

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss der Hämoxygenase-1 auf die VEGF
und ICAM-1 Expression von Zellen der
kolorektalen Karzinomzelllinie DHD/K12/TRb**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Andreas Tilch
aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr.med. J. Pratschke
2. Prof. Dr.med. C.-D. Heidecke
3. Prof. Dr.med. B. Vollmar

Datum der Promotion: 07.12.07

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das Kolorektale Karzinom und hepatische Metastasen	1
1.2. Metastasierungsprozesse und Adhäsionsmoleküle.....	3
1.3. Angiogenese	5
1.4. Hämoxygenase-1	9
1.4.1. Struktur und Vorkommen der HO-1.....	9
1.4.2. HO-1 und Angiogenese.....	10
1.4.3. HO-1 und Tumorbilogie.....	11
1.5. Antiangiogene Therapie	11
1.6. Fragestellung.....	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Allgemeines.....	14
2.2. Geräte und Chemikalien.....	14
2.2.1. Geräte	14
2.2.2. Labormaterialien	14
2.2.3. Chirurgische Instrumente	15
2.2.4. Chemikalien	15
2.2.5. Antikörper.....	17
2.2.6. Versuchstiere	17
2.2.7. Zelllinie.....	17
2.3. Puffer und Lösungen	18
2.3.1. Zellkulturmedium.....	18
2.3.2. Puffer für FACS.....	18
2.3.3. Puffer für ELISA	18
2.3.4. Herstellung der ZnPP bzw. CoPP-Lösung zur 'in-vitro'-Stimulation.....	19
2.3.5. Herstellung der ZnPP bzw. CoPP Lösung zur intraperitonealen Injektion.....	19
2.3.6. Herstellung des AEC-Sunbstrates für die Immunhistochemie.....	19
2.4. Zelllinie DHD/K12/TRb	20
2.4.1. Präparation der Zellen für 'in-vitro' Untersuchungen	20

2.4.2. Analyse der Expression von ICAM-1 mittels FACS.....	21
2.4.3. Analyse der Expression von VEGF mittels ELISA.....	22
2.5. Versuchsaufbau	24
2.6. Versuchstiere	25
2.7. Präparation der Tumorzellen zur intraportalen Injektion.....	25
2.8. Operationstechnik	26
2.8.1. Narkose.....	26
2.8.2. Vorbehandlung der Versuchstiere mit ZnPP bzw. CoPP	26
2.8.3. Intraportale Injektion der Tumorzellen.....	26
2.8.4. Organentnahme und Tötung der Versuchstiere	27
2.9. Immunhistochemie mittels Streptavidin-Biotin-HRP Methode	28
2.10. Statistik und Dokumentation.....	30
3. Ergebnisse	31
3.1. Expression von ICAM-1.....	31
3.2. VEGF-Konzentration im Zellkulturüberstand	33
3.3. Tumorumfänge.....	37
3.4. Immunhistochemische Untersuchungen	39
3.4.1. Bestimmung der Gefäßdichte mittels CD31-Färbung.....	39
3.4.2. VEGF Expression im Tumorgewebe	42
4. Diskussion.....	44
4.1. Adhäsion	45
4.2. Angiogenese	47
4.3. Rolle der Abbauprodukte der HO-1	49
5. Zusammenfassung	52
6. Literaturverzeichnis.....	54
Erklärung	
Danksagung	
Lebenslauf	

Abkürzungen

3,3-5,5 Tetramethylbenzidin	TMB
3-Amino-9-Ethyl Carbazol	AEC
Cobalt Protoporphyrin	CoPP
Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM
Enzyme linked immunosandwichassay	ELISA
Fibroblast growth factor	FGF
Flourescence activated cell sorter	FACS
Fluoreszeinisothiocyanat	FITC
Hämoxygenase-1	HO-1
Horseradish-Peroxidase	HRP
Intercellular Adhesion Molecule-1	ICAM-1
Interferon-gamma	IFN γ
N,N-Dimethylformamid	DMF
Natriumhydroxid	NaOH
Phospahte buffered Saline	PBS
Platelet derived growth factor	PDGF
Reactive oxygen species	ROS
Transforming growth factor-beta	TGF β
Tumornekrosefaktor-alpha	TNF α
Vascular endothelian Growth Factor	VEGF
Wasserstoffchlorid (Salzsäure)	HCl
Zink Protoporphyrin (XI)	ZnPP
Zinn Protoporphyrin	SnPP

1. Einleitung

1.1. Das Kolonkarzinom und hepatische Metastasen

Das Kolonkarzinom ist mit einer Inzidenz von 30/100.000 Einwohner/Jahr bei steigender Tendenz eine der häufigsten malignen Neoplasien in vielen Industrieländern.

Es ist die zweithäufigste Todesursache unter den malignen Erkrankungen, mit einem Gesamtanteil von 2,4% unter allen Todesursachen (1).

Die Tumoren manifestieren sich meist nach dem 45. Lebensjahr, der Häufigkeitsgipfel liegt um das 70. Lebensjahr. 60% der Karzinome entstehen im Rektum, 20% im Colon sigmoideum, 10% im Caecum/Colon ascendens und 10% sind im übrigen Kolon lokalisiert.

Risikofaktoren stellen bestimmte Ernährungsfaktoren, wie ein hoher Fett- und Eiweißkonsum, Übergewicht und niedriger Ballaststoffgehalt dar. In 20% der Fälle besteht eine genetische Disposition im Rahmen hereditärer Erkrankungen, wie zum Beispiel der familiären Adenomatosis coli oder dem hereditären, nichtpolypösem Kolonkarzinomsyndrom. Auch Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wie Colitis ulcerosa haben ein sehr hohes Risiko ein Kolonkarzinom zu entwickeln.

Von Vogelstein (2) wurde ein Tumorprogressionsmodell entwickelt, dass als Dysplasie-Karzinom-Sequenz bezeichnet wird (Abb.1) Durch Verlust oder Mutation des APC-Gens in normalem Epithel geht dieses in hyperproliferatives Epithel über. Es entwickelt sich ein frühes Adenom mit geringer Dysplasie. Die Mutation des k-ras-Onkogens führt zu einem intermediärem Adenom mit mittelgradiger Dysplasie. Durch den Verlust des DCC-Tumor-Suppressor-Gens entsteht ein Adenom mit hochgradiger Dysplasie. Schließlich führt ein Verlust des p53-Gens zur Entstehung eines Karzinoms. Weitere Mutationen wie eine Mutation des nm23-Gens sind für die Entstehung von Metastasen notwendig.

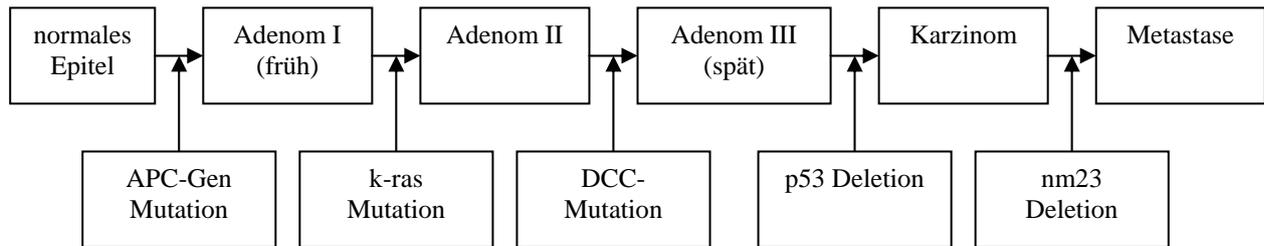


Abbildung 1: Modell der Dysplasie-Karzinom-Sequenz mit bekannten Mutationen und Deletionen spezifischer Kolonkarzinom-assoziiierter Gene (nach Schumpelick, 1999)

Die Prognose der kolorektalen Karzinome ist trotz medizinischen Fortschritts noch stets unbefriedigend.

Nahezu die Hälfte aller Patienten stirbt innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung (3). Damit ist trotz einer erheblichen Verbesserung der onkologischen Behandlung in den letzten Jahren die Mortalität des kolorektalen Karzinoms weiterhin außerordentlich hoch geblieben. Dabei sind Metastasen für mehr Todesfälle verantwortlich als die eigentlichen Primärtumoren. Trotz primär kurativer chirurgischer Resektion, verstirbt über die Hälfte der Patienten schließlich an den Folgen der Metastasierung (4). Bis zu 2/3 der Patienten mit kolorektalem Karzinom entwickeln langfristig Lebermetastasen, gleichzeitig stellen 80-90% der entfernten Lebermetastasen Metastasen eines initialen Kolonkarzinoms dar.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose weisen bereits 15-25% der Patienten mit Kolonkarzinom eine hepatische Metastasierung auf (5,6). Nach Resektion eines primär kolorektalen Karzinoms ohne erkennbare Metastasen, entwickeln etwa 50% der Patienten Lebermetastasen. Allerdings entwickeln nur ca. 5% der Patienten isolierte Lebermetastasen (7). Die chirurgische Resektion ist derzeit die einzig mögliche kurative Behandlungsform für Patienten mit hepatischen Metastasen. Andere Verfahren, die zur Anwendung kommen sind lokale Hyperthermie, Chemoembolisation oder lokale Chemotherapie. Frühere Studien haben gezeigt, dass bei Patienten mit unbehandelten Lebermetastasen, die 1-Jahres-Überlebensrate 21%-60% beträgt und die maximale Überlebenszeit im Einzelfall 5 Jahre betrug (5,8). Die mittlere Überlebenszeit betrug zwischen 5,7 und 24 Monaten (5,7,8). Nach Resektion hepatischer Metastasen betrug die 1-Jahres-Überlebensrate ca. 80% und die 5-Jahres-Überlebensrate ca. 25% (8).

1.2. Metastasierungsprozesse und Adhäsionsmoleküle

Der Prozess der Metastasierung beinhaltet eine Vielzahl von Schritten (Abb.2), die alle erfolgreich durchlaufen werden müssen um eine Metastase zu formen.

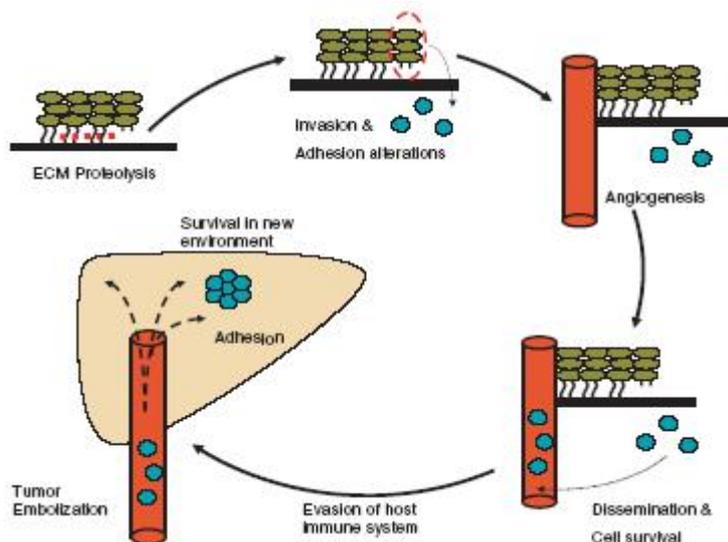


Abbildung 2: Schritte der Metastasenbildung. Von links beginnend im Uhrzeigersinn: Proteolyse der extrazellulären Matrix. Invasion des umliegenden Gewebes und Angiogenese. Zeldissemination und Intravasation. Formung von Tumorzellenembolie und Adhäsion im Zielorgan, (nach Rudmik LR, Magliocco AM: Molecular mechanisms of hepatic metastasis in colorectal metastasis. Journal of Surgical Oncology 2005;92:347-359)

Metastasen erreichen die Leber über die Lymphabflusswege, durch direkte Invasion, über die Arteria hepatica oder über die Pfortader.

Im Fall des Kolonkarzinoms erfolgt die Metastasierung am häufigsten über die Pfortader.

Wenn maligne Zellen vom Tumor aus in Blutgefäße eindringen, bezeichnet man diesen Prozess als Intravasation. Der Prozess der Intravasation wird ermöglicht durch eine Reduktion der Zell-Zell Adhäsion, erhöhte Zellbeweglichkeit und durch die Sekretion von Proteinen, die die extrazelluläre Matrix abbauen, z.B. Matrixmetalloproteinasen, Kathepsine oder Plasminogenaktivatoren (9,10). Auch Endothelzellen sezernieren eine Vielzahl von Matrix-abbauenden Proteasen, die die Invasion der Tumorzellen erleichtern (11).

Die Zellen zirkulieren in der Blutbahn bis sie in ein neues Organ gelangen und extravasieren (12).

Die Tumorzellen können dann mittels Oberflächenproteinen an Endothelzellen binden und eine Retraktion der Zellen erzwingen um schließlich mittels Glykoproteinen an spezifische Rezeptoren der Basalmembran zu binden.

Oberflächenproteine, welche die Bindung von im Blut zirkulierenden Zellen an andere Zellen ermöglichen werden als Adhäsionsmoleküle bezeichnet. In den letzten Jahren ist eine Vielzahl von verschiedenen Adhäsionsmolekülen beschrieben worden.

Zelladhäsionsmoleküle dienen zum Aufbau komplexer Gewebsverbände und gewährleisten die Aufrechterhaltung der morphologischen und funktionellen Integrität von Geweben. Außerdem sind sie an dynamischen physiologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Zellrekrutierung von Zellen des Immunsystems beteiligt.

Eine Einteilung der Adhäsionsmoleküle erfolgt anhand Proteinstruktur und Bindungsweise. So unterscheidet man die Immunglobulin-Superfamilie, die Integrine, Selektine und Cadherine (13).

Tumoren mit niedrigen Expressionsraten bestimmter Adhäsionsmolekülen neigen zu früherem Verlust von malignen Zellen aus dem Zellverband. So konnte gezeigt werden, dass eine niedrige Expression von E-Cadherin mit einer steigenden Rate an Tumorrezidiven korreliert (14).

ICAM-1 ist ein wichtiges Adhäsionsmolekül, das bei der Rekrutierung von Leukozyten eine Rolle spielt. Es ist ein 90kDa großes Zelloberflächenglykoprotein, welches aus 505 Aminosäuren besteht. Es ist aufgeteilt in 5 extrazelluläre immunglobulinähnliche Domänen, einen transmembranen und einen kurzen intrazytoplasmatischen Bereich.

Es wird auf Leukozyten und Zellen anderer Gewebe, wie auch auf Tumorzellen exprimiert.

Im Gegensatz dazu werden die Bindungspartner von ICAM-1, LFA-1 und Mac-1, ausschließlich auf Leukozyten exprimiert. ICAM-1 vermittelt daher den Kontakt zwischen Leukozyten und anderen Geweben. Durch Induktion von ICAM-1, z.B. bei entzündlichen Prozessen, werden viele Gewebe erst für das Immunsystem

zugänglich. Faktoren, die ICAM-1 induzieren können sind bestimmte Zytokine wie IFN γ , TNF α , IL-1, Retinoide oder Lipopolysaccharid (15,16,17). Die Expression kann durch IL-10, TGF β oder Glukokortikoide gehemmt werden (18,19).

Auch eine Erhöhung der Aktivität der Hämoxygenase-1 (HO-1) mit Hämin oder Inhibition mit SnPP kann zu einer erhöhten bzw. erniedrigten ICAM-1 Expression führen (20).

Eine erhöhte Expression von ICAM-1 in Zellen kolorektaler Karzinome und der damit verbundenen Einfluss auf die Tumorprogression wurden von Maurer et al. beschrieben (21). Vor allem gut differenzierte Karzinome zeigten eine erhöhte ICAM-1 Expression und Infiltration von CD3+ Lymphozyten. Die Infiltration eines Tumors mit inflammatorischen Zellen ist daher auch assoziiert mit einer günstigeren Prognose (22).

Ebenso ist eine hohe Expression von ICAM-1 von Zellen kolorektaler Karzinome assoziiert mit einer niedrigeren Inzidenz von Lymphknoten- und Lebermetastasen, als von ICAM-1 negativen Tumoren (23). Experimentell konnte gezeigt werden, dass Zellen kolorektaler Karzinome die mit dem ICAM-1 Gen transfiziert wurden, ein geringeres Tumorwachstum aufweisen (24). Durch den Verlust von ICAM-1 können Tumorzellen vom Immunsystem nicht erkannt werden und entgehen der Zellyse durch zytotoxische T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen. Dies führt zu einer erhöhten Metastasierungsrate und einer schlechteren Prognose (25).

Die therapeutische Beeinflussung der Expression von ICAM-1 und damit verbundene Erhöhung der Zellrekrutierung von immunkompetenten Zellen stellt somit eine mögliche neue Option für eine Therapie des kolorektalen Karzinoms bzw. dessen Metastasen dar.

1.3. Angiogenese

Damit ein Tumor wächst, muss er eine Blutversorgung aufbauen um seine Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten und Stoffwechselmetaboliten zu entfernen. Den Prozess der Neubildung von Gefäßen aus bereits vorhandenen Gefäßen bezeichnet man als Angiogenese. Dies ist ein fundamentaler Prozess der während der Embryogenese stattfindet, physiologisch im Rahmen der Menstruation, aber auch bei pathologischen Prozessen wie Hypoxie,

Ischämie, Inflammation, Wundheilung und eben Tumorwachstum. Die maximale Größe die ein Tumor ohne Neovaskularisation erreichen kann beträgt lediglich 1 bis 2 mm (26,27). Diese neuen Blutgefäße bieten auch eine Möglichkeit für die Tumorzellen in den systemischen Blutkreislauf zu gelangen. So ist beim kolorektalen Karzinom eine verstärkte Angiogenese assoziiert mit einer schlechteren Prognose und erhöhter Rezidivneigung (28,29).

Die Angiogenese ist abhängig von positiven und negativen angiogenen Modulatoren. In normalem Gewebe wird der Grad der Gefäßneubildung durch die Dominanz endogener Angiogenese-Inhibitoren über angiogene Stimuli bestimmt. Tumoren bleiben in einem schlafenden, avaskulären Zustand, solange ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose besteht.

Physiologische Stimuli wie Hypoxie und die Wirkung von proangiogenen Faktoren, induzieren die Neubildung von Gefäßen. Die Induktion einer Tumolvaskularisierung aus einem avaskulären Tumor wird mit dem englischsprachigen Terminus des 'angiogenic switch' beschrieben (Abb.3) (30,31). Der 'angiogenic switch' geht einher mit Beginn des invasiven Wachstums eines kolorektalen Karzinoms, also zwischen Tis und T1 Stadium (32).

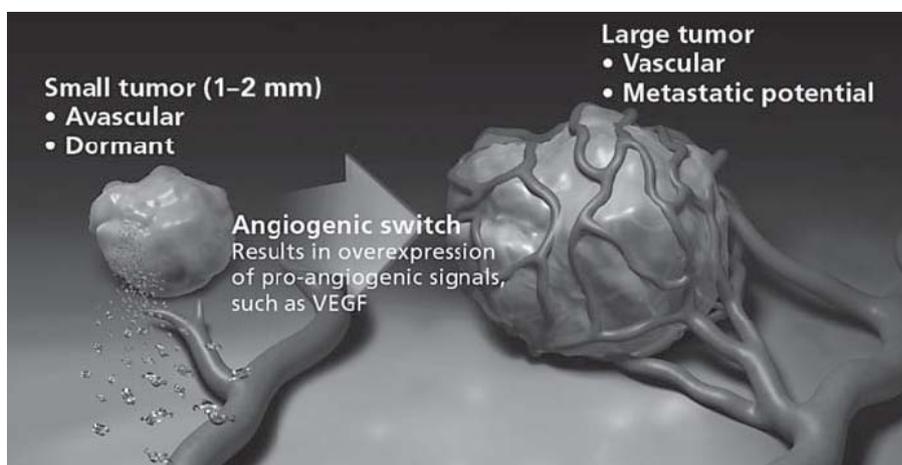


Abbildung 3: Schematische Darstellung des 'angiogenic switch'. Aus einer avaskulären, 'schlafenden' Mikrometastase entsteht durch das Überwiegen proangiogener Faktoren ein vaskularisierter, wachsender Tumor mit metastatischem Potential. (aus Carmeliet 'VEGF as Key Mediator of Angiogenesis in Cancer' Oncology 2005)

Dabei spielen zahlreiche Moleküle wie angiogene Wachstumsfaktoren, extrazelluläre Matrixproteine, Adhäsionsmoleküle und proteolytische Enzyme eine Rolle. Proangiogene Faktoren fördern die Proliferation und Differenzierung vaskulärer

Endothelzellen, die vaskuläre Permeabilität durch Verlust der Zell-Zell Adhäsion, Wanderung von Endothelzellen und Formung der Kapillaren(33,34). Eine Übersicht über proangiogene und antiangiogene Faktoren gibt Tabelle 1.

Proangiogene Faktoren	Antiangiogene Faktoren
Angiogenin	Angiostatin
Angiopoetin-1	Antiangiogenetisches Anti-Thrombin III
Fibroblast growth factor, azid (aFGF)	Cartilage-derived inhibitor
Fibroblast growth factor, basic (bFGF)	CD59 complement fragment
Follistatin	Endostatin (collagen XVIII fragment)
Granulocyten colony-stimulating factor (G-CSF)	Gro-beta
Hepatocyte growth factor (HGF)	Heparinasen
Interleukin-8 (IL-8)	Heparin hexasaccharid fragment
Leptin	Human chorionic gonadotropin (hCG)
Midkin	Interferon alpha, beta, gamma (IFN α,β,γ)
Placental growth factor (PiGF)	Interferon inducible protein
Platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF)	Interleukin 12 (IL-12)
Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB)	Kringle 5 (plasminogen fragment)
Pleiotropin	Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)
Proliferin	2-Methoxyestradiol
Transforming growth factor-alpha (TGF α)	Placental ribonuclease inhibitor
Transforming growth factor-beta (TGF β)	Plasminogen activator inhibitor
Tumor necrosis factor-alpha (TNF α)	Platelet factor 4 (PF4)
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Prolactin 16kD fragment
	Retinoide
	Tetrahydrocortisol
	Thrombospondin-1 (TSP-1)
	Transforming growth factor-beta (TGF β)
	Vasculostatin
	Vasostatin (calreticulin fragment)

Tabelle 1: pro- und antiangiogene Faktoren (nach Rosen, 'Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: Focus on Vascular endothelial growth factor (VEGF) Blockers' Cancer Control March/April 2002 pg. 36-44 Vol. 9. No.2 Supplement)

So wird eine Tumorangiogenese durch eine Steigerung der Sekretion angiogener Faktoren und eine verminderte Produktion von Angiogenese-Inhibitoren induziert.

Die Tumorzellen selbst stellen nicht die einzige Quelle für die Produktion angiogener Faktoren innerhalb eines Tumors dar. Inflammatorische Zellen, z.B. Mastzellen und

Makrophagen werden zu Beginn der Angiogenese durch den Tumor rekrutiert und aktiviert (35,36). Mastzellen sezernieren eine Reihe von bereits gebildeten und neu synthetisierten Zytokinen, die die Angiogenese induzieren und modulieren, wie VEGF, TNF- α , IL-8 oder FGF.

Darüberhinaus produzieren Mastzellen zahlreiche Proteasen wie z.B. Trypsinase und Chymase, die über die Degradierung von extrazellulärer Matrix und die Ausschüttung von Matrix-assoziiertem Wachstumsfaktor direkt in den Angiogeneseprozess involviert sind (37). Die Infiltration mit Mastzellen ist assoziiert mit einem gesteigerten Wachstum und verstärkter Invasion von Karzinomzellen (38).

VEGF ist der wichtigste Mediator für die Angiogenese in Tumoren (39). Eine Anzahl von Faktoren erhöht die VEGF-Gen Expression, wie zum Beispiel NO, PDGF, EGF, FGF, TNF α , TGF β , IL-1 β , IL-6 sowie Hypoxie (40). VEGF bindet an zwei Rezeptoren, VEGFR-1 und VEGFR-2, von denen vor allem VEGFR-2 für die Induktion der Angiogenese entscheidend ist (41, 42). Manche Tumoren exprimieren sowohl VEGF als auch die VEGF-Rezeptoren, so dass es hier zu einer autokrinen und parakrinen Stimulation mit einem positiven Feedback Mechanismus kommt (43). Der unmittelbare Effekt der Aktivierung von VEGFR-2 ist die Induktion der Phospholipase Cy, die zu einer erhöhten Synthese von Inositol 1,4,5-triphosphat führt. Die wiederum erhöht den Einstrom von Ca²⁺ in die Zellen und führt so zu einer Aktivitätserhöhung von NO-Synthase (NOS) mit erhöhter Freisetzung von NO (44). Die NOS vermittelt die angiogenen Effekte von VEGF. Eine Inhibition der NOS unterdrückte die VEGF-vermittelte Angiogenese (45).

Der angiogene Effekt von NO wird vermittelt durch die Aktivierung von Guanylylcyclase und eine Erhöhung von cGMP (46,47).

Endothelzellen stellen die Zielorte für die Wirkung von VEGF dar. Diese Zellen sind relativ stabil und mutieren weniger schnell zu behandlungsresistenten Zellen, als zum Beispiel die genetisch instabilen Tumorzellen. Für eine längerfristige Therapie ist dies von Bedeutung.

1.4. Hämoxygenase-1 (HO-1)

1.4.1. Struktur und Vorkommen der HO-1

Hämoxygenasen katalysieren den initialen Schritt des oxidativen Abbaus von Häm zu Biliverdin. HO-1 spaltet ein Molekül Häm, wobei zu gleichen Teilen Biliverdin, freies Eisen und Kohlenmonoxid entsteht (48) (Abb.4). Biliverdin wird dann mittels Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin reduziert, das freie Eisen wird durch Ferritin gebunden. Es wurden bisher 3 Isoformen der Hämoxygenase identifiziert. Hämoxygenase-1, ein 32kDa großes Hitzeschockprotein welches ubiquitär in allen Geweben vorkommt und induzierbar ist. Eine hohe Konzentration von HO-1 findet sich vor allem in Leber und Milz. Hämoxygenase-2, welche in Gehirn und Hoden exprimiert wird und von dem angenommen wird, dass es nicht induzierbar ist (49) und das bisher nicht näher charakterisierte Hämoxygenase-3 (50).

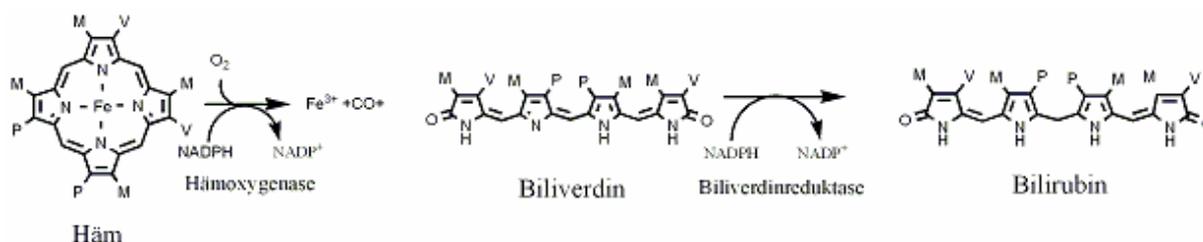


Abbildung 4: Abbau von Häm mittels Hämoxygenase in Biliverdin; Fe³⁺ und CO. Biliverdin wird mittels Biliverdinreduktase in Bilirubin umgewandelt. (modifiziert nach Sikorski et al.)

Die HO-1 Aktivität ist in-vitro nach Behandlung mit Häm, Metallen, inflammatorischen Zytokinen, NO, Wachstumsfaktoren, sowie unter hypoxischen und oxidativen Bedingungen erhöht (51,52,53).

Unter experimentellen Bedingungen wird die Induktion häufig mit Porphyrinen wie CoPP und eine Inhibition mit ZnPP oder SnPP durchgeführt (54).

Die Induktion von HO-1 vermittelt zellulären Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress, wie er nach verschiedenen Arten von akuten Zellschäden auftreten kann (55,56).

Die vermutete Mechanismus ist, das eine erhöhte Hämoxygenase - Aktivität das anfallende prooxidative Häm zu dem antioxidativen Biliverdin bzw. über

Biliverdinreduktase weiter zu Bilirubin metabolisiert (57,58). Auch durch das entstehende CO sollen antiinflammatorische, antiapoptotische und antioxidative Effekte vermittelt werden (59).

1.4.2. HO-1 und Angiogenese

Eine Korrelation zwischen HO-1 (Abb. 5) und der Induktion der Angiogenese ist von mehreren Autoren beschrieben worden. Eine Überexpression unterstützt die Proliferation von Endothelzellen, und somit die Angiogenese (60,61). Weiterhin besteht eine Korrelation zwischen der Anzahl infiltrierender Makrophagen, einer erhöhten Gefäßdichten und der Expression von HO-1 (61,62).

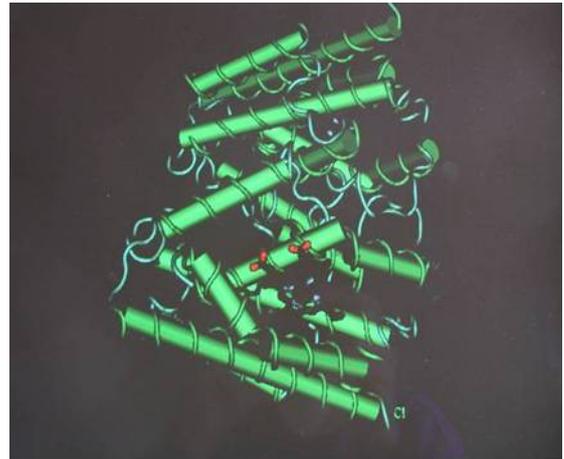


Abbildung 5: Graphische Darstellung des Enzyms Hämoxigenase-1

Stimuli, wie Häm, Zytokine, NO,

Wachstumsfaktoren und Prostaglandin J2,

welche die HO-1 Expression induzieren, führen auch zu einer verstärkten Synthese von VEGF (63).

CoPP induziert die HO-1 Expression und erhöhte die VEGF Synthese durch die Aktivierung eines Promotors. Hingegen führte eine Inhibition der HO-1 mit Zinnprotoporphyrin (SnPP) zu einer Minderung der VEGF Synthese (64). Auch eine durch Hypoxie induzierte erhöhte VEGF Expression kann mit SnPP unterdrückt werden. Interessanterweise führt eine Inhibition der NOS nicht zu einer verminderten VEGF Synthese unter Hypoxie. Hier scheint ein anderer Mechanismus als die Vermittlung durch NO von Bedeutung zu sein. Hier spielt Prostaglandin J2 eine Rolle, welches ein starker Induktor der VEGF Synthese ist und dessen Wirkung auf die VEGF Synthese unter Inhibition der HO-1 mit SnPP unterdrückt wird (65).

Auch der Gentransfer des HO-1 Gens mit Hilfe eines Adenovirus, führte zu einer deutlichen Erhöhung der VEGF Synthese (66).

1.4.3. HO-1 und Tumorbilogie

Es wurde gezeigt, dass in humanen Adenokarzinomen die HO-1 mRNA Expression erhöht ist und dass die Überexpression das Tumorstadium fördert (67). So ist zum Beispiel in Pankreaskarzinomen die Aktivität der HO-1 deutlich erhöht und eine Inhibition senkt das Tumorstadium (68). Experimentell konnte durch eine Reduzierung der HO-1 Aktivität die Tumorstadium von Ratten-Hepatomen nachgewiesen werden (69).

Eine chemotherapeutische Behandlung führt zu einer Steigerung der Expression von HO-1, durch das Entstehen oxidativer Substanzen. Eine gezielte Inhibition von HO-1 führt auch zu einem besseren Ansprechen auf eine Chemotherapie (70, 71).

Eine Überexpression der HO-1 verhindert zudem eine TNF α vermittelte Apoptose (72). Beim Wachstum solider Tumoren entsteht durch oxidativen Stress NO, was einen apoptotischen Stimulus darstellt. Die durch den oxidativen Stress entstehende Überexpression von HO-1 hat einen antiapoptotischen Effekt (69).

Im zellulären Milieu kolorektaler Karzinome liegt eine erhöhte Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies vor und auch eine verstärkte Aktivität antioxidativer Systeme (73).

Eine Inhibition der antioxidativen HO-1 würde demzufolge zu einem Anstieg der oxidativen Substanzen im Tumorgewebe und somit zur Induktion der Apoptose führen.

1.5. Antiangiogene Therapie

Im Jahr 1971 stellte Folkman ein neues Konzept zur Behandlung maligner Tumoren vor (74). Anstatt mit hochtoxischen Substanzen die Tumorzellen selbst anzugreifen, schlug er vor, die den Tumor versorgenden Gefäße zu bekämpfen und so den Tumor von seiner Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen abzuschneiden.

Theoretische Vorteile einer solchen Therapie sind: 1. Die Tumorgefäße sind unreifer als normale Gefäße und daher einer inhibitorischen, selektiven Therapie möglicherweise eher zugänglich. 2. Tumorzellen entwickeln relativ schnell Resistenzen, die Gefäße hingegen unterliegen immer noch den normalen zellulären

Kontrollmechanismen und reagieren noch auf normale Zellsignale wie Proliferationsstimuli und Apoptosesignale.

Man kann antiangiogene Strategien in vier Gruppen einteilen (nach Stoeltzing, 75):

1. Strategien, die direkt die Aktivität spezifischer angiogener Faktoren inhibieren, z.B. spezifische Antikörper gegen VEGF oder VEGF-Rezeptoren,
2. Strategien, die die Aktivität natürlich vorkommender antiangiogener Faktoren erhöhen,
3. Strategien, die überlebensnotwendige Faktoren für Endothelzellen zum Ziel haben, z.B. Antikörper gegen endotheliale Integrine,
4. Strategien, die indirekt die Aktivität von angiogenen und überlebensnotwendigen Faktoren herunterregeln.

VEGF wurde als Schlüsselmediator der Angiogenese in malignen Tumoren identifiziert (39). Tumorgefäße die unter Wirkung von VEGF entstehen sind unreif, stark gewunden, fenestriert und enden blind (76, 77, 78). Dies führt auch zu einem erhöhten interstiellen Druck führt, welcher es für Chemotherapeutika schwieriger macht in das Tumorgewebe zu penetrieren (79, 80). Eine Hemmung von VEGF könnte zu einer Remodellierung der Tumorgefäße führen mit verminderter Tumorperfusion, Mikrogefäßdichte, Gefäßvolumen und erniedrigtem interstitiellen Druck (81).

Die essentielle Rolle von VEGF in der Tumorangiogenese und seine geringe Beteiligung an physiologischen Prozessen machen es zu einem geeigneten Ziel für eine antiangiogene Therapie.

Verschiedene Ansätze zur Inhibition der VEGF vermittelten Angiogenese wurden bisher untersucht, vor allem Substanzen die VEGF direkt oder die VEGF-Rezeptoren angreifen. Ein Nachteil der rezeptorangreifenden Strategien liegt möglicherweise darin, dass die VEGF-Rezeptoren auch andere Substanzen der VEGF-Familie binden und andere Effekte als die Angiogenese vermitteln. Einer der Vorteile einer gegen VEGF gerichteten Therapie, nämlich die geringe physiologische Rolle des Moleküls, könnte dadurch eingeschränkt sein.

Einer der am besten untersuchten Ansätze zur Therapie mit Substanzen die die Wirkung von VEGF inhibieren, erfolgte mit dem humanen monoklonalen Antikörper Bevacizumab (Avastin), welches die zur Zeit einzige zur antiangiogene Therapie

zugelassene Substanz darstellt. In einer kontrollierten randomisierten Phase III-Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom die zusätzlich mit Bevacizumab behandelt wurden im Vergleich zu einer Standardchemotherapie, ein um 30% höhere mittlere Überlebensrate aufwiesen und einem um 71% längerem progressionsfreien Intervall (82).

1.6. Fragestellung

Unter Betracht der beschriebenen Gegebenheiten stellte sich die Frage, ob eine Inhibition der HO-1 durch bekannte Inhibitoren, z.B. ZnPP, zu einer Reduktion der Tumervaskularisation führt und einen Einfluss auf die Expression von ICAM-1 hat. Entsprechend dem Schema von Stoeltzing handelt es sich um eine Strategie die sich indirekt gegen die Aktivität von angiogenen (VEGF) und überlebensnotwendigen Faktoren richtet.

Es lassen sich folgende Fragen formulieren:

1. Erhöht eine Inhibition der HO-1 mit ZnPP die Expression von ICAM-1 und VEGF auf Tumorzellen einer kolorektalen Karzinomzelllinie ?
2. Reduziert eine perioperative Behandlung mit ZnPP die Ausbildung von hepatischen Metastasen kolorektaler Karzinome ?
3. Hat die perioperative Behandlung mit ZnPP einen Einfluß auf die Angiogenese von Metastasen kolorektaler Karzinome ?

Da nach heutigem Erkenntnisstand die antiangiogene Therapie nicht zu einer Abnahme der Tumormasse führt, sondern das Tumorstadium verlangsamt und die Ausbildung von Metastasen inhibiert, ist sie vor allem als adjuvante Therapieform von Interesse. Daher wählten wir ein Modell, dass die perioperative Situation nach Resektion primärer kolorektaler Karzinome simuliert, wobei der Primärtumor entfernt, aber, auch bedingt durch die Operation, im Blut Tumorzellen zirkulieren.

2. Material und Methoden

2.1. Allgemeines

Das zur Herstellung von Puffern und Lösungen verwendete Wasser war deionisiert und wurde über eine Millipore - Anlage filtriert.

2.2. Geräte, Chemikalien

2.2.1. Geräte

Brutschrank Cytoperm	Heraeus Instruments, Hanau, D
Cryotom Kryostat HM 500 OM	Microm, Walldorf, D.
Digitalkamera Camedia C-3030	Olympus Europe, Hamburg, D
FACS FACSCalibur	Becton Dickinson, UK
Feinwaage AC 121 S	Sartorius, Göttingen, D
Kühlschrank	Liebherr, D
Laminal-Flow LaminAir HB2472	Heraeus Instruments, Hanau, D
Mikroskop Olympus BX 41	Olympus Europe, Hamburg, D.
pH-Meter CG 840	Schott, D
Photometer Fluostar Galaxy	BMG Labtech, Offenburg, D
Tiefkühlschrank -20°C	Liebherr, D
Tiefkühlschrank -80°C	Heraeus Sepatech, Osterode, D
Tischvortexer VortexGenie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech, Osterode, D

2.2.2. Labormaterialien

30 Gauge Nadel	Microlance BD Biosciences, D
Bechergläser	Schott, D
BlueCap-Röhrchen	BD Falcon, Erembodegem, B
Dako – Pen	DakoCytomation, Glostrup, DK
Dauerverweilkanüle	BD, Helsingborg, S

Deckgläschen	Marienfeld, D
Einwegspritze (1ml)	BD, Madrid, E
FACS-Röhrchen	BD Falcon, Erembodegem, B
Glaspipetten	BD Falcon, Le Pont de Claix, F
Kaisers Glyceringelantine	Merck, Darmstadt, D
Kunststoff - Einmalpipetten	Sarstedt AG, Nürnberg, D
Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One, D
Neubauer-Zählkammer	Brand, D
Objektträger	R.Langenbrinck, Emmendingen, D
Pipettboy	Integra Biosciences, Fernwald, D
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen	Sarstedt AG, Nürnberg, D
sterile Flaschen	Biochrom KG, Berlin, D
Zellkulturflaschen	BD Falcon, Erembodegem, B

2.2.3. Chirurgische Instrumente

Chirurgische Pinzette BD 537	Aesculap, Tuttlingen, D
Feine Pinzette MIB 0201	Martin, D
Kleine Schere BC106	Aesculap, Tuttlingen, D
Nadelhalter 8709	Codman, D
Narkosegerät Sulla 808	Dräger, Lübeck, D
Operationsmikroskop	Wild Heerburg, CH
Präparierschere BC 263	Aesculap, Tuttlingen, D
Vicryl 4-0 SH-plus chirurgisches Nahtmaterial	Johnson&Johnson, B

2.2.4. Chemikalien

0,25% Trypsin/0,05% EDTA-Lösung	Biochrom AG, D
Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
AEC-Pulver	Pierce, Rockford, USA
Avidin/Biotin Blockierungsset	Dako, Glostrup, DK
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
CoPP	Sigma Chemical, St. Louis, USA

DMF	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin, D
Fötale Kälber Serum	Invitrogen, D
H ₂ O ₂ Lösung (30%ig)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
H ₂ SO ₄ (2 N)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
HAM's F10 500ml	Biochrom AG, Berlin, D
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Isofluran	Abbott, Wiesbaden, D
Killik Einbettmedium	Bio-Optica, Mailand, I
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, D
Na ₂ HPO ₄ (0,2M)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
NaN ₃	Merck, Darmstadt, D
NaOH (0,2%)	Merck, Darmstadt, D
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, D
Natriumpyruvat	Biochrom AG, Berlin, D
PBS	Invitrogen, D
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, D
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Streptavidin/HRP	DakoCytomation, Glostrup, DK
Sucrose	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
TMB	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tween [®] 20	Merck, Darmstadt, D
Zitronensäure (0,1M)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
ZnPP	Frontier Science, USA

2.2.5. Antikörper

FACS

Maus anti-ratte ICAM-1 FITC-gelabelter AK Serotec, Kidlington, UK
(Klon:1A29)

ELISA

Maus anti - Ratte VEGF Detection - AK R&D Systems, Minneapolis, USA
Ziege anti - Ratte VEGF Capture - AK R&D Systems, Minneapolis, USA

Immunhistochemie

Primärantikörper

Maus anti-Ratte CD-31 mAK Serotec, Kidlington, UK
(Klon:TLD 3A12)

Kaninchen anti-human VEGF pAK Oncogene, Cambridge, USA

Sekundärantikörper

Ziege anti-Maus biotinylierter pAK BD Biosciences, UK
Ziege anti-Kaninchen biotinylierter pAK DakoCytomation, DK

2.2.6. Versuchstiere

BD-IX-Ratten (männlich) Harlan & Winkelmann, UK
Pelletierte Rattenspezialdiät Ssniff, Soest, D

2.2.7. Zelllinie

DHD/K12/TRb CAMR, ECACC, Salisbury, UK

2.3. Puffer und Lösungen

2.3.1. Zellkulturmedium

Zur Anzucht der Tumorzellen der Tumorzelllinie DHD/K12/TRb wurde ein Zellkulturmedium verwendet, welches sich wie folgt zusammensetzt (Angaben für 1130 ml Zellkulturmedium):

DMEM 500 ml, HAM's F10 500 ml, Natriumpyruvat 10 ml, L-Glutamin 200 mM 10 ml, fötales Kälberserum 100 ml, Penicillin/Streptomycin 10000 U / 10000 µg 10ml.

Das Zellkulturmedium wurde unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Flow hergestellt.

2.3.2. Puffer für FACS

Der für die mittels FACS durchgeführten Analysen hergestellte Puffer (FACS-Puffer) enthielt 1% BSA und 0,1% NaN_3 gelöst in PBS 1%.

2.3.3. Puffer für ELISA

Es wurde ein kommerziell erhältliches ELISA-Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) verwendet.

Für die Durchführung des ELISA wurden verschiedene Puffer verwendet:

Blockpuffer: 1% BSA, 5% Sucrose und 0,05% NaN_3 gelöst in PBS 1%.

Waschpuffer: 0,05% Tween[®] 20 aufgelöst in PBS 1%.

Verdünnungslösung: 1% BSA aufgelöst in PBS 1% und steril gefiltert.

Substratpuffer: 25,7 ml, 0,2 M Na_2HPO_4 , 24,3 ml 0,1 M Zitronensäure und 50 ml Aqua dest., der pH wurde auf 5,0 eingestellt.

Substratlösung: eine Tablette TMB 1mg gelöst in 10ml Substratpuffer. Direkt vor Gebrauch wurden 2 µl einer 30%igen H_2O_2 Lösung hinzugegeben.

2.3.4. Herstellung der ZnPP bzw. CoPP Lösung zur ‚in-vitro‘- Stimulation

Für die ‚in-vitro‘ Stimulation wurden die erforderlichen Mengen an ZnPP bzw. CoPP so gewählt, dass durch hinzugeben von 100 µl Lösung in 10 ml Zellkulturmedium eine Zielkonzentration von 25 µM erreicht wurde.

7,83 mg ZnPP wurden mittels Feinwaage ausgewogen und 425 µl einer 0,2%igen NaOH Lösung hinzugefügt. Die Lösung wurde mittels Vortexer geschüttelt und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Es wurden 4500 µl 1% PBS-Lösung zugegeben und der pH-Wert auf einen Wert zwischen 7-8 mittels 1% HCl eingestellt. Das resultierende Volumen der Gesamtlösung betrug 5 ml.

Die CoPP-Lösung wurde analog hergestellt, allerdings wurden hier 8,19 mg CoPP eingesetzt, um eine adäquate Konzentration zu erhalten.

2.3.5. Herstellung der ZnPP bzw. CoPP Lösung zur intraperitonealen Injektion

Die Herstellung der Lösungen erfolgte analog zu 2.3.4. Die eingesetzten Mengen von ZnPP bzw. CoPP wurden so gewählt, dass eine Zieldosis von ZnPP 50 mg/kg Körpergewicht bzw. CoPP 10 mg/kg Körpergewicht erreicht wurde.

2.3.6. Herstellung des AEC-Substrates für die Immunhistochemie

Das verwendete Chromogen für die Immunhistochemie ist AEC, ein Elektronendonator der sich durch Oxidation in ein rotes Reaktionsprodukt verwandelt.

Die Chromogenlösung bestand aus zwei Komponenten, dem AEC-Substrat und dem AEC-Puffer. Das AEC-Substrat wurde unter einer Abzugshaube in einem durch Aluminiumfolie lichtgeschützten Reagenzglas hergestellt. Es wurden 100mg AEC Pulver in DMF aufgelöst und anschließend bei +6°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Der AEC-Puffer entspricht 0,1M Natriumacetatlösung, die auf einen pH=5,0 eingestellt und ebenfalls bei +6°C aufbewahrt wurde.

2.4. Zelllinie DHD/K12/TRb

Für die ‚in-vitro‘ Untersuchungen und zur Induktion von Lebermetastasen in männlichen BD-IX Ratten, wurden Zellen der syngenischen Tumorzelllinie DHD/K12/TRb verwendet. Die Zelllinie ist eine etablierte übertragbare Rattentumorzelllinie, die aus einem 1,2 Dimethylhydralazin-induzierten Kolonadenokarzinom von BD-IX Ratten gewonnen wurde. Da Ratte und Zelllinie den gleichen MHC-Typ aufweisen, kommt es nicht zur Abstoßung der malignen Zellen. Diese Kombination wurde in der Vergangenheit bereits häufig zu Untersuchungen von Metastasen kolorektaler Karzinome verwendet. (83,84)

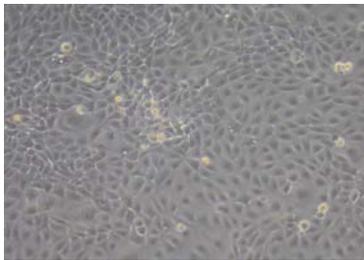


Abbildung 6:
Zellen der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie DHD/K12/TRb in Zellkultur.

Die Tumorzellen wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre angezüchtet und bei 80-100% Konfluenz der Zellen passagiert.

Zur Passage wurde das verbrauchte Zellkulturmedium entfernt und die Zellen anschließend mit 1%iger PBS-Lösung zweimal gewaschen. Zur Ablösung wurde eine 0,25% Trypsin / 0,05% EDTA-Lösung zugesetzt und die Zellen für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Ablösung wurde mikroskopisch kontrolliert und durch hinzugeben von Zellkulturmedium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen abhängig von der Menge im Verhältnis 1:2 – 1:4 passagiert.

2.4.1. Präparation der Zellen für ‚in-vitro‘ Untersuchungen

Für die ‚in-vitro‘ Untersuchungen wurden die Zellen analog 2.2. angezüchtet. Nach Ablösung der Zellen aus den Zellkulturflaschen wurden sie in 50 ml BlueCap-Röhrchen überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation der Zellsuspension bei 900 rpm für 5 Minuten, dann wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit 1% PBS-

Lösung resuspendiert. Folgend wurden 50 µl der Zellsuspension zu 950 µl Trypanblau gegeben und mittels Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt und anhand dieser die Menge Volumen berechnet, in der 3×10^6 Tumorzellen enthalten sind.

Zur Bestimmung der Expression der Adhäsionsmoleküle wurden je 3×10^6 Tumorzellen in 25ml-Zellkulturflaschen mit 10 ml Medium beimpft. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen entweder mit CoPP in Konzentrationen von 2,5 µM, 12,5 µM und 25 µM (1,638 mg/ml) zur Induktion der HO-1 bzw. mit ZnPP in Konzentrationen von 0,5 µM, 1 µM, 2,5 µM, 12,5 µM oder 25 µM (1,566 mg/ml) zur Inhibition der HO-1 beimpft.

2.4.2. Analyse der Expression von ICAM-1 mittels FACS

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz und Streulichteigenschaften. Zellen können einzeln über die Lichtstreuung im Dunkelfeld nach ihrer Größe und Granularität beurteilt werden. Durch die Verwendung von mit Fluorochromen gekoppelten Antikörpern können zelluläre Oberflächenmoleküle analysiert werden. Das verwendete Gerät enthielt einen Argon-Ion Laser mit einer Wellenlänge von 488nm. Bei Durchfluss der Zellen durch den Laser wird Licht gestreut. Mittels Dioden wird das Streulicht in Verlängerung des Laserstrahls (Forwardscatter) gemessen, wodurch die Zellgröße bestimmt wird. Das an Strukturen innerhalb der Zelle in einem 90° Winkel gestreute Licht wird als Seitwärtsstreulicht bezeichnet (Sidewardscatter) und ist ein Maß für die Granularität der Zelle.

Durch bestimmte fluoreszierende Farbstoffe, die meist an Antikörper gebunden sind und Licht einer definierten Wellenlänge emittieren, können weitere Eigenschaften der Zellen bestimmt werden.

Nach 6h, 12h oder 24h Inkubationszeitraum wurden FACS-Messungen zur Analyse der Expression des Oberflächenproteins ICAM-1 durchgeführt.

Aus jeder Zellkulturflasche wurden 2ml des Überstands abpipettiert und zu späteren Analysen bei -20°C eingefroren. Der restliche Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 1% PBS zweimal gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml 0,25% Trypsin / EDTA für 5 Minuten bei 37°C inkubiert und abgelöst.

Die Ablösung der Zellen wurde mit 5 ml Zellkulturmedium gestoppt und die Zellen in 15 ml BlueCap Röhrchen überführt. Folgend wurden die Zellen mit 900 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, anschließend der Überstand verworfen und die Zellen mit 1%PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt, 1×10^6 Zellen in FACS-Röhrchen überführt und 2 ml FACS-Puffer hinzugefügt. Im Anschluss wurden die Zellen nochmals bei 900 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellsuspension kurz mittels Vortexer geschüttelt.

Anschließend wurden 10 µl FITC-gelabelter anti-ICAM-1 Antikörper hinzugefügt und 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 2ml FACS-Puffer gewaschen, 5 Minuten bei 900rpm zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die ICAM - positiven Zellen im FACS-Gerät gemessen.

2.4.3. Analyse der Expression von VEGF mittels ELISA

VEGF ist ein sezerniertes Protein, es empfiehlt sich daher die Konzentrationsbestimmung im Zellkulturüberstand mittels ELISA.

Die ELISA Untersuchung basiert auf der spezifischen Affinität von monoklonalen Antikörpern zu einem Antigen. Der ELISA wurde unabhängig voneinander von Engvall und Perlmann (85), sowie von van Weeman und Schuurs (86) konzipiert und entwickelt.

Merkmale eines ELISA sind die Verwendung einer festen Phase als Reaktionsort und die durch Waschschrte getrennten, sukzessiv ablaufenden Reaktionen (Abb.7). Die feste Phase ist meist eine Polystyren-Mikrotiterplatte. An die feste Phase ist der bekannte Reaktionspartner (Antikörper oder Antigen) gebunden. Die zu untersuchende Probe wird hierauf inkubiert. Befindet sich die zu untersuchende Substanz in der Probe, so bindet sie an den Reaktionspartner (Antikörper oder Antigen) auf der Platte und ist so ebenfalls auf der festen Phase fixiert. Die Reaktion wird durch Inkubation mit einem enzymgebundenen, für die zu untersuchende Substanz spezifischen Detektionsantikörper nachgewiesen. Das Nachweisenzym katalysiert die mit einem Farbumschlag verbundene Reaktion eines farblosen Substrates, welches bei einer bestimmten Wellenlänge im Photometer gemessen werden kann. Auch ein Nachweis mittels einer Fluoreszenzreaktion ist möglich. Als

Enzym dient hierbei häufig Meerrettich-Peroxidase. Andere mögliche Enzyme sind alkalische Phosphatase oder beta-D-Galaktosidase (87).

Durch das Mitführen eines definierten Standards, ist das Erstellen einer Standardkurve möglich und somit eine quantitative Aussage über die Konzentration der untersuchten Substanz in der Probe.

Der Überstand aus der Zellkultur für die ICAM-1 Analyse (siehe 2.4.2.) wurde im Wasserbad aufgetaut und danach 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert um darin befindliche tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

Die Durchführung des ELISA's folgte den Empfehlungen des Herstellers.

Eine 96well Mikrotiterplatte wurde mit 100 µl/well einer Maus anti-Ratte VEGF Antikörperlösung (Capture - Antikörper) in einer Konzentration von 1µg/ml, verdünnt in PBS 1%, bestückt. Die Platten wurden über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Nach Inkubation wurden die Platten dreimal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 300 µl Blockpuffer/well für 60 Minuten inkubiert und danach wiederum dreimal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen. Alle folgenden Inkubationen wurden bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz durchgeführt. Es wurden 100 µl/well des unverdünnten Überstandes der Zellkultur inkubiert. Zur Erstellung einer 7-Punkt Standardkurve wurde rekombinante VEGF-Standardlösung, verdünnt in Verdünnungslösung, in Konzentrationen von 0 pg/ml, 15,625 pg/ml, 31,25 pg/ml, 62,5 pg/ml, 125 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml und 1000 pg/ml in Doppelbestimmung mitgeführt. Die Inkubationsdauer der Proben und des Standards betrug 2 Stunden. Anschließend wurde jedes well dreimal mit 300µl Waschpuffer gewaschen und es folgte die Inkubation mit 100 µl/well Ziege anti-Ratte Antikörper (Detection - Antikörper) in einer Konzentration von 100 ng/ml, verdünnt in Verdünnungslösung, für 2 Stunden.

Nach drei weiteren Waschschritten mit je 300 µl/well Waschpuffer wurden die Proben mit 100 µl/well Streptavidin/HRP, verdünnt 1:200 in Verdünnungslösung inkubiert. Nach 20 Minuten Inkubation wurde dreimal mit 300 µl/well Waschpuffer gewaschen und die Proben mit 100 µl Substratlösung für 20 Minuten inkubiert. Die Farbentwicklung wurde mit 50 µl/well einer 2 N H₂SO₄ Lösung gestoppt. Die Absorption von jedem well wurde mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 450nm bestimmt und mittels angeschlossener Software ausgewertet.

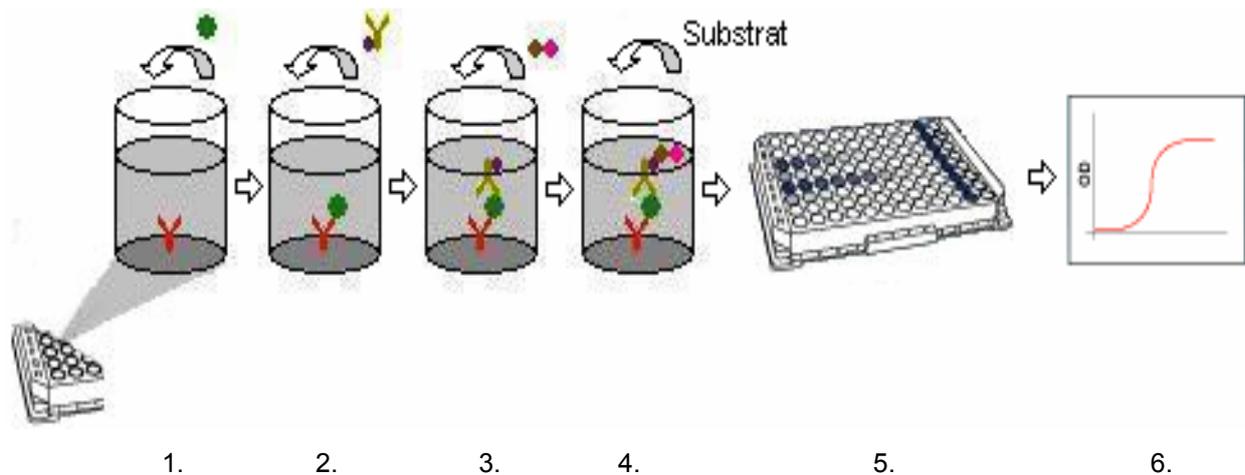


Abbildung 7

Schematische Darstellung der Funktionsweise des hier verwendeten Sandwich ELISA's

1. Eine mit einem Primärantikörper bestückte Mikrotiterplatte wird mit einer Lösung, die das zu untersuchende Antigen enthält, inkubiert.
2. Ein gegen ein anderes Epitop desselben Antigens gerichteter zweiter, biotinylierter Antikörper bindet an das Antigen.
3. Hinzugeben des Streptavidin/HRP Komplexes.
4. Hinzugeben eines chromogenen Substrates.
5. Inkubation
6. Auswertung mittels Absorptionsphotometrie

2.5. Versuchsaufbau

Zur Induktion von Lebermetastasen in Rattenlebern nutzten wir ein etabliertes Tierversuchsmodell bei dem durch Injektion von Tumorzellen der Zelllinie DHD/K12/TRb in die V. portae von männlichen BD-IX Ratten Lebermetastasen erzeugt wurden (84).

24 Stunden vor Injektion der Tumorzellen erhielten die Tiere eine einmalige intraperitoneale Gabe von ZnPP oder CoPP in entsprechender Dosierung (siehe 2.3.5.). Als Kontrolle wurde einer Versuchsgruppe PBS intraperitoneal injiziert. Am folgenden Tag erfolgte die Injektion der Tumorzellen. (siehe 2.8.2.)

Somit resultierten 3 Versuchsgruppen mit jeweils n=10 Tieren.

Am Ende des Beobachtungszeitraumes von 5 Wochen wurden die Tiere unter Narkose getötet (siehe 2.8.3)

Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zeigt Abbildung 8.

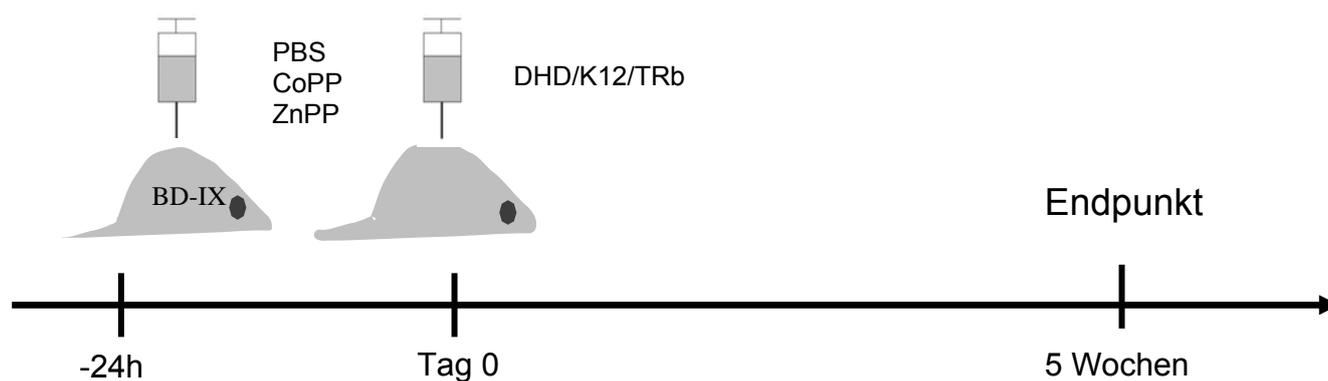


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

2.6. Versuchstiere

Die Versuchstiere waren männliche BD-IX Ratten und wurden gemäß der deutschen Tierschutzbestimmung in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité Berlin Campus Virchow Klinikum gehalten. Wasser und Rattenspezialdiät in pelletierter Form waren ad libitum verfügbar.

Die Unterbringung erfolgte unter Standardbedingungen und natürlichem Tag/Nachtrhythmus bei einer Raumtemperatur von $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Es wurden 5 Tiere pro Standardkäfig gehalten. Zur Identifikation wurden die Tiere mit Ohrmarkierung versehen und die Käfige beschriftet.

2.7. Präparation der Tumorzellen zur intraportalen Injektion

Die Anzucht der Tumorzellen erfolgte in 175 cm^2 Zellkulturflaschen. Das Zellkulturmedium wurde entfernt und die Zellen anschließend zweimal mit 10 ml PBS 1% gewaschen. Die Ablösung erfolgte mit 5 ml 0,25% Trypsin/0,05% EDTA-Lösung und wurde mikroskopisch kontrolliert. Nach vollständiger Ablösung aller Zellen wurde Trypsin mittels 10 ml Zellkulturmedium inaktiviert und so die Ablösung gestoppt. Die Zellen wurden anschließend in 50 ml BlueCap Röhrchen überführt und mit einer Einmalpipette durchmischt. 50 μl der Zellsuspension wurden in 950 μl Trypanblaulösung pipettiert und gut durchmischt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl durch Auszählung der nicht trypanblaugefärbten Zellen in der Neubauer-Zählkammer. Die Konzentration der Zellsuspension wurde auf 3×10^6 Zellen/0,5 ml eingestellt..

Die Tumorzellsuspension wurde bis zur Injektion im Kühlschrank bei +6°C aufbewahrt, um die Stoffwechselaktivität zu senken.

2.8. Operationstechnik

2.8.1. Narkose

Zur Narkose der Versuchstiere wurde das Inhalationsnarkotikum Isofluran verwendet, das in einem Gasgemisch aus 20% Sauerstoff und 80% Lachgas verdampft und der Ratte kontinuierlich über eine Mund/Nasenmaske zugeführt wurde.

Abströmendes Gas wurde anhand einer Unterdruckabsaugvorrichtung aus dem Operationssaal geleitet.

Als Narkoseeinleitungsbox diente ein luftdicht verschließbarer Glaszylinder mit Narkosegaszuleitung und Abzug, indem eine ausreichend hohe Gaskonzentration erreicht werden kann, um die Ratten vor Anlegen der Mund/Nasenmaske sorgfältig am Abdomen zu rasieren und in Rückenlage auf einem Korkbrett zu fixieren.

Die Konzentration des Isoflurans wurde auf 2 Vol.% eingestellt.

2.8.2. Vorbehandlung der Versuchstiere mit CoPP bzw. ZnPP

Die Versuchstiere wurden wie oben beschrieben narkotisiert. Anschließend wurden, je nach Versuchsgruppe, 0,5 ml CoPP (2 mg/kg KG), ZnPP (10 mg/kg KG) oder PBS 1% intraperitoneal injiziert. Anschließend wurden die Tiere mittels Ohrmarkierung nummeriert.

2.8.3. Intraportale Injektion der Tumorzellen

Die Injektion der Tumorzellen wurde 24h nach Vorbehandlung durchgeführt. Die Versuchstiere wurden unter Isoflurannarkose (analog 2.8.1.) median laparotomiert. Direkt vor Injektion wurde die Tumorzellsuspension aus dem Kühlschrank genommen und auf einem Vortexer durchmischt. Die Pfortader wurde dargestellt und die intraportale Injektion mittels einer 1 ml Spritze mit einer 30 Gauge Nadel langsam und unter mikroskopischer Kontrolle durchgeführt. Das

Injektionsvolumen betrug 0,5 ml. Postinjektionelle Blutungen werden durch vorsichtige Kompression mit einem Wattetupfer unterbunden. Anschließend wurde die Bauchdecke und Bauchhaut in fortlaufender Naht mit 4-0 Vicryl chirurgischem Nahtmaterial verschlossen.

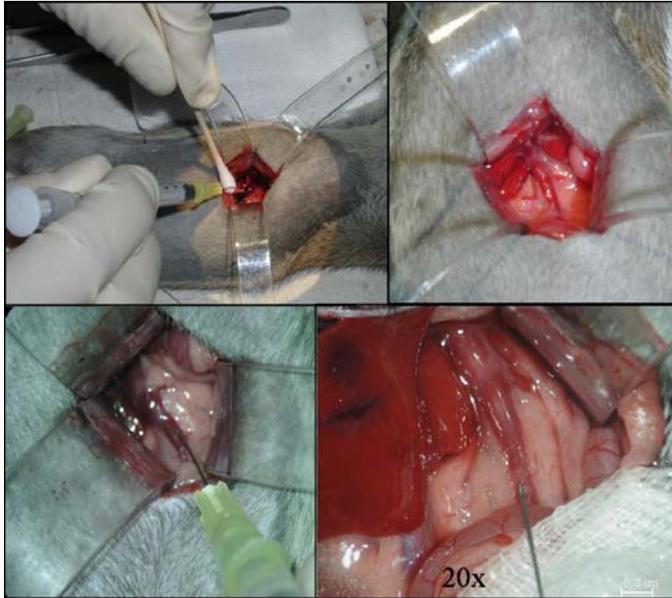


Abbildung 9: Verschiedene Schritte der Injektion der Tumorzellen: links oben freilegen der Pfortader, rechts oben und links unten Darstellung der Pfortader, rechts unten Darstellung der Pfortader unter mikroskopischer Sicht

2.8.4. Organentnahme und Tötung der Versuchstiere

Nach 5 Wochen wurden die Tiere unter Narkose getötet (Narkose analog zu 2.8.1.). Es wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt und die Peritonealhöhle nach Metastasen inspiziert.

Die V. cava und Aorta abdominalis wurden stumpf freipräpariert und mittels Punktion der Aorta an der Bifurkation mit einer Dauerverweilkanüle wurde Blut für verschiedenen Untersuchungen abgenommen. Die Leber wurde an der V. cava inf. und der V. portae abgesetzt, die Ligamenta der Leber scharf durchtrennt und entnommen. Die Leber wurde lamelliert und makroskopisch sichtbare Metastasen ausgemessen und gewogen.

Proben der Leber und des Tumors wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und später bei -80°C gelagert.

Anschließend erfolgte die Eröffnung des Thorax von abdominal zur Inspektion von Herz und Lunge auf systemische Metastasen.

2.9. Immunhistochemie mittels Streptavidin-Biotin-HRP Methode

Ziel immunhistochemischer Techniken sind Nachweis und Identifikation antigener Komponenten in Zellen oder Gewebsschnitten durch spezifische Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Isotopen oder Enzymen markiert sind. Die hier verwendete Methode ist eine indirekte immunhistochemische Untersuchung, da zur Visualisierung ein Sekundärantikörper verwendet wurde. Die verwendete ABC-Methode wurde erstmals von Hsu et al. (88) beschrieben. Der Vorteil dieser Methode liegt in ihrer großen Sensitivität durch den Verstärkereffekt des großen ABC-Komplexes. Die zu untersuchenden Gewebsschnitte werden mit spezifischen Antikörpern inkubiert und der entstehende Antigen-Antikörper Komplex kann durch einen weiteren Antikörper (=Sekundärantikörper), der häufig, je nach Methode, modifiziert ist, visualisiert werden. Bei der Streptavidin-Biotin-HRP Methode ist der Sekundärantikörper biotinyliert. So kann unter Ausnutzung der spezifischen Affinität von Streptavidin zu Biotin, ein Streptavidin-HRP Komplex spezifisch an das Antigen-Antikörper Konjugat binden und eine Visualisierung durch Hinzufügen eines geeigneten Chromogens durchgeführt werden.

Die eingefrorenen Tumorproben wurden immunhistochemisch untersucht. Dazu wurden die Tumorblöcke in speziellem Medium eingebettet und mit einem Cryomicrotom mit einer Schichtdicke von 5 µm geschnitten und auf unbeschichtete Objektträger überführt.

Anschließend wurden die Schnitte 24 h getrocknet, 10 Minuten in Aceton fixiert und 5 Minuten in PBS 1% gewaschen. Die Schnitte wurden mit einem Dako-Pen umrundet und die Objektträger beschriftet. Die Färbung erfolgte in einer Feuchtkammer, um zu verhindern, dass die Schnitte während der Färbung austrocknen. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte mit 0,3% H₂O₂ 10 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden die Schnitte dreimal in PBS 1% für je 5 Minuten gewaschen.

Im nächsten Schritt erfolgte die Blockierung des endogenen Biotin, durch ein kommerziell erhältliches Avidin/Biotin Blockierungsset. Zunächst wurden die Schnitte für 10 Minuten mit 2 Tropfen Avidin/Schnitt inkubiert, um endogenes Biotin zu binden. Anschließend wurde Avidin abgeklopft und für 10 Minuten mit 2 Tropfen Biotin/Schnitt inkubiert um überschüssiges Avidin zu binden und danach dreimal mit PBS 1% für je 5 Minuten gewaschen.

Anschließend wurde der Primärantikörper für 60 Minuten aufgetragen, entweder Maus anti-Ratte CD31 monoklonaler Antikörper oder Kaninchen anti-human VEGF polyklonaler Antikörper, jeweils in Verdünnungen von 1:100 (1 µg/ml) und mit einem Inkubationsvolumen von 100 µl, inkubiert. Die Verdünnung erfolgte mit PBS 1%. Der polyklonale anti-humane VEGF Antikörper zeigt eine Kreuzreaktivität zu Rattengewebe und ist daher für die Immunhistologie geeignet. Mit jedem Schnitt wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der anstelle des Primärantikörpers nur mit PBS 1% inkubiert wurde.

Anschließend wurde dreimal in PBS 1% für je 5 Minuten gewaschen und es erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 30 Minuten, entweder mit Ziege anti-Maus biotinyliertem polyklonalem Antikörper oder mit Ziege anti-Kaninchen biotinyliertem polyklonalem Antikörper, jeweils in Verdünnungen von 1:200 in einem Inkubationsvolumen von 100 µl.

Gleichzeitig erfolgte die Inkubation von Streptavidin und HRP im Verhältnis 1:1 für 30 Minuten und in einer Verdünnung von je 1:100 zu einem Streptavidin/HRP Komplex. Anschließend wurden die Schnitte mit dem gebildeten Streptavidin/HRP Komplex für 30 Minuten mit einem Inkubationsvolumen von 100 µl inkubiert und dreimal mit PBS 1% für 5 Minuten gewaschen.

Zur Farbentwicklung wurde kurz vor der Inkubation eine Visualisierungslösung bestehend aus 6 ml AEC-Puffer, 200 µl AEC-Substrat und 3 µl 30%iger H₂O₂ Lösung hergestellt.

Anschließend wurden die Schnitte mit 100 µl Visualisierungslösung inkubiert und die Farbreaktion nach 15 Minuten mit PBS 1% gestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin für 30 Sekunden, spühlen in Aqua dest. für eine Minute und bläuen der Schnitte mit lauwarmem Leitungswasser für 10 Minuten. Anschließend wurden die Objektträger mit Deckgläschen und Kaisers Glyceringelantine eingedeckt.

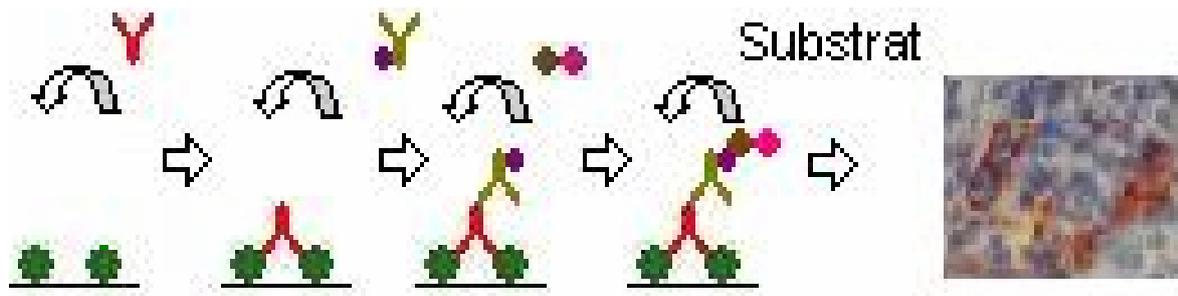


Abbildung 10

(Strept)avidin/Biotin-HRP Methode. Bei dieser Methode wird ein (Strept)avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase(HRP)-Komplex an einem biotinyliertem Sekundärantikörper, der an einen monoklonalen Primärantikörper bindet, unter Ausnutzung der Affinität von Avidin und Biotin gebunden. Die Peroxidase kann aufgrund ihrer Aktivität mit geeigneten Chromogenen nachgewiesen werden.

2.10. Statistik und Dokumentation

Die Dokumentation der operativen Eingriffe erfolgte auf standardisierten Dokumentationsbögen.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS 12.0 Software. Bei parametrischen Daten wurde der Student's t-Test und bei nicht parametrischen Daten der Mann-Whitney Test angewendet.

3. Ergebnisse

3.1. Expression von ICAM-1

Gemessen wurde die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 auf DHD/K12 Tumorzellen nach Inkubation mit ZnPP bzw. CoPP in verschiedenen Konzentrationen. Ziel war es die den Einfluss der HO-1 auf die Expression von ICAM-1 festzustellen. Zur Markierung diente ein mit FITC gekoppelter anti-ICAM-1 Antikörper. Es wurden die Messergebnisse von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ausgewertet. Zunächst wurde anhand einer unstimulierten Kontrollprobe ein „Fenster“ (gate) der Zellpopulation ermittelt. Die Messungen der markierten Tumorzellen (ICAM-1 positive Zellpopulation) erfolgte aus diesem Gate.

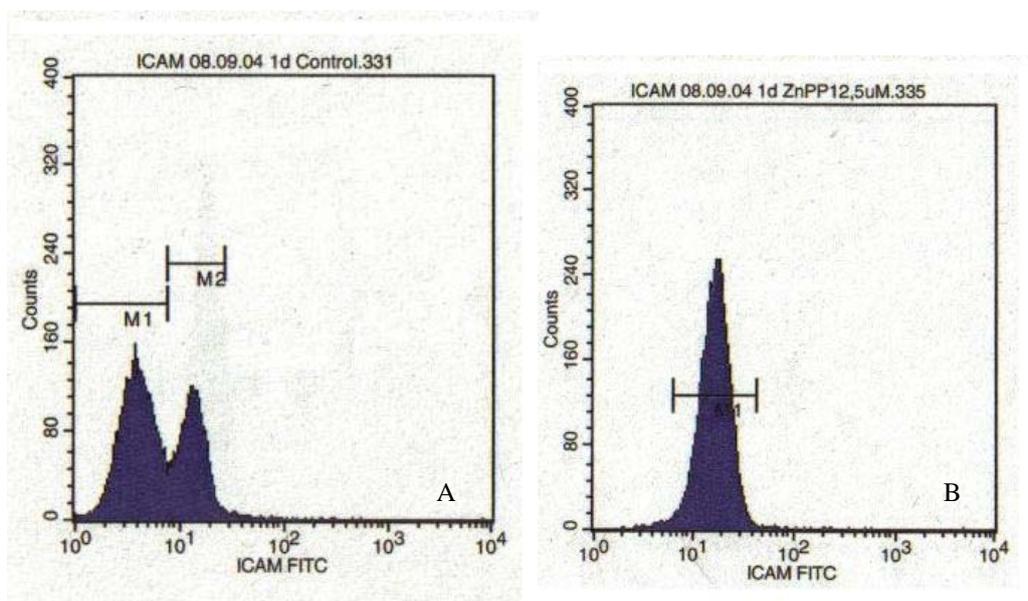


Abbildung 11:

FACS Analyse einer Messung einer DHD/K12 Tumorzellsuspension mit anti-ICAM-1 FITC gelabeltem AK. A: Kontrollprobe: Darstellung der mittleren Fluoreszenzaktivität (Abszisse) gegen die Anzahl der gezählten Zellen (Ordinate). Es scheint zwei Subpopulationen zu geben, eine mit sehr niedriger ICAM-1 (M1) Expression, eine zweite mit etwas höherer ICAM-1 Expression (M2). Die mittlere Fluoreszenzaktivität betrug 8,37

B: Probe 12,5uM ZnPP: Darstellung der mittleren Fluoreszenzaktivität gegen die Anzahl gezählter Zellen (Abszisse). Der Mittelwert der Fluoreszenzintensität betrug 17,44. Deutlich ist eine Zunahme der ICAM-1 Expression nach Stimulation zu erkennen. Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit angeschlossener CellQuest Software.

Es wurde die Expression von ICAM-1 nach 6h, 12h und 24h Inkubationszeit untersucht. Gemessen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität. Bei einigen Konstellationen existiert ein vierter Messwert aus Vorversuchen.

Folgende Tabelle zeigt die einzelnen Messdaten:

	6 Stunden				12 Stunden			24 Stunden			
Kontrolle	8,28	13,72	10,89		11,56	13,04	12,21	8,37	10,58	11,09	
ZnPP 0,5 µM	7,03	11,22	11,88		11,30	10,63	11,81	9,98	7,91	9,88	
ZnPP 1 µM	7,43	9,03	12,27		9,38	10,58	12,33	8,26	8,60	7,47	
ZnPP 2,5 µM	7,35	8,29	10,5	9,08	9,70	9,98	11,60	13,26	18,87	9,89	
ZnPP 12,5 µM	8,13	13,32	13,39		10,09	10,55	7,76	20,90	21,81	17,44	24,79
ZnPP 25 µM	9,13	11,01	11,86		11,51	9,96	14,95	20,24	19,26	13,77	
CoPP 2,5 µM	8,77	8,61	7,79		10,76	10,90	9,27	8,46	8,41	8,89	11,47
CoPP 12,5 µM	8,30	10,36	8,00		9,55	9,07	10,69	8,31	8,74	8,38	
CoPP 25 µM	8,25	8,89	9,84		8,80	8,87	9,72	9,01	8,34	8,80	12,2

Tabelle 2: Darstellung der einzelnen mittleren Fluoreszenzintensität der FACS-Analyse von der Expression von ICAM-1 auf DHD/K12 Tumorzellen.

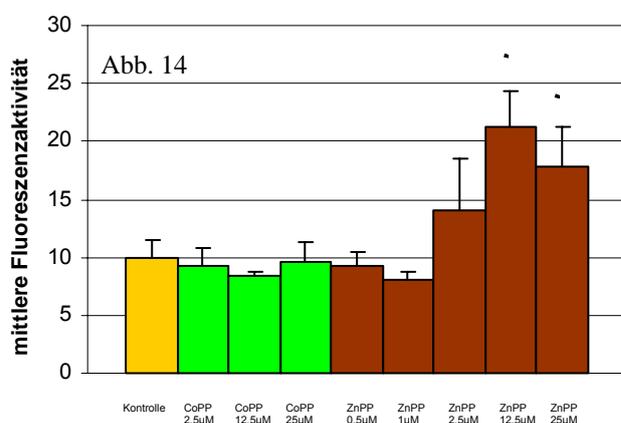
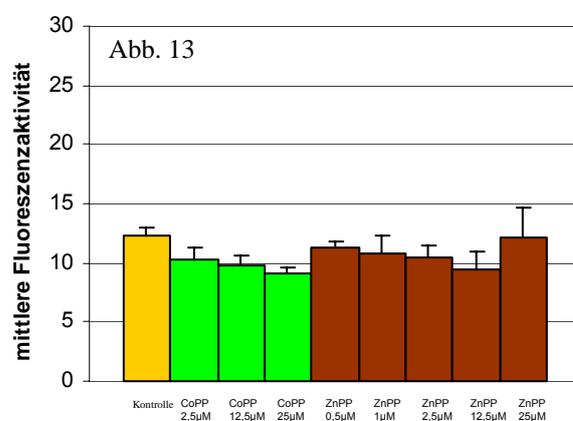
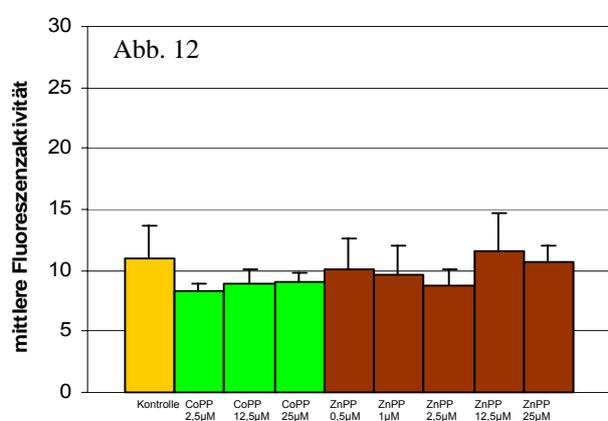
	6 Stunden		12 Stunden		24 Stunden	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Kontrolle	10,96	2,72	12,27	0,74	10,01	1,45
ZnPP 0,5 µM	10,04	2,63	11,25	0,59	9,26	1,17
ZnPP 1 µM	9,58	2,47	10,76	1,48	8,11	0,58
ZnPP 2,5 µM	8,81	1,33	10,43	1,03	14,01	4,54
ZnPP 12,5 µM	11,61	3,02	9,47	1,50	21,24	3,03
ZnPP 25 µM	10,67	1,40	12,14	2,55	17,76	3,49
CoPP 2,5 µM	8,39	0,53	10,31	0,90	9,31	1,46
CoPP 12,5 µM	8,89	1,28	9,77	0,83	8,48	0,23
CoPP 25 µM	8,99	0,80	9,13	0,51	9,59	1,76

Tabelle 3: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der mittleren Fluoreszenzintensität der FACS-Analyse von ICAM-1 auf DHD/K12 Tumorzellen.

Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle in der Expression von ICAM-1 nach Inkubation mit ZnPP in Dosen von 12,5

μM und $25 \mu\text{M}$ und einer Inkubationsdauer von 24 h. (Kontrolle vs. ZnPP $12,5 \mu\text{M}$ $p=0,0021$, Kontrolle vs. ZnPP $25 \mu\text{M}$ $p=0,0237$). Die Inkubation von Zellen der kolorektalen Karzinomzelllinie DHD/K12/TRb mit dem HO-1 Inhibitor ZnPP bewirkte eine dosis- und zeitabhängige erhöhte Expression von ICAM-1. Eine Inkubation mit CoPP zur Induktion der HO-1, hatte hingegen keinen Einfluss auf die ICAM-1 Expression. Gegenüber der Kontrollgruppe ließ sich hier keine Veränderung der Expression erkennen.

Die folgenden Abbildungen zeigen eine graphische Darstellung der mittleren Fluoreszenzaktivität bei unterschiedlichen Konzentrationen von CoPP und ZnPP



Abbildungen 12, 13, 14:
Graphische Darstellung der ICAM-1 Expression von DHD/K12 Zellen nach Inkubation für 6h (Abb. 12), 12h (Abb. 13) bzw. 24h (Abb. 14) mit CoPP bzw. ZnPP. In den mit '*' markierten Untersuchungen besteht ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle.

3.2. VEGF Konzentration im Zellkulturüberstand

Die Bestimmung der Extinktion erfolgte automatisch mit einem Photometer und angeschlossener Software (siehe 2.4.3.) Durch einen vom Hersteller mitgeführten Standard ist die Bestimmung der Konzentration möglich. Es wurde mit jeweils zwei Proben/Gruppe eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Folgende Tabellen zeigen die Messergebnisse nach Stimulation mit ZnPP und CoPP für 6h, 12h bzw. 24h. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-Test.

6 h Inkubationszeit	VEGF Konzentration in ng/ml					
	Probe 1		Probe 2		Probe 3	
Kontrolle	208,251	262,132	824,455	705,149	241,606	194,567
Copp 2,5 µM	215,093	192,429	242,889	209,962	214,666	208,679
CoPP 12,5 µM	62,004	46,182	33,781	59,439	67,136	60,294
CoPP 25 µM	102,201	115,030	162,923	83,385	91,510	74,833
ZnPP 0,5 µM	198,844	251,869	232,626	240,751	471,239	432,753
ZnPP 1 µM	136,411	194,955	134,273	192,429	498,179	405,385
ZnPP 2,5 µM	224,073	178,745	316,012	345,946	208,251	191,574
ZnPP 12,5 µM	60,294	45,327	211,672	159,075	18,814	38,485
ZnPP 25 µM	-0,001	69,702	103,056	126,575	64,570	45,327

12h Inkubationszeit	VEGF Konzentration in ng/ml					
	Probe 1		Probe 2		Probe 3	
Kontrolle	758,602	687,189	847,547	697,452	651,268	429,332
Copp 2,5 µM	1223,66	1288,32	1076,38	1152,26	1021,15	1140,59
CoPP 12,5 µM	717,163	625,113	793,047	780,924	997,352	982,984
CoPP 25 µM	806,967	718,959	742,308	784,516	661,484	694,711
ZnPP 0,5 µM	1398,75	1292,70	209,106	377,162	606,368	406,688
ZnPP 1 µM	284,796	430,615	590,974	406,241	441,306	217,659
ZnPP 2,5 µM	498,607	261,276	502,883	229,632	109,898	146,674
ZnPP 12,5 µM	103,911	98,352	751,288	661,933	399,255	400,602
ZnPP 25 µM	341,331	370,518	273,529	252,425	603,111	548,330

24h Inkubationszeit	VEGF Konzentration in ng/ml					
	Probe 1		Probe 2		Probe 3	
Kontrolle	437,971	428,785	861,299	829,867	778,230	811,457
Copp 2,5 µM	1425,72	787,210	753,084	510,612	902,609	644,421
CoPP 12,5 µM	460,319	308,270	548,779	902,609	665,525	529,022
CoPP 25 µM	334,731	349,264	454,934	419,910	546,085	476,038
ZnPP 0,5 µM	836,259	790,603	1808,73	1375,88	1597,69	1690,31
ZnPP 1 µM	934,151	875,922	1959,61	1864,41	2217,34	1979,81
ZnPP 2,5 µM	371,201	342,135	477,834	501,183	610,295	548,779
ZnPP 12,5 µM	393,549	349,401	264,548	260,507	288,347	287,000
ZnPP 25 µM	295,245	259,872	282,060	213,360	336,392	192,256

Tabelle 4, 5, 6: Konzentration von VEGF im Zellkulturüberstand von DHD/K12 Tumorzellen nach 6, 12 bzw. 24 Stunden Inkubationszeit mit verschiedenen Konzentrationen von ZnPP und CoPP.

	6 Stunden			12 Stunden			24 Stunden		
	MW	SD	p	MW	SD	p	MW	SD	p
Kontrolle	406,03	281,47		678,57	140,18		691,27	201,59	
ZnPP 0,5 µM	304,68	116,12	n.s.	715,13	505,61	n.s.	1348,25	437,81	0,0075
ZnPP 1 µM	260,27	153,46	n.s.	395,27	130,80	0,0047	1638,54	580,23	0,0092
ZnPP 2,5 µM	244,10	69,66	n.s.	291,50	171,04	0,0016	475,24	102,83	0,0415
ZnPP 12,5 µM	88,94	77,68	0,0239	402,56	272,26	0,0518	307,23	52,92	0,0063
ZnPP 25 µM	68,20	44,30	0,0157	398,21	145,14	0,0067	263,20	53,42	0,004
CoPP 2,5 µM	213,95	16,41	n.s.	1150,39	96,62	<0,0001	837,28	317,5	n.s.
CoPP 12,5 µM	54,81	12,42	0,0122	816,10	147,47	n.s.	569,09	201,2	n.s.
CoPP 25 µM	104,98	31,69	0,0263	734,82	54,72	n.s.	430,16	79,89	0,0256

Tabelle 7: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und statistische Signifikanz gegenüber Kontrolle, ausgedrückt als p-Wert, der Bestimmung von VEGF in den verschiedenen Proben.

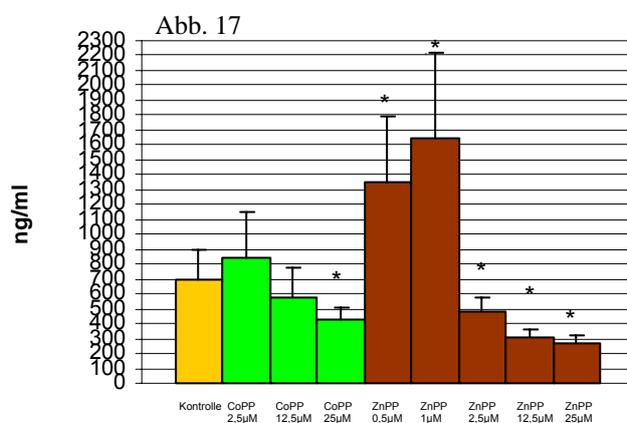
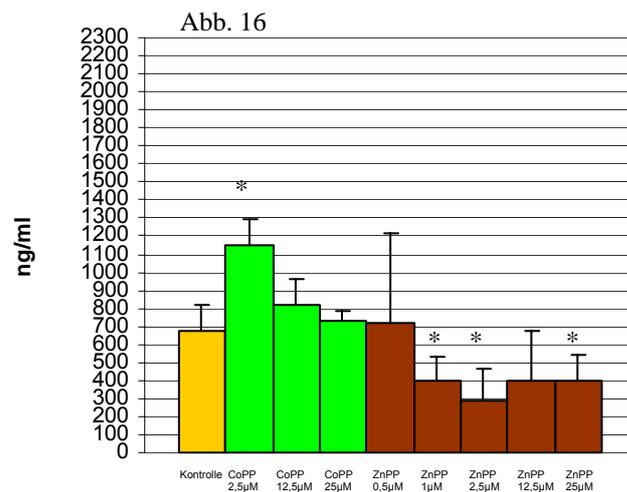
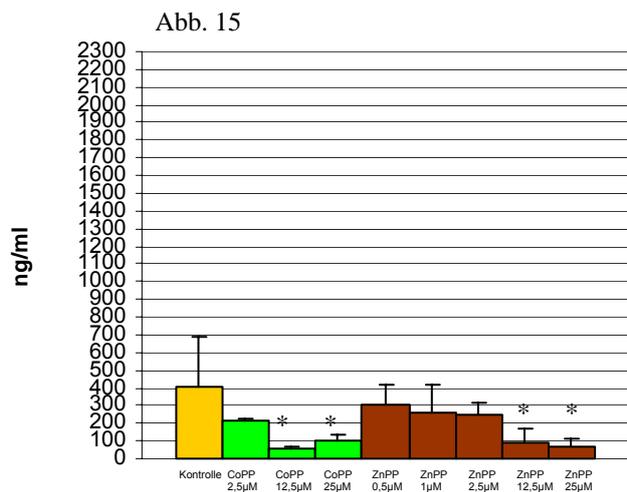


Abbildung 15, 16, 17: mittlere Konzentration von VEGF im Überstand einer DHD/K12 Zellkultur nach 6h (Abb.15) nach 12h (Abb.16) und nach 24h (Abb.17): graphische Darstellung der VEGF Konzentration von DHD/K12 Zellen nach Inkubation mit CoPP bzw. ZnPP. In den mit `*` markierten Untersuchungen besteht ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle.

Nach Stimulation der Zellen zeigt sich ein heterogenes Bild der Veränderung der VEGF Konzentration. So war nach 6h Inkubation die VEGF Konzentration nach CoPP und ZnPP-Gabe in Konzentrationen von 12,5 µM und 25 µM deutlich reduziert. Bei einer Inkubationszeit von 12 h war bei einer CoPP-Dosis von 2,5 µM ein deutlicher Anstieg der VEGF-Konzentration zu verzeichnen. Nach Inkubation mit ZnPP zeigte sich in Konzentrationen von 1 µM, 2,5 µM und 25 µM ein signifikanter Abfall der VEGF Konzentration, ebenso war bei einer ZnPP-Dosis von 12,5 µM die VEGF-Konzentration leicht reduziert, verfehlte jedoch das Signifikanzniveau ($p=0,518$).

Nach 24h Inkubationszeit war die VEGF-Konzentration nach Gabe von CoPP in einer Dosis 25 µM signifikant reduziert. Die Inkubation mit ZnPP zeigte in niedrigen Dosierungen einen extremen Anstieg der VEGF Konzentration, während in höheren Dosierungen ein signifikanter Abfall der VEGF Konzentration zu beobachten war.

Eine Inhibition der HO-1 mit ZnPP in höheren Dosen (12,5 μM , 25 μM) führte zu einem Abfall der VEGF Expression in der Tumorzellkultur. Dieser Effekt zeigte sich bereits nach kurzer Inkubationszeit von 6h.

Die Induktion der HO-1 mit CoPP hingegen zeigte keine durchgehende Veränderung im Expressionsmuster von VEGF.

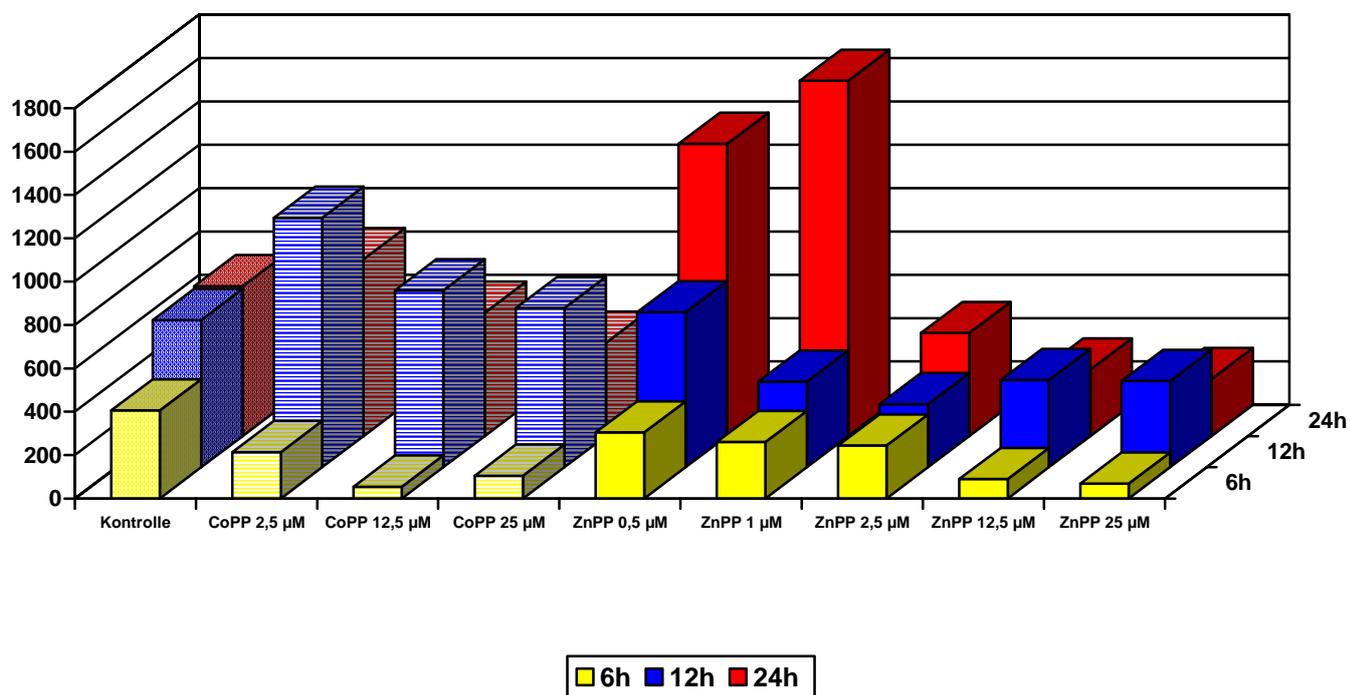


Abbildung 18: Darstellung der VEGF-Konzentration in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration von CoPP bzw. ZnPP. Hier ist eine niedrige Konzentration von VEGF bei Anwesenheit von ZnPP in hohen Dosierungen zu allen Untersuchungszeitpunkten gut ersichtlich. Bei 24h Inkubationszeit und niedriger ZnPP Dosierung ist eine sehr hohe VEGF-Expression ersichtlich.

3.3. Tumervolumina

Alle Operationen wurden komplikationslos durchgeführt. Das mittlere Gewicht der Tiere lag zum Zeitpunkt der intraperitonealen Injektion bei 291,6 g. In den ersten postoperativen Tagen gab es keine Komplikationen durch die Narkose, das Operationstrauma oder die Tumorzellinjektion. Ein Tier der mit ZnPP vorbehandelten

Gruppe verstarb an Tag 34 des Beobachtungszeitraumes. Dieses Tier von der Bewertung ausgeschlossen, da eine Bestimmung der genauen Todesursache nicht möglich war.

Nach dem Beobachtungszeitraum zeigten 6/10 (60%) Tieren der Kontrollgruppe Lebermetastasen, in der mit CoPP vorbehandelten Gruppe 7/10 (70%) Tieren und in der mit ZnPP vorbehandelten Gruppe 7/9 (77,8%) Tieren.

Zur Bestimmung der Tumormenge wurden die Metastasen gemessen und mit der Formel $V=4/3\pi abc$, wobei a, b und c die Radien der Achsen eines Ellipsoids bezeichnen, das Volumen errechnet. Bei Tumoren mit einem Durchmesser von 1 mm wurde das Volumen mit der Formel $V=4/3\pi r^3$ berechnet. In die Berechnung der durchschnittlichen Tumorumfänge wurden nur die Tiere einbezogen, die auch Tumoren entwickelten.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test.

Tabelle Tumorumfänge in mm^3 :

	Kontrollgruppe	CoPP	ZnPP
#1	387	21	8747
#2	55	65	20
#3	25	260	12723
#4	250	587	145
#5	150	226	117
#6	3120	377	687
#7	0	8	50
#8	0	0	0
#9	0	0	0
#10	0	0	exitus
MW	665 mm^3	221 mm^3	3213 mm^3
SD	1210 mm^3	212 mm^3	5270 mm^3

Tabelle 8: Tumorumfänge der Lebermetastasen am Ende des Beobachtungszeitraumes.

Die Tumorumfänge zeigen eine erhebliche Streubreite.

In allen Gruppen zeigten sich Tiere ohne Metastasen und mindestens ein Tier mit einem insgesamt sehr großen Tumorumfang. Die perioperative Applikation von ZnPP bzw. CoPP zeigt keinen Einfluss auf die Tumorumgröße.

(Kontrolle vs. CoPP vs. ZnPP: $665 \text{ mm}^3 \pm 1210 \text{ mm}^3$ vs. $221 \text{ mm}^3 \pm 212 \text{ mm}^3$ vs. $3213 \text{ mm}^3 \pm 5270 \text{ mm}^3$, $p > 0,05$).

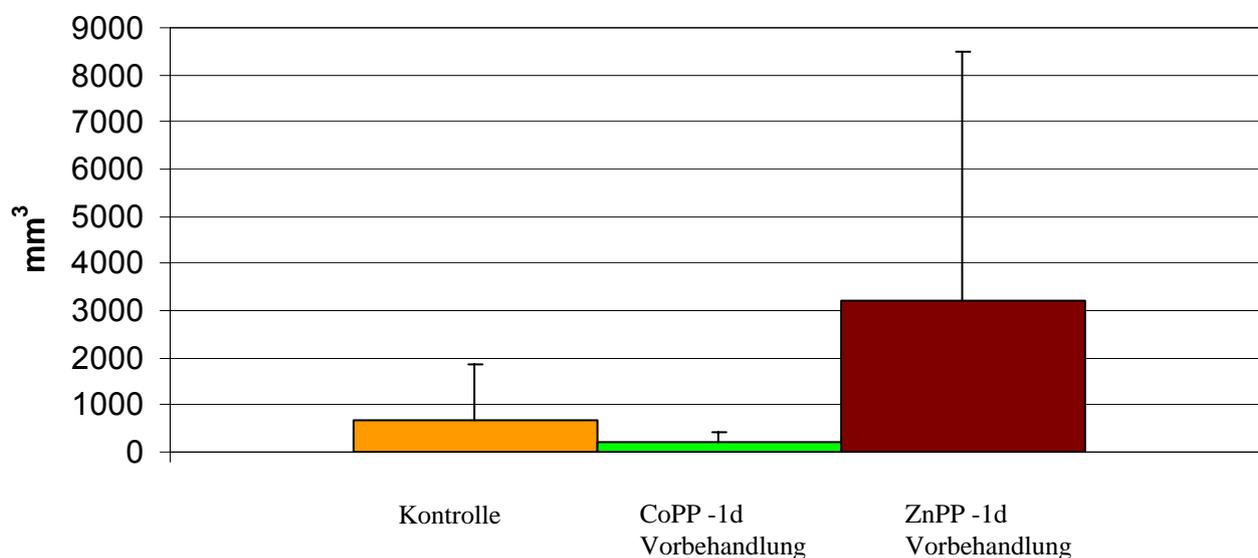


Abbildung 19: Darstellung der Tumorumfänge von Lebermetastasen nach perioperativer Applikation von ZnPP bzw. CoPP im Vergleich zur Kontrollgruppe, Kontrollgruppe und CoPP-Gruppe n=10, ZnPP-Gruppe n=9.

3.4. Immunhistochemische Untersuchungen

3.4.1. Bestimmung der Gefäßdichte mittels CD31 Färbung

CD31 ist ein etablierter panendothelialer Marker der häufig zur Beurteilung der Gefäßdichte genutzt wird (89,90). Er hat Bedeutung bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Zell-Zell Interaktionen (89). CD31 ist besonders bei der

tumorinduzierten Angiogenese vermehrt auf Endothelzellen und deren interzellulären Verbindungen zu finden (91).

Die Auswertung der immunhistochemischen Schnitte erfolgte mittels eines Lichtmikroskops. Unter 400facher Vergrößerung wurden an 10 Stellen des zu untersuchenden Schnittes die Gefäßanschnitte gezählt und der Mittelwert bestimmt.

	Kontrolle	CoPP	ZnPP
Gefäßanschnitte pro Gesichtsfeld bei 400x Vergrößerung	16,1	21,5	26,2
	18,8	25,7	13,4
	20,2	27,7	33,3
	14,4	30,3	8,9
	24,1	12,8	12,8
	20,6	20,2	25
			26,8
Durchschnitt	19,03	23,57	21,57
Standardabweichung	3,45	5,9	7,32

Tabelle 9: Ergebnisse der Bestimmung der Gefäßdichte in Lebermetastasen.

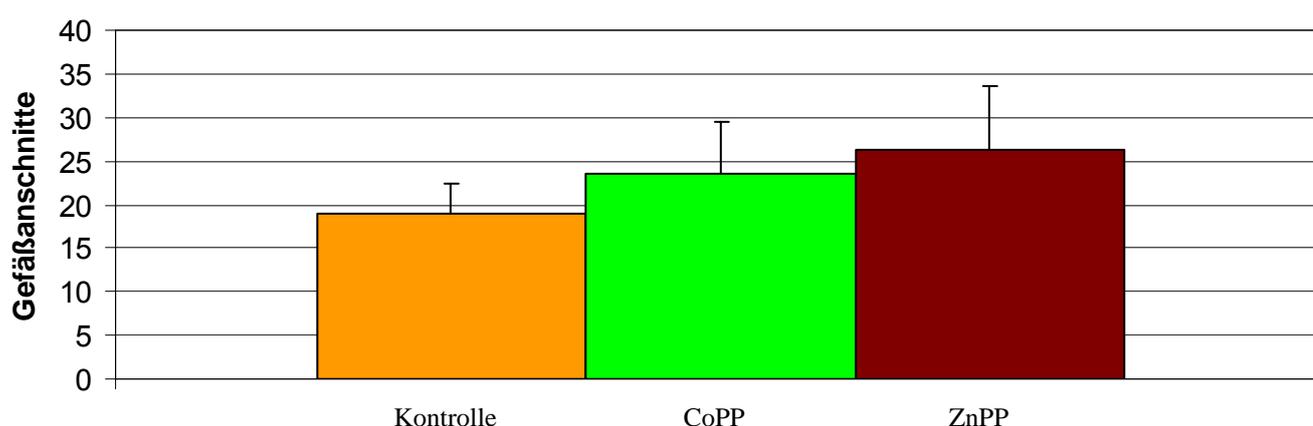
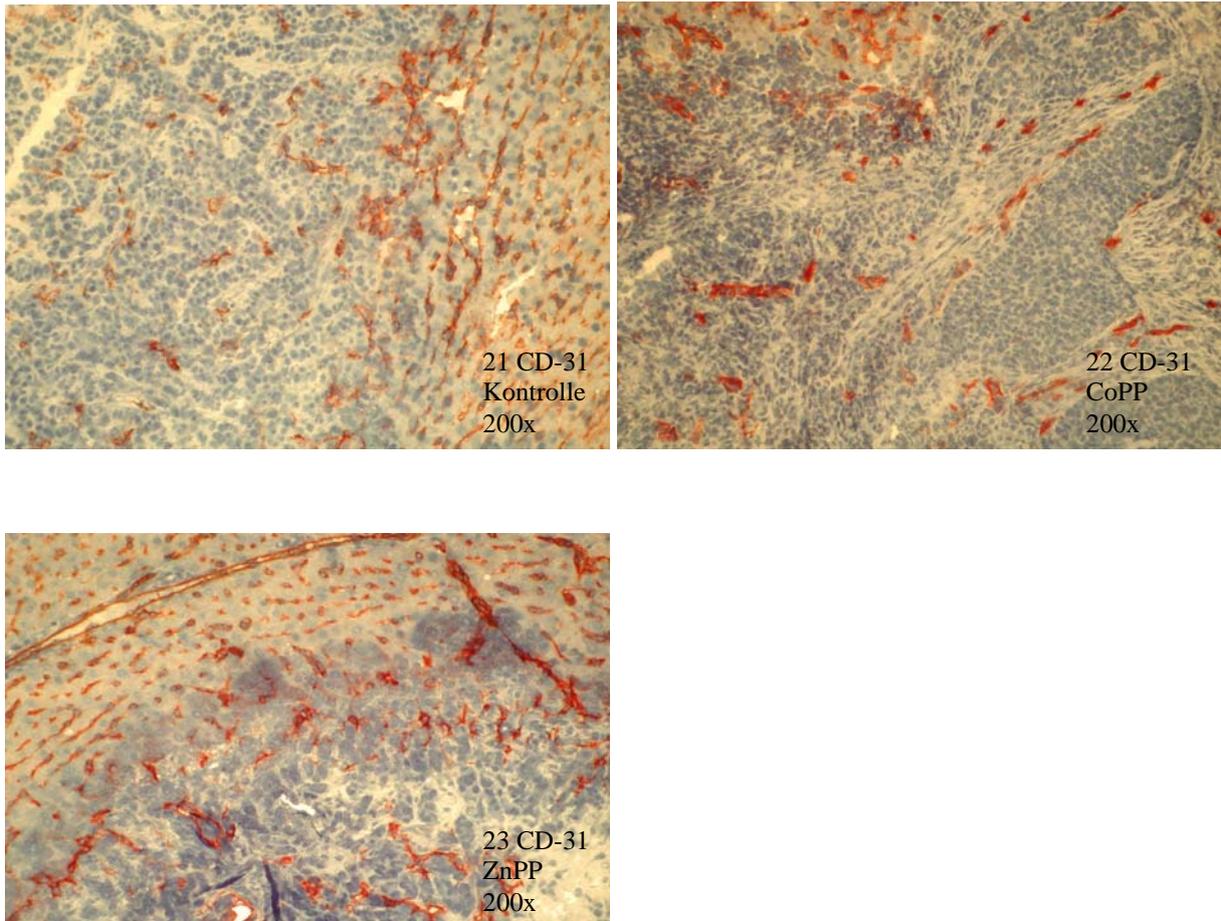


Abbildung 20: Darstellung der Gefäßdichte in Lebermetastasen.

Die Gefäßdichte im Tumor (CD31 Färbung), die mit der Neoangiogenese korreliert, war bei Vorbehandlung mit ZnPP nicht vermindert. (Kontrolle vs. ZnPP: 19,03 vs.

21,57 $p > 0,05$). Auch die perioperative Vorbehandlung mit CoPP zeigte keinen Einfluss auf die Gefäßdichte (Kontrolle vs. CoPP: 19,03 vs. 23,57, $p > 0,05$). Die Auswertung erfolgte mit Student's t-Test. Eine erhöhte Gefäßdichte fand sich meist am Tumorrand, das Tumorzentrum zeigte eine geringere Gefäßdichte.

Die Abbildungen 21, 22 und 23 zeigen exemplarisch Tumoranschnitte von Lebermetastasen nach immunhistologischer Untersuchung auf CD31.



Abbildungen 21, 22, 23: Immunhistochemische Untersuchung der CD31 Expression von Lebermetastasen repräsentative Färbungen, 200x Vergrößerung. 21: Darstellung der Gefäßdichte in einem Kontrolltier. Rechts ist noch originäres Leberparenchym zu erkennen. Die starke Expression von CD31 ist durch die Sinusendothelien bestimmt. Am Tumorrand zeigte sich eine erhöhte Gefäßdichte als im Zentrum. 22: Darstellung der Gefäßdichte einer Metastase eines Tieres der CoPP-Gruppe. Die Metastase weist etwas mehr Stroma auf. Auch hier ist die Gefäßdichte am Tumorrand höher. 23: Darstellung der Gefäßdichte einer Metastase eines Tieres der ZnPP-Gruppe. Es zeigt sich ein ähnliches Bild wie in den beiden vorigen Abbildungen.

3.4.2. VEGF Expression im Tumorgewebe

Zur Bestimmung der VEGF-Expression wurde an 5 verschiedenen Stellen einer Metastase der Immunreaktivitäts-Score (immunoreactivity scoring system=IRS) ermittelt. Bei dieser semiquantitativen Auswertung wird ein Punktwert für verschiedene Merkmale einer Probe vergeben. Merkmale der Probe sind: Menge der angefärbten Zellen (0%=0 Pkt., <10%=1 Pkt., 10-50%=2 Pkt., 50%-80%=3 Pkt., >80%=4 Pkt.); Intensität der angefärbten Zellen (keine Färbung 0 Pkt., schwache Färbung 1 Pkt., mittelstarke Färbung 2 Pkt. und starke Färbung 3 Pkt.) Die beiden Punktwerte werden miteinander multipliziert. Dies ist ein gängiges Verfahren, wenn sich eine Auszählung von gefärbten Zellen nicht anbietet (92).

	Kontrolle	CoPP	ZnPP
Immunreactivity scoring system	2,2	1	2,3
	1,8	2	5,7
	0,9	5,6	1,4
	3	2,1	5,6
		1,7	2,3
		3,4	1,6
Durchschnitt	1,98	2,33	3,16
Standardabweichung	0,87	1,71	1,8

Tabelle10: IRS für die untersuchten Lebermetastasen.

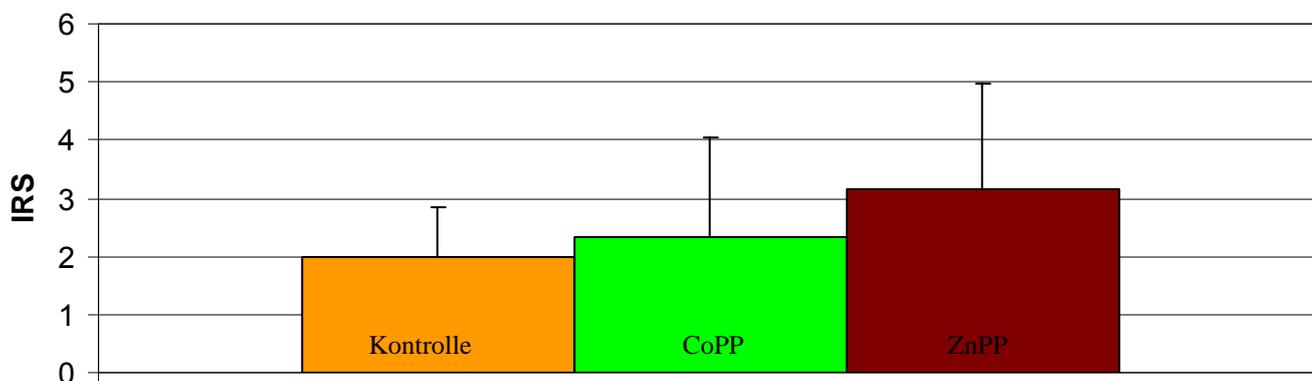


Abbildung 24: Darstellung der IRS für die untersuchten Metastasen.

Die perioperative intraperitoneale Applikation von ZnPP oder CoPP führt zu keiner Veränderung der VEGF Expression in den Tumormetastasen.

Bei insgesamt geringer Expression von VEGF zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. (Kontrolle vs. CoPP vs. ZnPP: 1,98 vs. 2,33 vs. 3,16 IRS, $p > 0,05$).

Aus der Kontrollgruppe konnten lediglich die Tumoren von 4 Tieren untersucht werden, da die Qualität der immunhistochemischen Färbung von zwei weiteren Schnitten für eine Auswertung nicht ausreichten.

In Abbildung 25 ist exemplarisch ein immunhistologischer Schnitt nach Anfärbung VEGF positiver Zellen einer Lebermetastase dargestellt.

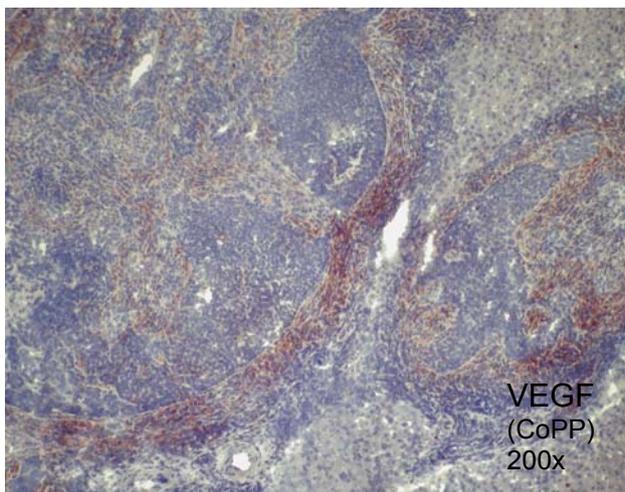


Abbildung 25: Immunhistochemische Untersuchung der VEGF-Expression. Dargestellt sind bei 200x Vergrößerung zwei Lebermetastasen, sowie noch originäres Leberparenchym. Die VEGF-Expression scheint vor allem im stromalen Anteil des Tumors am höchsten zu sein.

4. Diskussion

In den vorliegenden Untersuchungen wurde der Einfluss der HO-1 auf die Adhäsion und Angiogenese von Zellen der kolorektalen Karzinomzelllinie, sowie auf durch diese Zelllinie induzierte hepatische Metastasen untersucht. Dabei stellt das Konzept der antiangiogenen bzw. proleukozytenadhäsiven Therapie einen vielversprechenden Ansatz, vor allem in der adjuvanten Therapie von Karzinomen, dar. HO-1 scheint dabei eine Schlüsselposition in der Tumorangio-genese und Leukozytenrekrutierung einzunehmen. Eine Apoptoseinduktion durch die Inhibition von HO-1 ist ebenfalls beschrieben, war aber nicht Gegenstand dieser Untersuchung.

Eine Inhibition der HO-1 scheint aufgrund der beschriebenen Mechanismen und der offenbar zentralen Stellung der HO-1 in der Tumorprogression eine erfolgversprechende therapeutische Option in der Behandlung kolorektaler Karzinome zu sein.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Inhibition der HO-1 in Zellen des kolorektalen Karzinoms der Zelllinie DHD/K12/TRb in-vitro, die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und des proangiogenen Interleukins VEGF beeinflusst werden können. Dabei zeigt eine Inhibition der HO-1 mit ZnPP eine Erniedrigung der Expression von VEGF und eine Zunahme der Expression von ICAM-1 bei Gabe von hohen Dosen ZnPP in in-vitro Untersuchungen. Interessanterweise konnte ein gegenteiliger Effekt durch Induktion der HO-1 mit CoPP nicht erzielt werden.

Bei der Betrachtung der VEGF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand fällt auf, dass zwar zu bestimmten Zeitpunkten und Konzentrationen der Untersuchung mit dem HO-1 Induktor CoPP ein signifikanter Unterschied zu dem Kontrollwerten besteht, allerdings lässt sich hier kein Muster oder Trend eruieren. Weiterhin ist bemerkenswert, dass bei niedrigen Konzentrationen von 0,5 μM bzw. 1 μM ZnPP ein erheblicher Anstieg der VEGF-Konzentration zu beobachten ist, welcher im Gegensatz zu der Abnahme der VEGF-Konzentration unter Verwendung von hohen Dosen ZnPP steht. Hypothetisch kommt eine unzureichende Inhibition mit konsekutiver überschüssiger Expression von HO-1 und somit VEGF in Frage, wobei eine niedrige Dosierung nicht ausreicht diesen Effekt zu unterdrücken. Der genaue Mechanismus ist aber unbekannt.

Zur Verifizierung dieser Effekte wurde in einem Tiermodell die perioperative Situation nach Resektion eines kolorektalen Karzinoms simuliert.

Dazu wurden männlichen BD-IX Ratten 24h vor intraportaler Applikation von Tumorzellen einer syngenen Tumorzelllinie ein Inhibitor (ZnPP) bzw. Induktor (CoPP) der HO-1 intraperitoneal appliziert. In dieser in-vivo Untersuchung sollte untersucht werden, ob durch eine Beeinflussung der HO-1 ein günstiger Effekt auf die Tumorprogression ausgeübt werden kann. Es zeigte sich aber, dass kein positiver Effekt bezüglich Tumorwachstum, VEGF-Expression und Gefäßdichte erreicht werden konnte.

4.1. Adhäsion

Normales Lebergewebe zeigt eine schwache basale Expression von ICAM-1, welche hauptsächlich auf sinusoidalen Endothelzellen zu finden ist. In der Peripherie von Lebermetastasen gastrointestinaler Karzinome konnte eine erhöhte ICAM-1 Expression nachgewiesen werden (93).

Dass Zellen kolorektaler Karzinome eine fokal erhöhte ICAM-1 Expression im Gegensatz zu normalem Kolonepithel haben, zeigt eine Arbeit von Kelly et al (94). Die erhöhte Expression ging einher mit verstärkter perivaskulärer und peritumorale Leukozyteninfiltration. In-vitro konnten die Autoren nachweisen, dass Lymphozyten verstärkt an ICAM-1 positive Karzinomzellen adhäreren.

Spätere Arbeiten konnten zeigen, dass eine erhöhte Expression von ICAM-1 in Tumoren mit einer niedrigeren Inzidenz von Lymphknotenbefall und Lebermetastasierung sowie mit einer insgesamt besseren Prognose korrelieren kann. (95,96,23). Auch eine negative Korrelation zwischen ICAM-1 Expression einerseits und nukleären Pleomorphismen, Malignitätsgrad und Tumordinfiltration andererseits konnte nachgewiesen werden (95).

Eine Transfektion mit ICAM-1 zeigte eine reduzierte Anzahl von Lymphknotenmetastasen und eine allgemeine Reduktion des Tumorwachstums (97,24). Zudem zeigte sich in mit ICAM-1 transfizierten Zellen einer Magenkarzinomzelllinie eine erhöhte Adhäsion und Zytotoxizität durch Leukozyten mit einer resultierenden Reduktion einer Peritonealkarzinose (98).

Für das kolorektale Karzinom konnten Mulder et al. zeigen, dass unabhängig vom Dukes-Stadium eine geringe Anzahl von ICAM-1 exprimierenden Tumorzellen mit einer kürzeren tumorfreien Überlebenszeit korrelierten.

In der bereits erwähnten Arbeit von Tachimori et al. (24) fällt auf, dass sich durch die Injektion ICAM-1 transfizierter Zellen einer humanen kolorektalen Karzinomzelllinie (LM-H3) zwar eine deutliche Reduktion der Anzahl hepatischer Metastasen erzielen ließ, allerdings wurde dieser Versuch mit athymischen Mäusen durchgeführt. Ein möglicher Einfluss von T-Lymphozyten auf die Tumorprogression ist in diesem Modell ausgeschlossen. Hier erfolgte die Leukozyteninfiltration hauptsächlich durch Natürliche Killerzellen. Eine Berücksichtigung auch anderer Leukozyten bei Prozessen innerhalb des Tumors scheint aber unumgänglich, da immunologisch vermittelte Prozesse eine möglicherweise entscheidende Rolle bei der Tumorprogression spielen.

Trotz der gezeigten erhöhten Expression von ICAM-1 durch Inhibition der HO-1 in-vitro konnten wir keine Reduktion der Tumormasse in-vivo feststellen und somit retrospektiv erhaltene klinische Daten anderer Autoren nicht bestätigen. Es wird diskutiert, ob eine erhöhte Expression von ICAM-1 nicht nur Leukozyten in die Tumorperipherie rekrutiert, sondern ob hierdurch zusätzlich auch vermehrt tumorzelltragende Emboli gebunden werden und sich so neue Metastasen formen können (93).

Fraglich ist auch ob eine einmalige intraperitoneale Gabe von ZnPP in der gewählten Konzentration (50 mg/kg Körpergewicht) zu einem Effekt in-vivo führt. Martins et al. wählten im Transplantationsmodell eine Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht ZnPP bei ebenfalls einmaliger intraperitonealer Applikation und erzielten damit eine effektive Inhibition der HO-1 im Tiermodell (99). Die gewählte Dosis scheint daher geeignet, die Aktivität der HO-1 im Tiermodell zu inhibieren.

Eine durch TNF α erzeugte Induktion von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM und E-Selektin führten in einer Arbeit von Sturm et al. zu einer primär erhöhten Anzahl von Mikrometastasen, sekundär aber zu einer erniedrigten Anzahl von Metastasen, allerdings waren diese Metastasen größer und zellhaltiger (100). Dies

zeigt, dass andere Adhäsionsmoleküle möglicherweise einen stärkeren Einfluss auf die Tumorprogression haben.

Eine erhöhte Expression von E-Selektin führt zu einer vermehrten Bindung von zirkulierenden Tumorzellen an sinusoidale Endothelzellen der Leber, was möglicherweise einen initialen Schritt bei der Bildung von Mikrometastasen darstellt (101).

In der Leber könnten Kupffer'sche Sternzellen eine potentielle Quelle für eine hohe TNF α Produktion sein, die eine Induktion von Adhäsionsmolekülen begünstigt.

4.2. Angiogenese

Bussolati et al. beschrieben in einem in-vivo Versuch, dass eine Inhibition der HO-1 zu einer verstärkten Einwanderung von Leukozyten führte, die mit einer verstärkten proinflammatorischen Angiogenese einhergeht, da von Leukozyten produzierte inflammatorische Zytokine ihrerseits einen starken proangiogenen Effekt haben. Hierbei scheinen Faktoren, die nicht von HO-1 beeinflusst werden, wie beispielsweise bFGF, den angiogenen Effekt zu vermitteln. Vor allem monozytäre Zellen, aber auch Granulozyten spielen dabei eine entscheidende Rolle. Andererseits führte eine Induktion der HO-1 durch CoPP zu einer reduzierten Rekrutierung von Leukozyten in Tumorgewebe, was wiederum zu einer erhöhten nichtinflammatorischen vermittelten Angiogenese führte (102).

Die Autoren postulierten ein Modell, bei dem sowohl eine Inhibition als auch eine Induktion der HO-1 über zwei unterschiedliche Mechanismen zu einer Angiogenese führen kann. Hierbei spielt die Inflammation eine entscheidende Rolle. Es bleibt nachzuweisen, ob eine starke Entzündungsreaktion in Tumoren durch die Inhibition von HO-1 getriggert werden kann und es dadurch zu einer verstärkten Angiogenese kommt, oder ob die Inhibition von HO-1 und die dadurch bedingte Reduktion der VEGF-Konzentration zu einem antiangiogenen Effekt führt. Theoretisch möglich ist, dass sich unter physiologischen Bedingungen die Effekte aufheben und eine Beeinflussung der Tumolvaskularisation unterbleibt.

Im Gegensatz dazu zeigten Shaheen et al. (103) in einem Mausmodell, dass die Inhibition von VEGF mit dem Tyrosinkinaseinhibitor SU5416 das Wachstum von hepatischen Metastasen eines kolorektalen Karzinoms, sowie die Gefäßdichte und

die Zellproliferation senkte und zu einer erhöhten Apoptoserate von Tumor- und Endothelzellen führte. Bei Verwendung des Tyrosinkinaseinhibitors SU6666 zeigte sich eine noch effektivere Inhibition der Angiogenese, da SU6666 auch die proangiogenen Eigenschaften von bFGF und PDGF inhibiert. Auch hier zeigt sich, dass andere Faktoren als VEGF eine möglicherweise größere Rolle bei der Angiogenese spielen als erwartet. Vor allem bei der Inhibition von VEGF könnten solche Faktoren dann einen stärkeren Einfluss auf die Angiogenese nehmen.

Ein weiterer proangiogener Faktor in humanen kolorektalen Karzinomen ist platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) (104). PD-ECGF war vor allem auf den Tumor infiltrierende Makrophagen exprimiert und kaum auf Tumorepithel und war mit einer höheren Gefäßdichte, bei schwacher VEGF Anfärbung assoziiert (105). Die proangiogenen Faktoren scheinen dabei hauptsächlich durch infiltrierenden Leukozyten sezerniert zu werden und weniger durch Tumorzellen selbst.

Eine allgemein recht schwache Ausprägung von VEGF in hepatischen Metastasen entspricht unserer Beobachtung.

Bei Lebermetastasen mit niedriger VEGF Expression könnten also verstärkt andere Faktoren maßgeblich an der Angiogenese beteiligt sein.

In der Leber entstehen neue Gefäße vor allem aus Endothelzellen der Lebersinusoide und weniger aus Endothelzellen des Pfortadersystems. Die Gefäße des sinusoidalen Typs sind gewunden und besitzen keine Basalmembran, wohingegen die Gefäße des portalen Typs eine Basalmembran und eine höhere Gefäßdichte aufweisen (106). Hepatische Metastasen kolorektaler Karzinome zeigen eine erhöhte vaskuläre Permeabilität. Ob diese Beobachtung durch den Ursprung der Gefäße aus sinusoidalem Endothel, welches stärker fenestriert ist, erklärt werden kann oder auf der minderen Qualität der Gefäße im Tumor beruht, lässt sich bisher nicht definitiv klären.

Die Erkenntnis, dass neue Gefäße in hepatischen Metastasen vor allem aus Endothelien der Lebersinusoide gebildet werden, kann entscheidenden Einfluss auf antiangiogene Strategien haben. Da Sinusendothelien die VEGF Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 nicht exprimieren sind antiangiogene Strategien, die auf die Inhibition des Effektes von VEGF zielen, möglicherweise nicht erfolgreich.

Metastasen zeigen ein anderes Expressionsmuster angiogener Faktoren als die Primärtumoren. (107, 108). In kolorektalen Karzinomen ist die Expression von VEGF in Lebermetastasen niedriger als im orthotop gelegenen Tumor, im Gegensatz zur Expression von bFGF, die in Primärtumor und Lebermetastase annähernd gleich ist (109).

Trotzdem konnte Warren et al. im Mausmodell zeigen, dass mit einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF eine dosis- und zeitabhängige Reduktion von Lebermetastasen in Größe in Anzahl erreicht werden kann. Auch hier wurde ein unphysiologisches Modell mit athymischen Mäusen verwendet, so dass der Einfluss des Immunsystems nicht eingeschätzt werden kann (110).

Die Komplexität des angiogenen Prozesses macht es unwahrscheinlich, dass ein einzelner Faktor verantwortlich für die Angiogenese in bestimmten Tumortypen ist. Obwohl VEGF als Hauptfaktor für die Angiogenese in vielen Malignomen identifiziert wurde, scheinen unter bestimmten Bedingungen andere proangiogene Faktoren, wie beispielsweise bFGF oder PD-ECGF, einen entscheidenden Einfluß auf die Angiogenese zu haben. Wie in dem eigenen verwendeten Modell, könnten andere Faktoren als VEGF die Angiogenese verstärkt fördern und so einen therapeutischen Nutzen zunichte machen.

4.3. Rolle der Abbauprodukte der HO-1

Der durch das Enzym HO-1 vermittelte Abbau von Häm führt zu drei unterschiedlichen Abbauprodukten: CO, Fe³⁺ sowie Biliverdin, welches durch die Biliverdinreduktase in-vivo zu Bilirubin reduziert wird.

Welches der Abbauprodukte die biologischen Effekte von HO-1 vermittelt, ist Gegenstand aktueller Diskussion. Es zeigt sich aber, dass abhängig von gewählten Modell und Versuchsanordnungen, alle Abbauprodukte den Einfluß der HO-1 vermitteln können.

Für CO konnte gezeigt werden, dass es sowohl negativer als auch positiver Modulator der Angiogenese sein kann (111). Eine Inhibition der VEGF Expression durch CO zeigten Goldberg und Schneider (112), hierbei wurden jedoch der Effekt in einer Atmosphäre von 1% O₂ und 10% CO erzielt, was einer Gaskonzentration entspricht, die mit dem Leben nicht vereinbar ist. Eine Erhöhung von VEGF durch

den CO-Donator Tricarbonyldichlororuthenium beschrieben Jozkowicz et al. (113). Eine Induktion der HO-1 mit dem Induktor 15d-PG-J2 zeigte ebenfalls eine erhöhte CO-Konzentration. Die Synthese von VEGF ging dabei mit einer Erhöhung der CO Konzentration einher. Erst bei toxischen Konzentrationen von CO zeigte sich eine niedrigere Expression von VEGF.

CO könnte also ein Induktor der VEGF Synthese in-vivo sein. Mit CO freisetzenden Substanzen, wie CO releasing molecule-2 (CORM-2) oder Dichloromethan, konnte allerdings abhängig von der untersuchten Zelllinie nicht durchgehend ein VEGF induzierender Effekt nachgewiesen werden (114).

Mäuse die einer 0,1%igen CO Atmosphäre ausgesetzt waren und dadurch eine hypoxämischen Hypoxie aufwiesen, zeigten erhöhte VEGF Konzentrationen in unterschiedlichen Organen. Eine ähnliche Erhöhung der VEGF Expression zeigten die Tiere nach Exposition in einer 6%igen O₂ Atmosphäre (115).

Eine Hypoxie auf zellulärer Ebene ist ein möglicher Mechanismus für eine erhöhte VEGF Synthese durch CO, welches beim HO-1 vermittelten Abbau von Häm in-vivo produziert wird.

Biliverdin und Bilirubin sind nach der bestehenden Datenlage die Abbauprodukte der HO-1, welche die beschriebenen antioxidativen und zellprotektiven Effekte vermitteln (116). Biliverdin wird durch Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert, welches wiederum durch ROS zurück zu Biliverdin reoxidiert werden kann. Der Zyklus Biliverdin-Biliverdinreduktase-Bilirubin-ROS-Biliverdin scheint für den antioxidativen, zellprotektiven Effekt der HO-1 verantwortlich zu sein.

Die Rolle des Biliverdin/Bilirubin Systems in der Angiogenese ist bisher kaum untersucht.

Da Hypoxie und somit oxidativer Stress für die Induktion der VEGF Synthese entscheidend sind, ist anzunehmen, dass die antioxidative Wirkung des Biliverdin/Bilirubin Systems einen antiangiogenen Effekt hat.

So konnten Li Volti et al. zwar mit CO eine Angiogenese in-vitro induzieren, mit Bilirubin hingegen nicht (117).

Unter in-vivo Bedingungen muss auch eine mögliche Rolle von Eisen-Ionen bei der Angiogenese in Betracht gezogen werden. Eisen kann mittels der Fenton-Reaktion, bei der aus H₂O₂ in Gegenwart von Eisen Hydroxyl-Radikale entstehen, oder über

die Bildung von Stickoxyden oxidativen Stress induzieren (118). Dies würde für einen proangiogenen Effekt von Eisen-Ionen sprechen.

Andererseits induziert HO-1 die Synthese von Ferritin, welches antioxidativ wird.

Eine Stimulation von glatten Muskelzellen mit Fe^{2+} in vitro führte zur Inhibition der VEGF Synthese (119).

Unter hyperoxischen Bedingungen führt eine verstärkte HO-1 Aktivität zu zelltoxischen Schäden, was unter anderem auf erhöhte Eisen Konzentrationen zurückzuführen war (120). Die Rolle des Eisens bei der Vermittlung der Wirkung der HO-1, insbesondere auch bei der angiogenen Wirkung, ist bis jetzt nur unzureichend untersucht. Untersuchungen mit Eisenchelatoren belegen einen antitumorösen Effekt durch Senkung der intrazellulären Eisen-Konzentration (121). Es handelt sich dabei aber nicht um eine antiangiogene Wirkung, sondern um eine Störung der DNA-Synthese.

Eine Vielzahl von Mechanismen, die sich nur schwer voneinander getrennt betrachten und analysieren lassen, greift bei der Bildung und Progression von hepatischen Metastasen kolorektaler Karzinome ineinander. Das komplexe Zusammenspiel mehrerer regulierender Systeme, wie Zelladhäsion, Angiogenese und Apoptose erschwert die Einführung einer geeigneten Therapie.

So ist eine Änderung der Fähigkeit des Tumors zur Rekrutierung von zytotoxischen Leukozyten, möglicherweise mit einer Induktion der Angiogenese verbunden.

Die bei der Angiogenese wirkenden angiogenen Faktoren sind dabei vom Organ und vermutlich auch vom Ursprungsorgan der malignen Zelle abhängig. Zusätzlich spielt der Einfluss des interstitiellen und zellulären Milieus eine maßgebliche Rolle bei der Absiedlung maligner Zellen und Ausprägung von Metastasen. Bei der Entstehung hepatischer Metastasen scheinen auch für die Leber spezifische Mechanismen eine wichtige Rolle zu spielen. Erwähnt sei hier die Rolle des Sinusendothels für die Angiogenese oder auch die Wirkung von leberspezifischen Zellen, wie Kupffer'schen Sternzellen auf die Expression adhäsiver Oberflächenmoleküle.

5. Zusammenfassung

Das Kolonkarzinom ist eines der häufigsten Malignome in den westlichen Ländern. Dabei sind Metastasen für mehr Todesfälle verantwortlich als die Primärtumoren. Man geht davon aus, dass bereits zum Zeitpunkt des kurativen chirurgischen Eingriffs oder durch diesen bedingt, bereits einzelne Tumorzellen im Kreislauf zirkulieren oder schon Mikrometastasen ausgebildet haben. Die Entwicklung einer adjuvanten Therapie, um die Ausbildung von makroskopischen Metastasen aus Mikrometastasen zu verhindern ist Gegenstand aktueller Forschung. Besonders das Konzept der antiangiogenen Therapie scheint dabei eine vielversprechende Option zu sein. Grundidee dieses Konzeptes ist es, den Tumor durch Inhibierung der Gefäßneubildung von seiner Nährstoffversorgung abzuschneiden und somit ein Wachstum der Metastasen zu verhindern. Andere Konzepte beinhalten die Stimulation des Immunsystems zur Elimination der Tumorzellen oder die Apoptoseinduktion der Tumorzellen.

Die Induktion der Angiogenese beruht auf einem Ungleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren, welches hervorgerufen wird durch die Bildung von proangiogenen Faktoren durch Tumorzellen. Dabei hat sich gezeigt, dass vascular endothelial growth factor (VEGF) einer der wichtigsten proangiogenen Faktoren ist. Eine Inhibition der Wirkung von VEGF führt daher auch zu einer geringeren Ausbildung der Tumolvaskularisation.

Eine Stimulation des Immunsystems kann zum Beispiel durch eine vermehrte Rekrutierung von immunkompetenten Zellen im Tumorgebiet erfolgen. Für diesen Prozess sind Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, die Immunzellen aus dem Blutkreislauf binden, essentiell. Eine erhöhte Expression von ICAM-1 im Tumorgewebe korreliert daher auch mit einer günstigeren Prognose.

Für das Enzym Hämoxxygenase-1 konnte gezeigt werden, dass es sowohl die Angiogenese durch Induktion der VEGF-Synthese fördert und eine Inhibition der Häm induzierten HO-1 die ICAM-1 Expression erhöht. Eine Inhibition der HO-1 scheint daher für die antiangiogene Therapie geeignet und fördert gleichzeitig die Rekrutierung immunkompetenter Zellen in das Tumorgewebe.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Induktion der HO-1 mit ZnPP zu einer Reduktion der VEGF-Synthese und einer Erhöhung der Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 auf Tumorzellen der Kolonkarzinomzelllinie

DHD/K12/TRb in-vitro führt. In einem weiterführenden in-vivo Experiment konnte allerdings kein positiver Einfluss auf das Tumorwachstum nachgewiesen werden. Die VEGF-Konzentration und Mikrogefäßdichte zeigten keine Veränderungen zwischen der Vergleichsgruppe und der Therapiegruppe mit ZnPP. Andere proangiogene Faktoren als VEGF, die nicht durch HO-1 moduliert werden, scheinen also bei der Ausbildung hepatischer Metastasen kolorektaler Karzinome von entscheidender Bedeutung zu sein. Die Inhibition von VEGF mit dem HO-1 Inhibitor ZnPP ist offenbar keine therapeutische Option in der Prävention makroskopischer Metastasen kolorektaler Karzinome.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Statistisches Bundesamt, Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen insgesamt 2001
- (2) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988 Sep1;319(9):525-532
- (3) Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingpo PA: Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin* 1998 Nov-Dec;48(6):329
- (4) Cunningham D, Findlay M: The chemotherapy of colon cancer can no longer be ignored. *Eur J Cancer* 1993;29A(15):2077-9
- (5) Bengmark S, Hafstrom L.: The natural history of primary and secondary malignant tumours of the liver: I. the prognosis for patients with hepatic metastases from colonic and rectal carcinoma by laparotomy. *Cancer* 1969 Jan; 23(1):198-202
- (6) Morris MJ, Newland RC, Pheils MT, Macpherson JG: Hepatic metastases from colorectal carcinoma: an analysis of survival rates and histopathology. *Aust N Z J Surg* 1977 Jun;47(3):365-8
- (7) Ballantyne GH, Quin J: Surgical treatment of liver metastases in patients with colorectal cancer. *Cancer* 1993 Jun 15;71(12 Suppl.):4252-66
- (8) Adson MA, van Heerden JA, Adson MH, Wagner JS, Ilstrup DM: Resection of hepatic meatastases from colorectal cancer. *Arch. Surgery* 1984 Jun;119:647-651
- (9) Kumar R, Fidler IJ: Angiogenic molecules and cancer metastasis. *In Vivo* 1998; Jan-Feb;12(1):27-34
- (10) Liotta LA, Stetler-Stevenson WG: Cancer invasion and metastasis: positive and negative regulatory elements. *Cancer Invest* 1991;9(5):543-51
- (11) Mignatti P, Rifkin BD: Biology and Biochemistry of Proteinases in tumor invasion. *Pysiol Rev* 1993 Jan; 73(1):161-95
- (12) Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC: Dissemination and Growth of Cancer cells in metastatic sites. *Nature Rev Cancer* 2002 Aug,2(8):563-571
- (13) Elangbam CS, Qualls CW Jr., Dahlgren RR: Cell adhesion molecules-update. *Vet Path* 1997 Jan; 34(1):61-73
- (14) Schwartz GK: Invasion and metastasis in gastric cancer: in-vitro and in-vivo models with clinical correlations. *Semin Oncol* 1996 Jun;23(3):316-24

-
- (15) Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA: Induction by IL-1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 1986 Jul 1;137(1):245-54
 - (16) Rothlein R, Czajkowski M, O'Neill MM, Marlin SD, Mainolfi E, Merluzzi VJ: Induction of intercellular molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. *J Immunol* 1988 Sep 1; 141(5):1665-9
 - (17) Krutmann J, Kock A, Schauer E, Parlow F, Moller A, Kapp A, Forster E, Schopf E, Luger TA: Tumor necrosis factor beta and ultraviolet radiation are potent regulators of human keratinocytes ICAM-1 expression. *J Invest Dermatol* 1990 Aug;95(2):127-31
 - (18) van de Stolpe A, van der Saag PT: Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* 1996 Jan;74(1):13-33
 - (19) Tomioka H, Shimizu T, Maw WW, Ogasawara K: Roles of tumour necrosis factor alpha, transforming growth factor beta and IL-10 in the modulation of ICAM-1 expression by macrophages during mycobacterial infection. *Clin Exp Immunol* 2000 Dec;122(3):335-42
 - (20) Wagener, Feldman E, de Witte T, Abraham NG: Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in vascular endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997 Dec;216(3):456-63
 - (21) Maurer CA, Friess H, Kretschmann B, Wildi S, Muller C, Graber H, Schilling M, Buchler MW: Over-Expression of ICAM-1, VCAM-1 and ELAM-1 might influence tumor progression in colorectal cancer. *Int J Cancer* 1998 Feb 20;79(1):76-81
 - (22) Luebbers EL, Pretlow TP, Emancipator SN, Boohaker EA, Pitts AM, Macfayden AJ, Bradley EL Jr., Predlow TG 2nd: Heterogeneity and prognostic significance of macrophages in human colonic carcinomas. *Cancer Res* 1985 Oct;45(10):5196-200
 - (23) Maeda K, Kang SM, Sawada T, Nishiguchi Y, Yashiro M, Ogawa Y, Ohira M, Ishikawa T, Hirakawa-YS Chung K: Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2002 May-June;9(3):511-4
 - (24) Tachimori A, Yamada N, Sakate Y, Yashiro M, Maeda K, Ohira M, Nishino H, Hirakawa K: Up regulation of ICAM-1 expression inhibits tumor growth and liver metastasis in colorectal carcinoma. *Eur J Cancer* 2005 Aug;41(12):1802-10
 - (25) Hosch SB, Meyer SJ, Schneider C, Stoecklein N, Prenzel KL, Pantel K, Broelsch CE, Izbicki JR: Expression and prognostic Significance of HLA Class I, ICAM-1 and tumor-infiltrating lymphocytes in esophageal cancer. *J Gastrointest Surg* 1997 Jul;1(4):316-23

-
- (26) Folkman J: The role of Angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 1992; 3(2):65-71
- (27) Folkman J: Angiogenesis in Cancer, vascular and rheumatoid and other disease *Nat Med* 1995 Jan1(1):27-31
- (28) Takebayashi Y, Aklyama S, Yamada K, Akiba S, Aikou T: Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer* 1996 Jul 15;78(2):226-31
- (29) Vermeulen PB, van den Eynden GG, Huget P, Goovaerts G, Weyler J, Lardon F, van Marck E, Hubens G, Dirix LY: Prospective study of intratumoral microvessel density, p53 Expression and survival in colorectal cancer: biology and therapeutic implications. *Br J Cancer* 1999 Jan;79(2):316-22
- (30) Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer *Cell* 2000 Jan 100(1):57-70
- (31) Shpitz B, Gochberg S, Neufeld D, Grankin M, Buklan G, Klein E, Bernheim J: Angiogenic switch in earliest stages of human colonic tumorigenesis *Anticancer Res* 2003 Nov-Dec;23(6D):5153-7
- (32) Takahashi Y, Ellis LM, Mai M: The angiogenic switch of human colon cancers occurs simultaneous to initiation of invasion. *Oncol Rep* 2003 Jan-Feb;10(1):9-13
- (33) Kalluri R: Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2003 Jun;3(6):422-33
- (34) Jain RK: Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003 Jun;9(6):685-93
- (35) Polverini PJ: How extracellular matrix and macrophages contribute to angiogenesis-dependent diseases. *Eur J Cancer* 1996 Dec;32A(14):2430-7
- (36) Ribatti D, Vacca A, Nico B, Crivellato E, Roncali L, Dammacco F: The role of mast cells in tumour angiogenesis. *Br J Haematol* 2001 Dec; 115(3):514-21
- (37) Ibaraki T, Muramatsu M, Takai S, Jin D, Maruyama H, Orino T, Katsumata T, Miyazaki M: The relationship of tryptase- and chymase-positive mast cells to angiogenesis in stage 1 non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005 Oct;28(4):617-21
- (38) Lachter J, Stein M, Lichtig C, Eidelman S, Munichor M: Mast cells in colorectal neoplasias and premalignant disorders. *Dis Colon Rectum* 1995 Mar; 38(3):290-3
- (39) Carmeliet P: VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 2005; 69 Supp 3:4-10. Epub 2005 Nov 21

-
- (40) Ferrara N: Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* 2004;9 Suppl 1:2-10
- (41) Ferrara N: Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004 Aug;25(4):581-611
- (42) Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A: High affinity VEGF binding and development expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993 Mar 26;72(6):835-46
- (43) Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hinton DR, Gill PS: Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood* 2001 Sep 15; 98(6):1904-13
- (44) Zachary I: Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 Jun; 280(6):C1375-86
- (45) Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC: Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1997 Dec 15;100(12):3131-9
- (46) Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM: Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Apr 20;28(5):1075-9
- (47) Namkoong S, Lee SJ, Kim CK, Kim YM, Chung HT, Lee H, Han JA, Ha KS, Kwon YG, Kim YM: Prostaglandin E2 stimulates angiogenesis by activating the nitric oxide/cGMP pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Exp Mol Med* 2005 Dec 31;37(6):588-600
- (48) Tenhunen R, Marver HS, Schmid R: The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 61:748-755
- (49) Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK: Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* 1986 Jan 5;261(1):411-9
- (50) McCoubrey WK, Huang TJ, Maines MD: Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoportin heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 247:725-732
- (51) Rizzardini M, Carelli M, Cabell Porras MR, Cantoni L: Mechanisms of endotoxin induced heme oxygenase mRNA accumulation in mouse liver: synergism by glutathione depletion and protection by N-acetylcysteine. *Biochem J* 1994 Dec 1;304 (Pt 2):477-83
- (52) Applegate LA, Luscher P, Tyrrell RM: Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress stimuli in cultured mammalian cells. *Cancer Res* 1991 Feb 1;51(3):974-8

-
- (53) Choi AM, Alam J: Heme-oxygenase-1: function, regulation and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Cell Respir Mol Biol* 1996 Jul ;15(1):9-19
- (54) Maines MD: Zinc protoporphyrin is a selective inhibitor of heme oxygenase activity in the neonatal rat. *Biochim Biophys Acta* 1981 Mar 18;673(3):339-50
- (55) Abraham NG, da Silva JL, Lavrovsky Y, Stoltz RA, Kappas A, Dunn MW, Schwartzman ML: Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer into rabbit ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995 Oct;36(11):2202-10
- (56) Vogt BA, Shanley TP, Croatt A, Alam J, Johnson KJ, Nath KA: Glomerular inflammation induces resistance to tubular injury in the rat. A novel form of acquired, heme oxygenase-dependent resistance to renal injury. *J Clin Invest* 1996 Nov 1;98(9):2139-45
- (57) Stocker R, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN: Antioxidant activities of bile pigments: biliverdin and bilirubin. *Methods Enzymol* 1990;186:301-9
- (58) Nakagami T, Toyomura K, Kinoshita T, Morisawa S: A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin. *Biochim Biophys Acta* 1993 Oct 3;1158(2):189-93
- (59) Sass G, Soares MC, Yamashita K, Seyfried S, Zimmermann WH, Eschenhagen T, Kaczmarek E, Ritter T, Volk HD, Tiegs G: Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology* 2005 Mar;41(3):680-1
- (60) Deramandt BM, Braunstein S, Remy P, Abraham NG: Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis. *J Cell Biochem* 1998 Jan 1;68(1):121-7
- (61) Nishie A, Ono M, Shono T, Fukushi J, Otsubo M, Onoue H, Ito Y, Inamura T, Ikezaki K, Fukui M, Iwaki T, Kuwano M: Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res* 1999 May;5(5):1107-13
- (62) Torisu-Itakura H, Furue M, Kuwano M, Ono M: Co-expression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanoma. *Jpn J Cancer Res* 2000 Sep; 91(9):906-10
- (63) Dulak J, Jozkowicz A, Foresti R, Kasza A, Frick M, Huk I, Green CJ, Pachinger O, Weidinger F, Motterlini R: Heme oxygenase activity modulates vascular endothelial growth factor synthesis in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal* 2002 Apr;4(2):229-40
- (64) Loboda A, Jazwa A, Wegiel B, Jozkowicz A, Dulak J: Heme oxygenase-1-dependent and -independent regulation of angiogenic genes expression: effect of cobalt protoporphyrin and cobalt chloride on VEGF and IL-8 Synthesis

- in human microvascular endothelial cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2005 Sep 30;51(4):347-55
- (65) Jozkowicz A, Huk I, Nigisch A, Weigel G, Weidinger F, Dulak J: Effect of prostaglandin-J(2) on VEGF Synthesis depends on the induction of heme oxygenase-1. *Antioxid Redox Signal* 2002 Aug;4(4):577-85
- (66) Kreiser D, Nguyen X, Wong R, Seidman D, Stevenson D, Quan S, Abraham N, Dennery PA: Heme oxygenase-1 modulates fetal growth in the rat. *Lab Invest* 2002 Jun;82(6):687-92
- (67) Goodman AI, Choudhury M, da Silva JL, Schwartzman ML, Abraham NG: Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997 Jan; 214(1):54-61
- (68) Sunamura M, Duda DG, Ghattas MH, Lozonschi L, Motoi F, Yamauchi J, Matsuno S, Shibahara S, Abraham NG: Heme oxygenase-1 accelerates tumor angiogenesis of human pancreatic cancer. *Angiogenesis* 2003;6(1):15-24
- (69) Tanaka S, Akaike T, Fang J, Beppu T, Ogawa M, Tamura F, Miyamoto Y, Maeda H: Antiapoptotic effect of heme oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour. *Br J Cancer* 2003 Mar 24;88(6):902-9
- (70) Berberat PO, Dambrauskas Z, Gulbians A, Giese T, Kunzli B, Autschbach F, Meuer S, Buchler MW, Friess H: Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment. *Clin Cancer Res* 2005 May 15;11(10):3790-8
- (71) Fang J, Sawa T, Akaike T, Greish K, Maeda H: Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a heme oxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin. *Int J Cancer* 2004 Mar;109(1):1-8
- (72) Chen GG, Liu ZM, Vlantis AC, Tse GM, Leung BC, van Hasselt CA: Heme oxygenase-1 protects against apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha and cycloheximide in papillary thyroid carcinoma cells. *J Cell Biochem* 2004 Aug 15;92(6):1246-56
- (73) Skrydlewska E, Sulkowski S, Koda M, Zalewski B, Kanczuga-Koda L, Sulkowska M: Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005 Jan 21;11(3):403-6
- (74) Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971 Nov 18;285(21):1182-6
- (75) Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, Parikh A, Ahmad SA, Jung YD, Fan F, Ellis LM: Angiogenesis and antiangiogenic therapy of colon cancer liver metastasis. *Ann Surg Oncol* 2003 Aug;10(7):722-33
- (76) Carmeliet P, Jain RK: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000 Sep 14;407(6801):249-57

-
- (77) Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, MacDonald DM: Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoetin-1. *Science* 1999 Dec 24;286(5449):2511-4
- (78) Pettersson A, Nagy JA, Brown LF, Sundberg C, Morgan E, Jungles S, Carter R, Krieger JE, Manseau EJ, Harvey VS, Eckelhoefer IA, Feng D, Dvorak AM, Mulligan RC, Dvorak HF: Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* 2000 Jan;80(1):99-115
- (79) Netti PA, Hamberg LM, Babich JW, Kierstead, D, Graham W, Hunter GJ, Wolf GL, Fischman A, Boucher Y, Jain RK: Enhancement of fluid filtration across tumor vessels: implication for delivery of macromolecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 Mar 16;96(6):3137-42
- (80) Boucher Y, Baxter LT, Jain RK: Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors: implications for therapy. *Cancer Res* 1990 Aug 1;50(15):4478-84
- (81) Willet CG, Boucher Y, di Tomaso E et al. : Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 2004 Feb;10(2):145-7
- (82) Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W et al.: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colon cancer. *N Engl J Med* 2004 Jun 3;350(23):2335-42
- (83) Topal B, Roskams T, Fevery J, Penninckx: Aggregated colon cancer cells have a higher metastatic efficiency in the liver compared with nonaggregated cells: an experimental study. *J Surg Res* 2003 Jun 1;112(1):31-7
- (84) Panis Y, Nordlinger B, Delelo R et al.: Experimental colorectal liver metastases. Influence of sex, immunological status and liver regeneration. *J Hepatol* 1990 Jul;11(1):53-7
- (85) Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971;8:871-4
- (86) van Weeman BK, Schuurs AHWM: Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letts* 1971;15:232-236.
- (87) Oellerich M: Enzyme-immunoassay: a review. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984 Dec;22(12):895-904
- (88) Hsu SM, Raine L: Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *Histochem Cytochem* 1981 Nov;29(11):1349-53
- (89) Newman PJ, Berndt MC, Gorski J et al.: PECAM-1 (CD-31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 1990 Mar 9;247(4947):1219-22
- (90) DeLisser HM, Newman PJ, Albelda SM: Molecular and functional aspects of

PECAM-1/CD-31. *Immunol Today* 1994 Oct;15(10):490-5

- (91) Berger R, Albelda SM, Berd D, Ioffreda M, Whitaker D, Murphy GF: Expression of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) during melanoma-induced angiogenesis in vivo. *J Cutan Pathol* 1993 Oct;20(5):399-406
- (92) Weichert W, Schmidt M, Jacob J: Overexpression of Polo-like kinase 1 is common and early event in pancreatic cancer. *Pancreatology* 2005;5(2-3):259-65
- (93) Gulubova MV: Expression of cell adhesion molecules, their ligands and tumour necrosis factor alpha in the liver of patients with metastatic gastrointestinal carcinomas. *Histochem J* 2002 Jan-Feb;34(1-2):67-77
- (94) Kelly CP, O'Keane JC, Orellana J et al.: Human colon cancer express ICAM-1 in vivo and support LFA-1-dependent lymphocyte adhesion in vitro. *Am J Physiol.* 1992 Dec;263(6 Pt 1):G864-70
- (95) Ogawa Y, Hirakawa K, Nakata B et al.: Expression of intercellular adhesion molecule-1 in invasive breast cancer reflects low growth potential, negative lymph node involvement and good prognosis. *Clin Cancer Res* 1998 Jan;4(1):31-6
- (96) Fujihara T, Yashiro M, Inoue T et al.: Decrease in ICAM-1 expression on gastric cancer cells is correlated with lymph node metastasis. *Gastric Cancer* 1999 Dec;2(4):221-225
- (97) Sunami T, Yashiro M, Chung KH: ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) gene transfection inhibits lymph node metastasis by human gastric cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 2000 Sep;91(9):925-33
- (98) Tanaka H, Yashiro M, Sunami T, Ohira M, Hirakawa-Y S, Chung K: Lipid-mediated gene transfection of intercellular adhesion molecule-1 suppresses the peritoneal metastasis of gastric carcinoma. *Int J Mol Med* 2002 Nov;10(5):613-7
- (99) Martins PN, Kessler H, Jurisch A et al.: Induction of heme oxygenase-1 in the donor reduces graft immunogenicity. *Transplant Proc* 2005 Jan-Feb;37(1):382-3
- (100) Sturm JW, Magdeburg R, Berger K et al.: Influence of TNF α on the formation of liver metastasis in syngenic mouse model. *Int J Cancer* 2003 Oct;107(1):11-21
- (101) Matsushita Y, Kitajima S, Goto M et al.: Selectins induced by interleukin-1 β on the human liver endothelial cells act as ligands for sialyl Lewis X-expressing human colon cancer cell metastasis. *Cancer Lett* 1998 Nov 27;133(2):151-60

-
- (102) Bussolati B, Ahmed A, Pemberton H et al.: Bifunctional role for VEGF-induced Heme oxygenase-1 in vivo: induction of angiogenesis and inhibition of leukocytic infiltration. *Blood* 2004 Feb 1;103(3):761-6 Epub 2003 Oct 2
- (103) Shaheen RM, Davis DW, Liu W et al.: Antiangiogenic therapy targeting the induces tumor and endothelial cell apoptosis. *Cancer Res* 1999 Nov 1;59(21):5412-6
- (104) Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U, Drexler H, Wernstedt C, Hagiwara K et al.: Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 1989 Apr 13;338(6216):557-62
- (105) Takahashi Y, Bucana CD, Liu W et al.: Platelet-derived endothelial cell growth in human colon cancer angiogenesis: role of infiltrating cells. *J Natl Cancer Inst* 1996 Aug 21;88(16):1146-51
- (106) Paku S, Lapis K: Morphological aspects of angiogenesis in experimental liver metastases. *Am J Pathol* 1993 Sep;143(3):926-36
- (107) Takahashi Y, Mai M, Wilson MR, Ellis LM: Site-dependent expression of vascular endothelial growth factor, angiogenesis and proliferation in human gastric carcinoma. *Int J Oncol* 1996;8:701-5
- (108) Singh RK, Bucana CD, Gutman M, Fan D, Wilson MR, Fidler IJ: Organ site-dependent expression of basic fibroblast growth factor in human renal cell carcinoma cells. *Am J Pathol* 1994 Aug;145(2):365-74
- (109) Jung YD, Ahmad SA, Akagi Y et al.: Role of microenvironment in mediating response to anti-angiogenic therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19(1-2):147-57
- (110) Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillet NA, Ferrara N: Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 1995 Apr;95(4):1789-97
- (111) Dulak J, Jozkowicz A: Carbon monoxide – a “new” gaseous modulator of gene expression. *Acta Biochim Pol* 2003;50(1):31-47
- (112) Goldberg MA, Schneider TJ: Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem* 1994 Feb 11;269(6):4355-9
- (113) Jozkowicz A, Huk I, Nigisch A, Weigel G et al.: Heme oxygenase and angiogenic activity of endothelial cells: stimulation by carbon monoxide and inhibition by tin protoporphyrin-IX. *Antioxid Redox Signal* 2003 Apr;5(2):155-62
- (114) Dulak J, Loboda A, Zagorska A, Jozkowicz A: Complex role of heme oxygenase in angiogenesis. *Antioxid Redox Signal* 2004 Oct;6(5):858-66

-
- (115) Marti HH, Risau W: Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 Dec 22;95(26):15809-14
- (116) Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH: Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 Dec 10;99(25):16093-8
- (117) Li Volti G, Sacerdoti D, Sangras B et al.: Carbon monoxide signaling in promoting angiogenesis in human microvessel endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 2005 May-Jun;7(5-6):704-10
- (118) Watts RN, Ponka P, Richardson DR: Effects of nitrogen monoxide and carbon monoxide on molecular and cellular iron metabolism: mirror-image effector molecules that target iron. *Biochem J* 2003 Feb 1;369(Pt 3):429-40
- (119) Dulak J, Jozowicz A, Foresti R et al.: Heme oxygenase activity modulates vascular endothelial growth factor synthesis in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal* 2002 Apr;4(2):229-40
- (120) Dennery PA, Visner G, Weng YH et al.: Resistance to hyperoxia with heme oxygenase-1 disruption: role of iron. *Free Radic Biol Med* 2003 Jan 1;34(1):124-33
- (121) Richardson DR: Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002 Jun;42(3):267-81

Erklärung

„Ich, Andreas Tilch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Einfluss der Hämoxygenase-1 auf die VEGF und ICAM-1 Expression von Zellen der kolorektalen Karzinomzelllinie DHD/K12/TRb“ 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.“

Danksagung

Herrn PD Dr. Stefan Tullius möchte ich besonders für die Überlassung des Themas und die Aufnahme in die Arbeitsgruppe danken, sowie für die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Ebenso möchte ich PD Dr. Johann Pratschke danken für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung nach dem Weggang von PD Dr. Tullius.

Mein ganz besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe. Dr. Paulo Martins für die geduldige und kompetente Anleitung bei den chirurgischen Eingriffen, Anke Jurisch für die Anleitung und Unterstützung bei den Laborarbeiten und Dr. Anja Reutzel-Selke für die Hilfe bei der statistischen Auswertung und für die fachliche Betreuung. Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Maja Francuski, Jie Chen und meinen Mitstreitern Henriette Kessler und Paul Brandenburg.

Meinen Eltern, Ursula Tilch und Dr. Johannes Tilch, meinen Geschwistern und Annika Matthes möchte für die jahrelange Unterstützung während des Studiums und der Zeit dieser Dissertation danken.

Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.