

Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
Klinikum rechts der Isar
Technische Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher)

Modulation des metastatischen Potentials einer humanen
Fibrosarkomzelllinie durch Ko-Expression von TIMP-1 (*tissue
inhibitor of metalloproteinases-1*) und einer löslichen Form des
Urokinase-Rezeptors

Jutta Maria Nagel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. A. Krüger
2. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher

Die Dissertation wurde am 01.07.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 20.10. 2004 angenommen.

1	Zusammenfassung	8
2	Einleitung	9
	2.1 Invasion und Metastasierung: Bedeutung verschiedener Proteasesysteme	9
	2.2 Das uPA-System	10
	2.2.1 uPA	10
	2.2.2 uPA-Rezeptor	11
	2.2.3 Plasminogen Aktivator Inhibitoren (PAIs)	11
	2.2.4 Plasmin	12
	2.2.5 Bedeutung des uPA-Systems für die Invasivität <i>in vitro</i>	13
	2.2.6 Bedeutung des uPA-Systems für die Metastasierung <i>in vivo</i>	14
	2.2.7 suPAR	15
	2.3 Das MMP-System	16
	2.3.1 Matrix-Metalloproteinasen	16
	2.3.1.1 MMP-2	18
	2.3.1.2 MMP-9	18
	2.3.2 Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen (TIMPs)	19
	2.3.2.1 TIMP-1	20
	2.3.3 Bedeutung des MMP-Systems für die Invasivität <i>in vitro</i>	21
	2.3.4 Bedeutung des MMP-Systems für die Metastasierung <i>in vivo</i>	22
	2.4 Zusammenspiel von uPA-System und MMP-System	23
	2.5 Zielsetzung der Arbeit	25
3	Material und Methoden	26
	3.1 Mäuse	26
	3.1.1 Mausstamm	26
	3.2 Metastasierungsmodell	26
	3.2.1 Experimentelle Metastasierung in die Lunge	26
	3.2.1.1 Injektion	26
	3.2.1.2 Behandlung mit monoklonalem uPAR-Antikörper	26
	3.2.1.3 Durchführung und Euthanasie	27
	3.2.1.4 Gewinnung von Serum	27
	3.2.1.5 Gewinnung der Gewebeproben	27

3.3 Zellbiologische Verfahren	27
3.3.1 Zellkultur	27
3.3.1.1 Zelllinie	27
3.3.1.2 Kultivierung der Zellen	27
3.3.1.3 Zellkultur-Reagenzien	28
3.3.2 Transfektion und Selektion	29
3.3.2.1 Transfektion mit <i>suPAR</i> bzw. <i>timp-1</i>	29
3.3.2.2 Transfektion einer <i>suPAR</i> -transfizierten Zelllinie mit <i>timp-1</i>	30
3.3.2.3 <i>Limiting Dilution</i> Klonierungsverfahren	30
3.3.3 Matrigel-Invasionsassay	31
3.3.3.1 Proben	31
3.3.3.2 Reagenzien	31
3.3.3.3 Materialien und Geräte	31
3.3.3.4 Durchführung	31
3.3.4 Färbung mit 5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β -D-Galaktopyranosid (X-Gal)	32
3.3.4.1 Proben	32
3.3.4.2 Reagenzien	32
3.3.4.3 Materialien und Geräte	32
3.3.4.4 Durchführung	32
3.4 Molekularbiologische Verfahren	33
3.4.1 Verwendete Plasmide	33
3.4.1.1 Plasmidvektor pLZ 12	33
3.4.1.2 Plasmidvektor pcDNA3.1/ <i>suPAR</i> /hygro	34
3.4.1.3 Plasmidvektor pcDNA3.1/ <i>timp-1</i> /hygro	35
3.4.2 Klonierung des Plasmids pJNhT-1 (pcDNA6/ <i>timp-1</i> /blast)	35
3.4.2.1 Proben	35
3.4.2.2 Reagenzien	35
3.4.2.3 Materialien und Geräte	36
3.4.2.4 Durchführung	36
3.4.3 Transformation der DNA-Vektoren	36
3.4.3.1 Proben	36
3.4.3.2 Reagenzien	36
3.4.3.3 Materialien und Geräte	36
3.4.3.4 Durchführung	37

3.4.4	Minipräparation von DNA zur Restriktionsfragmentanalyse	37
3.4.4.1	Proben	37
3.4.4.2	Reagenzien	37
3.4.4.3	Materialien und Geräte	37
3.4.4.4	Durchführung	37
3.4.5	Restriktionsfragmentanalyse	38
3.4.5.1	Proben	38
3.4.5.2	Reagenzien	38
3.4.5.3	Materialien und Geräte	39
3.4.5.4	Durchführung	39
3.4.6	Maxipräparation zur Gewinnung der DNA zur Transfektion	40
3.4.6.1	Proben	40
3.4.6.2	Reagenzien	40
3.4.6.3	Materialien und Geräte	40
3.4.6.4	Durchführung	40
3.4.7	Konzentrationsbestimmung der DNA	41
3.4.7.1	Proben	41
3.4.7.2	Reagenzien	41
3.4.7.3	Materialien und Geräte	41
3.4.7.4	Durchführung	41
3.5	Biochemische Verfahren	42
3.5.1	MMP-Zymographie	42
3.5.1.1	Proben	42
3.5.1.2	Reagenzien	42
3.5.1.3	Materialien und Geräte	44
3.5.1.4	Durchführung	44
3.5.2	PA-Zymographie	45
3.5.2.1	Proben	45
3.5.2.2	Reagenzien	45
3.5.2.3	Materialien und Geräte	46
3.5.2.4	Durchführung	46
3.5.3	ELISA	46
3.5.3.1	Proben	46
3.5.3.2	Reagenzien	47

3.5.3.3	Materialien und Geräte	47
3.5.3.4	Durchführung	47
3.5.4	suPAR-Bindungsassay	48
3.5.4.1	Proben	48
3.5.4.2	Reagenzien	48
3.5.4.3	Materialien und Geräte	49
3.5.4.4	Durchführung	49
3.5.5	Western Blot	50
3.5.5.1	Proben	50
3.5.5.2	Reagenzien	50
3.5.5.3	Materialien und Geräte	52
3.5.5.4	Durchführung	52
3.6	Histologische Verfahren	54
3.6.1	Lungenfärbung mit X-Gal	54
3.6.2	Auszählung der Lungenmetastasen	54
3.7	Statistische Analyse	54
4	Ergebnisse	55
4.1	Herstellung der Zelllinien	55
4.1.1	Herstellung der suPAR-überexprimierenden Zelllinie suPAR 16	56
4.1.2	Herstellung der TIMP-1-überexprimierenden Zelllinie Timp 5	57
4.1.3	Klonierung eines für hTIMP-1 kodierenden eukaryotischen Expressionsvektors mit Blastocidin-Resistenz	59
4.1.4	Herstellung der suPAR und TIMP-1 überexprimierenden Zelllinie LD 14	60
4.2	Charakterisierung der Zelllinien	63
4.2.1	Fortgesetzte Expression von suPAR in suPAR 16 und LD 14	63
4.2.2	Von den Zelllinien suPAR 16 und LD 14 sezerniertes suPAR bindet aktiv an uPA	65
4.2.3	Fortgesetzte TIMP-1 Überexpression in Timp 5 und LD 14	67
4.2.4	Erhöhte Expression von uPA in den transfizierten Zelllinien	69
4.2.5	Leicht erhöhte Expression von PAI-1 in der Zelllinie suPAR 16	70
4.2.6	Transfektion und Selektion führen zu erhöhter MMP-2- und MMP-9- Sekretion	71

4.2.7	Die Überexpression von suPAR und TIMP-1 hat keinen Einfluß auf die Proliferationsgeschwindigkeit der transfizierten Zelllinien <i>in vitro</i>	73
4.3	Invasives Potential der transfizierten Zelllinien <i>in vitro</i>	75
4.4	Metastatisches Potential der Zelllinien <i>in vivo</i>	77
4.4.1	Etablierung eines Metastasierungsmodells	77
4.4.1.1	Spontanes Metastasierungsmodell	78
4.4.1.2	Experimentelles Metastasierungsmodell	79
4.4.1.3	Vergleich spontanes vs. experimentelles Metastasierungsmodell	80
4.5	Vergleich der Überexpression von suPAR, TIMP-1 und suPAR und TIMP-1 im experimentellen Metastasierungsmodell <i>in vivo</i>	80
4.5.1	Reduktion der Lungenmetastasierung durch Überexpression von suPAR und TIMP-1	81
4.6	Einfluss der Überexpression von suPAR und TIMP-1 auf die Proteaseexpression <i>in vivo</i>	83
4.6.1	Sekretion von MMP-9 und MMP-2 <i>in vivo</i>	83
4.6.2	Sekretion von uPA <i>in vivo</i>	86
4.7	Kombination der Überexpression von TIMP-1 und der Behandlung mit monoklonalem Antikörper (anti-uPAR-mAK) im experimentellen Metastasierungsmodell <i>in vivo</i>	89
5	Diskussion	92
5.1	Herstellung und Charakterisierung der Zelllinien	92
5.2	Invasives Potential der transfizierten Zelllinien <i>in vitro</i>	95
5.3	Metastatisches Potential der Zelllinien <i>in vivo</i>	98
5.3.1	Vergleich der Zelllinien im experimentellen Metastasierungsmodell	99
5.3.1.1	suPAR inhibiert <i>in vivo</i> die Lungenmetastasierung von HT 1080-Zellen	99
5.3.1.2	TIMP-1 inhibiert die Lungenmetastasierung von HT 1080-Zellen <i>in vivo</i>	101
5.3.1.3	Die kombinierte Überexpression von suPAR und TIMP-1 <i>in vivo</i> reduziert die Lungenmetastasierung von HT 1080-Zellen, erzielt aber keinen Synergismus	103

5.4	Die Proteaseexpression in vivo ist unabhängig von der Überexpression von suPAR und TIMP-1	105
5.5	Effektive Reduktion der Lungenmetastasierung durch Kombination der Überexpression von TIMP-1 und der Behandlung mit monoklonalem, gegen uPAR gerichteten Antikörper (anti-uPAR-mAK)	108
	5.5.1.1 Ausblick: Therapeutische Anwendung von TIMP-1 und suPAR	108
6	Literaturverzeichnis	110
7	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	120
8	Abkürzungsverzeichnis	123
9	Danksagung	124
10	Lebenslauf	126

1 Zusammenfassung

Für die Invasion und Metastasierung von soliden Tumoren ist die proteolytische Aktivität des urokinase-typ Plasminogen-Aktivator-Systems (uPA-System) und des Matrix-Metalloproteinase-Systems (MMP-System) von großer Bedeutung. Durch die Interaktion von uPA- und MMP-System kann eine Vielzahl von Proteasen aktiviert werden und im Zusammenspiel können alle Komponenten der Extrazellulären Matrix abgebaut werden, so dass Invasion, Extravasation und Migration von Tumorzellen in das Zielgewebe ermöglicht werden. Um die Bindung von uPA an seinen membranständigen Rezeptor und die nachfolgende Plasminaktivierung zu verhindern, wurde das Gen für eine lösliche (*soluble*) Form des uPA-Rezeptors (suPAR) in Fibrosarkomzellen stabil transfiziert und überexprimiert. Um die Matrix Metalloproteinasen (MMPs) zu inhibieren, wurde ein natürlicher Inhibitor der MMPs, *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*, Typ 1 (TIMP-1), stabil transfiziert und überexprimiert. Es wurde ein eukaryotischer Expressionsvektor kloniert, um sequentiell beide Gene zu transfizieren und eine Zelllinie zu erhalten, die sowohl suPAR als auch TIMP-1 stabil überexprimierte. Die Zelllinien wurden charakterisiert und *in vitro* im Invasionsassay und *in vivo* im experimentellen Metastasierungsmodell mit der Ausgangszelllinie HT 1080 verglichen. *In vitro* zeigte sich im Matrigel-Invasionsassay eine Reduktion des invasiven Potentials der Zelllinie, die suPAR überexprimierte. Für die Zelllinie, die TIMP-1 überexprimierte sowie die Zelllinie, die beide Transgene überexprimierte, konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden. Um das metastatische Potential der Zelllinien *in vivo* zu untersuchen, wurde ein experimentelles Metastasierungsmodell der Fibrosarkomzelllinie HT 1080 etabliert. Die Überexpression von suPAR oder TIMP-1 *in vivo* reduzierte die Zahl der Lungenmetastasen signifikant. Die kombinierte Expression beider Transgene führte zu einer geringeren Reduktion der Lungenmetastasierung. Wurde zusätzlich zur Überexpression von TIMP-1 ein monoklonaler, gegen den uPA-Rezeptor gerichteter Antikörper (uPAR-mAK) eingesetzt, war die Zahl der Lungenmetastasen im Vergleich zur Einzelbehandlung weiter reduziert. Es konnte hier erstmals gezeigt werden, dass die Überexpression von suPAR und TIMP-1 die Zahl der Lungenmetastasen einer Fibrosarkomzelllinie im experimentellen Metastasierungsmodell signifikant senken konnte. Die kombinierte Inhibition von uPA- und MMP-System im Fibrosarkommodell führte zu einer weiteren Inhibition der Metastasierung. Es konnte *proof of principle* erbracht werden, dass die kombinierte Inhibition von uPA- und MMP-System die Lungenmetastasierung effizienter hemmt als die Inhibition eines Systems allein.

2 Einleitung

2.1 Invasion und Metastasierung: Bedeutung verschiedener Proteasesysteme

Invasion und Metastasierung von soliden Tumoren ist ein komplexer Prozess, der aus der sequentiellen Abfolge vieler einzelner Schritte besteht. Im Wirtsgewebe stellt die extrazelluläre Matrix eine natürliche Barriere für die Tumorzellen dar. Um in das Stroma des umgebenden Gewebes eindringen zu können, müssen die Zellen des entarteten Zellklons die Proteine der Basalmembran und die der extrazellulären Matrix degradieren (Barsky et al., 1983). Mit Hilfe von Proteolyse kann es den Zellen dann gelingen, sich vom Primärtumor zu lösen, in Blut- und/oder Lymphbahnen zu invadieren, zu disseminieren, aus dem Gefäßsystem zu extravadiieren und entfernt vom Primärtumor Metastasen zu setzen (Liotta et al., 1980). Dabei ist eine hochregulierte Aktivität von Proteasen mit Hilfe von aktivierenden Faktoren und ihren natürlich vorkommenden Inhibitoren entscheidend, da die Proteolyse einerseits die Migration durch Auflösung von Matrices bzw. Membranen ermöglichen muss, andererseits exzessive Proteolyse den Tumorzellen die Wanderungsunterlage entzieht (Reijerkerk et al., 2000). Für die erfolgreiche Metastasierung eines Tumors ist außerdem entscheidend, dass die Zellen in der Blut- bzw. Lymphbahn überleben und nach dem erfolgreichen Eindringen in ein neues Gewebe erneut beginnen, zu proliferieren.

Verschiedene proteolytische Systeme tragen zu der proteolytischen Aktivität an der Grenzfläche zwischen Wirts- und Tumorgewebe bei. Das Plasminogen Aktivator System vom urokinase-Typ (uPA-System) und die Matrix Metalloproteinasen (MMPs), zum Teil auch die Cathepsine, insbesondere Cathepsin B, L und D, interagieren in der Aktivierung von Komponenten der anderen Systeme und kooperieren in der Degradation der extrazellulären Matrix (Andreasen et al., 1997; Noel et al., 1999). Viele *in vitro* und *in vivo*-Studien konnten zeigen, dass dabei insbesondere das uPA-System und das MMP-System von Bedeutung sind und Komponenten der einzelnen Systeme neben den etablierten prognostischen Faktoren wie der Tumorgröße, der Histomorphologie, dem *Nuclear Grading*, der S-Phase-Fraktion und dem Hormonrezeptorstatus klinisch prognostische Bedeutung haben.

2.2 Das uPA-System

Das uPA-System besteht aus mehreren Komponenten. Hierzu zählen uPA, eine Serinprotease, uPAR, der membranständige Rezeptor für uPA, Plasminogen, das Substratzymogen, das zu Plasmin aktiviert werden kann, und die Serin Protease Inhibitoren (Serpine) Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) und Plasminogen Aktivator Inhibitor 2 (PAI-2).

2.2.1 uPA

uPA ist eine Serinprotease und besteht aus drei Domänen: einer aminoterminalen wachstumsfaktorähnlichen Domäne (*growth factor-like domain*, GFD), der *Kringle*-Domäne und der Serin-Protease-Domäne. uPA wird in der Einzelkettenform (*single chain form*) als pro-uPA sezerniert (Petersen et al., 1988). Eine Vielzahl von Proteasen, einschließlich Plasmin, Thermolysin, Kallikrein und den Cathepsinen B and L, können uPA in die enzymatisch aktive zweikettige (*two-chain-uPA = high molecular weight-uPA = HMW-uPA*) Form umwandeln und so aktivieren. uPA wiederum kann durch Spaltung Plasminogen zu Plasmin aktivieren. Die proteolytische Aktivität ist am 3'-terminalen Ende lokalisiert, das 5'-terminale Ende des uPA bindet an den uPA-Rezeptor (Appella et al., 1987; Magdolen et al., 1996). Diese Bindungssequenz liegt innerhalb einer Domäne, die strukturelle Ähnlichkeit mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) aufweist und zusammen mit dem angrenzenden Kringle (*kringle*) als aminoterminales Eragment (ATF) bezeichnet wird. uPA induziert Zellproliferation (Fischer et al., 1998; Stepanova et al., 1999) und stimuliert über mehrere intrazelluläre Signalwege einschließlich des Ras-*extracellular signal-regulated kinase* (ERK)-Signalwegs Migration, Wachstum und Invasivität von Tumorzellen (Reuning et al., 1998; Blasi, 1999a; Chapman et al., 1999; Aguirre-Ghiso et al., 2003). HT 1080-Zellen sezernieren hohe Mengen an uPA im Vergleich zu anderen Zelllinien wie NIH 3T3-Fibroblasten oder den Mammakarzinom- Zelllinien MDA 231 oder MDA 435 (eigene Daten).

Daneben spielt auch Plasminogen Aktivator vom Gewebetyp (*tissue-type plasminogen activator* = tPA) für die Aktivierung von Plasmin im Gefäßsystem eine entscheidende Rolle. tPA wird von den HT 1080-Zellen exprimiert, aber nicht sezerniert (Stephens et al., 1989).

2.2.2 uPA-Rezeptor

uPAR ist der membranständige Rezeptor des uPA (Roldan et al., 1990). Der aus drei homologen Domänen bestehende Rezeptor ist über einen Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) in der äußeren Zellmembran verankert. Alle drei Domänen sind für die Bindung von uPA erforderlich (Ploug, 1998). uPAR kann vom GPI-Anker gespalten werden, dies ist ein Mechanismus der Regulation der Regulation proteolytischer Aktivität an der Zelloberfläche (Wilhelm et al., 1999). Diese Spaltung des uPAR-Rezeptors könnte das erhöhte Vorkommen einer löslichen (*soluble*) Variante des uPA-Rezeptors (suPAR) im Serum von Patienten mit malignen Tumoren erklären (Brunner et al., 1999).

Nicht an den membranständigen Rezeptor gebundenes uPA weist nur eine sehr geringe intrinsische Aktivität auf (Petersen et al., 1988). Die Bindung an den uPA-Rezeptor ist keine Voraussetzung für die proteolytische Aktivität von uPA, allerdings erfolgt die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin sehr viel effizienter, wenn uPA an uPAR gebunden ist (Ellis, 1996). Wie oben ausgeführt, kann das entstandene Plasmin wiederum uPA aktivieren, und dieser Prozess der gegenseitigen Aktivierung wird durch die Kolo-kalisation von uPA und Plasminogen auf der Tumorzelloberfläche durch die Bindung von uPA an den membranständigen Rezeptor uPAR erleichtert (Ellis et al., 1991). Die entstehende proteolytische Aktivität wird so an der Tumorzelloberfläche fokussiert. Dieser Mechanismus ist nicht nur für epidermale Zelllinien, sondern auch für die Fibrosarkom-Zelllinie HT 1080 beschrieben worden (Stephens et al., 1989). HT 1080-Zellen weisen neben hohen Leveln an uPA auch hohe Level uPAR auf. Der Großteil der uPAR-Moleküle ist frei und für die Bindung von uPA verfügbar (Nguyen et al., 1999).

2.2.3 Plasminogen Aktivator Inhibitoren (PAIs)

Die Plasmin Aktivator Inhibitoren Typ 1 und Typ 2, regulieren die proteolytische Aktivität des uPA-Systems. PAI-1 inhibiert die proteolytische Aktivität von uPA und bildet mit uPA/uPAR einen Komplex. Dieser Komplex (uPA/uPAR/PAI-1) wird durch die (Tumor-) Zelle internalisiert, was zur Initiation von Zellproliferation führt. Der uPA-Rezeptor wird „recycelt“ und gelangt wieder zur Tumorzell-Oberfläche (Nykjaer et al., 1997). So bleibt die proteolytische Aktivität auf die Tumorzelloberfläche fokussiert. Die Menge an auf der Zelloberfläche vorhandenem uPAR wird durch die Internalisation reduziert, da ein Teil des vorhandenen uPAR nicht recycelt wird.

Neben der Bedeutung als antiproteolytischer Faktor interferiert PAI-1 mit der Bindung des uPA/uPAR-Komplexes sowie Integrinen an Vitronektin (Stefansson and Lawrence, 1996), einem Bestandteil der extrazellulären Matrix. Dadurch reguliert PAI-1 die Balance zwischen Adhäsion und Lösung von Zellkontakten, die für die Migration von Zellen entscheidend ist (Lauffenburger and Horwitz, 1996).

Plasminogen Activator Inhibitor Typ 2 (PAI-2) ist hauptsächlich intrazellulär lokalisiert (von Heijne et al., 1991), und bindet nicht an Vitronektin oder andere Proteine der extrazellulären Matrix (Mikus et al., 1993). Es ist gezeigt worden, dass HT 1080-Zellen keine mRNA des PAI-2-Gens exprimieren (Laug et al., 1993).

2.2.4 Plasmin

Plasmin spielt eine zentrale Rolle für das proteolytische Potential der Tumorzellen. Plasmin ist eine Serinprotease, die durch die Aktivierung von Plasminogen entsteht. *In vitro* ist kein Plasminogen im Zellkulturmedium vorhanden; diesem muss Plasminogen erst zugesetzt werden: entweder in Form von Plasminogen enthaltendem Serum, oder in gereinigter Form. *In vivo* liegt dagegen eine große Menge Plasminogen vor (Robbins and Summaria, 1976; Isseroff and Rifkin, 1983). Die Zelllinie HT 1080 sezerniert kein Plasminogen, kann aber über die Sekretion von uPA und dessen Bindung an uPAR exogenes Plasminogen aktivieren (Stephens et al., 1989). So aktiviertes Plasmin ist, solange es an die Zelloberfläche gebunden ist, vor der Inaktivierung durch im Serum vorhandene Inhibitoren, wie z.B. α 2-Antiplasmin, geschützt (Stephens et al., 1989).

Plasmin ist in der Lage eine Vielzahl von Proteinen der Extrazellulären Matrix direkt zu spalten. Darüber hinaus findet durch Plasmin die Interaktion mit dem MMP-System statt. Über die direkte Aktivierung von pro-MMP-3 zu MMP-3 (Stromelysin 1) durch Plasmin werden *in vitro* MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B) aktiviert (Mazzieri et al., 1997; Ramos-DeSimone et al., 1999). *In vivo* ist die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin durch uPA, und die direkte Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen durch das entstandene Plasmin beschrieben worden, die zu Degradation von Elastin und Kollagen in der Extrazellulären Matrix (ECM) führte (Carmeliet et al., 1997). Durch diese vielfältigen Funktionen nimmt Plasmin eine Schlüsselstellung für die Generierung proteolytischer Aktivität ein.

2.2.5 Bedeutung des uPA-Systems für die Invasivität *in vitro*

Infolge der Interaktion von uPA mit seinem membranständigen Rezeptor entsteht durch die Aktivierung von uPA und Plasmin proteolytische Aktivität, die auf der Tumorzelloberfläche fokussiert ist. Um die Invasivität von Tumorzellen durch die Basalmembran *in vitro* zu testen, haben viele Arbeitsgruppen den Matrigel-Assay (synonym: *Boyden Chamber Assay*) verwendet. Hierbei wird eine Membran mit einer nachgebildeten Basalmembran, dem Matrigel, beschichtet. Matrigel ist ein lösliches Basalmembran-Extrakt aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Tumor (EHS-Tumor) der Maus (Kleinman et al., 1982). Die wesentlichen Komponenten der Matrigel-Matrix sind Laminin, Kollagen IV, Entaktin und Heparansulfat-Proteoglykan. Diese beschichtete Membran hängt in einer Kammer, die mit Medium gefüllt ist, das ein Chemoattraktant, meist fötales Kälberserum (FCS), enthält. Die Zellen werden auf dieser Membran ausgesät und wandern durch das Matrigel auf die andere Seite der Membran. Nach 24-72 Stunden kann die Anzahl der Zellen, die erfolgreich in die Basalmembran invadiert und auf die andere Seite der Membran migriert sind, quantifiziert werden.

Bereits frühe Studien konnten zeigen, dass uPA durch die Bindung an seinen Rezeptor die Invasivität von Tumorzellen *in vitro* steigert, die Unterdrückung der Interaktion von uPA und uPAR dagegen zu verminderter Invasivität *in vitro* führt (Cajot et al., 1989; Hollas et al., 1991; Ossowski et al., 1991). Hierbei nimmt die Generierung von Plasmin eine zentrale Rolle ein (Meissauer et al., 1991; Meissauer et al., 1992). Plasmin ist in der Lage, eine Vielzahl von Substraten einschließlich Kollagen Typ IV zu spalten (Mackay et al., 1990), als auch die Aktivierung des MMP-Systems zu initiieren (s.o.). Die zentrale Rolle von Plasmin wird unterstrichen durch die wirksame Inhibition der Matrigel-Invasion durch Plasmin-Inhibitoren (Cajot et al., 1989; Meissauer et al., 1991; Meissauer et al., 1992).

Für die Invasivität ist zusätzlich zur Aktivierung der proteolytischen Kaskade die Aktivierung zahlreicher Signalwege von großer Bedeutung, die durch die Bindung von uPA an uPAR initiiert wird (Huang et al., 2000; Blasi and Carmeliet, 2002). Hierdurch kommt es zu verstärkter Migration und Proliferation der Zellen, was zur erhöhten Invasivität beiträgt (Webb et al., 2000).

2.2.6 Bedeutung des uPA-Systems für die Metastasierung *in vivo*

Klinische Studien konnten einen Zusammenhang zwischen der Überexpression von uPA, uPAR und PAI-1 und schlechter Prognose für verschiedene Krebsarten zeigen (Brustkrebs, Ovarialkrebs, Gebärmutterhalskrebs, Prostatakrebs, Blasenkrebs, nichtkleinzelliger Lungenkrebs, Magenkrebs und Weichteilsarkome) (Reuning et al., 1998). uPA ist bereits ein etablierter prognostischer Marker bei Brust- und Ovarialkrebs (Liotta et al., 1991; Del Vecchio et al., 1993; Andreasen et al., 1997; Fischer et al., 1998; Harbeck et al., 2001; Konecny et al., 2001; Duffy, 2002a; Duffy, 2002b). Die Inhibition des uPA-Systems, insbesondere der Interaktion von uPA mit seinem Rezeptor uPAR, stellt daher einen Angriffspunkt (*Target*) antimetastatischer Therapie dar (Mazar, 2001).

Durch die Bindung von von uPA an uPAR und die Aktivierung von Plasmin wird proteolytische Aktivität im perizellulären Raum produziert. Durch die Zelloberflächen-gebundene Aktivierung von pro-uPA durch Plasmin wird die proteolytische Aktivität potenziert. So gelingt es den Tumorzellen, sich aus ihrem Zellverband zu lösen und in entfernte Organe zu gelangen, wo sie Metastasen bilden können (Andreasen et al., 1997; Reuning et al., 1998; Andreasen et al., 2000). Für die erfolgreiche Bildung von Metastasen ist *in vivo* auch die Aktivierung intrazellulärer Signalwege wichtig, die zu verstärkter Migration (Blasi, 1999a) und einem Überwiegen der Proliferation gegenüber einem Zustand ruhender Zellen (*Dormancy*) (Aguirre-Ghiso et al., 2001) führen. Im Unterschied zu *in vitro*-Untersuchungen spielt *in vivo* auch Chemotaxis eine Rolle. Sowohl uPA als auch der (abgespaltene) uPA-Rezeptor weisen chemotaktische Wirkung auf (Blasi, 1999b), Entzündungszellen im Tumorgewebe können uPA produzieren und so perizellulär zu verstärkter uPA/uPAR- Bindung beitragen (Andreasen et al., 1997; Hildenbrand et al., 1998). Allerdings ist im xenogenen Tiermodell zu beachten, dass murines uPA nicht an den humanen uPAR binden kann (Estreicher et al., 1989). Viele Studien konnten *in vivo* zeigen, dass die Inhibition von uPA (Ossowski and Reich, 1983; Rabbani et al., 1995; Wilhelm et al., 1995) oder uPAR (Mohan et al., 1999; Magdolen et al., 2001), und somit der Interaktion von uPA mit uPAR, zu einer Reduktion der Metastasierung führte. Unsere Gruppe konnte zeigen, dass die Inhibition von uPA zu einer Reduktion von Lungenmetastasen und verlängertem Überleben in einem xenogenen Fibrosarkomzell- Modell führte (Schweinitz et al., 2004). Eine weitere Strategie ist die Inhibition der Interaktion von uPA mit uPAR durch die Überexpression eines löslichen (*soluble*) uPA-Rezeptors, suPAR. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Überexpression von suPAR, das als „Abfänger“ (*scavenger*) für uPA

diente, die Metastasierung in einem Brustkrebsmodell sowie in einem Ovarialkarzinom-Modell signifikant reduzierte (Krüger et al., 2000; Lutz et al., 2001).

2.2.7 suPAR

Die lösliche Form des uPA-Rezeptors, suPAR (*soluble urokinase-type plasminogen activator receptor*), entspricht dem nativen uPAR bis auf wenige Aminosäuren, an denen der GPI-Anker an das Protein geheftet ist (Wilhelm et al., 1994). Wird suPAR exprimiert, kann durch den löslichen Rezeptor uPA im perizellulären Raum abgefangen werden. So findet eine kompetitive Hemmung der uPA-Bindung an uPAR statt, die die proteolytische Aktivität an der Tumorzelloberfläche stark reduziert.

Mehrere *in vitro*- und *in vivo*-Studien konnten zeigen, dass die Disruption der uPA/uPAR-Bindung durch die Überexpression einer löslichen Form des uPA-Rezeptors, suPAR, effektiv ist. suPAR inhibiert *in vitro* die Invasivität von Zellen im Matrigel-Assay (Wilhelm et al., 1994) und reduziert die uPA-vermittelte Stimulation der Proliferation von Ovarialkarzinomzellen (Lutz et al., 2001). Jo et al. konnten zeigen, dass suPAR die Aktivierung von ERK, eines intrazellulären Signalwegs, verhindert und Zellwachstum und Invasivität im Matrigel vermindert.

Unsere Arbeitsgruppe hatte gezeigt, dass *in vivo* das Primärtumorwachstum in einer Ovarialkarzinomzelllinie durch die stabile Überexpression von suPAR stark reduziert werden konnte. Daneben kam es durch die Überexpression zu einer Reduktion und Verkleinerung von Peritonealmetastasen (Lutz et al., 2001). In einer Brustkrebszelllinie führte die stabile Überexpression von suPAR *in vitro* zu verminderter gelatinolytischer und kollagenolytischer Aktivität sowie *in vivo* zu einer Reduktion des Primärtumorwachstums und zu einer Reduktion von Lungenmetastasen (Krüger et al., 2000).

Die stabile Überexpression von suPAR stellt somit eine wirksame Strategie zur Inhibition der durch die Bindung von uPA an uPAR vermittelten Effekte dar.

2.3 Das MMP-System

Die Familie der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) besteht aus 24 derzeit bekannten MMPs (Nagase and Woessner, 1999; Visse and Nagase, 2003). Diese lassen sich aufgrund ihres Aufbaus in sechs Untergruppen unterteilen. Die natürlichen Inhibitoren der MMPs sind die *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMPs), von denen 4 Formen (TIMP-1 bis TIMP-4) bekannt sind.

2.3.1 Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Familie von Zink-abhängigen Proteasen. Matrix-Metalloproteinasen werden als inaktive Zymogene synthetisiert. Sie werden in inflammatorischen Zellgranula gespeichert und in der inaktiven pro-Form sezerniert. Sie befinden sich an der Zelloberfläche, verankert in der Zellmembran, oder an andere Proteine an der Zelloberfläche oder in der EZM gebunden. Aufgrund ihres Aufbaus sowie aufgrund der Substratspezifität können die MMPs in 6 Untergruppen aufgeteilt werden (Visse and Nagase, 2003):

- 1) Matrilysine, die strukturell die Minimalform der MMPs darstellen und aus einem Signalpeptid, der Propeptid-Domäne und der katalytischen Domäne mit dem charakteristischen Zink-bindenden Motiv bestehen. Zu den Matrilysinen zählen MMP-7 und MMP-26.
- 2) Gelatinasen, die zusätzlich drei Elemente einer Typ II Fibronectin-Domäne innerhalb der katalytischen Domäne sowie eine Hemopexin-Domäne aufweisen und nichtfibrilläre Kollagene und die Kollagene Typ IV und V sowie Laminin, Elastin und weitere Komponenten der ECM, insbesondere der Basalmembran (BM), spalten können. Hierzu zählen MMP-2 und MMP-9.
- 3) Stromelysine, die eine Hemopexin-Domäne aufweisen und Komponenten der ECM spalten und weitere MMPs aktivieren können. Hierzu zählen MMP-3, MMP-10 und MMP-11.
- 4) Kollagenasen, die ebenfalls eine Hemopexin-Domäne aufweisen und die Kollagene Typ I, II und III sowie weitere Moleküle der Extrazellulären Matrix (ECM) spalten können, hierzu zählen MMP-1, MMP-8, MMP-13 und MMP-18.
- 5) MMPs vom Membran-Typ, die weiter unterteilt werden können in Typ I Transmembran-Proteinasen (MMP-14, MMP-15, MMP-16 und MMP-24) und in

Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-verankerte Membranproteinasen (MMP-17 und MMP-25).

- 6) Andere MMPs, die den oben genannten Gruppen nicht zugeordnet werden können wie MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-22 und MMP-28. Innerhalb dieser Gruppe stellt MMP-23 eine Besonderheit dar, da es im Unterschied zu allen anderen MMPs kein *Cysteine-Switch*-Motiv aufweist.

MMPs können unterschiedliche Substrate spalten und im Zusammenspiel alle Bestandteile der EZM abbauen:

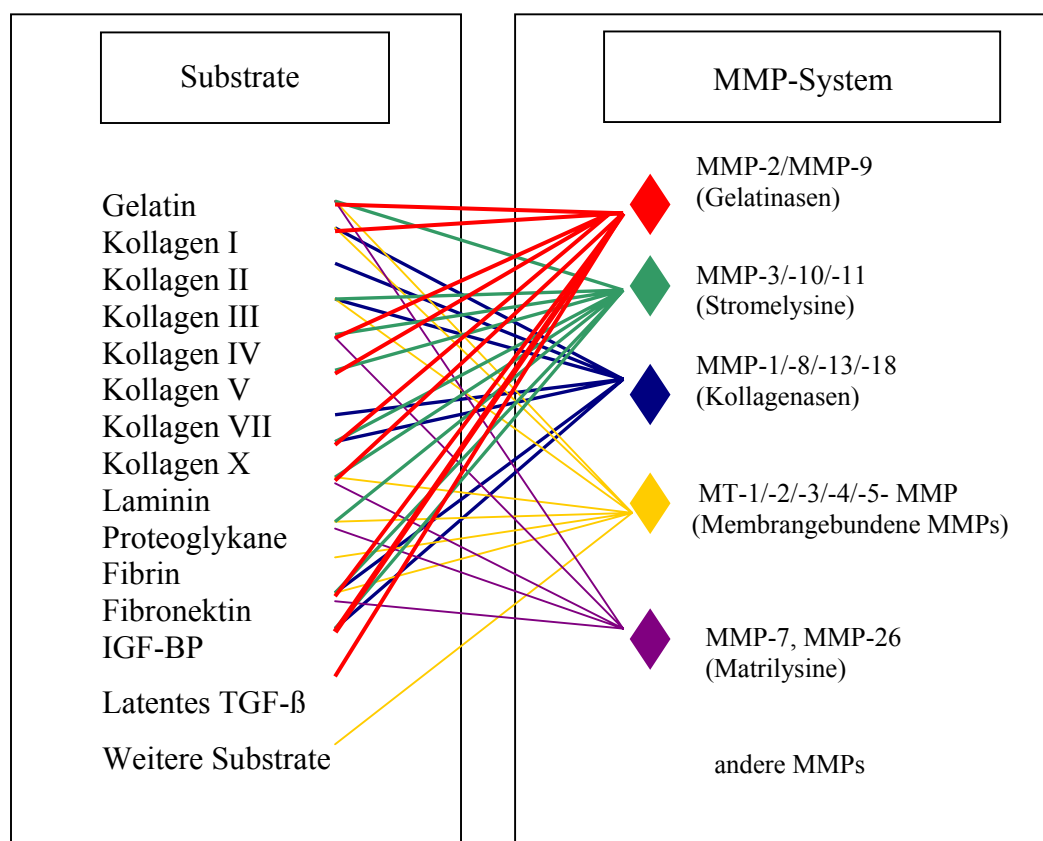


Abb.1: Substratspezifität und Zusammenspiel der verschiedenen Matrix-Metalloproteinasen Matrix-Metalloproteinasen spalten bestimmte Substrate. Andere MMPs können die resultierenden Spaltprodukte weiter degradieren. Im Zusammenspiel können die Bestandteile der Extrazellulären Matrix von den MMPs degradiert werden.

Die MMPs werden als inaktive Zymogene synthetisiert und sezerniert. Die Proform enthält in der abspaltbaren Pro-Domäne Cystein, das an ein zentrales Zinkatom im katalytischen Zentrum bindet. Durch initiale Proteolyse wird die Cystein- Zink- Interaktion destabilisiert und es kommt zur Abspaltung des Pro-Peptids, was als *Cysteine-Switch* bezeichnet wird (Springman et al., 1990). Hierdurch erfolgt eine strukturelle Formänderung des Enzyms

(Becker et al., 1995), wodurch Substrate ans aktive Zentrum binden und gespalten werden können.

Die Bedeutung der MMPs für die Metastasierung maligner Tumore wurde zuerst von Liotta et al. herausgestellt, die die Proteolyse als einen der entscheidenden Schritte bei der Tumorzell-Invasion beschrieben (Liotta et al., 1980). Die Arbeit zeigte, dass das metastatische Potential mit der enzymatischen Degradation der Basalmembran korrelierte. Bald darauf wurden die ersten MMPs identifiziert (Matrisian et al., 1985; Goldberg et al., 1986) und die proteolytische Aktivität konnte den Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 zugeordnet werden. MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B) spielen eine Schlüsselrolle für die Invasion maligner Tumoren (Coussens et al., 2002).

2.3.1.1 MMP-2

Die Gelatinase MMP-2 wird als inaktive pro-Form sezerniert. Die Sekretion von MMP-2 erfolgt nicht nur durch die Tumorzellen selbst, sondern erfolgt auch durch Stromazellen (Sugiura et al., 1998). Die Aktivierung erfolgt an der Tumorzelloberfläche und erfordert die Hilfe von TIMP-2. pro-MMP-2 bildet über die C-terminale Domäne einen Komplex mit der C-terminalen Domäne von TIMP-2. Dadurch wird die Bindung des N-terminalen Endes von TIMP-2 an die MMP-assoziierte Protease MMP-14 (MT-1-MMP) beschleunigt. Das so zellgebundene pro-MMP-2 wird durch ein weiteres, freies MMP-14 aktiviert (Toth et al., 2000; Bigg et al., 2001). Die Aktivität der Metalloproteinase MMP-14 und die folgende Aktivierung von MMP-2 kann durch TIMP-1 nicht inhibiert werden (Murphy and Knauper, 1997). Aktives MMP-2 findet sich dabei an der Invasionsfront der Tumorzellen (Monsky et al., 1993).

Sowohl MMP-2 und MMP-9 sind in der Lage, die Komponenten der Basalmembran abzubauen und sind verantwortlich für die abschließende Degradation von fibrillärem Kollagen, nachdem dieses durch Kollagenasen gespalten wurde.

2.3.1.2 MMP-9

MMP-9 wird ebenfalls als inaktive pro-Form sezerniert. Die Sekretion erfolgt sowohl durch Tumorzellen als auch durch Stromazellen (Sugiura et al., 1998) sowie inflammatorische Zellen (Nielsen et al., 1996), die sich in der unmittelbaren Umgebung des Tumors befinden oder den Tumor infiltrieren. Die Sekretion der Metalloproteinasen durch die umgebenden Stromazellen kann dabei von dem Tumor induziert werden (Segain et al., 1996). Das sezernierte MMP-9 bindet über den Rezeptor CD44 an die Zelloberfläche und trägt so zur proteolytischen Aktivität an der Tumorzelloberfläche bei (Yu and Stamenkovic, 1999).

Liegt MMP-9 im Überschuss vor, kann es ein Homodimer formen, das nicht mit TIMP-1 komplexieren kann. Das MMP-9-Heterodimer kann durch andere Proteasen, wie MMP-3 oder Plasmin, aktiviert werden (Murphy and Knäuper, 1997). Als Aktivierungsmechanismus ist die Aktivierung von MMP-9 durch eine proteolytische Kaskade beschrieben worden, an deren Anfang die Generierung von Plasmin durch die Interaktion von uPA mit uPAR steht. Plasmin aktiviert MMP-3, das wiederum MMP-9 aktiviert (Ramos-DeSimone et al., 1999). Dieser Prozess ist an die Zelloberfläche gebunden (Mazzieri et al., 1997) und fokussiert die proteolytische Aktivität an der invasiven Front der Tumorzellen. Neben diesem Mechanismus ist die Aktivierung von MMP-2 und MMP-9 durch MMP-13 beschrieben worden, das wiederum durch MMP-14 (MT1-MMP) aktiviert werden kann (Murphy and Knäuper, 1997; Johansson et al., 1999).

Neben den proteolytischen Funktionen sind für MMP-9 auch Funktionen für die Angiogenese (Bergers et al., 2000) und proliferationsfördernde Funktionen (Coussens et al., 2000) beschrieben worden.

2.3.2 Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs)

Die Aktivierung von pro-MMPs sowie auch aktive MMPs können durch die natürlichen Inhibitoren der MMPs, die *Tissue Inhibitors of Metallo-Proteases* (TIMPs), gehemmt werden. Derzeit sind vier endogene TIMPs (TIMP-1 bis TIMP-4) bekannt, die viele grundlegende Übereinstimmungen aufweisen, sich aber in ihrem Expressionsmuster und in ihrer Wirkung unterscheiden.

Sie bestehen strukturell aus einem jeweils 3 „loops“ aufweisenden C-terminalen Ende und einem N-terminalen Ende. Die antiproteolytischen Funktionen der TIMPs finden ihr morphologisches Korrelat im Bereich von 125 Aminosäuren am N-terminalen Ende (Murphy et al., 1991). Die C-terminale Subdomäne (65 Aminosäuren) interagiert mit der katalytischen Domäne einiger MMPs und mit den Hemopexin-Domänen von MMP-2 und MMP-9 (Brew et al., 2000; Visse and Nagase, 2003), weist daneben aber auch Funktionen für Proliferation, Angiogenese und Apoptose auf.

TIMP-1 ist ein lösliches Protein, was sich ubiquitär findet; TIMP-2 und TIMP-4 sind lösliche Proteine, die sich an der Zelloberfläche befinden; TIMP-3 findet sich in der EZM. Alle 4 TIMPs inhibieren die aktiven Formen aller bisher untersuchten MMPs, wobei die Bindungskonstante jeweils im picomolaren Bereich liegt (Baker et al., 2002). Entsprechend den TIMPs im Gewebe findet sich im Plasma α 2-Makroglobulin, das die MMPs inhibiert.

2.3.2.1 TIMP-1

TIMP-1 wird von einer Vielzahl von Zelltypen sezerniert und inhibiert die meisten MMPs. Es weist allerdings nur eine geringe Inhibition der MMPs vom Membrantyp (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-21) und MMP-19 auf (Gomez et al., 1997; Visse and Nagase, 2003). Neben der antiproteolytischen Funktion übt TIMP-1 noch weitere Wirkungen aus:

Initial wurde TIMP-1 als Protein mit *erythroid potentiating activity* identifiziert, d.h. als Protein mit einer proliferationsstimulierenden Wirkung auf die roten Vorläuferzellen des Knochenmarks (Gasson et al., 1985). Unabhängig davon konnte TIMP-1 als Proteaseinhibitor identifiziert werden (Carmichael et al., 1986). Es konnte gezeigt werden, dass TIMP-1 an die Zelloberfläche bindet und in den Zellkern transloziert wird, die Bedeutung dieses Vorgangs ist bisher nicht bekannt (Ritter et al., 1999). TIMP-1 hat außerdem eine proliferationsfördernde Wirkung auf ein breites Spektrum von Zelllinien (Hayakawa et al., 1992). Die antiapoptotische Wirkung von TIMP-1 ist ebenfalls zelltypspezifisch. Durch die Expression von TIMP-1 werden Fas-Ligand-abhängige und –unabhängige Apoptose gehemmt (Ritter et al., 1999). Während die antiproteolytische Funktion dem N-terminalen Ende zuzuordnen sind, liegen die anderen beschriebenen Wirkungen im Bereich des C-Terminus (Chesler et al., 1995).

Für die antiproteolytische Funktion hat das C-terminale Ende nur eine indirekte Funktion: Das C-terminale Ende von TIMP-1 kann an MMP-9 binden, wodurch die Bindung an das N-terminale Ende beschleunigt wird (Olson et al., 1997). Die Interaktion von TIMP-1 und pro-MMP-9 verhindert die Aktivierung von pro-MMP-9 zu aktivem MMP-9 (Okada et al., 1992), daneben kann TIMP-1 über das N-terminale Ende auch aktives MMP-9 inhibieren (Murphy et al., 1991). Der TIMP-1/MMP-9-Komplex kann durch die Bindung an LDL-Rezeptor-ähnliches Protein (LDL-RP) internalisiert werden (Hahn-Dantona et al., 2001).

2.3.3 Bedeutung des MMP-Systems für die Invasivität *in vitro*

Viele Studien konnten die Bedeutung des MMP-Systems für die Invasivität *in vitro* zeigen. Insbesondere für die erhöhte Expression der Matrix Metalloproteinasen MMP-2, -3, -13 und -14 (MT1-MMP) konnte eine Korrelation mit erhöhter Invasivität *in vitro* gezeigt werden, während die Überexpression von TIMP-1 die Invasivität senken konnte (Egeblad and Werb, 2002). Inhibitorstudien wiesen auf die Bedeutung insbesondere der Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) für die Invasion *in vitro* hin. So konnte die Invasivität einer Liposarkomzelllinie durch die Aktivierung von MMP-2 und MMP-9 gesteigert werden (Pazzaglia et al., 2004), das invasive Verhalten einer Glioblastomzelllinie durch die Inhibition von MMP-9 reduziert werden (Kondraganti et al., 2000). In einer Fibrosarkomzelllinie ist neben MMP-2 und MMP-9 die Bedeutung von MMP-3, MMP-8, MMP-12, MMP-13 und MMP-20 beschrieben worden. Die Inhibition dieser Metalloproteinasen durch Bisphosphonate resultierte in mindestens gleicher oder stärkerer Reduktion der Invasivität durch Matrigel wie ein Gelatinase-spezifischer Inhibitor (Heikkila et al., 2002). Für die HT 1080-Fibrosarkomzelllinie ist insbesondere die Bedeutung von MMP-2 und MMP-14 (MT1-MMP) herausgestellt worden (Deryugina et al., 1997; Maquoi et al., 1998). Hierbei ist die Aktivierung von MMP-2 als entscheidender Faktor für die Invasivität der Fibrosarkomzellen beschrieben worden. Die Aktivierung hängt vom Verhältnis des perizellulären MMP-2:TIMP-2:MMP-14 (MT1-MMP) ab, wodurch die Aktivierung entweder fast vollständig oder nur zum Teil erfolgen kann. Dabei ist das stärkste Invasionspotential im Fall einer nicht vollständigen Aktivierung von MMP-2 beschrieben worden (Deryugina et al., 1997). Durch die Interaktion von MMP-2 mit Kollagen Typ IV, einem Bestandteil der Basalmembran, wird die Aktivierung von MMP-2 erhöht (Maquoi et al., 2000). Diese wiederum ist in der Lage, zu gesteigerter Invasivität *in vitro* beizutragen.

2.3.4 Bedeutung des MMP-Systems für die Metastasierung *in vivo*

In vielen Tiermodellen konnte *in vivo* die Rolle des MMP-Systems für Tumorwachstum, Metastasierung, und Angiogenese gezeigt werden (Bergers et al., 2000; Nelson et al., 2000). Hierbei werden die Matrix-Metalloproteinasen zwar auch von den Tumorzellen produziert, zunehmend ist aber die Bedeutung von inflammatorischen Zellen bzw. Stromazellen in der unmittelbaren Umgebung des Tumors für die Sekretion der Matrix-Metalloproteinasen deutlich geworden (Coussens and Werb, 2001; Vihinen and Kahari, 2002). Eine Rolle für Matrix-Metalloproteinasen für Invasivität und Metastasierung *in vivo* konnte für Brustkrebs, Lungenkrebs, kolorektale Karzinome, Prostatakarzinome, Pankreaskarzinome und Ovarialkarzinome gezeigt werden (Nelson et al., 2000).

Besondere Bedeutung für die Metastasierung im experimentellen Metastasierungsmodell kommt den Gelatinasen zu, wie verschiedene Studien zeigen konnten. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die antimetastatische Effizienz synthetischer MMP-Inhibitoren mit der Gelatinase-Spezifität der Inhibitoren korrelierte (Arlt et al., 2002). In MMP-2 und MMP-9 *Knock-out*-Mäusen, war die Zahl der Lungenmetastasen im experimentellen Metastasierungsmodell einer Melanomzelllinie bzw. einer Lungenkarzinomzelllinie reduziert (Itoh et al., 1998; Itoh et al., 1999). Für die Metastasierung in die Lunge nach intravenöser (i.v.) Injektion von Tumorzellen eines Blasenkarzinoms, Lungenkarzinoms sowie von Fibrosarkomzellen ist die Bedeutung von MMP-2, MMP-9 und MMP-14 beschrieben worden (Bernhard et al., 1994; Kawamata et al., 1995; Tsunozuka et al., 1996). Durch die Inhibition von MMP-9 konnte die Metastasierung in einem Sarkommodell unterdrückt werden (Hua and Muschel, 1996).

Indirekte Hinweise auf die Relevanz des MMP-Systems für die Metastasierung ergeben sich auch aus TIMP-Studien. Die Überexpression von TIMP-1 in transgenen Mäusen konnte sowohl die spontane Metastasierung in einem Lymphommodell als auch die experimentelle Metastasierung in einem Fibrosarkommodell signifikant reduzieren (Krüger et al., 1997; Krüger et al., 1998a). Im Unterschied zur hier vorgelegten Arbeit wurde in der zitierten Arbeit die TIMP-1-Expression des Wirtes moduliert. Die Überexpression von TIMP-1 im Wirtsgewebe führte zu einer Reduktion der sonst obligaten Entstehung von Hirnmetastasen im syngenem (Maus-) Fibrosarkommodell. Bisher konnte allerdings nicht gezeigt werden, dass die experimentelle Metastasierung im HT 1080-Fibrosarkommodell durch die alleinige Überexpression von TIMP-1 im Tumorgewebe reduziert werden konnte.

2.4 Zusammenspiel von uPA-System und MMP-System

Durch die Interaktion von uPA-System und MMP-System entsteht eine proteolytische Kaskade, an deren Anfang die Generierung von Plasmin durch die Interaktion von uPA mit uPAR steht (Abb.2). Plasmin spielt eine zentrale Rolle, indem es zum einen in der Lage ist, selbst Komponenten der ECM zu degradieren; zum anderen aktiviert es pro-MMP-3, das seinerseits verschiedene Substrate der ECM degradiert, und pro-MMP-9 aktivieren kann. Weitere MMPs, wie MMP-7, -10 und -13 werden ebenfalls aktiviert, ebenso wie MMP-2, das durch Plasmin gespalten und durch die Interaktion mit TIMP-2 und MMP-14 (MT1-MMP) vollständig aktiviert werden kann (in der Grafik nicht dargestellt). Im Zusammenspiel des uPA-Systems und des MMP-Systems können durch die Aktivierung der verschiedenen Proteasen alle Bestandteile der Extrazellulären Matrix degradiert werden.

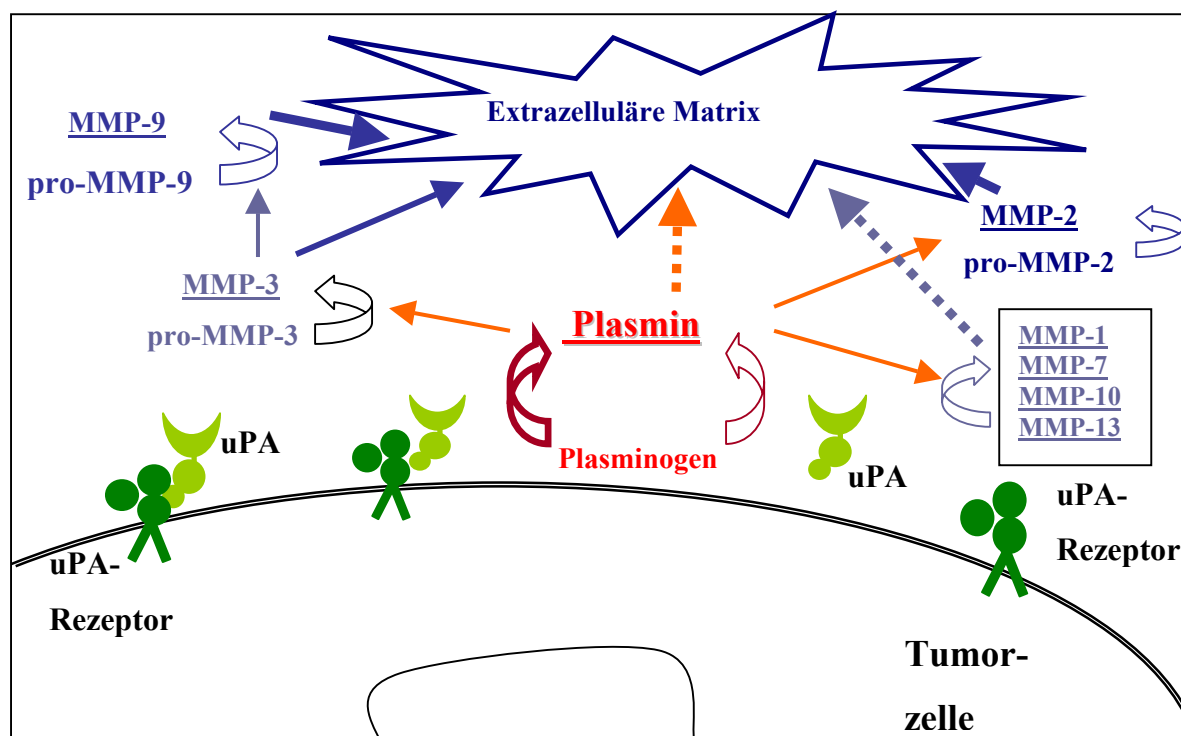


Abb.2: Kooperation zwischen uPA-System und MMP-System

Plasmin, das zentrale Effektorprotein des uPA-Systems, entsteht aus Plasminogen an der Tumorzelloberfläche, katalysiert durch die Interaktion von uPA/uPAR. Plasmin interagiert mit dem MMP-System und aktiviert verschiedene pro-MMPs zu aktiven MMPs, die ihrerseits in der Lage sind, weitere MMPs zu aktivieren. Im Zusammenspiel können alle Bestandteile der ECM gespalten werden.

Viele Autoren konnten die Bedeutung des Zusammenspiels von uPA-System und MMP-System herausstellen. Kim et al. konnten zeigen, dass für die Intravasation sowohl uPA als auch MMPs, insbesondere MMP-9, benötigt wurden (Kim et al., 1998). Der (synthetische) MMP-Inhibitor Marimastat konnte trotz hoher MMP-9-Level die Intravasation verhindern, ebenso wurde die Intravasation durch die Herunterregulation von uPA und uPAR verhindert. Somit wurde der Nachweis für das Erfordernis beider Systeme für die Intravasation geführt. Lund et al. konnten zeigen, dass für die Wundheilung, einen Prozess, der viele pathophysiologische Übereinstimmungen mit dem Prozess des malignen Wachstums aufweist, die Aktivität des uPA-Systems sowie des MMP-Systems entscheidend sind. Wurde entweder nur das uPA-System oder nur das MMP-System inhibiert, erfolgte eine verzögerte Wundheilung, wurden jedoch beide Systeme inhibiert, konnte die Wundheilung nicht erfolgen (Lund et al., 1999). Hieraus, wie aus dem Verständnis des Zusammenspiels beider Systeme (s.o.), ergibt sich der Ansatz dieser Arbeit, statt der Inhibition nur eines Systems nun einen kombinierten inhibitorischen Ansatz zu wählen.

In Studien konnten bereits die Effizienz dieses Ansatzes gezeigt werden (Lakka et al., 2003). Ein Ansatz unserer Gruppe, die Invasion und Metastasierung einer Ösophaguskarzinomzelllinie und einer Ovarialkarzinomzelllinie durch die kombinierte Behandlung mit einem Serinprotease-Inhibitor und einem Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor zu hemmen, erbrachte jedoch keinen synergistischen Effekt (Della Porta et al., 1999). Eine kombinierte Inhibition des uPA-Systems und des MMP-Systems durch Überexpression der löslichen Form des uPA-Rezeptors, suPAR, und TIMP-1 ist bisher nicht gezeigt worden.

Die Zelllinie HT 1080 ist eine menschliche Fibrosarkomzelllinie, die aus einem metastatischen Tumor gewonnen wurde (Rasheed et al., 1974). Sie wurde ausgewählt, da sie uPA und uPAR exprimiert, die ein *Target* darstellen, und über autokrine und parakrine uPAR-abhängige Zellsignalwege verfügt. Für die HT 1080-Zelllinie ist die Expression von MMP-2 und MMP-9 gezeigt worden, deren Aktivierung Plasmin-abhängig ist (Baramova et al., 1997). Zusätzlich exprimiert die Zelllinie HT 1080 den natürlichen Inhibitor TIMP-1.

Um die Zellen *in vivo* vom Wirtsgewebe unterscheiden zu können, sollten die Zellen *lacZ*-markiert werden. Das Plasmid *lacZ* kodiert für β -Galaktosidase, das β -D-Galakto-Pyranoside spalten kann und dadurch zu einer Blaufärbung *lacZ*-markierter Zellen führt. Diese genetische Markierung der Tumorzellen erlaubt es im Metastasierungsmodell *in vivo*, nach Anfärbung selbst einzelne Zellen im Wirtsgewebe zu detektieren und Metastasen zu quantifizieren (Krüger et al., 1998b).

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Zusammenspiel von uPA-System und MMP-System ist entscheidend für die Invasivität und die Metastasierung maligner Tumore. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die proteolytische Aktivität von Tumorzellen durch eine kombinierte Inhibition des uPA-Systems sowie des MMP-Systems zu reduzieren. Die Inhibition des MMP-Systems sollte durch die Überexpression und Sekretion von TIMP-1 erfolgen, die Inhibition des uPA-Systems durch die Überexpression und Sekretion einer löslichen (*soluble*) Form des uPA-Rezeptors (suPAR), der als *scavenger* für uPA diene und die Bindung von uPA an den membranständigen Rezeptor verhindern sollte.

Die humane Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 sollte stabil mit dem Plasmid für TIMP-1 bzw. suPAR, bzw. mit beiden Vektoren für TIMP-1 und suPAR transfiziert werden. Die Expression der Transgene sollte in den entstandenen Zelllinien überprüft werden und hinsichtlich der Expression weiterer Komponenten des uPA-Systems bzw. des MMP-Systems sowie des Proliferationsverhaltens charakterisiert werden.

Im Matrigel-Invasionsassay sollte das invasive Verhalten *in vitro* überprüft werden. Hier sollte unter kontrollierten Bedingungen die Invasion durch eine rekonstituierte Basalmembran nachgebildet und zwischen der Ausgangszelllinie HT 1080 und den Tumorzelllinien, die suPAR, TIMP-1 oder suPAR und TIMP-1 überexprimierten, verglichen werden.

In einem Metastasierungsmodell in Nacktmäusen sollte *in vivo* das metastatische Potential der transfizierten Tumorzellen mit der Ausgangszelllinie verglichen werden. Nur *in vivo* kann der komplexe Prozess der Interaktion zwischen den Tumorzellen und dem Wirtsgewebe und sein Einfluss auf die Metastasierung sichtbar gemacht werden. Mögliche Unterschiede des Verhaltens der Zelllinien *in vitro* und *in vivo* sollten herausgestellt werden. Dazu sollte das Proteasenprofil und der Einfluss der Metastasierung auf das Proteasenprofil *in vivo* untersucht werden.

Es konnte nicht prinzipiell ausgeschlossen werden, dass es durch wiederholte stabile Transfektion und Selektion zu Veränderungen gekommen war, die das metastatische Verhalten der Zelllinie beeinflusste, die suPAR und TIMP-1 kombiniert überexprimierte. Um unabhängig von diesen möglichen Effekten die Wirksamkeit der kombinierten Inhibition von uPA-System und MMP-System zu untersuchen, sollte zusätzlich die Kombination aus stabiler Überexpression von TIMP-1 und der Behandlung mit einem monoklonalen, gegen uPAR gerichteten Antikörper *in vivo* getestet werden und die Ergebnisse verglichen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Mäuse

3.1.1 Mausstamm

Für das Tierexperiment wurden 7-10 Wochen alte, athymische immundefiziente weibliche CD1 nu/nu Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Germany) verwendet.

3.2 Metastasierungsmodell

3.2.1 Experimentelle Metastasierung in die Lunge

3.2.1.1 Injektion

Die Zellen der Ausgangszelllinie HT 1080 und der Zelllinien, die suPAR (suPAR 16), TIMP-1 (Timp 5) oder suPAR und TIMP-1 (LD 14) überexprimierten, befanden sich bei Beginn der Tierexperimente jeweils in der logarithmischen Wachstumsphase und waren ca. 70-80% konfluent. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit EDTA abgelöst und in DMEM-Komplettmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde durch Auszählen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und aufgrund der Zellzahl das errechnete Volumen aliquotiert und abzentrifugiert. DMEM-Komplettmedium wurde abgesaugt und das Zellpellet in PBS resuspendiert, wobei auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt wurde.

Die Zellen wurden auf Eis in den Tierstall transportiert. Die Mäusen wurden für kurze Zeit von einer Infrarot-Lampe bestrahlt, damit sich die Schwanzvenen weiteten. Es wurden 1×10^6 Tumorzellen in 200 μ l in PBS in die Schwanzvene injiziert. Alle Injektionen wurden von PD Dr. Krüger vorgenommen.

3.2.1.2 Behandlung mit monoklonalem uPAR-Antikörper

Die Behandlung erfolgte mit einem von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Pharma Research, Penzberg, zur Verfügung gestellten monoklonalen, gegen uPAR gerichteten Antikörper 1.H2.10A3, lot number 010329-03. Die Proteinkonzentration betrug 2,31 mg/ml in 20 mM NaPO₄, 100 mM NaCl, pH = 7,4.

Am Tag vor der Zellinjektion wurde eine Vorbehandlung der Behandlungsgruppe mit 80 mg/kg i.p. durchgeführt. Die tägliche Behandlung erfolgte mit einer Dosis von 28 mg/kg.

3.2.1.3 Durchführung und Euthanasie

Die Versorgung der Tiere wurde durch die Tierpfleger des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung entsprechend den Standardroutinen gewährleistet. Die Euthanasie der Tiere erfolgte durch CO₂.

3.2.1.4 Gewinnung von Serum

Unmittelbar nach der Tötung des jeweiligen Tieres wurde der Bauchsitus geöffnet, die Aorta durchtrennt und mit Hilfe einer Pasteurpipette Blut entnommen. Das Blut wurde im geschlossenen Eppendorfgefäß bei RT belassen. Nachdem das Blut geronnen war, wurde es 2 x 30min/2000rpm/4°C zentrifugiert, das Serum abgenommen und bei -20°C gelagert.

3.2.1.5 Gewinnung der Gewebeproben

Der Brustkorb wurde eröffnet und die Lunge herauspräpariert. Der linke Lungenflügel wurde im Ganzen fixiert und X-Gal gefärbt; die vier Lappen der rechten Lungenhälfte wurden in drei Teile zerteilt, in jeweils ein Kryogefäß (1,8 ml Kryotubes, Nunc Nalge) gegeben und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die aus dem rechten Lungenflügel stammenden Gewebeproben wurden bei -80°C gelagert.

3.3 Zellbiologische Verfahren

3.3.1 Zellkultur

3.3.1.1 Zelllinie

Die Zelllinie HT 1080 wurde von Agnès Noël, Laboratoire de Biologie et du Développement, Université de Liège, zur Verfügung gestellt. Dipl.-Biol. Charlotte Kopitz, Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, München, transfizierte die Zelllinie mit dem *lacZ*-Gen. Die *lacZ*-transfizierte HT 1080 - Zelllinie wurde als Ausgangszelllinie für alle weiteren Transfektionen und Experimente benutzt.

3.3.1.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator (Forma Scientific CO₂ Water Jacketed Incubator, Thermo Life Sciences, Staufen, Germany) kultiviert.

Die Zellen wurden auf beschichteten Zellkulturschalen in DMEM- Komplettmedium kultiviert und dreimal pro Woche in der logarithmischen Wachstumsphase (70-80% Konfluenz) passagiert, d.h. 1 x mit 5 ml PBS gewaschen, mit 1 ml EDTA abgelöst und in insgesamt 10 ml Medium neu ausgesät.

3.3.1.3 Zellkultur-Reagenzien

DMEM-Komplettmedium

500 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (1x) Biochrom KG, Berlin, Germany
mit 50 ml Fötalen Kälberserum, Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Germany
mit 5 ml 1M Hepes Pufferlösung, Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Germany
mit 1 ml 140 mM Asparagin/ 270 mM Arginin
mit 5 ml 200 mM L-Glutamin, Biochrom KG, Berlin, Germany

Phosphate Buffered Saline w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} (PBS) Biochrom KG, Berlin, Germany

EDTA (0,053 mM, Versene) seromed Biochrom KG, Berlin, Germany

1:50 verdünnt in PBS

Für die Zymogramme wurde serumfreies Medium verwendet.

Serumfreies DMEM

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (1x) 500 ml, Biochrom KG, Berlin, Germany
Hepes Pufferlösung 1M 5 ml, Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Asparagin/Arginin 1 ml,
L-Glutamin 5 ml, Biochrom KG, Berlin, Germany

Im Matrigel-Invasionsassay wurde DMEM mit 0,1% (w/v) Bovinem Serumalbumin (BSA) verwendet.

Serumfreies DMEM, 0,1% BSA

Serumfreies DMEM

0,1% (w/v) BSA Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany

Das Medium wurde nach Einwiegen des BSA sterilfiltriert (Filter mit Porengröße 0,22 μm).

3.3.2 Transfektion und Selektion

3.3.2.1 Transfektion mit *suPAR* bzw. *timp-1*

Die Transfektionen wurden mithilfe des Transfektionsreagens Lipofectamine[®] (LipofectAMINE Reagent, 2 mg/ml; Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Germany) durchgeführt.

Am Tag vor der Transfektion wurden 1×10^5 Zellen in 5 ml DMEM Komplettmedium auf einer 6 cm-Schale ausgesät. Am Tag der Transfektion erfolgte 2 Stunden vor der Transfektion ein Mediumwechsel. Für jede Transfektion wurden 10 µl Lipofectamin[®] und 1 µg DNA (pcDNA3.1/hygro/suPAR bzw. pcDNA3.1/hygro/TIMP-1) zu je 300 µl OptiMEM (OptiMEM Reduced Serum Medium (1x); Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Germany) pipettiert. Das Gemisch für die Kontrolltransfektion enthielt keine DNA. Das OptiMEM/Lipofectamine[®]-Gemisch wurde zu dem DNA/OptiMEM-Gemisch hinzupipettiert und 15 min inkubiert. Das Medium wurde von den zu transfizierenden Zellen abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit 2,5 ml PBS gewaschen. Nach der Inkubationszeit wurde die Transfektionslösung auf die Zellen gegeben und 6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 5 ml Komplett-DMEM zugefügt. Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (Trypsin/EDTA, Biochrom KG, Berlin, Germany) gesplittet (Verhältnis 1:4) und mit 400 µg Hygromycin/ml Medium selektiert. Bei der Transfektion lag die DNA in Plasmidform vor. Das Transgen kann sowohl episomal als auch stabil in die zelleigene DNA integriert transkribiert und translatiert werden. Der Selektionsdruck durch die Zugabe des Zellgiftes Hygromycin bewirkte, dass nur die Zellen überlebten, in welchen die transfizierte DNA in das Zellgenom integriert hatte.

Das Selektionsmedium wurde zweimal pro Woche gewechselt, bis nach ca. drei Wochen keine Zellen auf der Schale der Negativkontrolle mehr zu sehen waren, und sich in den Schalen mit den Transfektionen Einzelkolonien gebildet hatten. So konnte ausgeschlossen werden, dass nach der Transfektion noch Zellen überlebten, die das Transgen nicht stabil ins Genom integriert hatten.

Die einzeln liegenden Kolonien wurden mit Hilfe von Klonierungszyklindern abgelöst und amplifiziert. Dabei wurde dem DMEM-Komplettmedium kein Selektionsgift mehr beigemischt.

3.3.2.2 Transfektion einer suPAR-transfizierten Zelllinie mit *timp-1*

Die aus der suPAR-Transfektion hervorgegangene Zelllinie suPAR 16 wurde nach dem oben beschriebenen Protokoll mit dem für TIMP-1 kodierenden Vektor pJNhT-1 (pcDNA3.1/blast/TIMP-1), der ein Blastocidin-Resistenzgen enthielt, transfiziert. Im Unterschied zu obigem Protokoll wurden am Vortag der Transfektion 2×10^5 Zellen ausgesät und in der Transfektion 0,5 µg DNA eingesetzt. Die Selektion erfolgte mit 10 µg Blastocidin/ml DMEM. Bereits nach ca. 10 Tagen waren keine Zellen der Negativkontrolle mehr vorhanden, und es hatten sich Einzelkolonien gebildet. Diese wurden mithilfe von Klonierungszyklindern isoliert und amplifiziert.

Da die Selektionszeit kurz war (10 Tage im Vergleich zu 21 Tagen bei Selektion mit Hygromycin) und die Selektion mit Blastocidin nicht in jedem Fall die Isolierung scharf abgegrenzter Einzelkolonien erlaubte, wurde zusätzlich zu der Isolation mithilfe von Klonierungszyklindern eine Subklonierung mittels *Limiting Dilution* durchgeführt. Hierbei wurden durch eine sehr große Verdünnung (1 Zelle/500 µl), bei der jeweils 100 µl je well in einer 96well-Platte ausplattiert wurden (rechnerisch 1 Zelle pro 5 wells entsprechend), einzelne Zellen klonal amplifiziert. Ist keine Isolierung sauber abgegrenzter Kolonien möglich, besteht die Gefahr, dass während der Passagierung ein Überwachsen der Zelllinie mit nicht transfizierten Zellen erfolgt. Eine Subklonierung mittels Limiting Dilution verhindert dies.

3.3.2.3 Limiting Dilution Klonierungsverfahren

Selektierte Zellen aus der Transfektion von suPAR 16 mit pcDNA6/blast/TIMP-1 wurden von einer 10cm - Zellkulturschale abgelöst. Die Zellsuspension mit einer Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml wurde in einer Verdünnungsreihe (jeweils 1:10) auf 2×10^0 Zellen/ml verdünnt. In eine 96well-Mikrotiterplatte wurden 100µl/well pipettiert, so dass rechnerisch eine Zelle pro 5 wells ausplattiert wurde. Es wurden drei 96well-Mikrotiterplatten ausplattiert.

3.3.3 Matrigel-Invasionsassay

3.3.3.1 Proben

Die Ausgangszelllinie HT 1080 und die Zelllinien suPAR 16, Timp 5 und LD 14 wurden getestet.

3.3.3.2 Reagenzien

Wachstumsfaktor-reduziertes Matrigel[®], Becton Dickenson, Cat. No. 356230,

Lot No. 003241, c = 11,89 mg/ml

DiffQuick Staining Set, Dade Behring AG, Marburg, Germany

PBS, DMEM 0,1% BSA, Komplett - DMEM (s.Zellkultur)

3.3.3.3 Materialien und Geräte

Einsätze für 24well-Platten (Falcon/Becton Dickenson, Porengröße 8 µm)

24well-Platte

weiche Tücher (z.B. Kleenex Kosmetiktücher)

Mikroskop (Zeiss Axiovert 25) mit Zählgitter

3.3.3.4 Durchführung

Die Oberfläche der Einsätze für 24well-Platten (Falcon/Becton Dickenson, Porengröße 8 µm) wurde mit 28,4 µg Matrigel/Einsatz beschichtet. Dazu wurde das Wachstumsfaktor-reduzierte Matrigel[®] (Becton Dickenson, Cat. No. 356230, Lot No. 003241, c = 11,89 mg/ml) zunächst bei 4°C aufgetaut, 2,4 µl Matrigel[®] mit 67,6 µl PBS pro Einsatz verdünnt und mittig über den Membranen der in einer 24well-Platte hängenden Einsätze aufgebracht. Zur Verfestigung wurde das Matrigel drei Stunden im Brutschrank inkubiert, anschließend ÜN in der geschlossenen ausgeschalteten Sterilbank getrocknet.

Am nächsten Tag wurde das Matrigel durch Zugabe von 200 µl DMEM 0,1% BSA rehydriert. Die Zellen wurden mit EDTA abgelöst, einmal mit DMEM 0,1% BSA gewaschen und auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Zwischen 24well-Platte und Einsatz wurden 750 µl Komplett-DMEM pipettiert; die Einsätze wurden mit 500 µl Zellsuspension (entsprechend 5×10^5 Zellen) befüllt und 48 Stunden im Zellkulturbrutschrank kultiviert.

Die Einsätze wurden aus dem 24well genommen, die Matrigel[®]-Beschichtung mit weichen Tüchern vorsichtig entfernt und die Zellen am Boden des Einsatzes mit dem DiffQuick Staining Set (Dade Behring AG, Marburg, Germany) gefärbt. Das DiffQuick Staining Set

stellt eine Möglichkeit dar, die Zellen rasch und einfach anzufärben. Dazu wurde der Einsatz 5 x 1 Sekunde lang mit dem Boden in die Fixierlösung getaucht, danach je 5 x 1 Sekunde in Färbelösung I bzw. II. Abschließend wurde das Insert 2-3 x in ddH₂O getaucht. Das Mikroskop (Zeiss Axiovert 25) wurde auf die Poren der Einsätze fokussiert und das Zählgitter mittig auf den oberen Rand des Einsatzes eingestellt. Das Zählgitter wurde ausgezählt, vertikal eine Gitterlänge nach unten verschoben und wiederum ausgezählt. Bei 10-facher Vergrößerung wurden so vertikal 5 Raster ausgezählt. Alle Ansätze wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.3.4 Färbung mit 5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl-β-D-Galaktopyranosid (X-Gal)

3.3.4.1 Proben

Die Ausgangszelllinie HT 1080 und die transfizierten Zelllinien suPAR 16, Timp 5 und LD 14.

3.3.4.2 Reagenzien

Herstellung der X-Gal Stammlösung

1 g 5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl-β-D-Galaktopyranosid (X-Gal)
in 25 ml Dimethylformamid lösen

Herstellung der X-Gal - Ausgangslösung

1,62 g K₃Fe (CN)₆
2,10 g K₄Fe (CN)₆ x 3 H₂O
2 ml 1M MgCl₂
1 ml 10% Natriumdesoxycholat
2 ml 10% NP40
in 1 l PBS lösen

3.3.4.3 Materialien und Geräte

10 cm-Kulturschale

3.3.4.4 Durchführung

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, 5 Minuten lang mit 5 ml 0,2% Glutaraldehyd/ 2% Formaldehyd in PBS fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und über Nacht

mit 5 ml X-Gal Färbelösung ($c = 1 \text{ mg/ml}$) im Brutschrank inkubiert (Angaben bezogen auf eine 10 cm-Kulturschale). Die X-Gal-Färbelösung wurde durch 1:40-Verdünnung der Stammlösung mit der Ausgangslösung hergestellt.

3.4 Molekularbiologische Verfahren

3.4.1 Verwendete Plasmide

3.4.1.1 Plasmidvektor pLZ 12

pLZ 12 ist eukaryotischer Expressionsvektor, der für das *lacZ*-Gen kodiert. Die Expression steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Der Vektor enthält eine nuclear leading sequence (nls), eine Signalsequenz, mit deren Hilfe das Protein in den Kern gelangt. So ist das Genprodukt β -Galaktosidase vorwiegend im Kern lokalisiert.

pLZ 12 enthält ein Ampicillin-Resistenzgen (Beta-lactamase-Gen), wodurch die selektive Amplifikation in der Bakterienkultur (100 μg Ampicillin je ml LB-Medium) ermöglicht wird. Ein Neomycin-Resistenzgen (G 418; neo) ermöglicht die Selektion in eukaryotischen Zellen.

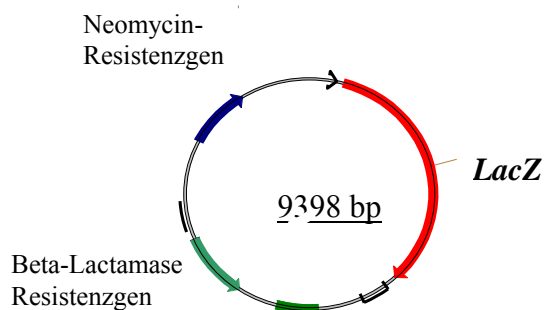


Abb. 3: Plasmidvektor *LacZ*

3.4.1.2 Plasmidvektor pcDNA3.1/*suPAR*/hygro

Der Vektor pcDNA3.1/hygro/*suPAR* ist ein eukaryotischer Expressionsvektor, der für den löslichen humanen Plasminogen Activator-Rezeptor vom Urokinase-Typ (uPAR) kodiert. Der lösliche uPA-Rezeptor (*soluble uPA-Receptor*, *suPAR*) unterscheidet sich vom nativen Rezeptor durch das Fehlen des Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Ankers (GPI-Anker) und einiger Aminosäuren am Carboxylende des Proteins, die beim nativen Protein das posttranslationale Anhängen des GPI-Ankers ermöglichen.

Das für *suPAR* kodierende Insert wurde durch PCR-Amplifikation der cDNA des uPA-Rezeptors generiert. Dazu wurden der N'-terminale Primer 5'-AATATAAGCTTGAGCTGCCCTCGCGAC-3' und der C'-terminale Primer 5'-TTTTATCTAGATTACCCACTGCGGTACTG-3' verwendet. Das gewonnene Insert wurde in den pRcRSV-Vector (Invitrogen, San Diego, CA) subkloniert und mit den Restriktionsenzymen *Hind* III und *Bam* HI in die Multiple Cloning Site des pcDNA3.1/hygro-Vektors (Invitrogen) kloniert. Die Klonierungen waren von Frau Katja Honert, Technische Assistentin, durchgeführt worden.

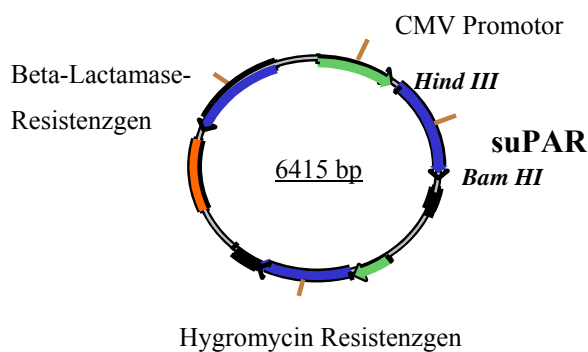


Abb. 4: Plasmidvektor pcDNA3.1/ *suPAR*/ hygro

Der pcDNA3.1/*suPAR*/hygro-Vektor enthält ein Ampicillin-Resistenzgen und ein Hygromycin-Resistenzgen. Das Ampicillin-Resistenzgen ermöglicht die selektive Amplifikation in der Bakterienkultur (100 µg Ampicillin je ml LB-Medium); das Hygromycin-Resistenzgen die Selektion in eukaryotischen Zellen.

3.4.1.3 Plasmidvektor pcDNA3.1/*timp-1*/hygro

Der verwendete Vektor enthält das native *timp-1*-Gen, das mit Hilfe von Bam HI und Hind III ausgeschnitten und in die Multiple Cloning Site (MCS) des pcDNA3.1/hygro-Expressionsvektors (Invitrogen) kloniert wurde (Klonierung durch Frau Katja Honert, Technische Assistentin).

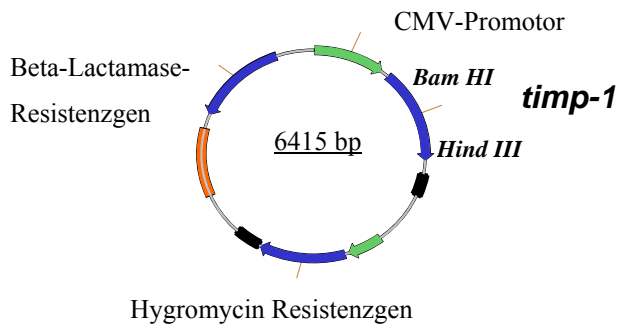


Abb. 5: Plasmidvektor pcDNA3/ *timp-1*/hygro

Auch dieser Vektor enthält ein Ampicillin-Resistenzgen zur Amplifikation in der Bakterienkultur sowie ein Hygromycin-Resistenzgen zur Selektion in eukaryotischen Zellen.

3.4.2 Klonierung des Plasmids pJNhT-1 (pcDNA6/ *timp-1*/blast)

3.4.2.1 Proben

Plasmid pcDNA3.1/*timp-1*/hygro (s.o.)

Plasmid pcDNA6/V5-HisA/blast, Invitrogen Ltd. Paisley, UK

3.4.2.2 Reagenzien

alkalische Phosphatase, New England Biolabs, Beverly, MA, USA

Restriktionsenzyme, New England Biolabs, Beverly, MA, USA

Ligase (T4), New England Biolabs, Beverly, MA, USA

Puffer (5x), New England Biolabs, Beverly, MA, USA

ddH₂O

QIAquick Gel Extraction-Kit

3.4.2.3 Materialien und Geräte

Eppendorfgeläße

Eiswanne

Wasserbad (16°C)

3.4.2.4 Durchföhrung

timp-1 wurde mit dem Restriktionsenzym Pme I aus dem pcDNA3.1/*timp-1*/hygro-Vektor ausgeschnitten und mit alkalischer Phosphatase (1 µl) im gleichen Ansatz eine Stunde lang bei 37°C dephosphoryliert. Anschließend wurde das *Insert* isoliert. Die Isolierung erfolgte mittels Gelextraktion nach der Anleitung des QIAquick Gel Extraction- Kit- Protokolls. Um die V5-HisA-Kassette aus dem pcDNA6/V5-HisA/blast-Vektor auszuschneiden, wurde der pcDNA6-Vektor mit PmeI verdaut und aufgereinigt. Der linearisierte und dephosphorylierte Vektor wurde mit dem *timp-1*-Insert aus dem pcDNA3.1/*timp-1*/hygro-Vektor ligiert, wobei das Insert mit 15-fachem molarem Überschuss (30 ng des Vektors, ca. 5400 bp; 58,33 ng des *Inserts*, ca. 700 bp, 1µl Ligase, ad 10 µl ddH₂O) eingesetzt wurde. Die Ligation erfolgte auf Eis, über Nacht wurde der Ligationsansatz bei 16°C inkubiert (Wasserbad, 16°C).

3.4.3 **Transformation der DNA-Vektoren**

3.4.3.1 Proben

Es wurden die oben genannten Plasmide verwendet.

DH10ß-Bakterien, elektroporiert (kompetent)

3.4.3.2 Reagenzien

Lucia-Bertani-Medium (LB-Medium)

1% Trypton

0,5% w/v Hefeextrakt

170 mM NaCl

3.4.3.3 Materialien und Geräte

Wärmeblock, Heat Incubator Shaker, Eppendorf, Hamburg, Germany

Inkubationsschüttler, Controlled Environment Incubator Shaker; New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA

3.4.3.4 Durchführung

10 µl des Ligationsansatzes von pcDNA6/*timp-1*/blast wurden in DH10β-Bakterien transformiert. Dazu wurden die durch Elektroporation kompetent gemachten und bei -80°C gelagerten Bakterien auf Eis aufgetaut. Der Ligationsansatz wurde hinzugegeben, kurz durch Antippen des Eppendorfgefäßes vermischt, und die Mischung 30 min auf Eis inkubiert. Die Mischung wurde anschließend für 120 Sekunden bei 42°C in den Wärmeblock gestellt, unmittelbar danach auf Eis abgekühlt. Den Ansatz wurde in 5 ml Lucia-Bertani-Medium (LB-Medium) gegeben und die Bakteriensuspension 1 Stunde bei 37°C im Inkubationsschüttler inkubiert. Danach wurden ca. 200 µl der Bakteriensuspension auf einer Agarplatte (LB-Medium mit 100 µg Ampicillin/ml) ausgestrichen und ÜN im Inkubationsschrank bei 37°C inkubiert.

3.4.4 **Minipräparation von DNA zur Restriktionsfragmentanalyse**

3.4.4.1 Proben

Einzelkolonien der transformierten Bakterien (s.o.)

3.4.4.2 Reagenzien

Mini Wizard® Plus Minipreps; Promega, Madison, WI, USA

D-(-)-alpha-Aminobenzylpenicillin; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany

LB-Medium (s.o.)

Restriktionsenzyme New England Biolabs, Beverly, MA, USA

3.4.4.3 Materialien und Geräte

Hettich Tischzentrifuge EBA 12; Hettich, Tuttlingen, Germany

Eppendorfgefäße

3.4.4.4 Durchführung

Für Minipräparationen wurde das Wizard® Plus Minipreps-Kit entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. Dieses Kit enthält Zellresuspensionslösung, Zellyse-Lösung, Neutralisationslösung, Resin-Lösung, Waschlösung sowie Spritzen und Aufreinigungssäulen. In 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurde eine Einzelkolonie von Bakterien angeimpft und ÜN bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. 2 ml der Bakteriensuspension

wurden 2 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde in 200 µl Zellresuspensionslösung resuspendiert, 200 µl Zelllyse-Lösung wurden zugegeben und das Eppendorfgefäß invertiert. 200 µl Neutralisationslösung wurden zugegeben, das Eppendorfgefäß geschwenkt, danach wurde das Lysat bei 10.000 g (14.000 rpm) 10 min abzentrifugiert.

Eine Minisäule (Aufreinigungssäule) wurde auf eine Spritze gesetzt und auf eine Öffnung des *Vacuum Manifolds* gesteckt. 1 ml der auf 37°C vorgewärmten resuspendierten Lösung wurde in jede Spritze gefüllt und der Überstand aus dem vorhergehenden Zentrifugationsschritt (s.o.) auf die Resin-Lösung gegeben. Hatte das Vakuum das Gemisch durch die Säule gezogen, wurde diese mit 2 ml Waschlösung gereinigt und die Minisäule in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, um überschüssige Waschlösung zu entfernen. Die Säule wurde auf ein neues, steriles Eppendorfgefäß überführt; 50 µl ddH₂O zugegeben und 1 min inkubiert. Durch einen Zentrifugationsschritt (20s/14.000 rpm/RT) wurde die DNA eluiert.

3.4.5 Restriktionsfragmentanalyse

3.4.5.1 Proben

Aus der Minipräparation gewonnene DNA (s.o.)

3.4.5.2 Reagenzien

Stammlösung Loading Buffer (6x)

60% v/v Glycerin

60 mM EDTA

0,05% w/v Bromphenolblau

pH=7,4

1 kB-*Ladder* bzw. 100 bp-*Ladder*, New England Biolabs, Beverly, MA, USA

Agarose Genetic Technology Grade; ICN, Aurora, Ohio, USA

TAE-Puffer

0,1% v/v Eisessig

40 mM Tris

1 mM EDTA

pH=8,3

Stammlösung Ethidiumbromid

10 mg/ml Ethidiumbromid

3.4.5.3 Materialien und Geräte

Elektrophoresekammer Hoefer HE33 Mini Horizontal Submarine Unit

Power Supply Power Pac 200, BioRad, München, Germany

3.4.5.4 Durchführung

Ein Aliquot der DNA wurde mit geeigneten Enzymen und den entsprechenden Puffern ca. 2 Stunden bei der angegebenen Temperatur, meist 37°C, verdaut. Nach entsprechender Inkubation wurde die DNA mit Ladungspuffer (*loading buffer*) vermischt. Mit den einzelnen Proben und einer DNA-Leiter geeigneter Größe (1 kB-*Ladder* bzw. 100 bp-*Ladder*, NEB) wurde ein 1%-iges Agarose-Gel, das 2 µl Ethidiumbromid enthielt, beladen und bei 70 V in einer Elektrophoresekammer aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte anhand des Vergleichs der Restriktionsfragmentgrößen der Proben mit den definierten Bandengrößen der DNA-Leiter (*DNA-Ladder*).

3.4.6 Maxipräparation zur Gewinnung der DNA zur Transfektion

3.4.6.1 Proben

Bakteriensuspension (s.o.)

3.4.6.2 Reagenzien

Qiagen Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Hilden, Germany

Isopropanol

ddH₂O

70% Ethanol

3.4.6.3 Materialien und Geräte

Schüttelinkubator (s.o.)

Zentrifugenreagenzgläser (aus Glas)

Beckman J2 HS Zentrifuge; Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA

3.4.6.4 Durchführung

250 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit 20 µl der Bakteriensuspension, die zur Restriktionsfragmentanalyse hergestellt worden war, angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Danach wurde die DNA nach dem Qiagen-Kit-Protokoll (enthält Resuspensionspuffer, Lysepuffer, Neutralisationspuffer, QBT-Puffer, QF-Puffer und QC-Puffer sowie Spritzen und Aufreinigungssäulen) aufgereinigt. Die Bakteriensuspension wurde bei 6000g/15min/4°C abzentrifugiert, in 10 ml Puffer 1 (Resuspensionspuffer) resuspendiert, anschließend Puffer 2 (Lysepuffer) hinzugefügt, nach 5 min Puffer 3 (Neutralisationspuffer) zugegeben und die sehr gut vermischte Lösung 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Lösung 30 min bei 20000g/ 4°C zentrifugiert (Beckman J2 HS Zentrifuge; Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA) und der Überstand auf eine Aufreinigungssäule (Qiagen-tip 500), die zuvor mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert worden war, gegossen. Die Säule wurde zweimal mit Puffer QC gewaschen, danach wurde die DNA mit 15 ml Puffer QF aus der Säule eluiert. Nach Zugabe von 10,5 ml Isopropanol wurde 30 min/ 15000 g/4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgegossen.

Das Pellet wurde mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen, 10 min/15000g zentrifugiert, und der Überstand abgegossen. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 300 µl ddH₂O aufgenommen.

3.4.7 Konzentrationsbestimmung der DNA

3.4.7.1 Proben

Aus der Maxipräparation gewonnene DNA (s.o.)

3.4.7.2 Reagenzien

ddH₂O

3.4.7.3 Materialien und Geräte

Spektrophotometer, Beckman DU R 640 Spectrophotometer, Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA

3.4.7.4 Durchführung

Die DNA wurde 1:100 in ddH₂O verdünnt und die Konzentrationsbestimmung photometrisch durchgeführt. Je Probe wurden 100 µl eingesetzt und die Absorption bei 260 nm bestimmt. Alle Bestimmungen wurden als Doppelansätze durchgeführt. Die Konzentration der DNA in der Probe errechnete sich aus der Absorption bei 260 nm, multipliziert mit dem Faktor 50 und der Verdünnungsstufe (hier jeweils 100), dividiert durch 1000. Man erhielt so die Konzentration der DNA in µg/ µl.

3.5 Biochemische Verfahren

3.5.1 MMP-Zymographie

3.5.1.1 Proben

Es wurden FCS-freie Zellüberstände oder Gewebehomogenate als Proben eingesetzt. FCS-freie Überstände wurden auf das gewünschte Volumen in der Speed-Vac eingeengt. Von den Gewebehomogenaten wurden 20 µg Protein/Probe eingesetzt. Alle Proben wurden im Volumenverhältnis 1:4 mit Probenpuffer gemischt.

Gewinnung der FCS-freien Zellüberstände für Zymographie

3 x 10⁵ Zellen wurden in 2 ml DMEM-Komplettmedium in einem 6well ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zweimal mit 2,5 ml PBS gewaschen, danach wurde 1 ml serumfreies Medium zugegeben. Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen, 10 min/2000rpm/4°C zentrifugiert, die Überstände aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Gewinnung der Lungengewebe-Homogenate für Zymographie

In einem Mini-Bead-Beater wurden die bei -80°C gelagerten Lungengewebestücke in je 300 µl 4°C kaltem Extraktionspuffer mithilfe von Zirkonia Beads durch zweimal 20 sec vortexen homogenisiert. Anschließend wurden die Proben 10 min/14000rpm/4°C zentrifugiert, die Überstände aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.5.1.2 Reagenzien

100 x Gelatine

10% (w/v) Gelatine

0,1 g Gelatine

1 ml ddH₂O

Lagerung bei -20°C

4 x Probenpuffer

250 mM Tris (1,5 g Tris/50 ml ddH₂O)

40% (v/v) Glycerin (20 ml Glycerin/ 50 ml ddH₂O)

8% (w/v) SDS (4 g SDS/ 50 ml ddH₂O)

1 Spatelspitze Bromphenolblau

10 x Laufpuffer

31 g Tris /1l ddH₂O
144 g Glycin /1l ddH₂O
10 g SDS /1l ddH₂O

Ausgangslösung: 10 x MMP-Inkubationspuffer

0,5 M Tris-HCl (30,3 g Tris-HCl /500 ml ddH₂O)
50 mM CaCl₂ x 2 H₂O (3,7 g CaCl₂ x 2 H₂O /500 ml ddH₂O)
2M NaCl (58,4 g NaCl /500 ml ddH₂O)
pH= 7,5

1 x MMP-Inkubationspuffer mit Triton-X-100 (Inkubationspuffer 1)

50 ml 10 x MMP-Inkubationspuffer
12,5 ml Triton X-100
437,5 ml ddH₂O

1 x MMP-Inkubationspuffer ohne Triton-X-100 (Inkubationspuffer 2)

50 ml 10 x MMP-Inkubationspuffer
450 ml ddH₂O

Coomassie-Färbelösung

30% (v/v) Isopropanol
10% (v/v) Eisessig
2 % (v/v) Coomassie (brilliant blue)

Entfärber

10% (v/v) Isopropanol
10% (v/v) Eisessig

Trenngel

(Angaben für ein Gel)

40% (w/v) Polyacrylamid (PAA) 1,25 ml
1,5 M Tris pH 8,6 1,25 ml

100 x Gelatine	50 µl
10% (w/v) SDS	50 µl
ddH ₂ O	2,375 ml
10% APS	25 µl
TEMED	2,5 µl

Die Gelatine wurde auf dem Wärmeblock bei 50°C unter Schütteln erwärmt. Das Gel polymerisierte ca. 1h aus, anschließend wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet, das ca. 45 min auspolymerisierte.

Sammelgel

(Angaben für ein Gel)

40% (w/v) Polyacrylamid (PAA)	0,625 ml
0,5 M Tris pH8,6	1,25 ml
10% (w/v) SDS	50 µl
ddH ₂ O	3,05 ml
10% APS	25 µl
TEMED	2,5 µl

3.5.1.3 Materialien und Geräte

Mini Protean Gelkammer, BioRad, München, Germany

Geldicke 0,75 mm; 10 Taschen

3.5.1.4 Durchführung

Der Lauf erfolgte bei 20 mA (Power Supply Power Pac 200, BioRad, München, Germany) über ca. 3,5 Stunden. Nach dem Lauf wurde das Gel zweimal 15 min bei RT in Inkubationspuffer 1 gewaschen, danach wurde der Puffer bis auf ca. 2 ml abgegossen. Es wurden 25 ml Inkubationspuffer 2 zugegeben und weitere 15 min bei RT gewaschen. Das Gel wurde anschließend für 19 Stunden bei 37°C im Brutschrank (WTB, Binder, Germany) inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Inkubationspuffer abgegossen, das Gel einmal mit Leitungswasser gespült und ca. 5 Stunden in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Abschließend wurde das Gel unter regelmäßigem Erneuern des Entfärbers solange entfärbt, bis der Farbkontrast optimal war.

3.5.2 PA-Zymographie

3.5.2.1 Proben

Es wurden Gewebehomogenate als Proben eingesetzt. Von den Gewebehomogenaten wurden 5 µg Protein/Probe eingesetzt. Alle Proben wurden im Volumenverhältnis 1:4 mit Probenpuffer gemischt. (Gewinnung der Lungengewebe-Homogenate für Zymographie s.o.)

3.5.2.2 Reagenzien

4 x Probenpuffer (s.o.)

10 x Laufpuffer (s.o.)

Trenngel

(Angaben für ein Gel)

40% (w/v) Polyacrylamid (PAA)	1,25 ml
1,5 M Tris pH 8,6	1,25 ml
100 x Gelatine	50 µl
10% (w/v) SDS	50 µl
ddH ₂ O	2,38 ml
Plasminogen (454 µg/ml)	41,5 µl
10% APS	25 µl
TEMED	2,5 µl

Das Gel polymerisierte ca. 1h aus, anschließend wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet, das ca. 45 min auspolymerisierte.

Sammelgel (s.o.)

Ausgangslösung: 10 x uPA-Inkubationspuffer

01 M Tris-HCl (60,55 g Tris-HCl /500 ml ddH₂O)
pH= 7,5

uPA-Inkubationspuffer mit Triton X-100 (Inkubationspuffer 1)

50 ml 10 x uPA-Inkubationspuffer

100 ml 0,5 M EDTA, pH=7,5

12,5 ml Triton X-100

337,5 ml ddH₂O

uPA-Inkubationspuffer ohne Triton X-100 (Inkubationspuffer 2)

50 ml 10 x Inkubationspuffer

100 ml 0,5 M EDTA, pH= 7,5

350 ml ddH₂O

Coomassie-Färbelösung (s.o.)

Entfärber (s.o.)

3.5.2.3 Materialien und Geräte

Mini Protean Gelkammer, BioRad, München, Germany

Geldicke 0,75 mm; 10 Taschen

3.5.2.4 Durchführung

Durch die Zugabe von Plasminogen konnten im PA-Zymogramm die Plasminogen-Aktivatoren (LMW-uPA, HMW-uPA, tPA) sichtbar gemacht werden. Durch die Zugabe von EDTA im Inkubationspuffer wurden die MMPs inaktiviert und somit im Gel nicht erkennbar. Die weitere Durchführung entsprach der MMP-Zymographie (s.o.).

3.5.3 ELISA

3.5.3.1 Proben

Gewinnung der Überstände für ELISA

3 x 10⁵ Zellen wurden in 2 ml DMEM-Komplettmedium in einem 6well ausgesät. Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen, 10 min/2000 rpm/4°C zentrifugiert, die Überstände aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Gewinnung der Zellkultur-Lysate für ELISA

Die Zellen einer 10 cm-Zellkulturschale wurden gewaschen, mit EDTA abgelöst und in 10 ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden 5min/900 rpm/RT abzentrifugiert, das PBS abgesaugt, und das Pellet in 1,8 ml 1 x TBS + 200µl 10% Triton X-100 aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß (2 ml) gefüllt. Die Eppendorfgefäße wurden auf einen Test-Tube- Rotator gespannt und rotierten ÜN bei 4°C. Nach dem Triton-X-Aufschluss wurden die Lysate 45min/14000 rpm/4°C zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Gewinnung der Lungengewebe-Homogenate für ELISA

In einem Mini-Bead-Beater wurden die bei -80°C gelagerten Lungengewebestücke in je 300 µl 4°C kaltem Extraktionspuffer mithilfe von Zirkonia Beads durch 2 x 20 sec vortexen homogenisiert. Anschließend wurden die Proben 10 min/14000 rpm/4°C zentrifugiert, die Überstände aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Zellysate sowie der aufgearbeiteten Gewebeproben wurde mithilfe des BCA Protein Assay Kits (Pierce, Rockford, IL, USA) durchgeführt. Die Durchführung richtete sich nach dem Mikrotiterplatten-Protokoll („*Microtiter Plate Protocol*“) des Herstellers.

Die Messung erfolgte in 96well-Mikrotiterplatten, dabei wurden zu 200 µl Arbeitslösung („*Working Reagent*“) je 10 µl Probe hinzupipettiert; alle Bestimmungen erfolgten als Doppelansatz. Als Standard diente BSA (Sigma) in folgenden Konzentrationen: 4/2/1/0,5/0,25/0,125/0,0625 mg/ml. Die Auswertung erfolgte am Biolumin ELISA Reader (biolumin reader, Molecular Dynamics) bei 570 nm.

3.5.3.2 Reagenzien

Für den Nachweis von TIMP-1 wurde der ELISA-Kit der Firma amersham pharmacia biotech (BIOTRAK TIMP-1 ELISA system, code RPN 2611, amersham pharmacia biotech, Freiburg, Germany) benutzt. Für die Bestimmung der Menge löslichen uPA-Rezeptors wurde der uPAR-ELISA Kit (IMUBIND[®] Total uPAR, Product No. 893) verwendet. Die Bestimmung des uPA-Gehaltes erfolgte mit dem IMUBIND[®] ELISA-Kit No. 894, die Bestimmung von PAI-1 mit dem IMUBIND[®] ELISA Kit No. 821. Alle IMUBIND[®] ELISA Kits wurden von american diagnostica, Greenwich, CT, USA, bezogen.

3.5.3.3 Materialien und Geräte

Die Absorption wurde am Biolumin reader (Molecular Dynamics) gemessen.

3.5.3.4 Durchführung

Alle ELISA-Kits wurden entsprechend den Protokollen der Hersteller verwendet. Die Meerrettich-Peroxidase- Reaktion wurde in jedem ELISA durch die Zugabe von 1 M H₂SO₄ abgestoppt und die Absorption bei 450 nm gemessen.

3.5.4 suPAR-Bindungsassay

3.5.4.1 Proben

Standardreihe

Als Standard wurde das aminoternale Fragment (ATF) von uPA verwendet. Es wurde eine Standardreihe erstellt mit den Konzentrationen 1 ng/ml; 0,5 ng/ml; 0,25 ng/ml; 0,125 ng/ml und 0,06 ng/ml.

Gewinnung der Zellüberstände für den suPAR-Bindungsassay

3 x 10⁵ Zellen wurden in 2 ml DMEM-Komplettmedium in einem 6well ausgesät. Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen, 10 min/2000 rpm/4°C zentrifugiert, die Überstände aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.5.4.2 Reagenzien

Coating und Detektion

löslicher uPA-Rezeptor, isoliert aus CHO-Zellen

biotinylierter Detektionsantikörper, #377

Avidin-PEX-Antikörper

(bereitgestellt von PD Dr. V. Magdolen, Klinik für Gynäkologie, TU München)

Waschpuffer

PBS

1% Triton X-100

Verdünnungspuffer

PBS

2% (w/v) BSA

0,5% (v/v) Triton X-100

TMB-Substrat

10 ml TMB-Substrat

10 µl 3% H₂O₂

10 x MOPS-Puffer

83,72 g 3 [n-Morpholino]propanesulfonic acid sodium salt (Sigma)

8,2 g Natriumacetat (Sigma)

20 ml 0,5M Natrium-Ethylendiamintetraammonium (Na-EDTA) (Merck)

auffüllen bis 1l mit ddH₂O

auf pH = 7,0 einstellen mit NaOH

3.5.4.3 Materialien und Geräte

Maxi Sorb 96well Mikrotiterplatte (Nalge Nunc)

Die Absorption wurde am Biolumin reader (Molecular Dynamics) gemessen.

3.5.4.4 Durchführung

Eine Maxi-Sorb 96well-Mikrotiterplatte (Nalge Nunc) wurde mit 100 µl löslichem uPA-Rezeptor, isoliert aus CHO-Zellen, c = 0,5µg/ml in MOPS-Puffer, beschichtet und ÜN bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde 3 x mit PBS 1% Triton X-100 gewaschen und anschließend für 2 Stunden bei 4°C mit 200µl/well PBS 2% BSA blockiert. Als Proben wurden Zellüberstände der einzelnen Zelllinien in DMEM-Komplettmedium eingesetzt. Als Negativkontrolle diente DMEM-Komplettmedium, als Positivkontrolle der lösliche uPA-Rezeptor, mit dem die Platte beschichtet worden war. Alle Proben wurden entsprechend der jeweiligen Verdünnungsstufe mit Verdünnungspuffer verdünnt und mit 0,25 ng/ml ATF versetzt. Das Probenvolumen betrug jeweils 100 µl. Nach Zugabe von ATF wurden die Proben 10 min bei RT inkubiert. Die Blockierungslösung wurde ausgeklopft, die Proben zügig auf die Platte aufgetragen und bei 4°C ÜN inkubiert.

Die Platte wurde 3 x gewaschen, der biotinylierte Detektionsantikörper (4 µl/10 ml Inkubationspuffer, 100 µl/well) zugegeben und 1 Stunde bei RT inkubiert. Die Platte wurde 3x gewaschen, der Avidin-PEX-Antikörper (4 µl/10 ml Inkubationspuffer, 100 µl/well) zugegeben und 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 100 µl TMB-Substrat zugegeben und die Farbreaktion nach ca. 10 min mit 50 µl 0,5 M H₂SO₄ gestoppt. Die Absorption wurde am Biolumin- ELISA- reader bei 450 nm gemessen.

3.5.5 Western Blot

3.5.5.1 Proben

Zellen einer 10 cm Schale, ca. 80% konfluent

3.5.5.2 Reagenzien

Trenngel (12%)

Angaben für zwei Minigele

12,9 ml	H ₂ O
9 ml	PAA (40 %, 29:1)
7,5 ml	1,5 M TRIS, pH = 8,6
0,3 ml	10 % (w/v) SDS
0,3 ml	10 % (w/v) APS
12 µl	TEMED

Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet und polymerisierte ca. 30 min aus.

Sammelgel

Angaben für zwei Sammelgele

6,1 ml	H ₂ O
1,25 ml	PAA (40 %, 29:1)
2,5 ml	0,5 M TRIS, pH 6,8
0,1 ml	10 % (w/v) SDS
0,1 ml	10 % (w/v) APS
10 µl	TEMED

Isopropanol wurde entfernt und die Gele mit H₂O gründlich gespült. Das Sammelgel wurde gegossen, die Kämme vorsichtig hineingeschoben und die Sammelgele auspolymerisierten aus.

Tween-PBS (TPBS)

PBS

0,1 % (v/v) Tween

Blockierlösung

5 % (w/v) Milch

0,1 % (v/v) Tween

5 x Loading-Buffer

50 ml Mercapto-Ethanol

10 g SDS

25 ml Glycerin

25 ml 1 M TRIS, pH = 6,8

250 mg Bromphenolblau

100 ml dd H₂O

10 x Elektrophoresepuffer

30,3 g Tris-Base

144,2 g Glycin

10 g SDS

Bis ca. 800 ml mit dd H₂O auffüllen, pH = 8,3 einstellen

Anschließend mit ddH₂O auf genau 1 l auffüllen.

Blotting Puffer

14,4 g Glycin

3,03 g Tris-Base

0,5 g SDS

200 ml Methanol

Mit ddH₂O auf 1l auffüllen.

Proteaseinhibitor (# P8340, Sigma, Steinheim, Germany)

Molekulargewichtsmarker (# 161-0372 Biorad, München, Germany)

Ponceau S (# P-7170, Sigma, Steinheim, Germany)

Anti PCNA aus der Maus (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK)

anti α -Tubulin aus der Maus (Oncogene, Darmstadt, Germany)

Anti-mouse IgG-Peroxidase (Amersham, Freiburg, Germany)

Solution 1 und 2 (Lumi-Light, #2015200, Roche, Basel, Switzerland)

3.5.5.3 Materialien und Geräte

Filter Papier (# 1703932, BioRad, München, Germany)

Nitrozellulose- Membran (Nitrocellulose, #RPN2020D, Amersham, Freiburg, Germany)

Gelkammern (BioRad, München, Germany)

Blotting System (BioRad, München, Germany)

3.5.5.4 Durchführung

Die Zellen einer 10 cm - Schale wurde zweimal mit kaltem PBS gewaschen, 2 ml PBS auf die Zellen gegeben und die Zellen mit einem Schaber abgekratzt. Die Zellsuspension wurde in 2 ml- Eppendorfgefäße überführt und zentrifugiert (10 min/4°C/2000 rpm). Das *Pellet* wurde in 100 µl PBS mit Proteaseinhibitor (990 µl PBS + 10 µl Proteaseinhibitor) resuspendiert. Die Suspension wurde 10 x durch eine sehr feine Kanüle (z.B. Insulinspritze) gezogen, um die Zellen aufzuschließen. Anschließend erfolgte die BCA-Proteinbestimmung (Verdünnungsstufe 1:10-1:50).

Pro Probe wurden 20 µg Protein der Zelllysate eingesetzt. Die jeweilige Menge wurde mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt und 3 µl reduzierender 5 x Loading Buffer zugegeben. Zu 12 µl Molekulargewichtsmarker (Biorad, # 161-0372) wurden 3 µl reduzierender 5 x Loading Buffer gegeben. Die Proben wurden 8 min bei 99 °C denaturiert, anschließend 2 min auf Eis inkubiert.

Die SDS- Gele wurden in die Gelkammer eingespannt und die Kammer mit Elektrophoresepuffer befüllt. Die denaturierten Proben und der Molekulargewichtsmarker wurden auf das Gel aufgetragen. Der Lauf durch das Sammelgel erfolgte bei 30 mA, der Lauf durch das Trenngel bei 40-50 mA. Nach dem Lauf wurde das Gel blasenfrei auf die Nitrozellulose-Membran gelegt. Dieses wurde zwischen zwei Filterpapiere gelegt, die wiederum zwischen zwei Schwämme gelegt wurden. Der Blot wurde geschlossen und in den Blothalter gegeben. Der Blothalter wurde in die Blotting Kammer gesetzt, die Kühleinheit hinzugegeben und die Kammer mit Blotting Puffer befüllt. Das Blotting erfolgte bei 90 mA bei 4 °C ÜN.

Die Membran wurde 4 x 5 min mit TPBS (PBS mit 0,1% (v/v) Tween) gewaschen. Bei diesem und allen folgenden Schritten wies die Proteinseite der Membran jeweils nach oben. Ponceau S wurde für 3- 5 min auf die Membran gegeben, und die Membran mit ddH₂O gespült, bis ein guter Kontrast zwischen Banden und Hintergrund erreicht war. Die Membran wurde in Transparentfolie eingelegt und im Kopierer abgelichtet. Dann wurde sie

durchgeschnitten, um die Ladungskontrolle und das zu detektierende Protein zu trennen. Die Membranteile wurden daraufhin in jeweils eigenen Schälchen mit TPBS gewaschen, wobei der Puffer mehrmals gewechselt wurde. Um weniger Hintergrund zu erzielen, wurde die Membran ≥ 24 h bei 4 °C inkubiert.

Zum Blockieren wurde TPBS abgenommen und ca. 10 ml 5 % (w/v) Milch, 0,1 % (v/v) Tween zugegeben. Hierin wurde die Membran 1,5 Stunden lang bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Zugabe des Primärantikörpers erfolgt durch Aufnehmen des ersten Antikörpers (anti-PCNA bzw. anti- α -Tubulin) in 10 ml 2,5 % (w/v) Milch, 0,1 % (v/v) Tween. Anti-PCNA wurde im Verhältnis 1:1000, Anti- α -Tubulin wurde im Verhältnis 1:4000 verdünnt. Dies wurde auf die Membran gegeben und 1,5 Stunden bei Raumtemperatur geschwenkt. Im Anschluss wurde die Membran mindestens 4 x 10 min mit TPBS gewaschen. Der Sekundärantikörper Anti-mouse IgG-Peroxidase wurde 1:2000 in 10 ml 2,5 % (w/v) Milch, 0,1 % (v/v) Tween verdünnt und auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran mindestens 4 x 10 min mit TPBS gewaschen.

Zur Entwicklung des Blots wurden pro Membran 5 ml Solution 1 und 2 auf Raumtemperatur gebracht und beide Lösungen kurz vor der Detektion gemischt. Die Lösungen wurden auf die Membran gegeben und 5 min im Dunkelraum bei RT inkubiert. Dabei wurde die Signalentwicklung verfolgt. Die Membran wurde zwischen zwei Transparentfolien gelegt, der Röntgenfilm aufgelegt und 15 sec bis 15 min belichtet.

3.6 *Histologische Verfahren*

3.6.1 *Lungenfärbung mit X-Gal*

Die linke Lungenhälfte wurde zunächst kurz in PBS gespült und in PBS 0,2% Glutaraldehyd, 2% Formaldehyd 90 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden 10 ml X-Gal Färbelösung zugegeben und die Organe für 5 Stunden bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Färbelösung wurde ÜN belassen und bei 4°C weiter im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag wurde 2 x mit PBS gewaschen und ca. 10 ml PBS 2% Formaldehyd zugegeben.

3.6.2 *Auszählung der Lungenmetastasen*

Die Auszählung der Lungenmetastasen erfolgte am Zeiss-Binokular Mikroskop (Zeiss SZX 12).

Als eine Metastase wurde dabei jede durch X-Gal blau angefärbte Gruppe von Zellen auf der Oberfläche der dorsalen linken Lungenhälfte betrachtet. Die Metastasen standen meist als einzelne Erhebungen aus dem Lungengewebe heraus. Wo Metastasen in einer Lunge sehr dicht waren, wurden einzeln voneinander abgrenzbare Erhebungen innerhalb eines konfluenten Bereichs von Metastasen als einzelne Metastasen angesehen und gezählt.

3.7 *Statistische Analyse*

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte für kleine Gruppen mithilfe des Mann-Whitney Rank Sum Test. Das Erreichen des statistischen Signifikanzniveaus wurde mit $p < 0,05$ festgelegt. Von einem Trend wurde ausgegangen, wenn $0,1 < p > 0,05$ war.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung der Zelllinien

Als Ausgangszelllinie wurde die menschliche Fibrosarkom-Zelllinie HT 1080 verwendet, die zuvor *lacZ*-markiert worden war. Die Fibrosarkomzellen wurden mit den Vektoren für suPAR bzw. TIMP-1 transfiziert, woraus die Zelllinien hervorgingen, die suPAR bzw. TIMP-1 stabil überexprimierten. Die suPAR-überexprimierende Zelllinie suPAR 16 wurde anschließend mit *timp-1* transfiziert und selektioniert. Dadurch entstand eine Zelllinie, die sowohl suPAR als auch TIMP-1 stabil überexprimierte. So wurden drei Zelllinien hergestellt, die suPAR, TIMP-1 oder suPAR und TIMP-1 stabil überexprimierten (Abb.5).

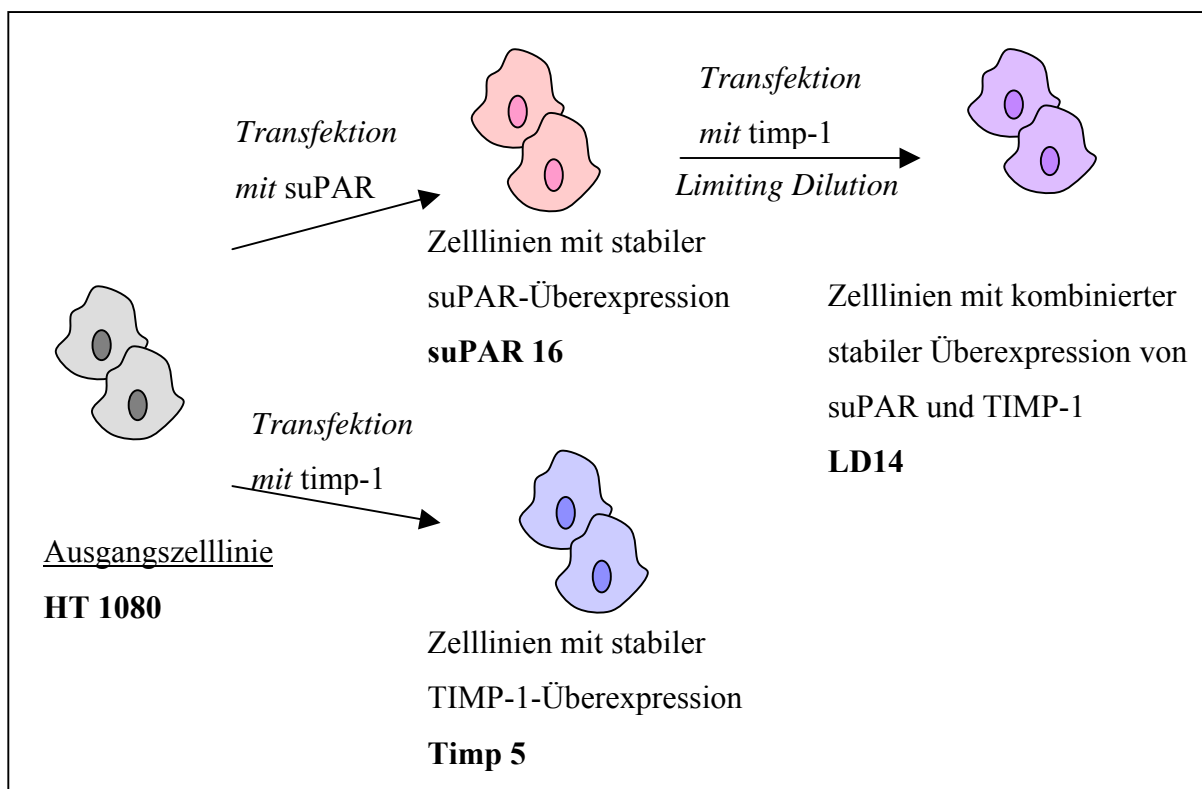


Abb.6: Übersicht über die Genealogie der Zelllinien

Die Herstellung der Zelllinien suPAR 16 und Timp 5 erfolgte durch Transfektion der Ausgangszelllinie HT 1080, die Herstellung der Zelllinie LD 14 durch Transfektion der Zelllinie suPAR 16 mit *timp-1*.

Die Zelllinien suPAR 16 und Timp 5 gingen durch die Transfektion direkt aus der Ausgangszelllinie HT 1080 hervor. Um Zelllinien zu erhalten, die suPAR und TIMP-1 stabil überexprimierten, wurde sequentiell transfiziert. Dazu wurde die Zelllinie suPAR 16, die

suPAR überexprimierte, als Ausgangszelllinie für die Transfektion mit *timp-1* benutzt. Aus dieser Transfektion ging die Zelllinie LD 14 hervor.

4.1.1 Herstellung der suPAR-überexprimierenden Zelllinie suPAR 16

Die Ausgangszelllinie wurde mit dem Vektor pcDNA3.1/*suPAR*/hygro transfiziert und selektioniert. Nach etwa 21 Tagen bildeten sich selektiv aus den Zellen, in denen das transfizierte Plasmid stabil integriert hatte und die gegen die Selektion eine Resistenz aufwiesen, Einzelkolonien in der Zellkulturschale, die isoliert und amplifiziert wurden. Nach der Transfektion mit pcDNA3.1/*suPAR*/hygro konnten 21 Klone isoliert werden, deren suPAR-Gehalt im Überstand bestimmt wurde (Abb.6).

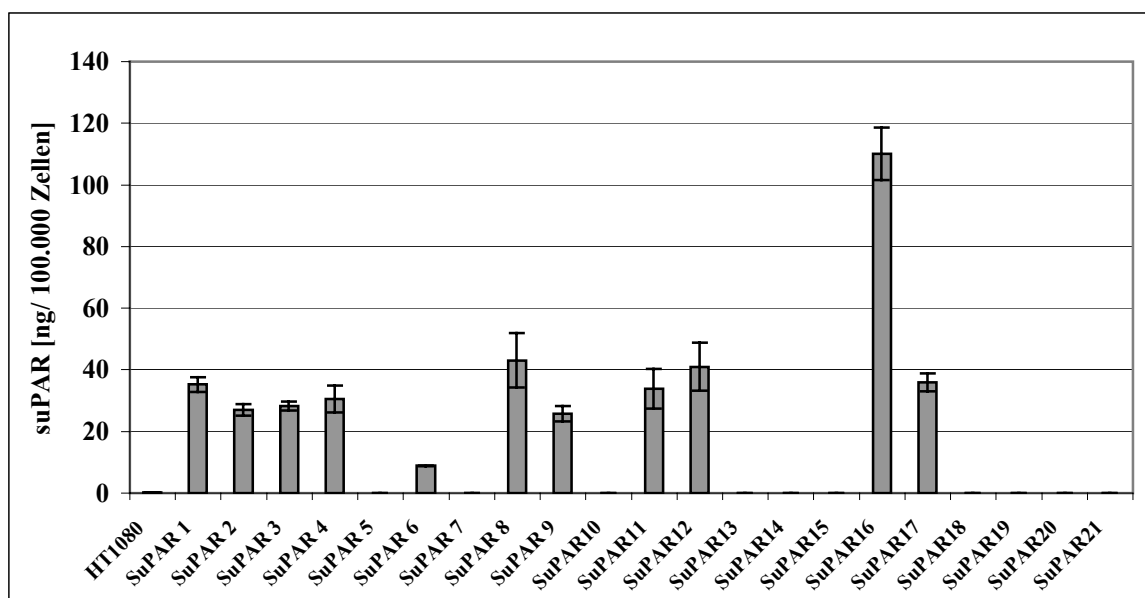


Abb.7: suPAR-Gehalt der *suPAR*-transfizierten Zelllinien

Die Bestimmung des suPAR-Gehalts erfolgte im ELISA des Zellüberstands nach Aussaat von 3×10^5 Zellen/well in 5 ml Medium in der 6-well-Platte nach 24 Stunden Inkubation (Doppelbestimmung).

Die erreichten Sekretionslevel von suPAR lagen zwischen $8,9 \text{ ng}/1 \times 10^5$ Zellen (suPAR 6) und $110,1 \text{ ng suPAR}/1 \times 10^5$ Zellen (suPAR 16). In mehreren Zelllinien (suPAR 5, 7, 10, 13, 14, 15, 18-21) war suPAR nicht detektierbar, in diesen Zelllinien wurde das Transgen nicht exprimiert. Der Median lag bei $33,8 \text{ ng suPAR}/1 \times 10^5$ Zellen, der Mittelwert bei $38,1 \text{ ng suPAR}/1 \times 10^5$ Zellen. Die Ausgangszelllinie HT 1080 wies $0,19 \text{ ng suPAR}/1 \times 10^5$ Zellen auf.

Tab. 1 : Überexpression von suPAR in vier transfizierten Zelllinien im Vergleich zur Ausgangszelllinie HT 1080

Zelllinie	uPAR im Zellüberstand [ng /1 x 10 ⁵ Zellen ± Stabw.]	Vielfaches der Ausgangszelllinie
HT 1080 (Ausgangszelllinie)	0,19 ± 0,017	–
suPAR 2	27 ± 1,8	142,1
suPAR 6	8,9 ± 3,8	46,8
suPAR 8	43,1 ± 7,7	226,8
suPAR 16	110,1 ± 8,55	579,5

Die Überexpression von suPAR in den transfizierten Zelllinien betrug vom ~ 46-fachen bis zum ~ 580-fachen der Ausgangszelllinie (Tab.1).

Mit 110,1 ng /1 x 10⁵ Zellen (entsprechend einer ~ 580-fachen Überexpression) wies die Zelllinie suPAR 16 die höchsten Expressionslevel auf. Alle weiteren Experimente wurden daher mit suPAR 16 durchgeführt.

4.1.2 Herstellung der TIMP-1-überexprimierenden Zelllinie Timp 5

HT 1080- Zellen wurden mit dem Vektor pcDNA3.1/*timp-1*/hygro transfiziert und selektioniert. Nach etwa 21 Tagen waren keine Zellen der Negativkontrolle mehr vorhanden und es bildeten sich Einzelkolonien in der Zellkulturschale, die isoliert und amplifiziert wurden. Es konnten 18 Klone isoliert werden, deren TIMP-1-Gehalt im Überstand im ELISA bestimmt wurde (Abb.7).

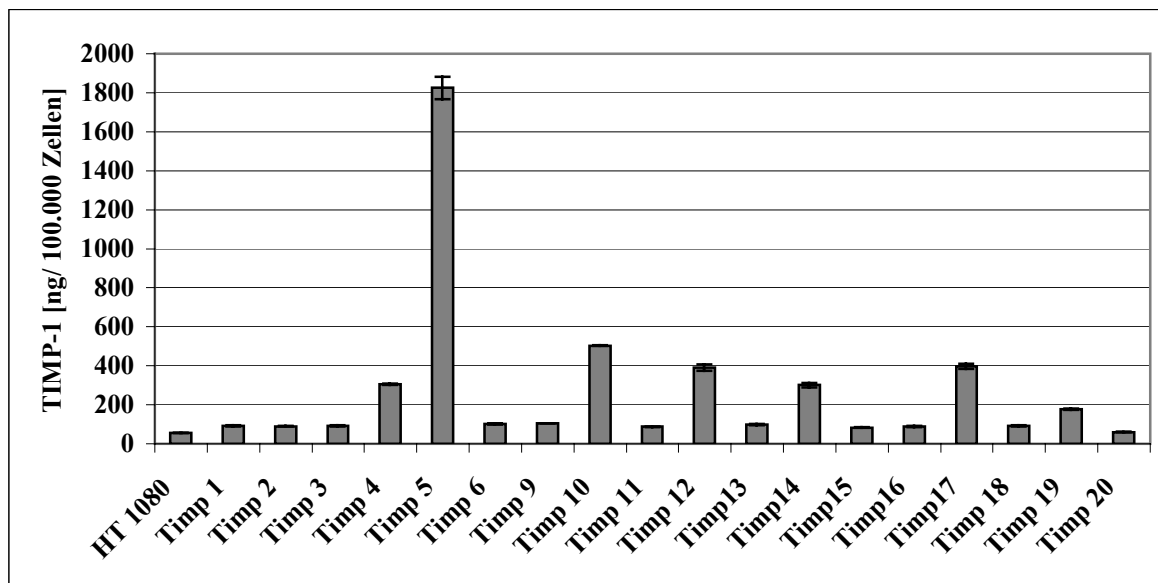


Abb.8: TIMP-1-Gehalt der *timp-1*-transfizierten Zelllinien

Die Bestimmung des TIMP-1-Gehaltes erfolgte im ELISA des Zellüberstands nach Aussaat von 3×10^5 Zellen/well in 5 ml Medium in der 6-well-Platte nach 24 Stunden Inkubation (Doppelbestimmung).

Die Menge des sezernierten TIMP-1-Proteins betrug zwischen $60,4 \text{ ng/1} \times 10^5$ Zellen (Timp 20) und $1824,5 \text{ ng/1} \times 10^5$ Zellen (Timp 5). Der Median lag bei $100,9 \text{ ng TIMP-1/1} \times 10^5$ Zellen, der Mittelwert bei $271,7 \text{ ng TIMP-1/1} \times 10^5$ Zellen. Die Ausgangszelllinie HT 1080 exprimierte $56 \text{ ng TIMP-1/1} \times 10^5$ Zellen.

Tab. 2. Überexpression von TIMP-1 in vier transfizierten Zelllinien im Vergleich zur Ausgangszelllinie HT 1080

Zelllinie	TIMP-1 im Zellüberstand [ng / 1×10^5 Zellen \pm Stabw.]	Vielfaches der Ausgangszelllinie
HT 1080	$56 \pm 0,56$	-
Timp 4	$305,5 \pm 4,4$	5,46
Timp 5	$1824,5 \pm 56,8$	32,6
Timp 10	$503,8 \pm 2,5$	9,0
Timp 19	$177,8 \pm 2,5$	3,2

Einige Zelllinien wiesen nach der Transfektion Sekretionslevel auf, die bis zum ~Zweifachen der Ausgangszelllinie betragen (Timp 1, 2, 3, 6, 9, 11, 13, 15, 16, 18 und 20). Hierbei handelte es sich wahrscheinlich nicht um die Expression des Transgens, sondern um die konstitutive TIMP-1-Expression. Insgesamt betrug die Überexpression vom ~3-fachen bis zum ~33-fachen der Ausgangszelllinie (Tab.2). Die Zelllinie Timp 5 wies mit $1824,5 \text{ ng/l} \times 10^5$ Zellen den höchsten Gehalt an TIMP-1 auf und wurde für alle weiteren Experimente verwendet.

4.1.3 Klonierung eines für hTIMP-1 kodierenden eukaryotischen Expressionsvektors mit Blasticidin-Resistenz

Um eine Zelllinie herzustellen, der sowohl suPAR als auch TIMP-1 stabil überexprimierte, wurde nach der stabilen Transfektion von HT 1080 mit pcDNA3.1/hygro/suPAR eine zweite Transfektion mit *timp-1* durchgeführt. Hierzu wurde die suPAR-überexprimierende Zelllinie suPAR 16 stabil transfiziert. Um die Zellen, die bereits eine *neo*- und eine *hygro*- Resistenz aufwiesen, selektionieren zu können, wurde ein für humanes TIMP-1 kodierender eukaryotischer Expressionsvektor mit Blasticidin-Resistenz kloniert. Dazu wurde das *timp-1*-Insert aus dem pcDNA3.1/hygro/TIMP-1-Vektor ausgeschnitten und in die Multiple Cloning Site (MCS) des pcDNA6/V5-HisA/blast-Vektor kloniert (Abb.8).

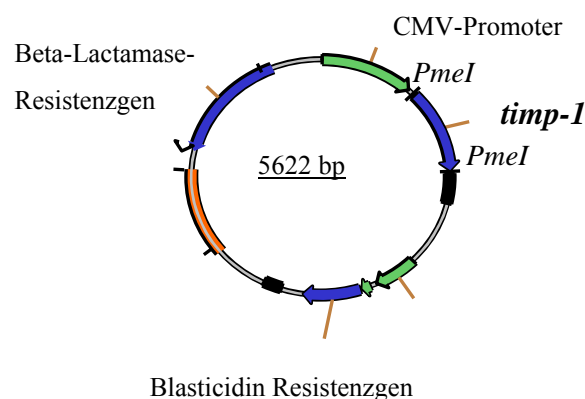


Abb.9: Plasmidvektor pJNhT-1 (pcDNA6/ *timp-1*/ blast)

Klonierung des *timp-1*-Inserts in den pcDNA6-Vektor mit Blasticidin-Resistenz. Die HisA-Kassette wurde durch die Klonierung aus dem Vektor herausgeschnitten, das Transgen stand unter der Kontrolle eines CMV-Promoters.

Mit pJNhT-1 (pcDNA6/*timp-1*/blast) stand ein Vektor zur Verfügung, mit dem eukaryotische Zellen mit Blasticidin selektioniert werden konnten. Die Expression des Transgens erfolgte unter der Kontrolle eines CMV-Promoters.

4.1.4 Herstellung der suPAR und TIMP-1 überexprimierenden Zelllinie LD 14

Die Zelllinie suPAR 16, die durch Transfektion von pcDNA3.1/hygro/suPAR aus der Ausgangszelllinie HT 1080 hervorgegangen war, wurde mit pJNhT-1 (pcDNA6/*timp-1*/blast) transfiziert und selektioniert (Abb.5). Nach etwa 10 Tagen bildeten sich Einzelkolonien, von denen 20 Kolonien („KL“ 1- 20) isoliert und amplifiziert werden konnten. Der TIMP-1-Gehalt dieser Zelllinien wurde im Überstand bestimmt (Abb.9).

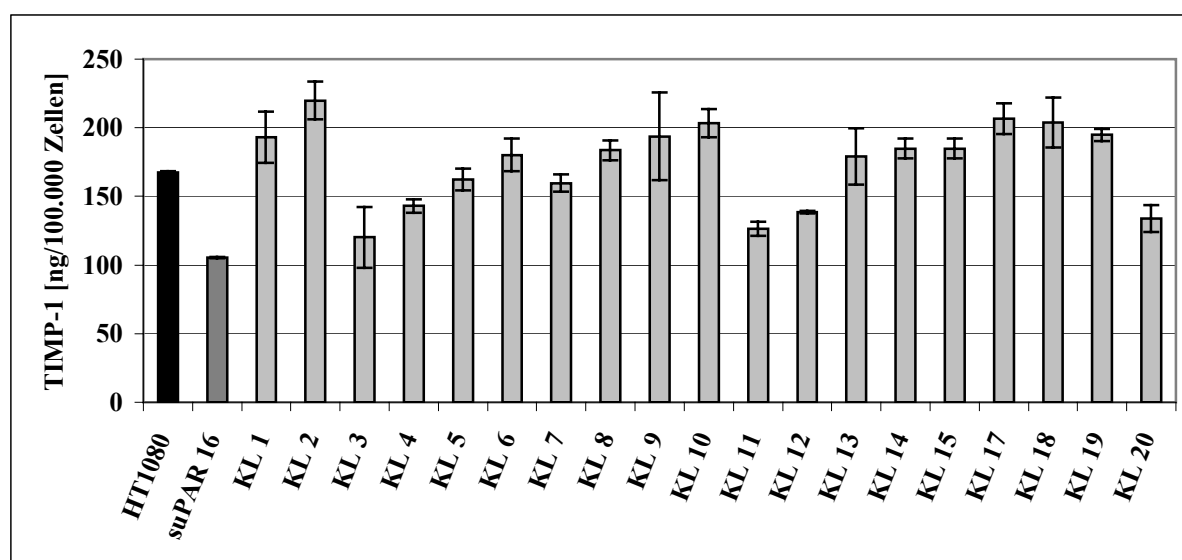


Abb.10: TIMP-1-Gehalt der mit suPAR und *timp-1* transfizierten Zelllinien

Die Bestimmung des TIMP-1-Gehalts erfolgte im ELISA des Zellüberstands nach Aussaat von 3×10^5 Zellen/well in 5 ml Medium in der 6well-Platte nach 24 Stunden Inkubation (Doppelbestimmung).

Im Vergleich zur Ausgangszelllinie sezernierte keine der Zelllinien eine wesentlich erhöhte Menge an TIMP-1. Die Sekretionslevel betragen zwischen 120,2 ng TIMP-1/ 1×10^5 Zellen (KL 3) und 219,7 ng TIMP-1/ 1×10^5 Zellen (KL 2) und betragen somit das 0,72-fache bis 1,31-fache im Vergleich zur Ausgangszelllinie.

Da die Selektionszeit, d.h. die Zeit bis zum Absterben der Transfektionskontrolle, kurz war (10 Tage im Unterschied zu 21 Tagen bei der Selektion mit Hygromycin), und die Selektion mit Blasticidin nicht in jedem Fall die Isolierung scharf abgegrenzter Einzelkolonien erlaubte,

wurde zusätzlich eine Subklonierung mittels *Limiting Dilution* durchgeführt. Hieraus konnten 18 Zelllinien („LD“ 1-18) amplifiziert werden, deren TIMP-1-Gehalt im Überstand bestimmt wurde (Abb.10).

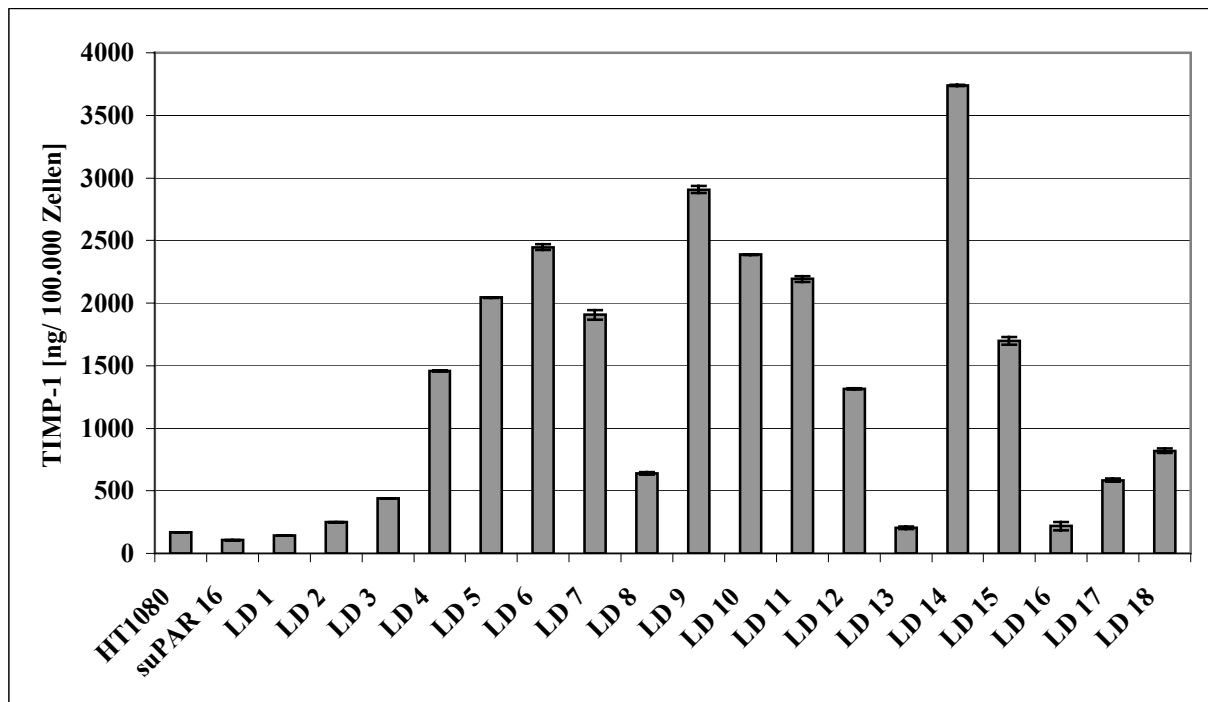


Abb.11: TIMP-1-Gehalts der durch Limiting Dilution gewonnenen, mit *suPAR* und *timp-1* transfizierten Zelllinien

Die Bestimmung des TIMP-1-Gehalts erfolgte mit ELISA des Zellüberstands nach Aussaat von 3×10^5 Zellen/well in 5 ml Medium in der 6-well-Platte nach 24 Stunden Inkubation (Doppelbestimmung).

Die Sekretionslevel von TIMP-1 lagen in den Zelllinien LD 1 bis LD 18 zwischen $144,7 \text{ ng}/1 \times 10^5$ Zellen (LD 1) und $3740 \text{ ng}/1 \times 10^5$ Zellen (LD 14). Der Median betrug $1387,2 \text{ ng TIMP-1}/1 \times 10^5$ Zellen, der Mittelwert $1411,2 \text{ ng TIMP-1}/1 \times 10^5$ Zellen. In dieser Bestimmung lag die Expression von TIMP-1 in HT 1080 bei $167,5 \text{ ng TIMP-1}/1 \times 10^5$ Zellen, in der Zelllinie suPAR 16, aus der die Doppelexprimierer hervorgegangen waren (Abb.5) bei $105,3 \text{ ng TIMP-1}/1 \times 10^5$ Zellen.

Tab. 3: Überexpression von TIMP-1 in vier Zelllinien, die suPAR und TIMP-1 überexprimieren, im Vergleich zur Ausgangszelllinie HT 1080

Zelllinie	TIMP-1 im Zellüberstand [ng /1 x 10 ⁵ Zellen ± Stabw.]	Vielfaches der Ausgangs- zelllinie HT 1080
HT 1080	167,5 ± 1,0	-
suPAR 16	105,3 ± 0,5	-
LD 3	442,3 ± 0	2,6
LD 4	1457,7 ± 5,3	8,7
LD 10	2386,7 ± 2,2	14,2
LD 14	3740 ± 3,6	22,3

Die Sekretion von TIMP-1 war in den Zelllinien LD 1 bis LD 18 um das 2,6-fache bis 22,3-fache gegenüber der Ausgangszelllinie HT 1080 erhöht (Tab.3). Gegenüber der Zelllinie suPAR 16 lag das Niveau der Überexpression von TIMP-1 in den Zelllinien LD 1 bis LD 18 um den Faktor 1,59 höher als gegenüber HT 1080, da die TIMP-1-Expression der Ausgangszelllinie HT 1080 über dem Expressionsniveau der Zelllinie suPAR 16 lag.

Durch stabile Transfektion war die Zelllinie suPAR 16 hergestellt worden, die suPAR stabil überexprimierte. Durch stabile Transfektion war die Zelllinie Timp 5 hergestellt worden, die TIMP-1 stabil überexprimierte. LD 14 war aus der Zelllinie suPAR 16 hervorgegangen und überexprimierte nach sequentieller stabiler Transfektion sowohl suPAR als auch TIMP-1 (Abb.5).

4.2 Charakterisierung der Zelllinien

Die Ausgangszelllinie sowie die transfizierten Zelllinien wurden hinsichtlich der Transgenexpression charakterisiert. Nach der Selektion war dem Kulturmedium kein Zellgift (Hygromycin bzw. Blasticidin) mehr zugesetzt worden. Es wurde zum einen überprüft, ob die Expression der Transgene auch nach mehrfacher Passagierung ohne Zellgift stabil war, zum anderen, ob das überexprimierte suPAR an uPA binden konnte. Zudem wurde überprüft, ob sich durch die Überexpression der Transgene oder durch die klonale Selektion Unterschiede in der Expression von uPA oder PAI-1 oder der Matrix- Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 zwischen den Zelllinien ergeben hatten. Das Proliferationsverhalten der Zelllinien wurde verglichen, um Einflüsse der Transgene oder der klonalen Selektion auf die Proliferationsgeschwindigkeit auszuschließen .

4.2.1 Fortgesetzte Expression von suPAR in suPAR 16 und LD 14

Die Expression von suPAR in den mit pcDNA3.1/hygro/suPAR transfizierten Zelllinien suPAR 16 und LD 14 wurde bestimmt. Es wurde untersucht, ob die Expression von suPAR in suPAR 16 und LD 14 nach mehrfacher Passagierung der Zellen (10 Passagen) fortgeführt wurde, ohne dass dem Medium weiter Hygromycin zugesetzt worden war. Zusätzlich wurde die Menge des abgespaltenen („shedded“) uPA-Rezeptors in den Zelllinien HT 1080 und Timp 5 bestimmt.

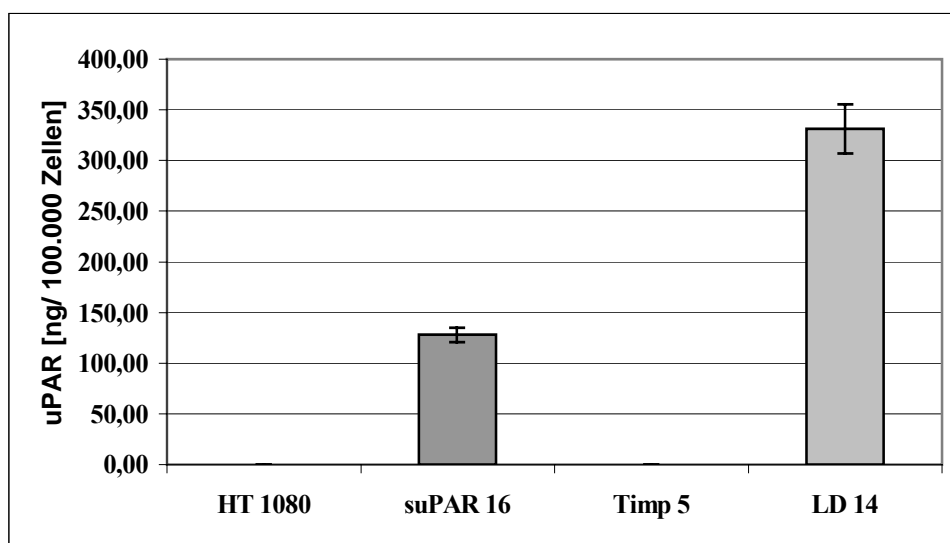


Abb.12: Sekretion von suPAR in den Zellüberstand

Die Bestimmung des TIMP-1-Gehaltes erfolgte im ELISA des Zellüberstands nach Aussaat von 3×10^5 Zellen/well in 5 ml Medium in der 6-well-Platte nach 24 Stunden Inkubation.

In HT 1080- Zellen konnten 0,17 ng uPAR/1 x 10⁵ Zellen im Zellüberstand nachgewiesen werden (vgl. 0,19 ng/1 x 10⁵ Zellen in der ersten Bestimmung, Tab. 1). Eine ähnliche Menge uPAR konnte in der Zelllinie Timp 5 im Überstand nachgewiesen werden (0,11 ng/1 x 10⁵ Zellen). Die Expression von suPAR in suPAR 16 lag bei 128 ng/1 x 10⁵ Zellen, was etwa dem Wert der ersten Bestimmung entsprach (110,1 ng/1 x 10⁵ Zellen). LD 14 sezernierte mit 331,3 ng/1 x 10⁵ Zellen deutlich mehr suPAR als die Zelllinie suPAR 16, aus der LD 14 hervorgegangen war (Abb.5).

Die Überexpression von suPAR in den Zelllinien suPAR 16 und LD 14 wurde auf mindestens gleich hohem Sekretionsniveau fortgesetzt.

Tab. 4: Relative Überexpression von suPAR

Zelllinie	uPAR im Zellüberstand [ng /1 x 10 ⁵ Zellen ± Stabw.]	Vielfaches der Ausgangszelllinie
HT 1080	0,17 ± 0,05	-
Timp 5	0,11 ± 0,01	-
suPAR 16	128 ± 7,2	753
LD 14	331,3 ± 24,3	1949

Die Überexpression von suPAR in suPAR 16 betrug das ~750-fache im Vergleich zur Ausgangszelllinie HT 1080, die Überexpression in LD 14 betrug das ~1950-fache des Ausgangswertes. Die Überexpression wurde in Bezug zur Menge des im Zellüberstand von HT 1080 und Timp 5 nachgewiesenen Spaltprodukts des uPA-Rezeptors gesetzt. Das Ergebnis unterstrich das hohe Niveau der Überexpression von suPAR in suPAR 16 und LD 14.

4.2.2 Von den Zelllinien suPAR 16 und LD 14 sezerniertes suPAR bindet aktiv an uPA

Um zu testen, ob mit dem von suPAR 16 und LD 14 sezernierten suPAR ein Molekül produziert wurde, das aktiv an uPA bindet, wurde ein uPA-Liganden-Bindungsassay durchgeführt. Darin wurde die Bindungskapazität des sezernierten suPAR an das aminoterminalen Fragment (ATF) des uPA untersucht.

In diesem Assay bindet das ATF-Fragment von uPA an rekombinante Festphase-assoziierte uPA-Rezeptor-Moleküle. Das ATF wird von einem Meerettich-Peroxidase-Detektionsantikörper erkannt und ergibt nach Zugabe des Substrates einen Absorptionwert. Ist in der Probe uPA vorhanden, bindet dessen aminoterminalen Fragment ebenfalls an die Festphase-assoziierten uPA-Rezeptor-Moleküle und erhöht so den Absorptionwert. Ist in der getesteten Probe funktionsfähiges suPAR vorhanden, bindet es ATF. Dieses kann nicht mehr an Festphase-assoziiertes uPAR gebunden werden und wird ausgewaschen. Somit verringert sich die Absorption umso stärker, je mehr ATF von in der Probe vorhandenem freien suPAR gebunden werden kann.

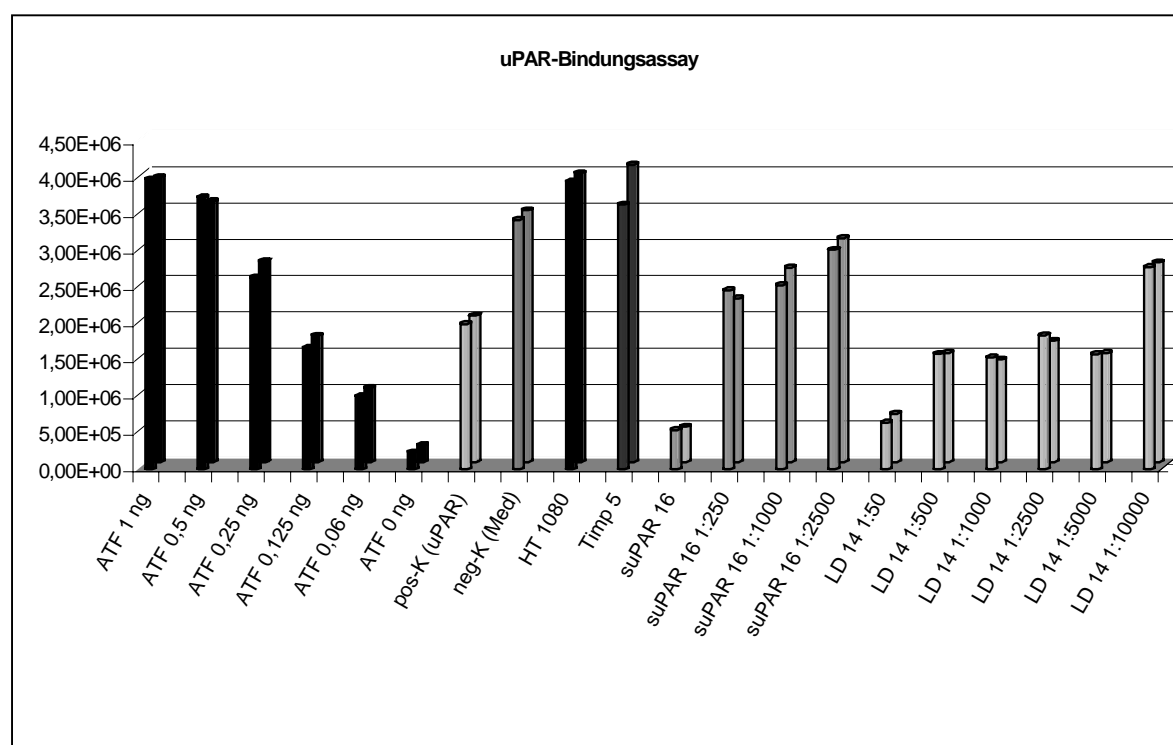


Abb.13: Nachweis der Aktivität von suPAR im uPA-Liganden-Bindungs-Assay

Das aminoterminalen Fragment des uPA bindet an Festphase-assoziierten uPA-Rezeptor (aus CHO-Zellen). Ein Detektionsantikörper erkennt das so gebundene ATF/uPA. Jeder Probe wurden 0,25 ng ATF zugesetzt. In den Proben verhinderte suPAR, dass uPA an den Festphase-gebundenen uPAR bindet.

Anhand der Standardkurve konnte abgelesen werden, dass die Absorption umso höher war, je mehr uPA (hier: rekombinantes ATF des uPA) zugegeben wurde. Jeder Probe wurden 0,25 ng ATF zugegeben (Abb.12).

Die Zellüberstände von HT 1080 und Timp 5 erreichten Absorptionswerte über dem Wert des zugegebenen ATF (0,25 ng). Dies war durch die Sekretion von uPA (Abb.14, s.u.) in den Zellüberstand bedingt, wodurch mehr uPA an Festphase- assoziiertes suPAR binden konnte. Wurde der unverdünnte Zellüberstand von suPAR 16 sowie der 1:50-verdünnte Überstand von LD 14 eingesetzt, konnte nur eine sehr geringe Mengen uPA (ATF) an den Festphase-assozierten uPA-Rezeptor binden, ATF wurde durch die große Menge des in der Probe vorhandenen suPAR abgefangen. Die Absorptionswerte waren sehr gering. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sowohl der von suPAR 16 als auch der von LD 14 überexprimierte lösliche uPA-Rezeptor in der Lage war, das aminoternale Fragment des uPA zu binden und somit funktionsfähig war. Es waren hohe Verdünnungsstufen nötig (1:2500 bzw. 1:10000), um die Inhibition der Bindung von uPA an Festphase-assoziertes-suPAR durch in den Proben vorhandenes suPAR schrittweise aufzuheben. Das von den Zelllinien suPAR 16 und LD 14 sezernierte suPAR war funktionell aktiv und konnte uPA binden.

4.2.3 Fortgesetzte TIMP-1 Überexpression in Timp 5 und LD 14

Die Expression von TIMP-1 in den Zelllinien Timp 5 und LD 14 wurde bestimmt. Es wurde untersucht, ob die Expression von TIMP-1 in Timp 5 und LD 14 nach mehrfacher Passagierung der Zellen (10 Passagen) fortgeführt wurde, ohne dass dem Medium weiter Hygromycin bzw. Blastocidin zugesetzt worden war.

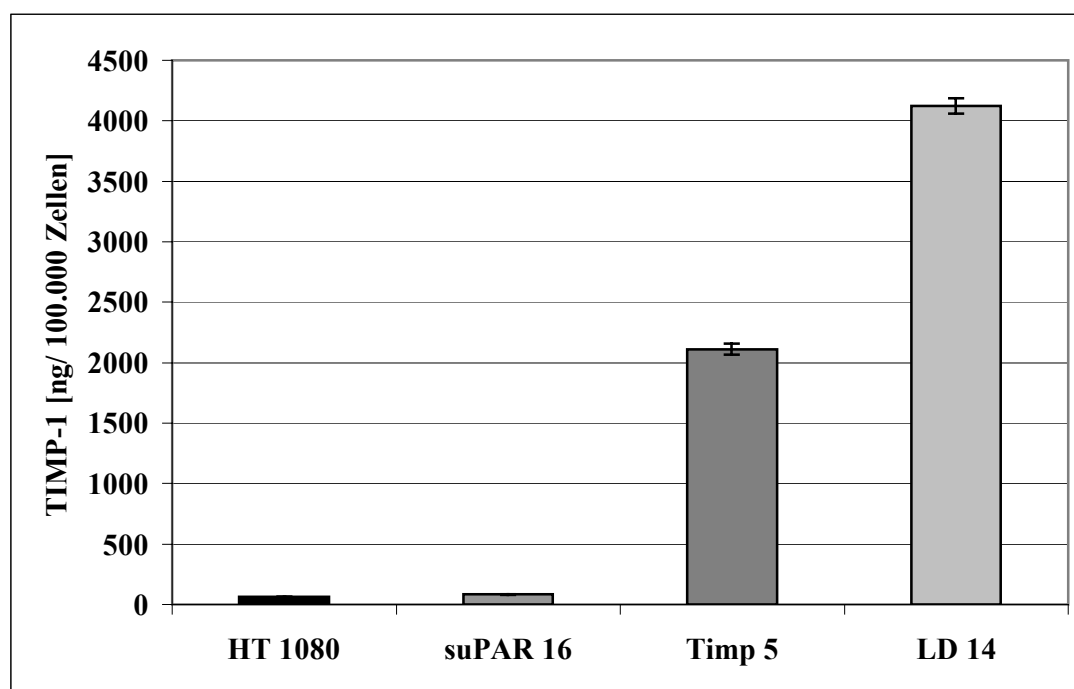


Abb.14: Vergleich des TIMP-1-Gehalts der Ausgangszelllinie und der transfizierten Zelllinien

Die Bestimmung des PAI-1-Gehaltes erfolgte im ELISA des Zellüberstands nach Aussaat von 3×10^5 Zellen/well in 5 ml Medium in der 6-well-Platte nach 24 Stunden Inkubation (Dreifachbestimmung).

Auch nach dem Ende der Selektion blieb die TIMP-1-Überexpression auf dem Niveau der Vorbestimmungen bestehen. Die Mutterzelllinie HT 1080 und suPAR 16 wiesen ähnliche TIMP-1- Expressionslevel auf ($64,4 \text{ ng/1} \times 10^5$ Zellen bzw. $83,3 \text{ ng/1} \times 10^5$ Zellen) Die Expression von TIMP-1 in suPAR 16 unterschied sich nicht von der Ausgangszelllinie.

Die Zelllinie Timp 5 sezernierte $2111 \text{ ng TIMP-1/1} \times 10^5$ Zellen, was etwa dem Doppelten der ersten Bestimmung entsprach ($947,4 \text{ ng/1} \times 10^5$ Zellen, Tab.2). Die Sekretion von TIMP-1 in der Zelllinie LD 14 lag bei $4120 \text{ ng/1} \times 10^5$ Zellen, was der Vorbestimmung gut entsprach ($3740 \text{ ng/1} \times 10^5$ Zellen, s. Tab.X). Die Überexpression von TIMP-1 in den Zelllinien Timp 5 und LD 14 wurde auch nach Ende der Selektion auf mindestens gleich hohem Niveau fortgesetzt.

Tab. 5: Relative Überexpression von TIMP-1

Zelllinie	TIMP-1 im Zellüberstand [ng /1 x 10⁵ Zellen ± Stabw.]	Vielfaches der Ausgangszelllinie
HT 1080	64,4 ± 0,77	-
SuPAR 16	83,3 ± 2,05	-
Timp 5	2111 ± 45,2	32,8
LD 14	4120± 63,6	64

Die Überexpression von TIMP-1 in der Zelllinie Timp 5 betrug das >30-fache der Expression von TIMP-1 in HT 1080; die Überexpression in LD 14 betrug das 64-fache des Ausgangswertes. Die Überexpression von TIMP-1 war stabil und betrug ein hohes Vielfaches der TIMP-1- Expression der Ausgangszelllinie.

4.2.4 Erhöhte Expression von uPA in den transfizierten Zelllinien

Der uPA-Gehalt aller transfizierten Zelllinien wurde bestimmt, um zu sehen, ob sich die Expression im Vergleich zur Ausgangszelllinie unterschied. Nach der Transfektion war denkbar, dass es sich im Fall eines veränderten Expressionsniveaus um auf klonale Selektion zurückführbare, zufällige Effekte handelte, oder im Fall einer Hochregulation in den Zelllinien suPAR 16 und LD 14 auf nicht-klonale Effekte im Sinne einer Gegenregulation (Hochregulation von uPA infolge der Überexpression von suPAR).

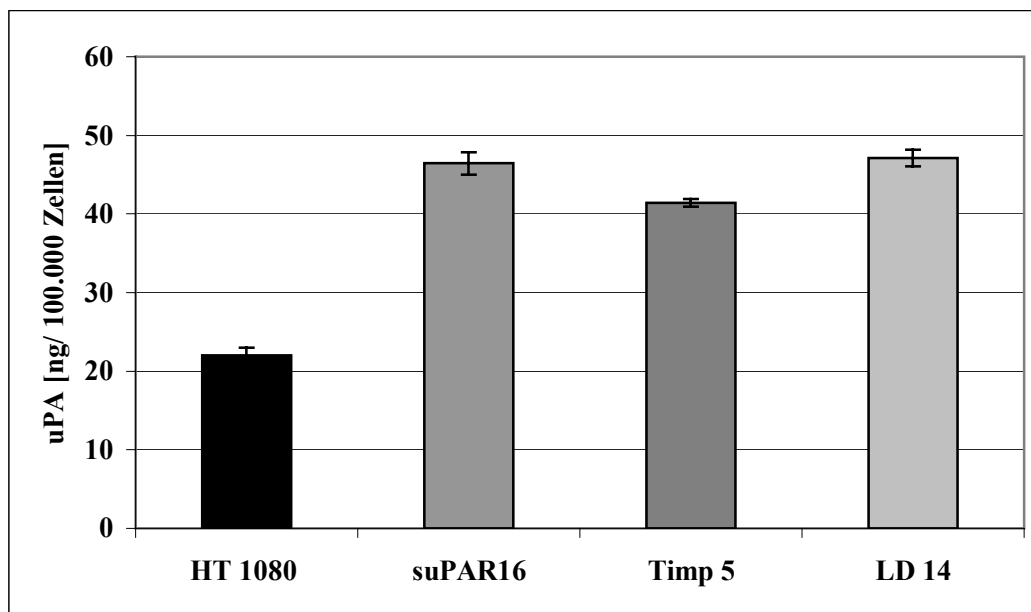


Abb.15: Vergleich des uPA-Gehalts der Ausgangszelllinie und der transfizierten Zelllinien

Die Bestimmung des uPA-Gehaltes erfolgte im ELISA des Zellüberstands nach Aussaat von 3×10^5 Zellen/well in 5 ml Medium in der 6-well-Platte nach 24 Stunden Inkubation (Doppelbestimmung).

Die transfizierten Zelllinien sezernierten etwa die doppelte Menge uPA (41,4 bis 47,1 ng/1 $\times 10^5$ Zellen) im Vergleich zur Ausgangszelllinie HT 1080 (22,0 ng/1 $\times 10^5$ Zellen). Die suPAR überexprimierenden Zelllinien LD 14 (47,1 ng/1 $\times 10^5$ Zellen) und suPAR 16 (46,4 ng/1 $\times 10^5$ Zellen) wiesen die höchsten uPA-Werte auf. Auch Timp 5 wies ähnlich hohe Sekretionslevel auf (41,4 ng/1 $\times 10^5$ Zellen). Dies entsprach einer Erhöhung bis zum 2,14-fachen (LD 14) der Ausgangszelllinie. Aufgrund der nicht sehr starken Erhöhung konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um eine Variation des Expressionsniveaus handelte. Allerdings wurde diese in allen transfizierten Zelllinien beobachtet. Da die uPA-Expression neben den suPAR-überexprimierenden Zelllinien auch in der TIMP-1-überexprimierenden Zelllinie erhöht war, konnte die erhöhte Expression nicht eindeutig auf die Überexpression von suPAR

zurückgeführt werden. Auch die Überexpression von TIMP-1 hätte dann eine gleichartige, geringe Erhöhung der uPA-Expression zur Folge. Somit handelte es sich am ehesten um eine Variation der uPA-Expression, möglicherweise auch um einen Effekt der Transfektion.

4.2.5 Leicht erhöhte Expression von PAI-1 in der Zelllinie suPAR 16

Der PAI-1-Gehalt aller transfizierten Zelllinien wurde bestimmt, um festzustellen, ob die Expression von PAI-1 infolge der klonalen Selektion durch die Transfektionen verändert war. In den Zellüberstand sezerniertes PAI-1 wurde im ELISA nachgewiesen.

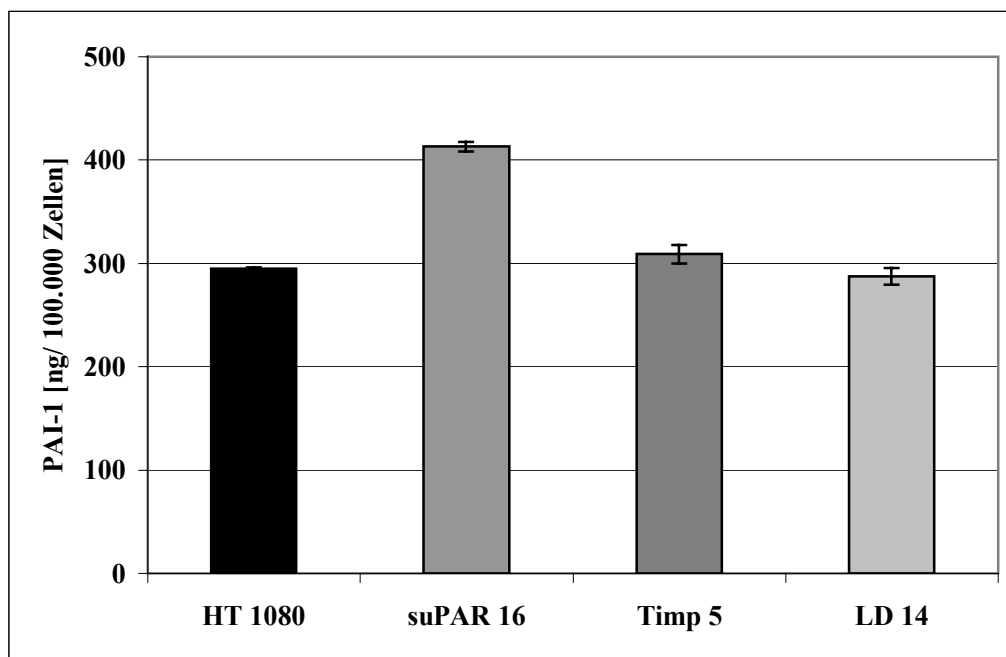


Abb.16: Vergleich des PAI-1-Gehalts der Ausgangszelllinie und der transfizierten Zelllinien

Die Bestimmung des PAI-1-Gehaltes erfolgte im ELISA des Zellüberstands nach Aussaat von 3×10^5 Zellen/well in 5 ml Medium in der 6-well-Platte nach 24 Stunden Inkubation.

Die Expression von PAI-1 variierte in den Zelllinien zwischen $287,4 \text{ ng}/1 \times 10^5$ Zellen (LD 14) und $413,0 \text{ ng}/1 \times 10^5$ Zellen (suPAR 16). Die PAI-1-Expression der Zelllinien Timp 5 und LD 14 war im Vergleich zur Ausgangszelllinie HT 1080 unverändert. In der Zelllinie suPAR 16 war die Expression um ca. ein Drittel erhöht. Da die Expression von PAI-1 in der ebenfalls suPAR überexprimierenden Zelllinie LD 14 unverändert war, konnte diese Beobachtung nicht auf die Überexpression von suPAR zurückgeführt werden. Da die Erhöhung insgesamt nur ein Drittel der in den anderen Zelllinien gemessenen Proteinmenge betrug, konnte dies nicht als einer Hochregulation der Expression infolge der Transfektion gewertet werden. Am ehesten handelte es sich hierbei ebenfalls um eine Variation des Expressionsniveaus.

4.2.6 Transfektion und Selektion führen zu erhöhter MMP-2- und MMP-9-Sekretion

Im Zymogramm wurde untersucht, ob es zu einer Veränderung der Sekretionsmenge der Matrix-Metalloproteinasen MMP-9 und MMP-2 gekommen war (Abb.16). Es wurde überprüft, ob sich nach der Transfektion oder durch die Expression der Transgene suPAR oder TIMP-1 die Zelllinien suPAR 16, Timp 5 und LD 14 im Zymogramm von der Zelllinie HT 1080 unterschieden. Um abgrenzen zu können, ob es sich bei Veränderungen um durch die Transfektion bedingte, Zelllinien-spezifische Effekte handelte oder ob die Expression eines Transgens die Sekretion der MMPs beeinflusste, wurde zusätzlich zu jeder der oben genannten Zelllinien jeweils eine weitere Zelllinie aufgetragen (suPAR 8, Timp 10 und LD 12), die aus der gleichen Transfektion stammte (Abb.5).

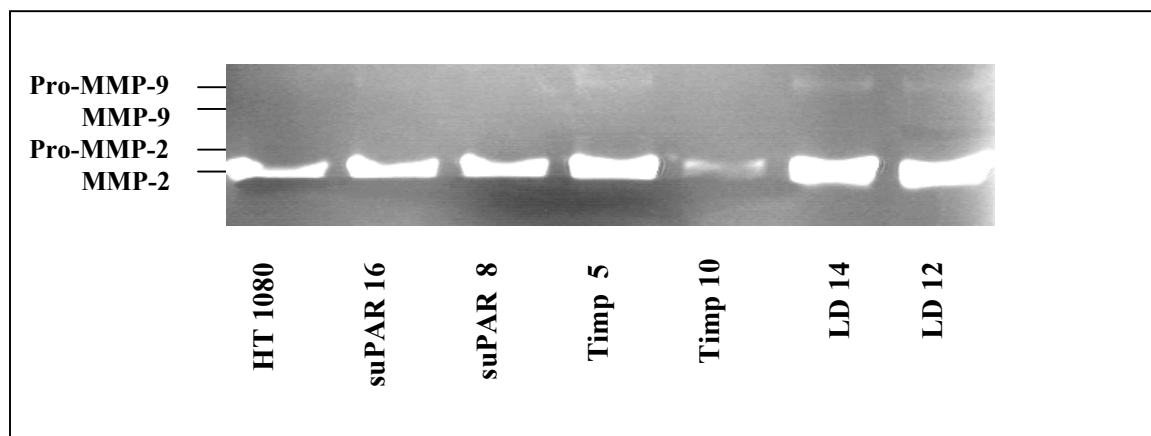


Abb.17: Bestimmung der Sekretion von MMP-2 und MMP-9 *in vitro*

3×10^5 Zellen wurden in 2 ml DMEM- Kompletmedium ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, 1 ml serumfreies Medium zugegeben und die Zellen weitere 24 Stunden inkubiert. 18 μ l Überstand wurden pro Probe aufgetragen.

In der Ausgangszelllinie HT 1080 war pro-MMP-9 nicht nachweisbar; aktives MMP-9 lag ebenfalls nicht vor. Es fand sich eine Bande aktives MMP-2; pro-MMP-2 konnte dagegen nicht nachgewiesen werden (Abb.16).

In den Zelllinien suPAR 16 und suPAR 8 wurde eine sehr schwache Bande pro-MMP-9 nachgewiesen, aktives MMP-9 fand sich nicht. Es fand sich eine Bande aktives MMP-2, die im Vergleich zur Zelllinie HT 1080 etwas stärker war; pro-MMP-2 war dagegen nicht nachweisbar.

Im Überstand der Zelllinie Timp 5 war eine schmale Bande pro-MMP-9 nachweisbar, nicht aber in Timp 10. Timp 5 wies eine im Vergleich zu HT 1080 deutlich stärkere Bande MMP-2

auf, Timp 10 eine deutlich schwächere. Aktives MMP-9 oder pro-MMP-2 konnten nicht nachgewiesen werden.

Auch in den Zelllinien, die sowohl suPAR als auch TIMP-1 überexprimierten (LD 14 und LD 12) fand sich eine schmale Bande pro-MMP-9 und eine Bande aktives MMP-2. Die MMP-2-Expression entsprach etwa der in Timp 5 beobachteten Expression und war damit deutlich stärker als die in HT 1080 detektierte Bande.

In HT 1080 und Timp 10 lag die Expression von pro-MMP-9 im Zymogramm unterhalb der Nachweisgrenze. Die transfizierten Zelllinien exprimierten unterschiedliche, insgesamt geringe Mengen pro-MMP-9, das *in vitro* in keiner Zelllinie nachweisbar zu aktivem MMP-9 umgewandelt wurde. Wie in HT 1080 war in keiner der transfizierten Zelllinien pro-MMP-2 nachweisbar. Die Expression von MMP-2 variierte zwischen den Zelllinien. Die TIMP-1-exprimierenden Zelllinien Timp 5, LD 14 und LD 12 wiesen im Unterschied zu den anderen Zelllinien im Zymogramm eine schmale Bande pro-MMP-9 und stärkere Banden MMP-2 auf. Die Zelllinie Timp 10 wies jedoch kein pro-MMP-9 auf und eine schwächere Bande MMP-2 als die Ausgangszelllinie HT 1080. Die Unterschiede in der Expression von pro-MMP-9 und MMP-2 waren somit in drei von vier TIMP-1-exprimierenden Zelllinien feststellbar, konnten aber nicht eindeutig auf die Überexpression von TIMP-1 zurückgeführt werden.

4.2.7 Die Überexpression von suPAR und TIMP-1 hat keinen Einfluß auf die Proliferationsgeschwindigkeit der transfizierten Zelllinien *in vitro*

Es wurde überprüft, ob die Überexpression von suPAR oder TIMP-1 Auswirkungen auf die Proliferation von HT1080 bzw. den verschiedenen Zelllinien hatte bzw. ob sich durch die Transfektionen Unterschiede in der Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen *in vitro* ergeben hatten. Hierzu wurde im Western-Blot *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) analysiert. PCNA ist ein Protein, dessen Expression mit dem Eintritt der Zellen in den Zellteilungszyklus korreliert und daher ein Maß für die Proliferationsgeschwindigkeit von Zellen darstellt.

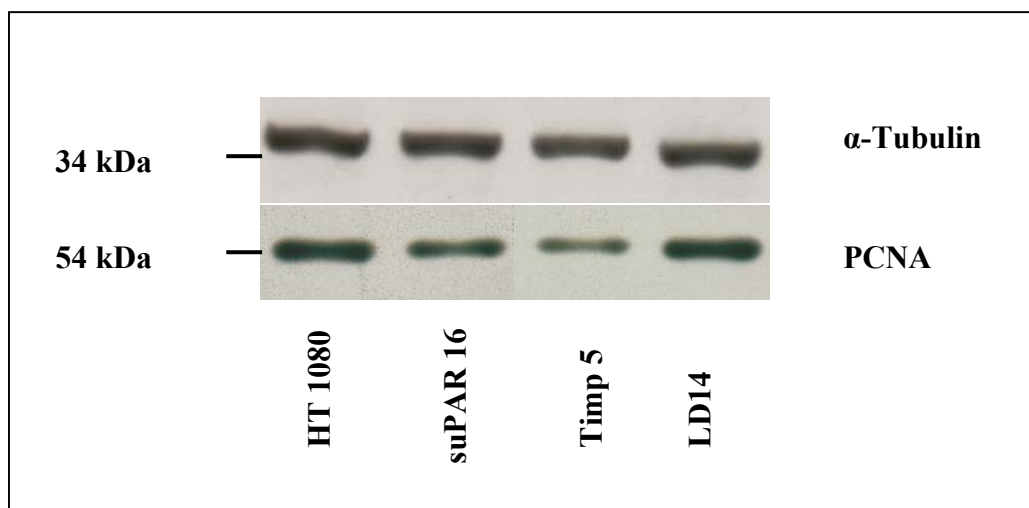


Abb.18: Analyse der Proliferation der Zelllinien *in vitro*

Jeweils 30 µg Protein wurden in einem 12%-igen SDS-Gel aufgetragen und α-Tubulin und PCNA detektiert (Belichtungszeit 1 min).

Die Zelllinien wiesen unterschiedliche Mengen PCNA auf in der Western-Blot- Bestimmung auf. Die PCNA-Banden waren in den Zelllinien HT 1080 und LD 14 am stärksten. Die Bandenstärke korrelierte in allen Zelllinien zur α-Tubulin- Bande, die als Ladekontrolle diente. Um die Menge des in jeder Zelllinie detektierten PCNA auf die in der Probe vorhandene Zellmenge beziehen zu können, wurde der Quotient PCNA/α-Tubulin quantitativ ausgewertet.

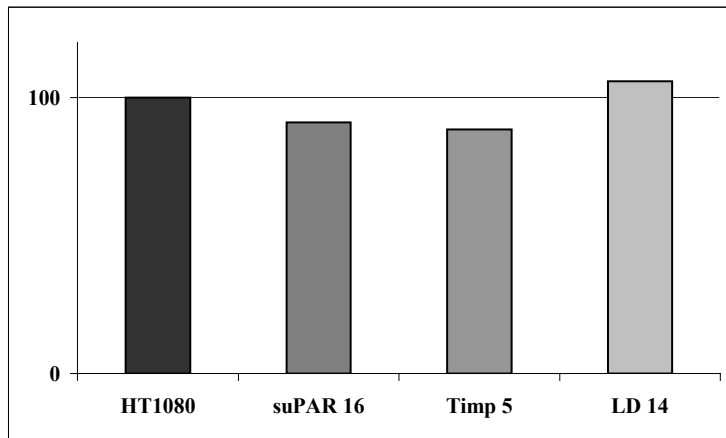


Abb.19: Quantitative Auswertung der Proliferation *in vitro*

Tumorzelllysate aus der Zellkultur wurden im Western Blot aufgetragen. Die Mengen an PCNA und α -Tubulin wurden detektiert und in der Kodak Imaging Station quantitativ ausgewertet. Der Quotient PCNA/ α -Tubulin wurde berechnet und der für die Ausgangszelllinie erhaltene Wert auf 100 festgesetzt.

Der Quotient PCNA/ α -Tubulin der Ausgangszelllinie HT 1080 wurde berechnet und auf 100 festgesetzt. Die PCNA/ α -Tubulin-Quotienten der transfizierten Zelllinien wurden auf diesen Wert bezogen. Die Proliferation der transfizierten Zelllinien variierte zwischen 88,4 % (Timp 5) und 106 % (LD 14) des Ausgangswertes (Abb.18). In keiner Zelllinie konnte eine deutliche Reduktion oder Erhöhung der Proliferation festgestellt werden, die Zelllinien unterschieden sich nicht hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens. Dieses Ergebnis deckte sich mit der Beobachtung in der Zellkultur, wo die Zelllinien in gleicher Dilution mit gleicher Frequenz passagiert werden konnten. Eine proliferationsfördernde Wirkung von TIMP-1 oder suPAR auf die transfizierten Zellen konnte nicht festgestellt werden, die Proliferation *in vitro* war unabhängig von der Expression der Transgene.

Durch stabile Transfektionen waren Zelllinien gewonnen worden, die suPAR überexprimierten (suPAR 16), TIMP-1 überexprimierten (Timp 5), oder suPAR und TIMP-1 überexprimierten (LD 14). Die Charakterisierung der Zelllinien hatte ergeben, dass es durch die Transfektion und Überexpression der jeweiligen Transgene nicht zu Veränderungen in der Genexpression von uPA und PAI-1 gekommen war. Die Expression von MMP-9 und MMP-2 war in den Zelllinien Timp 5 und LD 14 im Vergleich zu suPAR 16 und HT 1080 erhöht. Die Proliferationsgeschwindigkeit aller Zelllinien war im Vergleich zu HT 1080 unverändert.

4.3 Invasives Potential der transfizierten Zelllinien *in vitro*

Es wurde untersucht, ob die Überexpression von suPAR bzw. TIMP-1 zu einer Reduktion des invasiven Potentials *in vitro* geführt hatte. Dazu wurde die Invasion der Zelllinien durch eine rekonstituierte Basalmembran im Matrigel-Invasionsassay nachgebildet.

Im Matrigel-Invasionsassay wird die Fähigkeit von Zellen geprüft, eine Membran, die mit einer rekonstruierten Basalmembran (Matrigel) beschichtet ist, zu durchwandern. In diesem Versuch kann unter standardisierten Bedingungen *in vitro* die Invasivität der einzelnen Zelllinien verglichen werden.

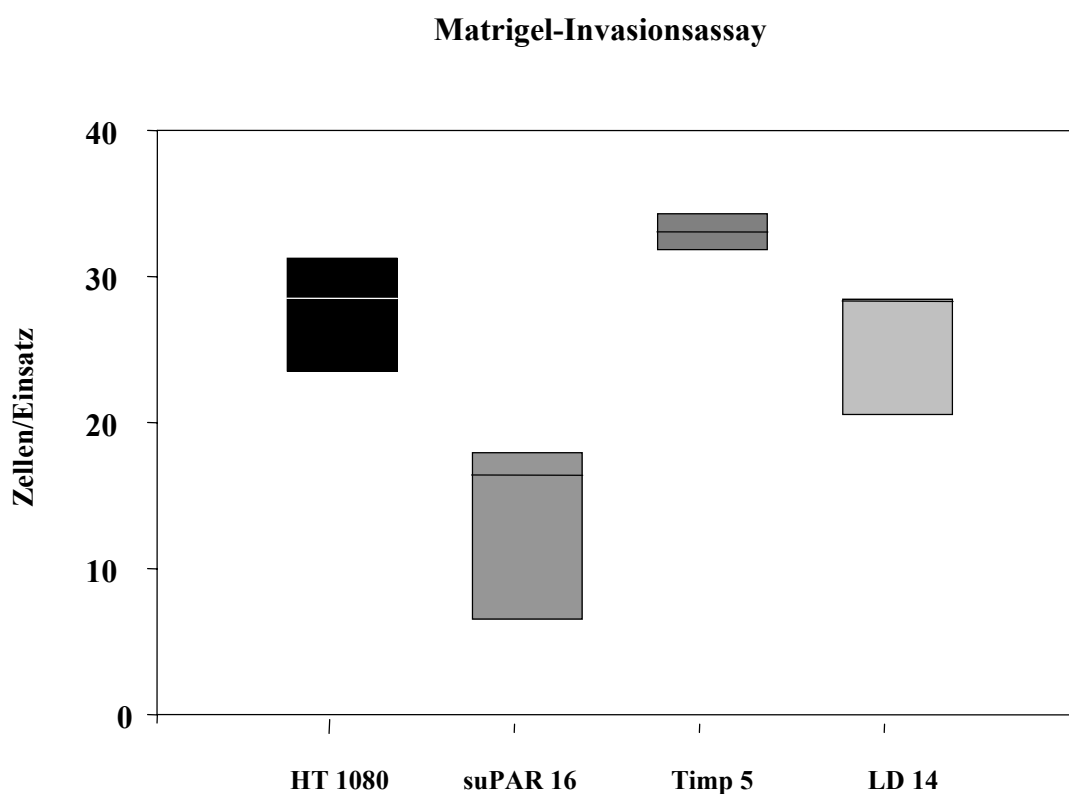


Abb.20: Invasives Verhalten der Zelllinien im Matrigel-Invasionsassay

Einsätze für 24-well-Platten wurden mit 28,4 µg Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel beschichtet. Die Einsätze wurden mit 500 µl Zellsuspension (entsprechend 5×10^5 Zellen) befüllt. Zwischen 24-well-plate und Einsatz wurden 750 µl Komplett- DMEM eingebracht, das als *Chemoattractant* 10% fötales Kälberserum enthielt. Nach 48 Stunden Inkubation wurden bei 10-facher Vergrößerung vertikal 5 Raster (Zeiss Axiovert 25-Zählgitter) ausgezählt. Alle Ansätze wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

In der Ausgangszelllinie HT 1080 lag die Zahl der Zellen, die die Matrigel-Membran durchwandert hatten, bei 275 Zellen. Die Anzahl der Zellen der Zelllinie suPAR 16, die die Matrigel-Membran durchwandert hatten, lag in deutlich unter der Zahl der Ausgangszelllinie HT 1080 ($127 \pm 82,9$ vs. $275 \pm 52,7$). In der Zelllinie Timp 5 lag die Zahl der Zellen, die durch die Membran gewandert waren, leicht über dem Wert der Zelllinie HT 1080 ($330 \pm 17,7$). Der Wert der Zelllinie LD 14 lag dagegen leicht darunter ($249 \pm 16,6$).

Insgesamt zeigte *in vitro* nur die Zelllinie suPAR 16 deutlich reduziertes invasives Verhalten, die Werte der anderen Zelllinien lagen im Bereich der Werte der Ausgangszelllinie. Für die Reduktion der Invasivität der Zelllinie suPAR 16 gegenüber der Ausgangszelllinie HT 1080 wurde statistisch ein Trend erreicht ($p = 0,1$). Das invasive Verhalten der anderen Zelllinien unterschied sich statistisch nicht signifikant (alle $p > 0,05$).

4.4 Metastatisches Potential der Zelllinien in vivo

Es waren Zelllinien hergestellt worden, die suPAR, TIMP-1 oder suPAR und TIMP-1 stabil überexprimierten. Die transfizierten Zelllinien unterschieden sich nicht in der Expression der für die Invasivität relevanten Proteasen uPA und PAI-1, die TIMP-1 überexprimierenden Zelllinien wiesen im Zymogramm z.T. leicht erhöhte Mengen MMP-9 sowie erhöhte Mengen MMP-2 im Vergleich zu den anderen Zelllinien auf. Die Proliferationsgeschwindigkeit *in vitro* unterschied sich nicht zwischen den Zelllinien. Das invasive Potential der Ausgangszelllinie und der transfizierten Zelllinien war *in vitro* im Matrigel-Invasionsassay untersucht worden. Hier war für die suPAR-überexprimierende Zelllinie suPAR 16 ein Trend zu geringerer Invasionsfähigkeit festgestellt worden, die TIMP-1-überexprimierende Zelllinie Timp 5 sowie die suPAR- und TIMP-1-überexprimierende Zelllinie LD 14 unterschieden sich im invasiven Verhalten jedoch nicht von der Ausgangszelllinie.

Im Matrigel-Invasionsassay wurde die Invasion durch eine Basalmembran nachgebildet. Im Unterschied zu den Bedingungen *in vitro* herrschen *in vivo* andere, häufig lokal kontrollierte Konzentrationen verschiedenster proteolytischer Enzyme und Mediatoren. Unter standardisierten Bedingungen *in vitro* durchgeführte Versuche können das komplizierte Zusammenspiel aller Faktoren, die beim metastatischen Prozess eine Rolle spielen, nicht berücksichtigen. Nur im Tierversuch konnte daher die Wechselwirkung zwischen dem Wirt und den (genetisch modifizierten) Tumorzellen erforscht werden.

4.4.1 Etablierung eines Metastasierungsmodells

Um das metastatische Potential der Zelllinien *in vivo* zu untersuchen, wurde versucht, ein Metastasierungsmodell von *lacZ*-markierten HT 1080-Zellen zu etablieren. In einem Vorversuch wurden spontane Metastasierung und experimentelle Metastasierung von HT 1080 in 7-10 Wochen alten weiblichen CD1 nu/nu Mäusen verglichen. Dazu wurden jeweils 1×10^6 Tumorzellen in 200 μ l PBS subkutan (s.c.) bzw. intravenös (i.v.) injiziert.

4.4.1.1 Spontanes Metastasierungsmodell

Zwei Mäusen wurden *lacZ*-markierte HT 1080- Zellen subkutan inokuliert. Nach 35 bzw. 43 Tagen wurden die Mäuse euthanasiert.

Nach 35 Tagen war der Primärtumor der ersten Maus 2,3 x 1,6 cm groß. Nekrosen waren makroskopisch nicht erkennbar, die Hautoberfläche war intakt. Die Maus war durch die Größe des Tumors zum Zeitpunkt der Euthanasie erheblich behindert, wies jedoch keine allgemeine Kachexie auf. Der Tumor der zweiten Maus wies zum Zeitpunkt der Euthanasie (Tag 43) eine Größe von 2,1 x 2,6 cm auf. Auch hier waren keine Nekrosen feststellbar, die Hautoberfläche war intakt. Die Maus wies eine beginnende Kachexie auf.

Die inneren Organe wurden konserviert und X-Gal gefärbt. Alle Organe wurden untersucht, ob sie mikroskopisch oder makroskopisch erkennbare Metastasen aufwiesen. Infolge der X-Gal-Färbung waren auch einzelne Zellen im Mikroskop als Metastasen im makroskopisch nicht befallenen Wirtsgewebe erkennbar. Größere Gruppen von X-Gal-gefärbten Zellen waren bereits makroskopisch als Makrometastasen erkennbar.



Abb.21: makroskopisch Metastasen-freie Lunge nach s.c.-Inokulation von HT 1080- Zellen

Präparation der linken Lunge, X-Gal Färbung, Aufsicht



Abb.22: makroskopisch Metastasen-freie Leber nach s.c.-Inokulation von HT 1080- Zellen

Präparation der gesamten Leber, X-Gal-Färbung, Aufsicht

Besonderes Augenmerk galt der Metastasierung in Gehirn, Lunge und Leber. In der Lunge waren im spontanen Metastasierungsmodell nach 35 und 43 Tagen Mikrometastasen

erkennbar, Makrometastasen dagegen nicht. In der Leber waren sowohl nach 35 als auch nach 43 Mikrometastasen zu sehen, Makrometastasen traten nicht auf. Nach 43 Tagen waren im Gehirn Mikrometastasen nachweisbar, die nach 35 Tagen noch nicht erkennbar gewesen waren. Andere Organe (Nieren, Darm, Milz) waren von der Metastasierung nicht betroffen.

4.4.1.2 Experimentelles Metastasierungsmodell

Zwei Mäusen wurden *lacZ*-markierte HT 1080-Zellen intravenös injiziert. Beide Tiere wurden am 35. Tag euthanasiert.

Nach Anfärbung der inneren Organe mit X-Gal fanden sich Makrometastasen in der Lunge. Die Leber wies makroskopisch keine Metastasen auf, im Binokular waren jedoch Mikrometastasen in der Leber erkennbar. Gehirn, Nieren, Darm und Milz waren sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch tumorfrei.

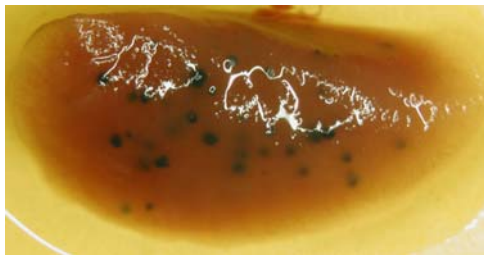


Abb.23: makroskopische Metastasierung in die Lunge nach i.v.- Inokulation von HT 1080-Zellen

Präparation der linken Lungenhälfte, X-Gal Färbung, Aufsicht

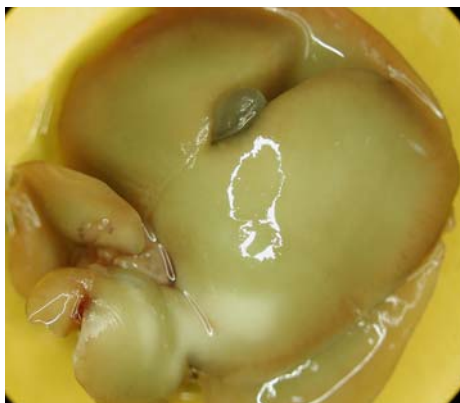


Abb.24: makroskopisch Metastasen-freie Leber nach i.v.- Inokulation von HT 1080-Zellen

Präparation des ganzen Leber, X-Gal Färbung, Aufsicht

4.4.1.3 Vergleich spontanes vs. experimentelles Metastasierungsmodell

Im Fibrosarkommodell stellte die Lunge den Hauptort der Metastasierung dar. Darüber hinaus fand eine Metastasierung in die Leber und in das Gehirn statt.

Im spontanen Metastasierungsmodell bestand eine sehr lange Latenz zwischen der Inokulation des Primärtumors und dem Auftreten von Mikrometastasen in der Lunge. Durch das Größenwachstum des Primärtumors wurde die Zeitdauer bis zur Euthanasie limitiert. Makrometastasen traten in der Lunge auch nach 43 Tagen nicht auf. Eine Auszählung der Mikrometastasen war nicht möglich.

Im experimentellen Metastasierungsmodell waren nach 35 Tagen Makrometastasen in der Lunge sichtbar, die im Binokular –Mikroskop ausgezählt werden konnten. In der Leber hatten sich Mikrometastasen gebildet, die mikroskopisch nicht quantifiziert werden konnten.

Es wurde das Modell der experimentellen Metastasierung gewählt, um das metastatische Potential der Ausgangszelllinie HT 1080 und der transfizierten Zelllinien *in vivo* zu untersuchen. Eine Quantifizierung konnte über das Auszählen der Makrometastasen in die Lunge erfolgen.

4.5 Vergleich der Überexpression von suPAR, TIMP-1 und suPAR und TIMP-1 im experimentellen Metastasierungsmodell *in vivo*

Im experimentellen Metastasierungsmodell wurden Unterschiede im metastatischen Potential *in vivo* zwischen den Zelllinien untersucht. Im Matrigel-Invasionsassay hatte sich nur für die Überexpression von suPAR in der Zelllinie suPAR 16 ein Trend zu geringerer Invasivität gezeigt. Unter kontrollierten Bedingungen *in vitro* war kein reduziertes invasives Potential für die TIMP-1 bzw. suPAR und TIMP-1 überexprimierenden Zelllinien Timp 5 und LD 14 gezeigt worden. *In vivo* findet dagegen eine Interaktion mit dem Wirtsgewebe statt. Die Tumorzellen treten dabei in unmittelbarem Kontakt mit den Gefäßendothelien und dem Lungengewebe. Der Erfolg der Metastasierung ist abhängig von der Tumor-Wirt-Interaktion und wird neben den von den Tumorzellen produzierten Proteasen auch von den durch das Wirtsgewebe produzierten Proteinen und Enzymen beeinflusst. Im experimentellen Metastasierungsmodell wurde der Einfluß der Überexpression von suPAR und TIMP-1 auf die Extravasation und die nachfolgende Ausbildung von Metastasen untersucht.

4.5.1 Reduktion der Lungenmetastasierung durch Überexpression von suPAR und TIMP-1

Im experimentellen Metastasierungsmodell wurde untersucht, ob die verminderte Invasivität der Zelllinie suPAR 16 *in vitro* auch *in vivo* zu einer geringeren Metastasierung, also zu einer Reduktion der Zahl der Lungenmetastasen führte. Es wurde analysiert, ob die Zelllinien Timp 5 und LD 14, die *in vitro* kein reduziertes invasives Potential aufwiesen, *in vivo* zu geringerer Metastasierung führten.

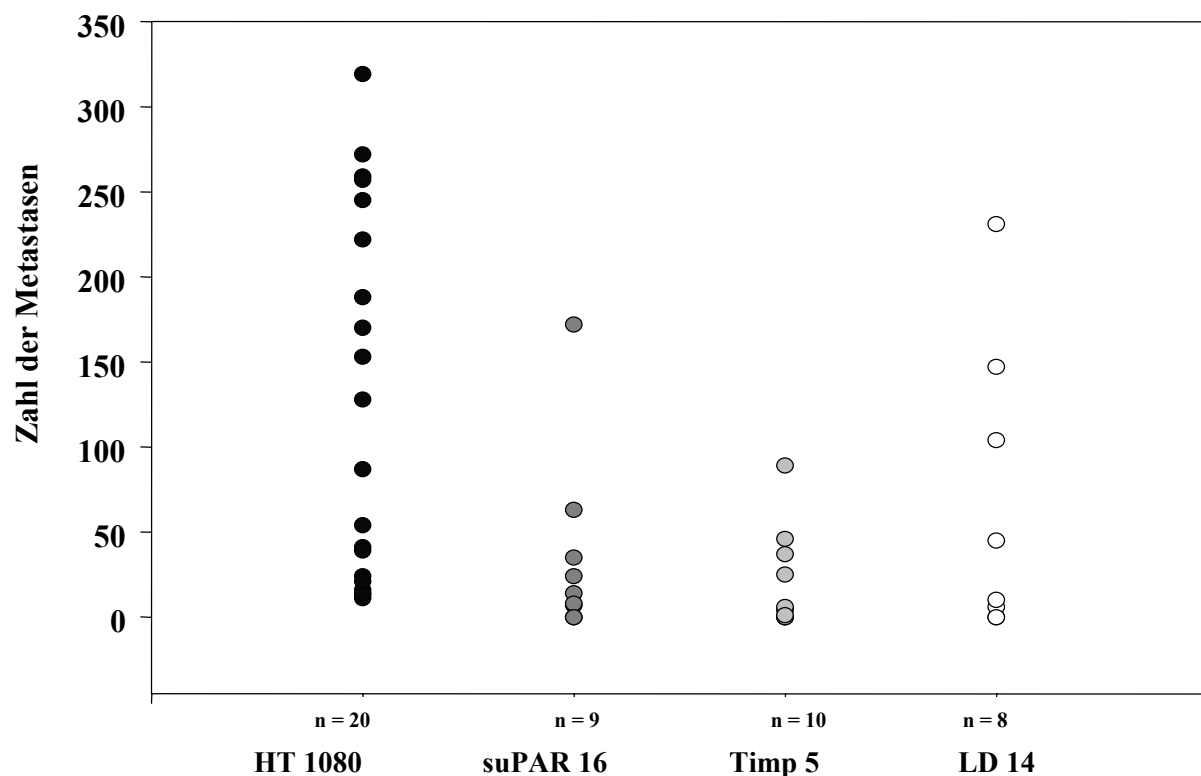


Abb.25: Metastatisches Potential der Zelllinien im experimentellen Metastasierungsmodell

Auszählung makroskopisch sichtbarer, mit X-Gal angefarbter Metastasen auf der Oberseite der jeweils linken Lungenhälfte im Zeiss Binokular. Jeder Punkt gibt die Zahl der Metastasen auf der linken Lungenhälfte einer Maus wieder.

Im experimentellen Metastasierungsmodell zeigte sich das Vorliegen hoher Metastasenzahlen in der Ausgangszelllinie HT 1080 bei einer großen Streubreite. Die Metastasierung in den Gruppen suPAR 16 und Timp 5 war dagegen deutlich verringert. Auch die Gruppe LD 14 wies eine Reduktion der Metastasierung auf, hier lag die Streubreite allerdings höher als in den Gruppen suPAR 16 und Timp 5.

In der Kontrollgruppe HT 1080 lag der Median der Zahl der Lungenmetastasen bei 107,5 Metastasen, der Mittelwert lag bei 126,7 Metastasen. Die Zahl der Lungenmetastasen wies in dieser Gruppe eine sehr hohe Streuung auf; sie reichte von 11 bis 319 Metastasen. Dies spiegelte sich in der großen Standardabweichung wider ($\pm 106,9$).

Die Metastasenzahlen in der Gruppe suPAR 16 waren im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduziert. Der Median lag bei 14 Metastasen, die meisten Tiere (7/9 Tieren) wiesen nur geringe Metastasenzahlen (≤ 35 Metastasen) auf. Die Streubreite reichte allerdings bis 172 Metastasen. Entsprechend lag der Mittelwert höher als der Median bei 35,9 Metastasen und wies eine große Standardabweichung auf ($\pm 54,9$).

Die Lungenmetastasierung in der Gruppe Timp 5 war ebenfalls stark reduziert. Die Metastasenzahlen in dieser Gruppe reichten von 0 bis 89 Metastasen, der Median lag bei 5 Metastasen. Es war hier zu einer deutlichen Reduktion sowohl der Metastasenzahlen als auch der Streubreite der Metastasenzahlen gekommen. Der Mittelwert lag bei 20,8 ($\pm 29,4$) Metastasen.

In der Gruppe LD 14 lag die Zahl der Lungenmetastasen deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe HT 1080. Auch die Streubreite lag unter der Kontrollgruppe, die Zahl der Lungenmetastasen reichte von 0 bis 231. Im Vergleich mit den Gruppen suPAR 16 und Timp 5 war die Streubreite jedoch größer. Der Mittelwert lag bei $67,9 \pm 85,4$ Metastasen. Der Median lag bei 27,5 Metastasen, in der Hälfte der Tiere hatten sich nur ≤ 10 Metastasen gebildet.

Insgesamt lag die Zahl der Metastasen in der Kontrollgruppe HT 1080 höher als in den transfizierten Zelllinien. Die Gruppen suPAR 16 sowie Timp 5 unterschieden sich statistisch signifikant von HT 1080 ($p = 0,012$ und $p = 0,002$, respektive). Im Vergleich der Gruppen HT 1080 und LD 14 wurde ein Trend ($p = 0,071$) zu einer geringeren Zahl von Lungenmetastasen in der Gruppe LD 14 beobachtet. Der Unterschied erreichte keine statistische Signifikanz. Die Behandlungsgruppen unterschieden sich untereinander nicht signifikant (suPAR 16 vs. Timp 5: $p = 0,54$; suPAR 16 vs. LD14: $p = 0,736$; Timp 5 vs. LD 14: $p = 0,286$).

Im experimentellen Metastasierungsmodell konnte die Lungenmetastasierung durch die Überexpression von suPAR bzw. TIMP-1 in den Zelllinien suPAR 16 bzw. Timp 5 im Vergleich zur Ausgangszelllinie signifikant gesenkt werden. Die kombinierte Überexpression von suPAR und TIMP-1 in der Zelllinie LD 14 hatte zu einer Reduktion der Lungenmetastasierung geführt; hier wurde statistisch ein Trend erreicht.

4.6 Einfluss der Überexpression von suPAR und TIMP-1 auf die Proteaseexpression *in vivo*

Die Überexpression von suPAR in suPAR 16 hatte *in vitro* zu geringerer Invasivität im Matrigel-Invasionsassay und *in vivo* zu einer signifikanten Reduktion der Metastasierung im experimentellen Metastasierungsmodell geführt. Die Überexpression von TIMP-1 in Timp 5 hatte *in vivo* im Unterschied zum unveränderten Invasionsverhalten *in vitro* die Metastasierung signifikant verringern können. Die Überexpression von suPAR und TIMP-1 in der Zelllinie LD 14 hatte zu einer Reduktion der Metastasierung im Vergleich zu der Ausgangszelllinie HT 1080 geführt, nicht aber im Vergleich mit den jeweils ein Transgen überexprimierenden Zelllinien suPAR 16 oder Timp 5.

Es wurde daher untersucht, welche Veränderungen im Proteasenprofil sich durch die Interaktion von Wirtsgewebe (Lunge als Hauptort der Metastasierung) und Tumorgewebe (HT 1080 und transfizierte Zelllinien) ergeben hatten. Um zu untersuchen, wie sich die Überexpression der einzelnen Transgene auf die Expression der inhibierten Proteasen *in vivo* auswirkte, wurden Zymogramme zum Nachweis von MMP-9 und MMP-2 und zum Nachweis von uPA durchgeführt. Hierbei wurde sowohl Lungengewebe von Mäusen untersucht, das nach Tumorzellinokulation keine Metastasen aufwies, als auch Lungengewebe, das metastatisch durchsetzt war.

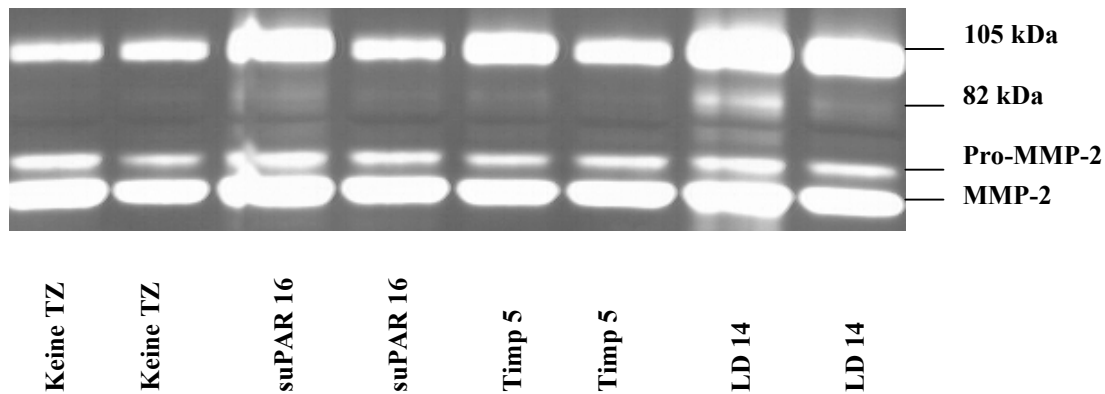
4.6.1 Sekretion von MMP-9 und MMP-2 *in vivo*

Die MMP-Expression wurde in einem ersten Zymogramm in Lungengewebe, das nach Tumorzellinjektion keine Metastasen aufwies, analysiert (Abb.25A). Dabei wurde untersucht, ob sich die Expression von MMP-9 und MMP-2 im Lungengewebe von Nacktmäusen, denen keine Tumorzellen injiziert worden waren, von der MMP-Expression im Lungengewebe der Mäuse unterschied, denen transgene Tumorzellen injiziert worden waren. In einem zweiten Zymogramm wurde analysiert, ob sich die MMP-Expression in metastatischem Lungengewebe zwischen den einzelnen Versuchsgruppen unterschied (Abb.25B). Die MMP-Expression in tumorfreiem Lungewebe und metastatischem Lungengewebe wurde verglichen.

Das aufgearbeitete Lungengewebe enthielt sowohl murines Lungengewebe als auch Tumorzellen der menschlichen Fibrosarkom-Zelllinien. Die im Zymogramm eingesetzten

Proben konnten daher sowohl murines als auch humanes MMP-9 und MMP-2 enthalten. Murines pro-MMP-9 hat eine Größe von 105 kD und ist damit etwas größer als humanes pro-MMP-9, das eine Größe von 96 kD besitzt. Ebenfalls 96 kD groß ist die aktive Form von murinem MMP-9, humanes MMP-9 hat eine Größe von 82 kD. Die Proteingrößen von humanem und murinem pro-MMP-2 und MMP-2 sind identisch.

A) Lungengewebe ohne Metastasen



B) Lungengewebe mit ähnlicher Metastasenzahl

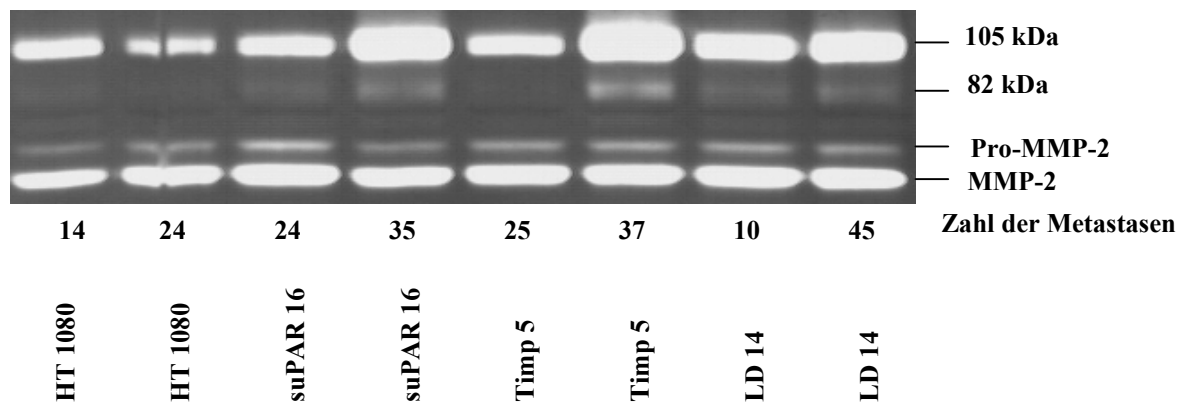


Abb.26: Bestimmung der Sekretion von MMP-2 und MMP-9 *in vivo* in Lungengewebe ohne Metastasen und mit ähnlicher Metastasenzahl

- A) Zymogramm aus aufgearbeitetem Lungengewebe, 25 µg Protein/Probe
Vergleich von Lungengewebe ohne Metastasen nach Tumorzellinjektion
- B) Zymogramm aus aufgearbeitetem Lungengewebe, 25 µg Protein/Probe
Vergleich von Lungengewebe mit ähnlicher Metastasenzahl nach Tumorzellinjektion

In jeder Probe war eine starke 105-kDa-Bande, eine schwache Bande pro-MMP-2 und eine breite Bande MMP-2 nachweisbar. In der Negativkontrolle (Lungengewebe ohne Tumorzellen) war die MMP-2-Bande etwas breiter als die pro-MMP-9-Bande, es waren jeweils etwa gleich starke Banden in beiden Proben der Negativkontrolle vorhanden.

Nach Injektion von suPAR 16-Zellen war in einer Probe im (tumorfremen) Lungengewebe eine stärkere pro-MMP-9-Bande als in der Negativkontrolle nachweisbar, in der zweiten Probe entsprach sie jedoch der Negativkontrolle. Hier war auch eine sehr schmale 82 kDa-Bande nachweisbar, die aktivem humanen MMP-9 entsprach. Unverändert waren im Vergleich die Bandenstärken von pro-MMP-2 und MMP-2.

In einer Probe aus (tumorfremem) Lungengewebe nach Timp 5- Inokulation war eine deutlich stärkere pro-MMP-9-Bande nachweisbar sowie eine schmale Bande humanes MMP-9; in der zweiten Probe lag die Expression von pro-MMP-9 über dem Expressionsniveau der Kontrolle, aktives MMP-9 war nicht detektierbar. Die pro-MMP-2 und MMP-2-Sekretion war dagegen unverändert im Vergleich zur Kontrolle.

Im Lungengewebe der Mäuse, denen LD 14-Tumorzellen injiziert worden waren, war eine sehr starke pro-MMP-9-Bande sowie eine schmale Bande humanes MMP-9 in beiden Proben nachweisbar. Auch die MMP-2-Bande war in diesen Proben stark ausgeprägt. Aufgrund der starken Erhöhung der pro-MMP-9-Bande war jedoch im Verhältnis mehr pro-MMP-9 als MMP-2 in beiden LD 14-Proben vorhanden. Dieses Verhältnis war außer in der ersten Probe der Zelllinie Timp 5 in allen anderen Proben umgekehrt; hier war die MMP-2 Bande schwächer bis ebenso stark wie pro-MMP-9. Dies deutete auf eine Induktion der pro-MMP-9-Expression im Lungengewebe der Tiere hin, denen TIMP-1-überexprimierende Tumorzelllinien injiziert worden waren. Die Induktion war dabei unabhängig von der Ausbildung von Metastasen im Lungengewebe.

Im zweiten Zymogramm wurde Lungengewebe analysiert, das mit 10-45 Metastasen ähnliche Metastasenzahlen aufwies (Abb.25B). In einem Vorversuch war für jede Gruppe (HT 1080, suPAR 16, Timp 5 und LD 14) ein Zymogramm durchgeführt worden, in dem Lungengewebe in der Reihenfolge steigender Metastasenzahlen aufgetragen worden war. Es konnte in jeder Gruppe nachgewiesen werden, dass die Expression von MMP-9 und MMP-2 nicht mit der Zahl der Metastasen korrelierte (Zymogramm hier nicht abgebildet).

Um Vergleichbarkeit hinsichtlich der Menge des in den Proben vorhandenen menschlichen Tumorgewebes zu erzielen, wurden hier im zweiten Zymogramm (Abb.25B) Proben mit etwa gleicher Metastasenzahl eingesetzt. Die Lungengewebe, in denen sich Metastasen aus den

Tumorzelllinien HT 1080, suPAR 16, Timp 5 und LD 14 gebildet hatten (Abb. 25B), wiesen jeweils eine starke Bande pro-MMP-9 auf, eine schwache Bande pro-MMP-2 sowie eine starke Bande MMP-2. Dieses Expressionsmuster entsprach dem der Proben aus Lungengewebe ohne Tumorzellen (vgl. Abb.25A), eine Induktion der MMP- Expression durch die Ausbildung von Metastasen war nicht nachweisbar.

Im Vergleich der Gruppen untereinander wies jeweils eine Probe der Gruppen suPAR 16 und Timp 5 eine stärkere Bande pro-MMP-9 auf als die Proben der Ausgangszelllinie HT 1080, die andere Probe entsprach jedoch etwa der Ausgangszelllinie. Beide Proben der Gruppe LD 14 wiesen eine höhere pro-MMP-9-Menge auf als die Ausgangszelllinie. Eine Erhöhung der pro-MMP-9-Menge war auch hier in drei von vier Proben aus den Gruppen der TIMP-1-überexprimierenden Zelllinien feststellbar. Humanes MMP-9 war in der Ausgangszelllinie und in der ersten Timp 5-Probe kaum detektierbar, die erste Probe der Gruppe suPAR 16 wies ebenfalls nur eine sehr schmale Bande MMP-9 auf. In beiden LD 14-Proben war MMP-9 nachweisbar. Insgesamt lag nur sehr wenig aktives MMP-9 vor, die Menge korrelierte jedoch mit dem Vorliegen von pro-MMP-9.

Insgesamt unterschied sich das Profil der Matrix-Metalloproteinasen in An- oder Abwesenheit von Lungenmetastasen wenig voneinander. Murines pro-MMP-9 und humanes MMP-9 sowie murines/humanes pro-MMP-2 und murines/humanes MMP-2 konnten nachgewiesen werden. In jeweils drei von vier Proben von TIMP-1-überexprimierenden Zelllinien wurde vermehrt pro-MMP-9 gefunden, sowie ebenfalls in einer Probe der suPAR- überexprimierenden Zelllinie suPAR 16.

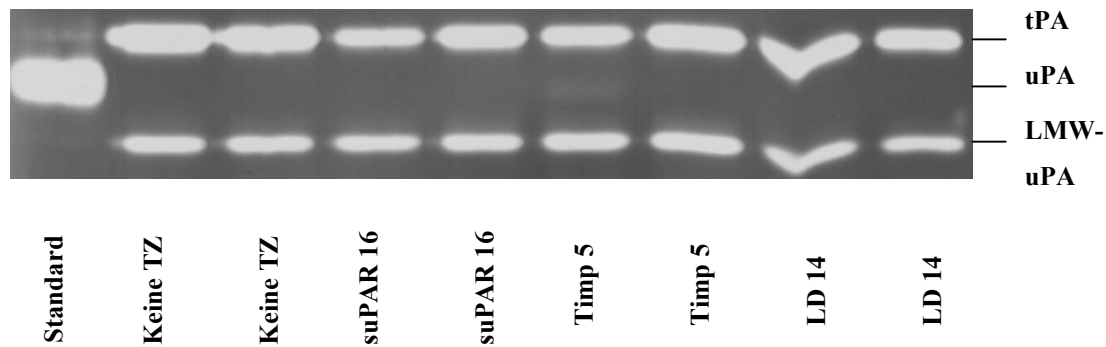
4.6.2 Sekretion von uPA *in vivo*

Die Sekretion von uPA wurde mit Hilfe von Zymogrammen bestimmt. Es wurde analysiert, ob das murine Lungengewebe uPA exprimiert und ob die Injektion von Tumorzellen die Expression von uPA im Lungengewebe induzierte. Außerdem wurde untersucht, ob sich nach der Bildung von Metastasen in der Lunge uPA nachweisen ließ und ob es Unterschiede in der uPA-Sekretion zwischen den Gruppen gab.

Im uPA-Zymogramm konnte neben uPA auch der Plasminogen Aktivator vom Gewebetyp (*tissue type plasminogen activator*, tPA) nachgewiesen werden. uPA konnte in zwei Formen als *high molecular weight*-uPA (HMW-uPA) und als *low molecular weight*-uPA (LMW-uPA) nachgewiesen werden. Die molekularen Größen der murinen und humanen Formen sind

sowohl für tPA (~63 kDa), uPA (~48 kDa) als auch LMW-uPA (~33 kDa) fast identisch und konnten im Zymogramm nicht unterschieden werden.

A) Lungengewebe ohne Metastasen



B) Lungengewebe mit ähnlicher Metastasenzahl

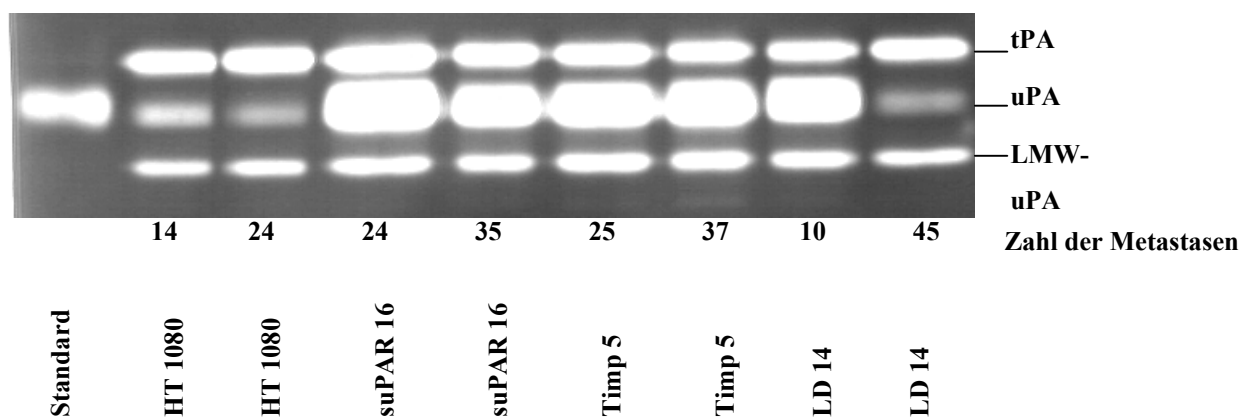


Abb.27: Bestimmung der Sekretion von uPA *in vivo*

im Lungengewebe ohne Metastasen und mit ähnlicher Metastasenzahl

- A) uPA-Zymogramm aus aufgearbeitetem Lungengewebe, 5 µg Protein/Probe
Vergleich von Lungengewebe ohne Metastasen nach Tumorzellinjektion
- B) uPA-Zymogramm aus aufgearbeitetem Lungengewebe, 5 µg Protein/Probe
Vergleich von Lungengewebe mit ähnlicher Metastasenzahl nach Tumorzellinjektion

Im uPA-Zymogramm konnte im Lungengewebe der Mäuse, denen keine Tumorzellen inokuliert worden waren, tPA und LMW-uPA nachgewiesen werden (Abb.26A). Auch in den Lungengewebe-Proben der Mäuse, in deren Lungen sich nach Tumorzellinokulation keine Metastasen gebildet hatten, war tPA und LMW- uPA nachzuweisen, (HMW-) uPA jedoch nicht. Die Menge an tPA und LMW- uPA unterschied sich nicht zwischen den Gruppen. Die

Inokulation der Tumorzellen hatte in den metastasenfremen Lungen nicht zu einer Veränderung des Profils der Plasminogen-Aktivatoren geführt.

In den Lungen, in denen sich nach Tumorzellinokulation Metastasen gebildet hatten, war neben tPA und LMW-uPA auch (HMW-) uPA nachweisbar (Abb.26B). Die Menge an tPA und LMW-uPA unterschied sich nicht zwischen den einzelnen Proben und war im Vergleich zu dem nicht-metastatischen Lungengewebe (Abb.26A) nicht erhöht. In beiden Proben der Ausgangszelllinie HT 1080 war eine schmale Bande uPA nachweisbar. In den Gruppen suPAR 16 und Timp 5 war in jeweils beiden Proben eine sehr starke Bande uPA vorhanden, ebenso in der ersten Probe der Gruppe LD 14. In der zweiten Probe war nur eine schmale Bande uPA nachweisbar, die etwa der Ausgangszelllinie entsprach.

Die Expression von tPA und LMW-uPA war unabhängig von der Ausbildung von Metastasen im Lungengewebe und erschien bei Vorliegen von Metastasen im Vergleich zu dem nicht-metastatischen Lungengewebe (Abb.26A) nicht erhöht. Das Vorliegen von Metastasen war Voraussetzung für den Nachweis von uPA im Zymogramm. Die Menge an uPA korrelierte nicht mit der Anzahl der Metastasen, die Ausgangszelllinie HT 1080 wies trotz annähernd gleicher Metastasenzahl deutlich weniger uPA auf als die Proben der transfizierten Zelllinien. Die Menge an uPA war in der suPAR-überexprimierenden Zelllinie suPAR 16 höher als in der Ausgangszelllinie, aber nicht höher als in den Proben der TIMP-1-überexprimierenden Zelllinie Timp 5. Somit korrelierte der Anstieg der uPA-Menge nicht mit der Überexpression von suPAR.

4.7 Kombination der Überexpression von TIMP-1 und der Behandlung mit monoklonalem Antikörper (anti-uPAR-mAK) im experimentellen Metastasierungsmodell in vivo

Im experimentellen Metastasierungsmodell hatte sich eine Reduktion der Metastasierung sowohl durch Überexpression von suPAR (in der Zelllinie suPAR 16) als auch durch Überexpression von TIMP-1 (in der Zelllinie Timp 5) gezeigt. Die kombinierte Überexpression von suPAR und TIMP-1 in der Zelllinie LD 14 hatte trotz mindestens gleich hoher Expressionslevel jedoch *in vitro* nicht zu einer Reduktion der Invasivität und *in vivo* zu einer geringeren Reduktion der Metastasierung geführt als die Überexpression jeweils eines Transgens allein in den Zelllinien suPAR 16 und Timp 5.

Da die Zelllinie LD 14 mehrfach transfiziert und selektioniert worden war, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es hierdurch zu Veränderungen in dieser Zelllinie gekommen war, die außerhalb der in dieser Arbeit untersuchten Einflußfaktoren lagen. Um differenzieren zu können, ob es sich bei den Resultaten um Effekte der kombinierten Überexpression von suPAR und TIMP-1, d.h. einer kombinierten Inhibition des uPA-Systems und des MMP-Systems durch nicht-synthetische Inhibitoren handelte, oder ob die Effekte davon getrennt auf mögliche Veränderungen in der Zelllinie LD 14 zurückzuführen waren, wurde ein weiteres Tierexperiment durchgeführt. Die Überexpression von suPAR wurde hier durch die Behandlung mit einem monoklonalen, gegen uPAR gerichteten Antikörper ersetzt. So konnte die gegen die Matrix-Metalloproteinasen gerichtete TIMP-1-Überexpression mit der Inhibition der Bindung von uPA an uPAR kombiniert werden, ohne dass eine doppelt transfizierte Zelllinie verwendet werden musste.

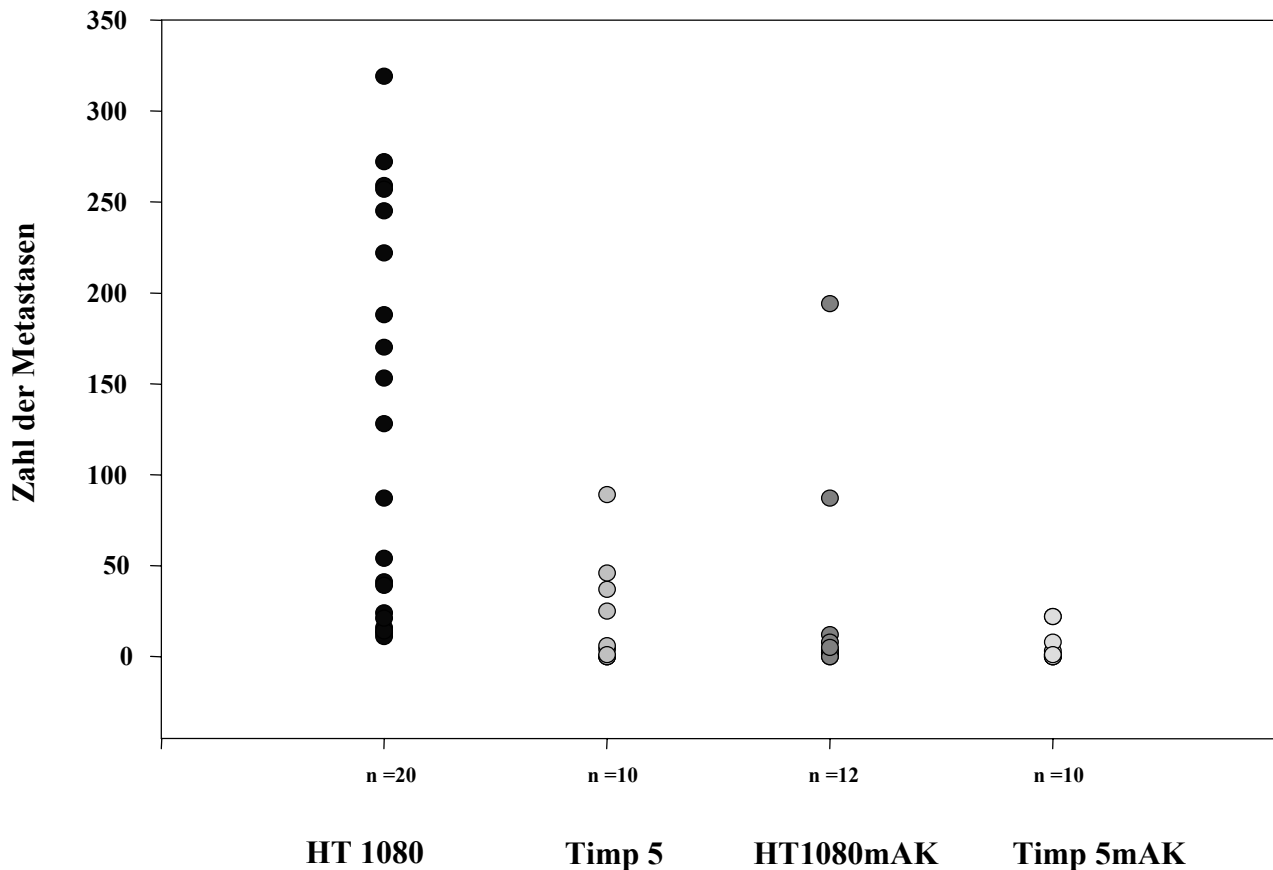


Abb.28: Metastatisches Potential bei Überexpression von TIMP-1 und Behandlung mit mAK im experimentellen Metastasierungsmodell

Auszählung makroskopisch sichtbarer, mit X-Gal angefarbter Metastasen auf der Oberseite der jeweils linken Lungenhälfte im Zeiss Binokular. Jeder Punkt gibt die Zahl der Metastasen auf der linken Lungenhälfte einer Maus wieder.

Im Vergleich zur Ausgangszelllinie, die hohe Metastasenzahlen bei einer weiten Streubreite aufwies, zeigte sich in den Gruppen der Zelllinie Timp 5 und der Gruppe HT 1080mAK eine deutliche Reduktion der Metastasierung. In der Gruppe HT 1080mAK waren HT 1080-Zellen inokuliert worden und die Mäuse mit monoklonalem, gegen uPAR gerichtetem Antikörper behandelt worden. Auch in der Gruppe Timp 5mAK, in der den Mäusen Zellen der Zelllinie Timp 5 inokuliert worden waren und zusätzlich mit dem monoklonalen Antikörper behandelt worden waren, war eine deutliche Reduktion der Metastasenzahlen sowie eine geringere Streubreite der Metastasenzahlen zu erkennen.

Die Ausgangszelllinie HT 1080 unterschied sich signifikant von der Gruppe Timp 5 ($p = 0,002$). Der Median der Metastasen in der Gruppe HT 1080 lag bei 108, in der Gruppe Timp 5 bei 5 Metastasen. Die Ausgangszelllinie unterschied sich ebenfalls signifikant von der uPAR-

mAK- Behandlungsgruppe, denen HT 1080-Zellen inokuliert worden waren (HT 1080 vs. HT 1080mAK: $p < 0,001$). Der Median in der Gruppe HT 1080 lag bei 3 Metastasen, die Streubreite lag zwischen 3 und 194 Metastasen. In der Gruppe, der Zellen der Zelllinie Timp 5 inokuliert worden war und in der eine Behandlung mit monoklonalem gegen uPAR gerichteten Antikörper erfolgt war, war die Metastasierung im Vergleich zur Ausgangszelllinie ebenfalls signifikant geringer ($p < 0,01$). Auch die Streubreite war stark reduziert auf eine Streubreite von 0-22 Metastasen.

Die Mutterzelllinie unterschied sich signifikant von den Behandlungsgruppen, die Gruppen Timp 5, HT 1080mAK und Timp 5mAK unterschieden sich allerdings nicht signifikant voneinander (Timp 5 vs. HT 1080mAK: $p = 0,947$; Timp 5 vs. Timp 5mAK: $p = 0,344$; HT 1080mAK vs. Timp 5mAK: $p = 0,391$).

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit einem monoklonalen, gegen uPAR gerichteten Antikörper zu einer signifikanten Reduktion der Metastasierung im experimentellen Metastasierungsmodell geführt hatte. Die Kombination der Überexpression von TIMP-1 und der Behandlung mit dem gegen uPAR gerichteten Antikörper hatte ebenfalls zu einer Reduktion der Metastasenanzahl geführt. Im Vergleich zur Überexpression von TIMP-1 allein oder der Behandlung mit dem gegen uPAR gerichteten Antikörper allein war durch die Kombination eine Reduktion der Streubreite der Metastasen erreicht worden.

5 Diskussion

5.1 Herstellung und Charakterisierung der Zelllinien

Die metastatische Fibrosarkomzelllinie HT 1080 bildete in dieser Arbeit die Ausgangszelllinie für die Generierung von suPAR-, TIMP-1 bzw. suPAR und TIMP-1 überexprimierenden Zelllinien. Die Zelllinie HT 1080 wurde wegen ihrer hohen Expression von uPA, uPAR und PAI-1 sowie MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 ausgewählt. Sie wies *in vitro* ein stark invasives Verhalten auf (Maquoi et al., 1998) sowie ein metastatisches Verhalten *in vivo* nach subkutaner als auch nach intravenöser Injektion (Praus et al., 1999).

Die Zelllinie war zuvor mit dem bakteriellen *lacZ*-Gen markiert worden, das nach Anfärbung mit β -Galaktopyranosiden diese spaltet und so eine einfache Detektion der Tumorzellen im (nicht-markierten) Wirtsgewebe ermöglicht (Krüger et al., 1998b).

Durch liposomale Transfektion und anschließende Selektion wurden Zelllinien generiert, die suPAR, TIMP-1 oder suPAR und TIMP-1 stabil überexprimierten (Abb.5). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der Transgene auch nach mehrfacher Passage auf hohem Niveau stabil war (Abb.11, Abb.13). Die Expression von uPA betrug in den transfizierten Zelllinien etwa das Doppelte der Ausgangszelllinie (Abb.14). Die Expression von PAI-1 war in den Zelllinien Timp 5 und LD 14 unverändert gegenüber der Ausgangszelllinie, in der Zelllinie suPAR 16 lag die Expression leicht über der Ausgangszelllinie (Abb.15). Im Zymogramm zeigte sich in drei der vier TIMP-1-überexprimierenden Zelllinien eine schmale Bande pro-MMP-9 und stärkere Banden MMP-2 (Abb.16). Die ebenfalls TIMP-1-überexprimierende Zelllinie Timp10 wies dagegen kein pro-MMP-9 und eine schwächere Bande MMP-2 auf als die Ausgangszelllinie HT 1080, somit konnte nicht von einer Induktion der Expression von MMP-9 und MMP-2 durch die Überexpression von TIMP-1 ausgegangen werden. Zudem wiesen auch zwei suPAR- überexprimierende Zelllinien, suPAR 16 und suPAR 8 eine minimale Menge pro-MMP-9 sowie eine im Vergleich zur Ausgangszelllinie HT 1080 erhöhte MMP-2-Mengen auf.

In HT 1080-Zellen ist eine klonale Variation der Gene, die für Plasminogen Aktivatoren (PAs), ihre Inhibitoren (PAIs) und den Urokinase-Rezeptor kodieren, beschrieben worden (Laug et al., 1992). In dieser Arbeit betrug die uPA-Expression in allen transfizierten Zelllinien etwa das Doppelte der Ausgangszelllinie. Die uPA-Expression war nicht nur in den suPAR-überexprimierenden Zelllinien suPAR 16 und LD 14, sondern auch in der TIMP-1-überexprimierenden Zelllinie Timp 5 in gleicher Weise erhöht. Wäre die erhöhte Expression

eine Folge der Transgenexpression, müsste sowohl die Überexpression von suPAR als auch die Überexpression von TIMP-1 zu einer gleichartigen, geringen Hochregulation von uPA geführt haben. Dies erscheint nicht wahrscheinlich, zumal bei einer Hochregulation durch verstärkte Transkription ein stärkerer Anstieg der uPA-Menge zu erwarten wäre. Es könnte sich dagegen um eine Variation des Expressionsniveaus handeln, möglicherweise als Folge der Transfektion. Da die uPA-Expression autokrin durch Bindung an den uPA-Rezeptor die Proliferation verstärken und Apoptose inhibieren kann, bedeutete möglicherweise bereits eine geringfügig höhere uPA-Expression einen Selektionsvorteil. Aufgrund klonaler Variation vorliegende Unterschiede in der uPA-Expression hätten zu einem Überlebensvorteil der Zellen mit höherer uPA-Expression geführt. So könnte zu erklären sein, dass alle transfizierten Zelllinien ein ähnlich hohes Expressionsniveau aufwiesen. Die leicht erhöhte Expression von uPA wäre somit eine Folge der Transfektion und stabilen Selektion, nicht aber der Überexpression von suPAR oder TIMP-1.

Die Expression von PAI-1 unterschied sich nicht zwischen der Ausgangszelllinie HT 1080 und den Zelllinien Timp 5 und LD 14. Die Expression von PAI-1 in der Zelllinie suPAR 16 lag dagegen um ein Drittel über dem Expressionsniveau der Ausgangszelllinie. In der ebenfalls suPAR, daneben aber auch TIMP-1 überexprimierenden Zelllinie LD 14 wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Die Expression von PAI-1 scheint daher nicht abhängig von der Überexpression von suPAR zu sein, da sich eine höhere Expression zum einen nur bei der alleinigen Überexpression von suPAR (nicht aber der Kombination suPAR und TIMP-1) beobachten ließ. Zum anderen ist dieser Effekt nur gering ausgeprägt (Erhöhung um ein Drittel) und kann daher nicht als systematische Hochregulation gewertet werden. Eher ist auch hier von einer Varianz der Expression von PAI-1 auszugehen, die sich möglicherweise ebenfalls infolge der Transfektion ergeben hatte. Da nur eine geringfügig höhere Expression von PAI-1 in nur einer transfizierten Zelllinie beobachtet wurde, hatte die PAI-1-Expression jedoch wahrscheinlich keinen Selektionsvorteil geboten. Die leicht erhöhte PAI-1-Expression in der Zelllinie suPAR 16 ist am ehesten als Expressionsvariante in der verwendeten Zelllinie suPAR 16 zu werten und nicht auf die Überexpression von suPAR zurückzuführen.

Ebenso ergab die zymographische Bestimmung von MMP-2 und MMP-9 Unterschiede, die nicht auf die Überexpression der Transgene, insbesondere TIMP-1, zurückzuführen waren. Die Ursachen für die Unterschiede können daher in einer erhöhten Transkription infolge der Insertion der transfizierten Plasmide in das Genom der transfizierten Zellen liegen. Möglicherweise liegt andernfalls die Ursache im Vorliegen klonaler Variation, wobei durch

den Selektionsvorgang im Anschluss an die Transfektion einzelne Klone amplifiziert wurden, die sich im Expressionsniveau von MMP-2 und MMP-9 unterschieden. In allen transfizierten Zelllinien waren sowohl MMP-9 als auch MMP-2 nachweisbar, in der Ausgangszelllinie lag das Expressionsniveau allerdings unter der Nachweisgrenze. In Zymogrammen mit höherer Konzentration des eingesetzten Überstandes war die Sekretion von MMP-9 auch in der Ausgangszelllinie nachgewiesen worden (eigene Daten, hier nicht gezeigt). Somit unterschieden sich die Zelllinien im Expressionsniveau der Gelatinasen, jedoch nicht im Expressionsmuster.

Das Niveau der Überexpression von suPAR und TIMP-1 nach gleichzeitiger Kultivierung der Ausgangszelllinie und der transfizierten Zelllinien wurde bestimmt. Hier zeigte sich die stabile Überexpression von suPAR in der Zelllinie suPAR 16 und von TIMP-1 in der Zelllinie Timp 5 (Abb.11, Abb.13). In der Zelllinie LD 14, die aus der Zelllinie suPAR 16 hervorgegangen war (Abb.5) und die nach Transfektion von suPAR 16 mit *timp-1* die höchsten Expressionslevel TIMP-1 aufwies, wurde eine Erhöhung des Expressionsniveaus von TIMP-1 auf etwa das Doppelte der Zelllinie Timp 5 festgestellt, darüber hinaus lag die Expression von suPAR in der Zelllinie LD 14 ebenfalls bei etwa der zweifachen Menge der Ausgangszelllinie suPAR 16. Die Ursache hierfür lag nicht in einer rascheren Zellproliferation, so dass nach 24 Stunden Inkubationszeit des Mediums mit den Zellen mehr Zellen der Zelllinie LD 14 vorhanden gewesen wären (Abb.17). Der Grund lag möglicherweise in einer Beeinflussung der Transkription von *suPAR* infolge der Insertion von *timp-1* nach der zweiten Transfektion.

Die Proliferationsgeschwindigkeit unterschied sich *in vitro* nicht zwischen den Zelllinien (Abb.17). Dieses Ergebnis unterscheidet sich zum Teil von anderen Studien, in denen die Überexpression von suPAR zu einer Reduktion der Proliferationsgeschwindigkeit geführt hatte (Wilhelm et al., 1994; Lutz et al., 2001). Durch suPAR wird die Interaktion von uPA und uPAR unterbrochen, die zur Induktion eines Signaltransduktionsweges und schließlich zu erhöhter Zellproliferation führt (Fischer et al., 1998). Das Ergebnis steht allerdings in Übereinstimmung mit der Beobachtung unserer Arbeitsgruppe, dass die stabile Überexpression von suPAR in einer Brustkrebszelllinie keinen Einfluß auf die Proliferationsgeschwindigkeit hatte (Krüger et al., 2000). Wie für uPA ist auch für TIMP-1 ein proliferationsfördernder Effekt für eine Vielzahl von Zelllinien beschrieben worden (Hayakawa et al., 1992), dieser Effekt ist zelltyp-spezifisch. In Fibrosarkomzellen ist dieser Effekt bisher nur für TIMP-2 beschrieben worden (Corcoran and Stetler-Stevenson, 1995).

Trotz hoher Überexpression von TIMP-1 konnte in dieser Arbeit kein proliferationsfördernder Effekt von TIMP-1 auf die HT 1080-Fibrosarkomzelllinie festgestellt werden.

Von den *suPAR*-transfizierten Zelllinien überexprimiertes *suPAR* ist funktionell aktiv. Im uPA-Liganden Bindungsassay konnte gezeigt werden, dass *suPAR* in der Lage ist, an das aminoterminalen Fragment (ATF) des uPA zu binden und somit in der Lage ist, als Abfänger (*scavenger*) zu dienen.

5.2 Invasives Potential der transfizierten Zelllinien *in vitro*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *suPAR* das invasive Potential der Zelllinie HT 1080 senken konnte. Die Überexpression von TIMP-1 und die kombinierte Überexpression von *suPAR* und TIMP-1 konnten das invasive Potential *in vitro* jedoch nicht verringern (Abb.19).

Andere Arbeitsgruppen konnten bereits früh die wichtige Funktion des uPA-Systems für die Invasion *in vitro* zeigen (Meissauer et al., 1991; Meissauer et al., 1992). Für die Invasivität von HT 1080-Zellen ist ebenfalls die Bedeutung des uPA-Systems beschrieben worden (Cajot et al., 1989). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte in dieser Arbeit in der Zelllinie *suPAR* 16, die *suPAR* stabil überexprimierte, eine Verringerung der Invasivität beobachtet werden. Dieses Ergebnis unterstreicht die zentrale Rolle des uPA-Systems für die Invasivität *in vitro*. Die Überexpression von *suPAR* stellte *in vitro* einen wirksamen Ansatz zur Reduktion des invasiven Potentials der Fibrosarkomzelllinie HT 1080 dar. Neben der starken Überexpression von *suPAR* könnte die leicht erhöhte PAI-1-Expression in der Zelllinie *suPAR* 16 zur verminderten Invasivität beigetragen haben. PAI-1 führt durch die Bindung an uPA zu einer Inhibition der Aktivität von uPA. Darüber hinaus kann PAI-1 an den uPA/uPAR-Komplex binden, dies führt zur Internalisierung des Komplexes und beendet die an der Zelloberfläche fokussierte proteolytische Aktivität des an den uPA-Rezeptor gebundenen uPA. Da uPA und PAI-1 lysosomal abgebaut werden, trägt dies zur Reduktion von uPA bei. Der uPA-Rezeptor gelangt dagegen nach der Internalisation wieder an die Zelloberfläche, jedoch wird auch hierbei ein kleiner Teil degradiert. So kommt es auch zu einer Reduktion der Menge des uPA-Rezeptors an der Oberfläche. Insgesamt kann also die leicht erhöhte PAI-1-Expression zur verminderten Invasivität beigetragen haben. Aufgrund der nur leicht erhöhten PAI-1-Expression in der Zelllinie *suPAR* 16 gegenüber den anderen

Zelllinien dürfte dies als ergänzender Mechanismus zu der wirksamen Inhibition der Interaktion von uPA und uPAR durch die starke Überexpression von suPAR in der Zelllinie suPAR 16 und die dadurch bewirkte Reduktion der Invasivität gesehen werden.

Auch die Bedeutung des MMP-Systems für das invasive Potential *in vitro* ist gut belegt. Insbesondere ist die Rolle der Gelatinasen für die Invasivität *in vitro* herausgestellt worden (Kondraganti et al., 2000; Pazzaglia et al., 2004). Die Überexpression von TIMP-1 in der Zelllinie Timp 5 führte in dieser Arbeit jedoch nicht zu einem reduzierten invasiven Verhalten. TIMP-1 inhibiert die meisten MMPs, weist allerdings eine geringere Inhibition der membranständigen Metalloproteinasen, u.a. MMP-14 (MT1-MMP) auf (Murphy and Knäuper, 1997). MMP-14 aktiviert im Zusammenspiel mit TIMP-2 pro-MMP-2 zu aktivem MMP-2. TIMP-1 ist nicht in der Lage, die Aktivierung von pro-MMP-2 zu MMP-2 zu inhibieren. In der Aktivität von MMP-2 kann der Grund für die fehlende Inhibition des invasiven Potentials der Zelllinie HT 1080 durch die Überexpression von TIMP-1 *in vitro* liegen. Liegt TIMP-1 im Überschuss vor, wird aktives MMP-2 jedoch gehemmt.

Alternativ könnte ein übergeordnetes System, z.B. das uPA-System, durch die Aktivierung von uPA und Plasmin unabhängig von der proteolytischen Aktivität der MMPs in der Lage sein, die Invasion durch die Matrigel-Membran zu ermöglichen. Hierfür spricht, die Degradation von Kollagen Typ IV, einem Substrat der Gelatinasen, durch eine proteolytischen Kaskade ohne die Beteiligung von Matrix-Metalloproteinasen nachgewiesen werden konnte (Mackay et al., 1990). In der Zelllinie HT 1080, die hohe Level an uPA und uPAR aufweist, könnte dies ein Invasions- Mechanismus zur Umgehung der Inhibition der MMPs durch die Überexpression von TIMP-1 sein. Die gegenüber der Ausgangszelllinie leicht erhöhte uPA-Expression in der Zelllinie Timp 5 könnte zu diesem Mechanismus und zu dem invasiven Phänotyp beigetragen haben. Tatsächlich liegt die beobachtete Invasivität der Zelllinie Timp 5 leicht über der Ausgangszelllinie HT 1080. Dieses Ergebnis deutet auf eine übergeordnete Funktion des uPA-Systems gegenüber dem MMP-System für die Invasivität der Fibrosarkom-Zelllinie HT 1080 *in vitro* hin. Die Inhibition des MMP-Systems scheint im HT 1080-Fibrosarkommodell von nachgeordneter Bedeutung zu sein und eine gegenüber der Inhibition des uPA-Systems weniger effektive Strategie zur Reduktion des invasiven Potentials zu sein.

Trotz der kombinierten Überexpression von suPAR und TIMP-1 in der Zelllinie LD 14 kam nicht zu einer Reduktion des invasiven Potentials. Sowohl suPAR als auch TIMP-1 wurden stabil überexprimiert, und es war ebenfalls gezeigt worden, dass suPAR funktionell aktiv war

(Abb.12). Nachdem eine Reduktion des invasiven Potentials für die suPAR-überexprimierende Zelllinie suPAR 16 beobachtet worden war, hätte allein die Überexpression von suPAR auch in der Zelllinie LD 14 die Invasivität reduzieren müssen, zumal die suPAR-Expression höher als in der Zelllinie suPAR 16 lag (Abb.11). Die Expression von PAI-1 in der Zelllinie LD 14 entsprach der Ausgangszelllinie, lag allerdings leicht unter der Expression von PAI-1 in der Zelllinie suPAR 16. Dennoch muss der Beitrag dieser gering erhöhten Expression zur Verminderung der Invasivität als eher gering eingestuft werden, wesentlich erscheint die Überexpression von suPAR. Möglicherweise hat auch die gegenüber der Ausgangszelllinie HT 1080 erhöhte Expression von uPA zu einer Erhöhung der Invasivität geführt. Die erhöhte Expression von uPA war jedoch auch in der Zelllinien suPAR 16 beobachtet worden. Trotz der leicht höheren Expression von uPA war es infolge der Überexpression von suPAR und dem Abfangen von uPA zu einer wirksamen Reduktion der Invasivität gekommen. Die erhöhte Expression von uPA hatte somit zwar sicher zu einem verstärkten invasiven Potential der Zelllinie LD 14 beigetragen, konnte jedoch nicht allein als Erklärung dafür dienen, warum es nicht zu einer Reduktion des invasiven Potentials gekommen war.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die kombinierte Inhibition von MMP-System und uPA-System mit synthetischen Inhibitoren die Invasivität einer Ovarialkarzinomzelllinie *in vitro* senken konnte. Der Serin-Protease-Inhibitor Aprotinin und der MMP-Inhibitor Batimastat wurden als Inhibitoren eingesetzt, und übereinstimmend mit der Beobachtung in dieser Arbeit, dass die Inhibition des uPA-Systems die Invasivität wirksamer hemmte als die Inhibition des MMP-Systems, konnte eine stärkere Hemmung kaseinolytischer und kollagenolytischer Aktivität durch Aprotinin als durch Batimastat erreicht werden. In der Zelllinie LD 14, die eine kombinierte Überexpression von suPAR und TIMP-1 aufwies, konnte jedoch kein synergistischer Effekt gezeigt werden, das invasive Potential dieser Zelllinie *in vitro* war vergleichbar mit der Zelllinie Timp 5, die TIMP-1 allein überexprimierte. Die leicht erhöhte Expression von uPA gegenüber der Ausgangszelllinie hatte möglicherweise zu einem invasiveren Phänotyp beigetragen, die Expression von PAI-1 sowie die Proliferation *in vitro* waren jedoch unverändert. Die fehlende Inhibition der Invasivität der Zelllinie LD 14 konnte hieraus nicht allein erklärt werden. Möglicherweise hatte die Insertion des Plasmids oder die anschließenden Selektionsprozesse zu zufälligen Veränderungen außerhalb der hier untersuchten Faktoren geführt, die zu einem weiterhin invasiven Verhalten der Zelllinie geführt hatten.

5.3 *Metastatisches Potential der Zelllinien in vivo*

Die Invasion der Matrigel-Membran erlaubte die Analyse des Effekts der Transgen-Expression unter standardisierten Bedingungen *in vitro*. Während die Invasion der nachgebildeten Basalmembran abhängig vom invasiven Potential der Tumorzellen ist, spielt für die Metastasierung *in vivo* die Interaktion mit dem Wirtsgewebe eine entscheidende Rolle. Damit sich Metastasen bilden können, müssen die Tumorzellen die Basalmembran durchwandern, in ein neues Gewebe migrieren und dort erneut proliferieren. Um dies zu ermöglichen, verfügen die Tumorzellen über Proteasen und Proteaseinhibitoren sowie autokrine Signalwege, werden aber auch durch Proteasen und Proteaseinhibitoren des Wirtsgewebes und parakrine Signalwege beeinflusst.

Um diese komplexen Interaktionen und die Effekte der Überexpression von suPAR und TIMP-1 auf die Metastasierung zu untersuchen, wurde ein Metastasierungsmodell von HT 1080-Zellen in Nacktmäusen etabliert. Spontane Metastasierung, d.h. die subkutane Implantation des Fibrosarkoms und experimentelle Metastasierung, d.h. die Injektion der Tumorzellen in die Schwanzvene der Mäuse, wurden hinsichtlich der Metastasierung in innere Organe, insbesondere die Lunge und Leber, miteinander verglichen.

Im spontanen Metastasierungsmodell war es weder in der Lunge noch in der Leber zu makroskopischen Metastasen gekommen (Abb.20, Abb.21). Zum Zeitpunkt der Opferung war die Maus durch den Primärtumor bereits erheblich beeinträchtigt und wies nach 43 Tagen eine beginnende Kachexie auf. Im spontanen Metastasierungsmodell werden die Stadien der Tumorprogression vom Wachstum des Primärtumors, der Loslösung von Zellen aus dem Zellverband, Invasion ins Gefäßsystem und Extravasation sowie Implantation am Ort der Metastasierung und Proliferation durchlaufen. Die Latenz zwischen der Implantation des Primärtumors und dem Auftreten mikroskopischer Fernmetastasen war jedoch sehr lang. So konnte es zur Selektion von Zellklonen mit höherem Metastasierungspotential kommen und die Metastasierung durch Zellklone erfolgen, deren Genotyp von den ursprünglich applizierten Zellen verschieden war. Dies war hier insbesondere deshalb zu befürchten, weil die Tumorzellen bereits durch mehrere Transfektionen genetisch modifiziert und mehrmals selektioniert worden waren.

Im experimentellen Metastasierungsmodell traten makroskopisch sichtbare Lungenmetastasen sowie mikroskopische Metastasierung in die Leber auf (Abb.22, Abb.23). Die Lunge stellte den Hauptort der Metastasierung dar, die Lungenmetastasen ließen sich nach X-Gal-Färbung

quantifizieren, was den Vergleich der metastatischen Effizienz zwischen den Tumorzelllinien ermöglichte (Krüger et al., 1998b). Die experimentelle Metastasierung stellte somit ein Modell zur Analyse der Tumorzelllinien *in vivo* dar.

5.3.1 Vergleich der Zelllinien im experimentellen Metastasierungsmodell

Im experimentellen Metastasierungsmodell hatte die Überexpression von suPAR in der Zelllinie suPAR 16 und die Überexpression von TIMP-1 in der Zelllinie Timp 5 zu einer signifikanten Reduktion der Zahl der Lungenmetastasen geführt. Die kombinierte Überexpression von suPAR und TIMP-1 in der Zelllinie LD 14 hatte ebenfalls zu einer Reduktion der Lungenmetastasierung im Vergleich zur Ausgangszelllinie HT 1080 geführt, nicht aber im Vergleich zu den Zelllinien suPAR 16 oder Timp 5 (Abb.24).

5.3.1.1 suPAR inhibiert *in vivo* die Lungenmetastasierung von HT 1080-Zellen

Unsere Arbeitsgruppe hatte bereits für eine Ovarialkarzinomzelllinie und für eine Brustkrebszelllinie gezeigt, dass die stabile Überexpression von suPAR die Zahl der Metastasen im experimentellen Metastasierungsmodell gesenkt werden konnte (Krüger et al., 2000; Lutz et al., 2001). In dieser Arbeit konnte erstmals für die Fibrosarkomzelllinie HT 1080 gezeigt werden, dass die Überexpression von suPAR zu verringerter Lungenmetastasierung im experimentellen Metastasierungsmodell führte. Während die Ovarialkarzinomzelllinie und die Brustkrebszelllinie epithelialen Ursprungs sind, konnte in dieser Arbeit in einer mesenchymalen Zelllinie die Wirksamkeit der Inhibition des uPA-Systems durch die stabile Überexpression von suPAR nachgewiesen werden.

Durch die Überexpression von suPAR konnte die Zahl der Lungenmetastasen signifikant reduziert werden. Dieses Ergebnis stimmte mit der Beobachtung *in vitro* überein, wo ein Trend zu geringerer Invasivität der suPAR-überexprimierenden Zelllinie suPAR 16 vorlag (Abb.19). Die zentrale Bedeutung des uPA-Systems, insbesondere von Plasmin, für die Invasivität *in vitro* ist bereits diskutiert worden. *In vivo* aktiviert Plasmin die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 über einen zellgebundenen Mechanismus. In der löslichen Phase degradiert Plasmin die aktiven Metalloproteinasen; findet jedoch die Interaktion von uPA und uPAR an der Tumorzelloberfläche statt, werden die Metalloproteinasen aktiviert (Mazzieri et al., 1997). Diese Aktivierung kann durch die Inhibition von uPA unterdrückt werden. Somit verringert die Überexpression von suPAR über das Abfangen von uPA im perizellulären

Raum die Interaktion von uPA und uPAR an der Tumorzelloberfläche. Hierdurch kommt es zu verminderter zellgebundener Plasminaktivierung und infolge dessen zu verringerter zellgebundener Aktivierung von Metalloproteinasen.

Als weiterer Wirkmechanismus der Überexpression von suPAR ist die Inhibition intrazellulären *Signallings* beschrieben worden. In einer Ovarialkarzinomzelllinie konnte die proliferationsfördernde Wirkung von uPA, die unabhängig von der proteolytischen Aktivität war, durch die Zugabe von suPAR inhibiert werden (Fischer et al., 1998). In dieser Arbeit konnte *in vitro* allerdings keine Änderung der Proliferationsgeschwindigkeit infolge der Überexpression von suPAR festgestellt werden (Abb.17); daher ist unklar, ob die Proliferationsgeschwindigkeit *in vivo* durch die Überexpression von suPAR verändert war. Eine Western-Blot-Analyse von PCNA in Lungengewebe der Gruppen HT 1080, Timp 5, suPAR 16 und LD 14 mit vergleichbarer Metastasenzahl ergab keinen Hinweis auf Unterschiede im Proliferationsverhalten der Gruppen *in vivo* (eigene Daten, nicht gezeigt).

Zusätzlich ist eine direkte Hemmung des Zellwachstums unabhängig von der Inhibition von uPA durch suPAR beschrieben worden (Jo et al., 2003). In einem ebenfalls zelltypabhängigen Mechanismus führt die Überexpression von suPAR zu einer Verringerung der ERK-Aktivierung in Zelllinien, die uPA/uPAR-abhängige Signalwege aufweisen. Da HT 1080 eine hohe Expression von uPAR und autokrines und parakrines uPA-abhängiges *Signalling* aufweist, kann hier angenommen werden, dass die Überexpression von suPAR in der Zelllinie HT 1080 über diesen von der antiproteolytischen Funktion unabhängigen Mechanismus, zur Reduktion der Metastasierung beigetragen hat.

Die Injektion menschlicher Fibrosarkomzellen in Nacktmäuse stellt ein xenogenes Metastasierungsmodell dar. Dabei muss berücksichtigt werden, dass murines uPA nicht an den menschlichen uPA-Rezeptor bindet und somit der Mechanismus der parakrinen uPA/uPAR-Interaktion nicht wirksam ist (Solberg et al., 1992). Gleichzeitig kann menschliches suPAR nur menschliches uPA binden und damit abfangen, nicht dagegen murines uPA (Estreicher et al., 1989). Für Darmkrebs und Brustkrebs ist die Expression von uPA in Stromazellen bzw. Makrophagen gezeigt worden, die durch die Bindung an den uPA-Rezeptor der Tumorzellen parakrine Wirkungen entfaltet (Grondahl-Hansen et al., 1991; Hildenbrand et al., 1998). Es kann angenommen werden, dass die Überexpression von suPAR auch im syngenem Modell zu einer Reduktion der Metastasierung führen würde, da suPAR dort sowohl das von den Tumorzellen als auch das von den Zellen in der Umgebung des Tumors produzierte uPA abfangen kann.

5.3.1.2 TIMP-1 inhibiert die Lungenmetastasierung von HT 1080-Zellen *in vivo*

Viele *in vivo*-Studien konnten die Bedeutung der Balance zwischen MMPs und TIMPs zeigen (Brew et al., 2000). Für die Metastasierung ist ein Überwiegen der Aktivität von MMPs erforderlich. Eine gestörte Balance mit einem Überwiegen der MMP-Aktivität kann zum einen durch die Überexpression von MMPs, andererseits durch die niedrige Expression von TIMPs entstehen und zur Entwicklung eines metastatischen Phänotyps führen (Khokha et al., 1989; Sternlicht et al., 1999). Hierbei können sowohl die Tumorzellen als auch Stromazellen oder inflammatorische Zellen zur Sekretion von MMPs beitragen (Brooks et al., 1996; Coussens and Werb, 2001).

Bisherige Studien konnten im Fibrosarkommodell die Bedeutung der Gelatinasen und TIMP-1 zeigen (Bernhard et al., 1994). Durch die Inhibition von MMP-9 konnte die Metastasierung in einem Sarkommodell gehemmt werden (Hua and Muschel, 1996). Die Überexpression von TIMP-1 im Wirtsgewebe konnte die experimentelle Metastasierung in einer Fibrosarkomzelle signifikant reduzieren (Krüger et al., 1998a). In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Überexpression von TIMP-1 in den Tumorzellen die Metastasierung der Fibrosarkom-Zelllinie HT 1080 im experimentellen Metastasierungsmodell reduzieren konnte.

Während die Überexpression von TIMP-1 nicht zu einer Reduktion des invasiven Potentials *in vitro* geführt hatte, war die Zahl der Lungenmetastasen *in vivo* signifikant reduziert gegenüber der Ausgangszelllinie. Die Bedeutung von MMP-2 für das invasive Verhalten der Zelllinie HT 1080 *in vitro* ist bereits diskutiert worden. *In vivo* scheinen im Unterschied zur Invasion *in vitro* Matrix-Metalloproteinasen zum Erfolg der Metastasierung beizutragen, die durch TIMP-1 inhibiert werden können. Die Aktivierung von pro-MMP-9 und aktives MMP-9 können durch TIMP-1 inhibiert werden. Die Sekretion von MMP-9 durch die Zelllinie HT 1080 ist beschrieben worden (Devarajan et al., 1992), inwieweit inflammatorische Zellen oder Stromazellen durch Sekretion von MMP-9 zum Erfolg der Lungenmetastasierung in diesem Modell beitragen, ist unklar (Nielsen et al., 1996; Sugiura et al., 1998). *In vivo* erfolgt die Aktivierung von pro-MMP-9 durch eine proteolytische Kaskade an der Tumorzelloberfläche: Plasmin aktiviert pro-MMP-3, aktiviertes MMP-3 wiederum aktiviert pro-MMP-9 (Mazzeri et al., 1997). Sowohl MMP-3 (Stromelysin-1) als auch MMP-9 werden durch TIMP-1 inhibiert. Die Überexpression von TIMP-1 in der Zelllinie Timp 5 führte in dieser Arbeit zu einer ähnlichen Reduktion der Metastasierung wie die Überexpression von suPAR in der

Zelllinie suPAR 16. Dies kann ein Hinweis auf die Bedeutung der Inhibition der Aktivierung von MMP-3 und MMP-9 zur Verringerung der Lungenmetastasierung im Fibrosarkommodell sein. Neben der Inhibition von MMP-3 und MMP-9 können durch die Überexpression von TIMP-1 weitere Matrix-Metalloproteinasen gehemmt werden. Auch MMP-13 wird durch TIMP-1 inhibiert, das nach der Aktivierung durch MMP-14 die Aktivierung von MMP-9 und MMP-2 bewirken kann (Murphy and Knäuper, 1997; Johansson et al., 1999). Dies würde die Wirkung von TIMP-1 auch bei fehlender bzw. nur geringer Inhibition von MMP-14 erklären. Unabhängig von der antiproteolytischen Funktion ist für TIMP-1 eine proliferative Funktion für ein breites Spektrum von Zelllinien beschrieben worden (Hayakawa et al., 1992; Chesler et al., 1995). *In vitro* hatten sich keine Unterschiede in der Proliferationsgeschwindigkeit zwischen den Zelllinien ergeben (Abb.17). Eine PCNA-Analyse der Gruppen HT 1080, Timp 5, suPAR 16 und LD 14 *in vivo* ergab keinen Hinweis auf Unterschiede im Proliferationsverhalten der Gruppen (eigene Daten, hier nicht gezeigt). Auch wenn ein proliferativer Effekt von TIMP-1 nicht sicher ausgeschlossen werden kann, erscheint fraglich, ob dieser Effekt für die Fibrosarkomzelllinie HT 1080 *in vivo* von Bedeutung ist. Dieser wäre aufgrund der effektiven Reduktion der Metastasierung durch die Überexpression von TIMP-1 von nachrangiger Bedeutung.

Die Überexpression von TIMP-1 ist mit schlechter Prognose bei Brustkrebs und kolorektalen Karzinomen korreliert worden (Holten-Andersen et al., 2002; Schrohl et al., 2004). Die Überexpression von Matrix-Metalloproteinasen geht mit der gesteigerten Expression von TIMP-1 einher. So ist eine erhöhte Expression von MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 und MMP-11 für kolorektale Karzinome gezeigt worden, zusätzlich dazu sind bei Brustkrebs erhöhte Mengen MMP-13 und MMP-14 (MT1-MMP) nachgewiesen worden (Nelson et al., 2000). In diesem Zusammenhang stellt die TIMP-1-Überexpression möglicherweise den Versuch dar, das erhöhte proteolytische Potential zu kontrollieren. Dies wird belegt durch eine Studie unserer Arbeitsgruppe: es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von TIMP-1 im Wirtsgewebe die Metastasierung von Fibrosarkomzellen in das Gehirn effizient (>75%) reduzieren konnte (Krüger et al., 1998a). In der hier vorliegenden Arbeit hatte die Überexpression von TIMP-1 durch die Tumorzellen selbst zu einer Reduktion der Lungenmetastasierung geführt. Die erhöhte Expression von TIMP-1 in Brustkrebszellen ist vor kurzem ebenfalls mit einer günstigen Prognose korreliert worden (Nakopoulou et al., 2003). Für die Prognose von Patienten mit Weichteilsarkomen konnte keine Korrelation der relativen Werte für MMP-2, MMP-9 oder TIMP-1 mit dem Vorliegen von Metastasen

festgestellt werden. Ein hoher MMP-9/TIMP-1-Quotient stellte jedoch einen ungünstigen prognostischen Marker für das krankheitsfreie Überleben (*disease free survival*) dar. Die Überexpression von TIMP-1 stellt daher einen wirksamen Ansatz zur antimetastatischen Therapie dar.

5.3.1.3 Die kombinierte Überexpression von suPAR und TIMP-1 *in vivo* reduziert die Lungenmetastasierung von HT 1080-Zellen, erzielt aber keinen Synergismus

Die kombinierte Überexpression von suPAR und TIMP-1 in der Zelllinie LD 14 hatte ebenfalls zu einer Reduktion der Lungenmetastasierung im Vergleich zur Ausgangszelllinie HT 1080 geführt, nicht aber im Vergleich zu den Zelllinien suPAR 16 oder Timp 5. Ein synergistischer Effekt der Überexpression von suPAR und TIMP-1 war nicht erkennbar. Im Gegenteil war die Kombination von suPAR und TIMP-1 weniger effektiv als die Überexpression eines einzelnen Transgens.

Auch *in vitro* hatte sich keine Reduktion des invasiven Potentials in der Zelllinie LD 14 ergeben, obwohl sie mehr suPAR sezernierte als die Zelllinie suPAR 16, für die verringerte Invasivität festgestellt werden konnte (Abb.19). Im uPA-Liganden-Bindungsassay war gezeigt worden, dass auch das von der Zelllinie LD 14 produzierte suPAR funktionell aktiv war (Abb.12).

Die Zelllinie LD 14 war zusätzlich zur *lacZ*-Markierung und der Transfektion mit *suPAR* mit *timp-1* transfiziert worden, die Zelllinie war nach insgesamt drei Selektionsvorgängen aus einer Limiting Dilution hervorgegangen (Abb.5). Möglicherweise war es hierdurch zu genetischen Veränderungen gekommen, die das unerwartete Verhalten der Zelllinie LD 14 erklären konnten.

Fidler hatte 1973 Metastasierung als Selektionsprozess beschrieben (Fidler, 1973). Durch klonale Selektion von Tumoren aus wiederholten experimentellen Metastasen konnten spezifische Tumorzellcharakteristika studiert werden, die für Metastasierung entscheidend waren. In der hier vorliegenden Arbeit waren nicht Zellen aus wiederholten experimentellen Metastasen selektioniert worden, sondern die bereits hochmetastatische Zelllinie HT 1080 war wiederholt der Selektion durch Zellgifte unterzogen worden. In dieser Zelllinie ist die klonale Variation verschiedener Proteasen des uPA-Systems beschrieben worden (Laug et al., 1992). In der zitierten Arbeit waren in der situ-Hybridisierung unterschiedliche Expressionslevel von

uPA und tPA aufgefallen, woraufhin Zelllinien aus Einzelzellkolonien auf ihren Gehalt an uPA, tPA, uPAR und PAI-1, PAI-2 sowie einen weiteren Protease-Inhibitor, Protease-Nexin-1, untersucht wurden. Die Studie zeigte beträchtliche Unterschiede in der Expression der verschiedenen Plasminogen Aktivatoren und deren Inhibitoren. In der hier vorliegenden Arbeit konnten dagegen keine Unterschiede in der Sekretion von uPA, PAI-1 oder uPAR nachgewiesen werden. Die Studie zeigte allerdings auch, dass die tatsächliche Aktivität an der Tumorzelloberfläche aufgrund der komplexen Interaktionen innerhalb des uPA-Systems (möglicherweise unter Beteiligung des MMP-Systems) nicht mit der festgestellten Proteinmenge für Plasminogen Aktivatoren und deren Inhibitoren korrelierte.

Während sich die Expressionslevel von uPA, uPAR und PAI-1 nicht von der Ausgangszelllinie HT 1080 unterschieden, ergab die Bestimmung von MMP-2 und MMP-9 erhöhte Level an MMP-2 in den transfizierten Zelllinien, die nicht auf die Überexpression der Transgene, insbesondere nicht auf TIMP-1, zurückzuführen waren (Abb.16). Die Zelllinien unterschieden sich im Expressionsniveau der Gelatinasen, jedoch nicht im Expressionsmuster. Die Expression von MMP-2 war dabei in den Zelllinien suPAR 16 und Timp 5, die nach der *lacZ*-Markierung jeweils einmal transfiziert worden waren, höher als in der Ausgangszelllinie HT 1080. Das Level an MMP-2 in der Zelllinie LD 14, die ein weiteres Mal transfiziert und selektioniert worden war, lag über dem der Zelllinien suPAR 16 und Timp 5. Die erhöhte MMP-2-Sekretion konnte allerdings in der Zelllinie Timp 10, die ebenfalls untersucht worden war, nicht festgestellt werden. Somit konnte die erhöhte Expression nicht auf die Überexpression von TIMP-1 zurückgeführt werden.

Der Grund für die erhöhte MMP-2-Produktion in den mehrfach selektionierten Zelllinien lag möglicherweise in einem Selektionsvorteil der Zellen, die MMP-2 produzierten. Bisher war nur *in vivo* eine Zunahme der MMP-2-Menge nach mehrfacher konsekutiver experimenteller Metastasierung und klonaler Selektion beschrieben worden (Togawa et al., 1999). Ein Selektionsvorteil auch *in vitro* aufgrund der erhöhten Expression von MMP-2 ist allerdings zuvor nicht beschrieben worden. In der Studie von Togawa et al. hatte die erhöhte Expression von MMP-2 nach mehrmaliger Passagierung und Selektion der HT 1080-Zellen zu einer erhöhten Zahl von Lungenmetastasen nach i.v.-Applikation der Tumorzellen geführt. Möglicherweise hatte auch in dieser Arbeit die erhöhte Expression von MMP-2 zu den erhöhten Metastasenzahlen der Zelllinie LD 14 im Vergleich zu den Zelllinien, die suPAR allein oder TIMP-1 allein exprimierten, beigetragen.

5.4 Die Proteaseexpression *in vivo* ist unabhängig von der Überexpression von suPAR und TIMP-1

Während die Überexpression von suPAR in der Zelllinie suPAR 16 und von TIMP-1 in Timp 5 zu einer signifikanten Reduktion der Zahl der Lungenmetastasen *in vivo* geführt hatte, hatte die kombinierte Überexpression von suPAR und TIMP-1 zu einer geringeren Reduktion der Lungenmetastasierung geführt (Abb.26). *In vitro* hatte sich eine leicht erhöhte Expression von pro-MMP-9 und eine erhöhte Menge von MMP-2 in der Zelllinie LD 14 gezeigt (Abb.12). Daher wurde die Expression der Gelatinasen und von uPA *in vivo* untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Injektion von Tumorzellen unabhängig von der Ausbildung von Lungenmetastasen zu einer Hochregulation von pro-MMP-9 führte (Abb.25). Aufgrund der unterschiedlichen Proteingrößen von humanem und murinem MMP-9 konnte gezeigt werden, dass pro-MMP-9 von Zellen des Wirtsgewebes (Stromazellen oder inflammatorischen Zellen) gebildet wurde. Dem erhöhten Nachweis von pro-MMP-9 im Lungengewebe ohne Tumoren lag möglicherweise die Reaktion des Stromas auf die Tumorzellen zugrunde (Abb.25A). Kupferman et al. beschrieben die Aktivierung des MMP-9-Promotors in Tumorzellen (Kupferman et al., 2000). Durch die *lacZ*-Markierung der Tumorzellen war es möglich, auch einzelne Tumorzellen nach der X-Gal-Anfärbung auf der Lungenoberfläche zu erkennen. Trotz der Tatsache, dass sich nach sorgfältiger mikroskopischer Evaluation keine Tumorzellen erkennen ließen, konnten kleine Mengen humanes MMP-9 im Zymogramm nachgewiesen werden. Es war denkbar, dass einzelne Tumorzellen nachweisbare Mengen MMP-9 sezernierten, die allerdings nicht zur Ausbildung von Metastasen führten.

In einem zweiten Zymogramm war Lungengewebe, in dem sich nach Inokulation der verschiedenen Tumorzelllinien Metastasen gebildet hatten, analysiert worden (Abb.25B). Insgesamt zeigte sich ein ähnliches MMP-Profil wie im ersten Zymogramm (Abb.25A). In den transfizierten Zelllinien lagen im Unterschied zur Ausgangszelllinie erhöhte Mengen murines pro-MMP-9 vor, in einer Probe der Zelllinie suPAR 16 wie in einer Probe der Zelllinie Timp 5 lag eine stark erhöhte Menge murines pro-MMP-9 sowie eine geringe Menge humanes MMP-9 vor. Auch in der Zelllinie LD 14 war *in vivo* in beiden Proben humanes MMP-9 nachweisbar.

Durch die Injektion von Tumorzellen war es unabhängig von der Ausbildung von Metastasen zu einer Induktion der MMP-9-Expression durch das Wirtsgewebe gekommen. Die MMP-2-

Expression dagegen war nur leicht erhöht oder unverändert geblieben. Auch in Anwesenheit von Metastasen lag das Niveau der MMP-9-Expression in den transfizierten Zelllinien über dem der Ausgangszelllinie. Eine stärkere MMP-Expression war möglicherweise erforderlich, um bei Überexpression von suPAR oder (bzw. und) TIMP-1 zur Ausbildung von Metastasen zu führen. Die MMP-Expression der Zelllinie LD 14 unterschied sich bei Abwesenheit von Metastasen durch eine erhöhte Expression von pro-MMP-9 von den Zelllinien suPAR 16 und Timp 5, nicht aber bei Vorliegen von Metastasen. Somit ergab sich aufgrund der MMP-Expression keine Erklärung für die höhere Zahl an Lungenmetastasen in der Zelllinie LD 14 im Vergleich zu suPAR 16 oder Timp 5.

In weiteren Zymogrammen wurde die Expression von uPA untersucht (Abb.26). In Abwesenheit von Metastasen konnte tPA und LMW-uPA nachgewiesen werden, nicht aber (HMW-) uPA; Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren nicht feststellbar (Abb.26A). Erst nach Ausbildung von Metastasen konnte HMW-uPA im Zymogramm nachgewiesen werden (Abb.26B). Hierbei lag wesentlich mehr uPA in den transfizierten Zelllinien als in der Ausgangszelllinie HT 1080 vor. Es konnte kein Unterschied in der uPA-Sekretion zwischen den Zelllinien suPAR 16 und LD 14, die suPAR überexprimierten, und der Zelllinie Timp 5, die TIMP-1 überexprimierte, festgestellt werden. Die Expression von uPA in den Gruppen war somit unabhängig von der Überexpression von suPAR. Der starke Nachweis von uPA war kein Effekt der Tumorzellinokulation an sich, sondern korrelierte mit der Ausbildung von Lungenmetastasen. Offenbar waren in den Zelllinien suPAR 16, Timp 5 und LD 14 höhere Mengen uPA für den Erfolg der Lungenmetastasierung nötig als in der Ausgangszelllinie. Eine verstärkte Sekretion von uPA lag auch in der Zelllinie Timp 5 vor, in der einer Inhibition des MMP-Systems durch TIMP-1 stattfand. Die verstärkte Sekretion von uPA als Folge der MMP-Inhibition durch den synthetischen Inhibitor Batimastat ist bereits gezeigt worden (Holst-Hansen et al., 2001), nicht jedoch die gesteigerte uPA-Sekretion als Folge der Inhibition durch TIMP-1. Die erhöhte uPA-Sekretion in malignen Tumoren ist bekannt (Lakka et al., 2001). Die Expression von uPA ist jedoch auch in Stromazellen und Makrophagen nachgewiesen worden (Grondahl-Hansen et al., 1991; Hildenbrand et al., 1998). Somit stammte das nachgewiesene uPA entweder aus den metastatischen Tumorzellen, oder die Sekretion von uPA war durch die Anwesenheit von Metastasen im Lungengewebe induziert worden.

Es konnte eine erhöhte uPA-Sekretion in den Zelllinien gezeigt werden, die insgesamt eine geringere Metastasierung zeigten. Verglichen wurde jedoch Lungengewebe mit ähnlicher Metastasenzahl. So kann hier spekuliert werden, dass die uPA-Sekretion über verstärkte Transkription je nach proteolytischem Potential der Tumorzellen reguliert werden kann, und dass erhöhte uPA-Level für den Erfolg der Metastasierung notwendig sind, wenn die Zellen (wie hier durch die Überexpression von suPAR oder bzw. und TIMP-1) ein vermindertes proteolytisches Potential aufweisen. Dies galt nicht nur für die Inhibition des uPA-Systems durch suPAR, sondern auch für die Inhibition des MMP-Systems durch TIMP-1.

Die Analyse der Zelllinien HT 1080, suPAR 16, Timp 5 und LD 14 *in vivo* ergab jedoch keinen Hinweis, warum die Metastasierung durch die kombinierte Überexpression von suPAR und TIMP-1 weniger effizient gehemmt werden konnte als durch die Überexpression nur eines Transgens. Die Zelllinie LD 14 wies sowohl *in vitro* als auch *in vivo* leicht veränderte Level an MMP-2, MMP-9 und uPA im Vergleich mit HT 1080, suPAR 16 und Timp 5 auf. Da die Expression jedoch einer gewissen Variabilität unterlag und die Zelllinie sich in der Expression der untersuchten Faktoren nicht eindeutig von den anderen Zelllinien unterschied, musste angenommen werden, dass es durch den Vorgang wiederholter Transfektion und Selektion zu Veränderungen gekommen war, die außerhalb des untersuchten Bereichs lagen. Es musste befürchtet werden, dass die in der Zelllinie LD 14 erzielten Ergebnisse durch diese Veränderungen beeinflusst worden waren und nicht das Ergebnis der kombinierten Überexpression von suPAR und TIMP-1 widerspiegelten. In einem weiteren experimentellen Metastasierungsmodell wurde daher untersucht, ob die Kombination eines gegen uPAR gerichteten Inhibitors und der Überexpression von TIMP-1 wirksam war. Durch den Einsatz eines monoklonalen Antikörpers konnten Effekte, die sich infolge wiederholter Transfektionen ergeben hatten und nicht die Effekte proteolytischer Inhibition widerspiegelten, vermieden werden.

5.5 Effektive Reduktion der Lungenmetastasierung durch Kombination der Überexpression von TIMP-1 und der Behandlung mit monoklonalem, gegen uPAR gerichteten Antikörper (anti-uPAR-mAK)

Im zweiten experimentellen Metastasierungsmodell wurde anstelle der stabilen Überexpression von suPAR die Inhibition der uPA/uPAR-Interaktion mithilfe eines monoklonalen, gegen uPAR gerichteten Antikörpers erreicht. Diese Behandlung wurde kombiniert mit der Überexpression von TIMP-1, indem die Tiere, denen Zellen der Zelllinie Timp 5 inokuliert worden waren, mit dem monoklonalen Antikörper behandelt wurden. Die Lungenmetastasierung wurde mit der Ausgangszelllinie verglichen. Durch diesen Ansatz konnte eine Mehrfachtransfektion zur Inhibition von uPA/uPAR-Interaktion und des MMP-Systems durch TIMP-1 umgangen werden.

Es zeigte sich, dass sowohl die Überexpression von TIMP-1 als auch die Behandlung mit einem monoklonalen, gegen uPAR gerichteten Antikörper zu einer Reduktion der Lungenmetastasierung führte. Die Kombination der Überexpression von TIMP-1 und der Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper führte zu einer weiteren Reduktion der Lungenmetastasierung. Aufgrund der kleinen Gruppengrößen war die weitere Reduktion der Lungenmetastasierung statistisch nicht darstellbar gegenüber der Behandlung allein bzw. der Überexpression von TIMP-1 allein. Allerdings zeigte sich durch die Kombination eine Verringerung der Metastasenzahlen bei kleinerer Streubreite der Metastasenzahlen. Somit konnte „proof of principle“ erbracht werden, dass die kombinierte Inhibition des uPA-Systems, speziell der uPA/uPAR-Interaktion und die Inhibition des MMP-Systems durch den natürlichen Inhibitor TIMP-1, einen effektiven Ansatz zur Inhibition der Lungenmetastastasierung im Fibrosarkommodell darstellt.

5.5.1.1 Ausblick: Therapeutische Anwendung von TIMP-1 und suPAR

Die Reduktion der Lungenmetastasierung durch die Überexpression von TIMP-1 und suPAR im experimentellen Metastasierungsmodell stellt eine mögliche Option für eine onkologische Therapie dar. Die Lungenmetastasierung konnte im experimentellen Metastasierungsmodell inhibiert werden, das einen späten Zeitpunkt der Metastasierung abbildet. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einer malignen Tumorerkrankung liegt meist schon eine Invasion von Tumorzellen in Lymph- oder Blutbahn vor. Die kombinierte Inhibition von uPA-System und MMP-System durch die Applikation von suPAR und TIMP-1 könnte hier einen Ansatz

darstellen, die für die weitere Prognose des Patienten entscheidende Fernmetastasierung zu hemmen.

Eine mögliche Applikationsform stellt die Gentherapie dar. Erste Erfolge in der Reduktion von Tumorwachstum und Metastasierung sind für die adenovirale Applikation von TIMPs im Tiermodell beschrieben worden (Brand, 2002). Darüber hinaus könnte durch den Einsatz gewebespezifischer Promotoren eine selektive Expression in bestimmten Geweben erreicht werden. Da suPAR und TIMP-1 sezerniert werden, üben sie nicht nur autokrine Wirkung auf die transduzierten Zellen aus, sondern können auch parakrine Wirkung entfalten. Auf diese Art könnte eine optimale Verfügbarkeit des therapeutischen Proteins im Tumorgewebe erreicht werden. Eine weitere Option stellt der Einsatz monoklonaler Antikörper dar. In den letzten Jahren ist eine Vielzahl von monoklonalen Antikörpern zum Einsatz in der onkologischen Therapie gelangt. Trotz der räumlich und zeitlich eingeschränkten Bioverfügbarkeit monoklonaler Antikörper konnte in dieser Arbeit die effiziente Reduzierung der Lungenmetastasierung im Fibrosarkommodell durch den Einsatz eines monoklonalen, gegen uPAR gerichteten Antikörpers gezeigt werden.

In dieser Arbeit konnte eine Reduktion, nicht jedoch die vollständige Hemmung der Lungenmetastasierung gezeigt werden. Während suPAR uPA inhibiert und direkt Zellsignalwege aktiviert, hemmt TIMP-1 eine Vielzahl von MMPs. Für einige MMPs ist allerdings auch eine protektive Wirkung, beispielsweise durch die Induktion von Apoptose oder die Spaltung von Plasminogen zu Angiostatin, beschrieben worden (Nelson et al., 2000). Um eine effizientere Hemmung der Metastasierung zu erreichen, ist die genaue Identifizierung der Proteasen, die im jeweiligen Metastasierungsmodell entscheidend sind, erforderlich. Unsere Arbeitsgruppe konnte sowohl für (synthetische) Inhibitoren von Serinproteasen als auch für Inhibitoren des MMP-Systems die Bedeutung der spezifischen Inhibition bestimmter *Targets* zeigen (Arlt et al., 2002; Banke et al., 2003). Hierbei müssen im jeweiligen Tumormodell die für die Metastasierung entscheidenden Proteasen identifiziert werden. Der Nachteil der geringen Selektivität infolge der unspezifischen Hemmung vieler MMPs besteht auch für den Einsatz natürlicher TIMPs, zusätzliche Probleme können durch die antiapoptotische und angiogenetische Wirkung von TIMP-1 entstehen. Eine Möglichkeit ist daher das Design von N-TIMP-1-Mutanten, die das C-terminale Ende nicht besitzen. Eine weitere Möglichkeit besteht im Design von TIMPs mit modifizierter Spezifität, die sich spezifischer gegen die MMPs richtet, die als entscheidende Faktoren im jeweiligen Tumormodell identifiziert worden sind.

6 Literaturverzeichnis

- Aguirre-Ghiso, J.A., Estrada, Y., Liu, D. and Ossowski, L.: ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res* 63 (2003) 1684-95.
- Aguirre-Ghiso, J.A., Liu, D., Mignatti, A., Kovalski, K. and Ossowski, L.: Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo. *Mol Biol Cell* 12 (2001) 863-79.
- Andreasen, P.A., Egelund, R. and Petersen, H.H.: The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 57 (2000) 25-40.
- Andreasen, P.A., Kjoller, L., Christensen, L. and Duffy, M.J.: The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72 (1997) 1-22.
- Appella, E., Robinson, E.A., Ullrich, S.J., Stoppelli, M.P., Corti, A., Cassani, G. and Blasi, F.: The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases. *J Biol Chem* 262 (1987) 4437-40.
- Arlt, M., Kopitz, C., Pennington, C., Watson, K.L., Krell, H.W., Bode, W., Gänsbacher, B., Khokha, R., Edwards, D.R. and Krüger, A.: Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model. *Cancer Res* 62 (2002) 5543-50.
- Baker, A.H., Edwards, D.R. and Murphy, G.: Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 115 (2002) 3719-27.
- Banke, I.J., Arlt, M.J., Pennington, C., Kopitz, C., Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Gänsbacher, B., Quigley, J.P., Edwards, D.R., Stürzebecher, J. and Krüger, A.: Increase of anti-metastatic efficacy by selectivity- but not affinity-optimization of synthetic serine protease inhibitors. *Biol Chem* 384 (2003) 1515-25.
- Baramova, E.N., Bajou, K., Remacle, A., L'Hoir, C., Krell, H.W., Weidle, U.H., Noel, A. and Foidart, J.M.: Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Lett* 405 (1997) 157-62.
- Barsky, S.H., Siegal, G.P., Jannotta, F. and Liotta, L.A.: Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest* 49 (1983) 140-7.
- Becker, J.W., Marcy, A.I., Rokosz, L.L., Axel, M.G., Burbaum, J.J., Fitzgerald, P.M., Cameron, P.M., Esser, C.K., Hagmann, W.K., Hermes, J.D. and et al.: Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme. *Protein Sci* 4 (1995) 1966-76.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z. and Hanahan, D.: Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2 (2000) 737-44.
- Bernhard, E.J., Gruber, S.B. and Muschel, R.J.: Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 4293-7.
- Bigg, H.F., Morrison, C.J., Butler, G.S., Bogoyevitch, M.A., Wang, Z., Soloway, P.D. and Overall, C.M.: Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 61 (2001) 3610-8.

- Blasi, F.: Proteolysis, cell adhesion, chemotaxis, and invasiveness are regulated by the u-PA-u-PAR-PAI-1 system. *Thromb Haemost* 82 (1999a) 298-304.
- Blasi, F.: The urokinase receptor. A cell surface, regulated chemokine. *Apmis* 107 (1999b) 96-101.
- Blasi, F. and Carmeliet, P.: uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (2002) 932-43.
- Brand, K.: Cancer gene therapy with tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). *Curr Gene Ther* 2 (2002) 255-71.
- Brew, K., Dinakarparandian, D. and Nagase, H.: Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477 (2000) 267-83.
- Brooks, P.C., Stromblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P. and Cheresch, D.A.: Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85 (1996) 683-93.
- Brunner, N., Nielsen, H.J., Hamers, M., Christensen, I.J., Thorlacius-Ussing, O. and Stephens, R.W.: The urokinase plasminogen activator receptor in blood from healthy individuals and patients with cancer. *Apmis* 107 (1999) 160-7.
- Cajot, J.F., Schleuning, W.D., Medcalf, R.L., Bamat, J., Testuz, J., Liebermann, L. and Sordat, B.: Mouse L cells expressing human prourokinase-type plasminogen activator: effects on extracellular matrix degradation and invasion. *J Cell Biol* 109 (1989) 915-25.
- Carmeliet, P., Moons, L., Lijnen, R., Baes, M., Lemaitre, V., Tipping, P., Drew, A., Eeckhout, Y., Shapiro, S., Lupu, F. and Collen, D.: Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet* 17 (1997) 439-44.
- Carmichael, D.F., Sommer, A., Thompson, R.C., Anderson, D.C., Smith, C.G., Welgus, H.G. and Stricklin, G.P.: Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (1986) 2407-11.
- Chapman, H.A., Wei, Y., Simon, D.I. and Waltz, D.A.: Role of urokinase receptor and caveolin in regulation of integrin signaling. *Thromb Haemost* 82 (1999) 291-7.
- Chesler, L., Golde, D.W., Bersch, N. and Johnson, M.D.: Metalloproteinase inhibition and erythroid potentiation are independent activities of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Blood* 86 (1995) 4506-15.
- Corcoran, M.L. and Stetler-Stevenson, W.G.: Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates fibroblast proliferation via a cAMP-dependent mechanism. *J Biol Chem* 270 (1995) 13453-9.
- Coussens, L.M., Fingleton, B. and Matrisian, L.M.: Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295 (2002) 2387-92.
- Coussens, L.M., Tinkle, C.L., Hanahan, D. and Werb, Z.: MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103 (2000) 481-90.
- Coussens, L.M. and Werb, Z.: Inflammatory cells and cancer: think different! *J Exp Med* 193 (2001) F23-6.
- Del Vecchio, S., Stoppelli, M.P., Carriero, M.V., Fonti, R., Massa, O., Li, P.Y., Botti, G., Cerra, M., D'Aiuto, G., Esposito, G. and et al.: Human urokinase receptor concentration in malignant and benign breast tumors by in vitro quantitative autoradiography: comparison with urokinase levels. *Cancer Res* 53 (1993) 3198-206.
- Della Porta, P., Soeltl, R., Krell, H.W., Collins, K., O'Donoghue, M., Schmitt, M. and Krüger, A.: Combined treatment with serine protease inhibitor aprotinin and matrix metalloproteinase inhibitor Batimastat (BB-94) does not prevent invasion of human esophageal and ovarian carcinoma cells in vivo. *Anticancer Res* 19 (1999) 3809-16.

- Deryugina, E.I., Luo, G.X., Reisfeld, R.A., Bourdon, M.A. and Strongin, A.: Tumor cell invasion through matrigel is regulated by activated matrix metalloproteinase-2. *Anticancer Res* 17 (1997) 3201-10.
- Devarajan, P., Johnston, J.J., Ginsberg, S.S., Van Wart, H.E. and Berliner, N.: Structure and expression of neutrophil gelatinase cDNA. Identity with type IV collagenase from HT1080 cells. *J Biol Chem* 267 (1992) 25228-32.
- Duffy, M.J.: Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clin Chem* 48 (2002a) 1194-7.
- Duffy, M.J.: Urokinase-type plasminogen activator: a potent marker of metastatic potential in human cancers. *Biochem Soc Trans* 30 (2002b) 207-10.
- Egeblad, M. and Werb, Z.: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2 (2002) 161-74.
- Ellis, V.: Functional analysis of the cellular receptor for urokinase in plasminogen activation. Receptor binding has no influence on the zymogenic nature of pro-urokinase. *J Biol Chem* 271 (1996) 14779-84.
- Ellis, V., Behrendt, N. and Dano, K.: Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. *J Biol Chem* 266 (1991) 12752-8.
- Estreicher, A., Wohlwend, A., Belin, D., Schleuning, W.D. and Vassalli, J.D.: Characterization of the cellular binding site for the urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 264 (1989) 1180-9.
- Fidler, I.J.: Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat New Biol* 242 (1973) 148-9.
- Fischer, K., Lutz, V., Wilhelm, O., Schmitt, M., Graeff, H., Heiss, P., Nishiguchi, T., Harbeck, N., Kessler, H., Luther, T., Magdolen, V. and Reuning, U.: Urokinase induces proliferation of human ovarian cancer cells: characterization of structural elements required for growth factor function. *FEBS Lett* 438 (1998) 101-5.
- Gasson, J.C., Bersch, N. and Golde, D.W.: Characterization of purified human erythroid-potentiating activity. *Prog Clin Biol Res* 184 (1985) 95-104.
- Goldberg, G.I., Wilhelm, S.M., Kronberger, A., Bauer, E.A., Grant, G.A. and Eisen, A.Z.: Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J Biol Chem* 261 (1986) 6600-5.
- Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H. and Thorgeirsson, U.P.: Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74 (1997) 111-22.
- Grondahl-Hansen, J., Ralfkiaer, E., Kirkeby, L.T., Kristensen, P., Lund, L.R. and Dano, K.: Localization of urokinase-type plasminogen activator in stromal cells in adenocarcinomas of the colon in humans. *Am J Pathol* 138 (1991) 111-7.
- Hahn-Dantona, E., Ruiz, J.F., Bornstein, P. and Strickland, D.K.: The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J Biol Chem* 276 (2001) 15498-503.
- Harbeck, N., Alt, U., Berger, U., Kruger, A., Thomssen, C., Janicke, F., Hofler, H., Kates, R.E. and Schmitt, M.: Prognostic impact of proteolytic factors (urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor 1, and cathepsins B, D, and L) in primary breast cancer reflects effects of adjuvant systemic therapy. *Clin Cancer Res* 7 (2001) 2757-64.
- Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E. and Iwata, K.: Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 298 (1992) 29-32.

- Heikkilä, P., Teronen, O., Moilanen, M., Konttinen, Y.T., Hanemaaijer, R., Laitinen, M., Maisi, P., van der Pluijm, G., Bartlett, J.D., Salo, T. and Sorsa, T.: Bisphosphonates inhibit stromelysin-1 (MMP-3), matrix metalloelastase (MMP-12), collagenase-3 (MMP-13) and enamelysin (MMP-20), but not urokinase-type plasminogen activator, and diminish invasion and migration of human malignant and endothelial cell lines. *Anticancer Drugs* 13 (2002) 245-54.
- Hildenbrand, R., Jansen, C., Wolf, G., Bohme, B., Berger, S., von Minckwitz, G., Horlin, A., Kaufmann, M. and Stutte, H.J.: Transforming growth factor-beta stimulates urokinase expression in tumor-associated macrophages of the breast. *Lab Invest* 78 (1998) 59-71.
- Hollas, W., Blasi, F. and Boyd, D.: Role of the urokinase receptor in facilitating extracellular matrix invasion by cultured colon cancer. *Cancer Res* 51 (1991) 3690-5.
- Holst-Hansen, C., Low, J.A., Stephens, R.W., Johnson, M.D., Carmeliet, P., Frandsen, T.L., Brunner, N. and Dickson, R.B.: Increased stromal expression of murine urokinase plasminogen activator in a human breast cancer xenograft model following treatment with the matrix metalloprotease inhibitor, batimastat. *Breast Cancer Res Treat* 68 (2001) 225-37.
- Holten-Andersen, M.N., Christensen, I.J., Nielsen, H.J., Stephens, R.W., Jensen, V., Nielsen, O.H., Sorensen, S., Overgaard, J., Lilja, H., Harris, A., Murphy, G. and Brunner, N.: Total levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in plasma yield high diagnostic sensitivity and specificity in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res* 8 (2002) 156-64.
- Hua, J. and Muschel, R.J.: Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system. *Cancer Res* 56 (1996) 5279-84.
- Huang, S., New, L., Pan, Z., Han, J. and Nemerow, G.R.: Urokinase plasminogen activator/urokinase-specific surface receptor expression and matrix invasion by breast cancer cells requires constitutive p38alpha mitogen-activated protein kinase activity. *J Biol Chem* 275 (2000) 12266-72.
- Isseroff, R.R. and Rifkin, D.B.: Plasminogen is present in the basal layer of the epidermis. *J Invest Dermatol* 80 (1983) 297-9.
- Itoh, T., Tanioka, M., Matsuda, H., Nishimoto, H., Yoshioka, T., Suzuki, R. and Uehira, M.: Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin Exp Metastasis* 17 (1999) 177-81.
- Itoh, T., Tanioka, M., Yoshida, H., Yoshioka, T., Nishimoto, H. and Itohara, S.: Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 58 (1998) 1048-51.
- Jo, M., Thomas, K.S., Wu, L. and Gonias, S.L.: Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits cancer cell growth and invasion by direct urokinase-independent effects on cell signaling. *J Biol Chem* 278 (2003) 46692-8.
- Johansson, N., Vaalamo, M., Grenman, S., Hietanen, S., Klemi, P., Saarialho-Kere, U. and Kahari, V.M.: Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by tumor cells in invasive vulvar squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 154 (1999) 469-80.
- Kawamata, H., Kameyama, S., Kawai, K., Tanaka, Y., Nan, L., Barch, D.H., Stetler-Stevenson, W.G. and Oyasu, R.: Marked acceleration of the metastatic phenotype of a rat bladder carcinoma cell line by the expression of human gelatinase A. *Int J Cancer* 63 (1995) 568-75.
- Khokha, R., Waterhouse, P., Yagel, S., Lala, P.K., Overall, C.M., Norton, G. and Denhardt, D.T.: Antisense RNA-induced reduction in murine TIMP levels confers oncogenicity on Swiss 3T3 cells. *Science* 243 (1989) 947-50.

- Kim, J., Yu, W., Kovalski, K. and Ossowski, L.: Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay. *Cell* 94 (1998) 353-62.
- Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Liotta, L.A., Robey, P.G., Tryggvason, K. and Martin, G.R.: Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 21 (1982) 6188-93.
- Kondraganti, S., Mohanam, S., Chintala, S.K., Kin, Y., Jasti, S.L., Nirmala, C., Lakka, S.S., Adachi, Y., Kyritsis, A.P., Ali-Osman, F., Sawaya, R., Fuller, G.N. and Rao, J.S.: Selective suppression of matrix metalloproteinase-9 in human glioblastoma cells by antisense gene transfer impairs glioblastoma cell invasion. *Cancer Res* 60 (2000) 6851-5.
- Konecny, G., Untch, M., Pihan, A., Kimmig, R., Gropp, M., Stieber, P., Hepp, H., Slamon, D. and Pegram, M.: Association of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor with disease progression and prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 7 (2001) 1743-9.
- Krüger, A., Fata, J.E. and Khokha, R.: Altered tumor growth and metastasis of a T-cell lymphoma in Timp-1 transgenic mice. *Blood* 90 (1997) 1993-2000.
- Krüger, A., Sanchez-Sweatman, O.H., Martin, D.C., Fata, J.E., Ho, A.T., Orr, F.W., Ruther, U. and Khokha, R.: Host TIMP-1 overexpression confers resistance to experimental brain metastasis of a fibrosarcoma cell line. *Oncogene* 16 (1998a) 2419-23.
- Krüger, A., Schirmacher, V. and Khokha, R.: The bacterial lacZ gene: an important tool for metastasis research and evaluation of new cancer therapies. *Cancer Metastasis Rev* 17 (1998b) 285-94.
- Krüger, A., Soeltl, R., Lutz, V., Wilhelm, O.G., Magdolen, V., Rojo, E.E., Hantzopoulos, P.A., Graeff, H., Gänsbacher, B. and Schmitt, M.: Reduction of breast carcinoma tumor growth and lung colonization by overexpression of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87). *Cancer Gene Ther* 7 (2000) 292-9.
- Kupferman, M.E., Fini, M.E., Muller, W.J., Weber, R., Cheng, Y. and Muschel, R.J.: Matrix metalloproteinase 9 promoter activity is induced coincident with invasion during tumor progression. *Am J Pathol* 157 (2000) 1777-83.
- Lakka, S.S., Bhattacharya, A., Mohanam, S., Boyd, D. and Rao, J.S.: Regulation of the uPA gene in various grades of human glioma cells. *Int J Oncol* 18 (2001) 71-9.
- Lakka, S.S., Gondi, C.S., Yanamandra, N., Dinh, D.H., Olivero, W.C., Gujrati, M. and Rao, J.S.: Synergistic down-regulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 in SNB19 glioblastoma cells efficiently inhibits glioma cell invasion, angiogenesis, and tumor growth. *Cancer Res* 63 (2003) 2454-61.
- Lauffenburger, D.A. and Horwitz, A.F.: Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84 (1996) 359-69.
- Laug, W.E., Cao, X.R., Yu, Y.B., Shimada, H. and Kruithof, E.K.: Inhibition of invasion of HT1080 sarcoma cells expressing recombinant plasminogen activator inhibitor 2. *Cancer Res* 53 (1993) 6051-7.
- Laug, W.E., Wang, K., Mundi, R., Rideout, W., 3rd, Kruithof, E.K. and Bogenmann, E.: Clonal variation of expression of the genes coding for plasminogen activators, their inhibitors and the urokinase receptor in HT1080 sarcoma cells. *Int J Cancer* 52 (1992) 298-304.
- Liotta, L.A., Steeg, P.S. and Stetler-Stevenson, W.G.: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64 (1991) 327-36.

- Liotta, L.A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C.M. and Shafie, S.: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284 (1980) 67-8.
- Lund, L.R., Romer, J., Bugge, T.H., Nielsen, B.S., Frandsen, T.L., Degen, J.L., Stephens, R.W. and Dano, K.: Functional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing. *Embo J* 18 (1999) 4645-56.
- Lutz, V., Reuning, U., Krüger, A., Luther, T., von Steinburg, S.P., Graeff, H., Schmitt, M., Wilhelm, O.G. and Magdolen, V.: High level synthesis of recombinant soluble urokinase receptor (CD87) by ovarian cancer cells reduces intraperitoneal tumor growth and spread in nude mice. *Biol Chem* 382 (2001) 789-98.
- Mackay, A.R., Corbitt, R.H., Hartzler, J.L. and Thorgeirsson, U.P.: Basement membrane type IV collagen degradation: evidence for the involvement of a proteolytic cascade independent of metalloproteinases. *Cancer Res* 50 (1990) 5997-6001.
- Magdolen, V., Burgle, M., de Prada, N.A., Schmiedeberg, N., Riemer, C., Schroeck, F., Kellermann, J., Degitz, K., Wilhelm, O.G., Schmitt, M. and Kessler, H.: Cyclo19,31[D-Cys19]-uPA19-31 is a potent competitive antagonist of the interaction of urokinase-type plasminogen activator with its receptor (CD87). *Biol Chem* 382 (2001) 1197-205.
- Magdolen, V., Rettenberger, P., Koppitz, M., Goretzki, L., Kessler, H., Weidle, U.H., König, B., Graeff, H., Schmitt, M. and Wilhelm, O.: Systematic mutational analysis of the receptor-binding region of the human urokinase-type plasminogen activator. *Eur J Biochem* 237 (1996) 743-51.
- Maquoi, E., Frankenne, F., Noel, A., Krell, H.W., Grams, F. and Foidart, J.M.: Type IV collagen induces matrix metalloproteinase 2 activation in HT1080 fibrosarcoma cells. *Exp Cell Res* 261 (2000) 348-59.
- Maquoi, E., Noel, A., Frankenne, F., Angliker, H., Murphy, G. and Foidart, J.M.: Inhibition of matrix metalloproteinase 2 maturation and HT1080 invasiveness by a synthetic furin inhibitor. *FEBS Lett* 424 (1998) 262-6.
- Matrisian, L.M., Glaichenhaus, N., Gesnel, M.C. and Breathnach, R.: Epidermal growth factor and oncogenes induce transcription of the same cellular mRNA in rat fibroblasts. *Embo J* 4 (1985) 1435-40.
- Mazar, A.P.: The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) as a target for the diagnosis and therapy of cancer. *Anticancer Drugs* 12 (2001) 387-400.
- Mazzieri, R., Masiero, L., Zanetta, L., Monea, S., Onisto, M., Garbisa, S. and Mignatti, P.: Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *Embo J* 16 (1997) 2319-32.
- Meissauer, A., Kramer, M.D., Hofmann, M., Erkell, L.J., Jacob, E., Schirmacher, V. and Brunner, G.: Urokinase-type and tissue-type plasminogen activators are essential for in vitro invasion of human melanoma cells. *Exp Cell Res* 192 (1991) 453-9.
- Meissauer, A., Kramer, M.D., Schirmacher, V. and Brunner, G.: Generation of cell surface-bound plasmin by cell-associated urokinase-type or secreted tissue-type plasminogen activator: a key event in melanoma cell invasiveness in vitro. *Exp Cell Res* 199 (1992) 179-90.
- Mikus, P., Urano, T., Liljestrom, P. and Ny, T.: Plasminogen-activator inhibitor type 2 (PAI-2) is a spontaneously polymerising SERPIN. Biochemical characterisation of the recombinant intracellular and extracellular forms. *Eur J Biochem* 218 (1993) 1071-82.
- Mohan, P.M., Lakka, S.S., Mohanam, S., Kin, Y., Sawaya, R., Kyritsis, A.P., Nicolson, G.L. and Rao, J.S.: Downregulation of the urokinase-type plasminogen activator receptor

- through inhibition of translation by antisense oligonucleotide suppresses invasion of human glioblastoma cells. *Clin Exp Metastasis* 17 (1999) 617-21.
- Monsky, W.L., Kelly, T., Lin, C.Y., Yeh, Y., Stetler-Stevenson, W.G., Mueller, S.C. and Chen, W.T.: Binding and localization of M(r) 72,000 matrix metalloproteinase at cell surface invadopodia. *Cancer Res* 53 (1993) 3159-64.
- Murphy, G., Houbrechts, A., Cockett, M.I., Williamson, R.A., O'Shea, M. and Docherty, A.J.: The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry* 30 (1991) 8097-102.
- Murphy, G. and Knäuper, V.: Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol* 15 (1997) 511-8.
- Murphy, G. and Knäuper, V.: Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol* 15 (1997) 511-8.
- Nagase, H. and Woessner, J.F., Jr.: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274 (1999) 21491-4.
- Nakopoulou, L., Giannopoulou, I., Lazaris, A., Alexandrou, P., Tsirmpa, I., Markaki, S., Panayotopoulou, E. and Keramopoulos, A.: The favorable prognostic impact of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 protein overexpression in breast cancer cells. *Apmis* 111 (2003) 1027-36.
- Nelson, A.R., Fingleton, B., Rothenberg, M.L. and Matrisian, L.M.: Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18 (2000) 1135-49.
- Nguyen, D.H., Catling, A.D., Webb, D.J., Sankovic, M., Walker, L.A., Somlyo, A.V., Weber, M.J. and Gonias, S.L.: Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner. *J Cell Biol* 146 (1999) 149-64.
- Nielsen, B.S., Timshel, S., Kjeldsen, L., Sehested, M., Pyke, C., Borregaard, N. and Dano, K.: 92 kDa type IV collagenase (MMP-9) is expressed in neutrophils and macrophages but not in malignant epithelial cells in human colon cancer. *Int J Cancer* 65 (1996) 57-62.
- Noel, A., Kebers, F., Maquoi, E. and Foidart, J.M.: Cell-cell and cell-matrix interactions during breast cancer progression. *Curr Top Pathol* 93 (1999) 183-93.
- Nykjaer, A., Conese, M., Christensen, E.I., Olson, D., Cremona, O., Gliemann, J. and Blasi, F.: Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *Embo J* 16 (1997) 2610-20.
- Okada, Y., Gonoji, Y., Naka, K., Tomita, K., Nakanishi, I., Iwata, K., Yamashita, K. and Hayakawa, T.: Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *J Biol Chem* 267 (1992) 21712-9.
- Olson, M.W., Gervasi, D.C., Mobashery, S. and Fridman, R.: Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem* 272 (1997) 29975-83.
- Ossowski, L., Clunie, G., Masucci, M.T. and Blasi, F.: In vivo paracrine interaction between urokinase and its receptor: effect on tumor cell invasion. *J Cell Biol* 115 (1991) 1107-12.
- Ossowski, L. and Reich, E.: Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis. *Cell* 35 (1983) 611-9.
- Pazzaglia, L., Ponticelli, F., Magagnoli, G., Gamberi, G., Ragazzini, P., Ballardelli, A., Picci, P. and Benassi, M.: Activation of metalloproteinases-2 and -9 by interleukin-1alpha in

- S100A4-positive liposarcoma cell line: correlation with cell invasiveness. *Anticancer Res* 24 (2004) 967-72.
- Petersen, L.C., Lund, L.R., Nielsen, L.S., Dano, K. and Skriver, L.: One-chain urokinase-type plasminogen activator from human sarcoma cells is a proenzyme with little or no intrinsic activity. *J Biol Chem* 263 (1988) 11189-95.
- Ploug, M.: Identification of specific sites involved in ligand binding by photoaffinity labeling of the receptor for the urokinase-type plasminogen activator. Residues located at equivalent positions in uPAR domains I and III participate in the assembly of a composite ligand-binding site. *Biochemistry* 37 (1998) 16494-505.
- Praus, M., Wauterickx, K., Collen, D. and Gerard, R.D.: Reduction of tumor cell migration and metastasis by adenoviral gene transfer of plasminogen activator inhibitors. *Gene Ther* 6 (1999) 227-36.
- Rabbani, S.A., Harakidas, P., Davidson, D.J., Henkin, J. and Mazar, A.P.: Prevention of prostate-cancer metastasis in vivo by a novel synthetic inhibitor of urokinase-type plasminogen activator (uPA). *Int J Cancer* 63 (1995) 840-5.
- Ramos-DeSimone, N., Hahn-Dantona, E., Siple, J., Nagase, H., French, D.L. and Quigley, J.P.: Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* 274 (1999) 13066-76.
- Rasheed, S., Nelson-Rees, W.A., Toth, E.M., Arnstein, P. and Gardner, M.B.: Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* 33 (1974) 1027-33.
- Reijerkerk, A., Voest, E.E. and Gebbink, M.F.: No grip, no growth: the conceptual basis of excessive proteolysis in the treatment of cancer. *Eur J Cancer* 36 (2000) 1695-705.
- Reuning, U., Magdolen, V., Wilhelm, O., Fischer, K., Lutz, V., Graeff, H. and Schmitt, M.: Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review). *Int J Oncol* 13 (1998) 893-906.
- Ritter, L.M., Garfield, S.H. and Thorgeirsson, U.P.: Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) binds to the cell surface and translocates to the nucleus of human MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 257 (1999) 494-9.
- Robbins, K.C. and Summari, L.: Plasminogen and plasmin. *Methods Enzymol* 45 (1976) 257-73.
- Roldan, A.L., Cubellis, M.V., Masucci, M.T., Behrendt, N., Lund, L.R., Dano, K., Appella, E. and Blasi, F.: Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *Embo J* 9 (1990) 467-74.
- Schrohl, A.S., Holten-Andersen, M.N., Peters, H.A., Look, M.P., Meijer-van Gelder, M.E., Klijn, J.G., Brunner, N. and Foekens, J.A.: Tumor tissue levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as a prognostic marker in primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 2289-98.
- Schweinitz, A., Steinmetzer, T., Banke, I.J., Arlt, M., Sturzebecher, A., Schuster, O., Geissler, A., Giersiefen, H., Zeslowska, E., Jacob, U., Kruger, A. and Sturzebecher, J.: Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for the use as antimetastatic agents. *J Biol Chem* (2004).
- Segain, J.P., Harb, J., Gregoire, M., Meflah, K. and Menanteau, J.: Induction of fibroblast gelatinase B expression by direct contact with cell lines derived from primary tumor but not from metastases. *Cancer Res* 56 (1996) 5506-12.

- Solberg, H., Lober, D., Eriksen, J., Ploug, M., Ronne, E., Behrendt, N., Dano, K. and Hoyer-Hansen, G.: Identification and characterization of the murine cell surface receptor for the urokinase-type plasminogen activator. *Eur J Biochem* 205 (1992) 451-8.
- Springman, E.B., Angleton, E.L., Birkedal-Hansen, H. and Van Wart, H.E.: Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 364-8.
- Stefansson, S. and Lawrence, D.A.: The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature* 383 (1996) 441-3.
- Stepanova, V., Mukhina, S., Kohler, E., Resink, T.J., Erne, P. and Tkachuk, V.A.: Urokinase plasminogen activator induces human smooth muscle cell migration and proliferation via distinct receptor-dependent and proteolysis-dependent mechanisms. *Mol Cell Biochem* 195 (1999) 199-206.
- Stephens, R.W., Pollanen, J., Tapiovaara, H., Leung, K.C., Sim, P.S., Salonen, E.M., Ronne, E., Behrendt, N., Dano, K. and Vaheri, A.: Activation of pro-urokinase and plasminogen on human sarcoma cells: a proteolytic system with surface-bound reactants. *J Cell Biol* 108 (1989) 1987-95.
- Sternlicht, M.D., Lochter, A., Sympon, C.J., Huey, B., Rougier, J.P., Gray, J.W., Pinkel, D., Bissell, M.J. and Werb, Z.: The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 98 (1999) 137-46.
- Sugiura, Y., Shimada, H., Seeger, R.C., Laug, W.E. and DeClerck, Y.A.: Matrix metalloproteinases-2 and -9 are expressed in human neuroblastoma: contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis. *Cancer Res* 58 (1998) 2209-16.
- Togawa, D., Koshino, T., Saito, T., Takagi, T. and Machida, J.: Highly activated matrix metalloproteinase-2 secreted from clones of metastatic lung nodules of nude mice injected with human fibrosarcoma HT1080. *Cancer Lett* 146 (1999) 25-33.
- Toth, M., Bernardo, M.M., Gervasi, D.C., Soloway, P.D., Wang, Z., Bigg, H.F., Overall, C.M., DeClerck, Y.A., Tschesche, H., Cher, M.L., Brown, S., Mobashery, S. and Fridman, R.: Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 acts synergistically with synthetic matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors but not with TIMP-4 to enhance the (Membrane type 1)-MMP-dependent activation of pro-MMP-2. *J Biol Chem* 275 (2000) 41415-23.
- Tsunezuka, Y., Kinoh, H., Takino, T., Watanabe, Y., Okada, Y., Shinagawa, A., Sato, H. and Seiki, M.: Expression of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) in tumor cells enhances pulmonary metastasis in an experimental metastasis assay. *Cancer Res* 56 (1996) 5678-83.
- Vihinen, P. and Kahari, V.M.: Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* 99 (2002) 157-66.
- Visse, R. and Nagase, H.: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92 (2003) 827-39.
- von Heijne, G., Liljestrom, P., Mikus, P., Andersson, H. and Ny, T.: The efficiency of the uncleaved secretion signal in the plasminogen activator inhibitor type 2 protein can be enhanced by point mutations that increase its hydrophobicity. *J Biol Chem* 266 (1991) 15240-3.
- Webb, D.J., Nguyen, D.H. and Gonias, S.L.: Extracellular signal-regulated kinase functions in the urokinase receptor-dependent pathway by which neutralization of low density lipoprotein receptor-related protein promotes fibrosarcoma cell migration and matrigel invasion. *J Cell Sci* 113 (Pt 1) (2000) 123-34.

- Wilhelm, O., Schmitt, M., Hohl, S., Senekowitsch, R. and Graeff, H.: Antisense inhibition of urokinase reduces spread of human ovarian cancer in mice. *Clin Exp Metastasis* 13 (1995) 296-302.
- Wilhelm, O., Weidle, U., Hohl, S., Rettenberger, P., Schmitt, M. and Graeff, H.: Recombinant soluble urokinase receptor as a scavenger for urokinase-type plasminogen activator (uPA). Inhibition of proliferation and invasion of human ovarian cancer cells. *FEBS Lett* 337 (1994) 131-4.
- Wilhelm, O.G., Wilhelm, S., Escott, G.M., Lutz, V., Magdolen, V., Schmitt, M., Rifkin, D.B., Wilson, E.L., Graeff, H. and Brunner, G.: Cellular glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D regulates urokinase receptor shedding and cell surface expression. *J Cell Physiol* 180 (1999) 225-35.
- Yu, Q. and Stamenkovic, I.: Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 13 (1999) 35-48.

7 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

- Abb. 1: Substratspezifität und Zusammenspiel der verschiedenen Matrix-Metalloproteinasen
- Abb.2: Kooperation zwischen uPA-System und MMP-System
- Abb.3: Plasmidvektor LacZ
- Abb.4: Plasmidvektor pcDNA3.1/ *suPAR*/ hygro
- Abb.5: Plasmidvektor pcDNA3/ *timp-1*/hygro
- Abb.6: Übersicht über die Genealogie der Zelllinien
- Abb.7: *suPAR*-Gehalt der *suPAR*-transfizierten Zelllinien
- Abb.8: TIMP-1-Gehalt der *timp-1*-transfizierten Zelllinien
- Abb.9: Plasmidvektor pJNhT-1 (pcDNA6/ *timp-1*/ blast)
- Abb.10: TIMP-1-Gehalt der mit *suPAR* und *timp-1* transfizierten Zelllinien
- Abb.11: TIMP-1-Gehalts der durch Limiting Dilution gewonnenen, mit *suPAR* und *timp-1* transfizierten Zelllinien
- Abb.12: Sekretion von *suPAR* in den Zellüberstand
- Abb.13: Nachweis der Aktivität von *suPAR* im uPA-Liganden-Bindungs-Assay
- Abb.14: Vergleich des TIMP-1-Gehalts der Ausgangszelllinie und der transfizierten Zelllinien
- Abb.15: Vergleich des uPA-Gehalts der Ausgangszelllinie und der transfizierten Zelllinien
- Abb.16: Vergleich des PAI-1-Gehalts der Ausgangszelllinie und der transfizierten Zelllinien
- Abb.17: Bestimmung der Sekretion von MMP-2 und MMP-9 *in vitro*
- Abb.18: Analyse der Proliferation der Zelllinien *in vitro*
- Abb.19: Quantitative Auswertung der Proliferation *in vitro*

- Abb.20: Invasives Verhalten der Zelllinien im Matrigel-Invasionsassay
- Abb.21: makroskopisch Metastasen-freie Lunge nach s.c.-Inokulation von HT 1080-Zellen
- Abb.22: makroskopisch Metastasen-freie Leber nach s.c.-Inokulation von HT 1080-Zellen
- Abb.23: makroskopische Metastasierung in die Lunge nach i.v.- Inokulation von HT 1080-Zellen
- Abb.24: makroskopisch Metastasen-freie Leber nach i.v.- Inokulation von HT 1080-Zellen
- Abb.25: Metastatisches Potential der Zelllinien im experimentellen Metastasierungsmodell
- Abb.26: Bestimmung der Sekretion von MMP-2 und MMP-9 *in vivo*
- A) Vergleich von Lungengewebe ohne Metastasen nach Tumorzellinjektion
 - B) Vergleich von Lungengewebe mit ähnlicher Metastasenzahl nach Tumorzellinjektion
- Abb.27: Bestimmung der Sekretion von uPA *in vivo*
- A) Vergleich von Lungengewebe ohne Metastasen nach Tumorzellinjektion
 - B) Vergleich von Lungengewebe mit ähnlicher Metastasenzahl nach Tumorzellinjektion
- Abb.28: Metastatisches Potential bei Überexpression von TIMP-1 und Behandlung mit mAK im experimentellen Metastasierungsmodell

Tabellenverzeichnis

- Tab.1: Überexpression von suPAR in vier transfizierten Zelllinien
im Vergleich zur Ausgangszelllinie HT 1080
- Tab.2: Überexpression von TIMP-1 in vier transfizierten Zelllinien
im Vergleich zur Ausgangszelllinie HT 1080
- Tab.3: Überexpression von TIMP-1 in vier Zelllinien, die suPAR und TIMP-1
überexprimieren, im Vergleich zur Ausgangszelllinie HT 1080
- Tab.4: Relative Überexpression von suPAR
- Tab.5: Relative Überexpression von TIMP-1

8 Abkürzungsverzeichnis

AK:	Antikörper
ATF:	Aminoterminales Fragment des uPA
BM:	Basalmembran
CD:	Cluster of Differentiation
CHO:	Chinese Hamster Ovary
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
ELISA:	Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay
EZM:	Extrazelluläre Matrix
FCS:	fötales Kälberserum
GPI-Anker:	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker
HMW-uPA:	High molecular weight uPA
i.p.:	intraperitoneal
i.v.:	intravenös
LMW-uPA:	low molecular weight uPA
mAK:	monoklonaler Antikörper
MCS:	Multiple Cloning Site
MMP:	Matrix Metalloproteinase
MMP-2:	auch Gelatinase A genannt
MMP-9:	auch Gelatinase B genannt
MMP-3:	auch Stromelysin 1 genannt
PA:	Plasminogen Aktivator
PAI-1:	Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1
PCNA:	Proliferating nuclear cell antigen
s.c.:	subkutan
Stabw.:	Standardabweichung
suPAR:	löslicher (soluble) urokinase-typ Plasminogen Aktivator Rezeptor
Timp:	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
tPA:	tissue-type Plasminogen Aktivator
uPA:	urokinase-typ Plasminogen Aktivator
uPAR:	urokinase-typ Plasminogen Aktivator Rezeptor
X-Gal:	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β -D-Galaktopyranosid

9 Danksagung

Ich danke meinem Betreuer **PD Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Achim Krüger** für die Überlassung des Themas dieser Arbeit. Ich möchte mich herzlich bedanken für seine Förderung, für die Weitergabe seines Wissens und sein Engagement, und für seine beständige und kritische Betreuung der Arbeit.

Ich danke Herrn **Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher**, dass ich die Promotion am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung anfertigen durfte. Auch ihm möchte ich herzlich danken für die Förderung meiner Arbeit und für seinen motivierenden und begeisternden Enthusiasmus.

Ich danke meinem Labor für die gute Zusammenarbeit und viele hilfreiche und fruchtbare Diskussionen: den DoktorandInnen **Matthias Arlt, Charlotte Kopitz** und **Bettina Wagner**, sowie den Technischen Assistentinnen **Katja Honert** und **Elisabeth Popescu**.

Ich danke allen für die Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit: PD Dr. A. Krüger danke ich für die Durchführung der intravenösen Injektionen bei den Tierexperimenten, Frau Honert für die Klonierung der Plasmide für suPAR und TIMP-1 mit Hygromycin-Resistenz, für die Hilfe bei der Durchführung des suPAR-Bindungsassays sowie Frau Popescu für die Hilfe bei der Durchführung der Western Blots. Ich danke Charlotte Kopitz für die *LacZ*-Transfektion der HT 1080-Zelllinie. Allen, insbesondere Matthias Arlt, danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Tierexperimente.

Mein Dank gilt auch **allen Mitarbeiter des Institutes für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung**, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere danke ich **Dr. Martina Anton** für viele wertvolle Hinweise und kritische Diskussionen. Herrn Josef Straßmair danke ich für die zuverlässige Bereitstellung von Lösungen und das Autoklavieren von Glaswaren.

Ein Dankeschön auch allen **Tierpflegern und –pflegerinnen des Instituts** für ihre flexible Kooperation während der Tierversuche.

Ich danke **PD Dr. Viktor Magdolen** and **Dr. Ulla Magdolen** von der Klinischen Forschergruppe am Institut für Gynäkologie für die Überlassung von CHO-uPAR und ATF und für die gute Zusammenarbeit.

Ich danke **Dr. Hans-Willi Krell** and **Dr. Sabine Bauer** von Roche Oncology, Penzberg für die Überlassung der monoklonalen uPAR-Antikörper und die gute Zusammenarbeit.

Meiner Familie möchte ich sehr herzlich danken für die außergewöhnliche Unterstützung, die ich durch sie erfahren durfte. Sie hat mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht, wofür ich meinen Eltern und meinen Geschwistern tief verbunden bin.

Ich danke **allen Freunden**, insbesondere **Christopher Patt, Isabelle Rassaerts, Lars Berster** und **Ruth Koch**, für die ich häufig zu wenig Zeit hatte. Ich bin ihnen sehr dankbar für ihr Verständnis und dafür, dass sie mich während der Dauer dieser Arbeit immer unterstützt haben.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 06.06.1976
 Geburtsort: Meschede
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig

Schulbildung

1982-1986 Grundschule St. Luzia, Meschede-Berge
 1986-1995 Gymnasium der Stadt Meschede, Abschluss: Abitur,
 Durchschnittsnote: 1,0

Studium

1995-1998 Studium der Humanmedizin an der RWTH, Aachen
 1997 Ärztliche Vorprüfung
 1997 sechswöchiger Studienaufenthalt an der Rijksuniversiteit
 Maastricht, Niederlande (ALMA-Austauschprogramm)
 1998 Erstes Staatsexamen, Note: befriedigend
 1998-1999 Studium der Humanmedizin an der Universität Lund, Schweden
 (ERASMUS-Austauschprogramm)
 1999-2003 Studium der Humanmedizin an der LMU München
 2002 Zweites Staatsexamen, Note: gut
 2002 Erstes Tertial des Praktischen Jahres,
 Medizinische Klinik II und III, Klinikum Großhadern, München
 2003 Zweites Tertial des Praktischen Jahres,
 I. Frauenklinik der Universität München, Maistraße, München
 2003 Drittes Tertial des Praktischen Jahres
 Chirurgische Klinik des Krankenhauses München-Schwabing

2003 Drittes Staatsexamen , Note: sehr gut
Gesamtnote: gut (1,99)

Berufliche Tätigkeit

seit 2004 Ärztin im Praktikum, Medizinische Klinik II, Klinikum
Großhadern, LMU München

Forschungsaufenthalt

1999 „Multiple primary tumors in South Sweden“:
dreimonatiges Forschungsprojekt am Institut für Onkologie und
Regionalen Tumorregister, Lund, Schweden
(Forschungsstipendium Berta Kamprads Stiftelse)

Publikationen:

Nagel J, Kopitz C, Soeltl R, Harbeck N, Schmitt M, Magdolen V,
Gänsbacher B, Krüger A
Inhibition of Collagenolytic Activity of Soluble uPA Receptor
(suPAR)-Overexpression Breast Carcinoma Cells is TIMP-1
Independent Poster AACR 2001

Magdolen V., Krüger A., Sato S., Nagel J., Sperl S., Reuning U.,
Rettenberger P., Magdolen U., Schmitt M.
Inhibition of the tumor-associated urokinase-type plasminogen
activation system: effects of high level synthesis of soluble
urokinase receptor in ovarian and breast cancer cells *in vitro* and *in*
vivo
Recent Results Cancer Res. 162 (2003) 43-63. Review.

Ericson K., Halvarsson B., Nagel J., Rambech E., Planck M.,
Piotrowska Y., Olsson H., Nilbert M.

Defective mismatch-repair in patients with multiple primary
tumors including colorectal cancer.

Eur J Cancer 39 (2) (2003) 240-8.

Nielsen K, Ingvar C, Måsbäck, A, Westerdahl J, Borg A, Sandberg
T, Jonsson N, Nagel J, Olsson H

Melanoma and nonmelanoma skin cancer in patients with multiple
tumors-evidence for new syndromes in a population-based study.

Brit J Dermatol, 150(3) (2004) 531-36