

Antiangiogene Wirkung der Faktor VII-aktivierenden Protease in einem Maus-Matrigel-Modell

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.)
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Uslu, Özgür
aus Bochum

Gießen 2012

Aus dem Biochemischen Institut
des Fachbereichs Medizin der Justus – Liebig – Universität Gießen

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Klaus T. Preissner

Gutachter: Prof. Dr. S. Kanse

Gutachter: Prof. Dr. G. Bein

Tag der Disputation: 05. April 2013

*an meine kleine und große Familie und insbesondere
meinen Vater Duran Uslu*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese	1
1.2	Physiologische und pathologische Angiogenese	4
1.3	Endogene und exogene Angiogenesestimulatoren sowie -inhibitoren	5
1.4	Tumorangiogenese und Metastasierung	10
1.5	Therapeutische Hemmung der Tumorneoangiogenese	11
1.6	Funktion, Lokalisation und Interaktion der Faktor VII-aktivierenden Protease (FSAP)	12
1.7	Rolle des uPA-Systems, der MMP's sowie TIMP in der Angiogenese	16
1.8	Fragestellung	21

2. Materialien

2.1	Chemikalien	23
2.2	Geräte	25
2.3	Kommerzielle Kits	26
2.4	Puffer und Lösungen	26
2.5	Antikörper	27
2.6	Zellmedien und Seren	28
2.7	Zellen	28

3. Methoden

3.1	Zellkulturtechniken	29
3.1.1	Auftauen von Zellen	29
3.1.2	Splitting von Zellen	29
3.1.3	Stimulation und Präparation von Zellen	29
3.2	Proteinbiochemische Methoden	31
3.2.1	SDS-PAGE für Casein- und Gelatine-Zymographie sowie Western Blot	31
3.2.2	Detektion von Proteinen mit der Western Blot Methode	31
3.2.3	Stripping von Western Blot Membranen	32
3.3	Untersuchungen der Proteasenaktivität	33

3.3.1	Casein-Zymographie	33
3.3.2	Gelatine-Zymographie	35
3.4	Molekularbiologische Methoden	36
3.4.1	RNA-Isolation (BxPC3): quantitative Genexpressionsanalyse	36
3.4.2	Bestimmung der RNA-Konzentration mit dem GeneQuant- Photometer	37
3.4.3	RNA-Qualitätsmessung	37
3.4.4	Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Prinzip der RT-PCR	38
3.4.5	Primer	39
3.4.6	Durchführung der PCR	40
3.5	In-vivo Angiogeneseversuche	41
3.5.1	Tiergut, Tierherkunft und Tierhaltung	41
3.5.2	Matrigelvorbereitung und die subkutane Injektion	42
3.5.3	Entnahme der Matrigelplugs	44
3.5.4	Matrigelvorbehandlung: Fixierung und Einbettung	44
3.5.5	Rotationsmikrotomschnitte mit BioCut 2030	45
3.6	Immunhistochemische Methoden	46
3.6.1	Fluoreszenzmikroskopie	46
3.6.2	Grundlagen der Immunhistochemie	46
3.6.3	Antigendemaskierung: Epitope-Retrieval-Methode	48
3.6.4	Hämatoxylin-Eosin Färbung nach Mayer der Matrigelschnitte	49
3.6.5	Immunhistochemie der Matrigelschnitte (Wildtyp-Mäuse)	50
3.6.6	Immunhistochemie der Matrigelschnitte (Knockout-Mäuse)	51
3.6.7	Densiometrische Analyse der immunhistochemisch gefärbten Matrigelschnitte	52
3.7	Statistische Analyse und Auswertung	53

4. Ergebnisse

4.1	In-vitro Effekte von FSAP auf BxPC3-Zellen	54
4.1.1	Plasminogen-Aktivierungs Aktivität im Extrakt vs. Überstand in BxPC3-Zellen nach Stimulierung mit FSAP	54
4.1.2	Konzentrationsabhängige uPA/ tPA-Aktivität im Überstand der BxPC3-Zellen nach FSAP-Gabe und	

	Western Blot Analyse von uPA und PAI-1	55
4.1.3	Kein FSAP-Effekt auf Matrixmetalloproteasen in BxPC3-Zellen	58
4.1.4	Keine Änderung der Genexpression von uPA, PAI-1, tPA, MMP-2/-9 und TIMP-1/-2 nach FSAP-Gabe	61
4.1.5	Geringe Aktivierung der Signaltransduktion durch FSAP in BxPC3-Zellen	62
4.2	In-vivo Effekt von FSAP auf die Angiogenese in einem Maus-Matrigel-Modell	64
4.2.1	Optimierung der Matrigelversuche	64
4.2.2	Ausgeprägte Abnahme einzelner Gefäßkomponenten durch FSAP	72
4.2.3	Signifikante Reduktion der mikrovaskulären Dichte durch FSAP im Wildtyp-Maus	78
4.3	In-vivo Effekt von FSAP auf die Angiogenese beim uPA- und uPAR-Knockout Maus	79
4.3.1	Abnahme der Gefäßdichte nach FSAP-Behandlung beim uPA ^{-/-} -Maus	80
4.3.2	Abnahme der Gefäßdichte nach FSAP-Behandlung beim uPAR ^{-/-} -Maus	82
5. Diskussion		
5.1	In-vitro Effekte von FSAP auf pankreatische Tumorzellen	85
5.2	In-vivo Effekte von FSAP auf die Neoangiogenese	87
5.3	Position von uPA und uPAR sowie ihre Knockout-Modelle in der Angiogenese	88
5.4	Radiologisch-interventionelle Applikation von FSAP im Rahmen einer antiangiogenen bzw. antitumoralen Therapie	90
5.5	Klinische Relevanz von FSAP	91
6. Zusammenfassung		
6.1	Deutsche Version	93
6.2	Englische Version (Summary)	94

7. Abkürzungsverzeichnis

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

8.2 Tabellenverzeichnis

9. Literaturverzeichnis

10. Publikationsverzeichnis

11. Ehrenwörtliche Erklärung

12. Danksagung

13. Lebenslauf

1. Einleitung

1.1 Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese

Das Blutgefäßsystem hat eine Transport- und eine Austauschfunktion. Daneben zeigt es ein Mitwirken sowohl bei der Blutstillung und wie auch bei der Immunabwehr. Das Gefäß- und blutbildende System spielt somit eine entscheidende Rolle in der Embryonal- und Fetalzeit. Die ersten gebildeten Gefäße in der Embryonalzeit sind die Umbilikalgefäße (V. umbilicalis und die paarige Aa. umbilicales dextra et sinistra), dabei leiten die Venen das maternale, arterielle Blut zum Fetus und die Arterien das fetale, sauerstoffarme Blut zur Plazenta. Erst durch die ausreichende Nährstoffversorgung über die Nabelschnur kann die Organentwicklung stattfinden. Schon bei der Implantation und Wachstum der Plazenta zeigt sich eine ausgeprägte Angiogenese, die sowohl auf der fetalen als auch auf der maternalen Seite VEGF-vermittelt (Vascular Endothelial Growth Factor) stattfindet (Sharkey et al. 1993). Das Blutgefäßsystem entsteht über drei Prozesse: Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese. Die Gefäßbildung an sich ist ein sehr komplexer und durch viele Faktoren beeinflussbarer Regelkreis aus mehreren ineinander verzahnten Komponenten.

In der Vaskulogenese wird primär das große, primitive Gefäßnetzwerk aus den endothelialen Progenitorzellen (Angioblasten) gebildet (Carmeliet 2003, Risau et al. 1988). Erst der Zusammenschluss der einzelnen Endothelzellen anastomosiert das primitive Gefäßnetzwerk.

Davon abzugrenzen ist die Angiogenese, die aus bestehenden Kapillaren und postkapillären Venolen ein komplexes Gefäßnetzwerk bildet. Der Terminus Angiogenese wurde 1787 durch Dr. John Hunter, einem britischen Chirurg, geprägt. Nach Rekrutierung von glatten Muskelzellen findet die Reifung der in der Angiogenese gebildeten Gefäße in der Arteriogenese statt (Carmeliet 2000). Der Begriff Intussuszeption, „non-sprouting“-angiogenesis, sollte in diesem Zusammenhang ebenfalls erwähnt werden. Dabei kommt es durch Längsspaltung bereits existierender Gefäße zur Bildung eines weiteren Netzwerkes. Das Gefäß wird durch interstitielle Gewebesäulen geteilt.

Die Angiogenese beinhaltet die aufeinander abgestimmte Abfolge aus Migration, Proliferation, Differenzierung und Lumenbildung. Hierbei werden vaskuläre Endothelzellen als „Bausteine“ benutzt. Somit kleiden die Endothelzellen von innen alle Gefäße aus. Dabei befinden sich an der Gefäßspitze des sprossenden Gefäßes die TIP-Zellen und am Schaft die Stiel-Zellen. Die TIP-Zellen sind in der Lage, Signale an das Gewebe und Endothelzellen auszusenden. Bereits 1997 beschrieb Asahara et al.,

dass die Blutgefäßbildung nicht nur durch lokal vorhandene Endothelzellen, sondern auch durch die Rekrutierung von im Blutkreislauf zirkulierenden, endothelialen Vorläuferzellen (circulating endothelial precursors, CEP) erfolgt (Asahara et al. 1997). Die endothelialen Vorläuferzellen differenzieren in der Peripherie zu vaskulären Endothelzellen.

Die CEPs spielen nicht nur für physiologische, sondern auch für pathologische Vorgänge eine wichtige Rolle. Bestimmte Erkrankungen wie z.B. Wundheilung, Psoriasis vulgaris oder Tumore gehen mit einer ausgeprägten Blutversorgung einher, welche nur durch die Bildung von neuen Gefäßen eine Progression zeigen. Für die Entstehung neuer Gefäße werden somit wachstumsfaktorvermittelt Vorläufer- und zirkulierende Endothelzellen in das Gewebe „dirigiert“, sodass ohne diese Zellen die Angiogenese unterbleibt (Rabbany et al. 2003).

Ablauf der Angiogenese:

1. Bildung und Ausschüttung von Wachstumsfaktoren bedingt durch einen Stimulus (z.B. Hypoxie)
2. Wachstumsfaktorvermittelte Aktivierung von Endothelzellen (EC)
3. Bildung und Sekretion von Enzymen (Proteasen) und angiogenen Molekülen durch die EC selbst oder durch die extrazelluläre Matrix
4. Lockerung sowie Öffnung der Basalmembran der lokoregionalen Blutgefäße durch VEGF
5. Proliferation und Migration der EC in Richtung des sezernierten Stimulus
6. Verankerung und Kommunikation der proliferierenden EC durch Integrine und Adhäsionsmoleküle
7. Proteolytische Zersetzung der extrazellulären Matrix (ECM) durch u.a. Matrixmetalloproteasen (MMP) und uPA-System sowie Remodeling der ECM um das neue Gefäß herum
8. Tubenförmige Formation der EC mit morphologischen Kriterien eines Gefäßes
9. Stabilisierung des neu gebildeten Gefäßes durch vaskuläre glatte Muskelzellen und Perizyten
10. Anastomose mit den bereits vorhandenen Gefäßen auf Kapillarebene mit anschließender Perfusion

Die innerste Schicht des Gefäßes bildet das Endothel, welches sich als zelluläre Barriere zwischen zirkulierendem Blut und dem Extravasalraum befindet. Die vaskuläre Endothelzelle zeigt im Rahmen der Angiogenese vielfältige Aufgaben. Sie stellt durch

Proliferation, Migration und Rekrutierung von periendothelialen Zellen die einzelnen Gefäßkomponenten dar. Durch Interaktion mit den Perizyten wird eine stabilisierende Basalmembran hergestellt. Zudem dürfte ein regulierender Wirkmechanismus der extrazellulären Matrix und seiner Proteasen ebenfalls durch die Endothelzelle erfolgen.

Die extrazelluläre Matrix trägt zu einer entscheidenden Rolle bei der Gefäßneubildung bei. Hier lassen sich sowohl angiogene als auch antiangiogene Faktoren identifizieren (Sottile 2004) und stimulusabhängig sezernieren. Dabei sind die Wachstumsfaktoren VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) eine der wichtigsten Stimulatoren der Angiogenese; VEGF-Expression wird über HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) gesteuert. VEGF wurde 1989 durch zwei verschiedene Arbeitsgruppen entdeckt (Ferrara & Henzel 1989, Gospodarowicz et al. 1989). Durch den permeabilitätssteigernden Effekt von VEGF, frühere Bezeichnung VPF (*vascular permeability factor*), auf die Endothelzelle kommt es zur einem Übertritt von Blutbestandteilen in die extrazelluläre Matrix. Die Synthese von VEGF findet u.a. in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen statt, die Synthese von FGF auch in Endothelzellen und glatten Muskelzellen sowie in Fibroblasten und Perizyten. Daneben spielt auch ein weiterer, in Relation zu VEGF und bFGF der schwach proangiogene Faktor Angiopoietin-1 (Ang-1) eine wichtige Rolle (Suri et al. 1996), die Synthese findet in periendothelialen Zellen (Perizyten, Fibroblasten) statt.

Sowohl für die Vaskulo-, Anglo- als auch für die Arteriogenese ist der Wachstumsfaktor VEGF einer der wichtigsten Stimulatoren (Carmeliet et al. 1996, Ferrara et al. 1996). Der primäre Antrieb der Angiogenese ist allerdings VEGF.

Daneben beschrieben Seghezzi et al. einerseits eine FGF-induzierte Expression von VEGF, andererseits bei systemischer Applikation eines VEGF-Antikörpers und somit Neutralisierung desselben, eine deutlich reduzierte FGF-induzierte Angiogenese, welche sie auf den autokrinen Mechanismus von VEGF zurückführen (Seghezzi et al. 1998). Die Kombination der beiden Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF üben zudem einen synergistischen Effekt auf die endogene Stimulierung der PDGF-B–PDGFR β - Signalkaskade und somit der Angiogenese aus (Kano et al. 2005). Der Wachstumsfaktor PDGF-BB (Platelet Derived Growth Factor-BB) ist für die Rekrutierung der glatten Muskelzellen notwendig und spielt u.a. eine Rolle in der Atherosklerose.

Nicht nur die extrazelluläre Matrix ist bei Gefäßprozessen ein wichtiger Faktor, sondern auch Komponenten der Hämostase spielen hierbei eine Rolle. Beispielsweise sind die Thrombozyten in der Lage 15 positive und 12 negative Regulatoren der

Angiogenese zur sezernieren (Donovan et al. 2000, Folkman et al. 2001, Yatomi et al. 1995). Die Positiven sind u.a. VEGF, bFGF, HGF (hepatocyte growth factor) und PDGF, die Negativen Thrombospondin-1 und Endostatin.

Für die Formation eines Gefäßes im Rahmen der Angiogenese spielen nicht nur vaskuläre Endothelzellen, sondern auch Perizyten (= periendotheliale Zellen, = Adventitiazellen) eine wichtige Rolle. Die Perizyten befinden sich in der Basalmembran der Endothelzellen auf kapillärer Seite und in den postkapillaren Venolen. Sie sitzen somit den Endothelzellen auf und zeigen zudem die Zellen umfassende Ausläufer. Die Ausläufer werden als stabilisierende und z.T. zur Kommunikation dienende Elemente der kleinen Gefäße angesehen. Bei der Reifung, Stabilisierung und dem Remodeling, vor allem auf mikrovaskulärer Ebene, zeigen Perizyten wichtige regulatorische Funktionen (Hellstrom et al. 2001, Lindahl & Betsholtz 1998). Daneben sind die Perizyten in der Lage, sich in Phagozyten oder Adipozyten zu differenzieren. Perizyten zeigen somit insgesamt eine wichtige Funktion in der Interaktion mit der extrazellulären Matrix, in der Gefäßneubildung sowie im Rahmen eines Myokardinfarktes (Katara & Madeddu 2013, Schor et al. 1990, Schor et al. 1991, Schor et al. 1995). Allerdings sind der „Informationsaustausch“ bzw. ihre wohlmöglich gegenseitig beeinflussenden Signalwege zwischen Endothelzelle und Perizyt noch nicht genau geklärt, Ansätze zum näheren Verständnis wurden bereits untersucht (Armulik et al. 2005).

1.2 Physiologische und pathologische Angiogenese

Die physiologische Angiogenese findet während der Embryogenese und Menstruation statt, die pathologische u.a. bei der Wundheilung, bei Tumorenstehung, peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK), chronischen Entzündungen und diabetischer Retinopathie (Bandello et al. 2013a, Bandello et al. 2013b, Miller 1997, Miller et al. 1997). Dabei spielen auf beiden Seiten das Vorhandensein von pro- und antiregulatorischen und sich dabei gegenseitig beeinflussenden Mechanismen der Angiogenese eine Rolle (Carmeliet 2003, Carmeliet 2005). Beim Tumor überwiegen allerdings die proregulatorischen Komponenten der Angiogenese, wobei VEGF als einer der relevanten Stimulatoren der Gefäßneubildung identifiziert wurde (Plate et al. 1992). Nicht nur der Wachstumsfaktor wurde für die Forschung interessant, sondern auch seine Rezeptoren. Dabei wird primär der Rezeptor VEGFR-1 (Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor-1) beim Tumor, Ischämie und Entzündung aktiviert, während beim Wachstum der VEGFR-2 (Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor-2) eine Rolle spielt (Takahashi & Shibuya 2005).

Während unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren besteht, ist das Gleichgewicht bei Tumorentstehung gestört. Hier überwiegen die proangiogenen Faktoren mit der Konsequenz der vermehrten Gefäßsprossung für nutritive und somit proliferative Zwecke. Im Vergleich mit den normalen Gefäßen sind die neu gebildeten Tumorgefäße defekt. Sie zeigen schwache Gefäßwände und führen oft zu Hämorrhagien bei insgesamt inhomogener Architektur (Baluk et al. 2005, McDonald & Baluk 2005). Die Hämorrhagien werden u.a. durch die unphysiologische Überproduktion von VEGF und konsekutiv durch die Erhöhung der Gefäßpermeabilität bedingt. Des Weiteren zeigen die Tumorgefäße zudem starke Schängelungen und Dilatationen auf.

1.3 Endogene und exogene Angiogenesestimulatoren sowie -inhibitoren

Die Forschungen von Judah Folkman (1974) ergaben, dass die soliden Tumore zwei Entwicklungsschritte durchlaufen (Folkman 1974). Der erste Schritt geht bei einem Durchmesser von 1 bis 2 mm mit einer avaskulären Phase einher, der zweite Schritt, die vaskuläre Phase, beginnt bei weiterer Größenzunahme des Tumors. Für die Bildung von neuen Kapillaren sind Tumor-Angiogenese-Faktoren (TAF, *tumor angiogenesis/ angiogenic factor*) notwendig. Die Erkenntnis konnte Folkman noch dadurch untermauern, dass bei Wegfall der TAF die neu gebildeten Kapillaren sich rasch zurückgebildet haben.

Der erste Faktor der tumorassoziierten Angiogenese, ein Heparin bindender Wachstumsfaktor, wurde 1984 entdeckt (Shing et al. 1984). Montesano et al. beschrieb bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) als einen proangiogenen Faktor, welcher auch in der Lage ist, die Endothelzellen durch Bildung eines Plasminogen-Aktivators zu stimulieren (Montesano et al. 1986). VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) wurde 1989 ebenfalls als ein Faktor beschrieben (Ferrara & Henzel 1989, Leung et al. 1989), welcher primär auf vaskulären Endothelzellen eine ausgeprägt wachstumsfördernde Wirkung ausübt. Im Gegensatz zu bFGF steigert VEGF zudem die vaskuläre Permeabilität, weshalb VEGF initial durch eine andere Arbeitsgruppe als *vascular permeability factor* (VPF) benannt wurde (Keck et al. 1989, Senger et al. 1983). Ein wichtiges Zusammenspiel zwischen bFGF und VEGF beschrieb Tille et al.; die Blockade des VEGFR-2 zeigte nicht nur eine verminderte VEGF-induzierte, sondern auch eine verminderte bFGF-induzierte Angiogenese (Tille et al. 2001). Weiterhin konnten Mandriota & Pepper mit der Gabe eines bFGF-Antikörpers in-vitro zeigen, dass einerseits eine reduzierte uPA-Aktivität und andererseits eine VEGF-induzierte

Angiogenese und Expression von uPA (urokinase-type plasminogen activator) und tPA (tissue type plasminogen activator) resultierte (Mandriota & Pepper 1997).

Thrombospondine sind multifunktionale Proteine, die bei der Angiogenese, Apoptose und Zelladhäsionen eine Rolle spielen (Patra & Sandell 2012; 2012). Mosher et al. zeigten einen Effekt der Thrombospondine auf die extrazelluläre Membran durch Hemmung von uPA und konsekutiv des Plasmins (Mosher et al. 1992). Thrombospondin-1 und -2 zeigen einen antiangiogenen Effekt (Good et al. 1990, Tolsma et al. 1993, Volpert et al. 1995). In geklonten Pankreastumorzellen mit Überexpression von Thrombospondin-2 konnte eine signifikante Aktivitätsminderung von MMP-9 und uPA festgestellt werden (Nakamura et al. 2008).

Aufgrund der Entdeckung von TAF und seiner Funktion sowie der raschen Rückbildung von neu gebildeten Kapillaren bei Wegfall von TAF, sprach Folkman schon 1971 über den Einsatz verschiedener, antiangiogener Mechanismen bzw. Faktoren im Rahmen der Gefäßneubildung (Folkman 1971, Folkman 1972).

Folkman beschreibt drei unterschiedliche Typen von Angiogenesehemmern (Folkman 2004), welche in Abb. 1 zusammengefasst sind. Der erste Typ hemmt spezifisch nur ein Protein (z.B. Bevacizumab (Avastin®) inhibiert VEGF), der zweite Typ hemmt 2 oder 3 angiogene Proteine (z.B. Downregulation von VEGF, bFGF und TGF- α durch Gefitinib (Iressa®)), und der letzte Typ hemmt viele angiogen wirkende Moleküle (z.B. Endostatin inhibiert u.a. die Effekte von VEGF, bFGF und HIF-1 α).

Three types of angiogenesis inhibitors																										
	Mechanism	Example																								
I	Blocks 1 major angiogenic protein	Avastin VEGF Trap } blocks VEGF																								
II	Blocks 2 or 3 angiogenic proteins	<table border="0"> <tr> <td>Sugen 11248</td> <td>Downregulates</td> <td>Upregulates</td> </tr> <tr> <td></td> <td>VEGF receptor2</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>PDGF receptor</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>c-kit receptor</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Iressa</td> <td>VEGF production</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>bFGF " "</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>TGF-α by tumor cells</td> <td></td> </tr> </table>	Sugen 11248	Downregulates	Upregulates		VEGF receptor2			PDGF receptor			c-kit receptor		Iressa	VEGF production			bFGF " "			TGF- α by tumor cells				
Sugen 11248	Downregulates	Upregulates																								
	VEGF receptor2																									
	PDGF receptor																									
	c-kit receptor																									
Iressa	VEGF production																									
	bFGF " "																									
	TGF- α by tumor cells																									
III	Blocks a broad spectrum of angiogenic regulators	<table border="0"> <tr> <td>Endostatin</td> <td>VEGF</td> <td>Thrombospondin-1</td> </tr> <tr> <td></td> <td>bFGF</td> <td>Maspin</td> </tr> <tr> <td></td> <td>bFGF receptor</td> <td>HIF1α inhibitor</td> </tr> <tr> <td></td> <td>HIF1α</td> <td>TIMP-2</td> </tr> <tr> <td></td> <td>EGF receptor</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>ID-1</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>Neuropilin</td> <td></td> </tr> <tr> <td>HPMA-TNP-470 (broadest anti-cancer spectrum)</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	Endostatin	VEGF	Thrombospondin-1		bFGF	Maspin		bFGF receptor	HIF1 α inhibitor		HIF1 α	TIMP-2		EGF receptor			ID-1			Neuropilin		HPMA-TNP-470 (broadest anti-cancer spectrum)		
Endostatin	VEGF	Thrombospondin-1																								
	bFGF	Maspin																								
	bFGF receptor	HIF1 α inhibitor																								
	HIF1 α	TIMP-2																								
	EGF receptor																									
	ID-1																									
	Neuropilin																									
HPMA-TNP-470 (broadest anti-cancer spectrum)																										

Abb. 1: Darstellung unterschiedlicher Angiogenesehemmer (Folkman 2004). Folkman et al. zeigten mit dieser Übersicht die verschiedenen Möglichkeiten der Angiogenese-Hemmung. Diese wurden in drei Mechanismen aufgeteilt (linke Spalte), in der rechten Spalte kommen die dazugehörigen Beispiele zur Darstellung. Je nach verabreichter Substanz werden entweder nur ein oder mehrere angiogen wirkende Faktoren gehemmt.

Brem und Folkman entdeckten 1975 den ersten Inhibitor der Angiogenese im Knorpel (Brem & Folkman 1975). Das Ergebnis konnte durch eine weitere Arbeitsgruppe in einem in-vivo Versuch untermauert werden (Langer et al. 1980). Angiostatin, ein Spaltprodukt von Plasminogen, welches auch u.a. vom malignen Tumor (Lewis-Lung Karzinom) nach Erreichen einer bestimmten Größe produziert wird, zeigte in einem Tiermodell die Hemmung der Neoangiogenese (O'Reilly et al. 1994). Konsekutiv zeigt der Tumor somit hinsichtlich des Größenwachstums eine autoregulatorische Eigenschaft. Erst nach Entfernung des Primärtumors, welcher somit keine Angiostatine mehr in den Blutkreislauf sezernieren konnte, ließen sich nach 6 bis 12 Monaten in verschiedenen Organen mehrere Metastasen nachweisen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Tumore sowohl in der Lage sind angiogene als auch antiangiogene Faktoren zu bilden. Insgesamt überwiegen allerdings die proangiogenen Faktoren. Mehrere Jahre später konnte erneut der Angiogenesehemmer Endostatin aus einem Tumor (Hämangioendotheliom) identifiziert und näher charakterisiert werden (O'Reilly et al. 1997). Endostatin ist ein Spaltprodukt aus Kollagen XVIII. In-vivo wird die Migration von Endothelzellen gehemmt und in-vitro die Apoptose eingeleitet. Die orale Applikation von Celecoxib, einem selektiven COX-2

Hemmer, erhöht die Konzentration des endogenen Inhibitors Endostatin (Ma et al. 2002).

Ein weiteres Medikament, welches spezifisch die VEGF-vermittelte Angiogenese hemmt, wurde 1997 als Bevacizumab humanisiert (Presta et al. 1997). Die kombinierte Hemmung der Rezeptoren von VEGF- und PDGF (Platelet Derived Growth Factor) und somit ihrer Signalkaskade führte in-vivo beim Pankreaskarzinom (Inselzellen) zu einem deutlich antiangiogenen und antitumoralen Effekt (Bergers et al. 2003). Auch die Aktivierung der Proteinkinase C führt über beta-Phorbol 12,13-Dibutyrate (PDBu) zu einer Hemmung der Endothelzellproliferation und der DNA-Synthese (Doctrow & Folkman 1987).

Abb. 2 gibt einen Überblick über die verschiedenen angiogenen und antiangiogenen wirkenden Faktoren. Die Faktoren sind vielfältig und werden sowohl physiologisch als auch tumorassoziiert gebildet (Hoff & Machado 2012). Aus der Übersicht geht hervor, dass die Wissenschaft ihren Schwerpunkt auf die Seite der Angiogenesehemmer verschoben hat. Dies resultiert daraus, dass die medikamentöse Hemmung der tumorassoziierten Gefäßneubildung in Relation zu den übrigen Verfahren wie Chemotherapie und Operation eine schonende Therapieoption stellt.

Weiterhin wurde beobachtet, dass TKI-28 (tyrosine kinase inhibitor-28) einen antiangiogenen Effekt zeigt, indem er die EGF, VEGF und PDGF stimulierte Proliferation, Migration und Gefäßformation hemmt (Guo et al. 2005). Auch Bestandteile aus dem grünen Tee, Katechine (epigallocatechin gallate, EGCG), zeigen antitumorale Effekte durch Hemmung der VEGF-induzierten Kaskade (Jung & Ellis 2001, Jung et al. 2001). Die Arbeitsgruppe um Du et al. bewies ebenfalls die chemopräventive Wirkung von verschiedenen Bestandteilen aus dem grünen Tee (Du et al. 2012).

Inzwischen sind eine Reihe unterschiedlich antiangiogen wirkender Medikamente bekannt, die in verschiedenen medizinischen Fachrichtungen eingesetzt werden: Monoklonale Antikörper (Bevacizumab, Cetuximab), Inhibitoren der Tyrosinkinase (Erlotinib, Pazopanib, Sorafenib, Sunitinib, Vandetanib), Hemmer des mammalian Target des rapamycin mTOR, eine Serine/ Threonin - Kinase, (Temsitrolimus, Everolimus) und weitere antiangiogene Medikamente (Interferon alfa, Lenalidomide, Thalidomide, rhEndostatin).

angiogene Wachstumsfaktoren	Angiogenesehemmer
Angiogenin	Angioarrestin
Angiopoietin-1	Angiostatin (plasminogen fragment)
Del-1	Antiangiogenic antithrombin III
Fibroblast growth factors: acidic (aFGF) and basic (bFGF)	Arrestin
Follistatin	Chondromodulin
Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)	Canstatin
Hepatocyte growth factor (HGF) /scatter factor (SF)	Cartilage-derived inhibitor (CDI)
Interleukin-8 (IL-8)	CD59 complement fragment
Leptin	Endostatin (collagen XVIII fragment)
Midkine	Endorepellin
Placental growth factor	Fibronectin fragment
Platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF)	Fibronectin fragment (Anastellin)
Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB)	Gro-beta
Pleiotrophin (PTN)	Heparinases
Progranulin	Heparin hexasaccharide fragment
Proliferin	Human chorionic gonadotropin (hCG)
Transforming growth factor-alpha (TGF-alpha)	Interferon alpha/beta/gamma
Transforming growth factor-beta (TGF-beta)	Interferon inducible protein (IP-10)
Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)	Interleukin-12
Vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF)	Kringle 5 (plasminogen fragment)
	Metalloproteinase inhibitors (TIMPs)
	2-Methoxyestradiol
	PEX
	Pigment epithelium derived factor (PEDF)
	Placental ribonuclease inhibitor
	Plasminogen activator inhibitor
	Platelet factor-4 (PF4)
	Prolactin 16kD fragment
	Proliferin-related protein (PRP)
	Prothrombin kringle 2
	Retinoids
	Soluble Fms-like tyrosine kinase-1 (S-Flt-1)
	Targeting fibronectin-binding integrins
	Tetrahydrocortisol-S
	Thrombospondin-1 (TSP-1) and -2
	Transforming growth factor-beta (TGF-b)
	Troponin I
	Tumstatin
	Vasculostatin
	Vasostatin (calreticulin fragment)

Abb. 2: Überblick über angiogene und antiangiogene Faktoren (The Angiogenesis Foundation, <http://www.angio.org/understanding/growth.php>). Die Übersicht demonstriert das Spektrum der gefäßbildenden- und hemmenden Substanzen, dabei liegt der wissenschaftliche Schwerpunkt auf der Seite der Angiogenesehemmer.

1.4 Tumorangiogenese und Metastasierung

Judah Folkman, der *Pionier der Tumorangiogenese*, legte u.a. die Meilensteine für die Angiogeneseforschung, sei es für das breite Verständnis als auch für eine antiangiogene Therapie.

„*In any case, tumor vascularization is a neovascularization process*“, damit kündigte Paweletz et al. ebenfalls die tumorassoziierte, obligatorische Gefäßneubildung an (Paweletz & Knierim 1989), was im Endeffekt eine *Anastomose* zwischen Tumor und vorhandenem Gefäß darstellt.

Die Tumorneoangiogenese ist ein Komplex von unterschiedlich, sowohl zusammen- als auch gegeneinander wirkenden Komponenten. Nach maligner Transformation einer Zelle findet die initiale nutritive Versorgung bei einer Größe von 1 bis 2 mm mittels Diffusion statt (Folkman 1972), der Tumor befindet sich in der ersten, avaskulären Phase. Bei Größenprogredienz kommt es vor allem innerhalb des zentralen Tumorgewebes zur Hypoxie, welche die Bildung von proangiogenen Faktoren und insbesondere von HIF-1 α , einem Transkriptionsfaktor, stimuliert (Shweiki et al. 1992). Dieser wiederum stimuliert die Bildung von Wachstumsfaktoren durch die Tumorzelle selbst (TAF, *tumor angiogenesis/ angiogenic factor*) (Folkman et al. 1971), welche dann in die extrazelluläre Matrix zur Gefäßbildung freigesetzt werden. Dabei wird die Angiogenese während des Überganges von der Hyperplasie zur Neoplasie „gestartet“, sie durchläuft somit einem „angiogenic switch“ (Folkman et al. 1989). Der Tumor wird vaskularisiert und geht somit in die zweite, vaskuläre Phase über. Die Wachstumsfaktoren führen u.a. zur einer Migration und Proliferation von Endothelzellen aus bereits vorbestehenden Gefäßen (Ausprunk & Folkman 1977), eine Rekrutierung von zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen (CEP) unterstützt die Neovaskularisation. Die CEP's werden durch den Tumor sezernierten angiogenen Faktoren aus dem Knochenmark freigesetzt.

Im Rahmen der Tumorneoangiogenese entstehen nicht nur Kapillaren und Venolen, sondern auch im gewissen Ausmaß neue Lymphgefäße (Korpelainen & Alitalo 1998). Die primär funktionsuntüchtige Lymphangiogenese dient u.a. zum Abtransport von Abfallstoffen und möglicherweise auch von maligne transformierten Zellen.

Ein bekannter Wachstumsfaktor der physiologischen Angiogenese, nämlich VEGF, wurde als potenter, angiogener Faktor im malignen Tumor beschrieben (Plate et al. 1992). Im selben Jahr wurden ihre Rezeptoren entdeckt, Tyrosinkinase-VEGF-Rezeptoren, nämlich VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (Flk-1) (de Vries et al. 1992,

Terman et al. 1992). Der dritte Rezeptor VEGFR-3 (Flt-4) wurde von Aprelikova und Galland beschrieben (Aprelikova et al. 1992, Galland et al. 1992). Somit stellt die Kaskade zwischen Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren einer der wichtigsten Angriffspunkte der Neoangiogenese dar.

1.5 Therapeutische Hemmung der Tumorneoangiogenese

Für die therapeutische Hemmung der Tumorneoangiogenese kommen verschiedene biologische Ziele in Frage. Von großer Bedeutung sind die Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren bzw. die intrazelluläre Signalkaskade (z.B. Tyrosinkinase-Inhibitoren). Andererseits können Moleküle gegen die extrazelluläre Matrix, tumorassoziierte Antigene, der Signalkaskade und die Bildung von proangiogenen Faktoren während der Angiogenese entwickelt werden (Storti et al. 2013). Antiangiogene Therapien sind generell im Vergleich zur Chemotherapie nebenwirkungsarm und zeigen primär keine Toxizität. Damit werden sie als die vierte Säule neben Operation, Bestrahlung und Chemotherapie angesehen. Vollständigkeitshalber sollten Hormon- und Immuntherapie erwähnt werden, die ebenfalls zur Tumorbehandlung eingesetzt werden.

Die Entdeckung von VEGF und sein Effekt u.a. bei der Tumorneoangiogenese legten nahe, dass ein potenter Inhibitor therapeutisch von Nutzen sei. Die Hypothese postulierte Folkman 1971 (Folkman 1971). Kim et al. beschrieben in-vivo eine Reduktion der mikrovaskulären Dichte nach Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF (Kim et al. 1993). Über die mikrovaskuläre Dichte in Tumormodellen lassen sich quantitative Rückschlüsse über die antiangiogene Wirkung des neuen Faktors ziehen (Bodnar et al. 2012, Novella-Maestre et al. 2012). In einer randomisierten Studie zeigte der spezifische Antikörper gegen VEGF, Bevacizumab, seinen therapeutischen Nutzen in Kombination mit anderen Chemotherapeutika durch Erhöhung der Überlebensrate bei metastasiertem Kolonkarzinom (Hurwitz et al. 2004). Die antiangiogene Kombinationstherapie wurde bereits 1993 von Brem et al. als therapeutisch sinnvoll und relevant eingestuft (Brem et al. 1993). Abdollahi et al. bestätigte diese Relevanz 2003. Die kombinierte Gabe von Endostatin und SU5416, einem Inhibitor der VEGFR-2 RTK (Fong et al. 1999, Sun et al. 1998), führte u.a. hinsichtlich des Tumorwachstums und der mikrovaskulären Dichte beim Prostatakarzinom, Bronchialkarzinom und Glioblastom zu einer signifikanten Abnahme (Abdollahi et al. 2003).

Eine weitere Arbeit zeigte zudem die PDGF-vermittelte Sekretion von VEGF im Ovarialkarzinom, welche durch die Gabe von Imatinib mesylate, einem selektiven PDGFR-Inhibitor, diesem entgegenwirkte und die wachstumsvermittelte Neoangiogenese reduzierte (Matei et al. 2007). Somit wurde auch der PDGF-Rezeptor (platelet derived growth factor-Rezeptor, PDGFR) für die antitumorale Therapie interessant (Ostman & Heldin 2007).

Das Zusammenspiel von Matrixmetalloproteasen (MMP's) und dem uPA-System (Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System) wurde in malignen Prozessen sowie der Metastasierung mehrfach beschrieben und ihre Relevanz hervorgehoben (Gondi et al. 2004, Schuler et al. 2012, Shia et al. 2011). Die Downregulation von uPAR und MMP-9 resultierten u.a. in einer Abnahme der Invasivität und Gefäßsprossung (Rao et al. 2005). Nicht nur das uPA-System an sich, sondern auch sein Rezeptor kann im Rahmen der antiangiogenen Therapie gehemmt werden (Preissner et al. 2000). Die Umgestaltung der extrazellulären Matrix findet u.a. über die MMP's und das uPA-System statt.

1.6 Funktion, Lokalisation und Interaktion der Faktor VII-aktivierenden Protease (FSAP)

Die Faktor VII-aktivierende Protease (FSAP) wird vorwiegend in der Leber synthetisiert und als Zymogen inaktiv in den Blutkreislauf sezerniert. Sie zeigt strukturelle Ähnlichkeiten mit Plasminogen, Urokinase und HGF-A (hepatocyte growth factor-activator) (Choi-Miura et al. 1996, Hashimoto et al. 1997). Choi-Miura et al. zeigten, dass u.a. Nieren, Skelettmuskulatur und Pankreas ebenfalls FSAP bilden (Choi-Miura et al. 1996).

Initial bezeichnete Choi-Miura et al. FSAP als PHBP (*plasma hyaluronan binding protein*), da die damalige Reinigung und Identifizierung aus dem Plasma über eine Säule mit Hyaluronsäure stattfand. Die scFSAP (single-chain - factor VII-activating protease) ist eine Serinprotease mit einem Molekulargewicht zwischen 65 und 70 kDa im inaktiven und 48 (schwere Kette) bzw. 30 kDa (leichte Kette) im aktiven Zustand (tcFSAP, two-chain - factor VII-activating protease). Die Konzentration beträgt im Plasma 12 µg/ml im Plasma vor. Beide Ketten werden im aktiven Zustand über Disulfidbrücken gehalten. Die Abb. 3 zeigt schematisch die Struktur von FSAP. Die scFSAP hat dabei insgesamt 3 EGF-Domänen (Epidermal Growth Factor) und eine Kringle-Domäne am N-terminalen Ende sowie eine Serinprotease-Domäne am C-terminalen Ende. Nach der Spaltung besitzt die aktive Form tcFSAP eine leichte und

eine schwere Kette; an der schweren Kette kommen die EGF- und die Kringle-Domänen, an der leichten die Serinprotease-Domäne vor.

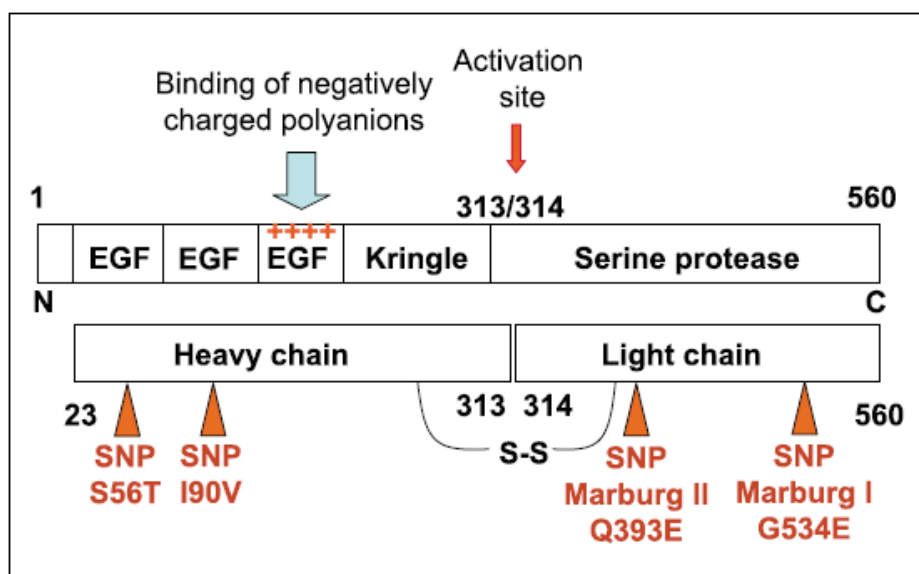


Abb. 3: Schematische Darstellung von FSAP (Kanse et al. 2008) mit seiner sc- (oben) und aktiven tc-Form (unten). Die FSAP-Aktivierung findet dabei über eine Spaltung an der Aktivierungsstelle 313/314 statt. Die schwere Kette trägt drei EGF- und eine Kringle-Domäne sowie eine leichte die Serinprotease-Domäne; beide Ketten werden über Disulfidbrücken gehalten. Mutationen führen zu vier verschiedenen Polymorphismen (SNP, single nucleotide polymorphism), Marburg I spielt dabei die klinisch wichtige Rolle.

FSAP spielt eine bei der Hämostase und Fibrinolyse (Kannemeier et al. 2001, Romisch et al. 1999a, Romisch et al. 1999c) und erhöht die Aktivität von BMP-2 (Roedel et al. 2013). Einerseits aktiviert FSAP unabhängig von tPA und TF (Tissue Factor, potenter Initiator der Blutgerinnung) den Faktor VII der Gerinnungskaskade, andererseits wird der Gegenspieler der Gerinnung, die Urokinase, aktiviert. Die Aktivierung von Plasmin durch die Urokinase führt anschließend zur Fibrinolyse. Auch die pro-Urokinase ist in der Lage scFSAP zu aktivieren. Neuere Arbeiten von Kanse et al. zeigen, dass FSAP die Proteolyse und die Hemmung von TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) fördert (Kanse et al. 2012).

Eine Arbeit von Stavenuiter et al. entkräftete den aktivierenden FSAP-Effekt auf Faktor VII, wohingegen die uPA-Aktivierung bestätigt wurde (Stavenuiter et al. 2012).

Die Autokatalyse von FSAP (Etscheid et al. 2000) wird durch polyanionische Moleküle wie Heparin und Nukleinsäuren/ RNA (Nakazawa et al. 2005) gesteigert. Dabei lassen sich z.B. höhere Konzentrationen der Ribonukleinsäuren lokoregional nach einem Zellschaden oder einer Gefäßverletzung nachweisen. Einerseits wird die FSAP-Aktivität durch Aprotinin gehemmt, andererseits führt die eigene proteolytische

Aktivität im Bereich der Serinprotease zur Degradation und somit zur Inaktivierung von FSAP (Choi-Miura et al. 2001). Bei Patienten mit einem akuten Lungenversagen (ARDS, *acute respiratory distress syndrome*) führte PAI-1 (Plasminogen-Aktivator Inhibitor-1, Serpin) zu einer Hemmung von FSAP, dabei wurde die inhibitorische Wirkung durch die extrazelluläre RNA gesteigert (Wygrecka et al. 2007). Extrazellulär vorkommende Histone fördern z.B. die Entstehung einer Sepsis (Chaput & Zychlinsky 2009). Darüberhinaus aktivieren freie Histone FSAP (Yamamichi et al. 2011), die wiederum zu einer proportionalen Zunahme von Nukleosomen führt, was mit einer gesteigerten Letalität einhergeht (Stephan et al. 2011a). Somit lassen sich sowohl pro- als auch anti-FSAP Moleküle finden, die teilweise abhängig von der lokalen Situation einen unterschiedlichen Effekt auf FSAP ausüben.

Des Weiteren konnten PDGF-BB vermittelte Proliferation und Migration der vaskulären glatten Muskelzellen durch FSAP gehemmt und bei Gabe von Aprotinin oder eines FSAP-Antikörpers neutralisiert werden (Kannemeier et al. 2004). Dabei zeigt FSAP eine hohe Bindungskraft an PDGF-BB und spaltet den Wachstumsfaktor im Bereich der Rezeptorbindungs- sowie der Aktivierungsstelle (Shibamiya et al. 2007).

Aufgrund der proteolytischen Aktivität zeigten weitere Untersuchungen mit FSAP, dass freies bFGF durch FSAP in seiner Funktion gehemmt wird und somit verliert bFGF seine mitogene Wirkung auf Endothelzellen (Etscheid et al. 2004b). Obwohl Heparin die FSAP-Autokatalyse steigert, hat Heparin eine protektive Wirkung auf bFGF.

FSAP ist in der Lage, dermale und pulmonale Fibroblasten über ERK 1 / 2 (extracellular regulated kinase 1 / 2) und PI3k/ Akt-Signalweg zu aktivieren und bFGF-vermittelte Proliferation und Migration zu stimulieren (Etscheid et al. 2005).

Die Abb. 4 zeigt zusammenfassend eine schematische Darstellung der FSAP-Interaktionen bzw. -Funktionen im Organismus.

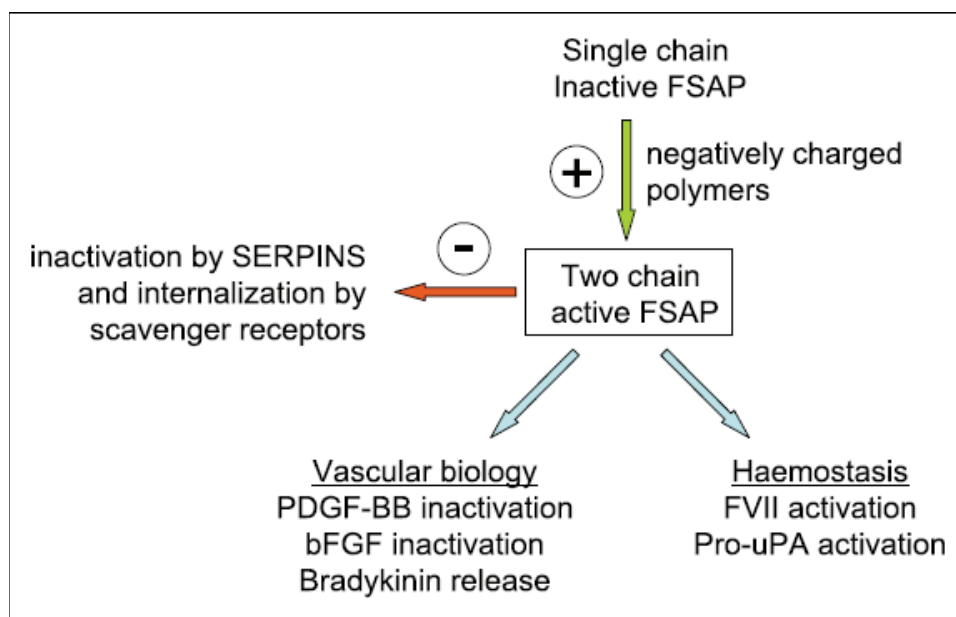


Abb. 4: Schematische Darstellung der FSAP-Funktionen (Kanse et al. 2008). Die FSAP-Aktivierung findet über negativ geladene Teilchen statt, wohingegen Serpine FSAP hemmen. Die aktive FSAP-Form wirkt einerseits dual auf die Hämostase und andererseits auf die Inaktivierung von Wachstumsfaktoren bzw. die Freisetzung von Bradykinin.

Zwei Polymorphismen (SNP, *single nucleotide polymorphism*) von FSAP wurden im Bereich der Serinprotease identifiziert (siehe Abb. 3). Die Variante 1 wird Marburg I (G₅₃₄E, MI-FSAP), die Variante 2 als Marburg II (Q₃₉₃E, MII-FSAP) bezeichnet (Kanse & Etscheid 2011, Roemisch et al. 2002). Zwei weitere Nukleotidpolymorphismen befinden sich im Bereich der EGF-Domäne und sind somit nicht relevant für die proteolytische FSAP-Funktion.

Die FSAP-Mutante „Marburg I Variante“, FSAP-MI oder G₅₃₄E, zeigt eine deutlich reduzierte Aktivierung der pro-Urokinase, allerdings bleibt die Aktivierung von Faktor VII unbeeinträchtigt (Roemisch et al. 2002). Dieses Ungleichgewicht führt konsekutiv zur gesteigerten Gerinnung und somit zu venösen Thrombosen (Ahmad-Nejad et al. 2012, Hoppe et al. 2005). Des Weiteren ist die generalisierte Atherosklerose bzw. das kardiovaskuläre Risiko sowie die Rate an Karotisstenosen durch den FSAP-Polymorphismus der Variante I (verminderte proteolytische Aktivität) signifikant erhöht (Ireland et al. 2004, Sedding et al. 2006a, Willeit et al. 2003), obwohl die Mutante den antikoagulatorisch wirkenden TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) nicht hemmt, und dadurch das Thromboserisiko reduziert ist (Etscheid et al. 2012, Kanse et al. 2012). Sedding et al. beschrieben dabei das erhöhte kardiovaskuläre Risiko beim G₅₃₄E-Polymorphismus durch fehlende Hemmung der Neointimabildung und konsekutiv der Re-Stenose im Vergleich mit WT-FSAP (Sedding et al. 2006a). Die Atherosklerose und die Re-Stenose werden primär durch die PDGF-BB vermittelte Aktivierung von

vaskulären glatten Muskelzellen getriggert (Kamimura et al. 2004), durch die verminderte proteolytische Aktivität in der MI-Variante findet keine Spaltung von PDGF-BB statt (Kannemeier et al. 2004). Daneben konnten in instabilen atherosklerotischen Plaques der Koronarien eine signifikante Akkumulation von FSAP-mRNA nachgewiesen werden, welche durch die entzündungsbedingt rekrutierten Monozyten und Makrophagen exprimiert wurden (Parahuleva et al. 2008, Parahuleva et al. 2012). Auch die erhöhte Rate an Schlaganfällen sowie Leberfibrosen bzw. -entzündungen bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen werden in Zusammenhang mit der verminderten proteolytischen Aktivität von FSAP (MI-FSAP) gebracht (Borkham-Kamphorst et al. 2013, Trompet et al. 2011).

Nähere Untersuchungen der Marburg II Variante zeigten insgesamt keine Veränderungen der FSAP-Funktionen.

In einem Vorversuch wurde die Wirkung von FSAP auf das Tumorwachstum in-vivo untersucht (Kanse et al., nicht publizierte Ergebnisse). Hierbei wurden SCID-Mäuse (*severe combined immunodeficiency*) verwendet, die aufgrund ihres immunologischen Defektes keine B- oder T-Zellen bilden. SCID-Mäuse eignen sich dabei, das Wachstum von menschlichen, pankreatischen Tumorzellen (BxPC3) zu untersuchen. Die Gabe von FSAP (8 mg/kg Körpergewicht) über zwei Wochen führte zur einer 50%-igen Verminderung des Tumolvolumens. Das Tumorwachstum an sich erfordert die Neoangiogenese sowie das Wachstum einzelner bzw. mehrerer Tumorzellen. In dieser Arbeit sollten beide Punkte, der Effekt von FSAP auf die Angiogenese in-vivo, sowie der Effekt auf die BxPC3-Zellen in-vitro, näher untersucht und charakterisiert werden.

FSAP zeigt somit nicht nur steuernde Effekte im Rahmen der Hämostase und Fibrinolyse, sondern spielt eine inhibitorische Rolle im Rahmen der wachstumsfaktorvermittelten Prozesse einzelner Komponenten der Angiogenese. Bestimmte Proteine mit einer Kringle-Domäne wurden als potente Inhibitoren der Angiogenese identifiziert. So zeigten nähere Untersuchungen der Kringle-Domäne im Angiostatin, einem Spaltprodukt von Plasminogen, einen antiendothelialen und somit antiangiogenen Effekt (Cao et al. 1996, Cao et al. 2002). Diese Vorarbeit impliziert, dass FSAP aufgrund seiner Kringle-Domäne in der schweren Kette einen antiangiogenen Effekt ausüben könnte.

1.7 Rolle des uPA-Systems, der MMP's sowie TIMP in der Angiogenese

Die Matrixmetalloproteasen (MMP's) und das Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System (uPA-System) beeinflussen sich gegenseitig, sowohl in physiologischen als

auch pathologischen Prozessen. Das uPA-System ist in der Lage, die MMP's direkt zu aktivieren.

Das uPA-System besteht aus dem Zymogen Plasminogen und seiner aktiven Form Plasmin, den Plasminogen-Aktivatoren uPA ("urokinase-type plasminogen activator") und tPA ("tissue type plasminogen activator"), seinen Rezeptoren für uPAR ("urokinase-type plasminogen activator receptor") und für Plasmin sowie den Inhibitoren PAI-1 (Plasminogen-Aktivator Inhibitor-1) und α 2-Antiplasmin.

Die Matrixmetalloproteasen sind Kollagenasen, welche 1962 beschrieben wurden (GROSS & LAPIERE 1962). Diese spielen sowohl in physiologischen (Knochenumbau, Embryogenese) als auch in pathologischen Prozessen eine Rolle (Tumor, Arthritis) und werden generell als inaktives Proenzym (Zymogen) sezerniert. Dabei führen sie zu einem Abbau und einer Umstrukturierung der extrazellulären Matrix. In dieser Arbeit sind MMP-2 und -9 relevant.

MMP-2, auch Gelatinase A oder Typ IV Kollagenase genannt, ist ein von Fibroblasten sezerniertes 72 kDa Enzym und wurde 1972 in der rheumatoiden Synovia entdeckt (Harris & Krane 1972). MMP-9, Gelatinase B oder Typ V Kollagenase, ist ein von Leukozyten sezerniertes 92 kDa Enzym (Sopata & Dancewicz 1974). Ihre Substrate sind u.a. Gelatine, Elastin und Kollagen.

Das uPA-System und die MMPs sind für das extrazelluläre Remodeling wichtig und spielen somit eine entscheidende Rolle u.a. bei der Angiogenese. Dabei korrelieren die Höhe der Expression des uPA-Systems und der MMPs in malignen Prozessen mit der Invasivität bzw. Aggressivität, der Metastasierung und der Prognose (Fink & Boratynski 2012). Baruch et al. untermauerten 2001 diesen Gesichtspunkt mit ihren Untersuchungen, die Höhe der MMP-Expression während der Tumorgenese steigerte die Wahrscheinlichkeit von Metastasierungen (Baruch et al. 2001).

Chang-Wan Oh et al. zeigten die Relevanz von Plasminogen und Urokinase bei der Angiogenese, wobei uPAR eine untergeordnete Rolle spielte (Oh et al. 2003). Dabei zeigten bFGF alleine sowie in Kombination mit VEGF stimulierte uPA^{-/-}- und Plasminogen^{-/-}-Mäuse eine signifikant verringerte Angiogenese hinsichtlich ihrer Gefäßlänge (*cornea angiogenesis*), wohingegen uPAR^{-/-}-Mäuse in Relation zum Wildtyp-Maus keine signifikante Abnahme der Gefäßlänge zeigten. Eine andere Arbeitsgruppe hingegen beschrieb den uPA-Rezeptor als eine wichtige Komponente der Tumorangio-genese (Min et al. 1996).

Die Interaktion zwischen FSAP und uPA bzw. der Fibrinolyse zeigte Römisch et al. (1999a). Hier konnte FSAP als potenter Aktivator der pro-Urokinase identifiziert werden (Römisch et al. 1999b). Die Aktivierung von Plasmin durch die Urokinase führte somit

zur Fibrinolyse. Diese Untersuchungen zeigten die erste Verknüpfung zwischen FSAP und dem uPA-System zu finden.

Die Inhibitoren der MMPs sind die tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP's. Hierbei lassen sich vier verschiedene TIMPs voneinander abgrenzen, wobei TIMP-1 und -2 gut erforscht sind und hier näher erläutert werden sollen. Die Erstbeschreibung der TIMPs erfolgte 1975 von Bauer et al. (Bauer et al. 1975). Dabei bildet TIMP-1 mit pro-MMP-9 und TIMP-2 mit pro-MMP-2 einen nicht-kovalenten Komplex (Goldberg et al. 1989) und hemmt deren proteolytische Aktivitäten.

Ein Ungleichgewicht zwischen MMP und TIMP geht in physiologischen und vor allem in pathologischen Prozessen mit unterschiedlicher Ausprägung der Angiogenese, Tumorinvasion und konsekutiver Metastasierung einher (Fassina et al. 2000, Trojanek 2012). Fernandez et al. zeigten bei einer Upregulation von TIMP-1 eine deutliche Abnahme der Migration sowie Invasion von Endothelzellen in die extrazelluläre Matrix (Fernandez et al. 1999). Kawamata et al. beschrieben bei einer Überexpression von TIMP-1 und -2 eine signifikante Hemmung der Größenprogredienz von pulmonalen Metastasen, aber keinen signifikanten Einfluss auf die Tumorgroße des Primärtumors, lokale Invasion sowie auf die Metastasen in retroperitoneale Lymphknoten bei Harnblasenkarzinom der Ratte (Kawamata et al. 1995). Zwischen Primärtumor (Glioblastom) und zerebralen Metastasen (Nierenzell- und Mammakarzinom bzw. Melanom) lassen sich unterschiedliche TIMP-1 und -2 Konzentrationen nachweisen, welche beim Glioblastom deutlich vermindert sind und konsekutiv das lokale aggressiv-invasive Verhalten fördern (Mohanam et al. 1995). Einen protektiven Effekt der TIMP-1 wurde über die Hemmung der Angiogenese bei an Mammakarzinom erkrankten Patientinnen beobachtet (Thorgeirsson et al. 1996).

Das Zusammenspiel von MMP's und TIMP's und somit das Remodeling der extrazellulären Matrix spielen eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Invasivität und Aggressivität eines tumorösen Prozesses (Liotta et al. 1980, Liotta & Stetler-Stevenson 1991, Mignatti & Rifkin 1993). Abhängig vom gestörten Gleichgewicht zwischen MMP's und TIMP's resultiert ein anderer Prognosefaktor für den Tumorpatienten (Mohanam et al. 1995), beispielsweise bei verminderten TIMP-1 und -2 Konzentrationen zeigt das Glioblastom lokal ein aggressiv-invasives Verhalten.

Die zweite Schnittstelle mit FSAP ist somit der indirekte Einfluss auf die MMPs über das uPA-System.

Die Interaktion des MMP- und uPA-Systems zeigen somit ihre Rolle in der perizellulären Proteolyse, die vor allem bei der Tumorinvasion und -metastasierung einen entscheidenden Beitrag leisten.

Die Abb. 5 gibt eine Übersicht sowie einen Zusammenhang zwischen uPA und MMP und somit über die Kaskade der perizellulären Proteolyse.

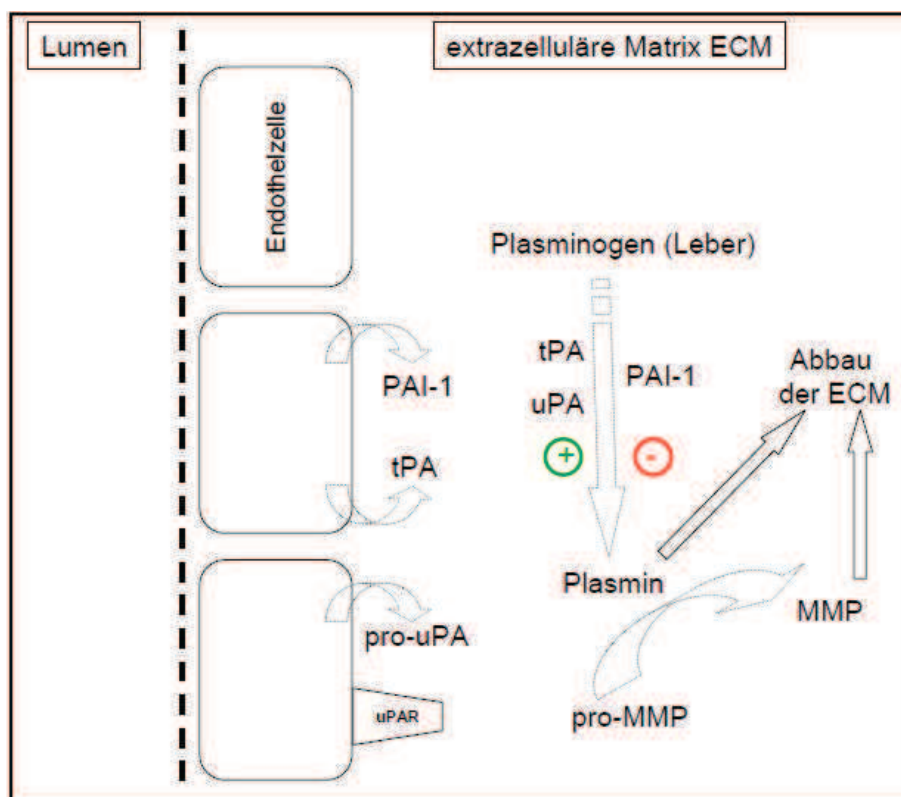


Abb. 5: Schematische Darstellung der uPA- und MMP-Wechselbeziehung im Rahmen der perizellulären Proteolyse. Dabei findet eine Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin über tPA und uPA statt, welches einerseits die MMPs aktiviert und andererseits die extrazelluläre Matrix degradiert. PAI-1 ist der Gegenspieler und hemmt die Plasminogen-Aktivierung.

Die Serinprotease tPA (*tissue type plasminogen activator*) aktiviert Plasminogen zu Plasmin, welches dann u.a. quervernetztes Fibrin zu kleinen molekularen Einheiten spaltet. tPA besitzt zwei Kringle-Domänen, welche mit dem Angiogeneseinhibitor Angiostatin gewisse Ähnlichkeiten aufweist. Eine zusammengesetzte, rekombinante Kringle-Domäne aus tPA, TK1-2, führte in-vitro zur einer Hemmung der von bFGF, VEGF und EGF stimulierten Proliferation der Endothelzellen und in-vivo zur einer Hemmung der Angiogenese (Kim et al. 2003).

Die Gegenspieler von Serinproteasen sind Serpine, irreversible **Serin-Protease-Inhibitoren**, die sowohl intra- als auch extrazellulär lokalisiert sind. Diese sind u.a. Antithrombin, C1-Inhibitor, Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren und α -1-Antitrypsin (AAT). Der stärkste Inhibitor der Serinprotease FSAP ist der C1-Inhibitor. Der Serinprotease-Inhibitor PN-1 (Protease Nexin-1) hemmte unter in-vitro Bedingungen die PDGF-BB vermittelte Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen durch

Komplexbildung mit FSAP (Muhl et al. 2007). Nach der Komplexbildung zwischen FSAP und seinem Inhibitor dockt er an LRP (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) und wird über Endozytose nach intrazellulär transportiert (Muhl et al. 2007). Dem PAI-1, einem weiteren Serpin, werden viele unterschiedliche Funktionen und Aufgaben im Bereich der Tumorangiogenese, Sepsis und rheumatoiden Arthritis zugesprochen (Lijnen 2005). Aktiviertes FSAP wird daneben noch durch α 1-Protease-Inhibitor, Antithrombin, α 2-Plasmin-Inhibitor und durch PAI-1 gehemmt (Wygrocka et al. 2007).

1.8 Fragestellung

Strukturell erwies sich die Kringle-Domäne von FSAP in anderen Faktoren als antiangiogen. Daher könnte FSAP in die Kategorie der Angiogenesehemmer eingeordnet werden. In-vitro Versuche zeigten eine durch FSAP-vermittelte Spaltung des PDGF-BB, so dass die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen nicht mehr stimuliert werden konnte. Dies untermauert die Hypothese, dass FSAP regulatorische, im engeren Sinne inhibitorische Effekte auf Wachstumsfaktoren ausübt.

Fibrinolytisch wirkt FSAP über die Aktivierung des uPA-Systems, welches seinerseits die MMP's aktivieren kann. Die beiden Komponenten, das uPA-System und die MMP's, sind entscheidende Bestandteile der perizellulären Proteolyse, welche sowohl physiologisch als auch pathologisch, z.B. im Rahmen einer Tumorneoangiogenese, hochreguliert sind. Die erhöhte Aktivität dieser Komponenten geht bei Tumorpatienten mit einem schlechten Outcome einher. Aufgrund der verschiedenen Wirkmechanismen von FSAP stellt sich die gerechtfertigte Frage, ob die Serinprotease FSAP in-vivo die Angiogenese reguliert. Dabei wurde der Einfluss von FSAP unter physiologischen und pathologischen Umständen auf die Angiogenese getestet.

Hierzu wurden sowohl Wildtyp- (WT) als auch uPA^{-/-}- und uPAR^{-/-}-Mäuse in einem etablierten Matrigel-Modell nach Stimulation der Angiogenese mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren sowie mit und ohne FSAP-Gabe auf mikroskopischer Ebene histologisch und immunhistologisch hinsichtlich der Gefäßneubildung untersucht.

Unsere in-vivo Vorversuche lieferten bereits relevante Ergebnisse, dass FSAP in der Lage ist, das Wachstum von pankreatischen Tumorzellen in einem Maus-Tumor-Modell zu hemmen. Aufgrund dieser vorliegenden Ergebnisse wurde in dieser Arbeit zudem die direkte Wirkung von FSAP auf die pankreatische Tumorzelllinie, BxPC3, untersucht.

Daneben stellte sich die Frage, welchen Effekt FSAP auf Tumorzellen hat. Die molekularbiologische bzw. enzymatische Ausstattung von BxPC3-Zellen wurde hinsichtlich ihrer Aktivität bzw. Genexpression von uPA, tPA, PAI-1, MMP-2/-9, TIMP-1/-2 sowie von p44/42 MAPK nach FSAP-Gabe mit proteinbiochemischen und molekularbiologischen Verfahren untersucht.

Die ermittelten Ergebnisse wurden einerseits auf zellulärer bzw. auf in-vivo Ebene für sich selber betrachtet und andererseits beiden Ergebnisse gegenübergestellt. Die vorliegende Arbeit sollte die klinische Relevanz von FSAP hinsichtlich seiner antiangiogenen Funktion in einem Maus-Matrigel-Modell näher charakterisieren, objektivieren und quantifizieren.

Daraus resultierten folgende Fragestellungen:

1. Welche Plasminogen-Aktivierung oder MMP-Aktivitäten lässt sich in einer Tumorzelle (BxPC3) nach FSAP-Stimulierung nachweisen?
2. Zeigen diese Zellen eine FSAP-dosisabhängige Aktivitätsänderung und wie zeichnet sich dies in der Proteinmenge sowie Genexpression ab?
3. Führt FSAP zu einer vermehrten Phosphorylierung von ERK 1/2 und/ oder Tyrosinresten in den BxPC3-Zellen?
4. Welchen antiangiogenen Einfluss hat FSAP unter in-vivo Bedingungen bei der WT-Maus?
5. Welche Veränderung zeigt die Angiogenese bei der uPA^{-/-}- und uPAR^{-/-}-Maus mit und ohne FSAP-Stimulierung?
6. Lässt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen FSAP-Stimulierung in der WT-Maus und in den Knockout-Mäusen ermitteln?
7. Wird die FSAP-Funktion hinsichtlich der Gefäßantwort über uPA- oder uPAR übermittelt?

2. Materialien

2.1 Chemikalien

Tab. 1: Chemikalien.

Beschreibung	Produktname	Firma	Firmensitz
β -Mercapto-ethanol	β -Mercaptoethanol	Sigma	Taufkirchen
Acrylamid	Rotiphorese Gel 30	Roth	Karlsruhe
Agarose	Agarose NEEO Ultra-Qualität, ROTI GAROSE	Roth	Karlsruhe
Agarose für Zymographie	Agar Noble 2,5 %	Difco Laboratories	Detroit, USA
Agarose-Film	GelBond Film (Agarose gel support medium)	Cambrex	Rockland, USA
Aprotinin	Antagosan®	Roche	Bern, Schweiz
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor (human, recombinant, lyophilised)	Invitrogen	Karlsruhe
BSA	Bovine serum Albumin (Minimum 98%)	Sigma	Taufkirchen
DAPI	Vectashield Mounting Medium mit DAPI	Linaris biolog. Produkte	Wertheim-Bettingen
DePeX	Gurr DePeX mounting medium (Gurr, BDH)	Merck	Darmstadt
DNA- Marker	Mass Ruler DNALadder, low range	Fermentas	St. Leon-Rot
Druckerpapier für Gel-Dokumentation	Thermopapier	Mitsubishi	Hatfield, England
Eiweiß-Glycerin	Eiweiß – Glycerin 3T o12	Division – Chroma	Münster
Eosin	Eosin G Certistain®	Merck	Darmstadt
Essigsäure	Acetic acid (glacial), 100% anhydrous	Merck	Schwalbach
Ethidiumbromid	Ethidium bromide solution	Sigma	Taufkirchen
Filtereinheit zum Konzentrieren	Centrifugal filter devices, Amicon	Millipore	Bedford, USA
Formaldehyd	Formaldehyd-Lösung 3,5 - 3,7%	Otto Fischar	Saarbrücken
Gelatine	Gelatin, 2% Solution Type B: From Bovine Skin	Sigma	Taufkirchen

Gelmembran	Gel Blotting Papier	Schleicher&Schue II BioScience	Dassel
Gentamycin	Gentamycin	Promocell	Heidelberg
Glycerin	Glycerin Rotipuran	Roth	Karlsruhe
Hämalaun	Mayer's Hämalaun	Merck	Darmstadt
Heparin	Heparin-Natrium-25000I.E / 5ml	Ratiopharm	Ulm
Hyperfilm	Hyperfilm	Amersham Biosciences	Freiburg
Isobutanol	2-Methyl-1-propanol Rotipuran	Roth	Karlsruhe
Isofluran	Isoflurane®	Baxter	USA
Matrigel	growth factor reduced Matrigel™ Matrix (Matrigel™ Basement Membrane Matrix)	BD Biosciences	Bedford, UK
Milchpulver	Skim-Milk-Powder	Fluka	Taufkirchen
Natriumpyruvat	Na-pyruvat	Gibco	Karlsruhe
Natriumortho- vanadat	Natriumorthovanadat	Sigma	Taufkirchen
Objektträger	Super Frost® Plus Objektträger (geschliffen, Mattrand)	R. Langenbrinck	Emmendingen
Paraffin	Paraffin 46 – 48°Celsius Schmelzpunkt, Blockform	Merck	Darmstadt
PDGF-BB	Platelet derived growth factor-BB	R&D Systems	Wiesbaden
Penicillin/ Streptomycin	Penicillin/ Streptomycin	GIBCO	Karlsruhe
Penicillin- Streptomycin- Glutamine	Penicillin-Streptomycin-Glutamine	Gibco-BRL	Paisley, Schottland
Plasminogen	humanes Plasminogen	Haemochrom	Essen
PMA	Phorbolmyristataacetat	Sigma	Taufkirchen
PPACK	Phe-Pro-Arg-Chloromethylketon	Calbiochem	Bad Soden
Proteinase K	Proteinase K	Qiagen	Hilden
Proteinkonzentrierungssäulen	Centricon, 10.000 NMWL (nominal molecular weight limit)	MILLIPORE	Schwalbach
Proteinmarker	PageRuler prestained Protein- Ladder	Fermentas	St. Leon-Rot
PVDF- Transfer Membran	Hybond-P PVDF Membrane	Amersham Biosciences	Freiburg
RNA-Marker	MassRuler™ RNA Ladder, Low Range/High Range	Fermentas	St.Leon-Rot

TEMED	TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Roth	Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Trypsin/EDTA (10x)	Invitrogen	Karlsruhe
VEGF	VEGF165, recombinant	R&D Systems	Wiesbaden

2.2 Geräte

Tab. 2: Geräte.

Beschreibung	Gerätename	Firma	Firmensitz
Fluoreszenzmikroskop	Immunfluoreszenzmikroskop HC (20x/0,50)	Leica DMR Microsysteme Vertrieb	Wetzlar
Gel-Aufnahme	Transluminator	BioRad	München
Gel-Dokumentation	Gel Doc2000 Documentation System	BioRad	München
Mikroskop H&E-Färbung	Mikroskop Dialux 20	Leitz	Wetzlar
Mikroskopkamera	Mikroskopkamera (RT Slide Diagnostic instruments, inc.) SPOT	Visitron Systems	Puchheim
Mikrotom	Rotationsmikrotom Biocut 2030	Mikrovid Reichert & Jung	Ense
Paraffingerät (Einbettautomat)	Tissue Embedding Center (Tissue Teck II, 6300)	Vogel (Med. Technik und Elektronik)	Gießen
PCR-Gerät	PCR MWG Primus	MWG Biotech AG	Martinsried
PCR-Themocyclus	PCR Biometra, T-Gradient	Biometra	Göttingen
RNA- Konzentrationsmessung	Gene Quant pro-RNA/DNA Calculator (Photometer)	Amersham pharmacia biotech	Freiburg
Spannungsgeber SDS-PAGE	Power Pac 1000	BioRad	München
Zentrifuge I Zellsplitting	Labofuge 400R	Heraeus Instruments	Hanau
Zentrifuge II Centricons	Rotina 46R	Hettich Zentrifugen	Nierstein
Zentrifuge III RNA-Isolierung	Mikro20	Hettich Zentrifugen	Nierstein

2.3 Kommerzielle Kits

Tab. 3: Kommerzielle Kits.

Beschreibung	Kit-Name	Firma	Firmensitz
BrdU-Proliferationsassay	Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics	Mannheim
cDNA-Synthese	SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT- PCR	Invitrogen	Karlsruhe
DNA-Polymerase	Hot Star Taq® DNA Polymerase 250 units	Qiagen	Hilden
Film-Entwicklerlösung	ECL-Plus Western Blotting Detection System	Amersham Biosciences	Freiburg
Gelfärbung	Coomassie blue staining kit R 250 (brilliant blue)	Invitrogen	Karlsruhe
Nukleotidmischung	dNTP Mix F-560XL	Finnzymes	Espoo, Finland
RNA-Aufreinigungskit	Rneasy Mini Kit	Qiagen	Hilden

2.4 Puffer und Lösungen

- ◆ Blotpuffer: Tris (0,02M), Glycin (0,15M), Methanol (20%)
- ◆ Entfärber: Propanol (30%), Essigsäure (5%)
- ◆ HBS (11x, pH 7,4): NaCl (1,31M), KCl (44mM), Glucose (121mM), Hepes (220mM)
- ◆ HE-Puffer (pH 4.5): Arginin (0,2M), Lysin (0,2 M), NaCl (0,3M), Na-Citrat (0,005M)
- ◆ Inkubations-Puffer : Triton X-100 (1%), Tris (pH 7.6, 50 mM), CaCl₂ (10 mM), ZnCl₂ (1 µM), NaN₃ (0,1%)
- ◆ Ladepuffer (4x Sample Buffer=SB) : Sammelgelpuffer (25%), SDS (5%), Glycerin (40%), Bromphenolblau (Spatelspitze)
- ◆ Laufpuffer (5X SDS running-buffer): Tris (0,125M), Glycin (1,25M), SDS (0,5%)
- ◆ PBS (11x, pH 7,4): NaCl (1,5M), KCl (0,03M), Na₂HPO₄ x 2H₂O (0,09M), KH₂PO₄ (0,02M)
- ◆ Proteinlysepuffer (pH7.5): NaCl (100mM), EDTA (2mM), Triton-X-100 (1%), Tris (20mM), β-Glycerophosphat (10mM), NaF (5mM)
- ◆ Sammelgelpuffer (pH6.8): Tris (1M), SDS (0,49%)

- ◆ Stripping buffer I (pH 2.8): Glycin (200mM), Tween 20 (0,1%)
- ◆ Stripping buffer II (pH 9.0): Glycin (200mM), NaCl (200mM), Tween 20 (0,1%)
- ◆ TAE-buffer (1x): Tris (0,04M), Essigsäure (0,02M), EDTA (0,001M)
- ◆ TBS (Tris-buffered-saline, 1x): Tris (25mM), NaCl (0,15M), KCl (0,003M)
- ◆ TBS-T (Tris-buffered-saline-Tween, 1x): Tris (25mM), NaCl (0,15M), KCl (0,003M), Tween 20 (0,1 %)
- ◆ Trenngelpuffer (pH 8.8): Tris (1,5 M), SDS (0,4 %)
- ◆ Tris-EDTA-Puffer (pH 9.0) : Tris (10mM), EDTA (1mM), Tween 20 (0,05 %)
- ◆ Triton-Wasch-Puffer: Triton X-100 (2,5%), Tris (pH 7.6, 50mM), CaCl₂ (10mM), ZnCl₂ (1μM)

2.5 Antikörper

Tab. 4 : Antikörper.

Antikörperbeschreibung	Firma	Firmensitz
Affinity Purified Anti-Mouse CD31 (PECAM-1)	eBioscience	Frankfurt am Main
Affinity Purified Anti-Mouse CD34 from Rat	eBioscience	Frankfurt am Main
Maus Anti-Aktin	Sigma	Taufkirchen
Maus Anti-human FSAP	American diagnostica	Pfungstadt
Rabbit Anti- human uPA	American diagnostica	Pfungstadt
FITC™-conjugated Anti-mouse-IgG	Dianova	Hamburg
FITC™-conjugated Anti-rabbit-IgG (H+L)	Dianova	Hamburg
FITC™-conjugated Anti-rat-IgG (H+L)	Dianova	Hamburg
Lectin (FITC labeled from Bandeiraea simplicifolia-1)	Sigma	Taufkirchen
Monoclonal Anti-Actin, α-Smooth Muscle-Cy3™ antibody produced in mouse (Indocarbocyanin)	Sigma	Taufkirchen
Monoclonal mouse-anti-MAPK p42/44-antibody	Cell Signaling Technology®	Danvers, MA, USA
Monoclonal mouse-anti-Phosphotyrosin-antibody	Cell Signaling Technology®	Danvers, MA, USA
Polyclonal rabbit anti-goat	Dako Cytomation	Hamburg

Immunoglobulins/HRP, rabbit anti-human vWF, rabbit anti-mouse Ig/HRP, rabbit anti-sheep Ig/HRP, swine anti-rabbit Ig/HRP		
Purified Rat Anti-Mouse CD31 (PECAM-1) Monoclonal Antibody	BD Pharmingen	Heidelberg
Purified Rat Anti-Mouse CD34 Monoclonal Antibody	BD Pharmingen	Heidelberg
Purified Rat Anti-Mouse CD45 Monoclonal Antibody	BD Pharmingen	Heidelberg
Purified Rat Anti-Mouse PECAM-1 (CD31) Monoclonal Antibody	emfret Analytic	Eibelstadt
Rabbit Polyclonal Antibody CD31	Dianova	Hamburg
Rat Anti-Mouse CD117 (2B8, cKIT)	BD Pharmingen	Heidelberg
Rat Anti-Mouse Ly-6A/E (Sca-1)	BD Pharmingen	Heidelberg
Rhodamine Red™-X-conjugated Affini pure F(ab') ₂ Fragment Donkey anti-rabbit-IgG (H+C)	Dianova	Hamburg
Streptavidin FITC	BD Pharmingen	Heidelberg

2.6 Zellmedien und Seren

Tab. 5: Zellmedien und Seren.

Beschreibung	Firma	Firmensitz
DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)	Invitrogen	Karlsruhe
ECBM (Endothelial Cell Basal Medium)	Promocell	Heidelberg
Fetal Bovine Serum	Perbio Science	Bonn
RPMI 1640	Invitrogen	Karlsruhe

2.7 Zellen

- ◆ BxPC3-Zellen: Zellen vom humanen Pankreaskarzinom (Adenokarzinom)

Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Ilhan Çelik, Experimentelle Chirurgie Philipps-Universität Marburg, zur Verfügung gestellt.

3. Methoden

3.1 Zellkulturtechniken

3.1.1 Auftauen von Zellen

Für die nochmalige Kultivierung wurden die in -196°C flüssigem Stickstoff aufbewahrten BxPC3-Zellen (pankreatische Tumorzellen, Adenokarzinom) in einem 37°C warmen Wasserbad langsam aufgetaut. Danach wurden die BxPC3-Zellen in ein schon vorher mit RPMI 1640 Vollmedium, zugesetzt mit 1mM Natriumpyruvat, 10% FCS und jeweils 1% Penicillin, Streptomycin und Glutamin, vorbereitetes steriles 15 ml Röhrchen langsam überführt. Anschließend wurde es bei 2000 rpm 5 min mit Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellsediment (Pellet) wurde erneut mit RPMI 1640 Vollmedium aufgenommen und auf einer 10 cm Petrischale ausplattiert. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO_2 aufbewahrt.

3.1.2 Splitting von Zellen

Die Subkultivierung der Zellen wurde im Abstand von 3 Tagen vorgenommen. Nach zweimaligem Waschen mit 10 ml 1xHBS wurden die Zellen für 10 s mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung behandelt. Nach dem Absaugen der Lösung wurden die Zellen erneut mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung behandelt und für 5 min in den Brutschrank bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO_2 aufbewahrt. Durch leichtes Klopfen lösten sich die Zellen von der Platte ab. Zum Neutralisieren des Trypsins und zum Stoppen des Trypsinverdaus wurden 8 ml RPMI 1640 VM in die Petrischale gegeben, die gelösten Zellen in ein 15 ml Röhrchen überführt und bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 10 ml RPMI 1640 VM gemischt und in einer 1:5 Verdünnung jeweils auf eine neue Petrischale ausplattiert.

3.1.3 Stimulation und Präparation von Zellen

Der konfluente Monolayer wurde einmalig mit 3 ml RPMI 1640 SF-Medium (BxPC3) und mit Endothelial Cell Basal Medium gewaschen. Anschließend wurden erneut 3 ml SF-Medium auf die Zellen gegeben. Durch die Zugabe von SF-Medium werden die zellulären Stoffwechselaktivitäten reduziert, sowohl Wachstums- wie auch

Produktivitätseigenschaften auf ein Basalniveau minimiert. Zur Stimulation der Zellen wurden die Testsubstanzen jeweils auf die Zellen gegeben und im Brutschrank bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ 24 h aufbewahrt. Die BxPC3-Zellen wurden folgendermaßen stimuliert:

Die Monolayer wurden mit 10 µg/ml scFSAP, 10 µg/ml FSAP-Puffer (HE = High-End-Puffer, Kontroll-Puffer) und der Positivkontrolle (100 ng/ml PMA) über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Negativkontrolle ohne Stimulation ist mitgelaufen.

Nach der Inkubation wurde jeweils der Überstand und der Extrakt getrennt. Dabei wurde der Überstand durch Zentrifugation, Konzentrationsverfahren mit amicon concentrated tubes und 4xSDS-Probenpuffer vorbereitet. Dem Extrakt wurde nach zweimaligem Waschen mit HBS einmalig 4xSDS-Probenpuffer hinzugegeben. Nach Beendigung dieser Prozedur wurde der Überstand und der Extrakt in zwei verschiedene Eppendorftuben überführt und bei -20°C aufbewahrt.

Nach dem Splitting (1:5) der BxPC3-Zellen wurden jeweils 450 µl RPMI 1640 VM und 50 µl Zellschubstanz in die zentralen 8 Vertiefungen (inner wells) einer 24 well-Platte hineinpipettiert. Nach vier Tagen Wachstumszeit wurden die Zellen mit 500 µl RPMI 1640 SF-Medium gewaschen und für die Stimulation erneut 300 µl RPMI 1640 SF-Medium hinzugegeben. ScFSAP und HE-Puffer wurden in einer absteigenden Konzentration (20-10-5-2-0,5-0,2 µg/ml) hinzugegeben und für 24h bei 37°C inkubiert. Nach 24 h wurden die Überstände (300 µl) in die beschrifteten Eppendorftuben überführt und mit 4x SDS-Probenpuffer (100 µl) versetzt.

50 µl der jeweils vorbereiteten Proben wurden zum Schluss in einer SDS-PAGE aufgetrennt und für Proteaseaktivitätstests (Zymographie) bzw. Western Blot verwendet.

Um die MAPK- und die Tyrosin-Phosphorylierung der BxPC3-Zellen nach der Stimulation durch verschiedene Substanzen zu zeigen, wurden erneut wie oben beschrieben 2 mal 24-well Platten vorbereitet. Eine Eppendorftube (Endvolumen 450 µl) wurde mit RPMI 1640 SF-Medium, 10 µg/ml Heparin und 0,1%igem BSA versetzt und anschließend jeweils mit einem Stimulus für 1 h bei 37°C vorinkubiert. Nach der einstündigen Vorinkubation der Stimuli wurde das Medium der Zellen abgesaugt und 200 µl pro Vertiefung (8 inner wells) hineinpipettiert. Die Platte 1 wurde für 10 min, die Platte 2 für 30 min bei 37°C inkubiert. Hier wurde eine FSAP-Konzentration von 12 µg/ml gewählt.

Nach Ablauf der Inkubation wurde der Überstand abgesaugt, 100 µl 1x SDS-Probenpuffer und 1 mM Orthovanadate in eine Vertiefung hineinpipettiert. Orthovanadate hemmt die Phosphorylierung zellulärer Proteine. Anschließend kamen die Platten für 30 min bei 4°C auf den Schwenktisch. Vor der Durchführung von Western Blot wurden die Proben für 10 min gekocht.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) für Casein- und Gelatine-Zymographie sowie Western Blot

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ist eine analytische Methode zur Trennung von Proteinen im elektrischen Feld. Als Trennmedium wird ein Gel auf Polyacrylamidbasis verwendet, das 10 cm breit, 4,5 cm hoch und 1 mm dick ist. Zu den einzelnen Proteinproben wurde jeweils 1x SDS-SB (Probenpuffer) hinzugegeben und bei 95°C erhitzt. SDS-SB dient zur Trennung von Wasserstoffbrücken (Denaturierung) und für eine einheitliche negative Ladung der Proteine. Die vorbereiteten Gele werden in den Laufpuffer (Laemmli 1970) eingelegt. Die denaturierten Proben werden im Anschluss in separate Kammern des Polyacrylamidgels geladen. Zusätzlich wird zur Bestimmung des Molekulargewichts ein Größenmarker zur eindeutigen Identifizierung der Proteine nach Molekulargewicht (kDa = Kilodalton) aufgetragen (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas). Nach angelegter elektrischer Spannung mit einer konstanten Stromstärke von 50 mA pro Gel für 90 min findet die Wanderung der negativ geladenen Proben in Richtung des Plus-Pols statt. Das Ende der vertikal gerichteten Auftrennung der Proteine zeigt das Erreichen des Indikators Bromphenolblau am unteren Rand des Gels an. Die aufgetrennten Proteine auf den Gelen wurden anschließend für Casein-Zymographie, Gelatin-Zymographie und Western Blot-Analyse verwendet.

3.2.2 Detektion von Proteinen mit der Western Blot Methode

Neben Silber- und Coomassie-Blau-Färbung können elektrophoretisch getrennte Proteine auch immunologisch sichtbar gemacht werden. Die Methode Western Blot

(Burnette 1981) bezeichnet den Transfer (Blotten) von Proteinen auf einer Membran. Dabei werden die negativ geladenen Proteine zum Gel angelegter Spannung auf eine Membran transferiert (Towbin et al. 1979). Die Transferrichtung erfolgt von der Kathode zur Anode.

Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, wurden die stimulierten Zellen (BxPC3-Zellen) auch immunologisch mittels Western Blot untersucht.

Als erstes wurden die benötigten PVDF-Transfermembrane (Hybond-P) in Methanol getränkt, mit ddH₂O ausgewaschen und anschließend in eine Schale mit Blot-Puffer eingelegt. Nach vorgeschriebener Reihenfolge wurde jeweils ein Gel, auf der sich durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteinproben befinden, zusammen mit einer Transfermembran, zwei Blot-Papieren und zwei Blot-Schwämmchen zu einem „Blotsandwich“ luftblasenfrei zusammengefügt. Dieses Blot-Halterungsgitter wurde in eine Transferkammer eingesetzt und die Transferierung bei einer konstanten Spannung von 100 V (Power Pac 1000) für 90 min durchgeführt.

Direkt nach dem Transfer der Proteine wurden die PVDF-Membrane 1 h mit 5% Milchpulver (skim milk powder, Fluka) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken, da sonst die Problematik besteht, dass die hinzugegebenen Antikörper sich an nicht gesättigte Bindungsstellen binden und dadurch die Sensitivität und die Spezifität der Methode erheblich reduzieren. Nach dem Blocken wurde der Primärantikörper hinzugegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Nach dreimaligem Waschvorgang und einmaliger Spülung auf dem Schwenktisch mit TBS-Tween wurde der Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper hinzugegeben und eine Stunde konstant gerollt. Nach drei weiteren Waschschrritten mit TBS-Tween wurde die spezifische Bindung der Antikörper an die Epitope mit dem ECL-Kit (enhanced chemi lumineszenz) sichtbar gemacht. Das Chemilumineszenz-Substrat für das Enzym HRP (Horse-Radish-Peroxidase) ist Luminol. Dabei katalysiert HRP die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, so dass anschließend eine Lumineszenz detektiert werden kann. Das erzeugte Licht ist dann in der Lage, einen Röntgenfilm zu schwärzen und dadurch die spezifischen Bindungsstellen der hinzugegebenen Antikörper optisch sichtbar zu machen.

3.2.3 Stripping von Western Blot-Membranen (für die Zweit-Detektion)

Vor der Detektion von anderen Antigenen müssen die PVDF-Membrane vorher behandelt werden. Zur Entfernung von Primär- und Sekundärantikörpern bzw. anderen Lösungsresten wurden die Blot-Membrane in 100 ml Stripping buffer (pH-Wert 2.8) für

30 min auf dem Schwenktisch inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Tween wurden sie erneut mit 100 ml Stripping buffer (pH-Wert 9.0) für 30 min inkubiert. Das Blocken wurde mit 5% Milchpulver durchgeführt.

3.3 Untersuchungen der Proteasenaktivität

3.3.1 Casein-Zymographie

Mit Hilfe der Zymographie lässt sich die Aktivität von Proteasen (Zymogen = inaktive Enzymvorstufen) bildhaft (griechisches Verb „graphein“ = schreiben) darstellen. Dieses Verfahren setzt aber eine SDS-PAGE voraus, wobei die Proteingemische nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt sein müssen.

Casein ist ein in Milch vorkommendes Eiweiß. Mit der Casein-Zymographie wurde anhand der Proteinverdauung die Aktivität der Plasminogenaktivatoren uPA („urokinase-type plasminogen activator“) und tPA („tissue type plasminogen activator“) bestimmt. Dabei wird durch die Hydrolyse einer Arginin-Valin-Bindung das Plasminogen (PSG) zu Plasmin katalysiert. Die Endopeptidase Plasmin ist jetzt in der Lage, u.a. das Substrat Casein, ein phosphorhaltiges Milchprotein, abzubauen (Abb. 6). Dieser Prozess ist als eine dunkle Bande auf dem Gel bzw. auf der Casein-Unterlage makroskopisch zu sehen. Mit der Dunkelfeld-Beleuchtung (*dark field illumination*) hat man die Möglichkeit diese dunklen Banden („*presence of zones of lysis*“, Lysehof) vor der eigentlichen Dokumentation (Transluminator, Gel Doc 2000, BioRad) zu betrachten. Die Zusammensetzung für zwei Gele ist in der Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Zusammensetzung für zwei Gele (Casein-Zymographie und Western Blot).

10% Trenngel	5% Sammelgel
3,75 ml Trenngelpuffer (4x)	1,25 ml Sammelpuffer (4x)
5,02 ml Acrylgel (30%)	0,83 ml Acrylgel (30%)
6,22 ml ddH ₂ O	2,85 ml ddH ₂ O
100 µl APS	50 µl APS
10 µl Temed	5 µl Temed

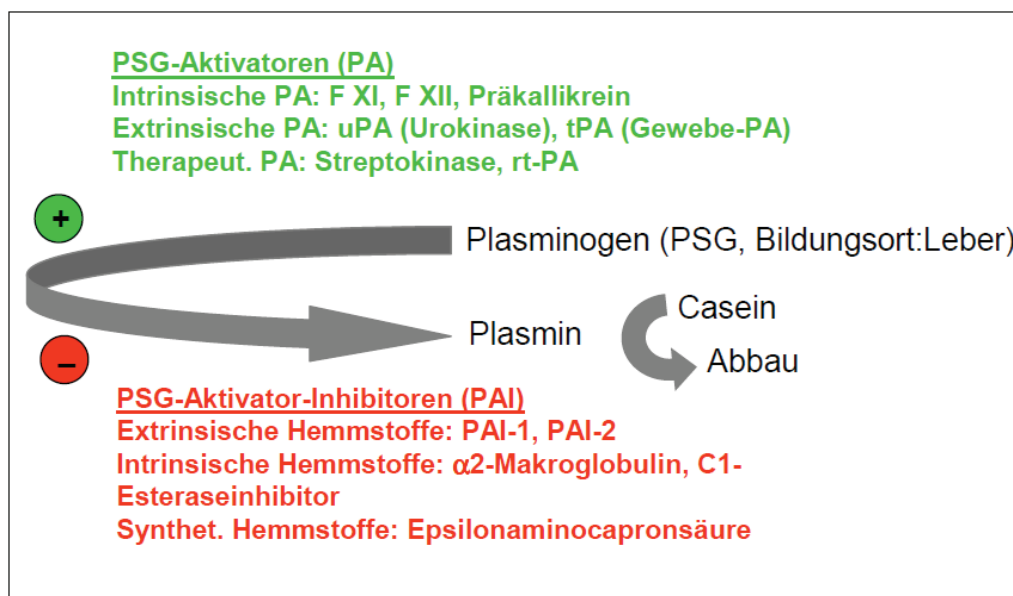


Abb. 6: Plasminogenaktivierung und -hemmung. Das Plasminogen wird in der Leber gebildet. Im Rahmen der Casein-Zymographie können die Aktivatoren (z.B. uPA) Plasminogen in die aktive Form Plasmin überführen, welches das Casein abbaut. Die PSG-Aktivator-Inhibitoren (zB. PAI-1) unterbinden diesen Prozess.

Zur Durchführung der Casein-Zymographie wurden stimulierte Zellen verwendet. Die Proteinproben wurden nach der Stimulation (Kap. 3.1.3) bei -20°C gelagert.

Nach der Auftrennung der Proteinproben mit SDS-PAGE wurden die Gele zuerst zweimal mit 2,5%igem Triton X-100 für 10 min zur Entfernung von SDS aus dem Gel und anschließend zweimal mit PBS für 10 min gewaschen. Währenddessen wurde die Casein-Plasminogen-Matrix vorbereitet (Tab. 7).

Tab. 7: Zusammensetzung der Casein-Plasminogen-Matrix (Underlay).

underlay
8% Milchpulver in PBS
500 U/ml Penicillin
200 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin
1xPBS
2,5% Agar Noble (Difco) in H_2O
40 $\mu\text{g/ml}$ humanes Plasminogen
10% Natriumazid (NaN_3)

Unter sterilen Bedingungen wurde eine 8%ige Milchlösung vorbereitet. Zusätzlich wurde in die Milchlösung Penicillin und Streptomycin zur Keimreduzierung hinzugegeben. Die Tuben wurden während der ganzen Prozedur in ein 43°C

erwärmtes Wasserbad gestellt. Anschließend wurden nacheinander 2,1 ml 1xPBS, 100 µl Natriumazid, 2,4 ml Plasminogen und zum Schluss das in der Mikrowelle zum Kochen gebrachte 2,5%ige Agar Noble (3 ml) in die 15 ml-Falcon-Tuben hinzugegeben. Auf die 40°C vorgeheizte und mit einer Libelle geeichten Platte wurde ein GelBond Film® (agarose gel support medium) gelegt. Direkt danach wurde die Lösung schnell und gleichmäßig mit einer 10 ml Einwegpipette horizontal auf den GelBond Film® aufgetragen. Nach 5-10 min ist die aufgetragene Lösung bei Raumtemperatur polymerisiert. Nach dem Waschvorgang wurde ein Gel auf die Casein-Plasminogen-Matrix (Underlay) gelegt und in einer Schale mit feuchten Tüchern aufbewahrt. Diese Schale wurde mit einer Klarsichtfolie (Saran Wrap) bedeckt und danach bei 4°C über Nacht inkubiert, so dass die Plasminogenaktivatoren (uPA und tPA) langsam vom Gel in die darunterliegende Matrix bzw. Underlay diffundieren. Am darauffolgenden Tag wurde die Schale bei 37°C inkubiert, und die langsam auftretenden Lysebanden regelmäßig am gleichen Tag mit einem Transluminator dargestellt und mit dem Gel Doc 2000 Software dokumentiert.

3.3.2 Gelatine-Zymographie

Mit der Gelatine-Zymographie wurden anhand der Verdauung von Gelatine die Aktivitäten von MMP-2 und MMP-9 (Matrixmetalloproteasen) bestimmt. Im Gegensatz zur Casein-Zymographie enthält das Gel zusätzlich als Substrat 0,2%ige Gelatine.

Die in Kapitel 3.1.3 erwähnten stimulierten pankreatischen Tumorzellen wurden auf ihre MMP-Aktivität untersucht. Analog zur Casein-Zymographie mussten vor Durchführung der Gelatine-Zymographie die Proteinproben elektrophoretisch getrennt werden. Um die MMPs zu aktivieren, wurden die Gele mit den getrennten Proteinen dreimal für 1 min in ddH₂O gewaschen. Dann wurden sie erneut dreimal für 15 min in Triton-Wasch-Puffer gespült und anschließend für 2 Tage im Inkubations-Puffer bei 37°C inkubiert. MMPs sind langsam aktivierbare Proteasen. Nach der Inkubation wurden die Gele zur Sichtbarmachung der Proteine mit Coomassie brilliant blue R-250 für 1 h auf dem Schwenktisch gefärbt. Im Anschluss wurden die blau gefärbten Gele mit einem Entfärber für 2-3 h entfärbt. Unter dem Transluminator wurden die weißen Zonen (*zones of clearing*) des Gels dargestellt und mittels Gel Doc 2000 Software dokumentiert. Die Tabelle 8 zeigt die Zusammensetzung der Gele.

Tab. 8: Zusammensetzung für zwei Gele (Gelatine-Zymographie).

8% Trenngel	5% Sammelgel
3,75 ml Trenngelpuffer (4x)	1,25 ml Sammelpuffer (4x)
4 ml Acrylgel (30%)	0,83 ml Acrylgel (30%)
5,8 ml ddH ₂ O	2,85 ml ddH ₂ O
1,5 ml Gelatine (Stocklösung 2%)	50 µl APS
100 µl APS	5 µl Temed
10 µl Temed	

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 RNA-Isolation (BxPC3) : quantitative Genexpressionsanalyse

Die Isolation der Gesamt-RNA nach den Angaben des Herstellers (RNeasy Mini Kit) wurde aus konfluenten Schalen mit den BxPC3-Zellen durchgeführt. Die quantitative Analyse soll die Genexpression der stimulierten Zellen zeigen.

Vor der RNA-Isolation wurden die pankreatischen Tumorzellen stimuliert. Die Zellen wurden zweimal mit HBS gewaschen. Anschließend wurde 10 ml RPMI 1640 SF-Medium für die Tumorzellen in die Petrischale hineinpipettiert. Nach 24 h im Inkubationsschrank bei 37°C wurden die Zellen für 2,5 bzw. 5 Stunden mit FSAP (10 µg/ml), PMA (100 ng/ml) und mit dem FSAP-Puffer stimuliert. Eine Negativkontrolle ohne Stimulation ist mitgelaufen.

Aus den stimulierten Zellen wurde das biologische Ausgangsmaterial (Zellpellet) verwendet und zur RNA-Isolation, RNA-Quantitätsmessung, RNA-Qualitätsmessung und RT-PCR eingesetzt. Das Pellet wurde durch Zugabe von RLT-Puffer und β-Mercaptoethanol lysiert und mit QIAshredder Spinsäule homogenisiert. Durch die Zugabe von 1 Volumen 70%igem Ethanol zum homogenisierten Lysat wurden optimale Bindungsbedingungen der RNA an die RNeasy Silicagel-Membran hergestellt. Anschließend wurde die gewonnene Probe auf eine RNeasy Mini-Säule aufgetragen und 15 s bei > 10.000 rpm in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Die Gesamt-RNA bindet dabei an die Silicagel-Membran (selektive Bindungseigenschaften), während nicht erwünschte Materialien durch die Zentrifugation effektiv ausgewaschen werden. Für die Elution der gebundenen RNA wurde 40 µl RNase-freies Wasser direkt auf die RNeasy Silicagel-Membran pipettiert und nach 10 min Wirkdauer für 1 min bei über 10.000 rpm zentrifugiert.

3.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration mit dem GeneQuant-Photometer

Die Bestimmung der RNA-Konzentration (ng/ μ l, Quantitätsmessung von totalem RNA) wurde bei 260 nm und bei 280 nm mit dem GeneQuant-Photometer durchgeführt. Zur Verdünnung der RNA (1:40) wurde steriles Wasser (Ultra pure Water) genommen. Die photometrisch gemessene optische Dichte (O.D.) bei 260 nm ist ein Maß für den Nukleinsäuregehalt und bei 280 nm ein Maß für den Proteingehalt. Eine Küvette mit sterilem Wasser diente dabei als Referenzwert. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} wurde zur Reinheitsprüfung der RNA-Lösung bestimmt. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.4.3 RNA-Qualitätsmessung

Um die Reinheit der RNA sichtbar darzustellen, wurde eine Horizontal-Gelelektrophorese angewendet. Hierdurch lassen sich zusätzliche Informationen über etwaige Kontaminationen mit RNA- oder DNA-Abbauprodukten gewinnen. Vor Benutzung der Gel-Apparaturen für die Gelelektrophorese wurden sie alle mit Wasserperoxid gereinigt. Als Trennmedium diente ein 2%iges Agarose-Gel (Agarose NEEO Ultra-Qualität, Roth). Hier wurden 2 g Agarose in einer Flasche mit 100 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle zum Kochen gebracht, davon 50 ml in ein Gefäß gegossen und nach sehr kurzer Abkühlung 5 μ l Ethidiumbromid (1 μ l/10 ml Puffer) hinzugegeben. Diese wurde sofort in die horizontale Vorrichtung gegossen. Nach 25 min Wartezeit bis zum Polymerisieren des Gels wurde es komplett mit dem TAE-Puffer überdeckt und direkt danach 1 μ l der Gesamt-RNA mit 1 μ l RNA-Probenpuffer (zum Sichtbarmachen der Probe während der Trennung) und 4 μ l sterilem Wasser verdünnt. Davon wurden 5 μ l in eine Geltasche mit einer Pipette gespritzt. In eine andere Tasche wurden 5 μ l RNA-Marker (RNA Ladder High Range) pipettiert. Eine konstante elektrische Spannung von 90 V (nach Länge der Elektrophoresekammer: 5 Volt/cm) trennte die aufgetragenen Proben auf. Anschließend konnten mittels UV-Licht Ethidiumbromid-gebundene Nukleinsäuren sichtbar gemacht werden. Hierbei zeigen sich klar abgegrenzte Banden mit jeweils den 18 und 28 Svedberg Untereinheiten der rRNA.

3.4.4 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion: Prinzip der RT-PCR

Bei der RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion) werden zwei verschiedene Methoden der Molekularbiologie kombiniert, um auf Transkriptionsebene die Genexpression nach Stimulation von Zellen oder Geweben zu analysieren. Da bei der Transkription RNA aus DNA synthetisiert wird, muss zuerst eine reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, eingesetzt werden, um die RNA in cDNA (complementary DNA) umzuschreiben. Die cDNA dient danach als Matrize für die Amplifikation von spezifischen Sequenzen. Nach der Vervielfältigung werden die RT-PCR-Produkte elektrophoretisch in einer Horizontal-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid unter dem Transluminator (UV-Licht) sichtbar gemacht.

Die Gesamt-RNA aus den pankreatischen Tumorzellen wurde mit RNeasy Mini Kit (Quiagen) isoliert. Die Stimulation der Zellen wurde bereits in Kapitel 3.1.3 erwähnt. Mit dem *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) wurde nach Herstellerinformation aus RNA cDNA synthetisiert.

Alle RNA-Proben wurden zuerst durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und kurz abzentrifugiert. Tab. 9 zeigt die benutzten Substanzen und deren Mengenangaben. Die Endkonzentration der Gesamt-RNA in einer sterilen PCR-Eppendorftube für die cDNA-Synthese war abhängig von deren Ausbeute und wurde jedes Mal neu berechnet. Das berechnete Volumen der Gesamt-RNA, 1 µl 10 mM dNTPmix und 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ als Primer wurde in eine PCR-Eppendorftube hineinpipettiert und mit DEPC-behandeltem Wasser auf insgesamt 10 µl aufgefüllt. Die reverse Transkriptase benötigt einen Primer, ein kurzes DNA-Stück. Dafür verwendet man ein Oligo-d(T)-Primer, mehrere Thymin-Basen, die komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA sind. Nachdem die Probe durch Auf- und Abpipettieren gemischt wurde, wurde sie in der PCR-Vorrichtung (PCR MWG Primus) bei 65°C 5 min inkubiert und anschließend 2 min auf Eis gekühlt.

Tab. 9: Übersicht der RNA-Primer-Mischung.

Reagenz	Menge für eine Probe
Gesamt-RNA	Endkonzentration abhängig von der RNA-Ausbeute jeweils neu berechnet
10 mM dNTPmix	1 µl
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer (0,5µg/µl)	1 µl
DEPC-behandeltem Wasser	auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt

Währenddessen wurde die in der Tab. 10 gezeigte Mischung für die nachfolgende cDNA-Synthese vorbereitet.

Tab. 10: Übersicht der Master-Mix für die cDNA-Synthese.

Reagenz	Menge für eine Probe
10x RT buffer	2 µl
25mM MgCl ₂	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNaseOUT™ (rec. RNase Inhibitor)	1 µl

Dabei wurden 9 µl vom Mastermix jeweils in jede RNA-Primer-Mischung hinzugegeben, vorsichtig gemischt und kurz abzentrifugiert. Die Inkubation wurde bei 42°C 2 min im PCR MWG Primus durchgeführt. Anschließend wurde 1 µl (50 units) SuperScript™ II RT in jeden Ansatz hineinpipetiert, gemischt und bei 42°C für 50 min inkubiert. Die cDNA-Synthese wurde nach 15 minütiger Inkubation bei 70°C terminiert. Zum Schluss wurde 1 µl RNase H (gewonnen aus E.coli) hinzugegeben und bei 37°C 20 min inkubiert.

3.4.5 Primer

Die Primerauswahl ist für einen erfolgreichen Abschluss der PCR sehr wichtig. Die in Tab. 11 aufgelisteten Primer wurden bei der PCR angewendet. Alle Gen-spezifischen Primer wurden 1:10 vorverdünnt. Bei jeder Amplifikation lief jeweils ein Leerwert mit, d.h. alle Reagenzien außer der Matrize (cDNA) wurden in ein PCR-Eppendorf tube hineinpipetiert. Anstelle der Matrize wurde 1 µl dH₂O verwendet.

Tab. 11: Humane Primer.

Primerbezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Actin forward	5'-ATT GCC GAC AGG ATG CAG GAA-3'
Actin reverse	5'-GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA-3'
uPA forward	5'-CGG GGG GGC TCT GCA CCT AC-3'
uPA reverse	5'-CGG CCC AGC TCA CAA TTC C-3'
PAI-1 forward	5'-GGG AAA GGA GCC GTG GAC CAG-3'
PAI-1 reverse	5'-GGG GCA GCC TGG TCA TGT TG-3'
tPA forward	5'-GCT ACG TCT TTA AGG CGG GGA A-3'
tPA reverse	5'-GTG GGC GGC AGA GAG AAT CC-3'

MMP2 forward	5'-TTG ACG GTA AGG ACG GAC TC-3'
MMP2 reverse	5'-ACT TGC AGT ACT CCC CAT CG-3'
MMP9 forward	5'-TTG ACA GCG ACA AGA AGT GG-3'
MMP9 reverse	5'-CCC TCA GTG AAG CGG TAC AT-3'

3.4.6 Durchführung der PCR

Für die Durchführung der PCR wurden die stimulierten Zellen in Kapitel 3.4.1 verwendet. Alle benötigten Reagenzien wurden in einem sterilen Eppi vorbereitet (Tab. 12).

Tab. 12: Master-Mix für PCR.

Reagenz	Menge für eine Probe
Matrize (cDNA)	1 µl
10x Puffer-taq	2 µl
Primer (vorverdünnt 1:10)	1 µl
10 mM dNTPmix	1 µl
dH ₂ O (Aqua ad iniectabilia, Braun)	14,9 µl
HotStart Taq-Polymerase	0,1 µl

Zum Schluß wurde die thermostabile Hot Star Taq DNA Polymerase hinzupipettiert. Die Vervielfältigung erfolgte in dem PCR MWG Primus (Thermocycler) nach folgendem Programm (außer MMP9-Amplifizierung), wobei die Schritte 2 bis 4 30 mal wiederholt wurden (30x-Zyklus):

1. Aktivierung der HotStart Taq-Polymerase : 15 min bei 95°C
2. Denaturierung : 30 s bei 94°C
3. Annealing (Primer-Anlagerung) : 30 s bei 55°C
4. Elongation (Verlängerung) : 45 s bei 72°C
5. Beendigung : 5 min bei 72°C

Die MMP9-Amplifizierung erfolgte als „Touchdown“-PCR in PCR Biometra (Thermocycler, T-Gradient) nach folgendem Schema, wobei die Schritte 3 bis 5 35 mal wiederholt wurden (35x-Zyklus):

1. Aktivierung der Hot Star Taq Polymerase : 15 min bei 95°C
2. Zyklusweise Annäherung der Annealing-Temperatur:
 - jeweils 30 s mit 5 Zyklen

- 95°C → 61°C → 60°C → 59°C → 58°C → 57° → 72°C (1 min)
- 3. Denaturierung : 30 s bei 95°C
- 4. Annealing : 45 s bei 56°C
- 5. Elongation : 60 s bei 72°C
- 6. Beendigung : 5 min bei 72°C

Durch die Anwendung der „*Touchdown*“-PCR wird die Spezifität der MMP9-Primer-Bindung durch die schrittweise durchgeführte Annäherung an die zu erwartende Schmelztemperatur des Primers erhöht.

Nach Ablauf der Amplifikation wurden die PCR-Produkte in einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurde 1 µl DNA-Probenpuffer (Sichtbarmachung) mit 5 µl der PCR-Probe vermischt, kurz abzentrifugiert und in eine Geltasche hineinpipettiert. Ein DNA-Marker (Mass Ruler DNA Ladder, low range) wurde in eine andere Tasche pipettiert. Bei 90 V konstanter elektrischer Spannung wurden die Amplikons nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch die Bindung von Ethidiumbromid an die Nukleinsäuren konnten daraufhin die aufgetrennten Produkte auf dem Gel mit dem Transluminator sichtbar gemacht und anschließend mittels GelDoc-System digital dokumentiert werden.

3.5 In-vivo Angiogeneseversuche

3.5.1 Tiergut, Tierherkunft und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten 8–12 Wochen junge, weibliche Wildtyp- und transgene Mäuse (Stamm: C57BL6), die zwischen 18 und 24 g wogen. Es handelte sich dabei um Inzuchtmäuse. Alle Tiere wurden vor der subkutanen (s.c.) Injektion und eine Woche später vor der Matrigelplugentnahme gewogen. Hier zeigte sich partiell eine geringe Zu- und Abnahme ohne Relevanz hinsichtlich der Angiogenese. Die Mäuse wurden im hauseigenen Tierstall von einem Tierpfleger artgerecht gepflegt und gefüttert.

Da die Angiogenese bzw. die Neoangiogenese bei jungen Mäusen ausgeprägter ist als bei älteren Mäusen (Pili et al. 1994), wurden sie für die Versuche verwendet. Des Weiteren ist nach Erfahrung von Passaniti et al. (Passaniti et al. 1992) die Gefäßaussprossung bei weiblichen Mäusen deutlich besser als bei männlichen

Mäusen. Somit wurden die Experimente ausschließlich mit jungen, weiblichen Mäusen durchgeführt.

Herkunft der Tiere: Alle Tiere werden eigens für Tierexperimente gezüchtet. Die Zuchtpaare wurden von bekannten Tierhändlern bezogen.

◆ Charles River Deutschland GmbH
Sandhofer Weg 7
D-97633 Sulzfeld

◆ Jackson Laboratory
600 Main Street
Bar Harbour
Maine 04609-1500
USA

Zu Untersuchung der Wirkung von uPA oder uPAR auf die Angiogenese wurden folgende Knockout-Mäuse verwendet:

◆ uPA^{-/-} und uPAR^{-/-} transgene Mäuse:

Dr. Thomas Bugge, National Institute of Health, 30 Convent Drive, Room 211, Bethesda, Maryland 20892-4340.

3.5.2 Matrigelvorbereitung und subkutane Injektion

Für die Untersuchung der Angiogenese in einem Maus-Matrigel-Modell wurde die etablierte Methode von Passaniti et al. (Passaniti et al. 1992) übernommen. Matrigel (growth factor reduced Matrigel™ Basement Membrane Matrix, BD Biosciences) ist eine Extrazellulärmatrix, die aus dem basalmembranreichen Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Tumor der Maus extrahiert wurde, hierbei handelt es sich dabei um ein Sarkom. Es enthält einerseits Laminin, Kollagen IV und Heparansulfat (Kleinman et al. 1982), andererseits auch geringe Mengen TGF-β, bFGF, EGF, IGF-1, PDGF und tPA (McGuire & Seeds 1989). Wachstumsfaktor reduziertes Matrigel ist im Vergleich zu normalem Gel deutlich weniger mit Wachstumsfaktoren belastet. Zur Durchführung der in-vivo Experimente wurden u.a. zusätzlich Wachstumsfaktoren in das Matrigel hinzugegeben, um die Neoangiogenese innerhalb des Matrigels zu induzieren.

Die Matrigelflasche wurde bei -80°C aufbewahrt und bei Bedarf über Nacht bei 4°C langsam aufgetaut. Am nächsten Tag wurden 0,5 ml Aliquots in sterilen Eppendorftuben vorbereitet. Vor dem Arbeiten mit dem Matrigel mussten alle

Utensilien (Eppendorftuben, Pipettenspitzen, Nadeln und Spritzen) für mindestens 30 min in -20°C aufbewahrt werden, um eine schnelle Konsistenzänderung bzw. Verhärtung des Gels zu vermeiden. Dabei ist das Matrigel bei 4°C flüssig und unter Raumtemperatur innerhalb von 5 bis 10 Minuten irreversibel polymerisiert. Aus diesem Grund wurden alle Matrigelaliquots auf Eis aufbewahrt, um eine flüssige und somit verwendbare Situation zu schaffen.

Standardmäßig wurde nach Optimierung in jede Matrigel-Eppendorftube $200\ \mu\text{g/ml}$ Heparin hinzugegeben, da nach eigenen Voruntersuchungen sowohl die Konzentration als auch Heparin an sich für die Neoangiogenese eine bedeutende Rolle spielen. Daneben wurden in das Matrigel Wachstumsfaktoren (bFGF, VEGF₁₆₅, PDGF-BB), FSAP bzw. PPACK-FSAP, der FSAP-Puffer sowie Aprotinin beigemischt.

Bei den Knockout-Mäusen wurden jeweils eine alleinige Behandlung mit bFGF ($400\ \text{ng/ml}$) und VEGF ($400\ \text{ng/ml}$) sowie eine kombinierte Gabe von bFGF und VEGF (jeweils $200\ \text{ng/ml}$ und $200\ \text{ng/ml}$) durchgeführt. Kano et al. (Kano et al. 2005) konnten nachweisen, dass die kombinierte Applikation von bFGF und VEGF im Rahmen der Neoangiogenese die endogene Kaskade von PDGF-B - PDGFRbeta deutlich fördert.

In jeder Serie wurden generell zwei Mäuse zeitgleich behandelt, bei den Knockout-Mäusen wurde bei der Kombination von bFGF und VEGF jeweils nur eine Maus behandelt. Einzelne Tiere sind leider in beiden Gruppen verstorben (4 in der Wildtyp-Gruppe und jeweils 2 in den uPA- und uPAR-Knockout-Gruppen).

Alle genannten Substanzen wurden unter sterilen Bedingungen dem Matrigel beigemischt, zweimal kurz gevortext und dann auf Eis aufbewahrt. Mit der gekühlten und sterilen Spritze sowie Nadel wurde jeweils ein vorbereitetes Matrigel-Eppendorftube vorsichtig luftblasenfrei aufgenommen und erneut auf Eis gestellt. Damit direkt nach der Injektion das Matrigel unter der Haut eine gelartige Substanz bildet und nicht subkutan ausläuft sowie flächige Masse bildet, wurde die Spritze für 5 min bei Raumtemperatur auf den Tisch gelegt. Vor der subkutanen Verabreichung des Matrigels wurden die Tiere mit Isofluran® (Inhalationsnarkotikum) narkotisiert. Jeder Maus wurden zwei Matrigelplugs (Applikationsvolumen = $0,5\ \text{ml}$) direkt unter die Haut in beide Seiten der Leistenregion injiziert, die rechte Seite enthält nur das Matrigel mit den Wachstumsfaktoren sowie dem Kontroll-Puffer und die linke anstatt des Kontroll-Puffers FSAP. Dadurch sollten individuelle Unterschiede zwischen den Mäusen vermieden werden. Die Neoangiogenese innerhalb der Matrigelplugs ist an der Leiste deutlich besser als am Rücken.

3.5.3 Entnahme der Matrigelplugs

Nach 7 Tagen wurden die Tiere entsprechend dem Versuchsplan durch Genickbruch geopfert und die Matrigelplugs mit einem Präparationsbesteck vorsichtig und sorgfältig entnommen. Mit einer Digitalkamera wurden die Matrigele für den makroskopischen Vergleich abgelichtet. Diese wurden in einem kleinen Becher mit PBS gewaschen und auf Eis gestellt. Die Abb. 7 zeigt die Matrigelplugs.

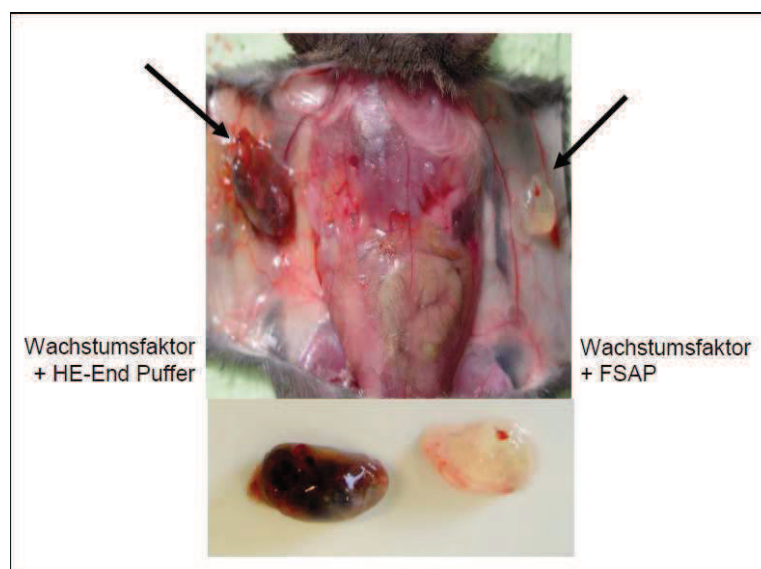


Abb. 7: Makroskopische Darstellung der subkutan injizierten Matrigelplugs. Im Seitenvergleich kommt das mit FSAP behandelte Matrigel ausgeprägt hypovaskularisiert zur Darstellung. Zudem ist die lokale Gefäßinjektion deutlich vermindert.

Allein makroskopisch lassen sich Unterschiede in der Neoangiogenese innerhalb der Matrigelplugs abgewinnen. Je heller sich die Plugs darstellen, desto weniger Gefäße sind vorzufinden.

3.5.4 Matrigelvorbehandlung: Fixierung und Einbettung

Die entnommenen und in PBS gewaschenen Matrigelplugs wurden anschließend in 3,5-3,7%igem Formaldehyd für 1 h fixiert, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und zum Schluss mit n-Butylacetat behandelt. Das Intermedium n-Butylacetat soll einerseits den Alkohol, der sich nicht mit Paraffin vermischen lässt, und andererseits die letzten Wasserreste entziehen, damit der Plug nicht während der Präparation (Mikrotomschnitte) bricht. Der vorbehandelte Plug wurde in Papier

eingewickelt, in ein Einbettkörbchen gegeben und über Nacht bei 46-48°C in Paraffin eingebettet. Am nächsten Tag wurden die Einbettkörbchen in einen zweiten Paraffinbehälter für 2 h umgetopft. Danach wurden die Matrigelplugs aus dem Einbettkörbchen entnommen und mit Hilfe eines Einbettautomaten (Tissue Embedding Center, Tissue Teck II, 6300) in Paraplast eingebettet.

3.5.5 Rotationsmikrotomschnitte mit BioCut 2030

Die eingebetteten Matrigelplugs wurden mit einem Rotationsmikrotom (Biocut 2030) 7 µm dünn geschnitten und im Wasserbad (36°C) auf Super Frost® Plus Objektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Matrigelschnitte aufgezogen auf einem Super Frost® Plus Objektträger verhindern unerwünschte Hintergrundfärbungen. Die beschichteten Objektträger binden durch elektrostatische Anziehungskraft die im Wasserbad (ddH₂O) schwimmenden histologischen Präparate ohne jegliche Zusätze. Bei Objektträgern ohne diese Eigenschaft muss man zusätzlich 1 ml Eiweißglycerin ins Wasserbad (1,5 l ddH₂O) geben. Das Eiweißglycerin dient hierbei als Haftstoff zwischen dem Schnitt und dem Objektträger. Nach eigener Durchführung bestätigte sich die Vermutung, dass nach Gebrauch von Eiweißglycerin eine zu starke Hintergrundfärbung zustande kommt, und dieses Verfahren eher ein Hindernis für eine gute immunhistologische Analyse darstellt.

Beim Schneiden der Matrigelplugs wurde auf die Schnittebene (Abb. 8) geachtet, da sich die Gefäßneubildung in jeder Ebene anders darstellen kann. Die Analyse der immunhistochemisch gefärbten Präparate wurde auf zwei Ebenen (1. und 2. Ebene) begrenzt. Pro Objektträger wurden vier bis fünf Schnitte aufgezogen, die eine Gesamtdicke von 28-35 µm ergaben. Die Objektträger wurden zur genauen Identifizierung der Schnittebene durchnummeriert.

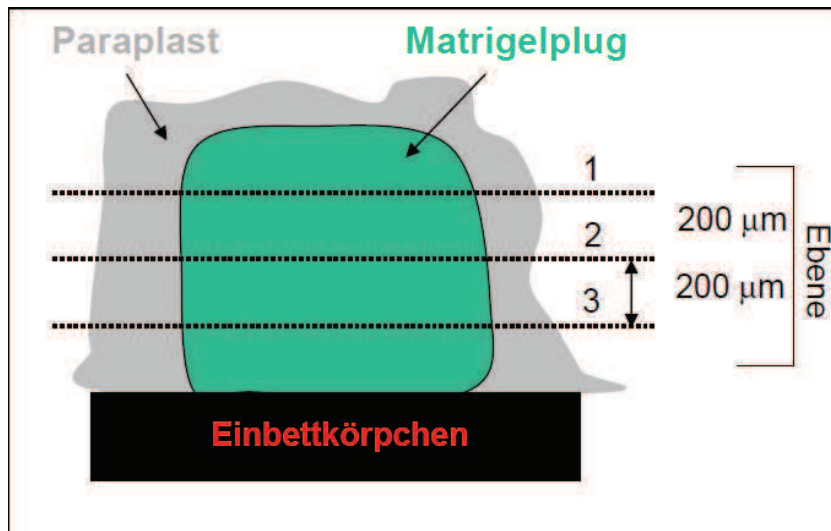


Abb. 8: Einbettkörperchen mit Matrigelplug in Paraffin. Hier werden die Schnittebenen schematisch dargestellt. Eine Ebene zeigte dabei eine Breite von ca. 200 µm.

3.6 Immunhistochemische Methoden

3.6.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Auflicht-Beleuchtungsoptik im Leica-Mikroskop DMR (Digital-Modul-R) HC schafft ein harmonisches Zusammenwirken von Beleuchtungs- und Abbildungsoptik (J. Schönenborn, Leica Microsystems Wetzlar, „Mitteilungen für Wissenschaft und Technik“, 1998). Sowohl Fluoreszenz- als auch Durchlichtmikroskopie wurden mit Leica DMR durchgeführt. Für die Fluoreszenzmikroskopie war das Mikroskop mit DAPI- (Blaufluoreszenz = Zellkernfärbung), FITC- (Grünfluoreszenz = Endothelzelle) und Rhodamin-Filtersätzen (Rotfluoreszenz = glatte Muskelzellen) ausgestattet.

3.6.2 Grundlagen der Immunhistochemie

Unter Immunhistochemie (Synonyme: Immunfärbung, Immunhistologie, Antikörperfärbung) wird in der Medizin ein Verfahren bezeichnet, das nach dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion abläuft. Man hat dadurch die Möglichkeit Proteine, die als Antigene dienen, mit Hilfe von Antikörpern zu färben und diese dann anschließend unter einem Immunfluoreszenzmikroskop zu betrachten. Durch diese Methode kann ermittelt werden, ob das Protein exprimiert und translatiert wurde (z.B. intrazellulär,

extrazellular). Sodann besteht die Möglichkeit, einen Vergleich mit anderen Proben durchzuführen.

Am Anfang eines solchen Verfahrens steht die Auswahl des Antikörpers, der spezifisch gegen das zu visualisierende Protein gerichtet sein muss.

Es gibt verschiedene Methoden der immunhistochemischen Färbung (Boenisch, Th., DakoCytomation, „Färbemethoden-Detektionssysteme“, 2003). Die älteste Methode ist die *direkte Methode*. Dabei reagiert ein enzymmarkierter Primärantikörper mit einem Antigen (z.B. Protein im Zellkern, im Zytoplasma oder auf der Zellmembran). Nach der Bindung des Antikörpers an die Antigenstelle besteht die Möglichkeit unter einem Fluoreszenzmikroskop die fluoreszierenden Antikörper zu sehen.

Die *indirekte Methode*, oder auch *Zwei-Schritt-Methode* genannt, erfordert, wie der Name schon sagt, zwei Schritte. Im ersten Schritt wird ein unmarkierter (unkonjugierter) Primärantikörper auf das Gewebe bzw. Zellen gegeben. Nach der Bindung und einem Waschvorgang wird im zweiten Schritt ein enzymmarkierter Sekundärantikörper aufgetragen. Der enzymmarkierte Sekundärantikörper reagiert jetzt mit dem unmarkierten Primärantikörper, der an ein Antigen gebunden hat.

Die *indirekte Methode* gibt es auch als *Drei-Schritt-Methode*. Dabei wird zusätzlich noch ein weiterer enzymmarkierter Tertiärantikörper, der an den enzymmarkierten Sekundärantikörper bindet, zugegeben. Mit diesem letzten Schritt wird eine Signalverstärkung im Gewebe bzw. in oder auf den Zellen erreicht. Die Drei-Schritt-Methode spielt dann eine Rolle, wenn Antigene mit wenigen Epitopen (antigene Determinante) dargestellt werden sollen (*Signalamplifikation*) oder in geringer Konzentration vorhanden sind.

Die (Strept)Avidin-Biotin-Methode (Hsu & Raine 1981, Hsu et al. 1981) nennt man die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) oder auch SABC-Methode (Streptavidin-Biotin-Complex). Diese Färbemethode basiert auf der hohen Affinität ($K_m=10^{-15}$ M) von Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) und Avidin (Hühnereiweiß) für Biotin. Streptavidin und Avidin besitzen vier Bindungsstellen für Biotin, wobei auf Grund der molekularen Ausrichtung der genannten vier Bindungsstellen jedoch weniger als vier Biotinmoleküle binden. Die Abfolge der Reagenzien lautet demnach: unmarkierter (unkonjugierter) Primärantikörper + biotinmarkierter (biotinylierter) Sekundärantikörper + Avidin-Biotin-Enzymkomplex + Substrat = Fluoreszenz.

Es besteht auch die Möglichkeit der Doppelfärbung (Doppel-Immunmarkierung). So können simultan zwei verschiedene Antigene in einem Gewebeschnitt oder an isolierten Zellen gefärbt werden. Das erste Antigen kann in einer Zelle (z.B. Transkriptionsfaktoren) sein und das zweite Antigen auf der Zelle (z.B. Rezeptoren).

Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass die beiden Antikörper spezifisch nur gegen ein Antigen gerichtet sind, aus verschiedenen Spezies stammen und jeweils ein anderes Fluoreszenzmolekül tragen.

Außer der Drei-Schritt-Methode wurden alle Methoden angewandt, um die während der Arbeit aufgetretenen Fragen adäquat zu beantworten.

3.6.3 Antigendemaskierung: Epitope-Retrieval-Methode

Auf die Qualität immunhistochemischer Färbungen haben viele verschiedene Komponenten einen Einfluss, wobei die Schnittqualität eine Ausgangsvoraussetzung ist. Einerseits haben Antikörpertiter, andererseits haben Inkubationszeit und Inkubationstemperatur und auch die Fixierungsart des Gewebes bzw. der Zellen einen erheblichen Einfluss. Auch der Waschvorgang spielt eine Rolle. Eine gute Färbung ermöglicht auch eine gute Analyse. So sollte eine klar begrenzte Färbung mit guter Fluoreszenz angestrebt werden.

Die aus der Maus entnommenen Matrigelplugs wurden in 3,5-3,7%igem Formaldehyd (Fischer) fixiert und anschließend in Paraffin (Merck) eingebettet. Diese Methode der Formalinfixierung wurde zufällig von F. Blum 1893 entdeckt. Formalinfixiertes und paraffineingebettetes (FFPE) Gewebe trägt erheblich bei der Erhaltung der Morphologie bei, wobei es auch durch Formalinfixierung bei formalinsensitiven Epitopen zu Proteinkonformationsänderungen kommen kann (Puchtler & Meloan 1985, Werner et al. 2000). Einige formalinresistente Epitope überstehen diese Prozedur unverändert. Dabei werden die durch die spezielle Proteinstruktur determinierenden Antigene in ihrer Antigenität verändert. Ursächlich für die Veränderung der Epitope ist die formalininduzierte Bildung chemischer Quervernetzungen, die sowohl zwischen den verschiedenen Proteinen (intermolekulare Cross-Links) als auch innerhalb eines Proteins (intramolekulare Cross-Links) stattfindet. Diese strukturelle Änderung der Antigene („Maskierung der Epitope“) bringt eine Antigendemaskierung mit sich (MacIntyre 2001). Mit Antigendemaskierung oder Antigen-Retrieval (AR) wird in der Biochemie und Immunhistochemie ein Verfahren bezeichnet, mit der die reduzierte Immunreaktivität von formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe bis zu einem gewissen Prozentsatz wiederhergestellt wird. Der Mechanismus der Demaskierung ist nach wie vor weitgehend ungeklärt. Es gibt viele verschiedene Methoden der Antigendemaskierung: Mikrowellenmethode mit Citratpuffer (Brown & Chirala 1995, Pellicer & Sundblad 1994, Shi et al. 1991), proteolytische Vorbehandlung mit

Proteinase K, Pronase, Pepsin oder Trypsin (Huang et al. 1976), Hitzebehandlung im Schnellkochtopf (Norton et al. 1994), Hitzebehandlung im Autoklav (Bankfalvi et al. 1994), Wasserbadmethode mit Citratpuffer (Kawai et al. 1994), hitzeinduzierte Antigendemaskierung mit Wasserdampf und die Kombination von Methoden (Trypsin- oder Proteinase K-Vorbehandlung und Erhitzen im Mikrowellengerät). Taylor et al. verglichen die verschiedenen hitzeinduzierten Antigendemaskierungsmethoden (Taylor et al. 1996). Dabei wurden die Mikrowelle- und Schnellkochtopf- sowie Autoklav- und Dampfkochtopfmethode untereinander verglichen. Nach ihrer Studie bringen alle hitzeinduzierten Verfahren die gleichen Resultate. Nach der Einführung der Antigendemaskierung konnten nun verschiedene Proliferationsmarker (z.B. Ki-67, Topoisomerase II-alpha), Hormonrezeptoren (ER, Östrogenrezeptor und PR, Progesteronrezeptor), Wachstumsfaktor-Rezeptoren (HER2/neu) und auch bis dahin in FFPE Gewebe als nicht-reaktiv eingestufte Antigene, bzw. ihre nicht paraffingängigen Antikörper, nachgewiesen werden. Bei der vorliegenden Arbeit wurde die hitzeinduzierte Antigendemaskierung vorgezogen.

3.6.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung nach Mayer (H&E-Färbung) der Matrigelschnitte

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer (H&E-Färbung) ist eine Übersichtsfärbung, die Zellkerne, Erythrozyten und andere Gewebestandteile mikroskopisch darstellt. Hämatoxylin, bzw. das industriell aufbereitete Hämalaun (basischer Hämateinlack, Mayer's Hämalaun, Merck), ist ein positiv geladener Farbstoff, der alle negativ geladenen Strukturen (saure, basophile Strukturen) blau färbt (DNA/ Zellkern, RNA des rauen endoplasmatischen Retikulums). Eosin G (Eosin G Certistain®, Merck) ist ein negativ geladener Farbstoff (saurer Farbstoff), der zur Gegenfärbung der vorhandenen Strukturen benutzt wird. Dabei werden alle azidophilen, eosinophilen und basischen Bestandteile rot gefärbt (Zytoplasma, Bindegewebe, Erythrozyten).

Die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte des Matrigelplugs wurden zuerst, wie alle anderen Schnitte, in Roti®-Histol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert, anschließend wurden sie für 3 min in dH₂O aufbewahrt. Das Färben in Mayer's Hämalaunlösung für 5 min war der nächste Schritt der H&E-Färbung. Nach dem Färben wurden die Schnitte für 2 s mit 0,1%igem HCl (Salzsäure) gespült. Um die charakteristische blau-violette Farbe der Schnitte zu bekommen, wurden die Objektträger unter Leitungswasser für 8 min gebläut. Dadurch wird der pH-Wert erhöht, um das Umschlagen der Farbe zu gewährleisten. Alle H-gefärbten

Objektträger wurden einmal mit dH₂O gespült und mit 0,1%igem wässrigem Eosin G (Gruppe: Xanthenfarbstoff) für 4 min gegengefärbt. Im Anschluss wurden sie erneut für 30 s mit Leitungswasser und kurz mit dH₂O gespült. Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte entwässert und mit dem organischen Lösungsmittel Roti®-Histol geklärt. Das Eindecken der Objektträger wurde mit DePeX mounting medium luftblasenfrei durchgeführt. Zum Trocknen wurden alle Objektträger unter dem Abzug für 24 h aufbewahrt. Überschüssiges DePex wurde mit Alkohol entfernt. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit dem Mikroskop HC (20x/0,50) dargestellt und digital dokumentiert.

3.6.5 Immunhistochemie der Matrigelschnitte (Wildtyp-Mäuse)

Bevor die immunhistologische Färbung mit Lektin (*Bandeiraea simplicifolia*-1, BS-1) und anti- α -Glattmuskel-Aktin (α -smooth muscle actin, α -SMA) durchgeführt werden konnte, mußten die Objektträger adäquat vorbereitet werden. Als erstes mussten die Super Frost® Plus Objektträger in einem Wärmeschrank bei 58 - 60°C für 1 h inkubiert werden. Diese Prozedur gewährleistet eine bessere Haftbarkeit des histologischen Schnittes auf dem Objektträger. Direkt im Anschluss wurden die histologischen Schnitte in Roti®-Histol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Anschließend wurden die Objektträger in einem Glaskasten mit TBS für 15 min aufbewahrt. Um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern, wurden alle nachfolgenden Schritte in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Objektträger wurden von unten mit einem Diamantstift umrandet, um später die histologischen Schnitte besser finden zu können. Zur Permeabilisierung der Schnitte wurde 0,1% Triton X-100 verwendet. Dabei wurde zuerst 0,1 g Triton X-100 in 10 ml 1xTBS auf einem Roller aufgelöst. Von dieser 1%igen Lösung wurde 1 ml Volumen entnommen und mit 9 ml 1xTBS vermischt, sodass wir zum Schluss eine 0,1%ige Triton X-100 Lösung zur Verfügung hatten. 200 μ l dieser 0,1%igen Triton X-100 Lösung wurde pro Objektträger verwendet. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Objektträger dreimal je 5 min in TBS ausgewaschen. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Triton komplett ausgewaschen wurde, um mögliche Nebeneffekte, bedingt durch Tritonreste, zu verhindern. Um unspezifischen Bindungen der Antikörper vorzubeugen, wurden die Schnitte mit 3%igem BSA in TBS aufgelöst und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen mit TBS wurden die Antikörper aufgetragen, um eine Doppelfärbung durchzuführen. Lektin (BS-1, Sigma, FITC

konjugiert, 1:50) und anti- α -Glattmuskel-Aktin (α -SMA, Sigma, Cy3 konjugiert, 1:500), aufgelöst in 1%igem BSA, inkubierten 3 h bei Raumtemperatur. Alle Objektträger wurden zur Entfernung ungebundener Antikörper erneut mit TBS gewaschen und danach mit dem Eindeckmedium (Vectashield mit DAPI) eingedeckt. Die Abdichtung der Objektträger wurde mit einem Nagellack durchgeführt, um einerseits das Austrocknen und andererseits das Auslaufen von zusammengepressten DAPI zu verhindern. Bei der Lektinhistochemie handelt es sich um eine spezifische Färbung des murinen Endothels. Lektine sind Proteine, welche die Eigenschaft besitzen, zuckerhaltige Moleküle zu binden.

3.6.6 Immunhistochemie der Matrigelschnitte (uPA^{-/-}- und uPAR^{-/-}-Mäuse)

Eine Vergleichsstudie von Espersen et al. mit Tris-EDTA-Puffer, pH-Wert 9.0, zeigte bei einer Vielzahl von Primärantikörpern (n= 121) sehr gute Färbeergebnisse (Espersen C et al. Heat-induced epitope retrieval in immunohistochemistry. *Virchows Arch* 2003; 443(3): 473). Auch Torlakovic et al konnten mit dieser Methode bei der Detektion von Cyclin D1 bei Mantelzelllymphom (MCL, mantle cell lymphoma) repräsentative Ergebnisse erzielen (Torlakovic et al. 2005). Außerdem wurde im Datenblatt von DakoCytomation vor der Anwendung von Polyclonal rabbit anti-human vWF eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung vorgeschrieben.

Zur Herstellung dieses Puffers wurde 1,21 g Tris (10 mM) und 0,37 g EDTA (1 mM) in 1 l destilliertem Wasser aufgelöst, auf einen pH-Wert von 9.0 eingestellt und anschließend 0,5 ml Tween 20 (0,05%) beigemischt.

Nach Entparaffinieren mit Roti®-Histol und Rehydrieren in einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Objektträger zur weiteren Rehydratation in einem Glaskasten mit ddH₂O für 20 min aufbewahrt. Diese zusätzliche Rehydratation dient der besseren Entfaltung der Proteine und unterstützt die Detektion der Antigene. Im Anschluss wurden die Objektträger in ein 95°C vortemperiertes Wasserbad, gefüllt mit Tris-EDTA-Puffer, überführt und 10 min lang inkubiert. Gearbeitet wurde nahe dem Siedepunkt des Wassers (95-99°C). Die wässrige Lösung wird auch „Retrieval-Lösung“ oder „-puffer“ genannt. Durch die anhaltende Hitzeeinwirkung auf die Objektträger wurde die Wiederherstellung der Immunreaktivität bewirkt. Diese ist wiederum von der Dauer der Inkubation und der erreichten Temperatur abhängig. Nach einer 20-minütigen langsamen Abkühlung in einem Glaskasten mit ddH₂O wurden die Objektträger zweimal mit TBS gewaschen, mit einem Diamantstift von unten markiert und

anschließend mit 3%iger BSA in TBS-Lösung 30 min lang geblockt. Um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern, wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer überführt und bis zum Eindecken mit DAPI alle Schritte darin ausgeführt. Auf die kurze Spülung mit TBS folgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit α -smooth muscle actin (α -SMA, 1:200, Cy3 konjugiert) und polyclonal rabbit α -human vWF (1:100). Nach zweimaligem Waschen wurde der sekundäre Antikörper gegen den vWF (anti-rabbit IgG: FITC, Dianova, 1:200) für 1 h in Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte dreimal gespült und direkt im Anschluss mit dem Eindeckmedium (Vectashield mit DAPI) eingedeckt. Die Abdichtung der Objektträger wurde mit einem herkömmlichen Nagellack durchgeführt.

3.6.7 Densiometrische Analyse der immunhistochemisch gefärbten Matrigelschnitte mit Metamorph (Software) und mittels manueller Bestimmung

Die densiometrische Analyse der immunhistochemisch gefärbten Schnitte sowie die mikrovaskuläre Dichte (density and microvascular density) mit α -SMA, Lektin, vWF und DAPI wurde einerseits mit der Software Metamorph am Immunfluoreszenzmikroskop HC (Leica DMR Microsysteme Vertrieb, Wetzlar) durchgeführt. Hierbei wurden die unterschiedlich gefärbten und somit fluoreszierenden Schnitte durch die entsprechenden Filter betrachtet. Somit registrierte die Software je nach Filtereinstellung die fluoreszierenden Schnitte; konsekutiv konnte die Menge bzw. die Dichte der gefärbten Antigene quantitativ bestimmt und dokumentiert werden. Das Ergebnis wurde dann prozentual zur Gesamtfläche angegeben.

Andererseits wurde durch das manuelle Auszählen der Gefäße auf einem Schnitt die mikrovaskuläre Dichte bestimmt. Dabei wurden jeweils Areale mit höchster Gefäßdichte ausgewählt. Zuerst wurde das Areal des Schnittes berechnet (Fläche = $3,14 \times r^2$) und anschließend wurden alle Gefäße jeweils auf einem Schnitt gezählt. Um die Gefäßanzahl pro mm^2 zu bekommen, wurden die ausgezählten Gefäße durch die Fläche dividiert. Das Ergebnis zeigte die Anzahl der Gefäße pro mm^2 . Die mikrovaskuläre Dichte korreliert mit der antiangiogenen Wirkung von FSAP und findet in vielen Tumormodellen seine Anwendung.

In den Diagrammen sind die Mittelwerte mit deren Standardfehler (SEM = standard error of mean) abgebildet.

3.7 Statistische Analyse und Auswertung (ANOVA)

Die statistische Auswertung erfolgte mit one-way analysis of variance (ANOVA) mit Bonferroni's post-hoc test (Prism Software, GraphPad, USA). Hier wurden Werte $p < 0,05$ als signifikant, $p < 0,01$ als hoch und $p < 0,001$ als höchst signifikant eingestuft. Dargestellt sind Mittelwerte mit standard error of mean (SEM).

4. Ergebnisse

4.1 In-vitro Effekte von FSAP auf BxPC3-Zellen

4.1.1 Plasminogen-Aktivierungs Aktivität im Extrakt vs. Überstand in BxPC3-Zellen nach Stimulierung mit FSAP

Die Casein-Zymographie zeigte die Aktivität von uPA bzw. tPA im Extrakt und im Überstand der BxPC3 Zellen nach Stimulierung mit FSAP bzw. seinem Kontroll HE-Puffer (Abb. 9). Daneben konnte als weiterer Effekt gezeigt werden, dass der uPA-PAI-1 Komplex (100 kDa) auch eine diskrete Aktivität aufwies, wohingegen in der Positivkontrolle PMA eine deutliche Aktivität von uPA und uPA-PAI-1 Komplex dokumentiert wurde. Die Wirkung von FSAP auf die uPA-Aktivität war im Zellextrakt sowie im Überstand deutlich erkennbar, was zu der Schlussfolgerung führt, dass FSAP die Aktivität von uPA in BxPC3-Zellen steigert.

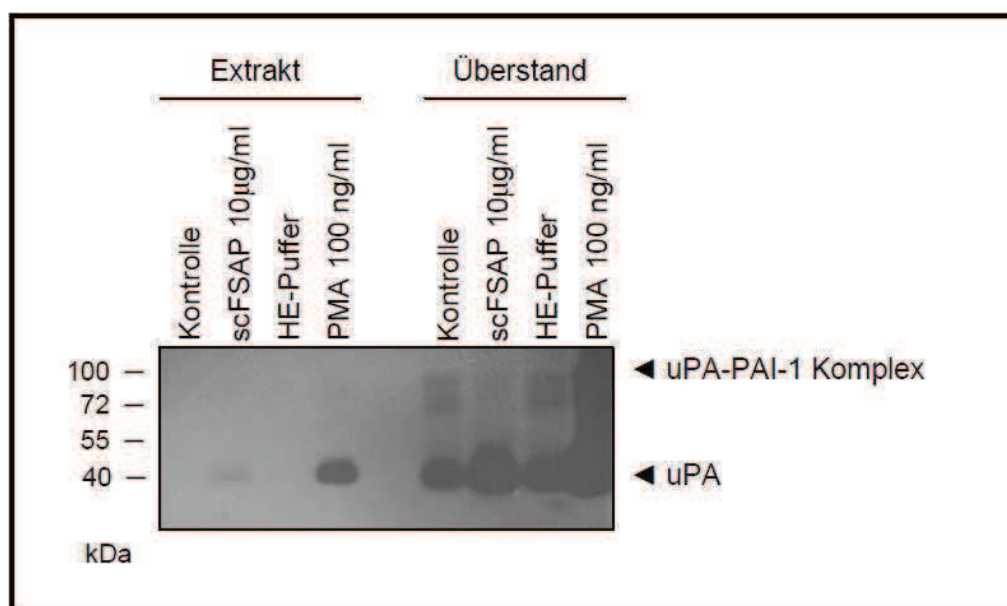


Abb. 9: Casein-Zymographie zur Darstellung der uPA/ tPA-Aktivität im Extrakt bzw. im Überstand der BxPC3-Zellen nach scFSAP-Gabe (10µg/ml) oder Kontroll HE-Puffer. PMA (100ng/ml) diente als Positivkontrolle für die Stimulation der zellulären uPA/ tPA-Aktivität. Die uPA-Aktivität (40 kDa) ist mit einem Pfeil markiert, tPA (60 kDa) war nicht detektierbar. Normalerweise wird uPA durch seinen Inhibitor PAI-1 inaktiviert. Aber in diesem Verfahren zeigt uPA einen Komplex mit der PAI-1-Aktivität (100 kDa, mit Pfeil markiert), weil der Komplex denaturiert und dadurch uPA wieder aktiviert wird.

4.1.2 Konzentrationsabhängige uPA/ tPA-Aktivität im Überstand der BxPC3-Zellen nach FSAP-Gabe und Western Blot Analyse von uPA und PAI-1

In dieser Versuchsreihe wurden die BxPC-3 Zellen nach Behandlung mit FSAP bzw. seinem HE-Puffer in unterschiedlichen Konzentrationen hinsichtlich der uPA/tPA-Aktivität im Überstand getestet. Dabei nahm die uPA-Aktivität mit zunehmender FSAP-Konzentration (0,2 – 20 µg/ml) proportional zu (Abb. 10 links), wobei der uPA-PAI1 Komplex im Vergleich mit der Positivkontrolle PMA bei höheren FSAP-Konzentrationen geringere Aktivität zeigte. Die Behandlung der BxPC3-Zellen mit dem FSAP-Puffer (HE-Puffer, Abb. 10 rechts) zeigte keine Wirkung in der Casein-Zymographie, hier kamen gleichmäßige Lysebanden zur Darstellung. Da die Konzentration des FSAP-Puffers nicht quantifiziert werden kann, wurde ein Volumenäquivalent von 0,2 bis 20 µg/ml verwendet.

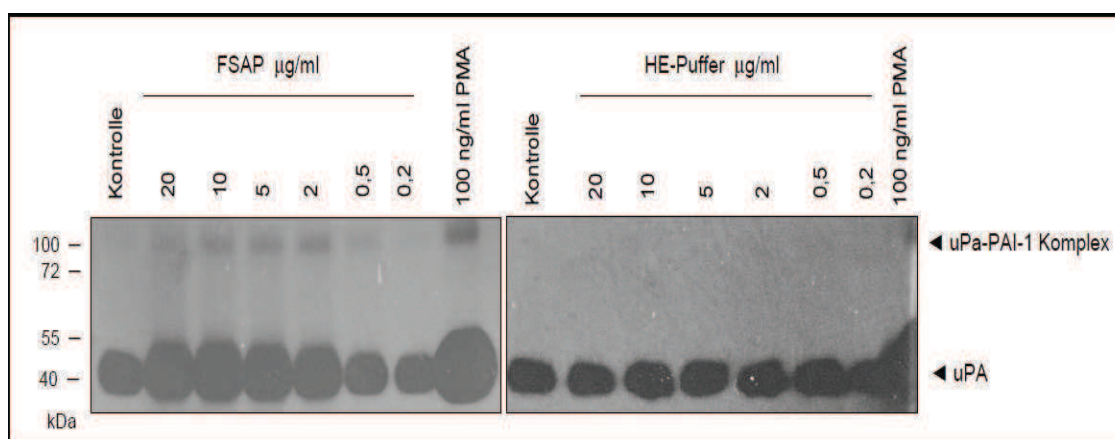


Abb. 10: Effekt von FSAP (0,2 – 20 µg/ml) bzw. dem Kontroll-Puffer auf die BxPC3-Zellen bei der Casein-Zymographie. Als Positivkontrolle diente 100 ng/ml PMA. Die Aktivität von uPA bzw. uPA-PAI-1 Komplex wird durch die dunklen Banden verdeutlicht.

Zur molekularbiologischen Darstellung von uPA (40 kDa), PAI-1 (47 kDa) und des uPA-PAI-1 Komplexes (100 kDa) wurde zusätzlich eine Western Blot Analyse durchgeführt, um dadurch qualitativ und quantitativ die Proteine zu bestimmen. Hier sollten ihre Expression nach FSAP-Gabe ermittelt werden.

Auf Proteinebene konnte in Relation zur Positivkontrolle PMA und zum HE-Puffer eine deutlich verminderte Expression von uPA im Überstand und keine Änderung im Extrakt dokumentiert werden (Abb. 11 oben). Der Inhibitor von uPA, PAI-1, blieb bezüglich Proteinmenge sowohl im Extrakt als auch im Überstand unverändert (Abb. 11 unten).

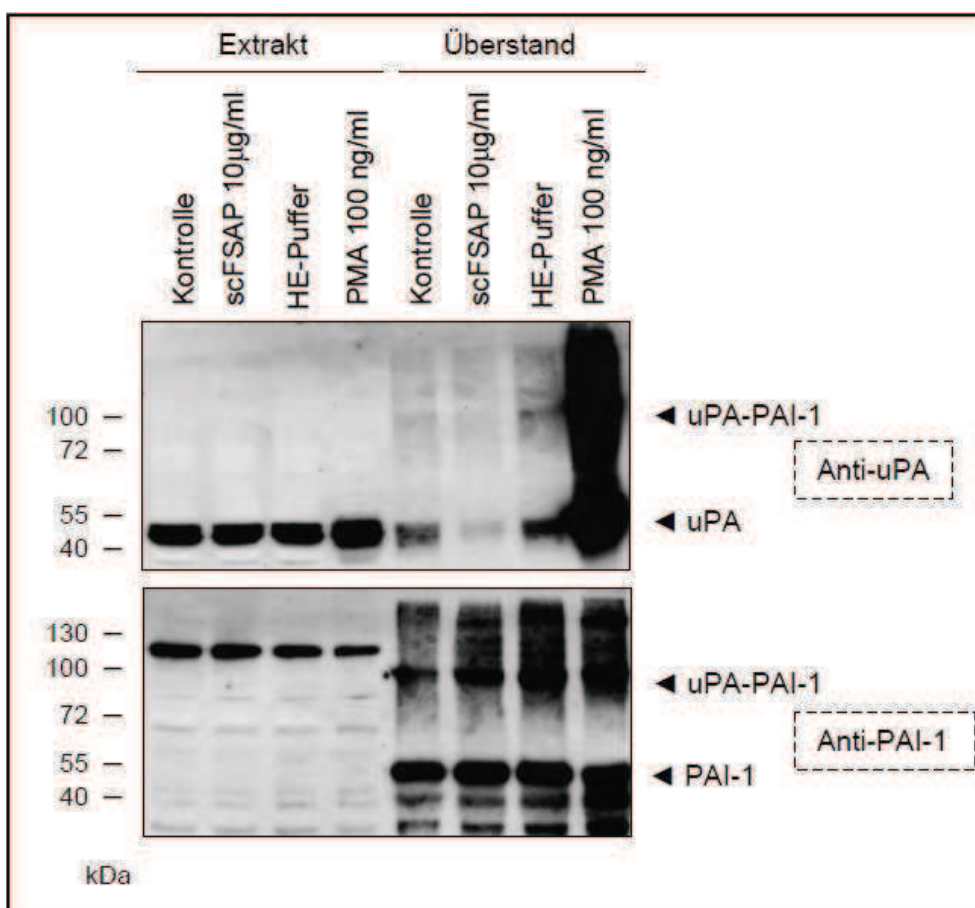


Abb. 11: Western Blot Analyse zum Nachweis von uPA (oben), PAI-1 (unten) und des uPA-PAI-1-Komplexes auf Proteinebene in BxPC3 nach Stimulierung mit FSAP. Die BxPC3-Zellen waren stimuliert mit FSAP (10 µg/ml), HE-Puffer und PMA (100 ng/ml) für 24 h, welche nach der Inkubation als Extrakt bzw. Überstand getrennt worden sind. Die Expression von uPA bzw. PAI-1 sowie indirekt der Komplex uPA-PAI-1 wird mittels Antikörpergabe visualisiert.

Bei Darstellung der uPA-Proteinmenge in einer FSAP-Konzentrationsreihe (0,2 – 20 µg/ml) nahm im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe (HE-Puffer) die Proteinexpression mit absteigender Konzentration deutlich zu (Abb. 12 links). Die FSAP-Gabe führte zu einer deutlichen Abnahme des uPA-PAI-1 Komplexes zwischen den Konzentrationen von 0,5 und 20 µg/ml und einer ausgeprägten Abnahme bei 0,2 µg/ml (Abb. 12 links). Wie erwartet, zeigt PMA eine Stimulierung der Expression von uPA und uPA-PAI-1 Komplex in diesen Zellen, was die Richtigkeit der Experimente untermauert.

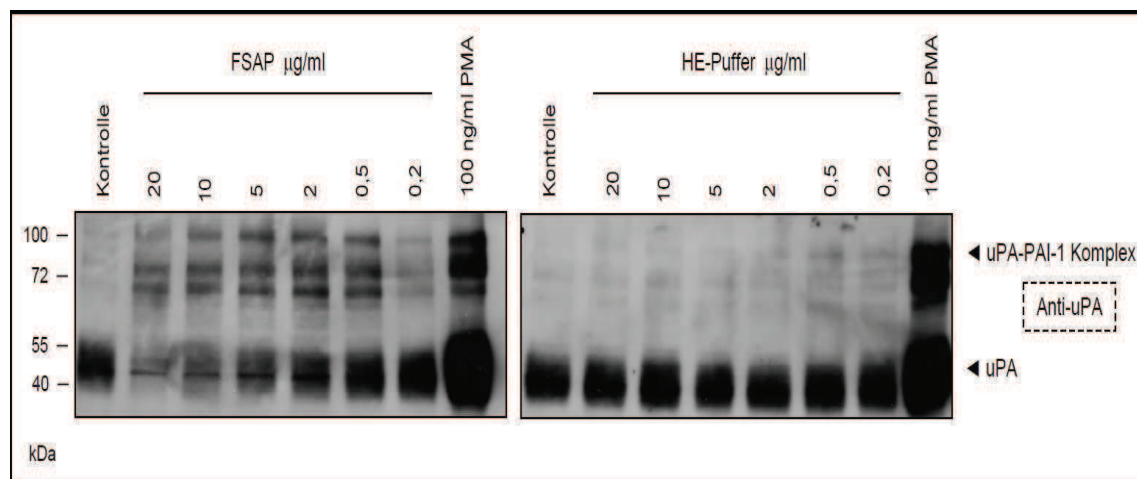


Abb. 12: Western Blot Analyse zum Nachweis von uPA und des uPA-PAI1-Komplexes in BxPC3-Zellen nach FSAP-Stimulierung (links). Die Zellen wurden mit einer FSAP-Konzentration von 0,2 – 20 $\mu\text{g/ml}$ für 24 h stimuliert. Als Volumenäquivalent sind der Kontroll HE-Puffer (rechts) sowie als Positivkontrolle 100ng/ml PMA mitgelaufen.

Weitere Untersuchungen zur PAI-1-Expression in BxPC3-Zellen nach FSAP-Stimulierung in einem Konzentrationsgefälle führten zu keinen signifikanten Ergebnissen (Abb. 13). Die PMA-Stimulierung zeigte auch keine Veränderung in der PAI-1 Konzentration.

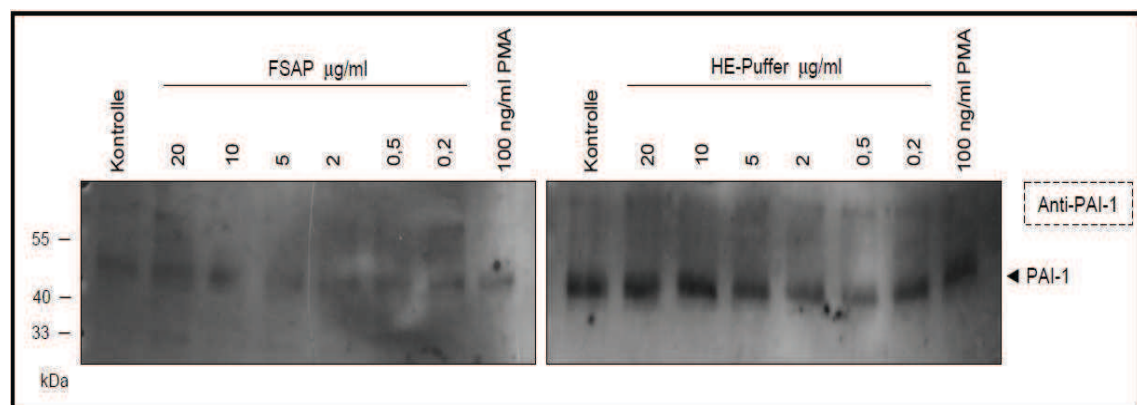


Abb. 13: FSAP-Konzentrationsabhängige Expressionsanalyse mittels Western Blot zum Nachweis von PAI-1 in BxPC3-Zellen. Dabei wurden die BxPC3-Zellen mit einem Konzentrationsgefälle von FSAP zwischen 0,2 und 20 $\mu\text{g/ml}$ stimuliert. Der FSAP-Puffer als Volumenäquivalent sowie die Positivkontrolle PMA (100 ng/ml) sind getestet worden.

Als Nachweis von FSAP in der jeweiligen Stocklösung wurde zur quantitativen und qualitativen Kontrolle sowie der eindeutigen Identifikation eine Western Blot Analyse durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Proben verwendet wie in Kap. 4.1.1. Hierbei zeigte sich eine ausgeprägte Schwärzung im Überstand nach Gabe des Antikörpers

gegen FSAP, das als Beweis für das Vorhandensein von FSAP in den jeweiligen Proben diene (Abb. 14).

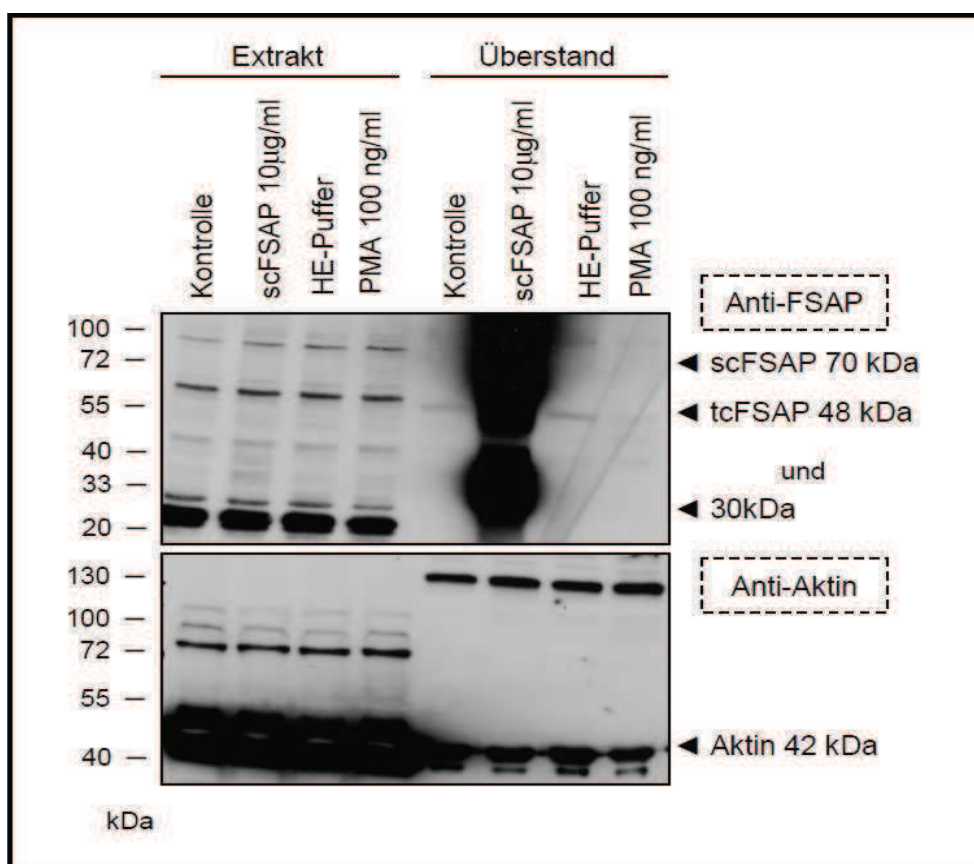


Abb. 14: Western Blot Analyse zum Nachweis von FSAP in der jeweiligen Stocklösung. Dabei wurden die Proben aus Abb. 9 getestet. Durch die autokatalytische Aktivität von FSAP lassen sich hier sowohl die intakten als auch die gespaltenen Formen nachweisen. Als Ladungskontrolle wurde Aktin bestimmt, was eine gleiche Färbung in allen Proben aufweist.

4.1.3 Kein FSAP-Effekt auf Matrixmetalloproteasen in BxPC3-Zellen

Die Gelatine-Zymographie sollte die Aktivitäten von MMP-2 und MMP-9 (Matrixmetalloproteasen) im Extrakt und im Überstand der BxPC3-Zellen nach Stimulierung mit FSAP (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ scFSAP) sowie dosisabhängig (0,2 bis 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FSAP) zeigen.

Bei der Durchführung der Zymographie mit dem Extrakt bzw. mit dem Überstand der BxPC3-Zellen zeigten MMP-2 und -9 keine Aktivierung (Abb. 15).

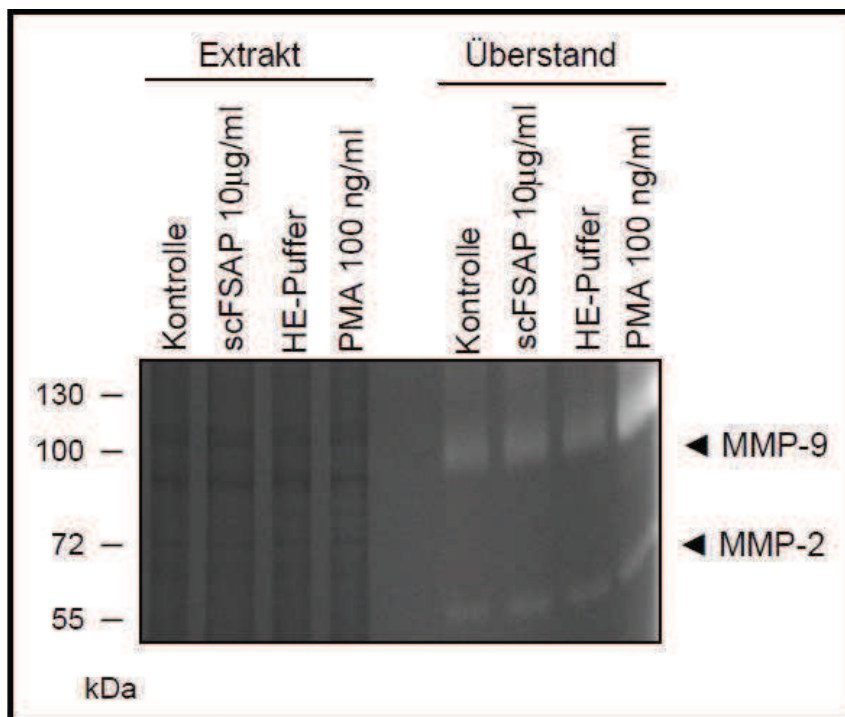


Abb. 15: Gelatine-Zymographie zur Darstellung von MMP2- und -9 -Aktivität in BxPC3-Zellen nach FSAP-Stimulierung. Die Stimulierung durch scFSAP (10 µg/ml), dem Kontroll HE-Puffer und der Postitivkontrolle PMA (100 ng/ml) erfolgte für 24 h.

Auch konnten keine Effekte hinsichtlich der Aktivierung von MMP-2 bzw. -9 bei konzentrationsabhängiger Stimulation durch FSAP nachgewiesen werden (Abb. 16).

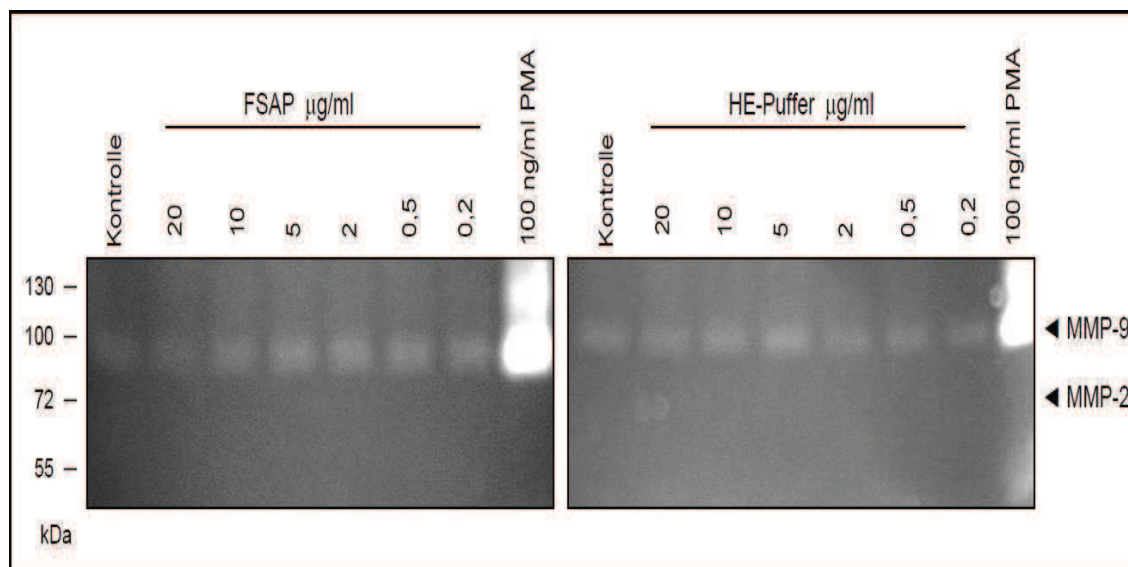


Abb. 16: Gelatine-Zymographie zur Darstellung von MMP2- und -9 -Aktivität in BxPC3-Zellen nach FSAP-Stimulierung. Hierbei wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von FSAP zwischen 0,2 und 20 µg/ml bzw. mit einem Kontroll HE-Puffer stimuliert. Eine Positiv- (PMA 100 ng/ml) sowie eine Negativkontrolle ohne Stimulation sind parallel mitgelaufen.

Bei unklarem Bandenverlust sollte zusätzlich die MMP-2 und -9 Expression nach Stimulierung über 24 h durch eine FSAP-Dosis von 10 $\mu\text{g/ml}$ und durch aufsteigende FSAP-Konzentrationen (0,2 – 20 $\mu\text{g/ml}$), hier nur MMP-9, mittels Western Blot Analyse dargestellt werden. Hierbei konnte ebenfalls kein Effekt auf Aktivität und Expression von MMP-2 und -9 durch FSAP gezeigt werden (Abb. 17 Extrakt und Überstand, Abb. 18 FSAP-Konzentrationsgefälle). Die Positivkontrolle PMA zeigte in jeder Versuchsreihe eine deutliche Stimulierung von MMP-9 Aktivität und Zunahme der Proteinmenge, aber keine Wirkung auf die MMP-2.

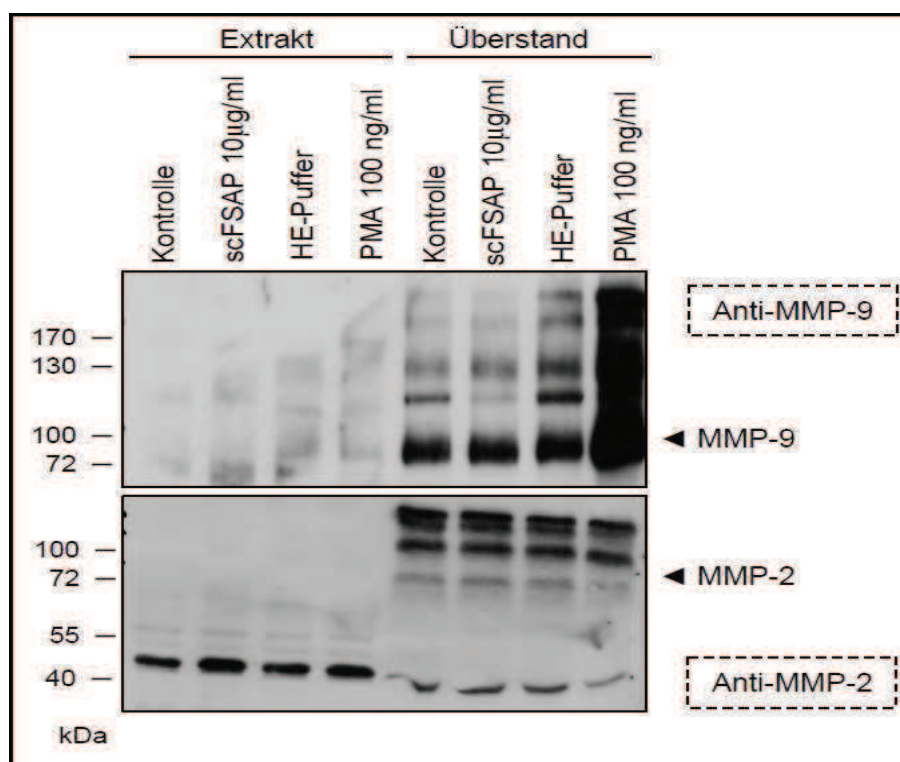


Abb. 17: Western Blot Analyse zum Nachweis der MMP-2 und -9 Proteinexpression in BxPC3-Zellen nach FSAP-Stimulation. Nach Stimulierung der Zellen mit scFSAP (10 $\mu\text{g/ml}$), dem Kontroll HE-Puffer und der Positivkontrolle PMA (100 ng/ml) wurde der Extrakt sowie der Überstand hinsichtlich der MMP-2 und -9 untersucht.

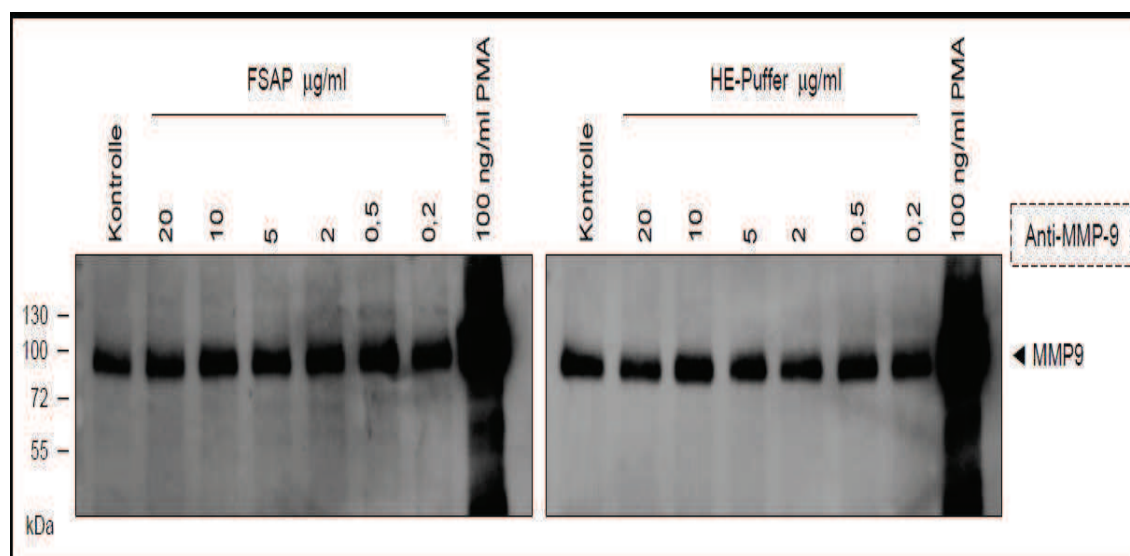


Abb. 18: Western Blot Analyse. Konzentrationsabhängiger Effekt von FSAP hinsichtlich der MMP-2 und -9 -Expression in BxPC3-Zellen. Ein FSAP-Konzentrationsgefälle von 0,2 bis 20 µg/ml sollte demonstrieren, inwieweit die Genexpression von MMP-2 und -9 in BxPC3-Zellen eine Korrelation zeigen. Parallele Durchführung als Kontrolle mit dem HE-Puffer sowie einer Negativ- bzw. Positivkontrolle (PMA 100 ng/ml).

4.1.4 Keine Änderung der Genexpression von uPA, PAI-1, tPA, MMP-2/-9 und TIMP-1/-2 nach FSAP-Gabe

Mit der RT-PCR sollte dargestellt werden, in wieweit FSAP die Genexpression von uPA, PAI-1, tPA, MMP-2/-9, TIMP1- und -2 auf Transkriptionsebene verändert. Sowohl nach 2,5 als auch nach 5 h Inkubation zeigte uPA keine Änderung der mRNA-Expression. In Korrelation mit der uPA-Aktivitätszunahme nach FSAP-Gabe bei der Casein-Zymographie lässt sich daraus schließen, dass FSAP auf posttranskriptionaler bzw. zellulärer Ebene wirkt. Die Inhibitoren von MMP's (TIMP1/-2) und uPA bzw. tPA (PAI-1) wurden mit untersucht, um einen eventuellen Nebeneffekt von FSAP aufzudecken. Diese zeigten ebenfalls keine Änderung ihrer Genexpression (Abb. 19). Die einzige deutlich erkennbare Veränderung im Expressionsmuster war die Stimulierung von MMP-9 mRNA mit PMA nach 5 h Inkubation. Diese positive Kontrolle entspricht der deutlichen Zunahme von MMP-9 Protein und Aktivität unter dem Einfluss von PMA. Dies bekräftigt die Schlussfolgerung, dass FSAP keine Wirkung auf die Expression von diesen Genen hat.

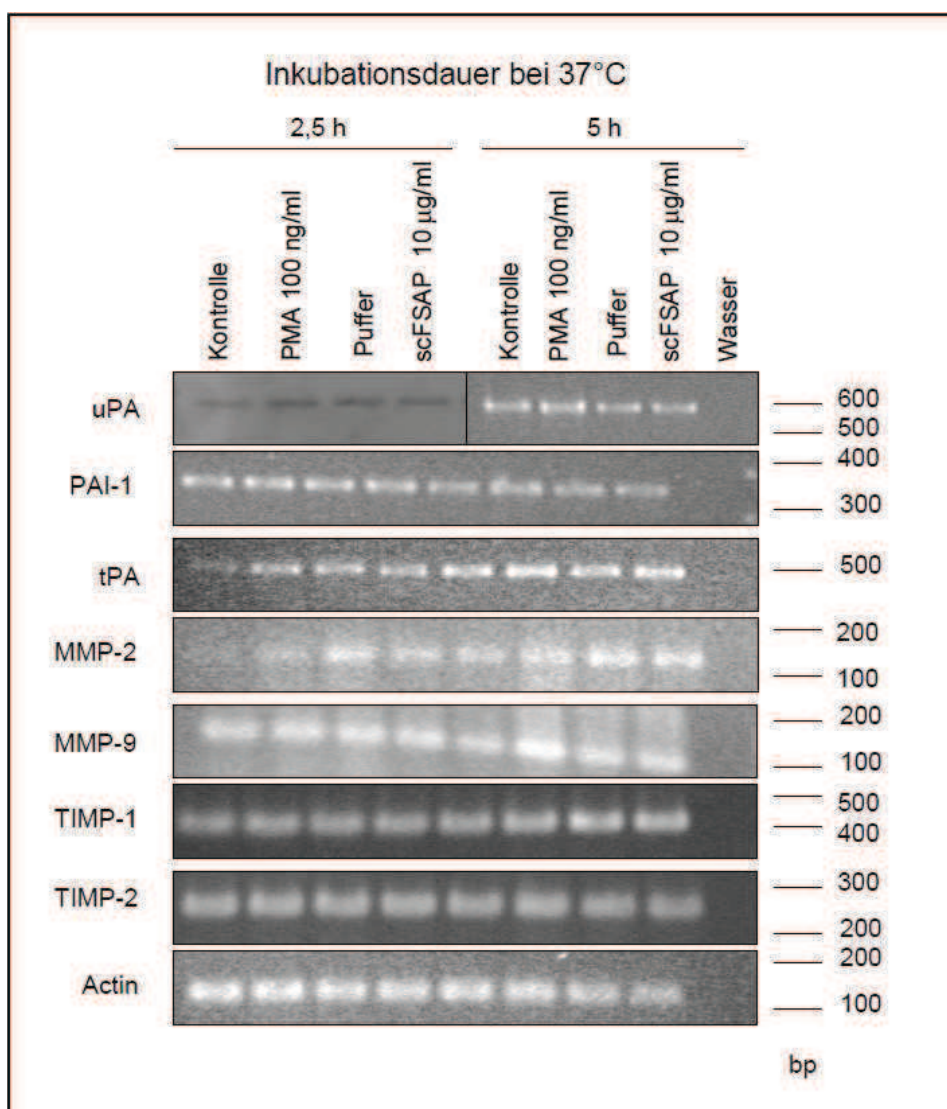


Abb. 19: RT-PCR zum Nachweis eines FSAP-Effektes auf Transkriptionsebene bei uPA, PAI-1, tPA, MMP-2/-9, TIMP1- und -2 in BxPC3-Zellen. Nach der Stimulation von BxPC3-Zellen mit scFSAP (10µg/ml) über 2,5 und 5 h bei 37°C wurden unterschiedliche Primer zur Darstellung der Expression von uPA, PAI-1, tPA, MMP-2/-9, TIMP1- und -2 mRNA verwendet. Der Kontroll-Puffer wurde mituntersucht. Die Ladungskontrolle wurde in diesen Experimenten die Aktin-mRNA. Eine RT-PCR Reaktion mit Wasser schliesst eventuelle Artefakte im Amplifikationsprozess aus. Eine Negativkontrolle ohne Stimulation sowie eine Positivkontrolle mit PMA sind mitgelaufen.

4.1.5 Geringe Aktivierung der Signaltransduktion durch FSAP in BxPC3-Zellen

Anhand der Western Blot Analyse sollte zudem gezeigt werden, inwieweit FSAP in der Lage ist, eine Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kaskade (MAPK) ERK1/2 (extracellular-signal regulated kinases) im Sinne einer Phosphorylierung zu induzieren.

MAPKs spielen sowohl bei der physiologischen als auch bei der malignen Genregulation im Zellkern eine wichtige Rolle, indem sie Einfluss auf die Zellproliferation, -differenzierung und -tod nehmen. Um die MAPK- und die Tyrosinphosphorylierung der BxPC3-Zellen nach der Stimulation durch FSAP und anderen Substanzen zu zeigen, wurde eine entsprechende Versuchsreihe aufgebaut. Dabei sollten die Wachstumsfaktoren IGF-1 (insulin-like growth factor-1) und PDGF-BB die Phosphorylierung positiv beeinflussen und in Relation zum FSAP-Effekt verglichen werden. Hier zeigte FSAP nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C in Relation zum Kontroll-Puffer bzw. Kontroll-Puffer und IGF-1 eine geringe Phosphorylierung von p42/44 MAPK (Abb. 20 links). Nach 30-minütiger Inkubation konnte kein FSAP-Effekt abgegrenzt werden (Abb. 20 rechts). PDGF-BB hat eine geringfügige Wirkung auf die Phosphorylierung von MAPK, aber der Einfluss von IGF-1 war größer und nicht mit FSAP modifizierbar.

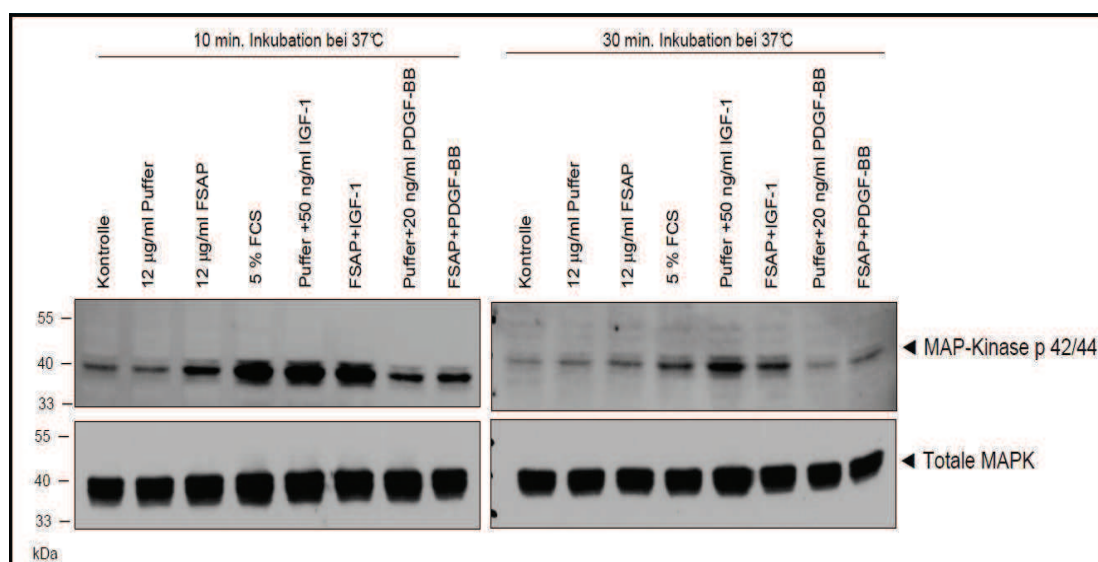


Abb. 20: Western Blot Analyse zum Nachweis einer ERK1/2-Phosphorylierung über MAPK in BxPC3-Zellen nach FSAP-Gabe (links nach 10 und rechts nach 30 min Inkubation). Es fand eine Vorinkubation von RPMI 1640 (serumfreies Medium), Heparin und BSA für 1 h bei 37°C statt, anschließend wurden HE-Puffer, FSAP (12 µg/ml), FCS (5%), IGF-1 (50 ng/ml) und PDGF-BB (20 ng/ml) hinzupipettiert und für 10 min bzw. für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Stimulierung wurde mit SDS Puffer und Orthovanadate (100 µM) gestoppt. Die totale MAPK zeigt eine gleichmäßige Beladung der Proben.

Weiterhin wurde untersucht, ob FSAP über eine Aktivierung von Kinasen eine Tyrosinphosphorylierung bewirken kann, welche einen intrazellulären Effekt im Sinne einer Signaltransduktionskaskade in Gang setzt. Die aktivierte Kaskade wäre somit in der Lage z.B. Transkriptionsfaktoren zu bilden oder zu aktivieren, welche weitere

Effekte mit sich bringen. Nach 10 Minuten konnte eine signifikante Aktivierung nach FSAP-Gabe festgestellt werden (Abb. 21). Die Tyrosin phosphorylierte Bande, der häufigste Unterschied liegt bei etwa 170 kDa und deutet darauf hin, dass das eine Protein von der Rezeptor-Tyrosin Kinase Familie entstammt, wurde hinsichtlich dieses Punktes in der jetzigen Studie nicht weiter untersucht. FSAP zeigt somit einen schwachen Einfluss auf die Tyrosinphorylierung in den BxPC3-Zellen, die Wirkung von IGF-1 wurde durch FSAP nicht beeinflusst.

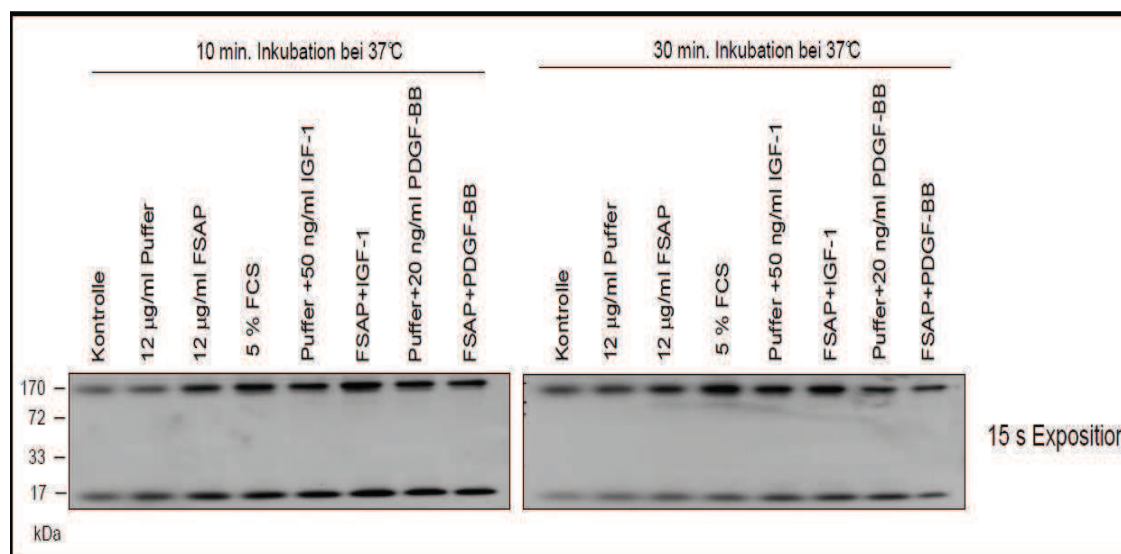


Abb. 21: Western Blot Analyse zum Nachweis einer Tyrosinphosphorylierung in BxPC3-Zellen nach FSAP-Gabe (links nach 10 und rechts nach 30 min Inkubation). Nach Vorinkubation der Grundsubstanzen für 1 h bei 37°C fand eine Inkubation für 10 min bzw. für 30 min bei 37°C nach Gabe der übrigen Substanzen statt. Ein phosphoryliertes Protein am Tyrosinrest lag bei 170 kDa und ein anderes bei 15 kDa.

4.2 In-vivo Effekt von FSAP auf die Angiogenese in einem Maus-Matrigel-Modell

4.2.1 Optimierung der Matrigelversuche

Die autokatalytische Zustandsveränderung von FSAP wird durch polyanionische Moleküle wie Heparin beschleunigt (Altincicek et al. 2006). Allerdings spielt Heparin auch eine wesentliche Rolle bei der (Neo-) Angiogenese, welcher durch zahlreiche Publikationen belegt werden konnte (Fujita et al. 1988, Quyyumi et al. 1993, Taylor & Folkman 1982). Aus diesem Grund wurden zur Optimierung der Heparindosis vorab

mehrere Matrigelversuche durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen von Wachstumsfaktoren (20 – 200 ng/ml) gewählt und mit verschiedenen Heparindosen (100, 200 und 628 $\mu\text{g/ml}$) durchgeführt. Hierbei wurden die Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF verwendet.

Bereits in-vivo nach Freilegung der subkutan liegenden Matrigelplugs zeigten die vaskularisierten Plugs makroskopisch einen Unterschied. Die mit der höchsten Heparindosis behandelten Plugs (628 $\mu\text{g/ml}$, Abb. 24) führten zu einer ausgeprägten Neoangiogenese, die mit der niedrigsten Dosis (100 $\mu\text{g/ml}$) deutlich zu einer verminderten Gefäßneubildung (Abb. 22 links und 23 oben).

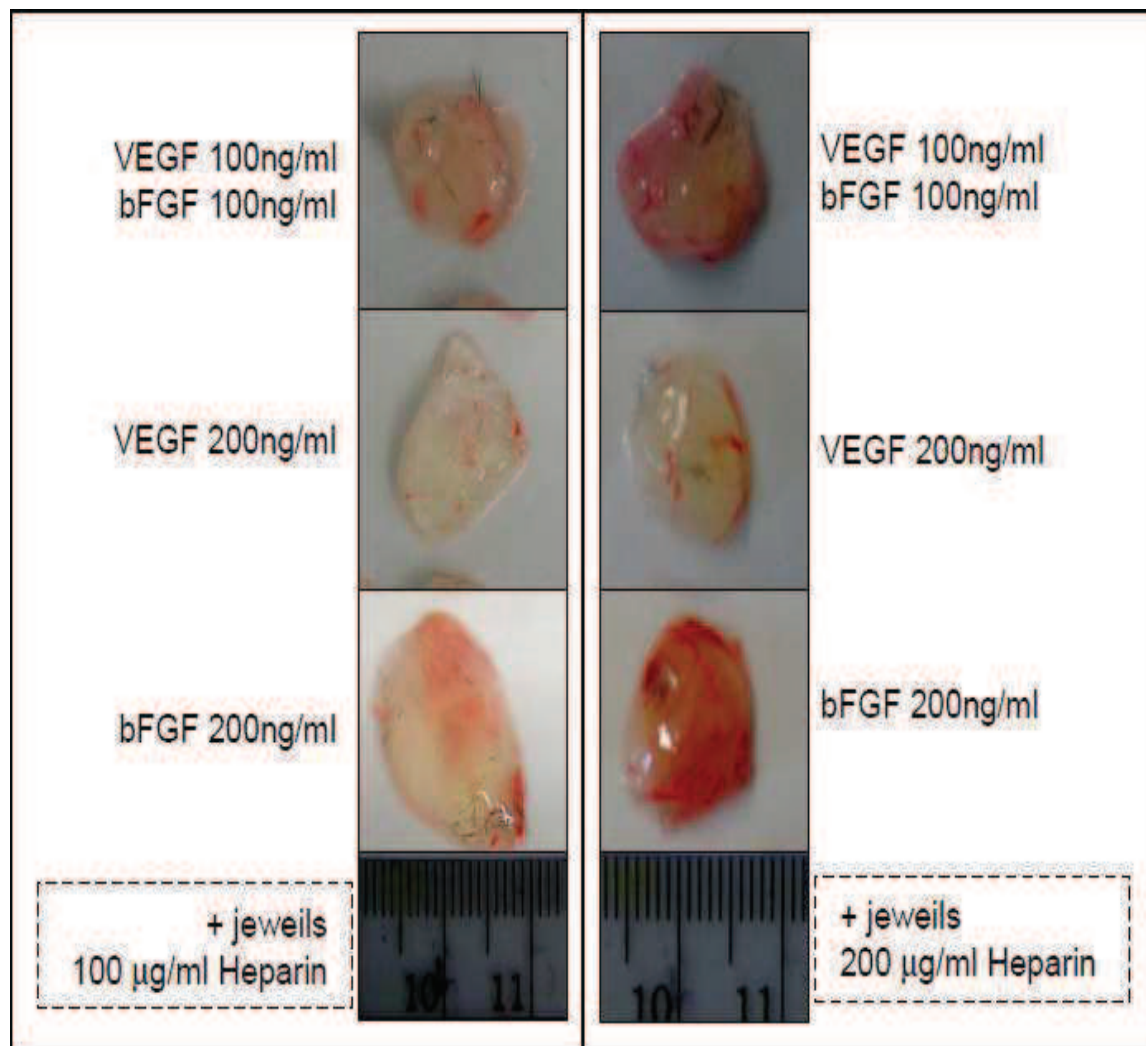


Abb. 22: Matrigelplugs nach wachstumsfaktorinduzierter Stimulation der Neoangiogenese mit jeweils 100 (links) bzw. 200 $\mu\text{g/ml}$ Heparin (rechts). In das Matrigel wurden bei kombinierter Gabe jeweils 100 ng/ml VEGF und bFGF und bei alleiniger 200 ng/ml VEGF bzw. bFGF hinzupipettiert. Die Testung erfolgte für Heparin mit einer Konzentration von 100 (links) bzw. 200 $\mu\text{g/ml}$ (rechts). Die Matrigelplugs wurden nach 7 Tagen aus der subkutanen Region komplett entfernt.

Die Heparindosis von 200 $\mu\text{g/ml}$ und 200 ng/ml Wachstumsfaktoren zeigten dabei eine adäquate Gefäßsprossung sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch (Abb. 22 rechts und 23 unten).

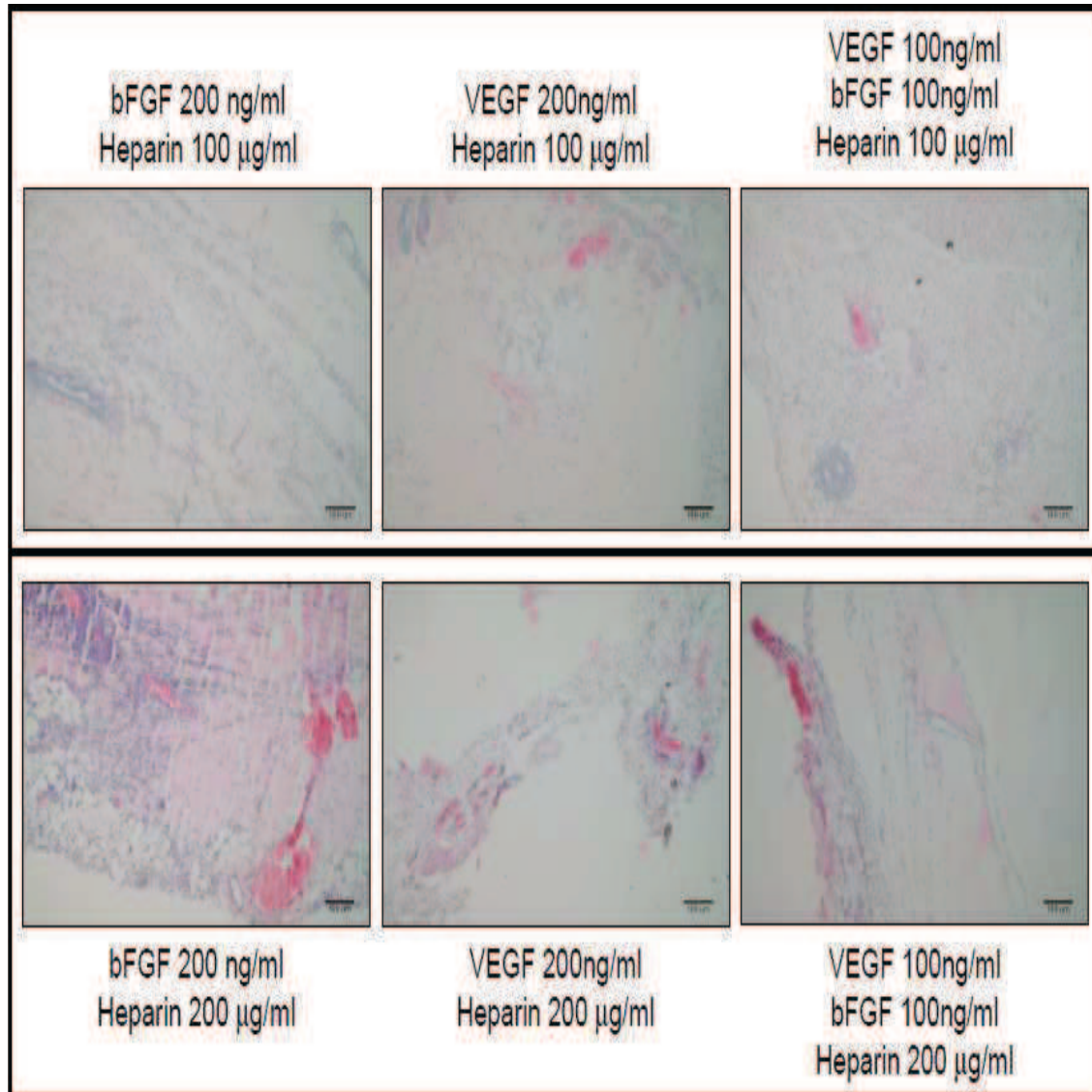


Abb. 23: H&E-Übersichtsfärbung der Matrigelplugs bei unterschiedlicher Vorbehandlung, hier zur Testung der Heparindosen von 100 und 200 $\mu\text{g/ml}$. In das Matrigel wurden bei kombinierter Gabe jeweils 100 ng/ml VEGF und bFGF und bei alleiniger 200 ng/ml VEGF bzw. bFGF hinzupipettiert. Die Testung erfolgte für Heparin mit einer Konzentration von 100 (oben) bzw. 200 $\mu\text{g/ml}$ (unten).

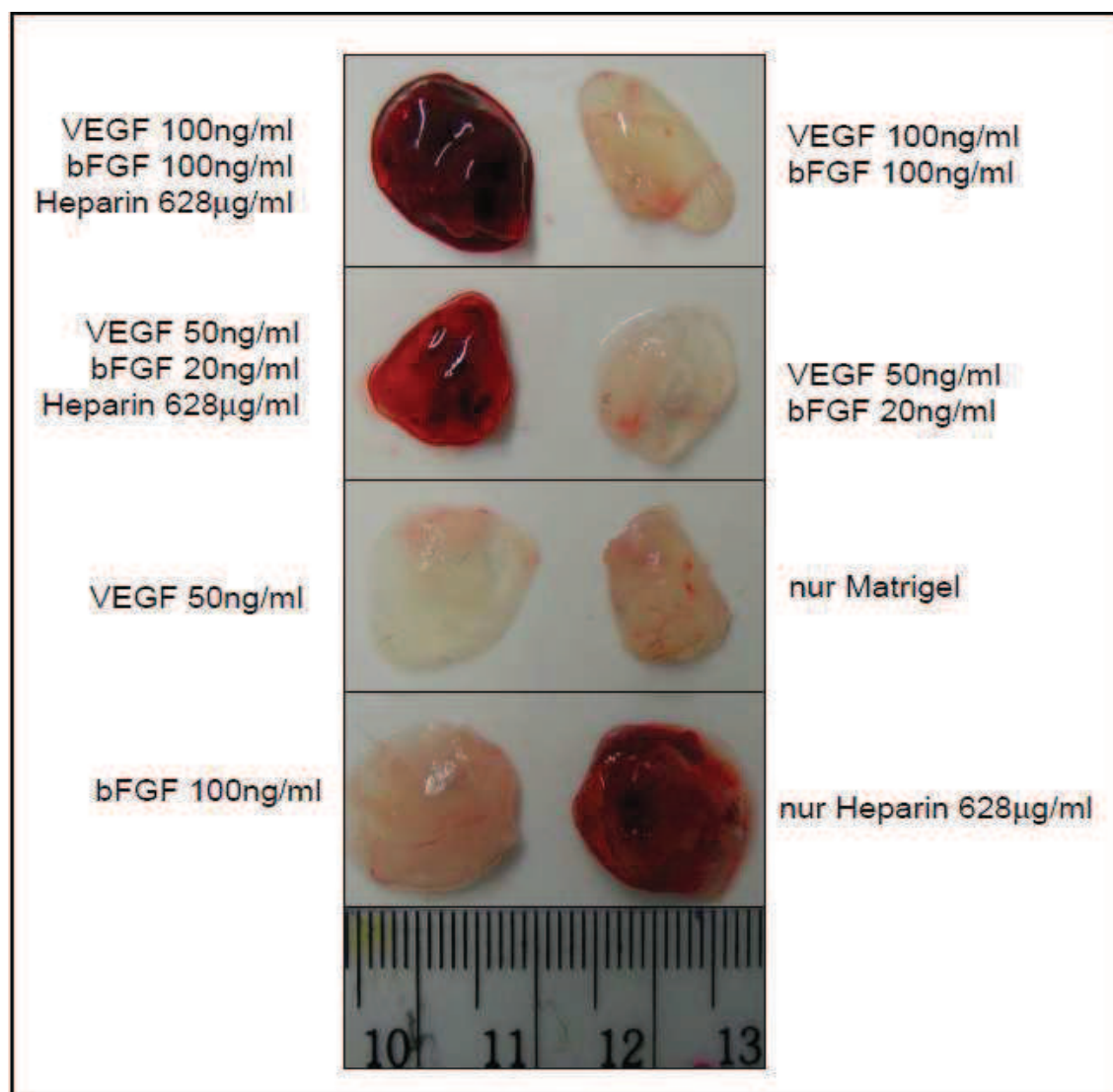


Abb. 24: Matrigelplugs mit unterschiedlicher Vorbehandlung, hier zur Testung der Heparindosis von 628 µg/ml. Es wurde die kombinierte Gabe von VEGF (100 bzw. 50 ng/ml) und bFGF (100 bzw. 20 ng/ml) mit und ohne Heparin (628 µg/ml) getestet. Daneben Gabe von nur Wachstumsfaktoren (VEGF 50 und bFGF 100 ng/ml) und Heparin (628 µg/ml) sowie Matrigel (growth factor reduced) alleine ohne Gabe irgendwelcher Substanzen.

Die kombinierte Stimulation mit den Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF (jeweils 100 ng/ml bzw. 50 und 20 ng/ml) ohne Heparin-gabe zeigte makroskopisch eine geringe Gefäßneubildung (Abb. 24), mittels H&E-Färbung und der Immunhistochemie konnte das makroskopische Ergebnis untermauert werden (Abb. 25 und 27).

Nur das Matrigel (growth factor reduced Matrigel) zeigte eine minimale Gefäßneubildung (Abb. 24, 25 und 27), wobei die alleinige Gabe von Heparin mit der höchsten Dosis von 628 µg/ml makroskopisch eine ausgeprägte „Neoangiogenese“ zeigte (Abb. 24). Dieser Effekt konnte mikroskopisch widerlegt werden, da hier keine

fassbare Neoangiogenese stattfand. Lediglich die die Migration von zahlreichen Zellen konnte beobachtet werden (Abb. 25 und 27).

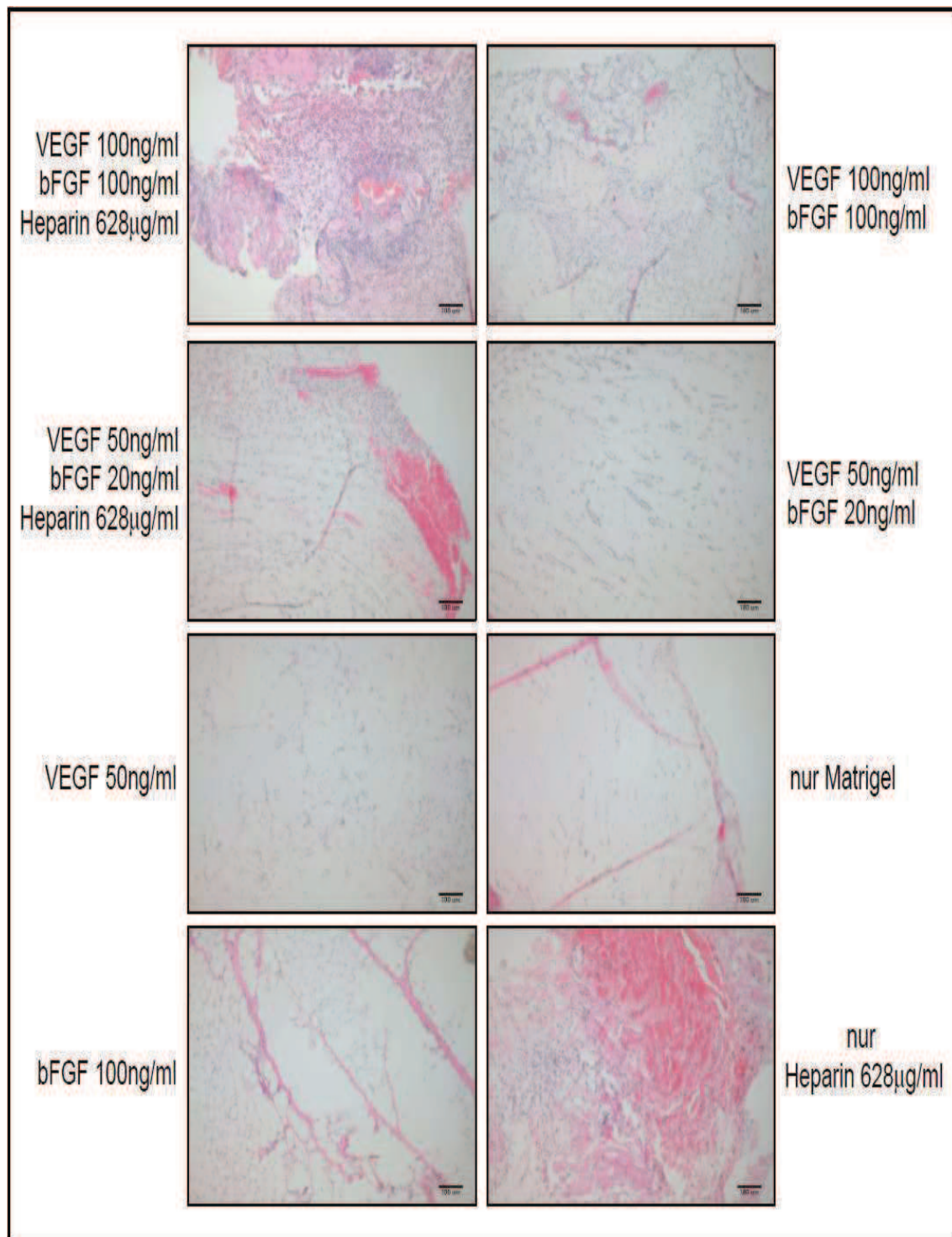


Abb. 25: H&E-Übersichtsfärbung der Matrigelplugs bei unterschiedlicher Vorbehandlung, hier zur Testung der Heparindosis von 628 $\mu\text{g/ml}$. Es wurde die kombinierte Gabe von VEGF (100 bzw. 50 ng/ml) und bFGF (100 bzw. 20 ng/ml) mit und ohne Heparin (628 $\mu\text{g/ml}$) getestet, daneben allein die Gabe von Wachstumsfaktoren (VEGF 50 und bFGF 100 ng/ml), Heparin (628 $\mu\text{g/ml}$) und Matrigel (growth factor reduced).

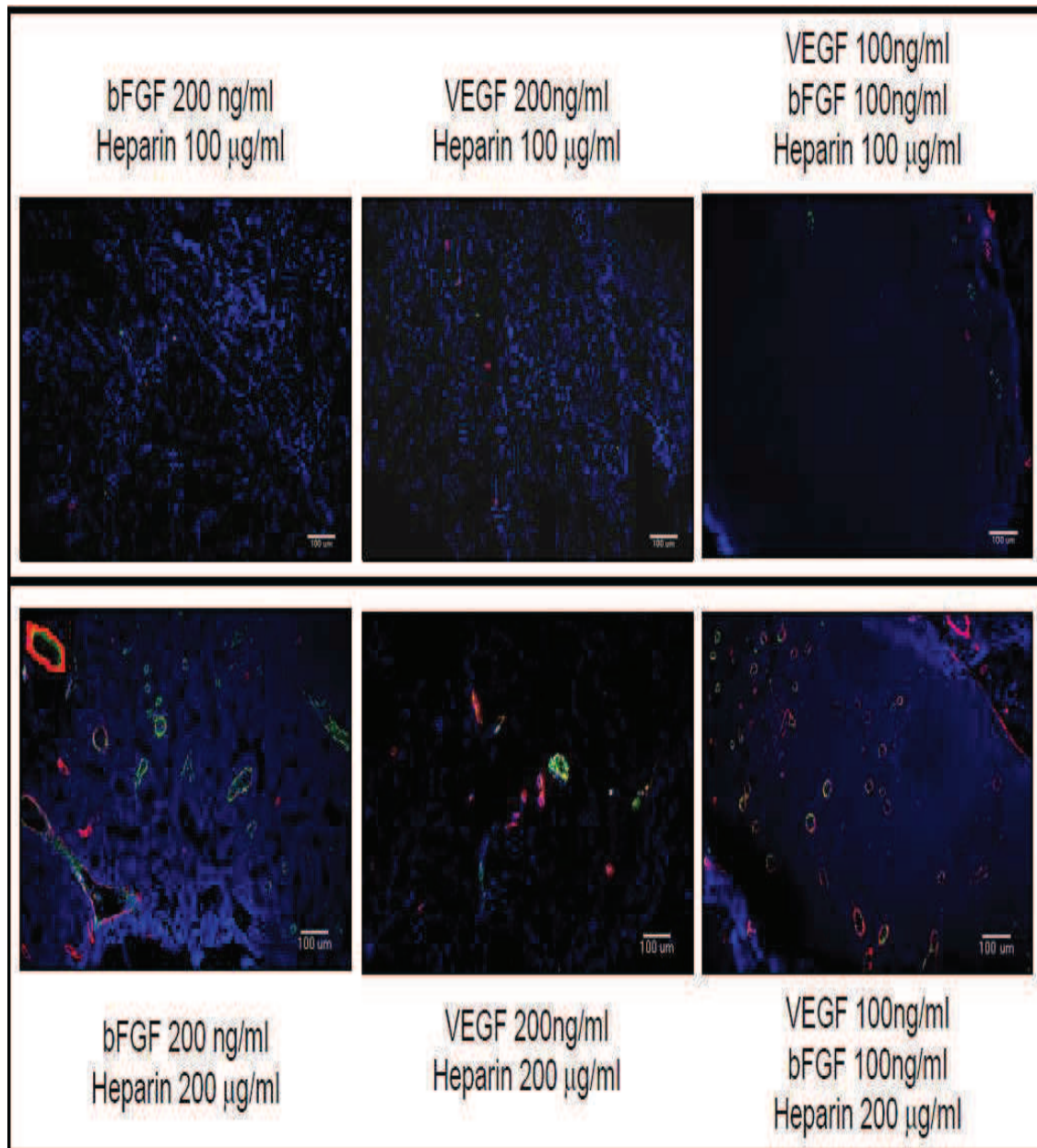


Abb. 26: Immunhistochemische Färbung der Schnitte der Matrigelplugs. Der oberen Reihe wurden 100 und der unteren 200 µg/ml Heparin zugesetzt. Durch die Überlappung von Rot- und Grünfluoreszenz erscheint eine gelbliche Fluoreszenz, was bedeutet, dass die Endothel- und glatten Muskelzellen in unmittelbarer Nachbarschaft sind. Die Überlappung von Blau- und Grünfluoreszenz führt zu einer hellblauen Färbung. DAPI/Blau = Zellkerne, grün = Bandeiraea simplicifolia-1 Lektin/ Endothelzellen und rot = α -smooth-muscle actin/ glatte Muskelzellen.

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse und Vorarbeiten durch andere Arbeitsgruppen wurden die in-vivo Versuche mit Matrigel jeweils mit 200 µg/ml Heparin durchgeführt.

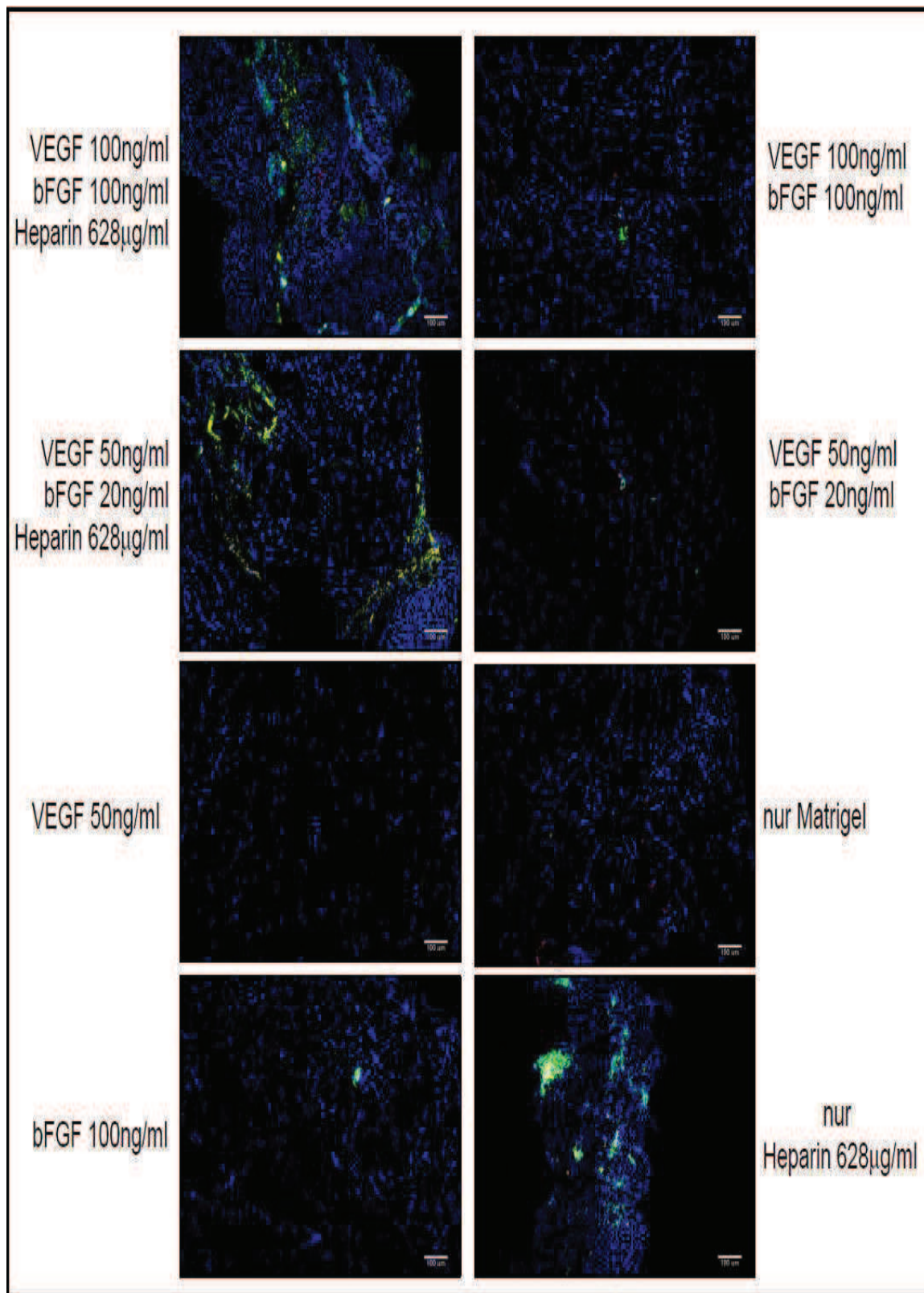


Abb. 27: Immunhistochemische Färbung der Schnitte der Matrigelplugs, Gabe von 628 µg/ml Heparin. Daneben nur Gabe von Wachstumsfaktoren, Heparin und Matrigel. Blau = Zellkerne, grün = Endothelzellen und rot = glatte Muskelzellen.

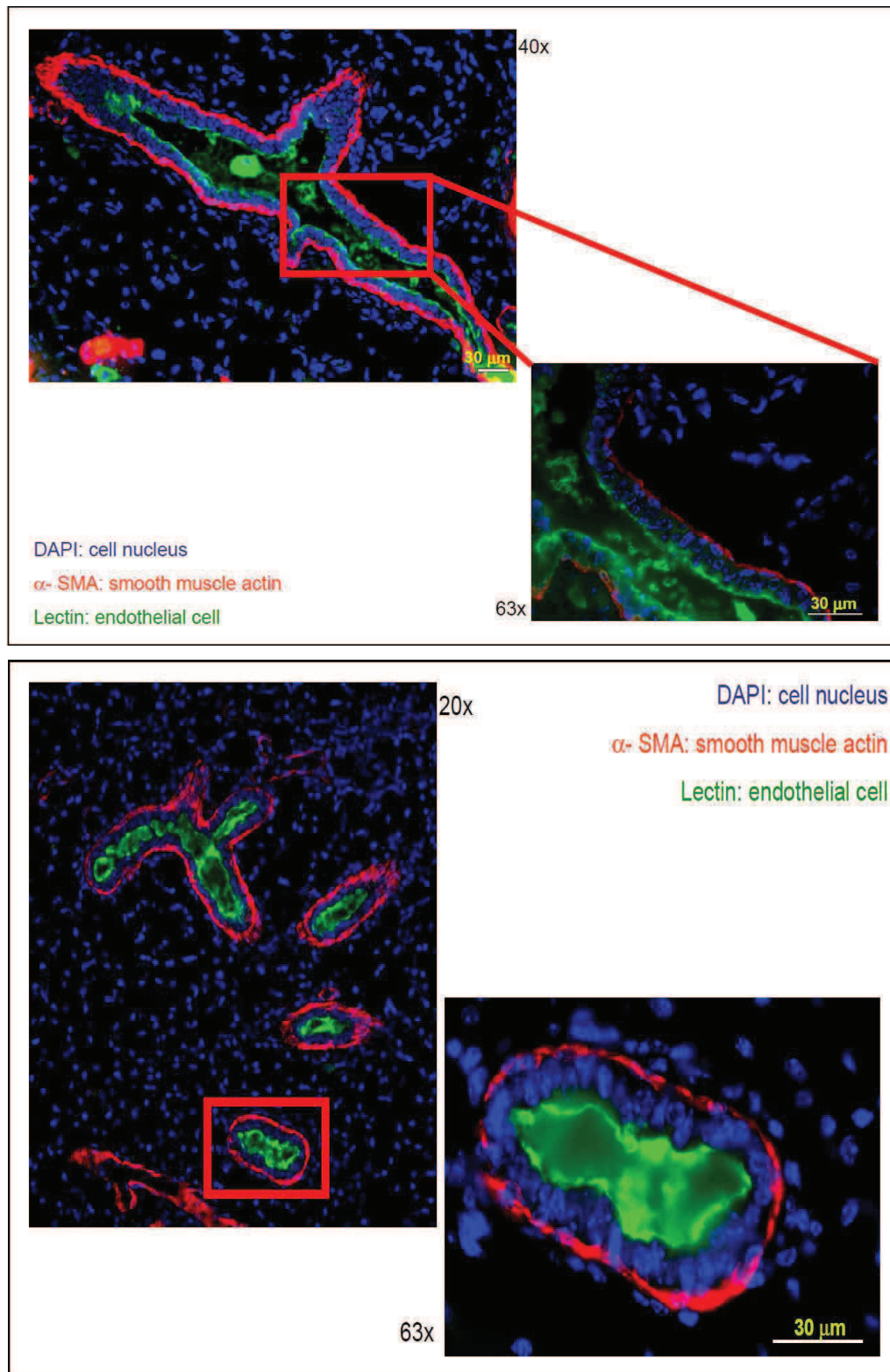


Abb. 28: Immunhistochemische Färbung mit Darstellung eines Gefäßes, welche im Rahmen der Neoangiogenese innerhalb des Matrigelplugs entstanden ist. Die 20-, 40- und 63-fache Vergrößerung werden demonstriert.

Um quantitativ und qualitativ die Neoangiogenese zu ermitteln, wurde manuell optisch die Gefäßdichte pro Quadratmillimeter bestimmt, indem vollständig

abgrenzbare Gefäße mit den Komponenten Zellkerne, Endothelzellen und glatte Muskelzellen (α -smooth muscle actin) als ein neu gebildetes Gefäß betrachtet wurden (Abb. 28). Alle Daten wurden dann ausgewertet und in einem Diagramm mit dem SEM gegenübergestellt.

4.2.2 Ausgeprägte Abnahme einzelner Gefäßkomponenten durch FSAP

Nach der Optimierung der Matrigelversuche und der Etablierung von Methoden zum Nachweis von Angiogenese wurde die Wirkung von FSAP getestet. Die Kombination von FSAP bzw. seinem Kontroll HE-Puffer, Aprotinin und Wachstumsfaktoren zeigen den Einfluss von FSAP auf die Neoangiogenese.

Für die quantitative Untersuchung hinsichtlich der antiangiogenen Wirkung von FSAP im Maus-Matrigel-Modell wurden folgende Anzahl (n) von Mäusen für jede Gruppe (FSAP vs. Kontroll-Puffer) verwendet: bFGF: n= 7, VEGF: n= 8, bFGF-VEGF: n= 8, bFGF-VEGF-PDGF-BB: n= 5, bFGF-VEGF-PPACK-FSAP: n= 8, bFGF-VEGF-Aprotinin: n= 2. Die Abb. 29 zeigt die Matrigelplugs unmittelbar nach der Entnahme aus dem subkutanen Gewebe der Mäuse.

Die Gabe von FSAP zu den Matrigelplugs führte zu einer deutlichen Reduzierung von Zellinfiltration und Strukturbildung innerhalb der Matrigelplugs. Das am aktiven Zentrum inhibierte Phe-Pro-Arg-Chloromethylketon (PPACK-) FSAP zeigte hierbei keine hemmende Wirkung auf die Gefäßneubildung. Die Kombination von Aprotinin mit dem Kontroll-Puffer sowie Wachstumsfaktoren führte zur einer deutlichen und die mit FSAP zur einer ausgeprägten, am ehesten synergistischen Hemmung der Neoangiogenese (Abb. 29).

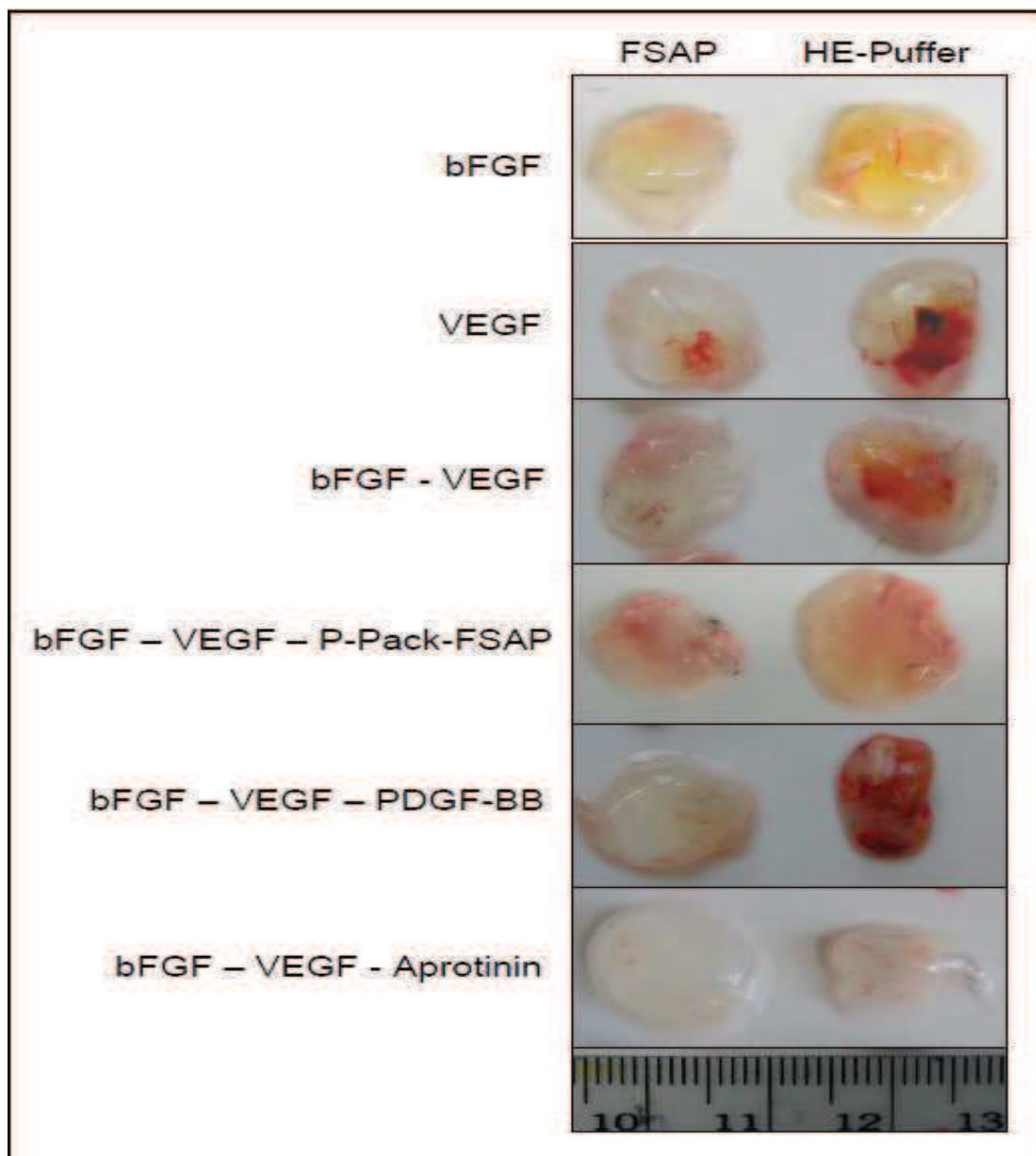


Abb. 29: Maus-Matrigel-Modell zum Nachweis des FSAP-Effektes auf die Angiogenese. Dabei wurden FSAP (12 $\mu\text{g/ml}$) und sein Kontroll-HE-Puffer (Volumenäquivalent) getestet. In jede Matrigeltube (500 μl) wurde jeweils 200 $\mu\text{g/ml}$ Heparin hineinpipettiert. Danach wurde bFGF (200 ng/ml) und VEGF (200 ng/ml) alleine, bFGF in Kombination mit VEGF (jeweils 100 ng/ml) sowie bFGF (100 ng/ml), VEGF (100 ng/ml) und PDGF-BB (50 ng/ml) zusammen dem Matrigel beigemischt. Die enzymatisch inaktive Form von FSAP (P-Pack-FSAP, 12 $\mu\text{g/ml}$) und Aprotinin (14 $\mu\text{g/ml}$) sind mitgelaufen.

Mit dem Maus-Matrigel-Modell sollte die antiangiogene Wirkung von FSAP auf die Gefäßneubildung in-vivo näher untersucht und charakterisiert werden. Die Abb. 30 zeigt die mit den Antikörpern inkubierten Matrigelschnitte. Dabei wurden die Endothelzellen mit Lektin, die glatten Muskelzellen mit anti- α -smooth muscle-Aktin und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Hierbei zeigt sich in der Gruppe mit dem Kontroll-Puffer

plus Wachstumsfaktoren bei unterschiedlichen Konzentrationen eine ausgeprägte Neoangiogenese, wobei einerseits die Gefäßmorphologie und andererseits alle Bestandteile eines Gefäßes, nämlich Zellkerne, Endothelzellen sowie glatte Muskelzellen, eindeutig identifiziert werden konnten (Abb. 30 oben rechte vertikale Reihe).

In Relation zu PPACK-FSAP, also der inaktivierten Form von FSAP, sowie der Versuchsreihe mit dem HE-Puffer zeigen die Matrigelschnitte nach einer FSAP-Gabe von 12 µg/ml auf mikroskopischer Ebene eine signifikante Reduktion der Neoangiogenese (Abb. 30 oben linke vertikale Reihe). Bei mikroskopischer Betrachtung der einzelnen Gefäßkomponenten im Vergleich mit dem Kontroll-Puffer bzw. PPACK-FSAP kamen die Differenzen deutlicher zur Darstellung. Dabei wurde die densitometrische Analyse der immunhistochemisch gefärbten Schnitte mit α -SMA, Lektin und DAPI mittels der Software Metamorph am Immunfluoreszenzmikroskop HC (Leica DMR Microsysteme Vertrieb, Wetzlar) bestimmt. Hierbei wurden die einzelnen, unterschiedlich gefärbten Schnitte durch die entsprechenden Filter betrachtet. Erst dann konnten die fluoreszierenden Antikörper mittels der Software erkannt und quantitativ ermittelt und dokumentiert werden. Das Ergebnis wurde dann prozentual zur Gesamtfläche angegeben.

Das wachstumsreduzierte Matrigel zeigte kaum eine Angiogenese (Abb. 30 rechts unten).

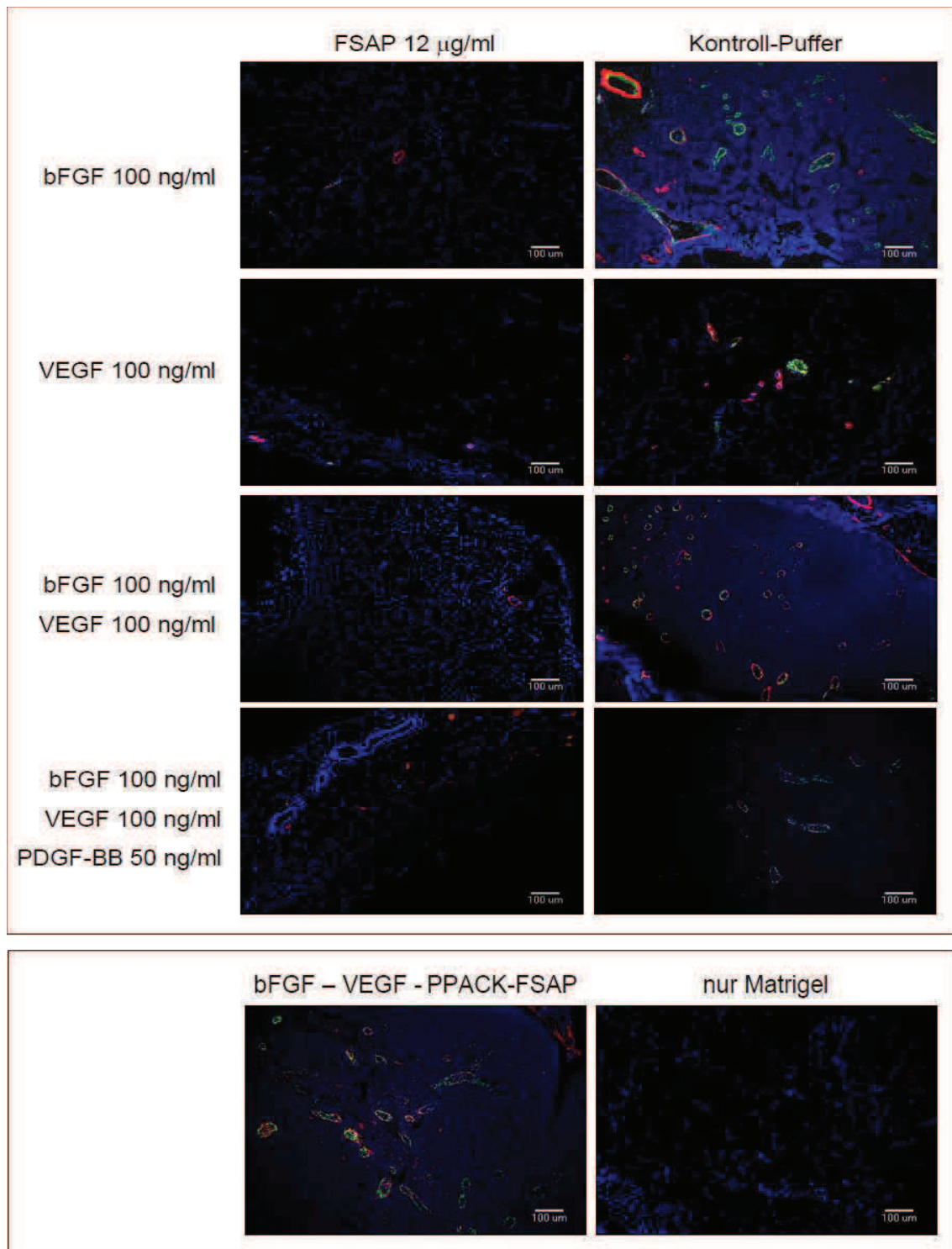


Abb. 30: Immunhistochemische Färbung der Matrigelschnitte bei der Wildtyp-Maus zur Analyse des FSAP-Effektes auf die Angiogenese. Gabe von verschiedenen Wachstumsfaktoren (bFGF, VEGF und PDGF-BB) mit unterschiedlichen Konzentrationen (50 – 200 ng/ml). Die enzymatisch inaktive FSAP (P-Pack-FSAP, 12 $\mu\text{g/ml}$) sowie das Matrigel alleine wurden mitgetestet. Blau = Zellkerne, grün = Endothelzellen und rot = glatte Muskelzellen.

Dabei stellte sich heraus, dass die glatten Muskelzellen nach FSAP-Gabe in Korrelation mit dem HE-Puffer eine signifikante Reduktion zeigten (Abb. 31, $p < 0.05$). Im Einzelnen betrachtet, zeigte sich nach VEGF-Stimulation eine geringe und nach bFGF- bzw. in Kombination der Wachstumsfaktoren bFGF-VEGF eine relevante Reduktion der glatten Muskelzellen. Die Kombination der drei Wachstumsfaktoren, bFGF, VEGF und PDGF-BB, führte einerseits zur deutlich vermehrten Bildung der glatten Muskelzellen, andererseits zeigte hier FSAP im Gegenzug auch eine umso stärkere, hoch signifikante Abnahme der Dichte (Abb. 31, $p < 0.01$).

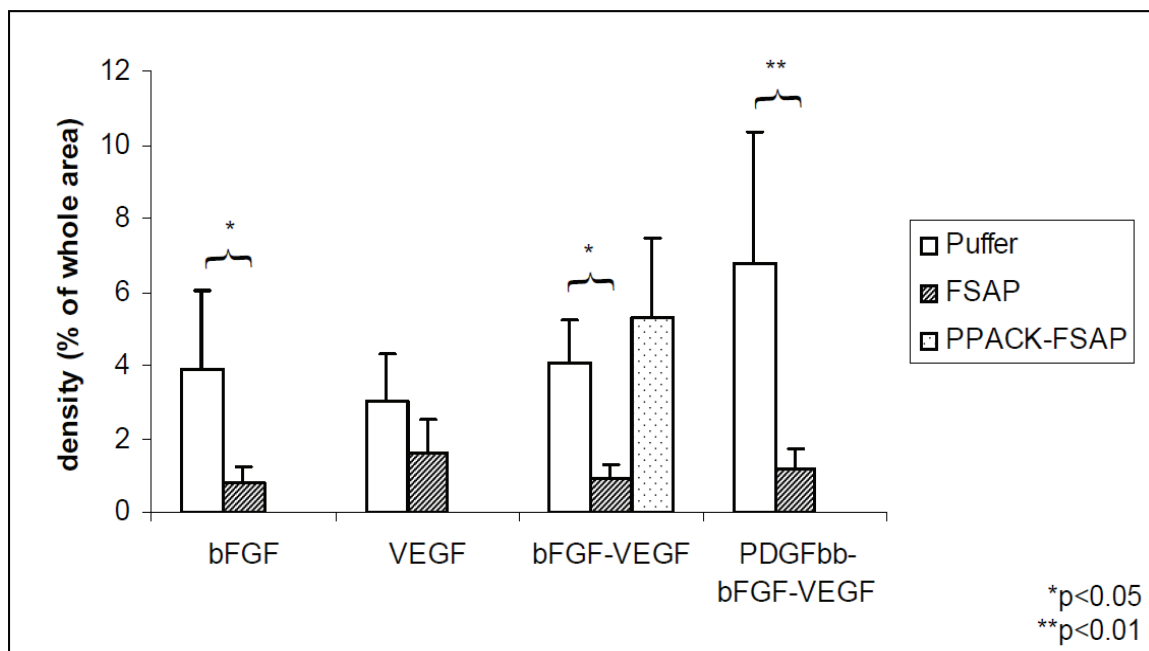


Abb. 31: Prozentuale Dichte der glatten Muskelzellen nach unterschiedlicher Behandlung bei Wildtyp-Mäusen. Nach Gabe von FSAP, seinem Kontroll-Puffer und der inaktiven Form des FSAP (PPACK-FSAP) in Kombination mit verschiedenen Wachstumsfaktoren kommt hier die prozentuale Dichte der glatten Muskelzellen in den Matrigelschnitten zur Darstellung. Auf der x-Achse befinden sich die unterschiedlichen Wachstumsfaktoren (bFGF, VEGF und PDGF-BB) und auf der y-Achse die prozentuale Dichte der glatten Muskelzellen. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM (standard error of mean). bFGF $n = 7$, VEGF $n = 8$, bFGF-VEGF $n = 8$, bFGF-VEGF-PPACK-FSAP $n = 8$ und bFGF-VEGF-PDGF-BB $n = 5$.

Auch die prozentuale Dichte der Endothelzellen zeigten nach FSAP-Gabe eine signifikante Reduktion in der Versuchsreihe VEGF sowie in der kombinierten Stimulation der Neoangiogenese durch bFGF und VEGF (Abb. 32, $p < 0.05$). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Dreifach-Stimulation durch bFGF, VEGF und PDGF-BB zur Gefäßneubildung durch die FSAP-Gabe eine hoch signifikante Abnahme der Endothelzellen zur Folge hat (Abb. 32, $p < 0.01$).

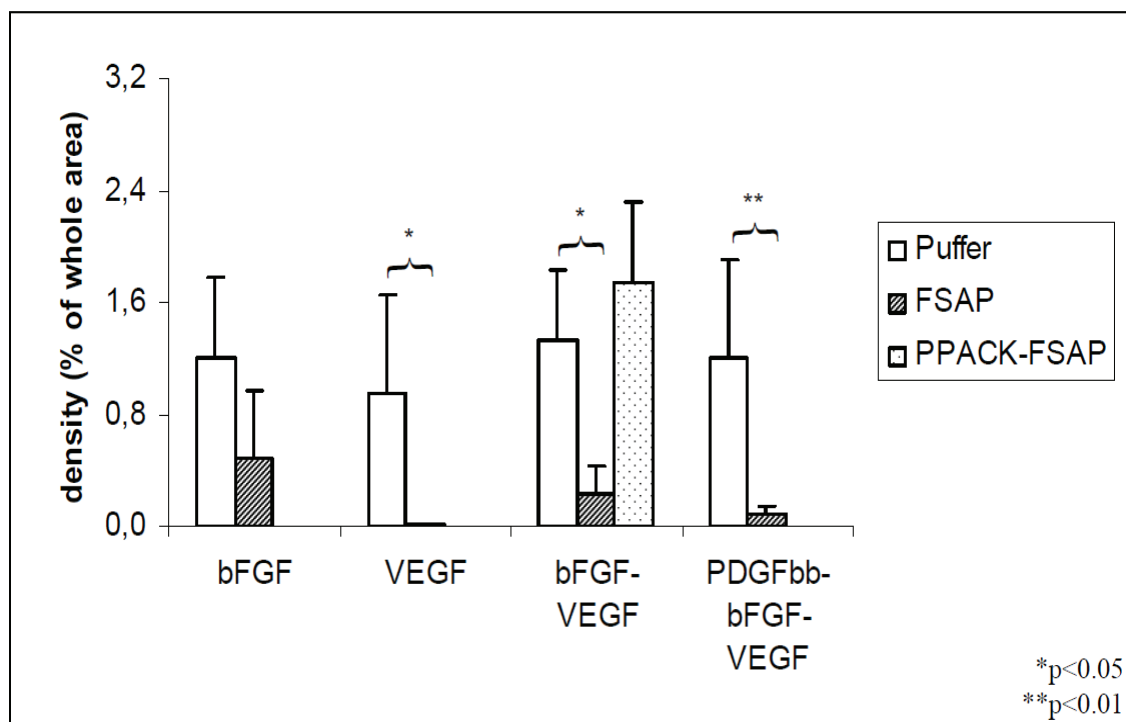


Abb. 32: Prozentuale Dichte der Endothelzellen nach unterschiedlicher Behandlung bei Wildtyp-Mäusen. Quantitative Gegenüberstellung der Endothelzellen nach Behandlung des Matrigels mit FSAP versus Kontroll-Puffer bzw. PPACK-FSAP. Auf der x-Achse befinden sich die unterschiedlichen Wachstumsfaktoren (bFGF, VEGF und PDGF-BB) und auf der y-Achse prozentuale Dichte der Endothelzellen. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM. bFGF n= 7, VEGF n= 8, bFGF-VEGF n= 8, bFGF-VEGF-PPACK-FSAP n= 8 und bFGF-VEGF-PDGF-BB n= 5.

Nur die Zellkerne in der Versuchsreihe bFGF, VEGF und PDGF-BB zeigten eine signifikante Reduktion der prozentualen Dichte nach FSAP-Gabe (Abb. 33, $p < 0.05$).

Die alleinige Gabe von bFGF bzw. VEGF sowie die kombinierte Gabe bFGF und VEGF führten zu keinen relevanten Veränderungen der prozentualen Dichte der Zellkerne.

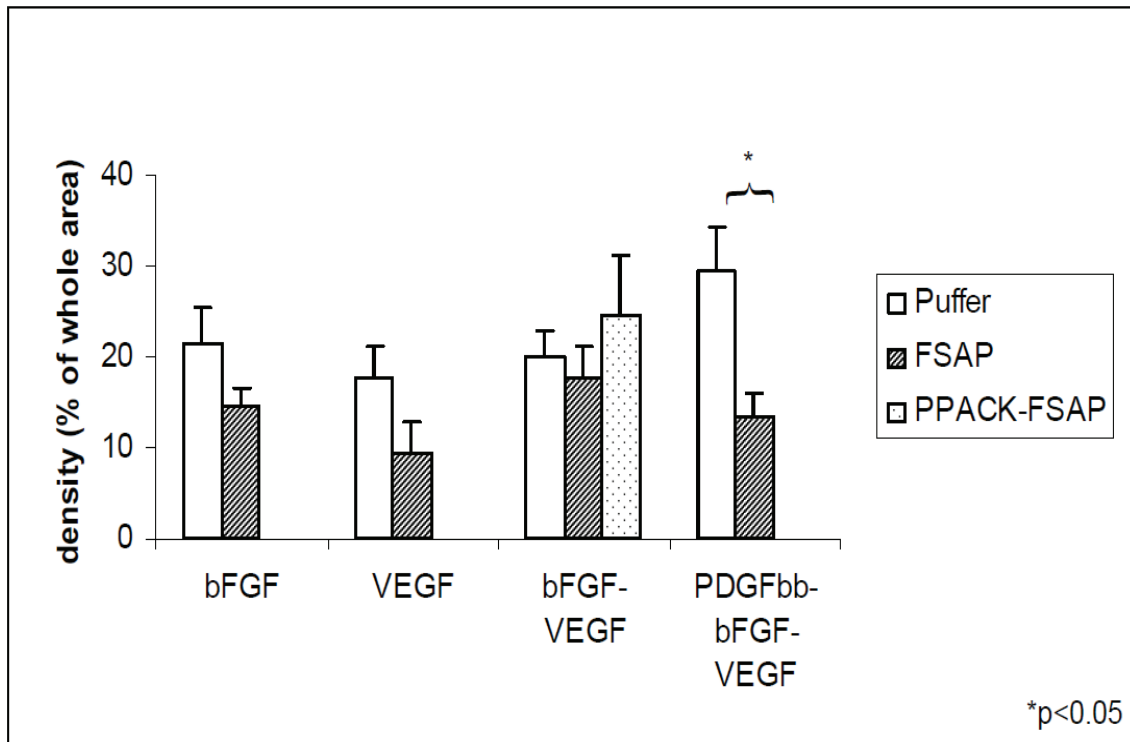


Abb. 33: Prozentuale Dichte der Zellkerne nach unterschiedlicher Behandlung bei Wildtyp-Mäusen. Die Gabe von Wachstumsfaktoren (bFGF, VEGF sowie PDGF-BB, y-Achse) mit und ohne FSAP im Rahmen der Angiogenese wird hier anhand der Dichte der Zellkerne (x-Achse) dargestellt. Die enzymatisch inaktive Form (PPACK-FSAP) wurde mit untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM. bFGF n= 7, VEGF n= 8, bFGF-VEGF n= 8, bFGF-VEGF-PDGF-BB n= 5 und bFGF-VEGF-PPACK-FSAP n= 8.

4.2.3 Signifikante Reduktion der mikrovaskulären Dichte durch FSAP im WT-Maus

Nachdem die einzelnen Gefäßkomponenten nach der FSAP-Behandlung betrachtet wurden und diese insgesamt eine deutliche Reduktion zeigten, sollte die mikrovaskuläre Dichte einerseits einen Gesamteindruck über die Neoangiogenese in Relation zu dem Kontroll-Puffer und andererseits die angiogene Wirkung der einzelnen Wachstumsfaktoren im Zusammenspiel mit FSAP verdeutlichen. Wie in Kap. 3.6.7 erklärt, wurde die mikrovaskuläre Dichte optisch manuell bestimmt. Hierbei wurden die Gefäße gezählt und in Relation zu ihrer Gesamtfläche gesetzt.

Das Maus-Matrigel-Modell verdeutlichte, dass die Wachstumsfaktoren eine unterschiedlich stimulierende Wirkung auf die Gefäßneubildung haben. Dabei führten die kombinierte Gabe von bFGF, VEGF und PDGF-BB sowie die alleinige Gabe von bFGF einerseits zur einer ausgeprägten Zunahme der mikrovaskulären Dichte, andererseits zeigte FSAP eine hoch bis höchst signifikante Abnahme der

mikrovaskulären Dichte (Abb. 34). Sowohl bei alleiniger Stimulation der Neoangiogenese mit VEGF oder in Kombination mit bFGF reduzierte FSAP hoch signifikant die Gefäßdichte. Die enzymatisch inaktive FSAP (PPACK-FSAP) zeigte diesen Effekt nicht. Eine höchstsignifikante Reduktion der mikrovaskulären Dichte erreichte FSAP in der Versuchsreihe PDGFBB, bFGF und VEGF.

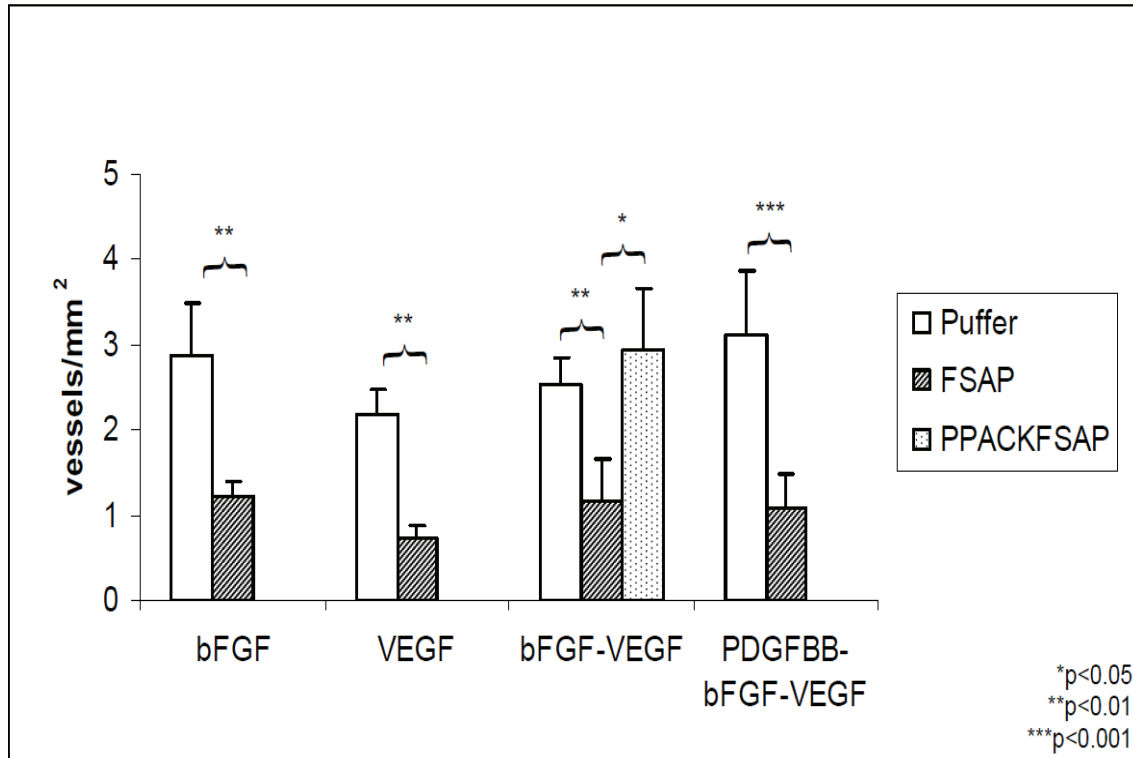


Abb. 34: Mikrovaskuläre Dichte innerhalb der Matrigelplugs nach Behandlung mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren (x-Achse: bFGF, VEGF und PDGF-BB) sowie mit und ohne FSAP. Die y-Achse zeigt die mikrovaskuläre Dichte im Rahmen der Angiogenese. PPACK-FSAP (enzymatisch inaktives FSAP) ist mitgelaufen. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM. bFGF n= 7, VEGF n= 8, bFGF-VEGF n= 8, bFGF-VEGF-PPACK-FSAP n= 8 und bFGF-VEGF-PDGF-BB n= 5.

4.3 In-vivo Effekt von FSAP auf die Angiogenese beim uPA- und uPAR-Knockout Maus

Da FSAP in der Lage ist, die pro-Urokinase zu aktivieren (Romisch et al. 1999b), sollte durch gezielte Ausschaltung der uPA sowie seines Rezeptors, uPAR, ein Knockout-Tiermodell verdeutlichen, in welchem Zusammenhang diese beiden Faktoren für die Angiogenese bzw. Neoangiogenese eine Rolle spielen. Einen Einfluss auf die Angiogenese von uPA und uPAR wurde bereits gezeigt (Raghu et al. 2010). Der

Verdacht liegt nahe, dass sich die Wirkung von FSAP über Urokinase bzw. über seinen Rezeptor entfaltet.

Die Matrigelplugs waren identisch wie bei den vorherigen Versuchen subkutan eingesetzt und danach bearbeitet worden. Lediglich wurde zur immunhistochemischen Färbung der Endothelzellen polyclonal rabbit α - human vWF (1:100) verwendet, da die Färbung mit Lektin unzureichend, schwach kontrastiert und nicht sicher messbare Ergebnisse lieferte. Die Färbung der glatten Muskelzellen (α -SMA, 1:200, Cy3 konjugiert) sowie der Zellkerne (DAPI) änderte sich nicht. Aufgrund der bekannten Ergebnisse bezüglich der Beteiligung von uPA und uPAR bei der Gefäßbildung wurde die doppelte Konzentration von bFGF (400 ng/ml), von VEGF (400 ng/ml) und bei Kombination bFGF-VEGF (200 ng/ml-200 ng/ml) zur Stimulierung der Neoangiogenese verabreicht.

Folgende Anzahl (n) von Knockout-Mäusen wurden jeweils für die uPA- bzw. für die uPAR-Gruppe (FSAP vs. Kontroll-Puffer) verwendet: bFGF: n= 3, VEGF: n= 3 und bFGF-VEGF: n= 2.

4.3.1 Abnahme der Gefäßdichte nach FSAP-Behandlung beim uPA^{-/-}-Mäusen

In den immunhistochemisch gefärbten Schnitten der uPA^{-/-}-Mäuse kam es insgesamt im Vergleich mit der WT-Gruppe zur einer reduzierten Neoangiogenese innerhalb der Matrigelschnitte, obwohl die doppelte Konzentration an Wachstumsfaktoren verabreicht wurde. Dabei konnten die einzelnen Gefäßkomponenten Zellkerne, Endothelzellen und glatte Muskelzellen teilweise nicht in Gänze abgegrenzt werden. Obwohl die Zellkerne eine Gefäßformation zeigten, fehlten entweder die Endothelzellen, die glatten Muskelzellen oder beide Komponenten. Somit wurde die Information zur Gefäßneubildung zwar weitergetragen, diese zeigte sich primär in der morphologischen Formation, sekundär bei der Bildung von glatten Muskelzellen und Endothelzellen, bis ein vollkommenes, in sich geschlossenes „Rohrsystem“, die Blutleiter, entsteht (Abb. 35 oben). Das legt nahe, dass die Gefäßbildung u.a. mit dem Vorhandensein von uPA als „Mitgestalter“ angesehen werden muss.

Daneben fiel auf, dass die alleinige Gabe von VEGF zu einer höheren mikrovaskulären Dichte führte als bFGF allein oder die Kombinationsgabe bFGF mit VEGF (Abb. 35 unten). Der Verdacht liegt nahe, dass VEGF teilweise über einen anderen Mechanismus zur Angiogenese beiträgt.

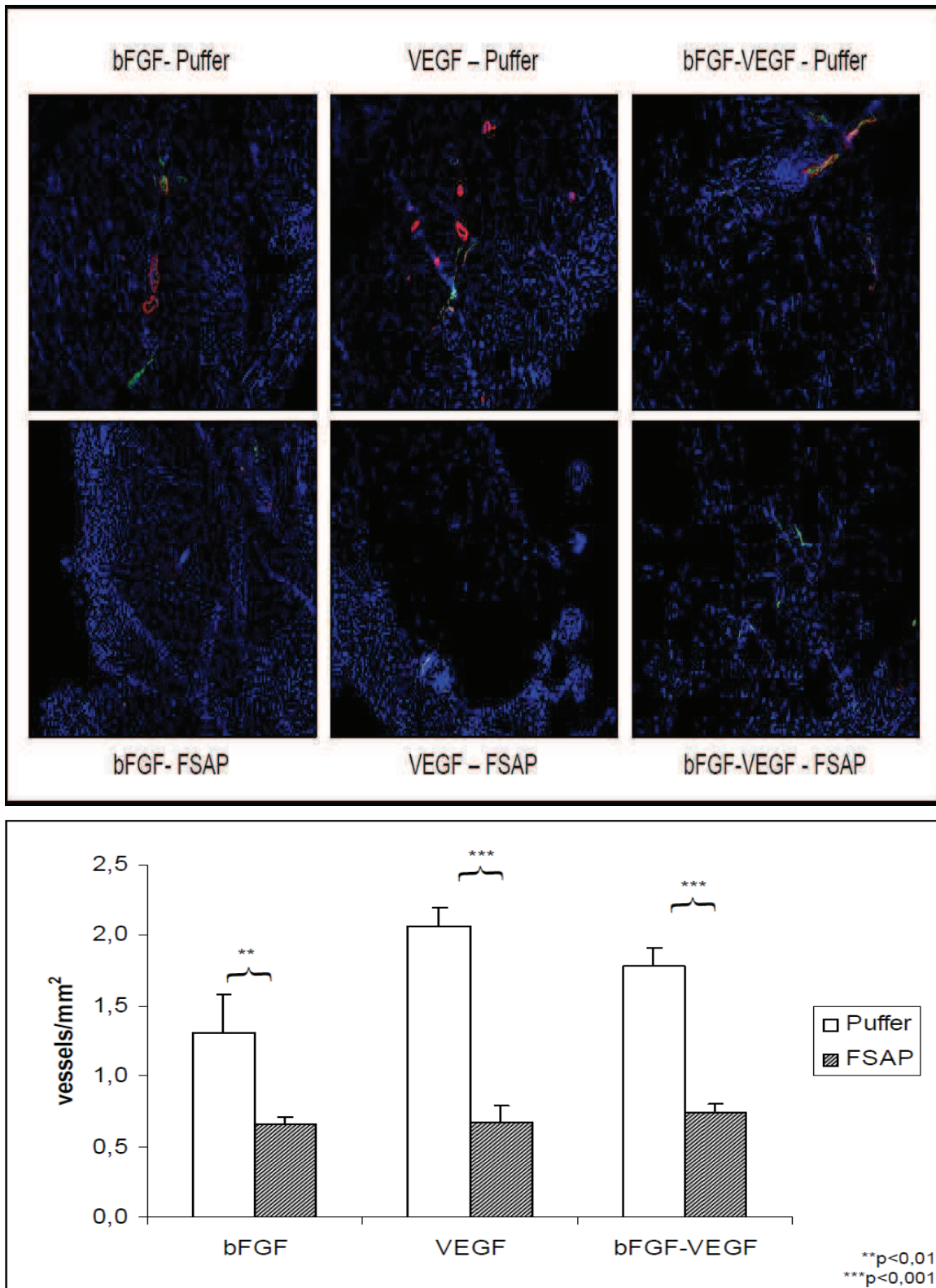


Abb. 35: Immunhistochemische Färbung (oben) sowie mikrovaskuläre Dichte (unten) der Matrigelschnitte bei $uPA^{-/-}$ -Mäusen nach unterschiedlicher Gabe von Wachstumsfaktoren sowie FSAP (12 $\mu\text{g/ml}$) und seinem Kontroll-Puffer. Die verabreichte Konzentration der Wachstumsfaktoren in das Matrigel beträgt bei alleiniger Gabe bei bFGF und VEGF 400 ng/ml und bei kombinierter (bFGF-VEGF) jeweils 200 ng/ml. Die untere Abbildung zeigt die mikrovaskuläre Dichte nach FSAP-Behandlung in Relation zu seinem Puffer. Blau = Zellkerne,

grün = Endothelzellen und rot = glatte Muskelzellen. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM (bFGF n= 3, VEGF n= 3 und bFGF-VEGF n= 2).

Die mit Wachstumsfaktoren stimulierten Matrigelschnitte unter Kontroll-Puffer Gabe führten in den uPA-Knockout Mäusen zwar vermindert, aber noch deutlich abgrenzbar zur Neoangiogenese. Im Vergleich mit der FSAP-Gruppe konnten allerdings erneut deutliche Differenzen bezüglich der mikrovaskulären Dichte nachgewiesen werden. Dabei zeigte die mikrovaskuläre Dichte in allen Behandlungsgruppen mit bFGF, VEGF oder der Kombination bFGF-VEGF eine hoch bis höchst signifikante Reduktion (Abb. 35 unten). Dies äußerte sich besonders nach VEGF und nach bFGF-VEGF Behandlung.

4.3.2 Abnahme der Gefäßdichte nach FSAP-Behandlung bei uPAR^{-/-}-Mäusen

Bei den uPAR-Knockout Mäusen stellte sich im Vergleich mit den uPA-Knockout Mäusen heraus, dass die Gefäßmorphologie an sich mit Darstellung der Gefäßkomponenten Zellkerne, Endothelzellen und glatten Muskelzellen mikroskopisch-anatomisch regelrechter abgrenzbar waren. Hier ließen sich mehrere, eindeutig identifizierbare Gefäße nachweisen.

Daneben zeigte sich im Vergleich mit der uPA-Knockout Maus in Relation mit den anderen Behandlungen eine vermehrte Gefäßbildung nach bFGF (Abb. 36 unten).

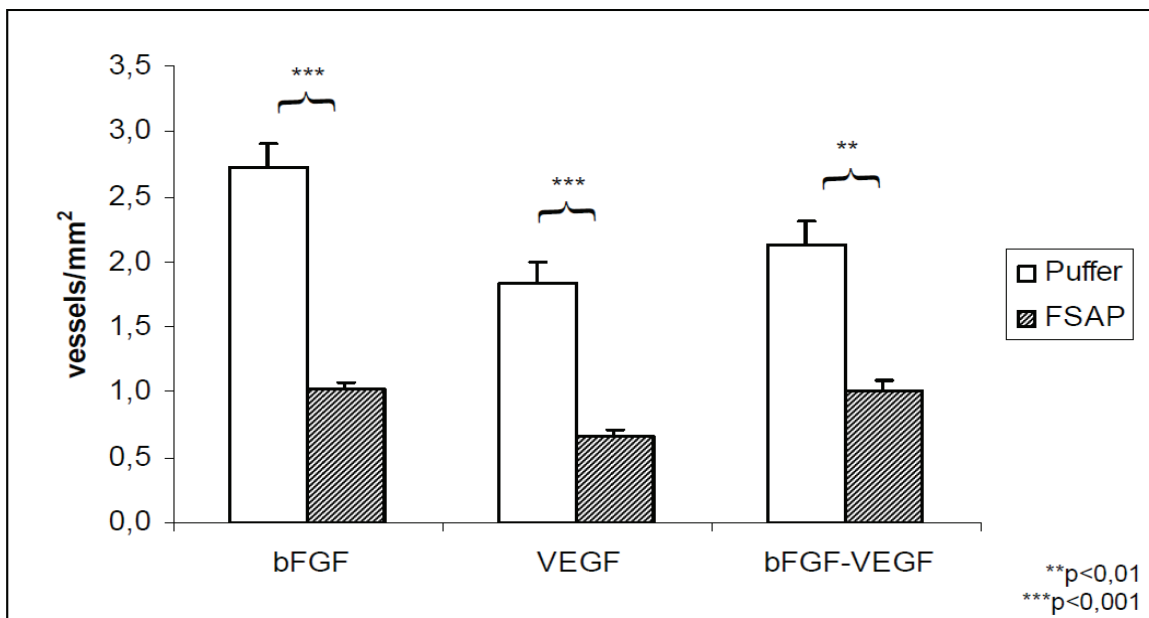
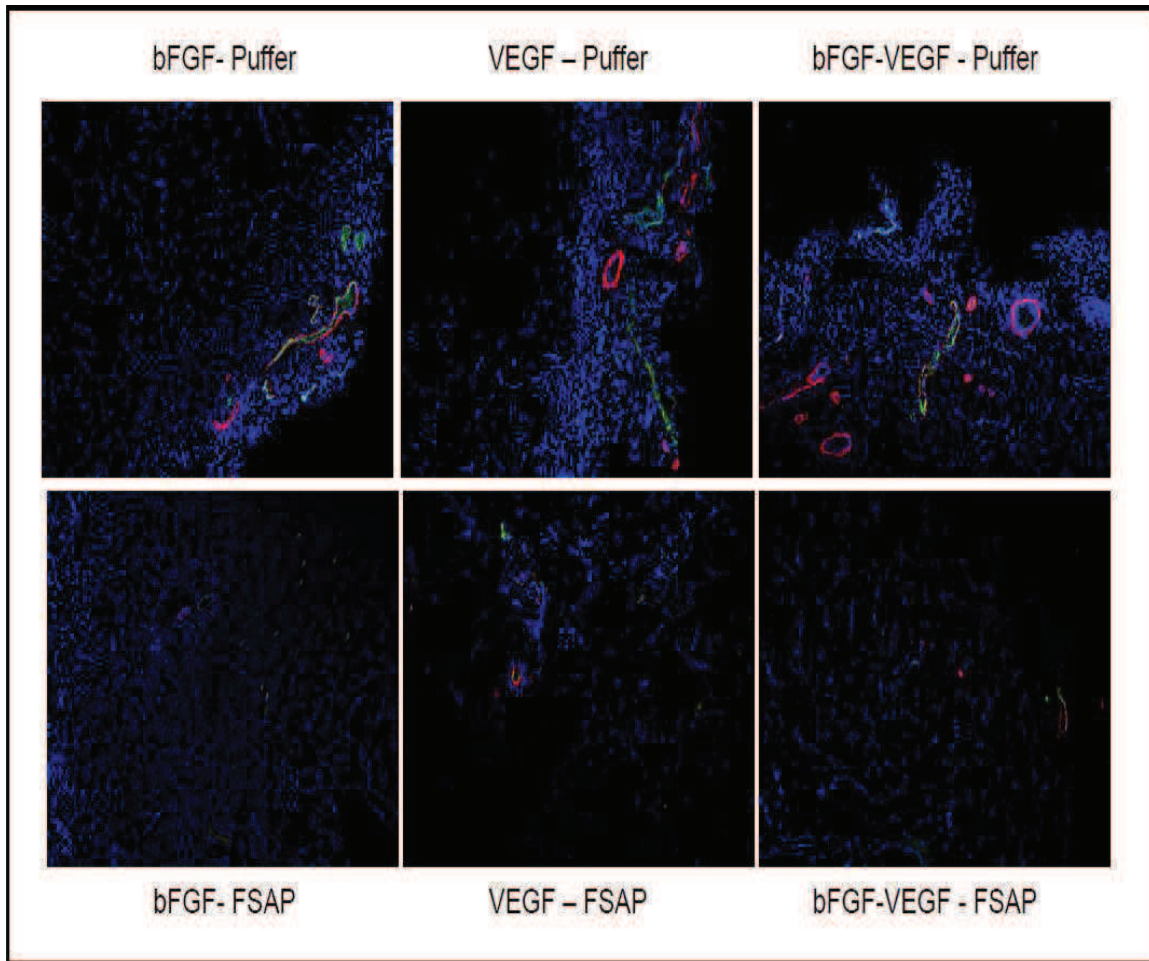


Abb. 36: Immunhistochemische Färbung (oben) und mikrovaskuläre Dichte (unten) der Matrigelschnitte bei $uPAR^{-/-}$ -Mäusen nach unterschiedlicher Gabe von Wachstumsfaktoren sowie FSAP (12 $\mu\text{g/ml}$) und seinem Kontroll-Puffer. Es erfolgte sowohl die alleinige Gabe von bFGF bzw. VEGF bei einer Konzentration von jeweils 400 ng/ml als auch die Kombination (bFGF-VEGF) bei Halbierung der Konzentration (jeweils 200 ng/ml). Die mikrovaskuläre Dichte

nach FSAP-Behandlung bzw. seinem Puffer wurde quantitativ ausgewertet. Blau = Zellkerne, grün = Endothelzellen und rot = glatte Muskelzellen. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM (bFGF n= 3, VEGF n= 3 und bFGF-VEGF n= 2).

Die Bestimmung der mikrovaskulären Dichte zeigte auch hier eine Reduktion nach FSAP-Behandlung in Relation zu seinem Kontroll-Puffer. Hier ließen sich hoch bis höchst signifikante Ergebnisse bezüglich der Gefäßdichte nachweisen (Abb. 36 unten).

Insgesamt neigten die Knockout-Mäuse ohne FSAP-Behandlung zu einer deutlich verminderten Gefäßneubildung, wobei FSAP sowohl in der WT-Gruppe als auch in der Knockout-Gruppe inhibierend auf die Neoangiogenese wirkte.

5 Diskussion

Aus der Tatsache, dass FSAP einerseits im Rahmen der Hämostase sowie der Fibrinolyse (Kannemeier et al. 2001, Romisch 2002) und andererseits bei der Zellproliferation sowie –migration (Kannemeier et al. 2004) seine steuernden Funktionen gezeigt hat, ergeben sich weitere Fragen und somit Untersuchungen zur Angiogenese. Die Arbeiten von Sedding (Sedding et al. 2006b), Kanse (Kanse et al. 2008) und Parahuleva et al. (Parahuleva et al. 2008) demonstrieren die unmittelbare Interaktion von FSAP mit dem kardiovaskulären System. Dabei wurden inhibitorische Funktionen von FSAP auf die PDGF im Rahmen der Atherosklerose herausgearbeitet. Weitere in-vitro Ergebnisse zeigten zudem, dass FSAP die Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF hemmt (Etscheid et al. 2004a, Jeon et al. 2006).

Mit der vorliegenden Arbeit sollten zum einen der in-vitro Effekt von FSAP auf die pankreatischen Tumorzellen (BxPC3) und zum anderen in-vivo die antiangiogene Wirkung in einem Maus-Matrigel-Modell näher untersucht und charakterisiert werden.

5.1 In-vitro Effekte von FSAP auf pankreatische Tumorzellen

Die perizelluläre Proteolyse durch das uPA- und MMP-System ist sowohl für die physiologische als auch für die pathologische Angiogenese einer der wichtigsten Aspekte. Bei der Tumorangiogenese können anhand der Aktivierung dieser Systeme prognostische Faktoren errechnet werden. Dabei zeigten die Vorarbeiten, dass hohe Konzentrationen der uPA- und MMP-Systeme und deren Inhibitoren entweder mit einer starken lokalen Invasivität bzw. Aggressivität oder einer hohen Rate an Metastasen einhergingen (Duffy 2004, Mohanam et al. 1995). Somit ist die Interaktion zwischen den Matrixmetalloproteasen und dem Plasminogen-Aktivator System während der tumorassoziierten Neovaskularisation hinsichtlich Remodeling der extrazellulären Matrix ein wichtiger Aspekt. Sie führen zu einer proteolytischen Zerstörung des Zytoskeletts und der Basalmembran, konsekutiv sind sowohl die Zellverbände als auch die extrazelluläre Matrix aufgelockert. Durch diese „Vorarbeit“ kann die Anastomose zwischen Tumor und bereits existierenden Kapillaren stattfinden. Die Arbeiten von Foekens et al. beschrieben sogar die vom uPA-System abhängige Prognose bei Mammakarzinom-Patientinnen (Foekens et al. 2000), dass die gesteigerte Aktivität des uPA-Systems mit einem schlechten Outcome einherging. Das uPA-System wird heutzutage als einen prognostischen Faktor betrachtet.

Da FSAP pro-uPA aktiviert, haben wir die Hypothese erstellt, dass FSAP die Aktivität und Expression von Mitgliedern der Plasminogen und MMP-Systemen beeinflussen könnte. Als Testsystem haben wir BxPC3-Zellen genommen. Diese fungieren häufig als Modellsystem. Die BxPC3-Zellen stammten aus einem humanen Adenokarzinom des Pankreas. Die zunehmende Konzentration von FSAP führte zu einer Zunahme der uPA-Aktivität in BxPC3-Zellen. Allerdings zeigte die molekularbiologische Untersuchung hinsichtlich der Proteinexpression eine deutliche Abnahme. Ein ähnliches Phänomen ergaben auch die Untersuchungen von Paduch (Paduch & Kandefler-Szerszen 2011). Im Gegensatz hierzu konnte in der vorliegenden Arbeit eine Veränderung der Genexpression von PAI-1, dem Inhibitor von uPA, nach FSAP-Behandlung weder mittels Western-Blot noch mittels RT-PCR festgestellt werden.

Sowohl die Proteasenaktivitätsmessung mit der Gelatine-Zymographie als auch die Genexpressionsanalyse (RT-PCR) führten bei den Matrixmetalloproteasen (MMP) nach FSAP-Stimulierung zu keinem relevanten Ergebnis. Die FSAP zeigt in dieser Arbeit keinen Effekt auf der Transkriptionsebene der Faktoren uPA und MMP. Somit sind die FSAP-Effekte im posttranskriptionalen Bereich zu suchen.

Ein weiterer Aspekt meiner Arbeit betrachtete den direkten Einfluss von FSAP auf die Tumorzellen sowie nach Stimulation von BxPC3-Zellen durch Wachstumsfaktoren. Die Stimulation von BxPC3-Zellen mit FSAP führte über die MAPK-Phosphorylierung sowie die Tyrosinphosphorylierung zu einem 170 kDa schweren Protein. Allerdings war die Stimulation im Vergleich zu FCS oder IGF-1 sehr schwach. Die Stimulierung von IGF-1 war, in beiden Analysen, durch FSAP nicht verändert. Kürzlich publizierten Mambetsariiev et al eine Studie, die postuliert, dass FSAP Zellen über Protease-aktivierte Rezeptoren stimulieren können (Mambetsariiev et al. 2010). Diese Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die über Thrombin und andere verwandte Proteasen aktiviert werden (Coughlin 2005).

Eine Steigerung der Aktivität der uPA ohne eine Absenkung in seiner Expression bedeutet, dass FSAP uPA direkt aktiviert. Die ist identisch mit der bekannten Wirkung von FSAP auf die pro-uPA Aktivierung. Schlussfolgernd kann postuliert werden, dass FSAP mutmaßlich zu einer gesteigerten perizellulären Proteolyse mit Degradation nicht nur der extrazellulären Matrix, sondern auch zu einer Regulation einzelner Komponenten des vaskulären Systems beiträgt. Die allgemeine Relevanz der direkten Aktivierung von Tumorzellen mit FSAP muss weiter im Detail untersucht werden. Den in-vivo Einfluss von FSAP hinsichtlich Outcome sollten weitere Untersuchungen an einem Tiermodell mit primärem Tumor klären.

5.2 In-vivo Effekte von FSAP auf die Neoangiogenese

Im Matrigelmodell spielt die Zugabe von Wachstumsfaktoren wie bFGF, VEGF und PDGF eine wichtige Rolle bei der Neoangiogenese. Nach der Optimierung der Heparinkonzentration haben wir FSAP in Kombination mit Wachstumsfaktoren getestet. Die Gabe von FSAP in das Matrigel hat zu einer deutlichen Reduzierung der Neoangiogenese geführt. Alle Wachstumsfaktoren allein sowie in unterschiedlichen Kombinationen wurden durch FSAP gehemmt. Das stimmt mit der bekannten inhibitorischen Eigenschaft von FSAP auf Faktoren wie VEGF (Jeon et al. 2006), bFGF (Etscheid et al. 2004a) und PDGF (Kannemeier et al. 2004) überein. Für die Hemmung der PDGF-vermittelten Migration und Proliferation ist der gesteigerte proteolytische Abbau verantwortlich (Kannemeier et al. 2004). Bei bFGF-vermittelten Prozessen kommt ein komplexer Mechanismus teilweise basierend auf Bindung und teilweise Abbau ins Spiel (Etscheid et al. 2004a). Die Hemmung von VEGF scheint unabhängig von der proteolytischen Aktivität von FSAP zu sein (Jeon et al. 2006).

Nach FSAP-Gabe reduzierte sich die Anzahl der glatten Muskelzellen und der Endothelzellen deutlich. Da FSAP in der Lage ist, die Dichte der beiden Zellarten signifikant zu reduzieren, wäre es denkbar, dass FSAP inhibierend auf die Endothelzellen wirkt und zusätzlich einen inhibitorischen Einfluss auf die Perizyten ausübt (Stephan et al. 2011b). Somit ist die Gefäßneubildung reduziert. Hier sollten hinsichtlich des Signalweges zwischen Endothelzelle und Perizyt mit und ohne FSAP-Gabe weitere Untersuchungen erfolgen. Daneben sollte in diesem Zusammenhang ein FSAP-Knock-out Model weitere Anhaltspunkte liefern. Hier würde ein spezifischer Perizytenmarker, RGS-5, weitere Informationen bezüglich der aktivierten Perizyten liefern (Berger et al. 2005). Die in-vitro Ergebnisse von Nicosia et al. zeigte 1995, dass die intimale bzw. subintimale Aorta (Ratte) eine kleine Untergruppe von glatten Muskelzellen beherbergt und diese in der Lage sind, sich in Perizyten während der Angiogenese zu differenzieren (Nicosia & Villaschi 1995). Auf mikroskopischer Ebene zeigen Perizyten sowie glatte Muskelzellen morphologische Ähnlichkeiten. Beide Zellarten sorgen für eine höhere Gefäßreife und –stabilität. Somit wäre insgesamt eine Hemmung der Signalkaskade zwischen der Endothelzelle und dem Perizyt durch FSAP denkbar. Frühere Studien in unserem Labor haben die Wirkung von FSAP nur auf glatte Muskelzellen hin untersucht, aber es ist denkbar, dass durch die große Ähnlichkeit zwischen den beiden Zellarten auch die Perizyten durch FSAP gehemmt werden.

Studien von anderen Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass maligne Tumore in der Lage sind, Angiogeneseinhibitoren durch Spaltung von vorhandenen Proteinen herzustellen. Einer der bekanntesten sind Angiostatin (O'Reilly 1994) und Endostatin (O'Reilly et al. 1997). Hierbei wird zwischen Molekülen mit direkten antiangiogenen und zusätzlich antiangiogen besitzenden Nebeneigenschaften unterschieden (Folkman 2004). Als Beispiel sei Angiostatin genannt, ein Produkt, das nach proteolytischem Abbau von Plasminogen entsteht. Angiostatin weist eine grosse Homologie zu FSAP auf. Auf dieser Basis haben wir die Hypothese gestellt, dass FSAP Plasminogen unter Bildung von Angiostatin spaltet. Unsere in-vitro Versuche zeigten jedoch keine Spaltung von Plasminogen durch FSAP (nicht gezeigte Daten).

FSAP besitzt eine Kringle-Domäne ähnlich wie Angiostatin. Proteine mit einer Kringle-Domäne präsentierten sich in den durchgeführten Untersuchungen als antiangiogen. Diese und eigene Ergebnisse lassen vermuten, dass FSAP primär mit seiner Kringle-Domäne antiangiogene Eigenschaften besitzt. Daneben stellt sich die Frage, ob FSAP, sei es durch seine Kringle- oder seine Serinprotease-Domäne, direkt über proteolytische und indirekt über Signalkaskaden eine Aktivierung bzw. Stimulation der Synthese von endogenen Angiogeneseinhibitoren in Gang setzt. Auch eine gesteigerte Tumorsuppressorgen-Funktion sollte in diesem Zusammenhang durch FSAP in Betracht gezogen werden (Pan 2013). Die geringfügige Wirkung von enzymatisch-inhibiertem FSAP auf die Angiogenese unterstützt nicht die Idee, dass die FSAP-Kringle-Domäne in der anti-angiogenen Wirkung eine Rolle spielt.

Zu Bedenken ist, dass das Matrigel aus einem Tumorextrakt gewonnen wurde. Matrigel ist somit eine Basalmembranmatrix, welche aus Engelbreth-Holm-Swarm-Maus-Sarkom extrahiert wurde und reich an extrazellulären Matrixproteinen ist. So wäre es auch denkbar, dass Bestandteile aus der extrazellulären Matrix nach FSAP-Gabe aktiviert werden.

5.3 Position von uPA und uPAR sowie ihre Knockout-Modelle in der Angiogenese

Da FSAP in der Lage ist, pro-uPA zu aktivieren (Romisch et al. 1999b), sollte durch gezielte Ausschaltung des Urokinase-Plasminogen-Aktivators (uPA) sowie seines Rezeptors (uPAR), ein entsprechendes Knockout-Tiermodell die Rolle der beiden Faktoren für die Angiogenese bzw. Neoangiogenese verdeutlichen.

Aufgrund der Tatsache, dass FSAP in der WT-Maus eine Abnahme der mikrovaskulären Dichte zeigte und in der uPA^{-/-}-Maus ohne FSAP-Behandlung ebenfalls zu einer reduzierten mikrovaskulären Dichte führte, lässt sich folgern, dass die Kombination einer antiangiogen wirkenden Protease sowie der genetischen Downregulation der Neoangiogenese über das uPA-System insgesamt synergistisch wirkt. Dieses legt aber auch nahe, dass die Inhibition der Neoangiogenese durch FSAP über eine andere Kaskade laufen muss.

Beim Vergleich der mikrovaskulären Dichte zwischen WT-Maus und den Knockout-Mäusen ohne FSAP Behandlung konnten hinsichtlich der Anzahl als auch der Morphologie der Gefäße auf mikroskopischer Ebene Unterschiede festgestellt werden. Bei der WT-Maus konnten eine hohe Anzahl und eine regelrechte Morphologie der Gefäße dokumentiert werden. Die Anzahl der gebildeten Gefäße war bei den uPA- und uPAR-Knockout-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen reduziert. Daneben zeigten die Gefäße auf mikroskopischer Ebene Unterschiede in der Morphologie. Partiiell fehlten einzelne Gefäßkomponenten, sowohl Endothelzellen als auch glatte Muskelzellen.

Zwischen den beiden Knockout-Modellen konnte insgesamt eine regelrechte Gefäßmorphologie, vorwiegend bei den uPAR^{-/-}-Mäusen, nachgewiesen werden. Somit spielt primär das uPA-System im Rahmen der Neoangiogenese eine wichtige Rolle. Ein Unterschied in der Knockout-Gruppe zeigte sich zudem nach alleiniger Gabe der Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF. Nach alleiniger Gabe von VEGF war die mikrovaskuläre Dichte bei der uPA^{-/-}-Maus im Vergleich mit der uPAR^{-/-}-Maus deutlich höher. Andererseits war die mikrovaskuläre Dichte bei der uPAR^{-/-}-Maus nach alleiniger bFGF-Gabe deutlich höher. Hier wäre es denkbar, dass die Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF über unterschiedliche Signalkaskaden ihre Wirkung entfalten (Alexander et al. 2012, Breuss & Uhrin 2012). Eine Interaktion zwischen bFGF und VEGF ist bekannt. Einerseits induziert b-FGF die Expression von VEGF, andererseits ist nach systemischer Applikation eines VEGF-Antikörpers und somit Neutralisierung desselben die FGF-induzierte Angiogenese deutlich reduziert. Die Effekte führen die Autoren auf den autokrinen Mechanismus von VEGF zurück (Seghezzi et al. 1998).

5.4 Radiologisch-interventionelle Applikation von FSAP im Rahmen einer antiangiogenen bzw. antitumoralen Therapie

Neben Operation, Bestrahlung und Chemotherapie gibt es weitere, in der klinischen Anwendung etablierte Verfahren zur Behandlung benignen bzw. malignen vaskularisierter Grunderkrankungen. Es gibt sowohl systemische als auch lokal verwendete Verfahren zur antiangiogenen Behandlung. Diese sind u.a. die *transarterielle Chemoembolisation* (TACE) und die *Embolisation mittels Mikrosphären (Kügelchen)*. Diese Verfahren sind bekannte und in Kliniken etablierte Methoden bei Behandlung von Patienten mit einem hypervaskularisierten Primärtumor bzw. Uterusmyomen. Die Verfahren zeigen eine lokale Wirkung, somit werden systemische, unerwünschte Effekte umgangen und eine bessere Verträglichkeit bzw. höhere Dosis erzielt.

Die TACE ist ein radiologisch-interventionelles Verfahren zur Therapie von Lebertumoren (z.B. hepatozelluläres Karzinom, Karzinoid-Metastasen). Sie ist minimalinvasiv und kombiniert die Applikation von unterschiedlichen Substanzen (z.B. Chemotherapeutikum und Embolisat (ölhaltiges Kontrastmittel Lipiodol)). Dabei wird perkutan transarteriell über die A. femoralis communis die Leberarterie selektiv bzw. ein Seitenast superselektiv sondiert, und die Substanzen über den eingebrachten Mikrokatheter lokal in die Raumforderung appliziert (Vogl et al. 2007, Zangos et al. 2001). Einerseits wirkt das Chemotherapeutikum lokal, andererseits führt das ölhaltige Kontrastmittel Lipiodol zu einer Verstopfung der den Tumor versorgenden Gefäße (arterielle Okklusion). Die Leber wird zwei Drittel von der V. portae versorgt, während maligne, hypervaskularisierte Tumore vorwiegend arteriell versorgt werden.

Die *Embolisation* von symptomatischen Uterusmyomen durch kleine Kügelchen wird ebenfalls als ein minimal-invasives Verfahren in der Radiologie durchgeführt. Hierbei werden selektiv bzw. superselektiv in die Uterusarterie kleine Kügelchen gespritzt, welche die Gefäße verstopfen und so zu einer Unterbrechung der Blutzufuhr führen (Ravina et al. 2000).

Nach Behandlung der Läsionen zeigen diese eine deutliche Reduktion der Vaskularisation. Die kernspintomographische Verlaufskontrolle der Läsionen zeigt im Vergleich mit der initialen Untersuchung vor allem zentral hypovaskularisierte bis nekrotische Areale. Ziel ist es, die Vaskularisation der Läsionen komplett zu unterbinden.

Der antiangiogene Effekt von FSAP kann einerseits die oben genannten Verfahren unterstützen oder andererseits als eigene Therapieoption etabliert und angewendet werden. Somit könnte FSAP sowohl systemisch als auch nur lokal in das

Tumorparenchym bzw. in das tumorversorgende Gefäß appliziert werden. Mit der zweiten Option würde man den systemischen FSAP-Effekt umgehen und hätte zudem lokal eine höhere Dosis.

5.5 Klinische Relevanz von FSAP

Die Angiogenese bzw. die Neoangiogenese ist ein multifaktoriell zusammenwirkender Mechanismus, der für die antiangiogene Therapie ein breites Spektrum hinsichtlich der Behandlungsmöglichkeiten bietet. Aus diesem Grund sind bereits mehrere, sowohl direkt als auch indirekt antiangiogen wirkende Substanzen, erforscht und teilweise entwickelt worden. Die Kombination von direkten (z.B. Endostatin) mit indirekten (z.B. SU54216) Angiogenesehemmern zeigte einen synergistischen, insgesamt antitumoralen Effekt (Abdollahi et al. 2003). Die in-vivo Ergebnisse demonstrierten die antiangiogene Wirkung von FSAP. Ob FSAP direkt oder indirekt die Angiogenese hemmt, müssen weitere Untersuchungen die FSAP-Wirkung klären. Hierbei könnten u.a. FSAP-Knockout Mäuse untersucht werden

Die klinische Relevanz solcher antiangiogenen Ansätze wurde schon bei der Entdeckung des VEGF-Antikörpers Bevacizumab entdeckt, und somit ein Meilenstein als eine weitere Säule der Krebstherapie etabliert. Im Vergleich mit der Chemotherapie stellen solche antiangiogene Behandlungsmöglichkeiten eine schonende Alternative dar. Die von Chemotherapien ausgehenden Nebenwirkungen bzw. ihre Toxizität könnten vermieden werden. Dabei werden Resistenzen kaum, und Nebenwirkungen selten dokumentiert. Allerdings zeigen neuere Studien, dass antiangiogene Mittel (Sunitinib und Bevacizumab) bei Erzeugung einer intratumoralen Hypoxie in humanen Brustkrebs-Xenotransplantaten einen Anstieg der Stammzellen hervorruft (Conley et al. 2012).

Eine antiangiogene Therapie durch FSAP legt zudem nahe, dass sie im Sinne einer neoadjuvanten Therapie ein Downsizing und somit eine Operabilität mit sich bringt. Eine adjuvante Therapie kommt ebenfalls in Frage.

Insgesamt sollte festgehalten werden, dass antiangiogene Therapien primär palliativ sind und das Tumorwachstum an sich reduzieren, aber den Tumor nicht komplett eradizieren. Somit sollten antiangiogene Therapien mit konventionellen und anderen antiangiogenen Verfahren kombiniert werden, um bessere Erfolge zu erzielen.

Zusammenfassend stellt FSAP eine weitere, alternative Therapie zur antiangiogenen Behandlung unterschiedlicher, primär hypervaskularisierter Erkrankungen dar. Neben der systemischen Applikation von FSAP kann zum Erreichen höherer Dosen eine lokale Gabe mit möglicherweise schnellem und wirkungsvollem Eintritt durchgeführt werden. So könnte FSAP entweder supportiv zu den bekannten, etablierten Verfahren wie transarterielle Chemoembolisation oder Embolisation dienen oder als eigene Therapieoption in der klinischen Anwendung seinen Platz finden.

Die schematische Darstellung der FSAP-Funktionen (Abb. 37) müsste somit durch einen weiteren Effekt, nämlich der antiangiogenen Wirkung, ergänzt werden.

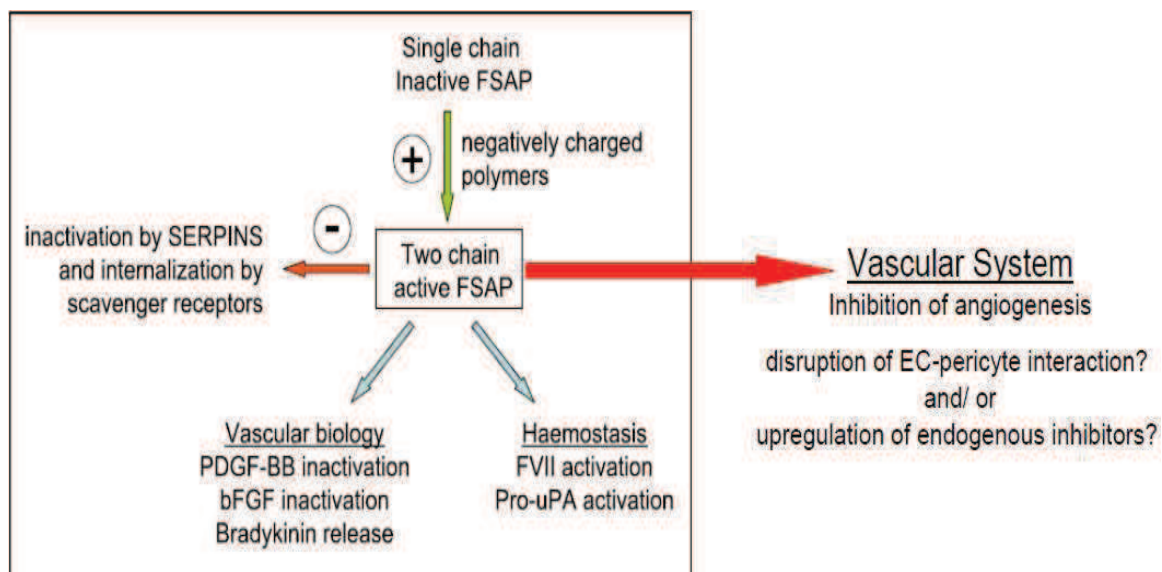


Abb. 37: Schematische Darstellung der FSAP-Funktionen (Kanase et al. 2008). FSAP zeigt nicht nur eine duale Rolle bei der Hämostase und Fibrinolyse, sondern sie zeigt auch eine Hemmung von Serpinen bzw. eine Internalisierung von Rezeptoren. Nach dieser vorliegenden Arbeit in einem Maus-Matrigel-Modell lässt sich eine zusätzliche Funktion der Faktor VII-aktivierenden Protease zuschreiben, nämlich die antiangiogene Wirkung.

6 Zusammenfassung

6.1 Deutsche Version

Die Faktor VII-aktivierende Protease (FSAP) ist ein Plasmaprotein, das in der Leber als ein Zymogen synthetisiert wird. Im Gefäßsystem spielt es eine duale Rolle; auf der einen Seite wirkt es prokoagulatorisch, indem Faktor VII aktiviert und TFPI inaktiviert wird, auf der anderen Seite fibrinolytisch, indem pro-uPA in die aktive Form umgewandelt wird. Durch die spezifische Spaltung von PDGF-BB (platelet derived growth factor-BB) hemmt es die Wachstumsfaktor-vermittelte Migration und Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen. In dieser Arbeit wurden Aspekte in Zusammenhang mit der Rolle der FSAP bei der Regulierung der perizellulären Proteolyse sowie Angiogenese untersucht.

In Tumorzellen wird das Plasminogenaktivierungssystem durch FSAP reguliert, auf die Matrix-Metalloproteinasen zeigt es allerdings keinen Effekt. Somit könnte FSAP eine Rolle beim Umbauprozess der extrazellulären Matrix im Rahmen des Tumorstwachstums eine Rolle spielen.

Um die Wirkung der FSAP auf die Angiogenese zu testen, wurde Matrigel (ein Tumorextrakt) zusammen mit FSAP subkutan in beide Leisten der Maus implantiert. Die Neovaskularisation im Matrigelplug wurde immunhistochemisch analysiert. FSAP wurde mit Kontroll-Puffer, ihrer inaktiven Form (PPACK-FSAP) und nach Aprotinigungabe verglichen. Darüber hinaus wurden verschiedene Wachstumsfaktoren alleine oder in Kombination mit Heparin in das Matrigel hinzupipettiert.

FSAP zeigte eine deutliche Abnahme der mikrovaskulären Dichte innerhalb der Matrigelplugs. Die Anzahl von vaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen wurden signifikant reduziert. Die Angiogenese in der Kontrollgruppe blieb unverändert. Im Gegensatz dazu zeigten Aprotinin als auch die enzymatisch inaktive Form von FSAP, PPACK-FSAP, eine vollständige Neutralisierung des FSAP-Effektes.

Die Angiogenese in der uPA^{-/-} und uPAR^{-/-}-Mäusen (urokinase-type plasminogen activator receptor) war im Vergleich mit der Wildtyp-Gruppe reduziert. Die mikrovaskuläre Dichte innerhalb der Matrigelplugs war im Vergleich mit den uPAR^{-/-}-Mäusen bei den uPA^{-/-}-Mäusen deutlich verringert. FSAP reduziert die Angiogenese sowohl in den uPA^{-/-} als auch in den uPAR^{-/-}-Mäusen.

Die Ergebnisse zeigen FSAP als einen endogenen Angiogenesehemmer und somit als eine weitere mögliche Option in der Tumorthherapie.

6.2 Englische Version (Summary)

The factor VII-activating protease (FSAP) is a plasma protein that is synthesized by the liver as a zymogen. In the vascular system, it plays a dual role, on the one hand it activates factor VII and inactivates TFPI and thus promoting coagulation and secondly it converts pro-uPA into the active form and thus supports fibrinolysis. By specifically cleaving PDGF-BB (platelet derived growth factor-BB) it inhibits the growth factor-mediated migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. In this thesis aspects relating to the role of FSAP in regulating pericellular proteolysis as well as angiogenesis have been investigated.

In tumor cells the plasminogen activation system was regulated by FSAP but this was not the case for the matrix metalloproteases tested. Thus, FSAP could play a role in the remodeling of the extracellular matrix in the context of tumor growth.

To test the effect of FSAP in angiogenesis it was added to Matrigel (a tumor extract) which was implanted subcutaneously in both inguinal regions of the mouse. Neovascularization in the matrigel plug was analyzed *by immunohistochemistry*. FSAP was compared with its control-buffer, its inactivated form (PPACK-FSAP) and after aprotinin administration to inhibit its proteolytic activity. In addition, various growth factors were added alone or in combination with heparin to the matrigel plugs.

FSAP significantly reduced microvascular density in matrigel plugs. The number of vascular endothelial cells as well as smooth muscle cells was significantly reduced. Angiogenesis in the control group was unaffected. In contrast, aprotinin as well the enzymatically inactive form of FSAP, PPACK-FSAP, completely neutralized the effect of FSAP.

Angiogenesis in the uPA^{-/-} and uPAR^{-/-} mice (urokinase-type plasminogen activator receptor) was generally reduced in comparison to the wild-type group. Microvascular density in matrigel plugs was lower in uPA^{-/-}-mice compared with the uPAR^{-/-}-mice. FSAP reduced angiogenesis in both uPA^{-/-} and uPAR^{-/-}-mice.

The results demonstrate that FSAP is an endogenous angiogenesis inhibitor that could be useful in tumor therapy.

7. Abkürzungsverzeichnis

- AK Antikörper
- alpha(α)-SMA α -smooth muscle actin
- APS Ammoniumpersulfat
- Aqua dest. destilliertes Wasser
- bFGF basic Fibroblast Growth Factor
- bp Basenpaare
- BS-1 *Bandeiraea simplicifolia*-1
- BSA bovines Serumalbumin
- BxPC3 Zellen vom humanen Pankreaskarzinom (Adenokarzinom)
- cDNA complementary Desoxyribonucleic acid
- DAPI 4,6-diamidino-2-Phenylindol
- ddH₂O doppelt destilliertes Wasser
- DEPC Diethylpyrocarbonate
- DMSO Dimethylsulfoxid
- dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphate
- DTT Dithiothreitol
- EC endothelial cell
- EDTA Ethylendeamintetraacetat
- EGF Epidermal Growth Factor
- ERK 1/2 extracellular regulated kinase 1/2
- FCS fetales Kälberserum
- FFPE formalin-fixed paraffin embedded
- FITC Fluoresceinisothiocyanat
- HABP Hyaluronsäure-bindende Protease
- hbFGF human basic Fibroblast Growth Factor
- HBS Hepes buffered saline
- hEGF human Epidermal Growth Factor
- HGF hepatocyte growth factor
- HIF-1 α hypoxia-inducible factor-1 α
- HRP horseradish peroxidase
- kDa Kilodalton
- LPS Lipopolysaccharid
- M Molar
- mA Milliamper
- mg Milligramm
- min Minute
- ml Milliliter

- MMP matrix metalloproteinase
- NaCl Natriumchlorid
- ng Nanogramm
- nm Nanometer
- Oligo dT Oligodeoxy-thymidine
- PAGE polyacrylamide gel electrophoresis
- PAI-1 Plasminogen-Aktivator Inhibitor-1
- PBS Phosphate buffered saline
- PCR Polymerase Chain Reaction
- PDGF-BB Platelet Derived Growth Factor-BB
- PECAM-1 Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
- PI3K Phosphoinositid-3 Kinase
- PMA Phorbolmyristataacetat
- PPACK D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketon
- PSG Plasminogen
- PVDF-Membran Polyvinylidenfluorid
- RNA Ribonucleic acid
- RNase A Ribonukleasae A
- rpm rounds per minute
- RT-PCR reverse Transkriptase – Polymerase – Kettenreaktion
- s Sekunden
- scFSAP single-chain - Faktor VII-activating protease
- SDS Sodium dodecyl sulfate
- SEM standard error of the mean
- Serpin Serinprotease-Inhibitor
- SF-Medium serumfreies Medium
- TAE Tris-Acetat-EDTA-Puffer
- TBS Tris-buffered-saline
- tcFSAP two-chain - Faktor VII-activating protease
- TF Tissue Factor
- TFPI Tissue Factor Pathway Inhibitor
- TIMP tissue inhibitors of metalloproteinases
- tPA "tissue type plasminogen activator"
- Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
- Triton-X-100 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenol]ethoxylat
- uPA "urokinase-type plasminogen activator"
- uPAR "urokinase-type plasminogen activator receptor"
- VEGF Vascular Endothelial Growth Factor
- vWF von-Willebrand-Faktor
- ZMG Zymographie

8. Abbildungsverzeichnis

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung unterschiedlicher Angiogenesehemmer.	7
Abb. 2: Überblick über angiogene und antiangiogene Faktoren.	9
Abb. 3: Schematische Darstellung von FSAP mit seiner sc- und tc-Form.	13
Abb. 4: Schematische Darstellung der FSAP-Funktionen.	15
Abb. 5: Schematische Darstellung der uPA- und MMP-Interaktion i.R. der perizellulären Proteolyse.	19
Abb. 6: Plasminogenaktivierung und -hemmung. Veranschaulichung der Casein-Zymographie.	34
Abb. 7: Makroskopische Darstellung der s.c. injizierten Matrigelplugs.	44
Abb. 8: Einbettkörperchen mit Matrigelplug in Paraffin.	46
Abb. 9: Casein-ZMG zur Darstellung der uPA/ tPA-Aktivität im Extrakt bzw. im Überstand der BxPC3-Zellen nach scFSAP-Gabe oder Kontroll-Puffer.	54
Abb. 10: Effekt von FSAP (0,2 – 20 µg/ml) bzw. seinem Kontroll-Puffer auf die BxPC3-Zellen bei der Casein-Zymographie.	55
Abb. 11: Western Blot Analyse zum Nachweis von uPA (oben), PAI-1 (unten) und des uPA-PAI1-Komplexes in BxPC3 nach Stimulation mit FSAP.	56
Abb. 12: Western Blot Analyse zum Nachweis von uPA und des uPA-PAI1-Komplexes in BxPC3-Zellen nach FSAP-Stimulation.	57
Abb. 13: FSAP-Konzentrationsabhängige Expressionsanalyse mittels Western Blot zum Nachweis von PAI-1 in BxPC3-Zellen.	57
Abb. 14: Western Blot Analyse zum Nachweis von FSAP in der jeweiligen Stocklösung.	58
Abb. 15: Gelatine-Zymographie zur Darstellung von MMP2- und -9 -Aktivität in BxPC3 nach FSAP-Stimulation.	59
Abb. 16: Gelatine-Zymographie zur Darstellung von MMP2- und -9 -Aktivität in BxPC3 nach FSAP-Stimulation.	59
Abb. 17: Western Blot Analyse zum Nachweis der MMP-2 und -9 - Expression in BxPC3-Zellen nach FSAP-Stimulation.	60
Abb. 18: Western Blot Analyse. Konzentrationsabhängiger Effekt von FSAP hinsichtlich der MMP-2 und -9 Expression in BxPC3-Zellen.	61
Abb. 19: RT-PCR zum Nachweis eines FSAP-Effektes auf Transkriptionsebene bei uPA, PAI-1, tPA, MMP-2/-9, TIMP1- und -2 in	

BxPC3-Zellen.	62
Abb. 20: Western Blot Analyse zum Nachweis einer ERK1/2-Aktivierung über MAPK in BxPC3-Zellen nach FSAP-Gabe (links nach 10 und rechts nach 30 min Inkubation).	63
Abb. 21: Western Blot Analyse zum Nachweis einer Tyrosinphosphorylierung in BxPC3-Zellen nach FSAP-Gabe (links nach 10 und rechts nach 30 min Inkubation).	64
Abb. 22: Matrigelplugs nach wachstumsfaktorinduzierter Stimulation der Neoangiogenese mit jeweils 100 (links) bzw. 200 µg /ml Heparin (rechts).	65
Abb. 23: H&E-Übersichtsfärbung der Matrigelplugs bei unterschiedlicher Vorbehandlung, hier zur Testung der Heparindosen von 100 und 200 µg/ml.	66
Abb. 24: Matrigelplugs mit unterschiedlicher Vorbehandlung, hier zur Testung der Heparindosis von 628 µg/ml.	67
Abb. 25: H&E-Übersichtsfärbung der Matrigelplugs bei unterschiedlicher Vorbehandlung, hier zur Testung der Heparindosis von 628 µg/ml.	68
Abb. 26: Immunhistochemische Färbung der Schnitte der Matrigelplugs (100 und 200 µg/ml Heparin).	69
Abb. 27: Immunhistochemische Färbung der Schnitte der Matrigelplugs, Gabe von 628 µg/ml Heparin.	70
Abb. 28: Immunhistochemische Färbung mit Darstellung eines Gefäßes, welche im Rahmen der Neoangiogenese innerhalb des Matrigelplugs entstanden ist.	71
Abb. 29: Maus-Matrigel-Model zum Nachweis des FSAP-Effektes auf die Angiogenese.	73
Abb. 30: Immunhistochemische Färbung der Matrigelschnitte bei der Wildtyp-Maus zur Analyse des FSAP-Effektes auf die Angiogenese.	75
Abb. 31: Prozentuale Dichte der glatten Muskelzellen nach unterschiedlicher Behandlung bei Wildtyp-Mäusen.	76
Abb. 32: Prozentuale Dichte der Endothelzellen nach unterschiedlicher Behandlung bei Wildtyp-Mäusen.	77
Abb. 33: Prozentuale Dichte der Zellkerne nach unterschiedlicher Behandlung bei Wildtyp-Mäusen.	78
Abb. 34: Mikrovaskuläre Dichte innerhalb der Matrigelplugs nach Behandlung mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren sowie mit und ohne FSAP.	79
Abb. 35: Immunhistochemische Färbung (oben) sowie mikrovaskuläre Dichte	

(unten) der Matrigelschnitte bei uPA ^{-/-} -Mäusen nach unterschiedlicher Gabe von Wachstumsfaktoren sowie FSAP (12 µg/ml) und seinem Kontroll-Puffer.	81
Abb. 36: Immunhistochemische Färbung (oben) und mikrovaskuläre Dichte (unten) der Matrigelschnitte bei uPAR ^{-/-} -Mäusen nach unterschiedlicher Gabe von Wachstumsfaktoren sowie FSAP (12 µg/ml) und seinem Kontroll-Puffer.	83
Abb. 37: Schematische Darstellung der FSAP-Funktionen.	92

8.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Chemikalien.	23
Tab. 2: Geräte.	25
Tab. 3: Kommerzielle Kits.	26
Tab. 4: Antikörper.	27
Tab. 5: Zellmedien und Seren.	28
Tab. 6: Zusammensetzung für zwei Gele (Casein-ZMG und Western Blot).	33
Tab. 7: Zusammensetzung der Casein-Plasminogen-Matrix (Underlay).	34
Tab. 8: Zusammensetzung für zwei Gele (Gelatine-Zymographie).	36
Tab. 9: Übersicht der RNA-Primer-Mischung.	38
Tab. 10: Übersicht der Master-Mix für die cDNA-Synthese.	39
Tab. 11: Humane Primer.	39
Tab. 12: Master-Mix für PCR.	40

9. Literaturverzeichnis

- Abdollahi A, Lipson KE, Sckell A, Zieher H, Klenke F, Poerschke D, Roth A, Han X, Krix M, Bischof M, Hahnfeldt P, Grone H-, Debus J, Hlatky L and Huber PE (2003): Combined Therapy with Direct and Indirect Angiogenesis Inhibition Results in Enhanced Antiangiogenic and Antitumor Effects. *Cancer Res.* 63:24: 8890-8898.
- Ahmad-Nejad P, Dempfle C, Weiss C, Bugert P, Borggreffe M and Neumaier M (2012): The G534E-polymorphism of the gene encoding the Factor VII-activating protease is a risk factor for venous thrombosis and recurrent events. *Thromb.Res.* 130:3: 441-444.
- Alexander RA, Prager GW, Mihaly-Bison J, Uhrin P, Sunzenauer S, Binder BR, Schutz GJ, Freissmuth M and Breuss JM (2012): VEGF-induced endothelial cell migration requires urokinase receptor (uPAR)-dependent integrin redistribution. *Cardiovasc.Res.* 94:1: 125-135.
- Altincicek B, Shibamiya A, Trusheim H, Tzima E, Niepmann M, Linder D, Preissner KT and Kanse SM (2006): A positively charged cluster in the epidermal growth factor-like domain of Factor VII-activating protease (FSAP) is essential for polyanion binding. *Biochem.J.* 394:Pt 3: 687-692.
- Aprelikova O, Pajusola K, Partanen J, Armstrong E, Alitalo R, Bailey SK, McMahon J, Wasmuth J, Huebner K and Alitalo K (1992): FLT4, a Novel Class III Receptor Tyrosine Kinase in Chromosome 5q33-qter. *Cancer Research* 52:3: 746-748.
- Armulik A, Abramsson A and Betsholtz C (2005): Endothelial/pericyte interactions. *Circ.Res.* 97:6: 512-523.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G and Isner JM (1997): Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:5302: 964-967.
- Ausprunk DH & Folkman J (1977): Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc.Res.* 14:1: 53-65.
- Baluk P, Hashizume H and McDonald DM (2005): Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 15:1: 102-111.
- Bandello F, Lattanzio R, Zucchiatti I and Del Turco C (2013a): Pathophysiology and treatment of diabetic retinopathy. *Acta Diabetol.* 50:1: 1-20.
- Bandello F, Lattanzio R, Zucchiatti I and Del Turco C (2013b): Pathophysiology and treatment of diabetic retinopathy. *Acta Diabetol.* 50:1: 1-20.
- Bankfalvi A, Navabi H, Bier B, Bocker W, Jasani B and Schmid KW (1994): Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *J.Pathol.* 174:3: 223-228.
- Baruch RR, Melinscak H, Lo J, Liu Y, Yeung O and Hurta RA (2001): Altered matrix metalloproteinase expression associated with oncogene-mediated cellular transformation and metastasis formation. *Cell Biol.Int.* 25:5: 411-420.

- Bauer EA, Stricklin GP, Jeffrey JJ and Eisen AZ (1975): Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 64:1: 232-240.
- Berger M, Bergers G, Arnold B, Hammerling GJ and Ganss R (2005): Regulator of G-protein signaling-5 induction in pericytes coincides with active vessel remodeling during neovascularization. *Blood* 105:3: 1094-1101.
- Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E and Hanahan D (2003): Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J.Clin.Invest.* 111:9: 1287-1295.
- Bodnar M, Szyberg L, Kazmierczak W and Marszalek A (2012): Evaluation of microvessel density (MVD) in laryngeal squamous cell carcinoma. *Przegl.Lek.* 69:10: 726-730.
- Borkham-Kamphorst E, Zimmermann HW, Gassler N, Bissels U, Bosio A, Tacke F, Weiskirchen R and Kanse SM (2013): Factor VII activating protease (FSAP) exerts anti-inflammatory and anti-fibrotic effects in liver fibrosis in mice and men. *J.Hepatol.* 58:1: 104-111.
- Brem H & Folkman J (1975): Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage. *J.Exp.Med.* 141:2: 427-439.
- Brem H, Gresser I, Grosfeld J and Folkman J (1993): The combination of antiangiogenic agents to inhibit primary tumor growth and metastasis. *J Pediatr Surg* 28:10: 1253-7.
- Breuss JM & Uhrin P (2012): VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/uPAR system. *Cell.Adh Migr.* 6:6: 535-615.
- Brown RW & Chirala R (1995): Utility of microwave-citrate antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *Mod.Pathol.* 8:5: 515-520.
- Burnette WN (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal.Biochem.* 112:2: 195-203.
- Cao Y, Cao R and Veitonmaki N (2002): Kringle structures and antiangiogenesis. *Curr.Med.Chem.Anticancer Agents* 2:6: 667-681.
- Cao Y, Ji RW, Davidson D, Schaller J, Marti D, Sohndel S, McCance SG, O'Reilly MS, Llinas M and Folkman J (1996): Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 271:46: 29461-29467.
- Carmeliet P (2003): Angiogenesis in health and disease. *Nat.Med.* 9:6: 653-660.
- Carmeliet P (2000): Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat.Med.* 6:4: 389-395.
- Carmeliet P (2005): VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 Suppl 3: 4-10.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W and Nagy A (1996): Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380:6573: 435-439.

Chaput C & Zychlinsky A (2009): Sepsis: the dark side of histones *Nat.Med.* 15:11: 1245-1246.

Choi-Miura NH, Takahashi K, Yoda M, Saito K, Mazda T and Tomita M (2001): Proteolytic activation and inactivation of the serine protease activity of plasma hyaluronan binding protein. *Biol.Pharm.Bull.* 24:5: 448-452.

Choi-Miura NH, Tobe T, Sumiya J, Nakano Y, Sano Y, Mazda T and Tomita M (1996): Purification and characterization of a novel hyaluronan-binding protein (PHBP) from human plasma: it has three EGF, a kringle and a serine protease domain, similar to hepatocyte growth factor activator. *J.Biochem.* 119:6: 1157-1165.

Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P, Newman B, Korkaya H, Heath AN, Clouthier SG and Wicha MS (2012): Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 109:8: 2784-2789.

Coughlin SR (2005): Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J.Thromb.Haemost.* 3:8: 1800-1814.

de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N and Williams LT (1992): The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255:5047: 989-991.

Doctrow SR & Folkman J (1987): Protein kinase C activators suppress stimulation of capillary endothelial cell growth by angiogenic endothelial mitogens. *J Cell Biol* 104:3: 679-87.

Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, Ringstedt T, Kraemer R, Hahn R, Wang S, Ibanez CF, Rafii S and Hempstead BL (2000): Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development* 127:21: 4531-4540.

Du G, Zhang Z, Wen X, Yu C, Calway T, Yuan C and Wang C (2012): Epigallocatechin Gallate (EGCG) Is the Most Effective Cancer Chemopreventive Polyphenol in Green Tea Nutrients 4:12: 1679 <last_page> 1691.

Duffy MJ (2004): The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr.Pharm.Des.* 10:1: 39-49.

Etscheid M, Beer N and Dodt J (2005): The hyaluronan-binding protease upregulates ERK1/2 and PI3K/Akt signalling pathways in fibroblasts and stimulates cell proliferation and migration. *Cell.Signal.* 17:12: 1486-1494.

Etscheid M, Beer N, Kress JA, Seitz R and Dodt J (2004a): Inhibition of bFGF/EGF-dependent endothelial cell proliferation by the hyaluronan-binding protease from human plasma. *Eur.J.Cell Biol.* 82:12: 597-604.

Etscheid M, Beer N, Kress JA, Seitz R and Dodt J (2004b): Inhibition of bFGF/EGF-dependent endothelial cell proliferation by the hyaluronan-binding protease from human plasma. *Eur.J.Cell Biol.* 82:12: 597-604.

Etscheid M, Hunfeld A, König H, Seitz R and Dodt J (2000): Activation of proPHBSP, the zymogen of a plasma hyaluronan binding serine protease, by an intermolecular autocatalytic mechanism. *Biol.Chem.* 381:12: 1223-1231.

Etscheid M, Muhl L, Pons D, Jukema JW, König H and Kanse SM (2012): The Marburg I polymorphism of factor VII activating protease is associated with low proteolytic and low pro-coagulant activity. *Thromb.Res.* 130:6: 935-941.

Fassina G, Ferrari N, Brigati C, Benelli R, Santi L, Noonan DM and Albini A (2000): Tissue inhibitors of metalloproteases: regulation and biological activities. *Clin.Exp.Metastasis* 18:2: 111-120.

Fernandez HA, Kallenbach K, Seghezzi G, Grossi E, Colvin S, Schneider R, Mignatti P and Galloway A (1999): Inhibition of endothelial cell migration by gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Surg Res* 82:2: 156-62.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ and Moore MW (1996): Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380:6573: 439-442.

Ferrara N & Henzel WJ (1989): Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 161:2: 851-858.

Fink K & Boratynski J (2012): The role of metalloproteinases in modification of extracellular matrix in invasive tumor growth, metastasis and angiogenesis. *Postepy Hig.Med.Dosw.(Online)* 66: 609-628.

Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Kramer MD, Brunner N, Janicke F, Meijer-van Gelder ME, Henzen-Logmans SC, van Putten WL and Klijn JG (2000): The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res.* 60:3: 636-643.

Folkman J (1972): Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann.Surg.* 175:3: 409-416.

Folkman J (2004): Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMIS* 112:7-8: 496-507.

Folkman J (1974): Proceedings: Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res.* 34:8: 2109-2113.

Folkman J (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N.Engl.J.Med.* 285:21: 1182-1186.

Folkman J, Browder T and Palmblad J (2001): Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. *Thromb.Haemost.* 86:1: 23-33.

Folkman J, Merler E, Abernathy C and Williams G (1971): Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J.Exp.Med.* 133:2: 275-288.

- Folkman J, Watson K, Ingber D and Hanahan D (1989): Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339:6219: 58-61.
- Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP and McMahon G (1999): SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res.* 59:1: 99-106.
- Fujita M, Sasayama S, Asanoi H, Nakajima H, Sakai O and Ohno A (1988): Improvement of treadmill capacity and collateral circulation as a result of exercise with heparin pretreatment in patients with effort angina. *Circulation* 77:5: 1022-1029.
- Galland F, Karamysheva A, Mattei M, Rosnet O, Marchetto S and Birnbaum D (1992): Chromosomal localization of FLT4, a novel receptor-type tyrosine kinase gene. *Genomics* 13:2: 475-478.
- Goldberg GI, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Wilhelm S and He CS (1989): Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteases designated TIMP-2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:21: 8207-8211.
- Gondi CS, Lakka SS, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M and Rao JS (2004): Downregulation of uPA, uPAR and MMP-9 using small, interfering, hairpin RNA (siRNA) inhibits glioma cell invasion, angiogenesis and tumor growth. *Neuron.Glia Biol.* 1:2: 165-176.
- Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA and Bouck NP (1990): A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87:17: 6624-6628.
- Gospodarowicz D, Abraham JA and Schilling J (1989): Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:19: 7311-7315.
- GROSS J & LAPIERE CM (1962): Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 48: 1014-1022.
- Guo XN, Zhong L, Tan JZ, Li J, Luo XM, Jiang HL, Nan FJ, Lin LP, Zhang XW and Ding J (2005): In vitro pharmacological characterization of TKI-28, a broad-spectrum tyrosine kinase inhibitor with anti-tumor and anti-angiogenic effects. *Cancer Biol Ther* 4:10: 1125-32.
- Harris ED,Jr & Krane SM (1972): An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture. *Biochim.Biophys.Acta* 258:2: 566-576.
- Hashimoto K, Tobe T, Sumiya J, Saguchi K, Sano Y, Nakano Y, Choi-Miura NH and Tomita M (1997): Cloning of the cDNA for a mouse homologue of human PHBP: a novel hyaluronan-binding protein. *Biol.Pharm.Bull.* 20:11: 1127-1130.
- Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U, Wolburg H and Betsholtz C (2001): Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J.Cell Biol.* 153:3: 543-553.

- Hoff PM & Machado KK (2012): Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer. *Cancer Treat.Rev.* 38:7: 825-833.
- Hoppe B, Tolou F, Radtke H, Kiesewetter H, Dorner T and Salama A (2005): Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease is associated with idiopathic venous thromboembolism. *Blood* 105:4: 1549-1551.
- Hsu SM & Raine L (1981): Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J.Histochem.Cytochem.* 29:11: 1349-1353.
- Hsu SM, Raine L and Fanger H (1981): Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J.Histochem.Cytochem.* 29:4: 577-580.
- Huang SN, Minassian H and More JD (1976): Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Lab.Invest.* 35:4: 383-390.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R and Kabbinavar F (2004): Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N.Engl.J.Med.* 350:23: 2335-2342.
- Ireland H, Miller GJ, Webb KE, Cooper JA and Humphries SE (2004): The factor VII activating protease G511E (Marburg) variant and cardiovascular risk. *Thromb.Haemost.* 92:5: 986-992.
- Jeon JW, Song HS, Moon EJ, Park SY, Son MJ, Jung SY, Kim JT, Nam DH, Choi-Miura NH, Kim KW and Kim YJ (2006): Anti-angiogenic action of plasma hyaluronan binding protein in human umbilical vein endothelial cells. *Int.J.Oncol.* 29:1: 209-215.
- Jung YD & Ellis LM (2001): Inhibition of tumour invasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea. *Int.J.Exp.Pathol.* 82:6: 309-316.
- Jung YD, Kim MS, Shin BA, Chay KO, Ahn BW, Liu W, Bucana CD, Gallick GE and Ellis LM (2001): EGCG, a major component of green tea, inhibits tumour growth by inhibiting VEGF induction in human colon carcinoma cells. *Br.J.Cancer* 84:6: 844-850.
- Kamimura M, Bea F, Akizawa T, Katus HA, Kreuzer J and Viedt C (2004): Platelet-derived growth factor induces tissue factor expression in vascular smooth muscle cells via activation of Egr-1. *Hypertension* 44:6: 944-951.
- Kannemeier C, Al-Fakhri N, Preissner KT and Kanse SM (2004): Factor VII-activating protease (FSAP) inhibits growth factor-mediated cell proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *FASEB J.* 18:6: 728-730.
- Kannemeier C, Feussner A, Stohr HA, Weisse J, Preissner KT and Romisch J (2001): Factor VII and single-chain plasminogen activator-activating protease: activation and autoactivation of the proenzyme. *Eur.J.Biochem.* 268:13: 3789-3796.
- Kano MR, Morishita Y, Iwata C, Iwasaka S, Watabe T, Ouchi Y, Miyazono K and Miyazawa K (2005): VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis

through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling. *J.Cell.Sci.* 118:Pt 16: 3759-3768.

Kanse SM & Etscheid M (2011): Factor VII activating protease. Single nucleotide polymorphisms light the way. *Hamostaseologie* 31:3: 174-6, 177-8.

Kanse SM, Parahuleva M, Muhl L, Kemkes-Matthes B, Sedding D and Preissner KT (2008): Factor VII-activating protease (FSAP): vascular functions and role in atherosclerosis. *Thromb.Haemost.* 99:2: 286-289.

Kanse SM, Declerck PJ, Ruf W, Broze G and Etscheid M (2012): Factor VII–Activating Protease Promotes the Proteolysis and Inhibition of Tissue Factor Pathway Inhibitor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32:2: 427-433.

Katare RG & Madeddu P (2013): Pericytes from human veins for treatment of myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc.Med.* 23:3: 66-70.

Kawai K, Serizawa A, Hamana T and Tsutsumi Y (1994): Heat-induced antigen retrieval of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Pathol.Int.* 44:10-11: 759-764.

Kawamata H, Kawai K, Kameyama S, Johnson MD, Stetler-Stevenson WG and Oyasu R (1995): Over-expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP1 and TIMP2) suppresses extravasation of pulmonary metastasis of a rat bladder carcinoma. *Int.J.Cancer* 63:5: 680-687.

Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J and Connolly DT (1989): Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246:4935: 1309-1312.

Kim HK, Lee SY, Oh HK, Kang BH, Ku HJ, Lee Y, Shin JY, Hong YK and Joe YA (2003): Inhibition of endothelial cell proliferation by the recombinant kringle domain of tissue-type plasminogen activator. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 304:4: 740-746.

Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS and Ferrara N (1993): Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362:6423: 841-844.

Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K and Martin GR (1982): Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 21:24: 6188-6193.

Korpelainen EI & Alitalo K (1998): Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr.Opin.Cell Biol.* 10:2: 159-164.

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:5259: 680-685.

Langer R, Conn H, Vacanti J, Haudenschild C and Folkman J (1980): Control of tumor growth in animals by infusion of an angiogenesis inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:7: 4331-5.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV and Ferrara N (1989): Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246:4935: 1306-1309.

Lijnen HR (2005): Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J.Thromb.Haemost.* 3:1: 35-45.

Lindahl P & Betsholtz C (1998): Not all myofibroblasts are alike: revisiting the role of PDGF-A and PDGF-B using PDGF-targeted mice. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 7:1: 21-26.

Liotta LA & Stetler-Stevenson WG (1991): Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res.* 51:18 Suppl: 5054s-5059s.

Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM and Shafie S (1980): Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284:5751: 67-68.

Ma L, del Soldato P and Wallace JL (2002): Divergent effects of new cyclooxygenase inhibitors on gastric ulcer healing: Shifting the angiogenic balance *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99:20: 13243-13247.

MacIntyre N (2001): Unmasking antigens for immunohistochemistry. *Br.J.Biomed.Sci.* 58:3: 190-196.

Mambetsariev N, Mirzapozazova T, Mambetsariev B, Sammani S, Lennon FE, Garcia JG and Singleton PA (2010): Hyaluronic Acid binding protein 2 is a novel regulator of vascular integrity. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 30:3: 483-490.

Mandriota SJ & Pepper MS (1997): Vascular endothelial growth factor-induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J.Cell.Sci.* 110 (Pt 18):Pt 18: 2293-2302.

Matei D, Kelich S, Cao L, Menning N, Emerson RE, Rao J, Jeng MH and Sledge GW (2007): PDGF BB induces VEGF secretion in ovarian cancer. *Cancer.Biol.Ther.* 6:12: 1951-1959.

McDonald DM & Baluk P (2005): Imaging of angiogenesis in inflamed airways and tumors: newly formed blood vessels are not alike and may be wildly abnormal: Parker B. Francis lecture. *Chest* 128:6 Suppl: 602S-608S.

McGuire PG & Seeds NW (1989): The interaction of plasminogen activator with a reconstituted basement membrane matrix and extracellular macromolecules produced by cultured epithelial cells. *J.Cell.Biochem.* 40:2: 215-227.

Mignatti P & Rifkin DB (1993): Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol.Rev.* 73:1: 161-195.

Miller JW (1997): Vascular endothelial growth factor and ocular neovascularization. *Am.J.Pathol.* 151:1: 13-23.

Miller JW, Adamis AP and Aiello LP (1997): Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Metab.Rev.* 13:1: 37-50.

Min HY, Doyle LV, Vitt CR, Zandonella CL, Stratton-Thomas JR, Shuman MA and Rosenberg S (1996): Urokinase receptor antagonists inhibit angiogenesis and primary tumor growth in syngeneic mice. *Cancer Res.* 56:10: 2428-2433.

Mohanam S, Wang SW, Rayford A, Yamamoto M, Sawaya R, Nakajima M, Liotta LA, Nicolson GL, Stetler-Stevenson WG and Rao JS (1995): Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases: negative regulators of human glioblastoma invasion in vivo. *Clin.Exp.Metastasis* 13:1: 57-62.

Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R and Orci L (1986): Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 83:19: 7297-7301.

Mosher DF, Misenheimer TM, Stenflo J and Hogg PJ (1992): Modulation of fibrinolysis by thrombospondin. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 667: 64-69.

Muhl L, Nykjaer A, Wygrecka M, Monard D, Preissner KT and Kanse SM (2007): Inhibition of PDGF-BB by Factor VII-activating protease (FSAP) is neutralized by protease nexin-1, and the FSAP-inhibitor complexes are internalized via LRP. *Biochem.J.* 404:2: 191-196.

Nakamura M, Oida Y, Abe Y, Yamazaki H, Mukai M, Matsuyama M, Chijiwa T, Matsumoto H and Ueyama Y (2008): Thrombospondin-2 inhibits tumor cell invasion through the modulation of MMP-9 and uPA in pancreatic cancer cells. *Mol.Med.Report* 1:3: 423-427.

Nakazawa F, Kannemeier C, Shibamiya A, Song Y, Tzima E, Schubert U, Koyama T, Niepmann M, Trusheim H, Engelmann B and Preissner KT (2005): Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII-activating protease (FSAP). *Biochem.J.* 385:Pt 3: 831-838.

Nicosia RF & Villaschi S (1995): Rat aortic smooth muscle cells become pericytes during angiogenesis in vitro. *Lab.Invest.* 73:5: 658-666.

Norton AJ, Jordan S and Yeomans P (1994): Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J.Pathol.* 173:4: 371-379.

Novella-Maestre E, Herraiz S, Vila-Vives JM, Carda C, Ruiz-Sauri A and Pellicer A (2012): Effect of antiangiogenic treatment on peritoneal endometriosis-associated nerve fibers. *Fertil.Steril.* 98:5: 1209-1217.

Oh CW, Hoover-Plow J and Plow EF (2003): The role of plasminogen in angiogenesis in vivo. *J.Thromb.Haemost.* 1:8: 1683-1687.

O'Reilly M (1994): Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma *Cell* 79:2: 315 <last_page> 328.

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR and Folkman J (1997): Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88:2: 277-285.

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Cao Y, Moses M, Lane WS, Sage EH and Folkman J (1994): Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59: 471-82.

Ostman A & Heldin CH (2007): PDGF receptors as targets in tumor treatment. *Adv.Cancer Res.* 97: 247-274.

Paduch R & Kandefler-Szerszen M (2011): Expression and activation of proteases in co-cultures. *Exp.Toxicol.Pathol.* 63:1-2: 79-87.

Pan D (2013): Activation of p53 by Chemotherapeutic Agents Enhances Reovirus Oncolysis ONE Alerts.

Parahuleva MS, Kanse SM, Parviz B, Barth A, Tillmanns H, Bohle RM, Sedding DG and Holschermann H (2008): Factor Seven Activating Protease (FSAP) expression in human monocytes and accumulation in unstable coronary atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 196:1: 164-171.

Parahuleva MS, H^A, [^]ouml, Ischermann H, Zandt D, Pons-K^A, [^]uuml, hneemann J, [^]ouml, rn, Parviz B, Weiskirchen R, Staubitz A, Tillmanns H, Erdogan A and Kanse SM (2012): Circulating Factor VII Activating Protease (FSAP) Is Associated With Clinical Outcome in Acute Coronary Syndrome *Circulation Journal* 76:11: 2653 <last_page> 2661.

Passaniti A, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, Pauly RR, Grant DS and Martin GR (1992): A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab.Invest.* 67:4: 519-528.

Patra D & Sandell LJ (2012; 2012): Antiangiogenic and anticancer molecules in cartilage *Expert Reviews in Molecular Medicine* 14:.

Paweletz N & Knierim M (1989): Tumor-related angiogenesis. *Crit.Rev.Oncol.* 9:3: 197-242.

Pellicer EM & Sundblad A (1994): Antigen retrieval by microwave oven with buffer of citric acid. *Medicina (B.Aires)* 54:2: 129-132.

Pili R, Guo Y, Chang J, Nakanishi H, Martin GR and Passaniti A (1994): Altered angiogenesis underlying age-dependent changes in tumor growth. *J.Natl.Cancer Inst.* 86:17: 1303-1314.

Plate KH, Breier G, Weich HA and Risau W (1992): Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 359:6398: 845-848.

Preissner KT, Kanse SM and May AE (2000): Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication. *Curr.Opin.Cell Biol.* 12:5: 621-628.

Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M and Ferrara N (1997): Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 57:20: 4593-4599.

Puchtler H & Meloan SN (1985): On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry* 82:3: 201-204.

Quyyumi AA, Diodati JG, Lakatos E, Bonow RO and Epstein SE (1993): Angiogenic effects of low molecular weight heparin in patients with stable coronary artery disease: a pilot study. *J.Am.Coll.Cardiol.* 22:3: 635-641.

Rabbany SY, Heissig B, Hattori K and Rafii S (2003): Molecular pathways regulating mobilization of marrow-derived stem cells for tissue revascularization. *Trends Mol.Med.* 9:3: 109-117.

Raghu H, Lakka SS, Gondi CS, Mohanam S, Dinh DH, Gujrati M and Rao JS (2010): Suppression of uPA and uPAR attenuates angiogenin mediated angiogenesis in endothelial and glioblastoma cell lines. *PLoS One* 5:8: e12458.

Rao JS, Gondi C, Chetty C, Chittivelu S, Joseph PA and Lakka SS (2005): Inhibition of invasion, angiogenesis, tumor growth, and metastasis by adenovirus-mediated transfer of antisense uPAR and MMP-9 in non-small cell lung cancer cells. *Mol.Cancer.Ther.* 4:9: 1399-1408.

Ravina JH, Aymard A, Ciraru-Vigneron N, Ledreff O and Merland JJ (2000): Arterial embolization of uterine myoma: results apropos of 286 cases. *J.Gynecol.Obstet.Biol.Reprod.(Paris)* 29:3: 272-275.

Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Ekblom P, Kemler R and Doetschman T (1988): Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 102:3: 471-478.

Roedel EK, Schwarz E and Kanse SM (2013): The factor VII-activating protease (FSAP) enhances the activity of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *J.Biol.Chem.* 288:10: 7193-7203.

Roemisch J, Feussner A, Nerlich C, Stoehr HA and Weimer T (2002): The frequent Marburg I polymorphism impairs the pro-urokinase activating potency of the factor VII activating protease (FSAP). *Blood Coagul.Fibrinolysis* 13:5: 433-441.

Romisch J (2002): Factor VII activating protease (FSAP): a novel protease in hemostasis. *Biol.Chem.* 383:7-8: 1119-1124.

Romisch J, Feussner A, Vermohlen S and Stohr HA (1999a): A protease isolated from human plasma activating factor VII independent of tissue factor. *Blood Coagul.Fibrinolysis* 10:8: 471-479.

Romisch J, Vermohlen S, Feussner A and Stohr H (1999b): The FVII activating protease cleaves single-chain plasminogen activators. *Haemostasis* 29:5: 292-299.

Romisch J, Vermohlen S, Feussner A and Stohr H (1999c): The FVII activating protease cleaves single-chain plasminogen activators. *Haemostasis* 29:5: 292-299.

Schor AM, Allen TD, Canfield AE, Sloan P and Schor SL (1990): Pericytes derived from the retinal microvasculature undergo calcification in vitro. *J.Cell.Sci.* 97 (Pt 3):Pt 3: 449-461.

Schor AM, Canfield AE, Sloan P and Schor SL (1991): Differentiation of pericytes in culture is accompanied by changes in the extracellular matrix. *In Vitro Cell.Dev.Biol.* 27A:8: 651-659.

Schor AM, Canfield AE, Sutton AB, Arciniegas E and Allen TD (1995): Pericyte differentiation. *Clin.Orthop.Relat.Res.* (313):313: 81-91.

Schuler PJ, Bendszus M, Kuehnel S, Wagner S, Hoffmann TK, Goldbrunner R and Vince GH (2012): Urokinase plasminogen activator, uPAR, MMP-2, and MMP-9 in the C6-glioblastoma rat model. *In Vivo* 26:4: 571-576.

Sedding D, Daniel JM, Muhl L, Hersemeyer K, Brunsch H, Kemkes-Matthes B, Braun-Dullaues RC, Tillmanns H, Weimer T, Preissner KT and Kanse SM (2006a): The G534E polymorphism of the gene encoding the factor VII-activating protease is associated with cardiovascular risk due to increased neointima formation. *J.Exp.Med.* 203:13: 2801-2807.

Sedding D, Daniel JM, Muhl L, Hersemeyer K, Brunsch H, Kemkes-Matthes B, Braun-Dullaues RC, Tillmanns H, Weimer T, Preissner KT and Kanse SM (2006b): The G534E polymorphism of the gene encoding the factor VII-activating protease is associated with cardiovascular risk due to increased neointima formation. *J.Exp.Med.* 203:13: 2801-2807.

Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB and Mignatti P (1998): Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J.Cell Biol.* 141:7: 1659-1673.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS and Dvorak HF (1983): Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219:4587: 983-985.

Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Boocock CA, Brown KD and Smith SK (1993): Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta *J.Reprod.Fertil.* 99:2: 609-615.

Shi SR, Key ME and Kalra KL (1991): Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J.Histochem.Cytochem.* 39:6: 741-748.

Shia C, Suresh G, Hou Y, Lin Y, Chao PL and Juang S (2011): Suppression on metastasis by rhuarbarb through modulation on MMP-2 and uPA in human A549 lung adenocarcinoma: An ex vivo approach. *J.Ethnopharmacol.* 133:2: 426-433.

Shibamiya A, Muhl L, Tannert-Otto S, Preissner KT and Kanse SM (2007): Nucleic acids potentiate Factor VII-activating protease (FSAP)-mediated cleavage of platelet-derived growth factor-BB and inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation. *Biochem.J.* 404:1: 45-50.

Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J and Klagsbrun M (1984): Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 223:4642: 1296-1299.

Shweiki D, Itin A, Soffer D and Keshet E (1992): Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:6398: 843-845.

Sopata I & Dancewicz AM (1974): Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochim.Biophys.Acta* 370:2: 510-523.

Sottile J (2004): Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochim.Biophys.Acta* 1654:1: 13-22.

Stavenuiter F, Dienava-Verdoold I, Boon-Spijker MG, Brinkman HJ, Meijer AB and Mertens K (2012): Factor Seven Activating Protease (FSAP): does it Activate Factor VII? *J.Thromb.Haemost.*

Stephan F, Hazelzet JA, Bulder I, Boermeester MA, van Till JO, van der Poll T, Willemin WA, Aarden LA and Zeerleder S (2011a): Activation of factor VII-activating protease in human inflammation: a sensor for cell death. *Crit.Care* 15:2: R110.

Stephan F, Hazelzet JA, Bulder I, Boermeester MA, van Till JO, van der Poll T, Willemin WA, Aarden LA and Zeerleder S (2011b): Activation of factor VII-activating protease in human inflammation: a sensor for cell death *Crit.Care* 15:2: R110.

Storti P, Bolzoni M, Donofrio G, Airoldi I, Guasco D, Toscani D, Martella E, Lazzaretti M, Mancini C, Agnelli L, Patrene K, Maiga S, Franceschi V, Colla S, Anderson J, Neri A, Amiot M, Aversa F, David Roodman G and Giuliani N (2013): Hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha suppression in myeloma cells blocks tumoral growth in vivo inhibiting angiogenesis and bone destruction. *Leukemia*.

Sun L, Tran N, Tang F, App H, Hirth P, McMahon G and Tang C (1998): Synthesis and biological evaluations of 3-substituted indolin-2-ones: a novel class of tyrosine kinase inhibitors that exhibit selectivity toward particular receptor tyrosine kinases. *J.Med.Chem.* 41:14: 2588-2603.

Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN and Yancopoulos GD (1996): Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87:7: 1171-1180.

Takahashi H & Shibuya M (2005): The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin.Sci.(Lond)* 109:3: 227-241.

Taylor CR, Shi SR, Chen C, Young L, Yang C and Cote RJ (1996): Comparative study of antigen retrieval heating methods: microwave, microwave and pressure cooker, autoclave, and steamer. *Biotech.Histochem.* 71:5: 263-270.

Taylor S & Folkman J (1982): Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* 297:5864: 307-312.

Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D and Bohlen P (1992): Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 187:3: 1579-1586.

Thorgeirsson UP, Yoshiji H, Sinha CC and Gomez DE (1996): Breast cancer; tumor neovasculature and the effect of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) on angiogenesis. *In Vivo* 10:2: 137-144.

Tille JC, Wood J, Mandriota SJ, Schnell C, Ferrari S, Mestan J, Zhu Z, Witte L and Pepper MS (2001): Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 antagonists inhibit VEGF- and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vivo and in vitro. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 299:3: 1073-1085.

Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ and Bouck N (1993): Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J.Cell Biol.* 122:2: 497-511.

Torlakovic E, Nielsen S and Vyberg M (2005): Antibody selection in immunohistochemical detection of cyclin D1 in mantle cell lymphoma. *Am.J.Clin.Pathol.* 124:5: 782-789.

Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76:9: 4350-4354.

Trojanek J (2012): Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Postepy Biochem.* 58:3: 353-362.

Trompet S, Pons D, Kanse SM, de Craen AJ, Ikram MA, Verschuren JJ, Zwinderman AH, Doevendans PA, Tio RA, de Winter RJ, Slagboom PE, Westendorp RG and Jukema JW (2011): Factor VII Activating Protease Polymorphism (G534E) Is Associated with Increased Risk for Stroke and Mortality. *Stroke Res.Treat.* 2011: 424759.

Vogl TJ, Zangos S, Balzer JO, Nabil M, Rao P, Eichler K, Bechstein WO, Zeuzem S and Abdelkader A (2007): Transarterial chemoembolization (TACE) in hepatocellular carcinoma: technique, indication and results. *Rofo* 179:11: 1113-1126.

Volpert OV, Tolsma SS, Pellerin S, Feige JJ, Chen H, Mosher DF and Bouck N (1995): Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-2. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 217:1: 326-332.

Werner M, Chott A, Fabiano A and Battifora H (2000): Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am.J.Surg.Pathol.* 24:7: 1016-1019.

Willeit J, Kiechl S, Weimer T, Mair A, Santer P, Wiedermann CJ and Roemisch J (2003): Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease: a prominent risk predictor of carotid stenosis. *Circulation* 107:5: 667-670.

Wygrecka M, Morty RE, Markart P, Kanse SM, Andreasen PA, Wind T, Guenther A and Preissner KT (2007): Plasminogen activator inhibitor-1 is an inhibitor of factor VII-activating protease in patients with acute respiratory distress syndrome. *J.Biol.Chem.* 282:30: 21671-21682.

Yamamichi S, Fujiwara Y, Kikuchi T, Nishitani M, Matsushita Y and Hasumi K (2011): Extracellular histone induces plasma hyaluronan-binding protein (factor VII activating protease) activation in vivo. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 409:3: 483-488.

Yatomi Y, Ruan F, Hakomori S and Igarashi Y (1995): Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood* 86:1: 193-202.

Zangos S, Gille T, Eichler K, Engelmann K, Woitaschek D, Balzer JO, Mack MG, Thalhammer A and Vogl TJ (2001): Transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinomas: technique, indications, results. *Radiologe* 41:10: 906-914.

10. Publikationsverzeichnis

Oral Präsentation:

S. Rentala, J. M. Daniel, Ö. Uslu, K. T. Preissner, D. Sedding, S. M. Kanse. (2007) The urokinase system regulates the mobilization, homing and differentiation of progenitor cells into endothelial cells. (Abstract) ISTH Congress 2007 Geneva, J Thromb Haemost

Poster Präsentation:

S. Rentala, Ö. Uslu, L. Muhl, K. T. Preissner, S. M. Kanse. (2007) Factor VII activating protease (FSAP) inhibits vascular endothelial growth factor-mediated progenitor cell homing and differentiation into endothelial cells. (Abstract) ISTH Congress 2007 Geneva, J Thromb Haemost

S. M. Kanse, Ö. Uslu, K. Hersemeyer, L. Muhl, J. M. Daniel, K. T. Preissner, D. Sedding. (2007) Factor VII activating protease (FSAP) inhibits the urokinase plasminogen activation system and stimulates gelatinases (matrix metalloproteinases-2 and -9) in vascular smooth muscle and endothelial cells. (Abstract) ISTH Congress 2007 Geneva, J Thromb Haemost

J.-M. Daniel, K. Hersemeyer, Ö. Uslu, O. Rannou, L. Muhl, K. T. Preissner, D.G. Sedding, S. M. Kanse (2009) Factor VII activating protease (FSAP) alters the pericellular proteolysis balance in the vessel wall during neointima formation. (Poster Presentation) XXXI Congress of the European Society of Cardiology, Barcelona, Spain

J.-M. Daniel, Ö. Uslu, K. Hersemeyer, O. Rannou, L. Muhl, K. T. Preissner, D.G. Sedding, S. M. Kanse (2009) Factor VII activating protease (FSAP); a key regulator of pericellular proteolysis. (Poster Presentation) XXII Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis, Boston, U.S.A.

Weitere Präsentationen, die nicht mit der Doktorarbeit verbunden sind:

Ö. Uslu, Ch. Chen, R.B. Bretzel, Th. Linn (2007) Matrix metalloproteinase (MMP) and urokinase-type plasminogen activator (uPA) expression in pancreatic beta cells. (Poster Presentation) 18th EASD Islet Study Group Symposium, Brussels, Belgium.

Ö. Uslu, Ch. Chen, R.B. Bretzel, K.T. Preissner, Th. Linn (2008) Proteinase expression in pancreatic beta cells and therapeutical implications for islet transplantation. (Poster Presentation) 52. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, Wiesbaden, Germany.

11. Erklärung

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Özgür Uslu

12. Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen recht herzlich, die mich während meiner Doktorarbeit in jeder Hinsicht sowohl wissenschaftlich als auch menschlich unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Klaus T. Preissner danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Bereitstellung des Themas und die stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Sandip M. Kanse danke ich für die sehr gute, professionelle Betreuung und die immerwährende wissenschaftliche Unterstützung. Er war und ist immer noch sehr hilfsbereit und immer für mich ansprechbar gewesen.

Frau Dr. K. Hersemeyer und Frau Dr. A. Shibamiya bin ich für die professionelle Einarbeitung und Unterstützung sehr dankbar. Bei Frau Dr. Hersemeyer bedanke ich mich für die Hilfe bei den Immunfluoreszenzexperimenten und Frau Dr. Shibamiya bei der professionellen Gestaltung der Vorträge.

Dipl.-Ing. Susanne Tannert-Otto und Thomas Schmidt-Wöll danke ich ebenfalls recht herzlich für die sehr gute Einarbeitung, Unterstützung und die dauernde Bereitschaft für fruchtbare Diskussionen.

Bärbel Fühler danke ich für die gute Betreuung und Durchführung der Tierexperimente. Danke auch an Dr. Lars Muhl, Judith Schmitz und Katrin Möser. Für die praktische Unterstützung danke ich ebenfalls Prof. Dr. Thomas Linn und seiner Arbeitsgruppe,

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, einerseits meinen Eltern und Schwiegereltern, die mich jederzeit in jeder Hinsicht unterstützt haben, andererseits meiner tollen Frau Fatma für soviel Liebe, Geduld, Unterstützung und die täglichen, abwechslungsreichen Abendessen nach einem stressigen Arbeitsalltag. Lieben Dank noch an meine Tochter Feyza, die mir geholfen hat, kinderleicht Stress abzubauen.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**