

Aus der Medizinischen Klinik für Nephrologie; Transplantationszentrum
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Hemmung der Tumormetastasierung durch Verhinderung der Interaktion
zwischen zirkulierenden Tumorzellen und Thrombozyten mittels dualer
Liposomen im Mausmodell

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Jane Wenzel

aus Karl-Marx-Stadt, jetzt Chemnitz

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. van der Giet
2. Prof. Dr. med. U. Keilholz
3. Prof. Dr. B. Kleuser

Datum der Promotion: 03.09.2010

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2006 bis Oktober 2009 in der Arbeitsgruppe Experimentelle Pharmakologie unter der Leitung von Frau Dr. Iduna Fichtner am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	1
1. Einleitung	2
2. Zielstellung	2
3. Methodik	3
4. Ergebnisse	6
5. Diskussion	9
6. Referenzen	11
7. Abkürzungsverzeichnis	13
8. Anhang	14
Abbildungen.....	15
Erklärung zum Anteil der Doktorandin an den Publikationen.....	18
3 Publikationen als Promotionsleistung.....	19
Referenzen der Originalpublikationen.....	20
1. Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I (2009) <i>Inhibition of breast cancer metastasis by dual liposomes to disturb complex formation. Int J Pharm 370:121-128.</i>	
2. Wenzel J, Zeisig R, Haider W, Habedank S, Fichtner I (2009) <i>Inhibition of pulmonary metastasis in a human MT3 breast cancer xenograft model by dual liposomes preventing intravasal fibrin clot formation. Breast Cancer Res Treat: Published online 23 Jun. [Epub ahead of print].</i>	
3. Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I (2009) <i>Inhibition of metastasis in a murine 4T1 breast cancer model by liposomes preventing tumor cell-platelet interactions. Clin Exp Metastasis. Published online 15 Nov. [Epub ahead of print].</i>	
Lebenslauf.....	21
Weitere Publikationen und Veröffentlichungen.....	22
Erklärung über Selbstständigkeit.....	23
Danksagung.....	24

Abstract

Einleitung Tumormetastasierung ist ein komplexer Prozess, bei dem sich maligne Tumorzellen vom Primärtumor ablösen, in das Blutgefäßsystem einwandern und dort vor allem mit Thrombozyten oder dem Gefäßendothel interagieren, bevor sie in das umliegende Gewebe eindringen und dort Metastasen bilden. Mehrere Studien haben gezeigt, dass zirkulierende Tumorzellen in der Lage sind, Thrombozyten zu aktivieren, was zur Ausbildung von Komplexen aus Thrombozyten und Tumorzellen führen kann. Diese Aggregate können in engen Blutkapillaren verstärkt an das Endothel adhären, wodurch die Auswanderung der Tumorzellen erleichtert und damit die Metastasenbildung gefördert wird.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines liposomalen Systems, das gleichzeitig eine zytotoxische Substanz und einen Thrombozytenaggregationshemmer enthält, wodurch eine wirksame Hemmung der Metastasierung erreicht werden sollte. Diese Liposomen sollten die Thrombozytenaggregation und Komplexbildung mit Tumorzellen reduzieren und damit die Metastasenbildung in verschiedenen Mausmodellen einschränken oder verhindern.

Methodik Duale Liposomen, die zwei unterschiedliche Wirkstoffe enthalten, wurden durch die Lipidfilm-Hydrationsmethode hergestellt. Diese Vesikel wurden hinsichtlich ihrer Stabilität, sowie ihres Wirkstoff- und Lipidgehalts charakterisiert. Die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch duale Liposomen *in vitro* wurde mittels Impedanz-Aggregometer gemessen und die Verhinderung der Komplexbildung von Tumorzellen in Gegenwart von Thrombozyten durch diese Liposomen wurde mikroskopisch analysiert. Anschließend wurde nach Charakterisierung der zu verwendenden Metastasierungsmodelle der anti-metastatische Effekt der dualen Liposomen in einem experimentellen und einem spontanen Metastasierungsmodell für Brustkrebs in Mäusen quantifiziert.

Ergebnisse Es wurden Liposomen hergestellt, die das zytotoxische Alkylphospholipid OPP und einen der beiden Thrombozytenaggregationshemmer Dipyridamol (DIP/OPP-L) oder Cilostazol (Cil/OPP-L) in ihrer Membran verkapselt haben. DIP/OPP-L und Cil/OPP-L konnten die Thrombozytenaggregation *in vitro* um 60 % bzw. 80 % reduzieren sowie die Komplexbildung von Tumorzellen in Gegenwart von aktivierten Thrombozyten vollständig verhindern. *In vivo* konnten beide dualen Liposomenformulierungen die Metastasierung im experimentellen Metastasierungsmodell mit MT3 Brustkrebszellen um bis zu 90 % und im Spontanmetastasierungsmodell mit 4T1 Brustkrebszellen um bis zu 50 % reduzieren.

Schlussfolgerung In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Liposomen, die eine Wirkstoffkombination aus einer zytotoxischen Substanz und einem Thrombozytenaggregationshemmer enthalten, in der Lage sind, die Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten zu beeinflussen und dadurch die Metastasierung in verschiedenen Mausmodellen signifikant zu reduzieren. Diese neu entwickelten Liposomenformulierungen stellen eine vielversprechende Herangehensweise zur Hemmung der Metastasierung dar.

1. Einleitung

Das Auftreten von Metastasen ist die häufigste Todesursache bei Krebserkrankungen. Metastasierung ist ein komplexer Prozess, der zunächst die Ablösung maligner Tumorzellen vom Primärtumor und deren Eintritt in die Blutzirkulation beinhaltet. Dort kommt es zu vielfältigen Interaktionen der zirkulierenden Tumorzellen mit Blutzellen, wie beispielsweise Thrombozyten oder Leukozyten oder mit dem Gefäßendothel. Nach der Adhäsion der Tumorzellen an das Endothel können diese in Sekundärorgane auswandern [1] oder innerhalb des Blutgefäßes proliferieren [2,3], bevor sie in umliegenden Geweben Metastasen bilden. Bereits der Bericht von Trousseau, in dem er 1865 den Zusammenhang zwischen Krebs und thromboembolischen Krankheiten beschrieb [4], deutete auf die wichtige Rolle des Gerinnungssystems während der Metastasierung hin. Seitdem konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass durch die Aggregatbildung von Tumorzellen und Thrombozyten die Tumorzelladhäsion und somit die Metastasenentstehung und -progression gefördert wird [5-7]. Diese Tumorzell-induzierte Thrombozytenaggregation führt zur Bildung von Mikroemboli aus Tumorzellen und Thrombozyten [5,7-9], wodurch die Tumorzellen vor dem Angriff des Immunsystems geschützt werden [5,10]. Außerdem können solche Mikroemboli leichter in kleinen Kapillaren stecken bleiben, was zu einer verstärkten Interaktion zwischen Tumorzellen und dem Endothel führt [7]. Dadurch wird die Auswanderung der Tumorzellen aus dem Blutgefäß erleichtert und die Wahrscheinlichkeit für eine Metastasenansiedelung erhöht [11]. Unter den Strategien zur Verhinderung der Metastasierung existieren verschiedene therapeutische Herangehensweisen, um im Blutgefäßsystem zirkulierende Tumorzellen anzugreifen: zum Beispiel die Verhinderung der Tumorzellanheftung an das Endothel durch die Blockade des E-Selektin-Rezeptors [12-14], oder die Reduktion der Komplexbildung zwischen Tumorzellen und Thrombozyten [3,15,16]. Es ist bekannt, dass anti-koagulatorische Wirkstoffe, zum Beispiel durch die Beeinflussung der Beweglichkeit und der Anheftung von Tumorzellen an das Endothel, eine anti-metastatische Wirkung aufweisen [13]. Borsig et al. konnten zeigen, dass in P- und L-Selektin-defizienten Mäusen die Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten, und damit auch die Metastasierung, vermindert werden konnte [6,17].

Die Verhinderung der Aggregatbildung zwischen Tumorzellen und Thrombozyten oder der Angriff auf vorhandene Aggregate ist somit ein vielversprechender Ansatz, um Tumormetastasierung zu verhindern.

2. Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung eines liposomalen Systems, das gleichzeitig eine zytotoxische Substanz und einen Thrombozytenaggregationshemmstoff enthält und dadurch eine wirksame Hemmung der Metastasierung ermöglicht.

Es ist bekannt, dass im Blutkreislauf zirkulierende Tumorzellen mit anderen Komponenten des Blutsystems, vor allem aber mit Thrombozyten, interagieren. Insbesondere die Aggregatbildung zwischen Tumorzellen und Thrombozyten, die zur Mikroembolbildung führt, kann das Engraftment von Tumorzellen im engen Kapillarsystem unterstützen, wodurch die Etablierung und das Wachstum von Metastasen gefördert werden.

Durch die systemische Behandlung mit den neuartigen dualen Liposomen sollte die Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten gehemmt oder verhindert werden, indem sowohl die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten reduziert, als auch die Tumorzellen zytotoxisch angegriffen werden. Der Vorteil dieses therapeutischen Ansatzes ist die gleichzeitige und auf beide Interaktionspartner ausgerichtete Wirkung der dualen Liposomen während der Komplexbildung.

Da die dualen Liposomen im Rahmen dieser Arbeit erstmalig hergestellt werden sollten, mussten diese in ihren Eigenschaften optimiert und charakterisiert werden. Der Nachweis ihrer Hemmwirkung auf die Thrombozytenaggregation und die Komplexbildung von Tumorzellen in Gegenwart von Thrombozyten *in vitro* bildete die Grundlage für die sich anschließende Testung der Liposomen in verschiedenen Brustkrebsmodellen in der Maus. Zusätzlich zur Quantifizierung des anti-metastatischen Effekts der Liposomen waren Untersuchungen zur Charakterisierung des Mechanismus der Metastasierung vorgesehen.

3. Methodik

Herstellung und Charakterisierung von Liposomen (Publikation 1, Publikation 3)

Multilamellare Vesikel (MLV) wurden mittels der Lipidfilm-Hydrationsmethode [18,19] aus den Stammlösungen der Lipide in Dichlormethan/Methanol (7:3; v:v) mit einer initialen Konzentration von 64 mM hergestellt. Nach Extrusion [20] dieser MLV durch einen Polycarbonatfilter mit 400 nm Porengröße wurden unilamellare Vesikel mit einer einheitlichen Größenverteilung erhalten. Nicht eingeschlossenes Material wurde durch Größenausschlusschromatographie über eine Sephadex-G50 Säule entfernt. Die Vesikelgröße und die Größenverteilung wurden durch Photonenkorrelationsspektroskopie mit einem Submicron Particle Size Analyzer (Coulter Counter N5) gemessen und dienten auch der Charakterisierung der Lagerstabilität der Liposomen. Die finalen Konzentrationen der Lipide und von Cilostazol in den Liposomen wurden durch Hochleistungs-dünnschichtchromatographie (HPTLC) [19] und die von Dipyridamol durch Fluoreszenzmessung ($\lambda_{\text{Ex}}= 415 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Em}}= 500 \text{ nm}$) ermittelt.

Wirkstofffreisetzung aus den Liposomen in Gegenwart von PBS (P1, P3)

500 μl Liposomen wurden in einen Spectra/Por® Dialyseschlauch (Cut off 6000-8000) injiziert und gegen 500 ml PBS unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur dialysiert. Für jeden Zeitpunkt zwischen 1 Stunde (h) und 8 Tagen wurde aus einem Dialyseschlauch eine

Liposomenprobe entnommen und die verbleibende Menge der Wirkstoffe Dipyridamol (DIP) oder Cilostazol (Cil) und den Lipiden Perifosin (OPP), Cholesterol (CH) und Phosphatidylcholin (PC) in den Liposomen mittels HPTLC bestimmt.

In vitro Versuche

Beeinflussung der Thrombozytenaggregation durch duale Liposomen (P1, P3)

Die Messung der Thrombozytenaggregation erfolgte im Impedanz-Aggregometer (Chrono-Log) [3]. Dafür wurden $2,25 \times 10^8$ humane Thrombozyten in 900 μ l Plasma mit dualen Liposomen, Kontroll-Liposomen oder den entsprechenden Mengen an freien Wirkstoffen gemischt, mit 5 μ g/ml Kollagen aktiviert und die Aggregation bei 37 °C gemessen. Dabei korreliert die Stärke der Thrombozytenaggregation mit dem gemessenen Widerstand zwischen den beiden Elektroden [21]. Die maximale Aggregation (Amplitude in ohm) wurde mit dem Eintreten der Plateauphase nach 20 min erreicht.

Aggregatbildung von Tumorzellen in Gegenwart von Thrombozyten (P1, P3)

$2,5 \times 10^6$ Thrombozyten, 1×10^4 Fluoreszenz-markierte Tumorzellen und 10 nmol Liposomen wurden mit 0,01 units Thrombin in 100 μ l PBS für 20 min inkubiert. Diese Suspension wurde durch Zytospin-Zentrifugation auf Objektträger aufgebracht. Die Quantifizierung der Aggregatbildung erfolgte durch Auszählung aller Tumorzellen, sowie der Anzahl und Größe aller Tumorzellaggregate (bestehend aus ≥ 5 Zellen) in repräsentativen Bildausschnitten.

In vivo Versuche

Alle Tierversuche wurden entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz und nach Zustimmung der Behörden durchgeführt. Die Tiere wurden unter pathogenfreien Bedingungen in einzeln ventilierten Käfigen (22 °C, 50 ± 10 % relativer Luftfeuchte, 12 h Tag-Nacht-Rhythmus) gehalten. Sie erhielten autoklaviertes Futter und Streu (Ssniff, Soest, Germany) and Wasser *ad libitum* (pH 4). In den Versuchen wurden weibliche NMR1:nu/nu Mäuse (MT3 Tumorzellen) und Crl:Balb/c Mäuse (4T1 Tumorzellen) eingesetzt.

Etablierung der Metastasierungsmodelle von MT3 oder 4T1 Brustkrebszellen (P2, P3)

Jeder Maus wurden 1×10^4 murine 4T1 Brustkrebszellen ins Mammafettpolster implantiert oder 5×10^6 humane MT3 Brustkrebszellen i.v. in die Schwanzvene injiziert. Die Mäuse wurden zu definierten Zeitpunkten abgetötet, die Lungen und Primärtumore wurden entnommen, in 5 % Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Jeder dritte Lungenschnitt oder die Primärtumorschnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbt und mikroskopisch begutachtet. Zur immunhistologischen Detektion von MT3 Tumorzellen wurden die Schnitte mit einem monoklonalen Zytokeratin-Antikörper (Zymed laboratories) markiert. Für die Fibrin(ogen)-Detektion wurden die Schnitte mit einem polyklonalen Fibrin(ogen)-Antikörper (Oxford Biomedical Research) markiert. Anschließend wurde ein biotinylierter Antikörper zugegeben, gefolgt von

Peroxidase-markiertem Streptavidin (Zytochem Plus Kit; Zytomed Systems). Die Visualisierung erfolgte mit dem Substrat AEC (3-Komponenten-System; Zytomed Systems).

Einfluss dualer Liposomen auf die murine Thrombozytenaggregation (P1, P3)

Zur Bestimmung der Thrombozytenaggregation *ex vivo* wurden den Mäusen i.v. 100 nmol Liposomen injiziert, während Kontroll-Mäuse PBS erhielten. Zu definierten Zeitpunkten zwischen 0,5 h und 48 h wurde den Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen und dieses sofort mit Citratpuffer in einem Verhältnis von 9:1 (v:v) gemischt. Die Aggregationsfähigkeit der Mausthrombozyten im Vollblut wurde mittels Impedanz-Aggregometer bestimmt.

Einfluss der i.v. Tumorzellinjektion auf die Thrombozytenzahl der Mäuse (P2)

Zur Untersuchung des Einflusses der Tumorzellgabe auf die Thrombozytenzahl wurden NMRI:nu/nu Mäusen 5×10^6 MT3 Tumorzellen i.v. injiziert, während Kontroll-Mäuse PBS erhielten. Zu definierten Zeitpunkten zwischen 0,5 h und 48 h wurde den Mäusen Blut entnommen und die Thrombozytenzahl mit einem Zellzählgerät (Coulter) quantifiziert.

Hemmung der experimentellen Metastasierung von humanem MT3 Brustkrebs (P1)

Die Mäuse wurden zur Optimierung des Behandlungszeitpunktes zunächst zu verschiedenen Zeitpunkten in Bezug auf die Tumorzellinjektion ein- oder mehrmals mit Liposomen behandelt. Danach wurde der Einfluss der Liposomendosis auf die Metastasenentwicklung in einem Bereich zwischen 50-400 nmol Totallipid untersucht. Die Metastasenanzahl war nach einmaliger Behandlung mit 100 nmol Liposomen 6 h vor Tumorzellinjektion am stärksten reduziert. weshalb dieses Behandlungsschema in den weiteren Versuchen verwendet wurde. Zur Untersuchung des anti-metastatischen Effektes der dualen Liposomen, erhielt jede Maus 6 h vor der i.v. Inokulation von 5×10^6 MT3 Zellen 100 nmol Liposomen. Kontroll-Mäuse wurden mit PBS behandelt. Andere Gruppen erhielten korrespondierende Konzentrationen der freien Wirkstoffe, oder Liposomen mit nur einem der beiden Wirkstoffe. Die Mäuse wurden nach 30 Tagen abgetötet, um die Zahl, Größe und Lokalisation der Metastasen zu bestimmen.

Hemmung der spontanen Metastasierung von murinem 4T1 Brustkrebs (P2)

Zur Quantifizierung des anti-metastatischen Effektes der dualen Liposomen wurden den Mäusen 1×10^4 4T1 Zellen ins Mammafettpolster transplantiert. Die Tiere wurden 6 h vor Transplantation und dann täglich für 2 Wochen mit 100 nmol dualen Liposomen behandelt. Kontroll-Mäuse wurden mit PBS behandelt. Andere Kontrollgruppen erhielten entsprechende Konzentrationen der freien Wirkstoffe, oder Liposomen mit nur einen der beiden Substanzen. Die Mäuse wurden nach 30 Tagen abgetötet, um die Zahl, Größe und Lokalisation der Metastasen zu quantifizieren.

Statistische Evaluierung

Signifikanzen wurden unter Verwendung des Student's-*t*-Test für unverbundene Stichproben berechnet. Als signifikant verschieden galten Werte mit $P < 0,05$.

4. Ergebnisse

Liposomenherstellung und Charakterisierung (P1, P3)

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden erstmalig zwei verschiedene duale Liposomenformulierungen hergestellt, die gleichzeitig das zytotoxische Alkylphospholipid Perifosin (OPP) und einen der beiden Thrombozytenfunktionshemmer Dipyridamol (DIP/OPP-L) oder Cilostazol (Cil/OPP-L) in ihrer Membran enthielten. Die Zusammensetzung und die Eigenschaften dieser Liposomen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Zusätzlich wurden Kontroll-Liposomen mit nur einem der beiden Wirkstoffe oder wirkstofffreie Vesikel hergestellt. Die Wirkstofffreisetzung aus beiden Liposomenformulierungen wurde mittels Dialyse in PBS bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass in den DIP/OPP-L die Menge an PC und OPP über den untersuchten Zeitraum von 7 Tagen stabil in der Liposomenmembran blieb, während 42 % des eingeschlossenen DIP in der Vesikelmembran zurückgehalten wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden für Cil/OPP-L erhalten. Die Lipide PC, CH und OPP blieben stabil in der Liposomenmembran eingeschlossen, während nach 8-tägiger Dialyse 50 % des eingeschlossenen Cil freigesetzt wurde. Trotz kontinuierlicher Wirkstofffreisetzung aus beiden Formulierungen wurde kein signifikanter Anstieg in der Liposomengröße und der Größenverteilung beobachtet, was auf eine stabile Liposomensuspension hinweist.

Tabelle 1: Liposomenzusammensetzung und Eigenschaften

Liposom	Lipidbestandteile [mM]						Liposomeneigenschaften			
	PC	OPP	CH	DCP	PEG-PE	DIP/Cil	Größe [nm]	PI	DIP/Cil [mM]	OPP [mM]
DIP/OPP-L	15,6	6	6	3	1,4	10,8	137 ± 27	0,12 ± 0,06	0,293	4,3 ± 0,5
Cil/OPP-L	31,2	12	12	6	2,8	7,93	124 ± 18	0,16 ± 0,06	0,093	6,4 ± 2,1

Einfluss der dualen Liposomen auf die Thrombozytenaggregation und die Komplexbildung von Tumorzellen in Gegenwart von Thrombozyten *in vitro* (P1, P3)

Der Hemmeffekt der dualen Liposomen auf die Aggregation von humanen Thrombozyten im Plasma wurde mittels Impedanz-Aggregometer untersucht. DIP/OPP-L (P1) und Cil/OPP-L (P3) konnten die Aggregation der Thrombozyten nach Kollagen-Aktivierung um 60 % (Abb. 1A) bzw. 80 % (Abb. 1B) reduzieren. Liposomen, die nur den Thrombozytenaggregationshemmer DIP oder Cil enthielten, konnten die Aggregation fast im gleichen Ausmaß verringern. Wirkstofffreie Kontroll-Liposomen (Kon-L) oder Vesikel mit OPP (OPP-L) besaßen hingegen keinen Einfluss auf die Aggregation (Abb. 1).

Weiterhin wurde die Aggregatbildung von Tumorzellen in Gegenwart von Thrombin-aktivierten Thrombozyten untersucht. Dazu wurden die beiden Brustkrebszelllinien 4T1 und MT3 jeweils mit DIP/OPP-L oder Cil/OPP-L und Thrombozyten inkubiert. Dabei zeigte sich, dass die

Bildung von Tumorzellkomplexen (bestehend aus ≥ 5 Zellen) mit beiden dualen Liposomenformulierungen komplett verhindert werden konnte (Abb. 2).

Einfluss dualer Liposomen auf die murine Thrombozytenaggregation (P1, P3)

Nach i.v. Injektion von dualen Liposomen in Mäuse wurde die Aggregationsfähigkeit der Mausthrombozyten in Vollblut *ex vivo* untersucht. Bei beiden Liposomenformulierungen war die Thrombozytenaggregation bereits 1-2 h nach Liposomeninjektion signifikant verringert, wobei die stärkste Hemmung der Aggregation von bis zu 80 % nach 6 h gemessen wurde. 48 h nach Verabreichung der Liposomen erreichten die Aggregationswerte wieder den Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 (Abb. 3). Im Gegensatz dazu konnten die freien Substanzen DIP (Abb. 3A) oder Cil (Abb. 3B) die Aggregationsfähigkeit der Mausthrombozyten nur für einen kurzen Zeitraum von bis zu 1 h nach Substanzgabe signifikant reduzieren.

Einfluss der Injektion von MT3 Tumorzellen auf die Thrombozytenzahl der Mäuse (P2)

Die Quantifizierung der Anzahl der Mausthrombozyten nach einer i.v. Bolusinjektion von MT3 Zellen in Mäuse ergab, dass direkt nach Tumorzellgabe die Thrombozytenzahl signifikant um 40 % reduziert war. Diese signifikant verringerte Plättchenzahl konnte über einen Zeitraum von 24 h beobachtet werden.

Charakterisierung der experimentellen Metastasierung im MT3 Brustkrebsmodell (P2)

Die Injektion von 5×10^6 MT3 Zellen in die Schwanzvene der Mäuse ist notwendig, um nach 30 Tagen eine durchschnittliche Zahl von 8 pulmonalen und 4 extrapulmonalen Metastasen zu erhalten. Die mikroskopische Untersuchung der Lungenschnitte von MT3 Tumorzell-behandelten Mäusen zeigte, dass sich bereits 30 min nach i.v. Tumorzellinjektion Fibringerinnsel in den pulmonalen Blutgefäßen der Mäuse gebildet haben (Abb. 4B; 4C), in denen einzelne Tumorzellen nachweisbar waren (Abb. 4D). Diese intravasalen Fibringerinnsel waren nach 6 h aufgelöst, wenn keine Tumorzellen in deren Umgebung detektiert wurden. Bereits 5 Tage nach Tumorzellgabe hatten sich Mikrometastasen gebildet, die noch immer von Fibrin infiltriert und umgeben waren (Abb. 4E; 4F). Diese Metastasen wuchsen solange intravasal, bis sie das Blutgefäß komplett ausfüllten, dieses zerstörten und das umliegende Gewebe infiltrierten (Abb. 4G). In diesem Tumormodell wurde keine direkte Tumorzellanheftung an das Endothel oder eine Auswanderung einzelner Tumorzellen aus dem Blutgefäß beobachtet. Mäuse, die 6 h vor Tumorzellinjektion mit DIP/OPP-L behandelt wurden, zeigten keine Fibringerinnselbildung. Bis zu einem Zeitpunkt von 48 h nach Tumorzellgabe wurden einzelne Tumorzellen detektiert, die jedoch in den meisten Fällen nicht überlebten. Nach 5 Tagen wurde in nur einer Maus eine Mikrometastase detektiert.

Hemmung der Metastasierung im MT3 Brustkrebsmodell durch duale Liposomen (P1)

Zur genaueren Charakterisierung dieses Modells wurden zunächst der Zeitpunkt der Liposomengabe sowie die Dosis optimiert. Es wurde gezeigt, dass eine einmalige Verabreichung der dualen Liposomen 6 h vor der Tumorzellinjektion die Metastasierung am stärksten reduzierte. Die anschließende Dosiseskaltungsstudie ergab eine optimale Behandlungsdosis von 100 nmol Totallipid der dualen Liposomen 6 h vor Tumorzellgabe.

Vier unabhängige Therapieversuche zeigten, dass mittels DIP/OPP-L die Anzahl pulmonaler und extrapulmonaler Metastasen signifikant um 90 % bzw. 50 % reduziert werden konnte (Abb. 5A). Die Kombination der freien Substanzen DIP+OPP wies einen anti-metastatischen Effekt auf, der jedoch signifikant geringer gegenüber der DIP/OPP-L Behandlung war (Abb. 5A). Die Behandlung der Mäuse mit Cil/OPP-L im gleichen Dosisregime reduzierte die Anzahl der pulmonalen und extrapulmonalen Metastasen signifikant um 35 % bzw. 50 % (Abb. 5B). Die Kombination der freien Wirkstoffe Cil+OPP reduzierte die Metastasenbildung nicht.

Charakterisierung der spontanen Metastasierung im 4T1 Brustkrebsmodell (P3)

Der Hemmeffekt der dualen Liposomen auf die Metastasierung wurde zusätzlich zum experimentellen auch in einem spontanen Metastasierungsmodell untersucht, da dieses eine höhere klinische Relevanz aufweist. Zur Untersuchung der spontanen Metastasierung von 4T1 Zellen des primären Mammatumors in die Mäuslungen, wurden murine 4T1 Zellen orthotop in das Mammafettpolster der Mäuse transplantiert und das Tumorwachstum über den gesamten Versuchszeitraum dokumentiert (Abb. 6A). Erst 23 Tage nach Zelltransplantation waren die ersten Mikrometastasen in der Lunge detektierbar (Abb. 6B), der primäre Mammatumor hatte zu diesem Zeitpunkt eine Größe von 0,56 cm³. Innerhalb von nur fünf weiteren Tagen proliferierten diese Metastasen jedoch sehr stark (Abb. 6C). Im Gegensatz zum experimentellen Metastasierungsmodell mit MT3 Zellen konnten weder Fibringerinnsel noch ein intravasales Wachstum von Mikrometastasen beobachtet werden.

Hemmung der Metastasierung im 4T1 Brustkrebsmodell durch duale Liposomen (P3)

Zur Quantifizierung des anti-metastatischen Effektes der dualen Liposomen wurden den Mäusen 4T1 Tumorzellen transplantiert. Die Behandlung der Mäuse mit dualen Liposomen erfolgte 6 h vor der Tumorzelltransplantation und dann täglich für 2 Wochen. Beide dualen Liposomenformulierungen reduzierten die Metastasenanzahl signifikant um 60 % (Abb. 7). Die Kombination der freien Substanzen DIP und OPP führte zu einer 35 %igen Reduktion der Metastasen, jedoch war die Hemmung signifikant geringer im Vergleich zu DIP/OPP-L (Abb. 7A). Die freien Wirkstoffe Cil und OPP hingegen konnten die Metastasierung nicht beeinflussen (Abb. 7B). Kontroll-Liposomen und Vesikel, die einen der beiden Wirkstoffe enthielten, hatten keinen Einfluss auf die Metastasierung.

5. Diskussion

Für die Entstehung von Metastasen sind komplexe Prozesse notwendig, die eine Vielzahl an Interaktionen zwischen Tumorzellen und Komponenten des Blutkreislaufes oder dem Zielgewebe erfordern.

Es existieren verschiedene Hypothesen zum Ablauf der Tumormetastasierung. Einige Studien beschreiben die Liganden-basierte Adhäsion von einzelnen Tumorzellen an die Endothelmembran als einen essentiellen Schritt für die nachfolgende Auswanderung der Tumorzellen aus dem Blutgefäß [8,22,23]. Andere Studien zeigten, dass zirkulierende Tumorzellen in der Lage sind Thrombozyten zu aktivieren [24], wodurch es zur Bildung von Tumorzell-Thrombozyten-Aggregaten kommen kann, welche die Metastasenbildung verstärken können [7,25]. Muschel et al beschrieben einen weiteren Mechanismus der Metastasierung, bei dem die Proliferation der Tumorzellen in den Blutgefäßen von Fibrin und Thrombozyten unterstützt wird [2,26].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Ablauf der Metastasierung sehr stark von den Bedingungen im gewählten Metastasierungsmodell abhängt.

Im experimentellen Metastasierungsmodell wurden humane MT3 Brustkrebszellen als Bolusinjektion in die Schwanzvene der Mäuse injiziert, wobei sich hauptsächlich pulmonale Metastasen entwickelten. Dabei bildeten sich in den Lungen intravaskuläre Fibringerinnsel, welche die Tumorzellen vor dem Angriff natürlicher Killerzellen schützen und eine ungestörte Metastasenproliferation in den Blutgefäßen durch eine leichte Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen ermöglichen [27]. Eine Adhäsion einzelner Tumorzellen an das Gefäßendothel konnte zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden. Erst mit zunehmender Größe der Metastasen wuchsen diese invasiv durch das Gefäßendothel in das umliegende Gewebe ein. Dabei wurde deutlich, dass die Fibringerinnselbildung eine essentielle Voraussetzung für die pulmonale Ansiedelung von Tumorzellen und deren anschließende intravaskuläre Expansion darstellt.

Im Gegensatz dazu konnte im klinisch relevanteren murinen 4T1 Spontanmetastasierungsmodell nach orthotoper Transplantation von Brustkrebszellen gezeigt werden, dass sich die 4T1 Zellen während der spontanen Metastasierung vermutlich als Einzelzellen vom Primärtumor ablösen, zur Lunge wandern und dort ansiedeln [26]. In der vorliegenden Untersuchung begann diese Tumorzellansiedelung erst 23 Tage nach der Transplantation, wobei keine Fibringerinnselbildung festgestellt werden konnte. Die weitere Proliferation der Metastasen fand außerhalb der Blutgefäße statt.

Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass sich oberflächen-modifizierte Liposomen in Tumorzell-Thrombozyten-Aggregaten anlagern [14,28]. Dieser Ansatz wurde genutzt, um ein liposomales System zu entwickeln, das während der Zirkulation einzelner Tumorzellen im Blutgefäßsystem deren Interaktion mit Thrombozyten einschränkt oder bereits gebildete Aggregate angreift und auf diesem Wege die Metastasierung verhindert.

Liposomen sind geeignete Vehikel, um verschiedenartige Wirkstoffe, die gleichzeitig am Wirkungsort zur Verfügung stehen sollen, in einem Transportsystem zu vereinen, wodurch beide Stoffe eine gemeinsame Pharmakokinetik und Wirkstoffverteilung aufweisen [29,30].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Liposomen hergestellt, die das zytotoxische Alkylphospholipid OPP und den Thrombozytenaggregationshemmer DIP oder Cil enthalten. Es konnte gezeigt werden, dass diese Liposomen über 8 Tage stabil blieben, während 50 % des Cil oder DIP freigesetzt wurde. Diese kontinuierliche Freisetzung des Thrombozytenaggregationshemmers könnte die stärkere und mindestens 6 h anhaltende Hemmung der Thrombozytenaggregation nach Liposomeninjektion in Mäuse erklären. Im Vergleich dazu sind die freien Wirkstoffe DIP oder Cil nur für einen kurzen Zeitraum von circa 1 h nach Injektion in der Lage, die Aggregation der Mause thrombozyten signifikant zu reduzieren.

Zur Verhinderung der Metastasierung im 4T1 Modell wurden die Mäuse täglich über einen Zeitraum von zwei Wochen mit dualen Liposomen behandelt. Diese kontinuierliche Behandlung könnte zu einer über einen längeren Zeitraum anhaltenden Hemmung der Thrombozytenaggregation führen, die folglich die Interaktion von zirkulierenden Tumorzellen mit Thrombozyten und damit die Metastasenbildung einschränkte. Im experimentellen Metastasierungsmodell mit MT3 Tumorzellen konnte eine einmalige Bolusinjektion der dualen Liposomen die Bildung von pulmonalen Fibringerinnseln komplett verhindern und dadurch die Metastasierung um bis zu 90 % reduzieren. Die Verhinderung der Fibringerinnselbildung kann den Zugang von natürlichen Killerzellen zu den Tumorzellen und somit deren Eliminierung erleichtern [27]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nach i.v. Injektion von MT3 Zellen in Mäuse die Thrombozytenzahl um 40 % und die Aggregationsfähigkeit der Mause thrombozyten um bis zu 45 % vermindert war. Die Verringerung der Thrombozytenzahl könnte durch die Interaktion der Thrombozyten mit zirkulierenden Tumorzellen zustande kommen, da so weniger Thrombozyten bei der Zellzählung im Zählgerät quantifiziert werden können.

Bei beiden verwendeten Modellen unterscheidet sich der Mechanismus der zur Metastasenreduktion führt, jedoch scheint die Hemmung der Thrombozytenaggregation die Voraussetzung für die Verhinderung der Metastasierung zu sein. Zum einen schränkt die verminderte Thrombozytenaggregation die Fibringerinnselbildung im MT3 Modell ein und zum anderen führt dies zur Reduktion der Aggregatbildung zwischen Tumorzellen und Thrombozyten im 4T1 Modell. Andere Studien belegten analog, dass eine verminderte Aggregationsfähigkeit oder eine reduzierte Thrombozytenzahl zu einer Hemmung der Metastasierung führen kann [27]. Neben der Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Cil oder DIP, ist zu vermuten, dass das zytotoxische OPP die Membranfluidität und -integrität der Tumorzellen beeinträchtigt und somit synergistisch mit Cil und OPP die Komplexbildung von Tumorzellen hemmt [31].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass duale Liposomen mit einer Wirkstoffkombination aus einem Thrombozytenaggregationshemmer und einem Zytostatikum die Metastasierung in verschiedenen Mausmodellen sehr wirkungsvoll verhindern können.

6. Referenzen

1. Monzavi-Karbassi B, Stanley JS, Hennings L *et al.*(2007) Chondroitin sulfate glycosaminoglycans as major P-selectin ligands on metastatic breast cancer cell lines. *Int J Cancer* **120**: 1179-91.
2. Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ(2000) Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med* **6**: 100-2.
3. Wenzel J, Zeisig R, Haider W, Habedank S, Fichtner I(2009) Inhibition of pulmonary metastasis in a human MT3 breast cancer xenograft model by dual liposomes preventing intravasal fibrin clot formation. *Breast Cancer Res Treat.*
4. Trousseau A (1865) Phlegmasia alba dolens. In: Clinique Medicaale de l'Hotel Dieu de Paris, vol 3. JB Balliere et Fils, Paris, pp 654-712.
5. Borsig L(2008) The role of platelet activation in tumor metastasis. *Expert Rev Anticancer Ther* **8**: 1247-55.
6. Borsig L, Wong R, Feramisco J, Nadeau DR, Varki NM, Varki A(2001) Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3352-7.
7. Tsuruo T, Fujita N(2008) Platelet aggregation in the formation of tumor metastasis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **84**: 189-98.
8. Honn KV, Tang DG, Crissman JD(1992) Platelets and cancer metastasis: a causal relationship? *Cancer Metastasis Rev* **11**: 325-51.
9. Tohgo A, Tanaka NG, Ogawa H(1986) Platelet-aggregating activities of metastasizing tumor cells. IV. Effects of cell surface modification on thrombin generation, platelet aggregation and subsequent lung colonization. *Invasion Metastasis* **6**: 58-68.
10. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Mannel DN(1999) Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res* **59**: 1295-300.
11. Gupta GP, Massague J(2004) Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link. *J Clin Invest* **114**: 1691-3.
12. Miyake K, Yamamoto S, Iijima S(1996) Blocking adhesion of cancer cells to endothelial cell types by S. agalactiae type-specific polysaccharides. *Cytotechnology* **22**: 205-9.
13. Wahrenbrock M, Borsig L, Le D, Varki N, Varki A(2003) Selectin-mucin interactions as a probable molecular explanation for the association of Trousseau syndrome with mucinous adenocarcinomas. *J Clin Invest* **112**: 853-62.
14. Zeisig R, Stahn R, Wenzel K, Behrens D, Fichtner I(2004) Effect of sialyl Lewis X-glycoliposomes on the inhibition of E-selectin-mediated tumour cell adhesion in vitro. *Biochim Biophys Acta* **1660**: 31-40.
15. Mancuso A, Sternberg CN(2006) New treatment approaches in metastatic renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol* **16**: 337-41.
16. Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I(2009) Inhibition of breast cancer metastasis by dual liposomes to disturb complex formation. *Int J Pharm* **370**: 121-8.

17. Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A(2002) Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 2193-8.
18. Zeisig R, Eue I, Kosch M, Fichtner I, Arndt D(1996) Preparation and properties of sterically stabilized hexadecylphosphocholine (miltefosine)-liposomes and influence of this modification on macrophage activation. *Biochim Biophys Acta* **1283**: 177-84.
19. Zeisig R, Muller K, Maurer N, Arndt D, Fahr A(2001) The composition-dependent presence of free (micellar) alkylphospholipid in liposomal formulations of octadecyl-1,1-dimethyl-piperidino-4-yl-phosphate affects its cytotoxic activity in vitro. *J Membr Biol* **182**: 61-9.
20. MacDonald RC, MacDonald RI, Menco BP, Takeshita K, Subbarao NK, Hu LR(1991) Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1061**: 297-303.
21. Cardinal DC, Flower RJ(1980) The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods* **3**: 135-58.
22. Im JH, Fu W, Wang H *et al.*(2004) Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res* **64**: 8613-9.
23. Saiki I, Koike C, Obata A *et al.*(1996) Functional role of sialyl Lewis X and fibronectin-derived RGDS peptide analogue on tumor-cell arrest in lungs followed by extravasation. *Int J Cancer* **65**: 833-9.
24. Oleksowicz L, Mrowiec Z, Schwartz E, Khorshidi M, Dutcher JP, Puszkin E(1995) Characterization of tumor-induced platelet aggregation: the role of immunorelated GPIIb and GPIIb/IIIa expression by MCF-7 breast cancer cells. *Thromb Res* **79**: 261-74.
25. Gasic GJ(1984) Role of plasma, platelets, and endothelial cells in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **3**: 99-114.
26. Wong CW, Song C, Grimes MM *et al.*(2002) Intravascular location of breast cancer cells after spontaneous metastasis to the lung. *Am J Pathol* **161**: 749-53.
27. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV *et al.*(2005) Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* **105**: 178-85.
28. Keil C, Zeisig R, Fichtner I(2005) Effect of surface modified liposomes on the aggregation of platelets and tumor cells. *Thromb Haemost* **94**: 404-11.
29. Mayer LD, Harasym TO, Tardi PG *et al.*(2006) Ratiometric dosing of anticancer drug combinations: controlling drug ratios after systemic administration regulates therapeutic activity in tumor-bearing mice. *Mol Cancer Ther* **5**: 1854-63.
30. Al-Jamal WT, Kostarelos K(2007) Construction of nanoscale multicompartiment liposomes for combinatory drug delivery. *Int J Pharm* **331**: 182-5.
31. Zeisig R, Koklic T, Wiesner B, Fichtner I, Sentjurc M(2007) Increase in fluidity in the membrane of MT3 breast cancer cells correlates with enhanced cell adhesion in vitro and increased lung metastasis in NOD/SCID mice. *Arch Biochem Biophys* **459**: 98-106.

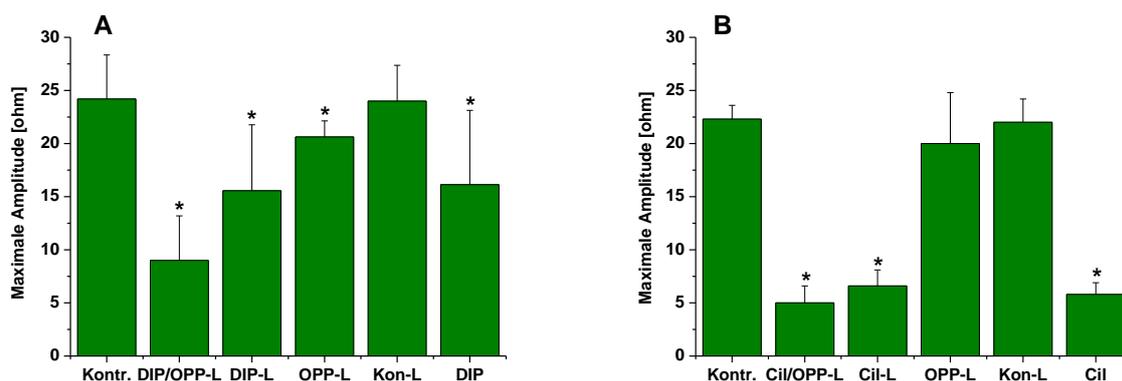
7. Abkürzungsverzeichnis

aPlt	aktivierte Thrombozyten
aPlt+DIP/OPP-L	aktivierte Thrombozyten in Kombination mit DIP/OPP-L
aPlt+Kon-L	aktivierte Thrombozyten in Kombination mit Kontroll-Liposomen
CH	Cholesterol
Cil	Cilostazol
Cil/OPP-L	Liposomen, die Cilostazol und Perifosin einschließen
Cil-L	Liposomen, die Cilostazol enthalten
DCP	Dicetylphosphat
DIP	Dipyridamol
DIP/OPP-L	Liposomen, die Dipyridamol und Perifosin einschließen
DIP-L	Liposomen, die Dipyridamol enthalten
h	Stunden
HE	Hämatoxylin/Eosin
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
i.v.	intravenös
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
Kon-L	wirkstofffreie Kontroll-Liposomen
Kontr.	Kontrolle
MLV	Multilamellare Vesikel
OPP	4-((Hydroxy(octadecyloxy)phosphinyloxy)-1,1-dimethylpiperidinium inner salt (Perifosine)
OPP-L	Liposomen, die Perifosin enthalten
PC	Phosphatidylcholin
PEG-PE	N-Methyl-(polyethyleneglycol) ₂₀₀₀ -1,2-distearyl-s,n-glycero-3-phosphatidylethanolamin
PI	Polydispersitätsindex
Plt	Thrombozyten
S.D.	Standardabweichung

8. Anhang

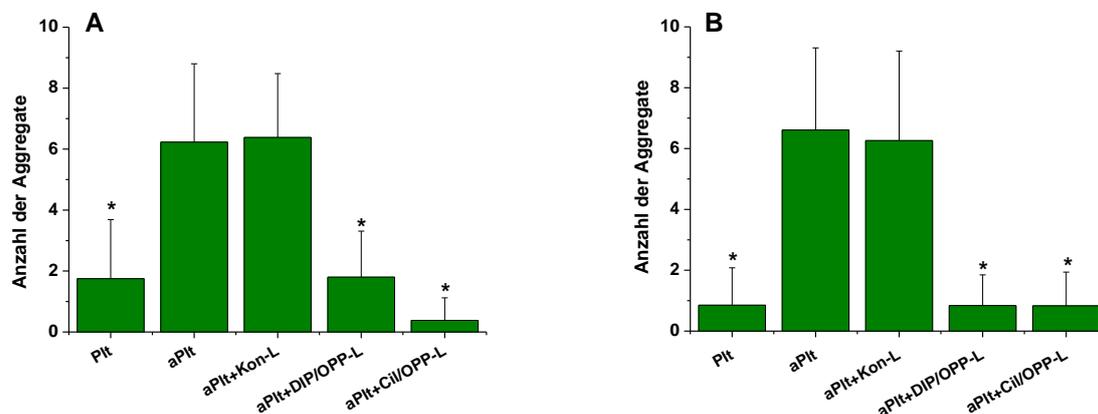
- Abbildungen
- Erklärung zum Anteil der Doktorandin an den Publikationen
- 3 Publikationen als Promotionsleistung
 1. Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I (2009) Inhibition of breast cancer metastasis by dual liposomes to disturb complex formation. Int J Pharm 370: 121-128.
 2. Wenzel J, Zeisig R, Haider W, Habedank S, Fichtner I (2009) Inhibition of pulmonary metastasis in a human MT3 breast cancer xenograft model by dual liposomes preventing intravasal fibrin clot formation. Breast Cancer Res Treat. Published online 23 Jun. [Epub ahead of print]
 3. Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I (2009) Inhibition of spontaneous Metastasis in a murine 4T1 breast cancer model by liposomes preventing tumor cell-platelet interactions. Clin Exp Metastasis. Published online 15 Nov. [Epub ahead of print]
- Lebenslauf
- Weitere Publikationen und Veröffentlichungen
- Erklärung über Selbstständigkeit
- Danksagung

Abbildungen

**Abb. 1: Einfluss dualer Liposomen auf die Thrombozytenaggregation in vitro**

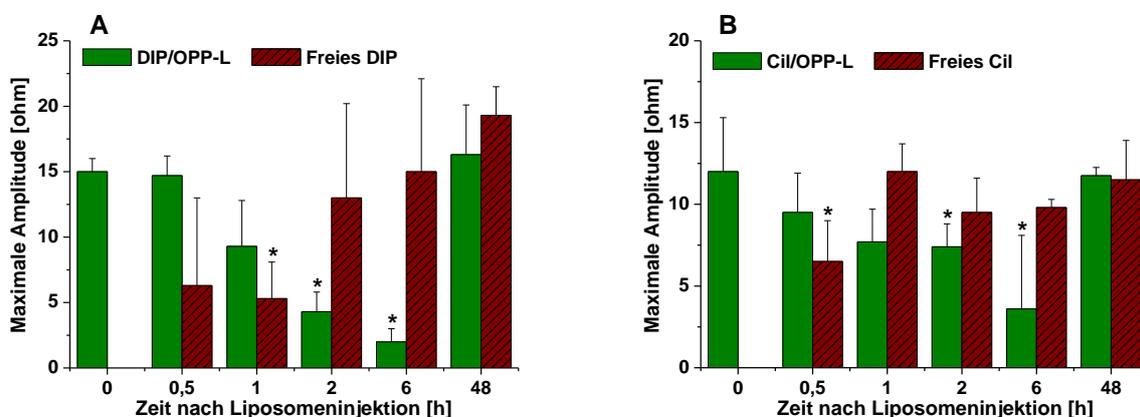
Die Aggregation humaner Thrombozyten in Plasma in Gegenwart von DIP/OPP-L (A) oder Cil/OPP-L (B) wurde mittels Impedanz-Aggregometer nach 20 min Messung bestimmt. Dargestellt ist die maximale Thrombozytenaggregation (Amplitude) \pm S.D. nach 5 unabhängigen Versuchen.

*: Signifikant verschieden zur „Kontr.“ (Kontrolle) und „Kon-L“ (Kontroll-Liposomen) ($P > 0,05$).

**Abb. 2: Einfluss dualer Liposomen auf Komplexbildung von Tumorzellen in vitro**

Thrombozyten, Fluoreszenz-markierte MT3 (A) oder 4T1 (B) Tumorzellen und DIP/OPP-L oder CIL/OPP-L wurden mit Thrombin für 20 min inkubiert und die Suspension auf Objektträger zentrifugiert. Dargestellt ist die Anzahl der Tumorzellaggregate (≥ 5 Zellen) \pm S.D. pro Bildausschnitt.

*: Signifikant verschieden zu „aPlt“ und „aPlt+Kon-L“ ($P > 0,05$).

**Abb. 3: Einfluss dualer Liposomen auf die murine Thrombozytenaggregation**

Zu bestimmten Zeitpunkten nach Injektion der DIP/OPP-L (A) oder Cil/OPP-L (B), sowie den jeweiligen Kontrollen, wurde den Mäusen Blut entnommen und die Thrombozytenaggregation *ex vivo* im Impedanz-Aggregometer nach 20 min Messung bestimmt. Dargestellt ist die maximale Thrombozytenaggregation (Amplitude in ohm) \pm S.D. nach verschiedenen Zeitpunkten.

*: Signifikant verschieden zum Zeitpunkt „0“ ($P < 0,05$).

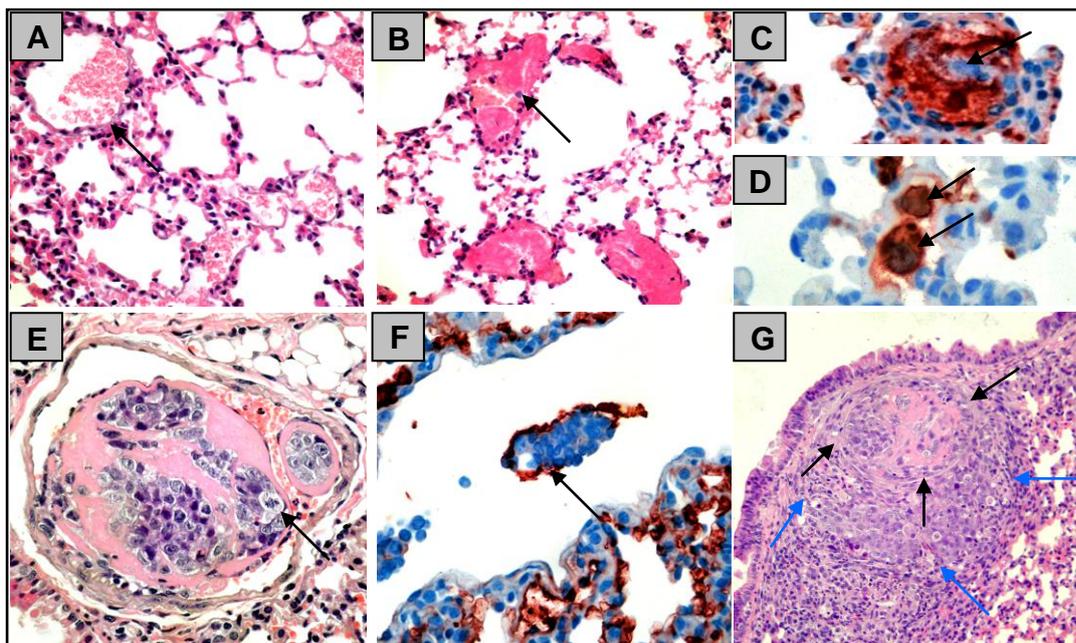


Abb. 4: Charakterisierung der experimentellen Metastasierung im MT3 Brustkrebsmodell

5×10^6 MT3 Tumorzellen wurden in Mäuse injiziert und diese nach bestimmten Zeitpunkten abgetötet. Die Lungen wurden, wie unter Methodik beschrieben, präpariert. Dargestellt sind folgende Lungenschnitte (in Klammern: Zeitpunkt nach Tumorzellgabe; Färbung und Vergrößerung): **(A)** Kontroll-Lunge ohne Tumorzellen; Pfeil: Blutgefäß mit Erythrozyten (HE; 20 \times); **(B)** Tumorzelle im Fibringerinnsel eingeschlossen (30 min; HE; 20 \times); **(C)** Tumorzelle im Fibringerinnsel eingeschlossen (30 min; Fibrin(ogen)-Färbung; 20 \times); **(D)** Zwei Tumorzellen in kleinen Kapillaren (30 min; Tumorzell-Färbung; 40 \times); **(E)** Mikrometastase ist umgeben und infiltriert von Fibrin; Pfeil: mitotische Zelle (5 Tage; HE; 40 \times); **(F)** Mikrometastase von Fibrin umgeben (5 Tage; Fibrin(ogen)-Färbung; 20 \times); **(G)** eine Mikrometastase (blaue Pfeile) hat die Endothelmembran durchbrochen (schwarze Pfeile) und das umliegende Gewebe infiltriert (5 Tage; HE; 20 \times).

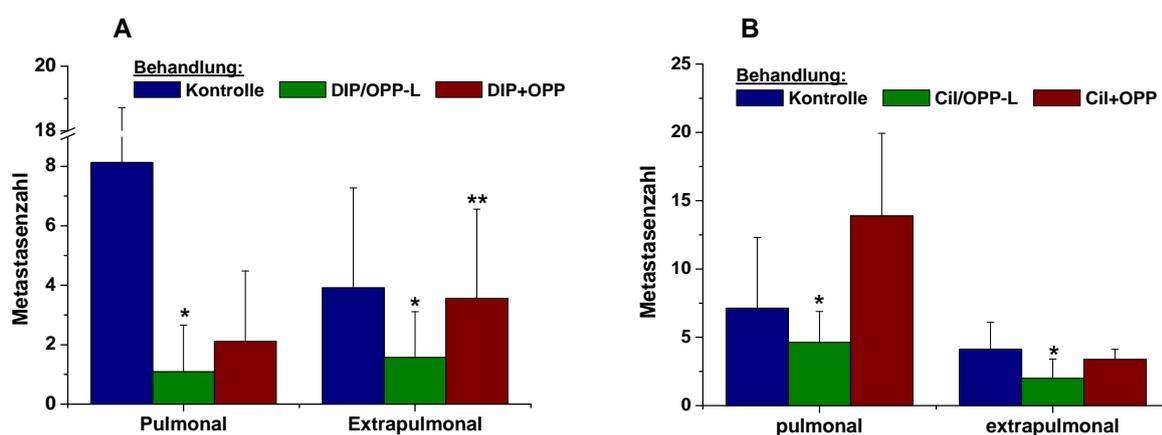


Abb. 5: Hemmung der Metastasierung im MT3 Brustkrebsmodell durch duale Liposomen

5×10^6 MT3 Tumorzellen wurden i.v. in die Schwanzvene von NMRI:nu/nu Mäusen injiziert. Die Tiere wurden 6 h vor der Tumorzellgabe mit je 100 nmol Totallipid DIP/OPP-L **(A)**, Cii/OPP-L **(B)** oder den entsprechenden Mengen an freien Wirkstoffen behandelt. 30 Tage später wurden die Mäuse abgetötet, um die Metastasenzahl und Lokalisation zu bestimmen. Dargestellt ist die durchschnittliche Metastasenzahl \pm S.D. von je 8 Mäusen pro Versuchsgruppe.

(*): Signifikant verschieden zur Kontrolle ($P < 0.05$).

(**): Signifikant verschieden zu "DIP/OPP-L" ($P < 0.05$).

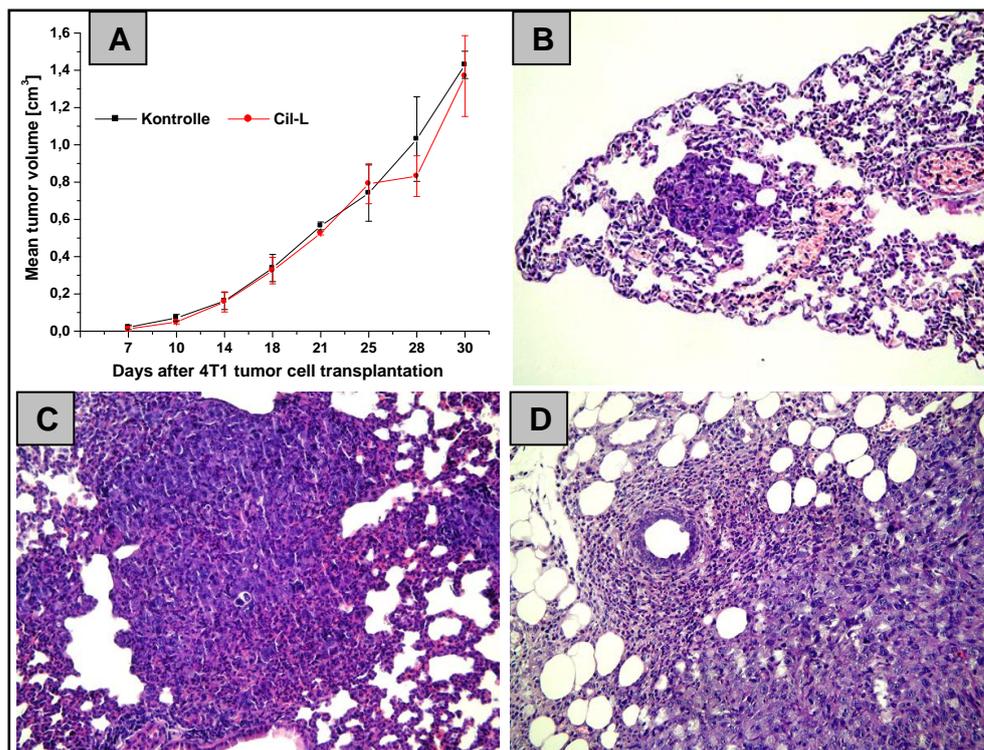


Abb. 6: Charakterisierung der spontanen Metastasierung im 4T1 Brustkrebsmodell

1×10^4 4T1 Brustkrebszellen wurden in das Mammafettpolster von Crl:Balb/c Mäusen transplantiert. Die Mäuse wurden nach bestimmten Zeitpunkten abgetötet, um den Primärtumor und die Lunge zu untersuchen, wie in Methodik beschrieben. **(A)** Das Wachstum des Primärtumors wurde über den gesamten Versuchszeitraum verfolgt. Folgende HE-gefärbte Schnitte sind in 20-facher Vergrößerung dargestellt (in Klammern: Tag nach Transplantation der Tumorzellen): **(B)** pulmonale Mikrometastase (23 Tage); **(C)** pulmonale Mikrometastase (28 Tage); **(D)** Primärer Mammatumor (30 Tage).

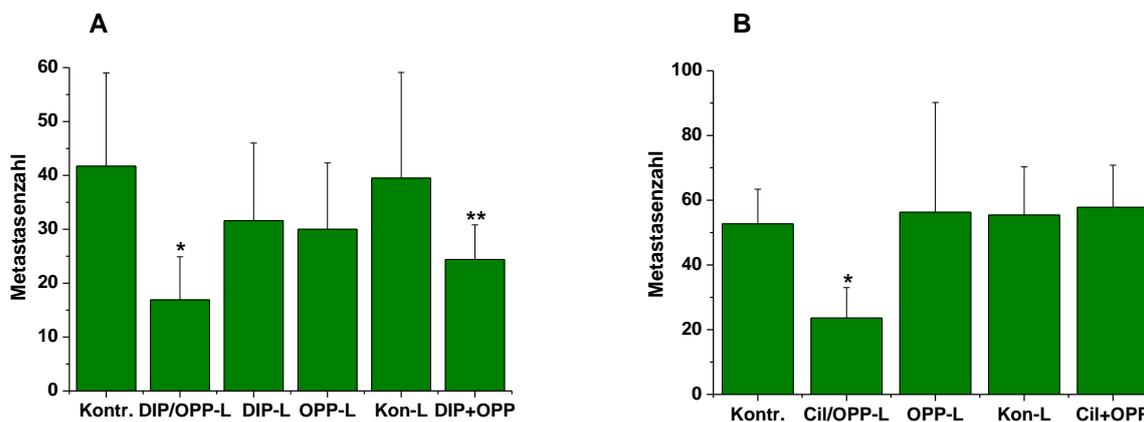


Abb. 7: Hemmung der Metastasierung im 4T1 Brustkrebsmodell durch duale Liposomen

1×10^4 murine 4T1 Brustkrebszellen wurden in das Mammafettpolster von Crl:Balb/c Mäusen transplantiert. Die Mäuse wurden i.v. mit 100 nmol Totallipid DIP/OPP-L **(A)** oder Cil/OPP-L **(B)** 6 h vor Tumorzellinjektion und dann täglich für zwei Wochen behandelt. Kontroll-Mäuse erhielten PBS. Zusätzliche Kontrollgruppen erhielten Liposomen, die einen der beiden oder keinen Wirkstoff enthielten oder wurden mit freien Wirkstoffen DIP+OPP oder Cil+OPP behandelt. Die Mäuse wurden nach 30 Tagen abgetötet und die Zahl der Metastasen quantifiziert. Dargestellt ist die durchschnittliche Metastasenanzahl \pm S.D. von je 8 Mäusen pro Versuchsgruppe.

* Signifikant verschieden zur "Kontr." (Kontrolle) ($P > 0,05$).

Erklärung zum Anteil der Doktorandin an den Publikationen

Publikation 1:

Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I (2009) Inhibition of breast cancer metastasis by dual liposomes to disturb complex formation. Int J Pharm 370:121-128.

Eigener Anteil: 60%

Zu Beginn des Projektes erfolgte zunächst eine Einweisung von Herrn Dr. Reiner Zeisig in die Methoden, die anschließend für alle weiteren Publikationen selbstständig von mir übernommen wurden: Liposomenherstellung und –charakterisierung, Isolierung und Verwendung von Thrombozyten in den *in vitro* Versuchen. Alle tierexperimentellen Arbeiten an Mäusen wurden von Frau Monika Becker (technische Angestellte) durchgeführt. Die Probenvorbereitung und –aufarbeitung für die Tierversuche, sowie die Datenauswertung wurden von mir übernommen. Die Planung der Experimente erfolgte zum großen Teil selbstständig in Absprache mit Dr. Reiner Zeisig und der Gruppenleiterin Dr. Iduna Fichtner. Für das Manuskript habe ich den Material und Methoden Teil und die Abbildungen verfasst, sowie mit Zuarbeiten und Korrekturarbeiten zum Manuskript beigetragen.

Publikation 2:

Wenzel J, Zeisig R, Haider W, Habedank S, Fichtner I (2009) Inhibition of pulmonary metastasis in a human MT3 breast cancer xenograft model by dual liposomes preventing intravasal fibrin clot formation. Breast Cancer Res Treat. Published online 23 Jun. [Epub ahead of print].

Eigener Anteil: 70%

Alle *in vitro* Versuche sowie deren statistische und graphische Auswertung wurden von mir selbstständig durchgeführt. Alle tierexperimentellen Arbeiten an Mäusen wurden von Frau Monika Becker (technische Angestellte) durchgeführt. Die Probenvorbereitung und -aufarbeitung für die Tierversuche, sowie die Datenauswertung wurden von mir übernommen. Die pathologische Begutachtung der Lungenschnitte erfolgte durch den Pathologen Herrn Dr. Haider. Die immunhistologischen Färbungen der Lungenschnitte wurden von Frau Dr. Habedank ausgeführt. Die Planung der Experimente erfolgte zum großen Teil selbstständig in Absprache mit Dr. Reiner Zeisig und Dr. Iduna Fichtner. Das Manuskript wurde von mir verfasst mit Unterstützung und Korrektur durch Dr. Reiner Zeisig und Dr. Iduna Fichtner.

Publikation 3:

Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I (2009) Inhibition of metastasis in a murine 4T1 breast cancer model by liposomes preventing tumor cell-platelet interactions. Clin Exp Metastasis. Published online 15 Nov. [Epub ahead of print].

Eigener Anteil: 80%

Alle *in vitro* Versuche sowie deren statistische und graphische Auswertung wurden von mir selbstständig durchgeführt. Alle tierexperimentellen Arbeiten an Mäusen wurden von Frau Monika Becker (technische Angestellte) durchgeführt. Die Probenvorbereitung und -aufarbeitung für die Tierversuche, sowie die Datenauswertung wurden von mir übernommen. Die pathologische Begutachtung der Lungenschnitte erfolgte durch den Pathologen Herrn Dr. Haider. Die Planung der Experimente erfolgte zum großen Teil selbstständig in Absprache mit Dr. Reiner Zeisig und Dr. Iduna Fichtner. Das Manuskript wurde von mir verfasst mit Unterstützung und Korrektur durch Dr. Reiner Zeisig und Dr. Iduna Fichtner.

Prof. Dr. med. M. van der Giet
Betreuer des Promotionsvorhabens

Jane Wenzel
Antragstellerin

3 Publikationen als Promotionsleistung

- (1) Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I (2009) Inhibition of breast cancer metastasis by dual liposomes to disturb complex formation. *Int J Pharm.* 370:121-128.

Impact Factor: 3,061

- (2) Wenzel J, Zeisig R, Haider W, Habedank S, Fichtner I (2009) Inhibition of pulmonary metastasis in a human MT3 breast cancer xenograft model by dual liposomes preventing intravasal fibrin clot formation. *Breast Cancer Res Treat.* Published online 23 Jun. [Epub ahead of print].

Impact Factor: 5,684

- (3) Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I (2009) Inhibition of metastasis in a murine 4T1 breast cancer model by liposomes preventing tumor cell-platelet interactions. *Clin Exp Metastasis.* Published online 15 Nov. [Epub ahead of print].

Impact Factor: 2,905

Referenzen der Originalpublikationen

1. Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I (2009) Inhibition of breast cancer metastasis by dual liposomes to disturb complex formation. *Int J Pharm* 370:121-128.
2. Wenzel J, Zeisig R, Haider W, Habedank S, Fichtner I (2009) Inhibition of pulmonary metastasis in a human MT3 breast cancer xenograft model by dual liposomes preventing intravascular fibrin clot formation. *Breast Cancer Res Treat*: Published online 23 Jun. [Epub ahead of print].
3. Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I (2009) Inhibition of metastasis in a murine 4T1 breast cancer model by liposomes preventing tumor cell-platelet interactions. *Clin Exp Metastasis*. Published online 15 Nov. [Epub ahead of print].

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Weitere Publikationen und Veröffentlichungen

Diplomarbeit

- Wenzel J. „Einfluss von Liposomen und Hämostase-Inhibitoren auf die Aggregation von Tumorzellen und Thrombozyten“. 2005. Diplomarbeit. Angefertigt am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin; AG Experimentelle Pharmakologie; Dr. I. Fichtner.

Patent

- Patent DE 10 2007 008 484.8 »Pharmazeutische Zubereitung zur Bekämpfung von Metastasen « von EPO GmbH Berlin Buch und MDC, 21.02.2007. PCT/DE2008/00264 application, 14.2.2008.

Vorträge

- Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I. “Characterisation of the effect of liposomes on the aggregation of platelets and tumor cells”. 17th Liposome (mountain-sea) Workshop 2005. Oberjoch, Deutschland.
- Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I. “Influence of liposomes on tumor cell-platelet interaction *in vitro* and *in vivo*”. 18th Liposome (mountain/sea) Workshop 2006. Ameland, Niederlande.
- Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I. “Influence of liposomes on tumour cell-platelet interaction *in vitro* and *in vivo*”. Controlled Release Society German Chapter, Annual Meeting 2007. Freiburg, Deutschland.
- Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I. “Inhibition of blood borne metastasis by DIP-OPP-liposomes disturbing the tumor cell platelet interaction *in vivo*”. 19th Liposome (mountain-sea) workshop 2008. Oberjoch, Deutschland.
- Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I. “Inhibition of breast cancer metastasis by dual liposomes disturbing the tumour cell-platelet interaction *in vivo*”. AEK Conference 2009. Berlin, Deutschland.

Posterpräsentationen

- Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I. “Molecular factors involved in the interaction between platelets and tumor cells in the process of tumor metastasis”. 8th PhD Retreat des MDC und FMP 2006. Berlin, Deutschland.
- Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I. “Inhibition of platelet functionality *in vitro* and metastasis in nude mice using liposomes for disturbance of MT3 breast cancer cell – platelet interplay”. International Liposome Society, Liposome Advances Conference 2007. London, Großbritannien.
- Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I. “Inhibition of metastasis of MT3 breast cancer in a mouse xenograft model by treatment with liposomes to reduce complex formation between platelets and tumor cells”. Controlled Release Society Meeting and Exposition 2008. New York City. USA.
- Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I. “Inhibition of breast cancer metastasis by reduced complex formation between platelets and tumor cells”. 10th PhD Retreat des MDC und FMP 2008. Berlin, Deutschland.
- Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I. “Inhibition of breast cancer metastasis by dual liposomes disturbing the tumour cell-platelet interaction *in vivo*”. 11th PhD Retreat des MDC und FMP 2009. Berlin, Deutschland.
- Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I. “Inhibition of breast cancer metastasis by dual liposomes interfering with the tumor cell-platelet interaction”. CESAR Jahrestagung 2009. Heidelberg, Deutschland.

Erklärung über Selbständigkeit

Ich, Jane Wenzel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Hemmung der Tumormetastasierung durch Verhinderung der Interaktion zwischen zirkulierenden Tumorzellen und Thrombozyten mittels dualer Liposomen im Mausmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein erster Dank gilt Frau Dr. Iduna Fichtner für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe Experimentelle Pharmakologie am Max Delbrück Centrum für Molekulare Medizin, Berlin. Ich danke Ihr für die Möglichkeit meine Dissertation in Ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen und für Ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und Unterstützung in jeder Phase meiner Arbeit.

Vor allem möchte ich Herrn Dr. Reiner Zeisig für die immer währende Unterstützung und gute Betreuung während meiner Dissertation und die geduldigen Korrekturen an den Publikationen und meiner Arbeit danken.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Experimentelle Pharmakologie für die gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Markus van der Giet von der Medizinischen Klinik für Nephrologie der Medizinischen Fakultät der Charité -Universitätsmedizin Berlin für die mentorielle Betreuung meiner Dissertation.

Ich danke Micha für seine Liebe und die moralische Unterstützung während dieser Zeit.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie und vor allem meinen Eltern danken, die mich während der gesamten Promotion unterstützt und an mich geglaubt haben.