Diagnosezeitpunkt inoperabel. Die mittlere 5-Jahres-Überlebensrate liegt deshalb nur bei 10-20%. Das NSCLC wird weiter unterteilt in:

1. Plattenepithelkarzinom (30-40%)
2. Adenokarzinom (25-30%)
3. großzelliges Karzinom (<10%)

Die Ätiologie des Lungenkarzinomes ist vielfältig. Hervorzuheben ist allerdings der Konsum von Tabakwaren. Dieser erhöht die Wahrscheinlichkeit, an Lungenkrebs zu erkranken deutlich. Laut Simonato et al. (2001) können rund 85% der Lungenkarzinomtodesfälle in der Europäischen Union auf das Rauchen von Tabakwaren zurückgeführt werden. Das Nicht-Rauchen stellt somit die wichtigste Maßnahme in der Prävention von Lungenkrebs dar (Zappa & Mousa, 2016). Weitere exogene Risikofaktoren sind berufliche Karzinogene, wie z.B. Arsen oder Uran, sowie umweltbedingte Faktoren, wie z.B. Passivrauchen, Asbest, Feinstaubbelastung, Industrie- und Verkehrsgase (Hammerschmidt & Wirtz, 2009). Endogene Risikofaktoren stellen genetische Dispositionen, wie z.B. die EGFR-Mutation bei Adenokarzinomen der Lunge (Herbst et al., 2008) oder chronisch entzündliche Prozesse, wie z.B. bei Tuberkulose (Campbell & Hughes, 1960), dar.

#### 1.1.4 Therapie

Die Therapie von Tumorerkrankungen ist vielfältig und komplex und hat in den letzten Jahren enorme Fortschritte gemacht. Vor allem der Begriff „personalisierte Krebsmedizin“ steht als Synonym für moderne Tumormedizin (Deutsche Krebsgesellschaft, 2014, 10. September). Bei der gezielten Krebstherapie (engl. *targeted therapies*) werden zielgerichtete Substanzen, wobei bei jedem Patienten die Zielstrukturen individuell diagnostiziert werden, verwendet. Sie zielen darauf ab, in molekulare Signalwege oder das Immunsystem einzugreifen. Dieser Therapieansatz wurde durch ein besseres Verständnis der Pathologie von malignen Tumoren möglich (Gutzmer & Strumberg, 2013). Im Grundsatz baut die Therapie von Tumorerkrankungen auf drei zentralen Säulen auf:

1. operative Therapie
2. Strahlentherapie (Radiotherapie)
3. medikamentöse Therapie (Chemotherapie)

Die **operative Therapie** stellt bei Krebserkrankungen wie Brust- oder Hautkrebs oft die primäre Therapiemöglichkeit dar. Die Chancen auf eine Heilung stehen dabei gut, wenn die Diagnose in einem frühen Stadium gestellt wird und der Tumor vollständig entfernt werden kann. In der Onkologie versteht man dabei unter Heilung, wenn in den ersten 5 Jahren nach einer Behandlung kein Rückfall (Rezidiv) auftritt (Siewert & Fink, 2006). Die operative Entfernung des Tumors oder eine Probenentnahme (Biopsie) dient dabei auch zur Risikoeinschätzung für ein Rezidiv der Krebserkrankung. Durch mikroskopische Untersuchungen des Tumorgewebes und angrenzender Lymphknoten sowie die Suche nach Metastasen kann der Differenzierungsgrad des Gewebes (Grading) festgestellt werden und eine Einteilung im TNM-System (Staging) stattfinden. Der Differenzierungsgrad wird dabei nach der *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC)-Stadieneinteilung vorgenommen (G1 gut differenziert bis G4 undifferenziert). Die TNM-Klassifikation dient der Einteilung in Schweregrade und gibt Aufschluss über die Tumorgröße und Infiltrationstiefe (**T**), den Befall der Lymphknoten (**N** für Nodus lymphaticus) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (**M**). Für die Prognose der Krebserkrankung eines Patienten sind der Differenzierungsgrad und die Ausbreitung eines Tumors entscheidend, sowie für den behandelnden Arzt eine wichtige Entscheidungshilfe bezüglich der bestmöglichen Therapie. In manchen Fällen ist es notwendig, die Tumorgröße durch Bestrahlung oder mit einer Chemotherapie zu verkleinern, das heißt eine *neoadjuvante* Therapie durchzuführen. Eine *adjuvante* Therapie dagegen bezeichnet ein

Therapieregime, das z.B. nach unvollständiger Tumorentfernung zum Einsatz kommt und darauf abzielt, restliches Tumorgewebe durch Bestrahlung oder Chemotherapie zu eliminieren. Bei der operativen Behandlung von Krebspatienten gilt, dass invasive Eingriffe so umfangreich wie nötig und so schonend wie möglich durchgeführt werden sollen (Krebsgesellschaft Nordrhein-Westfalen e.V., 2014).

Die **Strahlentherapie** (Radiotherapie) ist eine Methode, um in einem lokal abgegrenzten Bereich (Bestrahlungsfeld) Tumorgewebe zu zerstören, indem das Erbgut der Tumorzellen zerstört und teilungsunfähig gemacht wird (Bosset et al., 2006). Bei lokal begrenzten Krebsarten, wie Kehlkopfkrebs oder Prostatakrebs, kann eine alleinige Strahlentherapie zur Heilung führen. Außerdem kann die Strahlenbehandlung in Kombination mit einer Chemotherapie (Radiochemotherapie) angewandt werden. Zudem besteht die zusätzliche Möglichkeit einer *neoadjuvanten* oder *adjuvanten* Strahlentherapie. Auch im palliativen Kontext kann die Radiotherapie eingesetzt werden. Sie ist besonders effektiv, um Tumorschmerzen und Tumorschwellungen zu reduzieren. Der Knochenaufbau bei vorliegenden Knochenmetastasen kann ebenso verbessert werden (Molls, 2006).

Die **Chemotherapie** ist eine weitere zentrale Säule der Behandlung von Tumorerkrankungen. Die verwendeten Chemotherapeutika oder auch Zytostatika (griech. kytos = Zelle; statikos = zum Stehen bringend) greifen direkt in den Teilungszyklus der Krebszellen ein. Somit wirken Chemotherapeutika besonders gut bei sich sehr schnell teilenden Zellen, wie es bei den meisten Krebsarten der Fall ist (Pfreundschuh, 2006). Der Vorteil der Chemotherapie ist, dass sie systemisch wirkt und auch Tumorzellen erreicht, die trotz Radiotherapie oder chirurgischer Intervention zurückbleiben würden. Allerdings betrifft die zytostatische Wirkung auch gesunde Zellen (Harvey, 2017), vorrangig sind dies Zellen der Mucosa, der Haarwurzel, des Knochenmarks oder auch des Nervengewebes. So müssen Patienten, die sich einer Chemotherapie unterziehen, mit zum Teil schweren *unerwünschten Arzneimittelwirkungen* (UAW) rechnen. Diese sind erhöhte Blutungsneigung und Immunsuppression durch Zerstörung von Knochenmarksgewebe, Mucositis, Stomatitis, Diarrhö, Haarausfall und Hautveränderungen sowie Übelkeit und Erbrechen oder auch langwierige Beschwerden durch Polyneuropathien. Aufgrund der mitunter schweren unerwünschten Nebenwirkungen ist ein besonderes Ziel derzeitiger Untersuchungen hierzu, dass Chemotherapeutika ihre Wirkung zielgerichteter und selektiv am Tumorgewebe entfalten. Ein Beispiel dafür ist Nab-Paclitaxel (Abraxane®), dabei wird das Taxan Paclitaxel durch Albumin-Nanopartikel umschlossen (Rumpold & Winder, 2017). Ein weiterer

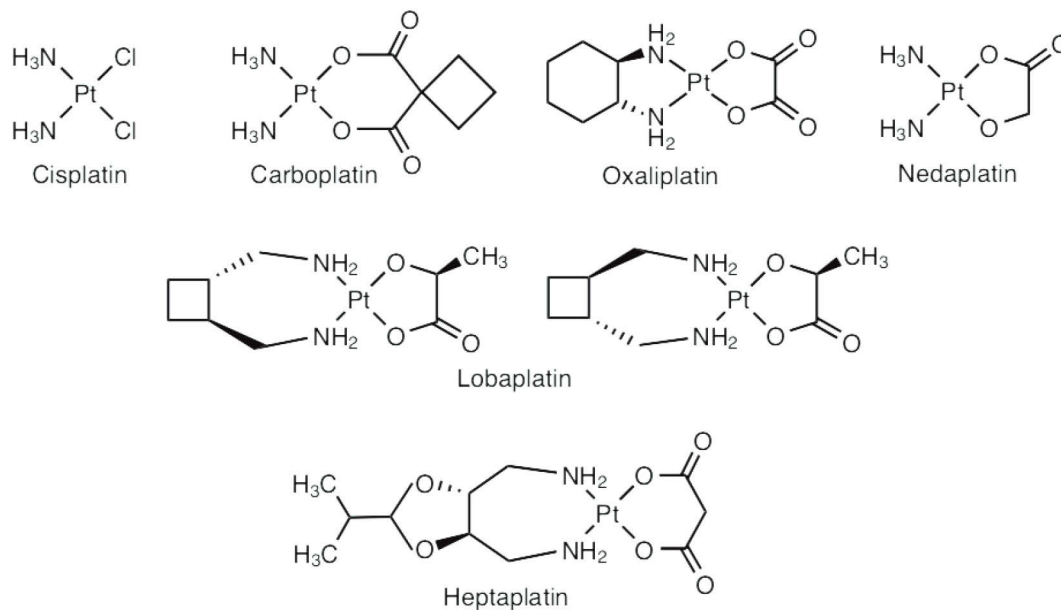
vielversprechender Ansatz, um schwere Nebenwirkungen zu reduzieren, ist die *Low-dose metronomic chemotherapy* (LDM-Chemotherapie). Dabei werden dem Patienten Chemotherapeutika in kürzeren und regelmäßigen Abständen sowie besser verträglichen Dosen verabreicht (Lien et al., 2013).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich die Krebsbehandlung in den letzten Jahrzehnten sehr schnell weiterentwickelt und verbessert hat, was sich im Anstieg der Überlebensraten nach Krebsdiagnose widerspiegelt (Allemani et al., 2018). Jedoch müssen Krebspatienten immer noch mit teils schweren Nebenwirkungen kämpfen, weshalb es notwendig ist, spezifischere Medikamente zu entwickeln. Zudem ist es sinnvoll Therapieoptimierungsstudien durchzuführen, wodurch effizientere Chemotherapeutika-Kombinationen ermittelt werden und Zytostatika-Resistenzen vermieden werden können. Außerdem sollten lange Zeit bewährte Therapieschemata auf ihre Wirksamkeit überprüft werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirksamkeit eines alternativen Therapieschemas, der bereits erwähnten LDM-Chemotherapie, untersucht. Hierbei wurde in einem In-vitro-Modell die Wirksamkeit eines alternativen Therapieschemas, der oben erwähnten LDM-Chemotherapie, untersucht. Entsprechend wurden in den Experimenten nichttoxische Konzentrationen von Cisplatin zur Behandlung von Lungenkarzinomzellen verwendet.

## 1.2 Cisplatin (cis-Diammindichloridoplatin(II); cis-DDP)

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden die verwendeten Zelllinien mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin behandelt. Cisplatin (cis-DDP) ist eine tumorhemmende Metallverbindung, welche seit den 1970er-Jahren bei vielen Krebsarten erfolgreich zum Einsatz kommt. Genauer gesagt, enthält heutzutage jedes zweite Therapieschema ein platinhaltiges Chemotherapeutikum. Anwendung findet Cisplatin bei Hoden-, Ovarial-, Bronchial-, Harnblasen- und Zervixkarzinomen sowie bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (Galanski & Keppler, 2006). Barnett Rosenberg hatte in den 1960er Jahren durch eine Reihe von Experimenten mit *Escherichia coli*-Bakterien die Hemmung der Zellteilung durch Cisplatin nachgewiesen (Rosenberg, 1978). Die erstmalige Synthese von Cisplatin fand allerdings schon in den 1840er Jahren statt und wurde von Michele Peyrone in den *Annalen der Chemie und Pharmazie* publiziert, allerdings ohne von der tumorhemmenden Wirkung Cisplatins zu wissen (Peyrone, 1844).

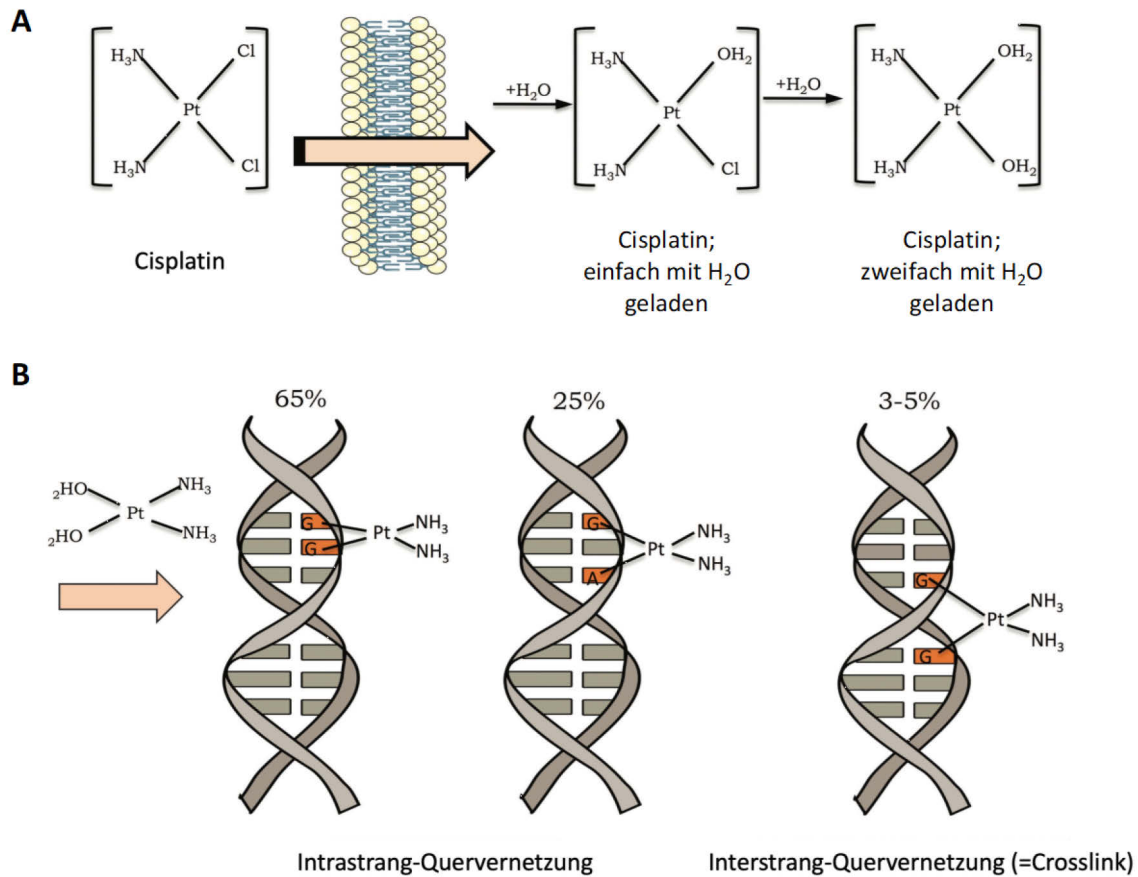




**Abb. 2. Zugelassene platinhaltige Chemotherapeutika.** Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin, Nedaplatin, Lobaplatin, Heptaplatin (modifiziert nach Galanski & Keppler, 2006).

Die hemmende Wirkung von Cisplatin auf die Zellteilung geschieht über die Querverknüpfung innerhalb eines DNA-Strangs (Intrastrang-Quervernetzung) oder zwischen benachbarten DNA-Strängen (Interstrang-Quervernetzung), das sogenannte „Cross-Linking“. Cisplatin reagiert dabei bevorzugt mit N-7 von Guanin oder Adenin. Die DNA ist nach diesem Vorgang funktionsunfähig und kann nicht mehr repliziert werden. Daraufhin wird die Apoptose der Zelle eingeleitet. Bestimmte Tumorzellen sind jedoch auch in der Lage Resistenzen gegenüber Cisplatin zu entwickeln, besonders oft geschieht das bei Hodenkrebs – etwa jeder fünfte Patient ist betroffen. Die Resistenz gegenüber Cisplatin wird durch eine spezielle DNA-Polymerase *Eta* vermittelt. Diese ist in der Lage, die verursachten Quervernetzungen in der DNA zu überlesen, so dass sich die Tumorzellen weiterhin teilen können (Alt et al., 2007). Aufgrund möglicher Resistenzbildungen und um die Wirksamkeit der Chemotherapie zu erhöhen, wird Cisplatin häufig in Kombination mit anderen Chemotherapeutika verabreicht. Gängige Kombinationen sind:

1. Cisplatin - Etoposid (*Topoisomerase II-Hemmer*)
2. Cisplatin - Vinorelbine (*Antitubulin, Spindelgift*)
3. Cisplatin - Gemcitabine (*Pyrimidinanaloga*)
4. Cisplatin - Docetaxel oder Paclitaxel (*Taxan, Spindelgift*)



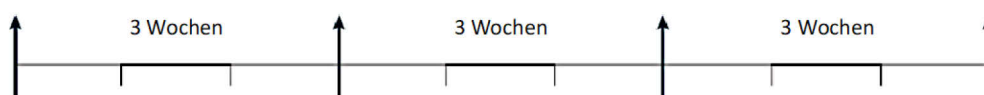
**Abb. 3. Schematische Darstellung der Aktivierung und Wirkung von Cisplatin.** A: Die Cisplatin-Aktivierung geschieht durch den Austausch eines oder beider Chlorid-Atome durch Wassermoleküle; B: Cisplatin geht kovalente Bindungen mit dem DNA-Strang ein, dabei sind die häufigsten die Intrastrang-Quervernetzungen und Interstrang-Quervernetzungen (=Crosslinks). Die Häufigkeiten der jeweiligen Typen werden in Prozent angegeben (modifiziert nach Rocha et al., 2018).

Da Cisplatin systemisch verabreicht wird und somit nicht nur im Tumorgewebe wirkt, können für den Krebspatienten während und nach erfolgter Chemotherapie einige unerwünschte Arzneimittelwirkungen auftreten. Es kann zu Nierenschäden (nephrotoxisch), Nervenschäden (neurotoxisch), Hörminderung (ototoxisch), Veränderungen des Blutbildes sowie zu starker Übelkeit und Erbrechen kommen. Vor allem die starke Übelkeit konnte durch die Einführung der 5HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten, wie z.B. Ondansetron in den 1990er Jahren, effektiv behandelt werden (Lindley & Blower, 2000).

### 1.3 Low-Dose Metronomic Chemotherapy (LDM-Chemotherapie)

In den letzten Jahren hat die LDM-Chemotherapie durch Therapieerfolge und neue vielversprechende Studienergebnisse an Attraktivität gewonnen. Dabei werden Patienten in kurzen und regelmäßigen Abständen mit nichttoxischen Konzentrationen eines Chemotherapeutikums behandelt. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen konnten so deutlich reduziert werden (Lien et al., 2013). Peroud et al. (2016) behandelten Patienten mit metastasiertem Brustkrebs mit Cyclophosphamid und Celecoxib in nichttoxischen Konzentrationen. Die Therapie zeigte sich wirksam, wenig toxisch und damit gut verträglich. Zusätzlich zeigte die Kombination antiangiogene Effekte. Außerdem fanden Berthold et al. (2017) heraus, dass die Behandlung von Hochrisiko-Neuroblastomen mit einer LDM-Chemotherapie gleich wirksam ist wie die mit einer dosisintensiven konventionellen Chemotherapie. Aufgrund der geringeren Toxizität der verabreichten Medikamente und der damit einhergehenden geringeren Anzahl an Nebenwirkungen, konnten die Patienten sogar ambulant behandelt werden. Die jahrelange Praxis seit Beginn der Tumorchemotherapie unterscheidet sich sehr zur LDM-Chemotherapie. Bei der dosisintensiven konventionellen Chemotherapie, wird einem Patienten in Einzelsitzungen jene Dosis des Chemotherapeutikums verabreicht, welche maximal toleriert werden kann und deshalb keine lebensbedrohlichen Folgen hat, die sogenannte *maximum tolerated dose* (MTD).

**A: MTD-Chemotherapie (alle 3 Wochen)**



**B: LDM-Chemotherapie (geringere Dosis; jede Woche)**



**C: LDM-Chemotherapie (geringere Dosis; jeden Tag)**



**Abb. 4. Unterschiedliche Therapieschemata der Chemotherapie.** A: MTD-Chemotherapie mit Sitzungen alle 3 Wochen, Verabreichung der maximal tolerierten Dosis; B und C sind Versionen der Low-dose metronomic chemotherapy, wöchentlich bis tägliche Sitzungen, niedrigere Dosis (modifiziert nach Kerbel & Kamen, 2004).

Zwischen den Sitzungen müssen Pausen zwischen zwei und drei Wochen eingehalten werden, um keine lebensbedrohliche Wirkstoffkumulation zu riskieren (Kerbel & Kamen, 2004). Die maximal tolerierte Dosis von Cisplatin beträgt  $100 \text{ mg/m}^2$ . Laut Himmelstein et al. (1981) ergibt sich bei einer MTD-Gabe von Cisplatin ein totaler Cisplatin-Plasmaspiegel von  $20,7 \text{ }\mu\text{M}$ , davon sind  $10,9 \text{ }\mu\text{M}$  ungebundenes Cisplatin.

Dagegen wurden in den In-vitro-Experimenten der vorliegenden Arbeit Cisplatin-Stoffmengenkonzentrationen verwendet, die sich deutlich unter denen nach MTD-Gabe von Cisplatin befinden ( $0,01 \text{ }\mu\text{M}$ ;  $0,1 \text{ }\mu\text{M}$ ;  $1 \text{ }\mu\text{M}$ ). Die Auswahl der Konzentrationen erfolgte nach vorheriger Toxizitätsanalyse an den verwendeten Tumorzelllinien, sowie nach Zusammenfassung bereits vorhandener Studienergebnisse zur Cisplatin-Toxizität *in vitro* von L'Azou et al. (2005). Zusätzlich zum geringeren Risikoprofil schreibt man der LDM-Chemotherapie eine antiangiogene Wirkung bezüglich der Tumorangiogenese zu (Pasquier et al., 2010). Die Wirkung von Cisplatin im LDM-Schema auf die Tumorangiogenese wurde bereits an mehreren Tumorzellarten untersucht und nachgewiesen: Leberkarzinom (Shen et al., 2010), Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses (Adhim et al., 2011), Urothelkarzinom (Jian et al., 2009) und Mammakarzinom (Munoz et al., 2005). Die Art und Weise wie es zur Inhibierung der Tumorangiogenese kommt, bleibt bisher unklar. Die zentrale Fragestellung der Experimente der vorliegenden Arbeit zielte somit auf den Mechanismus der antiangiogenen Wirkung nichttoxischer Konzentrationen Cisplatin.

## 1.4 Angiogenese, Vaskulogenese und Tumorangiogenese

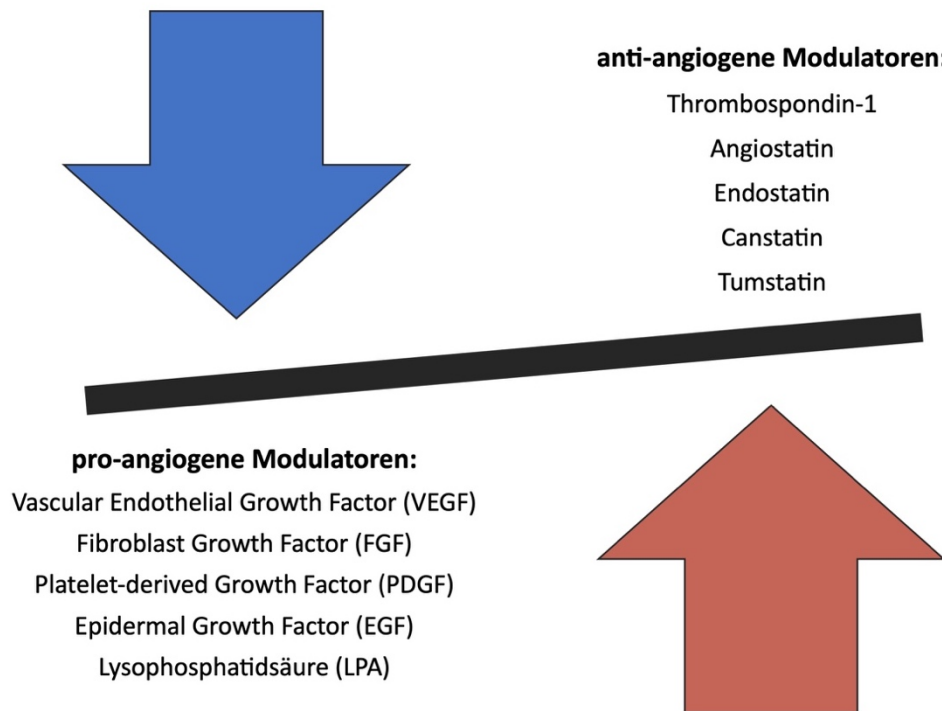
### 1.4.1 Angiogenese und Vaskulogenese

Jede Zelle eines Organismus benötigt eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie einen suffizienten Abtransport anfallender Stoffwechsel-Metabolite. Diese Grundvoraussetzung kann durch ein adäquates Gefäßsystem und einen geeigneten Transportträger, dem Blut, bewerkstelligt werden. Für die Entwicklung und Aufrechterhaltung dieses Gefäßsystems sind die Prozesse der Vaskulogenese und Angiogenese verantwortlich. Bei der **Vaskulogenese** (lateinisch: *vas* „Gefäß“ und altgriechisch: *génésis* „Entstehung“), die vor allem in der Embryonalentwicklung eines Organismus stattfindet, werden neue Blutgefäße aus endothelialen Vorläuferzellen des Knochenmarks (Angioblasten) gebildet und ein primitives Gefäßgeflecht entsteht (Risau, 1997). Unter **Angiogenese** (altgriechisch: *ángos* „Gefäß“ und *génésis* „Entstehung“) versteht man das Wachstum von Blutgefäßen aus bereits

vorgebildeten Blutgefäßen. Hierbei können zwei Arten der Angiogenese unterschieden werden. Die *sprossende* Angiogenese (*sprouting angiogenesis*) und die *nicht-sprossende* Angiogenese (*Intussusception* oder *splitting angiogenesis*). Die sprossende Angiogenese beginnt mit einem enzymatischen Abbau der kapillären Basalmembran. Anschließend proliferieren und migrieren Endothelzellen in den Extrazellularraum. Dort formen sich die Endothelzellen zu kleinen Röhren (*tube formation*) und bilden schließlich ein Gefäßlumen. Sauerstoffmangel (Hypoxie) kann in schlecht durchblutetem Gewebe ein auslösender Faktor sein. Dabei bilden Parenchymzellen unter hypoxischem Stress pro-angiogene Faktoren und scheiden diese aus. Ein Beispiel ist der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Adair & Montani, 2010). Die nicht-sprossende Angiogenese ist gekennzeichnet durch die Spaltung eines bereits bestehenden Gefäßes in Längsrichtung. Dabei bewegen sich die zwei gegenüberliegenden Gefäßwände aufeinander zu und verschmelzen. Somit entstehen zwei Lumina, welche durch eine mittige Spaltung in Längsrichtung voneinander getrennt werden. Vorhandene Endothelzellen müssen lediglich umorganisiert werden, deswegen ist die nicht-sprossende Angiogenese schnell und effizient (Adair & Montani, 2010).

Essenziell ist die Angiogenese für physiologische Prozesse, wie zum Beispiel für die Wundheilung oder den menstruellen Zyklus der Frau (Folkman & Shing, 1992). Aber auch bei Erkrankungen wie Retinopathien, vaskulärer Demenz, Durchblutungsstörungen, rheumatoide Arthritis, sowie Tumorerkrankungen spielt die Angiogenese eine erhebliche Rolle (Carmeliet, 2003; Carmeliet & Jain, 2000). Je nach Ursache gibt es unterschiedliche Behandlungsansätze: Einerseits Medikamente oder eine Gentherapie, die die Angiogenese anregen und somit hilfreich bei Durchblutungsstörungen sind (Marushima et al., 2019), andererseits antiangiogene Medikamente, welche wirksam gegen Tumorerkrankungen (Ferrara et al., 2003) oder Retinopathien (Fallah et al., 2019) sind.

Bereits im Jahr 1972 postulierte Dr. Judah Folkman, dass Neovaskularisierung in Tumoren durch einen humoralen Faktor den *tumor-angiogenesis-factor* (TAF) hervorgerufen wird. Heute ist durch das Wissen mehrerer Arbeiten zur Angiogenese klar, dass jener Prozess multifaktoriell ist und einem Wechselspiel zwischen proangiogenen und antiangiogenen Modulatoren gleicht (Bergers & Benjamin, 2003; Risau, 1997). Laut Stetler-Stevenson (1999) beeinflussen zudem auch Matrix-Metalloproteinasen die Angio- und Antiangiogenese (siehe Abschnitt 1.5).



**Abb. 5. Balance der Angiogenese.** Auswahl an pro- und antiangiogener Modulatoren (modifiziert nach Bergers & Benjamin, 2003).

#### 1.4.2 Tumorangiogenese

Der Begriff „Angiogenese“ wurde bereits im 18. Jahrhundert verwendet. Historischen Studien zufolge soll Dr. John Hunter, ein britischer Chirurg und Begründer der experimentellen wissenschaftlichen Chirurgie, als Erster in seinen Publikationen darauf aufmerksam gemacht haben (Folkman, 2008; Lenzi et al., 2016). Das Wachstum von Tumoren mit einer suffizienten Gefäßversorgung zu verknüpfen, gelang allerdings erst viel später Dr. Judah Folkman, dem „Vater der Angiogenese“ (Stephenson et al., 2013). In seinen Publikationen zur Angiogenese stellte er folgende Thesen auf:

Zum einen fand er heraus, dass für einen Tumor bereits ab einer Größe von 2-3 mm im Durchmesser ein Anschluss an das Gefäßsystem notwendig ist, um weiter zu wachsen. Das Gewebe von kleineren Tumoren ist dagegen auf die Diffusion von Energieträgern und Sauerstoff angewiesen. Ohne den Abtransport anfallender Stoffwechsel-Metaboliten und aufgrund eines Nährstoff- und Sauerstoffmangels entsteht so im Zentrum des neoplastischen Gewebes eine Nekrosezone (Folkman, 1972). Zum anderen vermutete er, dass in jedem Menschen, auch ohne diagnostizierte Krebserkrankung, sog. ruhende Tumore (*tumor dormancy*) existieren. Dabei kommt es zu einem Gleichgewicht von wachstumsfördernden

und apoptotischen Reizen, welches wiederum entscheidend durch pro- und antiangiogene Modulatoren beeinflusst wird. Eine Übersicht über pro- und antiangiogene Modulatoren ist in Abbildung 5 dargestellt. Seinen Verdacht konnte er mittels Autopsiestudien, die an Menschen ohne diagnostizierte Krebserkrankung durchgeführt wurden, erhärten. In den Organen dieser Menschen ließen sich mehrfach Neoplasien in mikroskopischer Größenordnung nachweisen (Folkman, 1971). Verschiebt sich das Gleichgewicht dieser schlafenden Tumorinseln in Richtung der proangiogenen Modulatoren, spricht man heutzutage vom *angiogenic switch* (Bergers & Benjamin, 2003). Die Zeitspanne bis zum angiogenen Wechsel ist variabel und wird hauptsächlich durch die Aggressivität der jeweiligen Tumorzellen und die Umgebungsbedingungen beeinflusst. Reize wie Hypoxie, Hypoglykämie, ein niedriger pH-Wert, Entzündungen sowie mechanische Belastung durch einen erhöhten Umgebungsdruck können den Wechsel beschleunigen (Carmeliet & Jain, 2000).

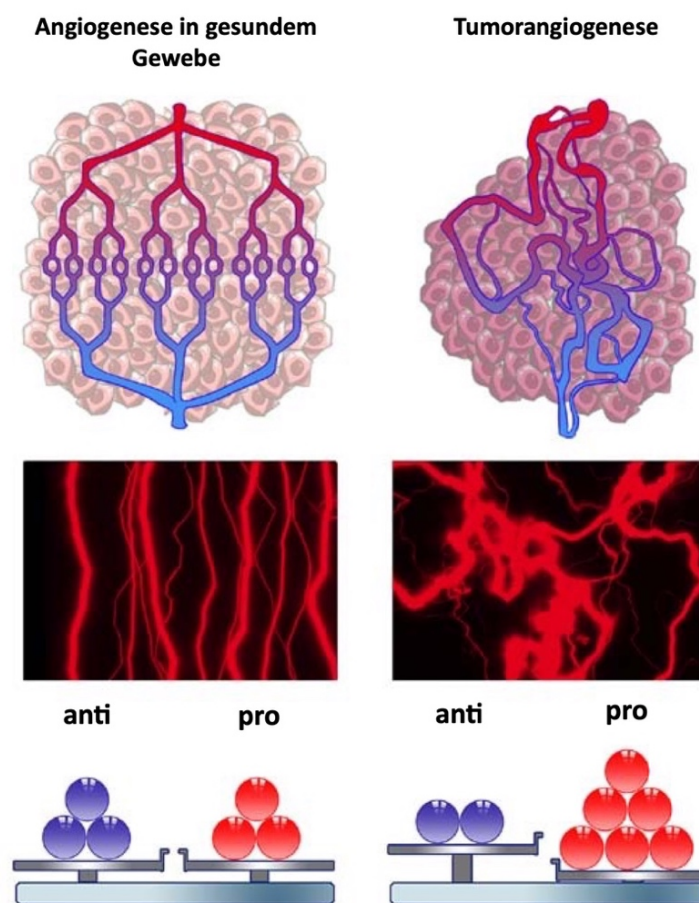
Im Vergleich zu Gefäßen, die in gesundem Gewebe entstehen, erscheinen Tumorgefäße strukturell und funktionell abnormal sowie chaotisch im Aufbau. Sie haben einen ungleichmäßigen Durchmesser, winden sich, sind dilatiert und übermäßig verzweigt. Als Folge kommt es zu einem nicht gleichmäßigen Blutfluss, der wiederum zu Hypoxie und sauren Bereichen führen kann. Zudem haben die gebildeten Endothelzellen eine abnormale Form und ragen in das Gefäßlumen hinein. Die Tumorgefäße werden somit undicht (Carmeliet & Jain, 2000). Das Durcheinander der Tumorangiogenese kann auf ein Ungleichgewicht beteiligter Modulatoren zurückzuführen sein und zeigt gleichzeitig die Komplexität der regulären Gefäßbildung auf.

Heute nach fast 50 Jahren Forschung zur Anti-Angiogenese als sinnvolle Therapiestrategie gegen Krebserkrankungen oder gegen Erkrankungen, die durch überschießende Angiogenese verursacht werden, stehen im klinischen Alltag bereits einige Medikamente zur Verfügung (Fallah et al., 2019):

1. Bevacizumab (anti-VEGF) und Cetuximab (anti-EGFR) → monoklonale Antikörper
2. Sorafenib → Proteinkinase-Inhibitor
3. Sunifinib → Tyrosinkinase-Inhibitor
4. Pegaptanib → RNA-Aptamer; VEGF-Inhibitor (Anwendung bei altersabhängiger Makuladegeneration)

Zudem befinden sich vielversprechende Ansätze in der präklinischen Phase, wie zum Beispiel eine Behandlung mittels Gentherapie (Guijarro-Munoz et al., 2013) oder mittels *small-interfering RNA* (siRNA) (Kim et al., 2006).

Wie in Abschnitt 2.3 bereits erwähnt, scheint auch das Chemotherapeutikum Cisplatin in regelmäßigen nichttoxischen Dosen eine antiangiogene Wirkung auf Tumorzellen zu besitzen, sowohl *in vitro* (Munoz et al., 2005) als auch *in vivo* (Li et al., 2014; Munoz et al., 2005). Es bleibt zu klären, wie es zur Abnahme der Gefäßdichte im Tumorgewebe durch Cisplatin kommt.



**Abb. 6. Angiogenese in gesundem Gewebe und Tumorangio-genese.** Angiogenese im gesunden Gewebe wird durch ein Gleichgewicht von pro- und antiangiogenen Modulatoren reguliert. Bei der Tumorangio-genese dagegen ist das Gleichgewicht in Richtung der proangiogenen Modulatoren verschoben, da eine Überexpression vor allem in Zellen des Tumors stattfindet. Es resultieren eine abnormale Struktur und Funktion der Blutgefäße, die unter anderem zu einer Hypoxie im versorgenden Gebiet führt (modifiziert nach Maj et al., 2016).



## 1.5 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

### 1.5.1 MMPs und ihre Rolle in der Tumorprogression

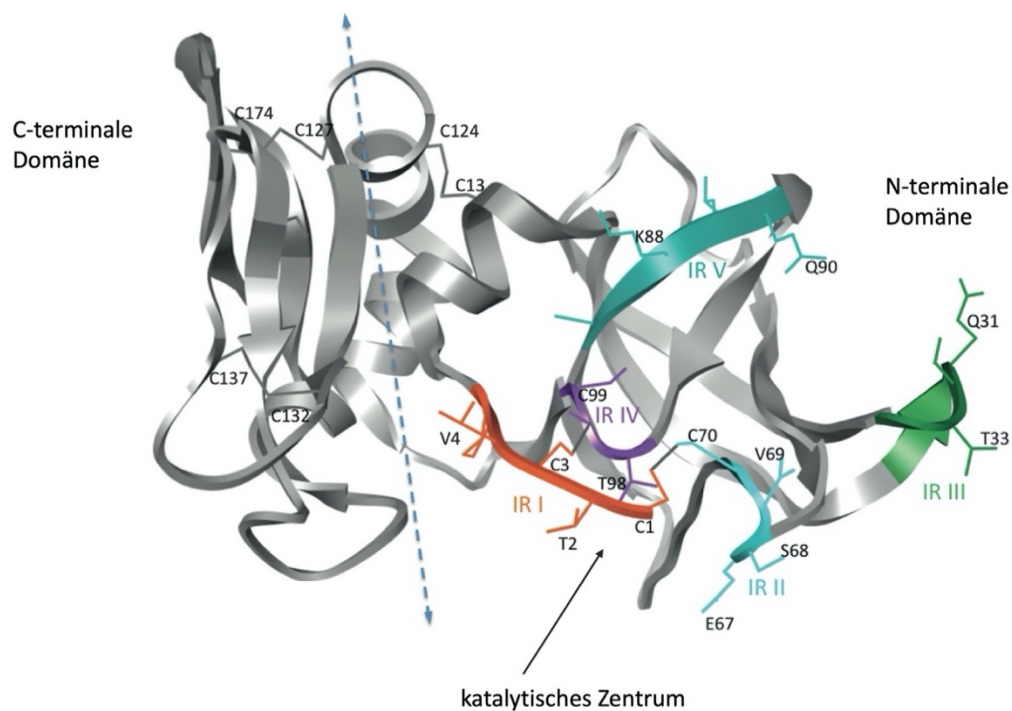
Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind proteolytische Enzyme und gehören zur Gruppe der Endopeptidasen, deren enzymatische Aktivität durch  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen in ihrer Peptidase-Domäne bestimmt werden. Ihre physiologische Aufgabe ist der Abbau und Umbau von Gewebe, genauer gesagt der extrazellulären Matrix (EZM). Dies spielt eine wichtige Rolle bei der Wundheilung und bei der Angiogenese (Jabłońska-Trypuć et al., 2016). Erstmals entdeckt wurde ein Enzym dieser Gruppe, die Kollagenase-1 (heute MMP-1), durch Gross und Lapiere (1962) in Experimenten über das Gewebe der Hinterflosse einer Kaulquappe der nordamerikanischen Froschart *Rana catesbiana*. Bis heute wurden 22 weitere Matrix-Metalloproteinasen identifiziert (Jackson et al., 2010).

Weiterhin sind MMPs nicht nur für gesunde Körperzellen wichtig, sondern auch für entartetes Gewebe. Tumorzellen sind so in der Lage, umliegendes Gewebe zu degradieren, in Gewebe einzudringen und sich schließlich zu verbreiten. Die Invasion und Metastasierung von neoplastischem Gewebe ist somit kausal verknüpft mit der Expression von MMPs (Curran & Murray, 2000). Die genauen Funktionen der einzelnen MMPs zu entschlüsseln, ist Gegenstand der heutigen Forschung. Aufgrund der Vielfalt an Zelltypen (u.a. Makrophagen, aktivierte Fibroblasten, Leukozyten, endotheliale Vorläuferzellen), die sich in der Tumorumgebung an proteolytischen Prozessen beteiligen, gestaltet sich die genaue Zuordnung jedoch schwierig (Guedez & Stetler-Stevenson, 2008). Der Großteil der Matrix-Metalloproteinasen haben einen positiven Effekt auf die Tumorangiogenese. Cornelius et al. (1998) fanden jedoch heraus, dass einige MMPs mit der Abspaltung von Angiostatin einen negativen Einfluss auf die Tumorangiogenese haben.

### 1.5.2 Tissue inhibitor of matrixmetalloproteinases-1 (TIMP-1)

*Tissue inhibitors of matrixmetalloproteinases* (TIMPs) sind Glykoproteine und agieren als natürliche und spezifische Inhibitoren der MMPs, wodurch der Abbau der extrazellulären Matrix gehemmt wird (Murphy et al., 1994). Sie binden MMPs im Verhältnis 1:1 (Visse & Nagase, 2003). Bisher wurden vier Vertreter identifiziert (TIMP-1 bis TIMP-4). Ihre Aminosäuresequenzen sind zu 35-40% identisch und es zeigen sich strukturelle Homologien (Denhardt et al., 1993). TIMPs haben jeweils eine N-terminale und eine C-terminale Domäne, die jeweils 3 Disulfidbrücken aufweisen. Die N-terminale Domäne funktioniert als

unabhängige Einheit mit der Fähigkeit MMPs zu inhibieren (Nagase et al., 2006). Die primäre Funktion der TIMPs ist die Inhibierung der Matrix-Metalloproteinasen, wodurch das Tumorwachstum (Gomez et al., 1997; Ramer et al., 2014; Ramer & Hinz, 2008) und auch die Tumorangio-genese (Bloomston et al., 2002; Ramer et al., 2014; Ramer & Hinz, 2008) negativ beeinflusst wird. Eine Vielzahl an Studien hat jedoch gezeigt, dass TIMPs außer ihrer offensichtlichen Funktion noch weitere zum Teil auch gegensätzliche Eigenschaften besitzen (Lambert et al., 2004). Dazu gehören zum einen die Förderung (TIMP-1 bis TIMP-3) und Hemmung (TIMP-2 bis TIMP-4) des Zellwachstums. Zum anderen die Aktivierung (TIMP-3) und Hemmung (TIMP-1 und TIMP-2) der Apoptose (Guedez et al., 2001). Die Experimente der vorliegenden Arbeit konzentrieren sich darauf, ob und wie TIMP-1 die Tumorangio-genese beeinflusst. Das Glykoprotein TIMP-1 besteht aus 184 Aminosäuren und hat ein Gewicht von 28,5 kDa (Williamson et al., 1990). In Abbildung 7 wird TIMP-1 als 3D-Struktur gezeigt.



**Abb. 7. 3D-Struktur von TIMP-1.** TIMP-1 im Bändermodell; Visualisierung der zwei Domänen, der Domänengrenzregion und der reaktiven Regionen (IR I – IR V) (modifiziert nach Brew & Nagase, 2010).

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Cisplatin ist ein seit den 1970er-Jahren weit verbreitetes Chemotherapeutikum und hat ein besonders breites Wirkspektrum, weshalb heutzutage fast jedes zweite Therapieschema ein platinhaltiges Chemotherapeutikum beinhaltet. Neben der Unterdrückung der Tumorzellproliferation und des Tumorwachstums hemmt Cisplatin zudem die Tumorangiogenese.

Wie Cisplatin jedoch genau die Tumorangiogenese hemmt ist noch nicht bekannt. Meine Motivation ist es also den Wirkmechanismus zu verstehen. Die Experimente der vorliegenden Arbeit befassen sich demnach mit dem Einfluss von Cisplatin auf eine potenzielle Kommunikation zwischen Tumorzellen und Endothelzellen, welche wiederum einen antiangiogenen Effekt haben könnte. Im Hinblick darauf, dass TIMPs Inhibitoren der Angiogenese darstellen, sollen die Experimente eine mögliche Expression von TIMP-1 durch Cisplatin sowie die Beteiligung von TIMP-1 an der Kommunikation zwischen Tumor- und Endothelzellen untersuchen.

Außerdem soll ein Zusammenhang zwischen der noch wenig etablierten LDM-Chemotherapie und der Hemmung der Tumorangiogenese durch Cisplatin hergestellt werden. Hierfür wurden nichttoxische Konzentrationen Cisplatins zur Behandlung von Lungenkarzinomzellen verwendet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellkulturmedien

**Tab. 1. Zellkulturmedien**

Name	Bestandteil	Hersteller
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) Komplettmedium	DMEM mit 4,5 g/l Glucose und 4mM L-Glutamin	Lonza, Köln
	10% hitzeinaktiviertes FCS	PAN Biotech, Aidenbach
	10 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin	Invitrogen, Darmstadt
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) serumfreies Komplettmedium	DMEM mit 4,5 g/l Glucose und 4mM L-Glutamin 10 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin	Lonza, Köln Invitrogen, Darmstadt
Spezielles Zellkulturmedium für HUVECs	Endothelial Cell Growth Medium Kit (C-22110)	PromoCell, Heidelberg

#### 2.1.2 Zelllinien

**Tab. 2. Zelllinien**

Name	Zellart	Hersteller
A549	Humane Lungenkarzinomzelllinie (Adenokarzinom)	DSMZ GmbH, Braunschweig DSMZ-Nummer: ACC 107
H358	Humane Lungenkarzinomzelllinie (Bronchioloalveoläres Karzinom)	American Type Culture Collection, Wesel, ATCC-Nummer: CRL-5807™
BEAS-2B	Humane Bronchialepithelzelllinie	American Type Culture Collection, Wesel, ATCC-Nummer: CRL-9609™
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells	PromoCell, Heidelberg

2.1.3 Oligonukleotide

Tab. 3. Oligonukleotide

Name	Target-Sequenz	Sense	Antisense	Hersteller
TIMP-1-siRNA	5'TCCCATCTTT CTTCCGGA CAA-3'	5'-GCCAGCUUA UACACAAGA ATT-3'	5'-UUCUUG UGUAUAAGC UGG CCG-3'	Quiagen, Hilde
siRNA-negativ-Kontrolle	-	dTdT 3' Überhang	dTdT 3' Überhang	EUROGENTEC, Köln
Transfektions-Reagenz	-	-	-	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

2.1.4 Antikörper

Tab. 4. Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung <sup>1</sup>	Hersteller
Anti-humanes TIMP-1	Maus	1:1000	Merck KGaA, Darmstadt
Anti-humanes $\beta$ -Aktin	Maus	1.10 000	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tab. 5. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung <sup>2</sup>	Hersteller
Anti-Maus IgG	1:1000	New England BioLabs GmbH, Frankfurt

2.1.5 Chemikalien

Tab. 6. Chemikalien

Name	Hersteller
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim
APS	Sigma-Aldrich, Steinheim
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA

<sup>1</sup> Verdünnung in 1% Milchpulver gelöst in TBS/T<sup>2</sup> Verdünnung in 1% Milchpulver gelöst in TBS/T

$\beta$ -Mercaptoethanol	Ferak, Berlin
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cisplatin	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Applichem, Darmstadt
DMF	Sigma-Aldrich, Steinheim
ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences, Freiburg
EDTA	Applichem, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Applichem, Darmstadt
HEPES	Ferak, Berlin
KCl	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Biomol, Hamburg
Lipofectamin	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Luminol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Matrigel™ Basement Membrane Matrix	BD Biosciences, Heidelberg
Milchpulver	Bio-Rad, München
NaCl	Allied Signal, Seelze
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (x 12 H <sub>2</sub> O)	Applichem, Darmstadt
Orthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS	PAN Biotech, Aidenbach
PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Applichem, Darmstadt
Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range	Bio-Rad, München
SDS	Applichem, Darmstadt
siRNA Suspensionspuffer	Qiagen, Hilden
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris Base/Tris-HCl	Applichem, Darmstadt
Triton® X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Tween® 20	Serva, Heidelberg

WST-1-Reagenz	Roche Applied Science, Mannheim
---------------	---------------------------------

### 2.1.6 Puffer und Lösungen

**Tab. 7. Puffer und Lösungen**

Produkt	Bestandteil	Menge
1,5 M Tris pH 8,8:	Tris Base	181,71 g
	Aqua dest.	ad 1.000 ml
Blockierungslösung:	Milchpulver	25 g
	TBS-T	ad 500 ml
Blotpuffer:	Transfer-Puffer	32 ml
	Aqua dest.	768 ml
	Methanol	200 ml
Glycin-Strip-Puffer (pH 2,5):	Glycin	15,01 g
	NaCl	29,22 g
	Aqua dest.	ad 1.000 ml
Protein-Lysispuffer	HEPES	5,98 g
	NaCl	4,38 g
	EDTA	0,146 g
	Triton® X-100	5 ml
	Glycerin	50 ml
	Aqua dest.	ad 500 ml
Lämmli-Puffer (5x):	Tris HCL (0,625 M, pH 6,8)	2 ml
	SDS	1,0 g
	Glycerin	5 ml
	Bromphenolblau	0,5 ml
	β-Mercaptoethanol	0,5 ml
	Aqua dest.	ad 10 ml
Laufpuffer:	Tris Base	15,14 g
	Glycin	72,07 g
	SDS	5 g
	Aqua dest.	ad 1.000 ml

Lysispuffer:	Protein-Lysispuffer	1 ml
	Aprotinin (2 mg/ml)	5,2 µl
	Leupeptin (1,9 mg/ml)	2 µl
	Orthovanadat (100 mM)	5 µl
	PMSF (100 mM)	10 µl
PBS (pH 7,4):	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (x 12 H <sub>2</sub> O)	2,9 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
	Aqua dest.	ad 1.000 ml
Ponceau S-Lösung:	Ponceau S	0,5 g
	Essigsäure	1 ml
	Aqua dest.	ad 1.000 ml
TBS (pH 7,5):	Tris Base	12,11 g
	NaCl	8,77 g
	Aqua dest.	ad 1.000 ml
TBS-T:	TBS (pH 7,5)	1.000 ml
	Tween®20	1 ml
Transfer-Puffer:	Tris Base	6,06 g
	Glycin	28,52 g
	SDS	1 g
	Aqua dest.	ad 1.000 ml
Trypsin/EDTA <sup>3</sup> :	Trypsin/EDTA	5 ml
	PBS	ad 50 ml

### 2.1.7 Geräte

**Tab. 8. Geräte**

Name	Hersteller
CO <sub>2</sub> -Inkubator CB210	Binder, Tuttlingen
Lichtmikroskop „Wilovert“	Hund, Wetzlar

<sup>3</sup> Trypsin/EDTA ist eine 10fach konzentrierte Fertiglösung der Firma Invitrogen, Karlsruhe



ELISA-Photometer Anthos	Anthos Microsysteme GmbH, Krefeld
SDS-Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN®Tetra Cell)	Bio-Rad, München
Tank-Blot Kammer (Mini Trans-Blot®Electrophoretic Transfer Cell)	Bio-Rad, München
Netzteil PowerPac™Basic Power Supply	Bio-Rad, München
Geldokumentationsanlage (Molecular Imager® ChemiDoc™XRS)	Bio-Rad, München
Automatisches Zellzählgerät LUNA II	Logos Biosystems, Anyang

### 2.1.8 Software

**Tab. 9. Software**

Name	Hersteller
Quantity One® 1-D Analysis Software	Bio-Rad, München
GraphPad Prism® 5.0	GraphPad Software, San Diego, USA

### 2.1.9 Verbrauchsmaterialien

**Tab. 10. Verbrauchsmaterialien**

Name	Hersteller
24-Well-Platten Falcon®	BD Biosciences, Heidelberg
48-Well-Platten Falcon®	BD Biosciences, Heidelberg
96-Well-Platten Falcon®	BD Biosciences, Heidelberg
Migrationsplatten 24-Well Bio Coat®	BD Biosciences, Heidelberg
Mikropipetten	Sarstedt, Nürnbrecht
Multipettenaufsätze	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Nitrozellulose Membranen	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Seropipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nürnbrecht
Falcon®-Röhrchen (50ml, 10 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Falcon® Cell Culture Inserts	Corning Inc., Corning, NY, USA

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Zellkultivierung

#### 2.2.1.1 **Allgemeines**

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Alle Arbeitsschritte, wie Aussaat oder Passagierung, wurden unter einer Sicherheitswerkbank erledigt. Das Wachstum der Zellen und das Ablösen der Zellen, während des Passagierens, wurde regelmäßig unter dem Lichtmikroskop kontrolliert.

#### 2.2.1.2 **Aufbewahren und Auftauen der Zelllinien**

Die verwendeten Zelllinien wurden in speziellen Kryogefäßen bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierbei ist es wichtig, die Schädigung der Zellen zu verhindern. Deshalb wurde das Kryoprotektivum Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) verwendet. Das Auftauen der Zellen wurde im Wasserbad bei 37°C beschleunigt. Da DMSO bei Raumtemperatur zelltoxisch wirkt, musste die Zeitspanne bis zum Vermischen der Zellsuspension mit DMEM-Komplettmedium, ein standardisiertes Nährmedium für Zellkulturen, möglichst kurzgehalten werden. Im Anschluss wurden die Zellen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die übrigen Zellen wieder in DMEM-Komplettmedium resuspendiert. Im letzten Schritt wurden die Zellen in Zellkulturflaschen in der gewünschten Menge ausgesät.

#### 2.2.1.3 **Passagierung der verwendeten Zelllinien**

Die zwei Tumorzelllinien A549 und H358 sowie die BEAS-2B-Zellen aus gesundem bronchialem Epithelgewebe wurden alle in sterilen Zellkulturflaschen mit einer Oberfläche von 75 cm<sup>2</sup> kultiviert (Amstad et al., 1988; Wan et al., 2012). Dabei wurde pro Flasche eine Zelldichte von ca. 15.000 bis 20.000 Zellen je cm<sup>2</sup> angestrebt. Als Nährmedium wurde DMEM-Komplettmedium (10% [v/v] FCS) benutzt. Die verwendeten Zelllinien wuchsen adhärent und in Form eines einschichtigen Zellrasens. Im Anschluss an die Aussaat inkubierten die Zellen 3-5 Tage im Brutschrank bis sich die Zellen auf bis zu 90% des Zellkulturflaschenbodens ausgebreitet hatten. Bei Erreichen der gewünschten Zelldichte wurde der Überstand abgesaugt und der Zellrasen mit 5 ml vorgewärmtem PBS (phosphathaltige Pufferlösung) gewaschen. Nach dem Waschen wurde 3-5 ml Trypsin/EDTA in die Zellkulturflasche gegeben

und darauf für vier Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Ablösung des Zellrasens vom Flaschenboden durch die Zugabe von Trypsin/EDTA wurde nach vier Minuten mit 5 ml DMEM-Komplettmedium (10% FCS) gestoppt. Um die Zellen vollständig vom Flaschenboden zu lösen, wurde die Zellkulturflaschenwand leicht angestoßen. Die Ablösung wurde abschließend unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Die nun vorhandene Zellsuspension wurde in ein steriles 50 ml Falcon®-Röhrchen überführt und bei 1.300 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das zurückgebliebene Zellpellet in DMEM-Komplettmedium (10% FCS) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels automatischem Zellzähler (LUNA-II™, Logos Biosystems, siehe auch 2.2.1.5) ausgezählt und in gewünschter Zelldichte in frischen Zellkulturflaschen ausgesät.

#### 2.2.1.4 Passagierung der HUVECs

Die Passagierung von HUVECs wurde nach dem gleichen Protokoll, wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben, durchgeführt. Lediglich das DMEM-Komplettmedium (10% FCS) wurde ersetzt durch das *Endothelial Cell Growth Medium Kit*.

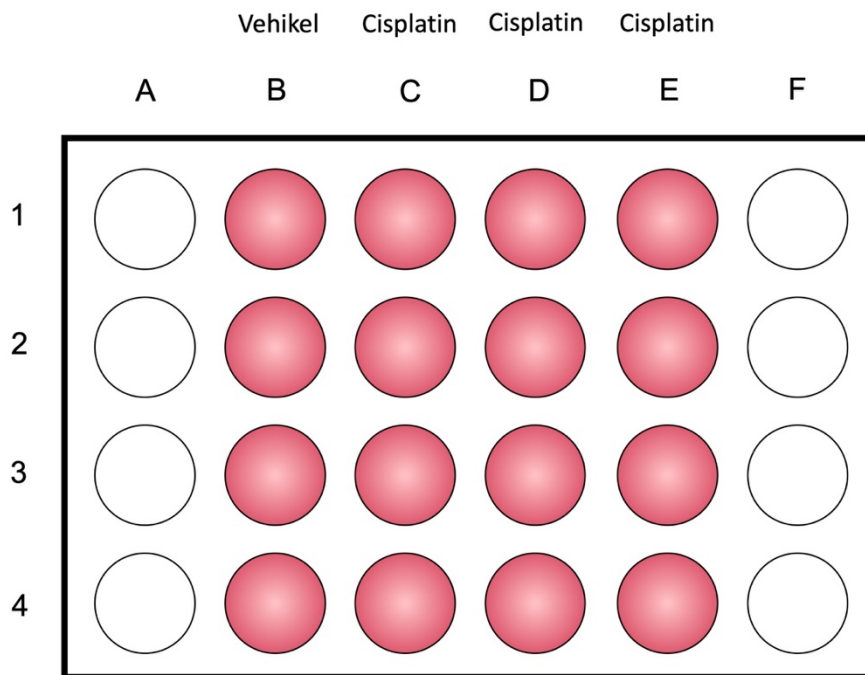
#### 2.2.1.5 Zellauszählung

Zum Auszählen der Zellen wurde ein automatisches Zellauszählgerät benutzt (LUNA-II™, Logos Biosystems). Als Vorbereitung wurden 15 µl Zellsuspension mit 15 µl Methylenblau in einem vorbereiteten Eppendorf-Röhrchen vermischt. Hiervon wurden zweimal 10 µl auf einen Zellauszähl Schlitten gegeben. Der Zellauszähl Schlitten wurde nun in den Zellauszähler gelegt und die einzelnen Proben wurden automatisch gezählt. Die Funktionsweise basiert auf einem neuartigen Fokussierungsmechanismus. Am Ende der Auszählung erhält man die Total-, Lebend- und Totzellanzahl pro ml.

#### 2.2.2 Stimulierung von Zellen

Die zuvor kultivierten Zellen wurden unter der Sicherheitswerkbank mit vorgewärmtem PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst und anschließend in DMEM-Komplettmedium (10% FCS) resuspendiert. Nun wurden die Zellen mittels LUNA-II™ ausgezählt. Daraufhin wurden jeweils 10<sup>5</sup> Zellen in die Kammern (Wells) einer 24-Well-Platte pipettiert (unterschiedliche Zellanzahl bei Verwendung von 48- oder 96-Well-Platten). Die ausgesäten Zellen wurden dann im Brutschrank über Nacht inkubiert. Danach wurden die Zellen mit vorgewärmtem PBS

gewaschen und die Kammern darauf mit 270  $\mu\text{l}$  serumfreiem DMEM-Medium aufgefüllt. Dann wurde in jede Kammer 30  $\mu\text{l}$  des Stimulationsreagenz (0,01, 0,1, 1  $\mu\text{M}$  Cisplatin bzw. 0,1% Dimethylformamid) gegeben, um ein Endvolumen von 300  $\mu\text{l}$  zu erreichen. Der fertige Stimulationsansatz wurde in den Inkubator gelegt und für 48 h inkubiert.

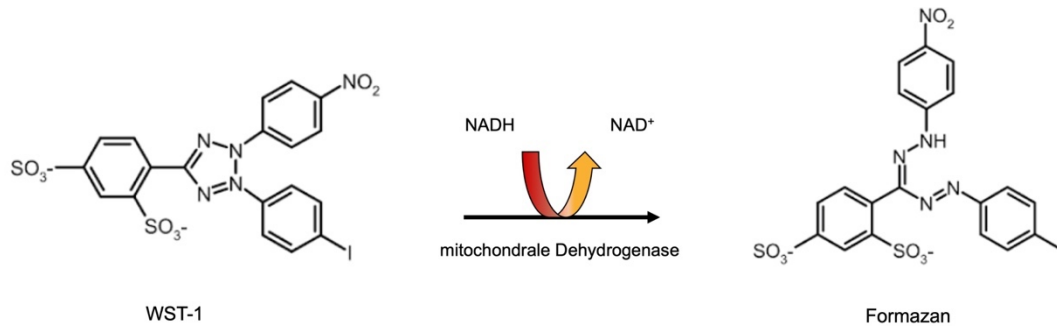


**Abb. 8. Schematische Darstellung eines Stimulationsansatzes.** 24-Well-Platte;  $10^5$  Zellen pro Well (B1 bis E4); Endvolumen 300  $\mu\text{l}$  (270  $\mu\text{l}$  serumfreies DMEM + 30  $\mu\text{l}$  Stimulans; Vehikel B1-B4 0,1% DMF, Cisplatin C1-C4 0,01  $\mu\text{M}$ , Cisplatin D1-D4 0,1  $\mu\text{M}$ , Cisplatin E1-E4 1  $\mu\text{M}$ ; n = 4 Experimente.

### 2.2.3 WST-1-Assay

Ein indirektes Verfahren, um die Viabilität von Zellen zu messen, ist der WST-1-Test. Dabei wird das WST-1-Reagenz (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat), ein Tetrazoliumsalz, durch mitochondriale Dehydrogenasen zu Formazan umgesetzt. Da Dehydrogenasen nur in lebenden Zellen aktiv sind, kann man die Reaktion als Viabilitätsnachweis ansehen. Bei der enzymatischen Umsetzung zu Formazansalz lässt sich ein Farbumschlag von Rot nach Orange-gelb detektieren, welchen man schließlich in einer photometrischen Analyse quantifizieren kann. Die Messung der Proben wurde mit einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm durchgeführt. Ein Blankwert, der durch die Eigenextinktion des im Medium enthaltenen Phenolrots und unter zellfreien Bedingungen umgesetzten WST-1, wurde bei jeder Messung von den Rohwerten der

Einzelmessungen subtrahiert. Die Durchführung des WST-1-Tests erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll mit leichten Modifikationen (Zugabe von 30  $\mu\text{l}$  WST-1-Reagenz zu 200  $\mu\text{l}$  Medium bei Migrationsexperimenten und 10  $\mu\text{l}$  WST-1-Reagenz zu 100  $\mu\text{l}$  Medium bei Viabilitätsuntersuchungen im 96-Well-Format). Die Analyse des Farbumschlags erfolgte durch das Mikroplatten-Photometer Anthos.

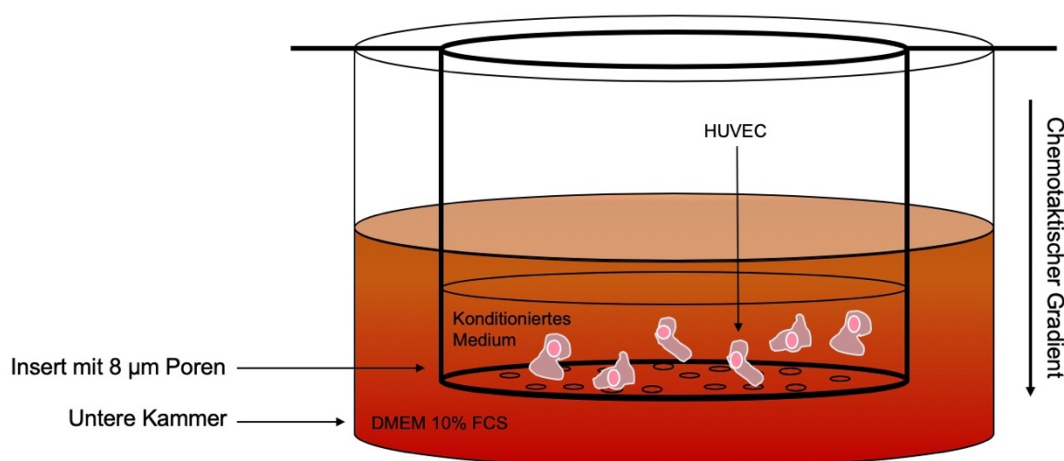


**Abb. 9. Prinzip des WST-1-Assays.** WST-1 wird durch eine mitochondriale Dehydrogenase zu Formazan umgesetzt, dabei beobachtet man einen Farbumschlag von Rot nach Orange-gelb (modifiziert nach Luttmann et al., 2014).

#### 2.2.4 Migrations-Assay mit konditionierten Medien (indirekte Stimulation)

In Vorbereitung des Migrations-Assays mit konditionierten Medien wurden die jeweiligen Tumorzellen bzw. BEAS-2B Zellen stimuliert und für 48 Stunden inkubiert. Die Überstände wurden dann benutzt, um die Migration der HUVECs zu untersuchen. Hierzu wurden Migrationsplatten (sog. Transwell-Platten, Boyden Chambers; Falcon<sup>®</sup> Cell Culture Inserts) im 24-Well-Format benutzt. In jedes Well wird ein Insert, welches im Boden 8  $\mu\text{m}$  große Poren aufweist, eingesetzt. Durch diese Poren können die HUVECs entlang eines chemotaktischen Gradienten (10 % [v/v] FCS an der Unterseite der Membran) in die untere Kammer migrieren (Ramer & Hinz, 2010). Im nächsten Schritt werden die nicht-migrierten Zellen auf der Oberseite des Inserts entfernt und die Migration wird durch die Exposition von an der Unterseite der Membran befindlichen Zellen gegenüber WST-1-Reagenz in serumfreiem DMEM quantifiziert. Die Aufbereitung der Überstände (konditionierte Medien) erfolgte unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer Sicherheitswerkbank. Zuerst wurden alle Überstände einer Reagenz-Reihe abgenommen und in ein Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden diese Eppendorf-Röhrchen bei 4 °C und 1.300 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der zellfreie Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt, welches auf Eis gestellt wurde.

Im Anschluss folgte die Waschung mit PBS und die Ablösung vom Flaschenboden mit Trypsin/EDTA von zuvor kultivierten HUVECs. Nach der Ablösung wurden die HUVECs in 10 ml DMEM-Komplettmedium (10% [v/v] FCS) resuspendiert und anschließend in ein 15 ml Falcon®-Röhrchen überführt und ausgezählt. Danach wurden die HUVECs bei Raumtemperatur und  $1.300 \times g$  für 5 Minuten zentrifugiert. Das zurückgebliebene Zellpellet wurde in serumfreiem DMEM resuspendiert und mittels LUNA-II™ (Logos Biosystems) ausgezählt. Anhand dieser gemessenen Zelldichte wurde für jeden Ansatz ein Volumen berechnet, in dem sich  $1 \times 10^5$  HUVECs befanden. Dieses Volumen wurde in Eppendorf-Röhrchen wiederum bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $1.300 \times g$  für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend auf Eis gestellt. Daraufhin wurden die Überstände vorsichtig abgesaugt und verworfen. Das HUVEC-Zellpellet wurde dann mit dem jeweiligen zu testenden konditionierten Medium resuspendiert (Endvolumen  $300 \text{ }\mu\text{l}$  pro Insert). Anschließend wurden jeweils  $300 \text{ }\mu\text{l}$  dieser HUVEC-Zellsuspension mit  $1 \times 10^5$  HUVECs pro Ansatz in konditionierten Medien in die jeweils obere Kammer der Transwell-Platten gegeben. In die untere Kammer der Transwell-Platten wurde pro Well  $750 \text{ }\mu\text{l}$  DMEM-Komplettmedium (10% [v/v] FCS) als Chemoattraktionsmittel gegeben. Der nun startbereite Assay wurde für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Um die an die Unterseite des Inserts migrierten HUVECs mittels WST-1 Test (siehe 2.2.3) zu quantifizieren, wurden nach Ablauf der Inkubationszeit die Überstände der Inserts abgesaugt



**Abb. 10. Schematische Darstellung einer Transwell-Platte.** Einteilung der Transwell-Platte in obere und untere Kammer; obere Kammer (Insert)  $300 \text{ }\mu\text{l}$  konditioniertes Medium +  $1 \times 10^5$  HUVECs; untere Kammer  $750 \text{ }\mu\text{l}$  DMEM-Komplettmedium (10% FCS). Im Boden des Inserts befinden sich Poren (Größe  $8 \text{ }\mu\text{m}$ ) durch die sich die HUVECs entlang des chemotaktischen Gradienten bewegen können.

und verworfen. Dann wurden die Inserts mit PBS gewaschen und nicht-migrierte Zellen auf der Oberseite vorsichtig mit einem Wattestäbchen entfernt. Die nun aufbereiteten Inserts wurden dann in eine neue 24-Well-Platte eingesetzt.

#### 2.2.5 Migrations-Assay mit unkonditionierten Medien (direkte Stimulation)

Im Migrations-Assay mit unkonditionierten Medien, also einer direkten Stimulation, geht es darum, die direkten Effekte von Cisplatin auf das Migrationsverhalten der HUVECs zu untersuchen. Der erste Schritt ist wiederum das Aufbereiten der zuvor kultivierten HUVECs. HUVECs wurden mit PBS gewaschen, dann mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst, in 10 ml DMEM-Komplettmedium (10% [v/v] FCS) resuspendiert, schließlich in ein 15 ml Röhrchen pipettiert und ausgezählt.

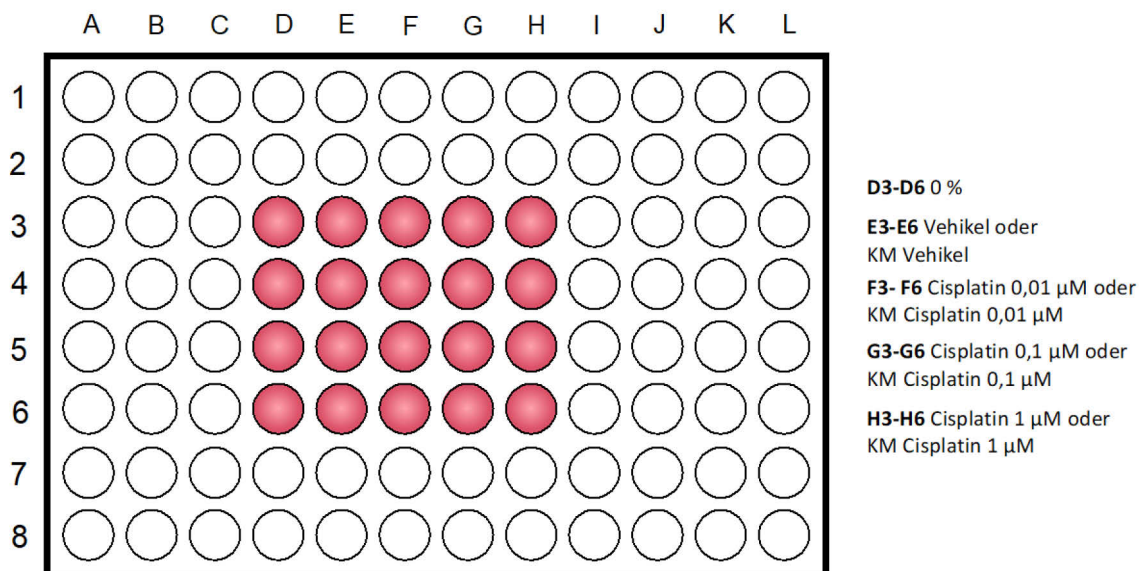
Danach wurden die HUVECs bei Raumtemperatur und  $1.300 \times g$  für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen. Das zurückgebliebene Zellpellet wurde in serumfreiem DMEM-Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension dient dazu, in jede obere Kammer einer Transwell-Platte (24-Well)  $1 \times 10^5$  Zellen mit dem Endvolumen von 270  $\mu\text{l}$  auszusähen. Im Folgenden wurde in jedes Insert jeweils 30  $\mu\text{l}$  der zu testenden Cisplatin-Konzentration hinzugegeben. Als letzten Schritt erfolgte die Füllung der unteren Kammer der Transwell-Platte mit jeweils 750  $\mu\text{l}$  DMEM-Komplettmedium (10% [v/v] FCS) als Chemoattraktionsmittel. Der einsatzbereite Migrations-Assay wurde dann für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss folgte die Auswertung der Migration der HUVECs mittels WST-1-Tests. Der Ablauf erfolgte wie im vorherigen Kapitel beschrieben.

#### 2.2.6 Viabilitäts-Assay mit konditionierten Medien (indirekte Stimulation)

Es ist entscheidend, die Viabilität von HUVECs unter dem Einfluss von konditionierten Medien zu untersuchen. Somit werden zytotoxische Phänomene durch das jeweils konditionierte Medium ausgeschlossen, die ebenfalls zu einer verringerten Migration der HUVECs führen würden. Dazu wurden  $5 \times 10^3$  HUVEC-Zellen pro Well in jeweils 100  $\mu\text{l}$  des zu testenden konditionierten Mediums auf einer 96-Well-Platte ausgesät. Der fertige Ansatz wurde für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation erfolgte die Viabilitätsmessung der HUVECs mittels WST-1-Tests.

### 2.2.7 Viabilitäts-Assay mit unkonditionierten Medien (direkte Stimulation)

Weiterhin muss ausgeschlossen werden, dass Cisplatin in den geplanten Konzentrationen direkt zellschädigend auf HUVECs wirkt und es so zu einer verminderten Migration von HUVECs kommen könnte. Dazu wurden  $5 \times 10^3$  HUVEC-Zellen pro Well in jeweils 100  $\mu\text{l}$  serumfreiem DMEM-Medium auf einer 96-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden für jeweils 6 Stunden inkubiert, um an die Oberfläche zu adhären. Anschließend wurden die Zellen mit aufsteigenden Cisplatin-Konzentrationen (0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,1  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ) sowie Vehikel (0,1% DMF) stimuliert. Dann wurde der Ansatz für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert und darauf die Viabilität mittels WST-1-Tests quantifiziert. Außerdem wurden auch Viabilitäts-Assays mit den Tumorzelllinien A549 und H358, sowie der humanen Epithelzelllinie BEAS-2B durchgeführt. Hierzu wurden  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well in 100  $\mu\text{l}$  DMEM (10% [v/v] FCS) auf eine 96-Well-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Überstände abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit aufsteigenden Cisplatin-Konzentrationen (0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,1  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ) sowie Vehikel (0,1% DMF) in serumfreiem DMEM stimuliert. Auch hier wurde der Ansatz für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert und darauf die Viabilität mittels WST-1-Tests quantifiziert.



**Abb. 11. Schematische Darstellung eines Viabilitäts-Assays.** 96-Well-Platte;  $5 \times 10^3$  Zellen; a) direkte Stimulation: 100  $\mu\text{l}$  Endvolumen (90  $\mu\text{l}$  serumfreies DMEM + 10  $\mu\text{l}$  Stimulans)  $\rightarrow$  0% serumfreies DMEM-Medium mit Vehikel 0,1% DMF, Vehikel 0,1% DMF, Cisplatin 0,01  $\mu\text{M}$ , Cisplatin 0,1  $\mu\text{M}$ , Cisplatin 1  $\mu\text{M}$ ; n = 4 Experimente; b) indirekte Stimulation mit KM (konditioniertes Medium), 300  $\mu\text{l}$  Endvolumen, n = 4 Experimente.



### 2.2.8 Transfektion mit siRNA

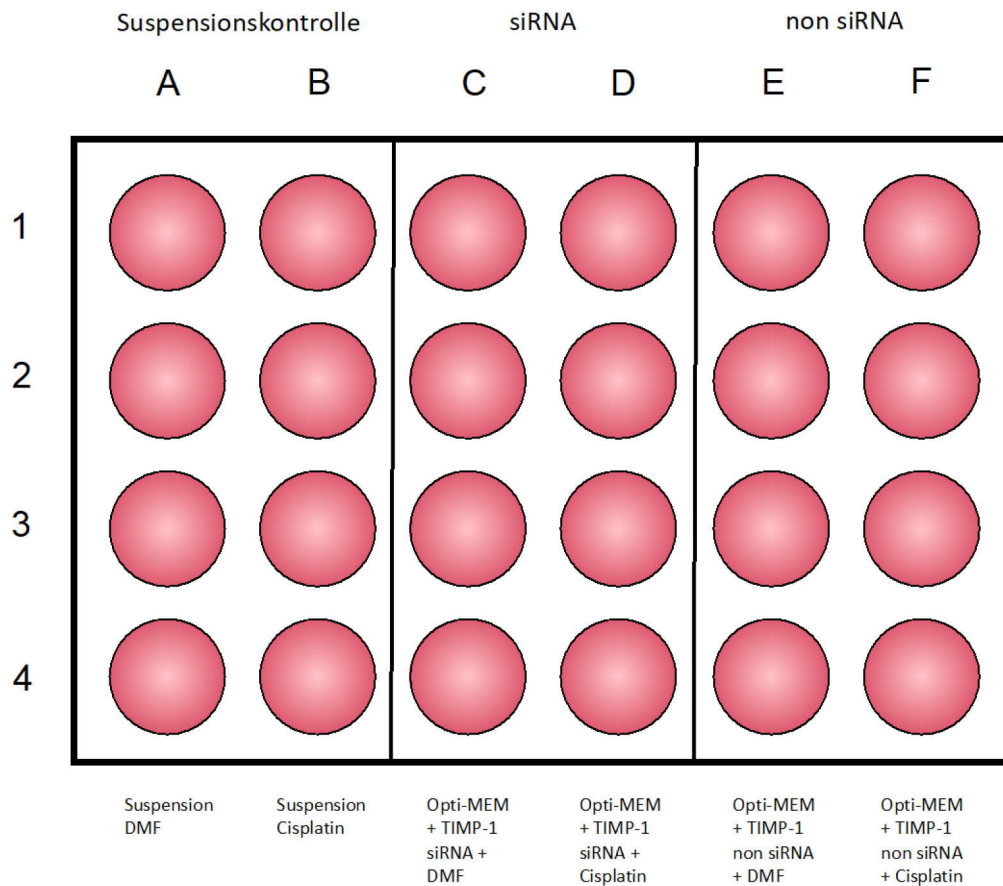
Um eine kausale Verbindung zwischen den antiangiogenen Effekte von Cisplatin und der Hochregulation von TIMP-1 in den Tumorzelllinien A549 und H358 herzustellen, wurden Versuche mit einer *small-interfering-RNA*, kurz siRNA, sog. Transfektionsversuche durchgeführt. Dabei bindet die siRNA an den komplementären Bereich der zugehörigen mRNA, im vorliegenden Fall für das Protein TIMP-1. Die mRNA wird daraufhin gespalten und kann nicht mehr translatiert werden (Dana et al., 2017). Somit entsteht ein Knockout der Expression des TIMP-1-Proteins. Die siRNA-Transfektion wurde mit dem Lipofectamine™-RNAiMAX-Reagenz (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland), gemäß dem Prinzip "Reverse Transfection" nach Herstellerhandbuch mit geringfügigen Modifikationen durchgeführt. RNAi- Lipofectamine™-RNAiMAX-Komplexe wurden in *Opti-MEM®-I-Reduced-Serum-Medium* hergestellt, welches 0,2 µl Lipofectamine™-RNAiMAX pro 100 µl enthielt. Anschließend wurden drei verschiedene RNA-Suspensionspuffer hergestellt:

1. ohne siRNA
2. mit TIMP-1-siRNA
3. mit einer *non-silencing* Kontroll-siRNA

Die einzelnen RNA-Suspensionspuffer wurden jeweils gut vermischt und auf eine 48-Well-Platte aufgetragen (100 µl pro Well). Danach wurde die Platte für 10-20 Minuten im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurden in jedes Well  $1 \times 10^5$  A549- oder H358-Zellen, welche in 500 µl DMEM-Komplettmedium (10% [v/v] FCS) suspendiert wurden, hinzugegeben. Daraus ergab sich eine Endkonzentration von 2 nM TIMP-1-siRNA bzw. non-si-siRNA pro Well. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen gewaschen und danach mit Vehikel (DMF) oder Cisplatin 1 µM in 300 µl Endvolumen serumfreiem DMEM stimuliert.

Nach weiteren 48 Stunden wurden die konditionierten Medien gesammelt, bei  $1300 \times g$  für 5 Minuten zentrifugiert und entweder zur Herstellung von HUVEC-Suspensionen für nachfolgende Angiogenese-Assays oder zur Durchführung einer Western-Blot-Analyse von TIMP-1 verwendet. Zur Analyse von  $\beta$ -Aktin wurden hingegen Zelllysate verwendet. Diese wurden gemäß dem Behandlungsprotokoll in Abschnitt 2.3.2 hergestellt.



**Abb. 12. Schematische Darstellung eines Transfektions-Assays.** Ausschnitt aus einer 48-Well-Platte; Endvolumen 300 µl (270 µl serumfreies DMEM + 30 µl Stimulans); Vehikel 0,1% DMF (A1-A4 C1-C4 E1-E4), Cisplatin 1 µM (B1-B4 D1-D4 F1-F4); n = 4 Experimente.

### 2.2.9 Tube-Formation-Assay

Die Tatsache, dass sich Endothelzellen *in vitro* auf einer Matrigel-Schicht zu kapillarähnlichen Netzwerken formieren und damit das zelluläre Verhalten während der Angiogenese nachahmen (Grant et al., 1989), ist die Basis des *Tube-Formation-Assays*. Er dient dazu, das antiangiogene Potenzial von Cisplatin oder von durch A549, H358 oder BEAS-2B-Zellen konditionierten Medien, gegenüber HUVECs zu quantifizieren. Der Versuchsaufbau wurde leicht modifiziert gegenüber früheren Veröffentlichungen (Ramer et al., 2014). Zu Beginn wurden 48-Well-Platten mit 30 µl eisgekühlten *Matrigel® Matrix Basement Membran* pro Well beschichtet und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, damit das Matrigel polymerisiert. Danach wurden die HUVECs in den Überständen, der jeweiligen Versuchsreihen resuspendiert und anschließend in einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen pro 200 µl auf die Matrigel-beschichtete 48-Well-Platte ausgesät:

1. *Indirekte Stimulation (s. Abb. 17):*

Vehikelkontrolle (serumfreies DMEM-Medium und 0,1% DMF); konditionierte Medien Vehikel- oder Cisplatin-behandelter-A549-, H358- oder BEAS2-2B-Zellen (0,01; 0,1; 1  $\mu$ M Cisplatin)

2. *Direkte Stimulation (s. Abb. 15):*

Vehikelkontrolle (serumfreies DMEM-Medium und 0,1% DMF); serumfreies DMEM-Medium und Cisplatin (0,01; 0,1; 1  $\mu$ M)

3. *Schlüsselexperiment TIMP-1-siRNA-Knockdown (s. Abb. 19):*

Konditionierte Medien stimuliert mit Vehikel 0,1% DMF, Cisplatin 1 $\mu$ M, Cisplatin 1 $\mu$ M und TIMP-1-siRNA, TIMP-1-siRNA, Cisplatin 1 $\mu$ M und non-si-, non-si

Danach erfolgte eine weitere Inkubation über 2 Stunden (im Vergleich zu Ramer et al. (2014) mit 24 Stunden). Diese Zeit erwies sich als ausreichend, damit sich HUVECs zu geschlossenen Intersektionen formieren konnten. Um den *Tube-Formation-Assay* auszuwerten, wurden mikroskopische Sichtfelder des Matrigel-beschichteten Wellbodens fotografiert. Diese wurden nun nach röhrenartigen Strukturen, welche geschlossene Abzweigungen bildeten, abgesucht und gezählt. Die Auswertung wurde verblindet durchgeführt.

#### 2.2.10 Auswertung und Statistik

Gruppenvergleiche wurden mit einer one-way-ANOVA und einem darauffolgenden *post-hoc* Bonferroni- oder Dunnett-Test durchgeführt. In Abb. 19 beschränkte sich die Bewertung der statistischen Signifikanz auf die jeweiligen Gruppen von Interesse. Vehikelkontrolle (1. Triplett) vs. Cisplatin-behandelte Zellen (2. Triplett) und 2. Triplets vs. Cisplatin-behandelte Zellen in Anwesenheit von TIMP-1-siRNA (3. Triplett). IC<sub>50</sub>-Werte wurden berechnet durch eine nicht-lineare Regression von log(Inhibitor) vs. Reaktion unter Verwendung der kleinsten Quadrate als Anpassungsmethode in einer 4-Parameter-Berechnung mit einer variablen Steigung. Konzentrationen (X) wurden umgewandelt in log(X). Die nicht-lineare Regression wurde mit folgender Formel berechnet:  $Y = \text{Unten} + (\text{Oben} - \text{Unten}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{Steigung})})$ . Oberes und unteres Plateau sind definiert als minimaler (100% Viabilität) und maximaler (0% Viabilität) Verlust von Viabilität als Reaktion auf die Konzentrationen (X). Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0 durchgeführt. Die Quantifizierung der Proteinbanden der durchgeführten Western Blots erfolgte mittels einer videodensitometrischen Analyse mit der *Quantity One<sup>®</sup> 1-D Analysis Software*.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Gewinnung der Überstände und Lysate

Um Regulationen von TIMP-1 und MMP-2 zu ermitteln, wurden A549-, H358- und BEAS-2B-Zellen in 48-Well-Platten mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und wie unter Abschnitt 2.2.2 und 2.2.8 beschrieben, stimuliert bzw. transfiziert. Nach einer 48-stündigen Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen, bei  $1.300 \times g$  für 5 Minuten zentrifugiert und für die *Western-Blot*-Analyse von TIMP-1 und MMP-2 benutzt. Die zurückgebliebenen Zellen am Boden der Wells wurden zur *Western-Blot*-Analyse von  $\beta$ -Aktin lysiert. Dabei wurden die Zellen gewaschen, unter dem Abzug getrocknet und anschließend mit einem Lysispuffer (100  $\mu$ l pro Well) behandelt. Nach Ablösung der Zellen vom Boden der Wells wurde jeder Wellinhalt einzeln in ein Reaktionsgefäß überführt, dann für 30 Minuten auf Eis gelagert und dabei mehrmals gevortext. Danach wurden die Reaktionsgefäße in einer Zentrifuge für 5 Minuten bei  $10.000 \times g$  abzentrifugiert. Die Überstände wurden dann weiter zur *Western-Blot*-Analyse der Lysate benutzt. Gleiche Mengen an Protein aus Zell-Lysaten ( $\beta$ -Aktin) und gleiche Volumina von konditionierten Medien (TIMP-1, MMP-2) wurden für die anschließende *Western-Blot*-Analyse verwendet.

### 2.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Bevor mit der *Western-Blot*-Analyse begonnen werden konnte, musste der Proteingehalt der einzelnen Proben der Lysate bestimmt werden. Aufgrund des fehlenden *Housekeeping*-Proteins in konditionierten Medien wurde die TIMP-1-Western-Blotting-Analyse der konditionierten Medien durch eine  $\beta$ -Aktin-Analyse der entsprechenden Zelllysate ergänzt, um eine mögliche toxische Wirkung der jeweiligen Testsubstanzen zu dokumentieren. Zur Bestimmung des Gesamtproteins wurde das *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit* benutzt. Zuerst wurde die enthaltene BCA-Lösung (2mg/ml) mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:1 vermischt und zur Erstellung einer Eichgerade benutzt. Die Lysate wurden dann im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Anschließend wurden die Proben der Eichgerade als Doppelbestimmung (10  $\mu$ l pro Well) und die Proben der Lysate als Dreifachbestimmung (10  $\mu$ l pro Well) auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Nun wurden Lösung A und B aus dem *BCA-Kit* im Verhältnis 50:1 gemischt und davon jeweils 200  $\mu$ l zu den Proben gegeben. Nachfolgend

wurde die 96-Well-Platte für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und darauf die Extinktion mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Aus den Extinktionswerten konnten nun mit Hilfe der Eichgeraden die Proteinmengen in µg/µl ermittelt werden.

### 2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) stellt eine Methode dar, um Proteine nach ihrer Molekülgröße durch elektrophoretische Auftrennung zu sortieren. Das SDS, also Sodiumdodecylsulfat, übernimmt dabei die Aufgabe, die Eigenladung der Proteine mit einer negativen Ladung zu überdecken. Somit können die einzelnen Proteine nach Anlegung eines elektrischen Feldes von der negativ geladenen Kathode zur positiv geladenen Anode wandern. Dabei gilt je kleiner die Molekülgröße, desto schneller bewegt sich das Protein im Polyacrylamidgel. Am Ende des Verfahrens befinden sich also im unteren Teil die leichtesten Proteine im oberen Teil die Schwersten. In der Vorbereitungsphase müssen die Polyacrylamidgele zuerst hergestellt werden. Sie bestehen aus einer Sammelgelschicht und einer Trenngelschicht. Im Sammelgel befinden sich kleine Aussparungen bzw. Taschen, in welche die Proteinproben pipettiert und angehäuft werden. Im Trenngel findet dann die Auftrennung nach Molekülgröße statt. Folgende Komponenten waren notwendig, um die Gele herzustellen (Mengenangaben bezogen auf vier Gele á 1mm):

**Tab. 11. Bestandteile der Polyacrylamidgele**

<b>Sammelgel</b>	1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
	10% (w/v) SDS	0,1 ml
	30%/0,8% (w/v) Polyacrylamid	1,3 ml
	TEMED	0,01 ml
	10% (w/v) APS	0,05 ml
	Aqua dest.	6,1 ml
<b>Trenngel</b>	1,5 M Tris (pH 8,8)	5,0 ml
	10% (w/v) SDS	0,2 ml
	30%/0,8% (w/v) Polyacrylamid	6,6 ml
	TEMED	0,01 ml
	10% (w/v) APS	0,1 ml
	Aqua dest.	8,1 ml

Nach der Fertigstellung wurden die Gele in einer Gelelektrophoresekammer vertikal aufgespannt und mit elektrolythaltigem Laufpuffer umspült. Die zu untersuchenden Proben wurden nun mit fünffach konzentriertem Ladepuffer, sogenannter Lämmli-Puffer, vermengt und für 10 Minuten bei 95 °C aufgekocht. Die Proteine wurden dadurch denaturiert, das heißt Wasserstoffbindungen wurden aufgebrochen und das Protein kehrt in die Primärstruktur zurück. Um zusätzlich Disulfidbrücken aufzuspalten, enthielt der Ladepuffer  $\beta$ -Mercaptoethanol. Die Proben wurden nun vorsichtig in die Taschen des Ladegels pipettiert. Danach wurde eine Stromstärke von 15 mA pro Gel angelegt, nachdem die Proben das Trenngel erreicht haben, wurde die Stromstärke auf 25 mA pro Gel erhöht. In eine Tasche neben den zu untersuchenden Proben wurde ein Lauffrontmarker (Prestained Broad Range Marker, Bio-Rad) eingebracht. So konnte man die verbleibende Laufzeit abschätzen, je nachdem welches Protein und welche Proteingröße untersucht wurde.

#### 2.3.4 Western Blot

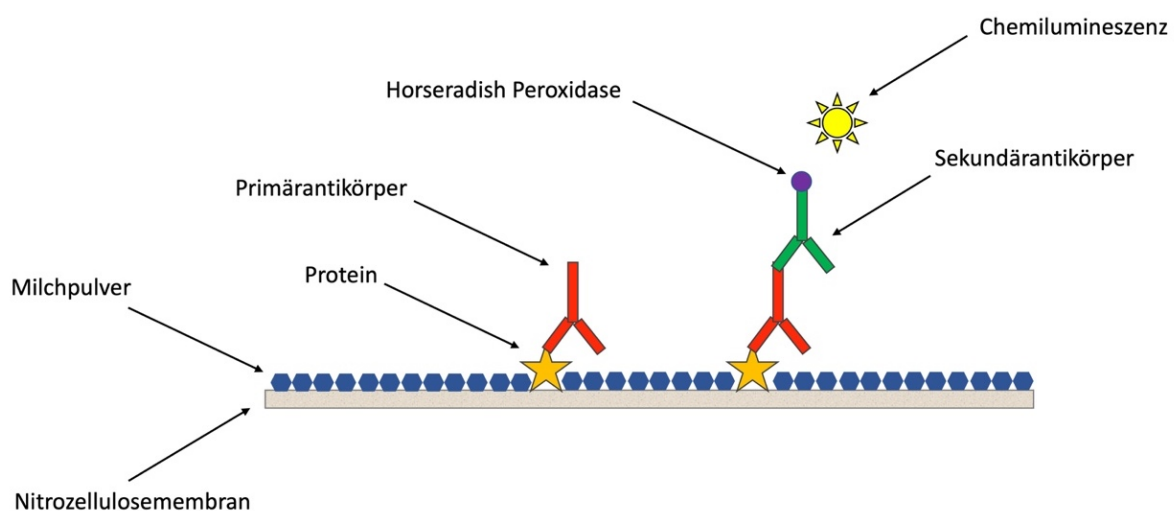
Um die Proteine, die sich bei der SDS-PAGE nach Größe aufgetrennt haben, nun auf eine Membran zu übertragen und später sichtbar zu machen, benötigt es ein weiteres Verfahren, den *Western Blot*. Dazu werden die Polyacrylamidgele aus der Gelelektrophoresekammer entfernt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran gelegt. Zusammengespannt, Gel zur negativ geladenen Kathode und Membran zur positiv geladenen Anode, werden beide wieder vertikal in eine Blot-Kammer eingesetzt und wiederum mit elektrolythaltigem Laufpuffer umspült. Dabei muss besonders darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen zwischen Gel und Membran befinden. Nach Anlage eines elektrischen Feldes werden die immer noch durch das SDS negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran übertragen. Die Proteine bleiben aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen an der Nitrozellulosemembran haften. Für zwei Stunden wurde eine Stromstärke von 200 mA pro Gel angelegt. Da bei diesem Verfahren viel Wärme entsteht, wurde die Blot-Kammer im Eisbad abgekühlt.

#### 2.3.5 Immundetektion und Chemilumineszenz-Analyse

Um die auf die Membran übertragenen Proteine sichtbar zu machen, wurde eine spezifische Antigen-Antikörper-Bindung benutzt. Ein spezifischer Primärantikörper bindet dabei an das Epitop des zu untersuchenden Proteins, der  $f_c$ -Anteil des Primärantikörpers bindet daraufhin

an einen spezifischen Sekundärantikörper. Der Sekundärantikörper hat nun seinerseits an seinem  $f_c$ -Anteil ein Reporterenzym gebunden, die sogenannte *horseradisch peroxidase* (HRP). Im nächsten Schritt wird das Chemilumineszenz-Kit (ECL-Kit) hinzugegeben. Die Peroxidase oxidiert nun das darin enthaltene Luminol. Das entstehende Produkt ist chemilumineszierend und kann mit einer sehr lichtempfindlichen Kamera (ChemiDoc<sup>®</sup>) detektiert werden.

Die Nitrozellulosemembran wurde also nach dem zweistündigen Blotvorgang für eine Stunde in einer 5%-igen Milchpulverlösung gebadet. So konnte sichergestellt werden, dass freie Proteinbindungsstellen auf der Membran blockiert sind und falsch-positive Antikörperbindungen ausbleiben. Danach wurde die Membran zweimal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Nach dem Waschvorgang erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C mit einem Primärantikörper, aufgelöst in 1%-igem Milchpulver. Am nächsten Tag wurde die Membran wiederum zweimal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper, aufgelöst in 1%-igem Milchpulver, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nun folgte ein letzter Waschgang mit TBS-T. Währenddessen wurde die Lösungen des *ECL-Kits* unter Lichtausschluss vermengt. Die fertig gewaschene Membran wurde in die Geldokumentationsanlage (ChemiDoc<sup>®</sup>) eingelegt und mit dem *ECL-Kit* benetzt. Die Banden der zu untersuchenden Proteine leuchteten nun auf und konnten durch die Kamera digital dokumentiert werden.



**Abb. 13. Schematische Darstellung der Immundetektion.** Ein spezifischer Primärantikörper setzt am Epitop des Zielproteins an und wird wiederum von einem spezifischen Sekundärantikörper an seinem  $f_c$ -Anteil gebunden. Der Sekundärantikörper hat eine Horseradisch Peroxidase an dessen  $f_c$ -Anteil gebunden, der nun Luminol oxidiert und so Chemilumineszenz verursacht.

### 2.3.6 Konservierung von Membranen

Nach der Chemilumineszenz-Analyse wurden die untersuchten Membranen mit einem Glycin-Strip-Puffer für zweimal 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend mit TBS-T gewaschen und nochmal für 1 Stunde in 5%-iger Milchpulverlösung gebadet. Danach erfolgte eine Trocknung der Membranen bei Raumtemperatur und anschließend eine Asservierung in einer speziellen Plastikfolie. Durch diesen Prozess wurden die Antikörper-Protein-Bindungen gelöst und die Membran für eine spätere erneute Immundetektion eines anderen Proteins konserviert.

### 2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um die Induktion eines Proteins auf mRNA-Ebene, also zwischen Transkription und Translation, zu untersuchen, ist die Polymerase-Kettenreaktion die Methode der Wahl (im Speziellen *quantitative real-time reverse transcriptase PCR*). Die quantitative Analyse von TIMP-1-mRNA wurde nach vorbeschriebenem Beispiel (Hinz, Rosch, Ramer, Tamm, & Brune, 2005) mit leichten Modifikationen durchgeführt. Das Prinzip der qRT-PCR beruht auf Fluoreszenz-Messungen, welche simultan zum PCR-Zyklus durchgeführt werden. Dabei steigt die Fluoreszenz proportional zur Anzahl der PCR-Produkte, in unserem Fall der TIMP-1-mRNA. Auf einer 24-Well-Platte wurden  $2,5 \times 10^4$  Zellen pro Well in DMEM-Komplettmedium (10% FCS) ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen gewaschen und wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben mit Cisplatin (0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,1  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. Nach 8, 24 und 48 Stunden wurde die TIMP-1-mRNA gemessen. Die Gesamt-RNA wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen GmbH) isoliert. TIMP-1-mRNA-Spiegel und  $\beta$ -Aktin (interner Standard) wurden durch die qRT-PCR unter Verwendung des *TaqMan<sup>®</sup> RNA-to-CTTM 1-Step-Kit* und *TaqMan<sup>®</sup>-Gene-Expression-Assays* (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) bestimmt.

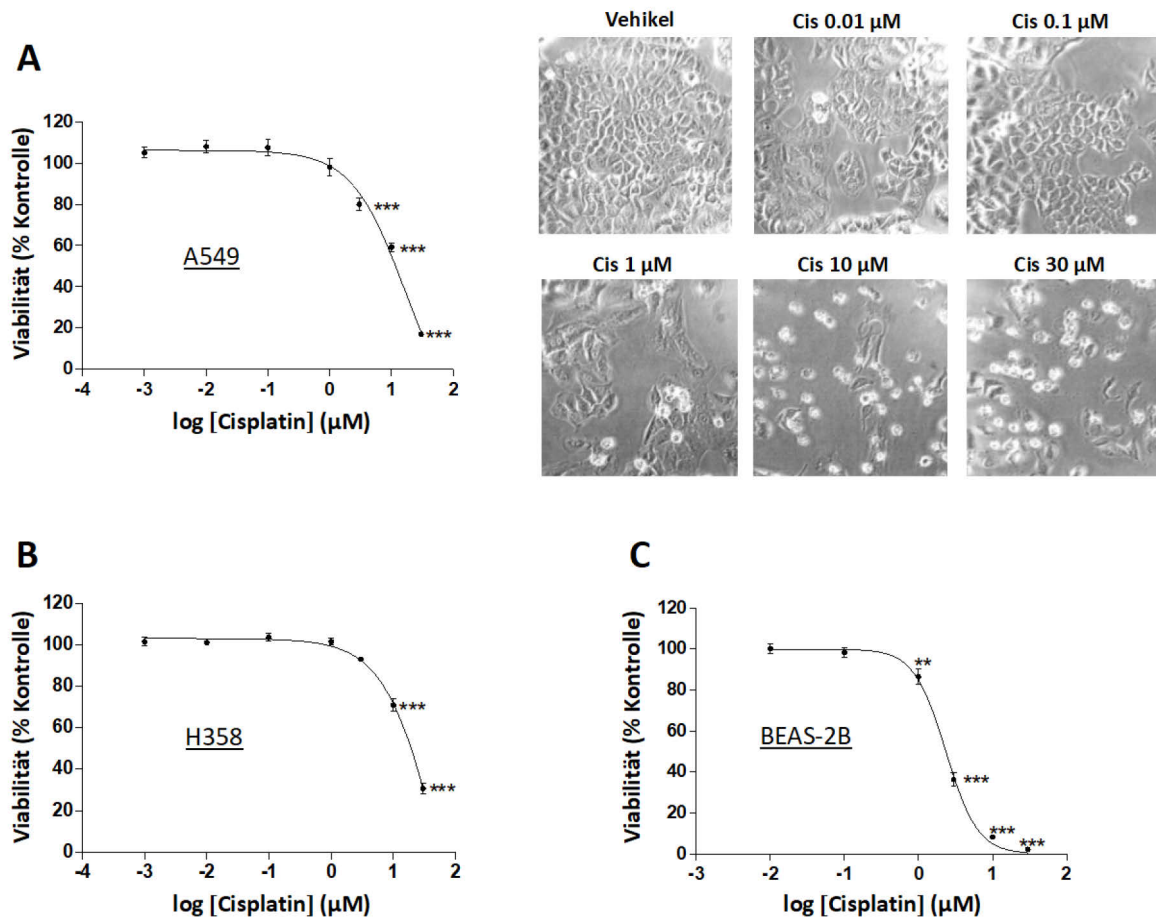


### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von Cisplatin auf die Viabilität von Lungenkarzinomzellen und Nicht-Tumor-Epithelzellen

Die ersten Experimente wurden durchgeführt, um die Toxizität von Cisplatin gegenüber den verwendeten Zelllinien A549-, H358- und BEAS-2B zu bestimmen. Ziel dabei war es, nichttoxische Konzentrationen von Cisplatin zu ermitteln, um in nachfolgenden Experimenten eine mögliche Beeinflussung der Angiogenese durch toxische Substanzwirkungen auszuschließen. Die Zellen wurden hierbei mit einer Konzentration von  $1 \times 10^{-3} \mu\text{M}$  (A549, H358) oder  $1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$  (BEAS-2B) bis  $30 \mu\text{M}$  Cisplatin stimuliert und für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität mittels WST-1-Tests ermittelt. Die Inkubationszeit von 48 Stunden wurde ausgewählt, da sich diese Zeitspanne laut Ramer et al. (2014) als ausreichend erwies, um durch konditioniertes Medium von A549-, H358- und BEAS-2B-Zellen die Migration, Viabilität und Tubulogenese von HUVECs zu induzieren.

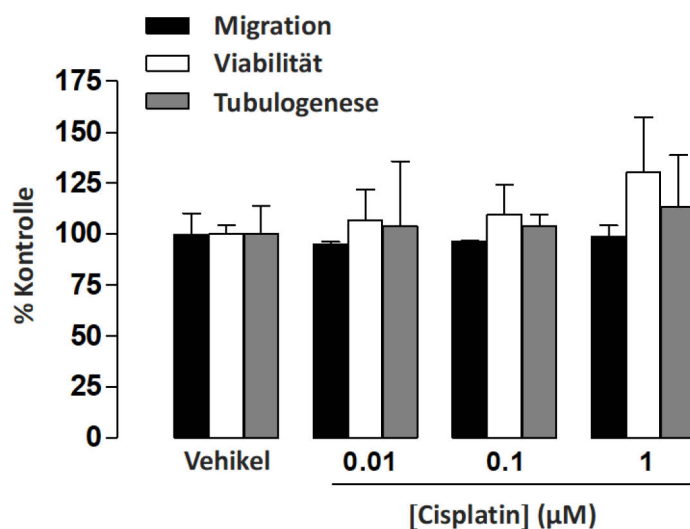
Nach Auswertung des Viabilitäts-Assays zeigte sich, dass Cisplatin erhebliche toxische Effekte auf A549- und H358-Lungenkarzinomzellen hat, die bereits bei Konzentrationen von  $3 \mu\text{M}$  (A549-Zellen) und  $10 \mu\text{M}$  (H358-Zellen) statistisch signifikant waren (Abb. 14A, 14B). Auch die Zellmorphologie wurde gravierend beeinflusst. Bei A549-Zellen, die  $10$  oder  $30 \mu\text{M}$  Cisplatin für 48 Stunden ausgesetzt waren, zeigten sich charakteristische Merkmale der Apoptose wie *membrane blebbing* (Bläschenbildung) sowie viele *floating-cells* (sich vom Boden ablösende Zellen) (Abb. 14A, rechts). Bei Konzentrationen von Cisplatin  $\leq 1 \mu\text{M}$  zeigten sich jedoch keine signifikanten toxischen Effekte gegenüber A549- und H358-Zellen (Abb. 14A, 14B). Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte von Cisplatin in Bezug auf die Viabilität von A549- und H358-Zellen betragen  $11,3 \mu\text{M}$  bzw.  $17,8 \mu\text{M}$ . Es stellte sich heraus, dass die Zelllinie BEAS-2B (Nicht-Tumorzellen aus humanem bronchialem Epithelgewebe) mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $2,35 \mu\text{M}$  noch empfindlicher gegenüber der toxischen Wirkung von Cisplatin ist. Die mittlere inhibitorische Konzentration, kurz  $\text{IC}_{50}$ , ist ein Maß für die Wirkstärke, mit der eine Substanz einen biochemischen Stoff (z.B. ein Enzym) bzw. die von ihm abhängige biochemische Reaktion *in vitro* hemmt. Die Bestimmung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte wird in Abschnitt 2.2.10 beschrieben.



**Abb. 14. Einfluss von Cisplatin auf die Viabilität von Lungenkarzinomzellen und Nicht-Tumor-Epithelzellen.** Die Viabilität von A549 (A)-, H358 (B)- und BEAS-2B-Zellen (C) wurde durch einen WST-Assay bestimmt. Zuvor wurden die Zellen mit Vehikel oder den angegebenen Konzentrationen von Cisplatin in serumfreiem DMEM-Medium stimuliert und für 48 Stunden inkubiert. Die Bilder oben rechts zeigen A549-Zellen nach einer 48-stündigen Inkubation mit den jeweils angegebenen Cisplatin-Konzentrationen. Der Prozentsatz der Kontrolle stellt den Vergleich mit Vehikel behandelten Zellen (als 100% festgelegt) in Abwesenheit von Cisplatin dar. Die angegebenen Werte sind der Mittelwert  $\pm$  SEM von  $n = 18-20$  (A, B) oder  $n = 21$  (C). \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  gegenüber entsprechender Vehikel-Kontrolle, one-way-ANOVA plus post-hoc-Dunnnett-Test.

### 3.2 Einfluss von Cisplatin auf Migration, Viabilität und Tubulogenese von HUVECs

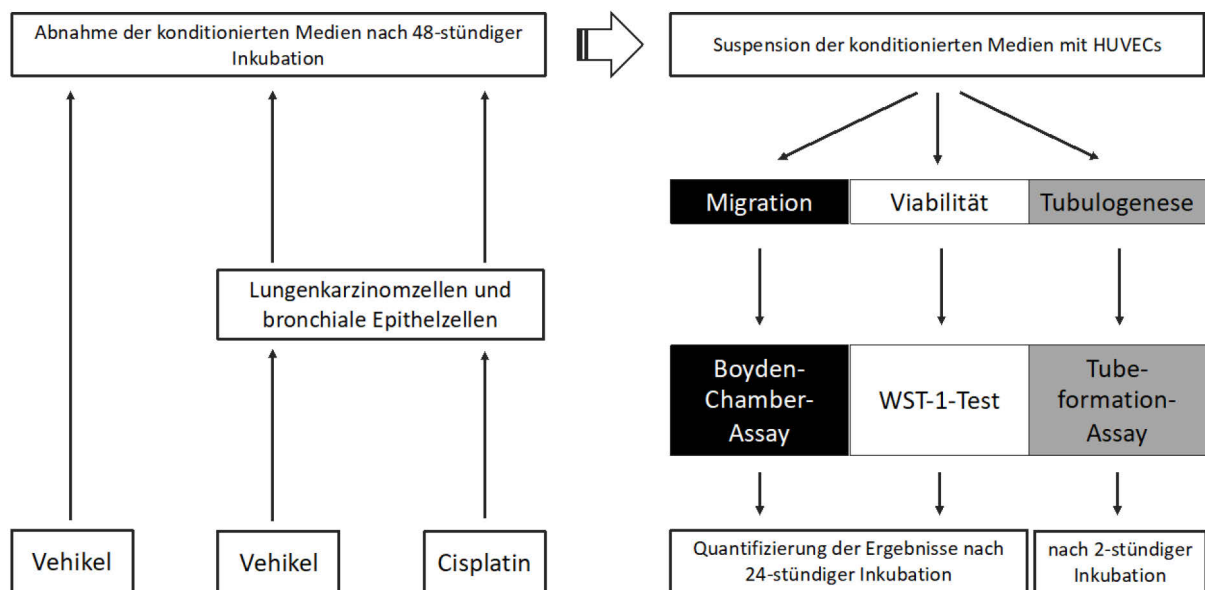
Im Anschluss an die Experimente zur Cisplatin-Toxizität folgten Versuche, um den direkten Einfluss von Cisplatin auf das Migrationsverhalten, die Viabilität und Tubulogenese von humanen umbilikalen Venenendothelzellen (HUVEC) zu ermitteln. HUVECs wurden mit Cisplatin-Konzentrationen  $\leq 1 \mu\text{M}$  (0,01; 0,1; 1) stimuliert und für 24 Stunden inkubiert. Auch dieses Behandlungsprotokoll wurde aufgrund kürzlich veröffentlichter Forschungsergebnisse ausgewählt. Ramer et al. (2014) zufolge ist eine Inkubationszeit von 24 Stunden ausreichend, um die Migration und Viabilität von HUVECs, welche konditionierten Medien von Lungenkarzinomzellen ausgesetzt waren, zu beobachten. Als Ergebnis zeigte sich, dass das Migrationsverhalten und die Viabilität von HUVECs durch den direkten Einfluss von Cisplatin unverändert blieben (Abb. 15). Keine signifikanten Veränderungen zeigten sich ebenso bei der Tubulogenese von HUVECs, die 2 Stunden lang den oben angegebenen Cisplatin-Konzentrationen ausgesetzt waren (Abb. 15).



**Abb. 15. Einfluss von Cisplatin auf das Migrationsverhalten, Viabilität und Tubulogenese von HUVECs.** Die Migration (schwarze Balken, modifizierter Boyden-Chamber-Assay) und die Viabilität (weiße Balken, WST-1-Test) von HUVECs wurde nach 24-stündiger Inkubation gemessen, die Tubulogenese (graue Balken, Tube-Formation-Assay) von HUVECs nach 2-stündiger Inkubation. Stimuliert wurde jeder Ansatz mit Vehikel oder den angegebenen Konzentrationen von Cisplatin. Der Prozentsatz der Kontrolle stellt den Vergleich mit Vehikel behandelten Zellen (als 100% festgelegt) in Abwesenheit von Cisplatin dar. Die angegebenen Werte sind der Mittelwert  $\pm$  SEM von  $n = 3$ . Die statistische Analyse erfolgte mit einem *one-way-ANOVA*, gefolgt von einem *post-hoc-Dunnett-Test*. Jedoch wurde zwischen den mit Vehikel- und Cisplatin-behandelten Zellen keine statistische Signifikanz festgestellt.

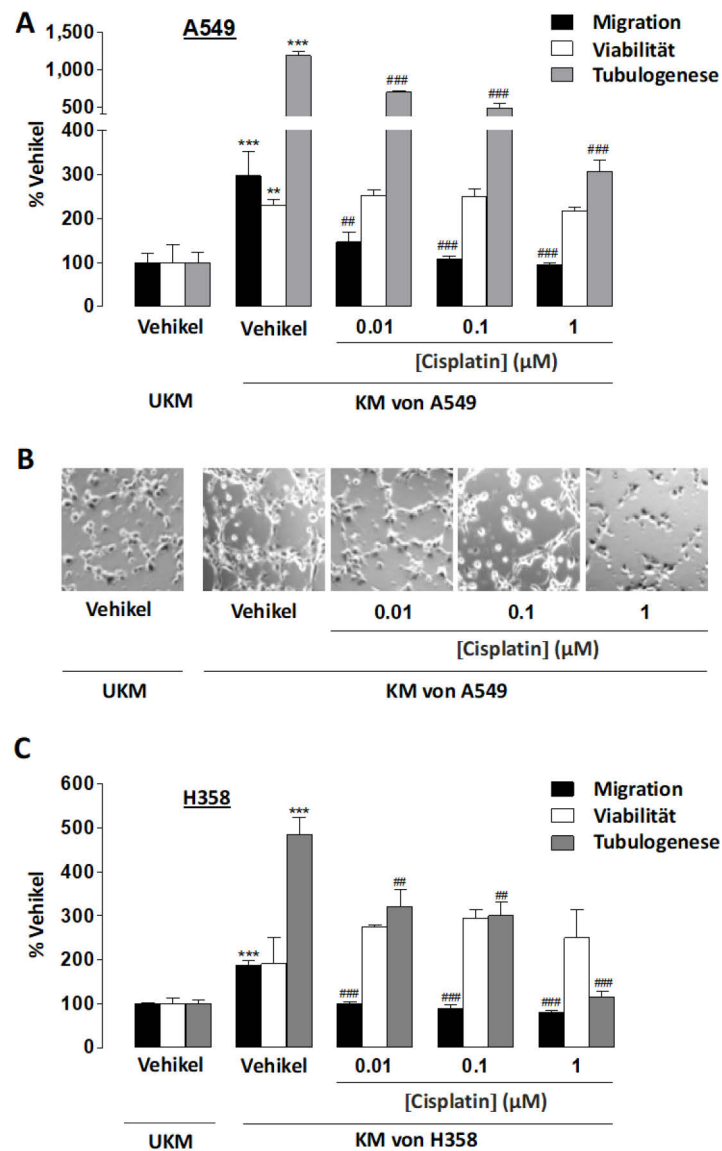
### 3.3 Einfluss von konditionierten Medien von Cisplatin-behandelten Lungenkarzinomzellen auf Migration, Viabilität und Tubulogenese von HUVECs

Im nächsten Schritt wurde die Wirkung von konditionierten Medien auf HUVECs untersucht. Zunächst wurden A549-Zellen mit Vehikel oder Cisplatin-Konzentrationen  $\leq 1 \mu\text{M}$  stimuliert und für 48 Stunden inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die konditionierten Medien abgenommen, zur Resuspension von HUVECs verwendet und anschließend auf Transwell-Platten zur Analyse der Migration oder auf 96-Well-Platten zur Analyse der Viabilität ausgesät. Die Ansätze wurden für weitere 24 Stunden inkubiert. Für die Analyse der Tubulogenese von in konditionierten Medien resuspendierten HUVECs, wurde eine mit Matrigel beschichtete 48-Well-Platte benutzt und für 2 Stunden inkubiert. Ein Schema des Bewandlungsprotokolles ist in Abbildung 16 dargestellt.



**Abb. 16. Behandlungsprotokoll zur Quantifizierung der Wirkung von konditionierten Medien auf das Verhalten von Endothelzellen.** Konditionierte Medien wurden durch Inkubation von A549-, H358- und BEAS-2B-Zellen mit einem Vehikel oder Cisplatin-Konzentrationen von 0,01 – 1  $\mu\text{M}$  hergestellt. Darauf wurden HUVECs in serumfreiem DMEM-Medium oder den zuvor abgenommenen konditionierten Medien der verschiedenen Zelllinien resuspendiert. Das Migrationsverhalten wurde in Boyden-Chamber-Assays quantifiziert. Die Viabilität wurde mittels WST-1-Tests festgestellt. Die Tubulogenese wurde durch die Auszählung der röhrenartigen Strukturen, die geschlossene Kreuzungen auf einer Matrigel-Schicht bildeten, ermittelt. Die Inkubationszeit für die genannten Experimente betrug 24 Stunden für Migrations- und Viabilitäts-Assay und 2 Stunden für den Tube-Formation-Assay.

Es zeigte sich, dass konditioniertes Medium von mit Vehikel-behandelten A549-Zellen einen signifikanten Anstieg der Migration, Viabilität und Tubulogenese von HUVECs auslöste, im Vergleich zu HUVECs, die ausschließlich Vehikel-enthaltendem DMEM-Medium (UKM, unkonditioniertes Medium) ausgesetzt waren, d.h. ohne Kontakt zu Tumorzellen (Abb. 17A, zweites Triplet vs. erstem Triplet). Konditionierte Medien von Cisplatin-behandelten A549-Zellen zeigten jedoch eine signifikante konzentrationsabhängige Abnahme von Migration (Abb. 17A, schwarze Balken) und Tubulogenese (Abb. 17A, graue Balken, Abb. 17B) von HUVECs im Vergleich zu konditionierten Medien von mit Vehikel-behandeltem A549-Zellen. Im Gegensatz dazu blieb die Viabilität der HUVECs praktisch unverändert (Abb. 17A, weiße Balken). Weiterhin wurden auch H358-Zellen demselben Behandlungs-Protokoll unterzogen, um einen Zelllinien-spezifischen Effekt auszuschließen. Konditionierte Medien von mit Vehikel-behandelten H358-Zellen verursachten ebenfalls eine signifikante Zunahme der Migration und Tubulogenese von HUVECs im Vergleich zu unkonditionierten Medien (Abb. 17C, zweites Triplet vs. erstem Triplet, schwarze und graue Balken). Auch die Viabilität der HUVECs wurde gesteigert, erreichte allerdings keine statistische Signifikanz (Abb. 17C, zweites Triplet vs. erstem Triplet, weiße Balken). Konditionierte Medien von Cisplatin-behandelten H358-Zellen zeigten, wie erwartet, eine signifikante konzentrationsabhängige Abnahme von Migration (Abb. 17C, schwarze Balken) und Tubulogenese (Abb. 17C, graue Balken) von HUVECs im Vergleich zu konditionierten Medien von mit Vehikel-behandeltem H358-Zellen. Die HUVEC-Viabilität wurde, wie im vorherigen Versuch, von keiner der Cisplatin-Konzentrationen signifikant verändert.



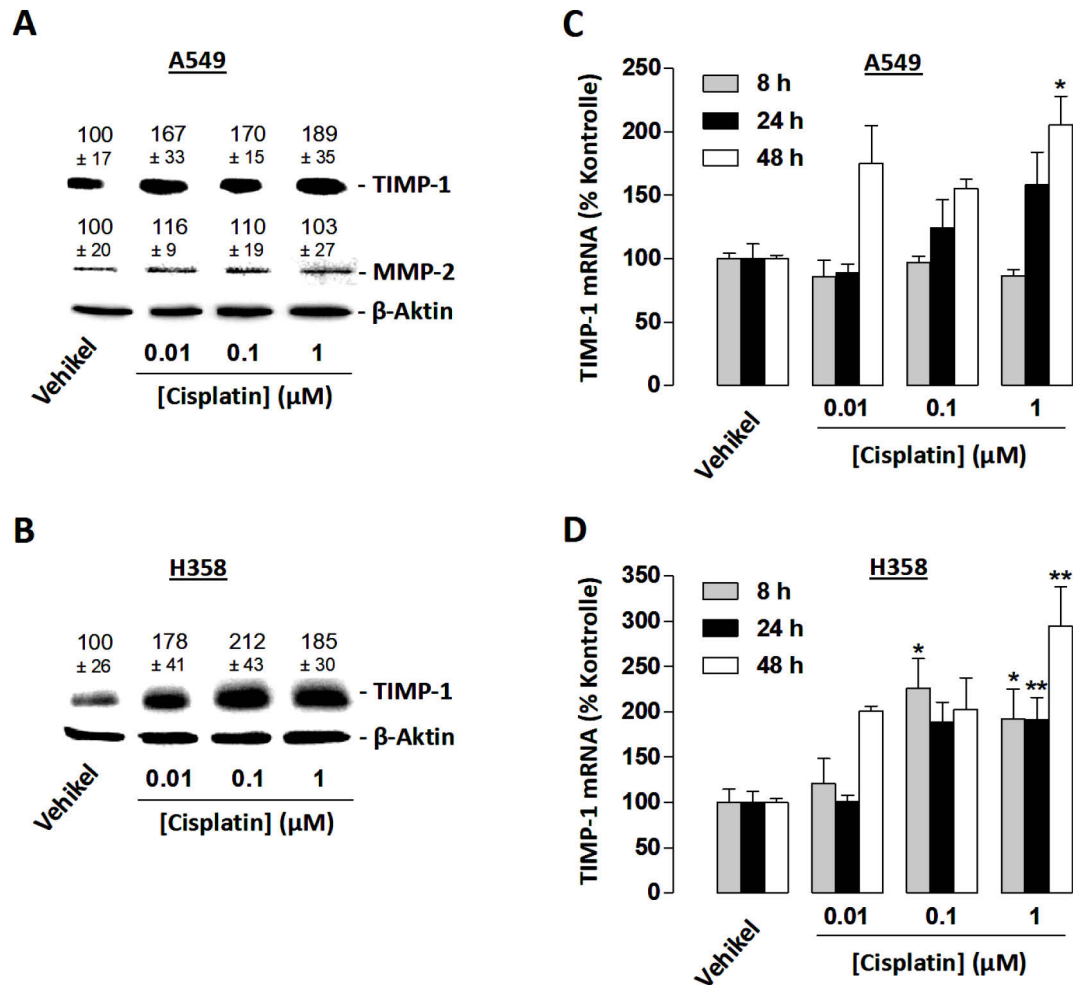
**Abb. 17. Einfluss von konditionierten Medien Cisplatin-behandelter Lungenkarzinomzellen auf Migration, Viabilität und Tubulogenese von HUVECs.** (A) und (C) Migration (schwarze Balken, modifizierter Boyden-Chamber-Assay), Viabilität (weiße Balken, WST-1-Test) und Tubulogenese (graue Balken, Tube-Formation- Assay) von HUVECs nach Resuspendierung in serumfreiem Vehikel-beinhaltenden DMEM-Medium (unkonditioniertes Medium [UKM]) oder konditioniertem Medium von Vehikel und Cisplatin-behandelten A549-Zellen (A) oder H358-Zellen (C). Migration und Viabilität wurden 24 Stunden nach Resuspendierung gemessen, Tube Formation 2 Stunden nach Resuspendierung. A549- und H358-Zellen wurden zuvor für 48 Stunden mit Vehikel oder 0.01  $\mu$ M bis 1  $\mu$ M Cisplatin in serumfreiem DMEM-Medium inkubiert. (B) Phasenkontrastbilder der Tube Formation von HUVECs aus (A) auf einer Matrigel-Schicht 2 Stunden nach Resuspendierung. Der Prozentsatz der Kontrolle stellt den Vergleich mit UKM (als 100% festgelegt), serumfreies DMEM-Medium von Vehikel-behandelten HUVECs in Abwesenheit von Cisplatin und Krebszellen, dar. Die angegebenen Werte sind der Mittelwert  $\pm$  SEM von  $n = 6$  (A, Migration) und  $n = 3$  (A, Viabilität und Tube Formation; C). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. Vehikel-beinhaltendem UKM. ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  vs. KM von Vehikel-behandelten A549 -und H358 Zellen, one-way-ANOVA plus post-hoc Bonferroni-Test.

### 3.4 Konzentrationsabhängiger Effekt von Cisplatin auf die TIMP-1-Expression von A549- und H358-Zellen

Nachdem in vorherigen Experimenten gezeigt wurde, dass konditionierte Medien von mit Cisplatin-behandelten Lungenkarzinomzellen das Migrationsverhalten sowie die Tubulogenese von HUVECs inhibieren, wurden nun Experimente zur genaueren Differenzierung des zugrundeliegenden Mechanismus durchgeführt. Laut Ramer et al. (2014) kommt es zur TIMP-1-Freisetzung aus Lungenkarzinomzellen im Rahmen der antiangiogenen Wirkung von Cannabinoiden, außerdem wurde gezeigt, dass auch Cisplatin eine TIMP-1-Induktion in Lungenkarzinomzellen bewirkt (Ramer et al., 2007). Deshalb konzentrierten sich nachfolgende Experimente auf eine mögliche antiangiogene Wirkung von TIMP-1 in konditionierten Medien von mit Cisplatin-behandelten A549- und H358-Zellen.

Hierzu wurden die beiden Lungenkarzinomzelllinien mit Vehikel und Cisplatin-Konzentrationen von 0,01  $\mu\text{M}$  bis 1  $\mu\text{M}$  stimuliert und für 48 Stunden inkubiert. Ziel war es, eine wahrscheinliche Induktion von TIMP-1-mRNA sowie die Freisetzung des TIMP-1-Moleküls in konditionierten Medien nachzuweisen. In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen, die zeigten, dass 30  $\mu\text{M}$  Cisplatin TIMP-1 in A549-Zellen induziert (Ramer et al., 2007), wurde eine erhöhte Freisetzung von TIMP-1 in konditionierten Medien von A549-Zellen bereits bei einer Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  Cisplatin beobachtet (Abb. 18A). Gleiches konnte mit H358-Zellen bestätigt werden (Abb. 18B). Auffällig dabei war, dass die TIMP-1-Proteinspiegel in konditionierten Medien von H358-Zellen bei 1  $\mu\text{M}$  Cisplatin eine Sättigung anzeigten im Gegensatz zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg bei A549-Zellen (Abb. 18B).

Außerdem wurde von Ramer et al. (2007) gezeigt, dass die MMP-2-Expression in A549-Zellen durch 30  $\mu\text{M}$  Cisplatin praktisch nicht beeinflusst wird. Dieser Befund wurde auch bei Konzentrationen von 0,01 bis 1  $\mu\text{M}$  Cisplatin bestätigt (Abb. 18A). In H358-Zellen gelang jedoch kein Nachweis von MMP-2. *Real-time* RT-PCR-Experimente mit Lysaten von A549- oder H358-Zellen zeigten eine Hochregulierung der TIMP-1-mRNA in beiden Zelllinien (Abb. 18C, Abb. 18D). Die Zellen wurden im Vorhinein mit Vehikel oder Cisplatin-Konzentrationen von 0,01 bis 1  $\mu\text{M}$  stimuliert und dann für 8, 24 oder 48 Stunden inkubiert. Interessanterweise zeigte die TIMP-1-mRNA-Induktion in beiden Zelllinien keinen konsistenten konzentrationsabhängigen Anstieg, wahrscheinlich aufgrund der zeitlich verzögerten TIMP-1-Induktion durch die niedrigste Konzentration (0,01  $\mu\text{M}$ ).

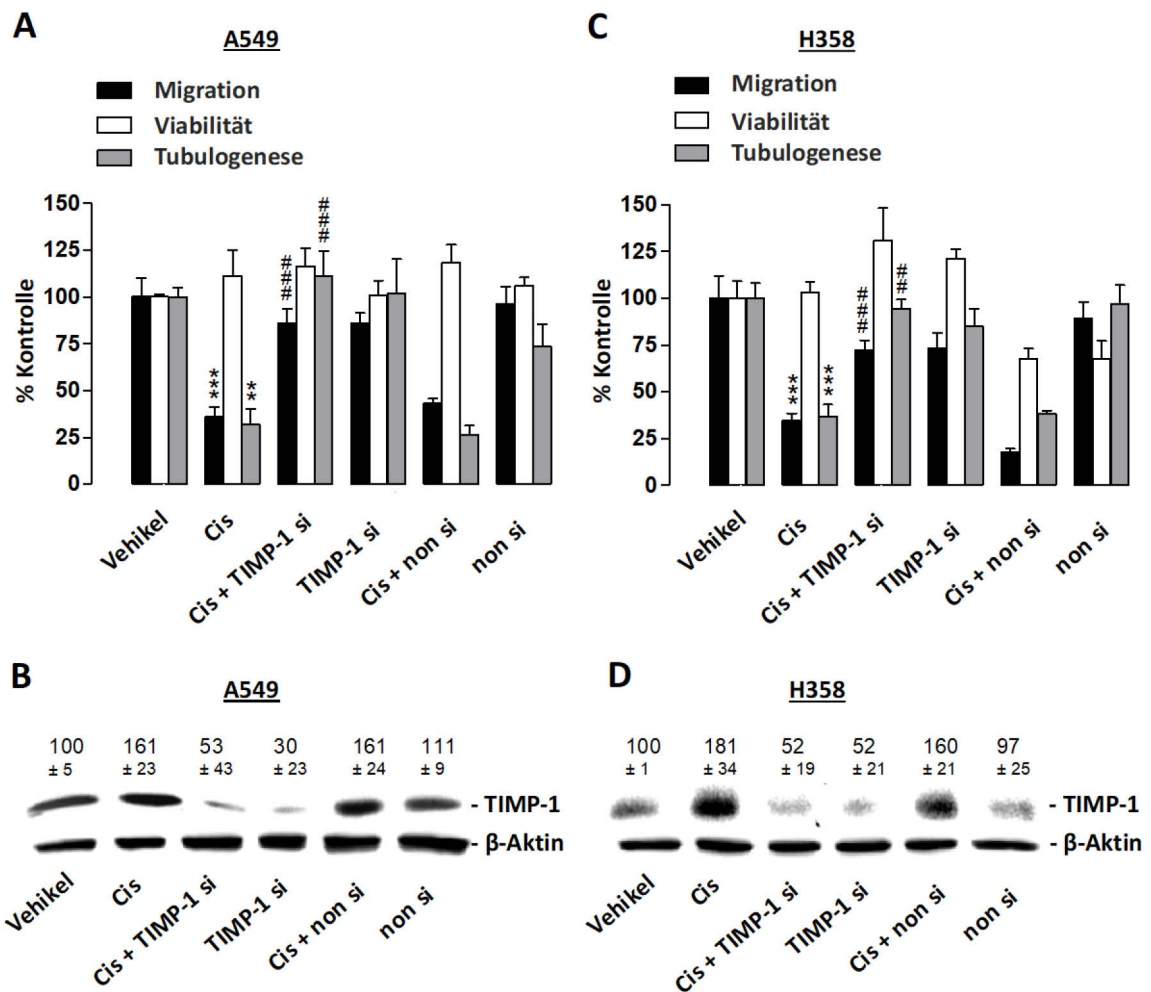


**Abb. 18. Konzentrationsabhängiger Effekt von Cisplatin auf die TIMP-1-Expression in A549- und H358-Zellen.** (A) und (B), Western-Blot Analyse von TIMP-1 in konditionierten Medien von A549- (A) und H358-Zellen (B), die vorher für 48 Stunden mit Vehikel oder den angegebenen Cisplatin-Konzentrationen behandelt wurden. Die angegebenen Werte über den Blots sind der Mittelwert  $\pm$  SEM und repräsentieren Änderungen der TIMP-1- und MMP-2-Proteinspiegel im KM im Vergleich zu mit Vehikel-behandelten Zellen (als 100% festgelegt) gemäß densitometrischer Analysen. Die Western-Blot-Analyse von TIMP-1 und MMP-2 im KM wurde durch  $\beta$ -Aktin-Analysen der jeweiligen Zelllysate ergänzt. (C) und (D), *real-time* RT-PCR-Analyse der von A549 (C)- und H358-Zellen (D) gewonnenen Lysate. Die Zellen wurden zuvor mit Vehikel oder den angegebenen Cisplatin-Konzentrationen für 8 h (graue Balken), 24 h (schwarze Balken) und 48 h (weiße Balken) inkubiert. Der Prozentsatz der Kontrolle stellt den Vergleich mit Vehikel-behandelten Zellen (als 100% festgelegt) in Abwesenheit von Cisplatin dar. Die angegebenen Werte sind der Mittelwert von  $n = 6$  (A, B),  $n = 3-4$  (C, D). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. zugehörige Vehikel-Kontrolle, *one-way*-ANOVA plus *post-hoc* Dunnett-Test.



### 3.5 Einfluss von konditionierten Medien von Cisplatin-behandelten Lungenkarzinomzellen auf die Migration, Viabilität und die Tubulogenese von HUVECs in Gegenwart und Abwesenheit von TIMP-1-siRNA

Um einen Zusammenhang zwischen der Cisplatin-induzierten TIMP-1-Expression und der antiangiogenen Wirkung konditionierter Medien von Cisplatin-behandelten Lungenkarzinomzellen nachzuweisen, wurden im nächsten Schritt Experimente mit Hilfe eines TIMP-1-siRNA-Knockdowns (Verminderung der Genexpression) durchgeführt. Hierzu wurden HUVECs mit konditionierten Medien von Lungenkarzinomzellen resuspendiert, die vorher mit Vehikel oder 1  $\mu$ M Cisplatin in Gegenwart oder Abwesenheit von TIMP-1-siRNA oder einer *non-silencing*-siRNA-Kontrolle behandelt wurden. Die unkonditionierten Medien (UKM) aus den vorherigen Experimenten, welche als Referenzgruppen dienten, wurden bei diesen Experimenten nicht mitgeführt. Der Grund hierfür ist, dass sie keine von Tumorzellen freigesetzten Komponenten enthalten und der Fokus bei diesen Experimenten auf der Wirkung von TIMP-1, welches von Tumorzellen freigesetzt wird, auf angiogene Prozesse der HUVECs liegt. Die Ergebnisse zur Migration, Viabilität und Tubulogenese von HUVECs durch konditionierte Medien von Vehikel-behandelten Lungenkarzinomzellen wurden somit als 100%-Kontrolle festgelegt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Verminderung von Cisplatin-induzierter TIMP-1-Expression den antimigrierenden Effekt von konditionierten Medien Cisplatin-behandelter Lungenkarzinomzellen auf HUVECs signifikant inhibiert (Abb. 19A, schwarze Balken). Zugleich bestätigte sich, dass TIMP-1 eine negative Wirkung auf die Tubulogenese von HUVECs besitzt (Abb. 19A, graue Balken). Im Gegensatz dazu blieb die Viabilität fast unverändert zur Kontrollgruppe (Abb. 19A, weiße Balken). Mit Hilfe des gleichen Behandlungsprotokolls wurden auch TIMP-1-Western-Blot-Analysen der konditionierten Medien von A549-Zellen durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine eindeutige Verminderung der TIMP-1-Expression (Abb. 19B). Um einen zelllinientypischen Effekt auszuschließen, wurden die Experimente ebenso mit H358-Zellen durchgeführt. Hierbei zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Es ergab sich eine signifikante Inhibierung der antiangiogenen Wirkung von konditionierten Medien Cisplatin-behandelter Lungenkarzinomzellen (Abb. 19C, schwarze und graue Balken). Die Viabilität veränderte sich nicht signifikant (Abb. 19C, weiße Balken). In den TIMP-1-Western-Blot-Analysen zeigte sich ebenfalls eine erhebliche Verminderung der TIMP-1-Expression (Abb. 19D).

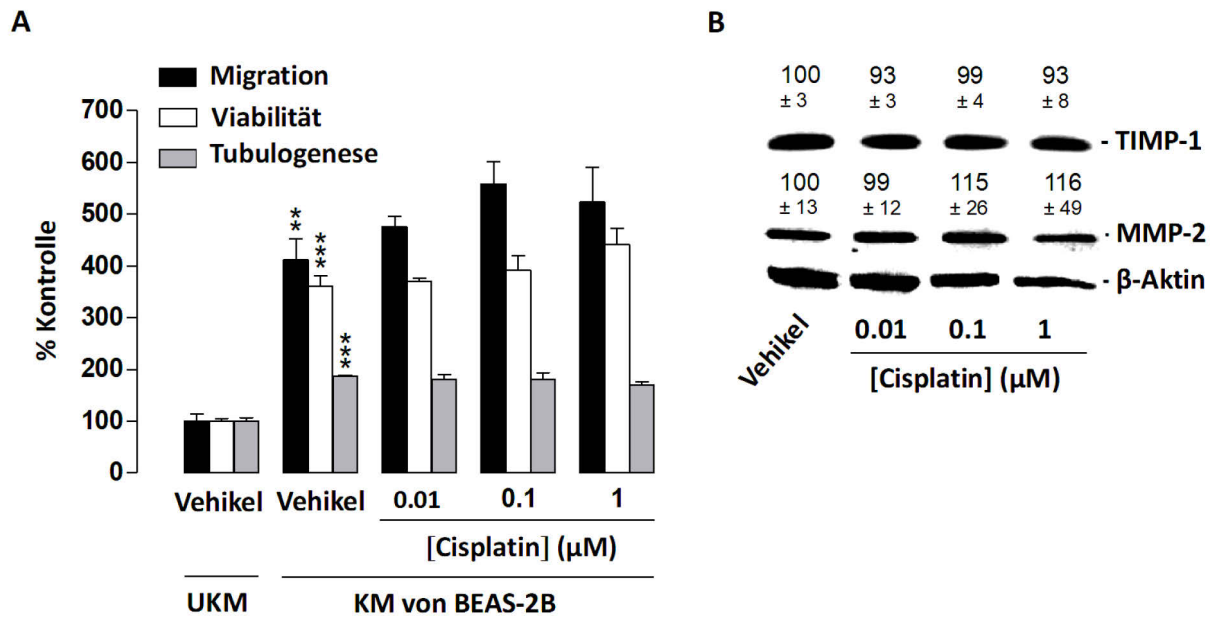


**Abb. 19.** Einfluss von konditionierten Medien Cisplatin-behandelter Lungenkarzinomzellen auf Migration, Viabilität und Tubulogenese der HUVECs in Gegenwart und Abwesenheit von TIMP-1-siRNA. A549- und H358-Zellen wurden mit Transfektionsreagenz ohne siRNA, mit TIMP-1-siRNA oder mit non-si-siRNA für 24 h in DMEM-Komplettmedium (10% FCS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit Vehikel oder 1  $\mu$ M Cisplatin für 48 Stunden in serumfreiem DMEM-Medium stimuliert. Die konditionierten Medien von A549 (A) und H358 (B) wurden nach 48 h abgenommen und für den Migrations-Assay (schwarze Balken, modifizierter Boyden-Chamber-Assay), Viabilitäts-Assay (weiße Balken, WST-1-Test) und für die Quantifizierung der Tubulogenese (graue Balken, Tube-Formation-Assay) mit HUVECs resuspendiert. Für den Viabilitäts-Assay erfolgte eine weitere Inkubation für 24 h und für den Tube-Formation-Assay eine Inkubation für 2 h. Parallel wurde die TIMP-1-Freisetzung von A549- (B) und H358-Zellen (D) mittels Western-Blot-Analysen der konditionierten Medien überprüft. Die Blot-Bilder sind repräsentativ für jedes Experiment. Die angegebenen Werte über den Blots sind der Mittelwert  $\pm$  SEM und repräsentieren Änderungen des TIMP-1-Proteinspiegel im KM im Vergleich zu mit Vehikel behandelten Zellen (als 100% festgelegt) gemäß densitometrischen Analysen. Die Western-Blot-Analyse von TIMP-1 im KM wurde durch  $\beta$ -Aktin-Analysen der jeweiligen Zelllysate ergänzt. Die angegebenen Werte sind der Mittelwert von n = 3 (A, Migration und Tube Formation, B, C), n = 4 (D) und n = 6 (A, Viabilität). \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. Vehikel-Kontrolle; ##p < 0.01, ###p < 0.001 vs. die jeweilige Cisplatin-behandelte Gruppe ohne siRNA, one-way-ANOVA plus post-hoc Bonferroni-Test.

### 3.6 Einfluss von konditionierten Medien von Cisplatin-behandelten bronchialen Epithelzellen BEAS-2B auf Migration, Tubulogenese und Viabilität von HUVECs

Als abschließende Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit wurden Nicht-Karzinomzellen dem gleichen Behandlungsprotokoll unterzogen. Hierzu wurde die Zelllinie BEAS-2B, die aus menschlichem bronchialem Epithelgewebe von Personen ohne Tumorerkrankung gewonnen wird (Reddel et al., 1988), benutzt. Sie wird auch als „normale Lungenepithelzelllinie“ bezeichnet (Amstad et al., 1988; Wan et al., 2012). Die konditionierten Medien wurden zur Resuspension von HUVECs verwendet und schließlich für die bereits beschriebenen Angiogenese-Assays oder Western-Blot-Analysen weiterverwendet.

Konditionierte Medien von mit Vehikel-behandelten BEAS-2B-Zellen erhöhten das Migrationsverhalten, die Viabilität und die Tubulogenese von HUVECs im Vergleich zu unkonditionierten Medien (UKM), ähnlich wie konditionierte Medien von Lungenkarzinomzellen (Abb. 20A, zweite Tripletts vs. erstes Tripletts). Im Gegensatz zu den Experimenten mit Lungenkarzinomzellen hatten konditionierte Medien von BEAS-2B-Zellen, welche mit denselben Cisplatin-Konzentrationen behandelt wurden, keinen Einfluss auf die Migration (Abb. 20A, schwarze Balken) und Tubulogenese (Abb. 20A, graue Balken) von HUVECs. Die Viabilität der HUVECs blieb ebenfalls unverändert (Abb. 20A, weiße Balken). Im Einklang mit der angenommenen inhibitorischen Wirkung von TIMP-1 auf die Migration und Tubulogenese von HUVECs, erwirkte Cisplatin nach 48-stündiger Inkubation keine Änderung des TIMP-1-Proteinspiegels in konditionierten Medien von BEAS-2B-Zellen (Abb. 20B). Ebenso unverändert blieben die MMP-2-Proteinspiegel (Abb. 20B).



**Abb. 20. Einfluss von BEAS-2B-Zellen gewonnenen konditionierten Medien auf Migration, Viabilität und Tubulogenese der HUVECs.** (A), Migration (schwarze Balken, modifizierter Boyden-chamber-Assay), Viabilität (weiße Balken, WST-1-Assay) und Tubulogenese (graue Balken, Tube-Formation-Assay) von HUVECs nach Resuspension in serumfreiem Vehikel-beinhaltenden DMEM-Medium (unkonditioniertes Medium [UKM]) oder konditioniertem Medium von Vehikel und Cisplatin-behandelten BEAS-2B-Zellen. BEAS-2B-Zellen wurden für 48 h mit Vehikel oder den angegebenen Cisplatin-Konzentrationen inkubiert. Die Inkubationszeit von HUVECs betrug 24 h in Migrations- und Viabilitäts-Assays. Die Tube Formation wurde nach einer 2-stündigen Exposition von HUVECs in KM gemessen. Der Prozentsatz der Kontrolle stellt den Vergleich mit UKM (als 100% festgelegt), serumfreies DMEM-Medium von Vehikel-behandelten HUVECs in Abwesenheit von Cisplatin und BEAS-2B-Zellen, dar. (B), Western-Blot-Analyse der TIMP-1- und MMP-2-Proteinspiegel in KM von BEAS-2B-Zellen, die entweder mit Vehikel oder den angegebenen Cisplatin-Konzentrationen für 48 Stunden inkubiert wurden. Die Blotbilder sind repräsentativ für jedes Experiment. Die angegebenen Werte über den Blots sind der Mittelwert  $\pm$  SEM und repräsentieren Änderungen der TIMP-1- und MMP-2-Proteinspiegel im KM im Vergleich zu mit Vehikel behandelten Zellen (als 100% festgelegt) gemäß densitometrischer Analysen. Die Western-Blot-Analyse von TIMP-1 und MMP-2 im KM wurde durch  $\beta$ -Aktin-Analysen der jeweiligen Zelllysate ergänzt. Die angegebenen Werte sind der Mittelwert von  $n = 3$  (A) und  $n = 6$  (B). \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs. die jeweilige Vehikel-Kontrolle, one-way-ANOVA plus post-hoc Bonferroni-Test. Statistische Analysen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen Cisplatin-behandelter Gruppen (drittes, viertes oder fünftes Triplet) und der entsprechenden Vehikel-behandelten Gruppe (zweites Triplet). Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden statistische Unterschiede (alle bei  $p < 0,001$ ) zwischen erstem, drittem, viertem oder fünftem Triplet nicht angegeben.

## 4 Diskussion

Aktuelle Studienergebnisse zur Wirkung von Cisplatin auf Tumorgewebe zeigen, dass durch antiangiogene Effekte Cisplatins maßgeblich die Tumorregression beeinflusst wird (siehe Abschnitt 1.3). Obwohl sich im Fokus der bisherigen Forschung die Regulierung der Angiogenese und die genaue Entschlüsselung der dabei beteiligten Modulatoren befanden, wurde eine mögliche Interaktion zwischen Tumor- und Endothelgewebe als Ausgangspunkt der antiangiogenen Wirkung von niedrig dosiertem Cisplatin dagegen bisher kaum berücksichtigt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen erstmaligen Nachweis, dass die durch niedrig dosiertes Cisplatin induzierte TIMP-1-Freisetzung aus nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen, eine Tumor-assoziierte antiangiogene Wirkung auf Endothelzellen bewirkt. Diese Theorie wird durch folgende Schlussfolgerungen untermauert.

Erstens verursachten alle konditionierten Medien, die von Cisplatin-behandelten A549- und H358-Zellen abgenommen wurden, eine signifikante Inhibition des Migrationsverhaltens und der Tubulogenese von HUVECs. Zweitens führte ein TIMP-1-Knockdown, also eine Verminderung der TIMP-1-Genexpression, in A549- und H358-Zellen zu einer deutlichen Abschwächung der Inhibition des Migrationsverhaltens und der Tubulogenese von HUVECs. Drittens basierte die antiangiogene Wirkung von Cisplatin nicht auf toxischen Effekten, da alle angewendeten Cisplatin-Konzentrationen (0,01 bis 1  $\mu\text{M}$ ) die Zellviabilität nicht beeinflussten. Viertens kann die antiangiogene Wirkung von Cisplatin ebenso nicht auf eine direkte Beeinflussung der Endothelzellen durch Cisplatin hervorgerufen werden. Direkter Kontakt von HUVECs mit Cisplatin (0,01 bis 1  $\mu\text{M}$ ) hatte entsprechend keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten, die Zellviabilität und die Tubulogenese von HUVECs. Schließlich konnte gezeigt werden, dass Cisplatin in humanen bronchialen Epithelzellen (BEAS-2B Zellen) keine TIMP-1-Freisetzung induziert und somit kein antiangiogener Effekt von konditionierten Medien auf HUVECs zu beobachten war. Die antiangiogene Wirkung von Cisplatin bei Konzentrationen von  $\leq 1 \mu\text{M}$  scheint sich daher auf Tumorgewebe zu beschränken.

Die ausbleibende antiangiogene Wirkung auf HUVECs durch direkte Stimulierung mit Cisplatin bei Konzentrationen von  $\leq 1 \mu\text{M}$  in den Experimenten der vorliegenden Arbeit deckt sich mit den Forschungsergebnissen von Muscella et al. (2016) und Yang et al. (2016). Dagegen kann ein antiangiogener Effekt höherer Cisplatin-Konzentrationen im verwendeten Versuchsansatz nicht ausgeschlossen werden. Bezüglich der direkten antiangiogenen Wirkung

von Cisplatin auf HUVECs bei Konzentrationen  $> 1 \mu\text{M}$  finden sich sehr unterschiedliche Daten in der Literatur.

Einerseits gibt es Ergebnisse, die ebenso keinen Effekt auf die In-vitro-Angiogenese bei Cisplatin-Konzentrationen von  $10 \mu\text{M}$  beschreiben (Bijman et al., 2006). Zudem zeigten auch In-vivo-Ergebnisse aus Experimenten mit transplantierten Ovarialkarzinomzellen bei Nacktmäusen keine signifikante Abnahme von Tumorgröße oder Gefäßdichte bei einer verabreichten Dosis von  $4 \text{ mg/kg KG}$  Cisplatin (Li et al, 2002). Andererseits kamen Muscella et al. (2016) zu einem gegensätzlichen Ergebnis. Hierbei verursachte die direkte Stimulation von HUVECs mit einer Cisplatin-Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  eine reduzierte Zellviabilität ( $\text{IC}_{50} = 2,35 \mu\text{M}$ ), eine Inhibition der HUVEC-Migration sowie eine verringerte Aktivität von MMP-1 und MMP-2. In einer weiteren Studie, in der eine noch höhere Konzentration von Cisplatin verwendet wurde ( $80 \mu\text{M}$ ), zeigte sich ebenso eine verminderte HUVEC-Migration, die außerdem mit einer verringerten MMP-Aktivität assoziiert war (Montiel et al., 2009).

Allerdings sind Zweifel an der klinischen Relevanz von Daten, welche durch In-vitro-Cisplatin-Stimulationen mit bis zu  $100 \mu\text{M}$  gewonnen wurden, angezeigt. So fanden Himmelstein et al. (1981) heraus, dass es bei einer intravenösen Gabe der MTD (Maximum Tolerated Dose) von Cisplatin, also  $100 \text{ mg/m}^2$ , zu einem Peak-Plasmaspiegel von ungefähr  $10 \mu\text{M}$  ungebundenem Cisplatin kommt. Die Halbwertszeit von Cisplatin liegt hierbei unter einer Stunde. Die Stimulation von Zellen mit der zehnfachen Menge der MTD erscheint somit wenig sinnvoll.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass es wahrscheinlich ist, dass unterschiedliche Versuchsansätze der jeweiligen Forscherteams die Divergenz der direkten Cisplatin-Wirkung auf Endothelzellen verursachen. Dabei scheint unter anderem wichtig zu sein, welcher Typ von Endothelzellen in den Experimenten benutzt wird. Kumar et al. (2005) verwendeten z.B. VEGF-stimulierte HDMEC-Zellen (human dermal microvascular cells) in einer Studie zur Wirksamkeit von Kombinationstherapien gegen Tumorerkrankungen. Dabei stellte sich heraus, dass bereits eine Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  Cisplatin signifikante toxische Reaktionen bei den HDMEC-Zellen auslöste. Dursun et al. (2006) verwendeten MS1-Zellen (mouse endothelial pancreatic islet cells) in einer Studie zu Cisplatin-induzierter Endothelzellnekrose. Die Autoren stellten fest, dass der Anteil an apoptotischen Endothelzellen bei einer In-vitro-Stimulation mit  $10 \mu\text{M}$  Cisplatin am höchsten ist. Um toxische Reaktionen bei HUVEC-Zellen in den Experimenten der vorliegenden Arbeit zu verhindern, wurden im Voraus Toxizitätsversuche mit den verwendeten Zelllinien durchgeführt. Hierbei

wurde herausgefunden, dass die Stimulation mit 1  $\mu$ M Cisplatin noch keine signifikanten toxischen Effekte verursachte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass TIMP-1 eine wichtige Rolle in antiangiogenen Prozessen spielt. Diese Theorie deckt sich mit den Daten zur Rolle von TIMP-1 bei der Angiogenese, die in den letzten Jahrzehnten publiziert wurden. Bereits in den 1990er Jahren beschrieben Johnson et al. (1994) eine verringerte Aktivierbarkeit von Endothelzellen durch TIMP-1 in einem In-vivo-Angiogenese-Assay. Laut Ikenaka et al. (2003) inhibiert TIMP-1 das Tumorwachstum und die Angiogenese bei zuvor mit *Ehrlich-Tumorzellen* transplantierten Mäusen. Ramer et al. (2014) fanden heraus, dass Cannabinoide durch die Freisetzung von TIMP-1 aus nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen antiangiogen wirken. Auf welche Art und Weise TIMP-1 antiangiogen wirkt, ist allerdings bis heute nicht vollständig geklärt.

Naheliegender scheint dabei die Theorie, dass TIMP-1 über die Inhibierung von MMPs die Migration von Endothelzellen negativ beeinflusst und somit antiangiogen wirkt. Montiel et al. (2009) konnten diesen Effekt, wie bereits beschrieben, bei zuvor mit Cisplatin behandelten HUVECs feststellen. Morikawa et al. (1995) beschreiben ebenfalls einen inhibitorischen Effekt von Cisplatin auf die MMP-2-Aktivität in kleinzelligen Lungenkarzinomzellen der Zelllinie Lu-135. Eine MMP-2-Downregulation in Glioblastomzellen durch Stimulation mit 25  $\mu$ M Cisplatin wurde ebenso von Chintala et al. (1997) nachgewiesen.

Als weiteres mögliches Target der TIMP-1-Induktion käme auch MMP-9 infrage. Sanceau et al. (2003) konnten durch MMP-9-Knockout entsprechend in Ewing-Sarkom-Zellen einen zellulären Wechsel von Migrationsphase zu einer stationären Phase nachweisen. Das Fehlen von proMMP-9 soll hierbei zu einer vermehrten Zelladhäsion durch die Stabilisierung des E-cadherin/ $\beta$ -catenin-Komplexes und einer Paxillin/RhoA-abhängigen Zytoskelettumstrukturierung führen.

Es mehren sich jedoch auch Studienergebnisse, welche eine von der MMP-Inhibition unabhängige TIMP-1-Wirkung nahelegen. Chesler et al. (1995) beschreiben, dass die stimulierende Wirkung von TIMP-1 auf erythroide Vorläuferzellen unabhängig von der Inhibition von MMPs geschieht. Chirco et al. (2006) berichten in einem Übersichtsartikel unter anderem über TIMP-interagierende Zelloberflächenproteine und geben Aufschluss über die molekularen Mechanismen der MMP-unabhängigen TIMP-Regulation von Zellproliferation und Angiogenese während des Tumorwachstums. Dabei erwähnen sie unter anderem eine Studie von Ritter et al. (1999) über einen möglichen TIMP-1-Rezeptor in MCF-7-Zellen des menschlichen Mammakarzinoms. Durch die Verwendung eines TIMP-1-EGFP-Proteins

konnten sie nachweisen, dass TIMP-1 an die Zelloberfläche bindet und in den Zellkern transloziert. Auch Stetler-Stevenson (2008) geht von einer multifunktionalen Wirkweise von TIMPs aus.

Brew und Nagase (2010) fassen zusammen, dass TIMPs verschiedene biologische Aktivitäten besitzen, einschließlich die Modulation der Zellproliferation, der Zellmigration und -invasion, der Anti-Angiogenese, der Anti- und Proapoptose sowie der synaptischen Plastizität. Ein Teil der Aktivitäten wird durch die Inhibition von MMPs vermittelt. Der restliche Teil erfolgt unabhängig der MMP-Inhibition, beispielsweise durch eine direkte Interaktion mit spezifischen Zelloberflächenrezeptoren. Die MMP-unabhängige Wirkung von TIMP-Molekülen wurde durch synthetische MMP-Inhibitoren und TIMP-Mutanten, welche MMPs nicht inhibieren, nachgewiesen. Diese lösten dieselben Aktivitäten wie ihre intakten Gegenstücke aus.

Die Wirkung von Cisplatin auf die MMPs in Krebszellen ist uneinheitlich. In einer Studie von Ramer et al. (2007) hatte die Stimulation von Zervixkarzinomzellen (HeLa; C33A) und Lungenkarzinomzellen (A549) mit 30  $\mu$ M Cisplatin keinen Einfluss auf die MMP-2- und MMP-9-Expression. Diese Erkenntnis lässt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vereinbaren. Andererseits fanden Shen et al. (2010) in In-vivo-Experimenten mit Leberkrebszellen von Nagetieren heraus, dass eine Therapie mit nichttoxischen und regelmäßigen Cisplatin-Dosen zu verringerten MMP-2- und VEGF-Spiegeln führte.

Aufgrund der vielschichtigen Mechanismen der Tumorigenese (Bergers & Benjamin, 2003) erscheinen zusätzliche Cisplatin-induzierte antiangiogene Effekte unabhängig des MMP-/TIMP-Systems durchaus wahrscheinlich. Laut Li et al. (2014) ist eine verminderte VEGF-Expression mitverantwortlich für die antiangiogene Wirkung von Cisplatin bei Mäusen mit transplantierten humanen Ovarialkarzinomzellen. Weiterhin konnten Geng et al. (2014) nachweisen, dass verringerte Spiegel von VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) und HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$* ) im Zusammenhang mit einer durch Cisplatin ausgelösten verringerten Gefäßdichte in einem Lewis-Lungenkarzinom-Modell stehen. HIF-1 $\alpha$  ist ein Transkriptionsfaktor, der bei Sauerstoffunterversorgung (Hypoxie) der Zelle ausgeschüttet wird und im Zusammenspiel mit VEGF für die Bildung neuer Gefäße mitverantwortlich ist. Die potenzielle Wirkung von Cisplatin über den HIF-1 $\alpha$ /VEGF-Signalweg konnten auch Lee und Wu (2015) bei Lungenkarzinomzellen, welche einen mutierten EGF-Rezeptor an Exon 19 besaßen, nachweisen.



Allerdings gibt es auch Studienergebnisse, die eine Involvierung eines verminderten VEGF-Spiegels bei der antiangiogenen Wirkung von Cisplatin nicht bestätigen konnten. Zum einen therapierten Ma et al. (2010) A549-xenotransplantierte Mäuse mit einer LDM-Cisplatin-Chemotherapie und verabreichten gleichzeitig eine VEGF-*small hairpin RNA* (shRNA), welche die VEGF-Expression ausschaltete. Nach dieser Kombinationstherapie konnte eine reduzierte Tumorneovaskularisation festgestellt werden, welche nicht durch eine Veränderung im VEGF-Spiegel zurückgeführt werden kann. Des Weiteren konnten Tas et al. (2008) keine veränderten VEGF-Serumspiegel bei Patienten, welche bei fortgeschrittenem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom eine LDM-Chemotherapie mit Cisplatin erhalten hatten, feststellen. In der vorliegenden Studie sind Untersuchungen zur Regulation von VEGF durch Cisplatin jedoch noch nicht adressiert worden.

Zur In-vivo-Wirksamkeit von Cisplatin und dessen antiangiogenen Effekte existieren ebenfalls widersprüchliche Daten. So konnten Coxon et al. (2012) weder eine Reduzierung der Tumorgröße noch eine verringerte Gefäßdichte bei H358-xenotransplantierten Mäusen feststellen, welche zuvor einmal wöchentlich mit einer Dosis von 5 mg/kg KG Cisplatin behandelt wurden. Diese Erkenntnis scheint sich nicht mit den In-vitro-Ergebnissen der vorliegenden Arbeit derselben Zelllinie zu vereinbaren. Grund für die ausbleibende In-vivo-Wirkung von Cisplatin könnte die kurze Halbwertszeit von Cisplatin sein – begünstigt durch die verabreichte Dosis – sowie den Zeitplan der Medikamentengabe (Himmelstein et al., 1981). Kong et al. (2005) therapierten Ratten, bei denen im Vorhinein mittels Nitrosamin Blasenkrebs induziert wurde, ebenfalls mit Cisplatin. Die Versuchstiere erhielten zweimal pro Woche eine Dosis von 0,25 mg/kg KG. Auch hier zeigte sich keine Inhibition der Tumorangio-genese. Weiterhin behandelten Kumar et al. (2005) Mäuse an Tag 2, 3 und 10 des Versuchsaufbaus mit einer Cisplatin-Dosis von 5 mg/kg KG. Den Mäusen wurde zuvor ein Gemisch aus oralen Plattenepithelkarzinomzellen und Endothelzellen auf einer Matrigelschicht ins Hinterglied implantiert. Nach 14 Tagen zeigte sich kein antiangiogener Effekt.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen In-vivo-Ergebnissen, steht eine Studie von Rattan et al. (2011). Hierbei reichte eine wöchentlich verabreichte Dosis von 4 mg/kg KG Cisplatin für eine Reduzierung der Tumorangio-genese. Versuchstiere waren hierbei Mäuse mit xenotransplantierten Ovarialkarzinomzellen. Zudem fanden Bai et al. (2009) positive Ergebnisse in Bezug auf antiangiogene Effekte von niedrig dosiertem Cisplatin bei LLC-xenotransplantierten (Lewis lung carcinoma) Mäusen. Zusammenfassend scheint die

antiangiogene Wirksamkeit von Cisplatin *in vivo* von der verabreichten Dosis, der Verabreichungshäufigkeit, dem Krebstyp sowie von Besonderheiten im Versuchsaufbau abhängig zu sein. Weiterführende Studien hierzu sollten zur einheitlichen Beurteilung der Cisplatin-Wirkung *in vivo* auf die Angiogenese von Lungentumoren In-vivo-Modelle mit in die experimentellen Ansätze einbeziehen.

Wie bereits beschrieben besitzt die herkömmliche Chemotherapie mit Cisplatin, d.h. die Verabreichung von hohen Dosen und die damit einhergehenden notwendigen regenerativen Pausen zwischen den Sitzungen, ein weites Spektrum an schweren Nebenwirkungen. Um diese zu vermeiden, haben LDM-Chemotherapien in letzter Zeit an Aufmerksamkeit gewonnen. So könnte die LDM-Chemotherapie, welche auf die Inhibierung der Tumorneovaskularisation zielt und gesundes Gewebe ausspart, eine effektive und sichere Methode darstellen, um Krebs zu behandeln (Kerbel & Kamen, 2004). Die genauen Wirkmechanismen werden derzeit intensiv untersucht. In den Fokus rückt dabei auch die Behandlung von arzneimittelresistenten Krebsarten (Munoz et al., 2005). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen die antiangiogenen Effekte von niedrig dosierten Cisplatin-Konzentrationen. Zudem wird belegt, dass sich Cisplatin schon in niedrigen Dosierungen toxisch gegenüber Nicht-Krebszellen (BEAS-2B) verhält, weshalb es zusätzlich sinnvoll ist, *Low-Dose-Metronomic*-Chemotherapien intensiv zu erforschen, um schwere Nebenwirkungen einer Krebsbehandlung möglichst gering zu halten.

## 5 Fazit

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten zusammengefasst darauf hin, dass eine vermehrte Freisetzung von TIMP-1 aus Lungenkarzinomzellen durch niedrig dosiertes Cisplatin, die angiogenen Kapazitäten von Endothelzellen deutlich reduziert. Bei gesunden Körperzellen konnte keine Induktion von TIMP-1 und somit auch keine Einschränkung der angiogenen Fähigkeiten von Endothelzellen beobachtet werden. Diese durch die subtoxischen Konzentrationen von Cisplatin ausgelöste Veränderung der Zell-Zell-Kommunikation zwischen Tumor- und Endothelzellen, welche eine Verringerung angiogener Eigenschaften von Endothelzellen zur Folge hat, stellt einen bislang unbekanntem Mechanismus dar, der eine erste mechanistische Erklärung für die antiangiogene Wirkung von LDM-Therapien mit Cisplatin sein könnte.

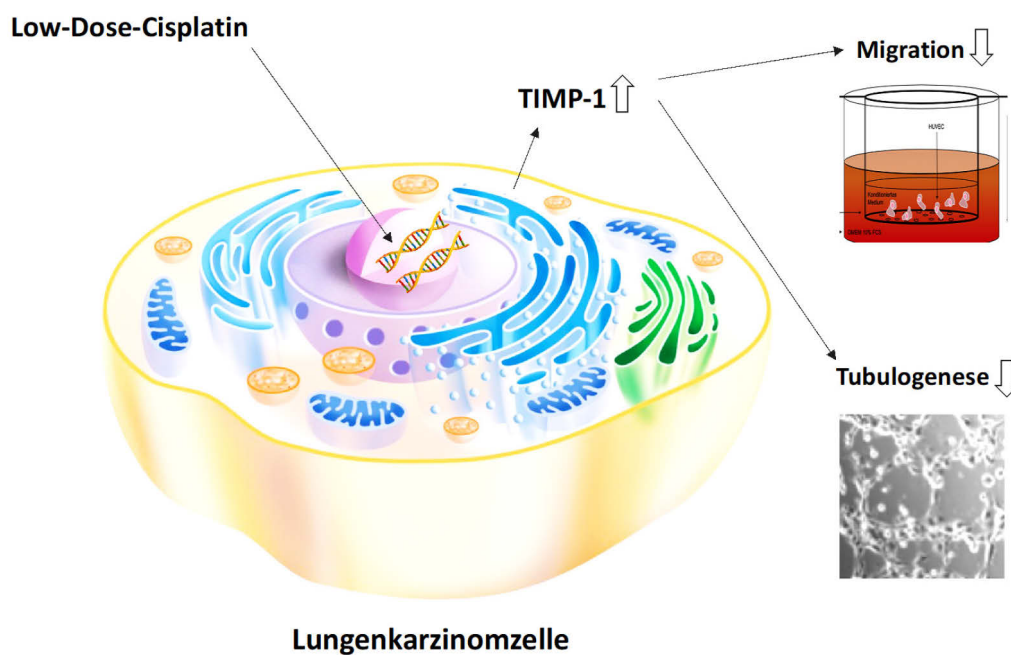


Abb. 21. Zusammenfassende Darstellung der Wirkung von Cisplatin auf das Migrationsverhalten und die Tubulogenese von HUVECs

## Literaturverzeichnis

- Adair, T. H., & Montani, J. P.** (2010). Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease. In *Angiogenesis*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences
- Adhim, Z., Lin, X., Huang, W., Morishita, N., Nakamura, T., Yasui, H., Shigemura, K., Fujisawa, M., Nibu, K., & Shirakawa, T.** (2011). E10A, an adenovirus-carrying endostatin gene, dramatically increased the tumor drug concentration of metronomic chemotherapy with low-dose cisplatin in a xenograft mouse model for head and neck squamous-cell carcinoma. *Cancer Gene Therapy*, 19, 144. <https://doi.org/10.1038/cgt.2011.79>.
- Allemani, C., Matsuda, T., Di Carlo, V., Harewood, R., Matz, M., Niksic, M., Bonaventure, A., Valkow, M., Johnson, C. J., Esteve, J., Azevedo, E., Silva G., Chen, W. Q., Eser, S., Engholm, G., Stiller, C. A., Monnereau, A., Woods, R. R., Visser, O., Lim, G. H., Aitken, J., Weir, H. K., & Coleman, M. P.** (2018). Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet*, 391(10125), 1023-1075. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)33326-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)33326-3).
- Alt, A., Lammens, K., Chiocchini, C., Lammens, A., Pieck, J. C., Kuch, D., Hopfner, K. P., & Carell, T.** (2007). Bypass of DNA Lesions Generated During Anticancer Treatment with Cisplatin by DNA Polymerase  $\eta$ . *Science*, 318(5852), 967-970. <https://doi.org/10.1126/science.1148242>.
- Amstad, P., Reddel, R. R., Pfeifer, A., Malan-Shibley, L., Mark, G. E., & Harris, C. C.** (1988). Neoplastic transformation of a human bronchial epithelial cell line by a recombinant retrovirus encoding viral Harvey ras. *Mol Carcinog*, 1(3), 151-160.
- Bai, R. Z., Wu, Y., Liu, Q., Xie, K., Wei, Y. Q., Wang, Y. S., Liu, K., Luo, Y., Su, J. M., Hu, B., Liu, J. Y., Li, Q., Niu, T., Zhao, Z. W., & Yang, L.** (2009). Suppression of lung cancer in murine model: treated by combination of recombinant human endostatin adenovirus with low-dose cisplatin. *J Exp Clin Cancer Res*, 28, 31. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-28-31>.
- Bergers, G., & Benjamin, L. E.** (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, 3, 401. <https://doi.org/10.1038/nrc1093>.
- Bijman, M. N., van Nieuw Amerongen, G. P., Laurens, N., van Hinsbergh, V. W., & Boven, E.** (2006). Microtubule-targeting agents inhibit angiogenesis at subtoxic concentrations, a process associated with inhibition of Rac1 and Cdc42 activity and changes in the endothelial cytoskeleton. *Mol Cancer Ther*, 5(9), 2348-2357. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.Mct-06-0242>.
- Bloomston, M., Shafii, A., Zervos, E. E., & Rosemurgy, A. S.** (2002). TIMP-1 overexpression in pancreatic cancer attenuates tumor growth, decreases implantation and metastasis, and inhibits angiogenesis. *J Surg Res*, 102(1), 39-44. <https://doi.org/10.1006/jsre.2001.6318>.

- Bosset, J.-F., Collette, L., Calais, G., Mineur, L., Maingon, P., Radosevic-Jelic, L., Daban, A., Bardet, E., Beny, A., & Ollier, J.-C.** (2006). Chemotherapy with Preoperative Radiotherapy in Rectal Cancer. *N Engl J Med*, 355(11), 1114-1123. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa060829>.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A.** (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Brew, K., & Nagase, H.** (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*, 1803(1), 55-71. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.003>.
- Campbell, R. E., & Hughes, F. A., Jr.** (1960). The development of bronchogenic carcinoma in patients with pulmonary tuberculosis. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 40, 98-101.
- Carmeliet, P.** (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9(6), 653-660. <https://doi.org/10.1038/nm0603-653>.
- Carmeliet, P., & Jain, R. K.** (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249-257. <https://doi.org/10.1038/35025220>.
- Chesler, L., Golde, D. W., Bersch, N., & Johnson, M. D.** (1995). Metalloproteinase inhibition and erythroid potentiation are independent activities of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Blood*, 86(12), 4506-4515.
- Chintala, S. K., Ali-Osman, F., Mohanam, S., Rayford, A., Go, Y., Gokaslan, Z. L., Gagercas, E., Venkaiah, B., Sawaya, R., Nicolson, G. L., & Rao, J. S.** (1997). Effect of cisplatin and BCNU on MMP-2 levels in human glioblastoma cell lines in vitro. *Clin Exp Metastasis*, 15(4), 361-367.
- Chirco, R., Liu, X. W., Jung, K. K., & Kim, H. R.** (2006). Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev*, 25(1), 99-113. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-7893-x>.
- Cornelius, L. A., Nehring, L. C., Harding, E., Bolanowski, M., Welgus, H. G., Kobayashi, D. K., Pierce, R. A., & Shapiro, S. D.** (1998). Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol*, 161(12), 6845-6852.
- Coxon, A., Ziegler, B., Kaufman, S., Xu, M., Wang, H., Weishuhn, D., Schmidt, J., Sweet, H., Starnes, C., Saffran, D., & Polverino, A.** (2012). Antitumor activity of motesanib alone and in combination with cisplatin or docetaxel in multiple human non-small-cell lung cancer xenograft models. *Mol Cancer*, 11(1), 70. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-11-70>.
- Curran, S., & Murray, G. I.** (2000). Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer*, 36(13 Spec No), 1621-1630.

- Dana, H., Chalbatani, G. M., Mahmoodzadeh, H., Karimloo, R., Rezaiean, O., Moradzadeh, A., Mehmandoost, N., Moazzen, F., Mazraeh, A., Marmari, V., Ebrahimi, M., Rashno, M. M., Abadi, S. J., & Gharagouzlo, E.** (2017). Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *International journal of biomedical science*, 13(2), 48–57.
- Denhardt, D. T., Feng, B., Edwards, D. R., Cocuzzi, E. T., & Malyankar, U. M.** (1993). Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka EPA): structure, control of expression and biological functions. *Pharmacol Ther*, 59(3), 329-341.
- Deutsches Krebsforschungszentrum** (2018, 3. September). Erstmals für Deutschland ermittelt: Vermeidbare Risikofaktoren verursachen 37 Prozent aller Krebsfälle. Abgerufen am 11. Februar, 2019, von <https://www.dkfz.de/de/presse/pressemitteilungen/2018/dkfz-pm-18-48-Vermeidbare-Risikofaktoren-verursachen-37-Prozent-aller-Krebsfaelle.php>
- Deutsches Krebsforschungszentrum** (2018, 1. Oktober). Grundlagen zum Thema Krebs. Abgerufen am 28. Februar, 2019, von <https://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen>
- Deutsche Krebsgesellschaft** (2014, 10. September). Personalisierte Krebsmedizin: Für jeden Patienten die richtige Medizin. Abgerufen am 28. Februar, 2019, von <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/basis-informationen-krebs-allgemeine-informationen/personalisierte-krebsmedizin.html>
- Dursun, B., He, Z., Somerset, H., Oh, D.-J., Faubel, S., & Edelstein, C. L.** (2006). Caspases and calpain are independent mediators of cisplatin-induced endothelial cell necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 291(3), F578-F587. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00455.2005>.
- Fallah, A., Sadeghinia, A., Kahroba, H., Samadi, A., Heidari, H. R., Bradaran, B., Zeinali, S., & Molavi, O.** (2019). Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases. *Biomed Pharmacother*, 110, 775-785. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.022>.
- Ferrara, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J.** (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9(6), 669-676. <https://doi.org/10.1038/nm0603-669>.
- Folkman, J.** (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N Engl J Med*, 285(21), 1182-1186. <https://doi.org/10.1056/nejm197111182852108>.
- Folkman, J.** (1972). Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg*, 175(3), 409-416.
- Folkman, J., & Shing, Y.** (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem*, 267(16), 10931-10934.
- Folkman, J.** (2008). History of Angiogenesis. In *Angiogenesis: An Integrative Approach From Science to Medicine* (pp. 1-14). Boston (MA): Springer US.

- Galanski, M., & Keppler, B. K.** (2006). Tumorhemmende Metallverbindungen: Entwicklung, Bedeutung und Perspektiven. *Pharm Unserer Zeit*, 35(2), 118-123. <https://doi.org/10.1002/pauz.200500160>.
- Geng, Y., Wang, J., Jing, H., Wang, H. W., & Bao, Y. X.** (2014). Inhibitory effect of dexamethasone on Lewis mice lung cancer cells. *Genet Mol Res*, 13(3), 6827-6836. <https://doi.org/10.4238/2014.August.29.4>.
- Gomez, D. E., Alonso, D. F., Yoshiji, H., & Thorgeirsson, U. P.** (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, 74(2), 111-122.
- Grant, D. S., Tashiro, K., Segui-Real, B., Yamada, Y., Martin, G. R., & Kleinman, H. K.** (1989). Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. *Cell*, 58(5), 933-943.
- Gross, J., & Lapierre, C. M.** (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48(6), 1014–1022. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.6.1014>
- Guedez, L., McMarlin, A. J., Kingma, D. W., Bennett, T. A., Stetler-Stevenson, M., & Stetler-Stevenson, W. G.** (2001). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 alters the tumorigenicity of Burkitt's lymphoma via divergent effects on tumor growth and angiogenesis. *Am J Pathol*, 158(4), 1207-1215. [https://doi.org/10.1016/s00029440\(10\)64070-9](https://doi.org/10.1016/s00029440(10)64070-9).
- Guedez, L., & Stetler-Stevenson, W. G.** (2008). Matrix Metalloproteinases and Their Endogenous Inhibitors. In *Angiogenesis: An Integrative Approach From Science To Medicine* (pp. 55-62). Boston (MA): Springer US.
- Guijarro-Munoz, I., Compte, M., Alvarez-Vallina, L., & Sanz, L.** (2013). Antibody gene therapy: getting closer to clinical application? *Curr Gene Ther*, 13(4), 282-290.
- Gutzmer, R., Strumberg, D.** (2013). Risiko und Management von Nebenwirkungen zielgerichteter Therapien, In *Der Onkologe*; 19(10); 863-869. <https://doi.org/10.1007/s00761-013-2500-6>.
- Hammerschmidt, S., & Wirtz, H.** (2009) Lungenkarzinom – aktuelle Diagnostik und Therapie. In *Deutsches Ärzteblatt*, 106(49), 809-20. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2009.0809>.
- Harvey, R. D. & Khuri F. R.** (2017). Cytotoxic Chemotherapy. In *The American Cancer Society's Principles of Oncology*. Hoboken (New Jersey): Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781119468868.ch18>.
- Herbst, R. S., Heymach, J. V., & Lippman, S. M.** (2008). Lung cancer. *N Engl J Med*, 359(13), 1367-1380. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0802714>.

- Himmelstein, K. J., Patton, T. F., Belt, R. J., Taylor, S., Repta, A. J., & Sternson, L. A.** (1981). Clinical kinetics on intact cisplatin and some related species. *Clin Pharmacol Ther*, 29(5), 658-664.
- Hinz, B., Rosch, S., Ramer, R., Tamm, E. R., & Brune, K.** (2005). Latanoprost induces matrix metalloproteinase-1 expression in human nonpigmented ciliary epithelial cells through a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Faseb j*, 19(13), 1929-1931. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3626fje>.
- Ikenaka, Y., Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., Noguchi, R., Tsujinoue, H., Yanase, K., Namisaki, T., Imazu, H., Masaki, T., & Fukui, H.** (2003). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) inhibits tumor growth and angiogenesis in the TIMP-1 transgenic mouse model. *Int J Cancer*, 105(3), 340-346. <https://doi.org/10.1002/ijc.11094>.
- International Agency for Research on Cancer** (2018, 12. September). Globocan 2018 Europe. Abgerufen am 24. Februar, 2019, von <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/908-europe-fact-sheets.pdf>
- Jabłońska-Trypuć, A., Matejczyk, M., & Rosochacki, S.** (2016). Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(1), 177-183. <https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1161620>.
- Jackson, B. C., Nebert, D. W., & Vasiliou, V.** (2010). Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. *Hum Genomics*, 4(3), 194-201.
- Jian, W., Levitt, J. M., Lerner, S. P., & Sonpavde, G.** (2009). Preclinical antitumor and antiangiogenic activity of a metronomic schedule of cisplatin against human transitional cell carcinoma (TCC). *Journal of Clinical Oncology* 27(15), 16018-16018.
- Johnson, M. D., Kim, H. R., Chesler, L., Tsao-Wu, G., Bouck, N., & Poverini, P. J.** (1994). Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J Cell Physiol*, 160(1), 194-202. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041600122>.
- Kerbel, R. S., & Kamen, B. A.** (2004). The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 4(6), 423-436. <https://doi.org/10.1038/nrc1369>.
- Kim, S. H., Jeong, J. H., Lee, S. H., Kim, S. W., & Park, T. G.** (2006). PEG conjugated VEGF siRNA for anti-angiogenic gene therapy. *J Control Release*, 116(2), 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.05.023>.
- Kong, C., Zhu, Y., Sun, C., Li, Z., Sun, Z., Zhang, X., & Takanaka, I.** (2005). Inhibition of tumor angiogenesis during cisplatin chemotherapy for bladder cancer improves treatment outcome. *Urology*, 65(2), 395-399. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2004.09.041>.



- Krebsgesellschaft Nordrhein-Westfalen e.V.** (2014, Dezember). Diganose Krebs - Wegweiser zur ersten Orientierung. Abgerufen am 15. Februar, 2019, von [http://krebsgesellschaft-nrw.de/a\\_material/b\\_runterladen/Wegweiser\\_Erstdiagnose\\_web.pdf](http://krebsgesellschaft-nrw.de/a_material/b_runterladen/Wegweiser_Erstdiagnose_web.pdf)
- Kumar, P., Benedict, R., Urzua, F., Fischbach, C., Mooney, D., & Polverini, P.** (2005). Combination treatment significantly enhances the efficacy of antitumor therapy by preferentially targeting angiogenesis. *Laboratory Investigation*, 85(6), 756. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700272>.
- L'Azou, B., Fernandez, P., Bareille, R., Beneteau, M., Bourget, C., Cambar, J., & Bordenave, L.** (2005). In vitro endothelial cell susceptibility to xenobiotics: comparison of three cell types. *Cell Biol Toxicol*, 21(2), 127-137. <https://doi.org/10.1007/s10565-005-0172-8>.
- Lambert, E., Dasse, E., Haye, B., & Petitfrere, E.** (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*, 49(3), 187-198. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2003.09.008>.
- Lee, J. G., & Wu, R.** (2015). Erlotinib-cisplatin combination inhibits growth and angiogenesis through c-MYC and HIF-1alpha in EGFR-mutated lung cancer in vitro and in vivo. *Neoplasia*, 17(2), 190-200. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.008>.
- Lenzi, P., Bocci, G., & Natale, G.** (2016). John Hunter and the origin of the term "angiogenesis". In *Angiogenesis*. 19(2), 255-256. <https://doi.org/10.1007/s10456016-9496-7>.
- Li, D., Williams, J. I., & Pietras, R. J.** (2002). Squalamine and cisplatin block angiogenesis and growth of human ovarian cancer cells with or without HER-2 gene overexpression. *Oncogene*, 21(18), 2805-2814. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205410>.
- Li, W., Wan, L., Zhai, L. Y., & Wang, J.** (2014). Effects of SC-560 in combination with cisplatin or taxol on angiogenesis in human ovarian cancer xenografts. *Int J Mol Sci*, 15(10), 19265-19280. <https://doi.org/10.3390/ijms151019265>.
- Lien, K., Georgsdottir, S., Sivanathan, L., Chan, K., & Emmenegger, U.** (2013). Low-dose metronomic chemotherapy: a systematic literature analysis. *Eur J Cancer*, 49(16), 3387-3395. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.06.038>.
- Lindley, C., & Blower, P.** (2000). Oral serotonin type 3-receptor antagonists for prevention of chemotherapy-induced emesis. *Am J Health Syst Pharm*, 57(18), 1685-1697. <https://doi.org/10.1093/ajhp/57.18.1685>.
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., & Myrtek, D.** (2014). Die Zelle: leben, fressen, sterben. In *Der Experimentator: Immunologie* (pp. 197-221). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Ma, Y. P., Yang, Y., Zhang, S., Chen, X., Zhang, N., Wang, W., Cao, Z. X., Jiang, Y., Zhao, X., Wei, Y. Q., & Deng, H. X.** (2010). Efficient inhibition of lung cancer in murine model by plasmid-encoding VEGF short hairpin RNA in combination with low-dose DDP. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29(1), 56. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-56>.

- Maj, E., Papiernik, D., & Wietrzyk, J.** (2016). Antiangiogenic cancer treatment: The great discovery and greater complexity (Review). *Int J Oncol*, 49(5), 1773-1784. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3709>.
- Marushima, A., Nieminen, M., Kremenetskaia, I., Gianni-Barrera, R., Woitzik, J., Degenfeld, G. V., & Hecht, N.** (2019). Balanced single-vector co-delivery of VEGF/PDGF-BB improves functional collateralization in chronic cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. <https://doi.org/10.1177/0271678x18818298>.
- Molls, M. & Röper, B.** (2006). Strahlenbiologische Grundlagen der Strahlentherapie. In *Kompendium Internistische Onkologie* (pp. 541-549). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Montiel, M., Urso, L., de la Blanca, E. P., Marsigliante, S., & Jimenez, E.** (2009). Cisplatin reduces endothelial cell migration via regulation of type 2-matrix metalloproteinase activity. *Cell Physiol Biochem*, 23(4-6), 441-448. <https://doi.org/10.1159/000218191>.
- Morikawa, T., Shibuya, M., Sakai, S., & Kudo, S.** (1995). Effect of anticancer drugs on invasive capacity of human small-cell lung cancer cells in vitro. *Nihon Ika Daigaku Zasshi*, 62(4), 320-328.
- Munoz, R., Shaked, Y., Bertolini, F., Emmenegger, U., Man, S., & Kerbel, R. S.** (2005). Anti-angiogenic treatment of breast cancer using metronomic low-dose chemotherapy. *Breast*, 14(6), 466-479. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2005.08.026>.
- Murphy, G., Willenbrock, F., Crabbe, T., O'Shea, M., Ward, R., Atkinson, S., & Docherty, A.** (1994). Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann N Y Acad Sci*, 732, 31-41.
- Muscella, A., Vetrugno, C., Biagioni, F., Calabriso, N., Calierno, M. T., Fornai, F., & Fanizzi, F. P.** (2016). Antitumour and antiangiogenic activities of [Pt(O,O'-acac)(gamma-acac)(DMS)] in a xenograft model of human renal cell carcinoma. *Br J Pharmacol*, 173(17), 2633-2644. <https://doi.org/10.1111/bph.13543>.
- Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G.** (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, 69(3), 562-573. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002>.
- Pasquier, E., Kavallaris, M., & André, N.** (2010). Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7, 455. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.82>.
- Peyrone, M.** (1844). Über die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür. 51(1), 1-29. <https://doi.org/10.1002/jlac.18440510102>.
- Pfreunds Schuh, M.** (2006). Prinzipien der medikamentösen Tumorthherapie. In *Kompendium Internistische Onkologie Standards in Diagnostik und Therapie* (pp. 651-702). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- Ramer, R., Eichele, K., & Hinz, B.** (2007). Upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 confers the anti-invasive action of cisplatin on human cancer cells. *Oncogene*, 26(39), 5822-5827. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210358>.
- Ramer, R., Fischer, S., Haustein, M., Manda, K., & Hinz, B.** (2014). Cannabinoids inhibit angiogenic capacities of endothelial cells via release of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 from lung cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 91(2), 202-216. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.06.017>.
- Ramer, R., & Hinz, B.** (2008). Inhibition of cancer cell invasion by cannabinoids via increased expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *J Natl Cancer Inst*, 100(1), 59-69. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm268>.
- Ramer, R., & Hinz, B.** (2010). Cyclooxygenase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 confer the antimigratory effect of cannabinoids on human trabecular meshwork cells. *Biochem Pharmacol*, 80(6), 846-857. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.05.010>.
- Rattan, R., Graham, R. P., Maguire, J. L., Giri, S., & Shridhar, V.** (2011). Metformin suppresses ovarian cancer growth and metastasis with enhancement of cisplatin cytotoxicity in vivo. *Neoplasia*, 13(5), 483-491.
- Reddel, R. R., Ke, Y., Gerwin, B. I., McMenamin, M. G., Lechner, J. F., Su, R. T., Brash, D. E., Park, J. B., Rhim, J. S., & Harris, C. C.** (1988). Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res*, 48(7), 1904-1909.
- Risau, W.** (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386(6626), 671-674. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.05.01010.1038/386671a0>.
- Ritter, L. M., Garfield, S. H., & Thorgeirsson, U. P.** (1999). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) binds to the cell surface and translocates to the nucleus of human MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 257(2), 494-499. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0408>
- Rocha, C. R. R., Silva, M. M., Quinet, A., Cabral-Neto, J. B., & Menck, C. F. M.** (2018). DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics (Sao Paulo)*, 73(1), 478. <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e478s>.
- Rosenberg, B.** (1978). Platinum Complexes for the Treatment of Cancer. *Interdisciplinary Science Reviews*, 3(2), 134-147. <https://doi.org/10.1179/030801878791926119>.
- Rumpold, H., & Winder, T. J.** (2017). Development of chemotherapeutics in oncology: is there anything new?. *Magazine of European Medical Oncology*, 10(3), 119-120. <https://doi.org/10.1007/s12254-017-0350-4>.

- Sanceau, J., Truchet, S., & Bauvois, B.** (2003). Matrix metalloproteinase-9 silencing by RNA interference triggers the migratory-adhesive switch in Ewing's sarcoma cells. *J Biol Chem*, 278(38), 36537-36546. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304300200>.
- Shen, F. Z., Wang, J., Liang, J., Mu, K., Hou, J. Y., & Wang, Y. T.** (2010). Low-dose metronomic chemotherapy with cisplatin: can it suppress angiogenesis in H22 hepatocarcinoma cells? *Int J Exp Pathol*, 91(1), 10-16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00684.x>.
- Siewert, J. R., & Fink, U.** (2006). Prinzipien der onkologischen Chirurgie. In *Kompendium Internistische Onkologie Standards in Diagnostik und Therapie* (pp. 523-541). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Simonato, L., Agudo, A., Ahrens, W., Benhamou, E., Benhamou, S., Boffetta, P., Brennan, P., Darby, S. C., Forastiere, F., Fortes, C., Gaborieau, V., Gerken, M., Gonzales, C. A., Jockel, K. H., Kreuzer, M., Merletti, F., Nyberg, F., Pershagen, G., Pohlabein, H., Rosch, F., Whitley, E., Wichmann, H. E., & Zambon, P.** (2001). Lung cancer and cigarette smoking in Europe: an update of risk estimates and an assessment of inter-country heterogeneity. *Int J Cancer*, 91(6), 876-887.
- Stephenson, J. A., Goddard, J. C., Al-Taani, O., Dennison, A. R., & Morgan, B.** (2013). Tumour Angiogenesis: A Growth Area - From John Hunter to Judah Folkman and Beyond. *Journal of Cancer Research*. 2013(895019), 6. <https://doi.org/10.1155/2013/895019>.
- Stetler-Stevenson, W. G.** (1999). Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *The Journal of clinical investigation*, 103(9), 1237-1241. <https://doi.org/10.1172/JCI6870>
- Stetler-Stevenson, W. G.** (2008). Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal*, 1(27), 6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.127re6>
- Tas, F., Duranyildiz, D., Soyuncu, H. O., Cicin, I., Selam, M., Uygun, K., Disci, R., Yasasever, V., Topuz, E.** (2008). Effect of maximum-tolerated doses and low-dose metronomic chemotherapy on serum vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 levels in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 61(5), 721-725. <https://doi.org/10.1007/s00280-007-0526-4>.
- Theurich, S., Wunderlich, F., Thomas, F., & Hallek, M.** (2015). Adipositas: Hohe Relevanz für Krebs. In *Deutsches Ärzteblatt*, 112(39), 29. <https://doi.org/10.3238/PersOnko.2015.09.25.08>.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A.** (2015). Global cancer statistics 2012. *CA Cancer J Clin*, 65(2), 87-108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.

- Visse, R., & Nagase, H.** (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 92(8), 827-839. <https://doi.org/10.1161/01.Res.0000070112.80711.3d>.
- Wan, Y. W., Raese, R. A., Fortney, J. E., Xiao, C., Luo, D., Cavendish, J., Gibson, L. F., Castranova, V., Qian, Y., & Guo, N. L.** (2012). A smoking-associated 7-gene signature for lung cancer diagnosis and prognosis. *Int J Oncol*, 41(4), 1387-1396. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1556>.
- Williamson, R. A., Marston, F. A., Angal, S., Koklitis, P., Panico, M., Morris, H. R., Carne, A. F., Smith, B. J., Harris, T. J., & Freedman, R. B.** (1990). Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *Biochem J*, 268(2), 267-274. <https://doi.org/10.1042/bj2680267>.
- Yang, L., Moghaddas, S., Dezvareh, H., Belkacemi, L., Bark, S. J., Bose, R. N., & Do, L. H.** (2016). Insights into the anti-angiogenic properties of phosphaplatins. *J Inorg Biochem*, 164, 5-16. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.07.020>.
- Zappa, C., & Mousa, S. A.** (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational lung cancer research*, 5(3), 288–300. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.06.07>

## Abbildungsverzeichnis

ABB. 1. Häufigkeiten der Krebsdiagnosen für Männer und Frauen in Europa im Jahr 2018.....	2
ABB. 2. Zugelassene platinhaltige Chemotherapeutika.....	7
ABB. 3. Schematische Darstellung der Aktivierung und Wirkung von Cisplatin.....	8
ABB. 4. Unterschiedliche Therapieschemata der Chemotherapie.....	9
ABB. 5. Balance der Angiogenese.....	12
ABB. 6. Angiogenese in gesundem Gewebe und Tumorangiogenese.....	14
ABB. 7. 3D-Struktur von TIMP-1.....	16
ABB. 8. Schematische Darstellung eines Stimulationsansatzes.....	26
ABB. 9. Prinzip des WST-1-Assays.....	27
ABB. 10. Schematische Darstellung einer Transwell-Platte.....	28
ABB. 11. Schematische Darstellung eines Viabilitäts-Assays.....	30
ABB. 12. Schematische Darstellung eines Transfektions-Assays.....	32
ABB. 13. Schematische Darstellung der Immundetektion.....	37
ABB. 14. Einfluss von Cisplatin auf die Viabilität von Lungenkarzinomzellen und Nicht-Tumorepithelzellen.....	40
ABB. 15. Einfluss von Cisplatin auf Migrationsverhalten, Viabilität und Tubulogenese von HUVECs.....	41
ABB. 16. Behandlungsprotokoll zur Quantifizierung der Wirkung von konditionierten Medien auf das Verhalten von Endothelzellen.....	42
ABB. 17. Einfluss von konditionierten Medien von Cisplatin-behandelten Lungen- karzinomzellen auf Migration, Viabilität und Tubulogenese von HUVECs.....	44
ABB. 18. Konzentrationsabhängiger Effekt von Cisplatin auf die TIMP-1-Expression in A549- und H358-Zellen.....	46
ABB. 19. Einfluss von konditionierten Medien von Cisplatin-behandelten Lungen- karzinomzellen auf Migration, Viabilität und Tubulogenese von HUVECs in Gegenwart und Abwesenheit von TIMP-1-siRNA.....	48
ABB. 20. Einfluss von BEAS-2B-Zellen gewonnenen konditionierten Medien auf Migration, Viabilität und Tubulogenese der HUVECs.....	50
ABB. 21. Zusammenfassende Darstellung der Wirkung von Cisplatin auf das Migrationsverhalten und die Tubulogenese von HUVECs.....	57

## Tabellenverzeichnis

TAB. 1. Zellkulturmedien .....	18
TAB. 2. Zelllinien .....	18
TAB. 3. Oligonukleotide .....	19
TAB. 4. Primäre Antikörper .....	19
TAB. 5. Sekundäre Antikörper .....	19
TAB. 6. Chemikalien .....	19
TAB. 7. Puffer und Lösungen .....	21
TAB. 8. Geräte .....	22
TAB. 9. Software .....	23
TAB. 10. Verbrauchsmaterialien .....	23
TAB. 11. Bestandteile der Polyacrylamidgele .....	35

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
BCA	Bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
BEAS-2B	humane Bronchialepithelzellen aus gesundem Gewebe
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec <sup>2</sup> )
g	Gramm
h	Stunden
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells (humane Umbilikalvenen Endothelzellen)
IC <sub>50</sub>	half maximum inhibitory concentration (halbmaximale Hemmkonzentration)
IgG	Immunglobulin G
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat



l	Liter
lat.	Latein
LLC	Lewis lung carcinoma
M	Molarität
mA	Milliampère
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
mM	Millimol
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
n	Endsumme
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
ng	Nanogramm
nM	Nanomol
nm	Nanometer
NSCLC	non-small cell lung cancer
PBS	Phosphate-buffered saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TBS/T	Tris-buffered saline mit Tween®20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TIMP-1	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
Tween®20	Polyethylen Sorbitan Monolaurat
U	Unit (Einheit)
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WST-1	(4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1.6-Benzol-Disulfonat)



## Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz, Direktor des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universitätsmedizin Rostock, für die Vergabe des spannenden Promotionsthemas und die Betreuung als Doktorvater bedanken.

Weiterhin gilt mein großer Dank PD Dr. rer. nat. Robert Ramer, welcher mir während meiner gesamten Zeit als Doktorand als kompetenter Ansprechpartner in fachlichen sowie wissenschaftlichen Fragen zur Seite stand. Seine motivierende und gleichzeitig freundschaftliche Art waren mir eine wichtige Stütze.

Zudem möchte ich bei Philipp Borchert, welcher mich in den Alltag im Labor eingeführt hat, für die praktische Unterstützung bei den einzelnen Versuchsreihen bedanken. Außerdem bedanke ich mich allen Mitarbeitenden des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universitätsmedizin für die freundliche Aufnahme als Kollege sowie die Möglichkeit der Diskussion fachlicher Fragestellungen.

Zum Schluss danke ich meiner Familie, meiner Freundin sowie meinen Freunden. Ihr habt mich während der gesamten Zeit unterstützt und hattet immer ein offenes Ohr für mich. Das erfolgreiche Gelingen dieser Arbeit wurde vor allem auch durch Euch Realität.



## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit gebe folgende Erklärung ab:

1. Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Berlin, den 24.10.2020

Tilman Schmied



## Curriculum vitae

### Persönliche Informationen

Tilman Schmied, geboren am 30.09.1990 in Würzburg

### Ausbildung

1997 – 2001 Kirchbergschule Königheim

2001 – 2010 Matthias-Grünwald-Gymnasium, Abschluss: Abitur

2011 – 2012 Ausbildung zum Rettungsassistenten an der  
DRK Landesschule in Pfalzgrafenweiler

2012 – 2018 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock

09.2014 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2015 – 2019 Doktorand am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der  
Universitätsmedizin Rostock

10.2017 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2017 – 2018 Praktisches Jahr Universitätsmedizin Rostock, Kreiskrankenhaus Weilheim,  
Spital Frutigen, Krankenhaus Bethel Berlin

11.2018 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

01.2020 Assistenzarzt in Weiterbildung, Abteilung für Anästhesie, Intensiv- und  
Notfallmedizin, Caritas-Klinik Maria Heimsuchung Berlin-Pankow

### Publikationen

Ramer R. \*, Schmied T. \*, Wagner C., Haustein M., Hinz B. (2018). The antiangiogenic action of cisplatin on endothelial cells is mediated through the release of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 from lung cancer cells. *Oncotarget*; 9(75), 34038-34055

\* die ersten beiden Autoren trugen gleichermaßen bei





## Thesen

Zusätzlich zur Hemmung der Krebszellproliferation und des Tumorwachstums wurde gezeigt, dass Cisplatin in niedrigen Dosierungen die Tumorangiogenese hemmt. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht entschlüsselt. Die Experimente der vorliegenden Dissertation befassen sich daher mit der antiangiogenen Wirkung von Cisplatin durch eine potenzielle Kommunikation zwischen Tumor- und Endothelzellen. Zu diesem Zweck wurden humane umbilikale Venenendothelzellen (HUVEC) konditionierten Medien (KM) von Lungenkarzinomzellen (A549- und H358-Zellen) ausgesetzt und anschließend in Migrations- und Tubulogenese-Assays untersucht.

Alle konditionierten Medien, die von Cisplatin-behandelten A549- und H358-Zellen abgenommen wurden, verursachten eine signifikante Inhibition des Migrationsverhaltens und der Tubulogenese von HUVECs.

Eine Verminderung der TIMP-1-Genexpression mittels siRNA-Transfektionen in A549- und H358-Zellen führte zu einer deutlichen Abschwächung der Inhibition des Migrationsverhaltens und der Tubulogenese von HUVECs in konditionierten Medien.

Die antiangiogene Wirkung von Cisplatin kann nicht auf toxischen Effekten beruhen, da alle angewendeten Cisplatin-Konzentrationen (0,01 bis 1  $\mu\text{M}$ ) die Zellviabilität von Tumor- oder Endothelzellen nicht beeinflussten.

Die antiangiogene Wirkung von Cisplatin kann ebenso nicht auf eine direkte Beeinflussung der Endothelzellen durch Cisplatin hervorgerufen werden. Direkter Kontakt von HUVECs mit Cisplatin (0,01 bis 1  $\mu\text{M}$ ) hatte keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten, die Zellviabilität und die Tubulogenese von HUVECs.

Es konnte gezeigt werden, dass Cisplatin in humanen bronchialen Epithelzellen (BEAS-2B Zellen) keine TIMP-1-Freisetzung induziert und somit kein antiangiogener Effekt von konditionierten Medien auf HUVECs zu beobachten war. Die antiangiogene Wirkung von Cisplatin bei Konzentrationen von  $\leq 1 \mu\text{M}$  scheint sich daher nur auf die Mikroumgebung von Tumorzellen zu beschränken.