

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München

komm. Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

und

aus der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik

des Klinikums rechts der Isar

der Technischen Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Markus Schwaiger

**Untersuchungen zur Identifizierung und
funktionellen Charakterisierung von Peptiden
als selektive Liganden der extrazellulären
Matrix in soliden Tumoren**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der
Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Jan Müller

aus

Würzburg

Jahr

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Markus Essler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Friedrich - Wilhelm Kreth

Prof. Dr. Barbara Walzog

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 17.05.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Tumor-Angiogenese	1
1.2	Die Basalmembran	6
1.2.1	Funktion	9
1.3	Kollagene	10
1.3.1	Struktur der Kollagene	11
1.3.2	Genetik des Kollagen IV	15
1.3.3	Biosynthese des Kollagen IV	17
1.4	Matrix-Metalloproteasen	19
1.4.1	Struktur und Aufbau der Matrix-Metalloproteasen.....	21
1.4.2	Regulation/Genetik der Matrix-Metalloproteasen	25
1.4.3	Endogene Inhibition der aktivierten Matrix-Metalloproteasen	30
1.4.4	Matrix-Metalloproteasen in der Pathophysiologie.....	32
1.5	Der M13-Phage	36
1.6	Phage-Display	39
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	42
2	Material und Methoden	43
2.1	Material	43
2.1.1	Geräte	43
2.1.2	Chemikalien	45
2.1.2.1	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	47
2.1.2.2	Enzyme	50
2.1.2.3	Kits.....	50
2.1.2.4	verwendeter Bakterienstamm.....	51
2.1.2.5	Der Vektor M13KE.....	51
2.1.2.6	Oligonukleotide.....	54
2.1.2.7	chemisch synthetisierte Oligopeptide	55
2.2	Methoden.....	56
2.2.1	<i>In vitro</i> Kultivierung von eukaryontischen Zellen	56
2.2.2	Versuchstiere, Haltung, Anästhesie und Euthanasie	57
2.2.3	Herstellung Tumor tragender Mäuse.....	59
2.2.4	Zymogramm	59
2.2.5	Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen.....	60
2.2.6	Arbeiten mit Phagen.....	61
2.2.6.1	Beschichten von Mikrotiterplatten.....	61
2.2.6.2	Herstellung eines Phagen-Stocks	62
2.2.6.3	Phagen-Amplifikation.....	63
2.2.6.4	Titerbestimmung der Phagen	64
2.2.6.5	Phagen Selektion <i>in vivo</i>	65
2.2.6.6	Phagen Selektion <i>in vitro</i>	66
2.2.6.7	Test der Bindung der Phagen an unterschiedliche Matrices	67
2.2.6.8	Phagen-Biodistribution	67

2.2.7	Arbeiten mit chemisch synthetisierten Oligopeptiden	68
2.2.7.1	Kompetitive Inhibition der Bindung des TLTYTWS-Phagen an MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV <i>in vitro</i>	68
2.2.7.2	Inhibition der Akkumulation des TLTYTWS-Phagen im Gewebe eines LLC-Tumors <i>in vivo</i>	69
2.2.7.3	Nachweis der Endothelzell-Differenzierung mittels Tube-Formation Assay.....	69
2.2.7.4	Nachweis der Angiogenese <i>in vivo</i> mittels Matrigel-Plug-Assay.....	70
2.2.8	Arbeiten mit DNA	71
2.2.8.1	Isolierung von Phagen-DNA.....	71
2.2.8.2	Bestimmung des DNA-Gehalts	73
2.2.8.3	Ethanol-Fällung der DNA	74
2.2.8.4	Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente	74
2.2.8.5	Extraktion von DNA aus Agarosegelstücken	75
2.2.8.6	Restriktionsspaltung von DNA	76
2.2.8.7	Annealing von Oligonukleotiden.....	77
2.2.8.8	Ligation von DNA	78
2.2.8.9	Transformation von Bakterien	78
2.2.8.10	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	79
2.2.9	Berechnung und statistische Analyse der Versuchsergebnisse	80
2.2.9.1	Berechnung des output/input Quotienten der Phagen-Experimente.....	80
2.2.9.2	Berechnung der halbmaximalen Inhibitorkonzentration (IC ₅₀).....	81
2.2.9.3	Statistische Analysen	81
3	Ergebnisse	83
3.1	Identifizierung und Charakterisierung eines Phagen, welcher selektiv an MMP 2 modifiziertem humanen Kollagen IV in Tumorgewebe bindet	83
3.1.1	<i>In vitro/in vivo</i> Phagen-Display.....	83
3.1.1.1	Ermittlung der Oligopeptidsequenz der Phagen einzelner Plaques	91
3.1.2	Der TLTYTWS-Phage bindet spezifisch an Matrix- Metalloprotease 2 modifiziertes humanes Kollagen IV	92
3.1.3	Mutation der TLTYTWS-Sequenz.....	94
3.1.4	Anreicherung des TLTYTWS-Phagen im Tumorgewebe <i>in vivo</i> (tumor homing).....	98
3.2	Charakterisierung des chemisch synthetisierten TLTYTWS-Peptids.....	99
3.2.1	Inhibition der Bindung des TLTYTWS-Phagen an MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV durch ein chemisch synthetisiertes TLTYTWS-Peptid <i>in vitro</i>	99
3.2.2	Inhibition der Bindung des TLTYTWS-Phagen an das Tumorgewebe von LLC Tumor tragenden Maus durch ein chemisch synthetisiertes TLTYTWS-Peptid <i>in vivo</i>	101
3.2.3	Einfluss des TLTYTWS-Peptids auf die Endothelzell-Differenzierung.....	103
3.2.4	Einfluss des TLTYTWS-Peptids auf die Angiogenese.....	105
4	Diskussion	107
4.1	Die Angiogenese	109
4.1.1	Die physiologische Angiogenese	109

4.1.2	Die Tumor-Angiogenese	113
4.2	Die Tumor-Blutgefäße	117
4.3	Tumor-Blutgefäße als Zielstruktur für Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen	119
4.4	Peptide, die an Tumor-Blutgefäße binden.....	123
5	Ausblick	127
6	Zusammenfassung	133
7	Literaturverzeichnis.....	135
8	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	153
9	Lebenslauf	159
10	Vorveröffentlichungen	165
11	Danksagung	167

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Die Tumor-Angiogenese	5
Abbildung 2	verschiedene Arten der Basalmembran Organisation	6
Abbildung 3	Die Basalmembran	8
Abbildung 4	Bildung des Kollagen IV-Netzwerks	14
Abbildung 5	Schematische Darstellung der Gen-Lokalisation, Organisation und Genprodukte der sechs α -Ketten des humanen Kollagens IV	16
Abbildung 6	Die Domänenstruktur der humanen Matrix-Metalloproteasen	24
Abbildung 7	<i>Cis</i> - Elemente der Promotoren einiger humaner Matrix-Metalloproteasen	26
Abbildung 8	Der „Cystein-Switch“ Mechanismus der Matrix-Metalloproteasen	30
Abbildung 9	Die Proteine des M13 Bakteriophagen	36
Abbildung 10	Der Infektionszyklus des M13-Phagen	38
Abbildung 11	Vereinfachte Darstellung der <i>in vitro</i> Selektion von Phagen	40
Abbildung 12	Der von dem Bakteriophagen M13 abgeleitete Vektor M13KE	53
Abbildung 13	Exemplarische Darstellung eines Kasein-Zymogramms	61
Abbildung 14	Das kombinierte <i>in vivo/in vitro</i> Phage-Display	85
Abbildung 15	Ergebnis der Selektionsrunden des kombinierten <i>in vivo/in vitro</i> Phage-Display	87
Abbildung 16	Untersuchung der Bindungseigenschaften des Phagen-Pools der 2. und 3. Selektionsrunde	88
Abbildung 17	Bindungsverhalten von ausgewählten Phagen des Bindungstests des Phagen-Pools der 3. Selektionsrunde	90
Abbildung 18	Bindung des TLTYTWS-Phagen und eines Kontrollphagen an unterschiedliche Kollagen-Matrices, MMP 2 und BSA	93
Abbildung 19	Amplifikate der PCR	96
Abbildung 20	Bindung von Phagen mit rekombinant veränderten Varianten der Oligopeptidsequenz TLTYTWS an MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV	97
Abbildung 21	Biodistribution des TLTYTWS-Phagen im Vergleich zu dem GLGYGWS- Phagen (Kontrollphage) in LLC Tumor tragenden Mäusen	98
Abbildung 22	Kompetition der Bindung des TLTYTWS-Phagen an durch MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV durch das chemisch synthetisierte TLTYTWS-Oligopeptid	100
Abbildung 23	Kompetitive Inhibition der Anreicherung des TLTYTWS-Phagen im LLC Tumorgewebe durch das TLTYTWS-Oligopeptid	102
Abbildung 24	Inhibition der Bildung von tubulären Strukturen von HUVEC-Zellen durch das TLTYTWS-Oliogopeptid	104
Abbildung 25	Inhibition der Angiogenese durch das TLTYTWS-Oligopeptid <i>in vivo</i>	106

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Einteilung von Kollagen-Typen entsprechend ihrer Superstruktur.....	10
Tabelle 2 Die Matrix-Metalloproteasen 1, 2, 8 und 9 und ihrer Substrate.....	20
Tabelle 3 Die Konsensus-Sequenz der Spaltstellen der Matrix-Metalloproteasen 2 und 9	22
Tabelle 4 Erkrankungen, welche im Zusammenhang mit einer vermehrten, verminderten oder abnormalen Angiogenese stehen.....	35

1 Einleitung

Tumorerkrankungen sind die zweithäufigste Todesursache in Deutschland und den USA. Jeder dritte Europäer entwickelt im Laufe seines Lebens einen malignen Tumor (Rat der Europäischen Union, 2008). In Deutschland erkrankten im Jahre 2004 436.500 Menschen neu an Krebs, davon 230.500 Männer und 206.000 Frauen. Die häufigsten Tumorlokalisationen sind bei Männern Prostata, Darm und Lunge bei Frauen Brustdrüse, Darm und Lunge (Batzler *et al.*, 2008). Die Zellen eines malignen Tumors zeichnen sich unter anderem durch eine hohe Teilungsrate aus. Dadurch weisen Tumorzellen einen erhöhten Sauerstoff- und Nährstoffbedarf auf (Liotta *et al.*, 2000). Eine Zunahme des Tumorgewebes und die Metastasierung von Tumorzellen sind nur durch Zugang zum Blutgefäßsystem des Körpers möglich. Dazu werden aus bereits bestehenden Gefäßen neue Gefäße durch Sprossung gebildet. Dieser Vorgang wird als Tumor-Angiogenese bezeichnet (Folkman, 1971). Ein wichtiger Schritt der Angiogenese ist die Spaltung von Kollagen IV, welches ein Hauptbestandteil der vaskulären Basalmembran ist, durch spezielle Enzyme unter anderem der Matrix-Metalloprotease 2. Dabei werden bisher verborgene, kryptische Bindungsstellen für Endothelzellen freigelegt (Xu *et al.*, 2001).

1.1 Die Tumor-Angiogenese

Die Angiogenese ist der Prozess der Gefäßneubildung ausgehend von bereits existierenden Blutgefäßen. Im Unterschied dazu wird die Bildung von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen, den Angioblasten, während der Embryonalentwicklung als Vaskulogenese bezeichnet (Risau, 1997). Die Angiogenese spielt sowohl bei physiologischen Vorgängen als auch bei Erkrankungen eine Rolle.

Kennzeichnend für Tumorzellen ist die maligne Transformation, die die autonome Zellteilung ermöglicht, welche nicht den Regulationsmechanismen des Körpers unterworfen ist. Diese autonome Zellteilung führt zu einem unkontrollierten Zellwachstum. Zur tumorigenen Transformation von Zellen kann es durch die zell-autonome Anhäufung von Mutationen der zellulären DNA kommen. Durch Ausschalten der endogenen Zellzyklus-Kontrolle, der DNA-

Schäden Kontrollpunkte (checkpoints) und durch externe Wachstumsinhibitionssignale kommt es zu einer fortlaufenden Proliferation der Zellen.

Durch Verringerung der Aktivität von Tumor-Suppressorgenen und der Apoptose regulierenden Gene findet kein programmierter Zelltod statt (Ruegg *et al.*, 2007).

Zellen benötigen zum Wachstum Sauerstoff und Nährstoffe, welche durch Blutgefäße bzw. durch Diffusion aus diesen Gefäßen zu ihnen gelangen können. Tumorzellen haben auf Grund ihres unkontrollierten Zellwachstums einen erhöhten Sauerstoff- und Nährstoffbedarf. Bis zu einer Größe von etwa $0,125 \text{ mm}^2$ kann sich das Tumorgewebe jedoch durch Diffusion mit den notwendigen Nährstoffen versorgen (Liotta *et al.*, 2000). Auf Grund der fehlenden Blutversorgung kommt es innerhalb der Tumormasse sowohl zum Zellwachstum als auch zur Zellnekrose oder Apoptose. Dadurch nimmt die Tumormasse insgesamt nicht zu und der Tumor verbleibt in einer Art Ruhezustand, welche auch als „tumor dormancy“ bezeichnet wird. Dieses Tumore werden als avaskulär bezeichnet, welche klinisch meist erst bei Autopsien festgestellt werden (Wicki *et al.*, 2008).

Damit die Tumorzellen überleben, das umliegende Gewebe invadieren und metastasieren können, benötigen sie den Kontakt zum Blutgefäßsystem. Dieser Zugang zum Gefäßsystem wird durch eine Neubildung von Blutgefäßen ermöglicht, der Tumor-Angiogenese (Folkman, 1971). Damit es dazu kommt, erfolgt in den Tumorzellen ein „angiogenic switch“, welcher die Balance zwischen pro- und anti-angiogener Faktoren zu Gunsten pro-angiogener Faktoren verschiebt. Der angiogenic switch kann durch metabolischem Stress, wie die Hypoxie, mechanischem Stress, entzündliche Prozesse oder weitere Genmutationen der Tumorzellen verursacht werden (Carmeliet *et al.*, 2000; Rundhaug, 2005). Die Tumorzellen kommen durch fehlenden Sauerstoff und fehlenden Nährstoffen in metabolischen Stress. Es kommt zur Hypoxie der Zellen. Dabei akkumuliert der „Hypoxia-inducible factor-1a“ (HIF-1a) und gelangt in den Zellkern, wo er die Transkription von Genen, unter anderem von Wachstumsfaktoren wie VEGF oder FGF, induziert. Durch diese Wachstumsfaktoren kann auch die Apoptose der Zellen verhindert werden (Abb. 1) (Acker *et al.*, 2008). Außerdem konnte eine Beteiligung von MMP 2 und 9 an dem „Angiogenic switch“, dem Entstehen eines angiogenen Phänotyps, nachgewiesen werden (Fang *et al.*, 2000).

Die Tumor-Angiogenese erfolgt nun unter anderem durch Sprossung neuer Gefäße aus bereits vorhandenen Blutgefäßen (Carmeliet *et al.*, 2000; Ribatti *et al.*, 2007).

Ein wichtiger Initiator der Angiogenese durch Sprossung sind die in das Tumor-Stroma eingewanderten Immunzellen. Sie sezernieren unter anderem die Wachstumsfaktoren VEGF und HGF und die Matrix-Metalloproteasen 2 und 9 (Lorusso *et al.*, 2008). Weiterhin werden

Wachstumsfaktoren sowohl durch Tumorzellen als auch durch Zellen des Tumor-Stromas ausgeschüttet.

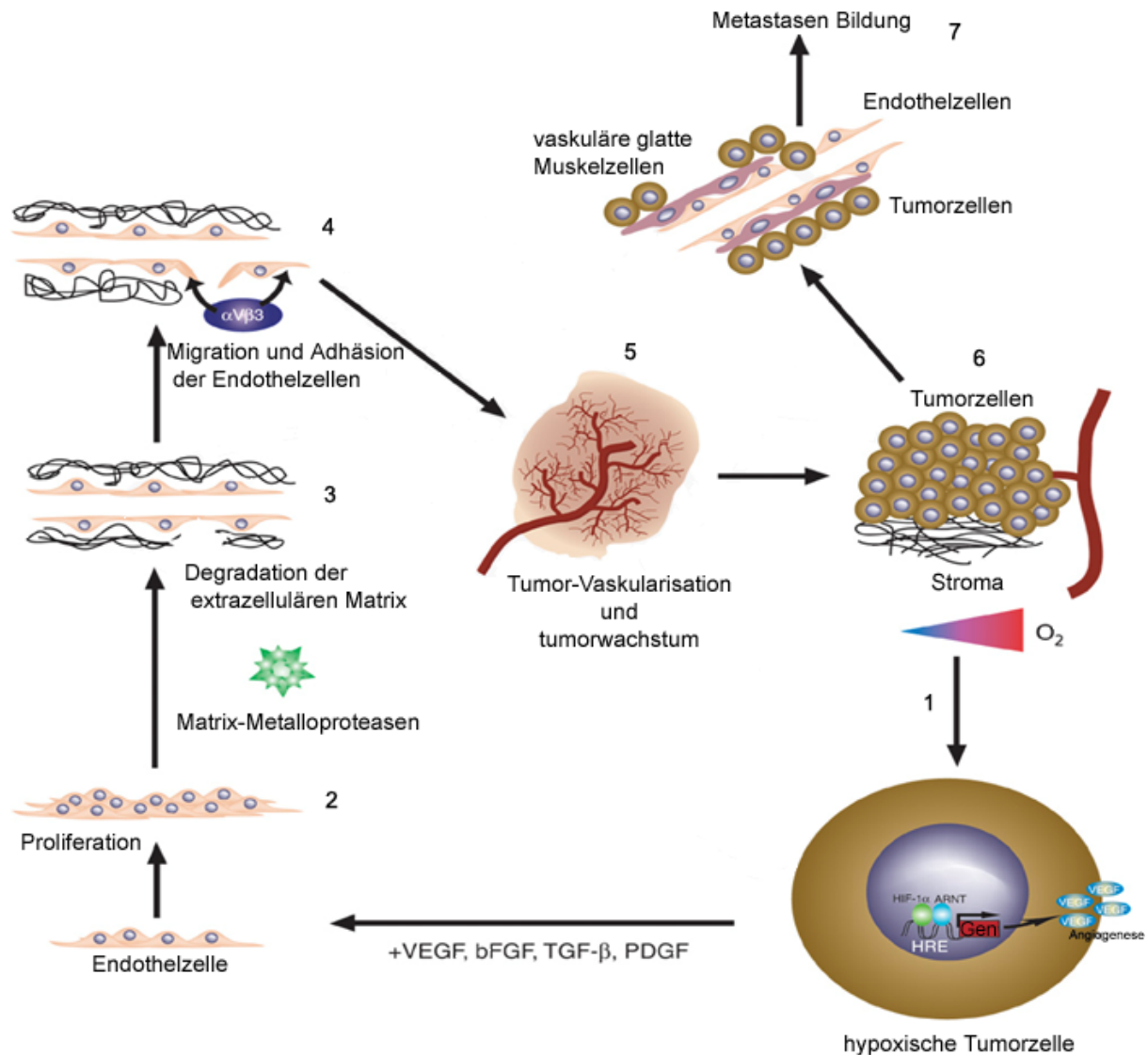
Diese Wachstumsfaktoren, insbesondere VEGF, gelangen durch Diffusion zu den Endothelzellen benachbarter Blutgefäße und aktivieren diese. Die Bindung des VEGF an den VEGF-Rezeptor 2 führt zur Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase und zur Phosphorylierung des an den zytoplasmatischen Anteil des VE-Cadherins gebundenen β -Katenins. Das phosphorylierte β -Katenin wandert in den Zellkern. Dadurch verliert das VE-Cadherin seine Funktion der Zell-Zell Bindung. Es kommt so zur Permeabilisierung der Endothelzellbarriere (Cavallaro, 2008; Ferrara, 2008).

Die von den Tumorzellen und den Zellen des Tumorstromas sezernierten Wachstumsfaktoren bilden von dem Tumor zu dem umliegenden Gewebe einen Gradienten aus. Diesem Gradienten können die Endothelzellen chemotaktisch folgen. Zunächst erfolgt jedoch die Aktivierung bzw. Ausschüttung von Proteasen, welche die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix lysieren. Eine Familie der dort beteiligten Proteasen sind die Matrix-Metalloproteasen. Zur Lyse der Basalmembran werden insbesondere die MMPs 2 und 9 benötigt (Milkiewicz *et al.*, 2006). Die Matrix-Metalloprotease 9 ist verantwortlich für die Aktivierung der in der Basalmembran gebundenen Wachstumsfaktoren. So wird an Heparin gebundenes VEGF freigesetzt und gelangt in die Zirkulation. Dies führt unter anderem zur Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (Seandel *et al.*, 2008). Durch sezernierte Matrix-Metalloproteasen können aus Bestandteilen der Basalmembran wie dem Kollagen IV antiangiogene Fragmente, z.B. Tumstatin oder Arrestin, freigesetzt werden. Diese Proteasen werden nicht nur von den Tumorzellen, sondern auch von den umgebenden nicht transformierten Zellen, dem Tumor-Stroma, ausgeschüttet (Wicki *et al.*, 2008). Weiterhin enthalten Fragmente des Fibronektins RGD-Motive, welche durch die Bindung an $\alpha\beta$ 3-Integrine die Migration induzieren können (Werb *et al.*, 1989). Neben diesen Fragmenten werden aber auch bisher verborgene Bereiche des Kollagens IV freigelegt. Diese Bereiche enthalten ebenfalls Migrationssignale für Endothelzellen (Davis *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001; Hangai *et al.*, 2002; Roth *et al.*, 2006).

Neben diesen Fragmenten entstehen auch antiangiogen wirkende Fragmente, jedoch überwiegen hier die proangiogenen Signale. Nach der Proteolyse der Basalmembran erfolgt die Spaltung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie dem Kollagen I, z.B. durch die Matrix-Metalloproteasen 3 und 8. In die sich bildende Lücke in der Basalmembran wandern Endothelzellen chemotaktisch dem Wachstumsfaktorgradienten folgend ein. Zur Migration benötigen die Zellen Bindungsstellen in der Matrix, welche unter anderem durch bisher

verborgene Bereiche des Kollagen IV zur Verfügung gestellt werden, die erst durch Prozessierung durch MMPs aktiviert werden (Roth *et al.*, 2006).

Durch die Bindung und Aktivierung von Integrinen der Endothelzellen an die Matrix, insbesondere den Integrinen $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_2\beta_1$, wird die Zellmigration und das Überleben der Endothelzellen ermöglicht (Brooks *et al.*, 1996; Ruoslahti, 2002). Die Endothelzellen wandern in den Tumor ein und bilden ein Gefäßlumen. Perizyten können nun zur Stabilität des Gefäßes beitragen, sind jedoch nicht essentiell für die Angiogenese. Das Endothel der Tumorblutgefäße muss nicht ausschließlich aus Endothelzellen gebildet sein, es kann auch vollständig aus Tumorzellen oder einem Mosaik aus Endothel- und Tumorzellen bestehen. Diese Mosaikbildung, welche auch als vaskuläre Mimikry der Tumorzellen bezeichnet wird, führt zu einer fortbestehenden Permeabilisierung der Gefäße, was wiederum ein Überführen der Endothelzellen in einen Ruhezustand verhindert. Diese Endothel-Fenster bieten den Tumorzellen auch eine Gelegenheit, über den Blutweg zu metastasieren. Die vaskuläre Permeabilität ist jedoch in einzelnen Tumoren unterschiedlich und kann auch innerhalb eines Tumors variieren. Das Fehlen von negativen Regulatoren der Angiogenese hat auch Auswirkungen auf die Tumorgefäßarchitektur. Diese Gefäße haben keinen konstanten Durchmesser, enthalten eine Vielzahl von Verzweigungen und können gewunden sein. Dadurch entsteht ein ungeordneter Blutfluss, welcher zu einer inhomogenen Versorgung des gesamten Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen führt. So entstehen wiederum hypoxische Areale, die eine weitere Angiogenese induzieren können. Zudem kann Hypoxie zu einer klonalen Vermehrung von Zellen führen, die die Apoptoseregulation verloren haben. Eine weitere Eigenschaft von Tumoren ist das Fehlen eines funktionellen Lymphsystems. Neu geformte Lymphgefäße, die den Abfluss von Gewebeflüssigkeit im Interzellularraum ermöglichen, werden vermutlich von den wachsenden Tumorzellen komprimiert. Im Gegensatz dazu kommt es durch die Sekretion von VEGF-C im umgebenden Gewebe des Tumors zu einer Vergrößerung von Lymphgefäßen. Diese vergrößerten Lymphgefäße nehmen die interstitielle Flüssigkeit und Tumorzellen auf und transportieren sie zum nächsten Lymphknoten. Auf diese Weise ist eine Lymphknotenmetastasierung erklärbar (Carmeliet *et al.*, 2000; Ruoslahti, 2002; Ribatti *et al.*, 2007).

**Abbildung 1**

Die Tumor-Angiogenese

Die Tumor-Angiogenese erfolgt in mehreren Schritten.

1 Durch Fehlen der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung werden die Tumorzellen hypoxisch. Durch Akkumulation von HIF-1 α und Fusion mit ARNT im Zellkern wird die Transkription von Genen von Angiogenesefaktoren, wie VEGF, bFGF und PDGF, gesteigert. Dadurch kommt es zum „angiogenic switch“.

2 Die sezernierten Wachstumsfaktoren bewirken eine Proliferation von vaskulären Endothelzellen.

3 Durch die Interaktionen der Tumor-, Stroma- und Endothelzellen werden Matrix-Metalloproteasen sekretiert und aktiviert, welche die extrazelluläre Matrix proteolytisch abbaut.

4 Die Matrix-Degradation ermöglicht die Migration und Adhäsion von vaskulären Endothelzellen in Richtung der Tumorzellen.

5 Es kommt in der Folge zur Vaskularisierung des Tumors. Dies ermöglicht ein weiteres Tumorwachstum.

6 Bedingt durch das unkontrollierte Tumorwachstum gibt es innerhalb des Tumors neue hypoxische Bereiche.

7 Die Tumorzellen haben nun Kontakt zum Blutgefäßsystem und können hämatogen metastasieren.

(modifiziert nach Sigma-Aldrich).

1.2 Die Basalmembran

Die Basalmembran ist eine 50 bis 100 nm dicke Schicht eines Komplexes extrazellulärer Matrixproteine und grenzt Zellen vom umgebendem Bindegewebe ab. Sie umgibt Muskelzellen, Epithelzellen oder Schwann-Zellen, welche das Myelin der Axone bilden. Im Glomerulus der Niere bildet sie eine Permeabilitätsbarriere zwischen Blut und Urin. Im Blutgefäßsystem liegt die Basalmembran unterhalb der Endothelzellschicht und grenzt die Endothelzellen von darunterliegenden Muskelzellen ab (Abb. 2) (Leblond *et al.*, 1989; Alberts *et al.*, 2004).

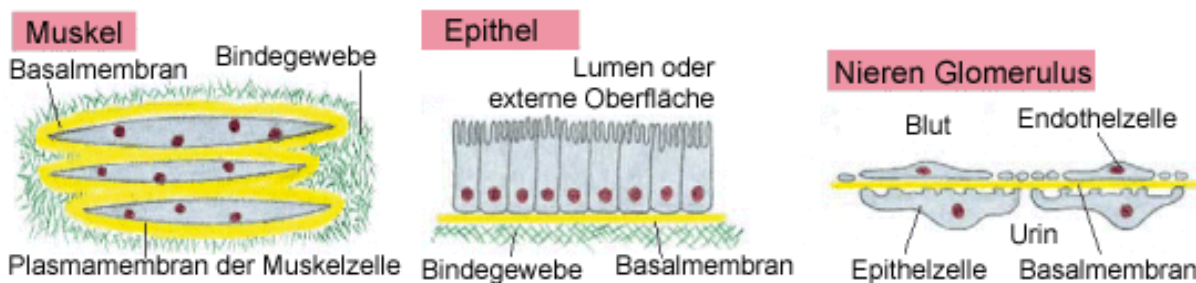


Abbildung 2

verschiedene Arten der Basalmembran Organisation

Die Basalmembran (gelb) umgibt Zellen wie etwa Muskelzellen, grenzt Epithelien von dem darunterliegenden Bindegewebe oder zwei Zelltypen voneinander ab, wie im Glomerulus der Niere. Zu beachten ist jedoch, dass im Glomerulus sowohl die Endothelzellen als auch die Epithelzellen Lücken bilden. Hier wirkt die Basalmembran als semipermeable Barriere, welche den Übertritt von Molekülen aus dem Blut in den Urin steuern kann. (modifiziert nach Alberts *et al.*, 2004)

Die Basalmembran setzt sich aus Kollagen IV, den Glykoproteinen Laminin und Nidogen, welches auch als Entactin bezeichnet wird, und dem Heparansulfat-Proteoglykan Perlecan zusammen. Bei einigen vielschichtigen Epithelien wird die Basalmembran durch Fibrillen des Kollagens VII verankert. Außer in der Niere hat das Kollagen IV die Zusammensetzung $[\alpha 1(\text{IV})]_2 [\alpha 2(\text{IV})]_1$ (Olsen *et al.*, 1999; Alberts *et al.*, 2004; LeBleu *et al.*, 2007). In der Basalmembran sind eine Vielzahl weiterer Komponenten wie Agrin, Fibulin, Osteonectin, Kollagen XV und Kollagen XVIII in geringeren Mengen enthalten. Dadurch ergibt sich eine Gewebespezifität und Heterogenität der Basalmembranen in verschiedenen Organen (LeBleu *et al.*, 2007).

Das Kollagen IV bildet durch Multimerisierung und laterale Assoziation der Kollagen-Monomere eine planare, netzartige Struktur mit einer Seitenlänge von 170 nm aus (Yurchenco *et al.*, 1984). Dieses Kollagen-Netz wird durch Bindung an die Integrine $\alpha1\beta1$ und $\alpha1\beta2$ der sezernierenden Zelle verankert (Kuhn, 1995; Olsen *et al.*, 1999).

Laminine sind Heterotrimere, die aus je einer α -, β - und γ -Kette bestehen. Diese Ketten sind durch Disulfidbrücken zu einer asymmetrischen, kreuzähnlichen Struktur verbunden. Laminine bilden durch einen Prozess der Selbst-Aggregation ebenfalls eine netzförmige Struktur in der Basalmembran aus. Auch Laminine sind an Integrine und andere Rezeptoren der Zelloberfläche gebunden.

Die Kollagen IV- und Laminin-Netzwerke werden durch Perlecan und Nidogen miteinander verbunden (Abb. 3) (Alberts *et al.*, 2004; LeBleu *et al.*, 2007).

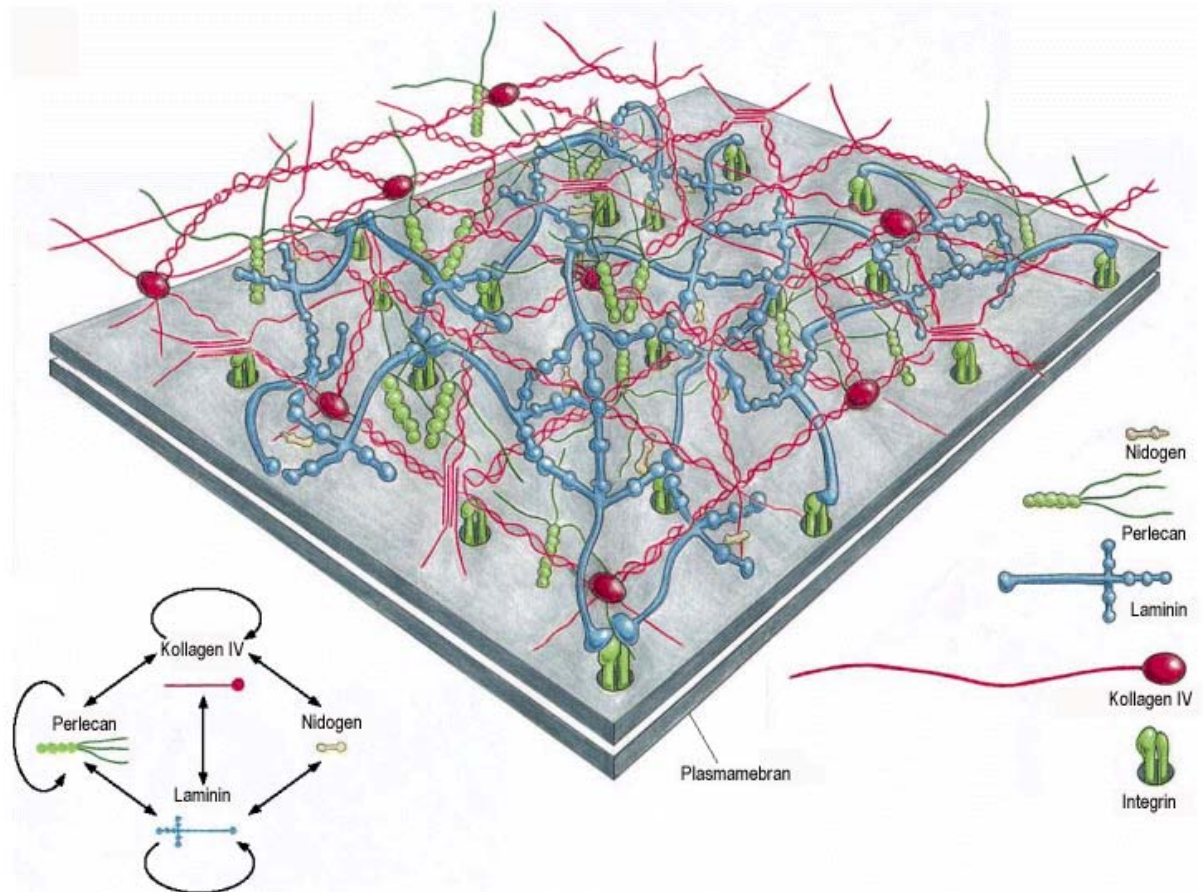


Abbildung 3

Die Basalmembran

Die Basalmembran wird durch Kollagen IV und Laminin Netzwerke gebildet, welche auch die Hauptbestandteile der Basalmembran darstellen. Beide Netzwerke werden durch Nidogen und Perlecan miteinander verbunden. Sowohl die Laminine als auch das Kollagen IV sind über ihre Bindung an Integrine mit der Plasmamembran der Zellen verbunden.

(modifiziert nach Alberts *et al.*, 2004).

1.2.1 Funktion

Die Basalmembran dient den Endothelzellen der Blutgefäße als Untergrund. Die Proteine der vaskulären Basalmembran sind dort mit ruhenden, wachstumsinhibierten Endothelzellen assoziiert. Diese Wachstumsinhibition wird unter anderem durch das in der Basalmembran enthaltene Thrombospondin 1 vermittelt (Rodriguez-Manzaneque *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2005).

Weiterhin sind die Laminine und Heparansulfat-Proteoglykane der Basalmembran in der Lage, Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie VEGF oder FGF, zu binden. Dadurch wird erreicht, dass diese Faktoren ihr angiogenes Potenzial nicht entfalten können und nur während der Angiogenese freigesetzt werden (Sottile, 2004; Davis *et al.*, 2005; Hallmann *et al.*, 2005).

Die Proteine der Basalmembran enthalten multiple Bindungsstellen für Zelladhäsionsmoleküle. Durch die Bindung dieser Zelloberflächenrezeptoren an Basalmembranproteine werden intrazelluläre Signalwege initiiert, welche das Verhalten der Zelle beeinflussen. So können beispielsweise die zelluläre Differenzierung und die Zellmigration gefördert oder inhibiert werden (LeBleu *et al.*, 2007).

Weiterhin befinden sich am N-Terminus des $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$ Kollagen-Moleküls Bindungsstellen für die Integrine $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$, welche eine antiangiogene Wirkung haben. Das im Kollagen IV Molekül vorkommende Arg-Gly-Asp (RGD) Aminosäuremotiv, welches mit den Integrinen $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$ interagiert, ist auf Grund der helikalen Struktur erst nach proteolytischer Spaltung zugänglich (Kuhn, 1995; Giancotti *et al.*, 1999). Daneben gibt es in der dreidimensionalen Struktur des Kollagens weitere verborgene Bindungsstellen, die erst durch Proteolyse des Kollagens zugänglich werden. Der Antikörper HUIV26 bindet an eine solche kryptische Bindungsstelle und ist in der Lage, die Angiogenese negativ zu beeinflussen (Xu *et al.*, 2001). Neben dem Kollagen sind kryptische Bindungsstellen auch bei den Matrixbestandteilen Laminin und Fibronectin nachgewiesen worden (Schenk *et al.*, 2003).

1.3 Kollagene

Kollagene bilden eine Familie extrazellulärer Proteine mit gleichen strukturellen Eigenschaften. Es sind 27 verschiedene Kollagene mit 42 verschiedenen Polypeptid-Ketten bekannt, deren Gene auf 15 Chromosomen verteilt sind. Weiterhin enthalten 20 Proteine kollagene Anteile, ohne dass diese Proteine zu den Kollagenen gerechnet werden. Generell bestehen Kollagene aus 3 Polypeptid-Ketten, den α -Strängen. Sie enthalten sich wiederholende Aminosäuremotive der Form Gly-X-Y, wobei X und Y jede beliebige Aminosäure außer Glycin sein kann. Diese Stränge bilden eine Tripelhelix. An der X-Position ist häufig Prolin anzutreffen. An der Y-Position hingegen findet sich häufig 4-Hydroxyprolin. Diese beiden Aminosäuren tragen zur Stabilität der Helix bei. Das Glycin hingegen passt auf Grund seiner Größe in das Zentrum der Helix. Neben Prolin und Hydroxyprolin sind ebenfalls Lysin und 3-Hydroxylysin häufig anzutreffen (Olsen *et al.*, 1999).

Kollagene werden wegen ihrer supramolekularen Struktur in 8 Gruppen eingeteilt (Tab.1).

Kollagen-Typ	Superstruktur
I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII	Fibrillen
IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII	Fibrillen-assoziiert (FACIT (Fibril associated collagens with interrupted tripelhelices))
IV	Netzwerk bildend, Basalmembran
VIII, X	hexagonale Netzwerke bildend
VI	perlenschnurförmige Filamente
VII	Verankerungsfibrillen
XIII, XVII, XXIII, XXV	Transmembrane Kollagene (Typ II Transmembranprotein)
XV, XVIII	Multiplexin (Multiple triple helix and interruptions)

Tabelle 1

Einteilung von Kollagen-Typen entsprechend ihrer Superstruktur
(modifiziert nach Birk *et al.*, 2005)

Im menschlichen Körper sind die Kollagene I, II, III und IV am häufigsten vorhanden. Den Hauptanteil an dem Gesamtkollagen-Gehalt hat das Kollagen I mit 90%. Es ist ein fibrilläres Kollagen, welches in der Haut, den Sehnen und den Bändern vorkommt. Dies sind Strukturen, wo eine große Reißfestigkeit gegeben sein muss. Das fibrilläre Kollagen II ist insbesondere im Knorpel, den Bandscheiben und im Rückenmark anzutreffen. Das Kollagen III, welches ebenfalls fibrillär ist, findet sich an den gleichen Stellen wie das Kollagen I. Das Kollagen IV dagegen bildet den Hauptbestandteil der Basalmembran von Blutgefäßen und der Niere. Es ist nicht fibrillär, sondern wabenförmig als Netzwerk angeordnet (Voet D. *et al.*, 2002; Alberts *et al.*, 2004).

1.3.1 Struktur der Kollagene

Die Kollagene werden durch jeweils 3 α -Ketten gebildet, die sich in Form einer rechtsgängigen Tripelhelix umeinanderwinden, wobei die einzelnen α -Ketten selbst linksgängige Helices bilden. Ein Kollagenmolekül kann sich aus 3 gleichen oder aus unterschiedlichen α -Ketten zusammensetzen. Die Kollagene II und III sind beispielsweise Homotrimere, welche aus 3 gleichen α -Stränge bestehen und als $[\alpha 1(\text{II})]_3$ bzw. $[\alpha 1(\text{III})]_3$ bezeichnet werden. Die Kollagene I und IV jedoch sind Heterotrimere. Kollagen I hat die Zusammensetzung $[\alpha 1(\text{I})]_2 \alpha 2(\text{I})$. Kollagen IV, weist je nach Lokalisation eine andere α -Ketten Zusammensetzung auf. Das Kollagen IV der ubiquitär vorkommenden vaskulären Basallamina bildet sich aus 2 $\alpha 1(\text{IV})$ Ketten und einer $\alpha 2(\text{IV})$ Kette. Die α -Ketten $\alpha 3(\text{IV})$ - $\alpha 6(\text{IV})$ kommen in spezialisierten Basallaminae, wie in der Niere, vor. Die glomeruläre Basalmembran der Niere besteht aus $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$ und $\alpha 5(\text{IV})$. Die $\alpha 6(\text{IV})$ Kette ist hingegen in der epidermalen Basalmembran, in der Bowmanschen Kapsel und den renalen distalen Tubuli der Niere, aber nicht in der glomerulären Basalmembran vorhanden. Die genaue Zusammensetzung der jeweiligen Kollagen IV-Spezies in der Niere ist nicht bekannt, jedoch wird vermutet, dass $\alpha 3(\text{IV})$ und $\alpha 4(\text{IV})$ Heterotrimere bilden. Es kommt auch eine Kombination zwischen $\alpha 3(\text{IV})$ und $\alpha 5(\text{IV})$ vor (Olsen *et al.*, 1999).

Wie oben beschrieben, weisen die einzelnen α -Ketten der Kollagene in ihrem helikalen Bereich ein typisches Gly-X-Y Aminosäure-Motiv auf, welches im Kollagen I über 300-mal wiederholt wird. An der Position X findet sich häufig Prolin (120 Reste pro $\alpha 1(\text{I})$ Kette), an der Position Y hingegen Hydroxyprolin (100 Reste pro $\alpha 1(\text{I})$ Kette) oder Hydroxylysin. Diese hydroxylierten Aminosäuren sind typisch für Kollagene.

Bei fibrillären Kollagenen findet sich, im Gegensatz zu anderen, keine Unterbrechung dieser Aminosäureabfolge. Auf Grund der sterischen Gegebenheiten weist eine einzelne Windung der linksgängigen Helix 3,3 Aminosäurereste mit einer Ganghöhe von 1 nm auf. Diese Helix wird durch Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen dem Glycin und der Aminosäure an der X-Position stabilisiert und ist auf Grund der Proline und Hydroxyproline nicht flexibel. Dies erklärt auch die Notwendigkeit des Glycins an jeder dritten Position, da nur diese Aminosäure klein genug ist, um im Zentrum der Helix zu liegen zu kommen. Weiterhin werden die α -Ketten durch Glykosylierungen modifiziert. Zunächst wird das C-Propeptid N-glykosyliert. Der helikale Bereich wird durch O-Glykosylierung der Hydroxylysine verändert. Hier werden Galaktose und Glucose angefügt. Jedoch variiert der Grad der Glykosylierung von Kollagen zu Kollagen und hängt zusätzlich von der exprimierenden Zelle ab. Jeweils drei α -Ketten bilden eine Kollagen-Fibrille. Die Assoziation der α -Ketten beginnt durch Aneinanderlagerung der drei C-Propeptide und Bildung von Disulfidbrücken zwischen den Propeptiden. Die Ausbildung der helikalen Struktur ist jedoch nicht enzymatisch katalysiert. Vielmehr scheinen hydrophobe Wechselwirkungen die treibende Kraft zu sein. Die rechtsgängige suprahelikale Struktur wird durch Wasserstoffbrücken-Bindungen stabilisiert. Die Kollagen I-Tripelhelix weist 10 Gly-X-Y Einheiten pro Windung auf mit einer Ganghöhe von 8,61 nm (Voet D. *et al.*, 2002; Alberts *et al.*, 2004; Lodish H. *et al.*, 2008).

Durch die posttranslationale Hydroxylierung der Proline und Lysine weisen die Kollagene eine Denaturierungstemperatur von über 37°C auf (Olsen *et al.*, 1999; Voet D. *et al.*, 2002). Bei anderen Organismen, wie der Seegurke, ist der Anteil von Prolin und Hydroxyprolin deutlich geringer. Dies führt zu einer Denaturierungstemperatur von 23°C (Song *et al.*, 2006). Die nativen Kollagen-Fibrillen sind auf Grund ihrer dichten Struktur nur schwer durch Pepsin oder Trypsin spaltbar. Kollagene können jedoch durch spezialisierte Enzyme, wie die Matrix-Metalloproteasen, gespalten werden. So wurde bei Kollagen I spaltenden MMPs eine die Tripelhelix entwindende Funktion festgestellt (Chung *et al.*, 2004).

Das Kollagen IV ist im Gegensatz zu Kollagen I nicht fibrillär, sondern netzwerkartig aufgebaut. Daher unterscheidet sich der Aufbau im Vergleich zum oben beschriebenen Kollagen I. So sind Unterbrechungen der Tripelhelix im helikalen Bereich vorhanden. Weiterhin werden die N- und C-terminalen Propeptide nicht abgespalten.

Die ca. 1700 Aminosäuren umfassenden 420 nm langen α -Ketten des Kollagen IV unterteilen sich in 3 Domänen (Schwarz *et al.*, 1986).

Dies sind die 60 nm lange aminoternale cysteinreiche 7S-Domäne, welche dem N-terminalen Propeptid entspricht, dem 330 nm helikalen Bereich und der C-terminalen globulären NC-Domäne, welche dem carboxyterminalen Propeptid entspricht (Kuhn *et al.*, 1981; Macarak *et al.*, 1983). Im helikalen Bereich kommen bis zu 26 Unterbrechungen der Helix vor. Dies beruht vor allem auf dem Fehlen von Glycin an der entsprechenden Position im Motiv Gly-X-Y. Die Denaturierungstemperatur des Kollagen IV liegt jedoch auch oberhalb von 37°C, was durch einen hohen Hydroxylysin-Anteil und einer intensiven O-Glykosylierung erreicht wird. Die Bildung des tripelhelikalen Kollagen-Heterotrimer beginnt am C-Terminus (Soder *et al.*, 2004). Die Stabilität der Tripelhelix-Bildung wird durch Disulfidbrücken der NC-Domänen untereinander erhöht. Das so gebildete Kollagen IV Monomer ist ca. 300 nm lang. Durch kovalente Bindung mittels Disulfidbrücken zweier NC-Domänen entstehen Dimere. Im extrazellulären Raum bildet sich dann das Kollagen IV-Netzwerk aus. Die N-terminalen 7S-Domänen können durch Disulfidbrückenbildung miteinander in Kontakt treten. So kommt es zur Bildung von Dimeren und Tetrameren. Durch laterale Assoziationen der einzelnen Kollagen IV Monomere, durch Bildung superhelikaler Strukturen und durch Bildung von Disulfidbrücken der jeweiligen NC-Domänen entsteht ein blattartiges supramolekulares Aggregat, welches die Grundlage zur Assoziation weiterer Bestandteile der extrazellulären Matrix ist (Abb. 4) (Olsen *et al.*, 1999; Khoshnoodi *et al.*, 2008).

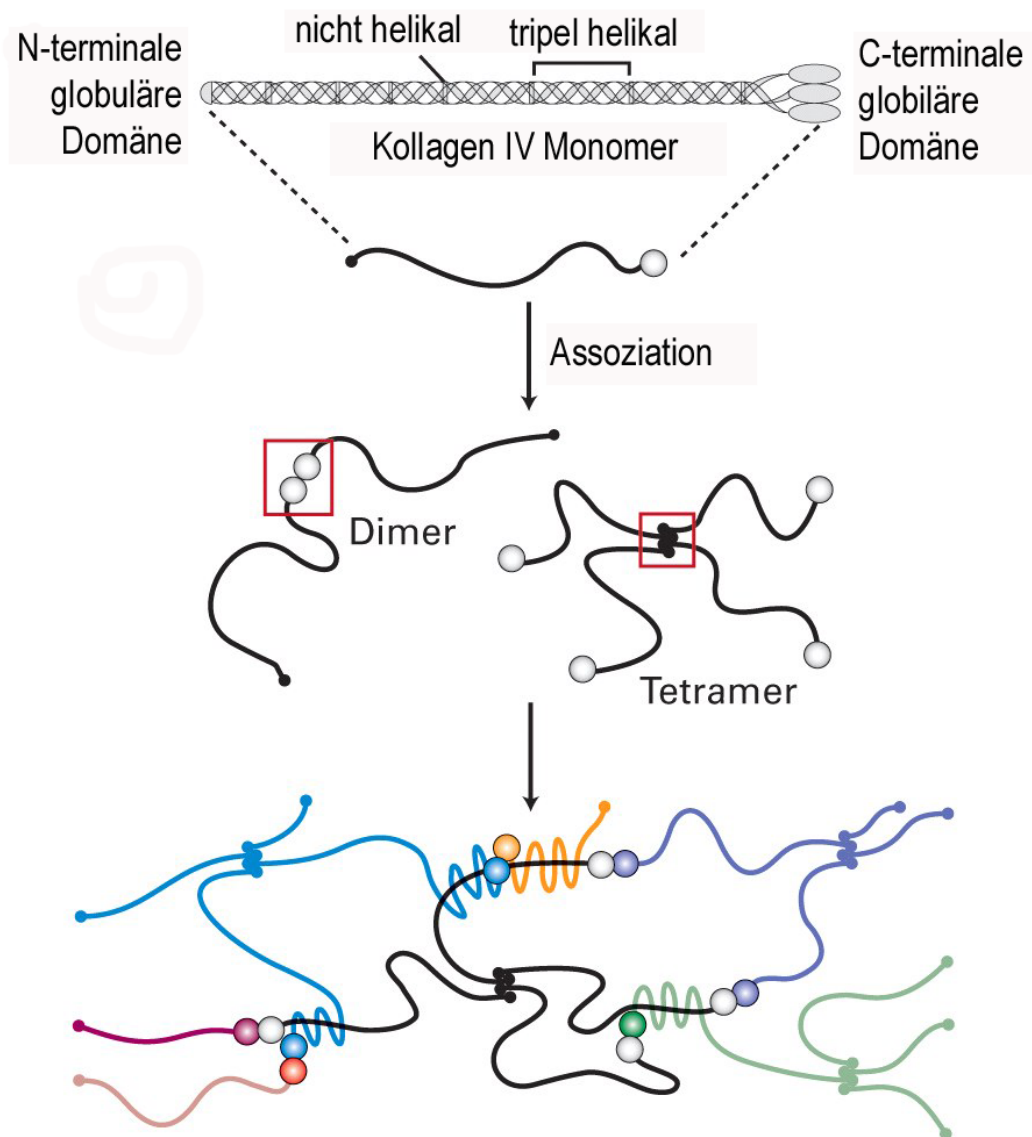


Abbildung 4

Bildung des Kollagen IV-Netzwerks

Das Kollagen IV-Netzwerk bildet sich zunächst durch Dimerisierung über die C-terminalen Domänen und Tetramerisierung durch Aneinanderlagerung der N-terminalen Domänen. Weiterhin kommt es zu einer lateralen Assoziation von Kollagen IV-Molekülen.

(modifiziert nach Lodish H. *et al.*, 2008)

1.3.2 Genetik des Kollagen IV

Die Gene der Kollagen IV α -Ketten befinden sich beim Menschen auf drei Chromosomen. Die Gene für die $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Ketten COL4A1 und COL4A2 befinden sich auf dem Chromosomenabschnitt 13q34. Sie bilden später das in der extrazellulären Matrix vorkommende Kollagen IV. Die Gene der Ketten $\alpha 3$ und $\alpha 4$, COL4A3 und COL4A4, befinden sich auf dem Chromosomenabschnitt 2q35-37 und die Gene der α -Ketten 5 und 6, COL4A5 und COL4A6, befinden sich auf dem Chromosomenabschnitt Xq22. Die Gene der α -Ketten auf einem Chromosomenabschnitt liegen sich in einer Kopf-zu-Kopf Anordnung einander gegenüber und sind durch einen Promotorbereich getrennt. Diese Promoterregion ist beispielsweise zwischen den Genen COL4A1 und COL4A2 127 bp lang (Abb. 5).

Bei den Genen COL4A5 und COL4A6 ist diese Region 452 bp lang und kann im Rahmen der Genregulation durch Hypermethylierung stillgelegt werden. Der Promoter selbst kann jedoch keine Transkriptionsaktivität initiieren. Jedes der beiden Gene enthält an der ersten Exon/Intron Grenze eine Aktivatorregion, die den Promotor in die entsprechende Richtung aktiviert. Weiterhin können Transkriptionsfaktoren an die *cis* agierenden Regulatorelemente der Promoterregion und der Aktivatorregionen binden (Maity *et al.*, 1988; Kuhn, 1995; Knippers, 2006; Tanjore *et al.*, 2006; Khoshnoodi *et al.*, 2008).

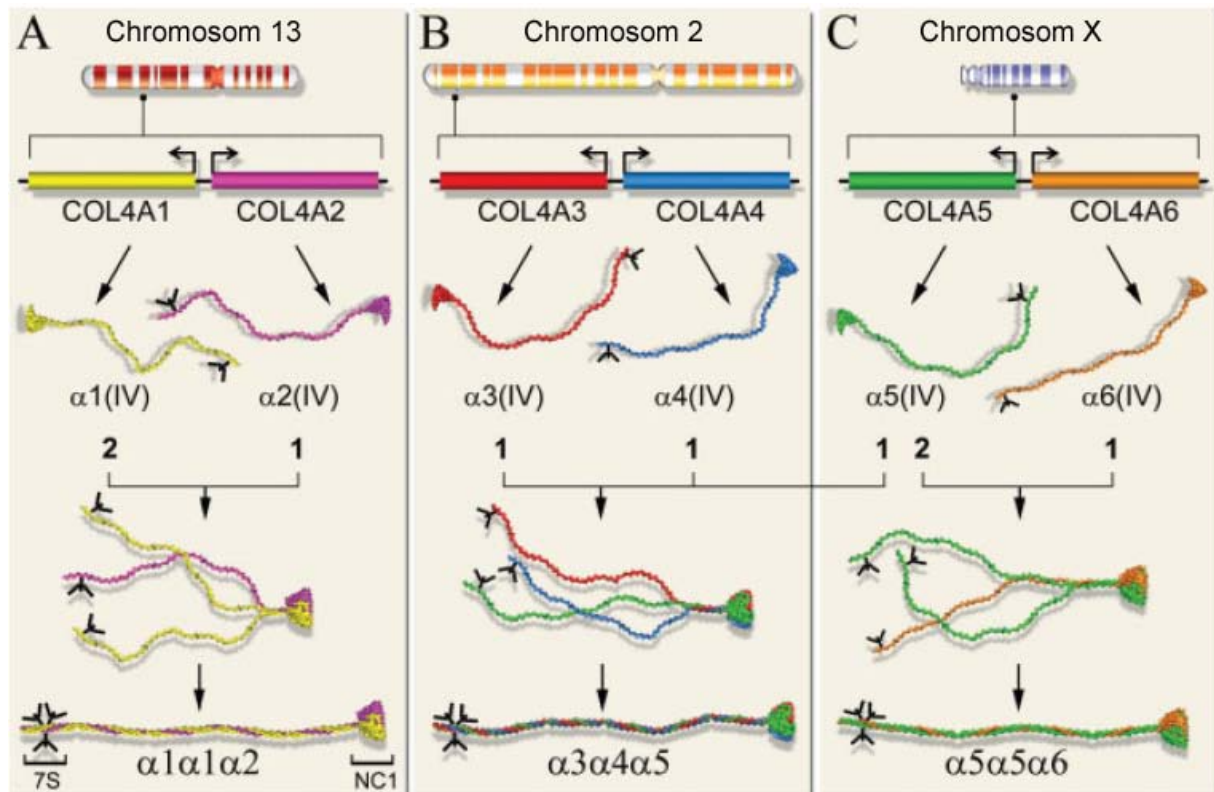


Abbildung 5

Schematische Darstellung der Gen-Lokalisation, Organisation und Genprodukte der sechs α -Ketten des humanen Kollagens IV

A Die Gene COL4A1 und COL4A2 liegen auf dem Chromosom 13 Kopf-zu-Kopf zueinander und sind durch einen kurzen Promotorbereich voneinander getrennt. Die Gene werden bidirektional transkribiert und ihre Genprodukte, die α -Ketten $\alpha 1$ [IV] und $\alpha 2$ [IV], beginnend mit der N-terminalen 7S-Domäne translatiert. Die 7S-Domäne enthält als einzige N-glykosidisch gebundene Oligosaccharide (Y). Der 7S-Domäne folgen die helikale Domäne und die carboxyterminale NC1-Domäne. Die Bildung des Heterotrimers beginnt an der NC1-Domäne und verläuft durch Bildung einer Tripel-Helix der kollagenen Domäne zur aminoterminalen 7S-Domäne.

B Hier sind die Gene COL4A3 und COL4A4 und ihre Genprodukte dargestellt. Die Bildung des triple-helikalen Protomers erfolgt wie unter **A** beschrieben.

C Hier sind die Gene COL4A5 und COL4A6 und ihre Genprodukte dargestellt. Die Bildung des triple-helikalen Protomers erfolgt wie unter **A** beschrieben.

Von den 56 potentiellen Heterotrimere wurden bisher nur drei spezifische Kombinationen: $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ und $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ *in vivo* gefunden.

(modifiziert nach Khoshnoodi *et al.*, 2008)

1.3.3 Biosynthese des Kollagen IV

Die Biosynthese des Kollagen IV ist, wie die der anderen Kollagene, ein komplexer Prozess mit mehreren ko- und posttranslationalen Modifikationen.

Die α -Kette eines Typ IV-Prä-Prokollagens besteht aus einer N-terminalen Signalsequenz, der nicht helikalen N-terminalen 7S-Domäne, dem helikalen Bereich und der nicht helikalen C-terminalen NC1-Domäne.

Das Prä-Prokollagen wird am rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) in das ER-Lumen synthetisiert. Nach Spaltung der Signalsequenz durch eine Signalpeptidase liegt das Kollagen-Monomer im ER-Lumen vor. Bereits kotranslational erfolgen erste Proteinmodifikationen. So wird ausschließlich die 7S-Domäne *N*-glykosyliert. Weiterhin erfolgt die Bindung des molekularen Chaperons HSP47 an das Prokollagen. HSP47 ist an der Translokation des Polypeptides in das ER-Lumen beteiligt, wobei es die unkontrollierte Faltung verhindert und die späteren Helices stabilisiert. Durch die Enzyme Prolyl-4-Hydroxylase, Prolyl-3-Hydroxylase und Lysyl-Hydroxylase werden Proline und Lysine im helikalen Bereich des Kollagen-Monomers hydroxyliert. Diese Hydroxylierung ermöglicht die *O*-Glykosylierung dieser Aminosäuren und erhöht die Denaturierungstemperatur des späteren Kollagens. Die Hydroxylasen benötigen als Kofaktoren Eisen-Ionen, 2-Oxoglutarat, molekularen Sauerstoff und Ascorbinsäure (Gelse *et al.*, 2003). Das Fehlen von Ascorbinsäure, wie bei der Vitamin C Mangelkrankung Skorbut, führt unter anderem zu instabilen Blutgefäßen. Die Konformation des Prolins wird durch eine Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase geändert, um eine Bildung der Helix zu ermöglichen. Durch verschiedene Transferasen erfolgt die *O*-Glykosylierung der 5-Hydroxylysine, wobei es zwischen einzelnen Kollagenen Unterschiede in der Anzahl der Glykosylierung gibt. Es werden dabei Disaccharide gebildet, welche aus Galaktose am Hydroxylysyl-Rest und Glukose bestehen.

Beginnend an der C-terminalen NC1-Domäne erfolgt im ER die Bildung der Tripelhelix durch Aneinanderlagerung von 3 α -Ketten. Dies wird durch die Chaperone GPR94 und Calnexin unterstützt. Durch die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) werden intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den N-terminalen 7S-Bereichen der Kollagen IV α -Ketten gebildet. Auch die NC1-Domänen der tripelhelikalen α -Stränge werden intermolekular kovalent miteinander verbunden. Hier findet sich eine S-hydroxy-lysyl-Methionin Bindung, eine Thioether-Bindung zwischen einem Methionin des einen Stranges und dem Lysyl-Rest des anderen Stranges. Weiterhin bindet das Protein SPARC, welches Eigenschaften eines molekularen Chaperons zeigt, an das tripelhelikale Kollagen IV.

Im Unterschied zu HSP47 gelangt SPARC in den extrazellulären Raum (Martinek *et al.*, 2007). Die Kollagen-Tripelhelices werden nun vesikulär vom ER zum Golgi-Apparat transportiert. Im cis-Golgi löst sich das HSP47 von dem Kollagen ab und gelangt, bedingt durch die C-terminale ER-Retentionssequenz KDEL, wieder in das ER-Lumen. Im Golgi-Apparat kann es bereits zur lateralen Aneinanderlagerung von Kollagen-Tripelhelices kommen, welche ebenfalls durch Disulfidbrücken stabilisiert werden können. Es folgt die Sekretion (Fessler *et al.*, 1985; Paulsson, 1992; Lamande *et al.*, 1999; Persikov *et al.*, 2002; Voet D. *et al.*, 2002; Alberts *et al.*, 2004; Myllyharju *et al.*, 2004; Khoshnoodi *et al.*, 2008; Lodish H. *et al.*, 2008).

1.4 Matrix-Metalloproteasen

Die Matrix-Metalloproteasen (MMPs) stellen eine Familie extrazellulärer, zinkabhängiger Kollagen spaltender Endopeptidasen dar, welche sowohl als lösliche als auch als membrangebundene Proteine vorliegen können. Zu den Substraten gehören neben den Kollagenen auch andere Proteine der extrazellulären Matrix, wie Laminine, Proteoglykane aber auch Proteine, die nicht Bestandteil der extrazellulären Matrix sind. Weitere kollagenolytische Enzyme sind die ADAM-Proteasen (A Disintegrin And Metalloprotease Domain) und die ADAMTS-Proteasen (A Disintegrin-like And Metalloprotease Domain mit ThromboSpondin type I Wiederholungen) (Somerville *et al.*, 2003).

Es sind derzeit 23 verschiedene humane MMPs bekannt. Charakteristisch ist der strukturelle Aufbau aus einem Signalpeptid, einer Pro-Domäne und einer katalytischen Domäne. Das Signalpeptid gewährleistet die Segregation des Proteins. Die Pro-Domäne ist für die Latenz der Protease verantwortlich, welche durch ein „cystein switch“-Motiv gewährleistet wird (Van Wart *et al.*, 1990). Die katalytische Domäne enthält ebenfalls ein konserviertes Sequenzmotiv, welches die Bindung des Zinkions ermöglicht. Die einzelnen MMPs können noch weitere Domänen aufweisen (Lemaitre *et al.*, 2006). Matrix-Metalloproteasen wurden auch bei anderen Organismen wie der Seegurke (Lepage *et al.*, 1990), *Drosophila melanogaster* (Llano *et al.*, 2000), Hydra (Leontovich *et al.*, 2000), dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Wada *et al.*, 1998), dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* (Stolow *et al.*, 1996), der Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* (Maidment *et al.*, 1999), der Sojabohne (McGeehan *et al.*, 1992) und der Grünalge *Clamydomonas reinhardtii* (Kinoshita *et al.*, 1992) nachgewiesen.

Auf Grund der Substratspezifität, der Organisation der Domänen und der Sequenzhomologien lassen sich die MMPs in 6 Gruppen unterteilen. Dies sind die Kollagenasen (MMP 1, 8 und 13), die Gelatinasen (MMP 2 und 9), die Stromelysine (MMP3 und 10), die Matrilysine (MMP7 und 26), die membrangebundenen MMPs (MMP 14, 15, 16, 17, 24 und 25) und die übrigen MMPs (MMP 11, 12, 19, 20, 21, 22, 23A, 23B und 28) (Lemaitre *et al.*, 2006). Im Folgenden sind die Substrate der MMPs 1, 2, 8 und 9 exemplarisch dargestellt (Tab. 2).

Protein Name	Alternative Namen	kollagene Substrate	nicht-kollagene extrazelluläre Matrix Substrate	nicht-strukturelle extrazelluläre Matrix Substrate
MMP-1	Kollagenase-1	Kollagen Typ I, II, III VII, VIII, X und Gelatine	Aggrecan, Kasein, Nidogen, Serpins, Versikan, Perlekan, Proteoglykan verknüpfte Proteine und Tenaskin	α_1 -Antichymotrypsin, α -Antitrypsin/ α_1 -Proteinase Inhibitor, IGF-BP3, IGFBP-5, -C IL-1 β , L-Selektin, Ovostatin, rekombinante TNF- α Peptide und SDF-1
MMP-2	Gelatinase-A	Kollagen Typ I, IV, V, VII, X, XI, XIV und Gelatine	Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Laminin Nidogen, Proteoglykan verknüpfte Proteine und Versican	aktive MMP-9, aktive MMP-13, FGF R1, IGF-BP3, IGF-BP5, IL-1 β , rekombinante TNF- α Peptide und TGF- β
MMP-8	Kollagenase-2	Kollagen Typ I, II, III, V VII, VIII, X, und Gelatine	Aggrecan, Laminin und Nidogen	α_2 -Antiplasmin und pro-MMP-8
MMP-9	Gelatinase-B	Kollagen Typ IV, V, VII X und XIV	Fibronectin, Laminin, Nidogen Proteoglykan verknüpfte Proteine und Versican	CXCL5, IL-1, IL2-R, Plasminogen, pro-TNF α , SDF-1 und TGF- β

Tabelle 2

Die Matrix-Metalloproteasen 1, 2, 8 und 9 und ihrer Substrate

Dargestellt sind hier die kollagenen, die nicht kollagenen, extrazellulären und die nicht-strukturellen extrazellulären Substrate der Matrix-Metalloproteasen 1, 2, 8 und 9

(modifiziert nach Somerville *et al.*, 2003)

1.4.1 Struktur und Aufbau der Matrix-Metalloproteasen

Die MMPs bestehen jeweils aus mindestens 3 Domänen. Es sind dies das Signalpeptid, die Prodomäne und die katalytische Domäne. Weitere Domänen, welche den MMPs 7, 23 und 26 fehlen, sind die Hinge-Region und die Hämapexin/Vitronektin ähnliche Domäne.

Das Signalpeptid bewirkt während der Translation des Proteins dessen Translokation zur Membran des rauhen endoplasmatischen Retikulums (ER) und die Synthese des Proteins in das Lumen des ER (Alberts *et al.*, 2004). Die Prodomäne ist verantwortlich für die Latenz der Protease. Sie besteht aus drei α -Helices und verbindenden Schleifen und liegt über dem katalytischen Zentrum des Enzyms. Zwischen den Helices 1 und 2 befindet sich eine protease-sensitive „Bait“ Region, welche für die Spaltung der Prodomäne wichtig ist. Die dritte Helix liegt über der Substratbindungsstelle der katalytischen Region und enthält einen konservierten Cysteinrest. Die Thiolgruppe dieses Cysteinrestes stellt den vierten Liganden des katalytischen Zink-Atoms dar und bewirkt so die Latenz der Protease. Diese Form der Aktivierung wird auch als „cysteine-switch“ Mechanismus bezeichnet und ist bei allen MMPs zu finden. Erst durch Spaltung der Prodomäne ist eine Aktivierung der MMPs möglich. Bei allen membrangebundenen MMPs und den MMPs 11 und 28 befindet sich zwischen der Prodomäne und der katalytischen Domäne eine Furin-Spaltstelle, welche eine Aktivierung dieser Proteasen während des sekretorischen Weges in der Zelle ermöglicht.

Die katalytische Domäne der Matrix-Metalloproteasen besteht aus einem fünf-strängigen β -Faltblatt, 3 α -Helices und verbindenden Schleifen. Hier sind ein katalytisches Zink-Atom, ein strukturelles Zink-Atom und 3 Kalzium-Ionen zu finden. Das aktive Zentrum wird durch ein β -Faltblatt, eine α -Helix und eine Schleifenregion, welche auf die α -Helix folgt, gebildet. Drei Histidine koordinieren das katalytische Zink-Atom. Bei dem aktivierten Enzym ist der vierte Ligand ein Wassermolekül. Im inaktiven Zustand ist der vierte Ligand ein Cystein-Rest des Propeptids. In die so gebildete katalytische Spalte bindet das zu spaltende Protein und die Carbonylgruppe der Peptidbindung koordiniert sich mit dem katalytischen Zinkatom, wodurch das Wassermolekül als vierter Ligand aus dem aktiven Zentrum entfernt wird. Die Hydrolyse der Peptidbindung wird durch die Carboxylgruppe eines Glutamatrestes unterstützt, welches ein Proton des verdrängten Wassermoleküls bindet und so den nukleophilen Angriff des Wassermoleküls auf den carbonylen Kohlenstoff der Peptidbindung ermöglicht. Eine Tasche neben dem aktiven Zentrum nimmt die Seitenkette des Peptidrestes des Substrates auf, welches den neuen N-Terminus des Proteins bildet.

Diese Tasche wird als Spezifitätstasche bezeichnet, da ihre Größe bei den einzelnen Proteasen unterschiedlich ist und so ein Faktor für die Bindung des geeigneten Substrates darstellt (Visse *et al.*, 2003).

Bei den MMPs 2 und 9 befinden sich vor dem aktiven Zentrum drei Fibronectin II Domänen. Jede dieser Domänen besteht aus zwei antiparallelen β -Faltblättern, welche durch eine kurze α -Helix verbunden sind. Die Domäne wird durch zwei Disulfid-Brückenbindungen stabilisiert. Die zweite und dritte Fibronectin II Domänen sind sehr flexibel und scheinen dadurch eine gleichzeitige Interaktion mit verschiedenen Stellen der extrazellulären Matrix zu ermöglichen (Morgunova *et al.*, 1999; Briknarova *et al.*, 2001). Es konnten potentielle Spaltstellen der MMPs 2 und 9 in ihren Substraten identifiziert werden (Tab.3).

	Konsensus Spaltstelle	Beispiel-Peptid
MMP-2, Gruppe I	PXX↓XHy	AKPRA↓LTA
II	I/LXX↓XHy	LRLA↓AITA
III	XHySX↓L	NRYS↓LTA
MMP-9, Gruppe I	PR(S/T)↓XHy(S/T)	KGPRQ↓ITA
II	XXG↓L(K/R)X	GSG↓LKA
III	XRR↓XHy(I/L)X	GRR↓LLSR

Tabelle 3

Die Konsensus-Sequenz der Spaltstellen der Matrix-Metalloproteasen 2 und 9

Dargestellt sind hier die Konsensus-Spaltstellen und ein Beispiel-Peptid der MMPs 2 und 9

(XHy = hydrophobe Aminosäure)

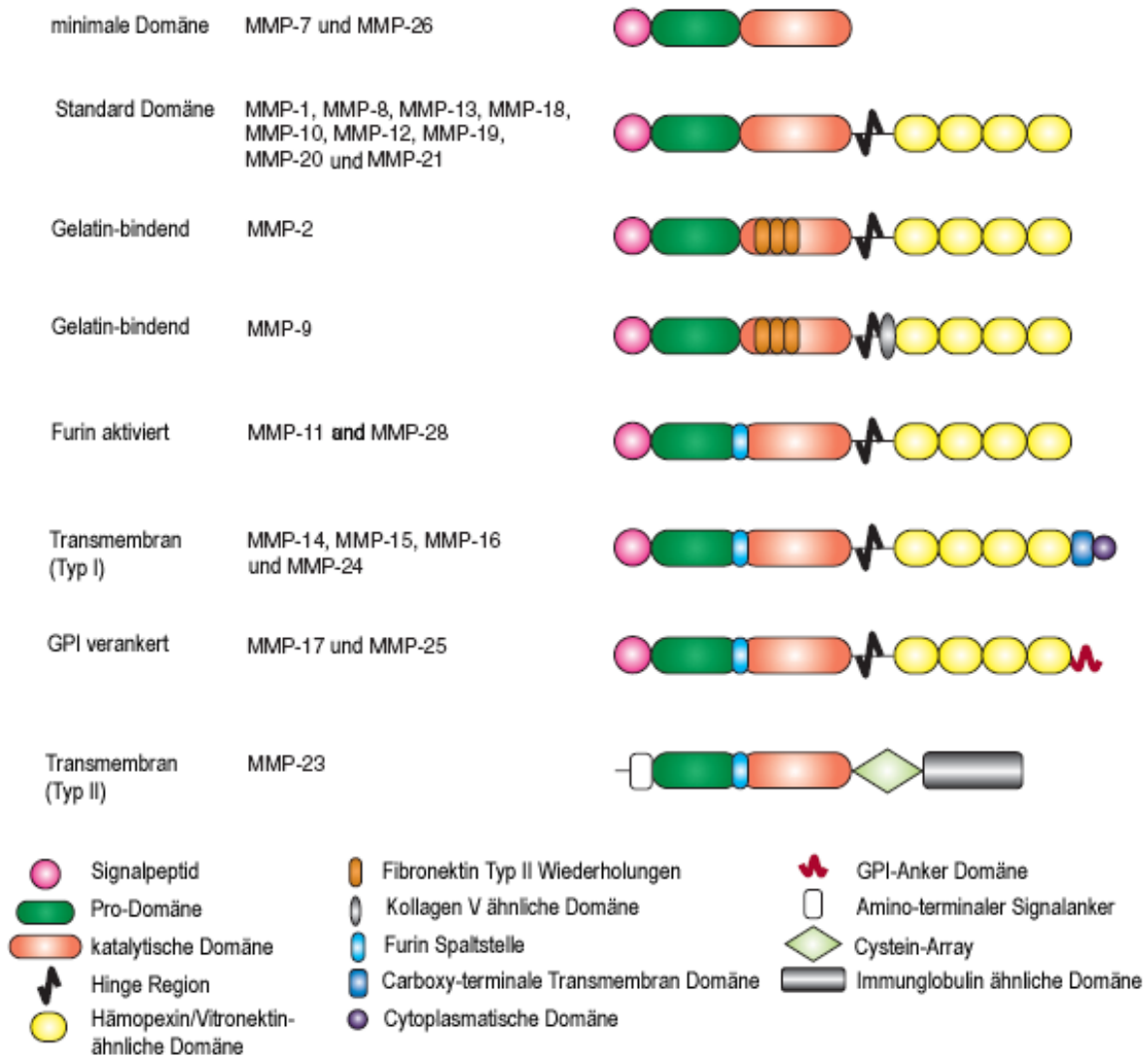
(modifiziert nach Kridel *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002).

Außer den MMPs 7, 23 und 26 verfügen alle Matrix-Metalloproteasen über eine Hämapexin/Vitronectin-Domäne, welche durch eine prolinreiche Hinge-Region mit der katalytischen Domäne verbunden ist (Somerville *et al.*, 2003). Die Hämapexin/Vitronectin-Domäne besteht aus einem 4 blättrigen β -Propeller, welcher durch eine Disulfid-Bindung zwischen den Blättern 1 und 4 stabilisiert wird. Diese Domäne dient der Substratspezifität und ist essenziell für die Aktivierung von proMMP2 und die Dimerisierung der MMPs 9 und 14 (Visse *et al.*, 2003). β -Propeller finden sich aber auch in anderen Proteinen, wie bei heterotrimeren G-Proteinen oder der α -Untereinheit der Integrine. Sie dienen vornehmlich der Protein-Protein-Interaktion (Smith *et al.*, 1999).

Bei MMP 9 befindet sich zwischen der Hinge-Region und der Hämopexin-Domäne eine Kollagen V-ähnliche Domäne, die sowohl *N*- als auch *O*-glykosyliert ist. Diese Domäne scheint der Stabilisierung und dem Schutz vor Degradation zu dienen (Ram *et al.*, 2006).

Bei den membrangebundenen Matrix-Metalloproteasen finden sich 3 Arten der Membranbindung. Die MMPs 14, 15, 16 und 24 sind Typ I-Transmembranproteine und verfügen daher über eine carboxy-terminale Transmembrandomäne und eine kleine zytoplasmatische Domäne. Wohingegen die MMPs 17 und 25 durch einen C-terminalen Glykosyl-Phosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) an die Zellmembran gebunden sind.

Die Matrix-Metalloprotease 23 ist ein Typ II-Transmembranprotein. Sie verfügt neben einem N-terminalen Signalanker über eine cysteinreiche Region und eine Immunglobulin ähnliche Domäne, welche C-terminal der katalytischen Domäne liegen (Abb. 6) (Velasco *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000; Somerville *et al.*, 2003).

**Abbildung 6**

Die Domänenstruktur der humanen Matrix-Metalloproteasen

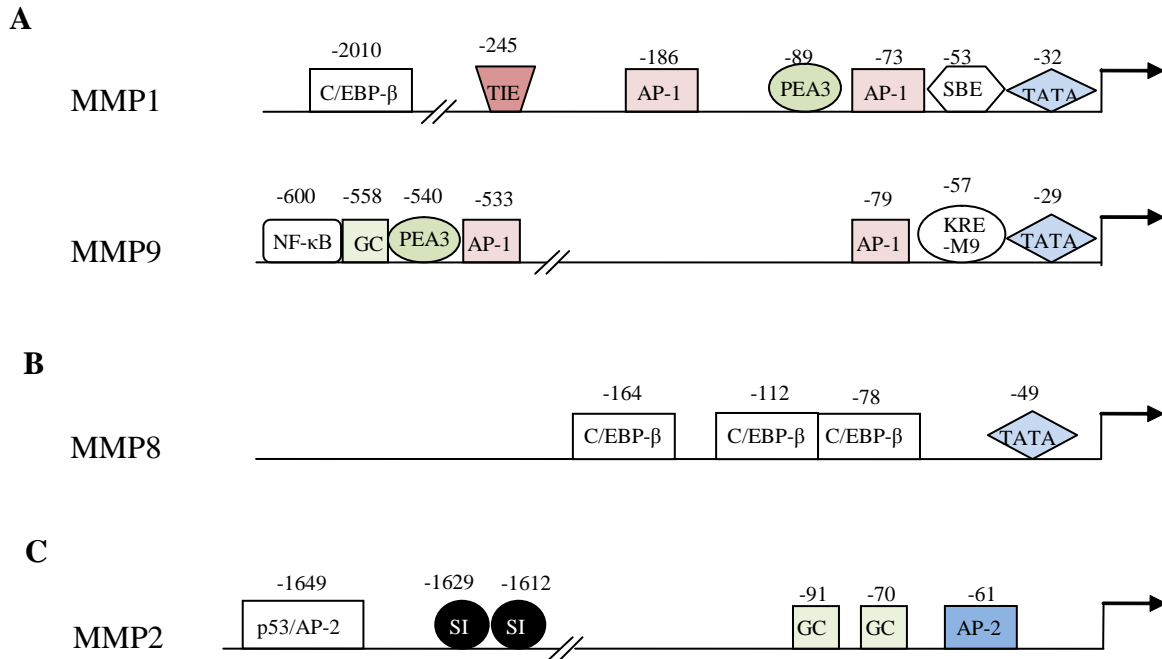
Alle MMPs bestehen aus der Pro-Domäne und der katalytischen Domäne. Weiterhin kommen die Hinge Region und eine Hämopexin/Vitronektin ähnliche Domäne in vielen MMPs vor. Je nach dem, ob es sich um sezernierte oder Membran verankerte Proteasen handelt, finden sich Transmembran Domänen oder GPI Anker. Die Domänenstruktur der MMP 23 weicht von allen anderen MMPs ab, da diese statt über eine Hämopexin Domäne über ein Cystein-Array und eine Immunglobulin ähnliche Domäne verfügt.

(modifiziert nach Somerville *et al.*, 2003)

1.4.2 Regulation/Genetik der Matrix-Metalloproteasen

Matrix-Metalloproteasen werden auf verschiedenen Ebenen reguliert. Zunächst findet eine transkriptionale und eine posttranskriptionale Regulation statt. Proteasen, welche nicht bereits intrazellulär aktiviert wurden, werden als inaktive Enzyme sezerniert und erst auf Grund bestimmter Stimuli aktiviert. Zusätzlich können aktive MMPs durch mehrere Proteine, wie den TIMPs (Tissue Inhibitor of MetalloProteases), inaktiviert werden.

Die Gene der humanen MMPs haben meist eine Länge von 8-12 Kilo-Basenpaaren (kb) mit 10 Exons und 9 Introns. Die Gene der MMPs 2 und 9 hingegen haben eine Länge von 26-27 kb mit 3 zusätzlichen Exons, welche für die Fibronektin II Domänen kodieren (Das *et al.*, 2003). Die transkriptionale Kontrolle der MMP-Expression erfolgt durch verschiedene *cis*-Elemente und unterschiedliche *trans*-Aktivatoren, wie die Proteine AP-1 oder NF- κ B. Auf Grund ihrer *cis*-Elemente kann man die Promotoren der humanen MMP-Gene in drei Gruppen zusammenfassen. Im Folgenden sind exemplarisch die Promotoren einiger MMPs dargestellt (Abb. 7).

**Abbildung 7**

Cis-Elemente der Promotoren einiger humaner Matrix-Metalloproteasen

Die Promotoren der Matrix-Metalloproteasen lassen sich auf Grund ihrer *Cis*-Elemente in 3 Gruppen einteilen und sind hier exemplarisch bei den MMPs 1, 2, 8 und 9 dargestellt.

A Kennzeichnend für Promotoren der ersten Gruppe sind eine TATA-Box an Position –30 und eine AP-1 Bindungsstelle bei ca. -70, jeweils relativ zum Transkriptionsstart.

B Promotoren der Gruppe 2 enthalten ebenfalls eine TATA-Box, jedoch fehlt die AP-1 Bindungsstelle.

C Promotoren der dritten Gruppe fehlt die TATA-Box. Die Transkription startet hier an unterschiedlichen Stellen. Weiterhin enthalten diese Promotoren mindestens eine GC-Box, an welche der Transkriptionsfaktor Sp-1 bindet.

Die über den *cis*-Elementen angegebenen Zahlen geben die Position in Basenpaaren relativ zum Transkriptionsstart an. Folgende Abkürzungen wurden verwandt: AP-1, Aktivator Protein-1; AP-2, Aktivator Protein-2; C/EBP-β, CCAAT/Enhancer Bindungsprotein -β; GC, Sp-1-Bindungsstelle; KRE-M9, Keratinozyten-Differenzierungsfaktor-1 abhängiges Element-4; NF-κB, nukleärer Faktor-κB; p53/AP-2, p53/AP-2 kombinierte Bindungsstelle; PEA3, Polyoma Enhancer A Bindungsprotein-3; Si, Silencer Sequenz; TATA, TATA-Box; TIE, TGF-β hemmendes Element.

(modifiziert nach Yan *et al.*, 2007)

Die Promotoren der Gene von MMP 1, 3, 7, 9, 10, 12, 13, 19 und 26 enthalten eine TATA-Box, welche 30 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart liegt, und eine AP-1 Bindungsstelle, welche 70 bp stromaufwärts liegt. Viele dieser Promotoren enthalten weiter stromaufwärts PEA-3 Bindungsstellen, welche oft eine weitere AP-1 Bindungsstelle enthalten. Die zweite Gruppe stellen die Promotoren der MMP-Gene 8, 11 und 21 dar.

Ihnen gemein ist ebenfalls eine TATA-Box, eine AP-1 Bindungsstelle findet sich jedoch nicht. Die dritte Gruppe umfasst die Promotoren der Gene für die MMPs 2, 14 und 28. Ihnen fehlt eine TATA-Box, dafür enthalten sie GC-Boxen, welche eine Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren der Sp1-Familie darstellen. Der Promotoraufbau dieser MMP-Gene ist dem von „Haushaltsgenen“ ähnlich und die Gen-Expression scheint konstitutiv zu sein (Yan *et al.*, 2007). Eine Induzierbarkeit durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren ist kaum gegeben. Eine Regulation erfolgt hier zelltypabhängig durch Methylierungen der Promotorregion (Reik *et al.*, 2001; Esteller, 2002).

Das Vorhandensein von AP-1 und PEA-3 Bindungsstellen bei den Gruppe 1 Promotoren ist ein Hinweis für die Induzierbarkeit dieser Promotoren. Das Aktivator Protein 1 (AP-1) ist ein Dimer aus den Proteinen Jun und Fos, wobei auch Jun/Jun Homodimere möglich sind. Weiterhin weisen viele dieser Promotoren Polyoma enhancer A Bindungsprotein 3 (PEA-3) Bindungsmotive auf. Hier können ETS-Transkriptionsfaktoren binden, welche alleine jedoch die Transkription nicht induzieren, sondern als Coaktivatoren wirken. Die Promotor-Induktion nach AP-1 und PEA-3 Bindung wird durch Phosphorylierung vermittelt durch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) oder aktivierte p38 Kinasen erreicht. Dadurch ist es möglich, dass Interleukine, Interferone, TNF- α , TGF- β und Wachstumsfaktoren, wie EGF, bFGF, VEGF oder PDGF, diese MMP-Promotoren induzieren. Weiterhin können Rezeptoren der Zellmembran, wie die Integrine, die Fokale Adhäsionskinase (FAK) aktivieren, deren Signalweg in den MAPK-Signalweg mündet (Chakraborti *et al.*, 2003; Reuben *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2007). Die Promotoren der MMP 7, 14, 12 und 26 Gene enthalten eine Tcf-4 Bindungsstelle für β -Katenin. Nukleäres β -Katenin bewirkt im Rahmen des Wnt-Signalweges die Induktion von MMP-Promotoren durch Bindung an Tcf-4 Bindungselemente. β -Katenin kann zusätzlich den c-jun Promotor transaktivieren und so die Expression der AP-1 regulierten Promotoren beeinflussen (Nawrocki-Raby *et al.*, 2003). Der Promotor des MMP9-Gens enthält im Bereich von -600 bp eine NF- κ B Bindungsstelle. Dort kann nukleäres NF- κ B binden, dessen Konzentration durch einen Signalweg reguliert wird, welcher durch inflammatorische Zytokine aktiviert werden kann. So besteht die Möglichkeit einer Expressionsregulation von MMP 9 durch Zytokine, wie TNF- α . NF- κ B beeinflusst auch die Regulation der Promotoren der MMPs 1, 3 und 11, obwohl dort keine Bindungsstellen in den Promotoren vorhanden sind (Hagemann *et al.*, 2004).

Neben diesen generellen Eigenschaften der Promotoren findet sich auch eine gewebe- und zellspezifische MMP-Expression, welche durch Aktivierung der einzelnen Promotorelemente reguliert wird (Yan *et al.*, 2007).

Weiterhin wird die Expression der MMPs 1, 2, und 14 durch das membranständige Glykoprotein „Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN)“ stimuliert (Caudroy *et al.*, 2002).

Neben der Expressionsregulation durch *cis*-Elemente und *trans*-Aktivatoren findet auch eine epigenetische Regulation der Genexpression statt. Ein Teil dieser Regulation ist die Methylierung von DNA, welche bevorzugt an CpG-Inseln vorkommt. Die Methylierung eines Promotors scheint jedoch nur bei den Genen der MMPs 3 und 9 eine Rolle zu spielen. Eine weitere Möglichkeit der epigenetischen Regulation ist die Relaxation des Chromatins, wodurch die Promotoren zugänglich werden für die basale Transkriptionsmaschinerie. Die Veränderung der Chromatinstruktur wird durch Modifikation der Histone durch Methylierung, Acetylierung oder Phosphorylierung erreicht. Ein Einfluss der Histonmodifikationen ist jedoch bisher nur für die Promotoren der MMPs 1, 9 und 13 nachgewiesen worden (Yan *et al.*, 2007).

Eine weitere Ebene der Regulation der Aktivität der Matrix-Metalloproteasen stellt die post-transkriptionale Regulation dar. Diese Regulation erfolgt durch unterschiedliche Stabilität der transkribierten mRNA. So wurde nachgewiesen, dass TGF- β die Konzentration der MMPs 2 und 9 hauptsächlich durch eine Verlängerung der mRNA-Halbwertszeit erhöht. Der Einfluss von TGF- β auf den Gehalt an MMP 13 erfolgt sowohl auf transkriptionaler Ebene durch Induktion der Expression als auch post-transkriptional durch Stabilisierung des Transkripts. Neben TGF- β haben z. B. auch $\alpha 3\beta 1$ Integrin, Doxycyclin und Retinsäure Einfluss auf die post-transkriptionale Regulation. Die Regulation erfolgt durch Bindung von Faktoren an Sequenzelemente im 5'- oder 3' nichttranslatorischen Bereich (UTR). So bewirkt die Bindung von Proteinen der Hu Familie an die A+U Regionen (ARE) im 3'-UTR Bereich die Stabilisierung der mRNAs der MMPs 9 und 13. Eine Inhibition des HuR-Proteins durch Nitroxid (NO) führt zu einem erhöhten Abbau der MMP-9 mRNA. Der 3'-UTR Bereich ist auch für die Bindung der mRNA an membrangebundene Ribosomen und somit für die Translation verantwortlich. So bewirkt die Bindung des 3'-UTR Bereichs der MMP 9-mRNA an ein zytoplasmatisches Nucleolinfragment unter Vermittlung des Eisenchelators 2,2-Dipyridyl eine effizientere Translation und so eine Erhöhung der MMP 9 Konzentration (Fahling *et al.*, 2005).

Weiterhin erfolgt die Regulation der Matrix-Metalloproteasen durch Aktivierung des inaktiven Proenzym. Diese Form der Regulation findet bei den meisten nicht membrangebundenen MMPs statt.

Bei den löslichen MMPs 11 und 28 und den membrangebundenen MMPs 14, 15, 16, 17, 23, 24 und 25 befindet sich eine Furin Erkennungssequenz am C-terminalen Ende der Prodomäne. Diese Proteasen werden intrazellulär durch Furin aktiviert. Der Regulation dieser Proteasen auf Transkriptionsebene und durch endogene Inhibitoren kommt dadurch eine besondere Bedeutung zu. Die Aktivierung von MMPs erfolgt durch Proteasen oder chemisch durch Thiol modifizierende Agenzien, wie 4-Aminophenylquecksilberacetat, oxidiertes Glutathion oder reaktiven Sauerstoff. Die Grundlage dieser Aktivierung liegt in der Störung der Interaktion des katalytischen Zinkatoms mit dessen vierten Liganden, dem Cystein der Prodomäne, dem „cysteine switch“ (Abb 8). Die proteolytische Aktivierung läuft meist in einzelnen Schritten ab. Zunächst wird das Propeptid in einer Schleifenregion zwischen der ersten und zweiten Helix, der „bait region“, gespalten. Dadurch wird das gesamte Propeptid destabilisiert und es folgt eine Autoproteolyse des Propeptids durch die teilweise aktivierte MMP. Nach Entfernen des Propetides ist die Protease vollständig aktiviert. Die Aktivierung von MMPs erfolgt *in vivo* meist proteolytisch (Visse *et al.*, 2003). Jedoch konnte bei einer cerebralen Ischämie die Aktivierung von proMMP9 durch NO, welches mit dem Cystein des Propetides reagierte, nachgewiesen werden (Gu *et al.*, 2002). Die aktivierenden Proteasen *in vivo* sind meist Plasmin, Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA), Tissue-type Plasminogen Aktivator (tPA) und die MMPs selbst (Mazar *et al.*, 1999; Lijnen, 2001; Chakraborti *et al.*, 2003). Die Aktivierung von proMMP2 dagegen erfolgt durch ein MMP 14-Dimer in Verbindung mit dem MMP-Inhibitor TIMP 2. Hierbei bindet der N-terminale Anteil des TIMP 2 an die katalytische Domäne des membrangebundenen MMP 14. Es kommt durch Interaktionen ihrer Hämopexin-Domänen zu einer Dimerisierung des MMP 14. Das proMMP2 bindet nun an die katalytische Domäne des zweiten MMP 14. Das am ersten MMP 14 gebundene TIMP 2 interagiert über ihren C-terminalen Anteil mit der Hämopexin-Domäne des proMMP2. Es folgt dann die proteolytische Aktivierung des MMP 2 und eine Auflösung dieses Komplexes. Neben MMP 14 sind auch die MMPs 15, 16, 24 und 25 in der Lage, proMMP 2 zu aktivieren. Weiterhin kann MMP 14 proMMP13 aktivieren, wobei diese Aktivierung TIMP 2 unabhängig ist (Visse *et al.*, 2003). Die MMPs 2, 3 und 9 können auch durch Integrin bindende Glykoproteine, den „small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs)“, aktiviert werden und ihre Inaktivierung durch Inhibitoren verhindern (Fedarko *et al.*, 2004).

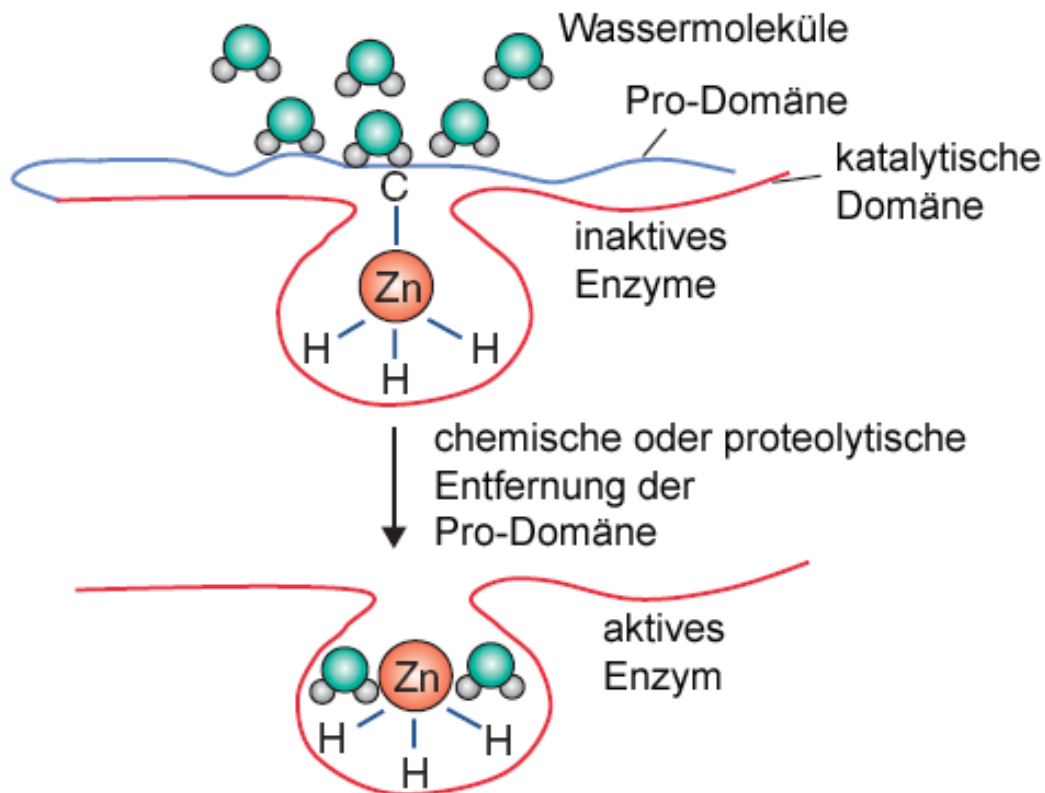


Abbildung 8

Der „Cystein-Switch“ Mechanismus der Matrix-Metalloproteasen

Die Thiol-Gruppe eines Cysteins (C) der Pro-Domäne fungiert als vierter inaktivierender Ligand des katalytischen Zinkatoms (Zn). Dadurch werden Wassermoleküle aus dem aktiven Zentrum ferngehalten und so die Latenz des Enzyms bewirkt. Durch Entfernung der Pro-Domäne durch Konformationsänderung oder Proteolyse wird die Cystein-Zink Paarung gestört und die Thiol-Gruppe durch Wassermoleküle ersetzt. Dies führt zur Aktivierung des Enzyms.

(modifiziert nach Somerville *et al.*, 2003)

1.4.3 Endogene Inhibition der aktivierten Matrix-Metalloproteasen

Die endogene Inhibition der aktivierten Matrix-Metalloproteasen erfolgt durch spezifische Inhibitoren und durch unspezifische Proteaseinhibitoren.

Die spezifischen Inhibitoren der MMPs sind die „Tissue inhibitors of Matrix-Metalloproteinases (TIMPS)“. In Vertebraten sind bisher 4 verschiedene 21 bis 29 kDa große TIMPS bekannt. Die N-terminale Domäne der TIMPS inhibiert durch Bindung in das aktive Zentrum die Aktivität der MMPs. Die TIMPS sind in der Lage, die Aktivität aller bisher bekannten humanen MMPs zu hemmen. Zusätzlich kann TIMP-3 die Proteasen ADAM 10, 12 und 17 und die ADAMTS-Proteasen 4 und 5 inhibieren (Baker *et al.*, 2002; Visse *et al.*, 2003).

MMPs können auch durch endogene unspezifische Proteaseinhibitoren gehemmt werden. Dies sind beispielsweise die Plasma α -Makroglobuline, allgemeine Endopeptidase-Inhibitoren, welche eine Vielzahl von Proteasen inhibieren. So ist unter anderem eine Inhibition der MMP 1 durch α 2-Makroglobulin nachgewiesen worden (Barrett, 1981). Ein weiterer MMP- Inhibitor ist der „Tissue factor pathway inhibitor-2“, ein Serin-Protease Inhibitor. Weiterhin inhibiert ein C-terminales Fragment des „procollagen C-terminal proteinase enhancer proteins“ MMP 2. Das GPI verankerte Glykoprotein RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) hemmt die MMPs 2, 9 und 14 und verhindert so die angiogene Gefäßbildung (Somerville *et al.*, 2003; Visse *et al.*, 2003).

Weitere Mechanismen der Regulation sind die Kompartimentierung, Endozytose und Komplexbildung von MMPs. So wurde nachgewiesen, dass der zytoplasmatische Anteil der membrangebundenen MMPs die Translokation dieser Proteasen zu einem definierten Bereich der Zellmembran vermittelt (Nakahara *et al.*, 1997; Annabi *et al.*, 2001). Während der Internalisation der membrangebundenen MMPs durch Clathrin-bedeckte Vesikel (clathrin-coated pits) scheint der zytoplasmatische Teil ebenfalls eine entscheidene Rolle zu spielen (Jiang *et al.*, 2001; Uekita *et al.*, 2001). Des Weiteren sind auch die nicht membrangebundenen MMPs nicht ubiquitär in der extrazellulären Matrix vorhanden. So konnte eine Bindung von MMP 2 an Integrin $\alpha_v\beta_3$ und von MMP 9 an CD44 nachgewiesen werden (Brooks *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2000). In Leukozyten befinden sich sekretorische Vesikel für MMP 9. Diese als „gelatinase granules“ bezeichneten Vesikel enthalten einen großen Anteil an proMMP9, welches dort einen Komplex mit $\alpha_M\beta_2$ Integrin bildet (Borregaard, 1997; Cowland *et al.*, 1999). An der Regulation des MMP 2 Gehaltes der extrazellulären Matrix ist Thrombospondin 2 beteiligt. Thrombospondin 2 bindet sowohl proMMP2 als auch aktiviertes MMP2 und wird nach Bindung an das „low density lipoprotein receptor-related protein“ (LRP) internalisiert. MMP 13 wird nach der Bindung an ein MMP 13 spezifisches 170 kDa Rezeptorprotein ebenfalls über LRP internalisiert und degradiert (Barmina *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000; Sternlicht *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001).

1.4.4 Matrix-Metalloproteasen in der Pathophysiologie

Auf Grund ihrer proteolytischen Eigenschaften sind Matrix-Metalloproteasen in einer Vielzahl von Krankheiten und in das Immunsystem involviert. So spaltet beispielsweise MMP 7 die Prodomäne von Defensinen, 3-6 kDa große Peptide mit antibakterieller Wirkung, und aktiviert sie so (Ganz, 1999; Wilson *et al.*, 1999). MMPs sind bei mehreren Infektionskrankheiten beteiligt. So sind MMP 2 und 9 in die HIV assoziierten neurologischen Erkrankungen involviert. Dies wird durch eine erhöhte Konzentration von MMP 9 im Liquor und eine erhöhte MMP 2 Sekretion der HIV infizierten Makrophagen belegt. Bei der Infektion mit dem Retrovirus HTLV-1 wurde ebenfalls eine erhöhte MMP 9 Konzentration im Liquor festgestellt. Weiterhin schütten Astrozyten, welche durch HTLV-1 infizierte T-Helferzellen aktiviert wurden, in erhöhtem Maße MMP 3 und 9 aus.

Bei einer akuten Hepatitis B Infektion kommt es durch entzündliche Vorgänge zu einer Ausschüttung von MMP 8 und 9, was zu einer Rekrutierung von unspezifischen Lymphozyten in das Leberparenchym führt. Das mit einer chronischen Hepatitis B Infektion assoziierte hepatozelluläre Karzinom zeigt einer erhöhte Ausschüttung bzw. Aktivierung von MMP 2, 9 und 14, was zu einer erhöhten Invasivität des Tumors führt.

Andere Erreger wiederum scheiden eigene Proteasen aus bzw. präsentieren diese an ihrer Oberfläche. Diese Proteasen können proMMPs aktivieren. So wird eine Aktivierung der proMMPs 1, 8 und 9 durch Thermolysin, welches durch *Pseudomonas aeruginosa* oder *Vibrio cholera* ausgeschieden wird, beobachtet (Elkington *et al.*, 2005).

Bei den Erkrankungen des Gehirns und des zentralen Nervensystems sind ebenfalls MMPs beteiligt. So sind sie an der Unterbrechung der Blut-Hirn Schranke, dem Abbau von Matrixproteinen und bei entzündlichen Prozessen als Antwort auf oxidativen Stress beteiligt. Erhöhte MMP-Konzentrationen, insbesondere von MMP 2, 8 und 9, wurden bei der bakterieller Meningitis, der multiplen Sklerose, der Alzheimer Erkrankung und bei entzündlichen Myopathien und Tumoren des zentralen Nervensystems, wie den Gliomen, beobachtet (Yong *et al.*, 1998; Leppert *et al.*, 2000; Ozenci *et al.*, 2000; Yong *et al.*, 2001; Nakada *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2007).

Weiterhin sind MMPs bei Arthritiden beteiligt. Bei der Arthrose, welche aus einem Knorpelschaden eines Gelenks entstehen kann, wurde eine unphysiologisch erhöhte Konzentration der MMPs 1, 2, 3,8 und 9 festgestellt.

Sie werden durch die beteiligten Zellen ausgeschüttet und sind an der Zerstörung des Knorpels und an der Entzündung des Synoviums beteiligt. Oben genannte MMPs sind ebenfalls an dem Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis beteiligt (Mancini *et al.*, 2006).

Auch bei der Wundheilung sind MMPs involviert. Die Wundheilung unterteilt sich in die Phasen Koagulation und Entzündung, Reepithelialisierung und Angiogenese und der Wiederherstellung des Gewebes und der Narbenbildung. Bei der normalen Wundheilung sind MMPs in einem stark regulierten Prozess beteiligt. Bei der entzündlichen Phase sind insbesondere die MMPs 1, 2, 3, 8 und 9 beteiligt. So spaltet MMP 9 IL-8 und erhöht dadurch dessen Aktivität um das 10fache. Weiterhin spaltet MMP 9 gebundenes TNF- α und aktiviert es. Dadurch wird ein chemokiner Gradient erzeugt, was zur Infiltration des Gewebes mit Neutrophilen, Mastzellen und Makrophagen führt. Die MMPs 1,2,3 und 9 aktivieren auch andere Zytokine, wie Il-1 β oder das humane „Granulozytenchemotatic Protein 2“ (GCP-2). Gleichzeitig tragen MMPs aber auch zu einer Begrenzung der Entzündung bei. MMP 2 spaltet beispielsweise das „Monozyten chemoattractant Protein 3“ (MCP 3), welches durch Bindung an die Rezeptoren CCR 1-3 die Leukozyten Migration inhibiert. Ein ähnlicher Effekt wird durch die Spaltung der Proteine MCP 1, 2 und 4 durch MMP 1, 3 und 8 erreicht.

Zur Reepithelialisierung ist die Einwanderung von Keratinozyten in den Wundbereich notwendig. Diese Wanderung durch die einzelnen Matrixbestandteile wird erst durch die Aktivität von MMPs, insbesondere MMP 1, 3 und 10, ermöglicht. In der angiogenen Phase, der Bildung von Gefäßen zur Versorgung des Wundbereiches, spielen insbesondere die MMPs 2, 9 und 14 eine entscheidende Rolle. Die MMPs 2 und 9 bewirken neben der Spaltung der Bestandteile der Basalmembran auch eine Freisetzung von angiogenen Wachstumsfaktoren wie bFGF, TGF, EGF und VEGF. Außerdem werden durch die Proteolyse der Matrixbestandteile bisher verborgene Migrationssignale freigelegt (Xu *et al.*, 2001). Die Rolle von MMP 14 beschränkt sich eher auf die Rolle der Aktivierung von proMMP2. Während der Wiederherstellung des Gewebes sind die MMPs 1, 2 und 9 beteiligt. Sie ermöglichen die Migration von Fibroblasten. Die Regulation der MMP-Aktivität erfolgt hier durch die TIMPs. So konnte bei Wundheilungsstörungen eine Verringerung der TIMP-Konzentration im Vergleich zur normalen Wundheilung festgestellt werden. Zu den pathologischen Wundheilungsstörungen gehören unter anderem die diabetische Fußulzeration, die Dekubitus-Ulzerationen und den durch Venenstauungen verursachten Ulzerationen. Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration der aktivierten MMPs 1, 2, 3, 8, 9 und 10 bei chronischen Wunden erhöht ist.

Dies führt zu einer persistierenden Entzündung und der verlängerten Einwanderung von Entzündungszellen, einer erhöhten Expression und Freisetzung von Wachstumsfaktoren, was zur Nekrose und Apoptose führt, und dem Fehlen einer Wiederherstellung des Gewebes im Wundbereich (Toy, 2005; Xue *et al.*, 2006).

Bei Erkrankungen des Herzens und der Gefäße sind ebenfalls MMPs, insbesondere MMP 2 und 9, beteiligt. So konnte eine Assoziation mit der Bildung und Instabilität von atherosklerotischen Plaques, der Migration von Gefäßmuskelzellen, der Restenose von Gefäßen, der Entwicklung von Aortenaneurysmen und dem Herzversagen belegt werden (Galis *et al.*, 1994; Danielsen *et al.*, 1998; Lovdahl *et al.*, 1999; Longo *et al.*, 2002; Yamazaki *et al.*, 2004; Malesud, 2006).

Bei Tumorerkrankungen sind die MMPs 2 und 9 essentiell. Sie ermöglichen unter anderem durch Spaltung der Basalmembran die Gefäßneubildung und somit die Versorgung des Tumorgewebes mit Nährstoffen. Dieser als Tumor-Angiogenese bezeichnete Vorgang wurde bereits im Abschnitt 1.1 beschrieben. Daneben werden aber auch bei anderen Erkrankungen, wie der diabetischen Retinopathie, angiogene Vorgänge beobachtet (Tab 4).

Gewebe oder Organ	Prozesse, die durch abnormale Angiogenese oder vaskuläre Fehlfunktion charakterisiert sind
Blutgefäße	† Atherosklerose, Hämangiom, Hämangioendotheliom § vaskuläre Fehlfunktionen
Haut	† Warzen, eiterbildendes Granulom, Haarwachstum, Kaposi Sarkom, Narbenkeloid, allergisches Ödem, Neoplasien § Psoriasis (Vergrößerung der Hautgefäße und gewunden) ‡ Dekubikus oder Stauungsgeschwür, gastrointestinale Geschwüre
Uterus, Ovar, Plazenta	† Dysfunktionale Uterusblutungen (Verhütung), folliculäre Zysten, ovare Hyperstimulation, Endometriose, Neoplasien § Präeklampsie ‡ plazentare Insuffizienz
Peritoneum, Pleura	Atemnot, Aszites, peritoneale Sklerose (Dialysepatienten), Adhäsionsbildung (abdominale Chirurgie), Metastasenverbreitung
Herz, Skelettmuskeln	† Überbelastung ‡ ischämisches Herz und Extremitäten Erkrankung
Adipöse Gewebe	† Adipositas

Gewebe oder Organ	Prozesse, die durch abnormale Angiogenese oder vaskuläre Fehlfunktion charakterisiert sind
Knochen, Gelenke	† Rheumatoide Arthritis, Synovitis, Knochen und Knorpel Destruktion, Osteomyelitis, Bindegewebewachstum (Pannus), Osteophytenbildung, Krebs ‡ aseptische Nekrose, verminderte Frakturheilung
Leber, Nieren, Lunge, Ohren und andere Epithelien	† Entzündliche und infektiöse Vorgänge (Hepatitis, Pneumonie, Glomerulonephritis), Asthma, nasale Polypen, Transplantationen, Leberregeneration, Krebs § pulmonale Hypertonie, Diabetes ‡ pulmonale und systemische Hypertonie
Gehirn, Nerven, Augen	† Frühgeburtliche Retinopathie, diabetische Retinopathie, choroidale und andere intraokulare Erkrankungen, Leukomalazie, Krebs ‡ Schlaganfall, vaskuläre Demenz, Alzheimer, CADASIL (zerebral autosomal dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie)
Endokrine Organe	† Thyreoiditis, thyreoidale Vergrößerung, Pankreas-Transplantation ‡ thyreoidale Pseudozysten
Lymphgefäße	† Tumormetastase, lymphoproliferative Erkrankungen ‡ Lymphödem
Hämatopoese	† AIDS (Kaposi), hämatologische Tumore

Tabelle 4

Erkrankungen, welche im Zusammenhang mit einer vermehrten, verminderten oder abnormalen Angiogenese stehen

Dargestellt sind Erkrankungen in Bezug auf das Gewebe, Organ oder die Blutbildung, welche im Zusammenhang mit einer vermehrten oder verminderten Angiogenese stehen.

† erhöhte Vaskularisation

‡ verminderte Vaskularisation

§ abnormales Gefäßumbau

|| erhöhte Vaskularisation und/oder Permeabilität

(modifiziert nach Carmeliet *et al.*, 2000)

1.5 Der M13-Phage

Der M13-Bakteriophage wurde für die folgenden Experimente verwendet und soll hier näher beschrieben werden. Der filamentöse Bakteriophage M13 ist 900 nm lang und hat einen Durchmesser von 5 bis 7 nm (Szardenings, 2003). Die Erbinformation liegt als zirkuläre, 6407 Basen große Einzelstrang DNA vor. Sie wird umgeben von 2700 Kopien des Haupthüllproteins pVIII. Die Enden des lang gestreckten Phagen werden durch je 5 Kopien der Hüllproteine pVII und pIX an einem Ende und je 5 Kopien der Hüllproteine pIII und pVI an dem anderen Ende gebildet (Abb. 9) (Kehoe *et al.*, 2005).

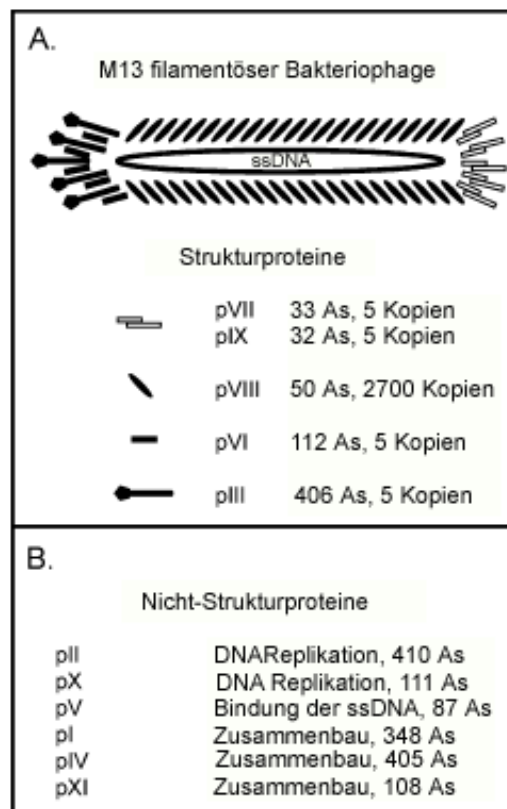


Abbildung 9

Die Proteine des M13 Bakteriophagen

A Das Haupthüllprotein pVIII umschließt das einzelsträngige DNA Genom des Phagen. Die Enden des Phagen werden durch die Hüllproteine pIII, pVI, pVII und pIX gebildet.

B Weitere 6 Proteine des M13-Phagen sind Nicht-Strukturproteine und dienen u.a. der Replikation und dem Zusammenbau des Virions.

(modifiziert nach Kehoe *et al.*, 2005)

Der M13-Phage ist ein F-Pilus spezifischer Phage, da er mit dem Hüllprotein pIII an das Membranprotein Tol A des F-Pilus von *Escherichia coli* Bakterien bindet. Die einzelsträngige Phagen-DNA gelangt durch den Pilus in das Bakterium. Dort wird die einzelsträngige DNA in die doppelsträngige, replikative (RF-) Form überführt (Knippers, 2006). Nun werden die insgesamt 11 Phagenproteine synthetisiert. Die Hüllproteine inserieren in die innere Bakterienzellmembran. Das Nicht-Strukturprotein pV umhüllt, wenn eine gewisse Konzentration erreicht wird, die neu synthetisierte einzelsträngige Phagen-DNA und verhindert so die Umwandlung in doppelsträngige DNA. An einer nicht bedeckten Stelle des Phagen-Genoms binden die zum Phagen-Zusammenbau, dem Assembly, notwendigen Membranproteine pIV, pXI und pI und bilden eine Membranpore. Während des Assembly-Prozesses wird das Protein pV von der DNA entfernt und durch das Haupthüllprotein pVIII ersetzt. Je 5 Kopien der Hüllproteine pVII und pIX befinden sich nun an einem Ende des Phagen und der Phage wird von dem Bakterium sekretiert. Nun werden an dem anderen Ende des Phagen die Hüllproteine pVI und pIII inkorporiert. Das Protein pIII assistiert jetzt bei der Loslösung des Phagen von dem Bakterium. Es kommt hierbei nicht zu einer Lyse der Bakterienzelle (Abb. 10) (Kehoe *et al.*, 2005).

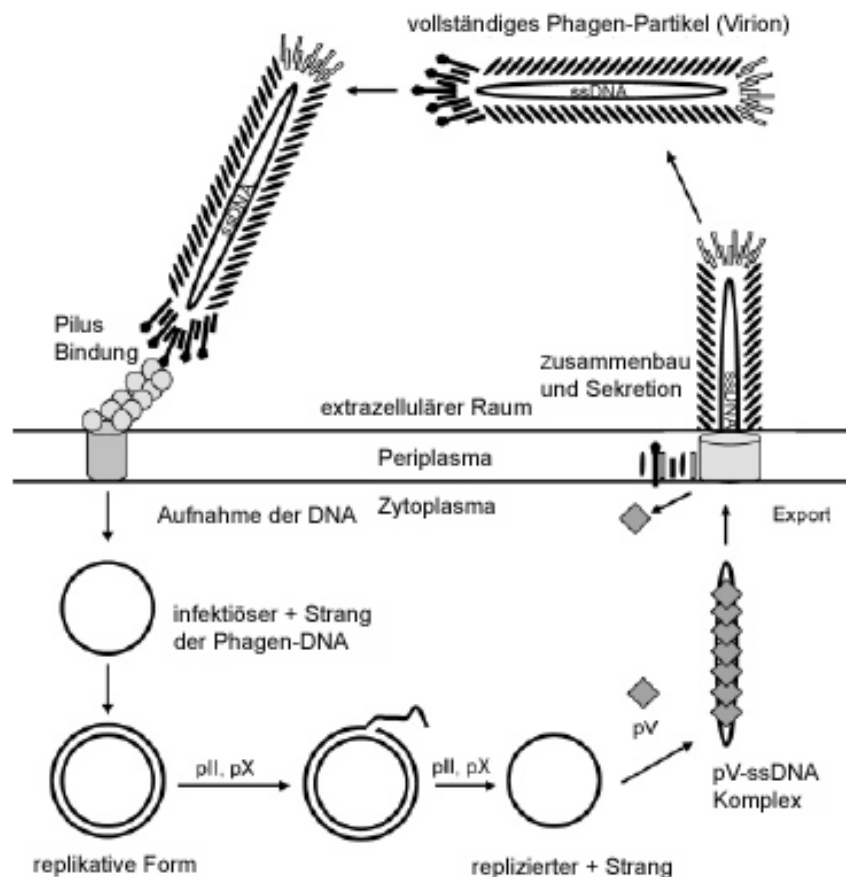


Abbildung 10

Der Infektionszyklus des M13-Phagen

Das Phagen Partikel (Virion) bindet an den F-Pilus, welcher durch Gene des F-Plasmids kodiert wird, des *Escherichia coli* Bakteriums. Nach der Phagenbindung gelangt das Virion durch Zurückziehen des F-Pilus an die Zelloberfläche. Dort interagiert das Phagen-Hüllprotein pIII mit dem membranständigen Protein TolA. Die einzelsträngige Phagen-DNA (Plus Strang) gelangt in die Bakterienzelle und wird durch bakterielle Proteine in die replikative doppelsträngige DNA konvertiert. Die Phagenproteine pII und pX sind an der Replikation des viralen Genoms beteiligt, welcher nach dem „rolling circle“ Mechanismus erfolgt. Die replizierte einzelsträngige Phagen-DNA wird von dem Phagenprotein pV bedeckt. Dieser DNA-Protein Komplex interagiert nun mit der Export-Maschinerie, welche durch die Phagen-Proteine pI, pIV, pXI und Thioredoxin gebildet wird. Dabei werden simultan die Phagen Partikel mit den bereits in der inneren Bakterienmembran inserierten Hüllproteinen gebildet und in den extrazellulären Raum sekretiert, wobei das Protein pV wiederverwendet wird. Das Virion wird nun von der Zelle entlassen, ohne diese zu töten. Die Symbole der Hüllproteine entsprechen denen der Abbildung 9.

(modifiziert nach Kehoe *et al.*, 2005)

1.6 Phage-Display

Als „Phage Display“ wird die Selektion von Phagen einer Phagen-Bibliothek, welche heterolog Peptide oder Proteine auf ihrer Oberfläche präsentieren, bezeichnet.

Diese Technologie macht sich zwei Gegebenheiten zunutze. Zum einen können Mutationen in Gene der Hüllproteine eines Phagen eingefügt werden. So lange keine essenziellen Funktionen des Genproduktes betroffen sind, wird das mutierte Hüllprotein an der Oberfläche des Phagen-Partikels präsentiert. Zum anderen besteht ein physikalischer Zusammenhang zwischen dem präsentierten mutierten Hüllprotein und dem für dieses Protein kodierende Gen. Durch die Verwendung von randomisierten Oligonukleotiden können die resultierenden Phagen eine Peptid-Bibliothek darstellen, wobei jedes präsenzierte Peptid physikalisch mit der Phagen- DNA verknüpft ist (Rodi *et al.*, 1999). Die Konstruktion einer solchen Bibliothek, bei der das Gen des Hüllproteins pIII des Bakteriophagen f1 verändert wurde, wurde 1985 erstmalig beschrieben (Smith, 1985). Als Träger der heterologen Peptide oder Proteine können Bakteriophagen wie lambda (Sternberg *et al.*, 1995), T4 (Efimov *et al.*, 1995), T7 (Houshmand *et al.*, 1999), fd oder M13 Phagen fungieren.

Bei der Herstellung einer auf der Phagen-Oberfläche präsentierten Oligopeptid-Bibliothek ist zu beachten, dass alle theoretisch möglichen Peptid-Kombinationen einer Oligopeptidsequenz enthalten sind. Dazu wird die DNA rekombinant modifiziert, in dem mittels Restriktionsendonukleasen die DNA gespalten wird und ein Oligonukleotid eingefügt wird. Dieses Oligonukleotid kodiert für das heterolog zu exprimierende Oligopeptid. Zur Erstellung einer Bibliothek wird eine Vielzahl von Oligonukleotiden verwendet. Nach Transformation von Bakterien mit diesen Phagen und folgender Amplifikation muss durch DNA-Sequenzierung der inserierten Oligonukleotide die Diversität der Bibliothek statistisch bestimmt werden (Sidhu *et al.*, 2000).

Diese Oligopeptid-Bibliothek ist der Ausgangspunkt für die Selektion von Phagen. Diese unselektionierte, „naive“ Bibliothek wird gegen ein bekanntes Substrat selektioniert. Der Vorgang dieser Selektion wird bei Phagen auch als „Panning“ bezeichnet. Dazu wird die Zielstruktur, z. B. ein Protein, auf einem Untergrund immobilisiert und anschließend mit der Phagenlösung inkubiert. Nicht oder schwach bindende Phagen werden dann durch Waschen entfernt. Die Stringenz des Waschpuffers kann von Selektionsrunde zu Selektionsrunde gesteigert werden. Die noch gebundenen Phagen werden jetzt eluiert.

Dazu können unspezifische Eluationsmittel, wie saure Lösungen, Bindungskompetitoren oder auch infizierbare Bakterien eingesetzt werden. Die gewonnenen Phagen können analysiert oder für eine weitere Selektionsrunde amplifiziert werden (Abb. 11).

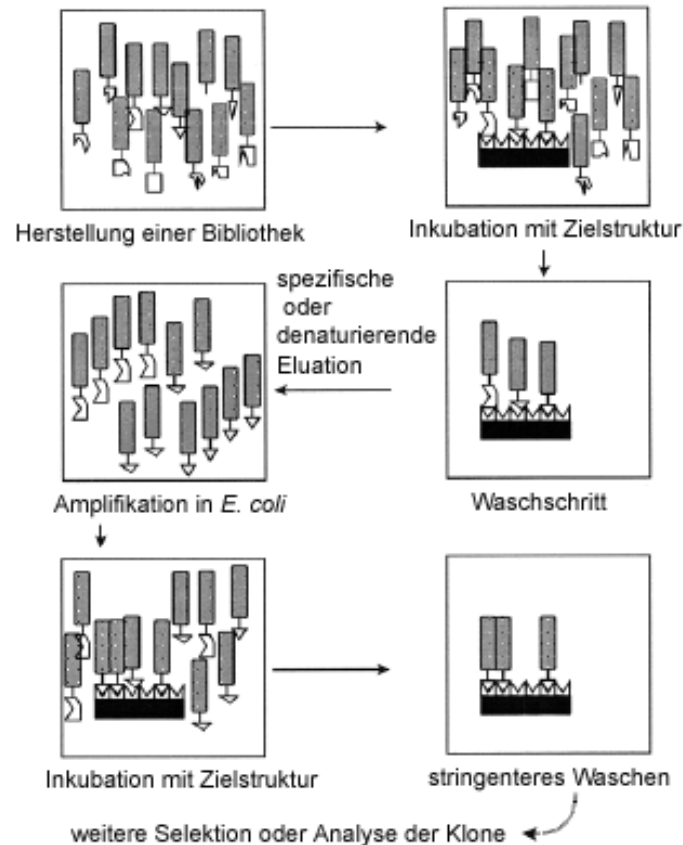


Abbildung 11

Vereinfachte Darstellung der *in vitro* Selektion von Phagen

Eine naive, nicht selektionierte Phagenbibliothek wird mit der Zielstruktur inkubiert. Anschließend werden die nicht gebundene Phagen durch Waschen entfernt und die gebundenen Phagen eluiert und in *Escherichia coli* Bakterien amplifiziert. Diese amplifizierten Phagen werden erneut mit der Zielstruktur inkubiert und durch stringenteres Waschen können nicht oder schlecht bindende Phagen entfernt werden. Es kann sich dann eine weitere Selektion oder die Analyse der Phagenklone anschließen.

(modifiziert nach Szardenings, 2003)

Dieses Verfahren kann jedoch durch eine Vielzahl von Parametern, wie die Qualität der Bibliothek, die Inkubationszeit oder das Vorhandensein von potenziellen Inhibitoren, beeinflusst werden. Weiterhin kann die Bindung des Phagen an seine Zielstruktur auch in Lösung stattfinden. Dazu muss an dem Protein ein Biotin oder ein anderes Motiv vorhanden sein, mit dem das Protein nach der Bindung immobilisiert werden kann (Noren *et al.*, 2001; Szardenings, 2003).

Eine weitere Methode der Selektion neben dem *in vitro* Verfahren ist die *in vivo* Selektion z.B. in Mäusen (Molenaar *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2004). Dieses Verfahren bietet sich an, wenn man Oligopeptide sucht, die an Gewebestrukturen von Organen oder Tumoren binden. Durch die Passage der naiven Phagenbibliothek durch das Tier können Phagen an die jeweiligen Strukturen binden, nicht bindende Phagen werden anschließend durch Perfusion des Tieres aus dem Organismus entfernt. Auf diese Weise erhält man einen Phagenpool, der an die gewünschte Struktur bindet. Durch weitere Selektionen, *in vivo* oder *in vitro*, können die am besten bindenden Phagen aufgefunden werden (Ruoslahti, 2002).

Oligopeptid- oder Protein-Bibliotheken können auch von Bakterien oder eukaryotische Viren, wie dem Baculovirus, präsentiert werden (Robert *et al.*, 1996; Ernst *et al.*, 1998; Grabherr *et al.*, 2001). Insbesondere bei der Verwendung eukaryotischer Viren können die posttranslationalen Modifikationen von Proteinen bei der Selektion berücksichtigt werden.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Neubildung von Blutgefäßen ist ein wichtiger Bestandteil des Tumorwachstums. Zur Deckung des Sauerstoff- und Nährstoffbedarfs eines Tumors muss ein Anschluss an das Blutgefäßsystem des Körpers hergestellt werden. Dieser Vorgang wird als Tumor-Angiogenese bezeichnet. Ein Bestandteil der Tumor-Angiogenese ist die Proteolyse der vaskulären Basalmembran, welche die Endothelzellen vom unterliegenden Bindegewebe abgrenzt. Ein Hauptbestandteil der Basalmembran ist das Kollagen IV, das durch die Matrix-Metalloproteasen 2 und 9 gespalten werden kann. Durch die proteolytische Modifikation des Kollagen IV werden bisher nicht zugängliche Bereiche des Kollagen IV für Endothelzellen zugänglich. Diese kryptischen Bindungsstellen dienen den Endothelzellen als Migrationssignale, die für eine regelrechte Gefäßbildung funktionell relevant sind. Diese tumorspezifischen Bindungsstellen sind aber auch mögliche Zielstrukturen für neue Krebstherapien. Liganden der kryptischen Bindungsstellen kommen als Konjugate für therapeutisch wirksame Radionuklide, oder Zytostatika in Frage, die eine selektive Verabreichung der Therapeutika in den Tumor ermöglichen. Die „Phage Display“ Technik ermöglicht die Selektion solcher Liganden aus einer auf Phagen exprimierten Peptidbank.

Unter Verwendung des „Phage Display“ sollen Phagen einer M13 Oligopeptid-Phagen-Bibliothek isoliert werden, welche an das Tumorgewebe einer Tumor-tragenden Maus und an durch MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV binden und sich dadurch selektiv in Tumoren anreichern. Zudem sollten die Bindungseigenschaften dieser Phagen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht werden. Weiterhin sollen die von den Phagen präsentierten Oligopeptidsequenzen, welche die Bindung ermöglichen, bestimmt und entsprechende Oligopeptide hergestellt werden und untersucht werden, ob sie die Endothelzell-Differenzierung *in vitro* und die Angiogenese *in vivo* modulieren und möglicherweise als Angiogenesehemmstoffe verwendet werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Schembera, München
Brutschrank für Bakterien	Heraeus, Hanau
Brutschrank für Zellen	Heraeus, Hanau
Digitalkamera AxioCam3 MR	Carl Zeiss, Oberkochen
Einmallskalpell Feather	Produkte für die Medizin AG, Köln
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen
Gewebe-Homogenisator Ultra-Turrax T25	IKA Labortechnik, Staufen
Gelelektrophoresekammer	GE Healthcare, Freiburg
Glaswaren	Schott, Mainz
Homogenisator nach Dounce	B. Braun Biotech, Melsungen
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Küvetten aus Plastik	Brand, Wertheim
Küvetten aus Quarzglas	Hellma, Jena
Mikroskop, Typ Axiovert 10	Carl Zeiss, Oberkochen
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
OP-Besteck	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	Abimed, Langenfeld
Pipetten	Gilson, Limburg
Photometer, Typ Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg
Polystyrol Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polaroid-Filme, Typ 667	Polaroid, USA
Polaroidkamera	Polaroid, USA
Reaktionsgefäße für die PCR	Biozym, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg

Rotor für 500ml Gefäße	Herolab, Wiesloch
Rotor für 50 ml Gefäße	Heraeus, Hanau
Spektrometer Kontron Uvikon 931	BioTek Kontron Instruments, Neufahrn
Spannungsquelle	Bio-Rad, München
Schüttler mit Inkubationshaube	Edmund Bühler, Hechingen
Schüttler, Typ Chemetron	Cellogel, Mailand, Italien
Spritzen	BD, Heidelberg
Speed-Vac	Savant Instruments, Holbrook, N.Y., USA
Steril-Sicherheitswerkbank der Stufe 2	Heraeus, Hanau
Thermo-Mixer	Eppendorf, Hamburg
Thermozykler	Hybaid, Teddington, UK
Tierkäfige	Tecniplast, Hohenpeißberg
Ultraschall-Homogenisator UP2000s	Dr. Hielscher, Teltow
UV-Transilluminator	Biometra, Göttingen
Wasserkühlung, Typ LKB Multi-Temp II	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Zentrifugalfilter Microcon YM-10	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.
Zentrifuge, Typ Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Typ Suprafuge 22	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Typ Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Zentrifugengefäße Nalgene	Fisher Scientific, Schwerte
Zellkulturflaschen	Greiner BioOne, Frickenhausen

2.1.2 Chemikalien

Das in den Versuchen verwendete Wasser wurde vor Benutzung durch eine MilliQ – Filteranlage (Millipore, Schwalbach/Ts.) entionisiert. Dieses entionisierte Wasser wies einen Widerstand von 18,2 M Ω cm auf und wurde bei Bedarf autoklaviert.

Acrylamid-,Bisacrylamid-Stammlösung (wässrige 40% Lösung im Verhältnis 29:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	Sigma, München
Agarose	Sigma, München
4-Aminophenylquecksilberacetat	Sigma, München
Ammoniumeisencitrat	Sigma, München
APS	Sigma, München
bFGF	Immunotools, Friesoythe
bovines Hämoglobin	Sigma, München
Brij-35	Sigma, München
BSA (Pulver, 96% rein)	Sigma, München
Butanol	Sigma, München
CaCl ₂	Sigma, München
Commassie Brilliant Blau	Sigma, München
Diethylether	Sigma, München
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Längenstandards	Fermentas, St. Leon-Rot
DPBS (10 ×)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Drabkins-Reagenz	Sigma, München
Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium	Biochrom, Berlin
EDTA	Sigma, München
Eisessig	Sigma, München
Endothelzell-Wachstumsmedium	PromoCell, Heidelberg
Ethanol (96%, p.A.)	Sigma, München
Ethanol, vergällt	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München
Ethidiumbromid	Sigma, München

Faser-Einstreu	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG Lage
fötale Kälberserum	Biochrom, Berlin
Glycerin	Sigma, München
Hefe Extrakt	Sigma, München
HEPES	Sigma, München
IPTG	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kasein-Natriumsalz	Sigma, München
Ketavet [®] (Ketamin)	Pfizer, Karlsruhe
Kollagen IV aus der humanen Plazenta	Sigma, München
Kollagen G	Biochrom, Berlin
Ladepuffer (6 ×) für Agarosegele	Fermentas, St. Leon-Rot
Matrigel, Wachstumsfaktor-reduziert	BD Biosciences, Heidelberg
Mäusestandardfutter Altromin 1314	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG Lage
NaCl	Sigma, München
NaCl-Lösung 0,9 % für Injektionszwecke	Delta Select, Dreieich
NaJ	Sigma, München
NaOH	Sigma, München
Natriumacetat	Sigma, München
NH ₄ Cl	Sigma, München
Paraformaldehyd	Sigma, München
PEG	Sigma, München
Penicillin/Streptomycin Lösung	Biochrom, Berlin
Rompun 2% [®] (Xylazin)	Bayer, Leverkusen
Rimadyl [®] (Carprofen)	Pfizer, Karlsruhe
SDS	BioRad, München
S-Gal Natriumsalz	Sigma, München
TEMED	Sigma, München
Trisacetat	Sigma, München
Tris	Sigma, München
Triton X-100	Sigma, München
Trypton	Sigma, München

Trypsin/EDTA Lösung	Biochrom, Berlin
Tween20	Sigma, München
Vidisc [®]	Bausch Lomb, Berlin
ZnCl ₂	Sigma, München

2.1.2.1 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

TAE-Puffer

Trisacetat	40 mM
EDTA	1 mM

Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (DPBS) (Dulbecco *et al.*, 1954)

KCl	2,68 mM
KH ₂ PO ₄	1,46 mM
NaCl	136 mM
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	8,05 mM

MMP2/9-Puffer

HEPES	25 mM
CaCl ₂	5 mM
Glycerol (=Glycerin)	20%
Brij-35	0,005%

pH 7,5 einstellen

MMP1/8-Puffer

Tris/HCl, pH 7,0	50 mM
NaCl	0,15 M
CaCl ₂	5 mM
Brij35	0,05%
ZnCl ₂	1 µM

LB (Luria-Bertani) Medium (Sambrook *et al.*, 2001)

Trypton	10 g/l
Hefe Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

LB/Agar

Trypton	10 g/l
Hefe Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
Agar	10 g/l
S-Gal Natriumsalz	0,72 mM
Ammoniumeisencitrat	1,89 mM

nach dem Autoklavieren

Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1mM)

PEG/NaCl

PEG	20 %
NaCl	2,5 M

Jodid-Puffer

Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM
NaJ	4 M
EDTA	1 mM

STE-Puffer

NaCl	100 mM
Tris/HCL, pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

Top-Agarose

Trypton	10 g/l
Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agarose	7 g/l

Coomassie-Färbelösung:

Coomassie Brilliant Blue R-250 200 mg/l

Methanol 30 %

Essigsäure 10 %

Entfärbelösung

Ethanol 35 %

Essigsäure 10 %

Zymografie-Puffer

Tris/HCL, pH 7,5 50 mM

NaCl 200 mM

CaCl₂ 10 mM

Lösungen für Zymogramm-Gele:

Trenngel

Tris/HCl, pH 8,8 375 mM

SDS 0,1 %

Sammelgel

Tris/HCl, pH 6,8 125 mM

SDS 0,1 %

Laufpuffer

Tris/HCl, pH 8,3 25 mM

Glycin 192 mM

SDS 0,1 %

Probenpuffer (2-fach)

Tris/HCl, pH 6,8 62,5 mM

SDS 2 %

Glycerin 10 %

Injektionsanästhesie

82% physiologische NaCl-Lösung, 0,9%

10% Ketavet[®] (100 mg/ml Ketaminhydrochlorid)

8% Rompun[®] (2% Xylazinhydrochlorid)

2.1.2.2 Enzyme

Die Enzyme wurden jeweils mit den mitgelieferten Reaktionspuffern nach Herstellerangaben verwendet.

T4–DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
PanScript DNA – Polymerase	Pan-Biotech, Aidenbach
Restriktionsendonukleasen <i>EagI</i> und <i>Acc65I</i>	New England Biolabs, Frankfurt/Main
rhMMP2	Calbiochem, Darmstadt
rhMMP9	Calbiochem, Darmstadt
hMMP1	Calbiochem, Darmstadt
hMMP8	Calbiochem, Darmstadt

2.1.2.3 Kits

Ph.D. [™] -7 Phage Display Peptide Library Kit	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Ph.D. Peptide Display Cloning System	New England Biolabs, Frankfurt/Main
TransFormAid Bacterial Transformation Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
peqGold Plasmid Miniprep Kit I	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
MiniElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

2.1.2.4 verwendeter Bakterienstamm

Escherichia coli K12 ER2738: F' *lacI* $\Delta(lacZ)M15$ *proA*·*B* *zzf::Tn10(Tet^r)/fhuA2 supE thi*
 $\Delta(lac-proAB)$ $\Delta(hsdMS-mcrB)5$ (r. m. McrBC)

Dieser Bakterienstamm diente als Wirt für die M13-Bakteriophagen. Die Infektion erfolgte über den durch das F-Plasmid kodierten F-Pilus (Gough *et al.*, 1983; Woodcock *et al.*, 1989). Die Bakterien wurden von der Firma New England Biolabs, Frankfurt/Main bezogen.

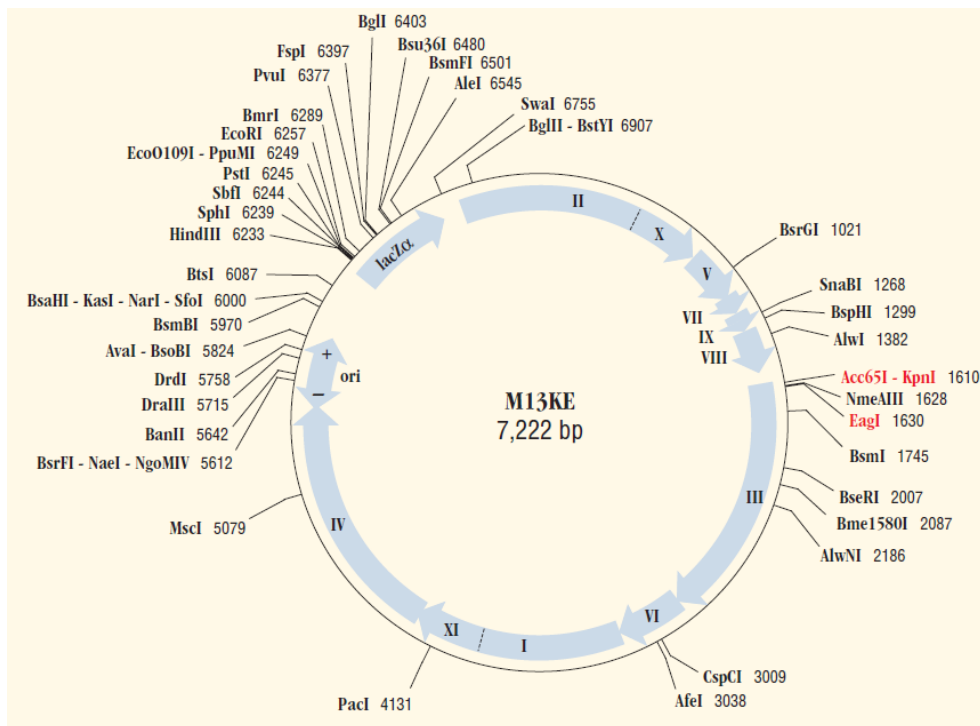
2.1.2.5 Der Vektor M13KE

Der Vektor M13KE diente der Erstellung von M13-Phagen, bei denen der N-Terminus des Phagenproteins pIII rekombinant verändert wurde (Abb. 12). Die Vektor-DNA wurde als Teil des „Ph.D. Peptide Display Cloning System“ von der Firma New England Biolabs (Frankfurt/Main) bezogen. Dieser Vektor wurde auch zur Konstruktion der Ph.D. 7 Phagenbibliothek der Firma New England Biolabs verwendet (Noren *et al.*, 2001). Die Fremd-DNA wird zwischen den Spaltstellen der Restriktionsendonukleasen *Acc65I/KpnI* (1610) und *EagI* (1630) eingefügt. Durch entsprechende Konstruktion der einzufügenden Fremd-DNA liegt der zu präsentierende Sequenz-Abschnitt direkt an der Spaltstelle der pIII Leader-Peptidase. Dadurch wird die zu exprimierende Peptidsequenz am N-Terminus des Phagenhüllproteins pIII präsentiert, welches in 5 Kopien vorliegt (Abb. 12 B). Weiterhin enthält der Vektor das *lacZ α* -Gen, welches für den N-terminalen Abschnitt der β -Galaktosidase kodiert. Bei Verwendung von *Escherichia coli* ER2738 wird so eine Alpha-Komplementation ermöglicht, welche im Folgenden näher erläutert wird.

Bei der Alpha-Komplementation wird das Enzym β -Galaktosidase, welches durch das Gen *lacZ* kodiert ist, durch zwei unterschiedliche Genbereiche kodiert. In den hier verwendeten *E. coli* ER2738 Bakterien ist der Promotorbereich mit dem lac-Repressor (*lacI*) und der C-terminale Teil der β -Galaktosidase (*lacZM15*) kodiert. In den M13-Phagen der verwendeten Phagenbibliothek ist das Gen *lacZ α* vorhanden, dieses kodiert für den N-terminalen Teil der β -Galaktosidase. Hat nun ein Phage dieser Bibliothek ein *E. coli* ER2738 Bakterium infiziert, befindet sich das gesamte *lacZ* Gen in einer Bakterienzelle und es kann eine funktionale β -Galaktosidase gebildet werden. Das in dem Phagen vorhandene *lacZ α* -Gen komplementiert also das fehlende *lacZ α* -Gen des Bakteriums. Durch Zusatz von IPTG wird der lac-Repressor inaktiv und das *lacZM15* Gen kann transkribiert werden.

Das Enzym β -Galaktosidase kann nun S-Gal verstoffwechseln. S-Gal, welches farblos ist, wird durch die β -Galaktosidase gespalten und führt durch Chelatierung von Eisenionen, welche durch Zugabe von Ammoniumeisencitrat im Medium zur Verfügung gestellt werden, zu einer Schwarzfärbung der Phagen infizierten Bakterien (Langley *et al.*, 1975; Heuermann *et al.*, 2001; Knippers, 2006).

A



B

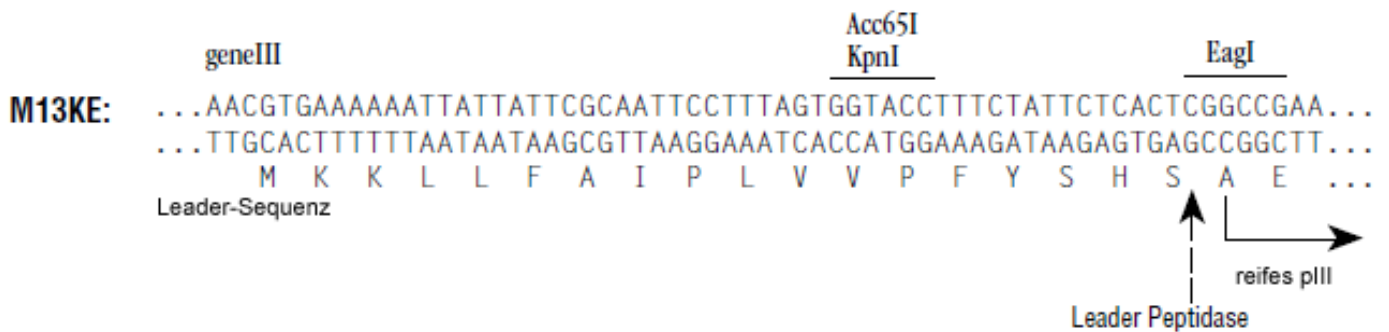


Abbildung 12

Der von dem Bakteriophagen M13 abgeleitete Vektor M13KE

A) In der Karte des 7222 bp großen Vektors M13KE sind die Genprodukte des Phagen und die Spaltstellen derjenigen Restriktionsendonukleasen, welche die DNA einmal schneiden, dargestellt. Auf Grund des *lacZα*-Gens besteht die Möglichkeit der Alpha-Komplementation des β -Galaktosidasegens, soweit auf dem Bakteriengenom das *lacZM15* Gen vorhanden ist.

B) Nach Spaltung der Vektor-DNA mit den Restriktionsendonukleasen *Acc65I* und *EagI* und Entfernung des kleineren Restriktionsfragments kann durch Ligation eine Sequenz inseriert werden, bei der zwischen den für die Aminosäuren Serin und Alanin kodierenden Triplets weitere für Aminosäuren kodierende Triplets eingefügt werden können. Dadurch werden die rekombinant eingefügten Aminosäuren am N-terminalen Ende des Hüllproteins pIII präsentiert.

2.1.2.6 Oligonukleotide

Die hier dargestellten Oligonukleotide wurden zur Erstellung der rekombinant veränderten Bindungsmotive des M13-Phagen, zur Amplifikation der inserierten DNA (mut_for, mut_rev) und zur Sequenzierung der M13-Phagen DNA (-96gIII) verwendet. Bei den komplementären Oligonukleotiden mut1_for bis mut4_rev wurden die durch die Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen *Acc65I* und *EagI* erzeugten Überhänge berücksichtigt. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg bezogen.

mut1_for

5´-GTACCTTTCTATTCTCACTCTGGTCTTGGTTATGGGTGGTCTGGTGGAGGTTC-3´
Acc65I *EagI*

mut1_rev

5´-GGCCGAACCTCCACCAGACCACCCATAACCAAGACCAGAGTGAGAATAGAAAG-3´
EagI *Acc65I*

mut2_for

5´-GTACCTTTCTATTCTCACTCTCTGAAGCAGAATGGGGTAATTTTTTCGCTGGGTGGAGGTTC-3´
Acc65I *EagI*

mut2_rev

5´-GGCCGAACCTCCACCCAGCGAAAAATTACCCCATTTCTGCTTCAGAGAGTGAGAATAGAAAG-3´
EagI *Acc65I*

mut3_for

5´-GTACCTTTCTATTCTCACTCTACGGGTACGTATACGTGGTCTGGTGGAGGTTC-3´
Acc65I *EagI*

mut3_rev

5´-GGCCGAACCTCCACCAGACCACGTATACGTACCCGTAGAGTGAGAATAGAAAG-3´
EagI *Acc65I*

mut4_for

5´-GTACCTTTCTATTCTCACTCTACGCTTACGTATACGGGTTCTGGTGGAGGTTC-3´

Acc65I

EagI

mut4_rev

5´-GGCCGAACCTCCACCAGAACCCGTATACGTAAGCGTAGAGTGAGAATAGAAAG-3´

EagI

Acc65I

mut_for

5´-GCTCCTTTTGGAGCCTTTTT-3´

mut_rev

5´-ATTCCACAGACAGCCCTCAT-3´

-96gIII

5´-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3´

2.1.2.7 chemisch synthetisierte Oligopeptide

TLTYTWS-Peptid

Dieses Oligopeptid mit der Aminosäuresequenz H-Thr-Leu-Thr-Tyr-Thr-Trp-Ser-Gly-Gly-Gly-Lys-Lys-Cys-NH₂ wurde für Inhibitionsversuche und die Untersuchung der Angiogenese *in vivo* und *in vitro* verwendet. Dieses Oligopeptid mit einer Größe von 1400 Da wurde von der Firma GL Biochem (Shanghai) Ltd., Shanghai, China als Pulver mit einer Reinheit von 95,14 % (HPLC-Analyse) bezogen.

SRPQITN-Peptid

Dieses Oligopeptid mit der Aminosäuresequenz H-Ser-Arg-Pro-Gln-Ile-Thr-Asn-Gly-Gly-Gly-Lys-Lys-Cys-NH₂ wurde als Kontrollpeptid in den Inhibitionsversuchen und bei der Untersuchung der Angiogenese *in vivo* und *in vitro* verwendet. Dieses Oligopeptid mit einer Größe von 1344 Da wurde von der Firma GL Biochem (Shanghai) Ltd., Shanghai, China als Pulver mit einer Reinheit von 97,06 % (HPLC-Analyse) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 *In vitro* Kultivierung von eukaryontischen Zellen

LLC

Für die *in vivo* Experimente wurden Mäuse verwendet, denen Lewis-Lung-Carcinoma (LLC)-Zellen injiziert wurden. Es handelt sich dabei um eine murine Lungenkrebszelllinie, die in Mäusen tumorigen ist (Bertram *et al.*, 1980). Sie wurde von der Firma Cell Lines Service (Eppelheim) bezogen.

Die Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (Biochrom, Berlin) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (Biochrom, Berlin), 50000 IE Penicillin und 50000 µg Streptomycin bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubator kultiviert. Alle Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten in einer Steril-Sicherheitswerkbank der Stufe 2. Zur Subkultivierung wurde der Zellrasen zunächst mit vorgewärmten DPBS (37°C) gewaschen. Zur Ablösung der Zellen wurden 2,5 µg Trypsin (Endkonzentration) und 1 µg EDTA (Endkonzentration) in DPBS als vorgewärmte Fertiglösung zugegeben und bis zum vollständigen Ablösen der Zellen bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden durch eine Zentrifugation bei 320 × g für 5 Minuten pelletiert und der verbleibende Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:4 auf neue Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75cm² verteilt.

HUVEC

Für die *in vitro* Angiogenese Experimente wurden humane Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) verwendet. Diese Zellen wurden als Pool verschiedener Spenderinnen von der Firma PromoCell, Heidelberg bezogen.

Die Zellen wurden in Endothel Growth Medium der Firma PromoCell bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubator kultiviert. Alle Arbeiten erfolgten in einer Steril-Sicherheitswerkbank der Stufe 2. Zur Subkultivierung wurde der Zellrasen zunächst mit vorgewärmten DPBS (37°C) gewaschen. Zur Ablösung der Zellen wurden 2,5 µg Trypsin (Endkonzentration) und 1 µg EDTA (Endkonzentration) in DPBS als vorgewärmte Fertiglösung zugegeben und bis zum vollständigen Ablösen der Zellen bei Raumtemperatur inkubiert.

Die abgelösten Zellen wurden durch Zentrifugation bei $320 \times g$ für 5 Minuten pelletiert und der verbleibende Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche: 75 cm^2) verteilt, welche zuvor mit Kollagen G ($0,16 \text{ mg/cm}^2$ Wachstumsfläche) beschichtet wurden. Zur Beschichtung einer Zellkulturflasche wurden zunächst 12 ml Kollagen G (4 mg/ml) (Biochrom, Berlin) 1:4 in DPBS verdünnt und auf die Wachstumsfläche gegeben. Nach einer Inkubation von einigen Minuten bei Raumtemperatur wurde die Zellkulturflasche mit DPBS gewaschen und dann zur Zellaussaat verwendet.

2.2.2 Versuchstiere, Haltung, Anästhesie und Euthanasie

Versuchstiere

- CD1TM-Mäuse

Für die *in vivo* Matrigel-Plug Versuche wurden weibliche Albino Mäuse des Auszuchtstammes Crl:CD1(ICR) verwendet. Die Tiere dieses Stammes werden im Weiteren als CD1 Mäuse bezeichnet und wurden von Charles River, Sulzfeld im Alter von 14 Wochen bezogen. Sie wurden bis zu einem Alter von 18 Wochen in der zentralen Tierhaltung untergebracht.

- NMRI nude Mäuse

Für die *in vivo* Phagenselektion und zur Untersuchung der Phagenverteilung *in vivo* wurden athymische, haarlose, weibliche Mäuse des Auszuchtstammes Crl:NMRI-*Foxn1*tm verwendet. Die Tiere dieses Stammes werden im Weiteren als NMRI nude Mäuse bezeichnet und wurden von Charles River, Sulzfeld bezogen. Sie wurden bis zur Versuchsdurchführung mindestens 2 Wochen in der zentralen Tierhaltung untergebracht und in einem Alter von 8 Wochen verwendet.

Diese Tiere zeichnen sich durch eine Thymushypoplasie aus, welche eine Reduktion der T-Zellen zur Folge hat. Weiterhin ist eine Reduktion verschiedener IgG's nachweisbar, wohingegen IgM in normalen Mengen vorhanden ist. Des Weiteren ist das Komplementsystem in normalem Umfang vorhanden. Auf Grund der reduzierten Immunität werden athymische Mäuse zur Xenotransplantation humaner Tumore und zur Etablierung von Tumoren aus humanen Tumorzelllinien verwendet (Fogh *et al.*, 1977; Van Weerden WM *et al.*, 1999; van Weerden *et al.*, 2000).

Haltung

Die Tierhaltung erfolgte in artgerecht ausgestalteten Käfigen mit Filterdeckeln zu je 5 Tieren in einem Tierstall mit speziellem Lichtprogramm bei 26°C und 50-60% Luftfeuchtigkeit. Die ad-libitum Versorgung wurde mit Mäusestandardfutter Altromin 1314 und Leitungswasser sichergestellt. Zweimal wöchentlich wurden die Käfige gereinigt, desinfiziert und mit Altromin Faser-Einstreu versehen. Die artgerechte Ausgestaltung der Käfige wurde mit autoklavierten Papierrollen und Zellstofftüchern vorgenommen. Die Einstallung der Tiere erfolgte mindestens 2 Wochen vor Versuchsbeginn.

Anästhesie

- Injektionsanästhesie

Die Anästhesie der Tiere erfolgte durch intraperitoneale (i.p.) Injektion eines Ketamin/Xylazin-Gemisches in 0,9% NaCl, welches 100 mg/kg Lebendgewicht Ketamin und 16 mg/kg Lebendgewicht Xylazin enthielt. Die Augensalbe Vidisic® wurde während des Fehlens des Lidschlussreflexes auf der Cornea verteilt. Ein rasches Auskühlen der Tierkörper, insbesondere der Nacktmäuse, bei narkosebedingt reduziertem Stoffwechsel wurde durch Einsatz einer Wärmematte oder einer Infrarotlampe verhindert. Eine adäquate Schmerzprophylaxe wurde präanästhetisch mit Carprofen p.o. oder s.c. durchgeführt.

- Inhalationsanästhesie

Alternativ wurde eine kurzzeitige Betäubung mittels Ether durchgeführt. Diese Inhalationsanästhesie wurde insbesondere bei intravenösen Injektionen durchgeführt.

Dazu wurden in einem verschließbaren Glasgefäß mehrere Lagen saugfähiges Papier gelegt und etwas Ether zugegeben. Anschließend wurde das Versuchstier in das Gefäß verbracht und nach Einsetzen der Betäubung wieder entnommen. Zum Aufrechterhalten der Anästhesie wurde ein kleines Gefäß mit etwas Papier gefüllt und eine geringe Menge Ether hinzugegeben. Bei Bedarf wurde der Maus dieses dann vor den Kopf gehalten.

Euthanasie

Die Tötung der Tiere erfolgte nach Atemstillstand infolge der Betäubung mit CO₂ durch Eröffnung des Brustkorbs und Durchtrennung der Aorta im Bereich des Aortenbogens zum Entbluten der Organe.

Alternativ erfolgte die Perfusion der Tiere mittels DPBS. Dazu wurde nach Anästhesie der Brustkorb eröffnet und die rechte Vorkammer des schlagenden Herzens mittels eines Einschnittes mit einem Skalpell eröffnet. Anschließend wurde DPBS in die linke Herzkammer injiziert. Die erfolgreiche Perfusion wurde durch die Ischämie der Akren und der Lunge festgestellt.

Die Tierversuche wurden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern mit den Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-34-02 und 55.2-1-54-2531-52-07 durchgeführt.

2.2.3 Herstellung Tumor tragender Mäuse

Für die *in vivo* Phagenselektion, zur Phage-Biodistribution und zur Inhibition der Bindung des TLTYTWS-Phagen durch das TLTYTWS-Peptid wurden Tumor tragende Mäuse verwendet. Dazu wurden 1×10^7 Lewis-Lung-Carcinoma Zellen (LLC) je Injektion in 100 μ l DPBS in die Flanke oder im Bereich des Oberschenkels einer athymischen weiblichen Maus s.c. injiziert. Nach 14 Tagen hatte sich an der Injektionsstelle ein sichtbarer Tumor entwickelt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Tiere für die Experimente verwendet.

2.2.4 Zymogramm

Das Zymogramm dient dem Nachweis aktiver Matrix-Metalloproteasen, welche auch als Zymogen bezeichnet werden, und wurde nach der Methode von Hangai durchgeführt (Hangai *et al.*, 2002). Zunächst werden die Proteasen in einem vertikalen SDS-Polyacrylamid Gel, welches Kasein oder Gelatine enthält, unter Verwendung des SDS haltigen, diskontinuierlichen Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystems nach Laemmli elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, 1970). Nach der Elektrophorese wird durch mehrfaches Waschen das SDS aus dem Gel herausgelöst und das Gel in einem Reaktionspuffer bei 37°C inkubiert. Dabei spaltet die Protease das in dem Gel enthaltene Substrat, Kasein oder Gelatine. Durch anschließende Färbung des Gels mit Coomassie kann die Spaltung des Substrates durch die aktive MMP sichtbar gemacht werden. Dabei wird das im Gel enthaltene Kasein bzw. Gelatine blau gefärbt. An der Stelle, wo eine aktive MMP ihr Substrat spalten konnte, erfolgt keine Blaufärbung.

Das verwendete Trenngel enthielt 12% Polyacrylamid und 1 mg/ml Kasein-Natriumsalz. Die Polymerisierung wurde durch die Zugabe von APS und TEMED gestartet. Das Sammelgel enthielt 5% Polyacrylamid. Auch hier wurde die Polymerisierung durch APS und TEMED gestartet. Einem Volumen der Matrix-Metalloprotease 1 oder 8 wurde ein Volumen eines 2fach konzentrierten Probenpuffer zugegeben und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die elektrophoretische Proteinauftrennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 150 V/Gel und Wasserkühlung bei 10°C bis zum Auslaufen des Bromphenol blau des Probenpuffers. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Trenngel 3 mal für eine Stunde in einer 2,5%igen Triton X-100-Lösung auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wird das SDS aus dem Trenngel entfernt. Anschließend wurde das Trenngel in Zymografie-Puffer überführt und für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Trenngel wurde mit einer Commassie Brilliant Blau-Färbelösung für eine Stunde gefärbt und anschließend für ca. 15 Minuten entfärbt.

2.2.5 Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen

Die hier verwendeten Matrix-Metalloproteasen 1, 2, 8 und 9 werden von Zellen physiologisch als inaktive Enzyme in das umgebende Medium sezerniert. Die Aktivierung kann durch andere Proteasen oder auch durch Chemikalien erfolgen. Die hier verwandten Proteasen rhMMP2 und rhMMP9 wurden als aktivierte Enzyme von Calbiochem, Darmstadt erworben. Im Unterschied dazu mussten die Proteasen hMMP1 und hMMP8 vor ihrer Verwendung aktiviert werden. Die chemische Aktivierung erfolgte durch 4-Aminophenylquecksilberacetat (APMA) (Murphy *et al.*, 1985).

Dazu wurde der Matrix-Metalloprotease eine 10 mM APMA Lösung in 0,1 M NaOH-Lösung in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt und für 2 Stunden bei hMMP8 und 4 Stunden bei hMMP1 bei 37°C inkubiert. Die Entfernung des APMA erfolgte mittels eines Zentrifugalfilters. Das gesamte Reaktionsvolumen wurde dazu in ein Microcon YM-10 Zentrifugalfilter (Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.) mit einem Größenausschluß (MWCO) von 10 kDa überführt. Da die Molekulargewichte der aktiven hMMP1 und der aktiven hMMP8 deutlich über dem MWCO liegen (45 kDa bzw. 58 kDa), war mit einer vollständigen Retention der Protease in obigem Filter zu rechnen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Der Filter mit dem Reaktionsansatz wurde in ein Reaktionsgefäß eingesetzt und bei $15.000 \times g$ für 30 Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wurde entnommen und das Retenat mit MMP1/8-Puffer auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt.

Es folgte eine erneute Zentrifugation bei $15.000 \times g$ für 30 Minuten. Der Filter wurde nun umgedreht in ein zweites Reaktionsgefäß eingesetzt. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei $4.000 \times g$ für 3 Minuten. Das im Reaktionsgefäß aufgefangene Retenat, welches die aktivierte Protease enthielt, wurde mit MMP1/8-Puffer auf $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ aufgefüllt und bei -70°C bis zur Verwendung gelagert. Um den Erfolg der Aktivierung zu verifizieren, wurde ein Kasein-Zymogramm, wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben, durchgeführt (Abb. 13).

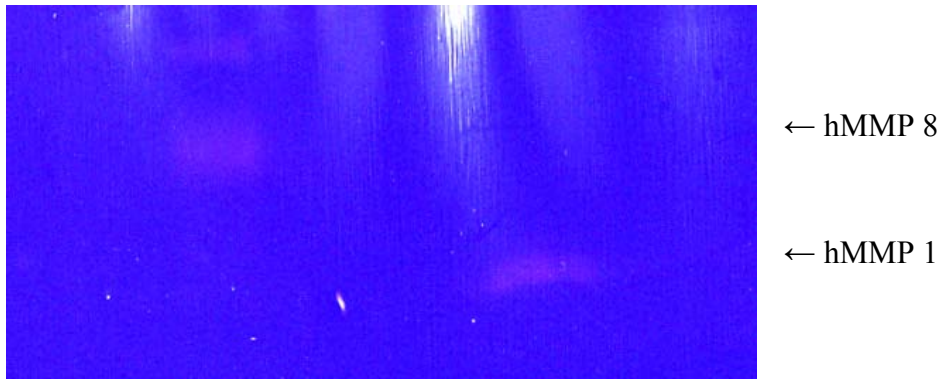


Abbildung 13

Exemplarische Darstellung eines Kasein-Zymogramms

Zur Verifikation der Aktivierung der Matrix-Metalloproteasen 1 und 8 wurde ein Kasein-Zymogramm durchgeführt. Hier wird durch nachfolgende Färbung mit Coomassie das im Zymogramm-Gel enthaltene Kasein blau gefärbt. Nur die Stelle, an der die Protease nach der SDS-Gelelektrophorese vorhanden war und das im Gel enthaltene Substrat spalten konnte, wurde nicht gefärbt.

2.2.6 Arbeiten mit Phagen

2.2.6.1 Beschichten von Mikrotiterplatten

Zur *in vitro* Selektion von Phagen und zum Test der Bindungseigenschaften der Phagen an unterschiedliche Matrices wurden die Wells einer Mikrotiter-Platte mit unterschiedlichen Substanzen beschichtet.

Es wurden hoch bindende 96 well Polystyrol Mikrotiterplatten (Microlon 600, F-Boden, Greiner Bio One) verwendet. Diese Platten weisen auf Grund ihrer Oberflächenbehandlung eine erhöhte Proteinbindungskapazität auf.

Die wells der Mikrotiterplatten wurden mit 10 µg gelöstem humanem Kollagen IV (Sigma), 10 µg BSA (Reinheit 96%) (Sigma), 260 ng aktivierter Matrix-Metalloprotease 2 (Calbiochem) oder 10 µg gelöstem humanem Kollagen IV, welches zuvor durch Erhitzung auf 99°C für 6 Minuten hitze-denaturiert wurde, in 100 µl DPBS beschichtet. Die Lösungen wurden 1 Stunde inkubiert und dreimal mit jeweils 200 µl DPBS/Tween20 (0,05%) gewaschen. Anschließend wurde die nicht beschichtete Oberfläche der wells blockiert. Dazu wurde jedes beschichtete well mit 200 µl einer Blockierungslösung (1% BSA (Reinheit 96%), DPBS, 0,05% Tween20) für 1 Stunde inkubiert. Die wells wurden dreimal mit je 200 µl DPBS/Tween20 (0,05%) gewaschen. Wells, in denen humanes Kollagen IV durch eine Matrix-Metalloprotease gespaltet werden sollte, wurden anschließend 260 ng der aktiven Matrix-Metalloprotease 1, 2, 8 oder 9 mit dem entsprechenden Protease-Puffer in einem Volumen von 100 µl zugegeben. In die verbleibenden beschichteten wells wurden 200 µl Wasser gegeben. Die Platte wurde nun mit Parafilm abgedeckt und für ca. 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die mit der Protease versehenen wells 20-30 mal mit DPBS/Tween20 (0,2%) gewaschen. Danach wurden in diese wells ebenfalls 200 µl Wasser gegeben und die Platte abgedeckt bei 4°C aufbewahrt.

2.2.6.2 Herstellung eines Phagen-Stocks

Um von einzelnen Phagen-Plaques eine ausreichende Phagenmenge zur Amplifikation (Abschnitt 2.2.6.3) oder zur Gewinnung von doppelsträngiger Phagen-DNA (Abschnitt 2.2.8.1) zu erhalten, wurden Phagen-Stocks erstellt.

Dazu wurde eine *E. coli* ER2738 über Nacht Kultur in einem Volumen von 1 ml 1:100 in LB-Medium verdünnt in ein 15 ml Polypropylenröhrchen gegeben. Nun wurde mit einer sterilen Pipettenspitze ein einzelner Plaque in dieses Reaktionsgefäß überführt und 4 ½ Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Suspension wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, die Bakterien durch Zentrifugation bei 16.000 × g für 1 Minute pelletiert und der die Phagen enthaltene Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 16.000 × g für 1 Minute zur Pelletierung verbliebener Bakterien und 80% des Überstandes wurde in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Dieser Überstand stellt den Phagen-Stock dar und wurde bei 8°C gelagert.

2.2.6.3 Phagen-Amplifikation

Zur Phagenselektion und zum Test ihrer Bindungseigenschaften wurde eine große Zahl an Phagen benötigt. Dazu wurden die Phagen in Bakterien amplifiziert und anschließend von den Bakterien abgetrennt und gereinigt. Die Vorgehensweise erfolgte nach Angaben des Herstellers der Phagen (New England Biolabs).

Die zu amplifizierenden Phagen wurden einer *Escherichia coli* ER 2738 Bakteriensuspension zugesetzt. Die optimale Bakteriendichte war bei einer OD_{600nm} von 0,05 bis 0,1 erreicht. Die Amplifikationen wurden in 20 ml LB-Medium durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde 4½ bis 5 Stunden bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. In dieser Zeit konnten sich die Phagen vermehren. Nach dieser Amplifikation wurden Phagen und Bakterien durch eine Zentrifugation bei 13.750 × g für 10 Minuten bei 4°C getrennt, wobei sich die Bakterien im Pellet befanden und verworfen wurden. Der die Phagen enthaltene Überstand wurde in ein weiteres Zentrifugengefäß überführt und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert, um verbliebene Bakterien zu pelletieren. Der phagenhaltige Überstand der zweiten Zentrifugation wurde in ein neues Zentrifugationsgefäß überführt und 1/6 Volumen PEG/NaCl Lösung zugegeben. Dies dient der Ausfällung der Phagen. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Phagen durch eine Zentrifugation bei 13.750 × g für 15 Minuten bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zentrifugation wiederholt. Das Phagenpellet wurde in 1 ml DPBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur weiteren Aufreinigung folgte eine Zentrifugation bei 16.000 × g für 5 Minuten bei 4°C. Der phagenhaltige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Phagen wurden zur weiteren Aufreinigung und Konzentration durch Zugabe von 1/6 Volumen PEG/NaCl und einstündiger Inkubation bei 8°C erneut ausgefällt. Die ausgefällten Phagen wurden nun durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 16.000 × g und 4°C pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde die Zentrifugation wiederholt. Das Phagenpellet wurde mit 200µl DPBS resuspendiert. Letzte Verunreinigungen wurden bei einer Zentrifugation bei 16.000 × g für 1 Minute bei 4°C pelletiert. Der die Phagen enthaltene Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Titerbestimmung wurden 10 µl entnommen und das restliche Phagenamplifikat bei 4°C gelagert.

2.2.6.4 Titerbestimmung der Phagen

Die Titerbestimmung der Phagen erfolgte nach jeder Selektionsrunde, jeder Phagenamplifikation und jedem Test auf Bindungseigenschaften.

Dazu wurden einem definierten Volumen Bakterien 10 µl einer Phagenverdünnung zugegeben. Diese Suspension wurde mit Top-Agarose vermischt und auf einer LB/Agar-Platte, welche zusätzlich S-Gal und IPTG enthielt, ausgestrichen. Durch die Vermehrung der Phagen bildeten sich sogenannte „Plaques“, Löcher, in dem Bakterienrasen. Auf Grund der Alpha-Komplementation konnten die rekombinant veränderten M13 Phagen, welche schwarz waren, und natürlich vorkommende M13 Phagen, welche weiß waren, unterschieden werden (vgl. Abschnitt 2.1.2.5). Durch die Anzahl der Plaques, der verwendeten Phagen-Verdünnung und dem eingesetzten Volumen der Phagenverdünnung konnte dann die Anzahl der Phagen in der Ausgangslösung ausgedrückt in „plaque forming units“ (pfu) bestimmt werden.

Die zu titrierende Phagensuspension wurde in LB-Medium 10 oder 100fach seriel verdünnt. Die Anzahl der Verdünnungen richtete sich nach der zu erwarteten Phagenanzahl. Für die *in vivo*-Selektionsrunde wurden 10^1 bis 10^4 fache Verdünnungen verwendet, für die *in vitro*-Selektionsrunden 10^3 bis 10^6 fache Verdünnungen und für die Phagenamplifikate 10^8 - 10^{11} fache Verdünnungen. In 15 ml Polypropylenröhrchen wurden je Verdünnung 200 µl einer *E.coli* ER2738 Bakteriensuspension mit einer OD_{600nm} von 0,45 - 0,5 vorgelegt. Dieser Suspension wurden 10µl der jeweiligen Phagenverdünnung zugefügt und 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 3 ml Top-Agarose zugegeben und das gesamte Gemisch in eine LB-Agar Platte mit S-Gal und 1mM IPTG gegossen und verteilt. Sobald die Top-Agarose fest geworden war, wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurden jeweils die schwarz gefärbten Plaques einer Platte ausgezählt und die erhaltene Zahl mit der Verdünnungsstufe multipliziert. Dadurch erhält man die Anzahl der Phagen in der Dimension pfu/10µl.

2.2.6.5 Phagen Selektion *in vivo*

Aus einer Phagenbibliothek sollen Phagen selektioniert werden, welche an das Gewebe eines Tumors binden. Um einen großen Teil der unspezifischen Phagen der Phagenbibliothek zu entfernen, wurde eine Phagenselektion in der Maus durchgeführt. Dazu wurde eine Tumor tragende Maus verwendet. Ziel ist es, nur die an das Tumorgewebe bindenden Phagen zu erhalten, alle anderen Phagen werden dadurch aus dem zu untersuchenden Phagen-Pool entfernt (Hoffman, 2004).

Hier wurde eine unselektierte Ph.D.-7 M13 Phagenbibliothek der Firma New England Biolabs, Frankfurt/Main verwendet. Durch rekombinante Modifikation des N-Terminus des M13 Hüllproteins pIII wurden dort 7 Aminosäure lange Oligopeptide eingefügt (Noren *et al.*, 2001) (Noren *et al.*, 2001). In der gesamten M13-Phagenbibliothek lag jede mögliche Aminosäurekombination des Oligopeptides 70 Mal vor.

Einer NMRI-Nacktmaus wurden Lewis-Lung-Carcinoma Zellen, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, in die Flanke s.c. injiziert und nach 14 Tagen für den Versuch verwendet. Dieser einen LLC-Tumor tragenden NMRI-Nacktmaus wurde nach erfolgter Anästhesie die nicht selektionierte M13-Phagenbibliothek mit 2×10^{11} pfu in 100 μ l DPBS i.v. in die Schwanzvene injiziert. Nach 10 Minuten, in denen die Phagen durch den Körper der Maus zirkulierten, wurde der Brustraum der Maus eröffnet und die Perfusion der Maus, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, mit DPBS durchgeführt. Der Tumor wurde frei präpariert, entnommen und gewogen. Das Tumorgewebe wurde mit einem Skalpell zerkleinert, in einen Homogenisator nach Dounce überführt und unter Zugabe von 2,5 ml DPBS mit 30-40 Stößen auf Eis homogenisiert. Eine Zelllyse wurde nicht durchgeführt, da Phagen selektioniert werden sollten, welche an die extrazelluläre Matrix banden. Das Homogenat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und lösliche von den unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation bei $2700 \times g$ für 5 Minuten getrennt. Das Pellet wurde anschließend viermal mit jeweils 1 ml DPBS gewaschen. Zur Eluation der Phagen wurden jetzt 900 μ l einer *E. coli* ER 2738 Bakteriensuspension mit einer OD_{600nm} von 0,432 dem Pellet zugegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden 10 μ l der Suspension zur Titerbestimmung entnommen (vgl. Abschnitt 2.2.6.4). Die verbleibende Lösung wurde einer 20 ml *E. coli* ER2738 Bakteriensuspension mit einer OD_{600nm} von 0,196 zugegeben. Die infektiösen Phagen wurden innerhalb von $4\frac{1}{2}$ Stunden bei 37°C schüttelnd amplifiziert (vgl. Abschnitt 2.2.6.3).

2.2.6.6 Phagen Selektion *in vitro*

Zur Selektion der M13-Phagen *in vitro* wurden beschichtete wells einer Polystyrol-Mikrotiterplatte mit hoher Proteinbindungskapazität verwendet (vgl. Abschnitt 2.2.6.1). Es wurde das Verfahren der negativen Selektion verwendet. Dazu wurden zunächst die Phagen in ein mit nicht modifiziertem humanem Kollagen IV beschichtetes well gegeben. Anschließend wurden alle nicht gebundenen Phagen in ein well mit MMP 2 modifiziertem humanem Kollagen IV überführt. Bei dem folgenden Waschschrift wurden alle nicht oder schwach gebundenen Phagen entfernt. Die gebundenen Phagen-Partikel wurden dann durch Infektion von *Escherichia coli* ER 2738 Bakterien eluiert. Es folgte die Bestimmung des Phagentiters und die Amplifikation der Phagen. Dieses Verfahren wurde mehrmals hintereinander ausgeführt. Zur Erhöhung der Stringenz wurde die Tween20-Konzentration im Binde- und Waschpuffer kontinuierlich gesteigert.

In ein mit 10 µg humanem Kollagen IV beschichtetes well einer Polystyrol-Mikrotiterplatte wurden 2×10^{11} pfu des Phagen-Pools der vorherigen Selektionsrunde gegeben. Das Volumen wurde mit DPBS/Tween20 auf ein Volumen von 100 µl gebracht. Dabei wurden Tween20 Konzentrationen von 0,1%, 0,2% oder 0,3% verwendet. Es folgte eine einstündige Inkubation auf einem Schüttler. Nun wurde die gesamte Lösung in ein mit MMP2 modifiziertem humanem Kollagen IV beschichtetes well der gleichen Mikrotiterplatte überführt. Es schloss sich eine weitere einstündige Inkubation auf einem Schüttler an. Anschließend wurden nicht gebundene Phagen durch 10maliges Waschen mit jeweils 200 µl DPBS/Tween20 entfernt. Hier lag die gleiche Tween20 Konzentration (0,1%, 0,2% oder 0,3%) wie bei der Phagenbindung vor. Die infektiösen Phagenpartikel wurden durch Zugabe von 100 µl einer *E. coli* ER 2738 Bakteriensuspension ($OD_{600nm} = 0,45 - 0,5$) und 30minütiger Inkubation bei 37°C eluiert. Dieser Suspension wurden 10 µl zur Titerbestimmung entnommen (vgl. Abschnitt 2.2.6.4). Das restliche Volumen wurde in 20 ml einer *E. coli* ER2738 Bakteriensuspension ($OD_{600nm} = 0,05 - 0,1$) überführt und die Phagen, wie in Abschnitt 2.2.6.3 beschrieben, amplifiziert. Das Phagenamplifikat stellte den Phagen-Pool dieser Selektionsrunde dar.

2.2.6.7 Test der Bindung der Phagen an unterschiedliche Matrices

Durch diesen Test konnten die Bindungseigenschaften von Phagen an unterschiedliche Matrices untersucht werden.

Dazu wurden, wie in Abschnitt 2.2.6.1 beschrieben, jeweils einer 96 well Mikrotiterplatten beschichtet. Bei dem Test auf „Plastik-Binder“ wurden 96 well Polystyrol-Platten (Greiner Bio-One) verwendet, welche über keine erhöhte Bindungseigenschaften verfügten. Die benutzten Matrices variierten hier je nach der gesuchten Bindungseigenschaft und sind im Ergebnisteil (Abschnitt 3) entsprechend benannt. In jedes beschichtete well wurden 1×10^{11} pfu der zu untersuchenden Phagen in 100 μ l DPBS/Tween20 (0,1% oder 0,2 %, je nach verwendeten Phagen) gegeben, eine Stunde schüttelnd inkubiert und nicht gebundene Phagen durch zehnmaliges Waschen mit je 200 μ l DPBS/Tween20 (0,1% oder 0,2 %, je nach verwendeten Phagen) entfernt. Gebundene Phagen wurden durch Zugabe von 100 μ l einer *E. coli* ER2738 Bakteriensuspension ($OD_{600nm} = 0,45 - 0,5$) und 30minütiger Inkubation bei 37°C eluiert. 10 μ l dieser Bakteriensuspension wurden zur Titerbestimmung verwendet und der Rest verworfen (vgl. Abschnitt 2.2.6.4).

2.2.6.8 Phagen-Biodistribution

Die Phagen-Biodistribution diente dem Nachweis der Anreicherung von Phagen in den unterschiedlichen Geweben einer Tumor-tragenden Maus. Nach i.v. Injektion und Zirkulation der Phagen im Blutgefäßsystem der Maus wurde die Maus euthanasiert. Im Anschluß wurden mehrere Organe und das Tumorgewebe entnommen, homogenisiert und der jeweilige Phagentiter bestimmt.

Einer NMRI- Nacktmaus wurden dazu LLC-Tumorzellen s.c. in beide Oberschenkel injiziert und nach 14 Tagen für das Experiment verwendet (vgl. Abschnitt 2.2.3). Nach Injektionsanästhesie (vgl. Abschnitt 2.2.2) wurden der Maus 1×10^{11} pfu der zu untersuchenden Phagen in einem Volumen von 100 μ l in DPBS i.v. in die Schwanzvene injiziert. Nach einer Zirkulationszeit von 10 Minuten wurde die Maus mit 10 ml DPBS perfundiert (vgl. Abschnitt 2.2.2). Nun wurden das Tumorgewebe, Gehirn, Oberarmmuskel, Magen, Nieren, Herz, Lunge, Leber und Milz entnommen und gewogen. Die einzelnen Gewebe wurden in 500 μ l LB-Medium mittels eines Gewebehomogenisators zerkleinert.

Durch Zugabe von jeweils 500 µl *E.coli* ER2738 mit einer OD_{600nm} von 0,45 bis 0,5 und 30minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Phagen aus dem homogenisierten Gewebe eluiert. 10 µl des Eluats wurden zur Titerbestimmung verwendet (vgl. Abschnitt 2.2.6.4). Zur Bestimmung des Verlustes von Phagen durch die Injektion wurden 1×10^{11} pfu der verwendeten Phagen durch eine Spritze mit Kanüle in ein Reaktionsgefäß gespritzt und der resultierende Phagentiter bestimmt (Injektionskontrolle).

2.2.7 Arbeiten mit chemisch synthetisierten Oligopeptiden

2.2.7.1 Kompetitive Inhibition der Bindung des TLTYTWS-Phagen an MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV *in vitro*

Dieses Experiment sollte zeigen, ob das TLTYTWS-Peptid an die gleiche Struktur des durch MMP 2 modifizierte humane Kollagen IV bindet wie der die Peptidsequenz TLTYTWS präsentierende Phage. Zu erwarten ist hier idealerweise eine dosisabhängige Inhibition der Phagenbindung.

Es wurden dazu, wie in Abschnitt 2.2.6.1 beschrieben, wells einer 96 well Mikrotiterplatte mit humanem Kollagen IV beschichtet und das Kollagen dann durch Matrix-Metalloprotease 2 gespalten. Das TLTYTWS-Peptid wurde mit Konzentrationen von 10 fg/µl bis 1 ng/µl in 100 µl DPBS in ein beschichtetes well gegeben und eine Stunde schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde abpipettiert und verworfen. Nun wurden 1×10^{11} pfu der TLTYTWS-Phagen in 100 µl DPBS/Tween20 (0,2%) in das well gegeben und eine Stunde schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10maligem Waschen des wells mit 200 µl DPBS/Tween20 (0,2%) wurden die gebundenen Phagen durch Zugabe von 100 µl einer *E. coli* ER2738 Bakteriensuspension ($OD_{600nm} = 0,45 - 0,5$) und 30minütiger Inkubation bei 37°C eluiert. 10 µl des Eluats wurden zur Titerbestimmung verwendet (vgl. Abschnitt 2.2.6.4).

2.2.7.2 Inhibition der Akkumulation des TLTYTWS-Phagen im Gewebe eines LLC-Tumors *in vivo*

Dieses Experiment sollte zeigen, ob das TLTYTWS-Peptid im Tumorgewebe von LLC Tumor-tragenden Mäusen die Bindung des TLTYTWS-Phagen inhibieren kann und ob das TLTYTWS-Peptid an Strukturen des LLC Tumors bindet.

Zu diesem Zweck wurden drei NMRI-Nacktmäusen jeweils in die rechte und linke Flanke LLC-Zellen s.c. injiziert und nach 14 Tagen für das Experiment verwendet (vgl. Abschnitt 2.2.3). Den Mäusen wurde jeweils 150 µg des TLTYTWS-Oligopeptids, 1×10^{11} pfu des TLTYTWS-Phagen und DPBS in einem Volumen von 100 µl i.v. in die Schwanzvene koinjiziert. Nach 10 Minuten wurde das Tier mit 10 ml DPBS perfundiert (vgl. Abschnitt 2.2.2). Das Tumorgewebe wurde entnommen und jeweils in 500 µl LB Medium homogenisiert. Die in dem Homogenat enthaltenen Phagen wurden durch Zugabe von 500 µl einer *E. coli* ER 2738 Bakteriensuspension ($OD_{600nm} = 0,47 - 0,5$) und 30minütiger Inkubation bei 37°C eluiert. 10 µl des Eluats wurden zur Titerbestimmung verwendet (vgl. Abschnitt 2.2.6.4).

2.2.7.3 Nachweis der Endothelzell-Differenzierung mittels Tube-Formation Assay

Zum Nachweis der Endothelzell-Differenzierung wurde der Tube-Formation-Assay verwendet. Zu diesem Zweck werden humane Endothelzellen auf Matrigel ausgesät. Die Endothelzellen wandern in das Matrigel ein und bilden tubuläre verzweigte Strukturen aus. Die Häufigkeit dieser Strukturen stellt ein Maß für die stattgefundenen Angiogenese dar und zeigt gleichzeitig die stattgefundenen Endothelzelldifferenzierung (Reimer *et al.*, 2002). Es wurde Wachstumsfaktor-reduziertes Matrigel verwendet. Bei dem Matrigel handelte es sich um eine rekonstituierte murine extrazelluläre Matrix des Engelbreth-Holm-Swarm Tumors (Kleinman *et al.*, 1986). Die Hauptbestandteile des Matrigels sind, wie in der extrazellulären Matrix, Laminin, Kollagen IV, Entaktin und Heparansulfat Proteoglykane (Kleinman *et al.*, 1982; Bissell *et al.*, 1987). Das Matrigel ist bei +4°C flüssig und verfestigt sich bei 37°C zu einem gelartigen Plug und wurde als Wachstumsfaktor reduziertes Matrigel von der Firma BD Bioscience bezogen.

In die wells einer 24-well Zellkulturplatte wurden jeweils 100 µl Wachstumsfaktor reduziertes Matrigel gegeben und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden in jedes well 5×10^4 humane Endothelzellen (HUVEC) in Endothelzell-Wachstumsmedium, welches 1 ng/µl bFGF enthielt, gegeben. Um den Einfluss unterschiedlicher TLTYTWS-Oligopeptid-Konzentrationen zu untersuchen, wurden 0,1, 1 oder 10 µg des Peptids hinzugegeben. Als Negativkontrolle diente ein well ohne Peptidzugabe. Die Zellkulturplatte wurde für 16 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in einen Zellkulturinkubator verbracht. Unter einem Mikroskop wurden die Verzweigungspunkte der sich bildenden tubulären Strukturen gezählt. Weiterhin wurden 0,1, 1 und 10 µg des SRPQITN-Peptids in Kontrollversuchen, wie oben beschrieben, verwendet. Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche durchgeführt.

2.2.7.4 Nachweis der Angiogenese *in vivo* mittels Matrigel-Plug-Assay

Zur Untersuchung der Angiogenese *in vivo* wurde der Matrigel-Plug Assay verwendet (Malinda, 2001; Kleinman *et al.*, 2005; Norrby, 2006).

500 µl Wachstumsfaktor reduziertem Matrigel wurden unter sterilen Bedingungen 200 ng bFGF und das TLTYTWS-Peptid (1, 5 und 10 µg/Plug) oder 10 µg/Plug des SRPQITN-Peptids zugesetzt. Als Kontrolle diente ein Gemisch aus Matrigel und 200 ng bFGF ohne Zusatz eines Peptids. Das Matrigelgemisch wurde CD1 Mäusen nach Injektionsanästhesie s.c. in die Flanke injiziert. Das Matrigel gelierte direkt nach Injektion an der Injektionsstelle unter der Haut. Nach 11 Tagen wurden die Matrigel-Plugs nach Euthanasie und Entbluten der Mäuse entnommen (vgl. Abschnitt 2.2.2). Bei der Entnahme wurde es vermieden, umgebendes Gewebe mit zu entfernen oder die Plugs mit Blut zu kontaminieren. Die Plugs wurden gewogen und unter Zugabe von 500 µl DPBS mittels Ultraschall homogenisiert. Sollte die untersuchte Substanz angiogene Eigenschaften haben, ist ein Einsproßen von Blutgefäßen, also das Vorhandensein von Hämoglobin, zu erwarten. Daher dient der Hämoglobingehalt des Plugs als Maß für die Angiogenese (Smith *et al.*, 2008; Zengel *et al.*, 2008).

Der Hämoglobingehalt der Matrigel-Plugs wurde nach der Drabkins-Methode ermittelt (Stadie, 1920; Drabkin *et al.*, 1935).

Dazu wurde ein Teil des Homogenats in ein Reaktionsgefäß überführt und in einem Endvolumen von 500 µl 1:50 bis 1:100 mit DPBS verdünnt. Nach Zugabe von 500 µl Drabkins-Reagenz wurde die Suspension für 5 Minuten auf einem Thermo-Mixer auf 56°C schüttelnd erhitzt.

Anschließend wurde die Suspension in Einmalküvetten überführt und gegen den Leerwert, bestehend aus DPBS und Drabkins Lösung zu gleichen Teilen, bei 540 nm in einem Spektrometer gemessen. Die Berechnung der Hämoglobin-Werte erfolgte mit Hilfe einer Hämoglobin-Standardgeraden. Dazu wurden 50 bis 1500 µg bovines Hämoglobin in DPBS in einem Gesamtvolumen von 500 µl in Reaktionsgefäße gegeben und unter Zugabe des gleichen Volumens Drabkins Lösung für 5 Minuten auf 56°C erhitzt. Die Proben wurden gegen den Leerwert bei 540 nm im Spektrometer gemessen. Die gemessenen Absorptionen wurden gegen den Hämoglobingehalt aufgetragen. Durch die Messpunkte wurde nun eine Ausgleichsgerade gelegt. Mit Hilfe der Geradengleichung konnte unter Berücksichtigung des Plug-Gewichts und der verwendeten Homogenat-Verdünnung der Hämoglobingehalt der homogenisierten Matrigel-Plugs ermittelt werden.

2.2.8 Arbeiten mit DNA

2.2.8.1 Isolierung von Phagen-DNA

Isolierung von einzelsträngiger M13-Phagen-DNA

Bei diesem Verfahren wird die DNA der extrazellulären Phagen im Kulturmedium isoliert. Diese zirkuläre DNA liegt einzelsträngig vor. Es wurde dabei die Methode zur schnellen Reinigung von Sequenzierungstemplate DNA nach Herstellerangaben (New England Biolabs, Frankfurt/Main) verwendet (Wilson, 1993).

Dazu wurde eine *E. coli* ER 2738 über Nacht Kultur 1:100 in LB Medium verdünnt und je Plaque in einem Volumen von 1 ml in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Nun wurden die Plaques mit einer Pipettenspitze zugegeben und bei 37°C für 4,5 Stunden schüttelnd inkubiert. Das gesamte Kulturvolumen wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei $16.000 \times g$ für 1 Minute zentrifugiert. 500 µl des Überstandes, welcher die extrazellulären Phagen enthielt, wurde in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert. Nach Zugabe von jeweils 200 µl PEG/NaCl wurden die Ansätze durch Invertieren gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die enthaltenen Phagen wurden durch eine Zentrifugation bei $16.000 \times g$ für 10 Minuten pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zentrifugation wurde einmal wiederholt und der verbleibende Überstand verworfen.

Das Phagenpellet wurde in 100 µl Jodid-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Ethanol und einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Phagen-DNA durch eine 10minütige Zentrifugation bei $16.000 \times g$ pelletiert. Die Phagen-DNA wurde nun mit 70%igem Ethanol gewaschen und in einer Speed-Vac unter Vakuum getrocknet. Die Phagen-DNA wurde mit 30 µl H₂O resuspendiert und zur Sequenzierung verwendet.

Isolierung von doppelsträngiger M13-Phagen-DNA

Bei diesem Verfahren wird die doppelstränge, zirkuläre Phagen-DNA, welche in den Wirtsbakterien vorliegt, isoliert. Diese Vorgehensweise wurde zur Gewinnung von doppelsträngiger DNA zur Analyse der Phagen-Klonierungsexperimente mittels PCR verwendet. Da die Phagen-DNA ähnlich einem Plasmid extrachromosomal in der Bakterienzelle vorliegt, wurde eine Plasmidisolierung mit Hilfe des „peqGold Plasmid Miniprep Kit I“ der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, welches alle benötigten Materialien und Reagenzien enthielt, durchgeführt. Dabei wird die Methode der alkalischen Lyse der Bakterienzellen durch SDS mit anschließender Neutralisierung des Lysats angewandt (Birnboim, 1983). Während der Lyse wird kräftiges Mischen des Lysats vermieden, dadurch bleibt die genomische DNA in ihrer ursprünglichen Größe erhalten und wird nicht durch Scherkräfte in Bruchstücke zerlegt. Diese zelluläre DNA wird bei der anschließenden Zentrifugation mit den übrigen unlöslichen Zellbestandteilen pelletiert. Die zirkuläre Phagen-DNA wird dann an eine in einem Säulchen enthaltene Matrix gebunden, gewaschen und anschließend eluiert.

Eine *E. coli* ER 2738 über Nacht Kultur wurde dazu 1:100 in LB Medium verdünnt und je Plaque in einem Volumen von 5 ml in 15 ml Polypropylenröhrchen überführt. Je Poylpropylenröhrchen wurden 5 µl des entsprechenden Phagenstocks hinzugegeben und bei 37°C schüttelnd über Nacht inkubiert. Das jeweilige Kulturvolumen wurde durch mehrmalige Zentrifugation bei $16.000 \times g$ für 2 Minuten und anschließendem Entfernen der Überstände in 2 ml Reaktionsgefäße pelletiert. Die Pellets wurden mit STE-Puffer (1/10 des Ausgangsvolumens) resuspendiert, durch Zentrifugation bei $16.000 \times g$ für 2 Minuten erneut pelletiert und die Überstände entfernt. Zur Resuspendierung der Pellets wurden jeweils 250 µl der Lösung 1 (50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) verwendet. Nach Zugabe von je 250 µl der Lösung 2 (0,2 M NaOH; 1 % SDS) wurden die Ansätze durch sechsmaliges Invertieren gemischt und so die Bakterien lysiert.

Da hier die Scherkräfte minimal waren blieb die zelluläre DNA intakt. Nach der Zell-Lyse wurden zur Neutralisierung der Lysate jeweils 350 µl der Lösung 3 (3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5) zugesetzt und durch sechsmaliges Invertieren gemischt. Es bildeten sich weiße, flockige Präzipitate, welche durch Zentrifugation bei $16.000 \times g$ für 10 Minuten auf dem Boden der Reaktionsgefäße konzentriert wurden. Die Überstände wurden in mit einer Matrix versehene Säulchen (Bestandteil des Plasmid Miniprep Kits) überführt. Die in diesen Überständen enthaltene Phagen-DNA wurde während der Zentrifugation bei $16.000 \times g$ für 1 Minute an die Säulchen-Matrix gebunden. Die restliche Flüssigkeit wurde in Gefäßen aufgefangen und verworfen. Die gebundene DNA wurde anschließend mit 750 µl Waschlösung (mit Ethanol versetzt) gewaschen. Dazu wurde die Waschlösung durch Zentrifugation bei $16.000 \times g$ für 1 Minute durch die Matrix gezogen und verworfen. Zur Entfernung des auf der Matrix verbliebenen Ethanol schloss sich eine erneute Zentrifugation bei $16.000 \times g$ für 1 Minute an. Die doppelsträngige M13-Phagen-DNA wurde mit jeweils 50 µl Eluationspuffer und einer Zentrifugation bei $16.000 \times g$ für 1 Minute von der Matrix in ein Reaktionsgefäß eluiert.

2.2.8.2 Bestimmung des DNA-Gehalts

Zur Bestimmung des DNA-Gehalts einer Lösung wird spektrophotometrisch die Absorption der Lösung bei 260 nm (A_{260nm}) bestimmt. Dazu wurde die Lösung im Verhältnis 1:50 oder 1:100 mit Wasser verdünnt. Als Referenzwert diente Wasser. Bei diesem Meßvorgang wurde auch die Absorption der DNA-haltigen Lösung bei 280 nm bestimmt. Aus den Meßwerten der Absorptionen wird der Quotient $\frac{A_{260nm}}{A_{280nm}}$ ermittelt. Dieser Wert gibt Auskunft über den

Grad der Kontamination der Lösung mit Proteinen, da Proteine im Gegensatz zu Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm haben. Dieser Quotient beträgt bei einer reinen DNA-Lösung 1,8, bei Proteinkontaminationen ist der Quotient deutlich kleiner.

Der DNA-Gehalt der gemessenen Lösung wurde nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\frac{\text{Verdünnungsstufe} \times 50}{1000} \times A_{260nm} = \mu\text{gDNA} / \mu\text{lLösung}$$

2.2.8.3 Ethanol-Fällung der DNA

Zu einem Volumen DNA-Lösung wurden 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 3 Volumen Ethanol (100 %) gegeben.

Dieser Ansatz wurde nun entweder für mindestens 15 Minuten in Trockeneis oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Es schloss sich eine Zentrifugation bei $16.000 \times g$ und Raumtemperatur für 15 Minuten an. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen. Die Waschschriffe beinhalteten eine Zentrifugation bei $1600 \times g$ und Raumtemperatur für mindestens 10 Minuten. Nach der zweiten Waschung wurde das Pellet luftgetrocknet, damit das noch vorhandene Ethanol entweichen konnte. Das Pellet wurde jetzt mit H_2O resuspendiert.

2.2.8.4 Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verschiedener Länge wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die DNA wandert dabei von der Anode zur Kathode, bedingt durch die negative Teilladung des Zucker-Phosphat-Rückgrates. Durch Anfärbung der DNA durch Ethidiumbromid, welches zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert, ist die DNA als Bande bei UV-Licht sichtbar.

Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Erfolgskontrolle der PCR, der Restriktionsspaltungen, der DNA Isolationen und zur Mengenabschätzung wurden DNA-Fragmente in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurden Gele mit einem Anteil von 1,0 - 1,5% Agarose verwendet, je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente.

Sowohl für das Gel, als auch als Laufpuffer, wurde einfach konzentrierter TAE-Puffer verwendet. Der Gellösung wurde Ethidiumbromid ($10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) zugegeben.

Die Gellösung wurde in einen abgedichteten Gelträger gegossen und anschließend der Taschenformer eingesetzt. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit sechsfach konzentriertem Ladepuffer versetzt und in Geltaschen geladen. Zur Größenbestimmung der einzelnen DNA-Fragmente wurde jeweils ein Längenstandard in eine Tasche des Agarosegels geladen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Bandenmuster des Gels mit einer Polaroid-Kamera fotografiert.

Präparative Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten, bei denen ein Fragment für weitere Versuche verwendet werden sollte, wurden präparative Agarosegele verwendet. Die präparativen Agarosegele wurden entsprechend der obigen Beschreibung jedoch mit größeren Taschen gegossen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente im elektrischen Feld erfolgte ebenfalls bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm. Nach Elektrophoreseende wurden ausgewählte DNA-Fragmente unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde später aus der Agarose extrahiert.

Folgende DNA-Längenstandard wurden verwendet: die 1 kb-Leiter und der pUC-Mix 8. Sie wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen.

2.2.8.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelstücken

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelstücken wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA in einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese und Ausschneiden des die DNA enthaltenen Agarosestücks durchgeführt. Zur DNA-Extraktion aus Agarosegelen wurde das Gelextraktionskit „MiniElute Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen, welches alle benötigte Materialien und Lösungen enthielt, nach Herstellerangaben verwendet. Bei diesem Verfahren wird zunächst die Agarose unter Verwendung einer Natrium-Perchlorat enthaltenen Lösung durch Hitze aufgelöst. Anschließend folgt die Bindung der in der Agarose enthaltenen DNA an eine Silica-Matrix (Vogelstein *et al.*, 1979). Agarosereste und Pufferrückstände werden durch Waschen der Matrix mit einer ethanolhaltigen Lösung entfernt.

Die DNA wurde in einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die gesuchte DNA-Bande unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Agarosestücke bis maximal 400 mg wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben. Zu der Agarose wurde der Gelauflösepuffer QG in einem Verhältnis von 1 Teil Agarose zu 3 Teile Puffer QG gegeben. Dieses Gemisch wurde bei 50°C bis zur Auflösung der Agarose inkubiert. Anschließend wurde 1 Gel-Volumen Isopropanol zugegeben und der Ansatz durch Invertieren gemischt.

Das Gemisch wurde dann in ein Matrix beschichtetes Säulchen gegeben, das in ein Auffanggefäß gestellt wurde. Während der folgenden Zentrifugation bei $16.000 \times g$ für 1 Minute wurde die im Gemisch enthaltene DNA an die Matrix gebunden und die Flüssigkeit in dem Auffanggefäß aufgefangen und verworfen. Anschließend wurden 500 μl Puffer QG zugegeben, um die Matrix-gebundene DNA zu waschen. Der Puffer wurde durch eine erneute Zentrifugation bei $16.000 \times g$ für 1 Minute durch das Säulchen in das Auffanggefäß gedrückt und anschließend verworfen. Es folgte ein zweiter Waschschriff mit der Ethanol-haltigen Waschlösung PE. Es wurden 750 μl Lösung PE auf das Säulchen gegeben und das Säulchen für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Waschlösung wurde ebenfalls durch eine Zentrifugation bei $16.000 \times g$ für 1 Minute durch das Säulchen in das Auffanggefäß zentrifugiert und verworfen. Um das restliche Ethanol von der Matrix zu entfernen, wurde eine erneute Zentrifugation bei $16.000 \times g$ für 1 Minute durchgeführt. Anschließend wurde das Säulchen in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. Zur Eluation der DNA von der Matrix wurden 10 μl Wasser auf das Säulchen gegeben und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wurde, gelöst in den Eluationspuffer, durch Zentrifugation bei $16.000 \times g$ bei Raumtemperatur für 1 Minute in das Reaktionsgefäß eluiert. Die DNA-Lösung wurde anschließend sofort für weitere Versuche verwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

2.2.8.6 Restriktionsspaltung von DNA

Zur Restriktionsspaltung wurden die Restriktionsenzyme *Acc65I* und *EagI* verwendet. Die Restriktionsspaltung diente der Linearisierung des zirkulären Vektors M13KE, um anschließend die gewünschten DNA-Fragmente in den Vektor zu ligieren.

Als Reaktionspuffer wurde der Puffer 3 unter Zusatz einer BSA-Lösung der Firma New England Biolabs, Frankfurt/Main nach Herstellerangaben verwendet.

Es wurden folgende Reaktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl pipettiert:

6 µg der Vektor-DNA
2 µl des 10fach konzentrierten Reaktionspuffers
0,2 µl der 100fach konzentrierten BSA-Lösung
je 10 U der verwendeten Restriktionsendonukleasen
H₂O, ad 20 µl

Die Reaktionsansätze wurden bei 37°C für 3 - 4 Stunden inkubiert.

Anschließend wurden die Restriktionsprodukte in einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und ausgewählte DNA-Banden ausgeschnitten und die DNA aus der Agarose extrahiert (vgl. Abschnitte 2.2.8.4, 2.2.8.5).

2.2.8.7 Annealing von Oligonukleotiden

Um das Bindungsmotiv der M13-Phagen zu verändern, wurden unterschiedliche DNA-Sequenzen rekombinant zwischen den Spaltstellen der Restriktionsenzyme *EagI* und *Acc65I* eingefügt. Die zu inserierende doppelsträngige DNA wurde auf Grund ihrer Größe von ca. 53 bp durch das Zusammenfügen, dem Annealing, von einzelsträngigen Oligonukleotiden (vgl. Abschnitt 2.1.2.6) erstellt.

Die komplementären Oligonukleotide, beispielsweise *mut1_for* und *mut1_rev*, wurden in einfach konzentriertem Ligase-Puffer resuspendiert, so dass sich jeweils eine Konzentration von 100 pM/µl ergab. Zum Annealing der Oligonukleotide wurden jeweils 10 µl der resuspendierten Oligonukleotide in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß vereinigt und in einen Thermozykler verbracht. Es wurde folgendes Temperatur-Zeit-Profil verwendet:

95°C für 2 Min,

25°C ramp 3,9°C/sec: dies bedeutet, dass sich die Temperatur des Heizblocks um 3,9°C je Sekunde erniedrigt, bis eine Temperatur von 25°C erreicht ist. Dieses Verfahren wurde durchgeführt, damit sich die komplementären, einzelsträngigen Oligonukleotide zu einem Doppelstrang zusammenlagern konnten.

Der Reaktionsansatz wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt und anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.8.8 Ligation von DNA

Durch die Ligation werden amplifizierten DNA-Fragmente miteinander verbunden beziehungsweise in einen Vektor inseriert. Die DNA-Ligase katalysiert dabei das Schließen des Zucker-Phosphat-Rückgrats der DNA-Helix nach erfolgter Basenpaarung. Es wurde dafür eine Ligase aus dem Bakteriophagen T4 verwendet. Durch den der Ligase beigefügten Reaktionspuffer wird ein optimales Ionenmilieu hergestellt.

Für die Ligation von Fragmenten in den durch Restriktionsspaltung linearisierten Vektor M13KE (Abschnitt 2.2.8.6), wurde das DNA-Fragment (Abschnitt 2.2.8.7) in zweifachem Überschuß zugegeben. Die T4-DNA-Ligase wurde in einer Konzentrationen von 5 Weiss-Einheiten zugegeben (Weiss *et al.*, 1968). Die Ligation wurde im mitgelieferten Reaktionspuffer in einfacher Konzentration bei Raumtemperatur für 1 Stunde durchgeführt. Die Ligase wurde durch Erhitzen der Reaktionansätze auf 65°C für 10 Minuten inaktiviert. Das so erhaltene Plasmid wurde anschließend in *E.coli* ER2738 transformiert (Abschnitt 2.2.8.9).

2.2.8.9 Transformation von Bakterien

Im Rahmen der Transformation nehmen Bakterien exogene DNA meist in Form von Plasmiden auf. Dies geschieht meist durch Hitzeschock oder Elektroporation. Dabei wird die Zellmembran der Bakterien derart verändert, dass diese gelöste exogene DNA aufnehmen. Bei den hier durchgeführten Transformationen wurde das „TransFormAid Bacterial Transformation Kit“ (Fermentas) verwendet.

In einem 15 ml Polypropylenröhrchen wurden 1,5 ml des in dem Kit enthaltenen C-Medium auf 37°C erwärmt. Es folgte die Zugabe von 150 µl einer *E. coli* ER2738 über Nacht Kultur in dem C-Medium und eine 20 minütige Inkubation bei 37°C auf einen Schüttler. Die Bakterienkultur wurde in zwei 1,5 ml Reaktionsgefäß verteilt und die Bakterien durch eine Zentrifugation bei 16.000 x g für 1 Minute und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 300 µl der T-Lösung, bestehend aus gleichen Teilen der Lösungen A und B des Kits, resuspendiert. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut pelletiert und nach Entfernen des Überstands mit 120 µl der Lösung T resuspendiert.

Nach einer weiteren 5 minütigen Inkubation auf Eis wurden 50 µl der Bakterienlösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Von der zuvor erfolgten Ligation (Abschnitt 2.2.8.8) der doppelsträngigen DNA-Fragmente in den M13KE-Vektor wurden 5 µl 2 Minuten auf Eis inkubiert, zu den Bakterien gegeben und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Aliquots des Transformationsansatzes zu je 10 µl wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und durch Zugabe von LB-Medium 1:100 verdünnt. Die Verdünnung sollte eine zu große Anzahl an Phagen-Plaques verhindern. Zu beiden Ansätzen wurden jeweils 3 ml Top-Agarose gegeben, auf LB/IPTG/S-Gal-Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Von den sich bildenden Plaques wurden einige in Reaktionsgefäße überführt und wie beschrieben amplifiziert (vgl. Abschnitt 2.2.6.3).

2.2.8.10 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur *in vitro* Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten der Phagen-DNA verwendet, um eine erfolgte Ligation der DNA-Fragmente nachzuweisen.

Die Reaktionsansätze enthalten die doppelsträngige Ausgangs-DNA (die Matrizen-DNA), Oligonukleotide, welche den 5'- bzw. 3'-Beginn der einzelnen DNA-Stränge bilden (die Primer), ein dNTP-Mix, welcher alle vier Nukleotid-Triposphate der DNA enthält, eine Pufferlösung und eine hitzestabile DNA-Polymerase. Diese Reaktionsansätze werden in einen programmierbaren Thermozykler eingesetzt. Ein typisches Programm zur DNA-Amplifikation besteht aus 3 Schritten. Zunächst erfolgt die Denaturierung der DNA bei 96°C, bei der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge aufgespaltet werden. Es folgt die Bindung der Oligonukleotide, das Annealing. Die Annealing-Temperatur liegt mindestens 5°C unterhalb der Schmelztemperatur t_m der verwendeten Oligonukleotide. Im anschließenden Schritt wird beginnend am Oligonukleotid der DNA-Einzelstrang durch die Taq-Polymerase synthetisiert. Die Temperatur beträgt dabei 72°C und entspricht der optimalen Reaktionstemperatur der Taq-DNA-Polymerase.

Zur Amplifikation der in den Vektor M13KE inserierten DNA wurden jeweils 10 µl der jeweilige doppelsträngigen Phagen-DNA verwendet, da der DNA-Gehalt vorher nicht bestimmt wurde (vgl. Abschnitt 2.2.8.1). Zusätzlich wurde in einem separaten Reaktionsansatz 500 ng der Vektor-DNA ohne inserierte Sequenz als Negativkontrolle der Ligation verwendet.

Reaktionsansatz:	Phagen-DNA	10 µl oder 500 ng
	KCl	50 mM
	Tris-HCl pH 8,8	10 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	dATP, dTTP, dGTP, dCTP	je 10 mM
	mut_for, mut_rev	je 100 pM
	PanScript DNA – Polymerase	1 Unit
	H ₂ O	ad 50 µl

Als Negativkontrolle der PCR diene ein Reaktionsansatz ohne DNA. Die Amplifikation wurde in einem automatischen Thermozykler durchgeführt. Es wurde folgendes Temperatur–Zeit-Profil verwendet:

Erste Denaturierung: 94°C für 1 min;

Denaturierung: 94°C für 1 min,

Annealing: 50°C für 1 min,

Polymerisation: 72°C für 1 min für 40 Reaktionszyklen;

Abschließende Polymerisation: 72°C für 10 min

Die Reaktionsprodukte wurden anschließend zur Erfolgskontrolle auf einem analytischen Agarosegel (1,5 % Agarose) elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Abschnitt 2.2.8.4).

2.2.9 Berechnung und statistische Analyse der Versuchsergebnisse

2.2.9.1 Berechnung des output/input Quotienten der Phagen-Experimente

Zur besseren Vergleichbarkeit der Phagen-Experimente wurde jeweils das Verhältnis zwischen den nach dem Versuch erhaltenen und den eingesetzten Phagen, das output/input Verhältnis, ermittelt. Hierzu wurde ein Quotient aus der durch Titerbestimmung ermittelte Phagenmenge multipliziert mit dem Eluationsvolumen und der eingesetzten Phagenmenge gebildet.

2.2.9.2 Berechnung der halbmaximalen InhibitorKonzentration (IC₅₀)

Bei Experimenten, wo es zur Hemmung der Phagenbindung bzw. der Angiogenese kam, wurde eine IC₅₀-Berechnung durchgeführt.

Zur Berechnung der halbmaximalen InhibitorKonzentration, IC₅₀, wurden die Ergebnisse in Prozent bezogen auf die Kontrolle ohne Inhibitor umgerechnet und gegen die verwendete InhibitorKonzentration aufgetragen. Die Gleichung der Regressionskurve wurde ermittelt (Gleichung 1a) und nach x , der InhibitorKonzentration, aufgelöst (Gleichung 1b).

Gleichung 1a $y = m \times x + b$

Gleichung 1b $x = \frac{y - b}{m}$

Zur Ermittlung der halbmaximalen InhibitorKonzentration IC₅₀ wurde für die Variable y der Wert 50 (50%) eingesetzt und das Ergebnis in der Dimension $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dargestellt (Gleichung 1c).

Gleichung 1c $x_{y=50} = \frac{50 - b}{m} = IC_{50}(\mu\text{g} / \mu\text{l})$

Da die Größe des TLTYTWS-Peptids mit 1800 Da bekannt war, konnte die molare halbmaximale InhibitorKonzentration ermittelt werden (Gleichung 2).

Gleichung 2 $\frac{1800\mu\text{g} / \mu\text{l}}{IC_{50}(\mu\text{g} / \mu\text{l})} \times 1\text{mol} = IC_{50}(\text{mol})$

2.2.9.3 Statistische Analysen

Alle Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde der t-Test nach Moore verwendet (Moore, 1957). Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ ($\alpha \leq 0,05$) wurden als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

Im Rahmen der Angiogenese, der Neubildung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen, wird die vaskuläre Basalmembran gespalten. Ein Hauptbestandteil der vaskulären Basalmembran ist das Kollagen IV, welches durch die Matrix-Metalloproteasen 2 und evtl. 9 gespalten wird (Mackay *et al.*, 1990; Lemaitre *et al.*, 2006). Durch die Spaltung des Kollagen IV werden bisher verborgene, kryptische, Bindungsstellen zugänglich, welche den Endothelzellen als Migrationssignale dienen und somit für die Angiogenese wichtig sind (Xu *et al.*, 2001).

Ziel dieser Untersuchung war daher die Identifizierung von Peptiden, die selektiv an durch Matrix-Metalloprotease 2 modifiziertes humanes Kollagen IV binden. Nachfolgend sollten deren Bindungseigenschaften und Einflüsse auf die Angiogenese untersucht werden.

3.1 Identifizierung und Charakterisierung eines Phagen, welcher selektiv an MMP 2 modifiziertem humanem Kollagen IV in Tumorgewebe bindet

3.1.1 *In vitro/in vivo* Phagen-Display

Zur Identifizierung eines Phagen, der selektiv an MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV in Tumorgewebe bindet, wurde ein kombiniertes *in vitro/in vivo* Phage-Display Screening durchgeführt. Dazu wurde eine Heptapeptid-Bibliothek verwendet, die von M13 Phagen als Teil des Hüllproteins pIII exprimiert wurde. Zunächst wurden aus dieser Bibliothek Phagen selektioniert, welche an das Tumorgewebe eines Lewis-Lung-Carcinoma Tumors, einer murinen Krebszelllinie, binden. Diese Selektion wurde *in vivo* in einem Mausmodell durchgeführt. Aus dieser 1. Selektion resultierte ein Phagenpool, der spezifisch an das Tumorgewebe binden konnte. Gleichzeitig wurde eine Reduktion der Zahl der unspezifischen Phagen im Phagen-Pool erreicht (Abb. 14 Nr. 1).

Die weiteren Selektionen wurden *in vitro* durchgeführt. Dazu wurde zunächst der Phagen-Pool der ersten, *in vivo*, Selektion in mit nicht gespaltenem humanem Kollagen IV beschichtete Wells einer Mikrotiterplatte gegeben (Abb. 14 Nr. 2) und der Überstand in Wells, welche mit MMP 2 gespaltenem humanem Kollagen IV beschichtet waren, überführt (Abb. 14 Nr.3). Die hier bindenden Phagen wurden nach Entfernung nicht-bindender Phagen durch Infektion von *Escherichia coli* ER2738 Bakterien eluiert und amplifiziert (Abb. 14 Nr. 4).

Diese Phagen wurde dann nach gleichem Muster zur weiteren Selektion *in vitro* verwendet (Abb. 14 Nr. 5). Durch diese negative Selektion wurden Phagen entfernt, welche an nicht gespaltenes humanes Kollagen IV binden. Von den an durch MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV bindenden Phagen wurden durch Eluation mittels Bakterieninfektion nur solche eluiert, die auch weiterhin infektiös waren. Dadurch konnten Phagen erhalten werden, welche durch *in vivo* Selektion spezifisch an LLC-Tumorgewebe banden und zugleich auf Grund der *in vitro* Selektion selektiv an durch MMP2 gespaltenes humanes Kollagen IV banden.

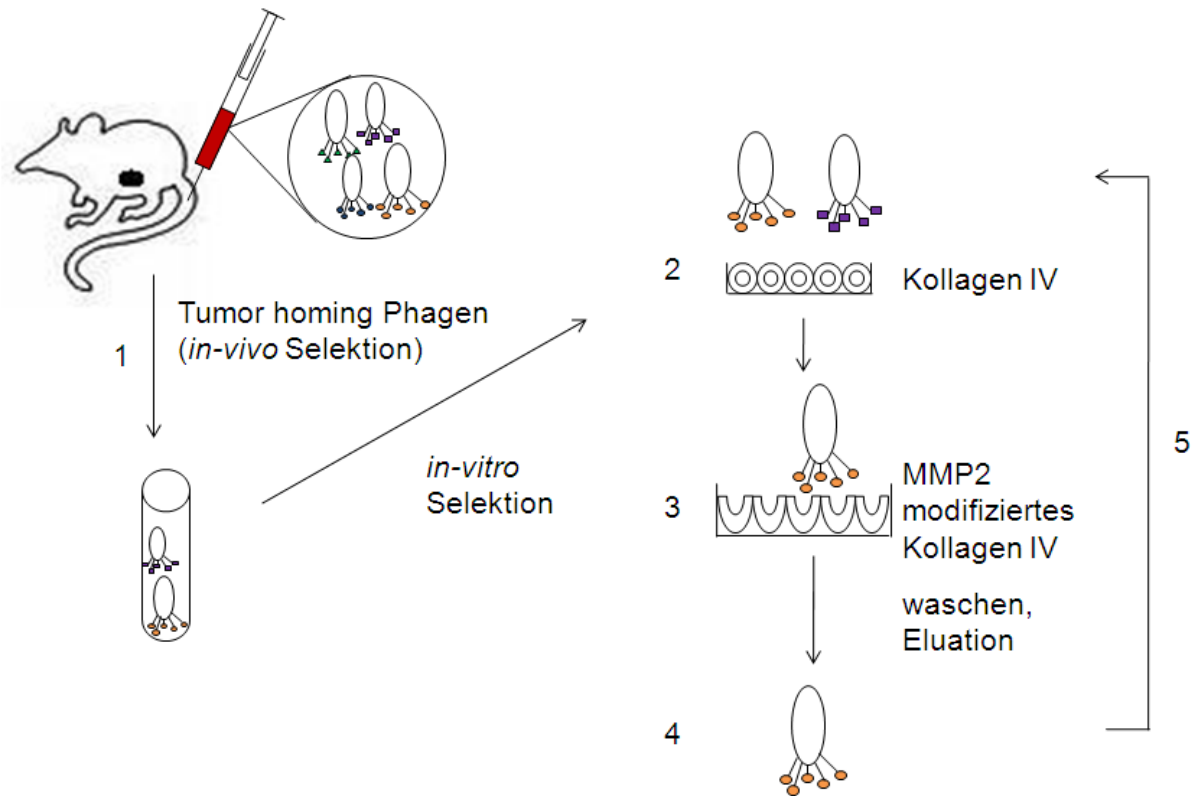


Abbildung 14

Das kombinierte *in vivo/in vitro* Phage-Display

1 in vivo Phagen-Selektion: Eine M13 Phagen-Bibliothek wurde in eine LLC-Tumor tragende Maus i.v. injiziert und der Tumor nach 10 Minuten entnommen. Die im Tumorgewebe enthaltenen Phagen wurden eluiert und bilden den Phagen-Pool der 1. Selektion. Sie binden spezifisch an das Tumorgewebe, es handelt sich daher um „Tumor Homing“ Phagen.

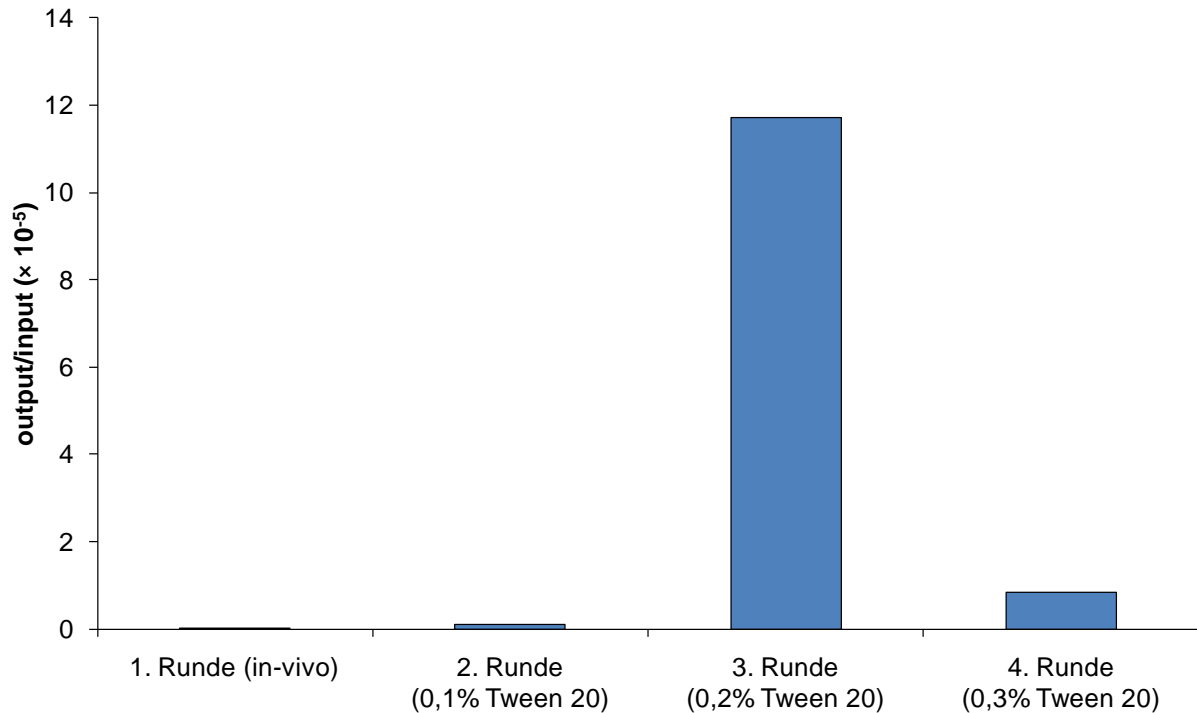
2-5 in vitro Selektion: Die Phagen des Pools der 1. Selektion wurden anschließend *in vitro* selektioniert. **2** Die Phagen wurden zunächst zu nicht modifiziertem humanem Kollagen IV gegeben. **3** Der Überstand wurde zu durch MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV gegeben. **4** Die an durch humane Matrix-Metalloprotease 2 modifiziertes humanes Kollagen IV bindenden Phagen wurden nach Entfernen nicht gebundener Phagen durch Waschen eluiert. **5** Die eluierten Phagen dieser Selektion wurden für weitere *in vitro* Selektionen (beginnend bei Nr.2) verwendet.

Bei der *in vitro* Selektion wurde die negative Selektion verwendet. Zunächst werden an nicht modifiziertes humanes Kollagen IV bindende Phagen entfernt (Nr. 2) und anschließend an MMP modifiziertes humanes Kollagen IV bindende Phagen eluiert (Nr. 4).

Zur *in vivo* Selektion wurden 2×10^{11} plaque forming units (pfu) einer M13 Heptapeptid Phagen-Bibliothek in eine LLC-Tumor tragende Maus i.v. injiziert. Nach 10 Minuten, während dessen die Phagen durch das Gefäßsystem der Maus zirkulieren konnten, wurde der Tumor entnommen und homogenisiert. Durch Zugabe einer *Escherichia coli* ER 2738 Bakteriensuspension konnten die Phagen aus dem Tumorgewebe eluiert werden.

Der Titer der eluierten Phagen wurde bestimmt und diese Phagen amplifiziert (vgl. Abschnitt 2.2.6.5). Das output/input-Verhältnis, der Quotient aus titrierten Phagen und der für den Versuch eingesetzten Phagenmenge, betrug $0,008 \times 10^{-5}$ (Abb. 15). Die amplifizierten Phagen stellten den Pool der ersten Selektionsrunde dar und wurden für die folgende *in vitro* Selektion verwendet. Die *in vitro* Phagen Selektion wurde als negative Selektion durchgeführt. Zunächst wurden an immobilisiertes nicht modifiziertes humanes Kollagen IV bindende Phagen entfernt. Im nächsten Schritt wurden an MMP 2 modifiziertes Kollagen IV bindenden Phagen eluiert, deren Titer bestimmt und amplifiziert. Die amplifizierten Phagen stellten den Phagen-Pool der 2. Selektion dar (vgl. Abschnitt 2.2.6.6). Bei der 2. Selektion wurden in den Lösungen zur Bindung und zum Waschen 0,1% Tween20 zugesetzt, um die Stringenz zu erhöhen. Das output/input-Verhältnis betrug hier $0,114 \times 10^{-5}$ (Abb. 15). Der Phagen-Pool der 2. Selektion wurde für eine weitere, dritte, Selektionsrunde verwendet. Hier wurde erneut die *in vitro* Phagen-Selektion, wie oben beschrieben, durchgeführt. Jedoch wurde hier zur Erhöhung der Stringenz die Konzentration des Tween20 auf 0,2% erhöht. Hier betrug das output/input-Verhältnis $11,7 \times 10^{-5}$ (Abb. 15).

Der nach Amplifikation der Phagen erhaltene Phagen-Pool der 3. Selektionsrunde wurde für eine weitere, vierte, Selektion *in vitro* eingesetzt. Hier wurde die Tween20 Konzentration auf 0,3% erhöht, das output/input-Verhältnis betrug jedoch nur noch $0,84 \times 10^{-5}$ (Abb. 15). Das Absinken der Phagen-Anzahl in der 4. Selektionsrunde zeigt, dass die Phagen, welche optimal an durch Matrix-Metalloprotease 2 modifiziertes humanes Kollagen IV binden, im Phagen-Pool der dritten Selektionsrunde enthalten sind.

**Abbildung 15**

Ergebnis der Selektionsrunden des kombinierten *in vivo/in vitro* Phage-Display

Einer LLC-Tumor tragenden Maus wurden 2×10^{11} pfu einer M13-Phagenbibliothek i.v. injiziert und das Tumorgewebe nach 10 Minuten entnommen und die enthaltenen Phagen eluiert (output/input-Verhältnis: $0,008 \times 10^{-5}$). Diese Phagen wurden amplifiziert und stellten den Phagen-Pool der 1. Selektionsrunde dar. Dieser Phagen-Pool wurde zu einer zweiten, *in vitro* Selektion eingesetzt. Dazu wurden 2×10^{11} pfu der Phagen in DPBS/Tween20 (0,1%) zunächst in ein well einer Mikrotiterplatte, welche mit nicht modifiziertem humanem Kollagen IV beschichtet war, gegeben. Danach wurden die Phagen in ein well beschichtet mit Matrix-Metalloprotease 2 modifiziertem humanem Kollagen IV überführt, nicht gebundene Phagen durch Waschen mit DPBS/Tween20 (0,1%) entfernt und durch Infektion von *E. coli* ER2738 Bakterien eluiert. Der Titer der eluierten Phagen wurde bestimmt und die Phagen amplifiziert. Dies ist der Phagen-Pool der 2. Selektionsrunde. Diese *in vitro* Phagenselektion wurde zweimal wiederholt, wobei jedoch bei der 3. Runde der DPBS-Puffer 0,2% Tween20 und bei der 4. Runde 0,3% Tween20 enthielt.

Die Phagen der 2. und 3. Selektionsrunde wurden jetzt auf ihre Bindungseigenschaften untersucht. Zunächst sollte dabei festgestellt werden, ob in dem jeweiligen Phagen-Pool Phagen enthalten sind, welche an durch Matrix-Metalloprotease 2 gespaltenes humanes Kollagen IV binden. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, einen an durch MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV bindenden Phagen zu finden, wurden Phagen dieser Untersuchung weiterverwendet.

Dazu wurden jeweils einer 96 Well Mikrotiterplatte jeweils mit nicht modifiziertem humanem Kollagen IV, durch MMP 2 modifiziertem humanem Kollagen IV und bovinem Serumalbumin (BSA) als unabhängige Negativkontrolle beschichtet (vgl. Abschnitt 2.2.6.1). In die wells wurden jeweils 1×10^{11} pfu des Phagenpools der 2. Selektionsrunde in DPBS/Tween20 (0,1%) gegeben und eine Stunde lang schüttelnd inkubiert. Nicht gebundene Phagen wurden durch Waschen mit DPBS/Tween20 (0,1%) entfernt und die verbleibenden Phagen wurden durch Infektion von *E. coli* ER2738 Bakterien eluiert und titriert (vgl. Abschnitt 2.2.6.7) (Abb. 16). Ebenso wurde der Phagen-Pool der 3. Selektionsrunde untersucht. Hier wurden ebenfalls 1×10^{11} pfu des Phagenpools verwendet, jedoch enthielt der DPBS-Puffer 0,2% Tween20 (Abb. 16).

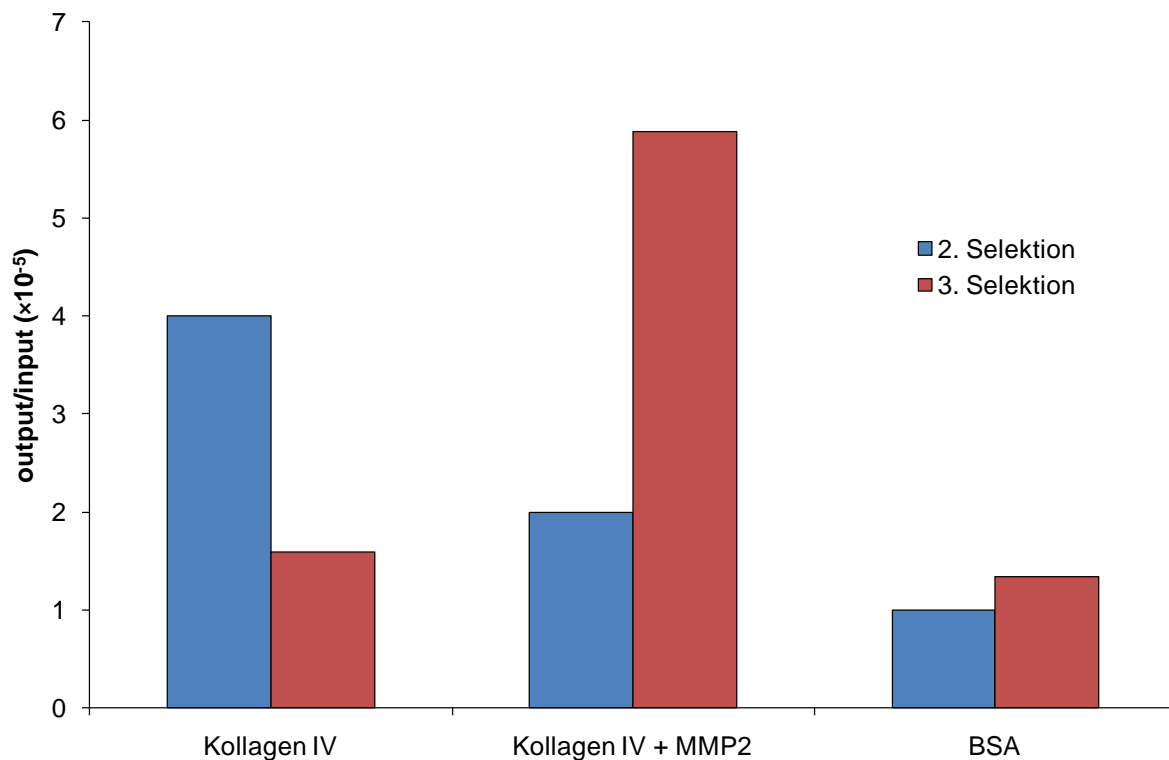


Abbildung 16

Untersuchung der Bindungseigenschaften des Phagen-Pools der 2. und 3. Selektionsrunde

Wells einer 96 well Mikrotiterplatte wurden jeweils mit nicht modifiziertem humanem Kollagen IV, durch MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV (Kollagen IV + MMP2) oder bovinem Serumalbumin (BSA) beschichtet. In diese wells wurden 1×10^{11} pfu des jeweiligen Phagen-Pools gegeben und eine Stunde schüttelnd inkubiert. Das verwendete DPBS enthielt bei der 2. Selektionsrunde 0,1% Tween20 und bei der 3. Selektionsrunde 0,2% Tween20. Nicht gebundene Phagen wurden durch Waschen mit DPBS mit 0,1% oder 0,2% Tween20 (2. oder 3. Selektionsrunde) entfernt, gebundene Phagen durch Infektion von *E. coli* ER2738 Bakterien eluiert und der Phagentiter bestimmt.

Bei der Untersuchung der Bindungseigenschaften der Phagen der 2. und 3. Selektionsrunde zeigte sich, dass im Phagen-Pool der 3. Selektion deutlich mehr Phagen als im Pool der 2. Runde enthalten sind, die an durch MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV binden. Dies belegt zudem den Erfolg der Selektion. Der Phagen-Pool der 4. Selektionsrunde wurde nicht untersucht, da der Titer deutlich geringer als der der 3. Runde war.

Zur Gewinnung einzelner Phagen wurden alle Plaque bildende Phagen der Titrationsplatte mit der höchsten Verdünnung (10^{-5}) aus dem Bindungstest der 3. Selektionsrunde in wells mit MMP2 modifiziertem humanem Kollagen IV ausgewählt. Die einzelnen Plaques wurden in jeweils eine *E. coli* ER2738 Bakteriensuspension überführt und amplifiziert (vgl. Abschnitt 2.2.6.3). Um den Phagen mit der effektivsten Bindung an MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV zu erhalten, wurden die Bindungseigenschaften der Phagen, zur Unterscheidung als Plaque 1-7 bezeichnet, an unterschiedliche Matrices untersucht.

Jeweils 1×10^{11} pfu der amplifizierten Phagen der Plaques 1 bis 7 wurden in DPBS/Tween20 (0,2%) in wells einer Mikrotiterplatte gegeben, welche mit nicht modifiziertem humanem Kollagen IV, durch MMP 2 modifiziertem humanem Kollagen IV und bovinem Serumalbumin beschichtet waren. Nach einstündiger Inkubation wurden durch Waschen mit DPBS/Tween20 (0,2%) nicht gebundene Phagen entfernt, gebundene Phagen durch Infektion von *E. coli* ER2738 Bakterien eluiert und titriert (vgl. Abschnitt 2.2.6.7) (Abb. 17).

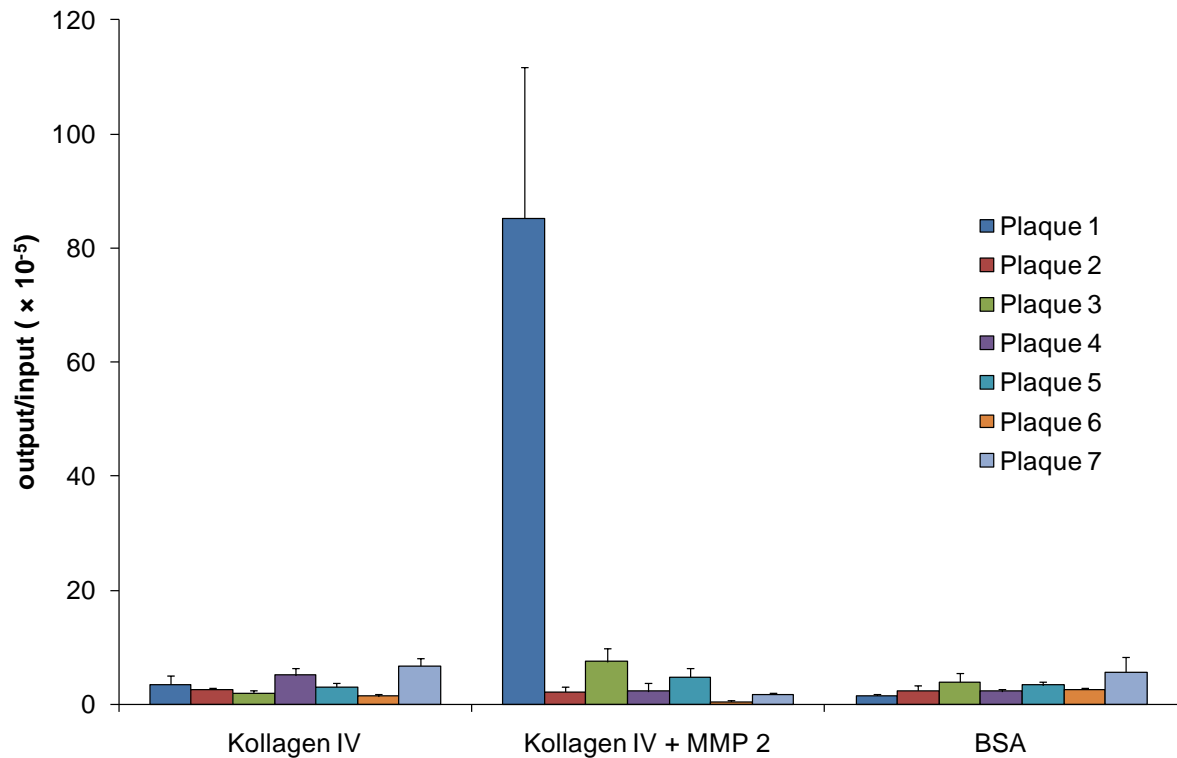


Abbildung 17

Bindungsverhalten von ausgewählten Phagen des Bindungstests des Phagen-Pools der 3. Selektionsrunde

Von der Titrationsplatte mit der höchsten Verdünnung (10^{-5}) aus dem Bindungstest der 3. Selektionsrunde in wells mit MMP2 modifiziertem humanem Kollagen IV wurden alle Plaque bildende Phagen zur Untersuchung der Bindungseigenschaften ausgewählt. Diese Phagen wurden einzeln amplifiziert und die Bindung an nicht modifiziertes humanes Kollagen IV, durch MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV (Kollagen IV + MMP2) und bovines Serumalbumin (BSA) getestet (vgl. Abschnitt 2.2.6.7). Das Ergebnis ist als Quotient der aus dem Versuch erhaltenen Phagenmenge und der im Versuch eingesetzten Phagenmenge (output/input-Verhältnis) dargestellt.

Im Ergebnis zeigte sich, dass die Phagen des Plaques 1 im Vergleich zu den anderen ausgewählten Plaques am Stärksten an durch MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV binden. Weiterhin war die Bindung an nicht modifiziertes humanes Kollagen IV und bovines Serumalbumin im Vergleich zur Bindung an MMP 2 modifiziertes Kollagen IV deutlich geringer.

3.1.1.1 Ermittlung der Oligopeptidsequenz der Phagen einzelner Plaques

Nun wurde die am N-Terminus des M13-Hüllproteins pIII präsentierte Heptapeptidsequenz des bindenden Phagen des Plaques 1 sowie eines nicht bindenden Phagen des Plaques 5 ermittelt. Der Phage des Plaques 5 wurde als Negativ-Kontrolle in den folgenden Versuchen verwendet. Dazu wurde die einzelsträngige Phagen-DNA isoliert und unter Verwendung des Oligonukleotids -96gIII sequenziert (vgl. Abschnitte 2.1.2.6, 2.2.8.1). Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch die Firma MWG Biotech, Ebersberg. Auf Grund der ermittelten DNA-Sequenz konnte auf die Peptidsequenz zurückgeschlossen werden. Es ergab sich für den Phagen des Plaques 1 die Heptapeptidsequenz Thr-Leu-Thr-Tyr-Thr-Trp-Ser (TLTYTWS) und für den nicht bindenden Phagen des Plaques 5 die Sequenz Ser-Arg-Pro-Gln-Ile-Thr-Asn (SRPQITN). Im Folgenden werden der Phage des Plaques 1 als TLTYTWS-Phage und der Phage des Plaques 5, der Kontrollphage, als SRPQITN-Phage bezeichnet.

Von Adey und Mitarbeitern wurde beschrieben, dass M13 Phagen, welche Oligopeptid-Bibliotheken am N-Terminus des Hüllproteins pIII präsentieren, auf Grund der Aminosäuren Tryptophan (Trp/W) und Tyrosin (Tyr/Y) bevorzugt an Polystyrol (PS) bzw. Polyvinylchlorid (PVC) binden. Weiterhin ist es für diese Bindung unerheblich, ob das Plastik nicht geblockt oder mit bovinem Serumalbumin geblockt war (Adey *et al.*, 1995) (Adey *et al.*, 1995). Da in der Peptidsequenz des TLTYTWS-Phagen sowohl Tryptophan als auch Tyrosin enthalten waren, wurde die Bindung der TLTYTWS-Phagen und des SRPQITN Phagen an Polystyrol untersucht. Diese Untersuchung sollte zeigen, ob der TLTYTWS-Phage ein „Plastik-Binder“ ist. Da die verwendeten Mikrotiterplatten (Greiner BioOne, Frickenhausen) laut Hersteller aus Polystyrol bestanden, wurde die Bindung der Phagen an Polystyrol untersucht (vgl. Abschnitt 2.2.6.7). Da die Bindung des TLTYTWS-Phagen an Polystyrol mit einem output/input-Verhältnis von $0,09 \times 10^{-5}$ und des SRPQITN-Phagen mit einem output/input-Verhältnis von $0,04 \times 10^{-5}$ deutlich unter der Bindung an BSA (Plaque 1: $2,2 \times 10^{-5}$, Plaque 5: $3,4 \times 10^{-5}$) lag, ist sie somit irrelevant. Dies schließt aus, dass der TLTYTWS-Phage und der SRPQITN-Phage bevorzugt an Polystyrol binden.

3.1.2 Der TLTYTWS-Phage bindet spezifisch an Matrix-Metalloprotease 2 modifiziertes humanes Kollagen IV

Im Folgenden sollte die Bindung des TLTYTWS-Phagen und des SRPQITN-Phagen, als Negativkontrolle, an unterschiedliche immobilisierte Matrices weiter charakterisiert werden. Als Matrices dienten nicht modifiziertes humanes Kollagen IV, durch die Matrix-Metalloproteasen 1, 2, 8 oder 9 prozessiertes humanes Kollagen IV, hitze-denaturiertes humanes Kollagen IV, die Matrix-Metalloprotease 2 und bovines Serumalbumin. Dazu wurden 96-well Mikrotiterplatten mit den zu testenden Substanzen, wie in Abschnitt 2.2.6.1 beschrieben, beschichtet. In die beschichteten wells wurden jeweils 1×10^{11} pfu des TLTYTWS-Phagen oder des SRPQITN-Phagen in DPBS/Tween20 (0,2%) in einem Gesamtvolumen von 100 μ l gegeben und eine Stunde schüttelnd inkubiert. Nach 10maligem Waschen mit 200 μ l DPBS/Tween20 (0,2%) zur Entfernung nicht gebundener Phagen und Elution der gebundenen Phagen durch Infektion von *E. coli* ER2738 Bakterien wurde der Titer der eluierten Phagen bestimmt (vgl. Abschnitt 2.2.6.7). In der Abbildung 18 sind die Ergebnisse als output/input-Verhältnis dargestellt.

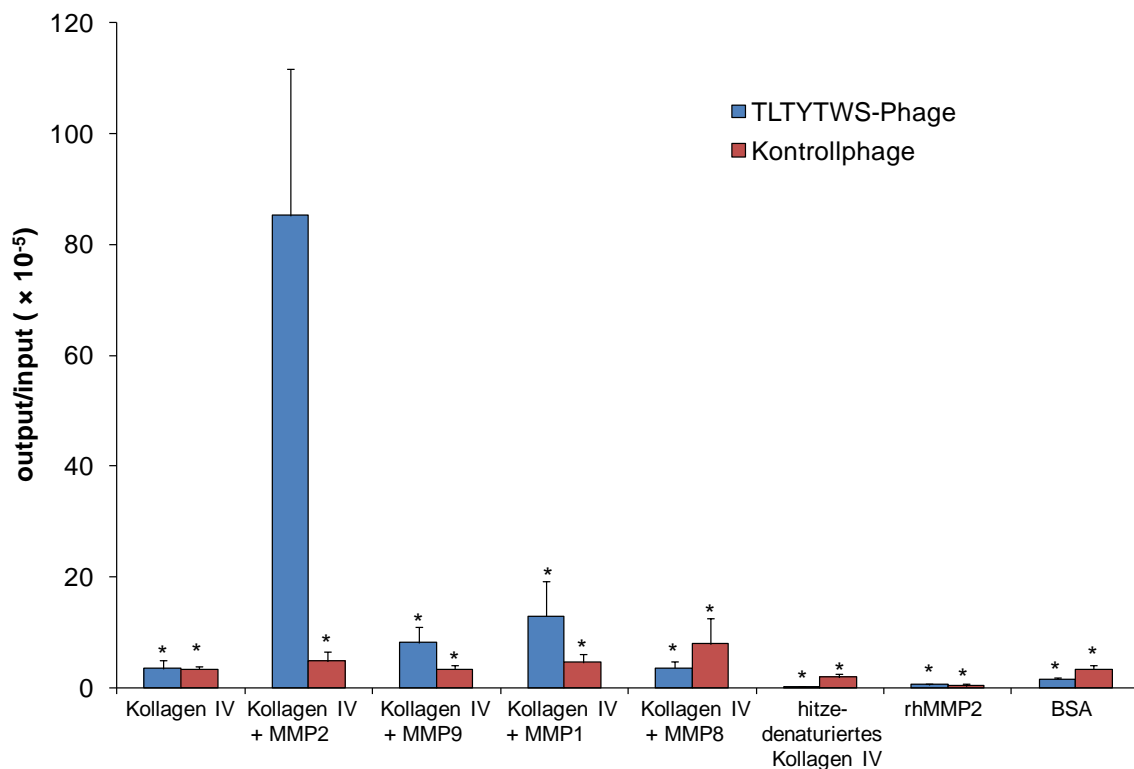


Abbildung 18

Bindung des TLTYTWS-Phagen und eines Kontrollphagen an unterschiedliche Kollagen-Matrices, MMP 2 und BSA

Der TLTYTWS-Phage und ein Kontrollphage (jeweils 1×10^{11} pfu) wurden in wells einer Mikrotiterplatte gegeben. Die wells waren wie folgt beschichtet: nicht modifiziertes humanes Kollagen IV, durch MMP 1, 2, 8 oder 9 modifiziertes humanes Kollagen IV, hitze-denaturiertes humanes Kollagen IV (99°C, 6 Minuten), bovines Serumalbumin (BSA) und MMP 2 alleine.

Nicht gebundene Phagen wurden nach einstündiger Inkubation durch Waschen entfernt, durch Infektion von *E. coli* ER2738 Bakterien eluiert und deren Titer bestimmt (wie oben beschrieben).

Im Ergebnis bindet der TLTYTWS-Phage signifikant besser an durch MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV als an alle anderen getestete Matrices. Der Kontrollphagen bindet deutlich schlechter an MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV. Die Bindung an die anderen getesteten Matrices war der des TLTYTWS-Phagen vergleichbar. * $p < 0,05$ bezogen auf die Bindung des TLTYTWS-Phagen an durch MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV

Dabei zeigte sich, dass der TLTYTWS-Phage mit einem output/input-Verhältnis von 85×10^{-5} an MMP 2 prozessierte humanes Kollagen IV bindet. Die Bindung an nicht prozessiertes humanes Kollagen IV oder an humanes Kollagen IV, welches durch eine der anderen getesteten MMPs gespalten wurde, wies ein deutlich geringeres output/input-Verhältnis auf.

Weiterhin konnte eine nur geringe Bindung an Matrix-Metalloprotease 2 alleine (output/input-Verhältnis: $0,54 \times 10^{-5}$), hitze-denaturiertes humanes Kollagen IV (output/input-Verhältnis: $0,22 \times 10^{-5}$) und bovines Serumalbumin (output/input-Verhältnis: $1,56 \times 10^{-5}$) beobachtet werden.

Diese Untersuchung zeigte die Spezifität der Bindung des TLTYTWS-Phagen an durch MMP 2 modifiziertes Kollagen IV. Der Phage band signifikant schlechter an nicht modifiziertes Kollagen IV und an wells, die nur mit MMP 2 beschichtet waren. Die Bindung an MMP 2 modifiziertes Kollagen IV kann also nicht durch die Bindung an nicht modifiziertes humanes Kollagen IV alleine (95,9% geringere Bindung als an MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV) oder an möglicherweise noch verbliebene Matrix-Metalloprotease 2 (99,3% geringere Bindung als an MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV) erklärt werden.

Der TLTYTWS-Phage bindet selektiv an durch Matrix-Metalloprotease 2 modifiziertes humanes Kollagen IV, aber nicht an nicht modifiziertes humanes Kollagen IV, an hitze-denaturiertes humanes Kollagen IV, an humanes Kollagen IV, welches durch die MMPs 1, 8 oder 9 modifiziert wurde, an MMP 2 alleine oder an bovines Serumalbumin.

3.1.3 Mutation der TLTYTWS-Sequenz

Zur weiteren Charakterisierung der Bindungsspezifität des TLTYTWS-Phagen wurde ein „Loss-of-function“-Versuch durchgeführt.

Dazu wurde die präsentierte Heptapeptidsequenz TLTYTWS durch Ersetzen einzelner oder mehrerer Aminosäuren durch Glycin rekombinant verändert.

Zu diesem Zweck wurden die komplementären Oligonukleotide mut1_for und mut1_rev; mut3_for und mut3_rev und mut4_for und mut4_rev jeweils zu doppelsträngigen DNA-Stücken (dsDNA) hybridisiert (vgl. Abschnitt 2.2.8.7). Auf Grund der verwendeten Oligonukleotidsequenzen enthielt die dsDNA bereits die Überhänge, welche durch eine DNA-Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen *Acc65I* und *EagI* entstehen würden (vgl. Abschnitt 2.1.2.6). Die zirkuläre dsDNA des Phagen-Vektors M13KE, welcher auch zur Konstruktion der Ph.D.-7 Phagenbibliothek verwendet wurde, wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Acc65I* und *EagI* gespalten und die so linearisierte Vektor DNA aus einem präparativen Agarosegel isoliert (vgl. Abschnitte 2.2.8.4, 2.2.8.5, 2.2.8.6). Die jeweiligen doppelsträngigen, hybridisierten Oligonukleotide wurden in den gespaltenen M13KE-Vektor durch Ligation inseriert und in *Escherichia coli* ER2738 Bakterien transformiert (vgl. Abschnitte 2.2.8.8, 2.2.8.9).

Dadurch lag die doppelstängige, replikative Form des Phagen-Genoms innerhalb des Wirtsbakteriums vor, die eine Replikation des Phagen ermöglichte. Die transformierten Bakterien wurden wie bei einer Phagen Titerbestimmung mit Top-Agarose vermischt und auf Agarplatten ausplattiert (vgl. Abschnitt 2.2.6.4). Von den resultierenden Phagen-Plaques wurden einzelne zur Infektion von *E. coli* ER2738-Bakterien willkürlich ausgewählt und Phagen-Stocks erstellt (vgl. Abschnitt 2.2.6.2). Mit Phagen dieser Phagenstocks wurden *E. coli* ER2738-Bakterien infiziert und über Nacht inkubiert. Es schloss sich eine Isolierung der intrazelluläre dsDNA der Phagen an (vgl. Abschnitt 2.2.8.1). Zur Erfolgskontrolle der Ligation wurde die inserierte DNA-Sequenz mittels PCR mit den Oligonukleotiden mut_for und mut_rev amplifiziert (vgl. Abschnitte 2.1.2.6, 2.2.8.10). Sollte die inserierte DNA-Sequenz in dem Phagen-Genom vorhanden sein, wurde eine Amplifikatgröße von 240 bp erwartet. Sollte sie jedoch nicht vorhanden sein, ergab sich eine Amplifikatgröße von 207 bp. Ein Teil der Amplifikate wurden auf einem Agarosegel (1,5 %) unter der Verwendung des DNA-Längenstandards pUC-Mix 8 elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Abschnitt 2.2.8.4) (Abb. 19).

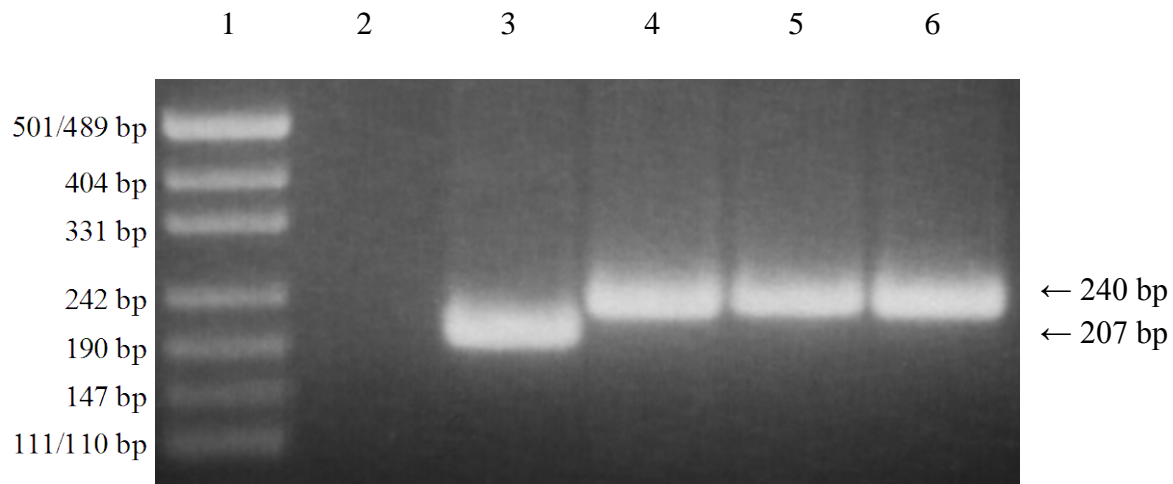


Abbildung 19

Amplifikate der PCR

Dargestellt sind hier die Amplifikate des unveränderten Vektors M13KE und die durch Insertion rekombinant veränderten Vektoren nach der PCR mit den Oligonukleotiden mut_for und mut_rev. Spur 1: pUC-Mix 8-Marker, Spur 2: Negativkontrolle (Ansatz ohne DNA), Spur 3: unveränderte Vektor M13KE, Spur 4: Vektor nach Insertion des doppelsträngigen Fragments aus mut1_for und mut1_rev, Spur 5: Vektor nach Insertion des doppelsträngigen Fragments aus mut3_for und mut3_rev, Spur 6: Vektor nach Insertion des doppelsträngigen Fragments aus mut4_for und mut4_rev.

Wie erwartet, zeigte sich bei dem unveränderten Vektor eine Amplifikatgröße von 207 bp (Spur 3). Die Amplifikate in den Spuren 4 bis 6 belegen eine erfolgreiche Insertion des jeweiligen Fragments mit einer Größe von 33 bp in den Vektor. Die Größe der Amplifikate betrug daher 240 bp.

Nach Analyse der Amplifikatgrößen mittels Elektrophorese wurden einzelne PCR-Amplifikate mittels Sequenzierung unter Verwendung des Oligonukleotids -96gIII verifiziert (vgl. Abschnitt 2.1.2.6). Die Sequenzierung wurde von MWG Biotech, Ebersberg durchgeführt. Phagen, deren inserierte DNA-Sequenz erfolgreich verifiziert werden konnte, wurden für Bindungstests an MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV verwendet.

Es konnten M13-Phagen erzeugt werden, welche die Heptapetidsequenzen **GLGYGWS**, **TGTYTWS** oder **TLTYTGS** am N-Terminus des Phagen-Hüllproteins pIII präsentierten. Diese Phagen wurden amplifiziert und für den Bindungstest verwendet (vgl. Abschnitt 2.2.6.3). Dazu wurden wells einer 96-well Mikrotiterplatte mit humanem Kollagen IV beschichtet und mit MMP 2 proteolytisch modifiziert. Es wurden nun 1×10^{11} pfu der amplifizierten Phagen eine Stunde in den beschichteten wells inkubiert, nicht gebundene Phagen durch Waschen entfernt,

verbliebene Phagen durch Infektion von *E. coli* ER 2738 Bakterien eluiert und titriert (vgl. Abschnitt 2.2.6.7). Die Ergebnisse aus 4 Versuchen sind als output/input-Verhältnis in der Abbildung 20 dargestellt.

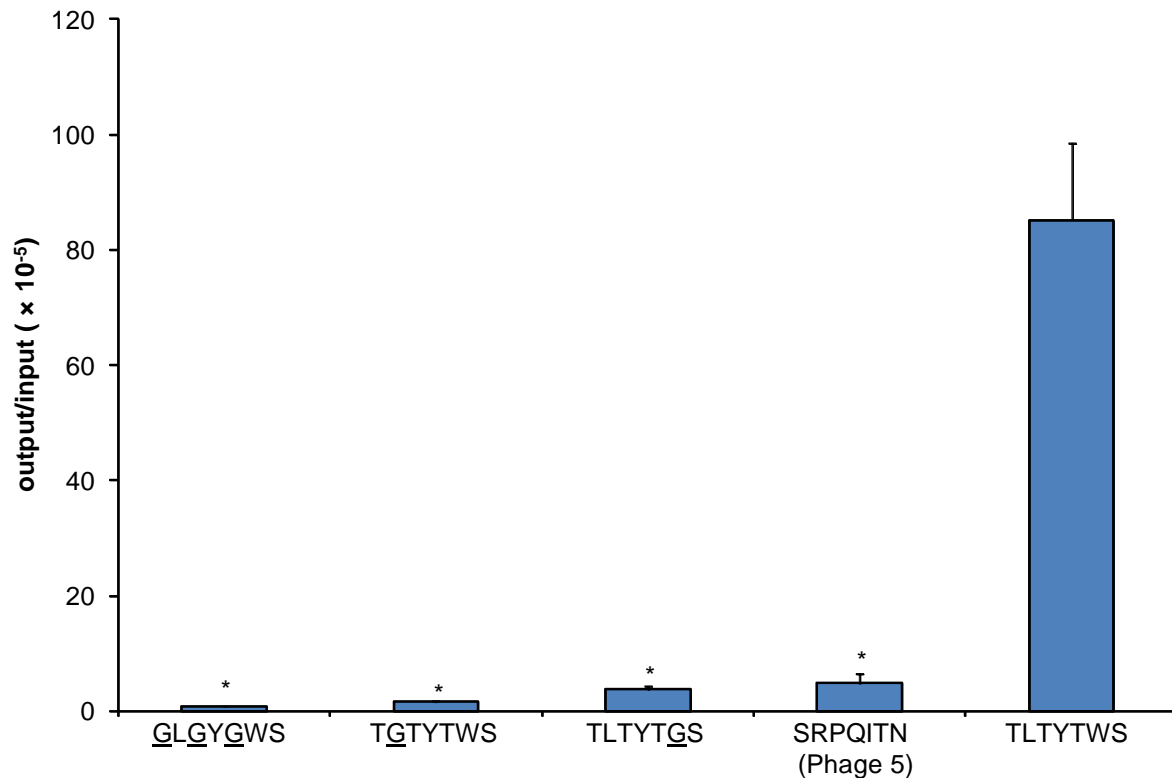


Abbildung 20

Bindung von Phagen mit rekombinant veränderten Varianten der Oligopeptidsequenz TLTYTWS an MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV

Im Bindungsmotiv der M13-Phagen vorhandenes Threonin, Leucin oder Tryptophan wurde rekombinant durch Glycin ersetzt. Es zeigte sich bei allen Varianten eine signifikant geringere Bindung an MMP2 modifiziertes humanes Kollagen IV im Vergleich zu dem Bindungsmotiv TLTYTWS. Zum Vergleich wurde der SRPQITN, ein Kontrollphage, dargestellt. Weiterhin belegt dieses Ergebnis die mögliche Bedeutung der drei Threonine für das Bindungsverhalten des Phagen. *= $p < 0,01$ bezogen auf die Bindung des TLTYTWS-Phagen im Vergleich zu den Varianten

Dabei zeigte sich, dass die Bindung des TLTYTWS-Phagen an MMP 2 modifiziertes Kollagen IV im Vergleich zu den rekombinant veränderten Phagen signifikant erhöht ist ($p < 0,01$). Im Vergleich der getesteten Varianten fällt auf, dass möglicherweise die drei Threonine wichtig für die Bindung des Phagen sind.

Dieses Ergebnis belegte, dass die Sequenz TLTYTWS eine spezifische Bindung des Phagen an Matrix-Metalloprotease 2 gespaltenes humanes Kollagen IV ermöglichte.

3.1.4 Anreicherung des TLTYTWS-Phagen im Tumorgewebe *in vivo* (tumor homing)

Zur Untersuchung der Phagen-Anreicherung im Tumorgewebe *in vivo* wurden 1×10^{11} pfu des TLTYTWS-Phagen oder des GLGYGWS-Phagen in LLC-Tumor tragende NMRI Nacktmäuse i.v. injiziert. Nach Perfusion der Tiere wurden jeweils Tumor und Organe entnommen, gewogen, homogenisiert und der Phagentiter in den unterschiedlichen Geweben bestimmt (vgl. Abschnitt 2.2.6.8). Neben dem Tumorgewebe wurden folgende Organgewebe untersucht: Gehirn, Oberarmmuskel, Magen, Niere, Herz, Lunge, Milz und Leber (Abb. 21).

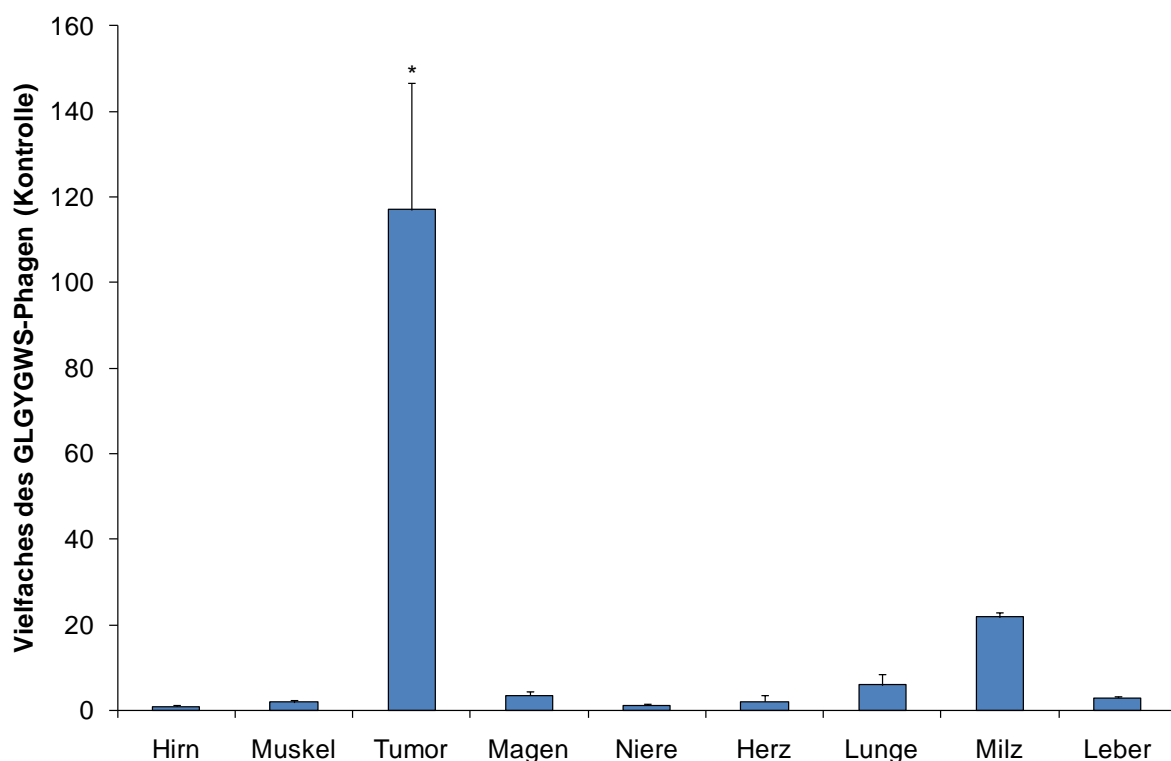


Abbildung 21

Biodistribution des TLTYTWS-Phagen im Vergleich zu dem GLGYGWS-Phagen (Kontrollphage) in LLC Tumor tragenden Mäusen

Es wurden jeweils 1×10^{11} pfu der Phagen i.v. in LLC-Tumor tragende Mäuse injiziert, nach 10 Minuten die einzelnen Gewebe entnommen und der Phagengehalt bestimmt. Die Werte wurden als Vielfaches des Kontrollphagen dargestellt. Der Phagengehalt des TLTYTWS-Phagen im Tumorgewebe war um das 117fache höher als der des Kontrollphagen. * $p < 0,01$ im Vergleich zu dem Kontrollphagen

Es zeigte sich eine 117fach höhere Anreicherung des TLTYTWS-Phagen im Tumorgewebe im Vergleich zu dem nicht-bindenden GLGYGWS-Phagen. Die leicht erhöhte Anreicherung des TLTYTWS-Phagen in der Milz im Vergleich zu der Kontrolle ist vermutlich auf eine

Variation der Aufnahme der Phagen-Partikel durch das retikulo-endotheliale System zurückzuführen (Molenaar *et al.*, 2002). Zudem zeigte ein weiterer Kontrollphage, der SRPQITN-Phage, keine Akkumulation im Gewebe eines LLC Tumors von Tumor tragenden Mäusen (Daten nicht gezeigt).

Dieses Ergebnis belegt die Fähigkeit des TLTYTWS-Phagen, sich spezifisch im LLC Tumorgewebe anzureichern. Zusammenfassend legt dies die Tumor-homing Eigenschaften des TLTYTWS-Phagen nahe.

3.2 Charakterisierung des chemisch synthetisierten TLTYTWS-Peptids

3.2.1 Inhibition der Bindung des TLTYTWS-Phagen an MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV durch ein chemisch synthetisiertes TLTYTWS-Peptid *in vitro*

Im Folgenden wurde untersucht, ob ein chemisch synthetisiertes TLTYTWS-Peptid die Bindung des TLTYTWS-Phagen an MMP 2 prozessiertes humanes Kollagen IV kompetitiv inhibieren kann. Dieses Experiment sollte zeigen, ob der TLTYTWS-Phage ausschließlich auf Grund der am N-Terminus des Hüllproteins pIII präsentierten Oligopeptidsequenz TLTYTWS an MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV binden kann, oder ob diese Bindung möglicherweise auch durch andere Hüllproteine vermittelt wurde. Sollte diese Bindung ausschließlich durch die Oligopeptidsequenz TLTYTWS vermittelt werden, ist zu erwarten, dass die Bindung durch Zugabe eines löslichen chemisch synthetisierten TLTYTWS-Oligopeptids kompetitiv inhibiert werden kann.

Dazu wurde immobilisiertes, MMP 2 prozessiertes humanes Kollagen IV zunächst mit dem chemisch synthetisierten TLTYTWS-Peptid (10 fg/ μ l bis 1 ng/ μ l) inkubiert. Anschließend wurde der TLTYTWS-Phage in einer Konzentration von 1×10^{11} pfu zugegeben und nach einstündiger Inkubation und Entfernen nicht gebundener Phagen die gebundenen Phagen eluiert (vgl. Abschnitt 2.2.7.1). Es folgte die Bestimmung des Titors der eluierten Phagen (Abb. 22).

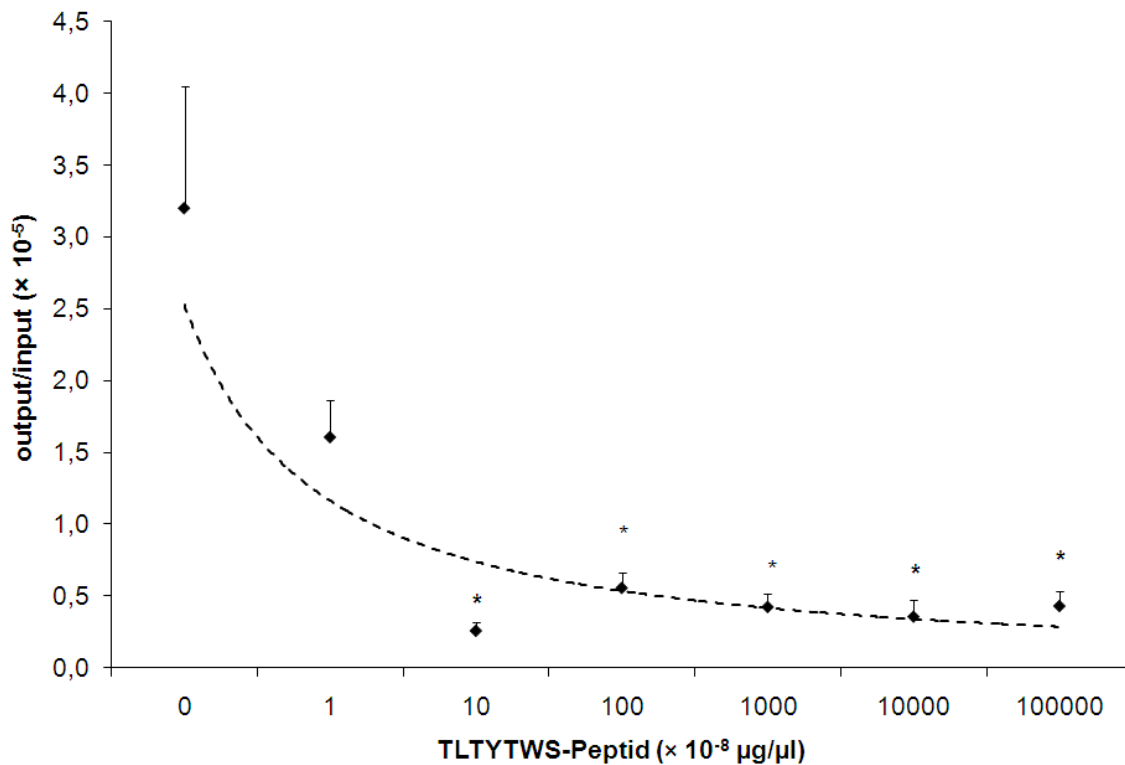


Abbildung 22

Kompetition der Bindung des TLTYTWS-Phagen an durch MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV durch das chemisch synthetisierte TLTYTWS-Oligopeptid

Wells einer 96 well Mikrotiterplatte wurde mit humanem Kollagen IV beschichtet und das Kollagen durch MMP 2 modifiziert (vgl. Abschnitt 2.2.6.1). Zunächst wurde das TLTYTWS-Oligopeptid in Konzentrationen von 10 fg/ μl bis 1 ng/ μl für eine Stunde in den wells inkubiert. Nach Entfernen der Peptidlösung wurden jeweils 1×10^{11} pfu des TLTYTWS-Phagen zugegeben, eine Stunde inkubiert, nicht gebundene Phagen durch Waschen entfernt und die verbliebenden Phagen eluiert und titriert (vgl. Abschnitt 2.2.7.1). Die Bindung des TLTYTWS-Phagen an durch MMP2 modifiziertes humanes Kollagen IV konnte durch das chemisch synthetisierte TLTYTWS-Peptid dosis abhängig kompetitiert werden. * $p < 0,05$ im Vergleich zum Wert ohne Peptidzugabe

Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige, kompetitive Inhibition der Phagenbindung. Bereits bei einer Konzentration von 100 fg/ μl des TLTYTWS-Peptids war eine signifikante Bindungsinhibition des TLTYTWS-Phagen beobachtbar. Daraus ergab sich eine halbmaximale Inhibitionskonzentration (IC_{50}) von 8,35 pmol.

Das Ergebnis beweist, dass der TLTYTWS-Phage mittels der Oligopeptidsequenz TLTYTWS an MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV bindet. Weiterhin legt die geringe Konzentration des TLTYTWS-Oligopeptids, welche zur Inhibition der Phagenbindung ausreicht, eine hohe Bindungsaffinität des Peptids nahe.

3.2.2 Inhibition der Bindung des TLTYTWS-Phagen an das Tumorgewebe von LLC Tumor tragenden Maus durch ein chemisch synthetisiertes TLTYTWS-Peptid *in vivo*

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der TLTYTWS-Phage sich im Gewebe von LLC Tumoren anreichert (vgl. Abschnitt 3.1.4). Weiterhin war das chemisch synthetisierte TLTYTWS-Oligopeptid in der Lage, die Bindung des TLTYTWS-Phagen an MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV *in vitro* kompetitiv zu inhibieren (vgl. Abschnitt 3.2.1). Nun wurde untersucht, ob sich die Anreicherung des TLTYTWS-Phagen im LLC Tumor durch Koinjektion des TLTYTWS-Oligopeptids kompetitiv hemmen lässt.

Wie in Abschnitt 2.2.7.2 beschrieben, wurden LLC Tumor tragenden NMRI-Mäusen 150 µg des TLTYTWS-Oligopeptids und 1×10^{11} pfu des TLTYTWS-Phagen i.v. koinjiziert. Nach 10 Minuten wurde die Mäuse perfundiert, die Tumore entnommen, homogenisiert und die Phagen durch Infektion von *E. coli* ER2738 Bakterien eluiert. Der Phagentiter wurde bestimmt und als output/input-Verhältnis/g Gewebe dargestellt (Abb. 23).

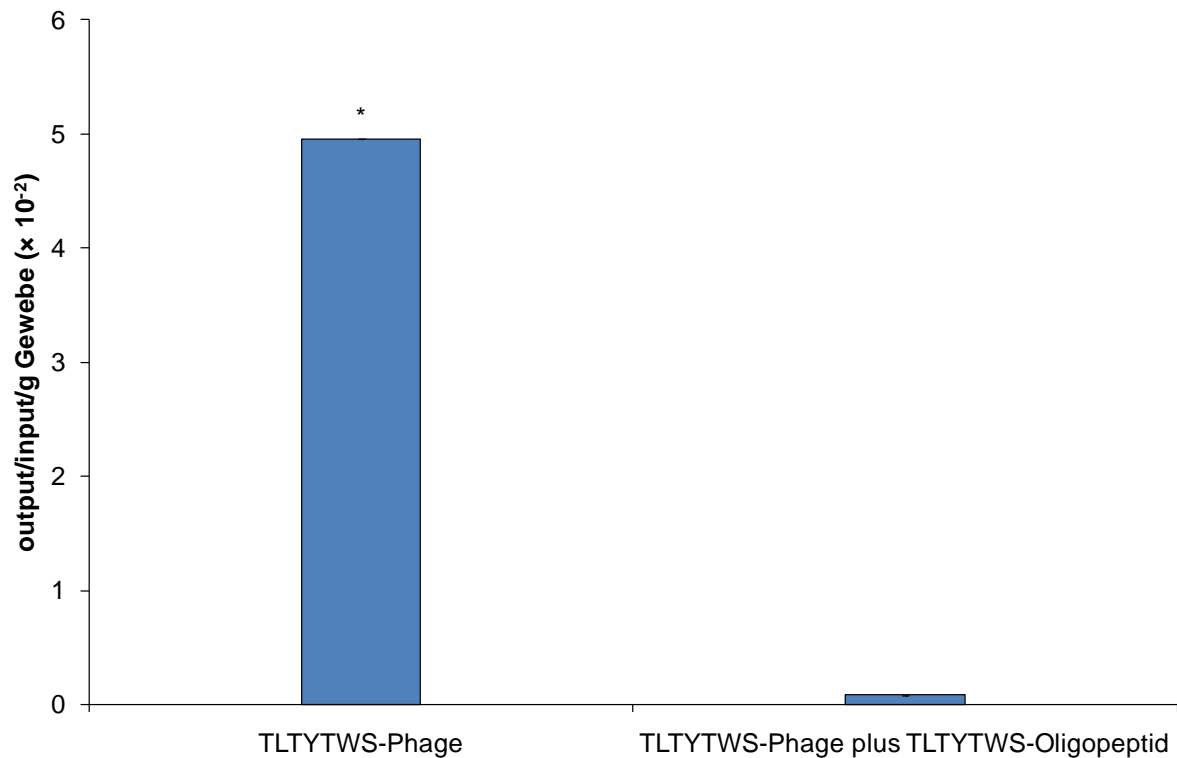


Abbildung 23

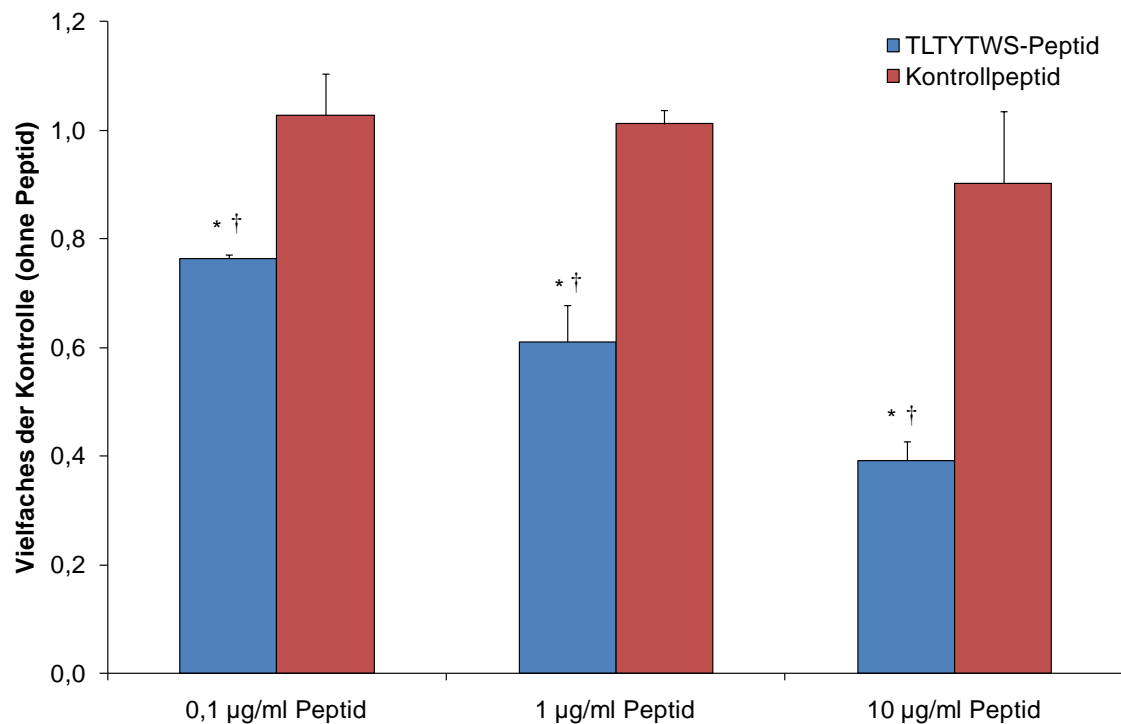
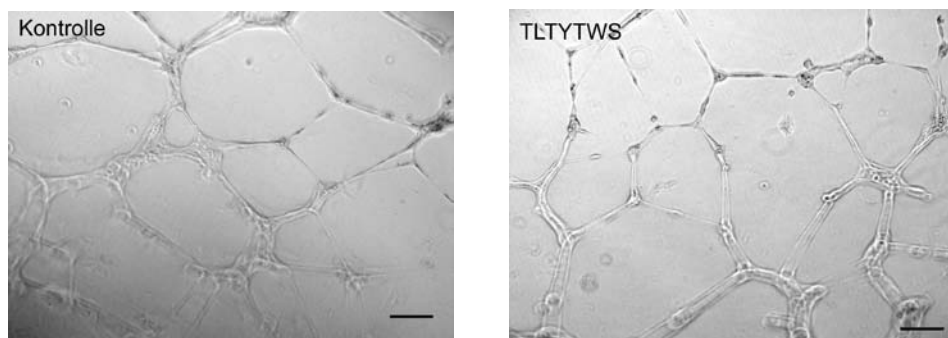
Kompetitive Inhibition der Anreicherung des TLTYTWS-Phagen im LLC Tumorgewebe durch das TLTYTWS-Oligopeptid

LLC Tumor tragenden Mäusen wurden 150 μg TLTYTWS-Peptid und 1×10^{11} pfu TLTYTWS-Phagen i.v. koinjiziert. Nach 10 Minuten wurden die Mäuse perfundiert, das Tumorgewebe entnommen, homogenisiert, die Phagen durch Infektion mit *E. coli* ER2738 Bakterien eluiert und der Phagentiter bestimmt. Die Anreicherung des Phagen im Gewebe eines LLC Tumors kann durch gleichzeitige Gabe des TLTYTWS-Peptids inhibiert werden. * $p < 0,01$

Die Anreicherung des TLTYTWS-Phagen im Gewebe eines LLC Tumor (tumor homing) konnte durch Koinjektion des TLTYTWS-Phagen signifikant um 98,35% reduziert werden ($p < 0,01$). Diese kompetitive Inhibition des Tumor homing zeigt, dass der Phage über die am N-Terminus des Hüllproteins pIII präsentierte Oligopeptidsequenz TLTYTWS an Strukturen des LLC Tumorgewebes bindet. Weiterhin belegt dieses Ergebnis, dass das TLTYTWS-Oligopeptid im LLC Tumorgewebe angereichert wird. Das TLTYTWS-Peptid zeigt, wie der TLTYTWS-Phage, die Eigenschaft des Tumor homing, der Anreicherung im Tumorgewebe.

3.2.3 Einfluss des TLTYTWS-Peptids auf die Endothelzell-Differenzierung

Um den Einfluss des TLTYTWS-Peptids auf die Endothelzell-Differenzierung und die Angiogenese zu untersuchen, wurde der Tube-Formation-Assay verwendet. Dabei wurden jeweils einer 24-well Platte mit je 100 μ l Wachstumsfaktor reduziertem Matrigel beschichtet und je well 5×10^4 HUVEC-Zellen in Wachstumsmedium ausgesät. In dem Wachstumsmedium war 1 ng/ml bFGF enthalten. Es folgte die Zugabe von 0,1; 1 und 10 μ g des TLTYTWS-Peptids oder des SRPQITN-Peptids (Kontrolle). Als weitere Kontrolle dienten jeweils ohne Zugabe eines Peptids (vgl. Abschnitt 2.2.7.3). Nach einer 16stündigen Inkubation bei 37°C wurden unter einem Mikroskop die Verzweigungspunkte in dem sich bildenden tubulären Netzwerk gezählt und als Vielfaches der Kontrolle ohne Peptid dargestellt (Abb. 24).

A**B****Abbildung 24**

Inhibition der Bildung von tubulären Strukturen von HUVEC-Zellen durch das TLTYTWS-Oligopeptid

A Es wurde die Fähigkeit von HUVEC-Zellen untersucht, tubuläre Strukturen in Wachstumsfaktor reduziertem Matrigel nach Zugabe des TLTYTWS-Peptids oder des SRPQITN-Peptids (Kontrollpeptid) zu bilden. Dazu wurden jeweils einer 24-well Platte mit je 100 µl Wachstumsfaktor reduziertem Matrigel beschichtet und je well 5×10^4 HUVEC-Zellen in Wachstumsmedium ausgesät. Es folgte die Zugabe von 0,1; 1 und 10 µg TLTYTWS-Peptid oder des SRPQITN-Peptids (Kontrolle). Als weitere Kontrolle dienten wells ohne Zugabe eines Peptids. Nach einer 16stündigen Inkubation bei 37°C wurden unter einem Mikroskop die Verzweigungspunkte in dem sich bildenden tubulären Netzwerk ausgezählt. Durch Zugabe des TLTYTWS-Peptids konnte die Bildung von tubulären Strukturen in signifikantem Maß reduziert werden. Das Kontrollpeptid hingegen zeigte keinen Einfluss auf die Bildung tubulärer Strukturen.

* $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle ohne Peptid, † $p < 0,02$ im Vergleich zu dem Kontrollpeptid.

B Tubuläres Netzwerk ohne Peptidzugabe (Kontrolle) und nach Zugabe von 10 µg TLTYTWS-Peptid. Balken entspricht 20 µm

Durch die Zugabe des TLTYTWS-Peptids (10µg/ml) konnte eine bis zu 60%ige Reduktion der Verzweigungspunkte beobachtet werden. Die Reduktion der Verzweigungspunkte steht hier in linearem Zusammenhang zur eingesetzten Peptidmenge. Unter Verwendung dieser linearen Regression ergab sich eine IC₅₀-Konzentration von 1,972 µmol des verwendeten TLTYTWS-Peptids. Das TLTYWS-Peptid scheint einen Kollaps des tubulären Netzwerk zu bewirken. Das Peptid blockiert daher möglicherweise die Interaktion von Endothelzellen, die zum Erhalt des Netzwerkes wichtig ist.

3.2.4 Einfluss des TLTYTWS-Peptids auf die Angiogenese

Schließlich wurde der Einfluss des TLTYTWS-Peptids auf die Angiogenese mittels eines *in vivo* Matrigel-Plug-Assay untersucht.

Dazu wurde Wachstumsfaktor reduziertes Matrigel mit 200 ng bFGF mit 1, 5 und 10 µg des TLTYTWS-Peptid oder 10 µg des SRPQITN-Peptids (Kontrollpeptid) vermischt. Als Negativkontrolle dienten Ansätze ohne Peptidzusatz. Die Gemische wurden jeweils CD1-Mäusen s.c. in die Flanke injiziert. Nach 11 Tagen wurde das verfestigte Matrigel, der Matrigel-Plug, entfernt, homogenisiert und der Hämoglobin-Gehalt bestimmt (vgl. Abschnitt 2.2.7.4). Der Hämoglobingehalt des Plugs diente als Maß für die in einem Matrigel-Plug stattgefundene Angiogenese (Smith *et al.*, 2008; Zengel *et al.*, 2008). Die Resultate sind als Vielfaches der Negativkontrolle (ohne Peptidzusatz) dargestellt (Abb. 25).

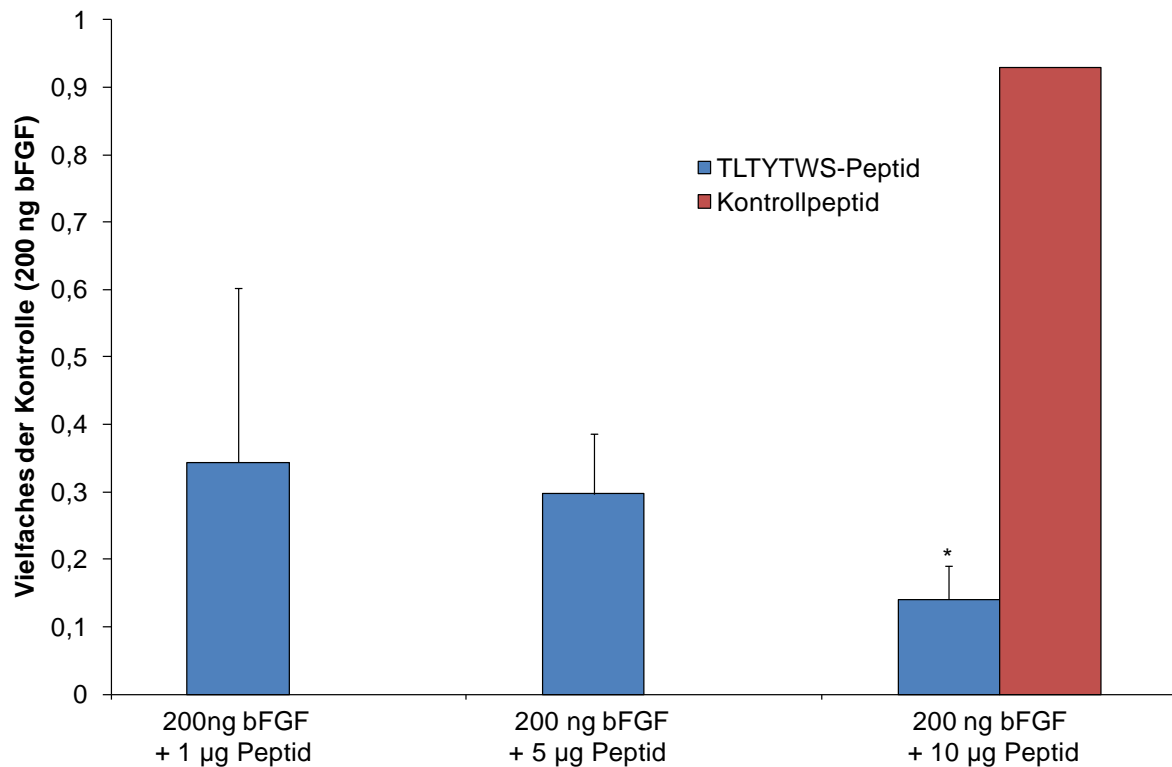


Abbildung 25

Inhibition der Angiogenese durch das TLTYTWS-Oligopeptid *in vivo*

200 ng bFGF und das TLTYTWS-Peptid (1, 5 und 10 µg) oder das SRPQITN-Peptid (10 µg) (Kontrollpeptid) wurden mit 500 µl Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel gemischt und s.c. in Mäuse injiziert. Nach 11 Tagen wurden die Matrigel-Plugs entnommen, homogenisiert und der Hämoglobin-Gehalt als Maß für die Angiogenese bestimmt. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle ohne Peptidzusatz

Durch Zugabe des TLTYTWS-Peptids konnte der Hämoglobingehalt des Matrigel-Plugs, ein Maß für die Angiogenese, dosisabhängig reduziert werden. Bei Zusatz von 10 µg TLTYTWS-Peptid konnte eine signifikante Reduktion der Angiogenese von bis zu 80% im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen werden. Mittels Regressionsgeraden wurde ein IC_{50} -Wert von 1,85 µmol für das TLTYTWS-Peptid ermittelt.

Dieses Ergebnis belegt, dass das TLTYTWS-Peptid eine Bindungsstelle im Kollagen IV blockiert, die im Rahmen der Angiogenese *in vivo* funktionelle Bedeutung besitzt.

4 Diskussion

Ziel meiner Untersuchung war die Identifizierung und Charakterisierung von Peptiden Generation von Peptiden, die an durch Matrix-Metalloprotease 2 modifiziertes humanes Kollagen IV binden. Weiterhin sollte die Fähigkeit dieser Peptide analysiert werden, sich spezifisch im Tumorgewebe anzureichern, die Fähigkeit zum „Tumor homing“. Zu diesem Zweck verwendete ich eine auf der Oberfläche von M13-Phagen kodierte Oligopeptid-Bibliothek. Diese Phagen präsentieren dabei alle mögliche Kombinationen von 7 Aminosäuren. Zur Selektion verwendete ich die kombinierten *in vivo/in vitro* Selektionmethode. Zunächst wurden Phagen in einer LLC-Tumor tragenden Maus selektioniert. Hierbei wurden die Vorteile der *in vivo* Selektion, wie die Spezifität der erhaltenen Phagen für das entsprechende Tumorgewebe und die Reduktion nicht bindender Phagen, genutzt. Bei den folgenden *in vitro* Selektionen wurde zunächst gegen humanes Kollagen IV und dann gegen MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV selektioniert. Hier wurden die Vorteile der negativen *in vitro* Selektion, das Vermeiden von Phagen, die an unmodifiziertes Kollagen IV binden, und die hohe Spezifität für die gewählte Zielstruktur genutzt. Mit Hilfe dieser Selektionsmethode erhielt ich einen Phagen, der die Peptidsequenz TLTYTWS an seiner Oberfläche präsentierte. Dieser Phage band spezifisch an durch MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV, jedoch nicht an unmodifiziertes humanes Kollagen IV, humanes Kollagen IV, welches mit anderen MMPs behandelt wurde, oder an MMP 2 alleine. Die Spezifität der Phagenbindung kann weiterhin durch die Kompetition der Bindung durch das chemisch synthetisierte TLTYTWS-Peptid belegt werden. Des Weiteren konnte ich zeigen, dass insbesondere die in der Peptidsequenz enthaltenen Threonine für die Bindung essenziell sind. Durch Mutation der drei Threonine zu drei Glycinen konnten Phagen erzeugt werden, die nicht mehr in der Lage waren, an MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV zu binden. Im Übrigen konnte ich zeigen, dass der Phage nicht an hitze-denaturiertes humanes Kollagen IV bindet. Daher ist anzunehmen, dass die kryptische Bindungsstelle des Phagen, der die Peptidsequenz TLTYTWS präsentiert, ausschließlich durch die proteolytische Spaltung des humanen Kollagens IV durch die Matrix-Metalloprotease 2 freigelegt wird. Im Unterschied dazu bindet der Antikörper HUIV26 auch an hitze-denaturiertes Kollagen IV (Xu *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001). Dieser Antikörper bindet demnach vermutlich an eine andere kryptische Bindungsstelle im Kollagen IV. Ein Vergleich der Bindung und eine funktionale Charakterisierung des HUIV26 Antikörpers, des CLK-Peptids (Brooks *et al.*, 2004) und des

TLTYTWS-Peptids im Rahmen der Tumor-Angiogenese wären sehr interessant, da weitere Antikörper und Peptide, die an kryptische Bindungsstellen des Kollagen IV binden, bisher nicht beschrieben worden sind. Weiterhin ist der Einsatz des TLTYTWS-Peptids zur Inhibition der Angiogenese bei Tumor-Modellen anderer Organe sehr interessant.

Da gezeigt wurde, dass kryptische Bindungsstellen des Kollagen IV während der Tumor-Angiogenese *in vivo* gebildet werden, habe ich die Lokalisation des TLTYTWS-Phagen in LLC-Tumor tragenden Mäusen untersucht. Ich konnte hierbei eine spezifische Anreicherung des Phagen im LLC Tumorgewebe zeigen. Dies unterstützt die Hypothese, dass dieser Phage spezifisch an eine kryptische Bindungsstelle des Kollagen IV binden kann, welche *in vivo* im Rahmen der Tumor-Angiogenese gebildet werden. Diese Spezifität konnte durch die kompetitive Inhibition der Phagen-Bindung durch eine Ko-Injektion des TLTYTWS-Phagen und des TLTYTWS-Peptids *in vivo* belegt werden. Weiterhin sind Phagen, welche Punktmutationen in der TLTYTWS-Sequenz enthalten, nicht mehr in der Lage, sich im Tumorgewebe anzureichern. Diese Ergebnisse zeigen eine spezifische Anreicherung des TLTYTWS-Phagen im Gewebe von LLC-Tumoren, welche durch das TLTYTWS-Peptid inhibierbar ist. Somit ist auch das TLTYTWS-Peptid in der Lage, sich im Tumorgewebe spezifisch anzureichern.

Es ist bereits nachgewiesen worden, dass Liganden der kryptische Bindungsstellen des Kollagens IV in der Lage sind, sowohl die Tumor-Angiogenese als auch die Bildung pathologischer Blutgefäße, wie bei der diabetischen Retinopathie, zu blockieren (Sottile, 2004; Jo *et al.*, 2006). Daher ist es nicht überraschend, dass auch das TLTYTWS-Peptid mit der Angiogenese interferiert. So konnte ich *in vitro* die Reduktion von Verzweigungspunkten in einem Endothelzell-Differenzierungs-Versuch zeigen. Durch einen Überschuß des TLTYTWS-Peptids konnte die Interaktion des physiologischen Liganden mit der kryptischen Bindungsstelle inhibiert werden. Dadurch konnte die Dichte des sich bildenden tubulären Netzwerkes reduziert werden, die Differenzierung jedoch nicht vollständig inhibiert werden.

Die Annahme, dass durch das TLTYTWS-Peptid eine funktional wichtige Bindungsstelle blockiert wird, wurde weiterhin durch eine Reduktion der Angiogenese *in vivo* in einem Matrigel-Plug-Versuch unterstützt.

4.1 Die Angiogenese

Als Angiogenese wird der Prozess der Gefäßneubildung ausgehend von bereits existierenden Blutgefäßen bezeichnet. Im Unterschied dazu wird die Bildung von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen, den Angioblasten, während der Embryonalentwicklung als Vaskulogenese bezeichnet (Risau, 1997). Die Angiogenese spielt sowohl bei physiologischen Vorgängen als auch bei Erkrankungen eine Rolle. Somit ist zu erwarten, dass im Menschen die von uns untersuchten Bindungsstellen des TLTYTWS-Peptids sowohl im Rahmen der physiologischen, als auch bei der Tumorangiogenese gebildet werden.

4.1.1 Die physiologische Angiogenese

Die physiologische Angiogenese, welche z. B. bei der Wundheilung, dem Menstruationszyklus oder der Embryonalentwicklung vorkommt, ist ein hochregulierter Prozess. Sie findet in mehreren Schritten statt. Es sind dies die Permeabilität des Endotheles, der Proliferation von Endothelzellen, der Proteolyse der Basalmembran, der Migration von Zellen und der Entstehung eines neuen Lumen und dessen Stabilisierung.

Die Permeabilität des Blutgefäßendothels entsteht durch Verlust der Zell-Zell Kontakte durch VE-Cadherin. VE-Cadherin ist ein transmembranes Protein der Endothelzellen, welches mit den extrazellulären Anteilen anderer zellulärer VE-Cadherinen interagiert. Diese Interaktion bewirkt eine Zell-Zell Adhäsion, das Überleben der Endothelzellen und die Kontaktinhibition, ein Verhinderung der Proliferation und den Übergang in einen Ruhezustand.

Intrazellulär binden α - und β -Katenin an den zytoplasmatischen Anteil des VE-Cadherin, welche ihrerseits mit dem Aktinzytoskelett interagieren. Durch VEGF und HGF Rezeptor Tyrosin-Kinasen erfolgt die Phosphorylierung des β -Katenins. Dies bewirkt den Verlust der Bindung an VE-Cadherin und eine Akkumulation im Zellkern. Dadurch wird die Zell-Zell Adhäsion reduziert und die Zellmigration erhöht (Hoschuetzky *et al.*, 1994; Potter *et al.*, 2005). Weiterhin erhöht VEGF die nukleäre β -Katenin Konzentration, was zur Permeabilität beiträgt (Milkiewicz *et al.*, 2006).

Durch die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege kommt es zur Progression des Zellzyklus, welches zur Endothelzell-Proliferation, zur Aktivierung von Promotoren und zum Zell-Überleben führt. Durch Bindung von Wachstumsfaktoren, wie VEGF oder FGF, an Rezeptor-Tyrosinkinase kommt es zur Phosphorylierung von weiteren Kinasen. Dadurch werden die PI3K/Akt-Kinase und der MAPK-Signalwege initiiert. In der Folge werden unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, wie Jun, NF κ B oder Cyclin D aktiviert.

Dies führt unter anderem zur Transkription von Genen pro-angiogener Faktoren (Guan, 1994). Eine weitere wichtige Rolle spielen hier die Integrine. Integrine sind Transmembranproteine, welche aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Sie binden unter anderem an Kollagene, Laminine oder Fibronectin. Durch Aktivierung von Integrinen werden ebenfalls unterschiedliche Signalwege initiiert. Unter anderem durch die Fokale Adhäsionskinase (FAK) und anderer Kinasen können ebenfalls Transkriptionsfaktoren aktiviert werden (Giancotti *et al.*, 1999). Des Weiteren wirkt nukleäres β -Katenin, welches von VE-Cadherin zum Zellkern wandert, als Ko-Transkriptionsfaktor (Milkiewicz *et al.*, 2006).

Der nächste Schritt der Angiogenese ist die Proteolyse der Basalmembran. Dadurch wird eine Sprossung des Blutgefäßes in umliegendes Gewebe ermöglicht. Die Proteolyse erfolgt unter anderem durch die Matrix-Metalloproteasen 2 und 9. Die durch die Endothelzellen und umgebenden Zellen ausgeschütteten MMPs sind in der Lage, neben dem Kollagen IV auch weitere Basalmembran Bestandteile wie Laminin zu spalten. Durch die Spaltung der Bestandteile der Basalmembran entstehen Fragmente, welche bioaktive Eigenschaften haben. So können proteolytische Bestandteile des Laminin-5 oder von Fibronectin die Migration von Endothelzellen induzieren (Schenk *et al.*, 2003; Mott *et al.*, 2004). Weiterhin enthalten Fragmente des Fibronectins RGD-Motive, welche durch die Bindung an $\alpha\beta$ 3-Integrine die Migration induzieren können (Werb *et al.*, 1989). Neben diesen Fragmenten werden aber auch bisher verborgene Bereiche des Kollagens IV freigelegt. Diese Bereiche enthalten ebenfalls Migrationssignale für Endothelzellen (Davis *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001; Hangai *et al.*, 2002; Roth *et al.*, 2006). Des Weiteren können bisher an der Basalmembran verankerte Wachstumsfaktoren durch MMPs gespalten und aktiviert werden. Beispiele hierfür sind bFGF und Heparin gebundene Isoformen des VEGFs. Dadurch wird die Konzentration dieser Wachstumsfaktoren am Ort der Angiogenese deutlich erhöht (Sottile, 2004).

Neben diesen angiogenen Eigenschaften entstehen jedoch auch Fragmente mit anti-angiogenen Eigenschaften. Dies sind u.a. die NC 1 Domänen der α -Ketten des Kollagen IV, das Arresten, NC1 α 1(IV) (Colorado *et al.*, 2000; Sudhakar *et al.*, 2005), das Canstatin, NC1 α 2(IV) (Kamphaus *et al.*, 2000; Petitclerc *et al.*, 2000) und das Tumstatin, NC1 α 3(IV) (Maeshima *et al.*, 2000). Nach Spaltung der Basalmembran-Bestandteile erfolgt die Proteolyse der Bestandteile der verbleibenden extrazellulären Matrix, wie das Kollagen I, durch andere Matrix-Metalloproteasen. Im Rahmen dieser Prozesse wird wohl auch die Bindungsstelle des TLTYTWS-Peptids gebildet. Die genauen Mechanismen, die zur

Entstehung dieser „cyptic-binding-site“ *in vivo* führen, sollten in Zukunft in Tiermodellen der Angiogenese untersucht werden.

Durch die Serin Protease Plasmin erfolgt ebenfalls die Proteolyse der Basalmembran. Plasmin entsteht durch proteolytische Aktivierung aus dem Vorläufer Plasminogen durch die Gewebe- oder Urokinase Plasminogen Aktivatoren (tPA/uPA). Substrate des Plasmins sind neben Fibrinogen und Fibrin auch Laminine, Fibronectin, inaktive Matrix-Metalloproteasen und membrangebundene Wachstumsfaktoren. Der Gewebe-Plasminogen Aktivator ist physiologisch nur in geringer Plasma-Konzentration vorhanden, kann aber von Endothelzellen in hoher Konzentration sezerniert werden. Er wird jedoch schnell von dem Inhibitor Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1 (PAI-1) inaktiviert. Der Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) hat in seiner ungebundenen Form eine hohe Affinität für Fibrin und wirkt fibrinolytisch. Nach der Bindung von uPA an seinen membranständigen Rezeptor uPAR wird die Spaltung von Plasminogen und die Aktivierung von MMPs deutlich erhöht. Auch uPA kann durch PAI-1 inaktiviert werden, welches nach Bindung an uPAR endozytiert werden kann (McMahon *et al.*, 2008).

Nach der proteolytische Spaltung der Basalmembran und der sich darunter befindlichen extrazellulären Matrix wandern Endothelzellen in diesen Bereich ein. Bei der Migration der Endothelzellen werden Zell-Matrix-Kontakte und eine intrazellulären Modulation des Zytoskeletts der Zelle benötigt. Zell-Matrix-Kontakte erfolgen insbesondere durch Bindung von Integrinen an die unterliegende Matrix. Integrine sind mit zytoplasmatischen Kinasen assoziiert, die ein „outside-in signaling“ vermitteln. Durch Bindung der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF und bei proliferierenden Endothelzellen werden insbesondere $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ – Integrine exprimiert. Durch die Integrin assoziierte fokale Adhäsionskinase (FAK) werden andere Kinasen aktiviert unter anderem die Rho-GTPasen. Zu den Rho-GTPasen gehören die GTPasen RhoA, Rac und Cdc42. Zunächst kommt es zu einer Polarisation der Endothelzellen. Durch Umorganisation des Aktinzytoskeletts, welches durch Rho-GTPasen vermittelt wird, bilden sich am nun vorderen Ende der Zelle, dem „leading edge“, Lamellopodien und Filopodien aus. Dort kommt es zum Clustering von Integrinen und es bilden sich fokale Adhäsionen aus. Die Zelle bewegt sich nun entlang der Adhäsionsstellen. Am hinteren Ende kommt es zur Auflösung der Adhäsion (Giancotti *et al.*, 1999; Ridley *et al.*, 2003; Mattila *et al.*, 2008). Diese Migration erfolgt jedoch nur in Abhängigkeit von einer angiogenese-spezifischen extrazellulären Matrix, in denen z. B. die spezifischen Bindungsstellen des TLTYTWS-Peptids exprimiert werden.

In welcher Weise diese Adhäsionsstellen auf intrazelluläre Signalwege zurückwirken und z.B. die GTPasen Rho, Rac und Cdc42 regulieren muss in Zukunft untersucht werden.

Die einwandernden Endothelzellen bilden ein Lumen aus. Dies kann durch intrazelluläre Kanalisation durch Fusion zytoplasmatischer Vakuolen oder durch interzelluläre Kanalisation durch Aufbau einer Basalmembran durch die Endothelzellen erfolgen. Dies wird unter anderem durch die Aktivierung des Integrins $\alpha_2\beta_1$, welches an Kollagen bindet, initiiert. Intrazellulär sind die Kinasen Src und Cdc42 mit Integrinen assoziiert. Deren Aktivierung führt zur Aktivierung der nachgeordneten p21-aktivierten Kinasen (PAK) 2 und 4. Diese Kinasen sind für die Bildung des Lumens verantwortlich (Milkiewicz *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2007). Auch bei diesen Vorgängen spielt die Bindungsstelle des TLTYTWS-Peptid *in vivo* vermutlich eine Rolle, da ich zeigen konnte, dass die *in vivo* Angiogenese durch Blockade der Bindungsstelle mit einem Überschuss an TLTYTWS-Peptid gehemmt werden kann.

Die Angiogenese endet mit der Stabilisierung des neu gebildeten Lumens. Durch Bindung der Wachstumsfaktoren PDGF und PIFG werden Perizyten und glatte Muskelzellen zu dem neuen Lumen rekrutiert. Diese Zellen bewirken durch die Ausschüttung von TGF β ein Verbleiben der Endothelzellen im Ruhezustand und die Bildung von Komponenten der extrazellulären Matrix. Weiterhin erfolgt die Bindung von Angiopietin 1 an den Tyrosinkinase Rezeptor Tie2 der Endothelzellen. Dies führt zu einer Aktivierung der MAPK und PI3K/Akt-Signalwege, was zu einem Endothelzell-Überleben, aber nicht zu einer weiteren Proliferation führt. Dadurch werden die Endothelzellen in einen Ruhezustand überführt. Durch Ausschüttung von Protease-Inhibitoren wie den TIMPs werden die an der Angiogenese beteiligte Proteasen inaktiviert (Giancotti *et al.*, 1999; Sottile, 2004; Rundhaug, 2005; Milkiewicz *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2007). Meine *in vitro* Experimente legen nahe, dass die Exposition der Bindungsstelle des TLTYTWS-Peptids auch für diese endgültige Gefäßdifferenzierung eine Rolle spielen könnte, da *in vitro* die Differenzierung von Endothelzellen durch einen Überschuss des Peptids gehemmt werden konnte.

4.1.2 Die Tumor-Angiogenese

Auch für das Wachstum maligner Tumore ist die Bildung neuer Blutgefäße entscheidend. Diese wird zwar teils durch ähnliche Mechanismen reguliert wie die physiologische Angiogenese, die entstehenden Blutgefäße unterscheiden sich jedoch morphologisch und funktionell deutlich von Blutgefäßen im Normalgewebe. Die von mir und anderen Forschern bisher beschriebenen kryptischen Bindungsstellen im Kollagen sind sowohl bei der Tumorangio-genese als auch während der physiologischen Angiogenese aktiv. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass die besonderen Bedingungen beim Tumorstadium zur Expression weiterer, tumorspezifischer kryptischer Bindungsstellen führen können. Kennzeichnend für Tumorzellen ist eine autonome Zellteilung, welche nicht den Regulationsmechanismen des Körpers unterworfen ist. Diese autonome Zellteilung führt zu einem unkontrollierten Zellwachstum. Zur tumorigenen Transformation von Zellen kommt es durch die zell-autonome Anhäufung von Mutationen der zellulären DNA. Durch das Ausschalten der endogenen Zellzyklus-Kontrolle, den DNA-Schäden Kontrollpunkte (checkpoints) und durch externe Wachstumsinhibitionssignale kommt es zu einer fortlaufenden Proliferation der Zellen. Durch Verringerung der Aktivität von Tumor-Suppressorgenen und der Apoptose regulierenden Gene findet kein programmierter Zelltod statt (Ruegg *et al.*, 2007).

Zellen benötigen zum Wachstum Sauerstoff und Nährstoffe, welche durch Blutgefäße bzw. durch Diffusion aus diesen Gefäßen zu ihnen gelangen. Tumorzellen haben auf Grund ihrer erhöhten Proliferation einen erhöhten Sauerstoff- und Nährstoffbedarf. Bis zu einer Größe von etwa $0,125 \text{ mm}^2$ kann sich das Tumorgewebe durch Diffusion mit den notwendigen Nährstoffen versorgen (Liotta *et al.*, 2000). Solche Tumore werden als avaskulär bezeichnet, welche klinisch meist erst bei Autopsien festgestellt werden. Hier überwiegen anti-angiogene Faktoren. Dies sind unter anderem die Ausschüttung von Thrombospondin 1 (TSP-1) oder die abgespaltene extrazelluläre Domäne des VEGF-Rezeptors 1 (sVEGFR-1) von Endothelzellen, welche VEGF binden. Durch sezernierte Proteasen, wie den Matrix-Metalloproteasen, können von Bestandteilen der Basalmembran wie dem Kollagen IV antiangiogene Fragmente, wie Tumstatin oder Arrestin, freigesetzt werden. Diese Proteasen werden nicht nur von den Tumorzellen, sondern auch von den umgebenden nicht transformierten Zellen, dem Tumorstroma, ausgeschüttet. Auf Grund der fehlenden Blutversorgung kommt es innerhalb der Tumormasse sowohl zum Zellwachstum als auch zur Zellnekrose oder Apoptose.

Dadurch nimmt die Tumormasse insgesamt nicht zu und der Tumor verbleibt in einer Art Ruhezustand, welche auch als „tumor dormancy“ bezeichnet wird (Wicki *et al.*, 2008). Die Tatsache, dass bei der Tumorangiogenese MMPs sowohl von Tumor-, als auch von Stromazellen gebildet werden könnte einen der Faktoren darstellen, der die Entstehung tumorspezifischer kryptischer Bindungsstellen begünstigt, da während der physiologischen Angiogenese MMPs nur von Stroma- und Entzündungszellen gebildet werden können.

Damit die Tumorzellen überleben, das umliegende Gewebe invadieren und metastasieren können, benötigen sie den Kontakt zum Blutgefäßsystem. Dieser Zugang zum Gefäßsystem wird durch die Neubildung von Blutgefäßen ermöglicht, der Tumor-Angiogenese (Folkman, 1971). Damit es dazu kommt, erfolgt in den Tumorzellen ein „angiogenic switch“, welcher die Balance zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren zu Gunsten pro-angiogener Faktoren verschiebt. Der angiogenic switch kann durch metabolischem Stress, mechanischem Stress, entzündliche Prozesse oder weitere Genmutationen der Tumorzellen erfolgen (Carmeliet *et al.*, 2000; Rundhaug, 2005). Außerdem konnte eine Beteiligung von MMP 2 und 9 an dem „Angiogenic switch“, dem Entstehen eines angiogenen Phänotyps, nachgewiesen werden (Fang *et al.*, 2000). Ob die beschriebenen kryptischen Bindungsstellen im Kollagen für diesen „Angiogenic switch“ entscheidend sind bleibt in geeigneten Tiermodellen der Tumorangiogenese zu untersuchen, meine Ergebniss lassen einen solchen Zusammenhang jedoch möglich erscheinen.

Auf Grund der Nekrose von Tumorzellen und durch Sezernierung von Zytokinen und Chemokinen werden Fibroblasten, Makrophagen sowie Mastzellen aktiviert und Monozyten und Lymphozyten rekrutiert. Im Blut zirkulierende Monozyten werden durch das von Tumorzellen ausgeschüttete Chemokin CCL2 und durch die Wachstumsfaktoren VEGF, PDGF, TGF β und dem Makrophagen Kolonie stimulierenden Faktor (M-CSF) rekrutiert und differenzieren zu Tumor assoziierten Makrophagen (TAM). Diese Makrophagen können Wachstumsfaktoren, wie VEGF und PDGF, und Matrix-Metalloproteasen sezernieren, welche die Angiogenese und das Zellüberleben ermöglichen. Weiterhin inhibieren TAMs die T_H1 adaptive Immunantwort (Le Bitoux *et al.*, 2008; Mueller, 2008).

Die Tumorzellen selbst kommen durch fehlenden Sauerstoff und fehlende Nährstoffe in metabolischen Stress. Es kommt zur Hypoxie. Dabei akkumuliert der „Hypoxia-inducible factor-1a“ (HIF-1a) und gelangt in den Zellkern. Dort dimerisiert er mit dem „aryl hydrogen receptor nuclear translocator“ (ARNT) und induziert die Transkription von Genen, welche in ihrer Promotorregion über ein „Hypoxia recognition element“ (HRE) verfügen. Die

Promotorregionen der Gene vieler Wachstumsfaktoren enthalten das HRE. Durch diese Wachstumsfaktoren kann auch die Apoptose der Zellen verhindert werden (Acker *et al.*, 2008). Da Integrine an kryptische Bindungsstellen im Kollagen binden können, ist denkbar, dass diese Interaktionen zum Apoptoseschutz beitragen.

Die Tumor-Angiogenese kann nun in verschiedenen Formen erfolgen. Eine Möglichkeit ist die Intussuszeption von Blutgefäßen. Dabei werden interstitielle Gewebesäulen in bereits existierende Gefäße gebildet.

Dadurch wird ein Gefäß in zwei aufgeteilt („splitting angiogenesis“) (Djonov *et al.*, 2003). Weiterhin besteht die Möglichkeit der vaskulären „Co-Option“. Hier wächst der Tumor um die Blutgefäße herum und bildet eine Manschette um das Gefäß. Dieser Vorgang wird insbesondere durch VEGF und Angiopoietin 1 reguliert. Durch die Mobilisierung von endothelialen Vorläuferzellen kann die Anzahl der für die Angiogenese zur Verfügung stehenden Endothelzellen erhöht werden. Die Interaktion von endothelialen Vorläuferzellen mit kryptischen Bindungsstellen im Kollagen wurde bisher nicht untersucht, es ist jedoch denkbar, dass Vorläuferzellen auch dieser speziell modifizierten extrazellulären Matrix während des „homing“-Vorganges ihren Weg zum Ort des Angiogenesegeschehens finden. Neben den oben genannten Varianten ist die klassische Angiogenese anzutreffen. Dabei entstehen aus bereits vorhandenen Blutgefäßen durch Sprossung neue Gefäße („sprouting angiogenesis“) (Carmeliet *et al.*, 2000; Ribatti *et al.*, 2007). Diese Form der Angiogenese wird im Folgenden näher beschrieben.

Ein wichtiger Initiator der Angiogenese durch Sprossung sind die in das Tumor-Stroma eingewanderten Immunzellen. Sie sezernieren unter anderem die Wachstumsfaktoren VEGF und HGF und die Matrix-Metalloproteasen 2 und 9 (Lorusso *et al.*, 2008). Weiterhin werden Wachstumsfaktoren sowohl durch die Tumorzellen, insbesondere hypoxische, als auch durch weitere Zellen des Tumor-Stromas sezerniert. Diese Wachstumsfaktoren, insbesondere VEGF, gelangen durch Diffusion zu den Endothelzellen benachbarter Blutgefäße und aktivieren diese. Durch die Bindung des VEGF an den VEGF Rezeptor 2, eine Tyrosin Rezeptor Kinase, wird dieser aktiviert und kann das an den zytoplasmatischen Anteil des VE-Cadherin gebundene β -Katenin phosphorylieren. Das phosphorylierte β -Katenin wandert in den Zellkern. Dadurch verliert das VE-Cadherin seine Funktion der Zell-Zell Bindung. Es kommt so zur Permeabilisierung der Endothelzellbarriere (Cavallaro, 2008; Ferrara, 2008). Weiterhin bilden die von den Tumorzellen und den Zellen des Tumorstromas sezernierten Wachstumsfaktoren von dem Tumor zu dem umliegenden Gewebe einen Gradienten aus.

Diesem Gradienten können die Endothelzellen chemotaktisch folgen. Zunächst erfolgt jedoch die Aktivierung bzw. Ausschüttung von Proteasen, welche die Basalmembran und die extrazelluläre Membran lysieren. Eine Familie der dort beteiligten Proteasen sind die Matrix-Metalloproteasen. Zur Lyse der Basalmembran werden insbesondere die MMPs 2 und 9 benötigt (Milkiewicz *et al.*, 2006). MMP 9 ist auch verantwortlich für die Aktivierung der an der Basalmembran gebundenen Wachstumsfaktoren. So wird das an Heparin gebundene VEGF gespalten und gelangt so in die Zirkulation. Dies führt unter anderem zur Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (Seandel *et al.*, 2008). Durch die Spaltung der Bestandteile der Basalmembran entstehen Fragmente, welche bioaktive Eigenschaften haben. So können proteolytische Bestandteile des Laminin-5 oder von Fibronectin die Migration von Endothelzellen induzieren (Schenk *et al.*, 2003; Mott *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse legen nahe, dass kryptische Bindungsstellen mit spezifischen Wachstumsfaktoren assoziiert sind, während andere Mediatoren durch die beschriebene MMP-bedingt Freisetzung nicht vorkommen.

Weiterhin enthalten Fragmente des Fibronectins RGD-Motive, welche durch die Bindung an $\alpha_v\beta_3$ -Integrine die Migration induzieren können (Werb *et al.*, 1989). Neben diesen Fragmenten werden aber auch bisher verborgene Bereiche des Kollagens IV freigelegt. Diese Bereiche enthalten ebenfalls Migrationssignale für Endothelzellen (Davis *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001; Hangai *et al.*, 2002; Roth *et al.*, 2006). Neben diesen Fragmenten entstehen auch anti-angiogen wirkende Fragmente, jedoch überwiegen hier die pro-angiogenen Signale. Nach der Proteolyse der Basalmembran erfolgt die Spaltung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie dem Kollagen I, unter anderem durch die Matrix-Metalloproteasen 1 und 8. In die sich bildende Lücke in der Basalmembran wandern Endothelzellen chemotaktisch dem Wachstumsfaktorgradienten folgend ein. Zur Migration benötigen die Zellen Bindungsstellen in der Matrix, welche unter anderem durch bisher verborgene Bereiche des Kollagen IV zur Verfügung gestellt werden (Roth *et al.*, 2006). Durch die Bindung und Aktivierung von Integrinen der Endothelzellen an die Matrix, insbesondere den Integrinen $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_2\beta_1$, wird die Zellmigration und das Überleben der Endothelzellen ermöglicht (Brooks *et al.*, 1996; Ruoslahti, 2002). Die Migration setzt sich bis zum Tumor fort und es kommt zur Bildung eines Lumens. Bei der physiologischen Angiogenese erfolgt nun die Stabilisierung des Gefäßes durch Inaktivierung der Proteasen, der Rekrutierung von Perizyten und der Überführung der Endothelzellen in den Ruhezustand. Im Unterschied dazu ist die Tumor-Angiogenese durch das Fehlen von Proteaseinhibitoren gekennzeichnet. Daneben fehlen meist funktionale Perizyten, welche ein entstandenes Gefäß umgeben und die Angiogenese

inhibieren. Das Endothel der Tumorblutgefäße muss nicht ausschließlich aus Endothelzellen gebildet werden, es kann auch vollständig aus Tumorzellen oder einem Mosaik aus Endothel- und Tumorzellen bestehen. Diese Mosaikbildung, welche auch als vaskuläre Mimikry der Tumorzellen bezeichnet wird, führt zu einer fortbestehenden Permeabilisierung der Gefäße, was wiederum ein Überführen der Endothelzellen in einen Ruhezustand verhindert. Diese Endothel-Fenster bieten den Tumorzellen auch eine Gelegenheit zur hämatogenen Metastasierung. Die vaskuläre Permeabilität ist jedoch in einzelnen Tumoren unterschiedlich und kann auch innerhalb eines Tumors variieren. Das Fehlen von negativen Regulatoren der Angiogenese hat auch Auswirkungen auf die Tumorgefäßarchitektur. Diese Gefäße haben keine konstanten Durchmesser, enthalten eine Vielzahl von Verzweigungen und können gewunden sein. Dadurch entsteht ein ungeordneter Blutfluss, der zu einer unterschiedlichen Versorgung des gesamten Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen führt. So entstehen wiederum hypoxische Areale, die eine weitere Angiogenese induzieren können. Weiterhin kann Hypoxie zu einer klonalen Vermehrung von Zellen führen, die die Apoptoseregulation verloren haben. Eine weitere Eigenschaft von Tumoren ist das Fehlen eines funktionellen Lymphsystems. Neu geformte Lymphgefäße, die den Abfluss von Gewebeflüssigkeit im Interzellularraum ermöglichen, werden vermutlich von den wachsenden Tumorzellen komprimiert. Im Gegensatz dazu kommt es durch die Sekretion von VEGF-C im umgebenden Gewebe des Tumors zu einer Vergrößerung von Lymphgefäßen. Diese vergrößerten Lymphgefäße nehmen die interstitielle Flüssigkeit und Tumorzellen auf und transportieren sie zum nächsten Lymphknoten. Auf diese Weise ist eine lymphogene Metastasierung erklärbar (Carmeliet *et al.*, 2000; Ruoslahti, 2002; Ribatti *et al.*, 2007).

4.2 Die Tumor-Blutgefäße

Die durch die Angiogenese neu gebildeten Blutgefäße eines Tumors weichen in ihrer Struktur und der Expression von Oberflächenmarkern von den physiologischen Blutgefäßen ab. Sie sind gewunden, besitzen Aussackungen und haben keine übliche arterielle-venöse Struktur. Die Gefäße zeigen eine starke Verzweigung, unterschiedliche Durchmesser und eine erhöhte Permeabilität für Makromoleküle. Weiterhin ist die Blutströmung nicht einheitlich, sondern variiert in Stärke und Richtung (Carmeliet *et al.*, 2000). Die Endothelzellen, welche physiologisch die Blutgefäße auskleiden und durch die vaskuläre Basalmembran zu der umgebenden extrazellulären Matrix abgegrenzt sind, weichen im Tumor von den üblicherweise vorkommenden Zellen ab.

Endothelzellen der Tumorblutgefäße teilen sich beispielsweise 50-200 mal häufiger als normale Endothelzellen, dies wird unter anderem durch die wachsende Tumormasse verursacht. Des Weiteren gibt es auch Bereiche im Tumor, in denen Endothelzellen apoptotisch werden und in der Folge Tumorzellen nekrotisch werden. Die Auskleidung der Gefäße ist im Tumor nicht durchgehend. Vielmehr gibt es Lücken, transendotheliale Löcher und endotheliale Fenster. Dadurch gelangen Plasmaproteine und Erythrozyten in das Tumorgewebe und Tumorzellen, können in den Blutstrom übertreten und dadurch hämatogen metastasieren. Die Entstehung endothelialer Fenster ist nicht geklärt, es besteht jedoch die Möglichkeit der Apoptose einzelner Endothelzellen, so dass Tumorzellen in Kontakt mit dem Blutstrom gelangen, welches als vaskuläre Mimikry bezeichnet wird. Eine weitere strukturelle Eigenart der Tumorblutgefäße ist eine Abweichung der vaskuläre Basalmembran. Die Basalmembran trennt die Endothelzellen von den Perizyten, welche ebenfalls die Blutgefäße umgeben, und der extrazellulären Matrix. Die Basalmembran selbst bildet eine 50-100 nm dicke Struktur hauptsächlich bestehend aus Kollagen IV und Laminin aus. Die Basalmembran der Tumor-Blutgefäße weist im Vergleich örtliche Verdickungen durch Auflagerung mehrerer Schichten auf, wohingegen sie an anderen Stellen fehlen kann. Weiterhin findet sich in Tumor-Blutgefäßen eine nur dort vorkommende Variante des Fibronektins, welche die zusätzliche ED-B Domäne enthält. Auf Grund fortschreitender Aktivität von Proteasen werden bisher verborgene Stellen des Kollagen IV, die kryptischen Bindungsstellen, freigelegt. Da die Basalmembran in Tumoren verglichen mit der Basalmembran normaler Blutgefäße andere Bestandteile enthält könnten dort tumorspezifische kryptische Bindungsstellen existieren. Inwieweit Perizyten bei den Tumor-Blutgefäßen vorhanden sind, ist bei Tumoren unterschiedlich. Vorhandene Perizyten sind jedoch nur lose mit den Endothelzellen assoziiert, zeigen eine ungewöhnliche Morphologie und bilden zusätzliche Schichten der Basalmembran aus. Murine Lewis-Lung (LLC) Tumore enthalten beispielsweise eine sehr geringe Perizyten-Gehalt (Ribatti *et al.*, 2007).

Wie schon beschrieben, zeigen Endothelzellen von Blutgefäßen abweichende strukturelle Eigenschaften im Vergleich zu physiologischen Endothelzellen. Neben diesen Eigenschaften weicht die Expression bestimmter Proteine ab, wobei festzustellen ist, dass die Endothelzellen nicht Teil der entarteten Zellen sind, sondern ihren Ursprung in den physiologischen Blutgefäßen des umgebenden Gewebes haben.

So sind die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 erhöht exprimiert. Weiterhin ist der Gehalt der Integrine $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_5\beta_1$ erhöht. Diese Integrine binden hauptsächlich an Fibronektin, Vitronektin oder Kollagen, welche alle in Tumor-Blutgefäßen vorkommen.

Durch die Bindung der Rezeptoren und der Integrine werden unterschiedliche Signalwege, wie der MAPK-Kinase Signalweg, aktiviert, welche zur Migration, zur Proliferation und dem Überleben der Endothelzellen führt. Daneben finden sich aktivierte Proteasen, wie die Matrix-Metalloproteasen 2 und 9, Plasmin und die Proteasen der ADAM-Familie. Durch genetische Untersuchungen konnte ein abnormales Expressionsmuster der Endothelzellen festgestellt werden. So wird die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1, supprimiert. Andere, wie Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder den Tumor endothelialen Markern (TEM), werden vermehrt oder neu exprimiert. Dabei hat sich die Unterscheidung in Angiogenese assoziierte und in Tumor assoziierte Gene durchgesetzt (Ruoslahti, 2002; Aird, 2009).

Auf Grund der strukturellen Abweichung der Endothelzellen, der Basalmembran und der Perizyten der Tumor-Blutgefäße im Vergleich zu physiologischen Blutgefäßen stellen diese eine Zielstruktur für die Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen dar. Insbesondere da diese Endothelzellen nicht Teil des malignen Zellklons sind, sondern physiologischen Ursprungs sind. In wie weit die von mir und anderen beschriebenen kryptischen Bindungsstellen als Zielstrukturen für das Tumor-targeting in Frage kommen muss in Zukunft untersucht werden.

4.3 Tumor-Blutgefäße als Zielstruktur für Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen

Neben den in dieser Arbeit beschriebenen kryptischen Bindungsstellen wurden auch andere Zielstrukturen in den Blutgefäßen von Tumoren beschrieben. Auf Grund der genannten Eigenarten der Tumor-Blutgefäße stellen diese ein ideales Ziel zur antiangiogenen Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen dar. Im Gegensatz zu Chemotherapeutika oder der Strahlentherapie hat eine antiangiogene Therapie weniger toxische Nebenwirkungen. Jedoch ist zu bedenken, dass hierbei nicht nur die pathologische Angiogenese, wie die des Tumors, sondern auch die physiologische Angiogenese inhibiert wird. Hier ist insbesondere der Einfluß der antiangiogenen Therapeutika auf den Menstruationszyklus, die Schwangerschaft, die Remodulierung des Knochengewebes, die Regeneration der Schleimhaut und die Wundheilung zu nennen. Weiterhin sind weitere Nebenwirkungen bei der Kombination mit Chemotherapeutika zu erwarten. Die Wahrscheinlichkeit, dass die an der Tumor-Angiogenese beteiligten Endothelzellen, welche ein Ziel vieler antiangiogener Therapeutika sind, Resistenzen gegen die eingesetzten Medikamente entwickeln ist eher gering. Jedoch können die beteiligten Tumorzellen Resistenzen gegen diese Medikamente entwickeln. Daher sind

beim Einsatz und der Entwicklung antiangiogener Medikamente einige Überlegungen anzustellen. Zunächst, ob die Zielstruktur eines antiangiogenen Medikaments, beispielsweise ein Wachstumsfaktor-Rezeptor, exprimiert wird und ob sie in dem gegebenen Tumorgewebe eine funktionale Rolle hat. Weiterhin ist zu beachten, dass einzelne Faktoren die Angiogenese und das Tumorwachstum nur in bestimmten Stadien regulieren. Somit ist es wichtig, den richtigen Zeitpunkt zur Verabreichung eines antiangiogenen Therapeutikums zu finden, damit die gewünschte Zielstruktur zum Zeitpunkt der Gabe funktional relevant ist. So konnte bei Brustkrebs gezeigt werden, dass sich das Repertoire der proangiogenen Faktoren sich mit der Zeit ändert. Weiterhin ist es notwendig, einen Nachweis über die Effizienz des antiangiogenen Mittels zu haben, damit man die Dosis ermitteln kann, ab der das Therapeutikum seine inhibitorische Aktivität entfaltet.

Auf Grund der antiangiogenen Wirkung dieser Medikamente ist eine Kombination mehrerer dieser Medikamente zur Stabilisierung der Erkrankung oder nach der Tumor-Resektion möglicherweise sinnvoll. Auch die Kombination mit Chemotherapeutika oder der Strahlentherapie ist sinnvoll. Jedoch muß dabei die jeweilige erwünschte Wirkung bedacht werden. So sollte vermieden werden, dass nicht ein Medikament die funktionale Aktivität des anderen Medikaments negativ beeinflusst. Beispielsweise reduziert ein Angiogenese-Inhibitor die Tumorzellproliferation, wohingegen Chemotherapeutika ihre beste Effizienz bei schnell replizierenden Tumorzellen haben. Eine weitere Problematik beim Einsatz von Kombinationen verschiedener Medikamente kann aus der Expression bestimmter Zielstrukturen resultieren. So besteht beispielsweise die Möglichkeit, dass durch ein Medikament die Expression eines Rezeptors inhibiert wird, wobei dieser Rezeptor die Zielstruktur des zweiten Medikaments darstellt.

Zusammenfassend ist hierbei zu sagen, dass antiangiogene Medikamente wichtige Neuentwicklungen im Bereich der Tumorthherapie sind. Jedoch ist bei ihrem Einsatz in Kombination mit Chemotherapeutika die jeweilige Wirkungsweise der einzelnen Medikamente zu beachten (Gagne *et al.*, 2004).

Im Folgenden möchte ich einige in der medizinischen Anwendung allgemein gebräuchliche antiangiogen wirkende Therapeutika näher beschreiben.

Zu unterscheiden sind hier zunächst die Antikörper und pharmakologisch wirksame „small molecules“, die alleine oder in Kombination mit Chemotherapeutika, die Tumor-Angiogenese inhibieren sollen. Der bekannteste Antikörper in diesem Bereich ist Bevacizumab (Avastin®). Es handelt sich hierbei um einen humanisierten monoklonalen Antikörper, der an die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 bindet und deren Dimerisierung und somit die Signalinitiierung inhibiert.

Durch Bindung von VEGF an seine Rezeptoren auf Endothelzellen werden unterschiedliche Signalwege, unter anderem der MAPK-Signalweg, initiiert. Dies führt zum Überleben und über Interaktion mit Rho-GTPasen zur Migration der Endothelzellen. Es handelt sich somit bei dem Wachstumsfaktor VEGF um einen proangiogenen Faktor. Bevacizumab wurde in Kombination mit den Chemotherapeutika Irinotecan, 5-Fluoruracil und Leucovorin (IFL) bei metastasierenden kolorektalen Karzinomen gegen die Chemotherapeutika mit einem Placebo getestet. Es zeigte sich ein um 4 Monate verlängertes Überleben und ein um 4 Monate verlängertes progressionsfreies Überleben im Vergleich zu den Chemotherapeutika alleine. Auch Untersuchungen bei anderen Tumorarten verliefen positiv (Mass, 2008). Es folgte die Zulassung durch die amerikanische Arzneimittelkommission (FDA) für Bevacizumab in Kombination mit einer 5-Fluoruracil basierten Chemotherapie bei metastasierendem Kolonkarzinom, in Kombination mit Carboplatin und Paclitaxel bei nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen und in Kombination mit Paclitaxel bei metastasierendem Brustkrebs (Bando, 2007; Cohen *et al.*, 2007; Food and Drug Administration, 2008). In der Europäischen Union wurde Bevacizumab von der europäischen Arzneimittelkommission (EMA) in Kombination mit einer 5-Fluoruracil basierten Chemotherapie bei metastasierendem Kolonkarzinom und in Kombination mit Paclitaxel bei metastasierendem Brustkrebs zugelassen. Weiterhin erfolgte die Zulassung zur Behandlung in Kombination mit einer Platinumbasierten Chemotherapie für das inoperable oder nicht-kleinzellige Lungenkarzinom und in Kombination mit Interferon α -2 bei fortgeschrittenem oder metastasiertem Nierenzellkarzinom (Europäische Arzneimittelagentur, 2008). Es wird jedoch diskutiert, ob Tumore durch die Behandlung mit Bevacizumab nicht invasiver werden und leichter metastasieren können (Loges *et al.*, 2009).

Eine andere Zielstruktur für Antikörper sind die EGF-Rezeptoren 1 und 2 (Her2/neu). Der EGF-Rezeptor 1 wird von humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMVEC), aber nicht von humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) exprimiert. Jedoch wird EGFR1 von Endothelzellen unterschiedlicher Tumore im Xenograft-Modell exprimiert. Durch Bindung von EGF an seinen Rezeptor wird insbesondere das Überleben der Zellen gefördert, indem die Apoptose verhindert wird. Weiterhin werden die EGF-Rezeptoren von Tumorzellen exprimiert (Hoekman *et al.*, 2008). Die Antikörper Cetuximab und Panitumumab sind als EGFR1 Antagonisten zur Tumorthherapie zugelassen, wohingegen sich der EGFR1-Antikörper Matuzumab in der klinischen Prüfung befindet (Giusti *et al.*, 2007; Schiller, 2008).

Die Wachstumsfaktor-Rezeptoren sind auch eine Zielstruktur für Tyrosinkinase-Inhibitoren, welche auch als „small molecules“ bezeichnet werden. Im Unterschied zu Antikörpern, die an die extrazellulären Domänen der Rezeptoren binden, können Tyrosinkinase-Rezeptoren an die intrazelluläre Kinase Domäne binden.

Der VEGF-Rezeptor Inhibitor Sunitinib inhibiert die intrazelluläre Tyrosinkinase Domäne. Dadurch wird der Ras/Raf/Mitogen Signalweg inhibiert. Dies beeinflusst das Zell-Überleben, die Proliferation, Migration und Angiogenese negativ. Sunitinib (Sutent[®]) ist zur Behandlung von inoperablen bzw. metastasierenden gastrointestinalen Stromatumoren und metastasierenden Nierenzellkarzinomen zugelassen (Grimaldi *et al.*, 2007; Ferrara, 2008).

Ein weiterer Kinase-Inhibitor ist Sorafenib. Hier wird die Raf-Kinase, der PDGF-Rezeptor β und die VEGF-Rezeptoren 1,2 und 3 inhibiert. Die Raf-Kinase ist in mehrere Signalwege eingebunden. Sie wirkt direkt antiapoptotisch und über die MEK/ERK-Kinasen führt sie zur Proliferation, Migration und Überleben von Zellen (Voliotis *et al.*, 2008).

Sorafenib vereint 2 anti-tumorale Aktivitäten in sich. Zum Einen wird die Tumor-Angiogenese durch die Inhibition der VEGF- und PDGF-Rezeptoren inhibiert, zum Anderen wird die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen durch die Inhibition von Raf und anderen Kinasen gestört. Sorafenib wurde zur Behandlung von des inoperablem hepatozellulärem Karzinom und von fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom nach erfolgloser Therapie mit Interferon α oder Interleukin-2 von der amerikanischen und europäischen Arzneimittelbehörde zugelassen (Murphy *et al.*, 2006; Herbst *et al.*, 2008; Wilhelm *et al.*, 2008).

Ein weiterer Kinase-Inhibitor ist Erlotinib. Er inhibiert die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors 1. Dadurch werden die durch den Rezeptor initiierten Ras/Raf MAP-Kinase, PI3K/Akt und der Jak2/STAT3 Signalwege gehemmt. Die Aktivierung dieser Signalwege reguliert die Zellproliferation, die Inhibition der Apoptose, die Angiogenese, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen. Da nicht nur Tumorzellen, sondern auch Tumor assoziierte Endothelzellen den EGF-Rezeptor 1 exprimieren können, wirkt Erlotinib auch auf die Zellen der Tumor-Blutgefäße. Erlotinib wurde von der amerikanischen und der europäischen Arzneimittelbehörde zur Behandlung von nicht-kleinzelligem Lungenkrazinom und des Pankreasakarzinoms zugelassen (Bareschino *et al.*, 2007; Hoekman *et al.*, 2008). Derzeit werden in klinischen Studien der kombinierte Einsatz von Erlotinib und Bevacizumab bei dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom getestet. Hierbei zeigt sich zwar keine Verbesserung beim progressionsfreiem Überleben, jedoch ist eine Überlebensverlängerung im Vergleich zur

Chemotherapie um 5 Monate und im Vergleich von Bevacizumab und Chemotherapie um einen Monat beobachtet worden (Herbst *et al.*, 2008).

Eine weitere wichtige Zielstruktur der Tumor-Blutgefäße sind die Integrine. Integrine sind Heterodimere, welche über Signalwege zum Überleben, der Proliferation und der Migration von Endothelzellen beitragen. Es befinden sich mehrere monoklonale Antikörper in klinischen Tests, welche an $\alpha_v\beta_3$, α_v und $\alpha_5\beta_1$ Integrine binden können. Neben den Antikörpern sind auch 2 Oligopeptide in klinischen Tests, welche an die $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_5\beta_1$ Integrine binden. Hierdurch kann die Phosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und nachfolgend die Aktivierung der Jun aminoterminalen Kinase und des NF κ B sowie die parallele Initiierung des MAP Kinase Signalwegs durch Phosphorylierung der Raf-Kinase inhibiert werden (Nemeth *et al.*, 2007).

Neben der Inhibition der Gefäßneubildung wurden auch Substanzen untersucht, welche bereits bestehende Tumor-Blutgefäße zerstören können. Zu den als „vascular disrupting agents“ bezeichneten Stoffe gehören Tubulin-bindende Agenzien und Flavonoide. Die Bindung erfolgt hier an der Colchicin Bindungsstelle der β -Untereinheit des endothelialen Tubulins. Durch Störung des Zytoskeletts und im Falle des Combretastatins des VE-Cadherins kommt es zum Verlust der Zell-Zell Adhäsion und so zu einem erhöhten interstitiellen Drucks. Dadurch wird der Blutfluss verringert. Durch die jetzt gegebene Exposition des Basalmembran kann es zur Koagulation und so zum Verschluss des Gefäßes kommen. Derzeit befinden sich 6 Tubulin Inhibitoren in klinischen Tests. Neben den Tubulin Inhibitoren wird auch das Flavonoid DMXAA in klinischen Tests überprüft. DMXAA ist in der Lage, die Apoptose der Endothelzellen einzuleiten (Hinnen *et al.*, 2007).

4.4 Peptide, die an Tumor-Blutgefäße binden

In meiner Arbeit wird ein neues Tumor-„homing“-Peptid mit der Aminosäuresequenz TLTYTWS beschrieben, das an durch MMP-2 modifiziertes Kollagen IV bindet. Es wurden jedoch bereits eine ganze Reihe anderer Tumor-„homing“ Peptide beschrieben. Dabei macht man sich die Spezifität eines Blutgefäßes in dem jeweiligen Gewebe zu nutze (Rajotte *et al.*, 1998; Ruoslahti, 2000). Um diese Oligopeptide zu finden, verwendet man Oligopeptid-Bibliotheken, welche beispielsweise auf Phagen präsentiert werden.

Mittels Selektion *in vivo* oder *in vitro* können so Oligopeptide gefunden werden, welche spezifisch an das jeweilige Blutgefäß binden können. Da sich, wie bereits geschildert, die Tumor-Blutgefäßen von physiologischen Blutgefäßen in ihrer Struktur und Proteinexpression abweichen, wurde dieses Verfahren auch dort durchgeführt (Ruoslahti, 2002).

So konnten mehrere Oligopeptide gefunden werden, die an bestimmte Strukturen angiogener bzw. tumor assoziierter Blutgefäße binden (Liu *et al.*, 2008). Ein sehr bekanntes Oligopeptid ist das Arg-Gly-Asp-Tripeptid (RGD), welches an $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Integrine bindet. Diese Integrine sind unter anderem kennzeichnend für proliferierende und migrierende Endothelzellen (Smith *et al.*, 1988; Pasqualini *et al.*, 1997). Das RGD-Motiv wurde in der Folge an Chemotherapeutika gekoppelt und zeigte im Tierversuch gute Ergebnisse (Arap *et al.*, 1998). Auch eine Kopplung in Form des Galacto-RGDs an Radionuklide wurde bereits *in vivo* getestet (Haubner *et al.*, 2004; Beer *et al.*, 2005; Beer *et al.*, 2006; Beer *et al.*, 2007). Daneben werden RGD-Peptide unter dem Namen Cilengitide klinisch zur Behandlung von Tumorerkrankungen getestet (Nemeth *et al.*, 2007). Daneben wurden noch weitere Oligopeptide gefunden, die an bestimmte Strukturen in Tumor-Blutgefäßen binden. Zu nennen wäre hier unter anderem das F3-Oligopeptid, welches an das Nucleolin von Tumor- und Endothelzellen bindet und in den Zellkern gelangt (Porkka *et al.*, 2002; Christian *et al.*, 2003; Grabulovski *et al.*, 2008). Weiterhin wurden Oligopeptide gefunden, die an die Aminopeptidasen A, N und P binden können (Essler *et al.*, 2002; Hajitou *et al.*, 2006). Auch die an der Angiogenese beteiligten Matrix-Metalloproteasen können durch Oligopeptide spezifisch inhibiert werden (Koivunen *et al.*, 1999).

Diese Oligopeptide können insbesondere dazu genutzt werden, spezifisch zytotoxische, zytostatische oder radioaktive Stoffe in das Tumorgewebe zu bringen. Weiterhin wurden bereits mit Oligopeptiden beladene Nanopartikel oder Liposome als Transport-Vehikel zum spezifischen Transport von Stoffen in das Tumorgewebe genutzt. Hierdurch können die toxischen Nebenwirkungen vieler Chemotherapeutika reduziert werden, da ihre Wirkung auf das Tumorgewebe begrenzt bleibt. Weiterhin zeigte sich, dass insbesondere ionisierende Strahlung nicht nur einen direkten Einfluss auf die Tumorzellen hat, sondern auch zur Apoptose der Endothelzellen führt und die Tumor-Angiogenese inhibiert.

Neben Oberflächenmarkern auf Tumorzellen oder den Endothelzellen findet auch die extrazelluläre Matrix bei der Entwicklung antiangiogener Medikamente Beachtung. Die Bestandteile der extrazellulären Matrix stellen dabei ein großes Reservoir an pro- und antiangiogen wirkenden Molekülen zur Verfügung. Beispielsweise sind die nicht-kollagenen Domänen der verschiedenen Koolagene anti-angiogen wirksam.

Hier wären insbesondere das Endostatin, das Arrestin, das Canstatin oder das Tumstatin zu nennen. Weiterhin wirken Fragmente anderer Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie des Laminins, des Fibronectins oder des Osteopontins antiangiogen. Daneben stellen auch die kryptischen Bindungsstellen des Kollagens eine sehr selektive Zielstruktur für Therapeutika dar (Gagne *et al.*, 2004).

So konnte gezeigt werden, dass mit dem CREKA-Oligopeptid beschichtete magnetische und Fluoreszenz-markierte Nanopartikel an das Fibrin von fibrinhaltige Blutgerinnseln im Tumorgewebe binden (Simberg *et al.*, 2007). Weiterhin kann das CREKA-Oligopeptid an einen Bereich der $\alpha 2$ -Kette des Kollagen IV binden (Ruoslahti *et al.*, 2009). Eine weitere Zielstruktur stellen kryptische Bindungsstellen dar. Es handelt sich dabei um Bereiche von beispielsweise Laminin oder Fibronectin, die im nativen Proteinzustand nicht zugänglich sind. Diese verborgenen Bereiche werden erst durch Denaturierung oder enzymatische Proteolyse für Proteine bzw. Zellen zugänglich. Beispiele hierfür sind RGD-haltige Fragmente des Fibronectins, welche die Migration von Endothelzellen unterstützen, oder Bereiche des Laminins 1, welche nach Proteolyse des Laminins durch Elastase die Expression von Matrix-Metalloprotease 9 stimulieren (Schenk *et al.*, 2003). Daneben wurden auch kryptische Bindungsstellen im Kollagen IV der Basalmembran entdeckt. Der Antikörper HUIV26 ist gegen diese Bindungsstellen gerichtet (Xu *et al.*, 2000). Es wurde gezeigt, dass der Antikörper HUIV26 erst nach Proteolyse oder thermischer Denaturierung an Kollagen IV binden kann. Die Bindung des Antikörpers inhibiert zudem die Bindung des Integrins $\alpha_v\beta_3$. Weiterhin inhibiert der Antikörper die Adhäsion und Migration von Endothelzellen *in vitro* und die Angiogenese und das Tumorwachstum *in vivo* (Xu *et al.*, 2001). Versuche mit MMP 2 bzw. MMP 9 defizienten Mäusen zeigten eine Exposition der HUIV26-Bindungsstelle im Rahmen der retinalen Neovaskularisation ausschließlich bei MMP-9 defizienten Mäusen. Diese Experimente zeigen, dass diese kryptische Bindungsstelle spezifisch durch MMP-9 freigelegt wird. Weiterhin konnte eine Migrationsinhibition der retinalen Endothelzellen *in vitro* und eine Inhibition der retinalen Neovaskularisation *in vivo* nachgewiesen werden (Hangai *et al.*, 2002). Die kryptische Bindungsstelle des Antikörpers HUIV26 im Kollagen IV wird demnach nur bei Proteolyse durch MMP-9 oder thermischer Denaturierung freigelegt. Neben dem Antikörper HUIV26 wurden auch 2 Oligopeptide, das CLKQNGGNFSLG (CLK)- und das SLKQNGGNFSLC (SLK) -Oligopeptid, die an thermisch denaturiertes humanes Kollagen IV binden mittels Phagen-Selektion generiert. Beide Oligopeptide können die Adhäsion von Melanom-Zellen an Kollagen IV und die Anzahl der Verzweigungspunkte in einem Endothelzell-Differenzierungs-Versuch *in vitro* und

die bFGF induzierte Angiogenese *in vivo* inhibieren. Die intravenöse Gabe des CLK-Oligopeptids konnte bei einer Patientin mit Lebermetastasen eines Brustkarzinoms zur Reduktion der Lebermetastasen führen (Brooks *et al.*, 2004).

In einem Phageninhibitionsversuch konnte von mir gezeigt werden, dass die Bindungsstellen des LKQNGGNFSL-Oligopeptids von der des TLTYTWS-Oligopeptids abweicht. Dazu wurde rekombinant ein Phage erzeugt, der anstelle der Sequenz TLTYTWS die Sequenz des LKQNGGNFSL-Oligopeptids präsentierte, der im Vergleich zu dem TLTYTWS-Phage 99fach schlechter an durch MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV band. Weiterhin bindet der die Sequenz TLTYTWS präsenterende Phage spezifisch an durch MMP 2 gespaltenes humanes Kollagen IV und im Unterschied zu dem Antikörper HUIV26 und den CLK- und SLK-Oligopeptiden nicht an thermisch denaturiertes humanes Kollagen IV.

Dies belegt eine von den Bindungsstellen des Antikörpers HUIV26 und des LKQNGGNFSL-Oligopeptids unabhängige Bindungsstelle des TLTYTWS-Oligopeptids für Endothelzellen. Diese kryptische Bindungsstelle ist jedoch *in vitro* und *in vivo* funktional relevant. So konnte durch Zugabe des TLTYTWS-Oligopeptids die Anzahl der Verzweigungspunkte in dem sich bildenden tubulären Netzwerk in einem *in vitro* Endothelzell-Differenzierungs-Versuch signifikant reduziert werden. In einem *in vivo* Matrigel-Plug Versuch zum Nachweis der Angiogenese konnte durch Zugabe des TLTYTS-Oligopeptids außerdem der Hämoglobin-Gehalt der Plugs signifikant reduziert werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine kryptische Stelle nach proteolytischer Prozessierung von humanem Kollagen IV durch MMP 2 freigelegt wird, an welche das TLTYTWS-Oligopeptid binden kann. Diese neue Bindungsstelle ist im Rahmen der Angiogenese funktionell relevant und deren Blockierung führt zu einer Reduktion der Angiogenese *in vivo*. Diese kryptische Bindungsstelle stellt also eine potentielle Zielstruktur für neue selektive anti-tumorale Medikamente dar.

Dies wird durch die Ergebnisse von Xu und Roth unterstützt, die zeigen konnten, dass die Bindung des HUIV 26-Antikörpers an sein kryptisches Epitop das Wachstum primärer Tumoren und experimentelle Tumor-Metastasen *in vivo* inhibieren kann (Xu *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 2006; Cretu *et al.*, 2007). Ebenso wie die Ergebnisse von Brooks und Mitarbeiter, die durch Verwendung des CLK-Oligopeptids die Angiogenese im Tierversuch und die Lebermetastasen in einer Patientin reduzieren konnten (Brooks *et al.*, 2004).

5 Ausblick

Im Rahmen der Untersuchungen konnte die Peptidsequenz TLTYTWS ermittelt werden, welche selektiv eine Bindung an MMP 2 prozessiertes humanes Kollagen IV, aber nicht an nicht modifiziertes humanes Kollagen IV, ermöglicht. Der M13-Phage, der die TLTYTWS-Sequenz präsentiert, zeigte in der Biodistribution mit LLC-Tumor tragenden Mäusen eine Akkumulation im Tumorgewebe, welche durch die Koinjektion mit dem TLTYTWS-Peptid blockiert werden kann. Das TLTYTWS-Oligopeptid ist demnach in der Lage, sich im Tumorgewebe anzureichern. Außerdem konnte ein negativer Einfluss des TLTYTWS-Peptids auf die Endothelzelldifferenzierung *in vitro* und auf die Angiogenese *in vivo* gezeigt werden. Diese Untersuchungen legen den Grundstein zur weiteren Erforschung der diagnostischen und therapeutischen Relevanz des TLTYTWS-Peptids im Rahmen von Erkrankungen, welche eine angiogene Komponente aufweisen, wie beispielsweise Tumorerkrankungen. Dazu bieten sich verschiedene Methoden an. So ist die Kopplung des Oligopeptids an radioaktive Nuklide und folgend die Injektion dieses radioaktiven „Tracers“ in Tumor-tragenden Mäuse möglich. Die Lokalisation des Tracers kann dann durch die Gammakamera, die Positronen-Emissions-Tomografie (PET) oder die Einzelphotonen-Emissions-Tomografie (SPECT) dargestellt werden. Diese Methoden sind nicht nur in der Humanmedizin, sondern auch in tierexperimentellen Modellen mittlerweile etabliert (Kießling *et al.*, 2008; O'Connor *et al.*, 2008). Als Radionuklide zur Verwendung in der Gammakamera oder SPECT kommen solche in Betracht, die γ -Strahlen mit einer Energie zwischen 75 und 360 keV emittieren. Dies sind beispielsweise die Jod-Isotope ^{123}I und ^{131}I , das Gallium Isotop ^{67}Ga und die in der Nuklearmedizin häufig verwendeten Indium Isotop ^{111}In und Technetium Isotop $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Wohingegen für die Darstellung im PET Positronen emittierende Radionuklide verwendet werden. Beispiele hierfür sind das Sauerstoff Isotop ^{15}O , das Stickstoff Isotop ^{13}N oder das Fluor Isotop ^{18}F (Hamoudeh *et al.*, 2008). Problematisch bei der Verwendung von radioaktiv markierten Oligopeptiden ist die geringe Plasmastabilität durch Degradation und die renale Exkretion und damit verbunden die radiogene Nephrotoxizität (Behr *et al.*, 1998). Um die renale Reabsorption zu inhibieren, wurde unter anderem eine gleichzeitige Gabe von Lysin empfohlen, die jedoch zu toxischen Effekten führen kann. Zur Zeit wird insbesondere der Gelatin-haltige Plasma-Expander Gelofusine[®] verwendet, da er ohne unerwünschte toxische Nebenwirkungen verabreicht werden kann (Akizawa *et al.*, 2008). So kann Gelofusine[®] die renale Strahlungs-dosis bei ^{111}In -DTPA-Octreotid um 45% reduzieren.

Daneben wird eine Reduktion der positiven Ladung von Oligopeptiden empfohlen (Vegt *et al.*, 2008). Zur Erhöhung der Plasmastabilität und zur Minimierung der renale Nephrotoxizität ist zudem die PEGylierung von Oligopeptiden möglich. Dabei wird Polyethylenglykol (PEG) kovalent an das Oligopeptid gebunden. Es konnte gezeigt werden, dass ein ^{125}I markiertes RGD-Peptid nach PEGylierung nicht mehr renal, sondern hepatobiliär ausgeschieden wird (Chen *et al.*, 2004). Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion der Nephrotoxizität ist die Koinjektion von Albuminfragmenten, welches jedoch bisher nur im Tierversuch getestet wurde. Tryptische Albuminfragmente können hier die Endozytose von chelatierten Radiometallen, wie etwa ^{111}In oder $^{91\text{m}}\text{Tc}$, reduzieren, da sie vermutlich an die gleiche Rezeptoren binden, wie die radioaktiven Nuklide (Vegt *et al.*, 2008).

Eine weitere Möglichkeit ist die Kopplung des Oligopeptids an paramagnetische Substanzen oder Gadolinium-haltige Chelatoren und die Injektion in Tumor-tragende Mäuse. Die Lokalisation der paramagnetischen Substanz kann dann mittels Magnet-Resonanz-Tomografie (MRT) dargestellt werden. Es besteht dabei die Möglichkeit der Kopplung an paramagnetische Partikel, welche einen Eisenkern enthalten, oder an Gadolinium (Gd^{3+}). Dabei wird zunächst der Chelator DTPA oder DOTA an das TLTYTWS-Oligopeptid gekoppelt. Danach kann das Gadolinium zugegeben werden, welches von dem Chelator gebunden wird. Auf Grund der Toxizität des Gadoliniums werden neben DTPA auch neuere Chelatoren, welche sich vom DTPA ableiten, verwendet (Nahrendorf *et al.*, 2008; Caravan, 2009). Hier erfolgt die Aufnahme und Auswertung T1 gewichtet. Daneben besteht die Möglichkeit der Kopplung des TLTYTWS-Oligopeptids an paramagnetische Nanopartikel. Diese Nanopartikel enthalten einen Eisenkern und sind 50-500 nm (small iron oxide, SPIO) oder 5-50 nm (ultra-small iron oxide, USPIO) groß. Neben der Darstellung im MRT besteht bei der Verwendung von bifunktionalen paramagnetischen Partikeln durch Kopplung eines Fluorochroms die Möglichkeit der Darstellung mittels Fluoreszenz Mikroskopie. Die Darstellung im MRT erfolgt hier meist mit einer T2 oder T2* Gewichtung (Nahrendorf *et al.*, 2008; Waters *et al.*, 2008). Paramagnetische Nanopartikel werden schnell von Makrophagen des retikuloendothelialen Systems aufgenommen und so aus dem Blutstrom entfernt. Dadurch wird die Konzentration der paramagnetischen Partikel im Blut und im Tumor verringert. Diese Problematik lässt sich durch Gabe von liposomalem Clodronat oder Ni^{2+} -haltigen Liposomen umgehen. Dieses Verfahren wurde unter anderm bei paramagnetischen Partikeln, an welche das CREKA-Oligopeptid gekoppelt wurde, erfolgreich angewendet (Simberg *et al.*, 2007). Neben diesen beiden generellen Möglichkeiten können auch Liposomen mit unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet werden.

Diese Liposomen können mit Gadolinium, Eisenoxid oder einem Fluorochrom und dem TLTYTWS-Oligopeptid beladen werden (Waters *et al.*, 2008).

Die therapeutische Relevanz könnte durch Verwendung des Oligopeptids oder nach Kopplung an ein radioaktives Nuklid oder an ein Chemotherapeutikum in Tumor-tragenden Mäusen untersucht werden. Zur therapeutischen Verwendung eignen sich insbesondere β -Strahlen emittierende radioaktive Nuklide. Auf Grund der hohen Reichweite und dem geringen linearen Energietransfer werden Atome ionisiert und es entstehen freie Radikale. Dadurch kommt es zu Einzelstrangbrüchen der DNA. Hier werden insbesondere die radioaktiven Isotope des Rheniums ^{186}Re und ^{188}Re , das Holmium Isotop ^{166}Ho , das Strontium Isotop ^{89}Sr , das Phosphor Isotop ^{32}P , das Yttrium Isotop ^{90}Y und das Jod Isotop ^{131}I in der klinischen nuklearmedizinischen Therapie verwendet. Auch einige α -Strahlen emittierende radioaktive Nuklide werden im Tierversuch und klinisch zur Therapie von Tumorerkrankungen verwendet. Im Unterschied zu β -Strahlen haben α -Strahlen nur eine kurze Reichweite von 50-80 μm im Gewebe, welche wenigen Zelldurchmessern entspricht. Daneben findet ein hoher linearer Energietransfer statt, der zu Doppelstrangbrüchen der DNA führt. Hier werden das Actinium Isotop ^{225}Ac , das Astat Isotop ^{211}At und das Bismut Isotop ^{213}Bi verwendet. Die Kopplung der Radiometalle, wie das ^{213}Bi Isotop, erfolgt durch Bindung eines Chelators wie DTPA oder DOTA an das Oligopeptid und nachfolgender Bindung des Radiometalls durch den Chelator (Hamoudeh *et al.*, 2008). In Bezug auf die Problematik der Nierentoxizität sei auf das oben genannte verwiesen.

Neben der Kopplung an radioaktive Isotope kann auch die Kopplung an Chemotherapeutika als Therapeutikum in Betracht. Ein Beispiel hierfür ist die Kopplung des Chemotherapeutikums Doxorubicin an das RGD-4C Oligopeptid. Hier wurde die Carbodiimid-Methode verwendet, die seit längerem bekannt ist (Arap *et al.*, 1998).

Zur Untersuchung der Wirksamkeit würden Therapieveruche mit einer hinreichend großen Zahl Tumor-tragender Mäuse durchgeführt. Dabei würde das TLTYTWS-Oligopeptid mit oder ohne Kopplung an ein therapeutische Radionuklid oder Chemotherapeutikum im Vergleich zu einer nicht behandelten Gruppe verwendet. Hier würde dann das Überleben der einzelnen Gruppen beobachtet werden. Unterstützend kann hier die Biolumineszenz verwendet werden. Hierzu werden zunächst Tumorzellen mit dem Luziferasegen und einem davor gelegenen konstitutiven Promotor transfiziert. Diese Tumorzellen werden dann in Mäuse injiziert. Die Zellproliferation in der Maus kann mit einer speziellen CCD-Kamera beobachtet werden. Hierzu wird zunächst Luziferin und ATP injiziert. Durch Spaltung des Luziferins durch die Luziferase wird Licht einer bestimmten Wellenlänge freigesetzt.

Die Wellenlänge hängt hier von der transfizierten Luziferase ab (Sadikot *et al.*, 2005; El-Deiry *et al.*, 2006; Luker *et al.*, 2008). Bei Verwendung des TLTYTWS-Oligopeptids wäre hier eine Verringerung des Tumorwachstums zu erwarten.

Weiterhin sollte die kryptische Bindungsstelle des TLTYTWS-Peptids im MMP 2 prozessierten Kollagen IV biochemisch charakterisiert werden. Dies kann auf zwei Wege erfolgen. Eine Möglichkeit besteht in der elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente nach Spaltung des humanen Kollagens IV durch Matrix-Metalloprotease 2 oder Trypsin. Nach dem Transfer der aufgetrennten Fragmente auf eine Membran und Bindung des TLTYTWS-M13-Phagen und eines sekundären M13-Phagen Antikörper können die Fragmente nachgewiesen werden, an welche der Phage bindet. Alternativ kann auch das FITC markiertes TLTYTWS-Peptid und ein FITC-Antikörper verwendet werden. Die so nachgewiesenen Fragmente können sequenziert werden und mit der Aminosäuresequenz der humanen Kollagen IV α -Stränge verglichen werden. Diese Methode wurde bereits erfolgreich von Freimark und Mitarbeitern zur Identifizierung von kryptischen Bindungsstellen des Antikörpers D93 im humanen Kollagen IV verwendet (Freimark *et al.*, 2007). Die von Freimark verwendete Methodik ist für das hier verwendete TLTYTWS-Peptid zu modifizieren.

Eine andere Möglichkeit besteht in der Verwendung einer zu konstruierenden Phagen-Bibliothek. Dazu können Phagen rekombinant so verändert werden, dass bestimmte Oligopeptide auf der Phagenoberfläche präsentiert werden. Ein Beispiel für eine solche Konstruktion wurde in dieser Arbeit bereits beschrieben. Zur Präsentation an der Phagenoberfläche können willkürlich gewählte Bereiche der humanen Kollagen IV α -Stränge verwendet werden. Eine vielversprechendere Alternative wäre die Verwendung von Kollagen IV-Fragmenten, welche bei einer Spaltung durch MMP 2 entstehen können. Chen und Mitarbeiter haben durch Verwendung einer Phagenbibliothek die Aminosäuresequenzen potentieller Spaltstellen der Matrix-Metalloprotease 2 nachgewiesen (Chen *et al.*, 2002). Nach Immobilisierung des TLTYTWS-Peptids kann eine solche Phagen-Bibliothek selektioniert werden und dadurch die Aminosäuresequenz ermittelt werden, an die das TLTYTWS-Oligopeptid bindet. Anhand der Aminosäuresequenz ließe sich ein Oligopeptid synthetisieren und in einem Inhibitionsversuch verwenden.

Dabei sollte die Bindung des TLTYTWS-Oligopeptids an MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV durch dieses Oligopeptid inhibiert werden. Ein ähnliches Verfahren wurde bereits bei der Bestimmung der Aminopeptidase P als Bindungspartner eines durch *in vivo* Phage-Display erhaltenen Oligopeptids erfolgreich verwendet (Essler *et al.*, 2002).

6 Zusammenfassung

Während der Tumorangiogenese werden neue, tumorspezifische Blutgefäße gebildet. Bei diesem Prozess wird unter anderem der Hauptbestandteil der Basalmembran das Kollagen IV durch die Matrix-Metalloproteasen (MMP) 2 und 9 enzymatisch gespalten. Dabei werden bisher verborgene Bereiche der Kollagen IV α -Stränge freigelegt, welche Endothelzellen als Migrationssignale dienen. Diese als kryptische Bindungsstellen bezeichneten Bereiche sind kennzeichnend für angiogene Blutgefäße. Ziel der Untersuchungen war, ein Oligopeptid zu finden, welches spezifisch an diese Bindungsstellen bindet, das möglicherweise als Konjugat für therapeutisch wirksame Radionuklide und Zytostatika in Frage kommt.

Zu diesem Zweck wurde ein kombiniertes *in vivo/in vitro* Phage-Display mit einer M13 Phagenbibliothek durchgeführt und ein Phage isoliert, der an durch MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV bindet und die Oligopeptidsequenz TLTYTWS präsentiert. Im Rahmen einer Phagen-Biodistribution mit LLC Tumor-tragenden Mäusen konnte eine spezifische Anreicherung des Phagen im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Der Phage weist also die Fähigkeit auf, sich im Tumorgewebe anzureichern. Diese Eigenschaft wird auch als „Tumor-homing“ bezeichnet. Die von dem Phagen präsentierte Peptidsequenz wurde zur chemische Synthese des TLTYTWS-Oligopeptids verwendet. Dieses Oligopeptid ist in der Lage, *in vitro* die Bindung des Phagen an durch MMP 2 modifiziertes humanes Kollagen IV dosisabhängig zu inhibieren. Weiterhin kann durch Koinjektion des TLTYTWS-Phagen und des TLTYTWS-Oligopeptids bei LLC Tumor-tragenden Mäusen die Akkumulation des Phagen im Tumorgewebe inhibiert werden, was die Spezifität des „Tumor-homings“ belegt. Zudem reduziert das TLTYTWS-Oligopeptid dosis-abhängig die Endothelzell-Differenzierung *in vitro* im Tube-Formation Assay und die Angiogenese *in vivo* im Matrigel-Plug Assay.

Auf Grund dieser Charakteristika eignet sich das Oligopeptid möglicherweise zum Einsatz in der Diagnostik oder Therapie in der Onkologie.

7 Literaturverzeichnis

Acker T., Plate K. H. Hypoxia and Angiogenesis in Glioblastomas. In: Marme D., Fusenig N. (Herausgeber). Tumor angiogenesis: basic mechanisms and cancer therapy. 1. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2008. Seiten 195-214.

Adey N. B., Mataragnon A. H., Rider J. E., Carter J. M., Kay B. K. Characterization of phage that bind plastic from phage-displayed random peptide libraries. *Gene*. 1995;(1):27-31.

Aird W. C. Molecular heterogeneity of tumor endothelium. *Cell Tissue Res*. 2009;(1):271-281.

Akizawa H., Uehara T., Arano Y. Renal uptake and metabolism of radiopharmaceuticals derived from peptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;(12):1319-1328.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Die extrazelluläre Matrix von Tieren. In: Jaenicke L. (Herausgeber). Molekularbiologie der Zelle. 4. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH; 2004. Seiten 1265-1291.

Annabi B., Lachambre M., Bousquet-Gagnon N., Page M., Gingras D., Beliveau R. Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains. *Biochem J*. 2001;(Pt 3):547-553.

Arap W., Pasqualini R., Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science*. 1998;(5349):377-380.

Baker A. H., Edwards D. R., Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*. 2002;(Pt 19):3719-3727.

Bando H. Vascular endothelial growth factor and bevacitumab in breast cancer. *Breast Cancer*. 2007;(2):163-173.

Bareschino M. A., Schettino C., Troiani T., Martinelli E., Morgillo F., Ciardiello F. Erlotinib in cancer treatment. *Ann Oncol*. 2007;vi35-41.

Barmina O. Y., Walling H. W., Fiacco G. J., Freije J. M., Lopez-Otin C., Jeffrey J. J., Partridge N. C. Collagenase-3 binds to a specific receptor and requires the low density lipoprotein receptor-related protein for internalization. *J Biol Chem*. 1999;(42):30087-30093.

Barrett A. J. Alpha 2-macroglobulin. *Methods Enzymol*. 1981:737-754.

Batzler W. U., Giersiepen K., Katalinic A., Kieschke J., Kraywinkel K., Meyer M., Stabenow R., Stegmaier C., Bertz J., Haberland J., Wolf U. Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. Robert Koch Institut (Hrsg), Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). 6. Auflage Berlin; 2008.

Beer A. J., Grosu A. L., Carlsen J., Kolk A., Sarbia M., Stangier I., Watzlowik P., Wester H. J., Haubner R., Schwaiger M. [¹⁸F]galacto-RGD positron emission tomography for imaging

of alphavbeta3 expression on the neovasculature in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2007;(22 Pt 1):6610-6616.

Beer A. J., Haubner R., Goebel M., Luderschmidt S., Spilker M. E., Wester H. J., Weber W. A., Schwaiger M. Biodistribution and pharmacokinetics of the alphavbeta3-selective tracer 18F-galacto-RGD in cancer patients. *J Nucl Med.* 2005;(8):1333-1341.

Beer A. J., Haubner R., Wolf I., Goebel M., Luderschmidt S., Niemeyer M., Grosu A. L., Martinez M. J., Wester H. J., Weber W. A., Schwaiger M. PET-based human dosimetry of 18F-galacto-RGD, a new radiotracer for imaging alpha v beta3 expression. *J Nucl Med.* 2006;(5):763-769.

Behr T. M., Goldenberg D. M., Becker W. Reducing the renal uptake of radiolabeled antibody fragments and peptides for diagnosis and therapy: present status, future prospects and limitations. *Eur J Nucl Med.* 1998;(2):201-212.

Bertram J. S., Janik P. Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture. *Cancer Lett.* 1980;(1):63-73.

Birk D. E., Bruckner P. Collagen Suprastructures. In: Brinckmann J., Notbohm H., Müller P. K. (Herausgeber). Collagen Primer in Structure, Processing and Assembly. Berlin / Heidelberg: Springer; 2005. Seiten 185-205.

Birnboim H. C. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 1983:243-255.

Bissell D. M., Arenson D. M., Maher J. J., Roll F. J. Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *J Clin Invest.* 1987;(3):801-812.

Borregaard N. Development of neutrophil granule diversity. *Ann N Y Acad Sci.* 1997:62-68.

Briknarova K., Gehrman M., Banyai L., Tordai H., Patthy L., Llinas M. Gelatin-binding region of human matrix metalloproteinase-2: solution structure, dynamics, and function of the COL-23 two-domain construct. *J Biol Chem.* 2001;(29):27613-27621.

Brooks P. C., Roth J. M., Erfinder; New York University, Anmelder. CLK-Peptide and SLK-Peptide. World Intellectual Property Organization Patent WO 2004/073649 A2. 19.02.2004.

Brooks P. C., Stromblad S., Sanders L. C., von Schalscha T. L., Aimes R. T., Stetler-Stevenson W. G., Quigley J. P., Cheresch D. A. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell.* 1996;(5):683-693.

Caravan P. Protein-Targeted Gadolinium-Based Magnetic Resonance Imaging (MRI) Contrast Agents: Design and Mechanism of Action. *Acc Chem Res.* 2009.

Carmeliet P., Jain R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;(6801):249-257.

- Caudroy S., Polette M., Nawrocki-Raby B., Cao J., Toole B. P., Zucker S., Birembaut P. EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells. *Clin Exp Metastasis*. 2002;(8):697-702.
- Cavallaro U. Adhesion Molecules in the Vascular Cell Cross-Talk. In: Marme D., Fusenig N. (Herausgeber). Tumor angiogenesis: basic mechanisms and cancer therapy. 1. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2008. Seiten 289-308.
- Chakraborti S., Mandal M., Das S., Mandal A., Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem*. 2003;(1-2):269-285.
- Chen E. I., Kridel S. J., Howard E. W., Li W., Godzik A., Smith J. W. A unique substrate recognition profile for matrix metalloproteinase-2. *J Biol Chem*. 2002;(6):4485-4491.
- Chen X., Park R., Shahinian A. H., Bading J. R., Conti P. S. Pharmacokinetics and tumor retention of 125I-labeled RGD peptide are improved by PEGylation. *Nucl Med Biol*. 2004;(1):11-19.
- Christian S., Pilch J., Akerman M. E., Porkka K., Laakkonen P., Ruoslahti E. Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J Cell Biol*. 2003;(4):871-878.
- Chung L., Dinakarandian D., Yoshida N., Lauer-Fields J. L., Fields G. B., Visse R., Nagase H. Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. *Embo J*. 2004;(15):3020-3030.
- Cohen M. H., Gootenberg J., Keegan P., Pazdur R. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) plus Carboplatin and Paclitaxel as first-line treatment of advanced/metastatic recurrent nonsquamous non-small cell lung cancer. *Oncologist*. 2007;(6):713-718.
- Colorado P. C., Torre A., Kamphaus G., Maeshima Y., Hopfer H., Takahashi K., Volk R., Zamborsky E. D., Herman S., Sarkar P. K., Ericksen M. B., Dhanabal M., Simons M., Post M., Kufe D. W., Weichselbaum R. R., Sukhatme V. P., Kalluri R. Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res*. 2000;(9):2520-2526.
- Cowland J. B., Borregaard N. The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J Leukoc Biol*. 1999;(6):989-995.
- Cretu A., Brooks P. C. Impact of the non-cellular tumor microenvironment on metastasis: Potential therapeutic and imaging opportunities. *J Cell Physiol*. 2007;(2):391-402.
- Danielsen C. C., Wiggers H., Andersen H. R. Increased amounts of collagenase and gelatinase in porcine myocardium following ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;(7):1431-1442.
- Das S., Mandal M., Chakraborti T., Mandal A., Chakraborti S. Structure and evolutionary aspects of matrix metalloproteinases: a brief overview. *Mol Cell Biochem*. 2003;(1-2):31-40.

Davis G. E., Bayless K. J., Davis M. J., Meininger G. A. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am J Pathol.* 2000;(5):1489-1498.

Davis G. E., Koh W., Stratman A. N. Mechanisms controlling human endothelial lumen formation and tube assembly in three-dimensional extracellular matrices. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2007;(4):270-285.

Davis G. E., Senger D. R. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res.* 2005;(11):1093-1107.

Djonov V., Baum O., Burri P. H. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 2003;(1):107-117.

Drabkin D. L., Austin J. H. Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed bloodcells; nitric oxides hemoglobin and sulfhemoglobin. *J Biol Chem.* 1935:51.

Dulbecco R., Vogt M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med.* 1954;(2):167-182.

Efimov V. P., Nepluev I. V., Mesyanzhinov V. V. Bacteriophage T4 as a surface display vector. *Virus Genes.* 1995;(2):173-177.

El-Deiry W. S., Sigman C. C., Kelloff G. J. Imaging and oncologic drug development. *J Clin Oncol.* 2006;(20):3261-3273.

Elkington P. T., O'Kane C. M., Friedland J. S. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol.* 2005;(1):12-20.

Ernst W., Grabherr R., Wegner D., Borth N., Grassauer A., Katinger H. Baculovirus surface display: construction and screening of a eukaryotic epitope library. *Nucleic Acids Res.* 1998;(7):1718-1723.

Essler M., Ruoslahti E. Molecular specialization of breast vasculature: a breast-homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;(4):2252-2257.

Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene.* 2002;(35):5427-5440.

Europäische Arzneimittelagentur. European Public Assessment Report - Avastin. [Internet] 2008 [zitiert 16.05.2009]; Erhältlich unter:
<http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/avastin/avastin.htm>

Fahling M., Steege A., Perlewitz A., Nafz B., Mrowka R., Persson P. B., Thiele B. J. Role of nucleolin in posttranscriptional control of MMP-9 expression. *Biochim Biophys Acta.* 2005;(1):32-40.

- Fang J., Shing Y., Wiederschain D., Yan L., Butterfield C., Jackson G., Harper J., Tamvakopoulos G., Moses M. A. Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;(8):3884-3889.
- Fedarko N. S., Jain A., Karadag A., Fisher L. W. Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases. *Faseb J*. 2004;(6):734-736.
- Ferrara N. Pathophysiology and Clinical Implications of Vascular Endothelial Growth Factor. In: Marme D., Fusenig N. (Herausgeber). Tumor angiogenesis: basic mechanisms an cancer therapy. 1. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2008. Seiten 89-108.
- Fessler J. H., Doege K. J., Duncan K. G., Fessler L. I. Biosynthesis of collagen. *J Cell Biochem*. 1985;(1):31-37.
- Fogh J., Fogh J. M., Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst*. 1977;(1):221-226.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971;(21):1182-1186.
- Food and Drug Administration. Avastin -Draft Labeling Text. [Internet] 2008 [zitiert 16.05.2009]; Erhältlich unter: <http://www.fda.gov/cder/foi/label/2008/125085s1451bl.pdf>
- Freimark B., Clark D., Pernasetti F., Nickel J., Myszka D., Baeuerle P. A., Van Epps D. Targeting of humanized antibody D93 to sites of angiogenesis and tumor growth by binding to multiple epitopes on denatured collagens. *Mol Immunol*. 2007;(15):3741-3750.
- Gagne P., Akalu A., Brooks P. C. Challenges facing antiangiogenic therapy for cancer: impact of the tumor extracellular environment. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2004;(1):129-140.
- Galis Z. S., Sukhova G. K., Lark M. W., Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1994;(6):2493-2503.
- Ganz T. Defensins and host defense. *Science*. 1999;(5439):420-421.
- Gelse K., Poschl E., Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;(12):1531-1546.
- Giancotti F. G., Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*. 1999;(5430):1028-1032.
- Giusti R. M., Shastri K. A., Cohen M. H., Keegan P., Pazdur R. FDA drug approval summary: panitumumab (Vectibix). *Oncologist*. 2007;(5):577-583.
- Gough J. A., Murray N. E. Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J Mol Biol*. 1983;(1):1-19.
- Grabherr R., Ernst W., Oker-Blom C., Jones I. Developments in the use of baculoviruses for the surface display of complex eukaryotic proteins. *Trends Biotechnol*. 2001;(6):231-236.

Grabulovski D., Neri D. Vascular Tumor Targeting. In: Marme D., Fusenig N. (Herausgeber). Tumor angiogenesis: basic mechanisms an cancer therapy. 1. Auflage. Berlin; Heidelberg; New York: Springer; 2008. Seiten 491-510.

Grimaldi A. M., Guida T., D'Attino R., Perrotta E., Otero M., Masala A., Carteni G. Sunitinib: bridging present and future cancer treatment. *Ann Oncol.* 2007;vi31-34.

Gu Z., Kaul M., Yan B., Kridel S. J., Cui J., Strongin A., Smith J. W., Liddington R. C., Lipton S. A. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science.* 2002;(5584):1186-1190.

Guan K. L. The mitogen activated protein kinase signal transduction pathway: from the cell surface to the nucleus. *Cell Signal.* 1994;(6):581-589.

Hagemann T., Robinson S. C., Schulz M., Trumper L., Balkwill F. R., Binder C. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis.* 2004;(8):1543-1549.

Hajitou A., Pasqualini R., Arap W. Vascular targeting: recent advances and therapeutic perspectives. *Trends Cardiovasc Med.* 2006;(3):80-88.

Hallmann R., Horn N., Selg M., Wendler O., Pausch F., Sorokin L. M. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev.* 2005;(3):979-1000.

Hamoudeh M., Kamleh M. A., Diab R., Fessi H. Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;(12):1329-1346.

Hangai M., Kitaya N., Xu J., Chan C. K., Kim J. J., Werb Z., Ryan S. J., Brooks P. C. Matrix metalloproteinase-9-dependent exposure of a cryptic migratory control site in collagen is required before retinal angiogenesis. *Am J Pathol.* 2002;(4):1429-1437.

Haubner R., Kuhnast B., Mang C., Weber W. A., Kessler H., Wester H. J., Schwaiger M. [18F]Galacto-RGD: synthesis, radiolabeling, metabolic stability, and radiation dose estimates. *Bioconjug Chem.* 2004;(1):61-69.

Herbst R. S., Sandler A. Bevacizumab and erlotinib: a promising new approach to the treatment of advanced NSCLC. *Oncologist.* 2008;(11):1166-1176.

Heuermann K., Cosgrove J. S-Gal: an autoclavable dye for color selection of cloned DNA inserts. *Biotechniques.* 2001;(5):1142-1147.

Hinnen P., Eskens F. A. Vascular disrupting agents in clinical development. *Br J Cancer.* 2007;(8):1159-1165.

Hoekman K., van Cruijsen H., Giaccone G. The EGF(R) and VEGF(R) Pathways as Combined Targets for Anti-Angiogenesis Trials in Cancer Therapy. In: Marme D., Fusenig N. (Herausgeber). Tumor angiogenesis: basic mechanisms an cancer therapy. 1. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2008. Seiten 707-716.

Hoffman J., Laakkonen P, Porkka K, Bernasconi M, Ruoslahti E. In vivo and ex vivo selections using phage-displayed libraries. In: Clackson T., Lowman H. (Herausgeber). Phage Display A Practical Approach. 1. Auflage. Oxford: Oxford University Press; 2004. Seiten 171-192.

Hoschuetzky H., Aberle H., Kemler R. Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol.* 1994;(5):1375-1380.

Houshmand H., Froman G., Magnusson G. Use of bacteriophage T7 displayed peptides for determination of monoclonal antibody specificity and biosensor analysis of the binding reaction. *Anal Biochem.* 1999;(2):363-370.

Jiang A., Lehti K., Wang X., Weiss S. J., Keski-Oja J., Pei D. Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;(24):13693-13698.

Jin D., Sheng J., Yang X., Gao B. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases expression in human cerebral ruptured and unruptured aneurysm. *Surg Neurol.* 2007:S11-16; discussion S16.

Jo N., Ju M., Nishijima K., Robinson G. S., Adamis A. P., Shima D. T., Mailhos C. Inhibitory effect of an antibody to cryptic collagen type IV epitopes on choroidal neovascularization. *Mol Vis.* 2006:1243-1249.

Kamphaus G. D., Colorado P. C., Panka D. J., Hopfer H., Ramchandran R., Torre A., Maeshima Y., Mier J. W., Sukhatme V. P., Kalluri R. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem.* 2000;(2):1209-1215.

Kehoe J. W., Kay B. K. Filamentous phage display in the new millennium. *Chem Rev.* 2005;(11):4056-4072.

Khoshnoodi J., Pedchenko V., Hudson B. G. Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech.* 2008;(5):357-370.

Kiessling F., Krix M. Imaging of Tumor Angiogenesis and Antiangiogenesis. In: Marmé D., Fusenig N. (Herausgeber). Tumor angiogenesis: basic mechanisms an cancer therapy. 1. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2008. Seiten 529-544.

Kinoshita T., Fukuzawa H., Shimada T., Saito T., Matsuda Y. Primary structure and expression of a gamete lytic enzyme in *Chlamydomonas reinhardtii*: similarity of functional domains to matrix metalloproteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;(10):4693-4697.

Kleinman H. K., Martin G. R. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol.* 2005;(5):378-386.

Kleinman H. K., McGarvey M. L., Hassell J. R., Star V. L., Cannon F. B., Laurie G. W., Martin G. R. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry.* 1986;(2):312-318.

Kleinman H. K., McGarvey M. L., Liotta L. A., Robey P. G., Tryggvason K., Martin G. R. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry*. 1982;(24):6188-6193.

Knippers R. Molekulare Genetik, 9. Auflage Auflage Stuttgart: Thieme; 2006.

Koivunen E., Arap W., Valtanen H., Rainisalo A., Medina O. P., Heikkila P., Kantor C., Gahmberg C. G., Salo T., Konttinen Y. T., Sorsa T., Ruoslahti E., Pasqualini R. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat Biotechnol*. 1999;(8):768-774.

Kridel S. J., Chen E., Kotra L. P., Howard E. W., Mobashery S., Smith J. W. Substrate hydrolysis by matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem*. 2001;(23):20572-20578.

Kuhn K. Basement membrane (type IV) collagen. *Matrix Biol*. 1995;(6):439-445.

Kuhn K., Wiedemann H., Timpl R., Risteli J., Dieringer H., Voss T., Glanville R. W. Macromolecular structure of basement membrane collagens. *FEBS Lett*. 1981;(1):123-128.

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

Lamande S. R., Bateman J. F. Procollagen folding and assembly: the role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones. *Semin Cell Dev Biol*. 1999;(5):455-464.

Langley K. E., Villarejo M. R., Fowler A. V., Zamenhof P. J., Zabin I. Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;(4):1254-1257.

Le Bitoux M. A., Stamenkovic I. Tumor-host interactions: the role of inflammation. *Histochem Cell Biol*. 2008;(6):1079-1090.

LeBleu V. S., Macdonald B., Kalluri R. Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007;(9):1121-1129.

Leblond C. P., Inoue S. Structure, composition, and assembly of basement membrane. *Am J Anat*. 1989;(4):367-390.

Lemaitre V., D'Armiento J. Matrix metalloproteinases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2006;(1):1-10.

Leontovich A. A., Zhang J., Shimokawa K., Nagase H., Sarras M. P., Jr. A novel hydra matrix metalloproteinase (HMMP) functions in extracellular matrix degradation, morphogenesis and the maintenance of differentiated cells in the foot process. *Development*. 2000;(4):907-920.

Lepage T., Gache C. Early expression of a collagenase-like hatching enzyme gene in the sea urchin embryo. *Embo J*. 1990;(9):3003-3012.

Leppert D., Leib S. L., Grygar C., Miller K. M., Schaad U. B., Hollander G. A. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. *Clin Infect Dis*. 2000;(1):80-84.

Lijnen H. R. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost.* 2001;(1):324-333.

Liotta L. A., Kohn E. C. Invasion and Metastasis. In: Holland J. F. (Herausgeber). *Cancer Medicine*, 5. Edition. 5. Edition. Auflage. Hamilton, USA: Decker; 2000. Seiten 121-131.

Liu Z., Wu K. Peptides homing to tumor vasculature: imaging and therapeutics for cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2008;(3):202-208.

Llano E., Pendas A. M., Aza-Blanc P., Kornberg T. B., Lopez-Otin C. Dm1-MMP, a matrix metalloproteinase from *Drosophila* with a potential role in extracellular matrix remodeling during neural development. *J Biol Chem.* 2000;(46):35978-35985.

Lodish H., Berk A., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Bretscher A., Ploegh H., Matsudaira P. Integrating cells into tissues. In: *Molecular Cell Biology*. 6. Auflage. New York: Freeman; 2008. Seiten 801-841.

Loges S., Mazzone M., Hohensinner P., Carmeliet P. Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited. *Cancer Cell.* 2009;(3):167-170.

Longo G. M., Xiong W., Greiner T. C., Zhao Y., Fiotti N., Baxter B. T. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 2002;(5):625-632.

Lorusso G., Ruegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol.* 2008;(6):1091-1103.

Lovdahl C., Thyberg J., Cercek B., Blomgren K., Dimayuga P., Kallin B., Hultgardh-Nilsson A. Antisense oligonucleotides to stromelysin mRNA inhibit injury-induced proliferation of arterial smooth muscle cells. *Histol Histopathol.* 1999;(4):1101-1112.

Luker G. D., Luker K. E. Optical imaging: current applications and future directions. *J Nucl Med.* 2008;(1):1-4.

Macarak E. J., Howard P. S. Adhesion of endothelial cells to extracellular matrix proteins. *J Cell Physiol.* 1983;(1):76-86.

Mackay A. R., Hartzler J. L., Pelina M. D., Thorgeirsson U. P. Studies on the ability of 65-kDa and 92-kDa tumor cell gelatinases to degrade type IV collagen. *J Biol Chem.* 1990;(35):21929-21934.

Maeshima Y., Colorado P. C., Kalluri R. Two RGD-independent alpha v beta 3 integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties. *J Biol Chem.* 2000;(31):23745-23750.

Maidment J. M., Moore D., Murphy G. P., Murphy G., Clark I. M. Matrix metalloproteinase homologues from *Arabidopsis thaliana*. Expression and activity. *J Biol Chem.* 1999;(49):34706-34710.

- Maity S. N., Golumbek P. T., Karsenty G., de Crombrughe B. Selective activation of transcription by a novel CCAAT binding factor. *Science*. 1988;(4865):582-585.
- Malemud C. J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci*. 2006:1696-1701.
- Malinda K. M. In vivo matrigel migration and angiogenesis assays. In: Murray J. C. (Herausgeber). *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 46: Angiogenesis Protocols. Totowa, NJ, USA: Humana Press Inc.; 2001. Seiten.
- Mancini A., Di Battista J. A. Transcriptional regulation of matrix metalloprotease gene expression in health and disease. *Front Biosci*. 2006:423-446.
- Martinek N., Shahab J., Sodek J., Ringuette M. Is SPARC an evolutionarily conserved collagen chaperone? *J Dent Res*. 2007;(4):296-305.
- Mass R. The Development of Avastin. In: Marme D., Fusenig N. (Herausgeber). *Tumor angiogenesis: basic mechanisms an cancer therapy*. 1. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2008. Seiten 611-654.
- Mattila P. K., Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;(6):446-454.
- Mazar A. P., Henkin J., Goldfarb R. H. The urokinase plasminogen activator system in cancer: implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Angiogenesis*. 1999;(1):15-32.
- McGeehan G., Burkhart W., Anderegg R., Becherer J. D., Gillikin J. W., Graham J. S. Sequencing and Characterization of the Soybean Leaf Metalloproteinase: Structural and Functional Similarity to the Matrix Metalloproteinase Family. *Plant Physiol*. 1992;(3):1179-1183.
- McMahon B., Kwaan H. C. The plasminogen activator system and cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2008;(3-4):184-194.
- Milkiewicz M., Ispanovic E., Doyle J. L., Haas T. L. Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;(3):333-357.
- Molenaar T. J., Michon I., de Haas S. A., van Berkel T. J., Kuiper J., Biessen E. A. Uptake and processing of modified bacteriophage M13 in mice: implications for phage display. *Virology*. 2002;(1):182-191.
- Moore P. G. The two-sample t-test based on range. *Biometrika*. 1957:482-489.
- Morgunova E., Tuuttila A., Bergmann U., Isupov M., Lindqvist Y., Schneider G., Tryggvason K. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science*. 1999;(5420):1667-1670.
- Mott J. D., Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;(5):558-564.

Mueller M. M. Inflammation and Angiogenesis: Innate Immune Cells as Modulator of Tumor Vascularization. In: Marme D., Fusenig N. (Herausgeber). Tumor angiogenesis: basic mechanisms an cancer therapy. 1. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2008. Seiten 351-362.

Murphy D. A., Makonnen S., Lassoued W., Feldman M. D., Carter C., Lee W. M. Inhibition of tumor endothelial ERK activation, angiogenesis, and tumor growth by sorafenib (BAY43-9006). *Am J Pathol.* 2006;(5):1875-1885.

Murphy G., McAlpine C. G., Poll C. T., Reynolds J. J. Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and types IV and V collagen. *Biochim Biophys Acta.* 1985;(1):49-58.

Myllyharju J., Kivirikko K. I. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 2004;(1):33-43.

Nahrendorf M., Sosnovik D. E., Weissleder R. MR-optical imaging of cardiovascular molecular targets. *Basic Res Cardiol.* 2008;(2):87-94.

Nakada M., Okada Y., Yamashita J. The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. *Front Biosci.* 2003:e261-269.

Nakahara H., Howard L., Thompson E. W., Sato H., Seiki M., Yeh Y., Chen W. T. Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;(15):7959-7964.

Nawrocki-Raby B., Gilles C., Polette M., Bruyneel E., Laronze J. Y., Bonnet N., Foidart J. M., Mareel M., Birembaut P. Upregulation of MMPs by soluble E-cadherin in human lung tumor cells. *Int J Cancer.* 2003;(6):790-795.

Nemeth J. A., Nakada M. T., Trikha M., Lang Z., Gordon M. S., Jayson G. C., Corringham R., Prabhakar U., Davis H. M., Beckman R. A. Alpha-v integrins as therapeutic targets in oncology. *Cancer Invest.* 2007;(7):632-646.

Noren K. A., Noren C. J. Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. *Methods.* 2001;(2):169-178.

Norrby K. In vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2006;(3):588-612.

O'Connor J. P., Rosa D. D., Jackson A., Jayson G. C. Molecular Imaging of Targets and Therapeutics in Tumor Angiogenesis. In: Marmé D., Fusenig N. (Herausgeber). Tumor angiogenesis: basic mechanisms an cancer therapy. 1. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2008. Seiten 511-528.

Olsen B., Ninomiya Y. Collagens. In: Kreis T., Vale R. (Herausgeber). Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins (2nd edition). New York, USA: Oxford University Press Inc.; 1999. Seiten 380-408.

- Ozenci V., Kouwenhoven M., Teleshova N., Pashenkov M., Fredrikson S., Link H. Multiple sclerosis: pro- and anti-inflammatory cytokines and metalloproteinases are affected differentially by treatment with IFN-beta. *J Neuroimmunol.* 2000;(1-2):236-243.
- Park H. I., Ni J., Gerkema F. E., Liu D., Belozarov V. E., Sang Q. X. Identification and characterization of human endometase (Matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor. *J Biol Chem.* 2000;(27):20540-20544.
- Pasqualini R., Koivunen E., Ruoslahti E. Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nat Biotechnol.* 1997;(6):542-546.
- Paulsson M. Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1992;(1-2):93-127.
- Persikov A. V., Brodsky B. Unstable molecules form stable tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;(3):1101-1103.
- Petitclerc E., Boutaud A., Prestayko A., Xu J., Sado Y., Ninomiya Y., Sarras M. P., Jr., Hudson B. G., Brooks P. C. New functions for non-collagenous domains of human collagen type IV. Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Biol Chem.* 2000;(11):8051-8061.
- Porkka K., Laakkonen P., Hoffman J. A., Bernasconi M., Ruoslahti E. A fragment of the HMG2 protein homes to the nuclei of tumor cells and tumor endothelial cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;(11):7444-7449.
- Potter M. D., Barbero S., Cheresch D. A. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem.* 2005;(36):31906-31912.
- Rajotte D., Arap W., Hagedorn M., Koivunen E., Pasqualini R., Ruoslahti E. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. *J Clin Invest.* 1998;(2):430-437.
- Ram M., Sherer Y., Shoenfeld Y. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. *J Clin Immunol.* 2006;(4):299-307.
- Rat der Europäischen Union. 2876. Tagung des Rates Beschäftigung, Sozialpolitik, Gesundheit und Verbraucherschutz -Mitteilung an die Presse-. [Internet] 2008 [zitiert 17.05.2009]; Erhältlich unter:
http://www.consilium.europa.eu/ueDocs/cms_Data/docs/pressData/de/lisa/101752.pdf
- Reik W., Dean W., Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 2001;(5532):1089-1093.
- Reimer C. L., Agata N., Tammam J. G., Bamberg M., Dickerson W. M., Kamphaus G. D., Rook S. L., Milhollen M., Fram R., Kalluri R., Kufe D., Kharbanda S. Antineoplastic effects of chemotherapeutic agents are potentiated by NM-3, an inhibitor of angiogenesis. *Cancer Res.* 2002;(3):789-795.

- Reuben P. M., Cheung H. S. Regulation of matrix metalloproteinase (MMP) gene expression by protein kinases. *Front Biosci.* 2006;1199-1215.
- Ribatti D., Nico B., Crivellato E., Vacca A. The structure of the vascular network of tumors. *Cancer Lett.* 2007;(1):18-23.
- Ridley A. J., Schwartz M. A., Burridge K., Firtel R. A., Ginsberg M. H., Borisy G., Parsons J. T., Horwitz A. R. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 2003;(5651):1704-1709.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;(6626):671-674.
- Robert A., Samuelson P., Andreoni C., Bachi T., Uhlen M., Binz H., Nguyen T. N., Stahl S. Surface display on staphylococci: a comparative study. *FEBS Lett.* 1996;(3):327-333.
- Rodi D. J., Makowski L. Phage-display technology--finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr Opin Biotechnol.* 1999;(1):87-93.
- Rodriguez-Manzanares J. C., Lane T. F., Ortega M. A., Hynes R. O., Lawler J., Iruela-Arispe M. L. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;(22):12485-12490.
- Roth J. M., Caunt M., Cretu A., Akalu A., Policarpio D., Li X., Gagne P., Formenti S., Brooks P. C. Inhibition of experimental metastasis by targeting the HUIV26 cryptic epitope in collagen. *Am J Pathol.* 2006;(5):1576-1586.
- Ruegg C., Mutter N. Anti-angiogenic therapies in cancer: achievements and open questions. *Bull Cancer.* 2007;(9):753-762.
- Rundhaug J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2005;(2):267-285.
- Ruoslahti E. Targeting tumor vasculature with homing peptides from phage display. *Semin Cancer Biol.* 2000;(6):435-442.
- Ruoslahti E. Specialization of tumour vasculature. *Nat Rev Cancer.* 2002;(2):83-90.
- Ruoslahti E., Essler M., Brown D., Erfinder; Burnham Institute for Medical Research (La Jolla, CA), Anmelder. Collagen-binding molecules that selectively home to tumor vasculature and methods of using same. United States Patent 7,488,792. 10.02.2009.
- Sadikot R. T., Blackwell T. S. Bioluminescence imaging. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;(6):537-540, 511-532.
- Sambrook J., Russell D. W. *Molecular Cloning* 3. Auflage New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Schenk S., Quaranta V. Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix. *Trends Cell Biol.* 2003;(7):366-375.

- Schiller J. H. Developments in epidermal growth factor receptor-targeting therapy for solid tumors: focus on matuzumab (EMD 72000). *Cancer Invest.* 2008;(1):81-95.
- Schwarz U., Schuppan D., Oberbaumer I., Glanville R. W., Deutzmann R., Timpl R., Kuhn K. Structure of mouse type IV collagen. Amino-acid sequence of the C-terminal 511-residue-long triple-helical segment of the alpha 2(IV) chain and its comparison with the alpha 1(IV) chain. *Eur J Biochem.* 1986;(1):49-56.
- Seandel M., Butler J., Lyden D., Rafii S. A catalytic role for proangiogenic marrow-derived cells in tumor neovascularization. *Cancer Cell.* 2008;(3):181-183.
- Sidhu S. S., Lowman H. B., Cunningham B. C., Wells J. A. Phage display for selection of novel binding peptides. *Methods Enzymol.* 2000:333-363.
- Sigma-Aldrich. Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Events Leading to Angiogenesis and Metastasis. [Internet] Taufkirchen: [zitiert 17.05.2009]; Erhältlich unter: http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Signaling/Key_Resources/Pathway_Slides__Charts/Events_Leading_to_Angiogenesis_.html
- Simberg D., Duza T., Park J. H., Essler M., Pilch J., Zhang L., Derfus A. M., Yang M., Hoffman R. M., Bhatia S., Sailor M. J., Ruoslahti E. Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;(3):932-936.
- Smith G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985;(4705):1315-1317.
- Smith J. W., Cheresch D. A. The Arg-Gly-Asp binding domain of the vitronectin receptor. Photoaffinity cross-linking implicates amino acid residues 61-203 of the beta subunit. *J Biol Chem.* 1988;(35):18726-18731.
- Smith R. S., Gao L., Chao L., Chao J. Tissue kallikrein and kinin infusion promotes neovascularization in limb ischemia. *Biol Chem.* 2008.
- Smith T. F., Gaitatzes C., Saxena K., Neer E. J. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci.* 1999;(5):181-185.
- Soder S., Poschl E. The NC1 domain of human collagen IV is necessary to initiate triple helix formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;(1):276-280.
- Somerville R. P., Oblander S. A., Apte S. S. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol.* 2003;(6):216.
- Song F., Wisithphrom K., Zhou J., Windsor L. J. Matrix metalloproteinase dependent and independent collagen degradation. *Front Biosci.* 2006:3100-3120.
- Sottile J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta.* 2004;(1):13-22.
- Stadie W. C. A method for the determination of methemoglobin in whole blood. *J Biol Chem.* 1920:237.

- Sternberg N., Hoess R. H. Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;(5):1609-1613.
- Sternlicht M. D., Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001:463-516.
- Stolow M. A., Bauzon D. D., Li J., Sedgwick T., Liang V. C., Sang Q. A., Shi Y. B. Identification and characterization of a novel collagenase in *Xenopus laevis*: possible roles during frog development. *Mol Biol Cell*. 1996;(10):1471-1483.
- Sudhakar A., Nyberg P., Keshamouni V. G., Mannam A. P., Li J., Sugimoto H., Cosgrove D., Kalluri R. Human alpha1 type IV collagen NC1 domain exhibits distinct antiangiogenic activity mediated by alpha1beta1 integrin. *J Clin Invest*. 2005;(10):2801-2810.
- Szardenings M. Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential. *J Recept Signal Transduct Res*. 2003;(4):307-349.
- Tanjore H., Kalluri R. The role of type IV collagen and basement membranes in cancer progression and metastasis. *Am J Pathol*. 2006;(3):715-717.
- Toy L. W. Matrix metalloproteinases: their function in tissue repair. *J Wound Care*. 2005;(1):20-22.
- Uekita T., Itoh Y., Yana I., Ohno H., Seiki M. Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity. *J Cell Biol*. 2001;(7):1345-1356.
- Van Wart H. E., Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;(14):5578-5582.
- Van Weerden WM, Romijn JC, GJ V. S. Tumor progression of prostatic cancer as studied in human prostate tumor xenograft models. *South West Cancer News*. 1999.
- van Weerden W. M., Romijn J. C. Use of nude mouse xenograft models in prostate cancer research. *Prostate*. 2000;(4):263-271.
- Vegt E., van Eerd J. E., Eek A., Oyen W. J., Wetzels J. F., de Jong M., Russel F. G., Masereeuw R., Gotthardt M., Boerman O. C. Reducing renal uptake of radiolabeled peptides using albumin fragments. *J Nucl Med*. 2008;(9):1506-1511.
- Velasco G., Pendas A. M., Fueyo A., Knauper V., Murphy G., Lopez-Otin C. Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J Biol Chem*. 1999;(8):4570-4576.
- Visse R., Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;(8):827-839.
- Voet D., Voet J.G., Pratt C.W. Kollagen. In: *Lehrbuch der Biochemie*. Weinheim: Wiley-VCH; 2002. Seiten 144-147.

- Vogelstein B., Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;(2):615-619.
- Voliotis D., Dumas J. Clinical Development of Sorafenib (BAY 43-9006), a VEGFR and RAF Inhibitor. In: Marme D., Fusenig N. (Herausgeber). Tumor angiogenesis: basic mechanisms an cancer therapy. 1. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2008. Seiten 655-672.
- Wada K., Sato H., Kinoh H., Kajita M., Yamamoto H., Seiki M. Cloning of three *Caenorhabditis elegans* genes potentially encoding novel matrix metalloproteinases. *Gene*. 1998;(1):57-62.
- Waters E. A., Wickline S. A. Contrast agents for MRI. *Basic Res Cardiol*. 2008;(2):114-121.
- Weiss B., Jacquemin-Sablon A., Live T. R., Fareed G. C., Richardson C. C. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J Biol Chem*. 1968;(17):4543-4555.
- Werb Z., Tremble P. M., Behrendtsen O., Crowley E., Damsky C. H. Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J Cell Biol*. 1989;(2):877-889.
- Wicki A., Christofori G. The Angiogenic Switch in Tumorigenesis. In: Marme D., Fusenig N. (Herausgeber). Tumor angiogenesis: basic mechanisms an cancer therapy. 1. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Spinger; 2008. Seiten 67-88.
- Wilhelm S. M., Adnane L., Newell P., Villanueva A., Llovet J. M., Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther*. 2008;(10):3129-3140.
- Wilson C. L., Ouellette A. J., Satchell D. P., Ayabe T., Lopez-Boado Y. S., Stratman J. L., Hultgren S. J., Matrisian L. M., Parks W. C. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science*. 1999;(5437):113-117.
- Wilson R. K. High-throughput purification of M13 templates for DNA sequencing. *Biotechniques*. 1993;(3):414-416, 418-420, 422.
- Woodcock D. M., Crowther P. J., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S. S., Michael M. Z., Graham M. W. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res*. 1989;(9):3469-3478.
- Xu J., Rodriguez D., Kim J. J., Brooks P. C. Generation of monoclonal antibodies to cryptic collagen sites by using subtractive immunization. *Hybridoma*. 2000;(5):375-385.
- Xu J., Rodriguez D., Petitclerc E., Kim J. J., Hangai M., Moon Y. S., Davis G. E., Brooks P. C. Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Cell Biol*. 2001;(5):1069-1079.

- Xue M., Le N. T., Jackson C. J. Targeting matrix metalloproteases to improve cutaneous wound healing. *Expert Opin Ther Targets*. 2006;(1):143-155.
- Yamazaki T., Lee J. D., Shimizu H., Uzui H., Ueda T. Circulating matrix metalloproteinase-2 is elevated in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2004;(1):41-45.
- Yan C., Boyd D. D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol*. 2007;(1):19-26.
- Yang Z., Kyriakides T. R., Bornstein P. Matricellular proteins as modulators of cell-matrix interactions: adhesive defect in thrombospondin 2-null fibroblasts is a consequence of increased levels of matrix metalloproteinase-2. *Mol Biol Cell*. 2000;(10):3353-3364.
- Yang Z., Strickland D. K., Bornstein P. Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J Biol Chem*. 2001;(11):8403-8408.
- Yong V. W., Krekoski C. A., Forsyth P. A., Bell R., Edwards D. R. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci*. 1998;(2):75-80.
- Yong V. W., Power C., Forsyth P., Edwards D. R. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2001;(7):502-511.
- Yu Q., Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*. 2000;(2):163-176.
- Yurchenco P. D., Furthmayr H. Self-assembly of basement membrane collagen. *Biochemistry*. 1984;(8):1839-1850.
- Zengel P., Bodenstein C., Senekowitsch-Schmidtke R., Weber W. A. [Demonstration of angiogenesis and the effect on an antiangiogenetic therapy with ^{99m}Tc labeled erythrocytes]. *Nuklearmedizin*. 2008;(3):104-109.
- Zou J., Dickerson M. T., Owen N. K., Landon L. A., Deutscher S. L. Biodistribution of filamentous phage peptide libraries in mice. *Mol Biol Rep*. 2004;(2):121-129.

8 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADAM	Protease mit einer Disintegrin und Metalloprotease Domäne (<u>A</u> <u>d</u> isintegrin <u>a</u> nd <u>m</u> etalloprotease domain)
ADAMTS	Protease mit einer Disintegrin und Metalloprotease Domäne und mit Thrombospondin type I Wiederholungen (<u>A</u> <u>d</u> isintegrin <u>a</u> nd <u>m</u> etalloprotease domain with <u>t</u> hrombospondin type I repeats)
AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom (<u>a</u> cquired <u>i</u> mmune <u>d</u> eficiency syndrome)
Akt	Proteinkinase B
AP	Aktivator Protein
APC	adenomatous polyposis coli
APMA	4-Aminophenylquecksilberacetat
APS	Amoniumpersulfat
ARNT	aryl hydrogen receptor nuclear translocator
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (<u>b</u> asic <u>F</u> ibroblast <u>G</u> rowth <u>F</u> actor (FGF-2))
Brij-35	Polyoxyethylen (23) laurylether
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CADASIL	zerebral autosomal dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie),
CaCl ₂	Kalziumdichlorid
CLACP	Kollagenähnliche Alzheimer Amyloidkomponentenvorläufer (<u>C</u> ollagen- <u>l</u> ike <u>A</u> lzheimer amyloid <u>c</u> omponent <u>p</u> recursor)
CO ₂	Kohlendioxid
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DCC	deleted in colon cancer,
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphate
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (<u>D</u> ulbecco's <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrotetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor)
EMMPRIN	Extracellular matrix metalloproteinase inducer
Emu	Emilin und Multimerin (<u>E</u> milin and <u>m</u> ultimerin,)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	femto (10^{-15})
FACIT	Fibrillen-assoziierte Kollagene mit unterbrochenen Helices (<u>F</u> ibril <u>a</u> ssociated <u>c</u> ollagens with <u>i</u> nterrupted <u>t</u> ripelhelices)
FAK	Fokale Adhäsionskinase
Fas-L	Fasligand
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Fibroblast Growth Factor)
FGFR	FGF-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyant
g	Gravitationskonstante ($g = 9,81 \text{ m/sec}$)
GCP-2	Granulozytenchemotatic Protein 2
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HB-EGF	Heparin bindender epidermaler Wachstumsfaktor (<u>h</u> eparin- <u>b</u> inding <u>e</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
HBS	HIF-Bindungsstelle
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulphonsäure
HGF	Heptatozyten Wachstumsfaktor (Hepatocyte growth factor)
HIF-1a	Hypoxie induzierbarer Faktor 1a (Hypoxia-inducible factor-1a)
HIV	Humane Immundefizienz-Virus (Human immunodeficiency virus)
HRE	Hypoxie erkennendes Element (Hypoxia recognition element)
HSP	Hitze-Schockprotein

HTLV	humane T-Zell-lymphotrope Virus
HUVEC	humane Endothelzellen der Nabelschnur (<u>h</u> uman <u>u</u> mbilical <u>v</u> ein <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ells)
IC ₅₀	halbmaximale Inhibitorkonzentration
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IGFBP	Insulinähnliches Wachstumsfaktor (IGF) Bindungsprotein
IL	Interleukin
IL-R	Interleukin-Rezeptor
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
i.v.	intravenös
KCl	Kaliumchlorid
keV	Kilo-Elektronenvolt
hMMP	humane Matrix-Metalloprotease
KRE-M9	Keratinozyten-Differenzierungsfaktor-1 abhängiges Element-4
LBP-1	Leader-binding protein
LLC	Lewis-Lung-Carcinoma-Zellen
LRP	low density lipoprotein receptor-related protein
M	mol
MAPK	Mitogen-aktivierten Proteinkinase
MCC	mutated in colon cancer
MCP 3	Monozyten chemoattractant Protein 3
MCS	Klonierungsstelle (multiple cloning site)
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloprotease
mod.	modifiziert
MRT	Magnet-Resonanz-Tomografie
Multiplexin	multiple Triplehelices mit Unterbrechungen (<u>M</u> ultiple <u>t</u> riple <u>h</u> elix and <u>i</u> nterruptions)
MWCO	Molekulargewichtsgrößenausschluß (<u>m</u> olekular <u>w</u> eight <u>c</u> ut- <u>o</u> ff)
NaCl	Natriumchlorid
NaJ	Natriumjodid
NaOH	Natriumhydroxid
NF1	nukleärer Faktor-1

NF- κ B	nukleäre Faktor Kappa B
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NO	Nitriloxid
Ω	Ohm
OD	optische Dichte
OSE-2	Osteoblast-spezifisches Element-2
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit (probability)
PA	Polyadenylierungssignal
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEA3	Polyoma Enhancer A Bindungsprotein-3
PEG	Polyethylenglycol
pfu	Plaque bildende Einheit (plaque forming unit)
PDGF	Blutplättchen Wachstumsfaktor (Platelet-derived growth factor)
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
RARE	Retinolsäure abhängiges Element
RECK	reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs
rhMMP	rekombinante humane Matrix-Metalloprotease
RNA	Ribonukleinsäure
SAF-1	Serum Amyloid A aktivierendes Factor-1
SBE	STAT bindendes Element
s.c.	unter der Haut (subkutan)
SDF-1	stromal cell-derived factor 1
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (Standard Error of the Mean)
S-Gal	3,4-cyclohexeneoesuletin-B-D-Galactopyranosid
Si	Silencer Sequenz
SIBLING	small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein
SPECT	Einzelphotonen-Emissions-Tomografie (Single Photon Emission Computed Tomography)
Tab.	Tabelle
Tcf-4	T-Zellfaktor-4/ β -Catenin-Bindungsstelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin

t_m	Schmelztemperatur
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor-alpha
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor-beta (<u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> actor)
tPA	Tissue-type Plasminogen Aktivator
TIMPS	Tissue inhibitor of Matrix-Metalloproteinases
TIE	TGF- β hemmendes Element
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
TRF	Oktamer-Bindungsprotein
TRITC	Tetramethylrhodamin-isothiocyanat
TSP-1	Thrombospondin 1
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
uPA	Urokinase Plasminogen Aktivator
UTR	nichttranslatorischen Bereich (<u>u</u> n <u>t</u> ranslated <u>r</u> egion)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (<u>V</u> ascular <u>E</u> ndothelial <u>G</u> rowth <u>F</u> actor)
VE-Cadherine	vesikulär endotheliales Cadherin
z.B.	zum Beispiel
ZnCl ₂	Zinkdichlorid

Abkürzungen der Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code und im Drei-Buchstaben-Code

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Leucin	Leu	L
Isoleucin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

9 Lebenslauf

Jan Müller geboren am 19. Januar 1975 in Würzburg

wohnhaft in Ewiges Tal 5, 35041 Marburg

schulische Ausbildung

1981 – 1985 Besuch der Grundschule in Marburg–Michelbach

1985 – 1994 Besuch des Gymnasiums Elisabethschule in Marburg

1994 Abschluss des Gymnasiums mit dem Abitur

berufliche Ausbildung

1994 – 1996 Ausbildung zum Landwirtschaftlich–technischen Assistenten (LTA) am Fachbereich Agrarwissenschaften der Justus–Liebig–Universität Gießen

Hochschulstudium

Oktober 1996 Beginn des Studiums der Biologie - Abschluss Diplom - an der Philipps–Universität Marburg

Oktober 1998 Vordiplomprüfung im Studiengang Biologie

27.09.2001 Diplomprüfung im Studiengang Biologie mit der Note 1,5

berufliche Werdegang

- 01.12. bis 31.12.2001 Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft mit Abschluss am Institut für Tropenmedizin, Klinikum der Universität Tübingen
- 28.02. bis 11.10.2002 Vorbereitende Arbeiten zum Thema „Ermittlung der Nukleotidsequenzen der Farnesyltransferase-Untereinheiten von *Toxoplasma gondii*“ in der Arbeitsgruppe Parasitologie des Klinikums der Philipps-Universität Marburg
- 01.02. bis 15.08.2003 Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Paul-Ehrlich-Institut, Langen
- seit 01.05.2004 Doktorand in der Arbeitsgruppe PD Dr. Essler, Nuklearmedizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
- 01.05.2004 bis 30.04.2006 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe PD Dr. Essler, Nuklearmedizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
- 01.05.2006 bis 31.12.2007 Stipendiat des DFG-Graduiertenkollegs „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ am Klinikum Innenstadt der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 25.02.2008 Bestehen der Promotionsvorprüfung zum Dr. rer. biol. hum. an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
- seit 01.06.2009 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Eggert, hämatologisch/onkologisches Labor, Klinik für Kinderheilkunde III, Universitätsklinikum Essen

Praktika

- 19.07. bis 17.09.1999 Praktikum am Bernhardt-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
Thema: „Diagnostik von Ebola- und Marburg-Virus Infektionen mittels Real-Time-PCR“
- 02.11. bis 23.12.1999 Praktikum in der Arbeitsgruppe Parasitologie des Klinikums der Philipps-Universität Marburg
Thema: „Einfluss von Ketoconazol auf die GPI-Biosynthese bei *Leishmania major*“
- 25.04. bis 21.06.2000 Praktikum in der Arbeitsgruppe Parasitologie des Klinikums der Philipps-Universität Marburg
Thema: „Klonierung des C-terminalen Ende des Stt3 Proteins bei *Leishmania major*“

weitere Aktivitäten

06. - 08.07.2000 Teilnahme am „International Symposium on Amoebiasis“ am Bernhardt-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg als Hörer
- 21.08. bis 30.11.2001 Mitarbeit und Fortführung der Versuche der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Parasitologie des Klinikums der Philipps-Universität Marburg
- 19.09. bis 30.09.2005 Teilnahme am 15. Versuchstierkundlichen Kurs des TIZ-BIFO an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 06.10. bis 07.10.2005 Teilnahme am Fortbildungslehrgang Gentechnikrecht entsprechend §§ 15 und 17 GenTSV bei der DECHEMA, Frankfurt/Main

- 23.01.2006 bis 01.08.2008 Beauftragter für biologische Sicherheit (BBS) an der Nuklearmedizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München
- 15.05. bis 19.05.2006 Teilnahme am Radioisotopenkurs (Fachkundegruppen S1.1, S1.2, S1.3, S2.1, S2.2, S4.1, S5 und S6.1 entsprechend Fachkunderichtlinie Technik nach StrlSchV) bei der GSF GmbH, Neuherberg
- 31.08. bis 02.09.2006 Teilnahme an einem Kurs für den Umgang mit offenen radioaktiven Stoffen mit Aktivitäten über dem 10^5 -fachen der Freigrenze (Fachkundegruppe S4.2 entsprechend Fachkunderichtlinie Technik nach StrlSchV) bei der Landesanstalt für Personendosimetrie und Strahlenschutz Ausbildung, Berlin
- 02.10.2006 bis 31.12.2007 Strahlenschutzbeauftragte der Nuklearmedizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München
- 17.10.2006 Fachkundebescheinigung im Strahlenschutz für die Fachkundegruppen S2.2 und S4.2 nach Fachkunderichtlinie Technik
- 09.02.2007 erfolgreiche Teilnahme an der virtuellen Fortbildung „Patente an Hochschulen“ im Rahmen des Patentführerscheins der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
- 10.02.2007 erfolgreiche Teilnahme an der virtuellen Fortbildung „Kooperation zwischen Hochschule und Wirtschaft“ im Rahmen des Patentführerscheines der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

01.10.2006 bis 09.03.2007 erfolgreiche Teilnahme am Fernstudium
„Patentrecht für Ingenieure und Naturwissenschaftler“
der Technischen Fachhochschule Berlin

Publikationen

Shams-Eldin H, Blaschke T, Anhlan D, Niehus S, Müller J, Azzouz N, Schwarz RT.
High-level expression of the *Toxoplasma gondii* STT3 gene is required for suppression of the yeast STT3 gene mutation. *Mol Biochem Parasitol.* 2005 Sep;143(1):6-11.

Schultheiss C, Blechert B, Gaertner FC, Drecoll E, Mueller J, Weber GF, Drzezga A, Essler M. In vivo characterization of endothelial cell activation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Angiogenesis.* 2006;9(2):59-65.

Drecoll E, Gaertner FC, Miederer M, Blechert B, Vallon M, Müller JM, Alke A, Seidl C, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Senekowitsch-Schmidtke R, Essler M. Treatment of peritoneal carcinomatosis by targeted delivery of the radio-labeled tumor homing peptide bi-DTPA-[F3]2 into the nucleus of tumor cells. *PLoS One.* 2009 May 27;4(5):e5715.

Gaertner FC, Rohde F, Mueller J, Blechert B, Janssen KP, Essler M. Endogenous expression of the sodium iodide symporter mediates uptake of iodide in murine models of colorectal carcinoma. *Int J Cancer.* 2009 Jun 30;125(12):2783-2791.

Mueller J, Gaertner FC, Blechert B, Janssen KP, Essler M. Targeting of tumor blood vessels: a phage-displayed tumor-homing peptide specifically binds to matrix metalloproteinase-2-processed collagen IV and blocks angiogenesis in vivo. *Mol Cancer Res.* 2009 Jul;7(7):1078-85.

Vorträge

Jan Mueller and Markus Essler „Nanoparticles for targeting the extracellular matrix of tumor blood vessels“ XIIIth International Symposium on Basement Membranes, 19.-22.09.2007, Köln, Deutschland

Poster

Jan Mueller and Markus Essler „Nanoparticles for targeting the extracellular matrix of tumor blood vessels“ XIIIth International Symposium on Basement Membranes, 19.-22.09.2007, Köln, Deutschland

Patente und Gebrauchsmuster

Jan Müller und Markus Essler „Peptide, die an durch Matrix-Metalloprotease 2 modifiziertes humanes Kollagen IV binden“, Deutsche Offenlegungsschrift DE 10 2008 047 781 A1. 30.04.2009

Jan Müller und Markus Essler „Peptide, die an durch Matrix-Metalloprotease 2 modifiziertes humanes Kollagen IV binden“, Deutsches Gebrauchsmuster 20 2008 012 716.5. 12.02.2009

10 Vorveröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertation „Untersuchungen zur Identifizierung und funktionellen Charakterisierung von Peptiden als selektive Liganden der extrazellulären Matrix in soliden Tumoren“ wurden wie folgt bereits veröffentlicht:

1. Fachzeitschrift

Mueller J, Gaertner FC, Blechert B, Janssen KP, Essler M. Targeting of tumor blood vessels: a phage-displayed tumor-homing peptide specifically binds to matrix metalloproteinase-2-processed collagen IV and blocks angiogenesis in vivo. Mol Cancer Res. 2009 Jul;7(7):1078-85.

2. Vortrag

Jan Mueller and Markus Essler „Nanoparticles for targeting the extracellular matrix of tumor blood vessels“ XIIIth International Symposium on Basement Membranes, 19.-22.09.2007, Köln Deutschland

3. Poster

Jan Mueller and Markus Essler „Nanoparticles for targeting the extracellular matrix of tumor blood vessels“ XIIIth International Symposium on Basement Membranes, 19.-22.09.2007, Köln Deutschland

4. Patent

Jan Müller und Markus Essler „Peptide, die an durch Matrix-Metalloprotease 2 modifiziertes humanes Kollagen IV binden“, Deutsche Offenlegungsschrift DE 10 2008 047 781 A1. 30.04.2009

5. Gebrauchsmuster

Jan Müller und Markus Essler „Peptide, die an durch Matrix-Metalloprotease 2 modifiziertes humanes Kollagen IV binden“, Deutsches Gebrauchsmuster 20 2008 012 716.5. 12.02.2009

11 Danksagung

Die vorliegende Doktorarbeit entstand in der Arbeitsgruppe von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Markus Essler in der Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München und in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Siess am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Markus Essler danke ich sehr herzlich für die Vergabe des Promotionsthemas. Weiterhin danke ich für die vielfältige Hilfe und Diskussion der Methoden und Ergebnisse und die Möglichkeit die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Siess danke ich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg und für die Möglichkeit, einzelne Arbeiten in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. Dr. Reingard Senekowitsch-Schmidtke, Nuklearmedizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar, für Ihre Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Dr. Klaus-Peter Jansen danke ich für die Möglichkeit der Nutzung des Immunfluoreszenz-Mikroskops

Großer Dank gebührt Frau Birgit Blechert für die Hilfe und Unterstützung bei den Tierversuchen, der Zellkultur und den histologischen Aufnahmen.

Ganz herzlich danke ich Herrn Dr. med. Florian Gärtner für die Hilfe bei den Tierversuchen und der Diskussion der praktischen Anwendung der Versuchsergebnisse

Weiterhin danke ich Frau Dr. med. vet. Birgit Pfof für die Unterstützung und Hilfe bei den Tierversuchen.

Herrn Dr. rer. nat. Christof Seidl danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit und der Diskussion zur Durchführung einiger Versuche

Danken möchte ich auch Herrn Dr. rer. nat. Thorsten Poethko für die Hilfe bei chemischen Problemen im Rahmen meiner Experimente.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen für die herzliche Aufnahme im Labor bedanken.