

Lehrstuhl II des Instituts für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

**uPA-gekoppelte Silica-Partikel zur Untersuchung der inhibitorischen Fähigkeit
synthetischer, von uPA abgeleiteter Peptide und anderer uPAR-Antagonisten**

Elke Guthaus

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. – Prof. Dr. St. J. Glaser

Prüfer der Dissertation:

1. Univ. - Prof. Dr. H. Kessler

2. Priv. – Doz. Dr. V. Magdolen

Die Dissertation wurde am 01.03.2004 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 09.09.2004 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1999 bis Februar 2003 in der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der TU München im Rahmen des Sonderforschungsbereichs SFB 456 „Zielstrukturen für selektive Tumorinterventionen“ der TU München unter Anleitung von Prof. Dr. Horst Kessler, Lehrstuhl II des Instituts für Organische Chemie und Biochemie der TU München, und Prof. Dr. Dr. Manfred Schmitt, Leiter der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der TU München, angefertigt.

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Horst Kessler für seine Unterstützung und die Vertretung der Doktorarbeit an der Fakultät für Chemie der TU München.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Manfred Schmitt für die Betreuung der Arbeit, seine ständige Unterstützung, seine Ideen, seine Begeisterungsfähigkeit und für sein sehr konstruktives und kritisches Hinterfragen von Ergebnissen.

Herzlichst danke ich Frau PD Dr. Ute Reuning für ihre stete Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen rund um die Zellkultur und das Labor.

Herrn PD Dr. Viktor Magdolen möchte ich für all seine Hilfe und Unterstützung danken, für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen, sowie die kurzweiligen Stunden während der Arbeit und außerhalb des Labors.

Der Firma Wilex AG München danke ich für die Bereitstellung der zyklischen, uPA-abgeleiteten Peptide und FITC-uPA. Herrn Nils Potthoff gilt dabei mein Dank für seine Hilfe und Antworten auf all die Fragen rund ums FACS.

Sehr herzlich danke ich meinen Kolleginnen und Kollegen in der Klinischen Forschergruppe:

Alexandra Eickler für ihr Engagement und ihre unermüdliche Mitarbeit an dieser Arbeit,

Sabine Creutzburg für die freundliche Unterstützung bei der Klonierung,

Anke Bengel für ihre Hilfe bei Problemen mit der Zellkultur und bei den Transfektionen,

Christel Schnelldorfer und Erika Sedlacek für die ständige Hilfsbereitschaft bei technischen Fragen zu ELISA und FACS,

Stefan Hocke für die Durchführung der Versuche am CLSM,

Angelika Welk für ihre unermüdliche Organisation rund um das FACS-Gerät, sowie den anderen Kolleginnen aus dem FACS-Labor Daniel Hellmann, Sonja Vehling, Sonja Sinz und Frigga Roggel für eine nette Arbeitsatmosphäre in der Dunkelheit.

Dr. Ulla Magdolen, Dr. Eva Groß, Janna Krol, Claudia Abou Ajram und Daniela Lössner für ein nettes Arbeitsklima.

Meinen „Mädels“ Stefanie Neubauer, Juliane Farthmann und Angela Kirschenhofer für eine tolle Zeit im Labor, ihre Freundschaft, für ihr offnes Ohr bei den vielen kleinen und großen Sorgen und für die vielen lustigen Abende bei Cocktails und Wein.

Meinem ehemaligen Kollegen Dominik Helmecke für dessen Hilfe zu Beginn dieser Arbeit.

Fanny, Rebekka, Andrea sowie meinen „Chemikern“ Chrisi, Tom, Lars und Steve danke ich für ihre treue Freundschaft und für eine schöne gemeinsame Zeit. Ihr habt immer an mich geglaubt.

Ganz persönlicher Dank gilt Stefan, der immer für mich da war.

Ich danke den Familien meiner Brüder André und Volkhard hier unten im Raum München, die mich im Laufe meines Studiums und meiner Promotion immer unterstützt haben und mir bei vielen Alltagsorgen geholfen haben.

Von ganzem Herzen danke ich meinen lieben Eltern, ohne die ich es niemals geschafft hätte. Trotz der Entfernung seid Ihr mir immer eine unschätzbare Hilfe gewesen. Ein Hoch auf den dicken Herrn Bell, der das Telefon erfunden hat.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	
1. Einleitung	1
1.1 Das Plasminogenaktivator-System	1
1.2 Komponenten des Plasminogenaktivator-Systems	2
1.2.1 Der uPA-Rezeptor	2
1.2.2 uPA	4
1.2.3 Die natürlichen Plasminogenaktivator-Inhibitoren	5
1.2.4 Klinische Relevanz des Plasminogenaktivator-Systems	8
1.3 uPA-abgeleitete Peptide	10
1.4 Methoden zur Interaktionsanalyse	11
1.4.1 Methoden zur Bestimmung der uPA/uPAR-Interaktion	11
1.4.2 Partikel-basierende Analysemethoden zur Bestimmung von Protein/Protein-Interaktionen	14
2. Zielsetzung	16
3. Material und Methoden	17
3.1 Material und Geräte	17
3.1.1 <i>E.coli</i> -Bakterienstämme und Expressionsvektoren	17
3.1.2 Zelllinien	17
3.1.3 Antikörper für Durchflusszytometrie und Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	17
3.1.4 Zyklische, uPA-abgeleitete Peptide	18
3.1.5 Restriktionsendonukleasen	18
3.1.6 Verbrauchsmaterial	18
3.1.7 Chemikalien	18
3.1.8 Zellkultur	19
3.1.9 Geräte	20
3.2 Molekularbiologische Methoden	20

3.2.1	Kultivierung von <i>E.coli</i>	20
3.2.2	Herstellung von <i>E.coli</i> -Dauerkulturen	20
3.2.3	Plasmidreinigung aus <i>E.coli</i>	21
3.2.4	Plasmid-DNA-Minipräparation aus <i>E.coli</i> zur DNA-Sequenzierung	22
3.2.5	Sequenzierungen	22
3.2.6	Polimerasekettenreaktion (PCR)	22
3.2.7	Proteinase K-Verdau	23
3.2.8	DNA-Gelelektrophorese	24
3.2.9	Isolierung der DNA aus Agarosegeelen	24
3.2.10	Restriktionsanalyse	25
3.2.11	Ligation von DNA-Fragmenten	25
3.2.12	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	26
3.2.13	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E.coli</i> -Zellen	27
3.3	Proteinchemische Methoden	27
3.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	27
3.3.2	Gelfärbemethoden	29
3.3.3	Western Blot	30
3.3.4	Quantifizierung von Proteinen	31
3.4	Zellbiologische Methoden	31
3.4.1	Zellkultur	31
3.4.2	Transfektionen	32
3.5	Reinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie	33
3.5.1	Reinigung von löslichem uPAR (suPAR)	33
3.5.2	Reinigung von HD13.1	34
4.	Ergebnisse	36
4.1	Bestimmung der inhibitorischen Kapazität uPA-abgeleiteter Peptide mittels Durchflusszytometrie	36
4.1.1	uPA-abgeleitete Peptide	36
4.1.2	Bestimmung des inhibitorischen Potentials uPA-abgeleiteter Peptide durch FACS-Analyse mit U937-Zellen	38
4.2	uPA-Silica-Partikel (SP-uPA) zur Untersuchung von uPAR-Antagonisten	42
4.2.1	Kopplung von HMW-uPA an Silica-Partikel	42

4.2.2	Qualitative Kontrolle der Kopplung	43
4.2.3	Funktionelle Kontrolle der Kopplung	45
4.2.4	Bestimmung des inhibitorischen Potentials uPA-abgeleiteter Peptide mittels Durchflusszytometrie mit SP-uPA	47
4.2.5	Vergleich von SP-uPA-Partikelsystem mit dem U937-Zellsystem	55
4.3	Generierung von His-suPAR-exprimierenden OV-MZ-6#8-Zellen	57
4.3.1	Entwicklung einer Klonierungsstrategie	57
4.3.2	Klonierung, Isolierung und Nachweis von suPAR-pQE60	58
4.3.3	Klonierung, Isolierung und Nachweis von His-suPAR-pRc/CMV2	62
4.3.4	Transfektion von pRc/CMV2-His-suPAR in OV-MZ-6#8-Zellen	65
5.	Diskussion	67
5.1	Effekt der uPA-abgeleiteten Peptide auf die Inhibierung der uPA/uPAR-Interaktion	68
5.2	uPA-Silica-Partikel (SP-uPA) zur Untersuchung von Inhibitoren der uPA/uPAR-Interaktion	71
5.3	Vergleich von SP-uPA mit dem U937-Zellsystem	74
5.4	Transfektion humaner Ovarialkarzinomzellen mit His-suPAR-kodierender Plasmid-DNA	76
6.	Zusammenfassung	79
7.	Literaturverzeichnis	81
8.	Lebenslauf und Liste der Veröffentlichungen	98

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
abs.	Absolut
AcO	Acetat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATF	Aminoterminales Fragment
AS	Aminosäure
bp	„base pair“
BrCN	Bromcyan
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
CHO	„chinese hamster ovary“
Da	Dalton
DMEM	„Dulbecco’s modified Eagle’s medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent-assay“
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	„fluorescence activated cell sorting“
FCS	Fötale Kälberserum
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d’Obstétrique
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GAM	„growth arrest medium“
GFD	„growth factor like“-Domäne
GPCR	„G-protein-coupled receptor“
GPI	Glykosylphosphatidylinositol

H ₂ O bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
HEPES	2-[4-[Hydroxyethyl]-1-Piperazin]ethansulfonsäure
HMW	„high molecular weight“
IC ₅₀	„50% inhibitory concentration“
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LDL	„low-density lipoprotein receptor“
LMW	„low molecular weight“
LRP	„low-density lipoprotein receptor-related protein“
mAb	„monoclonal antibody“
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	„nuclear magnetic resonance“
OD _x	Optische Dichte bei x nm
OS	„overall survival“
PA	Plasminogenaktivator
pAb	„polyclonal antibody“
PAI	Plasminogenaktivator-Inhibitor
PBS	„phosphate buffered solution“
P:C:I	Phenol:Chloroform:Isomylalkohol, 25:25:1
PCR	„polymerase chain reaction“
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFS	„relapse free survival“
RCL	„reactive center loop“
rpm	„rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
scuPA	„single-chain“ uPA
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SPR	„surface plasmon resonance“
suPAR	„soluble“-uPAR
Tab.	Tabelle

Taq	<i>thermophilus aquaticus</i>
TBS	“Tris-buffered saline”
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylenamin
tcuPA	„two-chain“ uPA
tPA	„tissue-type“ Plasminogenaktivator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Triton	Octylphenolpolyethylenglycol
U	Unit
ÜN	Über Nacht
uPA	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator
uPAR	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-Rezeptor
v/v	Volumenanteil
w/v	Gewichtsvolumenanteil
wt	„wild-type“

Aminosäuren

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

1. Einleitung

1.1 Das Plasminogenaktivator-System

Das Plasminogenaktivator (PA)-System mit seinen Komponenten uPA-Rezeptor (uPAR, CD87), den Plasminogenaktivatoren uPA und tPA sowie Plasmin(ogen), und den Plasminogenaktivator-Inhibitoren PAI-1 und PAI-2, spielt eine zentrale Rolle in Abbau und Reorganisation der extrazellulären Matrix (EZM) und beeinflusst entscheidend den Gewebeabbau bei normalen physiologischen Prozessen und während pathologischen Zuständen wie Krebs (Schmitt et al., 1997; Andreasen et al., 1997; Reuning et al., 1998). Plasminogen, ein Leber-Zymogen, wird durch Proteolyse in die enzymatisch aktive Serinprotease Plasmin überführt (Ellis 1996). Dieser Prozess wird namentlich von den beiden Plasminogenaktivatoren uPA und tPA aber auch verschiedenen bakteriellen Enzymen z. B. Streptokinase und Staphylokinase katalysiert (Lahteenmaki et al., 2001; Sazonova et al., 2001). Dabei wird die Peptidbindung R560 - V561 in Plasminogen gespalten, wodurch die zweikettige Struktur des Plasmins entsteht. Plasmin baut verschiedene EZM-Proteine ab, wie Laminin, Fibronectin, Fibrin und Vitronectin, aktiviert aber in einem Feedback-Mechanismus die Pro-Form von uPA (pro-uPA), die von verschiedenen normalen Zellen und von Tumorzellen gebildet und ausgeschleust wird. Durch den uPA-Rezeptor, der über eine Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Einheit in der Zellmembran verankert ist, wird proteolytisch aktives uPA (HMW-uPA) an die Tumorzelle gebunden. uPAR-gebundenes uPA katalysiert dadurch direkt in der Umgebung der Tumorzelle den Abbau der EZM und begünstigt damit die Ausbreitung der Tumorzellen vom Primärtumor über die Blut- und Lymphwege in anderes Gewebe. Die beiden natürlichen Inhibitoren des PA-Systems, PAI-1 und PAI-2, regulieren durch Bindung an uPA und Inhibierung von uPA die Plasminogenaktivierung.

1.2 Komponenten des Plasminogenaktivator-Systems

1.2.1 Der uPA-Rezeptor

Humaner uPA-Rezeptor wurde erstmals 1985 in der Literatur als spezifischer, zellulärer uPA-Bindungspartner auf Monozyten (Vassalli et al., 1985; Stoppelli et al., 1985) und Maus-Fibroblasten (del Rosso et al., 1985) beschrieben. Die cDNA von uPAR wurde abgeleitet von menschlichem und tierischem Ursprung kloniert (Roldan et al., 1990; Kristensen et al., 1991; Krätzschmar et al., 1993). Die Aminosäuresequenz des stark glykosylierten Proteins besteht aus drei unabhängigen, Cystein-reichen, homolog gefalteten Domänen (Abb. 1) von je ca. 90 Aminosäuren Länge, die über eine kurze Linker-Sequenz miteinander verbunden sind (Behrendt et al., 1991, Ploug 2003). Die C-terminale Domäne 3 ist mit einer Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Einheit auf der Zelloberfläche verankert (Ploug et al., 1991; Ploug & Ellis 1994, Ploug 2003), der Rezeptor besitzt aber keine transmembrane oder intrazelluläre Domäne. Eine lösliche Variante von uPAR ohne GPI-Anker wurde in Überständen verschiedener Zelllinien (Lau & Kim 1994) und in Aszites-Flüssigkeiten von Patientinnen mit Ovarialkarzinom (Pedersen et al., 1993) nachgewiesen. Am N-terminalen Ende von uPAR, Domäne 1, befindet sich der Bindungsbereich für uPA (Behrendt et al., 1991). Vitronektin bindet an die Domänen 2 und 3 von uPAR, wobei für diese Bindung die vollständige Struktur von uPAR, Domänen 1, 2 und 3, erforderlich ist (Waltz & Chapman 1994; Wei et al., 1994; Sidenius & Blasi 2000). uPAR interagiert mit Integrinen, und beeinflusst somit Integrin-vermitteltes Signalling-Geschehen ohne selbst primär daran beteiligt zu sein (Wei et al., 1996; Xue et al., 1994; Xue et al., 1997). Integrine, Rezeptoren auf der Zelloberfläche, binden an Proteine der EZM und vermitteln Signale zwischen Umgebung der Zelle und Zellinnerem, und umgekehrt (Wei et al., 1996). Einige Integrine interagieren direkt mit uPAR. So konnte für $\alpha_3\beta_1$ und $\alpha_5\beta_1$, die an Fibronectin binden, $\alpha_M\beta_2$, das an Fibrinogen bindet, und $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$, die an Vitronektin binden, eine direkte Interaktion mit uPAR mittels Koimmunopräzipitation nachgewiesen werden (Blasi & Carmeliet 2002, Reuning et al., 2003). Durch die uPAR-Integrin-Interaktion werden Adhäsion, Migration und Proliferation reguliert.

Die Linker-Region zwischen den uPAR-Domänen 1 und 2 ist sehr sensitiv gegenüber bestimmten Proteasen, z. B. uPA (Høyer-Hansen et al., 1992) oder Chymotrypsin (Behrendt et al., 1991). Eine Variante von uPAR, bestehend aus den uPAR-Domänen 2 und 3, konnte *in*

in vivo nachgewiesen werden (Solberg et al., 1994). Die abgespaltene Domäne 1 bindet uPA, allerdings mit einer um den Faktor 1.500 reduzierten Affinität (Ploug et al., 1994; Behrendt et al., 1996). Die Bedeutung dieser uPAR-Variante liegt in der Regulierung der uPA-Aktivität. Durch Abspalten der Domäne 1 wird uPAR inaktiviert (Høyer-Hansen et al., 1992), ist somit nicht mehr in der Lage uPA zu binden und die Plasminogenaktivierung auf die Zelloberfläche zu fokussieren. Die Regulierung von uPA erfolgt auch durch Bildung eines tetramären Komplexes von uPAR mit uPA, PAI-1 und LRP („low-density lipoprotein receptor-related protein“), der ins Innere der Zelle internalisiert und dort abgebaut wird. Der uPA-Rezeptor, der mit PAI-1-gebundenem uPA okkupiert war, erscheint wieder aktiv auf der Zelloberfläche, um erneut uPA zu binden (Cubellis et al., 1990).

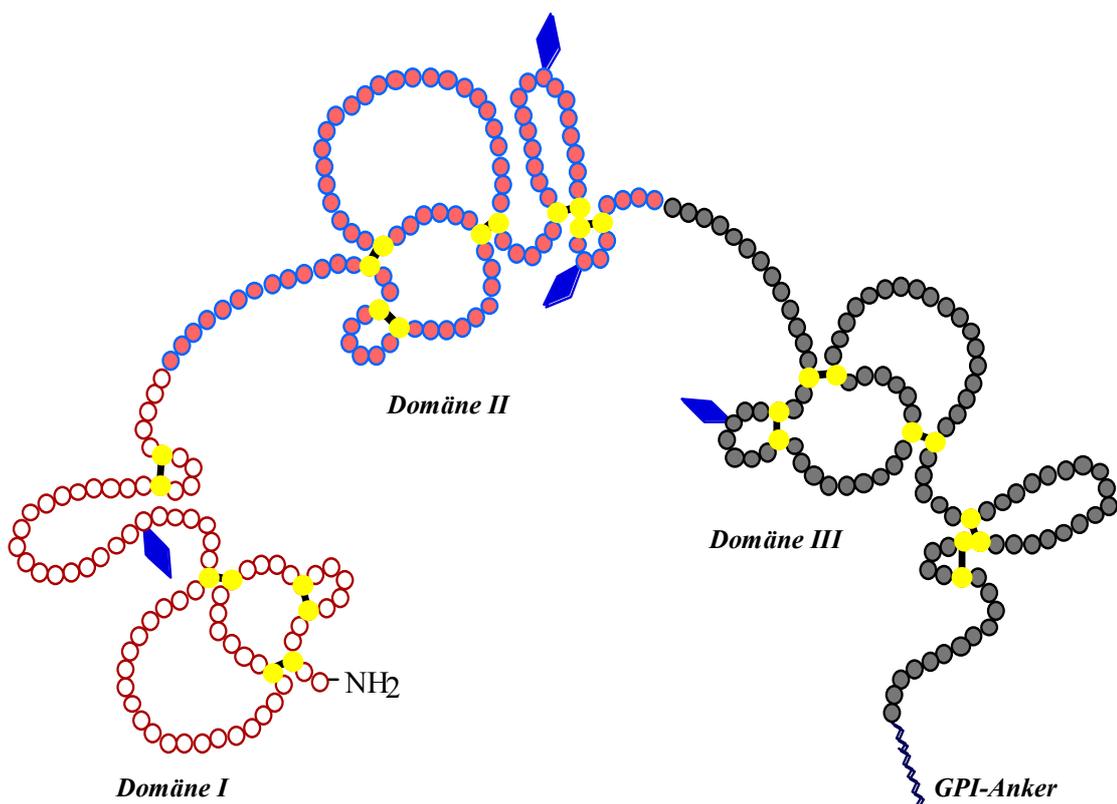


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Multidomänen-Struktur von uPAR. Die potentiellen Glykosylierungsstellen (blaue Raute) und die Disulfid-verbrückten Cysteine (gelbe Kugeln) sind grafisch hervorgehoben.

Zwischen Domäne I und Domäne II von uPAR befindet sich eine Region mit hoher chemotaktischer Aktivität, vergleichbar mit der des uPA in uPAR-exprimierenden Zellen. Durch proteolytische Spaltung von uPAR zwischen Domäne I und II wird dieses Epitop freigelegt. Die minimale chemotaktische Sequenz von uPAR, die benötigt wird, um für die Migration erforderliche Veränderung des Cytoskeletts und intrazelluläres Signalling-Geschehen zu induzieren, repräsentiert das Peptid ⁸⁸SRSRY⁹². Diese chemotaktische Aktivität des uPAR-Fragments bestehend aus Domäne I und II wird durch Pertussis-Toxin inhibiert. Es konnte bewiesen werden, dass „G-protein-coupled“-Rezeptoren (GPCR) als transmembrane Adaptoren zur Übertragung des chemotaktischen Signals in die Zelle wirken (Blasi et al., 2002; Resnati et al., 2002).

1.2.2 uPA

Der 53 kDa große Urokinase-Typ Plasminogenaktivator gehört zu den Serinproteasen, und wird als einkettiges Protein von verschiedenen Zellen gebildet und ausgeschleust (Günzler et al., 1982). Urokinase wurde erstmal 1951 im menschlichen Urin entdeckt (Williams et al., 1951). Durch die Serinprotease Plasmin wird das so genannte „single-chain“ uPA (scuPA oder pro-uPA) in die proteolytisch aktive, zweikettige Form (tcuPA oder HMW-uPA) überführt. Dabei wird die Peptidbindung K158 - I159 in pro-uPA gespalten (Danø et al., 1985). uPAR-gebundenes pro-uPA wird durch Plasmin erheblich schneller in HMW-uPA umgewandelt als ungebundenes (Ellis et al., 1989; Duval-Jobe & Parmely 1994), welches dann wiederum Membran-gebundenes Plasminogen in Plasmin spaltet (Stoppelli et al., 1986). Andere Proteine können pro-uPA in HMW-uPA überführen: z. B. Plasma-Kallikrein, Blutgerinnungs-Faktor XIIa (Ichinose et al., 1986), Kathepsine B und L (Kobayashi et al., 1991; Goretzki et al., 1992).

Das uPA-Molekül besteht aus drei funktionellen Domänen (Abb. 2): Die Serinprotease-Domäne (AS 144 - 411) am C-terminalen Ende bildet ohne den N-terminalen Teil das „low molecular weight“ (LMW)-uPA (Pennica et al., 1983, Strassburger et al., 1983). Das N-terminale Fragment (ATF) besteht aus der Kringel-Domäne und der „growth factor-like“-Domäne (GFD) (Steffens et al., 1982). uPA besteht somit aus zwei komplett unabhängigen Teilbereichen, ATF und der Protease-Bereich (LMW-uPA), die über eine Disulfidbrücke C148 - C279 miteinander verbunden sind. GFD bindet an uPAR (Appella et al., 1987).

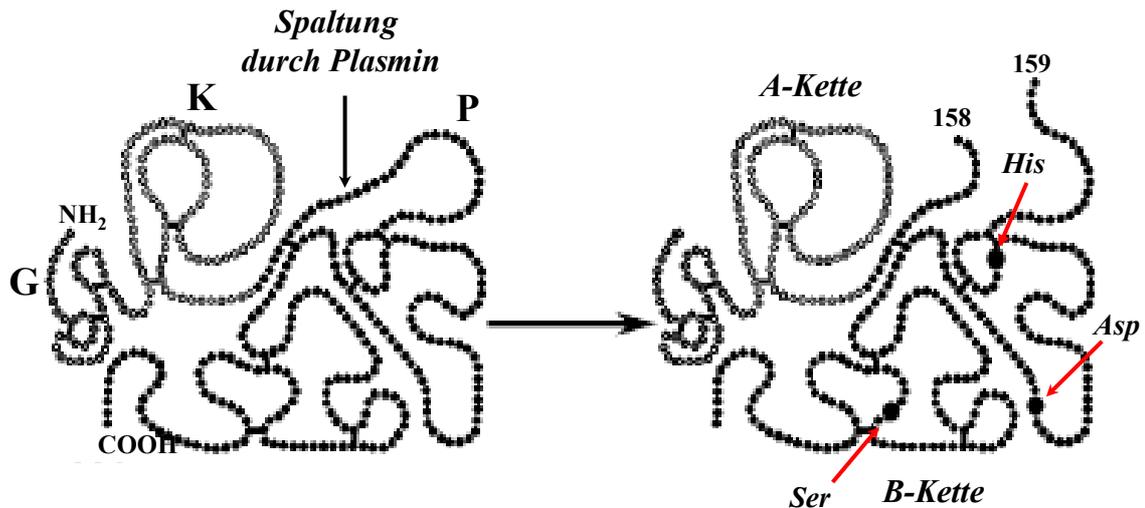


Abbildung 2: Struktur von (pro-) uPA. Plasmin überführt durch Spaltung der Peptidbindung K158 - I159 enzymatisch inaktives, einkettiges pro-uPA in die enzymatisch aktives, zweikettiges HMW-uPA. (G: "growth factor-like"-Domäne, K: Kringel-Domäne, P: Protease-Bereich). Die roten Pfeile markieren die Aminosäuren His, Asp, Ser der katalytischen Triade der Serinprotease HMW-uPA.

1.2.3 Die natürlichen Plasminogenaktivator-Inhibitoren

Uneingeschränkte proteolytische Aktivität von uPA, die eine fortlaufende Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin und einen damit verbundenen unkontrollierten Gewebeabbau (EZM) zur Folge hat, ist sogar in geringem Maße gefährlich für Zellen. Zur Beschränkung der uPA-Aktivität erfolgt die so genannte limitierte Proteolyse, d. h. die Zellen bilden einen Überschuss an Inhibitoren. HMW-uPA existiert fast ausschließlich inaktiv als Komplex mit PAI-1 (Chapman et al., 1982; Andreasen et al., 1994).

Die Plasminogenaktivator-Inhibitoren (PAIs) PAI-1 und PAI-2 gehören zur Familie der Serinprotease-Inhibitoren (SERPINS), zu denen auch der Plasmin-Inhibitor α 2-Antiplasmin gehört. Der uPA-Bindungsbereich von PAI-1 ist eine Peptidschleife, die sich oberhalb des komplexen Proteins PAI-1 befindet. Der so genannte „reactive center loop“ (RCL) dient als Pseudo-Substrat für die Protease uPA, wobei sich ein stabiler Komplex mit einer 1:1-Stöchiometrie bildet (Potempa et al., 1994; Stein & Carrell 1995).

(Ehrlich et al., 1991; Deng et al., 1995). Durch Bindung von PAI-1 an uPAR-gebundenes uPA wird Plasminogenaktivierung und damit der Abbau der EZM inhibiert (Cubellis et al., 1989). Daneben spielt PAI-1 in verschiedenen Prozessen im Tumorgeschehen eine Rolle, z. B. bei Tumorwachstum, Adhäsion, Vaskularisierung und Metastasierung (Wind et al., 2002).

PAI-1 bildet mit uPA und uPAR einen trimären Komplex, der ins Zellinnere internalisiert und dort abgebaut wird (Cubellis et al., 1990). Dieser Prozess wird durch Rezeptoren der „low-density lipoprotein receptor“ (LDL)-Familie vermittelt. Der bedeutendste Interaktionspartner ist dabei das „ α_2 -macroglobuline/LDL-receptor related protein“ (LRP) (Herz et al., 1992; Conese & Blasi 1995). Nach Internalisierung werden uPA and PAI-1 intrazellulär abgebaut, und uPAR erscheint wieder auf der Zelloberfläche, um erneut uPA und PAI-1 zu binden (Nykjaer et al., 1997).

Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ-2 (PAI-2) ist der zweite PA-spezifische Inhibitor. PAI-2 existiert zum größten Teil intrazellulär in nicht-glykosylierter Form als 47 kDa Protein in Monozyten (Antalis et al., 1988). Nur etwa 15 - 20 % werden glykosyliert und aus der Zelle ausgeschleust. Extrazellulärer PAI-2 hat ein Molekulargewicht von 60 - 70 kDa (Kruithof et al., 1995). Er bindet 15-mal schlechter an uPA als PAI-1 (Ellis et al., 1990). Unter normalen Bedingungen ist PAI-2 im menschlichen Plasma praktisch nicht nachweisbar (Kruithof et al., 1987). Nur bei Frauen während der Schwangerschaft steigt der PAI-2-Level bis auf einen Wert von 250 ng/mL an (Dougherty et al., 1999). PAI-2 wird selektiv von Trophoblasten exprimiert, aus denen sich während der Schwangerschaft die Plazenta bildet. Das Plasminogenaktivator-System hat während der Schwangerschaft verschiedene Funktionen. PAI-1, PAI-2 und uPA spielen eine bedeutende Rolle in Abbau und Proteolyse der Dezidua zur Sicherstellung ausreichender Trophoblasteninvasion. Darüber hinaus sind nach Abtrennung der Plazenta für eine ausreichende Hämostase reduzierte Fibrinolyse und erhöhte Koagulation erforderlich, die ebenfalls durch das PA-System reguliert werden (Roes et al., 2002). PAI-2 dient als positiver Marker für die Funktion der Plazenta. Bei Schwangeren mit Präeklampsie ist der PAI-2-Level reduziert und der PAI-1-Level erhöht, einhergehend mit einer noch weiteren Reduktion der Fibrinolyse, was zu häufigem Auftreten von Plazenta-Infarkten führt (Estelles et al., 1989)

Der Abbaumechanismus von PAI-2 erfolgt verschieden von dem des PAI-1. Nach Bindung von PAI-2 an uPAR-gebundenes uPA wird uPA gespalten. Es entsteht ein 70 kDa Komplex

aus PAI-2 und dem aktiven Zentrum von uPA, welcher ins Medium freigesetzt und zum Teil in die Zelle aufgenommen und dort abgebaut wird. Ein 22 kDa Fragment (ATF) verbleibt am Rezeptor. Damit ist uPAR „blockiert“ und nicht mehr in der Lage, neues uPA zu binden, um Plasminogen zu aktivieren (Ragno et al., 1995 & 1998).

1.2.4 Klinische Relevanz des Plasminogenaktivator-Systems

In verschiedenen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass unterschiedlicher Gehalt an uPA, uPAR, PAI-1 und/oder PAI-2 im Primärtumorgewebe von Krebspatienten von prognostischer Relevanz für Rezidivhäufigkeit und das Überleben ist. Das gilt für Krebserkrankungen der Brust, des Ovars, der Cervix Uteri, aber auch für Tumoren der Blase, der Niere, des Kopfes, des Halses, des Gehirns, des Magens, des Pankreas, der Speiseröhre, des Darms und der Leber (Reuning et al., 1998). Für uPA konnte 1988 erstmals durch Messung der enzymatischen Aktivität dieser Protease im Primärtumorgewebe von Brustkrebspatientinnen gezeigt werden, dass uPA prognostische Bedeutung besitzt (Duffy et al., 1988). Patientinnen mit einem hohen Gehalt an uPA-Aktivität im Tumorgewebe zeigten ein deutlich kürzeres Rezidiv-freies Überleben als Patientinnen mit niedriger uPA-Aktivität. Jänicke et al. (1993) konnten erstmals zeigen, dass bei Brustkrebspatientinnen Erhöhung von PAI-1 mit einem schlechteren Krankheitsverlauf korreliert, d. h. höheres Rezidiv-Risiko und früheres Versterben. Bei Patientinnen ohne Tumorbefall der Lymphknoten, der als ein Indiz für eine mögliche beginnende Metastasierung gilt, ist der PAI-1-Gehalt ein ebenso starker prognostischer Marker wie uPA. In einer 2002 veröffentlichten Meta-Analyse mit 8377 Brustkrebspatientinnen konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an uPA und PAI-1 im Primärtumorgewebe neben dem Status des Lymphknotenbefalls die höchste Aussagekraft für Rezidiv-freies Überleben („relapse-free survival“, RFS) und das Gesamtüberleben („overall survival“, OS) besitzt (Look et al., 2002). Bei der sehr großen Patientinnengruppe ohne Lymphknotenbefall lagen für 3483 Patientinnen die Werte für sowohl uPA- als auch PAI-1-Gehalt vor. Es wurde statistisch ermittelt, dass die Aussagekraft beider prognostischen Marker uPA und PAI-1 zusammen - bezüglich RFS und OS - höher ist, als jeden der beiden Marker einzeln bewertet. Anhand der Marker hoher uPA-/PAI-1-Gehalt und niedriger uPA-/PAI-1-Gehalt konnte bei diesen Patientinnen zwischen ungünstiger und günstiger Prognose unterschieden werden. Bei der Untergruppe mit der günstigsten Prognose (20 % der Patientinnen; 76,9 % RFS und 87,2 % OS nach 10 Jahren) könnte zukünftig von adjuvanter

Chemotherapie abgesehen werden. Die Bestimmung des uPA- und PAI-1-Gehalts ist v. a. bei der Patientinnengruppe ohne Lymphknotenbefall eine Möglichkeit, Risikogruppen zu definieren, und für diese individuelle Behandlungsstrategien zu entwickeln.

Im Gegensatz zu uPA und PAI-1 korreliert ein hoher PAI-2-Gehalt im Primärtumorgewebe von Brustkrebspatientinnen mit einer günstigen Prognose für Rezidiv-freies Überleben und das Gesamtüberleben (Foekens et al., 1995 & 2000; Bouchet et al., 1994; Stephens et al., 1998).

1.3 uPA-abgeleitete Peptide

1987 wurde mit Hilfe linearer, uPA-abgeleiteter Peptide der Bindungsbereich von uPA an uPAR zwischen Aminosäuren 18 bis 32 der GFD lokalisiert (Appella et al., 1987). Dabei wurde festgestellt, dass ein lineares Peptid mit der Sequenz uPA₁₈₋₃₂ in einer Konzentration von 100 nM die Bindung von ¹²⁵I-markiertem ATF an uPAR um 50 % reduzieren kann. Mittels systematischer Mutationsanalyse wurden folgende Aminosäuren als essentiell für die effektive Bindung von uPA an uPAR ermittelt: Cys19, Lys23, Tyr24, Phe25, Ile28, Trp30 und Cys31 (Magdolen et al., 1996).

Ausgehend davon wurde das lineare Peptid uPA₁₉₋₃₁ synthetisiert, und dessen inhibitorische Kapazität an Tumorzellen getestet und in einem uPA/uPAR-ELISA bestimmt (Bürgle et al., 1997). Durch Strukturaufklärung von ATF mittels NMR konnten Hansen et al. bereits 1994 feststellen, dass die C-Atome des Peptidrückgrats (α -C-Atome) der Aminosäuren Cys19 und Cys31 einen Abstand von nur 6,1 Å voneinander haben. Es wurden neue Varianten des Peptids synthetisiert und dabei Cys19 und Cys31 über Disulfidbindung verbrückt und so die zyklische Struktur gewonnen: cyclo^{19,31}-uPA₁₉₋₃₁ (Bürgle et al., 1997) und cyclo^{19,31}[D-Cys¹⁹]-uPA₁₉₋₃₁ (Magdolen et al., 2001). In cyclo^{19,31}[D-Cys¹⁹]-uPA₁₉₋₃₁ (Abb. 4) wurde Cys19 durch die korrespondierende D-Aminosäure ersetzt und D-Cys19 und Cys31 über eine Disulfidbindung miteinander verbrückt. Beide zyklischen Peptide inhibieren sehr effizient die Anbindung von uPA an uPAR. Mittels Durchflusszytometrie mit der Leukämie-Zelllinie U937, die nach Stimulierung mit Phorbol ester uPAR erhöht auf der Zelloberfläche exprimiert, und Zugabe von FITC-markiertem uPA als Ligand, wurde ein IC₅₀-Wert von 0,2 µM für cyclo^{19,31}[D-Cys¹⁹]-uPA₁₉₋₃₁ ermittelt (Schmitt et al., 2000; Magdolen et al., 2001). Durch Kürzung des Peptidrückgrats, Austausch von Ser21 durch D-Cys und His29 durch Cys und anschließende Zyklisierung wurde eine stabilere und besser inhibierende Peptidvariante synthetisiert. Mit einem IC₅₀-Wert von 40 nM repräsentiert cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (Abb. 4) das bisher am besten inhibierende uPA-abgeleitete, zyklische Peptid (Schmiedeberg et al. 2000 & 2002).

Unabhängig von dieser gezielten Entwicklung uPA-abgeleiteter Peptide zur Inhibierung der uPA/uPAR-Interaktion (Reuning et al., 2003) wurde mittels Bakteriophagen-Bibliothek ein lineares, 17 Aminosäuren langes Peptid („Clone 20“) gefunden, dessen Aminosäuresequenz sich von der uPA-Sequenz unterscheidet (Goodson et al., 1994). „Clone 20“ inhibiert mit

einem IC_{50} -Wert von 10 nM die Bindung von ^{125}I -markiertem ATF an uPAR. Allerdings besitzt die Bindungssequenz FXXYLW im „Clone 20“-Peptid sehr hohe strukturelle Ähnlichkeit mit dem uPAR-Bindungsbereich $^{24}YFXXIXW^{30}$ im uPA-Molekül (Magdolen et al., 1996; Bürgle et al., 1997).

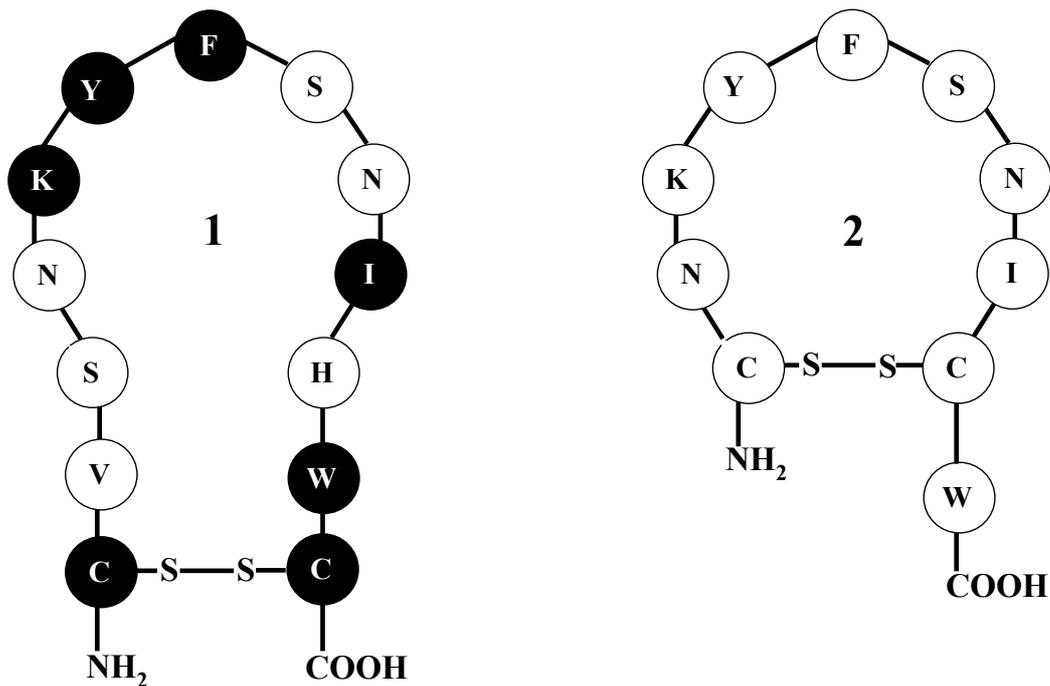


Abbildung 4: Schematische Darstellung der zyklischen uPA-Peptide $\text{cyclo}^{19,31}[\text{D-Cys}^{19}]\text{-uPA}_{19-31}$ (1) und $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$ (2). Die schwarzen Kreise markieren jene Aminosäuren, die für eine effektive Bindung an uPAR notwendig sind.

1.4 Methoden zur Interaktionsanalyse

1.4.1 Methoden zur Bestimmung der uPA/uPAR-Interaktion

Die Entwicklung und Verbesserung von Meßmethoden zur Untersuchung der uPA/uPAR-Bindung und Beeinflussung durch deren Inhibitoren spielte eine bedeutende Rolle (Crowley et al., 1993; Min et al., 1996; Kobayashi et al., 1998; Li et al., 1998; Tressler et al., 1998;

Krüger et al., 2000; Schmitt et al., 2000; Mazar 2001; Rabbani & Mazar 2001). Unterschiedliche Arten von Meßmethoden, basierend auf zellassoziertem uPAR wie auf löslichem uPAR (suPAR), wurden etabliert (Tabelle 1).

Es wurden Testmethoden im ELISA-Format entwickelt, wobei suPAR auf einer Mikrotiter-Platte immobilisiert und die Interaktion mit uPA oder ATF durch Zugabe spezifischer, primärer Antikörper nachgewiesen wurde (Rettenberger et al., 1995; De Witte et al., 1998). Alternativ wurde die ELISA-Platte mit Streptavidin beschichtet und biotinylierter suPAR zugegeben. Nach Zugabe von ^{125}I -markiertem uPA bzw. ATF wird deren Bindung an immobilisierten uPAR durch Messung der Radioaktivität ermittelt (Goodson et al., 1994, Min et al., 1996). ^{125}I -markiertes pro-uPA, uPA oder uPA-Mutanten wurden in SDS-PAGE und Autoradiography genutzt, um uPAR in Zelllysaten nachzuweisen (Engelholm & Behrendt 2001) oder in einem Verfahren, in dem Zellen in Mikrotiter-Platten kultiviert wurden, um die Bindung von uPA an zellassozierten Rezeptor zu bestimmen (Quax et al., 1998). Eine andere Alternative ist ein Western Blot mit SPOT-Membranen, der etabliert wurde, um den uPA-Bindungsereich in uPAR zu ermitteln (Liang et al., 2001). Lineare, uPAR-abgeleitete Peptide, 15 Aminosäuren lang und 3 Aminosäuren überlappend, werden direkt auf Zellulose synthetisiert und uPA anschließend zugegeben.

„Surface plasmon resonance“ (SPR) repräsentiert eine alternative Methode. Dafür wurden uPA, uPAR oder die inhibierenden Peptide auf CM5-Sensorchips immobilisiert und das spezifische uPA/uPAR-Bindungsverhalten untersucht (Ploug et al., 1998 & 2001, Gårdsvoll et al., 1999; List et al., 1999; Mühlenweg et al. 2000). Der lösliche, rekombinante uPA-Rezeptor konnte direkt auf die Sensorchips gebunden werden, da durch Behandlung von suPAR mit Neuraminidase der isoelektrische Punkt erreicht wurde, der zu Kopplung mittels EDC/NHS auf den Chip erforderlich war (Ploug et al., 1998).

Zellsystem		
Zelllinie	Ligand	Referenz
U937	^{125}I -uPA	Stoppelli et al., 1985, Vassalli et al., 1985 Picone et al., 1989
U937	FITC-uPA	Schmitt et al., 1991, Chucholowski et al., 1992 Magdolen et al., 1996 & 2001 Bürgle et al., 1997, Schmiedeberg et al., 2000 Guthaus et al., 2002
Maus Fibroblasten AA12-3T3	^{125}I -uPA	Del Rosso et al., 1985
Maus Makrophagen; HeLa	^{125}I -uPA; ^{125}I -[Tyr ²²]-uPA	Quax et al., 1998
Nicht-zelluläre Systeme		
Assay		Referenz
Mikrotiter-Platte		Goodson et al., 1994 Rettenberger et al., 1995 Min et al., 1996 De Witte et al., 1998
SDS-PAGE / Autoradiographie		Engelholm et al., 2001
SPOT-Membranen / Western Blots		Liang et al., 2001
BIAcore (Surface Plasmon Resonance)		Ploug et al., 1998 & 2001 Gårdsvoll et al., 1999 List et al., 1999 Mühlenweg et al., 2000
SP-uPA		Guthaus et al., 2002

Tabelle 1: Überblick über etablierte analytische Methoden zur Untersuchung der uPA/uPAR-Interaktion. Dabei wird unterschieden, ob uPAR zellassoziiert vorliegt oder als rekombinante, lösliche Variante (suPAR) eingesetzt wird.

Um die Wirksamkeit linearer und zyklischer, uPA-abgeleiteter Peptide als potentielle Inhibitoren zu bestimmen, wurde in FACS-Versuchen FITC-markiertes uPA an uPAR-exprimierende U937-Zellen gebunden und die konzentrationsabhängige Verdrängung von FITC-uPA durch Bindung der uPA-abgeleiteten Peptide mit einer daraus resultierenden Reduzierung der Fluoreszenzintensität nachgewiesen (Schmitt et al., 1991; Magdolen et al., 1996 & 2001; Bürgle et al., 1997; Schmiedeberg et. al., 2000 & 2002; Guthaus et al., 2002).

1.4.2 Partikel-basierende Analysemethoden zur Bestimmung von Protein/Protein-Interaktionen

Durchflusszytometrie (FACS: „Fluorescence Activated Cell Sorting“) repräsentiert eine weit verbreitete und sehr effiziente analytische Methode. Sie wurde ursprünglich entwickelt, um gleichzeitig physikalische und biochemische Parameter einzelner Zellen (z.B. Tumorzellen, Lymphozyten oder Bakterien) zu messen (O'Connor et al., 2001; Wedemeyer & Potter 2001). Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben (Antikörper, Rezeptoren, Streptavidin, etc.) bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren. Werden Zellen durch Partikel ersetzt, ermöglicht dies interessante Anwendungsmöglichkeiten. Mittels „high throughput“-Durchflusszytometrie können etwa 100.000 Proben pro Tag zu vermessen, was eine Erweiterung des Anwendungsbereichs ermöglicht (Kuckuck et al., 2001).

Müller et al. (1996) entwickelten eine zytometrische Methode, um hochaffine Bindungspartner der SH2-Domäne der Glutathion-S-Transferase mittels „Fluorescence-activated Bead Sorting“ (FABS) nachzuweisen. Dabei wird die rekombinante SH2-Domäne mit einer Peptid-Bibliothek inkubiert ($6,4 \times 10^6$ individuelle Peptide). Die Peptide sind auf Partikeln immobilisiert. Die Anbindung der SH2-Domäne an die immobilisierten Peptide wird durch Zugabe eines spezifischen FITC-markierten Antikörpers nachgewiesen. Stark fluoreszierende Partikel repräsentieren hochaffine Liganden, und können mittels FACS selektiert werden. In einer anderen Anwendung werden auf Partikel unterschiedlicher Fluoreszenzintensität Antikörper gegen verschiedene Zytokine immobilisiert, wobei Partikel bestimmter Fluoreszenz Antikörper gegen ein bestimmtes Zytokin tragen (Carson und Vignali 1999). Der Versuchsaufbau entspricht dem eines ELISA: Antikörper gegen Zytokine auf den Partikeln, Antikörper-gebundene Zytokine, biotinylierter Detektionsantikörper und

ALEXA488-markiertes Streptavidin. Damit können simultan 15 verschiedene Zytokine quantitativ bestimmt werden. Eine weitere Methode basiert auf Nukleinsäure-Hybridisierung. Dabei werden Oligonukleotide als „capture probes“ kovalent mittels der EDC/NHS-Methode auf kleinste Polystyrenkugeln gebunden, um spezifische Sequenzen in DNA-Sequenz-Gemischen zu identifizieren (Spiro et al., 2000). Die Menge an gebundener 5'-fluoreszenzmarkierter cDNA wird mit Durchflusszytometrie bestimmt.

Es existieren weitere Methoden, in denen Partikel zur Protein/Protein-Interaktionsanalyse eingesetzt werden. Der „Bead ARray Counter“ (BARC) nutzt unterschiedliche biologische Wechselwirkungen, wie DNA/DNA-, Antikörper/Antigen- oder Protein/Ligand-Interaktionen, um mikroskopisch kleine Partikel an eine Sensoroberfläche zu binden (Edelstein et al., 2000). Nach Entfernung unspezifisch gebundener Partikel detektiert ein „Giant Magnetoresistive“ (GMR)-Sensor die spezifisch gebundenen Partikel. Die Origen®-Technik ermöglicht die Detektion von Proteinen auf magnetischen Partikeln analog eines ELISA (Abraham et al., 1996; Swanson et al., 1999). Gebundene Proteine werden mit einem Lumineszenz-markierten Antikörper nachgewiesen. Ein Magnet hält die Partikel an einer Elektrode fest. Wird der Magnet gelöst, regt die Elektrode die Lumineszenz-Markierung an, und das emittierte Licht, dessen Intensität von der Menge an gebundenem Antikörper abhängt, wird mit einem Detektor gemessen.

2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser hier vorliegenden Arbeit sollte ein Partikel-basierendes Analytiksystem für Messungen mittels Durchflusszytometrie etabliert werden. Dieses System sollte ermöglichen, Substanzen zu untersuchen, welche die uPA/uPAR-Bindung unterbrechen, deren inhibitorische Kapazität zu bestimmen und damit potentielle Therapeutika schneller zu definieren. In *in vivo*-Studien wurde bereits gezeigt, dass Inhibitoren der uPA/uPAR-Interaktion tumorreduzierende Wirkung besitzen. Ein schnelles, kostengünstiges und einfach handhabbares System zum Test dieser potentiellen Therapeutika ist dabei von besonderer Bedeutung.

Für die Etablierung dieses Systems standen zyklische, uPA-abgeleitete Peptide zur Verfügung, welche bis zum Zeitpunkt der Test und der ersten Veröffentlichung der Ergebnisse (Guthaus et al., 2002) weder getestet noch beschrieben worden sind: cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Nle²⁸Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀, cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Orn²³Thi²⁴Thi²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀, cyclo^{21,29}[D-Cys²¹2-Nal²⁴Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀, und cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Tyr²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀. Diese sollten neben HMW-uPA, ATF und cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ bei der Etablierung und Optimierung des neuen Partikel-basierenden Analytiksystems helfen. Von Interesse waren dabei die Bewertung der inhibitorischen Effizienz der neuen Peptide sowie der Vergleich mit bisher in der Literatur beschriebenen und getesteten Substanzen. Die ermittelten IC₅₀-Werte der Peptide sowie von HMW-uPA und ATF sollten außerdem mit den im U937-Zellsystem ermittelten IC₅₀-Werten verglichen werden.

Für eine langfristige Nutzung des neuen Systems sollte rekombinanter suPAR bereitgestellt werden. Dafür sollten OV-MZ-6#8-Zellen generiert werden, die große Mengen an „His-tagged“ suPAR exprimieren. Die zusätzliche, C-terminale Aminosäuresequenz (6 Aminosäuren Histidin) ermöglicht eine einfache und sehr milde Aufreinigung des Rezeptors mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie.

3. Material und Methoden

3.1 Material und Geräte

3.1.1 *E.coli*-Bakterienstämme und Expressionsvektoren

Der Expressionsvektor pQE-60 wurde von der Firma Qiagen, Hilden bezogen, pRc/CMV2 von der Firma Invitrogen, Karlsruhe. Der Bakterienstamm XL1 blue wurde von der Firma Stratagene, Heidelberg erworben.

3.1.2 Zelllinien

Die humane Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 wurde von Prof. Dr. V. Möbus (vormals Frauenklinik der Universität Mainz, jetzt Städtisches Krankenhaus Frankfurt Hoechst) aus einem fortgeschrittenen (FIGO IV) serösen Zystadenokarzinom einer 70jährigen Patientin etabliert, und uns für Untersuchungen zur Verfügung gestellt (Möbus et al., 1992). Für die Versuche wurde die subklonierte Variante OV-MZ-6#8 eingesetzt (Fischer et al., 1998).

Die humane Leukämiezelllinie U937 wurde 1974 von Sundstrom und Nielsson aus malignen Zellen eines Pleura-Ergusses einer Patientin mit histiozytischem Lymphom gewonnen (Sundstrom & Nielsson 1976). Diese Zelllinie wurde von der Firma American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA kommerziell erworben.

3.1.3 Antikörper für Durchflusszytometrie und Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Zellkulturüberstände, die den mAb HD13.1 gegen humanen uPAR enthalten, wurden freundlicherweise von Dr. M. D. Kramer, LYNX Therapeutics GmbH, Heidelberg zur Verfügung gestellt. Anti-uPA mAb #3689 wurde von American Diagnostica, Pfungstadt bezogen, Cy5-markierter, gegen Maus-Antikörper gerichteter, sekundärer Antikörper aus Kaninchen von Dianova, Hamburg und ALEXA488-markierter, gegen Maus-Antikörper gerichteter, sekundärer Antikörper aus Kaninchen von Molecular Probes, Eugene, USA.

Monoklonaler Antikörper IIF10 gegen uPAR wurde an der Frauenklinik der TU München entwickelt (Magdolen et al., 1995, Luther et al., 1997)

3.1.4 Zyklische, uPA-abgeleitete Peptide

Die uPA-abgeleiteten Peptide $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{28}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{2-Nal}^{24}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Om}^{23}\text{Thi}^{24}\text{Thi}^{25}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Tyr}^{25}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$ wurden nach Standardmethoden (Guthaus et al., 2002) von der Firma Wilex synthetisiert.

3.1.5 Restriktionsendonukleasen

Alle Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs, Frankfurt bezogen.

3.1.6 Verbrauchsmaterial

Alle Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Schubert & Weiss Laborbedarf, München bezogen.

3.1.7 Chemikalien

Alle Chemikalien sind, sofern nicht im Folgenden aufgelistet, in p.a. Qualität von der Firma Merck, Darmstadt und der Firma Sigma, München bezogen worden.

Produktname	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid, 29:1	Roth, Karlsruhe
Agarose	peQLab, Erlangen
APS	Amresco, Solon, USA
ATF	American Diagnostica, Greenwich, USA
Bacto Agar	Difco Laboratories, Michigan, USA
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Michigan, USA
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Michigan, USA
BCA Protein Bestimmungs-Kit	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
BrCN-aktivierte Sepharose	Roche, Mannheim
BSA	ICN Biomedicals, Aurora, USA
Complete EDTA-free	Roche, Mannheim
Desoxyribonukleotide	Roche, Mannheim
ECL Western Blotting Detection Reagent	Amersham Pharmacia, Freiburg
ELISA Kit uPAR # 893	American Diagnostica, Greenwich, USA
FITC-uPA	Wilex AG, München
Expand High Fidelity PCR System Kit	Roche, Mannheim
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, Mannheim
HMW-uPA Actosolv	Marion Roussel, Frankfurt
Pefabloc	Roche, Mannheim
Protein G-Agarose	Roche, Mannheim
Superfect Transfektions Reagenz	Qiagen, Hilden
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
T4-Polynukleotid-Kinase	Roche, Mannheim

3.1.8 Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), RPMI-Medium ohne Phenolrot, FCS, HEPES, L-Glutamin, PBS, Gentamycin und Geniticin (G418-Sulfat) wurden von der Firma Gibco, Karlsruhe, und EDTA von Biochrom, Berlin bezogen.

3.1.9 Geräte

FACSCalibur Sort Cytofluorometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Zeiss, Göttingen / Leica, Solms
Protein-Gelapparatur	Bio-Rad, München
DNA-Gelapparatur	Amersham Pharmacia, Freiburg
„Semi-dry“- Blotkammer	Biometra, Göttingen
Thermocycler	Perkin-Elmer, Langen

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von *E.coli*

E.coli Bakterien lassen sich in Vollmedium (LB-Medium) züchten. Bei 37 °C teilt sich das Bakterium alle 30 min und kann bis zu $3 \cdot 10^9$ Zellen pro mL Medium auf LB-Agarplatten oder in LB-Flüssigmedium unter Schütteln bei 200 rpm angereichert werden. Zur Selektion werden dem Medium Antibiotikum, 100 µg/mL Ampicillin, zugesetzt.

LB-Medium	10 g/L Trypton
	5 g/L Bacto Yeast Extrakt
	10 g/L NaCl
	+ 1,5 % Bacto Agar (nur bei LB Platten)

3.2.2 Herstellung von *E.coli*-Dauerkulturen

Dauerkulturen werden bei -80 °C zur Langzeitlagerung aufbewahrt. Zur Herstellung zentrifugiert man 1,5 mL frische ÜN-Kultur sanft ab (1000 x g, RT, 5 min) und resuspendiert das Pellet vorsichtig in LB Medium mit 15 % Glycerin. Die Dauerkulturen werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.2.3 Plasmidreinigung aus *E.coli*

Rekombinante Plasmid-DNA wird aus *E.coli* nach Birnboim & Doly (1979) aufgereinigt. Dazu werden 3 mL ÜN-Kultur angesetzt. Von dieser ÜN-Kultur werden 1,5 mL 30 sek bei RT und 16.000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wird in 100 µL Lysispuffer resuspendiert um die Bakterienzellen aufzuschließen, und mindestens 30 sek stark gevortext. Anschließend gibt man 200 µL NaOH/SDS-Lösung dazu, welche die chromosomale DNA denaturiert. Es wird sanft gemischt und maximal 5 min bei RT inkubiert, um Schädigung der Plasmid-DNA zu vermeiden. Nach Inkubation werden 150 µL eisgekühlte KAcO-Lösung zugegeben, sofort sanft gemischt und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Die ausgefallene, renaturierte chromosomale DNA wird durch Zentrifugation von 15 min bei 4 °C und 16.000 x g pelletiert. Der Überstand wird abgenommen, mit 400 µL P:C:I-Lösung extrahiert und kurz gevortext. Die Lösung wird für 5 min bei RT und 16.000 x g zentrifugiert, die obere, wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 800 µL kaltes abs. Ethanol zugegeben. Nach Inkubation von 4 min bei RT wird 15 min bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig entfernt, und das Pellet in der SpeedVac getrocknet. Das Pellet wird in 100 µL RNase-Lösung resuspendiert, 3 min bei RT und anschließend 2,5 h bei 37 °C inkubiert. Es wird 300 µL 0,4 M LiCl-Lösung zugegeben und mit 400 µL P:C:I-Lösung extrahiert. Nach kurzem Vortexen wird bei RT 3 min zentrifugiert, anschließend die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es werden 800 µL kalter, abs. Ethanol zugegeben, 5 min auf Eis inkubiert, anschließend 15 min bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in der SpeedVac getrocknet und abschließend in 20 µL H₂O bidest. aufgenommen.

Lysispuffer: 250 mM Tris-HCl pH 8,0
 50 mM Glucose
 10 mM EDTA

NaOH/SDS-Lösung: 0,2 N NaOH
 1 % SDS

KAcO-Lösung: 3 M KAcO pH 4,8

RNase-Lösung	Stammlösung:	1 mg/mL in 50 % Glycerin
	Gebrauchtlösung:	1:10 in TE-Puffer verdünnen
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl	pH 8,0
	1 mM EDTA	

3.2.4 Plasmid-DNA-Minipräparation aus *E.coli* zur DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung wird die Plasmid-DNA mit Hilfe des „High Pure Plasmid Isolation Kits“ gemäß Gebrauchsanweisung des Herstellers aufgereinigt. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt ebenfalls nach Birnboim & Doly (1979). Die Plasmid-DNA bindet spezifisch in Gegenwart eines chaotropen Salzes an eine Glasoberfläche, was zu einem hohen Reinigungsgrad der isolierten DNA führt (Vogelstein & Gillespie 1979).

3.2.5 Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma Medigenomix, Martinsried durchgeführt

3.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei einer PCR wird in kurzer Zeit eine große Anzahl an DNA-Kopien einer spezifischen Sequenz hergestellt. Die dabei verwendete DNA-Polymerase vervielfältigt die durch Denaturierung der Doppelstrang-DNA entstandene Einzelstrang-DNA. Synthetisch hergestellte Primer von 15 - 21 bp garantieren die Sequenzspezifität. Diese werden so konzipiert, dass sie komplementär zur amplifizierenden Sequenz sind. Die „annealing“-Temperatur, bei der sich die Primer an die DNA anlagern, ist abhängig von der Primer-Sequenz, und kann aus deren Zusammensetzung ermittelt werden. Die einzelnen Schritte, Denaturierung, „annealing“ und Elongation (Vervielfältigung der DNA durch die Polymerase), sind Temperatur-gesteuert. Folgendes PCR-Protokoll wurde verwendet, wobei die ersten 10 Zyklen dazu dienen, nicht exakt passende Primer, die zum Einfügen neuer Restriktions-Schnittstellen dienen, anzulagern.

1. Denaturierung	94 °C	5 min
2. Denaturierung	94 °C	30 sek
3. „annealing“	45 °C	45 sek
4. Elongation	72 °C	75 sek
5. 10-fache Wiederholung des Zyklus 2.-4.		
6. Denaturierung	94 °C	30 sek
7. „annealing“	45 - 60 °C	45 sek
8. Elongation	72 °C	75 sek
9. 20-fache Wiederholung des Zyklus 7.-8.		
10.	72 °C	7 min

Die PCR-Ansätze enthalten folgende Komponenten:

- 10 x PCR-Puffer	5 µL
- dNTP-Mix (je 2,5 mM pro dNTP)	5 µL
- Primer 1 (10 pmol/µL)	5 µL
- Primer 2 (10 pmol/µL)	5 µL
- DNA (1-4 µg)	5 µL
- Taq-Polymerase	0,4 µL
- H ₂ O bidest.	24,6 µL

3.2.7 Proteinase K-Verdau

Um die noch im PCR-Ansatz enthaltene Taq-Polymerase zu entfernen, wird ein Proteinase K-Verdau durchgeführt. Nach P:C:I-Extraktion gibt man zu 90 µL PCR-Ansatz 10 µL 10 x Proteinase K-Puffer und 2 µL Proteinase K (5 mg/mL) hinzu, inkubiert 30 min bei 37 °C, 10 min bei 65 °C um die Proteinase K zu inaktivieren und anschließend noch 5 min auf Eis. Das Gemisch wird erneut mit P:C:I extrahiert, mit Ethanol gefällt und das Pellet in der SpeedVac getrocknet.

3.2.10 Restriktionsanalyse

Durch Einsatz speziell entwickelter Primer wurde mittels PCR die zu amplifizierende Sequenz so verändert, dass vor bzw. nach der suPAR-kodierenden Sequenz neue Restriktions-Schnittstellen entstanden sind. Dieses ermöglicht ein schnelles Screening der mutanten Klone mittels Restriktionsanalyse. Restriktionsendonukleasen erkennen und spalten bestimmte Sequenzen doppelsträngiger DNA. Die spezifischen Pufferbedingungen sind vom Anbieter angegeben. Bei Einsatz unterschiedlicher Restriktionsendonukleasen werden die besten Pufferbedingungen für die eingesetzten Enzyme gewählt. Eine Standard Restriktion erfolgt in einem sterilen Reaktionsgefäß mit einem Reaktionsvolumen zwischen 10 µL und 100 µL. Es werden die DNA, 1/10 des Reaktionsvolumens an 10 x Restriktionspuffer, 10 U der jeweiligen Enzyme zusammenpipetiert, mit H₂O bidest. auf das entsprechende Reaktionsvolumen aufgefüllt und anschließend bei 37 °C 1 - 3 Stunden inkubiert. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass das eingesetzte Volumen an Enzymen nicht mehr als 10 % des Gesamtvolumens ausmacht, da z.B. das enthaltene Glycerin die Reaktion stören könnte.

3.2.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch die Ligation werden Vektor-DNA und cDNA miteinander verbunden. Die vorherige Restriktion erzeugt überhängende DNA-Sequenzen, die nur spezifisch miteinander kombinieren. Es werden Vektor-DNA und cDNA in einem Verhältnis von 1:5 - 1:10 eingesetzt. In einem Reaktionsvolumen von 20 µL befinden sich 1/5 des Gesamtvolumens an 5 x Ligationpuffer, 3 µL 10 mM ATP und die entsprechende Menge an DNA. Es wird mit H₂O bidest. auf das Reaktionsvolumen aufgefüllt. Anschließend gibt man 1 U T4-DNA-Ligase dazu, inkubiert 3 Stunden bei 25 °C. Das Ligationsprodukt kann direkt zur Transformation in *E.coli* eingesetzt werden.

Ligationpuffer: 250 mM Tris-HCl pH 7,6
 50 mM MgCl₂
 25 % Polyethylenglykol [8000 g/mol]
 5 mM DTT

3.2.12 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

Kompetente Bakterienzellen sind in der Lage, in Lösung befindliche, fremde DNA nach Transformation leicht aufzunehmen. Dazu wird 1 mL einer ÜN-Bakterienkultur zu 100 mL 2 x TY-Medium gegeben, und bei 37 °C und 200 rpm so lange kultiviert, bis die Bakteriensuspension eine $OD_{550} = 0,5$ erreicht hat. Die Bakterienkultur wird in 25 mL Portionen bei 4 °C und 4.000 x g 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 mL kaltem Tbf I-Puffer resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird in je 1 mL Tbf II-Puffer auf Eis resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schlussendlich bei -80 °C gelagert.

Tbf I-Puffer:	30 mM KAcO/HAcO	pH 5,8
	50 mM MnCl ₂	
	100 mM KCl	
	10 mM CaCl ₂	
	15 % Glycerin	

Tbf II-Puffer:	10 mM Na-MOPS	pH 7,0
	75 mM CaCl ₂	
	10 mM KCl	
	15 % Glycerin	

2 x TY-Medium:	16 g/L Trypton	pH 7,0
	10 g/L Bacto Yeast Extract	
	5 g/L NaCl	

3.2.13 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli*-Zellen

Zur Vervielfältigung der Plasmid-DNA muss diese von der Wirtszelle aufgenommen werden. Bei der Transformation wird die fremde Plasmid-DNA durch Hitzeschock in das Bakterium transferiert. Dazu werden kompetente *E.coli*-Zellen 20 - 30 min auf Eis aufgetaut. 8 µL Ligationsansatz werden mit 42 µL TE-Puffer versetzt, und anschließend 100 µL kompetente Zellen zugegeben und 25 min auf Eis inkubiert. Es erfolgt 1 ¼ min ein Hitzeschock bei 37 °C. Der Transformationsansatz muss dann sofort für 5 min auf Eis gestellt und sanft gemischt werden. Es folgt eine Regenerationsphase für 1 Stunde bei 37 °C. Anschließend wird 1 min bei RT und 1.000 x g zentrifugiert. Nach Zentrifugieren wird der Überstand abgenommen, dass etwa 200 µL verbleiben, das Pellet wird sanft resuspendiert und die Zellen auf LB-Agarplatten ausplattiert.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteingemische im elektrischen Feld aufgetrennt. Durch Zugabe von reduzierenden Reagenzien wie Mercaptoethanol werden Disulfidbindungen gespalten. Mittels SDS werden Proteine stark negativ geladen und nicht-kovalente Wechselwirkungen aufgehoben. Somit werden die Proteine im elektrischen Feld nur nach Größe aufgetrennt. Die von der Aminosäure-Sequenz abhängige Eigenladung der Proteine spielt dabei keine Rolle.

Es werden 1 - 3 µg Protein pro Spur aufgetragen. Das Proteingemisch wird je nach Bedarf unter reduzierenden bzw. nativen, nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Dazu werden die Proben mit 3 x Lämmli-Puffer gemischt. Vor dem Auftragen werden die Proben 10 min bei 37 °C (nativ) oder 3 min bei 95 °C (reduzierend) inkubiert. Das Trenngel wird zwischen die vorbereiteten Platten gegossen, dass etwa 1,5 cm bis zum oberen Rand frei sind. Es wird sofort mit H₂O bidest. überschichtet. Nach Polymerisation wird H₂O bidest. entfernt, das Sammelgel bis zum oberen Rand aufgefüllt und der Kamm eingesetzt. Die Platten mit polymerisiertem Gel werden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Elektrophoresepuffer in die Kammer gefüllt. Es muss dafür gesorgt werden, dass sich in den

3. Material und Methoden

Geltaschen ebenfalls Elektrophoresepuffer befindet. Die vorbereiteten Proben und der Marker werden in die Taschen pipetiert. Es wird eine Spannung von 100 V angelegt bis die Lauffront das Trenngel erreicht hat. Dann wird die Spannung auf 150 V erhöht, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hat. Das Gel wird entnommen und gefärbt.

	nicht reduzierend	reduzierend
SDS	1,5 g	1,5 g
1 M Tris-HCl, pH 6,8	1,5 mL	1,5 mL
Glycerol	4,5 g	4,5 g
Bromphenolblau	1 mg	1 mg
β -Mercaptoethanol	-	600 μ L
H ₂ O bidest.	ad 10 mL	ad 10 mL

Tabelle 2: Zusammensetzung der 3 X Lämmli-Puffer.

	10 %iges Trenngel	5 %iges Sammelgel
H ₂ O bidest.	9,7 mL	11,95 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	5 mL	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	5 mL
10 % SDS	200 μ L	200 μ L
40 % Acrylamid/Bisacrylamid	5 mL	2,5 mL
10 % APS	100 μ L	100 μ L
TEMED	20 μ L	20 μ L

Tabelle 3: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele.

Elektrophoresepuffer: 1,4 g/L Glycerin
 3 g/L Tris
 1 g/L SDS

3.3.2 Gelfärbemethoden

Silberfärbung

Nach der Elektrophorese wird das Gel in Fixierlösung 20 min oder auch ÜN inkubiert. Es wird dreimal für 5 min gewaschen, und das Gel 5 min in „Farmer’s Reducer“-Lösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 20 min mit H₂O bidest. folgt eine Inkubation von 30 min in 0,1 % Silbernitratlösung. Anschließend wird das Gel 2 min mit H₂O bidest. gewaschen, dann in Entwickler-Lösung geschwenkt, bis die Proteinbanden sichtbar werden. Die Reaktion wird durch Zugabe 10 %iger Essigsäure gestoppt.

Fixierlösung: EtOH:H₂O bidest.:AcOH (5:5:1)

Farmer’s Reducer: 16 g Na₂S₂O₃
10 g K₃(Fe(CN)₆)
Gemisch im Mörser verreiben und in leerer Filmdose lagern.

Entwickler-Lösung: 100 µL 37 % Formaldehydlösung pro 100 mL 2,5 % Na₂CO₃-Lösung zugeben

Coomassiefärbung

Nach der Elektrophorese wird das Gel in Fixierlösung inkubiert, anschließend in Coomassie-Lösung für 1 Stunde bei RT inkubiert. Das Gel wird kurz mit H₂O bidest. und anschließend mit 10 %iger Essigsäure so lange gewaschen, bis der Hintergrund farblos und die Proteinbanden deutlich erkennbar sind.

Coomassie-Lösung: 0,1 % Coomassie Brilliant Blue in 10 %iger AcOH

3.3.3 Western Blot

Die PVDF-Membran und die Whatman-Filterpapiere werden auf die erforderliche Größe zugeschnitten. Die Membran wird in Methanol inkubiert, die Filterpapiere, die unter der Membran liegen sollen, inkubiert man in 20 % Methanol, die oberen in 5 % Methanol. Danach legt man zwischen die Elektroden der Blotapparatur zuerst die unteren Filterpapiere, dann die Membran, darauf – möglichst frei von Luftblasen - das Gel, und oben drauf die oberen Filterpapiere. Es wird bei einer Stromstärke von 5 mA pro 1 cm² Membran für etwa 3 Stunden geblottet. Die Membran wird nach dem Blot in 1 x NET-Gelatine ÜN bei 4 °C gelagert. Es wird dreimal für 10 min mit 1 x NET-Gelatine gewaschen. Der erste Antikörper, der das Protein spezifisch erkennt, wird in einer Verdünnung von 0,5 - 5 µg/mL in 1 x NET-Gelatine für 1 Stunde mit der Membran inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x NET-Gelatine inkubiert man die Membran für 1 Stunde mit einem Peroxidase-markiertem Sekundäntikörper, der den Primäntikörper spezifisch erkennt. Es folgt abschließend dreimaliges Waschen für 10 min mit 1 x NET-Gelatine. Die Membranen werden zur Entwicklung mit „ECL Western Blotting Detection Reagent“ nach Angaben des Herstellers inkubiert.

10 x NET: 1,5 M NaCl
 0,05 M EDTA (pH 8,0)
 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5)
 0,5 % Triton X-100

1 x NET-Gelatine: 2,5 g Gelatine in 100 mL H₂O bidest. kochen, auf 900 mL auffüllen, 100 mL 10 x NET zugeben

5 % Methanol-Lösung: 50 mM Borsäure pH 9,0
 5 % Methanol

20 % Methanol-Lösung: 50 mM Borsäure pH 9,0
 20 % Methanol

3.3.4 Quantifizierung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte in einer 96-well-Mikrotiter-Platte mittels eines kommerziell erhältlichen BCA-Tests nach Angaben des Herstellers. Die BSA-Standards werden in Konzentrationen von 25 bis 2000 µg/mL eingesetzt. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei 37 °C wird die Platte bei 560 nm im ELISA-Reader gemessen.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Zellkultur

OV-MZ-6#8-Zellen werden in „Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium“ (DMEM) kultiviert. Für das Komplettmedium werden 10 % Fötale Kälberserum (FCS), 10 mM HEPES, 1 mL Arg/Asp-Lösung und 20 µg/mL Gentamycin zu 500 mL DMEM gegeben. Als Selektionsmedium wird dem Komplettmedium 10 mg/mL G418-Anitbiotikum zugegeben. Die Zellen werden bei ca. 80 % Konfluenz mit PBS / 5 % EDTA abgelöst und nach Waschen mit PBS in eine neue Zellkulturflasche transferiert.

U937-Zellen werden in RPMI-Medium kultiviert, welches 10 % FCS, 10 mM HEPES und 2 mM L-Glutamin enthält. Die Suspensionszellen werden gesplittet, in dem man 1 mL der Suspensionskultur in eine Zellkulturflasche mit 30 mL Medium gibt.

Für die FACS-Versuche werden die U937-Zellen durch Stimulation mit Phorbol ester (PMA) zu einer 10-fach erhöhten Expression von uPAR auf der Zelloberfläche angeregt, wodurch diese dann adhären werden. 10^7 U937 Zellen werden in 110 mL RPMI-Medium ausgesät und mit 1 mM PMA für 72 h bei 37 °C inkubiert. Zum Ablösen der adhären Zellen werden nach Waschen der Zellen mit 5 mL PBS, um tote Zellen zu entfernen, die Zellen für 5 bis maximal 15 min mit 3 mL PBS / 1 % EDTA inkubiert. Die Zellen werden vom Flaschenboden abgeklopft, zweimal mit 5 mL PBS gewaschen und jeweils anschließend bei 10 °C 10 min sanft zentrifugiert (1500 rpm). Um zelleigenes, uPAR-gebundenes uPA von den Zellen zu entfernen, werden diese für 1 min mit 20 mL 50 mM Glycin / 0,1 M NaCl, pH 3,0 inkubiert und anschließend mit 20 mL 0,5 M HEPES / 0,1 M NaCl, pH 7,5 für 1 min neutralisiert. Nach 10 min Zentrifugation werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in

PBS / 1 % BSA aufgenommen, mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und eine Zellsuspension von 10^6 Zellen/mL in PBS / 1 % BSA hergestellt. Pro FACS-Röhrchen werden 250.000 Zellen mit entsprechender Menge FITC-uPA und unterschiedlichen Mengen an HMW-uPA, ATF und den zyklischen, uPA-abgeleiteten Peptiden inkubiert.

3.4.2 Transfektionen

Für die stabile Transfektion von OV-MZ-6#8-Zellen werden in eine „Six-well“-Platte je 200.000 OV-MZ-6#8-Zellen je „well“ ausgesät und 1 mL Komplettmedium zugegeben. Bei einer Konfluenz von 70 % werden die Zellen transfiziert. Dazu werden je „well“ 2 Transfektionsröhrchen mit 100 μ L „Growth Arrest Medium“ (GAM, Komplettmedium ohne FCS) benötigt. Zum ersten Röhrchen werden 10 μ L 3 mg/mL Superfect und zum zweiten Röhrchen 2 μ g DNA bzw. bei den Zellen zur Kontrolle erfolgreicher Transfektion keine DNA zugegeben. Der Inhalt beider Röhrchen wird vereinigt und anschließend 10 min inkubiert. Währenddessen werden die Zellen gewaschen, und je „well“ 300 μ L GAM zugegeben. Die 200 μ L Medium in den Transfektionsröhrchen werden zu den Zellen pipetiert. Man lässt die Platte 3 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubieren. Abschließend wird das Superfect- und DNA-haltige Medium abgesaugt und 1 mL Komplettmedium zugegeben.

Die Zellen werden bei etwa 90 - 100 % Konfluenz von der „Six-well“-Platte in 10 cm-Petrischalen gesplittet, in diesen bis zu einer Konfluenz von 70 % mit Komplettmedium kultiviert und dann mit G418-haltigem Medium selektiert, bis die nicht-transfizierten Kontrollzellen vollständig abgestorben sind. Die hochgewachsenen, einzelnen Klone werden subkultiviert, und deren uPAR-Antigen-Gehalt mittels uPAR-ELISA quantitativ und mit Western-Blot qualitativ nachgewiesen.

3.5 Reinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie

3.5.1 Reinigung von löslichem uPAR (suPAR)

Für die Reinigung von suPAR-Zellkulturüberständen nutzt man die hochaffine uPA/uPAR-Bindung. HMW-uPA wird nach Angaben der Hersteller mit Pefabloc inaktiviert und anschließend an BrCN-aktivierte Sepharose gebunden. Die Säule wird gründlich mit Waschpuffer gewaschen und die suPAR-Zellkulturüberstände auf Eis unter Zirkulation (Flussrate: 1mL/min) ÜN über die Säule laufen gelassen. Die Säule wird anschließend unter Kontrolle der OD₂₈₀ wieder gründlich mit Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgt ebenfalls unter simultaner Kontrolle der OD₂₈₀, wobei jede einzelne 1,5 mL-Elutionsfraktion gegen den Elutionspuffer im Photometer gemessen wird. Zum einen lässt sich somit feststellen, wann die Elution beendet ist, zum anderen können ähnlich konzentrierte Fraktionen anschließend vereinigt werden. Abschließend wird die Säule mit Waschpuffer gründlich gereinigt. Die vereinigten Fraktionen werden ÜN bei 4 °C gegen 1 x PBS dialysiert (Schläuche: MW 3.000), und anschließend die Konzentration mittels Proteinbestimmung und uPAR-ELISA bestimmt.

Waschpuffer: 0,1 M Tris-HCl pH 8
 0,5 M NaCl

Elutionspuffer:
 50 mM AcOH

Mittels SDS-PAGE (Abb. 5) der einzelnen Fraktionen konnte abgeschätzt werden, welche Fraktionen ähnliche Mengen an suPAR-Protein enthalten. Fraktionen geringeren suPAR-Gehalts wurden vereinigt. Es wurde gegen 1 x PBS dialysiert und Konzentration von suPAR mittels „Immunobind Total uPAR ELISA Kit“ bestimmt (Tab. 4).

suPAR-Fraktion	uPAR-Antigengehalt [$\mu\text{g/mL}$]
#6	80
#7	239
#8+9	104
#10+11	19
#12-14	14

Tabelle 4: Bestimmung der suPAR-Konzentrationen der Fraktionen nach Reinigung mittels uPA-Affinitätschromatographie und Dialyse gegen 1 x PBS. Es wurden Doppelwerte bestimmt, und die Mittelwerte ermittelt.



Abbildung 5: SDS-PAGE (Silberfärbung) der suPAR-Fractionen: Mittels uPA-Affinitätschromatographie wurden die Zellkulturüberstände gereinigt. Fraktionen mit geringerem suPAR-Gehalt wurden vereinigt.

3.5.2 Reinigung von HD13.1

Der HD13.1-Zellkulturüberstand wird mittels Affinitätschromatographie mit Protein G-Agarose nach Angaben des Herstellers unter Zirkulation (Flussrate: 1 mL/min) gereinigt. Die Zellkulturüberstände werden dabei ÜN auf Eis über die Säule laufen gelassen. Die Elution erfolgt simultan unter Messung der OD₂₈₀ der einzelnen 1 mL-Fractionen. Es erfolgt eine Dialyse ÜN bei 4 °C gegen 1 x PBS. Einzelne Fraktionen werden vereinigt und deren Konzentrationen durch Proteinbestimmung ermittelt (Tab 5).

3. Material und Methoden

Nach nativer SDS-PAGE (Abb. 6) konnte grob abgeschätzt werden, welche Fraktionen ähnliche Mengen an Protein enthalten. Folgende Fraktionen wurde vereinigt: #3-5, #6+7, #8+9, #10+11, #2+12-14. .

HD13.1-Fraktion	Proteinkonzentration [$\mu\text{g/mL}$]
#3-5	217
#6+7,	1591
#8+9	750
#10+11	256
#2+12-14	40

Tabelle 5: Konzentrationen der gereinigten und vereinigten Fraktionen von HD13.1.

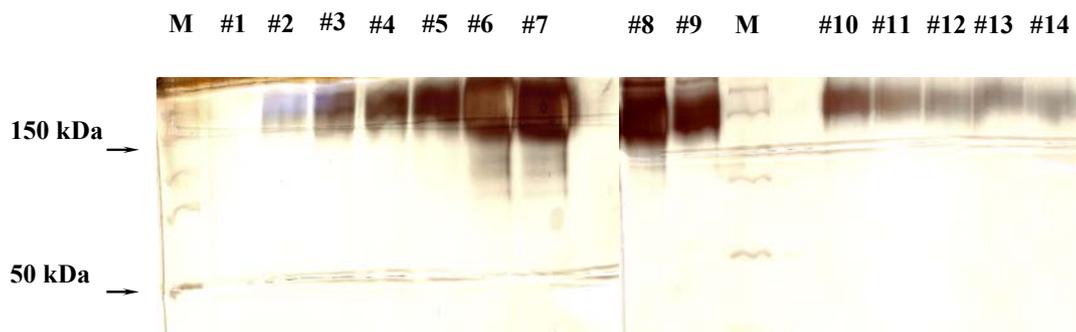


Abbildung 6: SDS-PAGE (Silberfärbung) der HD13.1-Fractionen: Mittels Chromatographie über Protein G-Agarose wurden die Zellkulturüberstände gereinigt. Fraktionen mit geringerem, ähnlichen HD13.1-Gehalt wurden vereinigt.

4. Ergebnisse

4.1 Bestimmung der inhibitorischen Kapazität uPA-abgeleiteter Peptide mittels Durchflusszytometrie

Das Plasminogenaktivator-System mit seinen Komponenten uPA, uPAR, PAI-1 und PAI-2 spielt im Tumorgeschehen eine bedeutende Rolle. Die Entwicklung potentieller Therapeutika basierend auf deren inhibierende Wirkung ist ein Bestandteil der Erforschung des Plasminogenaktivator-Systems. In *in vivo*-Studien konnte bereits gezeigt werden, dass uPA-abgeleitete Peptide einen inhibierenden Effekt auf das Tumorwachstum haben (Magdolen et al. 2001; Sperl et al., 2001; Sato et al. 2002).

4.1.1 uPA-abgeleitete Peptide

Der inhibitorische Effekt folgender uPA-abgeleiteter Peptide auf die uPA/uPAR-Interaktion sollte bestimmt werden: $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{28}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{2-Nal}^{24}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Orn}^{23}\text{Thi}^{24}\text{Thi}^{25}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Tyr}^{25}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$.

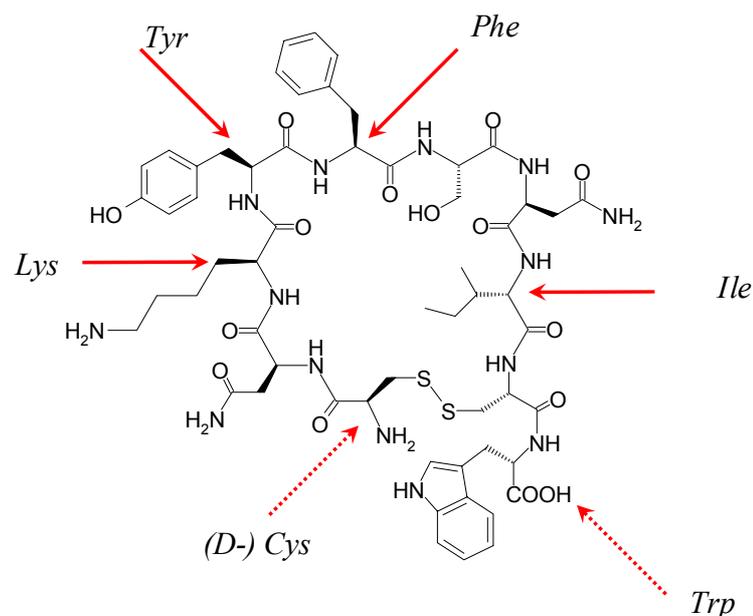


Abbildung 7: Struktur von $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$. Mittels roter Pfeile wurden die Aminosäuren in diesem uPA-abgeleiteten Peptids gekennzeichnet, die als relevant für die Bindung von uPA an uPAR ermittelt wurden (Magdolen et al., 1996).

Dadurch sollten erste Hinweise auf späteren möglichen Einsatz als tumorreduzierende Substanzen bzw. als Leitstruktur zur Entwicklung neuer, nicht-peptidischer Therapeutika erhalten werden. Ausgehend von $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$ (Schmiedeberg et al., 2002), wurden die Peptide durch Ersetzen der für die Bindung an uPAR wichtigen Aminosäuren durch nicht-proteinogene Aminosäuren (Abb. 7) entwickelt und synthetisiert (Guthaus et al., 2002). In Abbildung 7 sind dabei die Aminosäuren des Peptids mit roten Pfeilen markiert, die im uPA-Molekül für die Anbindung an uPAR essentiell sind (Magdolen et al., 1996; Schmiedeberg et al., 2002).

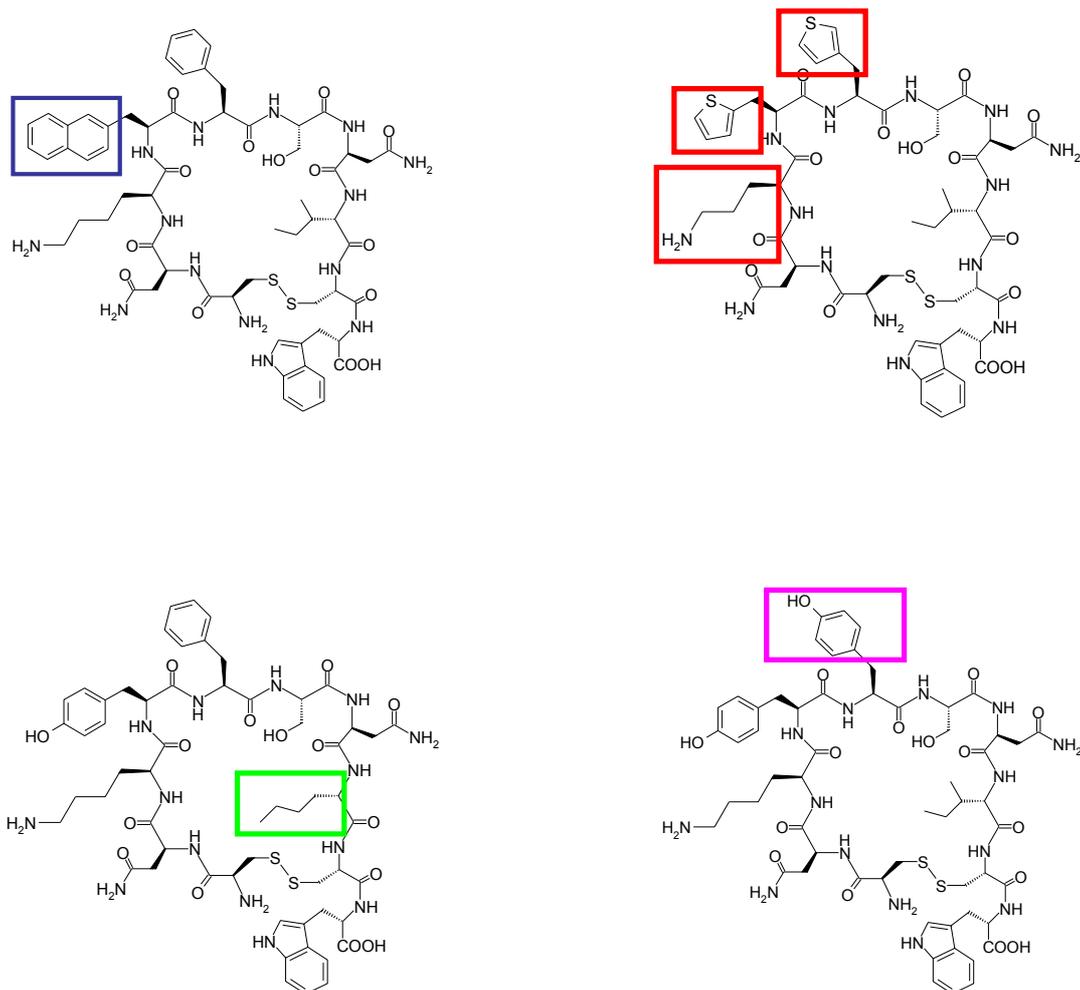


Abbildung 8: Struktur der getesteten, uPA-abgeleiteten Peptide $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{28}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$ (**grün**), $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Om}^{23}\text{Thi}^{24}\text{Thi}^{25}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$ (**rot**), $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}2\text{-Nal}^{24}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$ (**blau**), $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Tyr}^{25}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$ (**magenta**). Die ersetzten veränderten Seitenketten sind farblich hervorgehoben.

Dabei wurde grafisch unterschieden, welche Aminosäuren durch nicht-proteinogene Aminosäuren bzw. Tyrosin ersetzt wurden, um die vier Peptide $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₀, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{28}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₀, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}2\text{-Nal}^{24}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₀, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Orn}^{23}\text{Thi}^{24}\text{Thi}^{25}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₀, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Tyr}^{25}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₀ zu synthetisieren (roter, durchgezogener Pfeil) und welche nicht ersetzt wurden (roter, gestrichelter Pfeil). So wurde für $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}2\text{-Nal}^{24}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₀ die aromatische Aminosäure Tyr24 durch die ebenfalls aromatische Aminosäure 2-Naphthylalanin ersetzt. Bei $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Orn}^{23}\text{Thi}^{24}\text{Thi}^{25}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₀ wurden die beiden aromatischen Aminosäuren Tyr24 und Phe25 durch Thienylalanin ersetzt, sowie Lys23 durch Ornithin, dessen Seitenkette ebenfalls eine endständige NH₂-Gruppe besitzt und um eine CH₂-Gruppe verkürzt ist. Beim Ersetzen von Ile28 durch Norleucin ($\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{28}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₀) änderte sich bei gleich bleibendem Molekulargewicht nur die Primärstruktur der Seitenkette. Für $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Tyr}^{25}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₀ wurde Phe25 durch die proteinogene Aminosäure Tyrosin ersetzt (Abb. 8). Ersetzen dieser proteinogenen Aminosäuren durch nicht-proteinogene Aminosäuren bzw. durch Tyrosin mit strukturell und funktionell ähnlichen Seitenketten sollte möglichst eine erhöhte proteolytische Stabilität der Peptide bei gleich bleibender inhibitorischer Kapazität aufweisen. Diese Peptide dienen dann als mögliche Leitstruktur beim Ersetzen des Peptidrückgrats durch nicht-peptidische Strukturen.

4.1.2 Bestimmung des inhibitorischen Potentials uPA-abgeleiteter Peptide durch FACS-Analyse mit U937-Zellen

Die Peptide $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₀, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}2\text{-Nal}^{24}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₀, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{28}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₀, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Orn}^{23}\text{Thi}^{24}\text{Thi}^{25}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₀, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Tyr}^{25}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₀ sowie HMW-uPA und ATF wurden im U937 Zellsystem getestet, welches bereits schon vorher verwendet wurde, um den kompetitiven Effekt uPA-abgeleiteter Peptide oder anderer potentieller Inhibitoren der uPA/uPAR-Interaktion zu untersuchen (Schmiedeberg et al., 2000 & 2002; Magdolen et al., 2001; Guthaus et. al., 2002).

Durch Stimulation mit PMA wurde eine Überexpression von uPAR auf der Zelloberfläche induziert. Die Zugabe von FITC-markiertem HMW-uPA, welches an zellassozierten uPAR bindet, zu jeweils 250.000 U937-Zellen zeigte mittels Durchflusszytometrie eine

konzentrationsabhängige Steigerung der Fluoreszenzintensität festgestellt werden. Der Anstieg der Fluoreszenz ist insgesamt nicht linear, da durch Sättigung der Bindestellen der Rezeptormoleküle auf den Zellen durch FITC-uPA eine maximale Fluoreszenz erreicht wird. Die grafische Darstellung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Menge an zugegebenen FITC-uPA ergibt eine Sättigungskurve, die einen linearen Anstieg hat und dann in ein Plateau übergeht (Abb. 9).

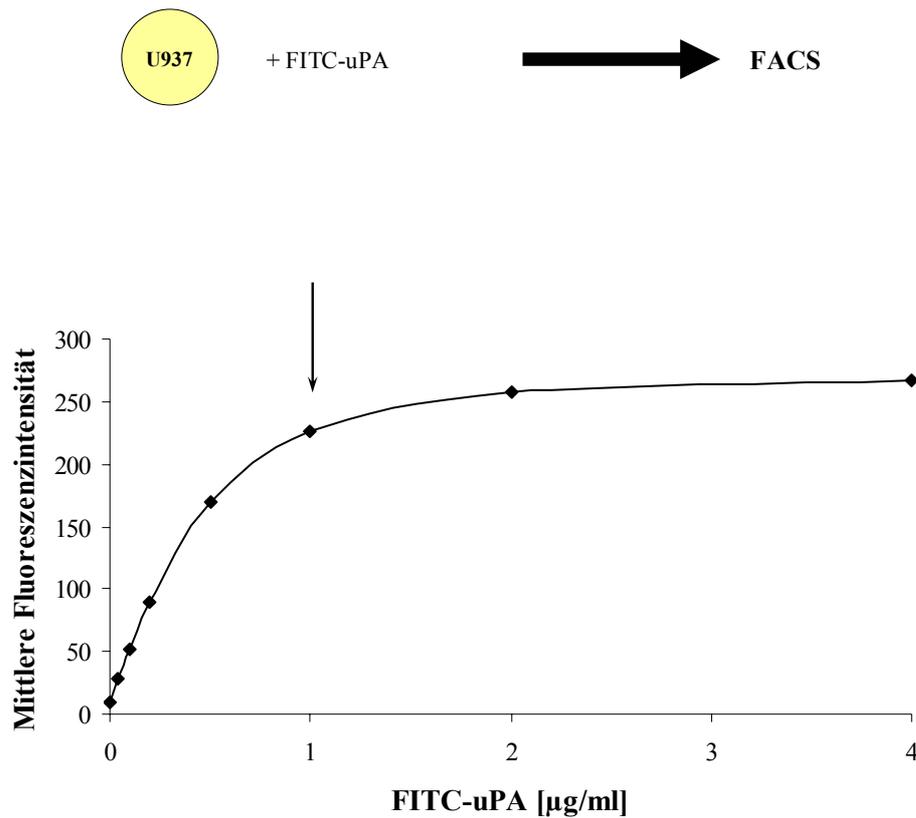


Abbildung 9: Mittlere Fluoreszenzintensität der U937 Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration an zugegebenem FITC-uPA. Es wird die optimale Menge an FITC-uPA ermittelt, die für weitere Versuche unter gleichen Bedingungen eingesetzt wird (Pfeil).

Daraus ließ sich grafisch die optimale Konzentration von FITC-uPA ermitteln, d. h. die minimal nötige Menge an Protein, aus der die höchstmögliche Fluoreszenz resultiert. Diese entspricht der Menge FITC-uPA am Scheitelpunkt der Kurve. Die Konzentration von 1 µg/mL wurde in den nachfolgenden Versuchen unter gleichen Bedingungen eingesetzt.

Zur Bestimmung des inhibitorischen Potentials wurden die uPA-abgeleiteten Peptide dreimal in unterschiedlichen Versuchen getestet. HMW-uPA und ATF wurden ebenfalls getestet, um die Werte der Peptide direkt zu vergleichen. Der inhibierende Effekt dieser Substanzen beruht auf deren Fähigkeit mit FITC-uPA um die Bindung an uPAR zu konkurrieren und, eingesetzt im Überschuss, die Bindung von FITC-uPA zu verhindern. Die gemessenen Fluoreszenzwerte jeder Probe gleicher Konzentration desselben Peptids bzw. Proteins wurden gemittelt. Die maximale Fluoreszenz (ohne Inhibition) abzüglich des Hintergrunds (Eigenfluoreszenz der Zellen) wurde 100 % gesetzt. Von den Werten für die einzelnen Peptide bzw. Proteine wurde ebenfalls der Hintergrund abgezogen, und diese Werte in prozentuale Relation zur Maximalfluoreszenz gesetzt. Die Auswertung erfolgte grafisch (Abb. 10). Zur Bestimmung der inhibitorischen Kapazität der Substanzen wurde der IC₅₀-Wert bestimmt, welcher genau der Konzentration an Inhibitor entspricht, die notwendig ist, die Fluoreszenzintensität auf 50 % ihres Maximums zu reduzieren. Erwartungsgemäß zeigten HMW-uPA und ATF annähernd identisches Inhibierungsverhalten. Die ermittelten IC₅₀-Werte von 5 nM für ATF und 10 nM für HMW-uPA liegen im Bereich bereits früher publizierter Werte (Magdolen et al., 2001). Cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ und cyclo^{21,29}[D-Cys²¹2-Nal²⁴Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀, haben nicht nur sehr ähnliche IC₅₀-Werte von 150 nM bzw. 130 nM, sondern auch einen fast identischen Verlauf der Inhibitionskurve. Cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Nle²⁸Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ inhibiert etwas schlechter als die anderen beiden Peptide, was im etwas schlechteren Verlauf der Kurve sichtbar ist. Der IC₅₀-Werte von 200 nM liegt allerdings im selben nanomolaren Bereich. Innerhalb der eingesetzten Konzentrationen (max. 4 µM) führte die Inkubation mit cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Orn²³Thi²⁴Thi²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ zu einer Reduktion der Fluoreszenzintensität, allerdings nicht auf 50 % des Maximalwertes. Cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Tyr²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ zeigte keinen inhibierenden Effekt.

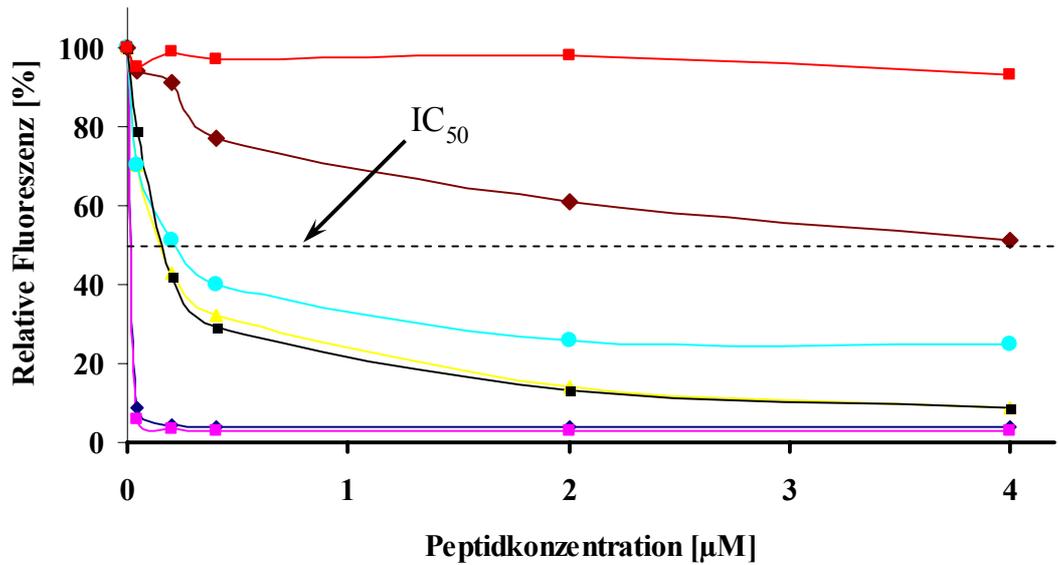


Abbildung 10: Effekt der uPA-abgeleiteten Peptide bzw. HMW-uPA und ATF auf die Bindung von FITC-uPA an uPAR-exprimierende U937-Zellen. HMW-uPA (blau) und ATF (magenta) zeigten erwartungsgemäß den besten inhibierenden Effekt. Cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (gelb), cyclo^{21,29}[D-Cys²¹2-Nal²⁴Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (schwarz) und cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Nle²⁸Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (türkis) besitzen ähnliches inhibitorisches Potential. Cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Orn²³Thi²⁴Thi²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (braun) zeigt inhibierenden Effekt, aber ein IC₅₀-Wert konnte innerhalb der eingesetzten Konzentrationen nicht ermittelt werden. Cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Tyr²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ ist ohne inhibierende Wirkung.

4.2 uPA-Silica-Partikel (SP-uPA) zur Untersuchung von uPAR-Antagonisten

Das Hauptziel dieser Arbeit war, ein Analytiksystem zu entwickeln, um Antagonisten der uPA/uPAR-Interaktion im Allgemeinen und die zur Verfügung stehenden uPA-abgeleiteten Peptide im Speziellen schnell und effektiv zu testen. Dafür wurde ein Partikelsystem gewählt und sich am seit langem etablierten U937-Zellsystem orientiert, da damit ein direkter Vergleich dieses Systems mit dem neu entwickelten Partikelsystem möglich wurde. Für die Etablierung des Partikelsystems wurden Silica-Partikel der Firma Micromod Partikeltechnologie GmbH/Rostock-Warnemünde eingesetzt. Sie besitzen einen Durchmesser von 10 µm und auf der Partikeloberfläche aktivierbare COOH- Gruppen. Dem Einsatz von Partikeln aus Glas ging die Überlegung voraus, mögliche unspezifische Bindung von eingesetzten Proteinen bzw. Peptiden an z. B. Polystyrenpartikel von vornherein zu vermeiden. Die höhere Dichte von Glas im Vergleich zu Polystyren ermöglichte durch schnellere Sedimentation leichteres Waschen und Zentrifugieren.

4.2.1 Kopplung von HMW-uPA an Silica-Partikel

HMW-uPA („Actosolv“, Fa. Marion Roussel, Frankfurt) wurde zur Vorbereitung der anschließenden Kopplung in 1 x PBS gelöst und ÜN bei 4 °C gegen 0,1 M MES-Puffer dialysiert, um gelöste Salze zu entfernen. Anschließend wurde die Konzentration der Lösung bestimmt. Zur Kopplung von uPA auf die Partikel mussten die COOH-Gruppen auf der Partikeloberfläche aktiviert werden, damit uPA über seine freien NH₂-Gruppen an die Partikel binden kann. Zur Aktivierung wurden bei RT zu 1 mL einer Partikelsuspension (25 mg/mL) in 0,5 M MES-Puffer für jeweils 20 min nacheinander 200 µL 50 mM EDC und 100 mM NHS in 0,5 M MES-Puffer zugegeben. Es wurde dann zweimal mit 1 mL 0,1 M MES-Puffer gewaschen, und bei 4 °C und 1000 x g sanft zentrifugiert. Die Partikel wurden in 500 µL 0,1 M MES-Puffer suspendiert und 1 mL 200 µg/mL uPA in 0,1 M MES-Puffer zugegeben. Unter sanftem Schwenken sind die Partikel 2 h bei RT inkubiert worden. Zur Herstellung der Kontrollpartikel wurde alternativ 1 mL 200 µg/mL BSA in 0,1 M MES-Puffer zugegeben und ebenfalls 2h inkubiert. Es wurde erneut zweimal mit 1 mL 0,1 mL MES-Puffer gewaschen. Freie COOH-Bindungsstellen wurden durch Zugabe von 1 mL 0,5 mM Ethanolamin 10 min bei RT blockiert. Die Partikel wurden zweimal mit 1 mL PBS gewaschen und anschließend in

1 mL PBS aufgenommen. Das entsprach nach Angaben des Herstellers einer Partikelmenge von $2,5 \times 10^7$ /mL.

4.2.2 Qualitative Kontrolle der Kopplung

Die Partikel (SP-uPA) wurden neben BSA-gebundenen Kontrollpartikeln (SP-BSA) und ungekoppelten Partikeln (SP-COOH) unter Zugabe des Antikörpers #3689 gegen uPA mittels Durchflusszytometrie getestet, um nachzuweisen, dass uPA auf der Partikeloberfläche gebunden wurde. Dazu wurden die Partikel in einer Konzentration von 10^6 /mL mit $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ #3689 in PBS/1 % BSA für 20 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden bei RT und $1000 \times g$ zentrifugiert und anschließend mit PBS/1 % BSA gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Danach wurde Fluoreszenz-markierter (cy5)-Sekundärantikörper (pAb aus Kaninchen, gegen Antikörper aus Maus gerichtet) in einer Konzentration von $80 \text{ ng}/\text{mL}$ zugegeben und ebenfalls für 20 min bei RT inkubiert. Auf einen anschließenden Waschschrift wurde verzichtet, da nur Zell- oder Partikel-gebundener Fluoreszenzfarbstoff mittels Durchflusszytometrie detektiert wird. Anschließend wurden die Proben im Durchflusszytometer vermessen, das mit einem roten Dioden-Laser ausgestattet ist, der den Fluoreszenzfarbstoff mit einer Wellenlänge von 635 nm anregt. Von jeder einzelnen Probe wurden 20.000 Partikel im Durchflusszytometer gemessen.

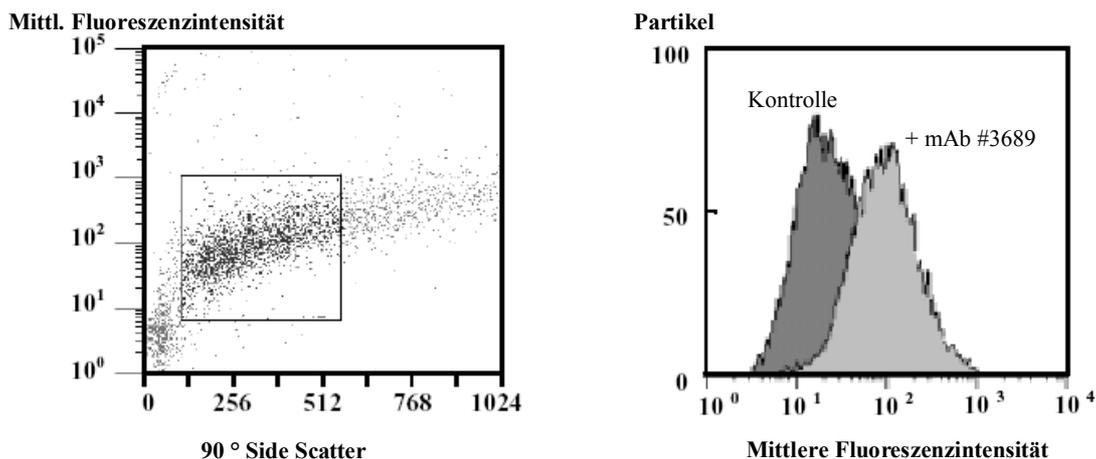


Abbildung 11: Qualitative Kontrolle von SP-uPA mittels Durchflusszytometrie durch Inkubation mit mAb #3689 gegen uPA. Im Dot Plot 90° Side Scatter vs. Mittlerer Fluoreszenzintensität wurden die Partikel eingegrenzt, und die Fluoreszenz dieser „gated“ Partikel im Histogramm im Vergleich zu ungekoppelten Partikeln (SP-COOH) dargestellt.

Bei der Auswertung des FACS-Versuchs wurden die Partikel im Dot Blot (90° Side Scatter gegen Mittlere Fluoreszenzintensität) dargestellt (Abb. 11). Dabei wurde die Verteilung der Partikel anhand der Parameter Fluoreszenzintensität und Oberflächenbeschaffenheit sichtbar. Der Bereich mit der höchsten Partikeldichte und damit der größte Teil der Partikel wurde eingegrenzt („gated“), und diese Partikel im Histogramm dargestellt. Beim Vergleich von SP-uPA zu den Kontrollpartikeln war eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität erkennbar. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Partikel kovalent gebundenes uPA auf der Oberfläche tragen.

Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurden mehrere Kontrollen parallel vermessen. So wurden nicht nur die Kontrollpartikel mit sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper inkubiert. Es wurden zusätzlich zur Kontrolle alle Partikel (SP-uPA, SP-BSA und SP-COOH) ohne Antikörper bzw. nur mit cy5-markiertem Sekundärantikörper inkubiert. Die Auswertung der einzelnen Proben erfolgte grafisch (Abb. 12). Dabei zeigte sich, dass nur SP-uPA mit mAb #3689 und cy5-markiertem Antikörper inkubiert eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität aufwies. Alle Kontrollen zeigten deutlich niedrigere Fluoreszenzintensität.

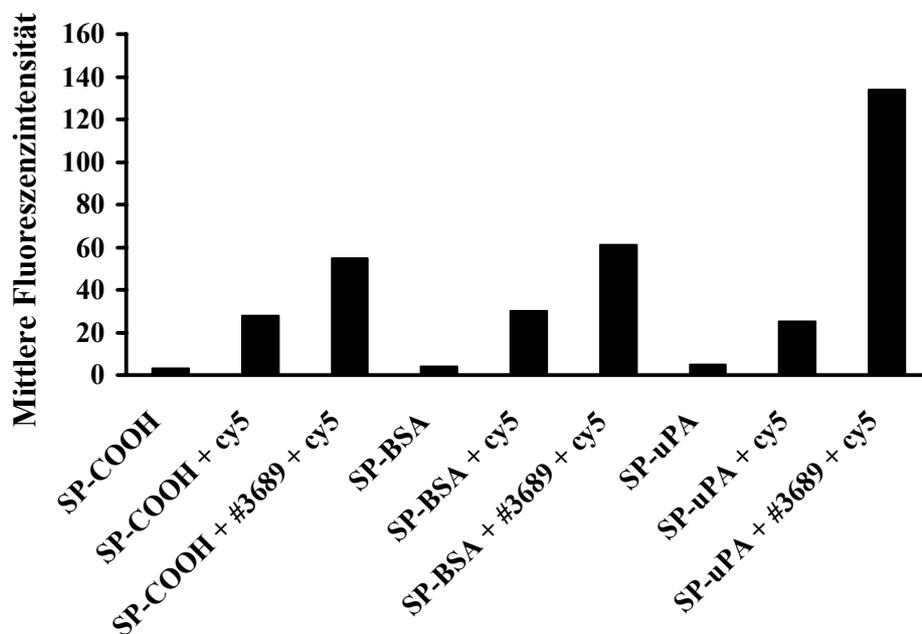


Abbildung 12: Auswertung eines repräsentativen Vorversuchs. SP-COOH, SP-BSA und SP-uPA werden unter gleichen Bedingungen mit mAb #3689 und/oder cy5-markiertem Sekundärantikörper inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Partikel nicht mit mAb #3689 und cy5-markierter Sekundärantikörper inkubiert.

4.2.3 Funktionelle Kontrolle der Kopplung

Der funktionelle Nachweis von SP-uPA wurde durch Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) erbracht. SP-uPA wurden mit suPAR, mAb HD13.1 als ersten Antikörper und ALEXA488-markiertem Sekundärantikörper nacheinander inkubiert. Hierbei dienten ebenfalls ungekoppelte Partikel (SP-COOH) und BSA-Partikel (SP-BSA) als Kontrollen. Es konnte visuell nachgewiesen werden, dass SP-uPA in der Lage sind, suPAR zu binden.

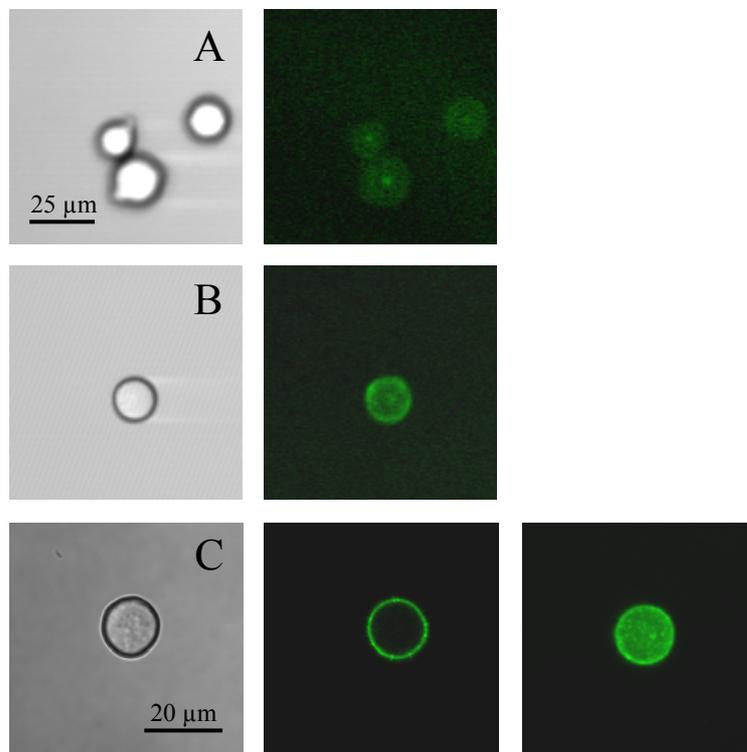


Abbildung 13: Nachweis der Bindung von suPAR an SP-uPA durch Konfokale Laser Scanning Mikroskopie. Transmissions- und Fluoreszenzbild der SP-BSA Kontrollpartikel (A) und SP-uPA (B). Inkubation der jeweiligen Partikel mit suPAR, mAb HD13.1 gegen uPA Rezeptor und ALEXA488-markiertem sekundären Antikörper. (C) Transmissionsbild von SP-uPA, Fluoreszenzbild vom Querschnitt des Partikels, Fluoreszenzbild im „Extended Focus“ bei gleich bleibenden Inkubationsbedingungen.

Dazu wurden die Partikel in einer Konzentration von $10^6/\text{mL}$ für 20 min bei RT mit $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ suPAR in PBS/1 % BSA inkubiert. Es erfolgte Waschen mit PBS/1 % BSA und anschließend Zentrifugation. Dann folgte Inkubation für 20 min bei RT mit $1,6 \mu\text{g}/\text{mL}$ mAb HD13.1, an die sich erneut ein Waschschriff mit PBS/1 % BSA anschloss. Abschließend wurden die Partikel mit $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ Fluoreszenz (ALEXA488)-markiertem Zweitantikörper für 20 min bei RT inkubiert. Diese Partikelsuspension wurde auf einen Objektträger pipetiert. Um Verdunsten der Probe zu Verhindern wurde diese mit einem Deckglas und nicht-fluoreszentem Nagellack auf dem Objektträger versiegelt. Die Proben wurden mit einem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) aufgenommen, das aus einer Leica Scanning Einheit und einem Zeiss Axiovert Mikroskop kombiniert ist. Es ist ausgestattet mit einem Argon-Krypton-Laser einer Anregungswellenlänge von 488 nm.

Mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) konnte gezeigt werden, dass Partikel-assoziiertes uPA in der Lage ist, suPAR selektiv zu binden (Abb. 13). Der Vergleich von SP-uPA mit den Kontrollpartikeln zeigt eine viel höhere Fluoreszenzintensität bei SP-uPA (Abb. 13A, 13B). Einen weiteren Hinweis darauf, dass über Anbindung von suPAR, mAb HD13.1 und ALEXA488-markiertem Sekundärantikörper das Partikel-gebundene uPA angefärbt wurde, gibt das Fluoreszenzbild vom Querschnitt des Partikels (Abb. 13C). Daraus ist ersichtlich, dass die gesamte Fluoreszenz auf der Partikeloberfläche gebunden ist. Gleiches gilt für das Fluoreszenzbild im „Extended Focus“. Beim „Extended Focus“ wurden Bilder, so genannte „Scans“, vom Partikel in vielen verschiedenen Ebenen aufgenommen, welche in immer gleichem Abstand von $0,2 \mu\text{m}$ voneinander entfernt sind. Der Partikel wurde sozusagen „in Scheiben geschnitten“. Die Bilder dieser Ebenen wurden optisch übereinander gelegt, und man erhält dabei die gesamte Fluoreszenz des Partikels (Noack et al., 1999). Nur Partikel, deren Oberfläche ausschließlich angefärbt wurde, zeigten eine gleichmäßig starke Fluoreszenz im „Extended Focus“ (Abb. 13C).

Damit konnte außerdem gezeigt werden, dass eine nichtselektive Bindung von uPA über seine freien NH_2 -Gruppen an die Partikel, z.B. über den N-Terminus oder die Seitenkette der Aminosäuren Lysin, das uPA-Molekül wenig strukturell verändert. Ein genügend großer Teil des gebundenen uPA ist in der Lage, suPAR zu binden.

4.2.4 Bestimmung des inhibitorischen Potentials uPA-abgeleiteter Peptide mittels Durchflusszytometrie mit SP-uPA

In Anlehnung an die FACS-Versuche mit U937 Zellen wurde das Inhibitionsverhalten und die IC_{50} -Werte für $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{2-Nal}^{24}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{28}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Orn}^{23}\text{Thi}^{24}\text{Thi}^{25}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Tyr}^{25}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$ sowie HMW-uPA und ATF durch Einsatz des Partikelsystems SP-uPA ermittelt. Dazu wurden die Inkubationsbedingungen weitestgehend gleich gehalten. Die eingesetzte Partikelzahl entspricht der Anzahl der eingesetzten U937 Zellen. Und um einen Vergleich zu erhalten, wurden die inhibierenden Peptide und Proteine in gleichen Konzentrationen eingesetzt.

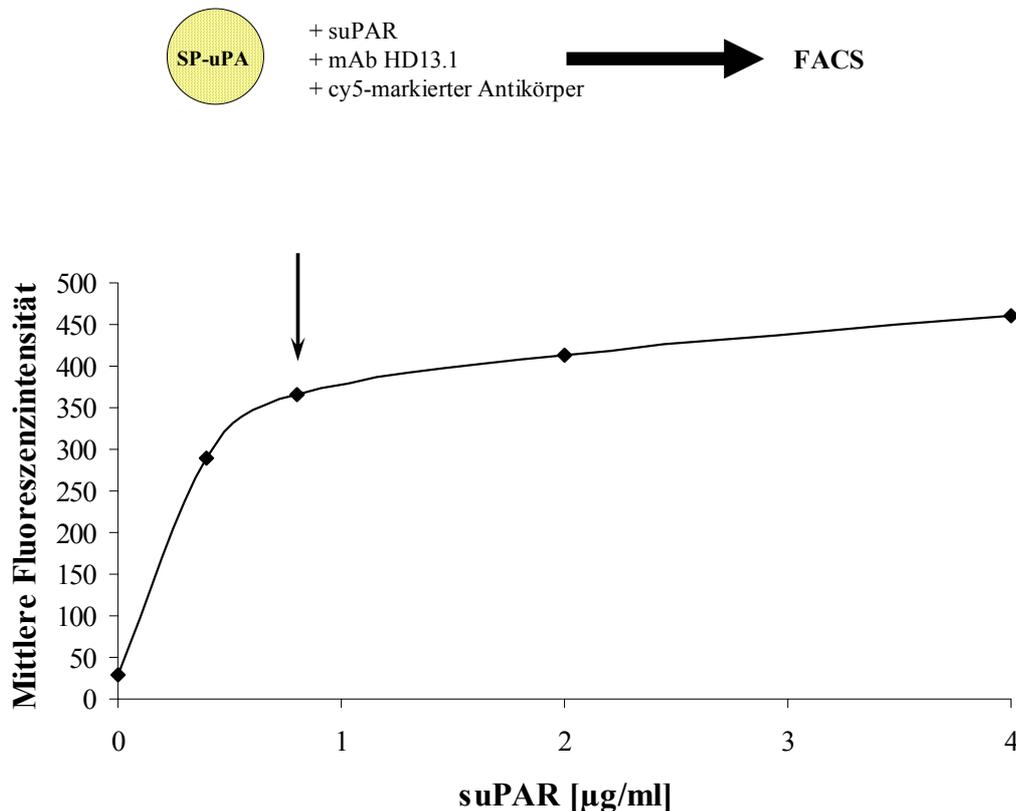


Abbildung 14: Fluoreszenzintensität von SP-uPA in Abhängigkeit von der Konzentration an zugegebenem suPAR bei konstanter Menge an HD13.1 und cy5-markiertem Sekundärantikörper. Es wird die optimale Menge an suPAR ermittelt, die für weitere Versuche unter gleichen Bedingungen eingesetzt wird (Pfeil).

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration von suPAR wurden die Partikel SP-uPA mit suPAR, mAb HD13.1 und cy5-markiertem Sekundärantikörper inkubiert. Je Probe wurden 250.000 Partikel für 20 min bei RT mit suPAR inkubiert. Nach Waschen mit PBS/1 % BSA folgte 20 min Inkubation bei RT mit 1,6 µg/mL HD13.1. Erneutem Waschen folgte 20 min Inkubation mit 0,5 µg/mL cy5-Antikörper. Die Antikörper wurden jeweils im Überschuss zugegeben, damit bei steigender Konzentration von suPAR genügend Antikörper zur Detektion von gebundenem suPAR vorhanden ist. Überschüssiger Antikörper HD13.1 wurde nach Inkubation durch Waschen entfernt, ungebundener cy5-Antikörper verblieb in der Probe, da Fluoreszenz, die nicht Partikel-gebunden ist, bei der Durchflusszytometrie nicht detektiert wird.

Die grafische Darstellung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Menge an zugegebenen suPAR ergab eine Sättigungskurve, die einen linearen Anstieg hatte und dann in ein Plateau überging (Abb. 14). Analog zur Bestimmung der optimalen Konzentration an FITC-uPA im Zellsystem ließ sich grafisch die optimale Konzentration von suPAR ermitteln, d. h. die minimal nötige Menge an Protein, aus der die höchstmögliche Fluoreszenz resultiert. Diese entspricht der Menge suPAR am Scheitelpunkt der Kurve. Die Konzentration an suPAR von 0,8 µg/mL wurde in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt.

Zur Bestimmung des inhibitorischen Potentials der uPA-abgeleiteten Peptide wurden $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{2-Nal}^{24}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{28}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Orn}^{23}\text{Thi}^{24}\text{Thi}^{25}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Tyr}^{25}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$ in Konzentrationen von 0 µmol/L bis 4 µmol/L sowie HMW-uPA und ATF zusammen mit 250.000 Partikeln SP-uPA und 0,8 µg/mL suPAR in PBS/1 % BSA für 20 min inkubiert. Es folgte ein Waschschritt mit PBS/1 % BSA und Zentrifugation bei 1000 x g. Danach wurden 0,8 µg/mL HD13.1 in PBS/1 % BSA zugegeben und bei RT 20 min inkubiert. Nach Waschen mit PBS/1 % BSA wurde 0,2 µg/mL cy5-markierter Sekundärantikörper für 20 min bei RT inkubiert. Das Volumen jeder einzelnen Probe betrug 250 µL. Die Proben wurden im Durchflusszytometer vermessen.

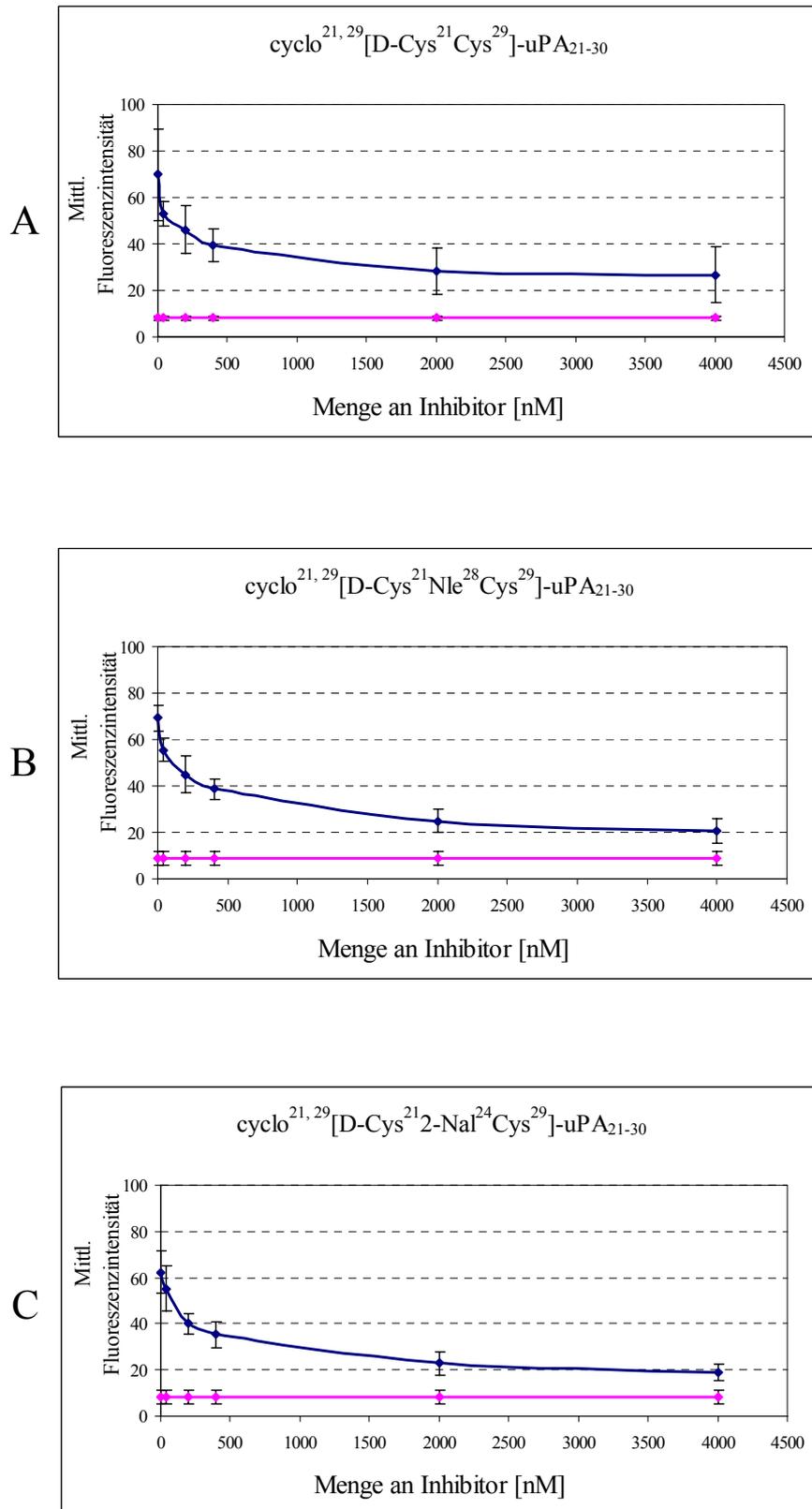


Abbildung 15: Inhibitionskurven von cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (A), cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Nle²⁸Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (B), cyclo^{21,29}[D-Cys²¹2-Nal²⁴Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (C) aus je drei unabhängigen Versuchen. Die Peptide zeigen sehr ähnliches Inhibitionsverhalten, aber keine Reduktion der Fluoreszenzintensität auf das Niveau der Hintergrund-Fluoreszenz (magenta).

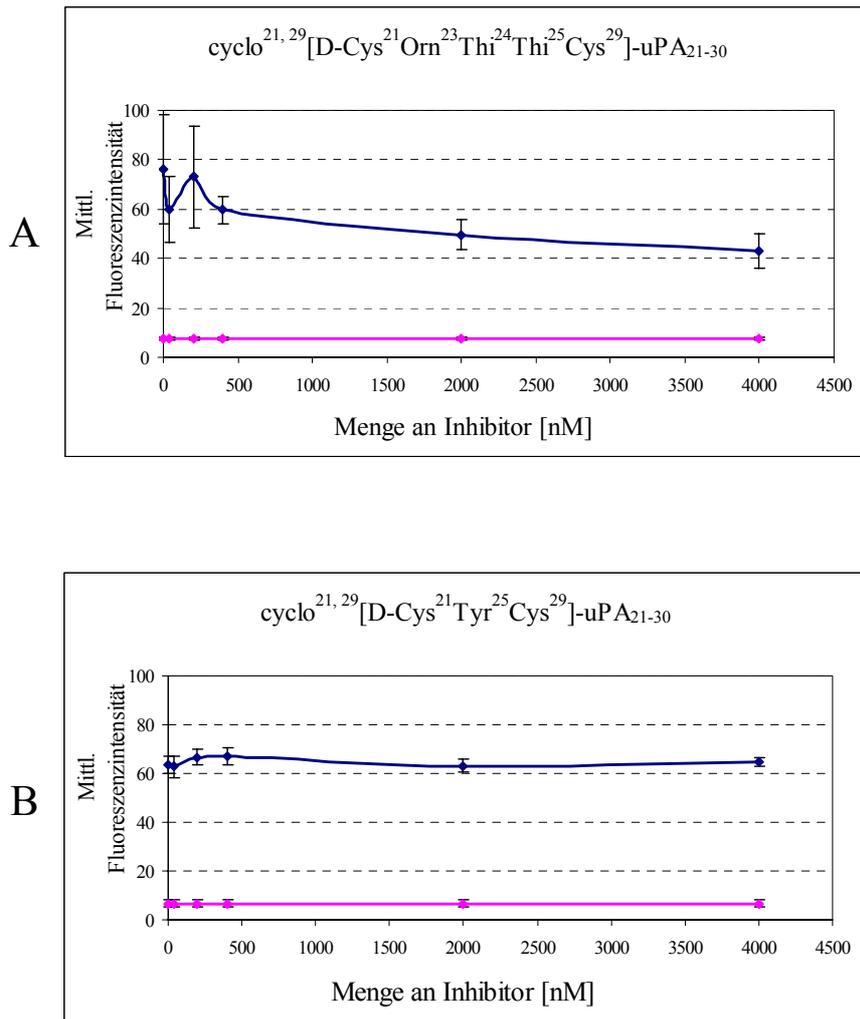


Abbildung 16: Inhibitionskurven von cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Orn²³Thi²⁴Thi²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (A) und cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Tyr²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (B) im Vergleich zur Hintergrund-Fluoreszenz (magenta).

In mindestens drei unabhängigen Versuchen unter gleichen Bedingungen wurden jedes Peptid sowie uPA und ATF getestet. Für die Peptide, uPA und ATF wurden unterschiedliche Inhibitionskurven erhalten, die Fluoreszenzintensität, und damit die Bindung von suPAR an die Partikel SP-uPA, in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration der jeweiligen Substanzen darstellen (Abb. 15 – 17). Dabei zeigten die Peptide cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀, cyclo^{21,29}[D-Cys²¹2-Nal²⁴Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀, cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Nle²⁸Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ sehr ähnliches Inhibitionsverhalten (Abb. 15). Eingesetzt in einer Konzentration bis 200 nM erfolgte eine sehr gute Reduktion der Fluoreszenzintensität. In hohen Konzentrationen bis 4 μ M wurde keine vollständige Reduktion auf den Level der Hintergrund-Fluoreszenz erreicht, wie es durch Einsetzen von uPA als kompetitive Komponente erreicht wird (Abb. 17).

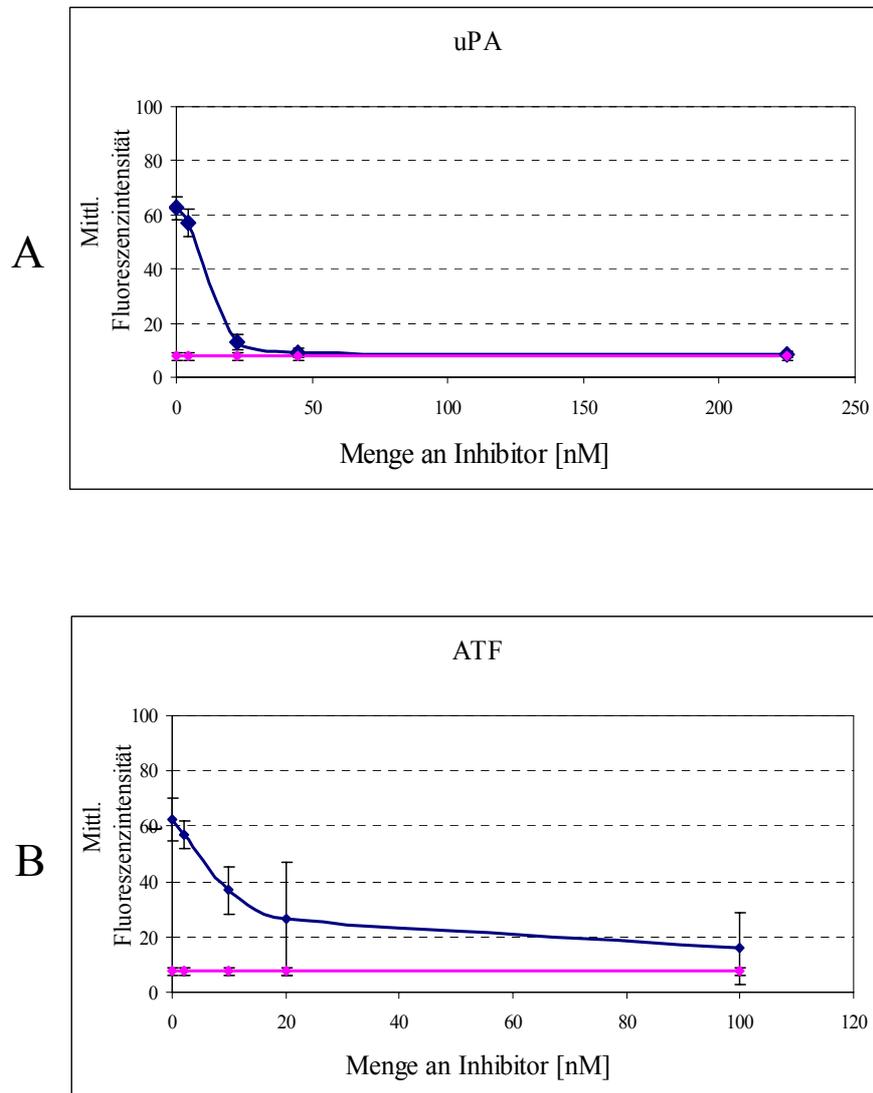


Abbildung 17: Inhibitionskurven von uPA und ATF aus je drei unabhängigen Versuchen. Eingesetzt in geringeren Konzentrationen als die Peptide zeigen die natürlichen Liganden von uPAR, uPA (**A**) und ATF (**B**) die beste Inhibition. uPA erreicht bei einer Konzentration von 50 nM eine Reduktion der Fluoreszenz auf den Level der Hintergrund-Fluoreszenz (magenta).

Cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Orn²³Thi²⁴Thi²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ zeigte deutliches Inhibitionsverhalten, wenn auch vergleichsweise geringer als cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀, cyclo^{21,29}[D-Cys²¹2-Nal²⁴Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀, cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Nle²⁸Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀. Mit cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Tyr²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ konnte die Bindung von suPAR an SP-uPA nicht verhindert werden (Abb. 16).

Die gemessenen Fluoreszenzwerte jeder Probe gleicher Konzentration desselben Peptids bzw. Proteins wurden gemittelt. Die maximale Fluoreszenz (ohne Inhibition) abzüglich des Hintergrunds (Eigenfluoreszenz der Zellen) wurde 100 % gesetzt. Von den Werten für die einzelnen Peptide bzw. Proteine wurde ebenfalls der Hintergrund abgezogen, und diese Werte in prozentuale Relation zur Maximalfluoreszenz gesetzt. Die Auswertung erfolgte grafisch (Abb. 18). Zur Bestimmung der inhibitorischen Kapazität der Substanzen wurde der IC_{50} -Wert bestimmt. Im SP-uPA System inhibieren HMW-uPA und ATF mit einem IC_{50} -Wert von 12 μ M bzw. 11 μ M am besten, und zeigen nahezu identische Inhibitionskurven (Abb. 18). Cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀, cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Nle²⁸Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ und cyclo^{21,29}[D-Cys²¹2-Nal²⁴Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ haben zwar identische IC_{50} -Werte von 400 nM, jedoch unterscheidet sich der Verlauf der Kurve von cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ etwas von dem der beiden anderen Peptide. Bei höheren Konzentrationen inhibiert cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ geringfügig schlechter als cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Nle²⁸Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ und cyclo^{21,29}[D-Cys²¹2-Nal²⁴Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀. Für cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Orn²³Thi²⁴Thi²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ konnte im Bereich der eingesetzten Konzentrationen (max. 4 μ g/mL) trotz deutlichen Inhibitionsverhaltens kein IC_{50} -Wert ermittelt werden. Cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Tyr²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ zeigte auch im SP-uPA System keinen inhibierenden Effekt.

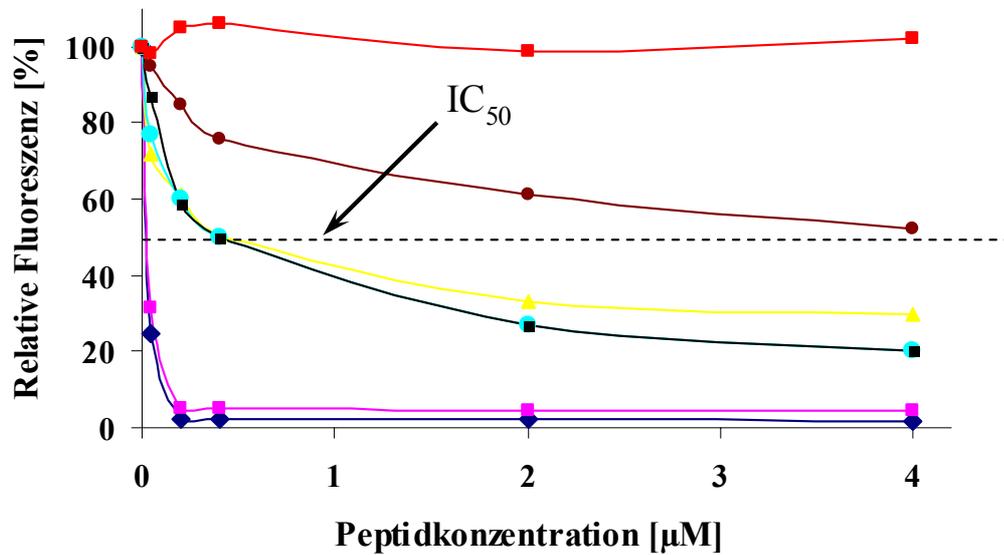


Abbildung 18: Effekt der uPA-abgeleiteten Peptide bzw. HMW-uPA und ATF auf die Bindung von suPAR an SP-uPA. Es erfolgt nacheinander Inkubation mit mAb HD13.1 und cy5-markiertem Sekundärantikörper. HMW-uPA (blau) und ATF (magenta) zeigen den besten inhibierenden Effekt. Cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (gelb), cyclo^{21,29}[D-Cys²¹²-Nal²⁴Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (schwarz) und cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Nle²⁸Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (türkis) besitzen ähnliches Inhibitionspotential. Cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Orn²³Thi²⁴Thi²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (braun) zeigt inhibierenden Effekt, aber ein IC₅₀-Wert konnte innerhalb der eingesetzten Konzentrationen nicht ermittelt werden. Cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Tyr²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ ist ohne inhibierende Wirkung.

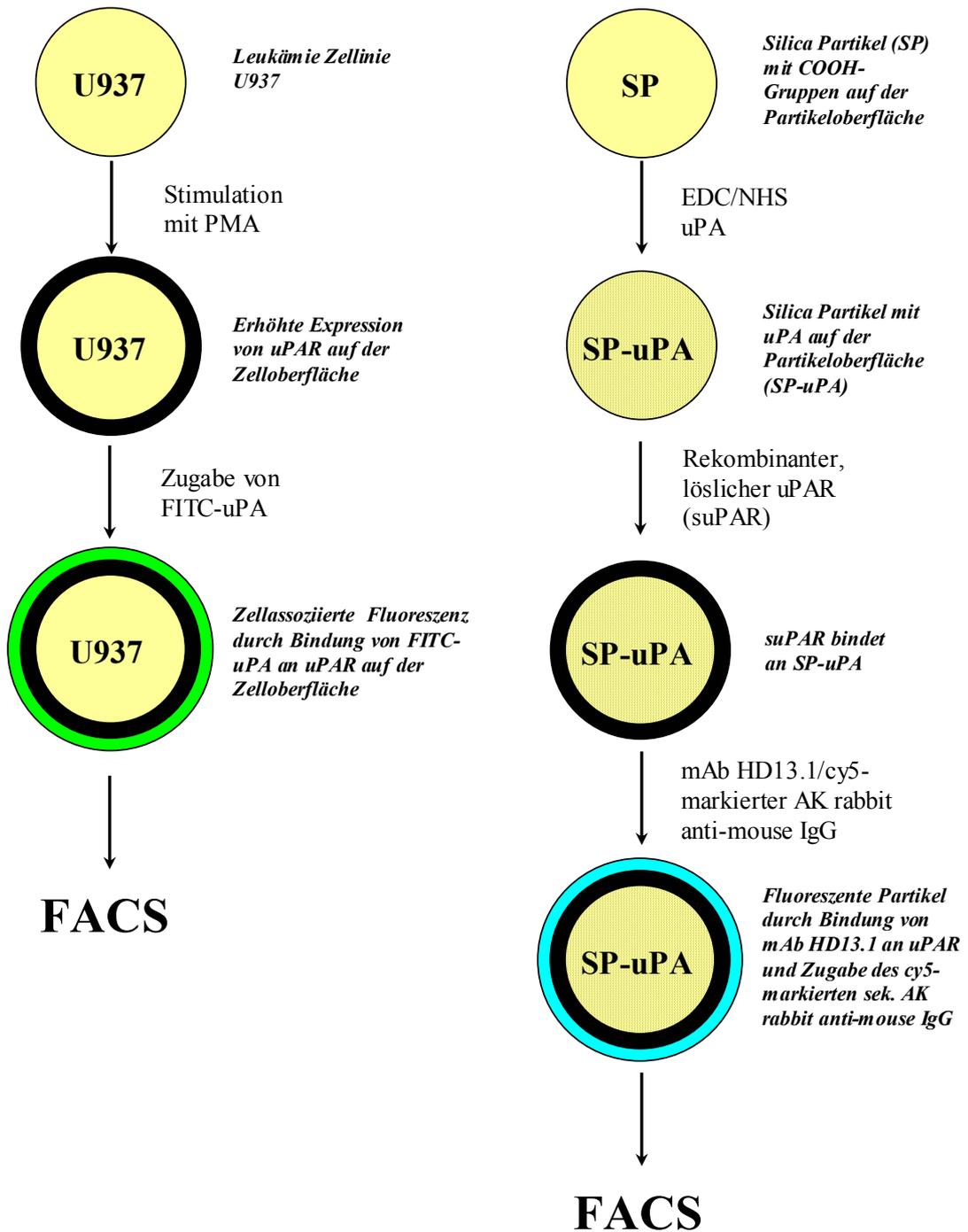


Abbildung 19. Vergleich des U937 Zellsystems mit den SP-uPA Partikelsystem. Durch Stimulation der U937 Zellen mit PMA wird uPAR auf der Zelloberfläche exprimiert. Zugabe von FITC-markiertem HMW-uPA führt zu einer zellassoziierten Fluoreszenz. Im Partikelsystem mit uPA-gekoppelten Silica-Partikeln (SP-uPA) kommt es durch Inkubation mit suPAR, mAb HD13.1 und c5-markiertem Sekundärantikörper zu einer Partikel-assoziierten Fluoreszenz, die mittels Durchflusszytometrie nachweisbar ist. Durch Inkubation mit uPAR-Antagonisten in beiden Systemen kommt es zu einer Verringerung der mittels FACS messbaren Fluoreszenzintensität.

4.2.5 Vergleich von SP-uPA-Partikelsystem mit dem U937-Zellsystem

In Anlehnung an das bereits etablierte und seit langem verwendete U937-Zellsystem wurde das Partikelsystem SP-uPA etabliert. Es sollten die Vorteile des Verfahrens Durchflusszytometrie erhalten bleiben, dabei allerdings die Probleme des Einsatzes von Zellen vermieden werden. Für einen Vergleich vom U937-Zellsystem mit dem neu entwickelten Partikelsystem SP-uPA wurden die Inkubationsbedingungen nahezu gleich gehalten. Die eingesetzten Konzentrationen der Peptide $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{2-Nal}^{24}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Orn}^{23}\text{Thi}^{24}\text{Thi}^{25}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{28}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Tyr}^{25}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$ sowie die von UPA und ATF blieben in beiden Systemen identisch. Sowohl im Partikelsystem SP-uPA und als auch im U937-Zellsystem wurden 250.000 Partikel bzw. Zellen in jeder Probe eines Versuchs eingesetzt. In beiden Systemen wurden alle Peptide sowie uPA und ATF in mindestens drei unterschiedlichen Versuchen bei gleich bleibenden Inkubationsbedingungen getestet. Die Auswertung erfolgte in beiden Systemen durch grafische Ermittlung des IC_{50} -Wertes.

Ansonsten unterscheidet sich das Partikelsystem SP-uPA deutlich vom U937-Zellsystem (Abb. 19). In beiden Systemen konkurrieren die zugegebenen uPAR-Antagonisten um die Bindung an uPAR: im U937-Zellsystem mit FITC-uPA um Bindung an zellassoziierten uPAR, im Partikelsystem mit uPA-gekoppelten Partikeln um die Bindung an in Lösung vorliegenden suPAR, welcher dadurch „abgefangen“ wird. Im U937-Zellsystem inhibieren die uPAR-Antagonisten im Überschuss die Bindung von FITC-uPA an uPAR auf der Zelloberfläche. Es erfolgt dadurch nachweisbar eine Verringerung der Fluoreszenz. Durch Bindung der uPAR-Antagonisten an im Überstand befindlichen suPAR, wird im Partikelsystem verhindert, dass suPAR an die Partikel SP-uPA binden kann. Durch Zugabe von Primärantikörper HD13.1 und cy5-markiertem Sekundärantikörper kann die Fluoreszenz nicht mehr an die Partikel gebunden werden. Es erfolgt ebenfalls eine Verringerung der Fluoreszenz. Auch stehen einem Inkubationsschritt im U937-Zellsystem drei Inkubationsschritte im Partikelsystem gegenüber, was zu einer Erhöhung der gesamten Inkubationszeit im Vergleich zum U937-Zellsystem führt.

Für die getesteten Proteine und Peptide HMW-uPA, ATF, cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀, cyclo^{21,29}[D-Cys²¹2-Nal²⁴Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀, cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Orn²³Thi²⁴Thi²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀, cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Nle²⁸Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀, cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Tyr²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ wurden in beiden Systemen vergleichbare IC₅₀-Werte (Tab. 6) und auch vergleichbare Inhibitionskurven erhalten. HMW-uPA und ATF inhibieren in beiden System die uPA/uPAR Interaktion am besten. Cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀, cyclo^{21,29}[D-Cys²¹2-Nal²⁴Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀, cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Nle²⁸Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ inhibieren in beiden Systemen mit IC₅₀-Werten in vergleichbarem nanomolaren Bereich: 130 nM – 200 nM mit U937 Zellen vs. 400 nM mit den Partikeln SP-uPA. Die Inhibitionskurven der drei Peptide weist in beiden Systemen Unterschiede auf, wobei cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Nle²⁸Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ im Zellsystem etwas schlechtere Inhibition zeigt als die anderen beiden Peptide, und im Partikelsystem cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ unwesentlich schlechter inhibiert. Cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Orn²³Thi²⁴Thi²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ zeigt deutlich schlechtere Inhibition. Es konnte für das Peptid in beiden System innerhalb der eingesetzten Konzentrationen kein IC₅₀-Wert ermittelt werden. Cyclo^{21,29}[D-Cys²¹Tyr²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ ist in beiden Systemen ohne inhibierenden Effekt.

Antagonist	IC ₅₀ [nM]	
	SP-uPA	U937 Zellen
HMW-uPA	12	10
ATF	11	5
cyclo ^{21,29} [D-Cys ²¹ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	400	150
cyclo ^{21,29} [D-Cys ²¹ 2-Nal ²⁴ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	400	130
cyclo ^{21,29} [D-Cys ²¹ Nle ²⁸ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	400	200
cyclo ^{21,29} [D-Cys ²¹ Orn ²³ Thi ²⁴ Thi ²⁵ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	>4000	>4000
cyclo ^{21,29} [D-Cys ²¹ Tyr ²⁵ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	kein Effekt	kein Effekt

Tabelle 6: Inhibitorisches Potential (IC₅₀) von HMW-uPA, ATF und den zyklischen, uPA-abgeleiteten Peptiden ermittelt im SP-uPA Partikelsystem und im U937 Zellsystem.

4.3 Generierung von His-suPAR-exprimierenden OV-MZ-6#8-Zellen

Um eine dauerhafte Anwendung des SP-uPA Partikelsystems zu ermöglichen, müssen die einzelnen Komponenten ständig zur Verfügung stehen. Es muss des Weiteren garantiert sein, dass die Partikel, die Antikörper und suPAR kommerziell erhältlich sind bzw. selbst leicht hergestellt und aufgereinigt werden können. Zur Bereitstellung von suPAR sollte eine humane Zelllinie generiert werden, die eine Variante von suPAR exprimiert, die am C-terminalen Ende des Moleküls, an dem sich im zellassoziierten uPAR der GPI-Anker befindet (Ploug et al., 1991), eine zusätzliche Sequenz von 6 aufeinander folgenden Aminosäuren Histidin besitzt, den so genannten „His-Tag“. Die lösliche Variante des uPA Rezeptors (suPAR) wurde bisher durch Affinitätschromatographie aus Zellkulturüberständen suPAR-exprimierender CHO-Zellen aufgereinigt. Die uPA-Säulen wurden aufgrund des sehr niedrigen pH-Wertes (pH 2,5) des Elutionspuffers auf lange Sicht instabil und verloren die Kapazität, suPAR zu binden. Durch die Expression von suPAR mit „His-Tag“ (His-suPAR) wird dieses Problem umgangen und Aufreinigung der Zellkulturüberstände mittels Ni-NTA-Chromatographie vereinfacht (Petty 1996). Die Bindungseffizienz von uPAR an uPA oder uPA-Analoga würde dabei nicht beeinflusst, da die Bindungsregion von suPAR für die Bindung an uPA am N-terminalen Ende des Moleküls lokalisiert ist.

4.3.1 Entwicklung einer Klonierungsstrategie

Die uPAR-cDNA, die den kompletten GPI-verankerten uPAR kodiert (Aminosäure 1 – 335) wurde mittels RT-PCR von Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe aus humanem Ovarialtumorgewebe isoliert (Türkmen et al., 1997). Das uPAR-Transkript enthält ein spaltbares 22 Aminosäuren Signalpeptid (Roldan et al., 1990). Der funktionell sezernierte uPAR besteht aus 283 Aminosäuren. Am C-terminalen Ende des funktionellen uPAR wird ein 30 Aminosäuren Fragment kodiert, welches posttranslational abgespalten wird. Dadurch entsteht ein neuer C-Terminus, an den sich der GPI-Anker anheftet, der das Protein an die äußere Schicht der Zellmembran bindet (Ploug et al., 1991).

Ausgehend von der suPAR-kodierenden Plasmid-DNA pRc/RSV-suPAR (Krüger et al. 2000, Lutz et al. 2001), die das C-terminale 30 Aminosäuren Fragment nicht kodiert, wurde eine Klonierungsstrategie entwickelt (Abb. 20) zur Generierung humaner Tumorzellen, die His-suPAR in erhöhten Mengen exprimieren. Da für humane Zellen kein Plasmid-Vektor kommerziell erhältlich war, der C-terminal den „His-Tag“ kodiert und eine stabile Transfektion in humane Zellen ermöglicht, wurde in zwei Stufen His-suPAR kodierende cDNA generiert. Im ersten Schritt konnte die cDNA-Sequenz, die zum größten Teil die suPAR-kodierende Sequenz enthält, in pQE60, einer Plasmid-DNA für Expression in Prokaryonten (*E.coli*), eingefügt werden. Das Plasmid pQE60-suPAR kodiert am C-terminalen Ende der suPAR-Sequenz den „His-Tag“. Durch das Resistenz-Gen in pQE60 wurden eine Selektion der Ampicillin-resistenten Klone und die Isolierung deren DNA möglich. Nach Sequenzanalyse konnte im zweiten Schritt, ausgehend von pQE60-suPAR, mittels PCR die DNA vervielfältigt werden, die His-suPAR kodiert. Diese konnte in den viralen Vektor pRc/CMV2 zur Expression in humanen Zellen eingefügt werden. pRc/CMV2-His-suPAR wurde anschließend in humane Zelllinie OV-MZ-6#8 transfiziert, die dadurch His-suPAR exprimieren sollten.

4.3.2 Klonierung, Isolierung und Nachweis von suPAR-pQE60

Das suPAR-kodierende Plasmid pRc/RSV-suPAR (Krüger et al., 2000; Lutz et al., 2001) wurde ursprünglich so konzipiert, dass sich hinter die cDNA-Sequenz für das spaltbare 22 Aminosäuren Signalpeptid und für den 283 Aminosäuren funktionellen uPAR ein Stop-Codon befindet. Die 30 Aminosäuren Sequenz, die abgespalten wird und die die Anheftung des GPI-Ankers kodiert, ist in dieser DNA nicht enthalten.

Mittels PCR wurde die suPAR-kodierende DNA-Sequenz vervielfältigt. Die dabei eingesetzten Primer „suPAR-H-do“ und „suPAR-H-up“ wurden dafür so konzipiert, dass das 5'-Ende die EcoR I-Schnittstelle von pRc/RSV-suPAR enthält und das Stop-Codon am 3'-Ende entfällt. Am 3'-Ende der suPAR-DNA-Sequenz wurde eine neue Schnittstelle für Bgl II eingefügt (Abb. 21). Die Hind III-Schnittstelle liegt im N-terminalen Bereich dieses cDNA-Fragment für die spätere Restriktion und anschließende Ligation in pRc/CMV2 (Abb. 22).

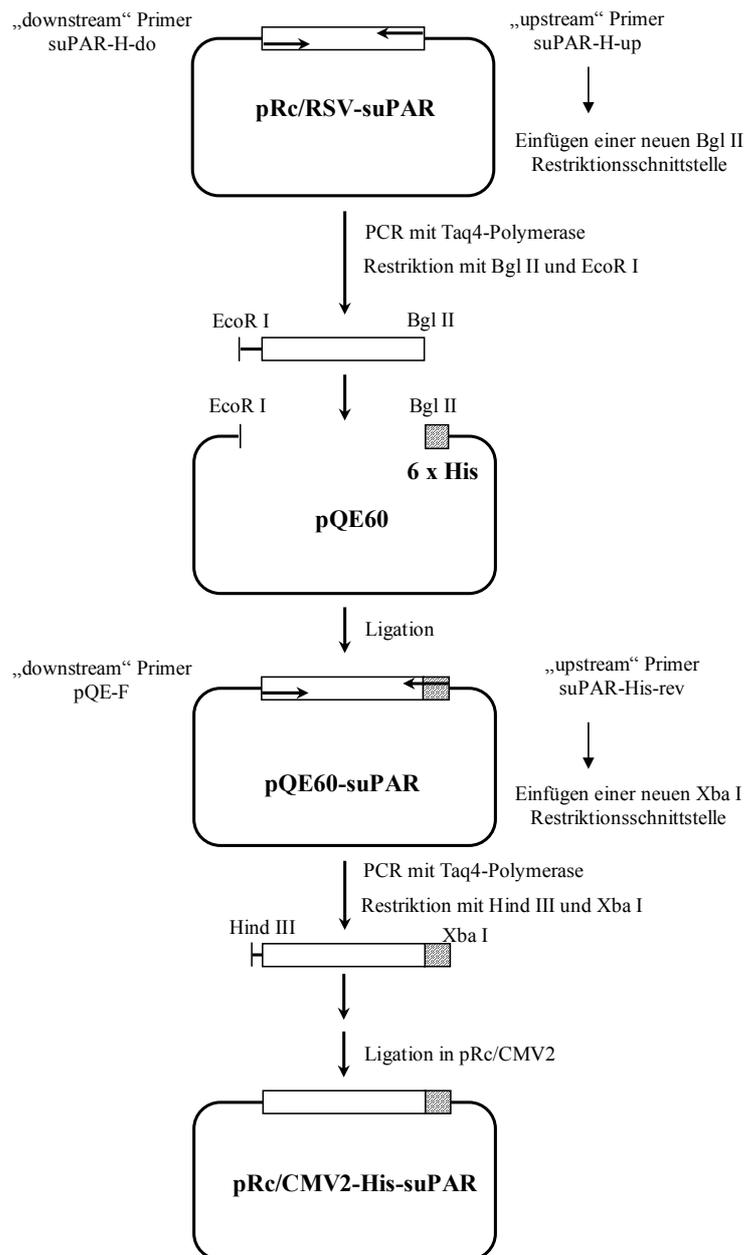


Abbildung 20: Klonierungsstrategie zur Generierung von His-suPAR-exprimierender OV-MZ-6#8-Zellen. Ausgehend von suPAR-kodierender cDNA pRc/RSV-suPAR wird die kodierende Sequenz amplifiziert. Die dafür nötigen Primer wurden so konzipiert, dass das Stop-Codon (TAA) entfällt und eine neue Bgl II Restriktionsschnittstelle entsteht. Das ermöglicht die Ligation in pQE60. Dadurch wird an das C-terminale Ende von suPAR eine zusätzliche Sequenz von 6 Aminosäuren Histidin kodiert. Die His-suPAR codierende DNA-Sequenz wird amplifiziert, mit Restriktionsendonukleasen verdaut und in pRc/CMV2 Plasmid-DNA ligiert. Diese cDNA wird in humane OV-MZ-6#8-Zellen transfiziert.

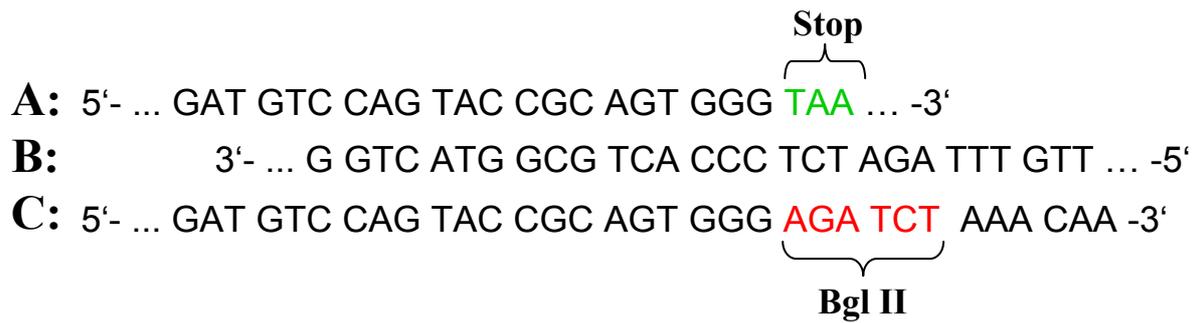


Abbildung 21: Klonierungskonzept zum Einfügen einer neuen Restriktionsschnittstelle mittels PCR. Der Upstream-Primer „suPAR-H-up“ (**B**) wurde so konzipiert, dass das Stop-Codon (grün) von pRc/RSV-suPAR entfällt und im Amplifikat (**C**) eine neue Bgl II-Schnittstelle (rot) entsteht. **A:** C-terminaler Teil der suPAR-kodierenden Sequenz von pRc/RSV-suPAR, **B:** Primer suPAR-H-do, **C:** C-terminaler Teil des PCR-Produkts.

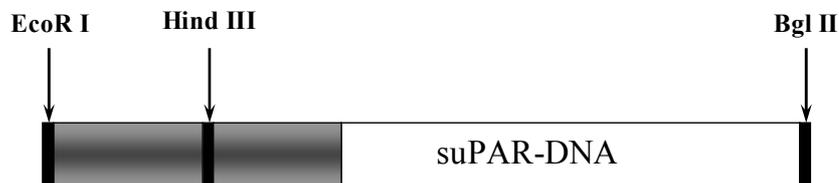


Abbildung 22: Schematische Darstellung des cDNA-Fragments, das ausgehend von pRc/RSV-suPAR mittels PCR vervielfältigt wurde. Es erfolgte anschließend eine Restriktion mit Bgl II und EcoR I. Im Fragment ist neben der suPAR-kodierenden Sequenz eine Hind III-Schnittstelle enthalten, die für die später folgende Ligation der His-suPAR-kodierenden DNA in das Plasmid pRc/CMV2 notwendig erforderlich war. Für das dargestellte Fragment wurde mittels Sequenzanalyse eine Größe von 1028 bp ermittelt.

Nach Restriktion des PCR-Produkts mit EcoR I und Bgl II wurde das cDNA-Fragment in pQE60 ligiert, anschließend in *E.coli*-Zellen transformiert und auf Platten mit LB^{Amp}-Agar ausplattiert. Das pQE60-Plasmid besitzt ein Resistenz-Gen, was eine Selektion durch Einsatz von Ampicillin ermöglichte, wodurch nur transformierte *E.coli*-Zellen wachsen konnten. Die unter Ampicillin-Druck gewachsenen *E.coli*-Kolonien wurden selektiert und in LB-Medium kultiviert. Daraus wurde die DNA isoliert und diese mit EcoR I und Bgl II verdaut. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die Transformation erfolgreich war, da die neue Bgl II-Schnittstelle eingefügt wurde. Durch Gelelektrophorese konnte gezeigt werden (Abb. 23), dass nur zwei der selektierten *E.coli*-Klone, #1 und #3, möglicherweise das vollständige Plasmid pQE60-suPAR tragen, da bei Kontroll-Restriktion ein cDNA-Fragment in erwarteter Größe (1026 Bp) entstand.

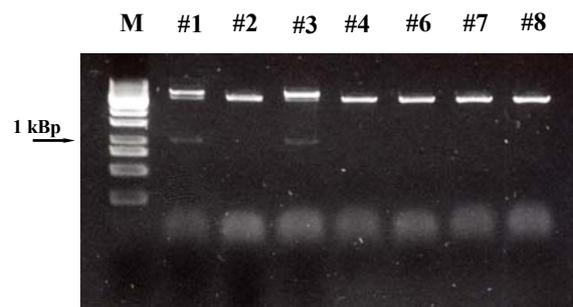


Abbildung 23: Agarosegel nach Restriktion der isolierten Plasmid-DNA der selektierten *E.coli*-Klone mit EcoR I und Bgl II. Nur bei Klonen #1 und #3 konnte ein cDNA-Fragment in erwarteter Größe von ca. 1 kBp (1026 Bp) nachgewiesen werden. **M**: Marker, **V**: Vektor-DNA (pQE60).

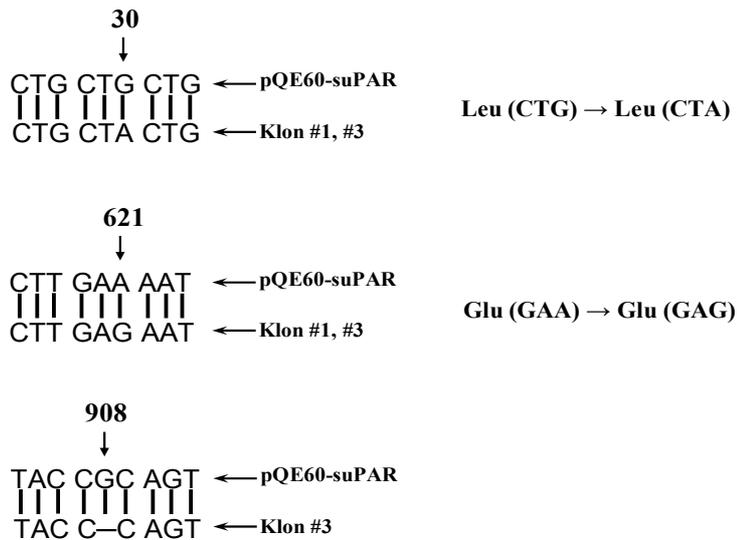


Abbildung 24: Sequenzvergleich der zu erwartenden DNA-Sequenz von pQE60-suPAR und der Sequenz der *E.coli*-Klone #1 und #3. Die Punktmutationen in den Positionen 30 und 621 der suPAR-kodierenden DNA (beginnend vom Start-Codon ATG) haben keinen Einfluss auf die Sequenz des SuPAR-Proteins. Die Deletion der Base Guanidin in Klon #3 an Position 908 verändert dagegen die Aminosäuresequenz. Hierbei handelt es sich nicht um einen pQE60-suPAR-Klon.

Durch Sequenzierung der cDNA der Klone #1 und #3 und Vergleich mit der zu erwartenden cDNA-Sequenz von pQE60-suPAR wurde festgestellt, dass nur *E.Coli*-Klon #1 His-suPAR-cDNA trägt. Ausgehend vom Start-Codon ATG wurden in den cDNA-Sequenzen von Klon #1 und #3 Punktmutationen an Position 30 und 621, der suPAR-kodierenden Sequenz festgestellt, die sich aber nicht auf die suPAR-Aminosäuresequenz auswirken (Abb. 24). Allerdings wies die DNA von Klon #3 eine Deletion an Position 908 auf, die eine Veränderung der Aminosäuresequenz zur Folge hat. Für die weiteren Klonierungsschritte wurde die isolierte cDNA von pQE60-suPAR #1 eingesetzt.

4.3.3 Klonierung, Isolierung und Nachweis von His-suPAR-pRc/CMV2

Im zweiten Schritt wurde mittels PCR die His-suPAR-kodierende cDNA aus pQE60-suPAR vervielfältigt. Dafür wurde als „Forward“-Primer der kommerziell von der Firma Qiagen bezogene Primer pQE-F verwendet. Der „Reverse“-Primer wurde so konzipiert, dass am C-terminalen Ende nach dem „His-Tag“ und dem Stop-Codon (TAA) eine Schnittstelle für Xba I eingefügt werden konnte (Abb. 25).

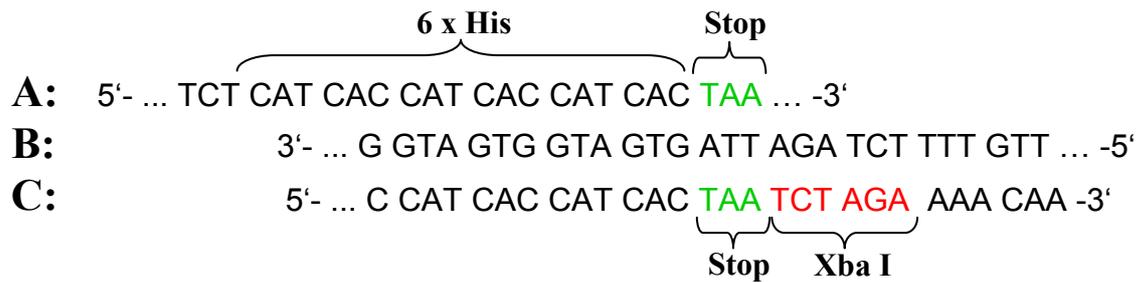
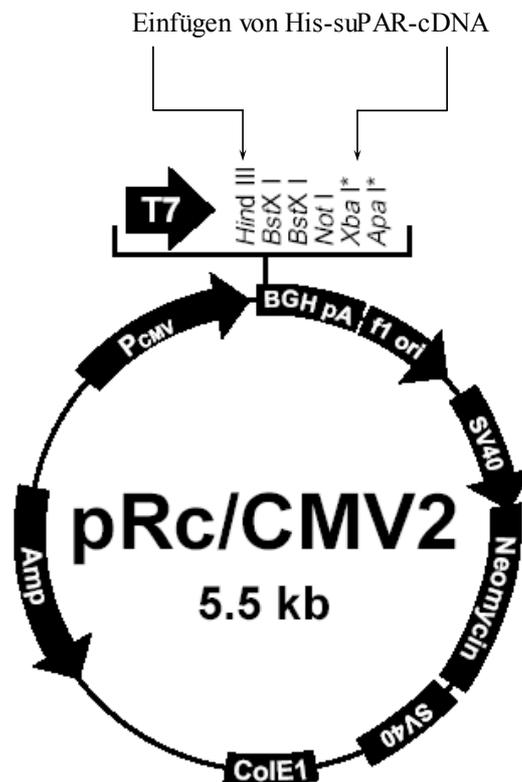


Abbildung 25: Klonierungskonzept zum Einfügen einer neuen Restriktionsschnittstelle mittels PCR. Der „Reverse“-Primer (**B**) wurde so konzipiert, dass im Amplifikat (**C**) nach der „His-Tag“-Sequenz und dem Stop-Codon (grün) eine neue Xba I-Schnittstelle (rot) entsteht. **A:** C-terminaler Teil der suPAR-kodierenden Sequenz von pQE60-suPAR, **B:** Primer suPAR-His-rev, **C:** C-terminaler Teil des PCR-Produkts.



* Vor der Xba I-Restriktionsschnittstelle befindet sich ein ATG

Abbildung 26: Schema des Expressionsvektors pRC/CMV2. PCMV: Promotorsequenz des Cytomegalovirus; BGHpA: Polyadenylierungssequenz; f1 ori: Replikationsursprung zur Bildung filamentöser Phagen; SV40: Promotor/Replikationsursprung zur Neomycin-Resistenz; Neomycin: Neomycin oder Geneticin bzw. G418-Resistenz; SV40: Polyadenylierungssequenz; ColE1: Replikationsursprung für *E. coli*; Amp: Ampicillin-Resistenz.

Nach Restriktion mit Hind III und Xba I wurde das PCR-Fragment in pRc/CMV2 ligiert (Abb. 26), in *E.coli*-Zellen transformiert und auf Platten mit LB^{Amp}-Agar ausplattiert. Das Resistenz-Gen in pRc/CMV2 ermöglicht eine Selektion mit Ampicillin. Es wachsen nur transformierte *E.coli*-Zellen, die pRc/CMV2 tragen. Einzelne klonale *E.coli*-Kolonien wurde selektiert, ÜN-Kulturen angezüchtet und die Plasmid-DNA isoliert. Kontroll-Restriktion mit Hind III und Xba I zeigte, dass nur einer der selektierten *E.coli*-Klone (#14) das vollständige Plasmid pRc/CMV2-His-suPAR besitzt, da ein Restriktions-Fragment in erwarteter Größe (964 Bp) nachgewiesen werden konnte (Abb. 27).



Abbildung 27: Agarosegel nach Restriktion der isolierten Plasmid-DNA der selektierten *E.coli*-Klone mit Hind III und Xba I. Nur bei Klon #14 ein DNA-Fragment in erwarteter Größe von 964 Bp nachgewiesen werden. **M**: Marker.

Mittels Analyse der His-suPAR kodierenden Sequenz der isolierten Plasmid-DNA von *E.coli*-Klon pRc/CMV2-His-suPAR #14 und anschließendem Vergleich mit der zu erwartenden Sequenz wurde nachgewiesen, dass es sich um die korrekte, vollständige Sequenz handelt. Die Plasmid-DNA pRc/CMV2-His-suPAR #14 wurde für die nachfolgende Transfektion in OV-MZ-6#8-Zellen eingesetzt.

4.3.4 Transfektion von pRc/CMV2-His-suPAR in OV-MZ-6#8-Zellen

Der Vektor pRc/CMV2 enthält neben dem Ampicillinresistenz-Gen, zur Selektion der *E. coli*-Klone, ein Geniticin (G418)-Resistenz-Gen, das eine Selektion in G418-haltigem Medium ermöglichte. Nach stabiler Transfektion und Selektion durch G418-haltiges Medium, wurden die OV-MZ-6#8-Zellklone „His-suPAR“, „Vektor“ und die klonale Wildtyp-Zelllinie OV-MZ-6#8 hinsichtlich ihrer Expression von suPAR untersucht. Dafür wurde die Menge an His-suPAR im Zellkultur-Medium mittels uPAR-ELISA bestimmt, wodurch der Rezeptor auch im Komplex mit uPA bzw. mit uPA und PAI-1 quantitativ nachgewiesen werden kann. Der zusätzlich, durch Klonierung generierte „His-Tag“ sollte keinen Einfluss auf die Bindung der ELISA-Antikörper, und damit auf die Antigenbestimmung haben. Mittels uPAR-ELISA konnte keine Erhöhung des (His)-suPAR-Gehalts im Zellkulturüberstand der His-suPAR-Zellklone im Vergleich zu Vektor-Zellklonen und Wildtyp-Zellen nachgewiesen werden (Tabelle 7).

	uPAR [ng/mL]
OV-MZ-6#8	1,37 ± 0,91
Vektor	1,04 ± 0,61
#A2	1,40 ± 0,21
#C2	1,34 ± 0,73
#C3	1,88 ± 1,29
#D2	2,41 ± 1,32

Tabelle 7: Bestimmung des Gehalts an His-suPAR im Überstand der transfizierten OV-MZ-6-Zellklone „His-suPAR“ (#A2, #C2, #C3, #D2), „Vektor“ und der klonalen Wildtyp-Zelllinie OV-MZ-6#8 mittels ELISA. Je 20.000 Zellen wurden in „Six-well“-Platten ausgesät und 48 h kultiviert. Zur Bestimmung des Antigengehalts wurden die Überstände abgenommen und unverdünnt im ELISA eingesetzt. Der Antigengehalt ist als ng/mL Zellkulturüberstand angegeben. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, jeweils in Doppelbestimmung.

Zur Bestätigung der ELISA-Resultate wurden Western Blots durchgeführt. Dabei konnte weder in den Zellkulturüberständen (Abb. 28) noch in Zelllysaten His-suPAR-Protein nachgewiesen werden. Durch Western-Blot der Zelllysate wurde ausgeschlossen, dass His-suPAR von den Zellen zwar exprimiert, dies aber in der Zelle verbleibt und nicht aus den Zellen ausgeschleust wird. Die Transfektionen wurde dreimal wiederholt, was aber zu keiner Änderung der Ergebnisse führte.

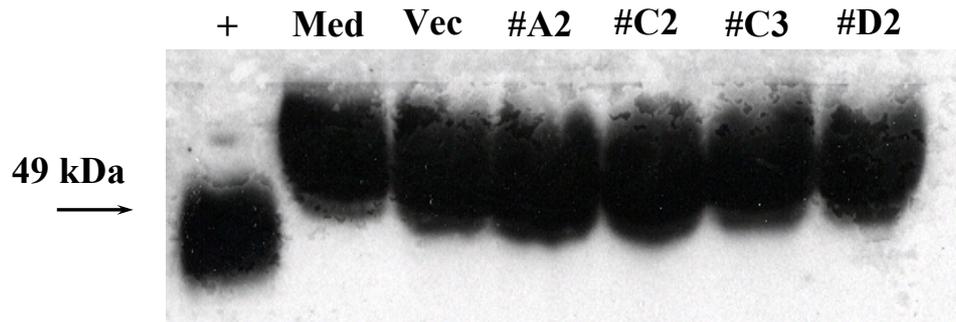


Abbildung 28: Western-Blot von Zellkulturüberständen. Als Positivkontrolle wurden 0,5 µg suPAR-Protein (+) eingesetzt. Die Verifizierung erfolgte durch mAb IIIIF10, der an Domäne I von uPAR bindet. Dieser bindet unspezifisch an im Medium befindliches Serum (FCS). **Med:** Mediumkontrolle, **Vec:** Vektor.

5. Diskussion

Das Plasminogenaktivator-System ist neben anderen proteolytischen Systemen wichtig für Wachstum und Ausbreitung von Tumoren. Die Protease uPA und ihr Zelloberflächen-assoziiertes Rezeptor uPAR beeinflussen entscheidend die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen. Nicht nur die proteolytische Funktion spielt im Tumorgeschehen eine Rolle. Bindet uPA an seinen Rezeptor, werden unterschiedliche Zellprozesse initiiert, wie Migration, Adhäsion, Proliferation und Tumorzellendifferenzierung (Andreasen et al., 1997; Schmitt et al., 1997; Reuning et al., 1998). Damit wird deutlich, dass das uPA/uPAR-System ein viel versprechendes Ziel zur Entwicklung potentieller Therapeutika darstellt. So konnte in *in vivo*-Studien der Klinischen Forschergruppe bereits gezeigt werden, dass Peptide, die von der Bindungssequenz der Protease uPA an uPAR abgeleitet sind, das Tumorwachstum signifikant reduzieren (Magdolen et al., 2001; Sato et al., 2002). Andere Mausexperimente, in denen suPAR-exprimierende Tumorzellen injiziert wurden, zeigten den „Scavenger“-Effekt von suPAR. Der lösliche Rezeptor (suPAR) bindet freien uPA, welcher dadurch nicht mehr an zellassoziierten uPAR binden kann und verringertes dadurch das Tumorwachstum (Krüger et al., 2000; Lutz et al., 2001). Der niedermolekulare uPA-Inhibitor WX-UK1 wird bereits in klinischen Studien der Phase II getestet (Pressemitteilung: <http://www.wilex.de>). Für die Entwicklung von Substanzen zur Unterbrechung der uPA/uPAR-Interaktion ist die erste Untersuchung auf ihre inhibitorische Kapazität von entscheidender Bedeutung, da man schon einen ersten Hinweis auf die Effektivität bezüglich ihrer tumorreduzierenden Wirkung bekommt. Für die Untersuchung dieser Substanzen hinsichtlich ihrer tumorreduzierenden Wirkung sollte ein analytisches System zur Verfügung stehen, das billig, einfach zu handhaben und zuverlässig ist.

5.1 Effekt der uPA-abgeleiteten Peptide auf die Inhibierung der uPA/uPAR-Interaktion

Für diese Arbeit wurden fünf zyklische, uPA-abgeleitete Peptide zum Test zur Verfügung gestellt. Dabei sollten zwei Ziele verfolgt werden. Zum einen sollten $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₁, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{28}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₁, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}2\text{-Nal}^{24}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₁, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Orn}^{23}\text{Thi}^{24}\text{Thi}^{25}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₁, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Tyr}^{25}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₁ in Hinblick auf ihre inhibitorische Kapazität untersucht werden. Von diesen Peptiden war zum Zeitpunkt der Versuche und deren ersten veröffentlichten Ergebnissen (Guthaus et al., 2002) nur $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₀ getestet und beschrieben worden (Schmiedeberg et al., 2000; Magdolen et al., 2001). Zum anderen sollte mit Hilfe dieser Peptide sowie HMW-uPA und ATF das SP-uPA-System etabliert, und mit dem bereits bewährten U937/FITC-uPA-System verglichen werden.

Bereits 1987 fanden Appella et al. heraus, dass ein lineares Peptide, dessen Sequenz vom uPAR-Bindungsbereich im uPA-Molekül (AS 18 - 32) abgeleitet ist, effektiv die Bindung von uPA an dessen Rezeptor inhibiert. Ausgehend davon folgten Untersuchungen, die feststellten, welche Aminosäuren uPA für die Bindung an den Rezeptor essentiell sind (Magdolen et al., 1996). Das ermöglichte die zielgerichtete Optimierung der Peptidsequenz und Peptidstruktur und dadurch Erhöhung der inhibitorischen Effizienz. Lineare Peptide, die von Bindungsregionen von Rezeptor-Antagonisten abgeleitet und durch systematische Analyse der für die Bindung essentiellen Aminosäuren optimiert wurden, besitzen häufig nur einen Bruchteil der Bindungseffizienz im Vergleich zum gesamten Protein. Die für eine optimale Bindung erforderliche Sekundärstruktur eines Liganden ist im Falle der linearen, sehr flexiblen Peptide nicht gegeben. Durch Einschränkung der Flexibilität der Peptide, z. B. durch Zyklisierung, wird den Peptiden eine Sekundärstruktur aufgezwungen, die im besten Fall ähnlich derer des ursprünglichen Liganden ist (Kessler 1982). Die Struktur der Bindungsregion von uPA wurde mittels NMR aufgeklärt (Hansen et al., 1994). Die Region zwischen Thr18 und Asn32 besteht aus einem flexiblen, sieben Aminosäuren langen „ ω -Loop“ (Asn22 - Ile28), der an ein doppelsträngiges, antiparalleles β -Faltblatt bindet (zwischen Thr18 - Ser21 und His29 - Asn32). Für die C-Atome von Cys19 und Cys31 im Peptidrückgrat (α -C-Atome) wurde dabei ein sehr geringer Abstand von 6,1 Å ermittelt. Die Seitenketten dieser beiden Aminosäuren sind über Disulfidbrücken mit anderen Cystein-Seitenketten verbunden (Cys11 mit Cys19, Cys13 mit Cys31). Ausgehend von diesen Erkenntnissen

wurden die beiden uPA-abgeleiteten Peptide $\text{cyclo}^{19,31}\text{-uPA}_{19-31}$ (Bürgle et al., 1997) und $\text{cyclo}^{19,31}[\text{D-Cys}^{19}]\text{-uPA}_{19-31}$ (Magdolen et al. 2001) synthetisiert, wobei die linearen Peptide über die Seitenketten von Cys19 und Cys31 zyklisiert wurden. Beide Peptide zeigten gute bis sehr gute inhibitorische Effekte. Die Peptide als Leitstruktur eingesetzt, um die Peptide durch Verkürzen des Peptidrückgrats und durch Versetzen der Disulfidbindung zu optimieren, wurden $\text{cyclo}^{21,29}\text{-uPA}_{21-30}$ und $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}]\text{-uPA}_{21-30}$ synthetisiert (Schmiedeberg et al., 2002). Diese sind von der Aminosäuresequenz AS 21 – 30 von uPA abgeleitet, und damit 3 Aminosäuren kürzer als die effektiv inhibierenden Peptide $\text{cyclo}^{19,31}\text{-uPA}_{19-31}$ und $\text{cyclo}^{19,31}[\text{D-Cys}^{19}]\text{-uPA}_{19-31}$. Die Aminosäure Ser21 wurde dabei durch Cys21 bzw. D-Cys21 ersetzt. His29 wurde durch Cys29 ersetzt, wodurch eine Zyklisierung über (D-)Cys21 und Cys29 möglich wurde. Vergleicht man die inhibitorische Aktivität von $\text{cyclo}^{19,31}\text{-uPA}_{19-31}$ mit der von $\text{cyclo}^{19,31}[\text{D-Cys}^{19}]\text{-uPA}_{19-31}$ (0,7 μM vs. 0,2 μM ; Magdolen et al., 2001) sowie die von $\text{cyclo}^{21,29}\text{-uPA}_{21-30}$ und $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}]\text{-uPA}_{21-30}$ (0,9 μM vs. 0,04 μM ; Schmiedeberg et al., 2002), wird deutlich, dass die D-Cys-Varianten einen deutlich besseren inhibitorischen Effekt zeigen. Dies ist in der Tatsache begründet, dass durch die Bindung Cys19 - Cys31, statt Cys11 – Cys19 und Cys13 – Cys31 im eigentlichen Protein, die stereochemische Orientierung des N-Terminus beeinflusst wird. Durch Ersetzen von Cys19 durch D-Cys19 bzw. Cys21 durch D-Cys21 kann diese wieder in die richtige Position für eine bessere Bindung an uPAR gebracht werden. Der bisher beste inhibitorische Effekt für ein uPA-abgeleitetes Peptid wurde für $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$ mit einem IC_{50} -Wert von 40 nM ermittelt (Schmiedeberg et al., 2000).

Für eine weitere Optimierung sollten Strukturen gefunden werden, die ähnlich gute oder noch bessere Inhibition zeigen. Außerdem sollte Stabilität gegenüber Proteasen erhöht werden, damit diese uPAR-Antagonisten längere Wirksamkeit *in vivo* besitzen. Dafür wurden bei drei in dieser Arbeit verwendeten Peptiden proteinogene gegen nicht-proteinogene Aminosäuren (Ornithin, 2-Naphthylalanin, Norleucin, Thienylalanin) ausgetauscht. Es wurden die Aminosäuren ersetzt, die sich im Alanin-Austausch als essentiell für die Bindung an uPAR herausstellten (Magdolen et al., 1996, Schmiedeberg et al., 2002): Lys23, Tyr24, Phe25 und Ile28. Allerdings sollen diese Peptide längerfristig als Leitstrukturen für Inhibitoren dienen, die auf einfacherem und vergleichsweise billigerem Wege chemisch synthetisiert werden. Dadurch werden diese resultierenden niedermolekularen Inhibitoren effektiv und stabil gegen proteolytischen Abbau sein.

Von den mittels Partikelsystem SP-uPA und U937-Zellsystem getesteten fünf Peptiden $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{28}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}2\text{-Nal}^{24}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Orn}^{23}\text{Thi}^{24}\text{Thi}^{25}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$ und $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Tyr}^{25}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$ zeigten die drei Peptide $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{28}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$ und $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}2\text{-Nal}^{24}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$ in beiden Systemen nahezu gleiche Inhibitionsverhalten mit IC_{50} -Werten von 130 nM – 200 nM mit U937-Zellen vs. 400 nM mit den Partikeln SP-uPA. Der gute inhibitorische Effekt ging durch Einführen der nicht-proteinogener Aminosäuren Norleucin und 2-Naphthylalanin nicht verloren. Allerdings konnte selbst im U937/FITC-uPA-System der bereits beschriebene, sehr niedrige IC_{50} -Wert von $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$ (0,04 μM) nicht bestätigt werden (Schmiedeberg et al., 2000). Die vergleichsweise etwa vierfache Erhöhung des IC_{50} -Wertes (150 nM) kann auf die unterschiedlichen Inkubationsbedingungen in den durchgeführten Versuchen zurückgeführt werden. Dabei besteht ein bedeutender Unterschied wohl darin, dass bei den Versuchen, in denen der IC_{50} -Wert von 0,04 μM erhalten wurde, die Peptide mit den Zellen zuerst für 45 min inkubiert wurden, und anschließend für 30 min mit FITC-uPA (Schmiedeberg et al., 2002). Im Gegensatz wurden für die hier vorliegende Arbeit Zellen, Peptide und FITC-uPA gleichzeitig für 30 min inkubiert. Unter ansonsten identischen Verhältnissen müsste sich nach ausreichend langer Zeit das Bindungsgleichgewicht einstellen, d. h. bei ausreichend langer Inkubationszeit würde man für gleichen Mengen Inhibitor, FITC-uPA und Zellen gleiche IC_{50} -Werte erhalten, unabhängig ob simultan oder nacheinander inkubiert. Auch wurde vor Einsetzen der Peptide in den FACS-Versuchen die Peptidkonzentration von Schmiedeberg et al. (2002) mittels quantitativer Aminosäureanalyse bestimmt. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Peptide wurden exakt abgewogen und in 1 x PBS gelöst, jedoch ohne anschließende, sehr aufwendige Aminosäureanalyse in den Versuchen eingesetzt. Möglicherweise hat sich das Peptid nicht vollständig gelöst, wodurch für eine Reduzierung der Fluoreszenzintensität auf 50 % der Gesamtfluoreszenz eine höhere Peptidmenge benötigt werden wäre.

Gleiches gilt für $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{28}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$ und $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}2\text{-Nal}^{24}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$ die in unabhängigen Versuchen ebenfalls getestet wurden. Die dabei erhaltenen IC_{50} -Werte von 0,06 μM für das Norleucin-Derivat und 0,08 μM für das 2-Naphthylalanin-Derivat (Schmiedeberg et al., 2002) betragen in etwa die Hälfte bis ein Drittel der im Rahmen dieser Arbeit mit den U937-Zellen erhaltenen Werte, (0,13 μM für das 2-Naphthylalanin-Derivat und 0,2 μM für das Norleucin-Derivat).

Der Austausch der Aminosäuren Lys23, Tyr24 und Phe25 durch Ornithin und Thienylalanin in $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Orn}^{23}\text{Thi}^{24}\text{Thi}^{25}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$ führte jedoch zum deutlichen, aber nicht kompletten Verlust der kompetitiven Kapazität. Im Bereich der in den Versuchen eingesetzten Konzentrationen (4 μM) konnte kein IC_{50} -Wert ermittelt werden, weder für SP-uPA noch für das U937/FITC-uPA-System. Interessanterweise führte der Austausch der aromatischen Aminosäure Phe25 durch die ebenfalls aromatische Aminosäure Tyrosin zu einem kompletten Verlust der Effektivität. Möglicherweise führt das Ersetzen der hydrophoben Seitenkette von Phenylalanin durch die hydrophilere Aminosäure Tyrosin zu einer Änderung der Sekundärstruktur des Peptids und damit zum Verlust dessen inhibitorischen Effekts.

In einem anderen zyklischen, uPA-abgeleiteten Peptid ($\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{23}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$), führte Ersetzen der hydrophilen Seitenkette von Lys23 mit endständiger NH_2 -Gruppe durch die hydrophobe Seitenkette vom Norleucin nur zu unwesentlich schlechterer inhibitorischer Effektivität in FACS-Versuchen mit U937-Zellen (Schmiedberg et al., 2002). $\text{Cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$ und das im Rahmen dieser Arbeit nicht untersuchte Norleucin-Derivat $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{23}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$ wurden bereits in *in vivo*-Versuchen auf ihren tumorreduzierenden Effekt getestet (Sato et al., 2002). Für $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{23}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$ konnte im Vorfeld für die Inhibierung der uPA/uPAR-Interaktion ein IC_{50} -Wert von 70 nM ermittelt werden. Beide Peptide zeigten in Versuchen mit Nacktmäusen signifikante Reduzierung des Wachstums vorher injizierter Tumorzellen (OM-MZ-6#8-BAG). Dabei tendiert $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-31}$ zu etwas besserer Effizienz. Es zeigten sich während der Dauer der Behandlung zwar keine ernstesten Nebenwirkungen, aber die mit dem Norleucin-Derivat behandelten Mäuse zeigten erhöhte Reizbarkeit und aggressiveres Verhalten.

5.2 uPA-Silica-Partikel (SP-uPA) zur Untersuchung von Inhibitoren der uPA/uPAR-Interaktion

Das uPA/uPAR-System ist in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus des Interesses gerückt. Protease Inhibitoren, Antikörper, rekombinanter, löslicher uPAR (suPAR) oder uPA-Analoga wie uPA-abgeleitete Peptide wurden entwickelt, um die uPA/uPAR-Interaktion zu unterbrechen und somit ins Tumorgeschehen eingreifen zu können (Crowley et al., 1993; Min

et al., 1996; Kobayashi et al., 1998; Li et al., 1998; Tressler et al., 1999; Krüger et al., 2000; Schmitt et al., 2000; Lutz et al., 2001; Mazar et al., 2001; Rabbani & Mazar 2001). Mittels Durchflusszytometrie wurden uPA-abgeleitete Peptide auf ihr inhibitorisches Potential untersucht. Dafür wurden U937-Zellen mit PMA stimuliert, um eine erhöhte Expression von uPAR anzuregen (Stoppelli et al., 1985). Durch Zugabe von Fluoreszenz-markiertem uPA und einer daraus resultierenden Erhöhung der Fluoreszenzintensität, kann die uPA/uPAR-Interaktion mittels FACS nachgewiesen werden (Schmitt et al., 1991; Chucholowski et al., 1992). Die Zugabe kompetitiver Substanzen, wie uPA, ATF oder uPA-abgeleitete Peptide, führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Fluoreszenz.

Die Methode der Durchflusszytometrie hat generell einige entscheidende Vorteile. Zum einen dauert die Messung einer einzelnen Probe nur Bruchteile von Minuten, was somit die Messung vieler Proben in einem angemessenen Zeitrahmen ermöglicht. Mit moderneren FACS-Geräten, so genannten Hochleistungs-Sortern, können heutzutage bis zu 70.000 Partikel (Zellen oder Kunststoff- bzw. Glaskugeln) pro Sekunde vermessen werden (Shapiro 2003). Beim Einsatz der Durchflusszytometrie ist die Anzahl der Proben nicht durch das Testformat limitiert. Beispielsweise sind Messungen von Proben mittels ELISA im 96-well-Format durch die Platte limitiert. Eine optimale Ausnutzung der gesamten ELISA-Platte gelingt nur in den seltensten Fällen, was einen Einfluss auf Kosten des Tests hat. Zum anderen beinhaltet die Messung einer Probe mittels FACS, je nach Definition der Messparameter, mehrere tausend Einzelmessungen. Einzelne Zellen oder Partikel, und damit auch die Target-Moleküle in einer Zelle bzw. auf einer Zelle oder einem Partikel, werden detektiert. Die gemessenen Fluoreszenzwerte sind über die Anzahl der Einzelmessungen gemittelt. Eine Doppelbestimmung im ELISA, wobei das Target-Molekül auf der Platte immobilisiert wurde, entspricht der Messung zweier Partikel oder Zellen mittels FACS. Eine optimale Messung gleicher Proben mittels Durchflusszytometrie im Vergleich zu einer Messung im ELISA hat bedeutend mehr Aussagekraft.

Werden Zellen in den Messungen eingesetzt, die in definierter Weise das Target-Molekül inner- oder außerhalb der Zelle exprimieren, ist eine erfolgreiche Messung von sehr vielen Faktoren abhängig. Es kann nicht garantiert werden, dass der Zustand der Zellen bei unterschiedlichen Messungen nahezu identisch ist. Nur innerhalb einer Messung, bei der Zellen einer Ernte eingesetzt werden, kann bei den einzelnen Proben von gleichen Bedingungen ausgegangen werden. Ersetzt man Zellen durch Partikel, bei denen das Target-

Molekül auf der Partikeloberfläche gebunden ist, umgeht man die Probleme, die beim Einsatz von Zellen auftreten. Wird eine größere Menge von Partikeln mit dem Zielprotein beschichtet und anschließend funktionell getestet, kann eine gleich bleibende Qualität der Partikel gesichert werden. Es entfällt außerdem die zeitaufwendige Zellkultur mit 72 h Wachstum und anschließender Ernte der Zellen zur Vorbereitung jeden einzelnen Versuchs. Die Vorteile der Durchflusszytometrie werden genutzt, wobei die Nachteile der Kultivierung von Zellen vermieden werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Silikatpartikel eingesetzt, die auf ihrer Oberfläche aktivierbare COOH-Gruppen besitzen. Durch Aktivierung der Carboxyl-Gruppen mit EDC und NHS war eine kovalente Bindung von Proteinen über deren freie NH₂-Gruppen möglich (Guthaus et al., 2002). Eine kovalente Bindung von Proteinen erfolgte über die NH₂-Gruppe am N-terminalen Ende des Proteins oder über die NH₂-Gruppen der Seitenkette der Aminosäuren Lysin des uPA-Moleküls. Silikat-Partikel sind im wässrigen Puffersystem sehr stabil und ließen sich aufgrund ihrer Dichte von 2 g/cm³ sehr leicht durch Zentrifugation oder Sedimentation von der flüssigen Phase abtrennen. Das erleichterte die Waschschriffe während der Kopplung und zwischen den einzelnen Inkubationsschritten während des Versuchs, und verringerte den dabei auftretenden Verlust von Partikeln.

Für einen direkten Vergleich des Partikelsystems zum Zellsystem wurde in den ersten Tests versucht, den aus CHO-Zellkulturüberständen aufgereinigten suPAR kovalent auf die Partikel zu binden, um mit FITC-markiertem uPA die uPA/uPAR-Bindung zu verifizieren. Damit hätten die Partikel größere Ähnlichkeit zu den eingesetzten U937-Zellen, da sowohl die Zellen als auch die Partikel uPAR bzw. suPAR direkt auf ihrer Oberfläche tragen. Allerdings war unspezifisch und kovalent gebundener suPAR nicht in der Lage, uPA zu binden. Interessanterweise konnte in anderen Analytiksystemen, ELISA und SPR, suPAR sehr wohl so immobilisiert werden, dass er noch in der Lage war, seinen natürlichen Liganden uPA zu binden (Rettenberger et al., 1995; List et al., 1999; Ploug et al., 2001). Selbst die kovalente, unspezifische Bindung von suPAR auf den CM5-Sensorchip führte nicht zum Verlust der Fähigkeit, uPA zu binden (List et al., 1999). Es wurde im nächsten Schritt versucht, uPA kovalent auf die Partikel zu binden und durch Zugabe des löslichen Rezeptors die uPA/uPAR-Bindung zu verifizieren. Mittels FACS-Analyse und CLSM konnte gezeigt werden, dass uPA auf den Partikeln nachweisbar und in der Lage ist, zugegebenen suPAR zu binden.

Die kovalente Bindung von uPA auf die Partikel erfolgte „zufällig“, d.h. die aktivierten COOH-Gruppen der Silikat-Partikel binden an jegliche freie NH₂-Gruppen vom uPA. Somit kann davon ausgegangen werden, dass ein Teil des uPA genau so an die Partikel gebunden ist, das es nicht mehr in der Lage ist, suPAR zu binden. Die 411 Aminosäuren langen Proteinsequenz von uPA (Ricco et al., 1985) enthält insgesamt 26 Aminosäuren Lysin, die neben dem N-Terminus potentielle Bindungsstellen repräsentieren. So befindet sich im uPAR-Bindungsbereich von uPA ein Lysin (Lys23), das für die Bindung an den Rezeptor entscheidend ist, und dessen Blockierung die Bindung von suPAR definitiv verhindert (Magdolen et al., 1996). Aufgrund der Größe des uPA-Moleküls dürfte die Bindung der COOH-Gruppen der Partikel an ein Lysin in räumlicher Nähe des uPAR-Bindungsbereichs (z. B. Lys35 und Lys36) aufgrund sterischer Hinderung zu einer Beeinträchtigung der suPAR-Anbindung führen. Die Menge an Partikel-gebundenem uPA, das suPAR binden kann, ist aber dennoch ausreichend für die Funktion dieses analytischen Systems. Werden mit uPA-gekoppelte Silikat-Partikel mit suPAR inkubiert, kann diese Interaktion durch Zugabe von monoklonalem Antikörper HD13.1 gegen uPAR und cy5-markiertem Sekundärantikörper mittels FACS nachgewiesen werden.

5.3 Vergleich von SP-uPA mit dem U937-Zellsystem

Trotz der großen Unterschiede beider Systeme wurden für die eingesetzten kompetitiven Substanzen überraschend ähnliche Resultate mit beiden Systemen erzielt. Beim Versuch, Zellen durch Partikel zu ersetzen, und den dabei auftretenden Problemen bei der Immobilisierung von suPAR, brachte man durch die direkte Bindung von uPA an die Partikel den ersten entscheidenden Unterschied in das Partikel-basierende System. Im Vergleich zum U937-Zellsystem, wo die Anzahl der uPAR-Moleküle auf der Zelloberfläche nach Stimulation mit PMA nach 72 h auf das mehr als 100-fache auf ca. 800.000 pro Zelle ansteigt (Picone et al., 1989), ist für Partikelsystem uPA immobilisiert. Wird zur Verifizierung der uPA/uPAR-Interaktion im U937-Zellsystem FITC-markiertes uPA zugegeben, weist man die Bindung von suPAR an SP-uPA durch Zugabe von monoklonalem Antikörper HD13.1 nach. Dessen Anbindung an suPAR wird durch Zugabe von cy5-markiertem, speziesspezifischem Sekundärantikörper und einem daraus resultierenden Anstieg der Partikel-assoziierten Fluoreszenzintensität mittels FACS verifiziert.

Der uPA-Rezeptor wurde 1985 u. a. auf U937-Zellen das erste Mal entdeckt und beschrieben (Stoppelli et al., 1985). Bereits vier Jahre später wurde der stimulierende Effekt von PMA auf die Expression von uPAR auf U937-Zellen beschrieben (Picone et al., 1989). Schmitt et al. (1991) wiesen uPAR auf U937 Zellen mittels FACS und CLSM durch Zugabe von FITC-markiertem pro-uPA nach. Das U937/FITC-uPA System wird seitdem verwendet, um die Bindungs-unterbrechende Wirkung potentieller uPA/uPAR-Inhibitoren zu untersuchen (Bürgle et al., 1997; Magdolen et al., 2001; Guthaus et al., 2002; Sato et al., 2002; Schmiedeberg et al., 2002). Das seit langem und sehr gut etablierte Analytiksystem besitzt einen Vorteil: Durch Bindung über den GPI-Anker auf die Zelloberfläche ist der N-Terminus mit der uPA-Bindungsstelle von uPAR optimal ausgerichtet, Fluoreszenz-markiertes uPA und andere, von uPA abgeleitete Liganden zu binden. Im Gegensatz dazu ist im Partikelsystem SP-uPA uPA unspezifisch an die Partikeloberfläche gekoppelt, und nur ein Teil des gebundenen Proteins kann suPAR binden. Zielgerichtete und selektive Bindung von uPA oder dessen Derivaten an die Partikel könnte zu einer Reduzierung der Kosten führen, da dabei nur ein Bruchteil der bisher gebundenen Menge uPA benötigt wird, um gleiche Mengen suPAR zu binden und damit gleiche Effektivität zu erzielen.

Beim Test der potentiellen Inhibitoren der uPA/uPAR-Bindung in beiden Systemen wurden keine wesentlichen Unterschiede festgestellt. Die natürlichen uPAR-Liganden HMW-uPA und ATF inhibieren am besten in beiden Systemen die uPA/uPAR-Interaktion im niedrigen nanomolaren Bereich. Das zyklische, uPA-abgeleitete Peptid $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₀ und dessen Naphthylalanin- und Norleucin-Derivate inhibieren sehr effektiv im ähnlichen nanomolaren Bereich, wobei die im U937/FITC-uPA-System ermittelten IC₅₀-Werte (130 – 200 nM) kleiner sind, als die mittels SP-uPA (400 nM) ermittelten. Im U937-Zellsystem inhibierte $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{28}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₀ geringfügig schlechter als $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₁ und $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{2-Nal}^{24}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₁. Im Partikelsystem zeigte $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₁ bei gleichem IC₅₀-Wert unwesentlich schlechtere Inhibition.

Generell konnte festgestellt werden, dass im Partikelsystem höhere Mengen an uPA-abgeleiteten Peptiden eingesetzt werden mussten als im U937-Zellsystem, um eine Reduzierung der Fluoreszenzintensität auf 50 % der Gesamtfluoreszenz zu erhalten. Ein Grund dafür liegt in der PMA-Stimulierung der U937-Zellen. Die daraus resultierende Erhöhung der Anzahl der uPAR-Moleküle ist einhergehend mit einer Reduzierung der uPA-

Bindungsaffinität von uPAR (Nielsen et al., 1988; Picone et al., 1989). Des Weiteren muss ein uPAR-Antagonist die Anbindung von FITC-markiertem uPA verhindern. Die Derivatisierung von uPA mit FITC erfolgte über freie NH₂-Gruppen im Molekül, so auch über die Seitenkette von Lys23 im uPAR-Bindungsbereich, wodurch die Bindungsaffinität von FITC-uPA im Vergleich zum unmarkierten Protein reduziert ist (Schmitt et al., 1991). Eine reduzierte Affinität von uPAR und die Derivatisierung des Liganden uPA im uPAR-Bindungsbereich haben eine schwächere Interaktion zur Folge, die mit dementsprechend geringerer Menge an Inhibitor unterbrochen werden konnte. Damit repräsentiert das Partikelsystem SP-uPA eher die natürliche uPA/uPAR-Bindung, da ein Teil des immobilisierten uPA den uPAR-Bindungsbereich bereitstellt und suPAR mit uneingeschränkter Bindungsaffinität zugegeben wurde.

5.4 Transfektion humaner Ovarialkarzinomzellen mit His-suPAR-kodierender Plasmid-DNA

Für die Funktion des SP-uPA-System sind folgende Komponenten notwendig: oberflächenaktivierbare Silicat-Partikel, HMW-uPA, suPAR, HD13.1 oder alternativer Antikörper gegen uPAR und Fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper. Die Bereitstellung der einzelnen Komponenten ist, von suPAR abgesehen, relativ unproblematisch. Die Silicat-Partikel können kommerziell z. B. von der Firma Micromod Partikeltechnologie GmbH bezogen werden. Humanes HMW-uPA wird von unterschiedlichen Firmen zur Thrombolyse-Therapie angeboten. Für die Etablierung des SP-uPA-Systems wurde auf Actosolv der Firma Marion Roussel, Frankfurt zurückgegriffen. Diesem Medikament wurde kein Serum zugesetzt, das die spätere Kopplung von uPA an die Partikel störend beeinflusste. Der hier verwendete monoklonale Antikörper HD13.1 gegen uPAR wurde aus Zellkulturüberständen aufgereinigt. Alternativ könnte auch ein kommerziell erhältlicher Antikörper eingesetzt werden, wobei getestet werden muss, ob der Ersatz von HD13.1 einen Einfluss auf die Effektivität von SP-uPA hat. Gleiches gilt auch für den hier verwendeten Cy5-markierten Sekundärantikörper, der bereits kommerziell bezogen wurde.

Die Bereitstellung der löslichen Variante von uPAR gestaltete sich dahingegen weitaus schwieriger. Neben der sehr zeit- und materialaufwendigen Kultivierung suPAR-exprimierender Zellen ist die Aufreinigung von suPAR über Affinitätschromatographie auf

lange Sicht sehr teuer. Durch die extremen Elutionsbedingungen (pH 2,5) verliert das an Agarose-gekoppelte uPA mit der Zeit seine suPAR-Bindungsaffinität. Da uPA mit sehr hoher Affinität (K_d 0,5 nM) an uPAR bindet (Ellis et al., 1995), werden durch Elution nicht alle uPAR-Moleküle von der Säule entfernt. Es müssten ständig neue uPA-Säulen bereitgestellt werden. Diese Problematik würde mit der Generierung His-suPAR exprimierender Zellen umgangen werden, da der „His-Tag“ am C-terminalen Ende des suPAR-Proteins die Bindung an uPA nicht beeinflusst. Die Aufreinigung *via* Ni-NTA-Chromatographie unter sehr milden Bedingungen (pH 7,4 und Elution mit 0,2 M Imidazol) ist eine einfache und kommerziell gut etablierte Methode (Petty 1996). Der „His-Tag“ wird auch spezifisch von verschiedenen Antikörpern als Epitop erkannt, welche von verschiedenen Firmen (z. B. Qiagen, Hilden und Invitrogen, Karlsruhe) vertrieben. Damit würde sich eine weitere Variation des Partikelsystems SP-uPA ergeben. Die Anbindung von His-suPAR an SP-uPA könnte durch Inkubation mit einem Anti-„His-Tag“-Antikörper detektiert werden.

Für die Generierung His-suPAR-exprimierender OV-MZ-6#8-Zellen wurde von früheren Arbeiten von Lutz et al. (2001) und Krüger et al. (2000) ausgegangen, die Herstellung von suPAR-exprimierenden OV-MZ-6#8 Zellen beschrieben haben. Dabei wurde für die Klonierung der Expressionsvektor pRc/RSV von Invitrogen verwendet. Da für die Klonierung einer His-suPAR-kodierender Plasmid-DNA und für deren anschließende Transfektion in humane Ovarialkarzinomzellen kommerziell kein passender Expressionsvektor erhältlich war, wurde eigens dafür ein Klonierungskonzept entwickelt. Für die Transfektion in humane OV-MZ-6#8-Zellen wurde der Expressionsvektor pRc/CMV2 verwendet, der den sehr starken Promoter des Cytomegalo-Virus besitzt, und damit speziell für Protein-Überexpressionen geeignet ist.

Nach Transfektion von pRc/CMV2-His-suPAR in OV-MZ-6#8-Zellen konnte keine Expression von His-suPAR nachgewiesen werden, weder im Überstand noch in den Lysaten der „His-suPAR“-Klone. Mehrmaliges Wiederholen der Transfektion führte zu keiner Veränderung der Resultate. Mittels Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass die His-suPAR-kodierende cDNA-Sequenz, die aus *E.coli*-Klon #14 isoliert wurde, nicht mutiert ist. Es muss auch davon ausgegangen werden, dass die Plasmid-DNA in den Zellen vorliegt, d. h. die Transfektion der Plasmid-DNA in OV-MZ6#8 erfolgreich war. Unter Antibiotika-Selektion (G418) konnten Zellen kultiviert werden, die das Plasmid mit Resistenz-Gen tragen. Diese überlebten im Gegensatz zu nicht-transfizierten Zellen. Eine komplette Sequenzierung

der Plasmid-DNA pRc/CMV2-His-suPAR oder zumindest die Sequenzierung der Promotorregion könnte weitere Aufschlüsse über die Fehlerquelle geben. Ausbleibende Proteinexpression könnte auf einen nicht funktionierenden Promoter zurückzuführen sein. Alternativ müsste die Ligation von His-suPAR-kodierender DNA in den Expressionsvektor pRc/CMV2 und die anschließende Transformation in *E.coli* wiederholt werden.

Eine Klonierung His-suPAR-kodierender Plasmid-DNA und die anschließende Generierung His-suPAR-exprimierender Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt. Inzwischen kann von der Firma R&D Systems, Minneapolis, USA rekombinanter suPAR mit C-terminalem „His-Tag“ kommerziell erworben werden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Neben seiner Rolle als proteolytisches System bei der Plasminogenaktivierung und dem daraus resultierenden Abbau der Extrazellulären Matrix (EZM), initiiert die uPA/uPAR-Interaktion die Migration, Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Tumorzellen. Damit ist das Plasminogenaktivator-System in den Mittelpunkt des Interesses für die Entwicklung tumorreduzierender Substanzen gerückt. uPA repräsentiert eine interessante Zielstruktur, denn uPA-abgeleitete Peptide sind nicht nur effektive Inhibitoren der uPA/uPAR-Interaktion, sondern reduzieren nachweislich das Tumorwachstum *in vivo*.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die uPA-abgeleiteten Peptide $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₁, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{28}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₁, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Orn}^{23}\text{Thi}^{24}\text{Thi}^{25}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₁, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}2\text{-Nal}^{24}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₁ und $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Tyr}^{25}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₁ auf ihr inhibitorisches Potential untersucht. Diese Peptide, sowie HMW-uPA und ATF wurden im neu etablierten Partikelsystem SP-uPA getestet und die dabei erhaltenen IC₅₀-Werte mit den Werten verglichen, die unter nahezu gleichen Bedingungen mit dem U937/FITC-uPA-System ermittelt wurden. Dabei konnten keine wesentlichen Unterschiede für beide Systeme festgestellt werden. Die natürlichen uPAR-Liganden HMW-uPA und ATF zeigten die besten inhibitorischen Effekte in beiden Systemen. Die IC₅₀-Werte für die sehr gut inhibierenden Peptide $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₁, $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Nle}^{28}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₁ und $\text{cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}2\text{-Nal}^{24}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₁ liegen im annähernd gleichen nanomolaren Bereich. $\text{Cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Orn}^{23}\text{Thi}^{24}\text{Thi}^{25}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₁ zeigt einen reduzierten kompetitiven Effekt, aber innerhalb der in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen (> 4000 nM) konnte kein IC₅₀-Wert ermittelt werden. $\text{Cyclo}^{21,29}[\text{D-Cys}^{21}\text{Tyr}^{25}\text{Cys}^{29}]$ -uPA₂₁₋₃₁ ist in beiden Systemen ohne jegliches inhibitorisches Potential.

Es konnte gezeigt werden, dass SP-uPA ein sehr gut funktionierendes und leicht handhabbares analytisches System zur Untersuchung kompetitiver Substanzen der uPA/uPAR-Bindung darstellt. Es vereinigt die Vorteile FACS-basierender Messungen und vermeidet gleichzeitig die zeitaufwendige und kostenintensive Kultivierung von im Test einzusetzenden Zellen. Damit wurde eine neue, sehr gute Methode zum schnellen Screening potentieller Therapeutika entwickelt. Ausgehend von SP-uPA können für jede Rezeptor/Ligand- bzw. Protein/Protein-Interaktion Partikel-basierende Testsysteme entwickelt werden.

Im gegebenen Zeitrahmen dieser Arbeit konnten His-suPAR-exprimierende OV-MZ-6#8-Zellen nicht bereitgestellt werden. Die Etablierung dieser Zelllinien hätte das etablierte SP-uPA-System erweitern und vereinfachen können. Der benötigte lösliche Rezeptor (suPAR) könnte in einer Variante mit einer zusätzlichen Aminosäuresequenz von sechs Aminosäuren Histidin am C-terminalen Ende eingesetzt werden. Bisherige Aufreinigungsprobleme würden dabei vermieden.

7. Literatur

- Abraham, R., Buxbaum, S., Link, J., Smith, R., Venti, C., Darsley, M. (1996). Determination of binding constants of diabodies directed against prostate-specific antigen using electrochemiluminescence-based immunoassays. *J Mol Recognit* **9**, 456-461.
- Andreasen, P. A., Kjøller, L., Christensen, L., Duffy, M. J. (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review. *Int J Cancer* **72**, 1-22.
- Andreasen, P. A., Sottrup-Jensen, L., Kjøller, L., Nykjaer, A., Moestrup, S. K., Petersen, C. M., Gliemann, J. (1994). Receptor-mediated endocytosis of plasminogen activators and activator/inhibitor complexes. *FEBS Lett* **338**, 239-245.
- Antalis, T. M., Clark, M. A., Barnes, T., Lehrbach, P. R., Devine, P. L., Schevzov, G., Goss, N. H., Stephens, R. W., Tolstoshev, P. (1988). Cloning and expression of a cDNA coding for a human monocyte-derived plasminogen activator inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 985-989.
- Appella, E., Robinson, E. A., Ullrich, S. J., Stoppelli, M. P., Corti, A., Cassani, G., Blasi, F. (1987). The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases. *J Biol Chem* **262**, 4437-4440.
- Behrendt, N., Ploug, M., Patthy, L., Houen, G., Blasi, F., Danø, K. (1991). The ligand-binding domain of the cell surface receptor for urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem* **266**, 7842-7847.
- Behrendt, N., Rønne, E., Dønno, K. (1996). Domain interplay in the urokinase receptor. Requirement for the third domain in high affinity ligand binding and demonstration of ligand contact sites in distinct receptor domains. *J Biol Chem* **271**, 22885-22894.
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.

- Blasi, F., Carmeliet, P. (2002). uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 932-943.
- Bouchet, C., Spyrtatos, F., Martin, P. M., Hacene, K., Gentile, A., Oglobine, J. (1994). Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitors PAI-1 and PAI-2 in breast carcinomas. *Br J Cancer* **69**, 398-405.
- Bürgle, M., Koppitz, M., Riemer, C., Kessler, H., König, B., Weidle, U. H., Kellermann, J., Lottspeich, F., Graeff, H., Schmitt, M., Goretzki, L., Reuning, U., Wilhelm, O., Magdolen, V. (1997). Inhibition of the interaction of urokinase-type plasminogen activator (uPA) with its receptor (uPAR) by synthetic peptides. *Biol Chem* **378**, 231-237.
- Carrell RW, Stein PE. (1995). What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease? *Nat Struct Biol* **2**, 96-113.
- Carson, R. T., Vignali, D. A. (1999). Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J Immunol Methods* **227**, 41-52.
- Chapman, H. A. Jr., Vavrin, Z., Hibbs, J. B. Jr. (1982). Macrophage fibrinolytic activity: identification of two pathways of plasmin formation by intact cells and of a plasminogen activator inhibitor. *Cell* **28**, 653-662.
- Chucholowski, N., Schmitt, M., Goretzki, L., Schüren, E., Moniwa, N., Weidle, U., Kramer, M., Wagner, B., Jänicke, F., Graeff, H. (1992). Flow cytofluorometry in tumour cell receptor analysis. Survey of the literature and recent developments concerning the urokinase-type plasminogen activator (uPA). *Biochem Soc Trans* **20**, 208-216.
- Conese, M., Blasi, F. (1995). The urokinase/urokinase-receptor system and cancer invasion. *Baillieres Clin Haematol* **8**, 365-389.
- Crowley, C. W., Cohen, R. L., Lucas, B. K., Liu, G., Shuman, M. A., Levinson, A. D. (1993). Prevention of metastasis by inhibition of the urokinase receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 5021-5025.

- Cubellis, M. V., Andreasen, P., Ragno, P., Mayer, M., Danø, K., Blasi, F. (1989). Accessibility of receptor-bound urokinase to type-1 plasminogen activator inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 4828-4832.
- Cubellis, M. V., Wun, T. C., Blasi, F. (1990). Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *EMBO J* **9**, 1079-1085.
- Danø, K., Andreasen, P. A., Grøndahl-Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen, L. S., Skriver, L. (1985). Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. *Adv Cancer Res* **44**, 139-266.
- Del Rosso, M., Dini, G., Fibbi, G. (1985). Receptors for plasminogen activator, urokinase, in normal and Rous sarcoma virus-transformed mouse fibroblasts. *Cancer Res* **45**, 630-636.
- Deng, G., Royle, G., Wang, S., Crain, K., Loskutoff, D. J. (1995). Structural and functional analysis of the plasminogen activator inhibitor-1 binding motif in the somatomedin B domain of vitronectin. *J Biol Chem* **271**, 12716-12723.
- De Witte, H., Sweep, F., Brüner, N., Heuvel, J., Beex, L., Grebenschikov, N., Benraad, T. (1998). Complexes between urokinase-type plasminogen activator and its receptor in blood as determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Int J Cancer* **77**, 236-242.
- Dougherty, K. M., Pearson, J. M., Yang, A. Y., Westrick, R. J., Baker, M. S., Ginsburg, D. (1999). The plasminogen activator inhibitor-2 gene is not required for normal murine development or survival. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 686-691.
- Duffy, M. J., O'Grady, P., Devaney, D., O'Siorain, L., Fennelly, J. J., Lijnen, H. J. (1988). Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report. *Cancer* **62**, 531-533.

- Duval-Jobe, C., Parmely, M. J. (1994). Regulation of plasminogen activation by human U937 promonocytic cells. *J Biol Chem* **269**, 21353-21357.
- Edelstein, R. L., Tamanaha, C. R., Sheehan, P. E., Miller, M. M., Baselt, D. R., Whitman, L. J., Colton, R. J. (2000). The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents. *Biosens Bioelectron* **14**, 805-813.
- Ehrlich, H. J., Keijer, J., Preissner, K. T., Gebbink, R. K., Pannekoek, H. (1991). Functional interaction of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and heparin. *Biochemistry* **30**, 1021-1028.
- Ellis, V. (1996). 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**, 14779-14784.
- Ellis, V., Ploug, M., Plesner, T., Danø, K. (1995). Gene expression and function of the cellular receptor for u-PA (uPAR). In *Fibrinolysis and Disease: Molecular and Hemovascular aspects of Fibrinolysis* (P. Glas-Greenwalt, Ed.), pp. 30-42. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ellis, V., Scully, M. F., Kakkar, V. V. (1989). Plasminogen activation initiated by single-chain urokinase-type plasminogen activator: potentiation by U937 monocytes. *J Biol Chem* **264**, 2185-2188.
- Ellis, V., Wun, T. C., Behrendt, N., Rønne, E., Danø, K. (1990). Inhibition of receptor-bound urokinase by plasminogen-activator inhibitors. *J Biol Chem* **265**, 9904-9908.
- Engelholm, L. H., Behrendt, N. (2001). Differential binding of urokinase and peptide antagonists to the urokinase receptor: evidence from characterization of the receptor in four primate species. *Biol Chem* **382**, 435-442.
- Estelles, A., Gilabert, J., Aznar, J., Loskutoff, D. J., Schleef, R. R. (1989). Changes in the plasma levels of type 1 and type 2 plasminogen activator inhibitors in normal pregnancy and in patients with severe preeclampsia. *Blood* **74**, 1332-1338.

- Fischer, K., Lutz, V., Wilhelm, O., Schmitt, M., Graeff, H., Heiss, P., Nishiguchi, T., Harbeck, N., Kessler, H., Luther, T., Magdolen, V., Reuning, U. (1998). Urokinase induces proliferation of human ovarian cancer cells: characterization of structural elements required for growth factor function. *FEBS Lett* **438**, 101-105.
- Foekens, J. A., Buessecker, F., Peters, H. A., Krainick, U., van Putten, W.L., Look, M. P., Klijn, J. G., Kramer, M. D. (1995). Plasminogen activator inhibitor-2: prognostic relevance in 1012 patients with primary breast cancer. *Cancer Res* **55**, 1423-1427.
- Foekens, J. A., Peters, H. A., Look, M. P., Portengen, H., Schmitt, M., Kramer, M. D., Brünner, N., Jänicke, F., Meijer-van Gelder, M. E., Henzen-Logmans, S. C., van Putten, W. L., Klijn, J. G. (2000). The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res* **60**, 636-643.
- Gårdsvoll, H., Danø, K., Ploug, M. (1999). Mapping part of the functional epitope for ligand binding on the receptor for urokinase-type plasminogen activator by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **274**, 37995-38003.
- Goodson, R. J., Doyle, M. V., Kaufman, S. E., Rosenberg, S. (1994). High-affinity urokinase receptor antagonists identified with bacteriophage peptide display. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 7129-7133.
- Goretzki, L., Schmitt, M., Mann, K., Celvete, J., Chucholowski, N., Kramer, M., Günzler, W. A., Jänicke, F., Graeff, H. (1992). Effective activation of the pro-enzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. *FEBS Letters* **297**, 112-118.
- Günzler, W. A., Steffens, G. J., Otting, F., Kim, S. M., Frankus, E., Flohe, L. (1982). The primary structure of high molecular mass urokinase from human urine. The complete amino acid sequence of the A chain. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **363**, 1155-1165.

- Guthaus, E., Bürgle, M., Schmiedeberg, N., Hocke, S., Eickler, A., Kramer, M. D., Sweep, C. G. J. F., Magdolen, V., Kessler, H., Schmitt, M. (2002). uPA-silica-Particles (SP-uPA): a novel analytical system to investigate uPA-uPAR interaction and to test synthetic uPAR antagonists as potential cancer therapeutics. *Biol Chem* **383**, 207-216.
- Hansen, A. P., Petros, A. M., Meadows, R. P., Fesik, S. W. (1994). Backbone dynamics of a two-domain protein: ¹⁵N relaxation studies of the amino-terminal fragment of urokinase-type plasminogen activator. *Biochemistry* **33**, 15418-15424.
- Herz, J., Clouthier, D. E., Hammer, R. E. (1992). LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* **71**, 411-421.
- Høyer-Hansen, G., Rønne, E., Solberg, H., Behrendt, N., Ploug, M., Lund, L. R., Ellis, V., Danø, K. (1992). Urokinase plasminogen activator cleaves its cell surface receptor releasing the ligand-binding domain. *J Biol Chem* **267**, 18224-18229.
- Ichinose, A., Fujikawa, K., Suyama, T. (1986). The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. *J Biol Chem* **261**, 3486-3489.
- Jänicke, F., Schmitt, M., Pache, L., Ulm, K., Harbeck, N., Höfler, H., Graeff, H. (1993). Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **24**, 195-208.
- Kessler, H. (1982). Conformation and biological activity of cyclic peptides. *Angew Chem Int Ed* **21**, 512-523.
- Kobayashi, H., Schmitt, M., Goretzki, L., Chucholowski, N., Calvette, J., Kramer, M., Günzler, W. A., Jänicke, F., Graeff, H. (1991). Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA). *J Biol Chem* **266**, 5147-5152.

- Kobayashi, H., Sugino, D., She, M. Y., Ohi, H., Hirashima, Y., Shinohara, H., Fujie, M., Shibata, K., Terao, T. (1998). A bifunctional hybrid molecule of the amino-terminal fragment of urokinase and domain II of bikunin efficiently inhibits tumor cell invasion and metastasis. *Eur J Biochem* **253**, 817-826.
- Krätzschmar, J., Haendler, B., Kojima, S., Rifkin, D. B., Schleuning, W. D. (1993). Bovine urokinase-type plasminogen activator and its receptor: cloning and induction by retinoic acid. *Gene* **125**, 177-183.
- Kristensen, P., Eriksen, J., Blasi, F., Danø, K. (1991). Two alternatively spliced mouse urokinase receptor mRNAs with different histological localization in the gastrointestinal tract. *J Cell Biol* **115**, 1763-1771.
- Krüger, A., Soeltl, R., Lutz, V., Wilhelm, O. G., Magdolen, V., Rojo, E. E., Hantzopoulos, P. A., Graeff, H., Gänsbacher, B., Schmitt, M. (2000). Reduction of breast carcinoma tumor growth and lung colonization by overexpression of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87). *Cancer Gene Ther* **7**, 292-299.
- Kruithof, E. K., Baker, M. S., Bunn, C. L. (1995). Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood* **86**, 4007-4024.
- Kuckuck, F. W., Edwards, B. S., Sklar, L. A. (2001). High throughput flow cytometry. *Cytometry* **44**, 83-90.
- Lahteenmaki, K., Kuusela, P., Korhonen, T. K. (2001). Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 531-552.
- Laiho, M., Saksela, O., Keski-Oja, J. (1987). Transforming growth factor-beta induction of type-1 plasminogen activator inhibitor. Pericellular deposition and sensitivity to exogenous urokinase. *J Biol Chem* **262**, 17467-17474.
- Lau, H. K., Kim, M. (1994). Soluble urokinase receptor from fibrosarcoma HT-1080 cells. *Blood Coagul Fibrinolysis* **5**, 473-478.

- Li, H., Lu, H., Griscelli, F., Opolon, P., Sun, L. Q., Ragot, T., Legrand, Y., Belin, D., Soria, J., Soria, C., Perricaudet, M., Yeh, P. (1998). Adenovirus-mediated delivery of a uPA/uPAR antagonist suppresses angiogenesis-dependent tumor growth and dissemination in mice. *Gene Ther* **5**, 1105-1113.
- Liang, O. D., Chavakis, T., Kanse, S. M., Preissner, K. T. (2001). Ligand binding regions in the receptor for urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem* **276**, 28946-28953.
- List, K., Høyer-Hansen, G., Rønne, E., Danø, K., Behrendt, N. (1999). Different mechanisms are involved in the antibody mediated inhibition of ligand binding to the urokinase receptor: a study based on biosensor technology. *J Immunol Methods* **222**, 125-133.
- Look, M. P., van Putten, W. L., Duffy, M. J., Harbeck, N., Christensen, I. J., Thomssen, C., Kates, R., Spyrtos, F., Ferno, M., Eppenberger-Castori, S., Sweep, C. G., Ulm, K., Peyrat, J. P., Martin, P. M., Magdelenat, H., Brüner, N., Duggan, C., Lisboa, B. W., Bendahl, P. O., Quillien, V., Daver, A., Ricolleau, G., Meijer-van Gelder, M.E., Manders, P., Fiets, W. E., Blankenstein, M. A., Broet, P., Romain, S., Daxenbichler, G., Windbichler, G., Cufer, T., Borstnar, S., Kueng, W., Beex, L. V., Klijn, J. G., O'Higgins, N., Eppenberger, U., Jänicke, F., Schmitt, M., Foekens, J. A. (2002). Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients *J Natl Cancer Inst* **94**, 116-128.
- Luther, T., Magdolen, V., Albrecht, S., Kasper, M., Riemer, C., Kessler, H., Graeff, H., Müller, M., Schmitt, M. (1997). Epitope-mapped monoclonal antibodies as tools for functional and morphological analyses of the human urokinase receptor in tumor tissue. *Am J Pathol* **150**, 1231-1244.
- Lutz, V., Reuning, U., Krüger, A., Luther, T., von Steinburg, S. P., Graeff, H., Schmitt, M., Wilhelm, O. G., Magdolen, V. (2001). 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**, 789-798.

- Magdolen, V., Bürgele, M., de Prada, N. A., Schmiedeberg, N., Riemer, C., Schroeck, F., Kellermann, J., Degitz, K., Wilhelm, O. G., Schmitt, M., Kessler, H. (2001). 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**, 1197-1205.
- Magdolen, V., Rettenberger, P., Koppitz, M., Goretzki, L., Kessler, H., Weidle, U. H., König, B., Graeff, H., Schmitt, M., Wilhelm, O. (1996). Systematic mutational analysis of the receptor-binding region of the human urokinase-type plasminogen activator. *Eur J Biochem* **237**, 743-751.
- Magdolen, V., Rettenberger, P., Lopens, A., Oi, H., Lottspeich, F., Kellermann, J., Creutzburg, S., Goretzki, L., Weidle, U. H., Wilhelm, O. (1995). Expression of the human urokinase-type plasminogen activator receptor in *E. coli* and Chinese hamster ovary cells: purification of the recombinant proteins and generation of polyclonal antibodies in chicken. *Electrophoresis* **16**, 813-816.
- Mazar, A. P. (2001). The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) as a target for the diagnosis and therapy of cancer. *Anticancer Drugs* **12**, 387-400.
- Min, H. Y., Doyle, L. V., Vitt, C. R., Zandonella, C. L., Stratton-Thomas, J. R., Shuman, M. A., Rosenberg, S. (1996). Urokinase receptor antagonists inhibit angiogenesis and primary tumor growth in syngenic mice. *Cancer Res* **56**, 2428-2433.
- Möbus, V., Gerharz, C. D., Press, U., Moll, R., Beck, T., Mellin, W., Pollow, K., Knapstein, P. G., Kreienberg, R. (1992). Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines. *Int J Cancer* **52**, 76-84.
- Mottonen, J., Strand, A., Symersky, J., Sweet, R. M., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., Gerard, R. D., Goldsmith, E. J. (1992). Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature* **355**, 270-273.

- Mühlenweg, B., Assfalg-Machleidt, I., Parrado, S. G., Bürgle, M., Creutzburg, S., Schmitt, M., Auerswald, E. A., Machleidt, W., Magdolen, V. (2000). A novel type of bifunctional inhibitor directed against proteolytic activity and receptor/ligand interaction. Cystatin with a urokinase receptor binding site. *J Biol Chem* **275**, 33562-33566.
- Müller, K., Gombert, F. O., Manning, U., Grossmüller, F., Graff, P., Zaegel, H., Zuber, J. F., Freuler, F., Tschopp, C., Baumann, G. (1996). Rapid identification of phosphopeptide ligands for SH2 domains. Screening of peptide libraries by fluorescence-activated bead sorting. *J Biol Chem* **271**, 16500-16505.
- Nielsen, L. S., Kellerman, G. M., Behrendt, N., Picone, R., Danø, K., Blasi, F. (1988). A 55,000-60,000 Mr receptor protein for urokinase-type plasminogen activator. Identification in human tumor cell lines and partial purification. *J Biol Chem* **263**, 2358-2363.
- Noack, F., Helmecke, D., Rosenberg, R., Thorban, S., Nekarda, H., Fink, U., Lewald, J., Stich, M., Schütze, K., Harbeck, N., Magdolen, V., Graeff, H., Schmitt, M. (1999). CD87-positive tumor cells in bone marrow aspirates identified by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Int J Oncol* **15**, 617-623.
- Nykjaer, A., Conese, M., Christensen, E. I., Olson, D., Cremona, O., Gliemann, J., Blasi, F. (1997). Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *EMBO J* **16**, 2610-2620.
- O'Connor, J. E., Callaghan, R. C., Escudero, M., Herrera, G., Martinez, A., Monteiro, M. D., Montoliu, H. (2001). The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. *IUBMB Life* **51**, 231-239.
- Pedersen, N., Schmitt, M., Rønne, E., Nicoletti, M. I., Høyer-Hansen, G., Conese, M., Giavazzi, R., Danø, K., Kuhn, W., Jänicke, F., Blasi, F. (1993). A ligand-free, soluble urokinase receptor is present in the ascitic fluid from patients with ovarian cancer. *J Clin Invest* **92**, 2160-2167.

- Pennica, D., Holmes, W. E., Kohr, W. J., Harkins, R. N., Vehar, G. A., Ward, C. A., Bennett, W. F., Yelverton, E., Seeburg, P. H., Heyneker, H. L., Goeddel, D. V., Collen, D. (1983). Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* **301**, 214-221.
- Petty, K (1996). Metal-chelate affinity chromatography. In *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F. M. *et al.*, Eds), Vol. 2. John Wiley and Sons, New York.
- Picone, R., Kajtaniak, E. L., Nielsen, L. S., Behrendt, N., Mastronicola, M. R., Cubellis, M. V., Stoppelli, M. P., Pedersen, S., Danø, K., Blasi, F. (1989). Regulation of urokinase receptors in monocytelike U937 cells by phorbol ester phorbol myristate acetate. *J Cell Biol* **108**, 693-702.
- Ploug, M. (2003). Structure-function relationships in the interaction between the urokinase-type plasminogen activator and its receptor. *Curr Pharm Des* **9**, 1499-1528.
- Ploug, M., Ellis, V. (1994). Structure-function relationships in the receptor for urokinase-type plasminogen activator. Comparison to other members of the Ly-6 family and snake venom alpha-neurotoxins. *FEBS Letters* **349**, 163-168.
- Ploug, M., Ellis, V., Danø, K. (1994). Ligand interaction between urokinase-type plasminogen activator and its receptor probed with 8-anilino-1-naphthalenesulfonate. Evidence for a hydrophobic binding site exposed only on the intact receptor. *Biochemistry* **33**, 8991-8997.
- Ploug, M., Ostergaard, S., Gårdsvoll, H., Kovalski, K., Holst-Hansen, C., Holm, A., Ossowski, L., Danø, K. (2001). Peptide-derived antagonists of the urokinase receptor. affinity maturation by combinatorial chemistry, identification of functional epitopes, and inhibitory effect on cancer cell intravasation. *Biochemistry* **40**, 12157-12168.
- Ploug, M., Ostergaard, S., Hansen, L. B., Holm, A., Danø, K. (1998). Photoaffinity labeling of the human receptor for urokinase-type plasminogen activator using a decapeptide antagonist. Evidence for a composite ligand-binding site and a short interdomain separation. *Biochemistry* **37**, 3612-3622.

- Ploug, M., Rønne, E., Behrendt, N., Jensen, A. L., Blasi, F., Danø, K. (1991). Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *J Biol Chem* **266**, 1926-1933.
- Potempa, J., Korzus, E., Travis, J. (1994). The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* **269**, 15957-15960.
- Pressemitteilung (2002): http://www.wilex.de/frames/company_fs/welcome.htm. Wilex Initiates First Clinical Trial for Urokinase Inhibitor WX-UK1 in Cancer Patients Anti-metastatic WX-UK1 is the first urokinase inhibitor in clinical trials with cancer patients worldwide.
- Quax, P. H., Grimbergen, J. M., Lansink, M., Bakker, A. H., Blatter, M. C., Belin, D., van Hinsbergh, V. W., Verheijen, J. H. (1998). Binding of human urokinase-type plasminogen activator to its receptor: residues involved in species specificity and binding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 693-701.
- Rabbani, S. A., Mazar, A. P. (2001). The role of the plasminogen activation system in angiogenesis and metastasis. *Surg Oncol Clin N Am* **10**, 393-415.
- Ragno, P., Montuori, N., Covelli, B., Høyer-Hansen, G., Rossi, G. (1998). Differential expression of a truncated form of the urokinase-type plasminogen-activator receptor in normal and tumor thyroid cells. *Cancer Res* **58**, 1315-1319.
- Ragno, P., Montuori, N., Ross, G. (1995). Urokinase-type-plasminogen-activator receptor in THP-1 cells. Interaction of urokinase-type plasminogen activator/type-2 plasminogen-activator inhibitor complexes with the cell surface. *Eur J Biochem* **233**, 514-519.
- Rettenberger, P., Wilhelm, O., Oi, H., Weidle, U. H., Goretzki, L., Koppitz, M., Lottspeich, F., König, B., Pessara, U., Kramer, M. D., Schmitt, M., Magdolen, V. (1995). A competitive chromogenic assay to study the functional interaction of urokinase-type plasminogen activator with its receptor. *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**, 587-594.

- Resnati, M., Pallavicini, I., Wang, J. M., Oppenheim, J., Serhan, C. N., Romano, M., Blasi, F. (2002). The fibrinolytic receptor for urokinase activates the G protein-coupled chemotactic receptor FPRL1/LXA4R. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 1359-1364.
- Reuning, U., Magdolen, V., Hapke, S., Schmitt, M. (2003). Molecular and functional interdependence of the urokinase-type plasminogen activator system with integrins *Biol Chem* **384**, 1119-1131.
- Reuning, U., Magdolen, V., Wilhelm, O., Fischer, K., Lutz, V., Graeff, H., Schmitt, M. (1998). Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review). *Int J Oncol* **13**, 893-906.
- Reuning, U., Sperl, S., Kopitz, C., Kessler, H., Krüger, A., Schmitt, M., Magdolen, V. (2003). Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): development of antagonists of uPA/uPAR interaction and their effects in vitro and in vivo. *Curr Pharm Des* **9**, 1529-1543.
- Riccio, A., Grimaldi, G., Verde, P., Sebastio, G., Boast, S., Blasi, F. (1985). The human urokinase-plasminogen activator gene and its promoter. *Nucleic Acids Res* **13**, 2759-2771.
- Robbins, K. C., Summaria, L., Hsieh, B., Shah, R. J. (1967). The peptide chains of human plasmin. Mechanism of activation of human plasminogen to plasmin. *J Biol Chem* **242**, 2333-2342.
- Roes, E. M., Sweep, C. G., Thomas, C. M., Zusterzeel, P. L., Geurts-Moespot, A., Peters, W. H., Steegers, E. A. (2002). Levels of plasminogen activators and their inhibitors in maternal and umbilical cord plasma in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* **187**, 1019-1025.
- Roldan, A. L., Cubellis, M. V., Masucci, M. T., Behrendt, N., Lund, L. R., Danø, K., Appella, E., Blasi, F. (1990). Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin-dependent proteolysis. *EMBO J* **9**, 467-474.

- Sato, S., Kopitz, C., Schmalix, W. A., Mühlenweg, B., Kessler, H., Schmitt, M., Krüger, A., Magdolen, V. (2002) High-affinity urokinase-derived cyclic peptides inhibiting urokinase/urokinase receptor-interaction: effects on tumor growth and spread. *FEBS Lett* **528**, 212-216.
- Sazonova, I. Y., Houn, A. K., Chowdhry, S. A., Robinson, B. R., Hedstrom, L., Reed, G. L. (2001). The mechanism of a bacterial plasminogen activator intermediate between streptokinase and staphylokinase. *J Biol Chem* **276**, 12609-12613.
- Schmiedeberg, N., Bürgle, M., Wilhelm, O., Lottspeich, F., Graeff, H., Schmitt, M., Magdolen, V., Kessler, H. (2000). Design and biological activity of new high-affinity ligands for the urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87). In *Peptides for the New Millennium* (Fields, G. B. et al., Eds), pp. 543-545. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, The Netherlands.
- Schmiedeberg, N., Schmitt, M., Rolz, C., Truffault, V., Sukopp, M., Bürgle, M., Wilhelm, O. G., Schmalix, W., Magdolen, V., Kessler, H. (2002). Synthesis, solution structure, and biological evaluation of urokinase type plasminogen activator (uPA)-derived receptor binding domain mimetics. *J Med Chem* **45**, 4984-4994.
- Schmitt, M., Chucholowski, N., Busch, E., Hellmann, D., Wagner, B., Goretzki, L., Jänicke, F., Gunzler, W. A., Graeff, H. (1991). Fluorescent probes as tools to assess the receptor for the urokinase-type plasminogen activator on tumor cells. *Semin Thromb Hemost* **17**, 291-302.
- Schmitt, M., Harbeck, N., Thomssen, C., Wilhelm, O., Magdolen, V., Reuning, U., Ulm, K., Höfler, H., Jänicke, F., Graeff, H. (1997). Clinical Impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: Prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Heamost* **17**, 291-302.
- Schmitt, M., Wilhelm, O. G., Reuning, U., Krüger, A., Harbeck, N., Lengyel, E., Graeff, H., Gänsbacher, B., Kessler, H., Bürgle, M., Stürzebecher, J., Sperl, S., Magdolen, V.

- (2000). The urokinase plasminogen activator system as a novel target for tumour therapy. *Fibrinol Proteol* **14**, 114-132.
- Shapiro, H. M. (2003). Practical Flow Cytometry 4th Edition. Wiley-Liss, New York.
- Sidenius, N., Blasi, F. (2000). Domain 1 of the urokinase receptor (uPAR) is required for uPAR-mediated cell binding to vitronectin. *FEBS Letters* **470**, 40-46.
- Solberg, H., Romer, J., Brünner, N., Holm, A., Sidenius, N., Danø, K., Høyer-Hansen, G. (1994). A cleaved form of the receptor for urokinase-type plasminogen activator in invasive transplanted human and murine tumors. *Int J Cancer* **58**, 877-881.
- Sperl, S., Müller, M. M., Wilhelm, O. G., Schmitt, M., Magdolen, V., Moroder, L. (2001). The uPA/uPA receptor system as a target for tumor therapy. *Drug News Perspect* **14**, 401-411.
- Spiro, A., Lowe, M., Brown, D. (2000). A bead-based method for multiplexed identification and quantitation of DNA sequences using flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4258-4265.
- Stein, P. E., Carrell, R. W. (1995). What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease? *Nat Struct Biol* **2**, 96-113:
- Steffens, G. J., Günzler, W. A., Otting, F., Frankus, E., Flohe, L. (1982). The complete amino acid sequence of low molecular mass urokinase from human urine. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **363**, 1043-1058.
- Stephens, R. W., Brünner, N., Jänicke, F., Schmitt, M. (1998). The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **52**, 99-111.
- Stoppelli, M.P., Corti, A., Soffientini, A., Cassani, G., Blasi, F., Assoian, R.K. (1985). Differentiation-enhanced binding of the amino-terminal fragment of human urokinase

- plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 4939-4943.
- Stopelli, M. P., Tacchetti, C., Cubellis, M. V., Corti, A., Hearing, V. J., Cassani, G. (1986). Autocrine saturation of pro-urokinase receptor on human A431 cells. *Cell* **45**, 675-684.
- Strassburger, W., Wollmer, A., Pitts, J. E., Glover, I. D., Tickle, I. J., Blundell, T. L., Steffens, G. J., Günzler, W. A., Otting, F., Flohe, L. (1983). Adaptation of plasminogen activator sequences to known protease structures. *FEBS Lett* **157**, 219-223.
- Sundstrom, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* **17**, 565-577.
- Swanson, S. J., Jacobs, S. J., Mytych, D., Shah, C., Indelicato, S. R., Bordens, R.W. (1999). Applications for the new electrochemiluminescent (ECL) and biosensor technologies. *Dev Biol Stand* **97**, 135-147.
- Tautz, D., Renz, M. (1983). An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal Biochem* **132**, 14-19.
- Tressler, R. J., Pitot, P. A., Stratton, J. R., Forrest, L. D., Zhuo, S., Drummond, R. J., Fong, S., Doyle, M. V., Doyle, L. V., Min, H. Y., Rosenberg, S. (1999). Urokinase receptor antagonists: discovery and application to in vivo models of tumor growth. *APMIS* **107**, 168-173.
- Türkmen, B., Schmitt, M., Schmalfeldt, B., Trommler, P., Hell, W., Creutzburg, S., Graeff, H., Magdolen, V. (1997). Mutational analysis of the genes encoding urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in advanced ovarian cancer. *Electrophoresis* **18**, 686-689
- Vassalli, J.D., Baccino, D., Belin, D. (1985). A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *J Cell Biol* **100**, 86-92

- Vogelstein, B., Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 615-619.
- Waltz, D. A., Chapman, H. A. (1994). Reversible cellular adhesion to vitronectin linked to urokinase receptor occupancy. *J Biol Chem* **269**, 14746-14750.
- Wedemeyer, N., Potter, T. (2001). Flow cytometry: an 'old' tool for novel applications in medical genetics. *Clin Genet* **60**, 1-8.
- Wei, Y., Lukashev, M., Simon, D. I., Bodary, S. C., Rosenberg, S., Doyle, M. V., Chapman, H. A. (1996). Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science* **273**, 1551-1555.
- Wei, Y., Waltz, D. A., Rao, N., Drummond, R. J., Rosenberg, S., Chapman, H. A. (1994). Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin. *J Biol Chem* **269**, 32380-32388.
- Williams, J. R. B. (1951). The fibrinolytic activity of urine. *Br J Exp Pathol* **32**, 530-537.
- Wind, T., Hansen, M., Jensen, J. K., Andreasen, P. A. (2002). The molecular basis for anti-proteolytic and non-proteolytic functions of plasminogen activator inhibitor type-1: roles of the reactive centre loop, the shutter region, the flexible joint region and the small serpin fragment. *Biol Chem* **383**, 21-36.
- Xue, W., Kindzelskii, A. L., Todd, R. F. 3rd, Petty, H. R. (1994). Physical association of complement receptor type 3 and urokinase-type plasminogen activator receptor in neutrophil membranes. *J Immunol* **152**, 4630-4640.
- Xue, W., Mizukami, I., Todd, R. F. 3rd, Petty, H. R. (1997). Urokinase-type plasminogen activator receptors associate with beta1 and beta3 integrins of fibrosarcoma cells: dependence on extracellular matrix components. *Cancer Res* **57**, 1682-1689.

8. Lebenslauf und Liste der Veröffentlichungen

Persönliche Daten

Name: Elke Eva Guthaus
Geburtstag: 23.07.1974
Geburtsort: Magdeburg
Eltern: Günter Guthaus
Heidemarie Guthaus, geb. Kaula

Schulbildung

09/1981 – 06/1989 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule „Heinrich Heine“, Wörlitz
09/1989 – 06/1993 Naturwissenschaftliches Gymnasium „Werner von Siemens“, Magdeburg mit Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Hochschulausbildung

11/1993 – 11/1998 Chemiestudium an der Technischen Universität München
12/1998 - 6/1999 Diplomarbeit in der Klinischen Forschergruppe an der Frauenklinik der TU München, Klinikum Rechts der Isar, München mit dem Thema „Epitop-Kartierung monoklonaler Antikörper gegen PAI-1 mittels PAI-1-/PAI-2- Fusionsproteinen und synthetischen, von PAI-1 abgeleiteten Peptiden“ unter der Betreuung von Prof. H. Kessler (Lehrstuhl) und Dr. Viktor Magdolen.

