

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie

Bestimmung der unterschiedlichen Beiträge von Wirtszell- und Tumorzell-MMP-9 zur Metastasierung der Leber

Michael Gerg

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Schemann
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H. Daniel
2. apl. Prof. Dr. A. Krüger
3. Univ.-Prof. Dr. D. Haller (schriftliche Beurteilung)

Die Dissertation wurde am 29.01.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 27.03.2009 angenommen.

Meinen Eltern

1. Zusammenfassung	8
2. Einleitung	9
2.1. Allgemeine Einführung in die Biologie der Tumorerkrankungen und Begriffserklärungen.....	9
2.2. Die metastatische Kaskade.....	10
2.3. Problematik der Behandlung maligner Tumorerkrankungen.....	14
2.4. Die Rolle der Matrix Metalloproteinasen (MMPs) bei der Metastasierung.....	16
2.4.1. Allgemeine Einführung in die Biologie der Matrix- Metalloproteinasen.....	17
2.4.2. Die Rolle der Matrix Metalloproteinasen bei Tumorerkrankungen.....	18
2.5. Die Entwicklung und das Scheitern der Breitspektrum-MMP-Inhibitoren.....	19
2.6. Bedeutung der Gewebemöostase für die Tumorprogression und das Gelingen anti-metastatischer Therapiestrategien.....	21
2.7. Pleiotrope Funktionen der MMPs.....	23
2.8. Das proteolytische Netzwerk.....	24
2.9. MMP-9 als potentiell Zielmolekül einer anti-metastatischen Therapie.....	25
2.10. MMP-9 als Regulator der Gewebemöostase.....	27
2.11. MMP-9 als Effektormolekül der Metastasierung.....	28
2.12. In vivo Modelle.....	30
2.13. Spezifische Unterdrückung der Expression eines Zielgens in Wirts- oder Tumorzellen.....	31
3. Ziel dieser Arbeit	32
4. Material und Methoden	33
4.1. Tierexperimentelle Methoden.....	33
4.1.1. Verwendete Versuchstiere.....	33
4.1.2. L-CI.5s-Metastasierungsmodell.....	34
4.1.3. HT1080 Xenograft-Metastasierungsmodell.....	35
4.1.4. CT26 Metastasierungsmodell.....	35
4.1.5. X-Gal Färbung von Organen.....	35
4.1.6. Behandlung von Mäusen mit synthetischen Breitspektrum-MMP- Inhibitoren oder spezifischen Gelatinase-Inhibitoren.....	36
4.2. Zellexperimentelle Methoden.....	36
4.2.1. Verwendete Zelllinien.....	36

4.2.2. Zellkulturmedien	38
4.2.3. Kultivierung von Zellen	39
4.2.4. Bestimmung der Zellzahl	40
4.2.5. Isolierung von Klonen durch <i>limiting dilution</i>	40
4.2.6. Isolierung von primären Knochenmarkzellen	41
4.2.7. Kotransfektion von 293T-Zellen zur Herstellung lentiviraler Zellkulturüberstände.....	42
4.2.8. Kotransfektion von 293T-Zellen zur Herstellung retroviraler Zellkulturüberstände.....	43
4.2.9. Gewinnung viraler Zellkulturüberstände	43
4.2.10. Transduktion adhärenter Zellen	43
4.2.11. Transduktion von Suspensionszellen	44
4.2.12. Selektion nach viraler Transduktion	44
4.2.13. <i>Boyden-Chamber</i> -Invasions- und Migrationsassays.....	44
4.3. Mikrobiologische Methoden	45
4.3.1. Verwendete Bakterienstämme.....	45
4.3.2. Kultivierung von Bakterien.....	46
4.3.3. Verwendete cDNAs.....	47
4.3.4. Verwendete Plasmide	48
4.3.5. Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	49
4.3.6. DNA-Isolierung aus Bakterien.....	50
4.3.7. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	51
4.3.8. Agarose-Gelelektrophorese	51
4.3.9. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	52
4.3.10. Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	53
4.3.11. Auffüllen von DNA-Überhängen (<i>blunt-end</i> Reaktion)	53
4.3.12. DNA-Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) und Ethanol-Fällung.....	54
4.3.13. Behandlung mit Alkalischer Phosphatase	54
4.3.14. Ligation von DNA-Fragmenten	55
4.3.15. LR-Clonase Reaktion	55
4.3.16. Konstruktion von shRNAs	56
4.3.17. <i>Annealing</i> von RNA-Oligonucleotiden.....	57
4.3.18. Isolierung von RNA aus Zellen oder Geweben	57

4.3.19. Reverse Transkription	58
4.3.20. <i>Real Time</i> -Polymerasekettenreaktion (TaqMan™-RT-PCR)	59
4.3.21. Bestimmung von Genexpressionsprofilen mit TaqMan™ Low Density Arrays.....	60
4.4. Proteinbiochemische Methoden	61
4.4.1. Aufarbeitung von Proteinen aus Gewebe.....	61
4.4.2. Aufarbeitung von Proteinen aus Zellen.....	61
4.4.3. Proteinbestimmung mit BCA™ von Pierce	62
4.4.4. Zymographie	62
4.4.5. Western Analyse und Densitometrie.....	63
4.4.6. Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	65
4.4.7. MMP-9 Aktivitätsassay.....	66
4.5. Immunhistochemische Methoden	66
4.5.1. MMP-9 <i>in situ</i> Hybridisierung.....	66
4.5.2. Immunhistochemie	68
4.5.3. <i>In situ</i> Zymographie	69
4.6. Patientenproben.....	70
4.7. Statistische Methoden	70
5. Ergebnisse	71
5.1. Veränderung der Expressionssignatur metastasierungsassoziiertes Gene in der Leber durch den knockout von Mmp-9.....	71
5.2. Induktion der Mmp-9 Promotoraktivität in Mmp-9-defizienten Mäusen	72
5.3. Induktion der Lebermetastasierung muriner Kolorektalkarzinom-zellen in Mmp-9-knockout Mäusen	74
5.4. Induktion der Lebermetastasierung humaner Fibrosarkomzellen in Mmp- 9-knockout Mäusen.....	76
5.5. Induktion der Lebermetastasierung muriner T-Zell Lymphomzellen in Mmp-9-knockout Mäusen.....	77
5.6. Steigerung der <i>in vitro</i> Migration und Invasion von T-Zell Lymphom Zellen durch rekombinantes IL-6.....	79
5.7. Steigerung der <i>in vitro</i> Migration und Invasion von murinen Kolorektalkarzinomzellen und humanen Fibrosarkomzellen durch rekombinantes IL-6	81

5.8. Induktion von IL-6 Expression in hämatopoietischen Zellen und erhöhte Konzentration von IL-6 im Serum von Mmp-9-knockout Mäusen	82
5.9. Induktion von Stat3 Signaltransduktion in Knochenmarkzellen durch den knockout von Mmp-9	84
5.10. Verstärkte Expression von IL-6 in Knochenmarkzellen durch den knockout von Mmp-9	86
5.11. Steigerung der IL-6 Expression in Knochenmarkzellen durch KitL.....	86
5.12. Induktion der IL-6 Expression durch spezifische Hemmung von Mmp-9 in vivo.....	88
5.13. Steigerung der MMP-9 Expression in Tumorzelllinien durch rekombinantes IL-6	89
5.14. Klonierung eines Mmp-9 Promotorkonstrukts zur Detektion der Mmp-9 Expression in Tumorzellen in vivo	90
5.15. Identifikation von shRNA Zielsequenzen im murinen Mmp-9 Gen und Klonierung der shRNAs in einen retroviralen Vektor	93
5.16. Knockdown von Mmp-9 in L-CI.5s T-Zell Lymphom Zellen.....	96
5.17. Unterdrückung des Metastasierungs-fördernden Effekts der Mmp-9-defizienten Mikroumgebung durch den knockdown von Mmp-9 in den Tumorzellen	97
5.18. Lokalisation von MMP-9 mRNA in den Tumorzellen von Lebermetastasen von Kolorektalkarzinompatienten	98
5.19. Korrelation der Mmp-9 Expression mit den invasiven Phasen der Lebermetastasierung in einem T-Zell Lymphommodell.....	100
5.20. Lokalisation von Mmp-9 mRNA in Tumorzellen des T-Zell Lymphom in vivo Invasions-Assays.....	103
5.21. Förderung der Metastasierung der Leber durch Tumorzell-Mmp-9	105
5.22. Nachweis der Heterogenität der Mmp-9-knockdown Zelllinie.....	108
5.23. Korrelation der Tumorzell-Mmp-9 Expression mit dem metastatischen Potential der Tumorzellen	109
6. Diskussion	111
6.1. Die spezifische Hemmung von Mmp-9 führt zur Etablierung einer potentiell krankheitsfördernden Mikroumgebung.....	112
6.2. Die Hemmung von Wirtszell-Mmp-9 fördert die Invasion von IL-6-sensitiven Tumorzellen in die Leber	115

6.3. Hämatopoietische Zellen und Immunzellen fördern die Metastasierung der Leber.....	118
6.4. IL-6 exprimiert durch Zellen hämatopoietischen Ursprungs fördert die Metastasierung der Leber	121
6.5. IL-6 kompensiert die verminderte Freisetzung von KitL in Mmp-9- defizienten Knochenmarkzellen	122
6.6. Die spezifische Hemmung von Wirts- und Tumorzell-MMP-9 reduziert die Metastasierung der Leber	124
6.7. Tumorzell-Mmp-9 fördert die Metastasierung der Leber	125
7. Ausblick.....	128
8. Literaturverzeichnis.....	129
9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	141
10. Abkürzungsverzeichnis.....	143
11. Danksagung.....	146
12. Anhang	i

1. Zusammenfassung

Eine essentielle Voraussetzung für die invasive Ausbreitung von Tumorzellen ist der proteolytische Abbau der extrazellulären Matrix (EZM). Während die Proteasen anfänglich als Enzyme charakterisiert wurden, die nur für den Abbau der EZM verantwortlich sind, ist inzwischen bekannt, dass Proteasen auch wichtige Beiträge zur Regulation physiologischer Prozesse leisten. Die Unkenntnis über diese Tatsache führte zum Scheitern der Breitspektrum-Matrix Metalloproteinase (MMPs)-Inhibitoren in den klinischen Testphasen. Im Gegensatz zur Breitspektrum-Hemmung könnte jedoch die gezielte, spezifische Hemmung einzelner, ausgewählter MMPs zu Therapien mit erhöhter anti-metastatischer Effizienz, bei gleichzeitig tolerierbaren Nebenwirkungen, führen. Eine Protease die entscheidend zur Metastasierung beiträgt ist die Matrix Metalloprotease-9 (MMP-9). Ziel dieser Arbeit war es, durch Modulation der Expression von MMP-9 in den Tumorzellen und/oder den Wirtszellen, die Beiträge von MMP-9 zur Invasivität von Tumorzellen und zum Erhalt einer physiologischen Homöostase zu untersuchen, um die Risiken oder den Nutzen einer spezifischen Hemmung von MMP-9 zu beurteilen. Durch Untersuchung einer MMP-9 *knockout*-Maus konnte gezeigt werden, dass MMP-9 ein wichtiger Regulator der Homöostase in der Leber und im Knochenmark ist. Die spezifische Hemmung von MMP-9, durch den *knockout* oder durch pharmakologische Inhibitoren, führte zur Aktivierung eines Kompensationsmechanismus. Das Fehlen von MMP-9 hatte eine reduzierte Freisetzung des Kit-Liganden im Knochenmark zur Folge, dessen Aktivität zur Aufrechterhaltung der Homöostase, durch Aktivierung von Stat3 Signaltransduktion, notwendig ist. Um diesen Mangel zu kompensieren, exprimierten die Knochenmarkszellen und die hämatopoietischen Zellen vermehrt IL-6, wodurch die Stat3 Signaltransduktion erhalten wurde, aber ebenfalls die Menge an IL-6 im Serum stark zunahm. IL-6 induzierte die Expression von MMP-9 in zirkulierenden Tumorzellen und förderte hierdurch die Invasion dieser Zellen in die Leber. Durch spezifischen, shRNA vermittelten *knockdown* von *Mmp-9* in den Tumorzellen, konnte die Induktion der Metastasierung, wie sie in den *Mmp-9*-defizienten Mäusen festgestellt worden war, unterbunden werden und eine grundsätzliche Korrelation zwischen der Tumorzell-MMP-9 Expression und dem metastatischen Potential der Tumorzellen nachgewiesen werden. Diese Arbeit belegt eine zweigeteilte Rolle von MMP-9, als Regulator der Homöostase und als essentieller Faktor der Tumorzellinvasion in die Leber. Das Wissen über die Auswirkungen einer spezifischen Hemmung von MMP-9 könnte nachhaltig zur Verbesserung von anti-metastatischen Therapiestrategien beitragen.

2. Einleitung

2.1. Allgemeine Einführung in die Biologie der Tumorerkrankungen und Begriffserklärungen

Der Begriff Tumor bezeichnet im Allgemeinen lediglich eine Schwellung und steht in der Medizin für die Zunahme von Gewebevolumen jedweder Ursache (Wagener, 1999). Im engeren Sinn bezeichnet der Begriff Tumor eine Anhäufung neugebildeter Körperzellen (Neoplasie) die durch eine deregulierte Zellproliferation entstanden sind, sagt aber nichts über die Dignität (Gut- oder Bösartigkeit) der Neoplasie aus. Bösartige Tumoren werden als maligne Tumoren oder als Krebs bezeichnet, und werden von den sog. gutartigen (benignen) Tumoren unterschieden (Wagener, 1999). Benigne Tumoren können meistens chirurgisch entfernt werden und führen nur in Ausnahmen zum Tode (Hanahan und Weinberg, 2000; Nguyen, 2004).

Im Gegensatz zu den benignen Tumoren führen Erkrankungen mit malignen Tumoren in einer Vielzahl der Fälle zum Tode der Patienten (Hanahan und Weinberg, 2000). Insgesamt sind 90 % der Tumor bedingten Todesfälle auf maligne Tumoren zurückzuführen (Christofori, 2006). Maligne Tumoren kennzeichnen sich durch die Ausbildung von Metastasen, d.h. die Ausbildung von Tochtergeschwüren in sekundär befallenen Organen und durch das invasive Wachstum des Primärtumors (Weinberg, 2006). Über 90 % der malignen Tumoren sind epithelialen Ursprungs (Christofori, 2006). Maligne Tumoren epithelialen Ursprungs werden als Karzinome bezeichnet und von den Sarkomen mesenchymalen Ursprungs unterschieden (Wagener, 1999). Bei der Behandlung von malignen Tumorerkrankungen wird auf konventionelle Verfahren (Chirurgie, Strahlen- oder Chemotherapie) zurückgegriffen, und diese Verfahren werden, je nach der Art des Tumors, in verschiedenen Kombinationen angewendet (Beart, 2007; Kosmider und Lipton, 2007). Im Falle einer malignen Tumorerkrankung kann jedoch durch keines dieser Verfahren, und auch nicht durch deren Kombination, das Überleben der betroffenen Patienten dauerhaft gewährleistet werden. Bis heute konnte keine Therapie entwickelt werden, die die Ausbreitung und die Progression maligner Tumoren unterbinden kann (Desai et al., 2007). Patienten die unter weit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen leiden, werden auf Grund des Fehlens geeigneter Therapiemöglichkeiten lediglich palliativ behandelt (Desai et al., 2007). Letztendlich führen ca. 55 % der malignen Tumorerkrankungen zum Tode des Patienten und ca. 25 % aller Todesfälle sind auf maligne Tumorerkrankungen zurückzuführen (Boyle und Ferlay, 2005). Damit stellen die

Erkrankungen mit bösartigen Tumoren, nach den Herz-Kreislaufkrankungen, die zweithäufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern dar (zur Hausen, 2003).

Eine sichere Unterscheidung von benignen oder malignen Tumoren kann nur auf histologischer Ebene erfolgen (Weinberg, 2006). Ein invasives Wachstum eines Primärtumors kann durch eine nicht eindeutige Abgrenzung des Tumorgewebes vom umliegenden Gewebe diagnostiziert werden (Weinberg, 2006). Zudem fallen bei der histologischen Begutachtung von malignen Tumoren viele atypische Zellveränderungen auf (Weinberg, 2006). Die Grundlage für die Entstehung von sowohl benignen als auch von malignen Tumoren ist die Transformation einer vormals normalen Zelle (Wagener, 1999). Die Transformation wird durch die Anhäufung mehrerer spontaner Mutationen, die die Aktivierung von Protoonkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen auslösen, induziert (Weinberg, 2006). Tumoren entstehen jedoch nicht nur durch spontane Mutationen, sondern bei ca. 5 % der Krebserkrankungen liegt die Ursache in einer vererbten genetischen Prädisposition (Wagener, 1999).

2.2. Die metastatische Kaskade

Der gesamte Prozess der zur Ausbildung von Metastasen in sekundär befallenen Organen und letztendlich zum Tode der Patienten führt, kann in unterscheidbare, auf einander folgende Abschnitte untergliedert werden (Weinberg, 2006). Das erfolgreiche Durchlaufen aller Schritte ist die Voraussetzung für die Etablierung von Metastasen (Gupta und Massague, 2006). Dieser Prozess wird als die metastatische Kaskade bezeichnet und in die Abschnitte lokale Invasion, Intravasation, Zirkulation von Tumorzellen im Blutkreislauf, Extravasation und Proliferation im Zielorgan der Metastasierung untergliedert (Nguyen, 2004; Weinberg, 2006). Jeder einzelne Abschnitt innerhalb der metastatischen Kaskade stellt für die transformierten Zellen prinzipiell eine Hürde dar, die auf dem Weg zur Etablierung von Metastasen überwunden werden muss. Um jeden Abschnitt erfolgreich zu durchlaufen, müssen die Tumorzellen kontinuierlich neue Eigenschaften erwerben, die es den Zellen ermöglichen, sich unterschiedlichsten äußeren Umgebungen anzupassen und in diesen zu überleben (Fidler, 2003; Nguyen, 2004).

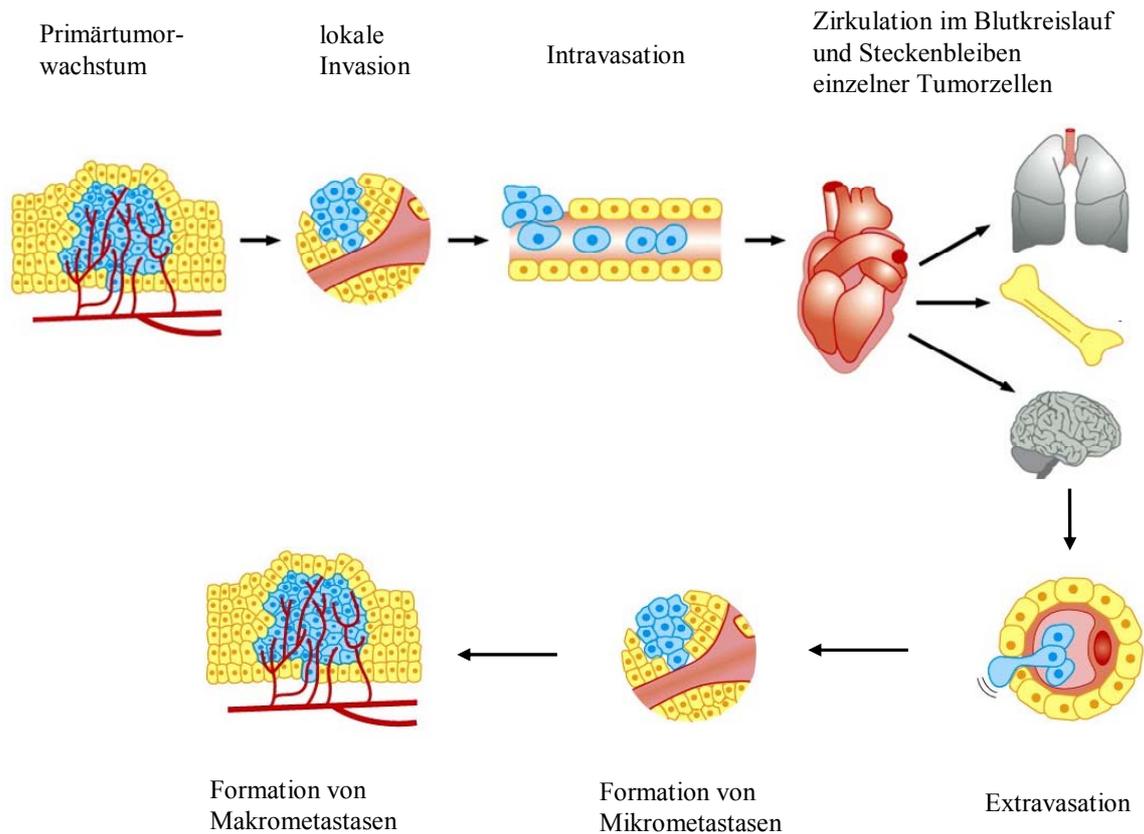


Abbildung 2.1: Die metastatische Kaskade

Gezeigt sind die einzelnen, aufeinander folgenden Schritte der metastatischen Kaskade (verändert nach Weinberg, 2006).

a) Lokale Invasion

Der erste Schritt in dem sich maligne von benignen Tumoren unterscheiden ist die lokale Invasion, d.h. Tumorzellen erlangen migratorische Aktivität/Motilität und verlassen den Primärtumorverband (Weinberg, 2006). Bevor maligne Tumoren epithelialen Ursprungs in das umliegende Gewebe invadieren können, durchlaufen sie den Prozess der epithelial-mesenchymalen-Transition (EMT; Christofori, 2006; Weinberg, 2006). Im Laufe dieses Prozesses verändern sich die zelluläre Morphologie und das Genexpressionsprofil der Zellen. Die Zellen legen ihren epithelialen Phänotyp ab und nehmen die Morphologie und die Genexpressionssignatur von Zellen mesenchymalen Ursprungs an (Christofori, 2006). Zellen dieses Ursprungs erscheinen morphologisch langgestreckt und zeichnen sich durch hohe migratorische Aktivität aus (Nguyen, 2004). Die molekulare Ursache dieser Veränderung ist ein modifiziertes Expressionsprofil von Adhäsionsmolekülen (z.B. Integrine, Cadherine; Christofori, 2006) und Proteasen (z.B. Serinproteasen, Matrix-Metalloproteinasen; Huber et al., 2005). Adhäsionsmoleküle dienen dem Kontakt zwischen Zellen und der Verankerung

von Zellen in der extrazellulären Matrix. Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakte bilden zudem die Grundlage für die Migration von Zellen. Bei der Migration kommt es jedoch auf ein koordiniertes Knüpfen und Lösen dieser Kontakte an (Weinberg, 2006). Deshalb weisen migrierende Zellen, im Vergleich zu migratorisch inaktiven Zellen, ein verändertes Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen auf (Christofori, 2006; Weinberg, 2006).

Eine weitere essentielle Voraussetzung für die lokale Invasion von Tumorzellen ist der proteolytische Abbau der umliegenden extrazellulären Matrix (EZM; Nguyen, 2004; Gupta und Massague, 2006). Die EZM ist der Anteil des Bindegewebes der im Interzellularraum liegt. Die Proteine der EZM werden von den Zellen sezerniert und liegen extrazellulär immobilisiert vor. Durch die enge Vernetzung der Strukturproteine der EZM entsteht eine Barriere die das Wandern von Zellen unterbindet (Liotta und Stetler-Stevenson, 1990). Um diese Barriere zu überwinden sind wandernde Zellen auf die Aktivität von Proteasen angewiesen, die diese Strukturproteine abbauen können (Nguyen, 2004; Polette et al., 2004). Diese Tatsache gilt im Besonderen für die Karzinome, da die epitheliale Zellschicht durch die Basallamina vom umliegenden Gewebe abgetrennt ist. Die Basallamina ist eine besonders dichte, spezialisierte EZM die unterhalb von Epithel- und Endothelzellen liegt und diese gegen das Bindegewebe abgrenzt. Die Bestandteile der Basallamina sind vornehmlich Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin und verschiedene Proteoglykane (Polette et al., 2004; Christofori, 2006). Für den Abbau von Kollagen Typ IV, dem Hauptbestandteil der Basallamina, sind in besonderem Maße MMP-2 und MMP-9, die sog. Gelatinasen, verantwortlich (Stamenkovic, 2003; Bjorklund und Koivunen, 2005). Somit ist es nicht verwunderlich, dass signifikant erhöhte Konzentrationen dieser beiden Proteasen im Tumorgewebe oder im Plasma von Patienten nachgewiesen werden können, die unter malignen Tumorerkrankungen leiden (Vihinen und Kahari, 2002; Mook et al., 2004).

b) Intravasation

Die Intravasation beschreibt den Prozess, bei dem maligne Zellen in das Lymph- oder Blutgefäßsystem eindringen (Nguyen, 2004). Beide Gefäßsysteme sind jedoch eng miteinander verknüpft und das Eindringen in eines der beiden Systeme ermöglicht automatisch auch den Zugang zum anderen System (Weinberg, 2006).

c) Zirkulation im Blutkreislauf

Durch den Prozess der Intravasation gelangen Tumorzellen in den Blutkreislauf. Doch längst nicht alle Tumorzellen die hierdurch die Möglichkeit erlangen, entfernte Organe innerhalb eines Organismus zu erreichen, besitzen das Potential zur Ausbildung von Metastasen. Innerhalb des Blutstroms sind die Tumorzellen starken Scherkräften ausgesetzt (Weinberg, 2006). Blutkapillaren, wie sie in der Lunge oder der Leber zu finden sind, haben einen Durchmesser von nicht mehr als 3 μm . Hämatopoietische Zellen sind im Mittel 8 μm groß, verfügen aber über eine hohe Plastizität, die ihnen die Passage der Kapillaren erlaubt (Weinberg, 2006). Tumorzellen können hingegen bis zu 20 μm groß sein und verfügen zudem über eine weitaus geringere Plastizität als normale hämatopoietische Zellen (Weinberg, 2006). Dies hat zur Folge, dass viele Tumorzellen in den Kapillaren stecken bleiben (Nguyen, 2004; Weinberg, 2006). Verfügen die steckengebliebenen Tumorzellen nicht über die Möglichkeit, durch proteolytischen Abbau der Basallamina den Blutkreislauf zu verlassen, sterben die Zellen nach kurzer Zeit ab (Nguyen, 2004; Pantel und Brakenhoff, 2004). Die wichtigsten Proteasen für den Abbau der Basallamina sind die Gelatinasen, Matrix Metalloproteinase-2 und -9 (Liotta und Stetler-Stevenson, 1990; Stamenkovic, 2003).

d) Extravasation im Zielorgan der Metastasierung und Etablierung von Metastasen

Der letzte Schritt der metastatischen Kaskade ist die Extravasation der Tumorzellen. Für eine erfolgreiche Extravasation müssen die Tumorzellen die Basalmembran und die EZM im Zielorgan der Metastasierung abbauen (Nguyen, 2004; Gupta und Massague, 2006). Das Eindringen einer Tumorzelle in ein sekundär befallenes Gewebe ist aber nicht mit einer erfolgreichen Etablierung einer Metastase gleichzusetzen. Die Mikroumgebungen in unterschiedlichen Organen weisen zum Teil beträchtliche Unterschiede, bezüglich der Verfügbarkeit verschiedener Wachstumsfaktoren, auf (Fidler, 2002; Gupta und Massague, 2006). Eine Adaptation der Tumorzellen an die Umgebung im Zielorgan der Metastasierung oder eine Veränderung der Mikroumgebung des befallenen Organs, sind essentielle Voraussetzungen für die Etablierung von Metastasen. Dieses Prinzip wurde bereits im Jahr 1889 von dem englischen Chirurgen Stephen Paget in der sog. „*seed and soil*“-Theorie formuliert (Fidler, 2003). Heute, über 100 Jahre später, gibt es experimentelle Daten die diese Theorie stützen, die darüber hinaus, aber auch zur Weiterentwicklung dieser Theorie beigetragen haben. Inzwischen geht man davon aus, dass ein gesundes Gewebe eine feindliche Umgebung für maligne Tumorzellen darstellt (Gupta und Massague, 2006). Demzufolge, muss die Mikroumgebung im Zielorgan der Metastasierung zuerst verändert werden, bevor diese die

Etablierung von Tumorzellen zulässt (Fidler, 2003; Gupta und Massague, 2006). Neueste Studien zeigen, dass bei der Reorganisation von Mikroumgebungen den Zellen des Immunsystems eine besondere Rolle zukommt (Kaplan et al., 2006a; Kaplan et al., 2006b). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Infiltration von Immunzellen in die Leber, nicht nur Folge der Ausbildung von Metastasen ist, sondern dass Immunzellen sogar zeitlich vor den Tumorzellen einwandern können (Kaplan et al., 2005). In diesem Zusammenhang spricht man von der Ausbildung von metastatischen Nischen im Zielorgan der Metastasierung (Kaplan et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass es sich bei den Nischen bildenden Zellen um aktivierte Makrophagen handelt. In einer Studie, die sich auf die Metastasierung der Lunge konzentrierte, konnte zudem aufgezeigt werden, dass diese Makrophagen durch die Expression von MMP-9 das Gewebe für die Aufnahme von Tumorzellen vorbereiten (Hiratsuka et al., 2002).

2.3. Problematik der Behandlung maligner Tumorerkrankungen

Die Tatsache, dass über 90 % der krebisbedingten Todesfälle auf die Ausbildung von Metastasen zurückzuführen ist (Hanahan und Weinberg, 2000; Cristofori, 2006), verdeutlicht die Notwendigkeit zur Entwicklung anti-metastatischer Therapien. Die Probleme die bei der Behandlung maligner Tumorerkrankungen auftreten, können besonders gut am Beispiel des kolorektalen Karzinoms illustriert werden. Jährlich erkranken an dieser Krebsart weltweit bis zu 940000 Menschen (Parkin, 2001; Boyle und Ferlay, 2005), von denen über 60 % im Verlauf der Krankheit Metastasen ausbilden (Boyle und Ferlay, 2005). Die Ausbildung von Metastasen führt letztendlich dazu, dass jährlich 500000 Patienten dieser Krankheit erliegen (Parkin, 2001). Kolorektalkarzinome metastasieren vornehmlich in die Leber, in selteneren Fällen werden aber auch Metastasen in Lunge, Gehirn oder Knochen diagnostiziert (Wagenaar-Miller et al., 2004).

Einzelne Lebermetastasen können wie Primärtumoren chirurgisch entfernt werden, wodurch zumindest die 5-Jahres Überlebensrate von Kolorektalkarzinompatienten signifikant gesteigert werden kann (Fusai und Davidson, 2003). Metastasen des kolorektalen Karzinoms in der Leber treten in den meisten Fällen metachron, d.h. nach Entfernung des Primärtumors auf (Choti und Bulkley, 1999). Zum Zeitpunkt der Diagnose von metachronen Lebermetastasen wird jedoch oftmals bereits eine inoperable, starke Streuung von Metastasen diagnostiziert. Dieser gestreute Metastasierungsphänotyp ist der Grund dafür, dass bei lediglich 10 – 30 % der Patienten ein potentiell kurativer, chirurgischer Eingriff

vorgenommen werden kann (Conzelmann et al., 2005). Der Ursprung dieses gestreuten Metastasierungsphänotyps sind zum Teil, die unzähligen, intravasierten Tumorzellen die den Primärtumorverband verlassen haben (Choti und Bulkley, 1999). Die initial disseminierten Tumorzellen können ruhend, über Zeiträume von vielen Jahren, in Organen wie der Leber oder im Knochenmark überdauern (Dormanz), bevor sie aus bislang unbekanntem Gründen erneut zu proliferieren beginnen und zu klinisch diagnostizierbaren, metachronen Metastasen auswachsen (Fusai und Davidson, 2003).

Schätzungen zur Folge, können von einem ein Gramm schweren Primärtumor täglich bis zu einer Million Zellen in den Blutstrom abgegeben werden (Weinberg, 2006). Da ein Primärtumor dieser Größe keine spürbaren Beschwerden hervorruft, ist eine frühzeitige Diagnose nahezu ausgeschlossen, und somit kann ein disseminierter Metastasierungsphänotyp (einzelne Tumorzellen oder kleine Tumorzell-Cluster) bereits vor der Diagnose des Primärtumors vorliegen (Bird et al., 2006; Conzelmann et al., 2005). Der Nachweis disseminierter Tumorzellen ist äußerst schwierig und kann nur anhand von Gewebeproben, immunhistochemisch oder Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)-basiert, vorgenommen werden (Conzelmann et al., 2005). Die Standarddiagnose-Methoden die derzeit in den Kliniken weltweit angewandt werden, wie US (Ultraschall), CTAP (*CT during arterial portography*) oder MR (*magnetic resonance*) können Lebermetastasen erst ab einer Größe von ungefähr 10 mm erkennen (Fusai und Davidson, 2003).

Werden Metastasen dieser Größe in der Leber diagnostiziert, hat es sich in der klinischen Praxis als vorteilhaft erwiesen, nicht nur das Tumorgewebe selbst, sondern auch das angrenzende Leberparenchym großzügig zu entfernen, oder sogar partielle Hepatektomien vorzunehmen (Jaeck et al., 1997; Jamison et al., 1997; Shirabe et al., 1997). Dies hat den Grund, dass die Tumorzellen der primären Metastasen erneut, ausgehend von den etablierten Lebermetastasen, in das Leberparenchym streuen (Fusai und Davidson, 2003). Dieser Prozess kann als sekundäre Invasion bezeichnet werden. Durch großzügiges Entfernen, des an die Lebermetastasen angrenzenden Leberparenchyms, kann die Wahrscheinlichkeit der Entstehung weiterer Lebermetastasen deutlich verringert werden, wodurch das Überleben der Patienten signifikant verlängert wird (Rees et al., 1997). Diese Erkenntnis aus der klinischen Praxis zeigt auf, dass ein therapeutischer Nutzen erzielt werden könnte, wenn es gelänge, die invasive Ausbreitung der Tumorzellen über einen längeren Zeitraum zu unterbinden (Wagenaar-Miller et al., 2004).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die initiale Dissemination von Tumorzellen kaum verhindert werden kann. Das Ziel muss es demzufolge sein, durch therapeutische Intervention, das Auswachsen von disseminierten Tumorzellen zu Metastasen und die invasiven späten Schritte der metastatischen Kaskade zu unterbinden (Wagenaar-Miller et al., 2004).

2.4. Die Rolle der Matrix Metalloproteinasen (MMPs) bei der Metastasierung

Für das Erreichen des Fernzieles einer effizienten anti-metastatischen Therapie, müssen zunächst geeignete therapeutische Zielmoleküle identifiziert werden. Wie bereits mehrfach aufgeführt, leisten Proteasen essentielle Beiträge zu allen Schritten der metastatischen Kaskade und werden deshalb als potentielle Zielmoleküle erachtet (Ahmad und Hart, 1997; Nguyen, 2004). Unter der Vielzahl der Proteasen stehen besonders die Mitglieder der Familie der MMPs im Fokus. Gemeinsam können die Mitglieder dieser Proteasefamilie alle Proteine der Basallamina oder der EZM abbauen (Egeblad und Werb, 2002; Stamenkovic, 2003). Die proteolytische Aktivität der MMPs ist die Grundvoraussetzung für alle invasiven Schritte der metastatischen Kaskade (Wagenaar-Miller et al., 2004; Deryugina und Quigley, 2006).

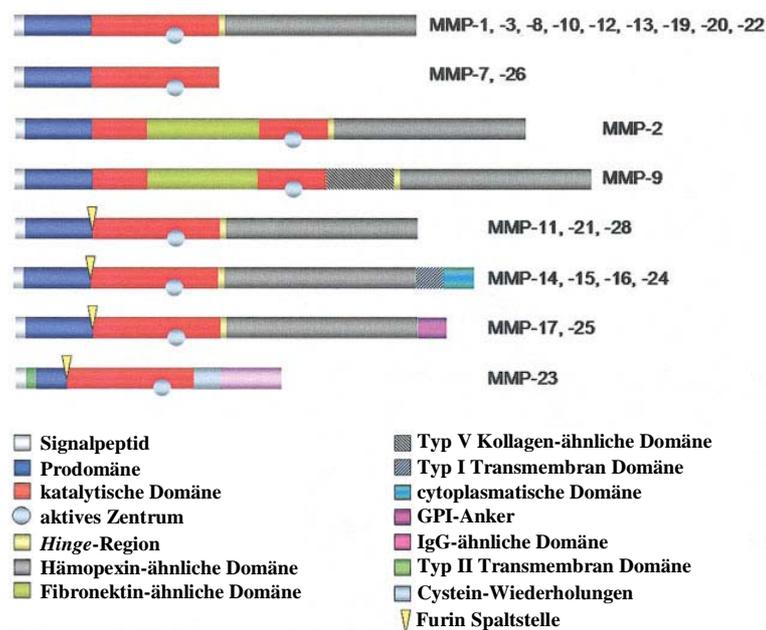


Abbildung 2.2: Darstellung des schematischen Aufbaus der MMPs

Gezeigt ist der schematische Aufbau der MMPs mit den einzelnen Domänen (verändert nach Lemaitre und D'Armiento, 2006).

2.4.1. Allgemeine Einführung in die Biologie der Matrix-Metalloproteinasen

Die MMPs bilden eine Gruppe von 23 strukturverwandten Zink-abhängigen Endopeptidasen (Nagase und Woessner, 1999; Visse und Nagase, 2003). Basierend auf ihrer Struktur und Substratspezifität werden die MMPs in die Untergruppen der Kollagenasen, Stromelysine, Stromelysin-ähnliche MMPs, Matrilysine, Gelatinasen, membranständige MMPs (*membrane type-MMPs*; MT-MMPs) und andere MMPs untergliedert (Abb. 2.2; Visse und Nagase, 2003). Die Grundstruktur aller MMPs besteht prinzipiell aus fünf Domänen: einem Signalpeptid für die Sekretion, einer Prodomäne die die Latenz gewährleistet, der katalytischen Domäne, einer *hinge*-Region und einer Hämopexin ähnlichen Domäne (Nagase et al., 2006). Die kleine, Prolin-reiche *hinge*-Region liegt zwischen der katalytischen und der Hämopexin ähnlichen Domäne. Die Funktion dieser Domäne ist bislang nicht eindeutig geklärt (Lemaitre und D'Armiento, 2006). Die C-terminale Hämopexin-ähnliche Domäne besteht aus vier Wiederholungen einer Subdomäne und bestimmt die Substratspezifitäten der MMPs (Nagase und Woessner, 1999). MMP-2 und -9 enthalten zusätzlich eine Kollagenbindedomäne (*collagen binding domain*; CBD) innerhalb der katalytischen Domäne (Visse und Nagase, 2003). Die CBD besteht aus drei Fibronectin Typ II Domänen (Bjorklund und Koivunen, 2005). Durch die CBD können die Gelatinasen besonders gut Kollagen Typ IV binden und nachfolgend spalten. Von den 23 bislang bekannten MMPs werden 15 als lösliche Formen sezerniert und 6 MMPs liegen membranständig vor (siehe Abb. 2.2). MT1-, MT2-, MT3- und MT5-MMP enthalten eine C-terminale Transmembrandomäne und MT4- und MT6-MMP haften über einen C-terminalen Glykosylphosphatidylinositol (GPI) Anker der äußeren Membran an (Visse und Nagase, 2003). Im katalytischen Zentrum aller MMPs befindet sich eine hoch konservierte Zink-Bindestelle (HEXGHxxGxxHS). Innerhalb dieser Sequenz sind die drei Histidine von besonderer Bedeutung, da diese über Wasserstoffbrücken das katalytische Zink-Ion (Zn^{2+}) binden und sterisch richtig positionieren (Nagase et al., 2006; Stamenkovic, 2003).

Die Aktivität der MMPs wird auf drei unterschiedlichen Ebenen reguliert: auf der Ebene der proteolytischen Aktivierung der Zymogen-Form, der Transkription und der Hemmung aktiver MMPs durch natürliche Inhibitoren (Stamenkovic, 2003). Alle MMPs werden als Proformen sezerniert. Für die Hemmung der Aktivität der Proform ist ein Cystein, aus einer konservierten Sequenz innerhalb der Prodomäne (PRCGxPD), verantwortlich. Dieses Cystein geht eine kovalente Bindung mit dem Zink-Ion im katalytischen Zentrum ein. Für die Aktivierung der MMPs muss die Prodomäne abgespalten werden (Zymogenaktivierung; Nagase und

Woessner, 1999). Für die Abspaltung sind hauptsächlich Serinproteinasen (z.B. Plasmin, Trypsin) oder bereits aktiviert vorliegende MMPs verantwortlich (Nagase, 1997; Visse und Nagase, 2003). Neben der Zymogenaktivierung werden die MMPs auf der Ebene der Gentranskription reguliert. Während bei nahezu allen Krankheiten die Expression von mehreren MMPs induziert ist (Lemaitre und D'Armiento, 2006), sind die Expressions-Level der einzelnen MMPs im gesunden Gewebe sehr gering (Stamenkovic, 2003). Die Expression von MMPs kann durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, physikalischen Stress, Zell-Matrix oder Zell-Zell-Interaktionen induziert werden (Nagase und Woessner, 1999; Stamenkovic, 2003). Neben den beiden beschriebenen Möglichkeiten der Regulation werden die MMPs zusätzlich noch durch ihre natürlichen Inhibitoren, auf der Ebene ihrer Aktivität, reguliert. Hierbei sind vorrangig die *tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases* (TIMPs) zu erwähnen (Gomez et al., 1997; Visse und Nagase, 2003). Die TIMPs sind natürliche Breitspektrum-Inhibitoren der MMPs. Bislang wurden in Vertebraten vier TIMPs (TIMP-1 – 4) charakterisiert (Brew et al., 2000). TIMPs binden MMPs in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1. Die TIMPs sind natürliche Breitspektrum-Inhibitoren der MMPs, da sie prinzipiell alle MMPs hemmen können, bis auf die Ausnahme, dass TIMP-1 MT1-MMP nicht hemmen kann (Gomez et al., 1997).

Die komplexen Regulationen der Aktivität und Expression der MMPs weisen auf ihre bedeutenden Beiträge zu physiologischen Prozessen hin (McCawley und Matrisian, 2001; Egeblad und Werb, 2002;). Eine gezielte, räumliche und zeitliche Aktivierung/Inaktivierung unterschiedlicher MMPs ist für einen normalen Ablauf vieler physiologischer Prozesse von entscheidender Bedeutung, und im Gegensatz hierzu ist eine unkontrollierte proteolytische Aktivität der MMPs oftmals ein Anzeichen für pathologische Veränderungen (Lemaitre und D'Armiento, 2006).

2.4.2. Die Rolle der Matrix Metalloproteinasen bei Tumorerkrankungen

Aktive MMPs sind unter physiologischen Bedingungen in vielfältige Prozesse wie in die Morphogenese, die Wundheilung, die Angiogenese oder die Immunantwort involviert. Ein koordinierter Ablauf dieser physiologischen Prozesse wird durch gezielte, zeitliche und räumliche Aktivierungen und Inaktivierungen der MMPs gewährleistet (Sternlicht und Werb, 2001; Egeblad und Werb, 2002; Overall und Kleinfeld, 2006b). Deregulierte Aktivitäten oder Überexpressionen von MMPs können hingegen bei nahezu allen Krankheiten nachgewiesen werden (Lemaitre und D'Armiento, 2006). So tragen die MMPs zu der Entstehung oder der

Progression unterschiedlichster Krankheiten, wie der rheumatoiden Arthritis (Tchetverikov et al., 2003), der Osteoarthritis (Goldring und Goldring, 2007), der Periodontitis (Sorsa et al., 2004) oder eben Krebs bei (Deryugina und Quigley, 2006).

Bei der Entstehung und der Progression von Krebs stehen die MMPs in besonderem Maße im Fokus, da sie die Fähigkeit besitzen alle Bestandteile der EZM abzubauen und deshalb für die Invasion und Migration von Tumorzellen essentiell sind (Vihinen und Kahari, 2002; Fingleton, 2007). In nahezu allen untersuchten Fällen ist die Expression von MMPs in tumorigenem Gewebe, im Vergleich zu gesundem Gewebe, deutlich verstärkt (Pavlaki und Zucker, 2003; Lemaitre und D'Armiento, 2006). Eine erhöhte Expression von MMPs kann in allen Tumorerkrankungen im Urin oder im Plasma nachgewiesen werden, und grundsätzlich besteht eine Korrelation zwischen dem Status der Tumorprogression und der Expression unterschiedlicher MMPs (Nelson et al., 2000; Wagenaar-Miller et al., 2004). In Adenokarzinomen des Kolon kann die Expression von MMP-1, -2, -3, -7 und -11 nachgewiesen werden, während in benignen Polypen des Kolon nur MMP-7 nachweisbar ist (Newell et al., 1994). Auch die Neubildung von Blutgefäßen, die die Grundlage des Wachstumspotentials von Primärtumoren ist, ist mit der Aktivität von MMPs assoziiert (Bjorklund und Koivunen, 2005; Handsley und Edwards, 2005). Zudem hat eine Vielzahl von Studien gezeigt, dass das Expressions-Level der MMPs mit der invasiven Ausbreitung von Tumoren und der Ausbildung von Metastasen korreliert ist (Polette et al., 2004; Fingleton, 2007). Eine Korrelation zwischen der Expression von Proteasen und der hämatogenen Ausbreitung von Tumoren wurde für MMP-2 bei Brustkrebs (Talvensaaari-Mattila et al., 1999) und für MMP-1 beim Kolorektalkarzinom (Sunami et al., 2000) nachgewiesen.

2.5. Die Entwicklung und das Scheitern der Breitspektrum-MMP-Inhibitoren

Die viel versprechenden klinischen Daten über die Korrelation der Expressionslevel mehrerer MMPs mit der Ausbreitung von Tumorerkrankungen oder einer schlechten Prognose für das Überleben der Patienten, veranlasste Wissenschaftler und die pharmazeutische Industrie zur Entwicklung von synthetischen MMP-Inhibitoren (MMPIs; Coussens et al., 2002; Fingleton, 2003). Da zum Zeitpunkt dieser Entwicklungen davon ausgegangen wurde, dass alle MMPs, durch den Abbau von EZM-Strukturen die Entstehung von Metastasen fördern, wurden in einem ersten Ansatz Breitspektrum-MMP-Inhibitoren entwickelt (Pavlaki und Zucker, 2003). Der Ansatz der Breitspektrum-MMP-Hemmung hatte das Ziel die exzessive proteolytische

Degradation von EZM, wie sie in Tumor tragendem Gewebe auftritt, auf das niedrige Niveau von gesundem Gewebe zurückzuführen und hierdurch die Ausbreitung der malignen Erkrankung zu unterbinden.

Die Strategie bei der Entwicklung der MMPis war es, synthetische Inhibitoren zu generieren die stereospezifisch die katalytische Region der MMPs binden und deren funktionelle Gruppe, das katalytische Zink-Ion, chelatieren (Pavlaki und Zucker, 2003). Einer der ersten Breitspektrum-MMP-Inhibitoren war Batimastat (BB-94). BB-94 hemmt hauptsächlich MMP-1, -2, -3, -8, -9 und -14 (Pavlaki und Zucker, 2003). Da BB-94 relativ unlöslich ist, wurde für die klinischen Studien eine Variante mit ähnlichen inhibitorischen Eigenschaften, aber verbesserter Löslichkeit entwickelt (Marimastat, BB-2516). Beide Inhibitoren wurden in klinische Phase I Studien getestet, Batimastat wurde jedoch auf Grund seiner äußerst geringen Löslichkeit nach kurzer Zeit durch Marimastat ersetzt (Rasmussen und McCann, 1997). Bereits in den klinische Phase I Studien wurden die ersten Nebenwirkungen der Breitspektrum-MMP-Inhibition ersichtlich (Hidalgo und Eckhardt, 2001; Zucker et al., 2000). Schwerpunktmäßig wurde als eine Nebenwirkung das sog. muskulär-skelettale Syndrom diagnostiziert, das durch reduzierte Mobilität der Patienten, Gelenkschmerzen, Gelenksteifigkeit, farbliche Hautveränderungen und der Bildung von Ödemen gekennzeichnet ist (Pavlaki und Zucker, 2003). Trotz dieser Nebenwirkungen wurde Marimastat in vielen weiteren klinische Phase II und III Studien auf anti-metastatische Effizienz getestet, doch bis heute konnten kaum eindeutige therapeutische Effekte nachgewiesen werden. Lediglich in einer Studie, bei Patienten mit nicht rezidierbaren Magenadenokarzinomen, konnte im Vergleich zu einer Placebokontrolle eine signifikante Steigerung des mittleren Überlebens erreicht werden (Bramhall et al., 2002). Dieser Studie stehen jedoch viele andere gegenüber, die keine Hinweise auf eine anti-metastatische Effizienz von Marimastat erbracht haben (Nemunaitis et al., 1998; Pavlaki und Zucker, 2003). Auch die Tests anderer Breitspektrum-MMP-Inhibitoren wie GM6001 (Prinomastat) erbrachten in der Klinik keine signifikanten Ergebnisse (Heath et al., 2006). Eine klinische Phase III Studie mit dem Breitspektrum-Inhibitor Bay 12-9566, bei fortgeschrittenem kleinzelligen Lungenkarzinom, musste sogar vorzeitig abgebrochen werden, da die Applikation dieses Inhibitors das Überleben der behandelten Patienten sogar verkürzte (Zucker et al., 2000; Coussens et al., 2002).

Bei Tests des Breitspektrum-MMP-Inhibitors Batimastat in Tiermodellen konnte sogar eine Metastasierungsfördernde Auswirkung dieser Substanz nachgewiesen werden (Krüger et al., 2001). Durch die Applikation von Batimastat wurde die experimentelle Metastasierung einer murinen T-Zell Lymphomzelllinie und einer humanen Brustkarzinomzelllinie in die Leber

induziert. Wie gezeigt werden konnte, führte die Gabe von Batimastat sogar in tumorfreien Lebern zu signifikanten Veränderungen der Genexpression Metastasierungs-assoziiierter Faktoren. So wurde nach Gabe von Batimastat eine verstärkte Expression von MMP-9 und von Angiogenese-fördernden Faktoren detektiert (Krüger et al., 2001).

Diese Arbeit erbrachte die ersten Hinweise auf die molekularen Ursachen des Scheiterns der Breitspektrum-MMP-Inhibitoren. Zum damaligen Zeitpunkt ist der jetzt bekannten Tatsache nicht Rechnung getragen worden, dass MMPs neben einer reinen EZM-abbauenden Funktion auch regulatorische Funktionen bei physiologischen Prozessen besitzen (Chambers und Matrisian, 1997; McCawley und Matrisian, 2001; Egeblad und Werb, 2002). Eine detaillierte Bestimmung dieser regulatorischen Beiträge der MMPs, sowohl zu physiologischen als auch zu pathologischen Prozessen, ist unerlässlich, bevor neue anti-proteolytische Therapien geplant werden können. Ein umfassenderes Wissen der regulatorischen Beiträge der einzelnen MMPs könnte zu neuen Therapien führen, die eine signifikant verbesserte anti-metastatische Wirksamkeit bei gleichzeitig stark reduzierten Nebenwirkungen aufweisen.

2.6. Bedeutung der Gewebemöostase für die Tumorprogression und das Gelingen anti-metastatischer Therapiestrategien

Ein Kennzeichen von gesunden Geweben oder Organen ist ein Fließgleichgewicht auf molekularer Ebene, das durch eine gezielte, räumliche und zeitliche Aktivierung/Inaktivierung, Hemmung oder Expression verschiedener Moleküle reguliert wird (Overall und Kleinfeld, 2006b). Der Erhalt dieser Gleichgewichte ist die Voraussetzung für eine physiologische Homöostase in jedem Gewebe eines Organismus.

Auf molekularer Ebene sind viele Faktoren in komplexen regulatorischen Kaskaden miteinander verknüpft, und diese Interaktionen führen insgesamt zur Ausbildung der jeweiligen Homöostase (Overall und Dean, 2006; Gupta und Massague, 2006). Durch jede Intervention mit Faktoren, die maßgeblich an der Regulation/Ausbildung einer Homöostase beteiligt sind, wird die etablierte Homöostase gestört und eine neue Homöostase wird ausgebildet. Die Veränderungen von Homöostasen können experimentell durch die Bestimmung von Genexpressionsprofilen erfasst werden. In diesem Kontext ist es wichtig herauszustellen, dass unterschiedliche Homöostasen die Ausbreitung einer Krankheit gleichermaßen hemmen oder auch fördern können (Gupta und Massague, 2006). Die jeweilige Auswirkung einer etablierten Homöostase auf die Progression einer Krankheit, wird

durch die Anzahl und die Expressions-Level von krankheitsfördernden oder -hemmenden Faktoren bestimmt.

Unterschiedliche Homöostasen sind besonders im Falle der Ausbreitung maligner Erkrankungen relevant. Eine physiologische Homöostase in einem gesunden Gewebe oder Organ gewährleistet eine Umgebung, die für invadierende Tumorzellen feindlich ist und der Etablierung von Metastasen entgegenwirkt (Gupta und Massague, 2006). Es wurde diskutiert, dass Tumorzellen ein Organ erst dann kolonisieren können, wenn die physiologische Homöostase verändert und das entsprechende Organ für die Aufnahme von Tumorzellen vorbereitet wurde (Fidler, 2003; Gupta und Massague, 2006). Die Einflüsse unterschiedlicher Homöostasen auf die Progression einer malignen Tumorerkrankung konnten bereits von Hunter et al. dargestellt werden (Hunter et al., 2003). Die genetische Diversität unterschiedlicher Mäusestämmen spiegelt sich auch in unterschiedlichen Homöostasen in allen Geweben wider. In der aufgeführten Studie wurden durch Auskreuzungen aus dem Mausstamm FVB/n *PymT* (Polyomavirus *middle T* Antigen) neue Mauslinien erzeugt, und wie sich zeigte, führten die Auskreuzungen auch zur Etablierung neuer Homöostasen, wie dies durch die Bestimmung der Genexpressionsprofile im Lungengewebe nachgewiesen werden konnte. Durch die genomische Integration des Polyomavirus *middle T* Antigens entwickeln alle erzeugten Stämme spontan Brustkarzinome, die in die Lunge metastasieren (Guy et al., 1992). Es zeigte sich, dass jede der neu etablierten Homöostasen eine unterschiedliche Suszeptibilität der Lunge für die Kolonisierung durch Tumorzellen zur Folge hatte (Hunter et al., 2003). Manche Stämme entwickelten mehr, manche Stämme weniger Lungenmetastasen. Diese Ergebnisse sind für die Entwicklung zukünftiger anti-metastatischer Therapiestrategien von entscheidender Bedeutung. Für jedes neue Therapeutika muss genau abgewägt werden, inwiefern dieses die physiologische Homöostase verändert, und ob aus der neu ausgebildeten Homöostase eine Umgebung resultiert, die eventuell die Progression einer Krankheit unterstützen könnte (Overall und Kleinfeld, 2006b).

Auf Grund von vielen, unterschiedlichen regulatorischen Funktionen sind die MMPs in nahezu alle physiologisch wichtigen Prozessen involviert (Chambers und Matrisian, 1997; Egeblad und Werb, 2002). Beiträge von MMPs wurden für die Wundheilung (Lund et al., 1999), die Entwicklung (Holmbeck et al., 1999; Lemaitre und D'Armiento, 2006) oder die Immunantwort (de Visser et al., 2005; Tlsty und Coussens, 2006) beschrieben. Durch eine Hemmung der Aktivität von MMPs wird somit nicht nur die Invasivität von Tumorzellen unterdrückt, sondern es wird gleichzeitig in die Regulation von physiologisch wichtigen Prozessen eingegriffen (auf dem Keller et al., 2007). Die MMPs sind somit immer an der

Ausbildung der Gewebekomöostase beteiligt und eine Hemmung von MMPs führt zur Ausbildung einer neuen Homöostase. Das Unwissen über diese Tatsache führte zum Scheitern der Breitspektrum-MMP-Inhibitoren in der Klinik (Coussens et al., 2002). Wie gezeigt werden konnte, führte die Applikation dieser Inhibitoren auch in tumorfreien Mäusen zu veränderten Homöostasen, wie dies durch die Detektion von veränderten Genexpressionen nachgewiesen werden konnte (Krüger et al., 2001). Die negativen Auswirkungen einer durch Breitspektrum-MMP-Hemmung veränderten Homöostase auf die Metastasierung, wurde auf besonders drastische Weise durch die Überexpression von TIMP-1 in der Leber gezeigt (Kopitz et al., 2007). TIMP-1 induzierte die Expression einer Vielzahl von Metastasierungs-fördernden Faktoren und aktivierte die Signaltransduktion über den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) in der Leber. Dies führte zu einer starken Induktion der Streuung einzelner Tumorzellen in der Leber (Kopitz et al., 2007). Diese Studie belegt, wie die Hemmung von MMPs zur Ausbildung einer neuen, krankheitsfördernden Homöostase in der Leber führen kann, und wie wichtig es ist, die Auswirkungen jeglicher therapeutischer Intervention auf die Gewebekomöostase zu berücksichtigen.

2.7. Pleiotrope Funktionen der MMPs

Das Scheitern der Breitspektrum-MMP-Inhibitoren ist auf die damals nicht bekannte Tatsache zurückzuführen, dass die MMPs nicht nur die Strukturproteine der EZM abbauen und hierdurch die Migration und die Invasion von Zellen ermöglichen, sondern dass die MMPs auch wichtige regulatorische Funktionen ausüben (Coussens et al., 2002; Egeblad und Werb, 2002).

Beispielsweise werden durch den MMP-vermittelten Abbau der EZM Peptide mit regulatorischen Funktionen freigesetzt. Zellen verfügen über Rezeptoren, wie z.B. die Integrine, mit denen sie diese EZM-Abbauprodukte detektieren können (Streuli, 1999). Der Abbau der EZM führt zudem zur Freisetzung sog. kryptischer Regionen in EZM-Strukturproteinen. Nach Abspaltung von Fragmenten von Laminin-5 (Giannelli et al., 1997) oder Kollagen Typ IV (Xu et al., 2001) werden Regionen im übrig bleibenden Fragment frei zugänglich, die die Migration von Zellen fördern. Eine weitere Möglichkeit wie MMPs regulatorische Wirkung entfalten können ist die Abspaltung von Rezeptoren von Zelloberflächen, das sog. *shedding*. So wird beispielsweise der Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor-1 (*fibroblast growth factor receptor-1*; FGFR-1) von MMP-2 abgespalten (Levi et al., 1996). Zellen deren Rezeptoren abgespalten wurden, können nicht mehr auf die zum jeweiligen Rezeptor gehörenden

Liganden reagieren. Auch die Aktivität dieser Liganden kann durch die Aktivität von MMPs reguliert werden. Das Netzwerk der EZM dient als Reservoir für Wachstumsfaktoren, die dort in inaktiver Form gespeichert vorliegen (Egeblad und Werb, 2002). Der Abbau der EZM führt zur Freisetzung dieser Wachstumsfaktoren. So werden die Aktivitäten der Wachstumsfaktoren *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *transforming growth factor- β* (TGF β ; Mott und Werb, 2004) zum Teil auf diese Weise reguliert. Nach der Freisetzung aus der EZM müssen die meisten Wachstumsfaktoren noch durch eine proteolytische Prozessierung der Proform aktiviert werden. Beispielsweise wird der *insulin-like growth factor* (IGF) durch MMP-9 aktiviert (Manes et al., 1999) oder TGF β wird durch MMP-2 und MMP-9 in seine aktive Form überführt (Yu und Stamenkovic, 2000). Neben der Aktivierung spielt auch die Inaktivierung verschiedener Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle (McQuibban et al., 2000; Opdenakker et al., 2001).

Die MMPs verfügen somit über unzählige regulatorische Funktionen, und eine Hemmung von MMPs wird immer Auswirkungen auf die Abläufe physiologischer Prozesse haben. Wie sich die hieraus resultierenden Veränderungen auf die Progressionen von Krankheiten auswirken ist im Einzelfall noch nicht bekannt.

2.8. Das proteolytische Netzwerk

Die Hemmung kritischer, regulatorischer Funktionen der MMPs ist die Ursache für die schweren Nebenwirkungen der Breitspektrum-MMP-Hemmung (Coussens et al., 2002). Dennoch bleibt festzuhalten, dass die Aktivität von MMPs für die invasive Ausbreitung von Tumoren essentiell ist und dass MMPs noch immer viel versprechende Kandidaten für eine anti-invasive, therapeutische Strategie sind (Stamenkovic, 2000; Polette et al., 2004). Für die Umsetzung einer anti-invasiven Therapie mit verbesserter Wirksamkeit und tolerierbaren Nebenwirkung ist es nun notwendig, die Bedeutungen der einzelnen MMPs detailliert zu erarbeiten. Eine Möglichkeit, eine anti-proteolytische Therapie zu verwirklichen, ist die spezifische Hemmung einer MMP, deren Hemmung die invasive Ausbreitung von Tumoren unterbindet und deren Hemmung gleichzeitig zu möglichst wenigen und tolerierbaren Nebenwirkungen führt (Overall und Kleinfeld, 2006a). Dies setzt voraus, dass die regulatorischen Funktionen der einzelnen MMPs untersucht werden, um deren Rollen als Effektormoleküle der Metastasierung und als Regulatoren der Gewebemöostase zu identifizieren.

Bei der Planung einer auf spezifischer Hemmung von MMPs aufbauender Therapie muss jedoch eine Art der Aktivierung der MMPs besonders berücksichtigt werden. MMPs werden als Zymogene sezerniert und durch proteolytische Abspaltung des Propeptids aktiviert (Stamenkovic, 2003; Nagase et al., 2006). MMPs werden extrazellulär durch andere Proteasen, wie Serinproteasen oder bereits aktiv vorliegende MMPs aktiviert (Nagase, 1997). Beispielsweise wird MMP-2 durch MT1-MMP (Strongin et al., 1995) und MMP-9 wird durch MMP-3 aktiviert (Ogata et al., 1992). Durch diese Art der Aktivierung sind die MMPs auf der Ebene ihrer Aktivität miteinander verknüpft und bilden ein regulatorisches Netzwerk aus. Insgesamt sind die MMPs aber nur ein Teil des gesamten Netzwerks, das aus allen extrazellulären Proteasen besteht, die sich gegenseitig aktivieren können. Plasminogen kann beispielsweise durch MMP-3 oder MMP-9 aktiviert werden (Stamenkovic, 2003). Die Erkenntnis über die vielfältigen Verknüpfungen der Proteasen untereinander und die Erkenntnis, dass alle Proteasen in einem regulatorischen Netzwerk miteinander verbunden sind, führten zu dem Begriff des Protease-Netzwerks (Overall und Kleifeld, 2006b).

Mit diesem Begriff werden die unzähligen Interaktionen der Proteasen beschrieben. Die komplexen Zusammenhänge innerhalb des Netzwerks machen es nahezu unmöglich, die Folgen einer Hemmung von MMPs *in silico* zu beurteilen (Overall und Kleifeld, 2006a). Basierend auf den äußerst komplexen Funktionen der einzelnen MMPs ergibt sich das Problem, dass auch eine spezifische Hemmung einer ausgewählten MMP zu unerwarteten Nebenwirkungen führen kann. Aus diesem Grund müssen die Auswirkungen einer spezifischen Hemmung einer MMP, auf die Invasivität von Tumorzellen und die Auswirkungen auf die Gewebemöostase, in *in vivo* Modellen untersucht werden, bevor neue MMP-basierte anti-invasive Therapiestrategien verwirklicht werden können.

2.9. MMP-9 als potentiell Zielmolekül einer anti-metastatischen Therapie

Der erste Schritt auf dem Weg zu einer auf spezifischer MMP-Hemmung basierenden, anti-metastatischen Therapie ist die Identifikation eines potentiellen Zielmoleküls aus der Gruppe der MMPs. Ein zentraler Schritt der für die Etablierung von Metastasen essentiell ist, ist der Abbau der Basalmembran. Sowohl beim Eindringen in das Blutgefäßsystem am Ort des Primärtumors als auch bei der Extravasation im Zielorgan der Metastasierung muss die Basallamina überwunden werden (Liotta et al., 1980; Nguyen, 2004; Gupta und Massague, 2006). Der Hauptbestandteil der Basallamina ist Kollagen Typ IV, das vornehmlich durch die

sog. Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 abgebaut wird (Liotta und Stetler-Stevenson, 1990). Übereinstimmend mit dieser Funktion von MMP-2 und -9, können bei vielen malignen Erkrankungen erhöhte Plasmawerte beider Proteasen detektiert werden (Mook et al., 2004; Vihinen und Kahari, 2002). Bei einigen malignen Tumoren konnte sogar eine Korrelation der Expression der Gelatinasen mit dem Überleben der Patienten nachgewiesen werden (Vihinen und Kahari, 2002). Bei Kolon- oder Kolorektalkarzinomen korreliert die Expression und Aktivität von MMP-2 mit dem Stadium und der Progression der Krankheiten (Levy et al., 1991; Chan et al., 2001; Ornstein und Cohn, 2002). Eine grundsätzliche Assoziation der Expression oder Aktivität von MMP-2 mit der Aggressivität maligner Erkrankungen konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden (Vihinen und Kahari, 2002). Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass die Expression von MMP-2 mehr mit der Ausbildung neuer Blutgefäße und dem Auswachsen von Tumoren oder Metastasen assoziiert ist (Deryugina und Quigley, 2006). Die Beiträge von MMP-2 zur Angiogenese oder dem Auswachsen von Tumoren konnten in *Mmp-2-knockout* Mäusen bestätigt werden (Itoh et al., 1998).

Im Gegensatz zu MMP-2 gibt es für MMP-9 bedeutend mehr Studien die diese Protease mit der Invasivität maligner Erkrankungen korrelieren (Zucker und Vacirca, 2004; Bjorklund und Koivunen, 2005). Beim Brustkarzinom konnte eine signifikante Korrelation von MMP-9 Plasmawerten mit der Tumorprogression gezeigt werden (Ranuncolo et al., 2003). Bei dieser Studie wurden im Zeitraum kurz nach der Entfernung der Primärtumoren sehr hohe Werte von MMP-9 im Plasma gemessen, die in der folgenden Zeit stetig abnahmen. Nicht absinkende oder wieder ansteigende Werte von MMP-9 waren mit dem Auftreten von Rezidiven und der Ausbildung von Metastasen korreliert (Ranuncolo et al., 2003). Beim Kolorektalkarzinom ist die Expression von MMP-9 im Primärtumor mit der Entstehung von Metastasen (Mook et al., 2004; Bjorklund und Koivunen, 2005) und die Expression von MMP-9 in den Metastasen mit einer verkürzten krankheitsfreien Periode und einer kürzeren Überlebensdauer der Patienten korreliert (Zeng et al., 1996).

Diese klinischen Daten implizieren, dass MMP-9 ein potientes Zielmolekül einer anti-metastatischen Therapie sein könnte. Um die Bedeutung von MMP-9 als potientes Zielmolekül zu untersuchen, wurden spezifische, synthetische Inhibitoren gegen MMP-9 entwickelt. In tierexperimentellen Tests zeigte sich eine Korrelation zwischen der Spezifität der Inhibitoren gegenüber MMP-9 und ihrer anti-metastatischen Effizienz (Arlt et al., 2002). Mit einem kürzlich entwickelten Inhibitor, mit verbesserter Selektivität, konnte die anti-metastatische Effizienz nochmals verbessert werden (Krüger et al., 2005). Für eine Validierung von MMP-9 als Zielmolekül einer anti-metastatischen Therapie, müssen jedoch

zuerst die jeweiligen Bedeutungen von MMP-9, als Regulator einer physiologischen Homöostase oder als Effektormolekül der Metastasierung untersucht und gegeneinander abgewogen werden.

2.10. MMP-9 als Regulator der Gewebhomöostase

Die Auswertungen klinischer Studien und tierexperimenteller Untersuchungen implizieren, dass MMP-9 ein potentielles Zielmolekül einer anti-invasiven Therapie sein könnte. Bei der Lokalisation von MMP-9 mRNA wurde jedoch festgestellt, dass MMP-9 in Metastasen-tragendem Gewebe hauptsächlich von Stroma-, Endothel- oder Immunzellen, und nicht von den Tumorzellen selbst exprimiert wird (Polette et al., 1994; Zeng und Guillem, 1996; Nelson et al., 2000; Hiratsuka et al., 2002). Illemann et al. und Zeng et al. berichteten, dass MMP-9 in Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms hauptsächlich von tumorinfiltrierenden Makrophagen exprimiert wird (Zeng und Guillem, 1995; Illemann et al., 2006). Diese Ergebnisse weisen auf eine wichtige Rolle von MMP-9 auf Seiten der Wirtszellen bei der Metastasierung hin. Bevor eine spezifische Hemmung von MMP-9 in der Klinik in Erwägung gezogen werden kann, müssen die Auswirkung der Hemmung von MMP-9 auf die Wirtszellen untersucht werden.

Durch die Aktivität von MMP-9 werden wichtige Prozesse reguliert, die zur Aufrechterhaltung einer physiologischen Gewebhomöostase beitragen (Van den Steen et al., 2002). Besonders in der Leber, einem der Hauptzielorgane der Metastasierung, werden einige Faktoren durch MMP-9 reguliert. MMP-9 aktiviert den *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1/CXCL-12; McQuibban et al., 2001) oder den *tumor necrosis factor- α* (TNF- α ; Gearing et al., 1994). Auch die Interleukine (IL) IL-1 β (Schonbeck et al., 1998) oder IL-8 (Van den Steen et al., 2000) werden von MMP-9 aktiviert. Die hier aufgeführten Faktoren sind wichtige Signalmoleküle und tragen zum Erhalt einer physiologischen Homöostase bei.

Neben den gewebespezifischen Zellen im Zielorgans der Metastasierung tragen auch die Zellen des hämatopoietischen Systems zur Gesamt-Effizienz der Metastasierung bei (Gupta und Massague, 2006; Kaplan et al., 2006b). Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Immun- und hämatopoietische Stamm- oder Vorläuferzellen. Es wurde bereits gezeigt, dass die Zellen hämatopoietischen Ursprungs etablierte Metastasen oder prämetastatisches Gewebe infiltrieren (Illemann et al., 2006; Kaplan et al., 2006a). Hiratsuka et al. zeigten, dass die Expression von MMP-9 durch Makrophagen ein entscheidender Beitrag zur Ausbildung von prämetastatischen Nischen in der Lunge ist (Hiratsuka et al., 2002). Dieses Ergebnis impli-

ziert, dass die Hemmung von MMP-9 in diesen Zellen anti-metastatische Wirkung haben könnte. Das Gewebe, aus dem diese Zellen entstammen, ist das Knochenmark. Im Knochenmark ist MMP-9 an zwei zentralen Prozessen der Homöostase beteiligt. MMP-9 aktiviert SDF-1, den Liganden des membranständigen Rezeptors CXCR-4 (McQuibban et al., 2001). Ein Gradient von SDF-1 führt zur Mobilisierung von CXCR-4⁺-Zellen aus dem Knochenmark und es wurde bereits gezeigt, dass über diesen Mechanismus die Infiltration von CD34⁺ Stammzellen in die Leber reguliert wird (Kollet et al., 2003). Der zweite zentrale Prozess ist die MMP-9-vermittelte Freisetzung des Kit-Liganden (KitL; Heissig et al., 2002). Die Proform von KitL wird in membranständiger Form exprimiert (Reber et al., 2006). Durch MMP-9-vermittelte Abspaltung des extrazellulären Anteils von KitL wird dieser aktiviert (Heissig et al., 2002). KitL ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für die hämatopoietischen Vorläuferzellen im Knochenmark (Heissig et al., 2003). Die Signaltransduktion von aktivem KitL über seinen Rezeptor c-Kit führt zur Überführung von Vorläuferzellen aus der Ruhenische in die Proliferationsnische im Knochenmark (Heissig et al., 2003). Es wurde bereits gezeigt, dass diese Transition aus der Ruhe- in die Proliferationsnische in *Mmp-9-knockout* Mäusen blockiert ist (Heissig et al., 2002).

Zusammengefasst belegen diese Untersuchungen, dass MMP-9 ein wichtiger Regulator der Homöostase in unterschiedlichen Geweben sein kann, und somit die Hemmung von MMP-9, durch eine Veränderung der Gewebekomöostase, die Effizienz der Metastasierung beeinflussen könnte. Die Beiträge von Wirtszell-MMP-9 wurden durch die Verwendung von *Mmp-9-knockout* Mäusen untersucht. Die Verwendung dieser Mäuse erbrachte jedoch unterschiedliche Ergebnisse. Je nach dem genetischen Hintergrund der Mäuse, in den der *knockout* eingefügt wurde, oder der Art der verwendeten Tumorzellen, wurde das Tumorwachstum oder die Metastasierung gefördert oder gehemmt (Coussens et al., 2000; Hamano et al., 2003; Martin et al., 2008). Hierdurch deutet sich an, dass MMP-9 auf unterschiedliche Weise die Invasivität von Tumorzellen oder die Ausbildung der Gewebekomöostase beeinflussen kann.

2.11. MMP-9 als Effektormolekül der Metastasierung

Tierexperimentelle Untersuchungen, die die Rolle von MMP-9 bei der Metastasierung untersuchten, unterstützen die Ergebnisse der klinischen Studien. Die bislang durchgeführten Untersuchungen zum Beitrag von MMP-9 zur Tumorprogression weisen darauf hin, dass MMP-9 ein Zielmolekül einer anti-metastatischen Therapie sein könnte (Bjorklund und

Koivunen, 2005). Es wurde festgestellt, dass die Aktivität von MMP-9 entscheidend zu mehreren Schritten der metastatischen Kaskade beiträgt (Deryugina und Quigley, 2006).

Bereits zu Beginn der metastatischen Kaskade unterstützt MMP-9 die Entstehung von Tumoren. In einem spontanen Hautkarzinommodell wurde gezeigt, dass durch das Einkreuzen von *Mmp-9-knockout* Mäusen die Entwicklung von Tumoren in der Haut reduziert wird (Coussens et al., 2000). Auch das weitere Wachstum von Tumoren wird durch aktives MMP-9 unterstützt. Durch Anwendung des *Mmp-9-knockout* Modells konnte gezeigt werden, dass MMP-9 den sog. *angiogenic switch* initiiert (Bergers et al., 2000). Der *angiogenic switch* bezeichnet den Übergang eines Tumors von einem ruhenden in einen angiogenen Zustand. Auch bei den nächsten Schritten der metastatischen Kaskade, der lokalen Invasion und Intravasation, leistet MMP-9 essentielle Beiträge (Deryugina und Quigley, 2006). Bei der Untersuchung des Einflusses von MMP-9 auf die Metastasierung wurde gezeigt, dass der *knockout* von *MMP-9* die Metastasierung von Melanom oder Lungenkarzinomzellen in die Lunge reduziert (Itoh et al., 1999).

Wenn die Ergebnisse dieser Studien zusammenfassend betrachtet werden kann festgestellt werden, dass MMP-9 auf Seiten der Wirtszellen bei allen Schritten der Tumorprogression wichtige Beiträge leistet. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den klinischen Daten, die eine vorwiegende Expression von MMP-9 mRNA in Stroma-, Endothel- oder Immunzellen zeigten (Zeng und Guillem, 1996; Illemann et al., 2006). Von den spezifischen Beiträgen der Wirtszellen wurde bislang vornehmlich der Beitrag der Immunzellen, durch Anwendung der Technik des Knochenmarktransfers untersucht. Dies ergab, dass *Mmp-9* exprimiert von Knochenmarkzellen zum Überleben von Tumorzellen in der Lunge oder zur Angiogenese von Neuroblastomen, durch Förderung der Perizyteninfiltration, beiträgt (Chantrain et al., 2004; Acuff et al., 2006). Gorden et al. zeigten, dass *Mmp-9*, exprimiert von residualen Makrophagen der Lunge, das Auswachsen von Lungenmetastasen unterstützt (Gorden et al., 2007).

Während die Rolle von MMP-9 bei der Entstehung des Primärtumors, der Progression des Primärtumors oder beim Auswachsen von Metastasen gut untersucht ist, sind die Beiträge von MMP-9 zur Invasivität von Tumorzellen nicht eindeutig geklärt. Die in der Klinik nachgewiesene Korrelation zwischen den Plasmaleveln von MMP-9 und der verkürzten Überlebensdauer von Patienten des kolorektalen Karzinoms, deutet aber darauf hin, dass MMP-9 besonders zu diesen invasiven Schritten der Metastasierung beiträgt, d.h. dass die Aktivität von MMP-9 die Kolonisierung von Organen unterstützt.

2.12. *In vivo* Modelle

Die Auswirkungen einer spezifischen Hemmung einer Protease auf die Wirtszellen oder die Tumorzellen, können nur in *in vivo* Modellen untersucht werden. Grundlage der Etablierung von Metastasen ist die komplexe Interaktion der Tumorzellen mit den vielen unterschiedlichen Wirtszellen (Gupta und Massague, 2006). Diese komplexen Interaktionen, zwischen unterschiedlichen Zellen können nur in *in vivo* Modellen und nicht in *in vitro* Kulturen simuliert werden. Wie bereits beschrieben sind die Proteasen in extrazellulär ablaufende Regulationsmechanismen involviert, die maßgeblich zum Erhalt einer physiologischen Homöostase beitragen (Egeblad und Werb, 2002; Overall und Dean, 2006). Voraussetzung für eine Klinik nahe Simulation der extrazellulären Regulationen ist eine EZM wie sie *in vivo* vorgefunden wird. Eine derart komplexe Matrix kann *in vitro* nicht nachgeahmt werden.

Die Beiträge von MMP-9 zu den frühen Schritten der metastatischen Kaskade wurden bereits vielfach durch die Verwendung von Primärtumor oder spontanen Modellen untersucht (Deryugina und Quigley, 2006). Da in diesen Modellen die Tumorzellen zu unterschiedlichen, schwer vorhersagbaren Zeiten metastasieren, sind diese Modelle für die Untersuchungen der späten metastatischen Kaskade weniger geeignet. Für die Untersuchung des Einflusses eines bestimmten Faktors auf die Effizienz der Metastasierung, sind die experimentellen Tumormodelle besser geeignet. In diesen Modellen werden die Tumorzellen direkt intravenös appliziert, und das Stadium des Primärtumorwachstums wird übersprungen. Hierdurch kann der Zeitpunkt der Metastasierung besser eingegrenzt werden, wodurch die Bestimmung der Effizienz der Metastasierung wesentlich erleichtert wird.

Die Effizienz der Metastasierung in diesen Modellen, besonders die Metastasierung der Leber, ist jedoch oftmals sehr gering (Heijstek et al. 2005). Für die Detektion und Quantifizierung der Tumorzellen muss deshalb ein geeignetes Markergen in die Tumorzellen eingebracht werden, das auch die Detektion weniger Tumorzellen erlaubt. Ein solches Markergen ist das bakterielle β -D-Galaktosidase kodierende Gen *lacZ* aus *E. coli*. Dieses Gen kodiert für ein Enzym das intrazellulär das chromogene Substrat X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galaktopyranosid) hydrolysiert, wodurch ein blaues Präzipitat (Indigo) in den Zellen entsteht (Pearson et al., 1963). Mit diese Technik ist es sogar möglich die Tumorzellen auf Einzelniveau optisch zu detektieren (Krüger et al., 1999).

2.13. Spezifische Unterdrückung der Expression eines Zielgens in Wirts- oder Tumorzellen

Um die Auswirkungen einer spezifischen Hemmung einer Protease in den Wirtszellen auf die Metastasierung zu untersuchen, können *knockout* Mäuse verwendet werden. Durch die Integration eines Neomycinresistenzgens in die genomische Sequenz des Zielgens kann die Sequenz so verändert, dass dieses Gen für keine aktive Protease kodiert. Es gilt jedoch zu beachten, dass *knockout* Mausstämme während der gesamten Ontogenese unter diesem Defekt leiden. Bei der Behandlung von Patienten werden die Hemmungen von Zielgenen jedoch, durch die Applikation von Antikörpern oder pharmakologischen Inhibitoren, akut herbeigeführt. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus *knockout*-Modellen mit der klinischen Situation ist deshalb eingeschränkt. Eine Möglichkeit eine spontane Reduktion der Expression eines Gens zu erzielen, ist die Verwendung der RNAi-Technologie. Durch das Einbringen kurzer, inhibitorischer RNA-Sequenzen (siRNAs) kann eine Ziel-mRNA für den Abbau, durch einen zelleigenen Mechanismus, markiert werden (Hamilton und Baulcombe, 1999; Zamore et al., 2000). Eingebrachte siRNAs werden in den Zellen von dem Enzym *RISC* (*RNAi induced silencing complex*) erkannt und gebunden. Der so aktivierte Komplex sucht nachfolgend nach komplementären mRNA Sequenzen (Tuschl et al., 1999). Falls komplementäre Sequenzen gefunden werden, werden diese für den Abbau, durch das Enzym *Dicer*, markiert (Bernstein et al., 2001). Um eine lang anhaltende Unterdrückung der Expression eines Zielgens zu erreichen, können sog. *short-hairpin* RNAs (shRNAs), durch viralen Transfer in das Genom von Zielzellen eingeschleust werden (Brummelkamp et al., 2002b). shRNAs kodieren für komplementäre, 21 Basenpaar lange, *sense* und *antisense*, siRNA-Sequenzen die durch einen kurzen *Spacer* getrennt sind. Der *Spacer* ermöglicht nach der Transkription der shRNA die Rückfaltung der beiden komplementären *sense* und *antisense* Sequenzen (Brummelkamp et al., 2002b). Diese doppelsträngigen RNAs werden auch durch das Enzym *Dicer* prozessiert und die Spacersequenz wird abgetrennt. Das entstehende siRNA-Duplex wird von *RISC* erkannt. Mit dieser Technologie kann die Expression eines Zielgens in Tumorzellen spezifisch unterdrückt werden. Theoretisch kann mit dieser Technologie auch die Expression eines ausgewählten Zielgens akut, *in vivo*, in Wirtszellen unterdrückt werden. Die derzeit verfügbaren Transfersysteme ermöglichen jedoch keine ausreichend effiziente Transduktion möglichst vieler Zellen im Zielgewebe.

3. Ziel dieser Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer spezifischen Hemmung von MMP-9 zu beurteilen. Wie in der Einleitung dargelegt, gelten die Proteasen allgemein und im Besonderen die Gruppe der Matrix Metalloproteinasen als viel versprechende Zielmoleküle anti-metastatischer Therapien. Der Ansatz der Breitspektrum-MMP-Hemmung scheiterte jedoch in der Klinik, da bei diesem Ansatz die regulatorischen Funktionen der MMPs nicht berücksichtigt wurden. Es gilt nun zu untersuchen und zu beurteilen, ob durch die spezifische Hemmung einer MMP, nämlich MMP-9, eine anti-metastatische Wirksamkeit erzielt werden kann oder ob hierdurch starke Nebenwirkungen induziert werden.

Für diese Abschätzung von Nutzen und Risiko sollten die Auswirkungen einer spezifischen Hemmung von MMP-9 in den Wirts- und Tumorzellen getrennt beurteilt werden. Für die Simulation der Hemmung von MMP-9 auf Wirtsseite sollten *Mmp-9-knockout* Mäuse untersucht werden. In diesen Mäusen sollte die Auswirkung der Deletion von MMP-9 auf die Homöostase der Leber, einem Hauptzielorgan der Metastasierung, betrachtet werden. Zudem sollten potentiell auftretende Kompensationsmechanismen der spezifischen Hemmung von MMP-9 identifiziert und untersucht werden. Durch diese Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob eine spezifische Hemmung von MMP-9 in Wirtszellen die Homöostase von Geweben derart stört, dass ein oder mehrere Mechanismen induziert werden, die die Progression einer Tumorerkrankung entweder fördern oder hemmen. Die Auswirkungen der spezifischen MMP-9-Hemmung auf die Progression maligner Erkrankungen sollte in experimentellen Tumormodellen untersucht werden. Für die Untersuchung der Folgen einer spezifischen Hemmung von MMP-9 in den Tumorzellen sollte die shRNAi-Technik etabliert werden, und mit dieser Technik sollte die Expression von MMP-9 in den Tumorzellen stabil unterdrückt werden. Durch die Suppression von MMP-9 in den Tumorzellen sollte ermittelt werden, ob die Expression von MMP-9 in den Tumorzellen mit deren metastatischem Potential korreliert ist.

Die Untersuchung der Folgen der spezifischen Hemmung von MMP-9 in den Tumorzellen oder den Wirtszellen sollte dazu führen, das Risiko und das anti-metastatische Potential einer spezifischen Hemmung von MMP-9 besser beurteilen zu können. Durch das Wissen über die Beiträge von MMP-9 auf Seiten der Wirts- oder der Tumorzellen zur malignen Progression oder zur Regulation der Homöostase sollte dazu führen, dass zukünftig anti-metastatische Therapien entwickelt werden können, die eine verbesserte Wirksamkeit bei gleichzeitig verminderten Nebenwirkungen aufzeigen.

4. Material und Methoden

Alle Einmalartikel wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Firma Peske (Aindlingen-Arnhofen, Deutschland) bezogen. Bezugsquellen für Reagenzien und Chemikalien befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

4.1. Tierexperimentelle Methoden

4.1.1. Verwendete Versuchstiere

a) DBA/2 Mäuse

DBA/2 Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Dieser Mausstamm ist immunkompetent.

b) $Rag^{-/-}$ und $Rag^{-/-} Mmp-9^{-/-}$ Mäuse

Mmp-9-knockout Mäuse wurden von Prof. Lisa M. Coussens (University of California, San Francisco, Department of Pathology and Comprehensive Cancer Center) zur Verfügung gestellt und im SPF Tierbereich des Zentrum für präklinische Forschung (ZPF, Klinikum rechts der Isar der TU München) unter Sterilbedingungen gezüchtet. Mäuse mit einer homozygoten Null-Mutation im *Mmp-9* Gen wurden für die Untersuchung der Rolle von Mmp-9 auf Seiten der Wirtszellen bei der Metastasierung, der Homöostase der Leber und des Knochenmarks eingesetzt. Bei diesem Stamm handelt es sich um einen immundefizienten Inzucht-Mausstamm. Dieser Stamm trägt zusätzlich zur homozygoten Null-Mutation im *Mmp-9* Gen eine weitere homozygote Null-Mutation im *Recombination Activating Gene (Rag)*-Gen (Chantrain et al., 2004). Durch diese Mutation wird die Bildung von Antikörpern verhindert, dieser Stamm ist somit immundefizient (Chen et al., 1994). Im Gegensatz zu CD1 *nu/nu* Mäusen die keine Thymusdrüse entwickeln und somit über keine reifen B- und T-Zellen verfügen, haben *Rag*-Mäuse B- und T-Zellen. *Rag*-Mäuse können jedoch auf Grund der Deletion des *Rag*-Gens keine Antikörper bilden. Der $Rag^{-/-} MMP-9^{-/-}$ doppelt defiziente Mausstamm wurde von Chantrain et al. (Chantrain et al., 2004) durch mehrfache Rückkreuzung von C57BL/6-*Mmp-9^{-/-}* Mäusen (Vu et al., 1998) in FVB/N- $Rag^{-/-}$ -Mäuse (Chen et al., 1994) hergestellt.

Da diese Mäuse immundefizient sind, konnten verschiedene Tumorzelllinien inokuliert werden. Es wurden L-CI.5s (siehe 4.1.2), HT1080 (siehe 4.1.3) und CT26 (siehe 4.1.4) Zellen in *Mmp-9^{-/-}*-Mäuse inokuliert. Für die Perfusion der Lebern wurden vor der Entnahme der

Lebern Venenverweilkanülen (Neoflon™; 0,7×19 mm, BD, Heidelberg, Deutschland) in die *Vena cava caudalis* eingeführt. Auf eine Fixierung der Kanülen wurde verzichtet. Für die Perfusion wurden die Lebern mit min. 100 ml PBS durchspült.

4.1.2. L-CI.5s-Metastasierungsmodell

Zur Generierung experimenteller Makro- (Metastasen > 0,2 mm) und Mikrometastasen (einzelner gestreuter Metastasen) in der Leber wurden 5×10^3 murine *lacZ*-markierte L-CI.5s Zellen in die Schwanzvenen von DBA/2 (Charles River, Sulzfeld, Deutschland), *Rag*^{-/-} oder *Rag*^{-/-} *Mmp-9*^{-/-} Mäusen inokuliert. Die Mäuse wurden 6 oder 7 Tage nach Tumorzellinokulation geopfert. Für das *timecourse*-Experiment wurden die Mäuse 3 Stunden nach Tumorzellinokulation und an jedem folgenden Tag, bis Tag 9 geopfert. Für den Nachweis der *Mmp-9*-Promotoraktivität in L-CI.5s-Zellen wurden 1×10^5 Tumorzellen in *Mmp-9*^{-/-} oder *Mmp-9*^{+/+} Mäuse inokuliert. In diesem Versuch wurde die Zahl inokulierter Tumorzellen erhöht, da nach der Inokulation von 5×10^3 L-CI.5s-Zellen mit quantitativer RT-PCR keine Signale von Luciferase detektiert werden konnten. Diese Mäuse wurden 2 Stunden nach Tumorzellinokulation geopfert. Bei allen Versuchen wurden Lebern und Lungen entnommen. *Lobus sinister* und *lobus dexter medialis hepatis* und der linke Lungenflügel (*pulmo sinister*) wurden für die Detektion der Tumorzellen X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) gefärbt. Die kleinen Leberlappen (*lobus dexter lateralis hepatis*, *lobus caudatus hepatis*) und die rechten Lungenflügel (*lobus cranialis*, *medius*, *caudalis pulmonis dextri*) wurden für nachfolgende biochemische Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Der *lobus sinister lateralis hepatis* wurde quer in 4 – 5 längliche Segmente zerteilt, für Kryoschnitte in OCT-compound (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und auf Trockeneis schockgefroren oder für die Einbettung in Paraffin für 2 – 4 h in 2 %-Formalin fixiert. Makrometastasen auf der Oberfläche des *lobus sinister* und *lobus dexter medialis hepatis* oder des *pulmo sinister* wurden mit einem Stereomikroskop (25-fache Vergrößerung, Stereomikroskop SZX, Olympus, Hamburg, Deutschland) ausgezählt und fotografiert. Mikrometastasen (Metastasen ≤ 0,2 mm oder einzelne Tumorzellen im Leberparenchym) wurden bei 36-facher Vergrößerung fotografiert und qualitativ bewertet.

4.1.3. HT1080 Xenograft-Metastasierungsmodell

Für die Generierung experimenteller HT1080 Makrometastasen in der Lunge oder Mikrometastasen in der Leber wurden 1×10^6 *lacZ*-markierte HT1080 Zellen (HT1080*lacZ*-K15-1) in die Schwanzvenen von *Mmp-9^{-/-}* oder *Mmp-9^{+/+}* Mäusen inokuliert. 21 Tage nach Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert und die Lebern und die Lungen entnommen. Die Aservation der Gewebeproben erfolgte wie beim L-CI.5s-Modell (siehe 4.1.2). *Lobus sinister* und *lobus dexter medialis hepatis* und der linke Lungenflügel (*pulmo sinister*) wurden für die Detektion der Metastasen X-Gal gefärbt.

4.1.4. CT26 Metastasierungsmodell

Für die Generierung experimenteller CT26 Makrometastasen in der Lunge oder Mikrometastasen in der Leber wurden 1×10^6 *lacZ*-markierte CT26 Zellen (CT26-L) in die Schwanzvenen von *Mmp-9^{-/-}* oder *Mmp-9^{+/+}* Mäusen inokuliert. 28 Tage nach Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert und Lebern und Lungen entnommen. Die Aservation der Gewebeproben erfolgte wie beim L-CI.5s-Modell (siehe 4.1.2). *Lobus sinister* und *lobus dexter medialis hepatis* und der linke Lungenflügel (*pulmo sinister*) wurden für die Detektion der Metastasen X-Gal gefärbt.

4.1.5. X-Gal Färbung von Organen

Die X-Gal-Färbung von *lacZ*-markierten Tumorzellen ermöglicht die Lokalisation von Tumorzellen. Mit dieser Technologie können Tumorzellen sogar auf Einzelniveau detektiert werden (Krüger et al., 1998). Die für die Färbung bestimmten Teile von Organen wurden direkt nach Entnahme kurz in $1 \times$ PBS gewaschen und anschließend 1 – 1,5 h in Fixierlösung (135 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM K₂HPO₄, 2 % (w/v) Formaldehyd, 0,2 % (w/v) Glutaraldehyd) fixiert. Vor der Färbung wurden die Organe dreimal mit $1 \times$ PBS gewaschen, um die Fixierlösung vollständig zu entfernen. Für die Herstellung einer fertigen Färbelösung wurden X-Gal-Stammlösung (4 % X-Gal in Di-methyl-fluorid (DMF)) und X-Gal-Ausgangsfärbelösung (135 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 Na₂HPO₄, 1,4 mM K₂HPO₄, 2,5 mM K₃Fe(CN)₆, 2,5 mM K₄Fe(CN)₆, 1 mM MgCl₂, 0,0005 % (v/v) Na-Deoxycholat, 0,001 % (v/v) NP40, pH 7,1) im Verhältnis 1:40 frisch angesetzt. 8 – 10 ml der Färbelösung wurde zu den Organen gegeben und diese wurden für 4 – 6 h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Farbeintensität wurde mehrfach kontrolliert. Anschließend wurden die Organe über Nacht,

zur Verbesserung des Kontrasts, bei 4°C in der Färbelösung gelagert. Am nächsten Morgen wurden die Organe min. zwei Mal mit 1×PBS gewaschen und für die Langzeitlagerung in 2 % Formalin in 1×PBS aufgenommen.

4.1.6. Behandlung von Mäusen mit synthetischen Breitspektrum-MMP-Inhibitoren oder spezifischen Gelatinase-Inhibitoren

Für die Bestimmung der Auswirkung einer spezifischen Hemmung von MMP-9 auf die Homöostase im Knochenmark wurden DBA/2 Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit drei spezifischen (Ro28-2653, Ro206-0222, SB-3CT) und einem Breitspektrum-MMP-Inhibitor (BB94) behandelt. Die beiden Ro-Inhibitoren und BB94 wurden von der Firma Roche Diagnostics (Penzberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. SB-3CT wurde von Calbiochem (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Batimastat (synthetisiert nach dem PCT Patent WO 90/05719), wurde in sterilem 1×PBS/0.01% Tween 80 resuspendiert. Ro28-2653 und Ro206-0222 (Patent WO 9858925) wurden mit 0,2 mg/ml Na-Carboxymethyl-Zellulose, 0,09 mg/ml Methyl-Paraben und 0,01 mg/ml Propyl-Paraben vermischt und in keimfreiem, isotonischem H₂O resuspendiert. SB-3CT wurde in keimfreiem, isotonischem H₂O mit 10 % (v/v) DMSO resuspendiert und durch Erhitzen gelöst. Durch langsame Zugabe von 80°C warmem H₂O wurde die Suspension 1:4 verdünnt (Endkonzentration DMSO = 2 % (v/v)). Die Mäuse wurden 14 Tage lang täglich einmal mit 30 mg/kg Batimastat oder täglich zweimal mit 25 mg/kg Ro28-2653, Ro206-0222 oder SB-3CT behandelt. Batimastat, Ro28-2653 und Ro206-0222 wurden oral verabreicht. SB-3CT wurde intraperitoneal appliziert. Am Ende des Behandlungszeitraumes wurden die Mäuse geopfert und die Knochenmarkzellen isoliert.

4.2. *Zellexperimentelle Methoden*

4.2.1. Verwendete Zelllinien

a) L-CI.5s Zellen

L-CI.5s-Zellen sind murine T-Zell Lymphom Zellen. Diese Zelllinie wurde von Prof. Dr. Achim Krüger aus der murinen T-Zell Lymphom Zelllinie Esb generiert (Krüger et al., 1994). Diese Zellen metastasieren nach intravenöser Inokulation effizient in die Leber. Diese Zellen wachsen in Suspension. L-CI.5s-Zellen sind mit dem bakteriellen *lacZ*-Gen markiert, wodurch diese Zellen durch X-Gal Färbung, sogar auf Einzelzellniveau, detektiert werden

können (Krüger et al., 1994). Diese Zelllinie ist in immunsupprimierten Mäusen und syngeneten DBA/2-Mäusen tumorigen.

b) HT1080 Zellen

HT1080 Zellen sind humane Fibrosarkomzellen. Diese Tumorzellen wurden von Agnes Noel (Université Liège, Lüttich, Belgien) zur Verfügung gestellt. HT1080 Zellen wurden aus einem Bindegewebstumor eines 35-jährigen männlichen Patienten kaukasischer Abstammung von S. Rasheed (Rasheed et al., 1974) isoliert. Diese Zellen wachsen adhärent und sind in immunsupprimierten Mäusen tumorigen. Die Tumorigenität der Zellen ist auf eine aktivierende Mutation im *N-ras* Onkogen zurückzuführen (Geiser et al., 1989). Für den Nachweis der Zellen *in situ* wurden diese von Dr. Charlotte Kopitz (TU München, Deutschland) mit dem bakteriellen *lacZ*-Gen markiert (HT1080pLZ12/K15-1). Nach intravenöser Applikation bilden diese Zellen Makrometastasen in der Lunge aus. Zusätzlich können einzelne Tumorzellen oder kleine Tumorzellkluster in der Leber detektiert werden.

c) CT26-Zellen

CT26 Zellen sind murine Kolonkarzinomzellen. Diese Tumorzellen wurden chemisch durch Gabe von N-Nitroso-N-Methylurethan in einer BALB/c-Maus induziert. Die Zellen wurden über LGC Promochem (Wesel, Deutschland) von *American Tissue Culture Collection* (ATCC, Manassas, USA) bezogen. Diese Zelllinie wächst adhärent und ist in immunsupprimierten Mäusen und syngeneten BALB/c-Mäusen tumorigen. Für den Nachweis der Zellen *in situ* wurden diese von Frau Katja Honert (TU München, Deutschland) mit dem bakteriellen *lacZ*-Gen markiert. Die *lacZ*-markierte CT26 Zelllinie wurde als CT26-L bezeichnet. Nach intravenöser Applikation bilden diese Zellen Makrometastasen in der Lunge aus. Zusätzlich können einzelne Tumorzellen oder kleine Tumorzellkluster in der Leber detektiert werden.

d) NIH/3T3 Zellen

NIH/3T3 Zellen sind murine Fibroblasten. Diese Zellen wurden 1969 von John Jainchill (Jainchill et al., 1969) aus einer primären Embryonen Zellkultur von NIH/Swiss Mäusen isoliert. Diese Zelllinie ist sehr gut transduzierbar und wurde aus diesem Grund, zum Test der Effizienzen verschiedener shRNAs gegen *Mmp-9* eingesetzt. Diese Zellen wurden von der Firma ATCC (Manassas, USA) erworben.

e) 293T Zellen

293T-Zellen sind humane embryonale Nierenepithelzellen. Diese Zellen sind stabil mit dem adenoviralen E1A-Gen und dem SV40 T-Antigen transduziert (DuBridge et al., 1987). Diese Zellen zeichnen sich durch sehr gute Transduzierbarkeit aus und wurden aus diesem Grund für die Herstellung von lenti- und retroviralen Partikeln verwendet. Diese Zellen wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) erworben.

f) Primäre Knochenmarkzellen

Primäre Knochenmarkzellen wurden aus Wildtyp DBA/2 Mäusen oder *Rag^{-/-} Mmp-9^{-/-}* Mäusen isoliert. Durch Zugabe bestimmter Zytokine und Wachstumsfaktoren (siehe Tabelle 4.1) können diese primären Zellen 3 – 4 Wochen in Kultur gehalten werden.

4.2.2. Zellkulturmedien

Tab. 4.1: Zellkulturmedien der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Medium
L-C1.5s	RPMI + 10 % (v/v) FKS (PAA Gold), 20 mM L-Glutamin, 100 mM Hepes, 0,55 mM Asparagin, 0,27 mM Arginin, 0,5 mM β -Mercaptoethanol
HT1080 <i>lacZ</i> /K15-1, 293T und NIH 3T3	DMEM + 10 % (v/v) FKS (PAA Gold), 20 mM L-Glutamin, 100 mM Hepes, 0,55 mM Asparagin, 0,27 mM Arginin
CT26-L	RPMI + 10 % (v/v) FKS (PAA Gold)
primäre Knochenmarkzellen	BBMM = IMDM + (30 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) BSA, 100 μ M β -Mercaptoethanol, 20 mM L-Glutamin, 100 μ g/ml Penicillin/Streptomycin, 0,5 μ g/ml Fungizone, 50 ng/ml IL-6, 10 ng/ml IL-3, 2,5 ng/ml SCF

Allgemeine Zellkulturlösungen:

- Arginin (55 mM; Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- Asparagin (27 mM; Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- BBMM (*bone marrow basal medium*)
- DMEM (Gibco GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- FBS (Fetal Bovine Serum; CellSystems GmbH, St. Katharinen, Deutschland)
- FKS (Fetales Kälber Serum; CellSystems GmbH, St. Katharinen, Deutschland)
- Fungizone (Amphotericin B; 250 mM; Biochrom, Berlin, Deutschland)
- L-Glutamat (200 mM; Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Hepes (1 M; Gibco GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

- IL-3 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)
- IL-6 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)
- IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Cambrex GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
- β -Mercaptoethanol (50 mM; Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- PBS (*phosphat buffered saline*, pH 7,4, Biochrom, Berlin, Deutschland)
- PBS²⁺

0,068 mM CaCl₂; 0,49 mM MgCl₂; in 1×PBS → 5 ml jeder Stammlösung wurden zu 500 ml Zellkultur-PBS gegeben

Stammlösungen:

68 mM CaCl₂: 5 g CaCl₂ × 2H₂O in 500 ml ddH₂O

49 mM MgCl₂: 5 g MgCl₂ × 6H₂O in 500 ml ddH₂O

Für die Sterilfiltration der Stammlösungen wurden Stericups™ (Porengröße 0,22 μ m, Millipore, Eschborn, Deutschland) verwendet.

- Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- RPMI 1640 (Gibco GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Trypsin/EDTA-Lösung
0,05 % (w/v) Trypsin, 0,02 % (w/v) EDTA, pH 7,4 (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Trypanblau-Lösung
0,4 % (w/v) Trypanblau (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

4.2.3. Kultivierung von Zellen

Alle Zelllinien wurden in Zellkulturbrutschränken der Firma Scientific (Scientific CO₂ Water Jacketed Incubator, Thermo Quest, Egelsbach, Deutschland) kultiviert. Die Kulturbedingungen betragen 5 % CO₂, 37°C und 95 % Luftfeuchtigkeit. Adhärenente Zellen wurden in Zellkultur-Petri-Schalen kultiviert. Die Suspensionszelllinie L-CI.5s wurde in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Kultivierung adhärenenter Zellen erfolgte auf handelsüblichen Zellkulturschalen (TPP, Trasadingen, Schweiz) mit den Durchmessern 6 cm, 10 cm oder 15 cm. Die Suspensionszelllinie L-CI.5s wurde in handelsüblichen Zellkulturflaschen (TPP, Trasadingen, Schweiz) der Größen T25 und T75 kultiviert. Alle Zelllinien wurden nach Standardprotokollen dreimal wöchentlich passagiert. Adhärenente Zellen wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung von den Zellkultur-Petri-Schalen gelöst. Das Ablösen wurde unter

dem Stereomikroskop kontrolliert und die Zellen wurden umgehend in kaltem PBS oder dem entsprechenden warmen Medium aufgenommen.

4.2.4. Bestimmung der Zellzahl

Für alle Zellzahlbestimmungen wurde eine Zählkammer nach Neubauer (Tiefe: 0,1 mm; Fläche: 0,0025 mm²; Assistent, Sondheim, Deutschland) verwendet. Nach dem Ablösen wurden die Zellen umgehend in kaltem PBS aufgenommen und gut resuspendiert. Aus der Zellsuspension wurden 100 µl entnommen und mit dem gleichen Volumen Trypanblau-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) versetzt. Je nach Dichte der Zellen wurden 2 diagonal gegenüberliegende oder alle 4 großen Kästchen ausgezählt. Bei einer Tiefe von 0,1 mm und einer Fläche von 0,0025 mm² pro großes Kästchen betrug das ausgezählte Volumen 0,1 µl (2 Kästchen) oder 0,2 µl (4 Kästchen). Die Zellzahl pro ml konnte hieraus durch Multiplikation mit dem Faktor 10⁴ oder 5×10³ erhalten werden.

4.2.5. Isolierung von Klonen durch *limiting dilution*

Für die Klonierung von Einzelkolonien aus der Suspensionszelllinie L-CI.5s-sh*Mmp-9* wurde die Technik der *limiting dilution* angewandt. Die Zellen wurden zuerst auf eine Dichte von 6×10⁵ Zellen pro ml eingestellt. Die Zelldichte wurde durch Bestimmung der Zellzahl (siehe 4.2.4) überprüft. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 3×10⁵ Zellen verdünnt. Aus dieser Zellsuspension wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Die Zellen wurden fünfmal 1:10, jeweils 1 ml Zellsuspension auf 9 ml Medium, verdünnt. Dies ergibt eine Endkonzentration von 3 Zellen pro ml. Je 100 µl der Zellsuspension dieser Dichte wurden in die Vertiefungen einer 96-*well*-Flachbodenplatte (TPP, Trasadingen, Schweiz) eingefüllt. Somit sollte statistisch, in jeder dritten Vertiefung eine Zelle zu liegen kommen. Es wurden 7 Platten ausgesät. Die Platten wurden nachfolgend unter Standardbedingungen für mehrere Tage im Zellkulturbrutschrank kultiviert. Das Heranwachsen von Klonen wurde täglich unter dem Stereomikroskop kontrolliert. Nach ca. 2 Wochen wurden 10 Klone in 24-*well*-Flachbodenplatten (TPP, Trasadingen, Schweiz) überführt. Diese Klone wurden für nachfolgende Analysen expandiert.

4.2.6. Isolierung von primären Knochenmarkzellen

Für die Untersuchung der Regulationsmechanismen im Knochenmark wurden primäre murine Knochenmarkzellen isoliert und in Zellkultur kultiviert. Die Zellen wurden aus 7 – 12 Wochen alten DBA/2 (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) oder *Rag^{-/-} Mmp-9^{-/-}* Mäusen aus dem *Femur* und der *Tibia* isoliert. Nach Entnahme wurden die Knochen kurz in 70 % Ethanol desinfiziert und bis zur Zellentnahme in kaltem PBS auf Eis gelagert. Das obere und untere Ende der Knochen wurde mit einem Skalpell abgetrennt, so dass der Knochenmarkkanal zugänglich war. Für die Gewinnung der Zellen wurden die geöffneten Knochen mit einer Spritze mit IMDM (Cambrex, Taufkirchen, Deutschland; siehe 4.2.2) ausgespült. Die isolierten Zellen in IMDM wurden vorsichtig mit einer Pipette resuspendiert und anschließend in Falcon-Röhrchen (TPP, Trasadingen, Schweiz) überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (300 g; 4°C; 5 min) und in Erylysepuffer (1 ml pro 4 Knochen) resuspendiert, um die Erythrozyten abzutrennen. Die Erylyse erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur. Für das Stoppen der Erylyse wurden 9 ml IMDM pro ml Erylysepuffer zugegeben. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (300 g; 4°C; 5 min), der Überstand abgossen und die Knochenmarkzellen in 10 ml BBMM (siehe 4.2.2) resuspendiert. Vor der Resuspension wurde die Färbung des Pellet kontrolliert. Nach Abtrennung der Erythrozyten sollte das Pellet eine weiße Farbe haben. Wies das Pellet eine Rotfärbung auf, was ein Hinweis auf eine Kontamination mit Erythrozyten ist, wurde die Erylyse ein zweites Mal wiederholt.

Die Anzahl der Knochenmarkzellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe 4.2.4) und die Zellsuspension auf eine Zelldichte von 4×10^5 Zellen pro ml eingestellt. Für die Kultivierung der primären Zellen wurden die Zytokine Interleukin-3 und -6 (murin rekombinant; R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) und der Wachstumsfaktor SCF (KitL; murin rekombinant; R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) zugegeben. Die isolierten primären Knochenmarkzellen wurden in unbeschichteten 6 cm oder 10 cm Zellkultur-Petri-Schalen (TPP, Trasadingen, Schweiz) kultiviert.

Erylysepuffer:

Der verwendete Erylysepuffer besteht aus 3 unterschiedlichen Puffern und ddH₂O. Die Lösungen wurden im Verhältnis 4:1:1:7 (Lösung 1/Lösung 2/Lösung 3/ddH₂O) vermischt. Alle Lösungen wurden sterilfiltriert und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

Lösung 1:

NH ₄ Cl	35 g/l
KCl	1,85 g/l
Glukose	5 g/l

Lösung 2:

MgCl × 6 H ₂ O	420 mg/l
MgSO ₄ × 6 H ₂ O	14 mg/l

Lösung 3:

NaHCO ₃	2,25 g/l
--------------------	----------

4.2.7. Kotransfektion von 293T-Zellen zur Herstellung lentiviraler Zellkulturüberstände

Für die Herstellung lenti- oder retroviraler Partikel wurden 5×10^6 293T-Zellen 24 h vor Transfektion in 10 cm Zellkultur-Petri-Schalen ausgesät. 24 h nach Aussaat wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden 3 h nach Medienwechsel transfiziert. Für die Transfektion wurden 10 µg Transferplasmid (enthält das Transgen; verwendete lentivirale Transferplasmide siehe Anhang), 6,6 µg Helferplasmid pLP1 (gag und pol), 5 µg Helferplasmid pLP2 (rev) und 3 µg Helferplasmid pLP/VSV-G (Hüllprotein, env-Gen des Vesikulostomatitisvirus) in einem 1,5 ml Eppendorffreaktionsgefäß vermischt. Alle pLP-Plasmide wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Die Plasmidlösung wurde mit ddH₂O auf 30 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Diese Lösung wurde anschließend mit 409 µl ddH₂O und 61 µl 2 M CaCl versetzt und durch auf- und abpipettieren vermischt. In einem 15 ml Falcon-Röhrchen (TPP, Trasadingen, Schweiz) wurden 500 µl 2×HBS (0,5 % (w/v) HEPES, 0,8 % (w/v) NaCl, 0,37 % (w/v) KCl, 0,125 % (w/v) Na₂HPO₄ × 2H₂O, 0,1 % Glukose, pH 7,1) vorgelegt. Die Plasmidlösung wurde tropfenweise, langsam zur 2×HBS-Lösung zugegeben, während gleichzeitig mit einer Pipettierhilfe über eine Pasteurpipette Luft in die 2×HBS-Lösung eingeblasen wurde. Die vermischte Lösung wurde 20 min bei Raumtemperatur, unter der Sterilbank inkubiert und anschließend tropfenweise zu den zu transfizierenden 293T-Zellen zugegeben. Der Transfektionsansatz wurde 8 h im Zellkulturbrutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend 10 ml frisches Medium zugegeben.

4.2.8. Kotransfektion von 293T-Zellen zur Herstellung retroviraler Zellkulturüberstände

Die Kotransfektion von 293T-Zellen zur Gewinnung retroviraler Zellkulturüberstände wurde größtenteils wie die Kotransfektion mit lentiviralen Plasmiden durchgeführt. Am Vortag der Kotransfektion wurden 2×10^6 293T Zellen ausgesät. Für die Plasmidlösung wurden 10 µg Transferplasmid (verwendete retrovirale Transferplasmide siehe Anhang) und jeweils 10 µg der Helferplasmide pHIT60 (gag und pol; Soneoka et al., 1995) und HCMV-VSVG (env; Yee et al., 1994) verwendet.

4.2.9. Gewinnung viraler Zellkulturüberstände

Die Gewinnung viraler Zellkulturüberstände wurde für retro- und lentivirale Überstände analog durchgeführt. 24 h nach dem Mediumwechsel (siehe 4.2.7) wurde das Medium vorsichtig und langsam (zur Vermeidung von Scherkräften) abgenommen. Durch filtrieren (Sterilfilter 0,45 µm Porengröße, TPP, Trasadingen, Schweiz) wurden abgelöste, virusproduzierende Zellen abgetrennt. Der Sterilfilter wurde an der Gefäßinnenwand von 50 ml Falcon-Röhrchen angesetzt, so dass das Filtrat an der Innenwand abfließen kann. Durch das Eintropfen in das Gefäß würden die instabilen Lipidhüllen der Viren zerstört werden. Die viralen Überstände wurden entweder sofort für die Transduktion von Zielzellen verwendet oder aliquotiert und bei -80°C gelagert.

4.2.10. Transduktion adhärenter Zellen

In dieser Arbeit wurden NIH 3T3-Zellen retroviral mit shRNAs gegen murines *Mmp-9* transduziert, um die *knockdown*-Effizienzen der unterschiedlichen shRNA-Zielsequenzen zu überprüfen. Hierfür wurden am Vortag 2×10^5 NIH 3T3-Zellen auf 6 cm Zellkultur-Petri-Schalen ausgesät. 24 h nach Aussaat wurde das Medium der Zellen abgenommen und die Zellen wurden einmal mit warmen PBS gewaschen. Für die Transduktion wurde frischer oder bei -80°C gelagerter Virusüberstand verwendet. 500 µl Virusüberstand wurde mit 5 µl Polybren (Konz. = 800 µg/ml) versetzt und direkt auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden 2 h mit reinem Virusüberstand inkubiert. Um das Austrocknen der Zellen zu vermeiden, wurden die Ansätze alle 15 min geschwenkt. Nach 2 h wurden die Ansätze mit 4 ml Medium (zellspezifische Medien siehe 4.2.2) aufgefüllt.

4.2.11. Transduktion von Suspensionszellen

Die Infektion von L-CI.5s T-Zell Lymphomzellen erfolgte in Kokultur mit den virusproduzierenden 293T-Zellen. Hierfür wurde beim Mediumwechsel, 8 h nach Transfektion (siehe 4.2.7), L-CI.5s-Medium mit 1×10^6 L-CI.5s-Zellen auf die 293T-Zellen gegeben. Zusätzlich wurden 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybren zu den Ansätzen gegeben. Nach 24 h Kokultur wurde 1 ml der L-CI.5s-Suspensionskultur abgenommen, in eine 5 ml Zellkulturfläche überführt und mit 4 ml frischem L-CI.5s-Medium aufgefüllt.

4.2.12. Selektion nach viraler Transduktion

Zur Selektion auf L-CI.5s-Zellen die die jeweiligen Transgene stabil in ihr Genom integriert hatten, wurden 25 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin bzw. 25 $\mu\text{g/ml}$ Blasticidin verwendet. Für die Selektion der anti-*Mmp-9* shRNA transduzierten NIH 3T3-Zellen wurden 10 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin eingesetzt. Bei allen Selektionen wurden nicht-transduzierte Zellen als Selektionskontrollen mitgeführt. Sobald auf den mitgeführten Kontrollplatten alle Zellen abgestorben waren, wurde die Selektion der transduzierten Zellen beendet. Hierfür wurde das Selektionsmedium abgenommen die Zellen mit $1 \times \text{PBS}$ gewaschen und anschließend in zellspezifischem Medium (siehe 4.2.2) aufgenommen.

4.2.13. *Boyden-Chamber*-Invasions- und Migrationsassays

Für die Invasions- und Migrationsassays wurden *Boyden-Chambers* der Firma TPP (Trasadingen, Schweiz) verwendet. Bei L-CI.5s- und CT26-Zellen wurden Inserts mit einer Porengröße von 3 μm verwendet, bei HT1080-Zellen wurden Inserts mit einer Porengröße von 6,5 μm verwendet. Bei den MatrigelTM-Invasionsassays erfolgte die Beschichtung der Membranen semisteril neben der Flamme eines Bunsenbrenners. Es wurden 50 μl MatrigelTM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 750 μl kaltem $1 \times \text{PBS}$ durch 30-maliges auf- und abpipettieren vermischt. 50 μl dieser Matrigelsuspension wurden auf die Membranen pipettiert. Das MatrigelTM wurde durch leichtes Klopfen verteilt. Zur Verfestigung des MatrigelsTM wurden die Inserts 3 h bei 37°C im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Die beschichteten Inserts wurden über Nacht unter der Sterilbank getrocknet. Am nächsten Tag wurde das getrocknete MatrigelTM mit 1 ml serumfreiem Medium mit 0,5 % BSA für 2 h rehydriert. Je 1×10^6 Zellen in 300 μl serumfreiem Medium wurden in der oberen Kammer ausgesät. Als Chemoattraktant wurde 1 ml Medium mit 10 % fötales Kälberserum (FKS) in

der unteren Kammer verwendet. Um die Einflüsse des Zytokins Interleukin (IL)-6 oder des Wachstumsfaktors *epidermal growth factor* (Egf) auf die Migration oder die Invasion der Zellen zu untersuchen, wurden die Faktoren in rekombinanter Form dem oberen Kompartiment zugegeben. Die Inkubation aller Ansätze erfolgte bei 37°C im Zellkulturbrutschrank. Die Anzahl invadierter oder migrierter L-CI.5s- oder CT26-Zellen wurde nach 48 Stunden, die Anzahl invadierter oder migrierter HT1080-Zellen nach 72 Stunden ermittelt. Für die Bestimmung der Anzahl migrierter oder invadierter Zellen der adhären wachsenden Linien CT26 und HT1080 wurden die Inserts aus den 24-well Flachbodenplatten entnommen, und die adhären Zellen an der Unterseite der Membran mit dem Diff-Quick® *Staining Kit* (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers gefärbt. Bei den Matrigel™-Invasionsassays wurde vor der Färbung der adhären Zellen das Matrigel auf der Oberseite der Membran entfernt. Anschließend wurden die migrierten oder invadierten Zellen auf der Unterseite der Membran unter dem Mikroskop ausgezählt. Für die Bestimmung der Zellzahl (siehe 4.2.4) von migrierten oder invadierten Suspensionszellen wurden die Zellen im unteren Kompartiment resuspendiert und 950 µl der Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (900 g; 5 min; 4°C) und 850 µl des Überstandes wurden abgenommen. Die Zellen wurden in den verbleibenden 100 µl Medium resuspendiert und anschließend mit 100 µl Trypanblau-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) versetzt. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe 4.2.4).

4.3. Mikrobiologische Methoden

4.3.1. Verwendete Bakterienstämme

a) *DH10β*

Genotyp: *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ±80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ rpsL nupG tonA*.

DH10β ist ein *E. coli* Bakterienstamm der in chemisch kompetenter Form besonders gut transformierbar ist. Für die Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien wurden Standardprotokolle verwendet. Der Stamm *DH10β* wurde für die Amplifikation von pBlueskript-II-SK+ (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) basierenden Plasmiden verwendet. Dieser Stamm ist geeignet für die Amplifikation methylierter DNA.

b) *Top10*

Genotyp: *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 galU galK Δ(ara-leu)7697 rpsL (Str^R) endA1 nupG*

TOP10 Bakterien sind von dem Stamm DH10β abgeleitet. Der Stamm TOP10 ist ein *E. coli* basierter Bakterienstamm der sich in chemisch-kompetenter Form durch gute Transformierbarkeit auszeichnet. Dieser Stamm ist besonders für die Amplifikation unmethylierte DNA geeignet. Dieser Stamm wird von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) vertrieben und wurde in dieser Arbeit für die Amplifikation von pEntr4 basierten Plasmiden verwendet.

c) One Shot® Stb13™

Genotyp: *F- mcrB mrr hsdS20 (r_B⁻, m_B⁻) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (Str^r) xyl-5 λ⁻ leu mtl-1*

Dieser Stamm wird in chemisch-kompetenter Form von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) vertrieben und stammt von dem *E. coli* Stamm *HB101* ab. Dieser Stamm ist für die Aufnahme und Amplifikation instabiler, großer Plasmide optimiert. Durch gezielte Deletionen innerhalb des Bakteriengenoms, ist dieser Bakterienstamm rekombinations-negativ. Die häufig auftretenden homologen Rekombinationen zwischen *long terminal repeats* (LTRs), wie sie bei lenti- und retroviralen Plasmiden vorkommen, werden durch diese Veränderungen minimiert. Dieser Bakterienstamm wurde für die Amplifikationen aller lenti- oder retroviraler Plasmide verwendet.

4.3.2. Kultivierung von Bakterien

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden bei 37°C in LB-Medium oder auf Agar-Platten kultiviert. Für Plasmidaufreinigungen in größerem Maßstab wurden 250 ml oder 500 ml Flüssigkulturen angesetzt. Hierfür wurden Vorkulturen in 8 ml LB-Medium angesetzt und 6 – 8 h bei 37°C unter schütteln kultiviert. Die über Nacht Kulturen wurden 1:500 aus der Vorkultur angeimpft und anschließend in einem Schüttel-Inkubator (*Series25 Incubator Shaker*, New Brunswick Scientific Inc., New Jersey, USA) kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde isoliert, wenn die Bakterienkultur in der logarithmischen Wachstumsphase war.

Kulturmedien, Kulturplatten, Antibiotika:

- LB-Medium

10 g Bacto™-Tryptone/1000 ml
5 g Bacto™-Yeast Extract/1000 ml
5 g NaCl/1000 ml

Nach dem Lösen in ddH₂O wurde das Medium autoklaviert und bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert.

- LB-Agarplatten

LB-Medium wurde zur Verfestigung mit 18 g Bacto™ Agar/1000 ml versetzt und anschließend autoklaviert.

- Antibiotika:

10 % (w/v) Ampicillin: 1 g Ampicillin/10 ml
5 % (w/v) Kanamycin: 0,5 g Kanamycin/10 ml

Beide Antibiotika wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Die Antibiotika wurden in ddH₂O gelöst, aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

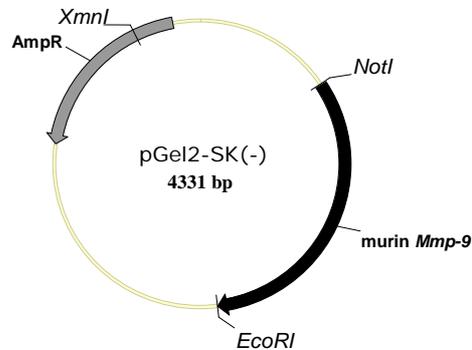
4.3.3. Verwendete cDNAs

Mmp-9

Die cDNA für murines *Mmp-9* wurde von Prof. Dr. Dylan Edwards (University of East Anglia, Norwich, UK) zur Verfügung gestellt. Die cDNA stammt aus dem Plasmid pGel2-SK. Die Sequenz der verwendeten murinen *Mmp-9* cDNA entspricht der Sequenz der in NCBI veröffentlichten *reviewed reference sequence* NM_013599.

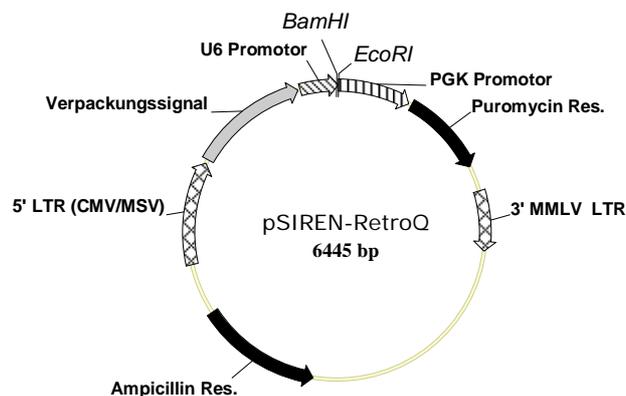
4.3.4. Verwendete Plasmide

a) pGel2-SK(-)



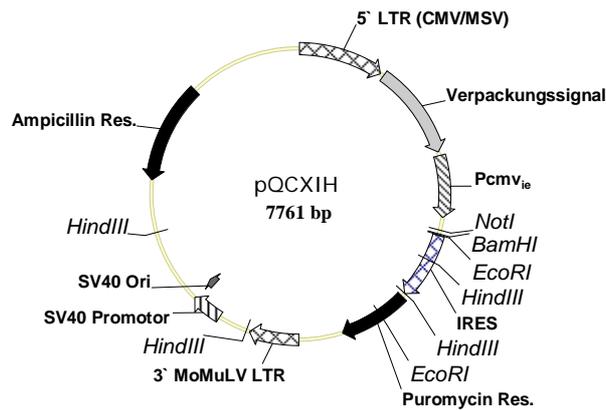
Dieses Plasmid wurde von Prof. Dr. Dylan Edwards (University of East Anglia, Norwich, UK) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid kodiert für die murine *Mmp-9* cDNA. Diese wurde durch *NotI/EcoRI* Verdau isoliert und anschließend *blunt/EcoRI* in den retroviralen Expressionsvektor pQCXIH kloniert. Für die Isolierung der kodierenden cDNA musste das Plasmid zusätzlich mit *XmnI* zerschnitten werden, da die *Mmp-9* cDNA nach dem Herausschneiden die gleiche Größe wie das Plasmid hat.

b) pSIREN-RetroQ



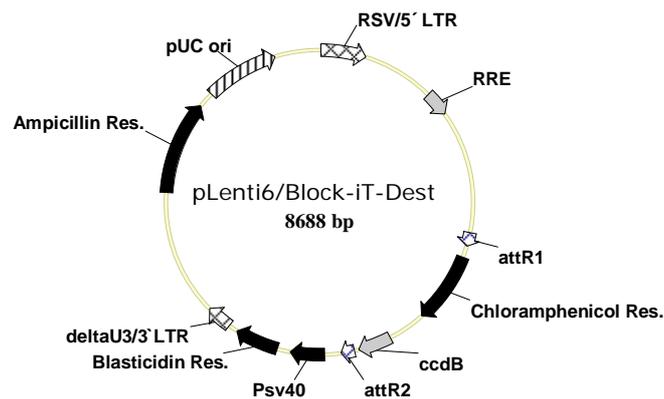
Dieser retrovirale Expressionsvektor ist für die Expression von shRNAs optimiert. Die shRNAs wurden mit 3' *BamHI* und 5' *EcoRI* Überhängen synthetisiert und direkt in *BamHI* und *EcoRI* geschnittene Vektoren eingefügt. Dieses Plasmid wird von der Firma Clontech (Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) vertrieben.

c) pQCXIH



Dieser retrovirale Expressionsvektor ist für die Expression von cDNAs optimiert. In diesen Vektor wurde die murine *Mmp-9* cDNA eingefügt. Dieses Plasmid wird von der Firma Clontech (Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) vertrieben.

d) pLenti/Block-iT-Dest



Dieser lentivirale Expressionsvektor wurde für die Expression von shRNAs hergestellt. In dieser Arbeit wurde das murine *Mmp-9/Luciferase* Promotorkonstrukt in diesen Vektor eingefügt, da dieser Vektor über keinen eigenen Promotor verfügt. Dieses Plasmid wird von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) vertrieben.

4.3.5. Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Für die Transformation aller verwendeten Bakterienstämme wurden 50 µl Bakterienzellsuspension langsam auf Eis aufgetaut. Zu diesen Bakterien wurden 1 – 100 ng Plasmid-DNA in 50 µl ddH₂O oder TE zugegeben und der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde 90 s auf 42°C erwärmt und anschließend sofort für 2 min auf Eis gestellt. Die Bakteriensuspension wurde mit 500 µl LB-Medium ohne Antibiotikum, in Bakterien-Kulturröhrchen

überführt und für 60 min bei 37°C unter schütteln inkubiert. Von dieser Zellsuspension wurden 50 µl, 150 µl und 350 µl auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert.

4.3.6. DNA-Isolierung aus Bakterien

a) DNA-Minipräparation

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterienkulturen der Stämme *Stbl3* und *TOP10* wurde ein Kit der Firma Qiagen (QIAprep Spin Miniprep Kit (250); Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Dieses Kit basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Für die Minipräparationen wurden am Vortag einzelne Bakterienkolonien gepickt und in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator (*Series25 Incubator Shaker*, New Brunswick Scientific Inc., New Jersey, USA) kultiviert. Am nächsten Tag wurden 2 ml der Bakterienkultur abzentrifugiert (6100 g; 4°C; 10 min). Die restliche Bakterienkultur wurde bei 4°C gelagert. Aus dieser Kultur konnte nach Analyse der Kolonien ein Klon, der das gewünschte Plasmid enthielt, für eine Präparation im Maxi-Maßstab angeimpft werden. Die Bakterienpellets wurden in 250 µl Puffer 1 (Qiagen, Hilden, Deutschland) resuspendiert. Die DNA-Minipräparation wurde gemäß den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Die Elution der säulengebundenen DNA erfolgte mit 30 µl EB-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland).

b) DNA-Maxipräparation

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterienkulturen im Maxi-Maßstab wurde ebenfalls ein Kit der Firma Qiagen (QIAGEN Plasmid Purification Kit (Maxi); Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Ein Bakterienklon der das gewünschte Plasmid enthielt wurde am Vortag in einer Vorkultur angeimpft und nach 6 – 8 h Stunden in 250 ml oder 500 ml LB-Medium überführt. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die erhaltenen Plasmid-DNA Pellets wurden in 100 – 250 µl TE-Puffer resuspendiert und anschließend nochmals mit Restriktionskontrollen auf Richtigkeit überprüft. Alle Plasmid-DNAs wurden bei 4°C gelagert.

4.3.7. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

a) Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Bei dieser Methode wurde die Konzentration von DNA-Fragmenten durch den optischen Vergleich mit Referenzproben, deren Konzentration bekannt war, ermittelt. Hierfür wurden 1 % (v/v) Agarosegele (siehe 4.3.8) verwendet. Als Referenzproben wurden 250 ng, 500 ng und 750 ng eines Lambda *HindIII*-DNA-Größenmarkers aufgetragen. Von den DNA-Fragmenten, deren Konzentration bestimmt werden sollte, wurde 1 – 4 µl geschnittener Plasmidlösung verwendet. Nach der Gelelektrophorese wurde die Leuchtintensität der zu bestimmenden Bande optisch eingeschätzt und einer Referenzbande mit gleicher Leuchtintensität zugeordnet. Durch diese Zuordnung kann mit folgender Formel die Konzentration des DNA-Fragments bestimmt werden:

$$C_X \text{ [ng/}\mu\text{l]} = G_{\text{Lambda}} \text{ [bp]} / G_M \text{ [bp]} \times C_M \text{ [ng]} / V \text{ [}\mu\text{l]}, \text{ wobei}$$

C_X = Konzentration des zu bestimmenden Fragments

G_{Lambda} = Gesamtgröße der Phagen DNA

G_M = Größe der Markerbande mit gleicher Leuchtintensität

C_M = Eingesetzte DNA Menge des Markers

V = eingesetztes Volumen des Fragments

b) Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA-Probe deren Konzentration bestimmt werden sollte wurde 1:100 mit ddH₂O verdünnt. 100 µl dieser verdünnten Probe wurden in eine Mikro-Quarzküvette überführt. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei 260 nm und 280 nm. Als Referenz wurde die Pufferlösung verwendet in der die DNA gelöst war. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht 50 µg dsDNA/ml, 40 µg RNA/ml oder 33 µg ssDNA/ml. Somit kann aus der Absorption bei 260 nm die DNA-Konzentration bestimmt werden. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA-Präparation. Für DNA wurde ein Quotient von 1,7 – 1,9 und für RNA ein Quotient von 1,9 – 2,1 angestrebt.

4.3.8. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten in Abhängigkeit deren Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. DNA-Banden wurden durch Zugabe von Ethidiumbromid (0,05 % (w/v) Ethidiumbromid) im Gel visualisiert. Diese Methode wurde sowohl im analytischen

Maßstab, zur Kontrolle von Restriktionsanalysen, als auch im präparativen Maßstab, zur Isolierung von DNA-Fragmenten, eingesetzt. Die Agarosekonzentrationen wurden den zu erwartenden Fragmentgrößen angepasst (siehe Tabelle 4.2). Agarose wurde durch Erhitzen in 1×TAE (40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) gelöst. Das Ethidiumbromid wurde, nach dem Erhitzen und nach einer kurzen Abkühlphase, zur Agaroselösung zugegeben. Die zu analysierenden Proben wurden 1:6 mit 6×DNA-Auftragspuffer (Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) versetzt und für die analytische Auftrennung in Geltaschen (3 mm × 8 mm × ca. 8 mm) eingefüllt. Als Größenstandards wurden kommerziell erhältliche 1 kb oder 100 bp DNA-Leitern (GeneRuler™; Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) verwendet. Die Banden wurden bei einer Spannung von 75 V für 60 – 90 min aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht und für eine nachfolgende Auswertung photographisch dokumentiert.

Die Auftrennung im präparativen Maßstab erfolgte weitgehend analog der analytischen Agarose-Gelelektrophorese. Von den DNA-Proben wurden ca. 2 µg in Taschen der Breite 2 cm geladen. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Banden unter dem UV-Licht (312 nm) visualisiert und das Ergebnis wurde ebenfalls photographisch dokumentiert (LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland). Anschließend wurde das Gel auf einem Durchlicht-UV-Tisch gelegt und die entsprechende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Tabelle 4.2 Agarosekonzentrationen für die Separationen von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe

Agarose [% (w/v)]	Auftrennungsbereich [kb]
0,8	0,8 – 12
1,0	0,5 – 10
1,5	0,2 – 3

4.3.9. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Aufreinigung wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution der säulengebundenen DNA erfolgte mit 30 – 50 µl EB. Auf Grund der geringen Konzentrationen der hierbei eluierten DNA-Fragmente wurde deren Konzentration visuell, mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt (siehe 4.3.7).

4.3.10. Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Analyse von Plasmiden und zur Präparation von DNA-Fragmenten, wurden Plasmide mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Alle enzymatischen Reaktionen mit Restriktionsendonukleasen wurden bei 37°C und in dem vom Hersteller der Enzyme empfohlenen Puffersystem durchgeführt. Waren mehrere Restriktionen eines Plasmids notwendig, so wurden die Restriktionen nacheinander durchgeführt. Nach jeder Restriktion wurde die DNA durch Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung (siehe 4.3.12) aufgereinigt.

Für analytische Restriktionen wurden 500 ng DNA eingesetzt. Präparative Restriktionen wurden zuerst im analytischen Maßstab etabliert. Für die Präparation wurde anschließend das 5 – 7fache aller Reagenzien und der DNA des analytischen Restriktionsansatzes eingesetzt. Die genauen Angaben zu den in dieser Arbeit vorgenommenen Restriktionen sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma NEB (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) bezogen. Die Enzyme wurden in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der Restriktionsverdaue

Restriktionsenzym	Menge Restriktionsenzym	10 x Puffer	Sonstige Zusätze	Temperatur
<i>EcoRI</i>	0,5 µl	U ^{dd}	-	37 °C
<i>HindIII</i>	0,5 µl	2	-	37 °C
<i>NheI</i>	1 µl	2	BSA	37 °C
<i>XmnI</i>	1 µl	2	BSA	37 °C

4.3.11. Auffüllen von DNA-Überhängen (*blunt-end* Reaktion)

Für das Auffüllen von DNA-Überhängen wurde die T4-Polymerase (3'- und 5'-Überhänge; Roche, Penzberg, Deutschland) verwendet. 5'-Überhänge werden durch dieses Enzym aufgefüllt und 3'-Überhänge werden abgebaut. T4-Polymerase ist in allen verwendeten Restriktionspuffern aktiv. Nach der Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme (70°C, 5 min) und nach 2 min abkühlen, wurden 1 µl T4-Polymerase (1 U) pro µg DNA und 2 µl dNTPs (0,5 mM, Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) direkt zu jedem Ansatz gegeben. Die Reaktion erfolgte für 5 – 8 min bei Raumtemperatur. Die T4-Polymerase wurde anschließend durch eine PCI-Extraktion (siehe 4.3.12) entfernt.

4.3.12. DNA-Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) und Ethanol-Fällung

Für die Extraktion von Enzymen aus DNA-haltigen Ansätzen wurde die Methode der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI/25:24:1)-Extraktion angewandt. Hierfür wurde die DNA-haltige Lösung mit PCI auf 100 µl – 300 µl Gesamtvolumen (je nach Ausgangsvolumen) aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde durch 15 s vortexen gemischt. Bei der Aufreinigung großer Plasmide (Plasmide > 8 kb) wurde der Ansatz nur von Hand geschwenkt, um die Fragmentierung durch starkes Schütteln zu vermeiden. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei 18500 g und 4°C. Die oberste, wässrige Phase, die die DNA enthält, wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für die Aufkonzentrierung von DNA wurde im Anschluss eine Ethanol-Fällung durchgeführt.

Hierfür wurde die wässrige Phase mit 10 % 3 M Natriumacetat (pH 5) und 3 Volumenteilen 98 % kaltem Ethanol (-20°C) versetzt und 1 h bei -80°C inkubiert. Nachfolgend wurde die ausgefallene DNA durch Zentrifugation (18500 g; 30 min; 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen und anschließend wurde die DNA erneut abzentrifugiert (18500 g; 30 min; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Für die Resuspension wurde das DNA-Pellet in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

4.3.13. Behandlung mit Alkalischer Phosphatase

Um bei der Ligation eine Religation von geschnittenen Plasmiden zu verhindern, wurden die Kloniervektoren nach der Restriktion dephosphoryliert. Hierfür wurde das Enzym CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*; Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) verwendet. Die Dephosphorylierung erfolgte direkt im Anschluss an eine Restriktion. Dem Ansatz wurde 1 µl CIAP (1 U) zugegeben und dieser Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Wurde die Dephosphorylierung im Anschluss an eine T4-Polymerasereaktion durchgeführt, so wurde die DNA zuvor PCI gereinigt (siehe 4.3.12). Das nach der Ethanol-Fällung erhaltene Pellet wurde in 10 µl ddH₂O resuspendiert und es wurden 2 µl 10×CIAP-Puffer, 1 µl CIAP und 7 µl ddH₂O zugegeben. Die Phosphatase wurde im Anschluss durch eine PCI-Extraktion, mit nachfolgender Ethanol-Fällung entfernt (siehe 4.3.12).

4.3.14. Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Verknüpfung von geschnittenen Plasmiden und DNA-Fragmenten mit komplementären Überhängen wurden eine Ligation mit dem Enzym T4-Ligase (Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) durchgeführt. Die molaren Verhältnisse von Plasmid zu Insert und die eingesetzten Mengen der jeweiligen DNA sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Alle Ligationen wurden in einem Endvolumen von 25 μl mit 5 μl 5 \times T4-Ligasepuffer durchgeführt. Die Ligationen wurden über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert.

Für die Ligation von shRNAs mit dem Expressionsvektor pSIREN-RetroQ (Clontech, Takara Bio Europa, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) wurden 1 μl der verdünnten, *annealten* shRNAs mit 6 μl ddH₂O, 1 μl 10 \times T4-Ligase Puffer, 1 μl Vektor (50 ng) und 1 μl T4 DNA Ligase (*high concentration*, 5 U/ μl , Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) vermischt und anschließend 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der Transformation von *Top10*-Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurden 3 μl dieses Ligations-Ansatzes verwendet.

Tabelle 4.4: Zusammenfassung der Ligationsansätze

Ligation	Vektor/Insert	Vektor	Insert	Ligase
pQCXIH/ muMmp-9	1:10	40 ng pQCXIH	420 ng muMmp-9	1 μl T4 (1 U)
pSIREN- RetroQ/shRNA	ca. 1 :10	50 ng pSIREN	8 ng shRNA	1 μl T4 (5 U)

4.3.15. LR-Clonase Reaktion

Das Klonieren von DNA-Fragmenten in virale Vektoren ist auf Grund der Größe der viralen Vektorplasmide (über 7 kb) sehr schwierig. Bei Ligationen oder Transformationen mit diesen Plasmiden treten oftmals DNA-Strangbrüche und Rekombinationen auf. Dieses Klonieren wird durch das *gateway*TM-Kloniersystem von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) erleichtert. In diesem System wird das Transgen in einen kleinen Kloniervektor (z.B. pEntr4) eingefügt. Dieser Vektor und die viralen Zielvektoren verfügen über homologe Rekombinationsstellen. Durch die LR-Clonase Reaktion wird das Insert des Kloniervektors mit dem Insert des viralen Zielvektors ausgetauscht. Für die Clonase-Reaktionen wurden 50 ng des Kloniervektors pEntr4-*Mmp-9/Luciferase* zu 150 ng pLenti6/BLOCK-iT-Dest gegeben. Zu diesem Ansatz wurden 2 μl LR-Clonase zugegeben und der Ansatz wurde mit TE-Puffer (pH 8,0) auf 10 μl

Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde 1 h bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl Proteinase K und nachfolgender Inkubation von 10 min bei 37°C gestoppt. Mit 3 µl dieses Ansatzes wurden *OneShot*TM Stbl3-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) transformiert. Dieser Stamm ist rekombinations-negativ und für die Aufnahme großer Plasmide optimiert.

4.3.16. Konstruktion von shRNAs

Die shRNAi-Technologie wurde eingesetzt um die Expression von MMP-9 gezielt zu unterdrücken. Diese Art der Suppression ist hoch spezifisch und bietet zudem die Möglichkeit, die Expression eines ausgewählten Zielgens gezielt in Tumor- oder verschiedenen Wirtszellen zu unterdrücken. In dieser Arbeit wurde die Expression von *Mmp-9* mRNA in Tumorzellen supprimiert. Die shRNAs wurden *in silico* konstruiert, die komplementären Oligonukleotide von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) synthetisiert und diese von Eurogentec mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt. Potentielle 19 bp Zielsequenzen wurden *in silico* mit dem Programm *shRNA target finder* (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_design.html, Ambion (Applied Biosystems), Darmstadt, Deutschland) identifiziert. Die Zielsequenzen wurden so ausgewählt, dass sie direkt im Anschluss an ein Adenin dinukleotid folgten, einen prozentualen Guanin/Cytosin-Gehalt von 40 – 60 % aufwiesen und mindestens 200 bp nach dem Start-ATG positioniert waren. Zudem wurde darauf geachtet, dass alle Zielsequenzen über die gesamte *Mmp-9*-cDNA-Sequenz verteilt waren, um einen geeigneten shRNA-Zielbereich zu identifizieren.

Aufbau shRNA

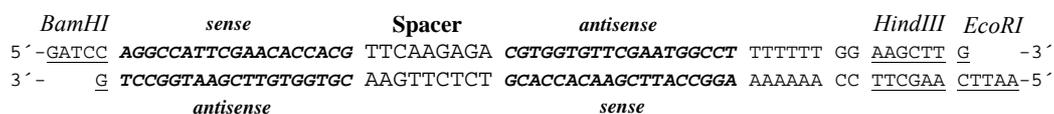


Abbildung 4.1 Aufbau der verwendeten shRNAs

Schematische Darstellung der komplementären Oligonukleotide im hybridisierten Zustand. Die Oligonukleotide wurden mit einem *Bam*HI 5' und einem *Eco*RI 3'-Überhang, für direkte Klonierung in den shRNA-Expressionsvektor pSIREN-RetroQ (Clontech, Takara Bio Europa, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) synthetisiert.

Als *loop*-Sequenz zwischen *sense* und *antisense* Bereich wurde eine 9 bp Sequenz nach Brummelkamp et al. ausgewählt (Abbildung 4.1; Brummelkamp et al., 2002b). Für die Klonierung in den retroviralen shRNA-Expressionsvektor wurden die Oligonukleotide mit

einem 5`-*BamHI* und einem 3`-*EcoRI* Überhang synthetisiert. Als weitere Schnittstelle, zur Überprüfung einer korrekten Integration der shRNAs in den Expressionsvektor, wurde eine *HindIII*-Schnittstelle direkt nach der poly-Thymidin Stoppssequenz integriert (Abbildung 4.1).

4.3.17. *Annealing* von RNA-Oligonucleotiden

Für das *Annealing* wurden die lyophilisierten DNA-Oligonukleotide auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. Hierfür wurden die Oligonukleotide in 100 µl ddH₂O gelöst und hieraus 1:100 Verdünnungen erstellt. Nach photometrischer Bestimmung der Konzentration (1 OD₂₆₀ = 33 µg/ml ssDNA) wurden die Oligonukleotide auf die gewünschte Endkonzentration eingestellt. Für das *Annealing* wurden 2 µl *sense* und *antisense* Oligonukleotid mit 46 µl 1×DNA *Annealing Solution* (Ambion (Applied Biosystems), Darmstadt, Deutschland) vermischt, 3 min auf 90°C erhitzt, langsam (1°C/30 s) abgekühlt und anschließend 1 h bei 37°C inkubiert. Die *annealten* shRNAs wurden entweder sofort für die Ligation eingesetzt (siehe 4.3.14) oder bei -20°C gelagert.

4.3.18. Isolierung von RNA aus Zellen oder Geweben

a) Isolierung von RNA aus Zellen

Zur Isolierung von RNA aus Zellen wurden am Vortag 2×10^6 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden zweimal mit 1×PBS gewaschen. Bei adhärenen Zellen wurde 1 ml kaltes Trizol™-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) auf die Zellkultur-Petri-Schale gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst. Suspensionszellen wurden durch 2-maliges abzentrifugieren (900 g; 5 min; 4°C) und anschließendes resuspendieren in 1×PBS in 15 ml Falcon-Röhrchen gewaschen. Die Zellen wurden nochmals abzentrifugiert und die Zellpellets wurden in 1 ml kaltem Trizol™-Reagenz resuspendiert und in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt.

Die Ansätze wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 100 µl Chloroform versetzt und 15 s mit einem Vortexer gemischt. Zur Phasentrennung wurden die Ansätze zuerst 2 – 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend zentrifugiert (14000 g; 15 min; 4°C). Während der Zentrifugation wurden in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße 500 µl Isopropanol vorgelegt. Nach der Zentrifugation wurde die obere, wässrige Phase, die die RNA enthält, abgenommen und in die vorbereiteten 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Ansätze wurden durch mehrmaliges Invertieren gemischt, 10 min bei

Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (14000 g; 10 min; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, und das Pellet wurde mit 80 % nukleasefreiem Ethanol gewaschen. Die RNA wurde durch Zentrifugation pelletiert (10000 g; 5 min; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das RNA-Pellet 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Resuspension wurde das Pellet in 30 µl Nuklease freiem ddH₂O aufgenommen und zum Lösen über Nacht bei 4°C gelagert.

b) RNA-Isolierung aus Gewebe

Für die Aufreinigung von RNA aus Gewebe wurde das RNeasy® Midi Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Die murinen Gewebeprouben wurden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gewebeprouben wurden in gefrorenem Zustand in RPM-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit β-Mercaptoethanol aufgenommen und in diesem Puffer mit einem Gewebehomogenisator (ULTRA-TURRAX, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) zerkleinert. Die Isolation der RNA erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers. Die isolierte RNA wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

4.3.19. Reverse Transkription

Vor der weiteren Prozessierung wurden die Sekundärstrukturen der RNA durch Erhitzen (70°C; 10 min) aufgelöst. Unmittelbar nach dem Erhitzen wurden die RNAs 2 min auf Eis abgekühlt, um die Neubildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt (siehe 4.3.7) und die RNA wurde auf eine Konzentration von 500 ng/µl eingestellt. Diese Konzentration wurde erneut photometrisch überprüft, bevor die RNA auf eine Endkonzentration von 100 ng/µl verdünnt wurde. Vor der reversen Transkription wurde die Qualität der RNA überprüft. Hierfür wurden 10 µl der eingestellten RNA entnommen, mit 2 µl 6×RNA-Laufpuffer (0,15 % (w/v) Bromphenolblau, 60 mM H₂O₂, 60 % (v/v) Glycerin) versetzt und auf ein 1 % Agarosegel (siehe 4.3.8) geladen. Bei nicht degradierter RNA sind nur 2 oder 3 Banden deutlich erkennbar, die den 28S, 18S und 5S RNA Banden entsprechen.

Für die reverse Transkription wurde 1 µg RNA (100 ng/µl) eingesetzt. Die RNA wurde in 200 µl PCR-Reaktionsgefäße überführt und es wurden 2 µl Random Hexamere (100 ng/µl; Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) zugegeben. Die Ansätze wurden 10 min bei 70°C in einer PCR-Maschine (Eppendorf Mastercycler®, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die RNA so schnell als möglich in ein unterkühltes

Salz-Eiswasserbad gestellt. Zu allen Ansätzen wurden 4 µl 5× reverse Transkriptase-Puffer, 1 µl dNTPs (10 mM jedes), 2 µl DTT, 1 µl reverse Transkriptase (SuperskriptII, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 1 µl rekombinanter RNase-Inhibitor (Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) zugegeben und die Ansätze 1 h bei 42°C inkubiert. Alle cDNAs wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

4.3.20. *Real Time*-Polymerasekettenreaktion (TaqMan™-RT-PCR)

Die quantitative *Real Time*-PCR (qRT-PCR) ermöglicht die quantitative Bestimmung von mRNA Expressionswerten. Die qRT-PCR wurde in speziellen 96-well Platten (Optical™ Plates, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Für die qRT-PCR wurde jeweils 1 µg mRNA, in einem 20 µl Reaktionsansatz revers transkribiert. Es wurde davon ausgegangen, dass bei der reversen Transkription von 1 µg RNA auch 1 µg cDNA entsteht. Diese cDNA hätte somit eine Konzentration von 50 ng/µl. Bei der RT-PCR handelte es sich bei allen angegebenen Werten um relative Genexpression, normalisiert gegen die Expression von 18S RNA. Die Werte der zu bestimmenden Proben und die Werte der jeweiligen 18S RNA wurden durch Abgleich gegen eine Standardgerade erhalten. Für die Analyse von 18S wurden die Standards 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 und 0,03125 ng Gesamt-cDNA eingesetzt. Für die zu bestimmenden Zielgene wurden die Standards 20, 10, 5, 2, 1 und 0,5 ng Gesamt-cDNA vorgelegt. Die Werte der Standards wurden einfach bestimmt. Die 18S- oder Zielgen-Expressionswerte der einzelnen Proben wurden in Triplets bestimmt. Für die Bestimmung der 18S RNA Einzelwerte wurde 1 ng cDNA (2 µl einer 1:100 Verdünnung der reversen Transkription) und für die Bestimmung der Zielgen-Einzelwerte wurden 5 ng cDNA (10 µl einer 1:100 Verdünnung der reversen Transkription) eingesetzt. Die 18S RNA Proben wurden mit nukleasefreiem Wasser auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Als Negativkontrolle wurden 10 µl nukleasefreies Wasser eingesetzt. Zu den Ansätzen wurden 900 nM *reverse* und *forward* Primer, 200 nM TaqMan™-Sonde und 12,5 µl 2×TaqMan™-universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) zugegeben. Alle Ansätze wurden mit nukleasefreiem Wasser auf 25 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Für *Mmp-9* wurden die Primer und die Sonde einzeln von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Alle anderen Assays wurden als *ready-to-use Primer* und *Probe* Mischungen von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Der Assay für das bakterielle *lacZ*-Gen wurde bei der Firma Applied Biosystems zur Herstellung in Auftrag gegeben. Die Sequenzen oder Identifikationsnummern der einzelnen Assays sind nachfolgend aufgeführt. Die quantitative RT-PCR wurde auf dem Gerät 7900HT ABI *Prism* (Applied Biosystems, Darmstadt,

Deutschland) mit der *Sequence Detection Software* SDS2.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SDS2.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland).

Primer, Sonden und *ready-to-use* Assays:

18S: *eucaryotic 18S rRNA endogenous control*, Reporter: VIC™; *Quencher*: *non-fluorescent*; (Assay-ID: 4352930E; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)

murines *Mmp-9*: *forward Primer*: 5'-CGAACTTCGACACTGACAAGAAGT-3'; *reverse Primer*: 5'-GCACGCTGGAATGATCTAAGC-3'; TaqMan™-Sonde: 5'-TCTGTCCAGACCAAGGGTACAGCCTGTTC-3'; Reporter: FAM™; *Quencher*: TAMRA™. Die Sequenzen für die *Primer* und die Sonde für murines *Mmp-9* wurden von Prof. Dylan Edward (University of East Anglia, Norwich, UK) zur Verfügung gestellt.

humanes *MMP-9*: Assay von Applied Biosystems (Assay-ID: Hs00957555_m1)

murines *IL-6*: Assay von Applied Biosystems (Assay-ID: Mm00446190_m1)

bakterielles *lacZ*: *forward Primer*: 5'-CAAGCCGTTGCTGATTTCGA-3', *reverse Primer*: 5'-GCTCATCCATGACCTGACCAT-3', TaqMan™-Sonde: 5'-ACCGTCACGAGCATCAT-3'; Reporter: FAM™; *Quencher*: *non-fluorescent* (Applied Biosystems *Assay-by-Design*)

4.3.21. Bestimmung von Genexpressionsprofilen mit TaqMan™ Low Density Arrays

Für die Bestimmung der Genexpressionsprofile in der Leber von *Rag*^{-/-} und *Rag*^{-/-} *Mmp-9*^{-/-} Mäusen wurde die Technik der quantitativen RT-PCR basierten *Low Density Arrays* (LDAs) von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) verwendet. In jedem Port wurden 50 ng cDNA in 50 µl nukleasefreien Wasser und 50 µl 2×TaqMan™-*universal* PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) geladen. Die Durchführung der LDAs erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die quantitative RT-PCR wurde auf dem Gerät 7900HT ABI *Prism* (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) mit dem *low density array upgrade* und der *Sequence Detection Software* SDS2.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SDS2.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland).

4.4. Proteinbiochemische Methoden

4.4.1. Aufarbeitung von Proteinen aus Gewebe

In einem 2 ml Kryoschraubdeckelgefäß mit Silikondichtring wurden Zirkoniumkugeln (Durchmesser = 0,1 mm) vorgelegt. Die bei -80°C gefrorenen Gewebestücke wurden je nach Größe in 300 – 800 μl kaltem Extraktionspuffer (50 mM TRIS, 5 mM CaCl₂, 200 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100, pH 7,5) aufgenommen. Die Gefäße wurden in einen Minibeatbeater™ (Biospec Products, Bartelsville, USA) eingespannt und für 20 s auf der Geschwindigkeitsstufe 3 geschüttelt. Durch die Zirkoniumkugeln wurde das Gewebe beim Schütteln zerkleinert und die Zellen aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde 10 min auf Eis gestellt und anschließend nochmals für 10 s, bei der gleichen Geschwindigkeit wie zuvor, geschüttelt. Zur Abtrennung von nicht zerkleinerten Geweberesten wurden die Ansätze zentrifugiert (6100 g; 10 min, 4°C). Die Proteinlösung wurde abgenommen, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Proteine für die Western Analysen von phosphorylierten Proteinen wurden analog aufgearbeitet. Jedoch wurde hierbei ein Phosphataseinhibitor-enthaltender Puffer (*Cell Lysis Buffer*, Cell Signaling Technology, NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet. Der $10\times$ *Cell Lysis Buffer* wurde 1:10 mit ddH₂O verdünnt und mit 1 mM des Proteinaseinhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) versetzt.

4.4.2. Aufarbeitung von Proteinen aus Zellen

Zur Isolierung von Proteinen aus Suspensionszellen wurden am Vortag 2×10^6 Zellen in 5 ml Medium in einer T25 Zellkulturflasche ausgesät. Vor der Proteinisolierung wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Pro Flasche wurden 400 μl $10\times$ *Cell Lysis Buffer* (Cell Signaling Technology, NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) zur Lyse der Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (900 g; 5 min; 20°C), der Überstand abgenommen und das Zellpellet in *Cell Lysis Buffer* resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 5 min inkubiert. Zum Zerkleinern der genomischen DNA wurden die Ansätze für 5 min in ein Ultraschallbad gestellt. Zur Abtrennung von nicht zerkleinerten Geweberesten wurden die Ansätze zentrifugiert (6100 g; 10 min, 4°C). Die Proteinlösung wurde abgenommen, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

4.4.3. Proteinbestimmung mit BCA™ von Pierce

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen wurde ein Bizinkoniniksäure Reagenz basierter Assay (BCA™ Pierce, Rockford, USA) eingesetzt. Die zu bestimmenden Proben wurden 1:100 in ddH₂O verdünnt. Als Standards wurden BSA-Lösungen der Konzentrationen 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 und 0,0625 mg/ml verwendet. Die Proteinbestimmungen wurden in 96-well Flachbodenplatten (TPP, Trasadingen, Schweiz) durchgeführt. 10 µl von jeder Probe oder des Standard wurden vorgelegt und zu jedem Ansatz wurden 200 µl frisch angesetztes BCA™-Reagenz (1 Volumenteil BCA™-Lösung A + 49 Volumenteilen BCA™-Lösung B) zugegeben. Die Ansätze wurden 30 min bei 37°C inkubiert. Für die Bestimmungen der Proteinkonzentrationen wurden die Absorptionen bei 570 nm (Wallac Victor², Perkin Elmar, Weiterstadt, Deutschland) gemessen, mit dem Programm SigmaPlot 8.0 Standardgeraden erstellt und anhand dieser die Konzentrationen errechnet.

4.4.4. Zymographie

Für die zymographische Analyse wurden Proteinasesubstrate in SDS-Polyakrylamidgele eingebettet. Diese können nach dem Lauf von den Proteinase abgebaut werden. Durch eine anschließende Coomassie-Färbung wird das nicht abgebaute Substrat angefärbt, während an den Stellen, an denen Proteasen aktiv waren, weiße Banden sichtbar werden. Für den Nachweis von Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) wurden jedem Gel 100 µl 100×Gelatin beigegefügt. Bei der Zymographie wurden Gele der Tiefe 0,75 mm (Biorad, München, Deutschland) verwendet.

Für die Polyakrylamid (PAA)-Gelelektrophoresen wurden Mini-Protean III Systeme (BioRad, München, Deutschland) oder Midi-Gel Apparaturen (Biometra, Göttingen, Deutschland) verwendet. Zunächst wurden Trenngele (siehe Tabelle 4.5) gegossen und für die Polymerisation wurden diese Gele 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach der Polymerisation wurden die Trenngele mit Sammelgelen (siehe Tabelle 4.5) überschichtet. Die Proben wurden 1:4 (v/v) mit nicht-reduzierendem 6×SDS-Probenpuffer (250 mM TRIS, 40 % (v/v) Glycerin, 8 % (w/v) SDS, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt und auf die Gele geladen. Die Gelläufe erfolgten in SDS-Elektrophoresepuffer (50 mM TRIS, 14,4 % (w/v) Glycerin, 1 % (w/v) SDS). Als Proteingrößen-Standard wurden in eine Tasche jedes Gels 12 µl *Precision Plus Protein Standard* (BioRad, München, Deutschland) geladen. Die Läufe erfolgten bei 30 mA pro Gel und wurden beendet sobald die Proteingrößen-Standards, im zu analysierenden Bereich, weit genug aufgetrennt waren. Nach dem Lauf wurden die Gele für die Renaturie-

rung der Proteine in Renaturierungspuffer (50 mM TRIS-HCl, 5 mM CaCl₂, 200 mM NaCl, 2,5 % Triton X-100, pH 7,5) geschwenkt. Anschließend wurden die Gele über Nacht bei 37°C in Entwicklungspuffer (50 mM TRIS HCl, 5 mM CaCl₂, 200 mM NaCl, pH 7,5) geschwenkt. In dieser Zeit erfolgt der Abbau der Proteasesubstrate im Gel. Anschließend wurden die Gele mindestens 1 h in Coomassie-Färbelösung (0,2 % Coomassie Brilliant-Blau, 10 % (v/v) Eisessig, 30 % (v/v) Isopropanol) gefärbt und nachfolgend solange in Entfärber (10 % (v/v) Eisessig, 30 % (v/v) Isopropanol) geschwenkt, bis ein deutlicher Kontrast zwischen den weißen Banden und dem blauen Gel entstanden war.

Tabelle 4.5: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel bei der Zymographie

Lösungen	Trenngel	Sammelgel
40 % (w/v) PAA (29:1)	2,5 ml	2,5 ml
1,5 M TRIS ; ph 8,6 ; 0,4 % (w/v) SDS	2,5 ml	-
0,5 M TRIS ; pH 6,8 ; 0,4 % (w/v) SDS	-	2,5 ml
100×Gelatin	100 µl	-
ddH ₂ O	4,9 ml	6,1 ml
10 % (w/v) APS	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

4.4.5. Western Analyse und Densitometrie

Für die Bestimmungen der Proteinmengen von Stat3, phosphoStat3 und KitL wurden Western Analysen durchgeführt und densitometrisch ausgewertet. Die Proteinmengen der einzelnen Spuren wurden über die Menge an α -Tubulin normalisiert.

Zunächst wurde das Trenngel (siehe Tabelle 4.6) gegossen und dieses, für die Polymerisation des Gels, 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde das Trenngel mit einem Sammelgel überschichtet (Tabelle 4.6). Bei allen Analysen wurden 10 %ige Trenngele verwendet. Für die Western Analysen wurden Gele mit der Tiefe 1,5 mm verwendet.

Tabelle 4.6: Zusammensetzung von Trenngel (10 %) und Sammelgel bei den Western Analysen

Lösungen	Trenngel	Sammelgel
40 % (w/v) PAA (29:1)	7,5 ml	1,25 ml
1,5 M TRIS ; ph 8,6 ; 0,4 % (w/v) SDS	7,5 ml	-
0,5 M TRIS ; pH 6,8 ; 0,4 % (w/v) SDS	-	2,5 ml
ddH ₂ O	15,7 ml	6,1 ml
10 % (w/v) APS	300 µl	100 µl
TEMED	12 µl	10 µl

Pro Probe wurden 60 µg Gesamt-Protein pro Spur geladen. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Proteinlösung in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert, mit ddH₂O auf 16 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und mit 4 µl 5×Laemmli-Auftragspuffer (1 M TRIS, 40 % (v/v) Glycerin, 8 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt. Die Proben wurden 5 min bei 95°C denaturiert und bis zum Auftragen auf Eis gestellt. Als Proteingrößen-Standard wurde 12 µl *Precision Plus Protein Standard* (BioRad, München, Deutschland) in eine Tasche jedes Gels geladen. Die Proteinauftrennungen erfolgten bei 30 mA pro Gel. Die Dauer wurde für jedes nachzuweisende Protein individuell angepasst, so dass der zu analysierende Bereich im Gel optimal aufgetrennt war. Die Auftrennung wurde anhand des gefärbten Proteingrößenstandards überwacht.

Für den Transfer der Proteine wurde eine *Semi-Dry* Blotting Apparatur (BioRad, München, Deutschland) verwendet. Für den Transfer wurden 6 Whatman 3M Papiere (Dassel, Deutschland) und eine Nitrocellulose-Membran (GE Healthcare, München, Deutschland) auf Gelgröße zugeschnitten. Die Whatman-Papiere wurden in Transferpuffer getränkt und die Nitrocellulose-Membran in ddH₂O aktiviert. Drei Whatman-Papiere wurden auf die Transfer-einheit gelegt, darauf die Membran, das Polyakrylamidgel und nochmals drei Whatman-Papiere. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte bei 250 mA konstanter Stromstärke für 2 h.

Tabelle 4.7: Verdünnung der bei Western Analysen verwendeten Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Verdünnungspuffer
KitL	1:500	2,5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS/T
Stat3	1:1000	2,5 % (w/v) BSA in TBS/T
phospho Stat3	1:1000	2,5 % (w/v) BSA in TBS/T
α -Tubulin	1:2000	2,5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS/T

Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose-Membran für 5 min in 1×TBS/T-Puffer (2,42 g/l TRIS, 8 g/l NaCl, 0,1 % Tween, pH 7,6) gewaschen und anschließend der Proteintransfer durch Färbung der Proteine auf der Membran mit Ponceau S (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) nachgewiesen. Anschließend wurde die Membran 5 min in 1×TBS/T-Puffer gewaschen und durch Schwenken für 1 h in 5 % (w/v) Magermilch (Applichem, Darmstadt, Deutschland) in 1×TBS/T-Puffer blockiert. Die Membran wurde dreimal 10 min in 1×TBS/T-Puffer gewaschen. Verdünnung und Puffer der primären Antikörper sind in Tabelle 4.7 angegeben. Zum Nachweis der Proteine wurde die Membran 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit der Antikörpersuspension inkubiert. Die Membran wurde viermal 10 min mit 1×TBS/T-Puffer gewaschen. Die Inkubation in sekundärem Antikörper erfolgte für 1,5 h bei Raumtemperatur unter Schwenken. Alle sekundären Antikörper (GE Healthcare, München, Deutschland) wurden nach den Angaben des Herstellers verdünnt. Anschließend wurden die Membranen viermal für je 10 min mit 1×TBS/T-Puffer gewaschen. Für die Proteindetektion wurde das Lumi-Light Kit der Firma Roche Diagnostics (Penzberg, Deutschland) verwendet. Je 1 ml der Lösungen 1 und 2 des Kits wurden gemischt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde 3 min in der Dunkelheit inkubiert und anschließend die emittierte Lumineszenz mit einer Kodak Imagestation 440 CF (Kodak, Stuttgart, Deutschland) nachgewiesen. Die densitometrische Auswertung erfolgte ebenfalls an der Kodak Imagestation.

4.4.6. Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Menge an IL-6 Protein in Knochenmarkzellen oder in Seren wurde mit einem IL-6 ELISA (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) nachgewiesen. Alle benötigten Reagenzien und die IL-6-Antikörper-beschichtete 96-well Flachbodenplatte waren Bestandteil des ELISA-Kits. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Pro well wurden

15 µg Gesamt-Protein oder 15 µl Serum eingesetzt. Die Messung der Absorption bei 450 nm erfolgte mit dem *multi-well* Photometer Wallac Victor² (Perkin Elmar, Weiterstadt, Deutschland).

4.4.7. MMP-9 Aktivitätsassay

Zum Nachweis von MMP-9 Aktivität wurde der MMP-9 Aktivitätsassay von GE Healthcare (München, Deutschland) verwendet. Alle verwendeten Reagenzien waren Bestandteil des Kits. Mit diesem Assay kann sowohl die Aktivität von humanem als auch von murinem MMP-9 bestimmt werden, da beide MMP-9 Formen von dem im Kit enthaltenem Antikörper erkannt und gebunden werden. Die MMP-9 Aktivitäten in 100 µg Leber Gesamt-Protein oder in 60 µg Zelllysate wurden bestimmt. Die Aktivität von MMP-9 wird durch die Umsetzung eines chromogenen Substrates durch aktives MMP-9 bestimmt. Dieser Assay kann auch verwendet werden um die Menge an MMP-9 Gesamt-Protein zu bestimmen. Durch Zugabe von APMA (Aminophenylmercuriacetat, Endkonzentration 2 mM in *assay buffer*) kann alles gebundene MMP-9 in die aktive Form überführt werden. Diese Methode wurde bei der Bestimmung der MMP-9 Gesamt-Menge aus Zelllysaten eingesetzt. Die APMA-Aktivierung erfolgte bei 37°C für 2 h in einer feuchten Kammer. Die Proteinlösungen wurden in 50 µl *assay buffer* aufgenommen, in die Antikörper beschichteten *wells* der 96-*well* Platten überführt und zur Bindung von MMP-9 an den Antikörper 16 h bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung von nicht gebundenem MMP-9 wurden alle *wells* viermal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend wurden 50 µl chromogenes Substrat pro *well* zugegeben. Die Ansätze wurden 7 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei 405 nm (Wallac Victor², Perkin Elmar, Weiterstadt, Deutschland). Alle Proben wurden in Duplikaten bestimmt, als Positivkontrolle wurde rekombinantes humanes MMP-9 verwendet.

4.5. Immunhistochemische Methoden

4.5.1. MMP-9 *in situ* Hybridisierung

Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung wurde murine *Mmp-9* mRNA in L-CI.5s metastasenträgenden Lebern oder humane *MMP-9* mRNA in klinischen Proben von Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms nachgewiesen und lokalisiert. Für diese Nachweise wurden

Digoxigenin markierte spezifische RNA-Sonden, gerichtet gegen murines oder humanes MMP-9, verwendet. Die Nachweise erfolgten auf Formalin-fixierten, Paraffin eingebetteten Proben. Alle Lösungen wurden in Diethylen-Pyrocbonat (DEPC) behandeltem (zur Inaktivierung von RNAsen) ddH₂O angesetzt. Alle Reagenzien wurden von Roche Applied Science (Penzberg, Deutschland) bezogen.

4 µm dicke Paraffinschnitte wurden auf silanisierte Objektträger (Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. Pro Objektträger wurden zwei serielle Schnitte aufgezogen. Einer der beiden Schnitte wurde anschließend mit der *sense*, der andere mit der *antisense*-Sonde hybridisiert. Die Schnitte wurden in einer Xylenreihe entwachst und anschließend in einer Ethanolreihe absteigender Ethanolkonzentration (100 %, 90%, 70%) rehydriert. Jeder Schnitt wurde 5 min in der jeweiligen Ethanollösung und abschließend in 1×PBS (pH 7,4) inkubiert. Für die Prähybridisierung wurden die Schnitte je 5 min in 100 mM Glycin in 1×PBS und in 1×PBS mit 0,3 % Triton X-100 inkubiert. Die Permeabilisierung der Zellen im Gewebe erfolgte durch Proteinase K Verdau (20 µg/ml, Roth, Karlsruhe, Deutschland) in TE-Puffer bei 37°C für 10 min. Anschließend wurden die Gewebeproben durch Inkubation in 4 % Paraformaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur nochmals fixiert. Die Proben wurden in 0,25 % (v/v) Acetatpuffer (0,1 M Triethanolamin, 0,25 % Acetanhydrid, pH 8,0) acetyliert. Für die Hybridisierung wurden 50 ng Digoxigenin markierte RNA-Sonde in 30 µl Hybridisierungspuffer (40 % Formamid, 5 % Dextransulfat, 1×Denhard's Lösung, 4×SSC, 10 mM DTT, 1 mg/ml Hefe t-RNA, 1 mg/ml denaturierte Lachs-Spermien DNA) aufgenommen und auf die Schnitte gegeben. Die Schnitte wurden über Nacht bei 42°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zuerst mit 2×SSC-Puffer und anschließend mit 1×SSC-Puffer bei 37°C für je 10 min gewaschen. Ungebundene RNA wurde durch einen RNase A-Verdau (20 µg/ml RNase A bei 37°C für 30 min, Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland) entfernt. Nachfolgend wurden die Schnitte in 1×SSC-Puffer mit 50 % Formamid bei 37°C für 10 min gewaschen. Für die Detektion der hybridisierten Sonden wurde ein alkalische Phosphatase markierter anti-Digoxigenin Antikörper der Firma Roche Applied Science (Penzberg, Deutschland) verwendet. Der Antikörper wurde 1:5000 in TBS/T (2,42 g/l TRIS, 8 g/l NaCl, 0,1 % Tween, pH 7,6) mit 1 % Ziegen Serum verdünnt und über Nacht bei 4°C auf den Schnitten inkubiert. Als Substrat der alkalischen Phosphatase wurde Nitroblau-Tetrazolium (NBT)/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) verwendet. Pro 1 ml Substratpuffer wurden 4,5 µl NBT, 7 µl BCIP und 1,2 ml Levamisol verwendet. Es wurden 200 µl pro Schnitt aufgetragen. Die Schnitte wurden so lange inkubiert, bis auf den ersten Schnitten deutliche Signale erkennbar waren. Zum Stoppen der Reaktion

wurden die Schnitte in ddH₂O überführt und darin für 5 min inkubiert. Die Schnitte wurden durch Eintauchen für 1 min in Kernechtrotlösung gegengefärbt.

4.5.2. Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie wurden Proteine in murinen oder humanen Gewebeproben lokalisiert. Die immunhistochemischen Färbungen wurden auf 6 µm dicken Paraffin- oder 8 µm dicken Kryoschnitten durchgeführt. Alle Schnitte wurden auf SuperFrost^β Plus Objektträgern (Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen.

a) Färbungen auf Paraffinschnitten

Für die Entparaffinierung wurden die Schnitte dreimal je 3 min in Roti-Clear inkubiert. Für die Rehydrierung wurden die Schnitte zweimal 3 min in 100 % Ethanol, zweimal 3 min in 90 % Ethanol und abschließend in ddH₂O inkubiert. Die Antigendemaskierung erfolgte durch aufkochen der Schnitte in Citratpuffer (0,01 M, pH 6) in einer Mikrowelle (680 W). Zum Abkühlen wurden die Schnitte 10 – 15 min mit ddH₂O gespült. Durch Inkubation für 5 min in 3 % H₂O₂ wurde die endogene Peroxidase blockiert. Die Schnitte wurden anschließend 5 min mit ddH₂O gespült. Das endogene Biotin wurde durch Inkubation in Avidin und Biotin für je 10 min bei RT blockiert. Anschließend wurden die Schnitte 10 min bei RT in 1×TBS inkubiert. Für die Immunfärbungen wurden alle verwendeten Antikörper in hintergrundreduzierendem Antikörperverdünnungsmedium (Dako, Hamburg, Deutschland) verdünnt. Die Verdünnungen der Antikörper sind in Tabelle 4.8 aufgeführt.

Tabelle 4.8: Antikörperverdünnungen IHC

Antikörper	Verdünnung
IL-6	1:200
CD68	1:100
F4/80	1:50

Pro Schnitt wurden 100 – 150 µl Antikörperverdünnung aufgetropft und die Schnitte 1 – 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal 5 min bei Raumtemperatur mit 1×TBS/T gewaschen. Für den Nachweis der primären Antikörper wurde der *mouse/rabbit* Duett-Kit (Dako, Hamburg, Deutschland) verwendet. Die sekundären Antikörper wurden 1:100 in 1×TBS verdünnt. Die Lösung wurde auf die Schnitte gegeben und diese wurden 1 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte zweimal für 5 min

in 1×TBS/T gewaschen und anschließend wurde der Streptavidin-Komplex (StreptAB Complex/HRP; Dako, Hamburg, Deutschland) auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 min. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für je 5 min in 1×TBS/T gewaschen. Als Chromogen wurde DAB (Dako, Hamburg, Deutschland) verwendet. Die Schnitte wurden 0,5 – 1 min in DAB-Lösung inkubiert und die Reaktion wurde durch Eintauchen in ddH₂O gestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayer's Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Schnitte wurden mit Kaiser's Glycerin Gelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

b) Färbungen auf Kryoschnitten

Für die Immunfärbungen auf Kryoschnitten wurden 8 µm dicke Kryoschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf SuperFrost^β Plus Objektträgern (Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die Schnitte wurden 10 min in eiskaltem Aceton fixiert und anschließend nochmals 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Durch Inkubation für 5 min in 1×TBS wurden die Schnitte rehydriert. Die Immunfärbung erfolgte analog zur Färbung auf Paraffinschnitten.

4.5.3. *In situ* Zymographie

Die *in situ* Zymographie wurde eingesetzt um gelatinolytische Aktivität in metastasentragendem Lebergewebe zu lokalisieren. Hierfür wurden Gewebeproben unmittelbar nach Entnahme der Lebern in OCT-*compound* (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und auf Trockeneis schockgefroren. Es wurden 5 µm dicke Kryoschnitte hergestellt und auf SuperFrost^β Plus Objektträgern (Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. 100µg/ml DQ-GelatinTM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurden in 1 %iger Agarose gelöst und auf die Schnitte aufgetragen. Für die Gegenfärbung wurde der DQ-GelatinTM/Agarose Lösung 1µg/ml DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, Appllichem, Darmstadt, Deutschland) zugefügt. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Die Detektion der proteolytisch freigesetzten Fluoreszenzsignale erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert135, Karl Zeiss, Jena, Deutschland).

4.6. Patientenproben

Alle Proben von humanen Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms wurden von Dr. Björn L.D.M. Brücher (Chirurgische Klinik, Klinikum rechts des Isar, München, Deutschland) und von Claus Hann von Weyhern (Institut für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden von 13 Patienten mit metastatischem Kolorektalkarzinom entnommen. Bei den Patienten handelte es sich um sechs Männer und 7 Frauen mit dem Durchschnittsalter von $60,5 \pm 2,4$ Jahren. Alle Patienten waren über die Eingriffe informiert und hatten schriftliche Einwilligungserklärungen unterzeichnet, die an der Chirurgischen Klinik des Klinikum rechts der Isar (München, Deutschland) hinterlegt sind. Für die Isolierung von RNA wurden alle Proben unmittelbar nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Überprüfung der histologischen Gleichheit der entnommenen Proben wurde von zwei Pathologen (Institut für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland) anhand von Kryoschnitten durchgeführt. Das normale Lebergewebe ohne offensichtliche Infiltration von Tumorzellen wurde im Abstand von 5 cm zu den Lebermetastasen entnommen. Für die Immunhistochemie wurden die entnommenen Proben unmittelbar nach der Entnahme für 12 h in 4 % Formalin fixiert, in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet.

4.7. Statistische Methoden

Für die statistische Analyse normalverteilter Daten wurde der Student's T-Test verwendet. Für die statistische Analyse nicht normalverteilter Daten wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

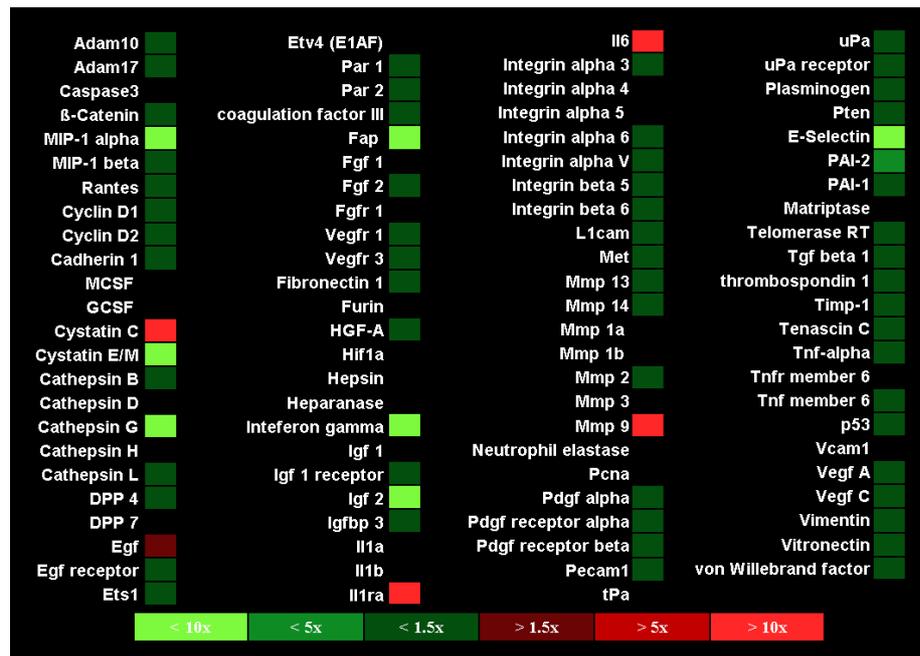
5. Ergebnisse

5.1. Veränderung der Expressionssignatur metastasierungsassoziiierter Gene in der Leber durch den knockout von *Mmp-9*

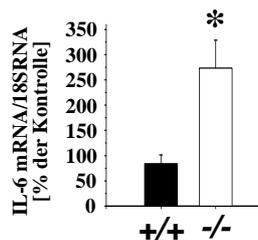
Bislang ist nicht geklärt, in welchem Umfang die spezifische Hemmung einer Matrix Metalloprotease die Homöostase in einem Organ verändert. Um die Auswirkungen einer hochspezifischen Hemmung von Wirtszell-MMP-9 auf das Gewebegleichgewicht, und die daraus resultierende Veränderung der Expression von metastasierungsassoziierten Genen in der Leber zu untersuchen, wurde ein Genexpressionsprofil der Leber von *Mmp-9 knockout* Mäusen erstellt. Hierfür wurde die Technologie der quantitativen RT-PCR (TaqMan™) basierten *Low Density Arrays* (LDAs) angewandt. Diese Technologie ermöglicht die simultane, quantitative Analyse mehrerer ausgewählter Gene.

Um Veränderungen der Wirtsumgebung in der Leber von *Mmp-9-knockout* Mäusen zu detektieren, wurden 95 Metastasierungs-assoziierte Gene zur Analyse ausgewählt. Die Untersuchung zeigte weitreichende Veränderungen der Genexpressionssignatur auf. Die Expression von 68 der untersuchten Gene war mehr als 1,5-fach induziert oder reduziert (Abb. 5.1, A). Auffallend waren besonders die Induktionen der Gene *epidermal growth factor* (Egf), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra) und Cystatin C (CysC). Da für die *Array*-Analyse nur cDNA *pools* (bestehend aus cDNAs von fünf Mäusen pro Gruppe zu je gleichen Anteilen) verwendet worden waren, mussten die erhaltenen Ergebnisse durch Einzelanalysen validiert werden. Mehrfachbestimmungen der vier Gene mit *single target Gene Expression Assays* zeigten signifikante Steigerungen der Expression der untersuchten Gene auf (Abb. 5.1, B – E; $n = 8$; IL-6, $P < 0,001$; Egf, $P < 0,001$; CysC, $P < 0,001$; IL-1ra, $P < 0,039$).

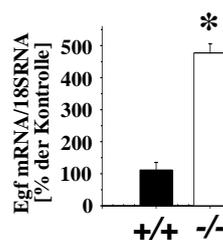
A



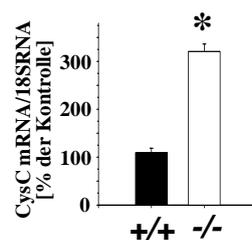
B



C



D



E

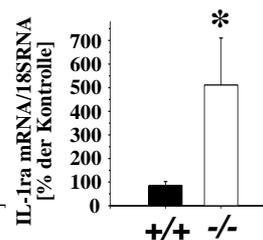


Abbildung 5.1: Veränderung der Genexpressionssignatur Metastasierungs-assoziiierter Gene durch den *knockout* von *Mmp-9*

A, aus 5 tumorfreien Tieren je Gruppe (*Mmp-9*^{+/+} und *Mmp-9*^{-/-}) wurden Lebern entnommen, GesamtrNA wurde isoliert und diese wurde revers transkribiert. Die Expression von 95 Metastasierungs-assoziierten Genen wurde quantitativ mit TaqMan™-Low Density Arrays bestimmt. Alle gemessenen Werte wurden gegen 18S RNA abgeglichen und die Werte wurden als vielfaches der Kontrolle dargestellt. Unveränderte Expressionen wurden durch schwarze Kästchen gekennzeichnet. **B – E**, Validierung der Expressionen von IL-6, Egf, CysC und IL-1ra mit *single target gene expression assays*. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler nach Normalisierung gegen 18S RNA.

5.2. Induktion der *Mmp-9* Promotoraktivität in *Mmp-9*-defizienten Mäusen

Überraschenderweise wurde bei der Genexpressionsanalyse Metastasierungs-assoziiierter Gene in der Leber von *Mmp-9*-knockout Mäusen auch *Mmp-9* mRNA detektiert. Die Expression von *Mmp-9* mRNA in den *knockout* Mäusen war sogar, im Vergleich zur Kontrolle, verstärkt.

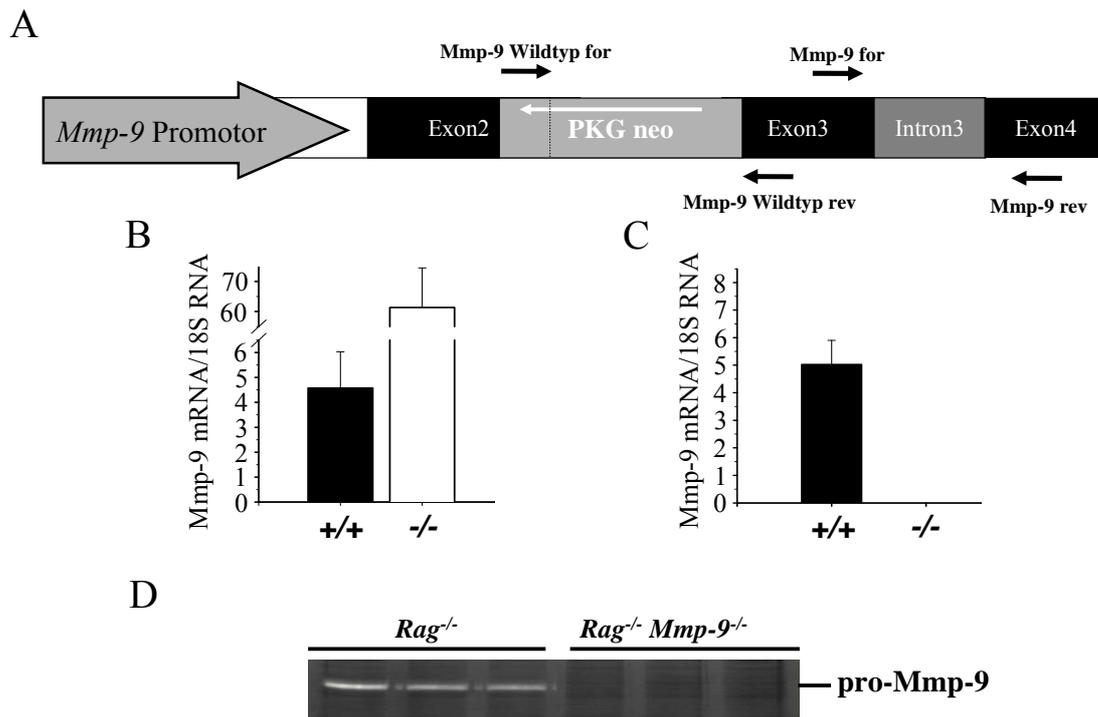


Abbildung 5.2: Der *knockout* von *Mmp-9* induziert die Aktivität des *Mmp-9*-Promotors

A, schematische Darstellung der Lokalisation der ausgewählten *Primer* für die Unterscheidung zwischen Wildtyp und mutierter *Mmp-9* cDNA. Der TaqMan™-Assay, der Intron 3 überspannt (Primer: *Mmp-9* for und *Mmp-9* rev) detektiert beide Varianten und ergibt somit einen Wert für die gesamte Menge an *Mmp-9* mRNA. Durch Einfügen der Neomycin Kasette wurde ein Abschnitt des Exon 2 deletiert. Der *forward Primer* (*Mmp-9* Wildtyp for) der in diesem Bereich bindet kann nur die Wildtyp-Form des *Mmp-9* Gens detektieren. **B – D**, aus 5 tumorzellfreien Tieren je Gruppe (*Mmp-9*^{+/+} und *Mmp-9*^{-/-}) wurden Lebern entnommen und Gesamt-Protein und RNA wurden isoliert. **B**, die relativen Mengen der mutierten *Mmp-9* mRNA oder Wildtyp *Mmp-9* mRNA wurden mit einem TaqMan™-*gene expression assay* bestimmt, welcher nicht zwischen beiden Varianten unterscheiden kann. Zusätzlich wurde die relative Menge an 18S RNA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Expression mit Standardfehler nach Abgleich gegen 18S RNA (*Mmp-9*^{+/+}: 4,57 ± 1,45; *Mmp-9*^{-/-}: 61,32 ± 13,16). **C**, relative Menge an Wildtyp *Mmp-9* mRNA normalisiert gegen 18S RNA. Für die Analyse der Menge an Wildtyp *Mmp-9* mRNA wurde ein TaqMan™-*gene expression assay* ausgewählt der zwischen der Wildtyp und trunkierten Variante unterscheidet (*Mmp-9*^{+/+}: 5,02 ± 0,88; *Mmp-9*^{-/-}: nicht detektiert). **D**, Nachweis von gelatinolytischer Aktivität durch Zymographie. Protein aus der Leber von je 3 *Mmp-9*^{+/+} und *Mmp-9*^{-/-} Mäusen wurden isoliert und auf ein Gelatinzymogramm aufgetragen.

Dieses Ergebnis kann dadurch erklärt werden, dass das *Mmp-9* Gen in den *knockout* Mäusen nicht vollständig deletiert ist, sondern dass durch die Insertion einer Neomycin-Resistenzkasette lediglich ein kleiner Teil deletiert und das Leseraster des noch vorhandenen Gens mutiert ist (Vu et al., 1998). Diese veränderte Form des *Mmp-9* Gens kodiert nicht mehr für ein funktionsfähiges Enzym. Durch eine Aktivierung des *Mmp-9* Promotors kann jedoch der verbliebene Abschnitt des Gens transkribiert werden. Die gebildete cDNA kann mit

quantitativer RT-PCR, bei Verwendung entsprechender *Primer*, detektiert werden (Abb. 5.2, A). Ziel der hier aufgeführten Experimente war es zu zeigen, dass in den *Mmp-9^{-/-}* Mäusen ausschließlich die mutierte Form des Gens exprimiert wurde und dass diese cDNA für keine enzymatisch aktive Protease kodierte.

Die Detektion der Gesamtmenge der *Mmp-9* mRNA ergab eine 12-fache Induktion der *Mmp-9* Promotoraktivität in den *Mmp-9-knockout* Mäusen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (Abb. 5.2, B). Für den Nachweis, dass in den *knockout* Mäusen ausschließlich die mutierte, inaktive Form der *Mmp-9* mRNA exprimiert wurde, wurde ein TaqManTM-*Assay* entwickelt, der zwischen der Wildtyp-Form und der mutierten Form des *Mmp-9* Gens unterscheiden konnte. Hierfür wurde der *forward* Primer des *Assays* (*Mmp-9* Wildtyp for; Abb. 5.2, A) innerhalb des deletierten Bereichs platziert, so dass dieser *Assay* die mutierte cDNA nicht amplifizieren konnte. Mit diesem Versuchsaufbau konnte wie erwartet keine Wildtyp-cDNA in den *Mmp-9-knockout* Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 5.2, C). Der zymographische Nachweis zeigte, dass die Form des Gens die in den *Mmp-9*-defizienten Mäusen transkribiert wurde für kein aktives oder aktivierbares *Mmp-9* kodierte (Abb. 5.2, D).

Es muss jedoch festgehalten werden, dass in den *knockout* Mäusen eine Induktion der *Mmp-9* Expression nachgewiesen wurde. Der *knockout* von *Mmp-9* schien einen oder mehrere Kompensationsmechanismen induziert zu haben, die auf den Promotor von *Mmp-9* rückwirkten und versuchten das Fehlen dieses Faktors auszugleichen.

5.3. Induktion der Lebermetastasierung muriner Kolorektalkarzinomzellen in *Mmp-9-knockout* Mäusen

In der Fachliteratur ist beschrieben, dass MMP-9 in Primärtumoren und Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms hauptsächlich von Stroma- und Wirtszellen exprimiert wird (Zeng und Guillem, 1996; Illemann et al., 2006). Basierend auf diesen Befunden wurde die Hypothese entwickelt, dass diese Zellen durch die Expression von MMP-9 zur Progression maligner Erkrankungen beitragen. Bei dieser Annahme wird jedoch nicht berücksichtigt, dass MMP-9 auch ein wichtiger Regulator der Gewebekomplexität ist, und demzufolge eine Hemmung von MMP-9 zu einer veränderten Homöostase und zu unerwarteten Nebenwirkungen führen könnte. Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten, dass eine spezifische Hemmung von MMP-9, simuliert durch den *knockout*, die Gleichgewichte in der Leber veränderte.

Um die Auswirkungen der durch MMP-9-Hemmung veränderten Homöostase auf die Invasivität von Kolorektalkarzinomzellen in der Leber zu untersuchen, wurden *lacZ*-markierte CT26 (CT26-L) murine Kolorektalkarzinomzellen intravenös (i.v.) in *Mmp-9*-defiziente Mäuse inokuliert. Die *Mmp-9*^{-/-} Mäuse tragen zusätzlich zur Nullmutation im *Mmp-9* Gen eine homozygote Deletion des *Rag*-Gens, wodurch diese Mäuse keine Antikörper bilden und somit immundefizient sind (Chen et al., 1994; Chantrain et al., 2004).

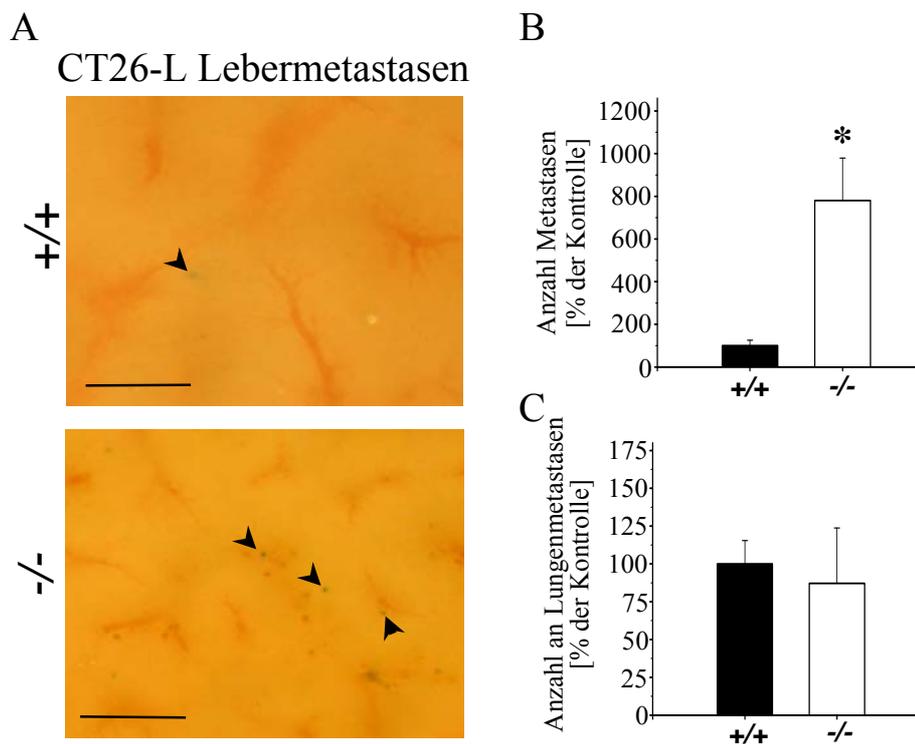


Abbildung 5.3: Induktion der Lebermetastasierung von CT26-L murinen Kolorektalkarzinomzellen durch den knockout von *Mmp-9*

A – C, 1×10^6 CT26-L Zellen wurden i.v. in *Mmp-9*^{+/+} und *Mmp-9*^{-/-} Mäuse inokuliert. 28 Tage nach Tumorzellinokulation wurden die Mäuse geopfert, die Lebern und Lungen entnommen und X-Gal gefärbt. **A**, Nahaufnahmen der Oberflächen von repräsentativen Lebern von *Mmp-9*^{+/+} und *Mmp-9*^{-/-} Mäusen. Die Pfeile markieren *lacZ*-gefärbte Tumorzellen (Maßstab = 0,05 mm). **B**, Anzahl einzelner X-Gal gefärbter CT26-L Tumorzellen auf den Oberflächen der Lebern von *Mmp-9*^{+/+} und *Mmp-9*^{-/-} Mäusen. Die Anzahl der Zellen wurde durch Auszählen unter dem Stereomikroskop ermittelt. Mittelwerte mit Standardfehler sind gezeigt (*Mmp-9*^{+/+}: $100,0 \pm 25,4$ %; *Mmp-9*^{-/-}: $780,6 \pm 198,7$ %; $n = 6$; $P < 0,001$). **C**, Anzahl der CT26-L Metastasen in der Lunge von *Mmp-9*^{-/-} oder *Mmp-9*^{+/+} Mäusen. Mittelwerte mit Standardfehler sind gezeigt (*Mmp-9*^{+/+}: $100,0 \pm 15,4$ %; *Mmp-9*^{-/-}: $87,2 \pm 36,6$ %).

Es wurden 1×10^6 CT26-L in die Schwanzvenen von *Mmp-9*^{-/-} und entsprechenden Kontrollmäusen inokuliert. Diese Zellen bilden nach i.v. Inokulation Makrometastasen in der Lunge und nur wenige Zellen kolonisieren die Leber. Die Anwendung der hochsensitiven *lacZ*-

Färbemethode ermöglicht es jedoch, diese wenigen Zellen zu detektieren und zu quantifizieren. Entgegen der Annahme, dass MMP-9 auf Seiten der Wirtszellen die Metastasierung begünstigt, wurde überraschenderweise eine signifikante Induktion der Lebermetastasierung in *Mmp-9-knockout* Mäusen detektiert (Abb. 5.3, A und B). Die veränderte Mikroumgebung, die durch den *knockout* von *Mmp-9* entstanden war, führte zu einer 780 %igen Induktion der Kolonisation der Leber durch CT26-L-Zellen (Abb. 5.3, A und B; $n = 6$; $P < 0,001$). Die Metastasierung der Lunge war nicht verändert (Abb. 5.3, C).

5.4. Induktion der Lebermetastasierung humaner Fibrosarkomzellen in *Mmp-9-knockout* Mäusen

Um ausschließen zu können, dass es sich bei der Induktion der Lebermetastasierung von CT26-L-Zellen um einen Tumorzelllinien spezifischen Effekt handelte, wurden *lacZ*-markierte humane Fibrosarkomzellen (HT1080) in *Mmp-9*-defiziente Mäuse und Kontrollmäuse inokuliert. Im Gegensatz zu den CT26-L-Zellen, die epithelialen Ursprungs sind, handelt es sich bei HT1080-Zellen um Zellen mesenchymalen Ursprungs.

Es wurden 1×10^6 HT1080 Zellen i.v. inokuliert. Diese Zellen bilden nach i.v. Inokulation typischerweise Makrometastasen in der Lunge. In der Leber können nach i.v. Inokulation dieser Zellen lediglich Infiltrate einzelner Zellen oder kleine Zellkluster detektiert werden. Im Gegensatz zu der Wildtyp-Mikroumgebung der *Mmp-9^{+/+}* Mäuse, in der nur wenige Zellen in der Leber nachgewiesen werden konnten, induzierte die *Mmp-9*-defiziente Mikroumgebung eine starke Kolonisation der Leber durch die Tumorzellen (Abb. 5.4, A und B). Auf der Oberfläche der Lebern von *Mmp-9^{-/-}* Mäusen konnte eine Vielzahl einzelner Zellen oder kleiner, stark gestreuter Zellkluster nachgewiesen werden. Für die Quantifizierung der Infiltrate humaner Tumorzellen wurde die Menge humaner *GAPDH* mRNA mit der Methode der quantitativen RT-PCR bestimmt. Die Spezifität dieser Technik erlaubt es, die humane Form des Gens von der murinen Variante zu unterscheiden. Humane *GAPDH* mRNA konnte nur in Lebern von *Mmp-9^{-/-}* Mäusen nachgewiesen werden, während in den Lebern der Kontrollmäuse die Menge an humaner *GAPDH* mRNA unterhalb der Detektionsgrenze lag (Abb. 5.4, B). Die Anzahl der Makrometastasen in der Lunge wurde durch die Deletion von *Mmp-9* im Wirt nicht verändert (Abb. 5.4, C).

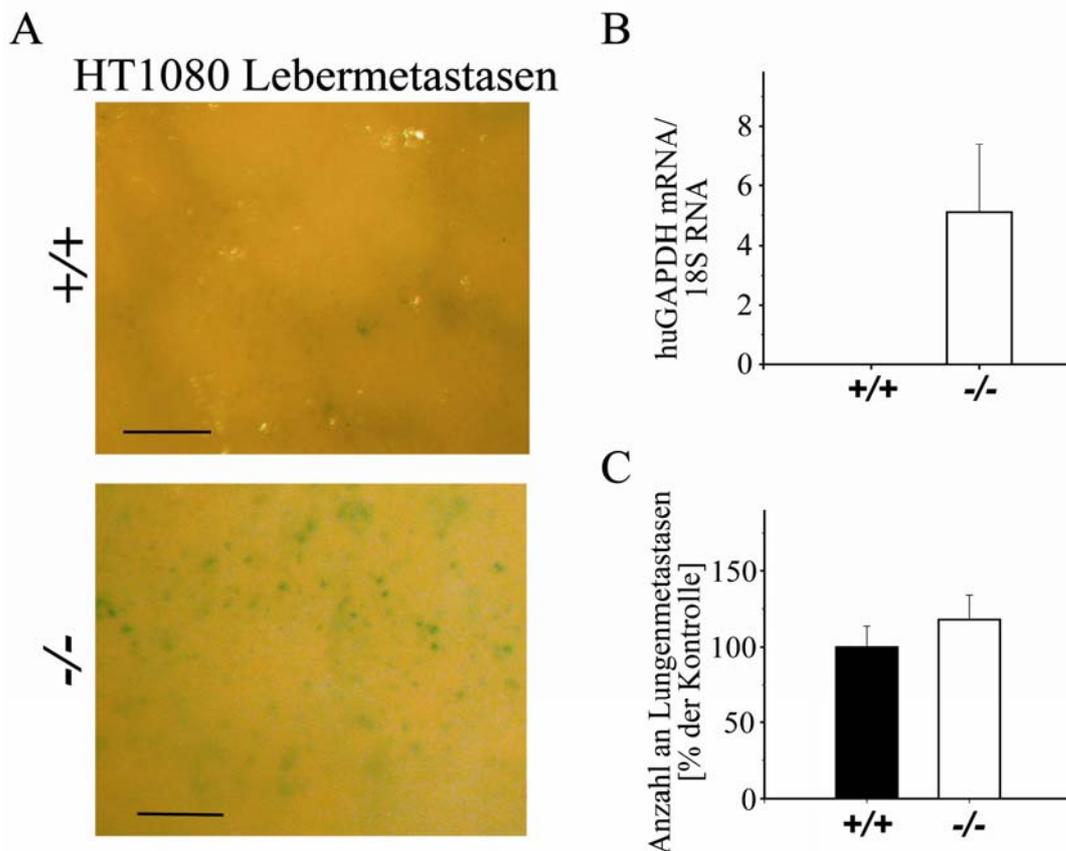


Abbildung 5.4: Induktion der Lebermetastasierung von HT1080 humanen Fibrosarkomzellen durch den *knockout* von MMP-9

A – C, 1×10^6 HT1080 Zellen wurden i.v. in *Mmp-9*^{+/+} und *Mmp-9*^{-/-} Mäuse inokuliert. 21 Tage nach Tumorzellinokulation wurden die Mäuse geopfert, die Lebern und Lungen entnommen und X-Gal gefärbt. **A**, Nahaufnahmen der Oberflächen von repräsentativen, Metastasen tragenden Lebern von *Mmp-9*^{+/+} und *Mmp-9*^{-/-} Mäusen (Maßstab = 0,05 mm). **B**, Quantifizierung von HT1080-Infiltraten in den Lebern von *Mmp-9*^{+/+} und *Mmp-9*^{-/-} Mäusen. Die Menge humaner *GAPDH* mRNA wurde mittels quantitativer RT-PCR ermittelt und gegen die Expression von 18S RNA normalisiert. In den Lebern von *Mmp-9*^{+/+} Mäusen konnte keine humane *GAPDH* mRNA detektiert werden. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (*Mmp-9*^{+/+}: $0,0 \pm 0,0$; *Mmp-9*^{-/-}: $5,1 \pm 2,3$; $n = 6$). **C**, Anzahl der HT1080 Metastasen in der Lunge von *Mmp-9*^{-/-} oder *Mmp-9*^{+/+} Mäusen. Die Anzahl der X-Gal gefärbten blauen Makrometastasen wurde makroskopisch ermittelt. Mittelwerte mit Standardfehler sind gezeigt (*Mmp-9*^{+/+}: $100,0 \pm 17,6$ %; *Mmp-9*^{-/-}: $121,2 \pm 18,2$ %; $n = 6$).

5.5. Induktion der Lebermetastasierung muriner T-Zell Lymphomzellen in *Mmp-9-knockout* Mäusen

Durch i.v. Inokulation von HT1080 humanen Fibrosarkomzellen und CT26 murinen Kolo- rektalkarzinomzellen konnten lediglich die Auswirkungen der veränderten Homöostase auf die Anzahl einzelner Zellen oder kleiner Zellkluster in der Leber untersucht werden. Durch Inokulation von Tumorzellen die effizient die Leber invadieren und in dieser Umgebung auch zu Makrometastasen auswachsen, sollte der Einfluss der Mikroumgebung der *Mmp-9*-

knockout Mäuse auf das Auswachsen der Metastasen und die sekundäre Invasion von Tumorzellen analysiert werden.

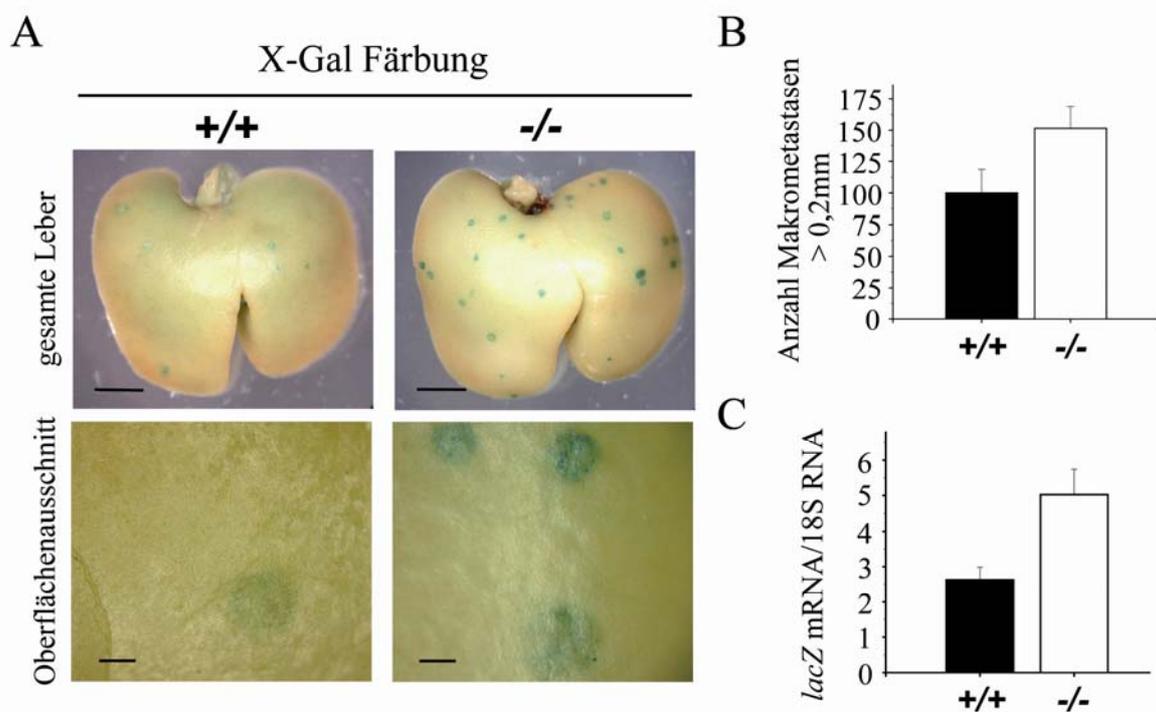


Abbildung 5.5: Der *knockout* von *Mmp-9* fördert die Lebermetastasierung von L-CI.5s T-Zell Lymphomzellen

Mmp-9^{+/+} und *Mmp-9*^{-/-} wurden mit je 5×10^3 L-CI.5s Zellen i.v. inokuliert ($n = 10$). Sechs Tage nach Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert, die Lebern entnommen und durch X-Gal Färbung wurden die Tumorzellen nachgewiesen. Für die Bestimmung der Gesamttumorbelastung wurde von jeder Maus Lebergewebe aserviert. **A**, Aufnahmen von repräsentativen, metastasenträgenden Lebern (oben; Maßstab = 4 mm) und Nahaufnahmen der Leberoberflächen (unten; Maßstab = 0,2 mm). **B**, Anzahl an Makrometastasen (Metastasen > 0,2 mm) in jeder Gruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte als Prozent der Kontrolle mit Standardfehler (*Mmp-9*^{+/+}: 100,0 % ± 18,6 %; *Mmp-9*^{-/-}: 151,6 % ± 17,3 %; $n = 10$; $P = 0,028$). **C**, Bestimmung der Gesamttumorbelastung durch quantitative RT-PCR für das Tumorzell-Markergen *lacZ*. Gesamt-RNA aus Lebern wurde isoliert, revers transkribiert und die relativen Mengen von *lacZ* mRNA und von 18S RNA bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler nach Normalisierung gegen 18S RNA (*Mmp-9*^{+/+}: 2,59 ± 0,61; *Mmp-9*^{-/-}: 4,46 ± 1,18).

Hierfür wurden *Mmp-9*^{-/-} Mäuse und entsprechende Kontrollen mit einer *lacZ*-markierten T-Zell Lymphomzelllinie (L-CI.5s) inokuliert, die nach i.v. Inokulation Makro- und Mikrometastasen in der Leber ausbildet. Sechs Tage nach der Inokulation von 5×10^3 L-CI.5s-Zellen konnte eine signifikant erhöhte Anzahl blau gefärbter L-CI.5s-Makrometastasen (Metastasen > 0,2 mm) detektiert werden (Abb. 5.5, A links und B; $n = 10$; $P = 0,028$). Die Anzahl an Lebermakrometastasen war im Vergleich zur Kontrolle um 151,2 % erhöht (Abb. 5.5, B). Der *knockout* von *Mmp-9* führte zudem zu einer größeren Gesamttumorbelastung, die durch quantitative RT-PCR des Tumorzell-Markergens *lacZ* bestimmt wurde (Abb. 5.5, C). Die

Anzahl und die Verteilung der Mikrometastasen (Abb. 5.5, A rechts) wurden durch den *knockout* von *Mmp-9* nicht beeinflusst.

5.6. Steigerung der *in vitro* Migration und Invasion von T-Zell Lymphom Zellen durch rekombinantes IL-6

Durch die Inokulation von Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs konnte gezeigt werden, dass die durch den *knockout* von *Mmp-9* veränderte Homöostase der Leber, die Invasivität der Tumorzellen steigerte. Um die mechanistische Ursache dieser Induktion zu identifizieren, sollte die Auswirkung der Faktoren auf die Tumorzellen untersucht werden, deren Expression durch den *Mmp-9-knockout* mehr als 1,5fach induziert worden war. Bei diesen Faktoren handelte es sich um den Wachstumsfaktor Egf, die Zytokine IL-6 und IL-1ra und den natürlichen Proteinaseinhibitor Cystatin C. Es sollte überprüft werden, ob einer dieser Faktoren die Invasion oder die Migration von L-CI.5s-Zellen *in vitro* steigern kann. Von den vier induzierten Faktoren wurden jedoch nur die Auswirkungen von IL-6 und Egf auf die Tumorzellen untersucht, da für Cystatin C bereits bekannt ist, dass dieses die Lebermetastasierung reduziert (Kopitz et al., 2005) und da IL-1ra grundsätzlich als anti-metastatischer Faktor beschrieben ist (Apte et al., 2006; Krelin et al., 2007). Hohe Werte von IL-6 und EGF wurden hingegen häufig mit einer gesteigerten Aggressivität von Tumorerkrankungen (Ashizawa et al., 2005; Festuccia et al., 2005) oder einer schlechten Prognose für Patienten korreliert (George et al., 2005; Shariat et al., 2007).

Um die Auswirkungen von IL-6 oder EGF auf die grundlegenden Eigenschaften metastasierender Zellen zu untersuchen, wurde die MatrigelTM-Invasion und die Migration von L-CI-5s-Zellen in Anwesenheit oder Abwesenheit von IL-6 oder Egf *in vitro* untersucht. IL-6 und Egf wurden als rekombinante, murine Proteine zu den L-CI.5s-Zellen, in serumfreien Medium, in das obere Kompartiment von *Boyden Chambers* zugegeben. Als Chemoattraktant wurde serumhaltiges Medium in das untere Kompartiment eingefüllt. Weder durch Zugabe von 10 ng/ml noch durch Zugabe von 100 ng/ml rekombinantes Egf wurde die Invasion (Abb. 5.6, A) oder die Migration (Abb. 5.6, B) der L-CI.5s-Zellen signifikant verändert. Im Gegensatz hierzu führte der Zusatz von 30 ng/ml IL-6 zu signifikanten Steigerungen der Invasion und der Migration von L-CI.5s Zellen (Abb. 5.6, C und D; Migration: $P = 0,002$; Invasion: $P = 0,002$)

Dieses Ergebnis zeigte, dass erhöhte IL-6 Werte, wie sie in den *Mmp-9-knockout* Mäusen festgestellt worden waren, alleine ausreichend sein könnten, die Metastasierung der

Tumorzellen induziert zu haben. Nachfolgend sollte geklärt werden, ob IL-6 auch die Migration und die Invasion von CT26 und HT1080-Zellen induzieren kann.

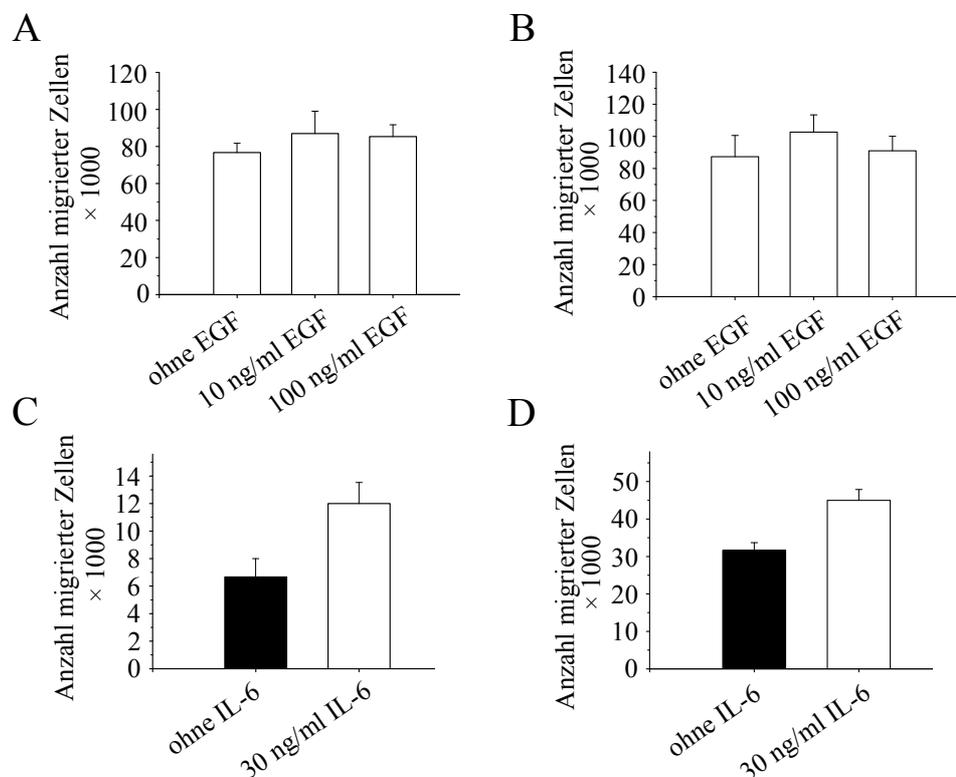


Abbildung 5.6: Induktion von Migration und Matrigel™-Invasion von L-CI.5s Zellen durch rekombinantes IL-6

A – D, dargestellt sind die Effekte von EGF und IL-6 auf die Migration und die Invasion von L-CI.5s Zellen in *Boyden-Chamber-Assays*. 1×10^6 L-CI.5s Zellen wurden in serumfreien Medium ausgesät und die angegebenen Mengen der rekombinanten Proteinen wurden zugegeben. **A**, Effekt von EGF auf die Migration von L-CI.5s-Zellen im *Boyden-Chamber-Assay* (ohne EGF: $100,0 \% \pm 6,6 \%$; 10 ng/ml EGF: $113,5 \% \pm 15,8 \%$; 100 ng/ml EGF: $111,3 \% \pm 8,3 \%$). **B**, Effekt von EGF auf die Matrigel™-Invasion von L-CI.5s-Zellen (ohne EGF: $100,0 \% \pm 15,2 \%$; 10 ng/ml EGF: $117,6 \% \pm 12,3 \%$; 100 ng/ml EGF: $104,2 \% \pm 10,4 \%$). **C**, Induktion der Migration von L-CI.5s-Zellen im *Boyden-Chamber-Assay* durch Zugabe von rekombinantischem IL-6 (ohne IL-6: $100,0 \% \pm 20,0 \%$; 30 ng/ml IL-6: $180,0 \% \pm 22,9 \%$; $P = 0,002$). **D**, Induktion der Matrigel™-Invasion von L-CI.5s-Zellen durch Zugabe von rekombinantischem IL-6 (ohne IL-6: $100,0 \% \pm 6,4 \%$; 30 ng/ml IL-6: $142,1 \% \pm 9,1 \%$; $P = 0,002$).

5.7. Steigerung der *in vitro* Migration und Invasion von murinen Kolorektalkarzinomzellen und humanen Fibrosarkomzellen durch rekombinantes IL-6

Wie gezeigt wurde, induzierte die Zugabe von rekombinantem IL-6 die Invasion und die Migration von L-CI.5s-Zellen. Um zu klären, ob IL-6 auch die Invasivität von CT26 und HT1080-Zellen steigern kann, wurde die Auswirkung von rekombinantem IL-6 auf die Matrigel™-Invasion und die Migration dieser Zelllinien analysiert.

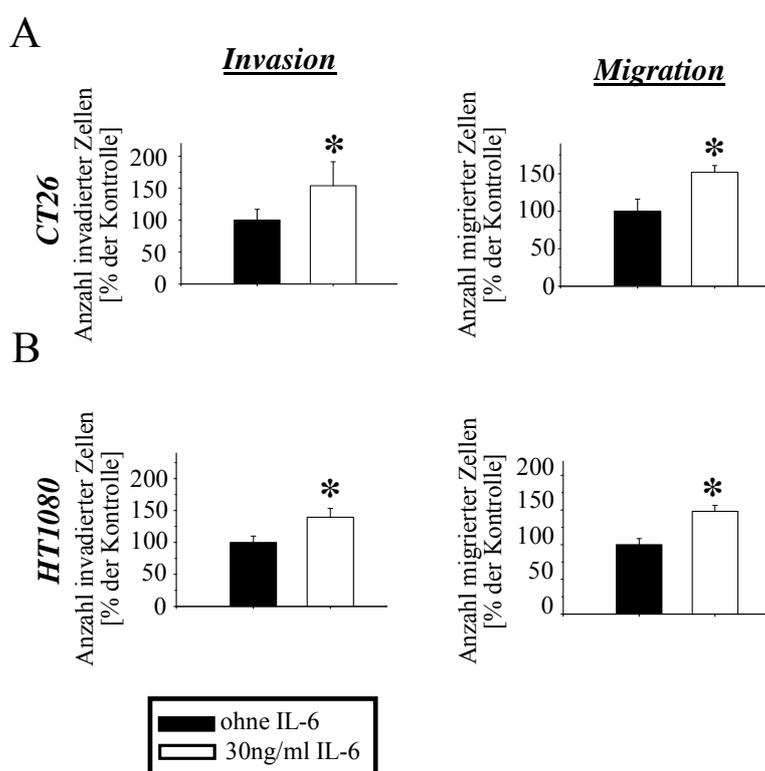


Abbildung 5.7: Induktion der Invasion und Migration von CT26- und HT1080-Zellen durch IL-6

Induktion der Invasion und der Migration von CT26 und HT1080 Zellen *in vitro* durch Inkubation mit rekombinantem IL-6. Rekombinantes murines IL-6 wurde dem oberen Kompartiment der *Boyden Chambers*, in der angegebenen Konzentration, beigefügt. Als Chemoattraktant wurde serumhaltiges Medium im unteren Kompartiment verwendet. **A**, CT26: Mittelwerte mit Standardfehler (Invasion: ohne IL-6: 100,0 ± 16,9 %, 30 ng/ml IL-6: 153,7 ± 37,7 %; $P < 0,05$; Migration: ohne IL-6: 100,0 ± 16,1 %, 30 ng/ml IL-6: 151,8 ± 9,1 %; $P < 0,05$). **B**, HT1080: Mittelwerte mit Standardfehler (Invasion: ohne IL-6: 100,0 ± 9,9 %, 30 ng/ml IL-6: 139,5 ± 13,8 %; $P = 0,002$; Migration: ohne IL-6: 100,0 ± 8,8 %, 30 ng/ml IL-6: 148,0 ± 8,7 %; $P = 0,002$).

Die Zugabe von rekombinantem IL-6 zu den Zellen in serumfreiem Medium in das obere Kompartiment der *Boyden Chambers* führte zu signifikanten Induktionen der Matrigel™-Invasion und der Migration von CT26- (Abb. 5.7, A; Migration: $P < 0,05$; Invasion: $P < 0,05$) und HT1080-Zellen (Abb. 5.7, B; Migration: $P = 0,002$; Invasion: $P = 0,002$) *in vitro*.

Als Chemoattraktant wurde erneut serumhaltiges Medium verwendet. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass im Falle aller drei Zelllinien IL-6 ausreichend war, die Migration und die Invasion zu steigern. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde die Hypothese entwickelt, dass die erhöhten Werte von IL-6 in den *Mmp-9-knockout* Mäusen für die Induktion der Metastasierung der Leber verantwortlich waren.

5.8. Induktion von IL-6 Expression in hämatopoietischen Zellen und erhöhte Konzentration von IL-6 im Serum von *Mmp-9-knockout* Mäusen

Um die mechanistische Ursache der Induktion der Lebermetastasierung in *Mmp-9*-defizienten Mäusen aufzuklären, sollten in einem ersten Schritt die Zellen in der Leber identifiziert werden, die hauptsächlich für die Erhöhte Expression von IL-6 verantwortlich waren. Hierfür wurden die IL-6 exprimierenden Zellen durch einen immunhistochemischen Nachweis lokalisiert.

Überraschenderweise wurde IL-6 hauptsächlich in hämatopoietischen Zellen detektiert, die im vaskulären System der Lebern der *Mmp-9*-defizienten Mäuse vorlagen (Abb. 5.8, A). In den parenchymalen oder den endothelialen Zellen der Lebern von *Mmp-9^{+/+}* und *Mmp-9^{-/-}* Mäusen wurde lediglich eine schwache Expression von IL-6 nachgewiesen. Für eine weitergehende Analyse dieses Sachverhaltes wurden die Expressionslevel von IL-6 in der Leber vor und nach Perfusion analysiert. Durch die Perfusion vor Entnahme der Lebern können die hämatopoietischen Zellen aus der Leber ausgespült werden. Durch die Subtraktion der Werte nach Perfusion, von den Werten vor der Perfusion, können die Beiträge der hämatopoietischen Zellen bestimmt werden. Dieser Ansatz zeigte: erstens, dass sowohl in *Mmp-9^{+/+}* als auch in *Mmp-9^{-/-}* Mäusen, IL-6 hauptsächlich von den hämatopoietischen Zellen exprimiert wurde und zweitens, dass die hämatopoietischen Zellen hauptsächlich für die Induktion der IL-6 Expression im *Mmp-9*-defizienten Wirt verantwortlich waren (Abb. 5.8, B).

Diese starke Induktion der IL-6 Expression in hämatopoietischen Zellen könnte zu einer Anreicherung von IL-6 im Serum dieser Tiere führen. Da IL-6 im Serum mit einer schlechten Prognose für das Überleben von Kolorektalkarzinompatienten korreliert ist (Belluco et al., 2000; Clinchy et al., 2007), sollte die Serumwerte von *Mmp-9-knockout* Mäusen und Kontrolltieren untersucht werden. Hierfür wurde Serum entnommen und mit einem IL-6 spezifischen ELISA untersucht. Dies ergab, dass der *knockout* von *Mmp-9* zu einer signifikanten Induktion von IL-6 im Serum führte (Abb. 5.8, C; $P = 0,024$).

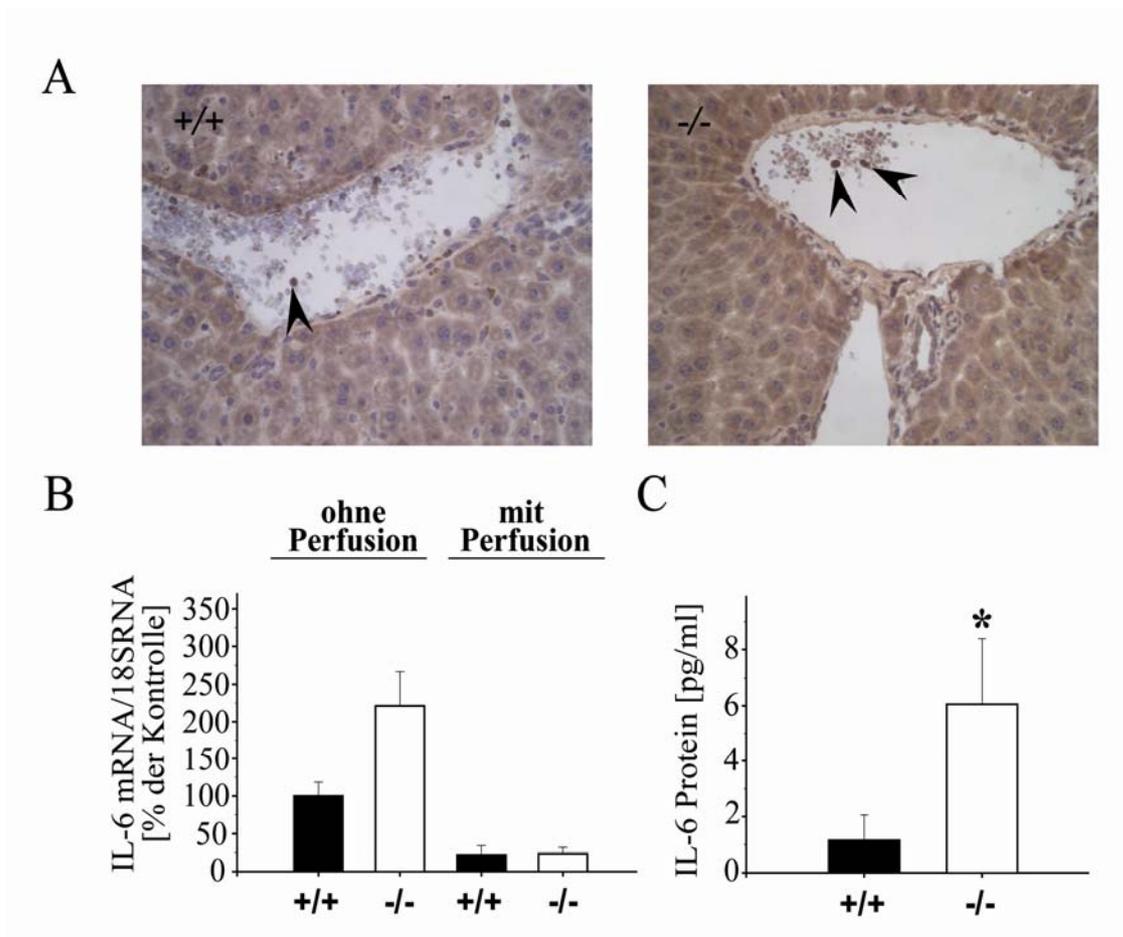


Abbildung 5.8: Induktion der IL-6 Expression in hämatopoietischen Zellen und erhöhte IL-6 Serumlevel in *Mmp-9*-knockout Mäusen

A, Lokalisation von IL-6 exprimierenden Zellen in Lebern von *Mmp-9*^{+/+} und *Mmp-9*^{-/-} Mäusen durch Immunhistochemie. Die Lebern von *Mmp-9*^{+/+} und *Mmp-9*^{-/-} Mäusen wurden entnommen, fixiert und in Paraffin eingebettet. Beispiele für IL-6 positive Zellen sind durch die Pfeile markiert. **B**, Quantifizierung der IL-6 Expression in der Leber mit quantitativer RT-PCR, mit und ohne Perfusion. Um den Beitrag der hämatopoietischen Zellen zur IL-6 Expression zu bestimmen, wurden *Mmp-9*^{+/+} und *Mmp-9*^{-/-} Mäuse geopfert und die Lebern vor oder nach Perfusion entnommen. Für die Perfusion wurden die Lebern vor Entnahme mit PBS durchspült. IL-6 mRNA Werte normalisiert gegen 18S RNA wurden vor und nach Perfusion ermittelt (ohne Perfusion: *Mmp-9*^{+/+}: 100,0 ± 18,5 %, *Mmp-9*^{-/-}: 221,1 ± 46,1 %; mit Perfusion: *Mmp-9*^{+/+}: 22,2 ± 12,1 %, *Mmp-9*^{-/-}: 23,7 ± 8,3 %). **C**, Induktion der IL-6 Level im Serum von *Mmp-9*-defizienten Mäusen. Die Serumlevel wurden mittels ELISA bestimmt. Mittelwerte mit Standardfehler sind dargestellt (*Mmp-9*^{+/+}: 1,15 ± 0,90 pg/ml, *Mmp-9*^{-/-}: 6,06 ± 2,34 pg/ml; n = 3; P = 0,024).

5.9. Induktion von Stat3 Signaltransduktion in Knochenmarkzellen durch den *knockout* von *Mmp-9*

Bei den folgenden Experimenten stand die Frage im Mittelpunkt, über welchen Mechanismus der *knockout* von *Mmp-9* in den Wirtszellen die Expression von IL-6 in hämatopoietischen Zellen induzierte. Die hämatopoietischen Zellen entstammen dem Knochenmark. In diesem Gewebe ist MMP-9 ein wichtiger Regulator der Stat3-Signaltransduktion. Über die Aktivität von MMP-9 wird die Freisetzung von KitL von der Zelloberfläche, einem Stat3-Aktivator, reguliert.

Um die Auswirkungen der Hemmung von *Mmp-9* auf diese Mechanismen zu untersuchen, wurde das Verhältnis zwischen Zelloberflächen-gebundenem und löslichem KitL im Knochenmark von *Mmp-9^{+/+}* und *Mmp-9^{-/-}* Mäusen bestimmt. Die densitometrische Auswertung der Western Analysen ergab, dass der *knockout* von *Mmp-9* eine verringerte Freisetzung von KitL zur Folge hatte (Abb. 5.9, A). Die reduzierte Freisetzung des Kit-Liganden sollte eigentlich zu einer reduzierten Stat3-Signaltransduktion in Knochenmarkzellen von *Mmp-9*-defizienten Mäusen führen. Die Analyse ergab jedoch, dass die Stat3-Signaltransduktion in *Mmp-9-knockout* Knochenmarkzellen nicht wie erwartet reduziert, sondern sogar induziert war (Abb. 5.9, B). Die Western Analysen zeigten, dass der prozentuale Anteil an phosphoryliertem Stat3 in *Mmp-9^{-/-}* Knochenmarkzellen erhöht war, bei nahezu gleicher Expression von Stat3 in *Mmp-9^{+/+}* und *Mmp-9^{-/-}* Knochenmarkzellen (Abb. 5.9, B).

Wie der immunhistochemische Nachweis von phospho-Stat3 im Knochenmark zeigte, war auch die Anzahl phospho-Stat3 positiver Zellen im Knochenmark von *Mmp-9*-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen deutlich erhöht (Abb. 5.9, C). Der Hauptaktivator der Stat3 Signaltransduktion ist IL-6. Deshalb wurde die Hypothese entwickelt, dass im Knochenmark von *Mmp-9*-defizienten Mäusen die Expression von IL-6 induziert war, um die Verminderung der Aktivierung von Stat3 Signaltransduktion über KitL zu kompensieren.

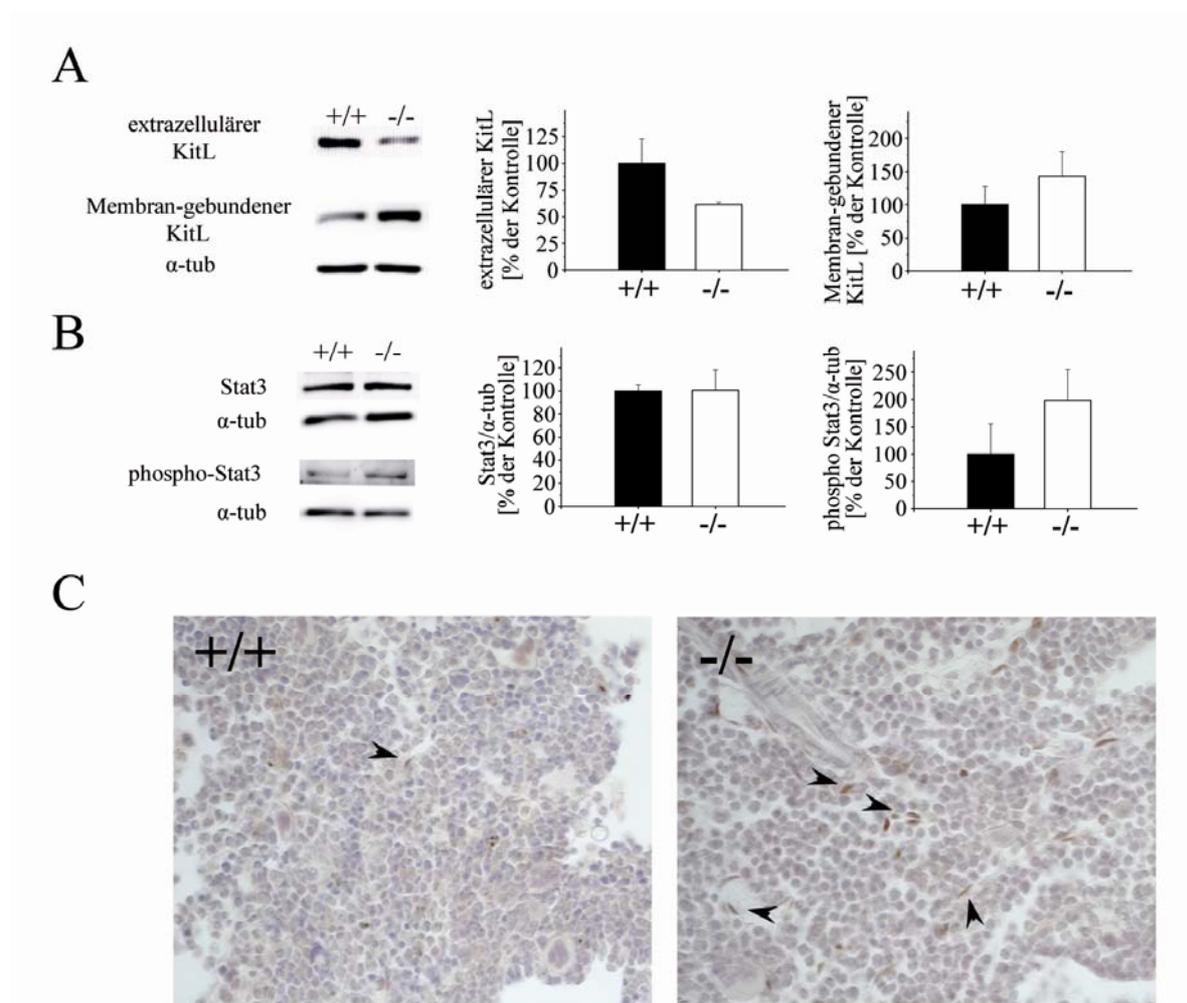


Abbildung 5.9: Induktion der Stat3 Signaltransduktion in Knochenmarkzellen von *Mmp-9*-defizienten Mäusen

A, reduziertes *shedding* von KitL in Knochenmarkzellen von *Mmp-9*-defizienten Mäusen. Für die Gewinnung von Knochenmarkzellen und löslichen EZM-Proteinen wurden die Knochenmarkzellen mit PBS aus dem Knochenmarkkanal ausgespült. Die Menge an löslichem KitL im Überstand und Membran gebundenem KitL wurde mit Western Analysen bestimmt. Die Western Analysen wurden in Triplikaten durchgeführt und densitometrisch ausgewertet. Die Werte wurden gegen α -Tubulin abgeglichen (extrazellulär KitL: *Mmp-9*^{+/+}: 100,0 ± 22,4 %; *Mmp-9*^{-/-}: 61,1 ± 2,4 %; membran-gebunden KitL: *Mmp-9*^{+/+}: 100,0 ± 27,3 %; *Mmp-9*^{-/-}: 142,6 ± 38,0 %). **B – C**, Induktion von Stat3 Signaltransduktion in *Mmp-9*-defizienten Knochenmarkzellen. **B**, Die Mengen von Stat3 und phospho-Stat3 in isolierten Knochenmarkzellen von *Mmp-9*^{+/+} und *Mmp-9*^{-/-} Mäusen wurden mittels Western Analyse quantifiziert. Die Analysen wurden in Triplikaten durchgeführt und densitometrisch ausgewertet. Die Werte wurden gegen α -Tubulin abgeglichen (Stat3: *Mmp-9*^{+/+}: 100,0 ± 5,1 %; *Mmp-9*^{-/-}: 100,6 ± 17,8 %; phospho-Stat3: *Mmp-9*^{+/+}: 100,0 ± 54,9 %; *Mmp-9*^{-/-}: 197,9 ± 57,1 %). **C**, Nachweis von phospho-Stat3 positiven Zellen im Knochenmark von *Mmp-9*^{+/+} und *Mmp-9*^{-/-} Mäusen auf Paraffinschnitten von eingebetteten Knochen. Positive Zellen sind mit Pfeilen markiert.

5.10. Verstärkte Expression von IL-6 in Knochenmarkszellen durch den *knockout* von *Mmp-9*

Um die zuvor aufgestellte Hypothese zu überprüfen, wurde zuerst die Expression von IL-6 im Knochenmark von *Mmp-9*-defizienten Mäusen und Kontrolltieren bestimmt. Dieses Vorgehen wurde ausgewählt um sicherzustellen, dass der *knockout* von *Mmp-9* auch in diesem Gewebe eine Induktion der Expression von IL-6 zur Folge hatte. Für diesen Nachweis wurden Knochenmarkszellen aus *Mmp-9*^{+/+} und *Mmp-9*^{-/-} Mäusen isoliert. Die Expression von IL-6 mRNA wurde mit quantitativer RT-PCR und die Expression von IL-6 Protein mit einem IL-6 spezifischen ELISA analysiert. Die Expression von IL-6 im Knochenmark war auf Ebene der mRNA (Abb. 5.10, A) um 320 % und auf Proteinebene um 100 %, im Vergleich zur Kontrolle, verstärkt (Abb. 5.10, B).

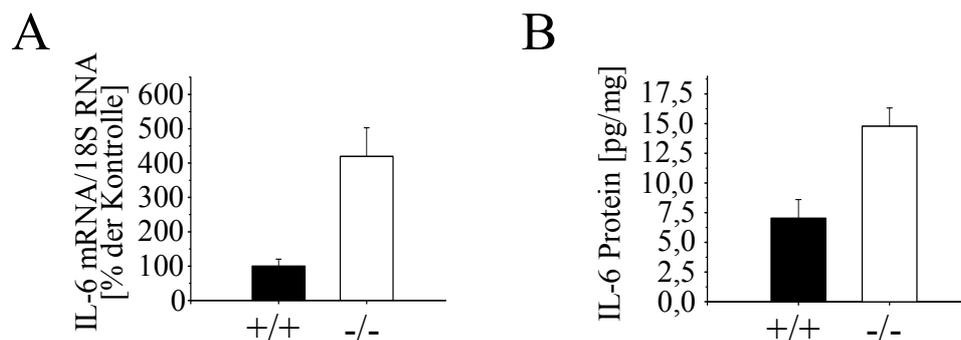


Abbildung 5.10: Induktion der IL-6 Expression in *Mmp-9*-defizienten Knochenmarkszellen

A – B, Induktion von IL-6 im Knochenmark von *Mmp-9*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen. Knochenmarkszellen von *Mmp-9*^{+/+} und *Mmp-9*^{-/-} Mäusen wurden entnommen und mRNA und Protein aus diesen Zellen wurde isoliert. A, Induktion der IL-6 mRNA Expression. IL-6 mRNA wurde mit quantitativer RT-PCR bestimmt und gegen 18S RNA normalisiert. Die Mittelwerte mit Standardfehler sind dargestellt (*Mmp-9*^{+/+}: 100,0 ± 20,5 %; *Mmp-9*^{-/-}: 419,4 ± 83,4 %). B, IL-6 Protein wurde mit einem ELISA bestimmt. Die Mittelwerte mit Standardfehler sind dargestellt (*Mmp-9*^{+/+}: 7,03 ± 1,58 pg/mg; *Mmp-9*^{-/-}: 14,78 ± 1,54 pg/mg).

5.11. Steigerung der IL-6 Expression in Knochenmarkszellen durch KitL

Um zu untersuchen, ob die Induktion der IL-6 Expression als Kompensation für reduzierte KitL/cKit-Signaltransduktion ein grundsätzlicher Mechanismus in Knochenmarkszellen ist, wurde dieser Sachverhalt *in vitro*, anhand isolierter, primärer Knochenmarkszellen analysiert.

In einem ersten Ansatz wurden Knochenmarkszellen aus Wildtyp DBA/2 Mäusen isoliert und in Anwesenheit oder Abwesenheit von KitL *in vitro* kultiviert. KitL wird normalerweise stan-

dardisiert, in rekombinanter Form *in vitro* Kulturen von primären Knochenmarkzellen zugesetzt. Dies ist bereits ein Hinweis auf die Bedeutsamkeit dieses Faktors für die Knochenmarkzellen. Wie gezeigt werden konnte, induzierte das Fehlen von KitL in der *in vitro* Kultur die Expression von IL-6 in den Knochenmarkzellen (Abb. 5.11, A).

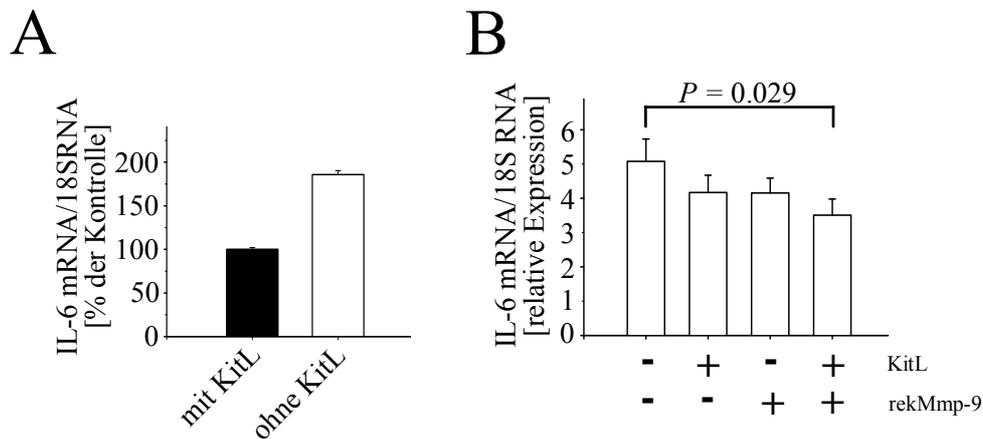


Abbildung 5.11: Kompensation der reduzierten KitL/c-Kit Signaltransduktion durch Induktion der IL-6 Expression in Knochenmarkzellen

A, KitL abhängige Expression von IL-6 in Wildtyp Knochenmarkzellen *in vitro*. Wildtyp Knochenmarkzellen wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von KitL in Zellkultur kultiviert. Die Expression von IL-6 wurde mit quantitativer RT-PCR detektiert. Die Mittelwerte mit Standardfehler der IL-6 mRNA normalisiert gegen 18S RNA sind gezeigt (mit KitL: 100,0 ± 2,0 %; ohne KitL: 185,8 ± 4,6 %). **B**, Zusammenhang zwischen der Expression von IL-6 mRNA und der Anwesenheit von Mmp-9 und KitL *in vitro*. Knochenmarkzellen von *Mmp-9^{-/-}* Mäusen wurden isoliert und 2 Stunden unter verschiedenen Bedingungen kultiviert (2,5 ng/ml rekombinanter KitL oder 50 ng/ml rekombinantes murines Mmp-9 oder beide Faktoren). RNA wurde isoliert und die Expression von IL-6 mRNA und 18S RNA mit quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Mittelwerte mit Standardfehler der relativen Expression von IL-6 sind gezeigt (ohne KitL und Mmp-9: 5,0 ± 0,6; mit KitL: 4,2 ± 0,4; mit Mmp-9: 4,2 ± 0,3; mit KitL und Mmp-9: 3,6 ± 0,3).

Eine gesteigerte Expression von IL-6 wurde zuvor im Knochenmark von *Mmp-9*-defizienten Mäusen nachgewiesen. Hierfür ist die Hypothese aufgestellt worden, dass die IL-6 Expression durch einen Mangel an löslichem KitL induziert worden war. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde getestet, ob durch Zugabe von rekombinantem Mmp-9 und/oder KitL, den beiden Mangelfaktoren im *Mmp-9^{-/-}* Knochenmark, die Expression von IL-6 wieder gesenkt werden konnte. Hierfür wurden *Mmp-9^{-/-}* Knochenmarkzellen isoliert und *in vitro* direkt nach der Isolation mit rekombinantem KitL oder Mmp-9, einzeln oder in Kombination, versetzt (Abb. 5.11, B). Die Expression von IL-6 mRNA in *Mmp-9*-defizienten Knochenmarkzellen wurde mit quantitativer RT-PCR bestimmt. Bereits durch Zugabe von rekombinantem KitL oder rekombinantem Mmp-9 konnte die Expression von IL-6 in den *Mmp-9^{-/-}* Knochenmarkzellen

leicht gesenkt werden (Abb. 5.11, B). Durch die gleichzeitige Zugabe beider Faktoren wurde eine signifikante Reduktion erzielt (Abb. 5.11, B).

5.12. Induktion der IL-6 Expression durch spezifische Hemmung von Mmp-9 *in vivo*

Es konnte gezeigt werden, dass der *knockout* von *Mmp-9* in Knochenmarkzellen einen Kompensationsmechanismus induziert, in dessen Folge die Lebermetastasierung IL-6 sensitiver Tumorzellen verstärkt wurde. Die veränderte Homöostase in *Mmp-9-knockout* Mäusen ist jedoch Folge einer Anpassung an das Fehlen von *Mmp-9* über den gesamten Zeitraum der Ontogenese, des hier verwendeten genmanipulierten Mausstammes. Um zu untersuchen, ob der gefundene Mechanismus auch in Wildtyp-Mäusen ausgelöst werden kann, wurden DBA/2-Mäuse mit verschiedenen synthetischen Inhibitoren, mit zunehmender Selektivität gegenüber MMP-9, behandelt. Durch die Verwendung von synthetischen Inhibitoren können die Auswirkungen einer akuten Hemmung von MMP-9 untersucht werden.

Als Inhibitoren wurden der Breitspektrum-MMP-Inhibitor Batimastat (BB94), die beiden Hydroxamat Inhibitoren Ro28-2653 und Ro206-0222 (Grams et al., 2001) und der Mechanismus basierte Inhibitor SB-3CT (Kleinfeld et al., 2001) verwendet. Bereits 14 Tage nach täglicher Applikation, konnte im Falle der Inhibitoren mit höherer Spezifität eine leichte (Ro206-0222) oder sogar eine signifikante (SB-3CT) Steigerung der IL-6 Expression in den Knochenmarkzellen detektiert werden (Abb. 5.12, A und B). Sowohl die mRNA Expression von IL-6 in den Knochenmarkzellen (Abb. 5.12, A), als auch die IL-6 Protein Expression (Abb. 5.12, B) waren induziert. Die Inhibitoren mit geringerer Spezifität (BB94 und Ro28-2653) zeigten keine Auswirkung auf die IL-6 Expression (Abb. 5.12, A und B).

Hierdurch konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Aktivität von *Mmp-9*, sowohl durch eine lebenslange Hemmung während der Entwicklung, wie beim *Mmp-9-knockout*, als auch durch eine akute Inhibition, mit pharmakologischen Inhibitoren, zu einer Störung der Homöostase im Knochenmark führte. Als nächstes sollte geklärt werden wie erhöhte Werte von IL-6 die Metastasierung der Leber fördern. Es wurde die Hypothese entwickelt, dass IL-6 die Expression eines metastasierungsfördernden Faktors induziert hatte, der für die Induktion der Metastasierung der Leber in den *Mmp-9*-defizienten Mäusen verantwortlich war.

Aus früheren Studien ist bekannt, dass MMP-9 die Invasion von Tumorzellen in die Leber fördern kann (Arlt et al., 2002) und es wurde bereits gezeigt, dass IL-6 die Expression von MMP-9 in Tumorzellen induzieren kann (Kossakowska et al., 1999). Die Auswertung des Genexpressionsprofils der Lebern von *Mmp-9*^{-/-} Mäusen zeigte bereits, dass in diesen Mäusen ein Kompensationsmechanismus induziert worden war, der die Expression von *Mmp-9* in den Wirtszellen steigerte. Im Gegensatz zu den Wirtszellen der *Mmp-9*-defizienten Mäuse die lediglich eine inaktive Form von Mmp-9 exprimieren können, könnten die Tumorzellen aktives Mmp-9 exprimieren.

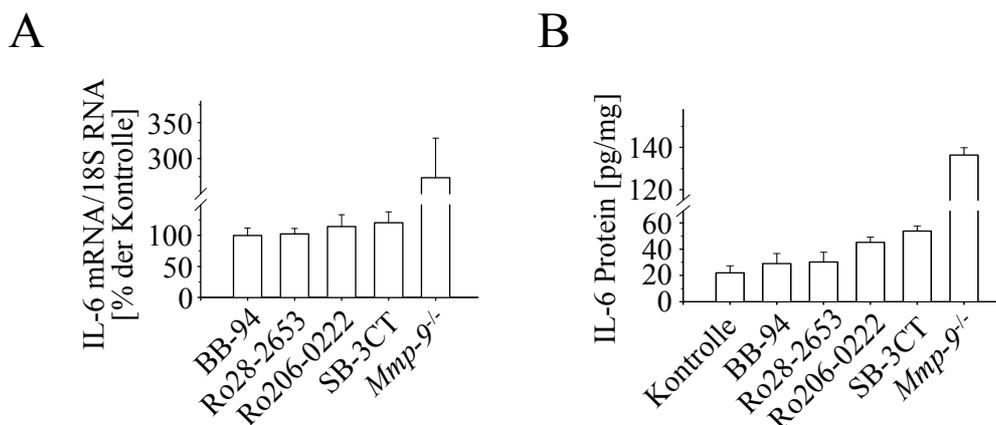


Abbildung 5.12: Induktion der IL-6 Expression in Knochenmarkzellen durch spezifische Hemmung von Mmp-9

A – B, Wildtyp Mäuse wurden mit synthetischen Inhibitoren mit zunehmender Selektivität gegenüber Mmp-9 behandelt. Die Mäuse wurden täglich mit 30 mg/kg Batimastat oder 50 mg/kg Ro28-2653, Ro206-0222, SB-3CT behandelt. 14 Tage nach der ersten Behandlung wurden die Mäuse geopfert und die Knochenmarkzellen isoliert. Die Werte der *Mmp-9*^{-/-} Mäuse wurden als Referenzwerte zusätzlich aufgetragen. **A**, Bestimmung der IL-6 mRNA Expression in den Knochenmarkzellen. mRNA wurde isoliert, revers transkribiert und die Werte der IL-6 mRNA und der 18S RNA mit quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Mittelwerte mit Standardfehler der IL-6 mRNA normalisiert gegen 18S RNA sind gezeigt. Die Werte sind als Prozent der Vehikel-Kontrolle dargestellt (BB-94 (Batimastat): 99,8 ± 12,0 %; Ro28-2653: 102,2 ± 8,8 %; Ro206-0222: 114,1 ± 19,0 %; SB-3CT: 120,2 ± 17,6 %; *Mmp-9*^{-/-}: 273,3 ± 55,3 %). **B**, IL-6 Protein Werte wurden mit einem ELISA bestimmt. Die Mittelwerte mit Standardfehler sind dargestellt (Kontrolle: 22,0 ± 5,4 pg/mg; BB-94: 29,0 ± 7,6 pg/mg; Ro28-2653: 30,2 ± 7,5 pg/mg; Ro206-0222: 45,2 ± 4,0 pg/mg; SB-3CT: 53,8 ± 3,9 pg/mg; *Mmp-9*^{-/-}: 136,4 ± 3,5 pg/mg).

5.13. Steigerung der MMP-9 Expression in Tumorzelllinien durch rekombinantes IL-6

Es ist bereits bekannt, dass IL-6 die Expression von MMP-9 induzieren kann (Kossakowska et al., 1999; Lin et al., 2007) und MMP-9 wiederum ist ein bekanntes Effektormolekül der Metastasierung der Leber (Arlt et al., 2002; London et al., 2003; Krüger et al., 2005; Lubbe et al., 2006). Um die Auswirkung von IL-6 auf die Expression von MMP-9 in den verwendeten

Tumorzelllinien zu untersuchen wurden die Tumorzelllinien mit rekombinantem IL-6 *in vitro* inkubiert. Die Tumorzelllinien wurden mit 30 ng/ml rekombinantem murinen IL-6 versetzt und die Expression von MMP-9, zu verschiedenen Zeitpunkten, mit quantitativer RT-PCR analysiert.

Im Falle aller drei Tumorzelllinien konnte nach Zugabe von rekombinantem IL-6 eine verstärkte Expression von MMP-9 in den Tumorzellen detektiert werden (Abb. 5.13, A – C). Bei CT26-Zellen konnte 24 Stunden nach Zugabe von IL-6 eine Induktion der *Mmp-9* mRNA Expression gemessen werden, die in den folgenden 24 Stunden nochmals zunahm (Abb. 5.13, A). Bei L-CI.5s- (Abb. 5.13, B) und HT1080-Zellen (Abb. 5.13, C) konnte bereits zwei Stunden nach Zugabe von IL-6 eine Induktion detektiert werden.

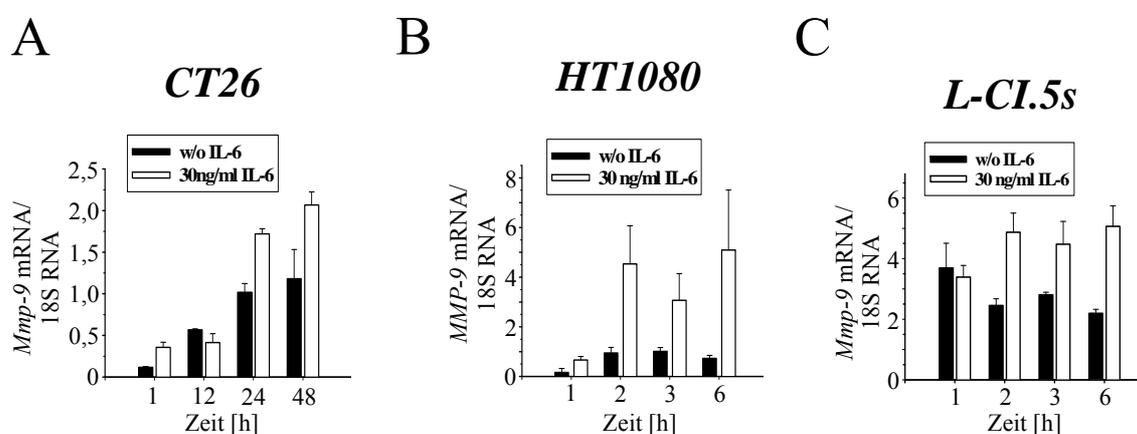


Abbildung 5.13: Induktion der *Mmp-9* Expression in Tumorzelllinien durch Inkubation mit rekombinantem IL-6

A – B, Zeitabhängige Induktion der *Mmp-9* Expression in CT26, HT1080 und L-CI.5s Zellen durch Zugabe von 30 ng/ml IL-6 ins Kulturmedium. Die Expression der *Mmp-9* mRNA und der 18S RNA wurden mit quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Mittelwerte mit Standardfehler der *Mmp-9* Expression normalisiert gegen 18S RNA sind gezeigt. **A**, CT26: (ohne IL-6: 1h: 0,12 ± 0,01; 12h: 0,57 ± 0,01; 24h: 1,02 ± 0,1; 48h: 1,18 ± 0,35; 30ng/ml IL-6: 1h: 0,36 ± 0,06; 12h: 0,41 ± 0,11; 24h: 1,72 ± 0,06; 48h: 2,07 ± 0,16). **B**, HT1080: (ohne IL-6: 1h: 0,3 ± 0,3; 2h: 1,9 ± 0,5; 3h: 2,0 ± 0,3; 6h: 1,5 ± 0,3; 30 ng/ml IL-6: 1h: 1,3 ± 0,3; 2h: 9,1 ± 3,1; 3h: 6,1 ± 2,2; 6h: 10,2 ± 4,9). **C**, L-CI.5s: (ohne IL-6: 1h: 3,6 ± 0,8; 2h: 2,4 ± 0,2; 3h: 2,8 ± 0,1; 6h: 2,1 ± 0,1; 30ng/ml IL-6: 1h: 3,4 ± 0,4; 2h: 4,9 ± 0,6; 3h: 4,5 ± 0,8; 6h: 5,1 ± 0,7).

5.14. Klonierung eines *Mmp-9* Promotorkonstrukts zur Detektion der *Mmp-9* Expression in Tumorzellen *in vivo*

Nach der Feststellung, dass rekombinantes IL-6 die Expression von *MMP-9* in den Tumorzelllinien *in vitro* induzieren konnte, sollte geklärt werden, ob die Expression von *MMP-9* in

den Tumorzellen auch durch die Mikroumgebung in den *Mmp-9*^{-/-} Mäusen *in vivo* induziert worden war.

Um nachzuweisen, dass Tumorzellen *in vivo* *Mmp-9* exprimieren können und dass diese Expression durch die Mikroumgebung der *Mmp-9*-defizienten Mäuse stärker gefördert wird, wurden zunächst die Tumorzellen mit einem chimären *Mmp-9/Luciferase* Promotorkonstrukt markiert. Hierfür wurde ein murines *Mmp-9* Promotorkonstrukt aus einem GatewayTM-Kloniervektor pEntr-4 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in den Zielvektor, das lentivirale Plasmid pLenti6-BlockIT-Dest (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), überführt. Dieser lentivirale Vektor verfügt über keinen Promotor für das Transgen, d.h. der Promotor muss zusammen mit dem Transgen in den lentiviralen Vektor eingebracht werden. Mit diesem Konstrukt wurden L-CI.5s Zellen transduziert.

Bevor die erhaltene, markierte Zelllinie in einem *in vivo* Experiment eingesetzt werden konnte, musste die Funktionalität des Promotorkonstrukts *in vitro* überprüft werden. Hierfür wurde die *Mmp-9* Expression in den Tumorzellen durch Zugabe von 10 % Serum (Abb. 5.14, B) oder Phorbol Myristat Acetat (PMA; Abb. 5.14, C) zu den Zellen induziert. Für den Nachweis, dass durch Zugabe von Serum oder PMA die Expression des endogenen *Mmp-9* induziert wird, wurde mit quantitativer RT-PCR die Expression von *Mmp-9* mRNA bestimmt. Die Induzierbarkeit des Promotorkonstrukts wurde durch die mRNA Expression des Markergens *Luciferase* analysiert. Die Zugabe von Serum oder PMA stimulierte die Expression von *Mmp-9* in den Tumorzellen, im Vergleich zu Kontrollen ohne Serum oder ohne PMA (Abb. 5.14, B und C). Die Expression von *Luciferase* mRNA wurde im gleichen Maße induziert wie die Expression von endogener *Mmp-9* mRNA.

Mit diesen markierten Zellen sollte nachfolgend die Aktivität des *Mmp-9* Promotors in den Tumorzellen *in vivo* nachgewiesen werden. Mit diesem Experiment sollte geklärt werden, ob die Mikroumgebung in der Leber von *Mmp-9*-defizienten Mäusen, die Expression von *Mmp-9* in den Tumorzellen induzierte. Für diesen Versuch wurden nur L-CI.5s-Zellen ausgewählt, da nur diese Zellen ausreichend effizient die Leber kolonisieren, um eine Quantifizierung der *Mmp-9* Promotoraktivität in der Leber zu ermöglichen. Um die Anzahl der Tumorzellen in der Leber zu erhöhen und eine bessere Quantifizierung zu ermöglichen, wurden in diesem Versuch, 1×10^5 L-CI.5s-Zellen injiziert, da nach Inokulation von 5×10^3 Zellen die Expression von *Luciferase* nicht nachweisbar war. Die Tiere wurden 3 Stunden nach Tumorzellinokulation geopfert und die Expression von *Luciferase* und *Mmp-9* mRNA mit quantitativer RT-PCR bestimmt.

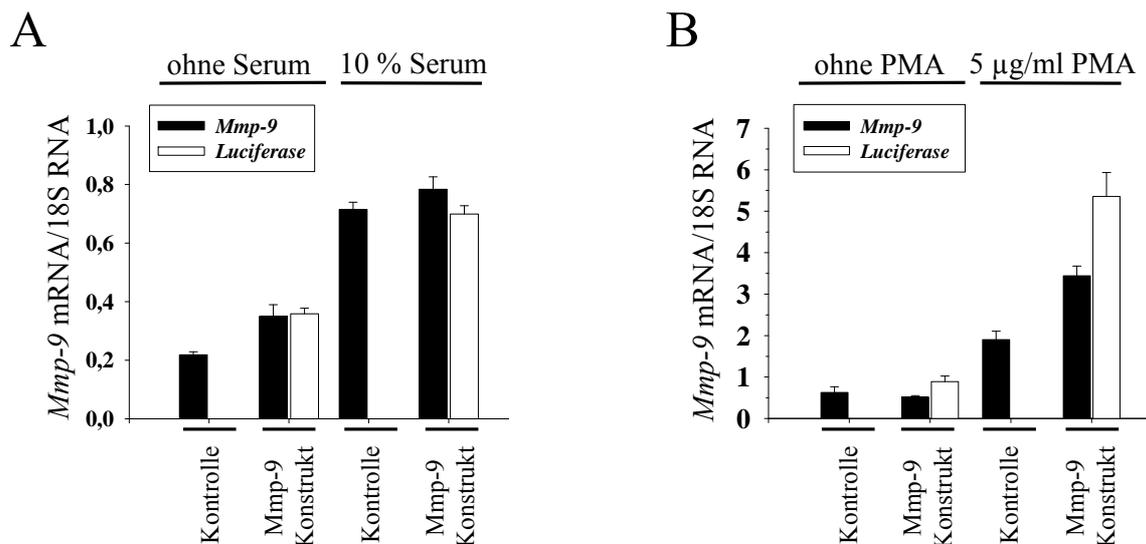


Abbildung 5.14: Nachweis der Induzierbarkeit des *Mmp-9* Promotorkonstruktes in L-CI.5s-Zellen

A – B, Induktion des *Mmp-9*-Promotors durch Zugabe von Serum oder PMA zur Kultur. L-CI.5s-Zellen wurden lentiviral mit dem Promotorkonstrukt transduziert. Die Aktivität des murinen *Mmp-9* Promotors wurde durch Zugabe von 10 % FKS oder 5 µg/ml PMA zum Medium induziert. Für die Darstellung der Promotoraktivitäten wurde nach Isolierung der Gesamt-RNA die Expression von *Luciferase* mRNA und 18S RNA mit TaqMan™ analysiert. Zusätzlich wurde die Expression von *Mmp-9* mRNA bestimmt. **A**, Induktion mit Serum. Mittelwerte mit Standardfehler (ohne Serum/MMP-9 Expression: Kontrolle: 0,22 ± 0,01; Luciferase markierte Zellen: 0,35 ± 0,04; ohne Serum/Luciferase Expression: Kontrolle: 0,00 ± 0,00; Luciferase markierte Zellen: 0,36 ± 0,02; 10% Serum/MMP-9 Expression: Kontrolle: 0,72 ± 0,02; Luciferase markierte Zellen: 0,78 ± 0,04; 10% Serum/Luciferase Expression: Kontrolle: 0,00 ± 0,00; Luciferase markierte Zellen: 0,70 ± 0,03). **B**, Induktion mit PMA. Mittelwerte mit Standardfehler (ohne PMA/MMP-9 Expression: Kontrolle: 0,63 ± 0,14; Luciferase markierte Zellen: 0,52 ± 0,03; ohne PMA/Luciferase Expression: Kontrolle: 0,00 ± 0,00; markierte Zellen: 0,89 ± 0,13; 5µg/ml PMA/MMP-9 Expression: Kontrolle: 1,90 ± 0,20; markierte Zellen: 3,44 ± 0,23; 5µg/ml PMA/Luciferase Expression: Kontrolle: 0,00 ± 0,00; markierte Zellen: 5,35 ± 0,58).

Die Mikroumgebung in der Leber von *Mmp-9*-defizienten Mäuse führte zu einer signifikanten Induktion der *Mmp-9* Promotoraktivität in den Tumorzellen (Abb. 5.15). Die Expression von *Luciferase* in den L-CI.5s-Zellen wurde durch die Mikroumgebung der *Mmp-9-knockout* Mäuse 3-fach verstärkt (Abb. 5.15). Dies deutet darauf hin, dass der *knockout* von *Mmp-9* die Homöostase in der Leber derart verändert hat, dass diese neu geschaffene Umgebung die Expression von *Mmp-9* in den Tumorzellen förderte.

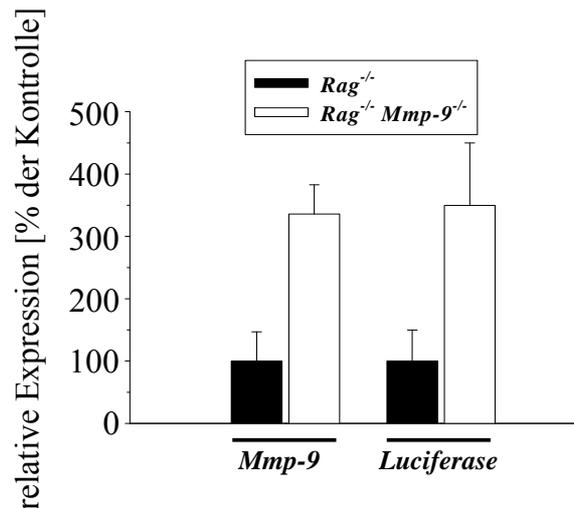


Abbildung 5.15: Induktion der *Mmp-9* mRNA Expression in den Tumorzellen durch die Mikroumgebung der *Mmp-9*-defizienten Mäuse

1×10^5 *Mmp-9*-Promotor/*Luciferase* Konstrukt transduzierte L-CI.5s Zellen wurden in *Mmp-9*^{+/+} und *Mmp-9*^{-/-} Mäuse i.v. inokuliert. Drei Stunden nach Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert, die Lebern entnommen und Gesamt-RNA wurde isoliert. Die Expression von *Mmp-9* mRNA, *Luciferase* mRNA und 18S RNA wurde mit quantitativer RT-PCR ermittelt. Die Mittelwerte mit Standardfehler der *Mmp-9* und *Luciferase* mRNA Expression normalisiert gegen 18S sind dargestellt (*Mmp-9* mRNA: *Mmp-9*^{+/+}: 100,0 ± 46,9% *Mmp-9*^{-/-}: 335,7 ± 47,1%; *Luciferase* mRNA: *Mmp-9*^{+/+}: 100,0 ± 49,6% *Mmp-9*^{-/-}: 349,8 ± 100,0%; $n = 6$; $P = 0,048$).

Diese Ergebnisse implizierten, dass das metastatische Potential der Tumorzellen durch die Expression von *Mmp-9* in den Tumorzellen bestimmt sein könnte. In der Fachliteratur wird hingegen hauptsächlich Wirtszell-MMP-9 für die Förderung der Metastasierung angeführt. Deshalb sollte nachfolgend der Beitrag von Tumorzell-MMP-9 zur Effizienz der Metastasierung untersucht werden.

5.15. Identifikation von shRNA Zielsequenzen im murinen *Mmp-9* Gen und Klonierung der shRNAs in einen retroviralen Vektor

Um die Bedeutung von MMP-9 auf Seiten der Tumorzellen eingehend zu untersuchen, sollte die Expression von MMP-9 in den Tumorzellen, durch das Einbringen einer anti-*Mmp-9* shRNA, spezifisch supprimiert werden. Hierfür mussten zunächst geeignete RNAi-Zielsequenzen in der murinen *Mmp-9* cDNA identifiziert werden.

Die Zielsequenzen wurden so ausgewählt, dass sie gleichmäßig über die cDNA Sequenz verteilt lagen, um einen Sequenzbereich zu identifizieren, der einen effizienten *knockdown* ermöglicht. Durch Bindung regulatorischer Proteine in Bereichen innerhalb einer Gensequenz, sind Sequenzbereiche unterschiedlich leicht für den aktivierten *RISC* zugänglich. Die shRNAs

wurden bereits während der Synthese 5' mit einem *Bam*HI und 3' mit einem *Eco*RI Überhang versehen (Abb. 5.16), um die zusammengesetzten shRNAs nach der Hybridisierung direkt in den retroviralen Vektor pSIREN-RetroQ zu klonieren. Als *Spacer*-Sequenz wurde eine Sequenz ausgewählt, die sich hierfür als geeignet erwiesen hat (Brummelkamp et al., 2002a).

shMmp-9-282

```

BamHI      sense      Spacer      antisense      HindIII
5'-GATCC  AGGCCATTCGAACACCACG TTCAAGAGA CGTGGTGTTCGAATGGCCT TTTTTT GG AAGCTT G-3'
5'-AATTC  AAGCTT CC AAAAAA AGGCCATTCGAACACCACG TCTCTTGAA CGTGGTGTTCGAATGGCCT G-3'
EcoRI      HindIII      antisense      Spacer      sense

```

shMmp-9-494

```

BamHI      sense      Spacer      antisense      HindIII
5'-GATCC  GCGGACATTGTTCATCCAGT TTCAAGAGA ACTGGATGACAATGTCCGC TTTTTT GG AAGCTT G-3'
5'-AATTC  AAGCTT CC AAAAAA GCGGACATTGTTCATCCAGT TCTCTTGAA ACTGGATGACAATGTCCGC G-3'
EcoRI      HindIII      antisense      Spacer      sense

```

shMmp-9-919

```

BamHI      sense      Spacer      antisense      HindIII
5'-GATCC  AGGCCGCTCGGATGGTTAC TTCAAGAGA GTAACCATCCGAGCGGCCT TTTTTT GG AAGCTT G-3'
5'-AATTC  AAGCTT CC AAAAAA AGGCCGCTCGGATGGTTAC TCTCTTGAA GTAACCATCCGAGCGGCCT G-3'
EcoRI      HindIII      antisense      Spacer      sense

```

shMmp-9-1303

```

BamHI      sense      Spacer      antisense      HindIII
5'-GATCC  AGACGACATAGACGGCATC TTCAAGAGA GATGCCGTCTATGTCTGCTCT TTTTTT GG AAGCTT G-3'
5'-AATTC  AAGCTT CC AAAAAA AGACGACATAGACGGCATC TCTCTTGAA GATGCCGTCTATGTCTGCTCT G-3'
EcoRI      HindIII      antisense      Spacer      sense

```

shMmp-9-2038

```

BamHI      sense      Spacer      antisense      HindIII
5'-GATCC  ATTCTTCTGGCGTGTGAGT TTCAAGAGA ACTCACACGCCAGAAGAAT TTTTTT GG AAGCTT G-3'
5'-AATTC  AAGCTT CC AAAAAA ATTCTTCTGGCGTGTGAGT TCTCTTGAA ACTCACACGCCAGAAGAAT G-3'
EcoRI      HindIII      antisense      Spacer      sense

```

shMmp-9-pub

```

BamHI      sense      Spacer      antisense      HindIII
5'-GATCC  G CATCACATACTGGATCCAA TTCAAGAGA TTGGATCCAGTATGTGATG TTTTTT GG AAGCTT G-3'
5'-AATTC  AAGCTT CC AAAAAA CATCACATACTGGATCCAA TCTCTTGAA TTGGATCCAGTATGTGATG C G-3'
EcoRI      HindIII      antisense      Spacer      sense

```

Abbildung 5.16: Design der shRNAs gegen murines *Mmp-9*

Gezeigt sind die Sequenzen der synthetischen Oligonukleotide mit den 5' *Bam*HI und 3' *Eco*RI Überhängen für die direkte Klonierung in den retroviralen Vektor pSIREN-RetroQ. Zudem sind die *sense* und *antisense* Sequenzen der shRNAs und die Spacersequenz, wie die *Hind*III Kontrollschnittstelle markiert. In der shRNA shMmp-9-pub wurde vor der *sense*-Sequenz zusätzlich ein Guaninnukleotid eingefügt, da nur Adenin oder Guanin von der RNA-PolymeraseIII als Transkriptionsstartpunkte erkannt werden. Die Zahlen im Namen der shRNAs bezeichnen die Positionen der Zielsequenzen in der murinen *Mmp-9* cDNA nach dem Start-ATG. Bei der shRNA shMmp-9-pub handelt es sich um eine bereits publizierte, effiziente Zielsequenz in der murinen *Mmp-9* cDNA die als Kontrolle mitgeführt wurde.

Um die *knockdown*-Effizienzen der einzelnen shRNAs zu überprüfen, wurden Retroviren hergestellt und Zielzellen mit diesen Viren transduziert. Für die Überprüfung der shRNAs wurde die murine Fibroblastenzelllinie NIH3T3 ausgewählt, da diese Zellen leicht transduzierbar sind und hohe Mengen an *Mmp-9* mRNA und Protein exprimieren. Die Tumorzelllinie L-CI.5s, die eigentlich transduziert werden sollte, ist für die Bestimmung der Effizienz

weniger geeignet, da sie *in vitro* nur sehr geringe Mengen an *Mmp-9* mRNA exprimierten, die auf Proteinebene nicht nachweisbar waren.

Die Expression von *Mmp-9* mRNA wurde durch quantitative RT-PCR (Abb. 5.17, A) und die Expression von *Mmp-9* Protein zymographisch (Abb. 5.17, B) bestimmt. Die effizienteste Suppression von *Mmp-9* wurde mit der shRNA erreicht, deren Zielsequenz 2038bp 5' des Start-ATGs lag. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde diese shRNA ausgewählt und in allen weiteren Versuchen verwendet.

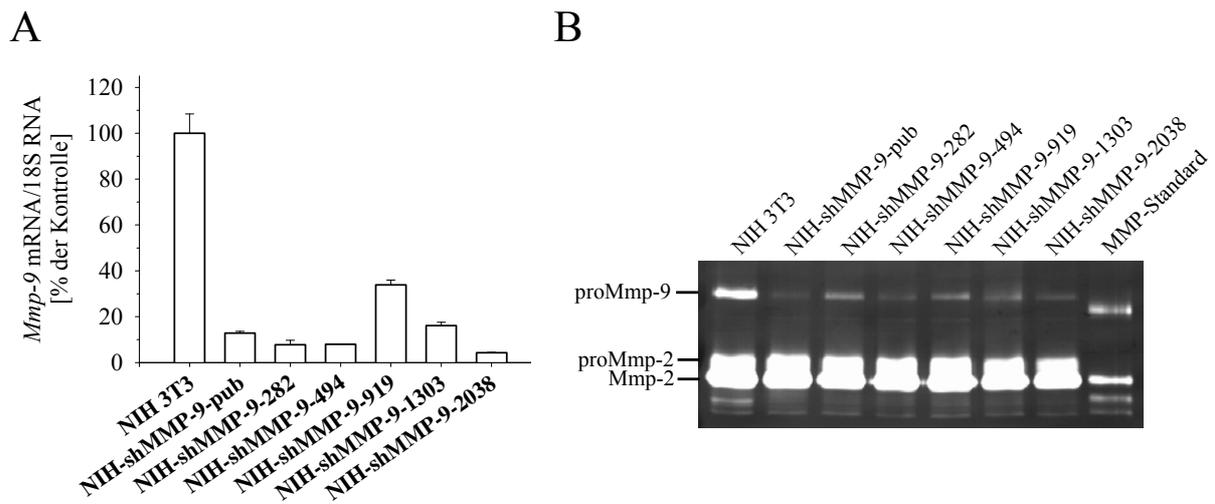


Abbildung 5.17: Nachweis der *knockdown* Effizienzen der shRNA kodierenden retroviralen Vektoren in murinen Fibroblasten

A, murine Fibroblasten (NIH 3T3) wurden retroviral mit shRNAs gegen murines *Mmp-9* transduziert. Die shRNAs sind gegen unterschiedliche Zielsequenzen gerichtet. Aus den transduzierten NIH 3T3-Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert und revers transkribiert. Die Expression der *Mmp-9* mRNA und der 18S RNA wurden mit der TaqMan™-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der *Mmp-9* mRNA Mengen normalisiert gegen 18S RNA (NIH 3T3: 100,0 ± 8,4 %; shMMP-9-pub: 12,8 ± 0,8 %; shMMP-9-282: 7,8 ± 2,0 %; shMMP-9-494: 8,0 ± 0,2 %; shMMP-9-919: 33,8 ± 2,1 %; shMMP-9-1303: 16,1 ± 1,5 %; shMMP-9-2038: 4,3 ± 0,2 %). **B**, Reduktion der *Mmp-9* Protein Expression. Zellkulturüberstände der shRNA-MMP-9 transduzierten NIH 3T3-Zellen wurden zymographisch hinsichtlich der *Mmp-9* Proteinexpression untersucht. Von jeder Probe wurden 10 µl unverdünnter Zellkulturüberstand auf das Zymogramm aufgetragen. Als Kontrolle wurde der Zellkulturüberstand von nicht-transduzierten NIH 3T3 Zellen aufgetragen.

5.16. Knockdown von *Mmp-9* in L-CI.5s T-Zell Lymphom Zellen

Für die Untersuchung der Rolle von MMP-9 auf Tumorzellseite sollte die Expression dieser Protease in L-CI.5s T-Zell Lymphom Zellen supprimiert werden. Für die Suppression der *Mmp-9* mRNA wurde die shRNA ausgewählt, die sich im Vorversuch als besonders effizient erwiesen hatte.

L-CI.5s Zellen wurden retroviral mit der anti-Mmp-9 shRNA transduziert. Der *knockdown* von Mmp-9 wurde auf Ebene der mRNA mit quantitativer RT-PCR überprüft. Als Kontrolle wurde eine *scrambled*-Variante der anti-Mmp-9-shRNA-2038 hergestellt und ebenfalls in den retroviralen Vektor pSIREN-RetroQ eingefügt. Durch Transduktion von L-CI.5s Zellen mit einer anti-Mmp-9 shRNA wurde die mRNA Expression von Mmp-9 *in vitro* (Abb. 5.17, A), im Vergleich zur *scrambled*-Kontrolle, um 90 % reduziert.

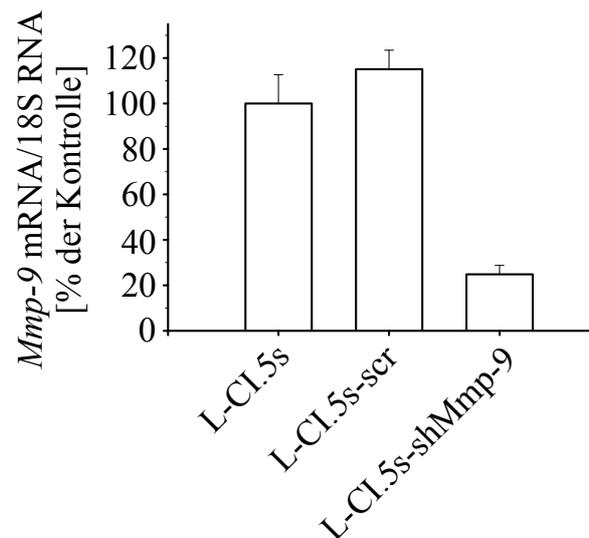


Abbildung 5.18: Knockdown von *Mmp-9* mRNA in L-CI.5s T-Zell Lymphom Zellen

L-CI.5s-Zellen wurden mit einem anti-Mmp-9 shRNA kodierenden retroviralen Vektor transduziert. Als Kontrolle wurden L-CI.5s-Zellen mit einer *scrambled* Variante der anti-Mmp-9 shRNA transduziert. Nach Selektion wurde Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und revers transkribiert. Die Expression von *Mmp-9* mRNA und 18S RNA wurde mit quantitativer RT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der *Mmp-9* mRNA Expression normalisiert gegen 18S RNA (L-CI.5s: 100,0 ± 12,7 %; L-CI.5s-scr: 115,1 ± 8,4 %; L-CI.5s-shMmp-9: 24,9 ± 3,9).

5.17. Unterdrückung des Metastasierungsfördernden Effekts der *Mmp-9*-defizienten Mikroumgebung durch den *knockdown* von *Mmp-9* in den Tumorzellen

Für die Überprüfung der zuvor aufgestellten Hypothese, dass der Auslöser der verstärkten Lebermetastasierung in *Mmp-9-knockout* Mäusen die Induktion von *Mmp-9* in den Tumorzellen war, wurde die *Mmp-9* Expression in den Tumorzellen mit der siRNA-Technologie unterdrückt. Um die Auswirkung dieser Hemmung auf die Metastasierung in der *Mmp-9*-defizienten Wirtsumgebung zu untersuchen wurden 5×10^3 L-CI.5s-sh*Mmp-9*-Zellen und L-CI.5s-scrambled-shRNA Kontrollzellen in *Mmp-9-knockout* Mäuse inokuliert.

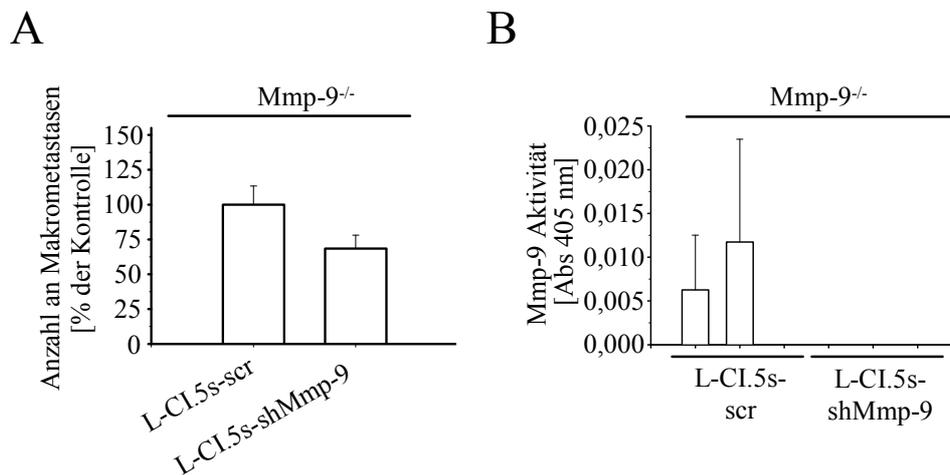


Abbildung 5.19: Suppression des Metastasierungsfördernden Effekts der *Mmp-9*-defizienten Mikroumgebung durch den *knockdown* von *Mmp-9* in den Tumorzellen

A – B, L-CI.5s-sh*Mmp-9* oder L-CI.5s-scr wurden intravenös in *Mmp-9*^{-/-} Mäuse inokuliert. Sieben Tage nach Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert, die Lebern entnommen und X-Gal gefärbt. **A**, Anzahl der Makrometastasen (Metastasen > 0,2 mm). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (L-CI.5s-scr: $100,0 \pm 13,3$ %, L-CI.5s-shMMP-9: $68,4 \pm 9,7$ %; $n = 6$). **B**, *Mmp-9* Protein Expression in L-CI.5s-sh*Mmp-9* und L-CI.5s-scr infiltrierten Lebern. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (L-CI.5s-scr: $6,0 \times 10^{-3} \pm 4,1 \times 10^{-3}$; L-CI.5s-sh*Mmp-9*: nicht detektiert).

Sieben Tage nach Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert und die Auswirkung der spezifischen Suppression auf das metastatische Potential der Tumorzellen, wurde durch Auszählen der blau gefärbten Makrometastasen (Metastasen > 0,2 mm) ermittelt. Durch den *knockdown* von *Mmp-9* in den Tumorzellen wurde die Induktion der Lebermetastasierung in den *Mmp-9-knockout* Mäusen unterdrückt. Das metastatische Potential der *knockdown* Tumorzellen war um 32 %, im Vergleich zur Kontrolle, vermindert (Abb. 5.18, A). Durch den

knockdown von Mmp-9 in den Tumorzellen wurde zudem die Expression von Mmp-9 Protein vollständig unterdrückt (Abb. 5.18, B).

Dieses Ergebnis spricht dafür, dass Mmp-9 exprimiert von den Tumorzellen ein wichtiger Faktor sein könnte, der das metastatische Potential der Tumorzellen bei der Metastasierung der Leber bestimmt. Es ist bereits bekannt, dass erhöhte Werte von MMP-9 im Plasma oder im Tumorgewebe von Kolorektalkarzinompatienten mit einer schlechten Prognose korreliert sind (Mook et al., 2004). Bislang wurde jedoch davon ausgegangen, dass dieses MMP-9 hauptsächlich von Wirtszellen exprimiert wird (Zeng und Guillem, 1996; Illemann et al., 2006). Die hier erhaltenen Ergebnisse werfen jedoch ein neues Licht auf die Rolle von Tumorzell-MMP-9 bei der Metastasierung der Leber. Aus diesem Grund sollte die Rolle von MMP-9 auf Seiten der Tumorzellen untersucht werden.

5.18. Lokalisation von *MMP-9 mRNA* in den Tumorzellen von Lebermetastasen von Kolorektalkarzinompatienten

In der Fachliteratur ist bislang ausschließlich beschrieben, dass MMP-9 bei der Metastasierung der Leber von tumorinfiltrierenden Immunzellen (z.B. Makrophagen) exprimiert wird (Zeng und Guillem, 1996; Illemann et al., 2006;). Obwohl bekannt ist, dass eine Vielzahl von Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs *in vitro* MMP-9 exprimieren können, wurde der Beitrag von Tumorzell-MMP-9 zur Lebermetastasierung *in vivo* bislang nicht eingehend untersucht. Bevor der Beitrag von Tumorzell-MMP-9 zur Metastasierung der Leber untersucht wurde, sollte zunächst bestimmt werden, ob *MMP-9 mRNA* in den Tumorzellen von klinischen Proben von Lebermetastasen des Kolorektalkarzinoms detektiert werden kann. Die Expression von *MMP-9 mRNA* wurde mittels *in situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitten detektiert und lokalisiert.

Es wurde festgestellt, dass nahezu alle Zellen in den metachronen Lebermetastasen kolorektalen Ursprungs *MMP-9* exprimierten. Unter diesen Zellen waren Stroma-, Immun- aber auch Tumorzellen (Abb. 5.20, A). Die Tumorzellen wiesen sogar die stärksten Signale für *MMP-9 mRNA* auf (Abb. 5.20, A). Die Expression von Mmp-9 war im Tumorgewebe, im Vergleich zum umliegenden Leberparenchym, stark induziert (Abb. 5.20, A rechts).

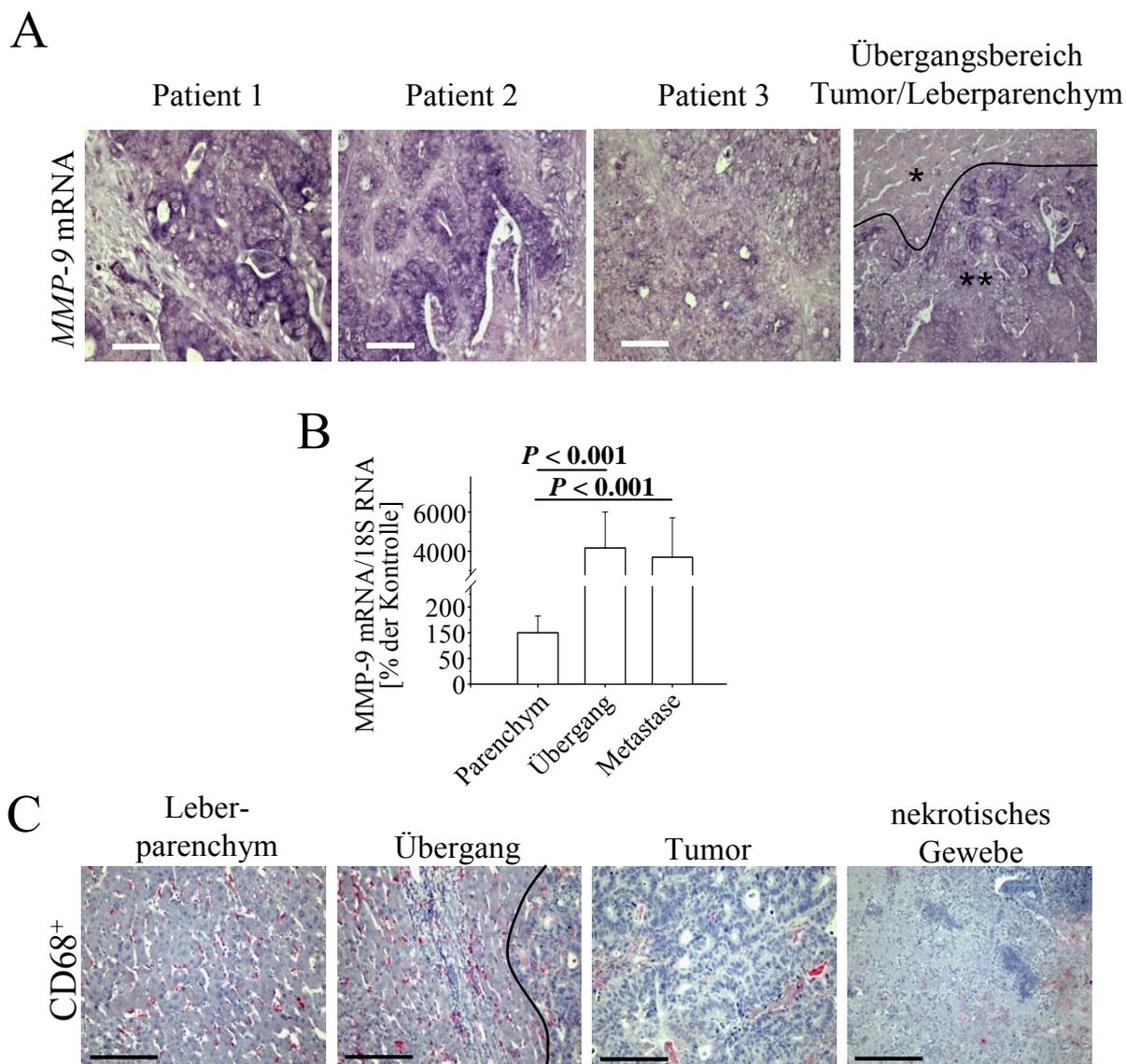


Abbildung 5.20: Lokalisation von *MMP-9* mRNA Expression in den Tumorzellen von Lebermetastasen von Kolorektalkarzinompatienten

A, *MMP-9* mRNA wurde mit *in situ* Hybridisierung auf Schnitten von Paraffin eingebetteten Lebermetastasen von Kolorektalkarzinompatienten lokalisiert (Balken = 50 μ m). Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus dem Inneren von Metastasen (Patient 1, 2 und 3). Für Patient 3 ist zusätzlich der Übergangsbereich zwischen Leberparenchym (*) und Tumor (**) gezeigt (rechts). Die schwarze Linie markiert den Übergang zwischen den beiden Bereichen. **B**, Analyse des *MMP-9* Expressionsmusters mit quantitativer RT-PCR. Gesamt-RNA aus Lebermetastasen von Kolorektalkarzinompatienten aus dem Inneren der Metastase, dem Übergangsbereich zwischen Tumor und Leberparenchym und von Lebergewebe (ca. 5 cm räumliche Distanz zur Metastase) wurde isoliert. *MMP-9* mRNA wurde detektiert und gegen 18S RNA abgeglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (Leberparenchym: 100,0 \pm 32,6 %; Übergang: 4168,4 \pm 1836,0 %; Metastase: 3697,0 \pm 2004,0 %; $n = 13$). **C**, Akkumulation von tumorinfiltrierenden Makrophagen am Rand der Metastase. Die Lokalisation der Makrophagen erfolgte durch immunhistochemischen Nachweis des Makrophagen-Markerproteins CD68. Die schwarze Linie markiert den Übergang zwischen den beiden Bereichen.

Da die *in situ* Hybridisierung eine qualitative, jedoch keine gute quantitative Analyse ist, wurde die Expression von *MMP-9* mRNA zusätzlich mit quantitativer RT-PCR analysiert. Hierfür wurden Proben aus dem Inneren der Lebermetastasen, dem Übergangsbereich zwischen Tumor und Leberparenchym und aus dem Leberparenchym ohne offensichtliche Tumorzellinfiltration entnommen (ca. 5 cm räumliche Distanz zur Metastase). Diese Analyse ergab eine drastische, 8000-fache ($n = 13$; $P < 0,001$) oder 11000-fache ($n = 13$; $P < 0,001$), Induktion der *MMP-9* mRNA Expression im Übergangsbereich oder im Inneren der Metastasen, im Vergleich zum Leberparenchym (Abb. 5.20, B). Das hier ermittelte Expressionsmuster stimmt mit dem Ergebnis der *in situ* Hybridisierung überein und verdeutlicht, dass die Tumorzellen von Lebermetastasen *MMP-9* exprimieren können.

Da beschrieben ist, dass *MMP-9* in Lebermetastasen vor allem von tumorinfiltrierenden Makrophagen exprimiert wird, wurde die Verteilung dieser Zellen in den klinischen Proben nachgewiesen und diese Verteilung mit dem *MMP-9* Expressionsmuster abgeglichen. Tumorinfiltrierende Makrophagen wurden immunhistochemisch, durch den Nachweis des Makrophagenmarkers CD68 auf Paraffinschnitten, lokalisiert. Eine Akkumulation von CD68⁺ Zellen wurde im Übergangsbereich zwischen Tumor und Leberparenchym festgestellt (Abb. 5.20, C Übergang). Die Verteilung der Makrophagen in den Lebermetastasen zeigte keine Übereinstimmungen mit der Verteilung der *MMP-9* Expression. Im Inneren der Metastase, einer Region in der mit der *in situ* Hybridisierung viele *MMP-9* positive Zellen gefunden wurden, konnten nur wenige, vereinzelte Makrophagen nachgewiesen werden (Abb. 5.20, C Tumor).

5.19. Korrelation der *Mmp-9* Expression mit den invasiven Phasen der Lebermetastasierung in einem T-Zell Lymphommodell

Nachdem mit der *in situ* Hybridisierung *MMP-9* mRNA in Tumorzellen von klinischen Proben von Lebermetastasen kolorektalen Ursprungs lokalisiert worden war, sollte als nächstes der Beitrag von Tumorzell-*MMP-9* zur Invasivität der Tumorzellen bei der Lebermetastasierung untersucht werden. Der Beitrag von Tumorzell-*MMP-9* zur Lebermetastasierung kann nicht anhand klinischer Proben analysiert werden, da hierbei nur Endpunkte betrachtet werden. Die Metastasierung der Leber ist aber ein dynamischer Prozess mit mehreren Schritten, und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass *Mmp-9* im Verlauf dieses Prozesses zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich stark exprimiert wird. Für die Bestimmung der Rolle von Tumorzell-*MMP-9* während der Lebermetastasierung wurde das

L-CI.5s-Leberinvasionsmodell ausgewählt. L-CI.5s-Zellen kolonisieren nach intravenöser Inokulation effizient die Leber und ahmen die aggressive Metastasierung der Leber, wie sie in der Klinik oft gefunden wird, nach. Zudem ermöglicht die murine L-CI.5s-Zelllinie die Verwendung von syngenem, immunkompetenten DBA/2 Mäusen wodurch auch der Beitrag von Immunzellen zur Metastasierung berücksichtigt wird.

Es wurden 5×10^3 *lacZ*-markierte L-CI.5s T-Zell Lymphomzellen in die Schwanzvenen von syngenem DBA/2 Mäuse inokuliert. Die ersten Mäuse wurden 3 Stunden nach Tumorzellinokulation geopfert. Im weiteren Verlauf, wurden Mäuse 24 Stunden nach der Inokulation und an jedem folgenden Tag bis Tag 9 geopfert, um die Beiträge von MMP-9 während dem gesamten Verlauf der Metastasierung zu erfassen. Anhand der optischen Betrachtung der X-Gal gefärbten Lebern wurde die Lebermetastasierung in drei unterschiedliche Phasen untergliedert: Extravasation, Auswachsen der Metastasen und sekundäre Invasion einzelner Tumorzellen in das Leberparenchym. Bereits 3 Stunden nach Tumorzellinokulation konnten die ersten Tumorzellen auf den Oberflächen der Lebern nachgewiesen werden (Abb. 5.21, A und B). Im Zeitraum von Tag 3 bis Tag 5 konnte nur eine Zunahme der Metastasengröße festgestellt werden (Abb. 5.21, A und B). Ab Tag 7 konnte hingegen erneut ein invasives Verhalten der Tumorzellen, die Streuung einzelner Tumorzellen in das Leberparenchym, dokumentiert werden (Abb. 5.21, A und B). Diese Phase wird als sekundäre Invasion bezeichnet.

Um den Beitrag von MMP-9 zu den einzelnen Phasen zu ermitteln, wurde die Expression von *Mmp-9* auf mRNA- (Abb. 5.21, C), Gesamtprotein- (Abb. 5.21, E) und Aktivitätsebene (Abb. 5.21, D und E) bestimmt. Diese Analysen zeigten eine verstärkte Expression und Aktivität von *Mmp-9* zu den beiden invasiven Phasen der Lebermetastasierung. Während der Extravasation (3 Stunden nach Tumorzellinokulation) wurde eine leichte und während der sekundären Invasion (Tag 6 nach Tumorzellinokulation) eine drastische Induktion der Expression von *Mmp-9* detektiert. Da an Tag 6 noch keine einzelnen Tumorzellen im Leberparenchym nachgewiesen wurden, die Expression von *Mmp-9* mRNA jedoch zu diesem Zeitpunkt bereits deutlich angestiegen war, wurde dieser Tag als Übergang von der Proliferationsphase zur Phase der sekundären Invasion definiert, jedoch keiner der Phasen zugeordnet.

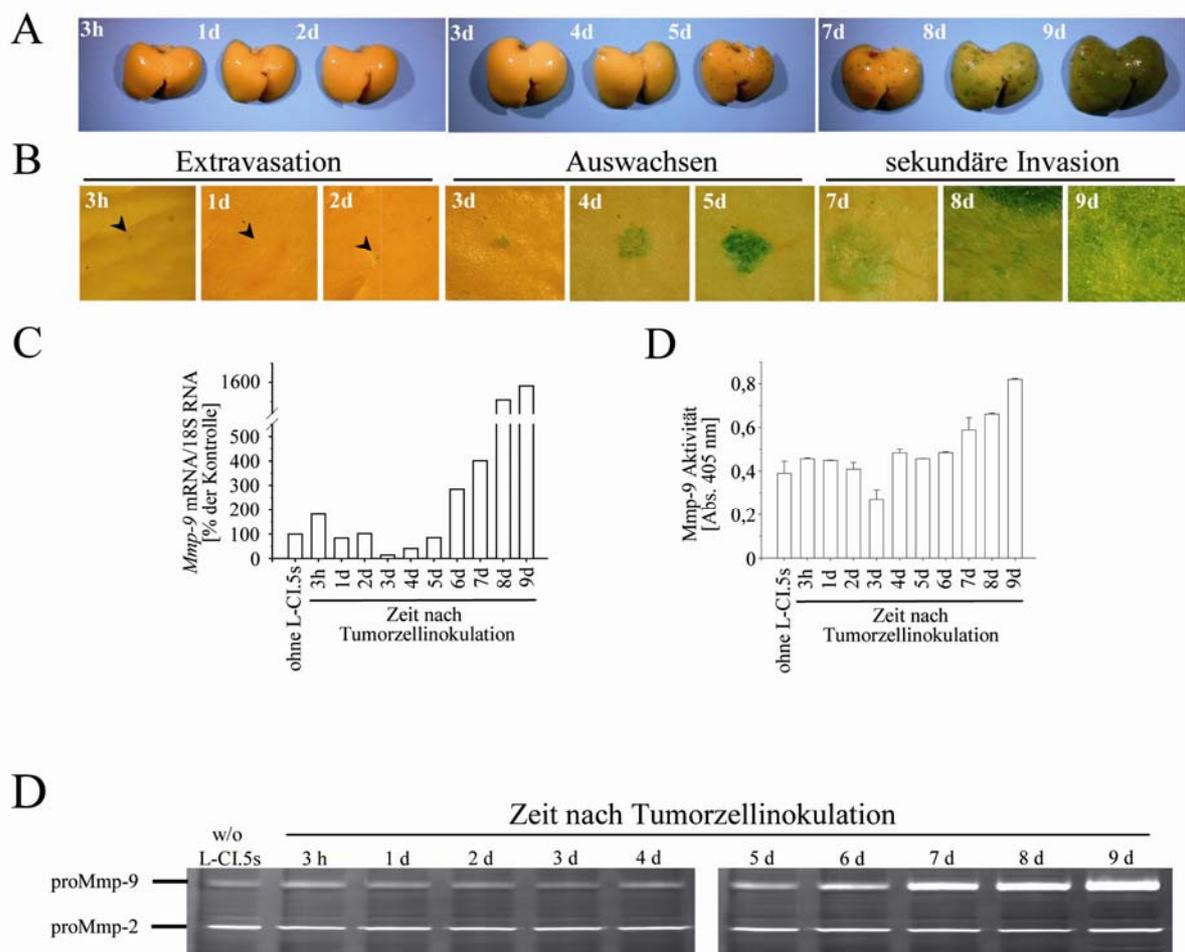


Abbildung 5.21: Korrelation der Mmp-9 Expression mit den invasiven Phasen eines T-Zell Lymphom *in vivo* Invasions-Modells

A – E, 5×10^3 L-Cl.5s-Zellen wurden i.v. in DBA/2 Mäuse inokuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 5 Tiere geopfert und die Lebern wurden entnommen. Für den Nachweis der Tumorzellen wurden der *lobus sinister* und der *lobus dexter medialis hepatis* X-Gal gefärbt. Zusätzlich wurde Gesamt-Protein und RNA aus dem Lebergewebe isoliert. **A**, repräsentative Übersichtsaufnahmen von gesamten Lebern. **B**, Nahaufnahmen der Oberflächen von repräsentativen Lebern zu den angegebenen Zeitpunkten. Gezeigt ist die Einteilung der späten metastatischen Kaskade in die 3 angegebenen unterschiedlichen Phasen. Die Einteilung wurde anhand der zeitlichen Entstehung von Makro- und Mikro-metastasen vorgenommen. **C**, Expression der *Mmp-9* mRNA im zeitlichen Verlauf der experimentellen Metastasierung von L-Cl.5s-Zellen. Die relative Expression von *Mmp-9* mRNA und 18S RNA wurde mit quantitativer RT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 5 Tieren normalisiert gegen 18S RNA (ohne L-Cl.5s: 100.0 %; 3 h: 181.9 %; 1 d: 83.5 %; 2 d: 101.8 %; 3 d: 13.9 %; 4 d: 40.7 %; 5 d: 84.7 %; 6 d: 284.9 %; 7 d: 400.9 %; 8 d: 1509.8 %; 9 d: 1582.0 %). **D**, Gesamt-Aktivität von Mmp-9 im zeitlichen Verlauf der Lebermetastasierung. Die Aktivität von Mmp-9 wurde mit einem Aktivitätsassay gemessen. Mittelwerte von 5 Tieren/Zeitpunkt sind gezeigt (ohne L-Cl.5s: 0,39; 3 h: 0,46; 1 d: 0,45; 2 d: 0,41; 3 d: 0,27; 4 d: 0,48; 5 d: 0,46; 6 d: 0,49; 7 d: 0,59; 8 d: 0,66; 9 d: 0,82). **E**, Zymographie Detektion von pro- und aktiver Form von Mmp-9. In jeder Spur wurden 35 μ g Gesamt-Protein (7 μ g/Tier; n = 5) geladen. Als Standard wurden Zellkulturüberstände einer murinen Fibroblastenzelllinie (NIH 3T3) aufgetragen.

Dieses Experiment zeigte eine eindeutige Korrelation der Gesamtmenge von Mmp-9 mit den invasiven Phasen der Lebermetastasierung. Zudem zeigte dieses Experiment, dass das verwendete T-Zell Lymphom-Lebermetastasierungsmodell geeignet war, um die Rolle von Mmp-9 bei der Lebermetastasierung zu untersuchen, da der Verlauf der Metastasierung mit der Expression von MMP-9 korrelierte. Es musste jedoch noch sichergestellt werden, dass das Mmp-9 Expressionsmuster in den Lebermetastasen und die Infiltration von Makrophagen mit den Mustern der Lebermetastasen von Patienten vergleichbar war.

5.20. Lokalisation von *Mmp-9* mRNA in Tumorzellen des T-Zell Lymphom *in vivo* Invasions-Assays

Ziel dieses Experiments war es zu bestimmen, ob Mmp-9 im Verlauf der Lebermetastasierung des L-CI.5s-Modells von den Wirts- oder von den Tumorzellen exprimiert wurde, und ob das Expressionsmuster mit dem der Patientenproben vergleichbar war. Für die Lokalisation von *Mmp-9* mRNA wurden Proben Metastasen tragender Lebern, von jedem Zeitpunkt nach Inokulation der L-CI.5s T-Zell Lymphomzellen, mit *in situ* Hybridisierung analysiert.

An allen untersuchten Zeitpunkten wurde eine schwache Expression von *Mmp-9* mRNA in den Zellen des Leberparenchyms detektiert. Die ersten deutlich *Mmp-9* positiven Zellen konnten bereits 3 Stunden nach Tumorzellinokulation nachgewiesen werden (Abb. 5.22, A links), während im Kontrollgewebe ohne Tumorzellen keine lokalisierten *Mmp-9* Signale detektiert wurden (Abb. 5.22, A). Eine verstärkte Expression von *Mmp-9* mRNA wurde ab Tag 6 nach Inokulation der Tumorzellen, in allen Zellen innerhalb der Lebermetastasen nachgewiesen (Abb. 5.22, A). An Tag 7 konnte die Expression von *Mmp-9* mRNA zusätzlich zu den Zellen innerhalb der Metastasen, in einzelnen Zellen im Leberparenchym gemessen werden. An Tag 8 nahm die Zahl *Mmp-9* positiver Zellen nochmals deutlich zu.

Das *Mmp-9* Expressionsmuster dieses experimentellen Lebermetastasierungsmodells gleicht somit dem der metachronen Lebermetastasen von Kolorektalkarzinompatienten (Abb. 5.20). In den klinischen Proben wurde festgestellt, dass die Metastasen von vielen Makrophagen infiltriert werden, und dass diese Zellen besonders im Übergangsbereich zwischen dem Tumorgewebe und den Leberparenchym akkumulierten (Abb. 5.20, C). Es sollte jetzt untersucht werden, ob auch im L-CI.5s-Modell die Lebermetastasen von Makrophagen infiltriert werden, und somit das Modell auch in diesem Punkt, mit der klinischen Situation vergleichbar war. Die infiltrierten Makrophagen wurden durch einen immunhistochemischen Nachweis des Makrophagenmarkers F4/80 auf Paraffinschnitten detektiert. Die Lokalisation der Makropha-

gen zeigte, dass ab Tag 6 die L-CI.5s-Lebermetastasen zunehmend von Makrophagen infiltriert wurden. Wie zuvor auch bei den Patientenproben, konnte auch in diesem Modell eine Akkumulation von Makrophagen im Übergangsbereich festgestellt werden (Abb. 5.22, B).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das L-CI.5s-Modell einer natürlichen Wirtsumgebung Rechnung trägt, und dass das *Mmp-9* Expressionsmuster dieses experimentellen Modells mit dem der klinischen Proben von metachronen Lebermetastasen vergleichbar ist. Dieses Modell war somit geeignet, durch spezifischen *knockdown* von *Mmp-9* in L-CI.5s Zellen, die Bedeutung von *Mmp-9* auf Seiten der Tumorzellen bei der Lebermetastasierung zu untersuchen.

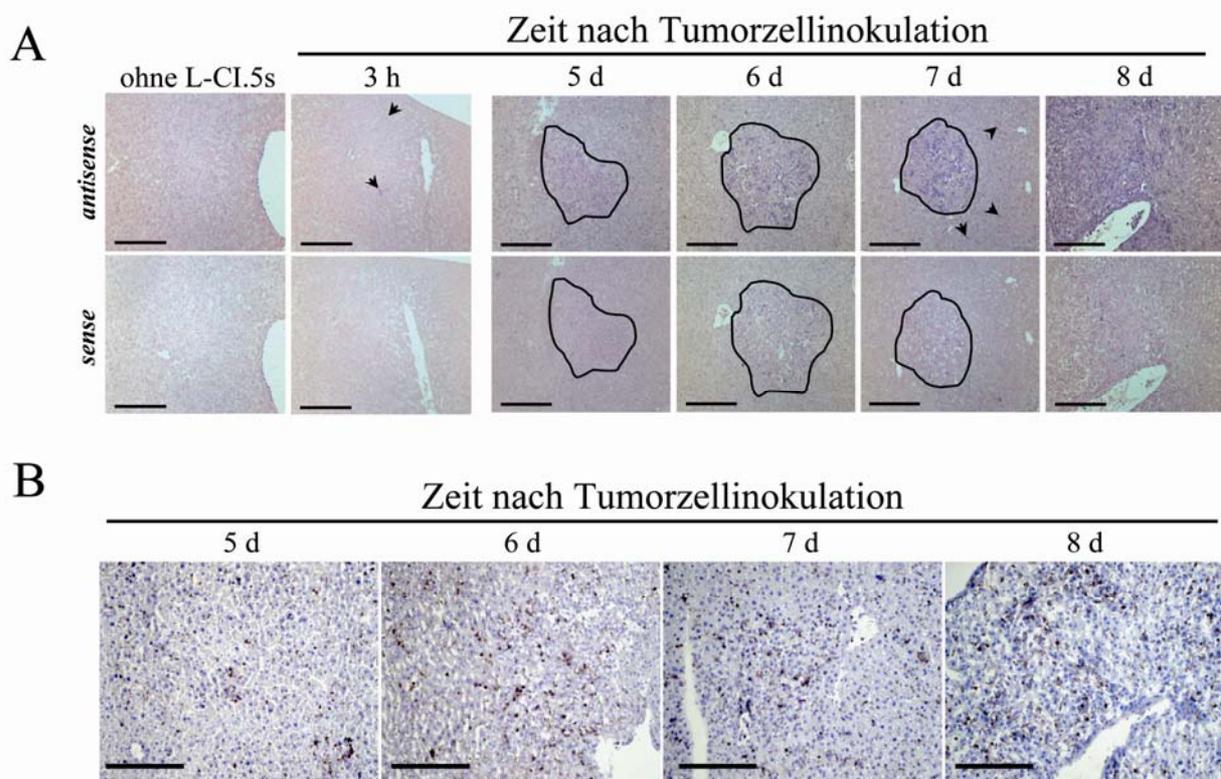


Abbildung 5.22: Lokalisation von *Mmp-9* in L-CI.5s T-Zell Lymphomzellen *in vivo*

A – B, 5×10^3 L-CI.5s Zellen wurden i.v. in syngene DBA/2 Mäuse inokuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 5 Tiere geopfert und die Lebern wurden entnommen. **A**, Lokalisation von *Mmp-9* mRNA in L-CI.5s infiltrierten Lebern. *Mmp-9* mRNA wurde durch *in situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitten nachgewiesen. Gezeigt sind repräsentative Photographien zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Pfeile markieren einzelne *Mmp-9* positive Zellen im Leberparenchym. Die schwarzen Linien in den Schnitten von Tag 5 bis Tag 7 markieren die Ränder von Makrometastasen. **B**, Immunhistochemische Lokalisation von Tumor infiltrierenden Makrophagen. Die Gewebeprobe wurden umgehend nach Entnahme in OCT eingebettet und Schock gefroren. Die Lokalisation der Makrophagen im zeitlichen Verlauf der Metastasierung erfolgte durch immunhistochemischen Nachweis des Makrophagen-Markerproteins F4/80 auf Kryoschnitten.

5.21. Förderung der Metastasierung der Leber durch Tumorzell-Mmp-9

Um die Hypothese zu überprüfen, dass Tumorzell-Mmp-9 die Lebermetastasierung fördert, wurden die zuvor generierten L-CI.5s-shMmp-9-Zellen in syngene, immunkompetente DBA/2 Mäuse inokuliert. In diesen Zellen wurde durch das Einbringen einer anti-Mmp-9-shRNA die Expression von Mmp-9 spezifisch unterdrückt. Hierdurch können die Auswirkungen des Fehlens von Mmp-9 auf Seiten der Tumorzellen auf die Lebermetastasierung untersucht werden.

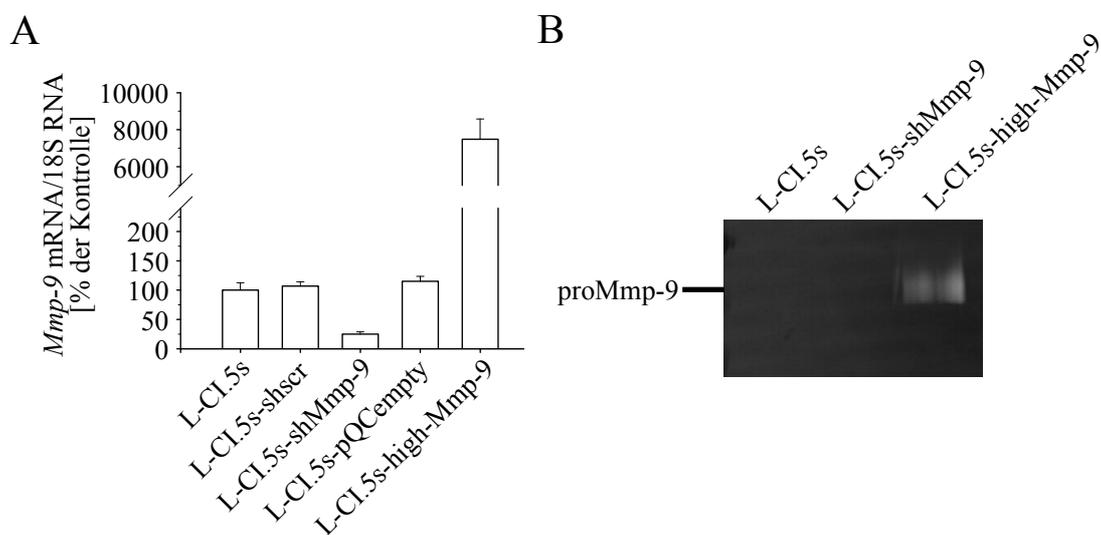


Abbildung 5.23: Nachweis von Mmp-9 knockdown und Überexpression in L-CI.5s-Zellen *in vitro*
A, LCI.5s-Zellen wurden mit einer anti-Mmp-9-shRNA und muriner Mmp-9 cDNA retroviral transduziert. Als Kontrolle für die Überexpression wurden die L-CI.5s-Zellen zusätzlich mit einem Leervektor (pQCXIIH-empty) transduziert. Nach Selektion wurde Gesamt-RNA aus den Zelllinien isoliert und revers transkribiert. Die Expression der Mmp-9 mRNA und der 18S RNA wurden mit quantitativer RT-PCR bestimmt und die Mmp-9 mRNA Menge gegen 18S RNA abgeglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (L-CI.5s: 100,0 ± 12,7 %; L-CI.5s-shscr: 106,9 ± 7,4; L-CI.5s-shMmp-9: 24,8 ± 3,9 %; L-CI.5s-pQCempty: 115,1 ± 8,4 %; L-CI.5s-high-Mmp-9: 7488,8 ± 1092,8 %). **B**, Zymographischer Nachweis der Mmp-9 Expression. Von jeder Zelllinie wurden 10 µl Zellkulturüberstände auf ein Gelatinzymogramm aufgetragen.

Als Kontrolle wurde L-CI.5s-Zellen mitgeführt die zuvor mit einer scrambled shRNA transduziert worden waren. Als zusätzliche Kontrolle wurden noch L-CI.5s-Zellen generiert die Mmp-9 überexprimierten, um das gegenteilige Extrem des *knockdown* zu erzeugen. Hierfür wurden Retroviren hergestellt die für murine-Mmp-9 cDNA kodierten, und mit diesen Retroviren wurden L-CI.5s-Zellen transduziert. Diese Zellen wurden als L-CI.5s-high-Mmp-9 bezeichnet. Als Kontrolle der Überexpressionszelllinie wurden L-CI.5s-Zellen mit dem Leervektor transduziert. Diese Zellen wurden als L-CI.5s-pQCempty bezeichnet. Mit quantitativer RT-PCR wurde gezeigt, dass die Expression von Mmp-9 in L-CI.5s-Mmp-9-

Zellen um mehr als 8000 % im Vergleich zur Kontrollzelllinie L-CI.5s-shscr verstärkt war (Abb. 5.23, A). Die Induktion der Mmp-9 Expression konnte auch zymographisch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 5.23, B).

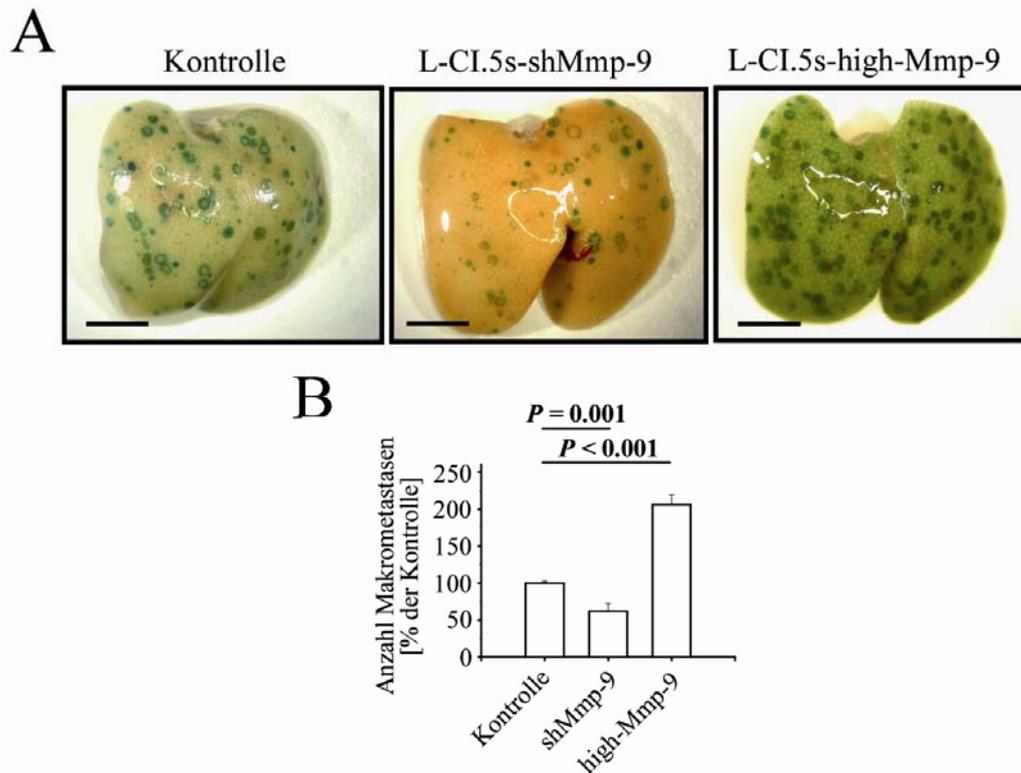


Abbildung 5.24: Förderung der Metastasierung der Leber durch Tumorzell-Mmp-9

A – B, 5×10^3 L-CI.5s-shMMP-9 oder L-CI.5s-high-MMP-9 wurden in DBA/2 Mäuse i.v. inokuliert. Als Kontrollzelllinien wurden L-CI.5s-shscr-Zellen und L-CI.5s-pQCempty mitgeführt. Die beiden Kontrollzelllinien wurden für die Auswertung zusammengefasst. Sieben Tage nach Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert, die Lebern entnommen und der *lobus sinister* und *lobus dexter medialis hepatis* wurden X-Gal gefärbt. Die Anzahl der Makrometastasen (Metastasen $\geq 0,2$ mm) wurde ermittelt. A. Übersichtsaufnahmen von Lebern repräsentativer Tiere jeder Gruppe. B. Anzahl der Metastasen auf den Leberoberflächen. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (Kontrolle $100,00 \pm 7,86\%$; L-CI.5s-shMmp-9 $73,47 \pm 6,62\%$; L-CI.5s-high-Mmp-9 $140,10 \pm 4,33\%$; Kontrolle $n = 10$, L-CI.5s-shMmp-9 und L-CI.5s-high-Mmp-9 $n = 5$).

Um die Effekte der Hemmung von Tumorzell-Mmp-9 zu untersuchen wurden 5×10^3 L-CI.5s-shMmp-9, L-CI.5s-shscr, LCI.5s-pQCempty und L-CI.5s-high-Mmp-9 intravenös in immunkompetente DBA/2 Mäuse inokuliert. Sieben Tage nach Inokulation der Tumorzellen wurden die Mäuse geopfert, um die Auswirkungen der Modulation auf die Extravasation und die sekundäre Invasion zu bestimmen. Der Einfluss von Tumorzell-Mmp-9 auf das metastatische Potential der Tumorzellen kann durch Bestimmung der Anzahl an Makrometastasen (Metastasen $> 0,2$ mm) quantifiziert werden. Die Metastasen benötigen mehrere Tage um einen Durchmesser größer 0,2 mm zu erreichen. Aus diesem Grund, reprä-

sentiert die Anzahl an Makrometastasen (Metastasen > 0,2 mm) die Anzahl an primären Extravasationsereignissen innerhalb der ersten Stunden oder Tage.

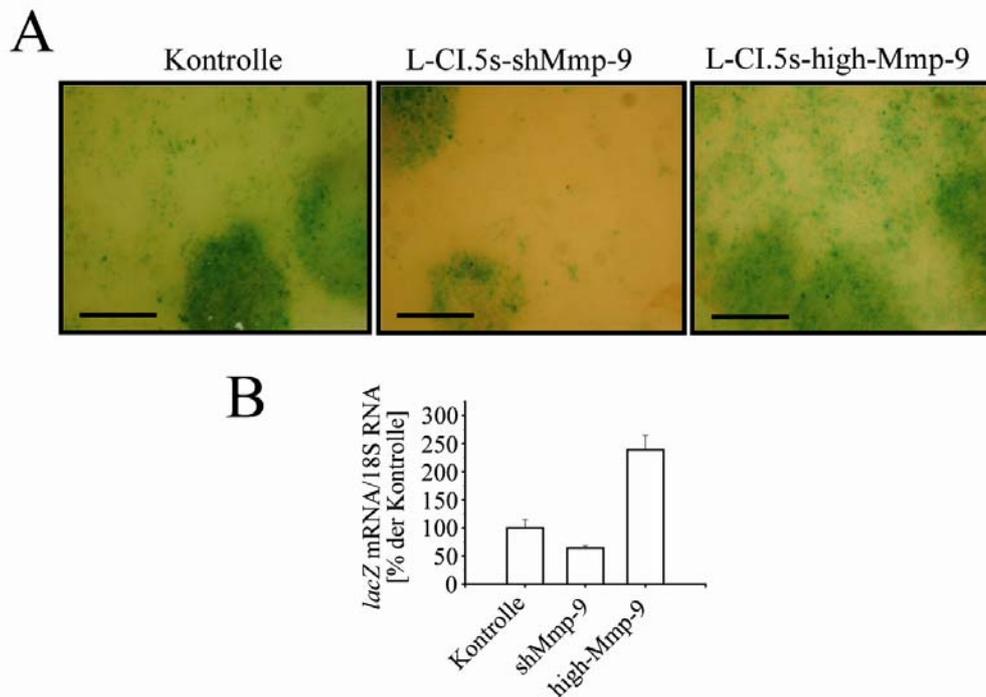


Abbildung 5.25: Förderung der Mikrometastasierung der Leber durch Tumorzell-Mmp-9

A – B, 5×10^3 L-CI.5s-shscr, L-CI.5s-pQCempty, L-CI.5s-shMMP-9 oder L-CI.5s-high-MMP-9 wurden in DBA/2 Mäuse i.v. inokuliert. Sieben Tage nach Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert, die Lebern entnommen und der *lobus sinister* und *lobus dexter medialis hepatis* wurden X-Gal gefärbt. Die beiden Kontrollzelllinien L-CI.5s-shscr und L-CI.5s-pQCempty wurden als Kontrolle zusammengefasst. **A**, Nahaufnahmen der Leberoberflächen zur Darstellung der Streuung einzelner Tumorzellen. **B**, Reduktion der Gesamttumorlast durch den *knockdown* von *Mmp-9* in den Tumorzellen. mRNA aus den Lebern wurde isoliert, revers transkribiert und *lacZ* mRNA und 18S RNA wurden quantitativ mittels RT-PCR bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (Kontrolle $100,00 \pm 14,34$ %; L-CI.5s-shMmp-9: $64,09 \pm 3,95$ %; L-CI.5s-high-Mmp-9 $238,96 \pm 25,21$ %).

Die Suppression von *Mmp-9* auf Seiten der Tumorzellen führte zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl an Makrometastasen (Abb. 5.24, A und B). Die zweite invasive Phase der späten Lebermetastasierung wird durch die sekundäre Invasion repräsentiert. Die Auswirkung von *Mmp-9* auf diesen Prozess kann durch Betrachtung der Anzahl an Mikrometastasen ermittelt werden. Durch die Auswertung von Nahaufnahmen der Leberoberflächen konnte gezeigt werden, dass durch den *knockdown* von *Mmp-9* in den Tumorzellen auch die Ausbildung von Mikrometastasen drastisch verringert wurde (Abb. 5.24, A). Die Reduktion der Anzahl an Makro- und Mikrometastasen wurde auch in der Reduktion der

Gesamtumorlast reflektiert. Die Bestimmung der mRNA Expression des Tumorzellmarkergens *lacZ* mit quantitativer RT-PCR ergab eine um 36 % Prozent verringerte Tumorlast, durch den knockdown von Mmp-9 in den Tumorzellen.

Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass trotz des knockdown von Mmp-9 in den Tumorzellen einige der Mmp-9-knockdown L-CI.5s Zellen extravasieren und zu Makrometastasen ausgewachsen waren. Um diesen Sachverhalt zu erklären wurde die Hypothese entwickelt, dass durch den retroviralen Gentransfer der anti-Mmp-9 shRNA in L-CI.5s Zellen eine heterogene Tumorzelllinie entstanden war. Innerhalb dieser heterogenen Zelllinie könnte es einzelne Klone geben, die trotz *knockdown* von Mmp-9 für die Extravasation ausreichende Mengen an Mmp-9 exprimierten.

5.22. Nachweis der Heterogenität der *Mmp-9-knockdown* Zelllinie

Für den Nachweis der Heterogenität wurden einzelne Klone der L-CI.5s-shMmp-9 Zelllinie durch *limiting dilution* isoliert und deren Mmp-9 Expression mit quantitativer RT-PCR analysiert.

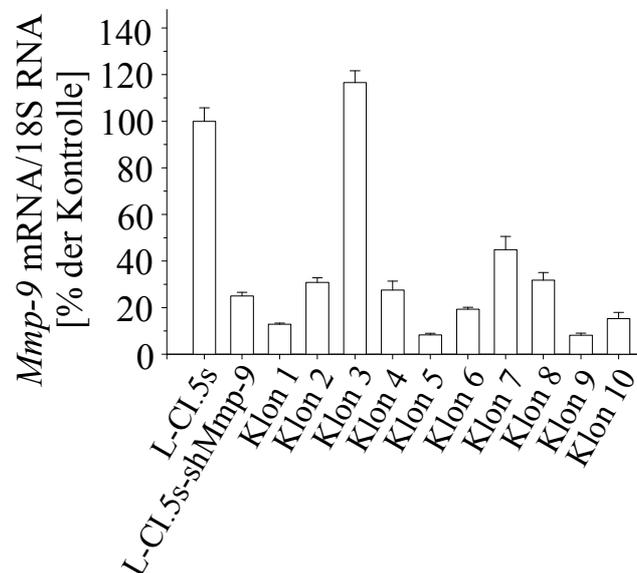


Abbildung 5.26: Nachweis der Heterogenität der *Mmp-9 knockdown* Zelllinie

Durch *limiting dilution* wurden 10 Klone der Zelllinie L-CI.5s-shMmp-9 isoliert. Von allen Klonen wurde Gesamt-RNA isoliert und revers transkribiert. Zusätzlich wurde Gesamt-RNA der Zelllinien L-CI.5s und L-CI.5s-shMmp-9 isoliert. Die Expression von *Mmp-9* mRNA wurde mit quantitativer RT-PCR bestimmt und gegen 18S RNA Expression abgeglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler als Prozent der L-CI.5s-Kontrollzelllinie (L-CI.5s: 100,0 ± 5,8 %; L-CI.5s-shMmp-9: 25,0 ± 1,5 %; Klon 1: 12,9 ± 0,4 %; Klon 2: 30,8 ± 2,0 %; Klon 3: 116,6 ± 5,0 %; Klon 4: 27,5 ± 3,9 %; Klon 5: 8,2 ± 0,7 %; Klon 6: 19,3 ± 0,8 %; Klon 7: 44,8 ± 5,7 %; Klon 8: 31,8 ± 3,3 %; Klon 9: 8,1 ± 0,9 %; Klon 10: 15,2 ± 2,7 %).

Es wurden insgesamt zehn Klone (L-CI.5s-shMmp-9-1-10) isoliert und nachfolgend mit quantitativer RT-PCR analysiert. Während einzelne Klone einen *knockdown* von über 90 % aufzeigten, exprimierten andere Klone nahezu unverminderte Mengen an Mmp-9, im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 5.26). Sollte die zuvor aufgestellte Hypothese richtig sein, dürften nur Klone mit hoher Mmp-9 Expression Makrometastasen in der Leber ausbilden.

5.23. Korrelation der Tumorzell-Mmp-9 Expression mit dem metastatischen Potential der Tumorzellen

Um die zuvor aufgestellte Hypothese zu überprüfen, dass die erfolgreich extravasieren Tumorzellen Klone entsprachen, die trotz eines *knockdown* von Mmp-9 noch immer ausreichende Mengen dieser Protease exprimierten, wurden zuerst die *Mmp-9* Expression und die gelatinolytische Aktivität in den verbleibenden L-CI-5s-shMmp-9 Metastasen bestimmt. Durch Bestimmung der gelatinolytischen Aktivität durch *in situ* Zymographie und der *Mmp-9* mRNA Expression durch *in situ* Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass die etablierten L-CI.5s-shMmp-9 Metastasen, im Vergleich zur Kontrolle, eine nahezu gleiche gelatinolytische Aktivität zeigten (Abb. 5.27, A oben) und gleiche Mengen an *Mmp-9* mRNA exprimierten (Abb. 5.27, A unten). Aufbauend auf diesem Ergebnis wurde die Hypothese entwickelt, dass das metastatische Potential der Tumorzellen durch die Menge an exprimiertem Mmp-9 bestimmt wurde. Um dies zu überprüfen, wurden drei der zuvor isolierten Klone ausgewählt. Es wurde ein Klon mit nahezu unveränderter Mmp-9 Expression ausgewählt, ein zweiter mit einer mittleren Expression und ein dritter mit einer starken Reduktion der *Mmp-9* mRNA Expression (Abb. 5.27, B). Je 5×10^3 Tumorzellen der drei Klone und der Kontrollzelllinien L-CI.5s und L-CI.5s-shMmp-9 wurden in syngene, immunkompetente DBA/2 Mäuse inokuliert. Während bei dem Klon mit nahezu unveränderter Mmp-9 Expression, auch die Anzahl an Makrometastasen, im Vergleich zur Kontrolle, unverändert war, wurde durch die effiziente Reduktion von Mmp-9 in den Tumorzellen auch deren Extravasation stark reduziert (Abb. 5.27, B). Durch dieses Experiment konnte eine Korrelation der Tumorzell-Mmp-9 Expression mit dem metastatischen Potential der Tumorzellen hergestellt werden.

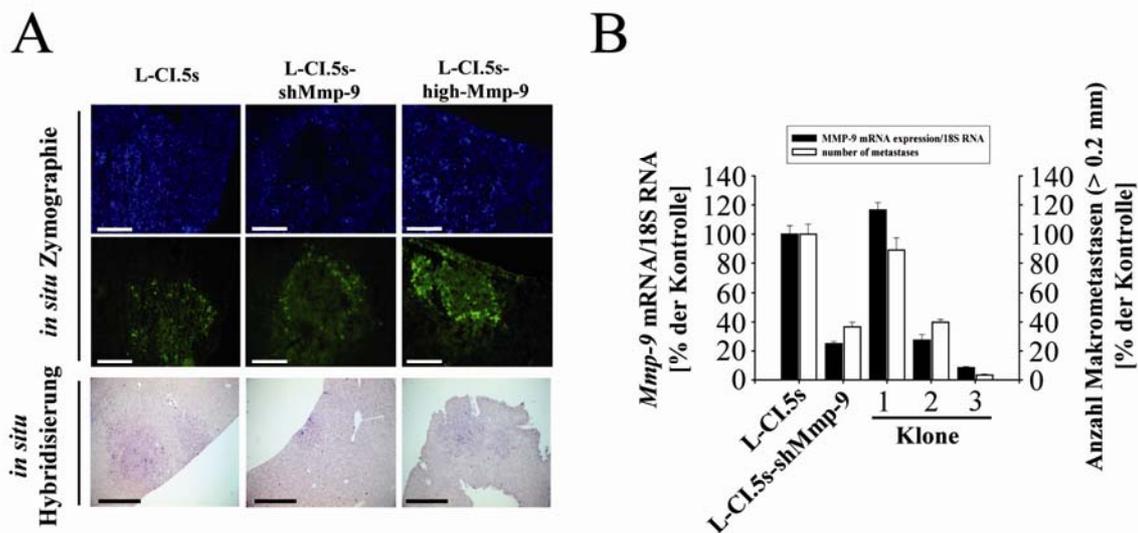


Abbildung 5.27: Korrelation zwischen der Tumorzell-Mmp-9 Expression und dem metastatischen Potential der Tumorzellen bei der Lebermetastasierung

A, Lokalisation und Quantifizierung von gelatinolytischer Aktivität und *Mmp-9* Expression in L-CI.5s oder L-CI.5s-shMmp-9 infiltrierte Lebern. **A**, Bestimmung der gelatinolytischen Aktivität in Kryoschnitten von L-CI.5s oder L-CI.5s-shMmp-9 Metastasen. Fotos repräsentativer Metastasen beider Gruppen sind gezeigt. Gelatinolytische Aktivität wurde mit DQ™-Gelatin nachgewiesen (Mitte). Für die Gegenfärbung wurde DAPI verwendet (oben). Um den Beitrag von Mmp-9 zur detektierten gelatinolytischen Aktivität zu bestimmen, wurde *Mmp-9* mRNA mittels *in situ* Hybridisierung nachgewiesen (unten). Maßstabsbalken = 100 μ m. **B**, Korrelation zwischen der Mmp-9 Expression und dem metastatischen Potential der Tumorzellen. Klone der L-CI.5s-shMmp-9 Zelllinie wurden mit quantitativer RT-PCR auf die Expression von Mmp-9 untersucht. Drei Klone mit unterschiedlicher (hoher, mittlerer, niedriger) Mmp-9 Expression wurden ausgewählt. Mmp-9 mRNA und 18S RNA wurden detektiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler nach Abgleich gegen 18S. 5×10^3 Zellen jeder der angegebenen Zelllinien oder Klone wurde i.v. in immunkompetente syngene DBA/2 Mäuse inokuliert. 7 Tage nach Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert, die Lebern entnommen und X-Gal gefärbt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Anzahl Makrometastasen (Metastasen > 0,2 mm; $n = 5$).

6. Diskussion

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine spezifische Hemmung von MMP-9 in Wirts- oder Tumorzellen unterschiedliche Auswirkungen auf die Effizienz der Lebermetastasierung hat. Durch den *knockout* von MMP-9 in den Wirtszellen wurde ein Kompensationsmechanismus induziert, der die Lebermetastasierung förderte. Im Gegensatz hierzu, führte die Hemmung von MMP-9 in den Tumorzellen zu einer signifikanten Reduktion der Metastasierung der Leber, durch Verminderung des metastatischen Potentials der Tumorzellen. Diese unterschiedlichen Ergebnisse reflektieren die zweigeteilte Rolle von MMP-9, einerseits als ein Regulator der Homöostase und andererseits als ein Effektormolekül der Metastasierung. Im Knochenmark ist MMP-9 für die Freisetzung des Kit Liganden verantwortlich. Die reduzierte Freisetzung von KitL im Knochenmark, in Folge einer spezifischen Hemmung von MMP-9, wurde durch die Induktion von IL-6 Expression kompensiert, um die Signaltransduktion über Stat3 zu erhalten. Dieser Kompensationsmechanismus resultierte jedoch auch in einer Anreicherung von IL-6 im Serum, wodurch die Expression von MMP-9 in IL-6 sensitiven, zirkulierenden Tumorzellen induziert wurde und die Invasivität dieser Zellen anstieg. Diese Ergebnisse zeigten zum ersten Mal, dass die Veränderung einer Homöostase nicht nur im Zielorgan der Metastasierung relevant ist, sondern dass die Auswirkungen von veränderten Gewebegleichgewichten auch *in trans* über eine Distanz wirksam sein können. Die Information einer gestörten physiologischen Homöostase des Knochenmarks wurde, durch die Verbreitung von IL-6 über den Blutstrom, an die Tumorzellen übertragen. Die Induktion der Lebermetastasierung in *Mmp-9*-defizienten Mäusen konnte durch eine spezifische Hemmung von MMP-9 Expression in den Tumorzellen unterbunden werden, wodurch die fördernde Rolle von Tumorzell-MMP-9 bei der Lebermetastasierung offensichtlich wurde. Durch die Anwendung der shRNAi-Technologie in Kombination mit einem experimentellen Metastasierungsmodell, das die spezifische Betrachtung der einzelnen, späten Schritte der Lebermetastasierung erlaubte, konnten die Beiträge von Tumorzell-MMP-9 zu den unterschiedlichen Phasen bestimmt werden. Es wurde gezeigt, dass Tumorzell-MMP-9 selektiv zu den invasiven Phasen der Lebermetastasierung beiträgt, und dass die Expression von MMP-9 durch die Tumorzellen mit ihrem metastatischen Potential korreliert ist. Aufbauend auf diesen Ergebnissen können die Risiken oder der therapeutische Nutzen einer spezifischen Hemmung von MMP-9 besser beurteilt werden. Die auftretenden Nebenwirkungen einer spezifischen Hemmung von Wirtszell-MMP-9 können entweder durch die Gabe einer ausreichenden Dosis eines spezifischen Inhibitors oder durch eine selektive Hemmung von Tumorzell-MMP-9 kontrolliert werden.

6.1. Die spezifische Hemmung von Mmp-9 führt zur Etablierung einer potentiell krankheitsfördernden Mikroumgebung

Es ist inzwischen bekannt, dass eine physiologische Homöostase eine feindliche Umgebung für invadierende Tumorzellen gewährleistet (Gupta und Massague, 2006). Diese physiologische Homöostase, die kennzeichnend für ein gesundes Gewebe ist, muss zuerst verändert werden, bevor diese die Invasion und die Etablierung von Tumorzellen zulässt bzw. unterstützt (Gupta und Massague, 2006). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, kann die spezifische Hemmung von Wirtszell-MMP-9 zur Ausbildung einer krankheitsfördernden Homöostase führen, wie am Beispiel der Induktion der Metastasierung der Leber gezeigt werden konnte. Die Proteasen und deren natürliche Inhibitoren, die zusammen das sog. *protease-network* (Protease-Netzwerk) bilden (Overall und Dean, 2006; auf dem Keller et al., 2007), leisten einen wichtigen regulatorischen Beitrag zum Erhalt eines physiologischen Gewebegleichgewichts. Die Bedeutung dieses Netzwerks ist daran ersichtlich, dass die Entstehung oder Progression vieler Krankheiten, nicht nur von Krebs, mit veränderten proteolytischen Aktivitäten im erkrankten Gewebe oder Organ korreliert ist (Lemaitre und D'Armiento, 2006). Veränderte Expressionslevel von Proteasen können bei nahezu allen Erkrankung diagnostiziert werden (auf dem Keller et al., 2007), auch wenn die Beiträge der Proteasen im Einzelnen oft noch nicht geklärt sind.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden anti-proteolytische Therapien mit Breitspektrum-Inhibitoren entwickelt, die das Ziel hatten, die verstärkte Proteolyse im erkrankten Gewebe auf das niedrige proteolytische Niveau von gesundem Gewebe zurückzuführen (Coussens et al., 2002). Doch diese Ansätze scheiterten, da die regulatorischen Bedeutungen der Proteasen und die Folgen von Eingriffen in das Protease-Netzwerk auf die Gewebegleichgewichte nicht berücksichtigt wurden (Chambers und Matrisian, 1997; Overall und Kleinfeld, 2006b). Inzwischen ist gezeigt, dass durch schwerwiegende Eingriffe in eine etablierte Homöostase, wie beispielsweise durch die Breitspektrum-Hemmung von MMPs, das Gleichgewicht gestört wird, und dass ein daraus resultierendes neues Gewebegleichgewicht die Metastasierung in die Leber fördern kann (Kopitz et al., 2007). Dieses Prinzip konnte auf drastische Weise durch die Überexpression des natürlichen Breitspektrum-MMP-Inhibitors Timp-1 in der Leber dargelegt werden (Kopitz et al., 2007). Die Überexpression von Timp-1 führte zu einer stark veränderten Homöostase in der Leber, die durch eine metastasierungsfördernde Genexpressionssignatur gekennzeichnet war. Timp-1 induzierte in tumorfreien Lebern die Expression des metastasierungsfördernden Wachstumsfaktors HGF, wodurch die Invasivität

von HGF-sensitiven Tumorzellen signifikant anstieg (Kopitz et al., 2007). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, bedarf es zur Ausbildung einer neuen Homöostase in der Leber nicht unbedingt eines schwerwiegenden Eingriffs, wie beispielsweise einer Breitspektrum-Hemmung von MMPs, sondern auch eine spezifische Hemmung einer Protease, nämlich MMP-9, kann hierfür ausreichend sein.

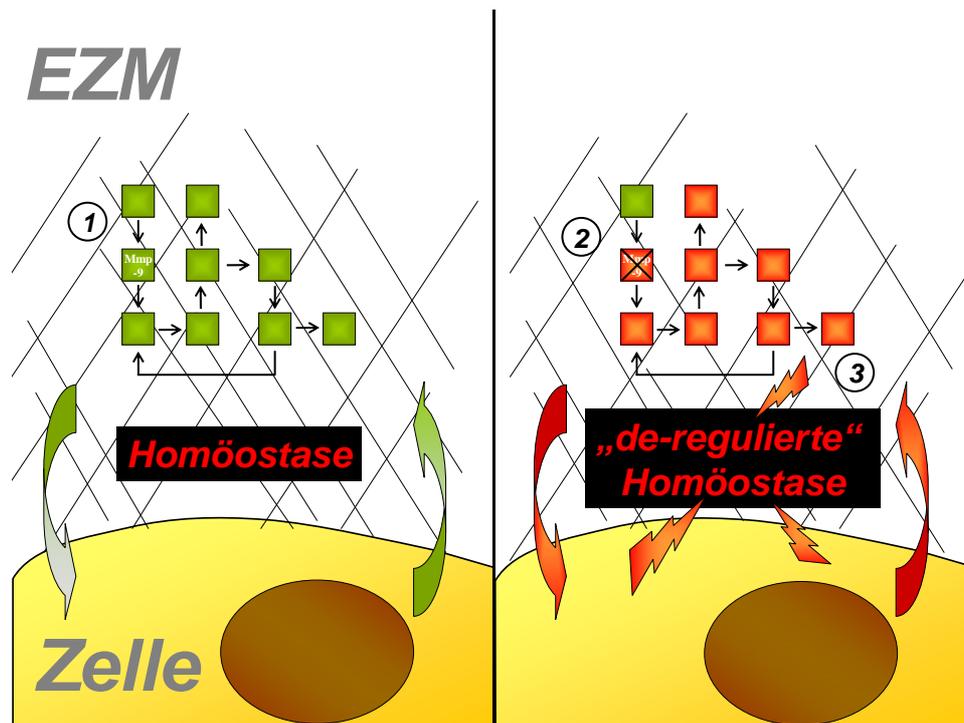


Abbildung 6.1: Veränderung der Homöostase durch eine spezifische Hemmung von MMP-9

Gezeigt ist, wie eine spezifische Hemmung von MMP-9, durch die komplexe Vernetzung von MMP-9 mit anderen Proteasen innerhalb des Protease-Netzwerks, zur Ausbildung einer neuen Homöostase führen kann. 1. MMP-9 hat durch seine Stellung innerhalb des Protease-Netzwerks eine regulatorische Funktion. Durch seine normale Aktivität trägt MMP-9 zu einer physiologischen Homöostase bei. 2. Eine spezifische Hemmung von MMP-9 beeinflusst die regulatorischen Abläufe innerhalb des Protease-Netzwerks. 3. Die veränderten proteolytischen Aktivitäten führen zur Ausbildung einer neuen Homöostase.

Die weitreichenden Auswirkungen der spezifischen Hemmung von Wirts-MMP-9 können durch die engen Vernetzungen der extrazellulären Proteasen im Protease-Netzwerk erklärt werden (siehe Abb 6.1; Van den Steen et al., 2002; Overall und Kleifeld, 2006b). Durch die komplexen Verknüpfungen innerhalb dieses Netzwerks kann auch eine spezifische Hemmung einer Protease zu unvorhersehbaren Nebenwirkungen führen (Folgueras et al., 2004; Overall und Kleifeld, 2006a). Die Auswirkungen einer spezifischen Hemmung müssen nicht unbedingt an einem offensichtlichen Phänotyp oder an einem klinisch diagnostizierbaren Symptom erkennbar sein, wie dies nach der Deletion mancher Gene auftritt, deren Fehlen oder Mutationen eindeutig einer Krankheit oder einem Symptom zugeordnet werden können

(Hunter et al., 2003). Eine spezifische Hemmung führt eventuell nur, wie hier gezeigt, zu Veränderungen auf molekularer Ebene, d.h. es bildet sich ein neuer molekularer Phänotyp aus, der nicht direkt mit einer Krankheit assoziiert und der auch nicht direkter Auslöser einer pathogenen Veränderung ist. Die Folgen eines krankheitsfördernden molekularen Phänotyps werden erst ersichtlich, wenn in diesem Organismus eine Krankheit auftritt, und der molekulare Phänotyp dazu führt, dass die schwere der Krankheit gefördert oder die Progression der Krankheit beschleunigt wird (Hunter et al., 2003; Gupta und Massague, 2006).

Wie hier gezeigt werden konnte, waren die Auswirkungen des *knockout* von MMP-9 hauptsächlich auf der Ebene der Genexpression ersichtlich. Die veränderte Genexpressions-signatur der MMP-9 *knockout* Mäuse hatte jedoch keine offensichtliche phänotypische oder pathologische Veränderung zur Folge. *Mmp-9-knockout* Mäuse sind vital, lebensfähig und zeigen nur ein leicht verlangsamtes Wachstum der Knochen innerhalb der ersten Wochen nach der Geburt der Mäuse (Vu et al., 1998). Die spezifische Hemmung von MMP-9 führte jedoch zu einer veränderten Homöostase der Leber und des Knochenmarks. Die Folgen der neuen, durch spezifische Hemmung von *Mmp-9* in den Wirtszellen entstandenen Homöostase wurden erst nach der Inokulation von Tumorzellen ersichtlich, die für die erhöhte Expression von IL-6 suszeptibel waren.

Obwohl der *knockout* von *Mmp-9* weit reichenden Veränderungen induziert hatte, schien ein Faktor für die Förderung der Metastasierung ausreichend gewesen zu sein, auch wenn die Beiträge weiterer nicht untersuchter Faktoren nicht ausgeschlossen werden können. Es werden derzeit große Anstrengungen unternommen, Genexpressionssignaturen zu identifizieren, die mit der Tumorprogression oder der Metastasierung korreliert sind (Hunter et al., 2003; Ramaswamy et al., 2003). Wie diese Arbeit zeigt, könnten diese Bemühungen dadurch erschwert werden, dass in einigen Fällen einzelne Faktoren oder die Kombination weniger Faktoren für die Förderung der Progression einer Krankheit ausreichend sein könnten. Bei der hier identifizierten Genexpressionssignatur viel auf, dass die Expression der Mehrheit der metastasierungsassoziierten Gene sogar reduziert war.

In diesem Zusammenhang ist es wichtig darauf hinzuweisen, dass eine spezifische Hemmung von MMP-9 nicht immer mit negativen Auswirkungen auf die Progression einer Krankheit korrelierte sein muss. Nur in dem hier beschriebenen Beispiel, dem *knockout* von *Mmp-9* in dem hier verwendeten Mausstamm, entstand eine molekulare Mikroumgebung die die Invasivität ausgewählter Tumorzellen in die Leber fördern konnte. Von Martin et al. konnte

kürzlich gezeigt werden, dass die Auswirkungen des *knockout* von *Mmp-9* auf die Metastasierung grundsätzlich unterschiedlich sein können (Martin et al., 2008). Während der *knockout* von *Mmp-9* in Mäusen im C57BL/6 Hintergrund die Metastasierung der Lunge um 80 % reduzierte, hatte der *knockout* von *Mmp-9* in Mäusen im FVB/N Hintergrund keinen signifikanten Effekt. Eine spezifische Hemmung von MMP-9 wird immer eine etablierte Homöostase verändern und zur Ausbildung einer neuen Homöostase führen (Overall und Dean, 2006; Martin et al., 2008). Ob hieraus eine krankheitsfördernde oder –hemmende Umgebung entsteht, wird dadurch bestimmt, in welchem genetischen Hintergrund die Hemmung von MMP-9 durchgeführt wird. Die unterschiedlichen Auswirkungen von verschiedenen Homöostasen auf die Metastasierung konnten von Hunter et al. dargestellt werden (Hunter et al., 2003). Wie in dieser Studie gezeigt wurde, entstehen durch Auskreuzungen aus einem Mausstamm neue Stämme, die alle unterschiedliche Gewebekomöostasen ausgebildet haben, wie durch Genexpressionsstudien belegt wurde. Alle Homöostasen zeigten eine unterschiedliche Suszeptibilität für die spontane Metastasierung der Lunge (Hunter et al., 2003). Diese unterschiedlichen Auswirkungen auf die Progression oder Entstehung einer Krankheit, resultierend aus verschiedenen Homöostasen, spiegeln sich auch in den divergenten Ergebnissen wider, die mit *Mmp-9-knockout* Mäusen erzielt wurden (Itoh et al., 1999; Coussens et al., 2000; Hamano et al., 2003; Martin et al., 2008). Durch das Einfügen des *Mmp-9-knockouts* in unterschiedliche Mausstämme werden divergente Homöostasen ausgebildet. Je nach der Art des Experiments in dem die unterschiedlichen *Mmp-9-knockout* Stämme eingesetzt werden, werden unterschiedliche Ergebnisse, teilweise pro- und teilweise anti-metastatisch/tumorigen, erhalten. Wie in dieser Arbeit gezeigt, kann aus einer spezifischen Hemmung von *Mmp-9* auch eine Gewebekomöostase resultieren, die bei geeigneter Auswahl der Tumorzellen die Metastasierung der Leber fördert.

6.2. Die Hemmung von Wirtszell-Mmp-9 fördert die Invasion von IL-6-sensitiven Tumorzellen in die Leber

Trotz des Scheiterns der Breitspektrum-MMP-Inhibitoren gelten die MMPs noch immer als viel versprechende Zielmoleküle anti-metastatischer Therapien, da ihre Funktionen essentiell für die Invasivität von Tumorzellen sind (Vihinen und Kahari, 2002; Deryugina und Quigley, 2006). Aus diesem Grund müssen die Folgen der spezifischen Hemmungen einzelner MMPs genau untersucht werden, um eventuell eine MMP zu identifizieren, deren Hemmung die invasive Ausbreitung von Tumoren unterbindet und deren Hemmung nur zu schwachen,

tolerierbaren Nebenwirkungen führt (Overall und Kleinfeld, 2006a; Overall und Kleinfeld, 2006b). Durch die Freisetzung von EZM-gebundenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen oder durch das Abspalten regulatorischer Peptide aus EZM Strukturproteinen, sind die einzelnen MMPs zentrale Bestandteile vieler regulatorischer Prozesse (McCawley und Matrisian, 2001; Egeblad und Werb, 2002; Overall und Dean, 2006). Zudem sind die Aktivitäten aller MMPs innerhalb des Protease-Netzwerks eng miteinander verknüpft, wodurch die Hemmung einer MMP zu unvorhersehbaren, schweren Nebenwirkungen führen kann. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, führte die spezifische Hemmung von Wirtszell-MMP-9 zu signifikanten Veränderungen der Homöostase, in deren Folge die Metastasierung in die Leber induziert wurde. In der Literatur wurde bereits diskutiert, dass die Hemmung einiger Wirts-MMPs pro-invasiv, die Hemmung anderer MMPs anti-invasive Folgen haben könnte, je nach der Stellung der MMP innerhalb der extrazellulären Regulationskaskaden (Overall und Kleinfeld, 2006a; auf dem Keller et al., 2007). Detaillierte Untersuchungen der Beiträge einzelner MMPs zeigten inzwischen, dass unterschiedliche MMPs in der Tat, sowohl metastasierungsfördernde als auch -hemmende Funktionen haben können (Deryugina und Quigley, 2006; Lopez-Otin und Matrisian, 2007). Diese unterschiedlichen Ergebnisse können teilweise dadurch erklärt werden, dass die einzelnen MMPs unterschiedliche regulatorische Bedeutungen innerhalb des Protease-Netzwerks haben. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist es aber nicht nur von Bedeutung welche Protease gehemmt wird. Gleichermäßen ist es von Bedeutung in welchen Zellen/welcher Region und zu welcher Zeit die spezifische Inhibition einer Protease stattfindet.

Für MMP-9 war bislang bekannt, dass eine verbesserte Selektivität synthetischer Inhibitoren gegenüber MMP-9, mit einer höheren anti-metastatischen Effizienz korreliert ist (Arlt et al., 2002; Krüger et al., 2005). In der Klinik werden hohe Plasmawerte von MMP-9 besonders häufig beim kolorektalen Karzinom, das vorrangig in die Leber metastasiert, gefunden (Zucker und Vacirca, 2004). Es wird angenommen, dass MMP-9 in diesem Fall die Metastasierung der Leber fördert (Mook et al., 2004; Zucker und Vacirca, 2004). Diese Ergebnisse geben Anlass zu der Vermutung, dass eine spezifische Hemmung von MMP-9 therapeutisch nützlich sein könnte, um die invasive Ausbreitung von Tumorzellen zu unterbinden. Durch die Gabe von synthetischen Inhibitoren wird sowohl das MMP-9 von Tumorzellen als auch das MMP-9 von Wirtszellen gehemmt. Werden die MMP-9 Beiträge dieser beiden Entitäten durch die Anwendung unterschiedlicher Techniken getrennt betrachtet, so führt dies zu differierenden Ergebnissen. Während die Hemmung von Wirtszell-

MMP-9 die Metastasierung der Leber förderte, führte die Hemmung von Tumorzell-MMP-9 zur Reduktion der Metastasierung.

Jedoch wurde auch gezeigt, dass die Metastasierung der Lunge in *Mmp-9*-defizienten Mäusen nach intravenöser Inokulation von Tumorzellen reduziert sein kann (Itoh et al., 1999). Dieses Ergebnis könnte dadurch erklärbar sein, dass in dieser Studie andere Tumorzelllinien verwendet wurden und die Metastasierung der Lunge, und nicht wie hier die Metastasierung der Leber, untersucht wurde (Itoh et al., 1999). Eine zentrale Aussage dieser Arbeit hier ist, dass die Förderung der Metastasierung davon abhängig ist, wie die verwendeten Tumorzellen auf die durch den *knockout* veränderte Homöostase reagieren. Wie hier gezeigt, war eine Voraussetzung für die Förderung der Metastasierung der Leber, dass die Tumorzellen sensitiv für die gesteigerten Werte von IL-6 waren. Zudem, wie bereits beschrieben, wird die Metastasierung der Lunge auch dadurch bestimmt, in welchem genetischen Hintergrund der *knockout* von *Mmp-9* eingeführt wird (Martin et al., 2008). Die Mäuse die in der Studie von Itoh et al. verwendet wurden, entstammten einem anderen genetischen Hintergrund als die Mäuse die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Es gilt zu beachten, dass eine spezifische Hemmung von Wirtszell-MMP-9 sowohl anti- als auch pro-tumorigene oder –metastatische Wirkung haben kann. Es wurde gezeigt, dass Wirtszell-MMP-9 für die Freisetzung des natürlichen Angiogeneseinhibitors Tumstatin aus Kollagen Typ IV verantwortlich ist (Hamano et al., 2003). Die reduzierte Freisetzung von Tumstatin in *Mmp-9*-defizienten Mäusen führt zu einer verbesserten Angiogenese und einem damit verbundenem verstärktem Tumorwachstum (Hamano et al., 2003). Gordon et al. konnten hingegen zeigen, dass MMP-9 exprimiert von Wirtszellen das Auswachsen von Metastasen in der Leber fördert. In einer anderen Studie wiederum wurde festgestellt, dass durch Einkreuzung von *Mmp-9*-defizienten Mäusen in das HPV16-Hautkarzinom Modell zwar die Anzahl entstehender Hauttumore reduziert wird, doch die verbliebenen Tumoren weniger differenziert und aggressiver sind (Coussens et al., 2000).

Zusammengefasst verdeutlichen diese kontroversen Ergebnisse jedoch, dass es entscheidend ist, in welcher Entität und zu welchem Zeitpunkt der metastatischen Kaskade MMP-9 gehemmt wird. Es gilt zu beachten, dass MMP-9 von verschiedenen Zellen und zudem auch in mehreren Stadien und in unterschiedlichen Regionen während der malignen Progression exprimiert wird (Deryugina und Quigley, 2006). Alle zuvor aufgeführten Studien betrachteten unterschiedliche räumliche Beiträge oder Zeitpunkte von Wirtszell-MMP-9 zur Tumorprogression und die Untersuchungen wurden zudem in unterschiedlichen Mausmodellen

durchgeführt. Bevor eine Entscheidung pro oder kontra MMP-9 getroffen wird, müssen diese unterschiedlichen räumlichen und zeitlichen MMP-9-Beiträge in weiteren Studien differenziert untersucht werden.

6.3. Hämatopoietische Zellen und Immunzellen fördern die Metastasierung der Leber

Durch die Anwendung immunhistochemischer Nachweisverfahren können sowohl in Primärtumoren als auch in Metastasen viele unterschiedliche Stroma- oder Immunzellen detektiert und lokalisiert werden (Illemann et al., 2006; Tlsty und Coussens, 2006). Die Tatsache, dass Immunzellen Primärtumoren und Metastasen infiltrieren ist seit längerem bekannt (Mantovani et al., 2006; Sica et al., 2007). Die Immunzellinfiltrate wurden lange Zeit als die Immunantwort des Organismus gegen einen wachsenden Tumor verstanden, und man nahm an, dass diese Zellen das Auswachsen des Tumors bekämpfen (Tlsty und Coussens, 2006). Inzwischen ist jedoch bekannt, dass aktivierte Immunzellen nicht grundsätzlich anti-tumorigen wirken, sondern dass diese Zellen auch entscheidend zur Progression von Tumoren beitragen können (Coussens und Werb, 2002). In diesem Zusammenhang wurden besonders die Beiträge der tumorassoziierten Makrophagen zur Förderung der Tumorprogression oder der Metastasierung untersucht (Mantovani et al., 2006). In allen bislang durchgeführten Arbeiten, wurde jedoch hauptsächlich der Beitrag von Immunzellen untersucht die das Tumorgewebe infiltriert haben. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, tragen die Immunzellen und die Zellen hämatopoietischen Ursprungs auch zur Effizienz der Metastasierung bei, durch die Expression tumorfördernder Faktoren, wenn diese nicht direkt im Zielgewebe der Metastasierung physisch präsent sind.

Das Konzept des Beitrags der Immunzellen zur Ausbildung von Metastasen wurde kürzlich fundamental erweitert. Neue Untersuchungen konnten zeigen, dass Immunzellen, wie tumorassoziierte Makrophagen, nicht nur als Reaktion auf etablierte Metastasen das befallene Gewebe infiltrieren. Es wurde gezeigt, dass aktivierte Makrophagen sogar den Tumorzellen vorangehen können und das Zielgewebe der Metastasierung auf die Ankunft der Tumorzellen vorbereiten (Kaplan et al., 2005; Kaplan et al., 2006b). In diesem Zusammenhang wurde der Begriff der metastatischen Nische geprägt. Von Hiratsuka et al. konnte zudem gezeigt werden, dass Makrophagen in der Lunge MMP-9 exprimieren und dass dies ein essentieller Beitrag zur Ausbildung prä-metastatischer Nischen ist (Hiratsuka et al., 2002). In dieser Studie wurde der nischenbildende Faktor Mmp-9 von Immunzellen exprimiert, die direkt im

Zielorgan der Metastasierung physisch präsent waren (Hiratsuka et al., 2002). Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten auch zu einer Erweiterung des Begriffs der prä-metastatischen Nische führen. Während in den bislang publizierten Arbeiten die prä-metastatischen Nischen durch die Infiltration von Immunzellen in tumorfreies Gewebe beschrieben wurde, wurde hier gezeigt, dass auch eine veränderte Homöostase eine Art prä-metastatische Nische bilden kann, wenn das ausgebildete Gewebegleichgewicht die Metastasierung eines Gewebes fördert. Hierbei ist es wichtig darauf hinzuweisen, dass diese Faktoren nicht unbedingt durch die prä-metastatischen nischenbildenden Immunzellen im Zielorgan der Metastasierung exprimiert werden müssen, sondern dass diese auch von Zellen mit räumlicher Distanz abgegeben werden können. Die Zytokine, die bestimmenden Botenstoffe der Immunzellen, können die Informationen die die Immunzellen an ihre Umgebung abgeben, über weite Strecken innerhalb eines Organismus transportieren. Über diese Botenstoffe können Immunzellen an einem anderen Ort wirken, ohne physisch präsent zu sein.

Es ist bereits bekannt, dass aktivierte Immunzellen und die Zellen hämatopoietischen Ursprungs eine Vielzahl von unterschiedlichen Faktoren, wie Zytokine, Chemokine oder Wachstumsfaktoren, exprimieren, die sowohl zur Förderung der Wachstumsrate als auch zur Steigerung der Invasivität von Tumorzellen beitragen können (Fitzpatrick, 2001; Balkwill, 2004). In vielen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Faktoren die im Verlauf einer normalen Entzündung abgegeben werden, die Invasivität von Tumorzellen positiv beeinflussen können. Auf diesen pro-tumorigenen Funktionen der Immunzellen beruht auch die Tatsache, dass entzündungshemmende Substanzen anti-tumorigene Wirkung entfalten (Koki und Masferrer, 2002; Tlsty und Coussens, 2006), oder dass Patienten die an chronischen Entzündungserkrankungen leiden ein signifikant erhöhtes Risiko haben einen Tumor zu entwickeln (Ernst und Gold, 2000; Shacter und Weitzman, 2002). In diesem Zusammenhang wurden bislang jedoch hauptsächlich die Einflüsse von Entzündungen auf die Entstehung von Primärtumoren am Ort der Entzündung, und nicht die Auswirkungen von Entzündungen auf Tumoren oder Metastasen an entfernten Orten innerhalb eines Organismus untersucht. Die Expression von tumorfördernden Faktoren durch die Immunzellen oder hämatopoietischen Zellen, ist aber grundsätzlich nicht davon abhängig, ob diese aktivierten Zellen direkten Kontakt zu den Tumorzellen im befallenen Gewebe haben. In einer Studie von de Visser et al. wurde bereits gezeigt, dass aktivierte B-Zellen durch die Ablagerung von Antikörpern im Tumorgewebe das Wachstum von Tumoren gefördert werden kann (de Visser et al., 2005). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die physische Präsenz von Immunzellen im Tumorgewebe keine notwendige Voraussetzung für die Förderung von Tumor-

erkrankungen ist. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wurde die metastasierungs-fördernde Wirkung *in trans*, durch das Zytokin IL-6 vermittelt, dessen Expression durch die Hemmung eines MMP-9 abhängigen Mechanismus induziert wurde. Auch wenn in dieser Arbeit die Wirkung *in trans* nur an einem Beispiel beschrieben wurde, so gilt zu beachten, dass es unzählig viele Verknüpfungen zwischen dem Protease-Netzwerk und den im Blut transportierten Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder Hormonen gibt (auf dem Keller et al., 2007). Interventionen mit dem Protease-Netzwerk werden immer veränderte Freisetzungen oder Expressionen dieser Faktoren zur Folge haben, und diese Faktoren können, transportiert über das Blut, überall im Körper wirken, wo Zellen mit den entsprechenden Rezeptoren vorliegen (siehe Abb. 6.2).

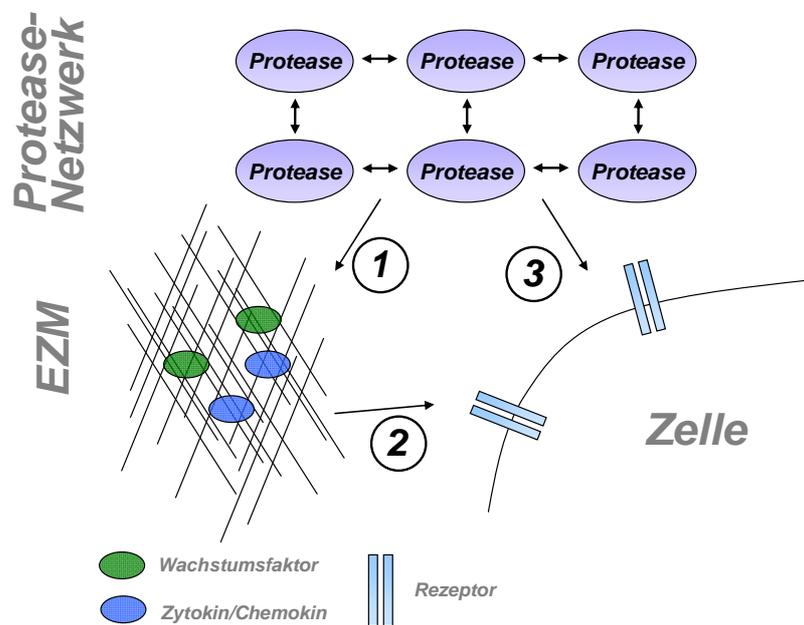


Abbildung 6.2: Das extrazelluläre regulatorische Netzwerk aus Proteasen und ihren Substraten
Gezeigt sind die komplexen Verknüpfungen der Proteasen untereinander (Protease-Netzwerk; oben) und die regulatorisch bedeutsamen Substrate der Proteasen: EZM-Fragmente, in der EZM gespeicherte Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, Zelloberflächenrezeptoren die von Proteasen abgespalten werden können (Anteile des Degradoms; unten). 1. Die Aktivitäten innerhalb des proteolytischen Netzwerks bestimmen die Freisetzung von in der EZM gespeicherten regulatorischen Faktoren. 2. Diese Faktoren wirken durch Interaktion mit zelloberflächen Rezeptoren auf die zelluläre Genexpression. Hierbei ist es wichtig hervorzuheben, dass die freigesetzten Zytokine, Chemokine oder Wachstumsfaktoren, über das Blut transportiert, an allen Zellen innerhalb eines Organismus wirken können, die die entsprechenden Rezeptoren exprimieren. 3. Auch der Schritt 2. kann durch Proteasen moduliert werden, da Proteasen Rezeptoren von der Zellmembran abspalten können.

6.4. IL-6 exprimiert durch Zellen hämatopoietischen Ursprungs fördert die Metastasierung der Leber

Als Ursache der Induktion der Metastasierung in *Mmp-9*-defizienten Mäusen, wurden die signifikant erhöhten Werte von IL-6 im Serum dieser Mäuse identifiziert. Stark erhöhte Serum-Level von IL-6 werden normalerweise während der akuten Phase bakterieller Infektionen diagnostiziert (Gabay, 2006). In diesem Fall wird IL-6 von aktivierten Makrophagen, hauptsächlich am Ort der Entzündung oder Infektion exprimiert und freigesetzt (Lang, 2005). Durch diesen Mechanismus wird die Immunantwort verstärkt und veranlasst durch den entstehenden IL-6-Chemogradienten, werden weitere Immunzellen zum Ort der Entzündung gelockt (Rose-John et al., 2007). Erhöhte Serumwerte von IL-6 werden auch bei Entzündungskrankheiten, wie z.B. Artherosklerose oder Rheuma, detektiert (Ito und Ikeda, 2003; Christodoulou und Choy, 2006). Im Falle dieser Krankheiten hat es sich, sowohl für die Detektion als auch für die Einstufung der Schwere dieser Krankheiten, als diagnostisch hilfreich erwiesen, die Werte von IL-6 im Serum zu bestimmen. Die erhöhte Konzentration von IL-6 im Serum von *Mmp-9*-defizienten Mäusen ist jedoch keine Folge einer Entzündung oder Erkrankung im klassischen Sinne. Bei einer normalen Immunantwort wird IL-6 als Reaktion auf unterschiedliche Pathogene von Immunzellen abgegeben (Rose-John et al., 2007). Hier war die vermehrte Sekretion von IL-6 keine Reaktion infolge von Pathogenen, sondern die Konsequenz einer veränderten Mikroumgebung, induziert durch die spezifische Hemmung von MMP-9.

Der Einfluss unterschiedlicher Homöostasen/Wirtsumgebungen auf die Metastasierung wurde bereits, wie zuvor beschrieben, von Hunter et al. untersucht (Hunter et al., 2003). In dieser Studie wurde jedoch nur der Einfluss der molekularen Umgebung am Ort der Tumorentstehung untersucht und berücksichtigt. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen aber darauf hin, dass auch Gewebe oder Zellen ohne unmittelbaren physischen Kontakt zum Tumorgewebe die Progression der Krankheit beeinflussen können, wenn diese Zellen unterschiedliche Mengen eines krankheitsfördernden oder -hemmenden Faktors in die Blutbahn abgeben. Es ist bereits bekannt, dass im Serum von Krebspatienten oftmals erhöhte Werte von IL-6 nachgewiesen werden können (Lauta, 2001; Knupfer und Preiss, 2007). Bei Kolorektalkarzinompatienten wurde sogar nachgewiesen, dass die Expression von IL-6 durch hämatopoietische Zellen, mit einer schlechten Prognose für die Patienten korreliert ist (Belluco et al., 2000; Clinchy et al., 2007). IL-6 wurde in dieser Arbeit als ein Effektormolekül einer krankheitsfördernden Mikroumgebung identifiziert, d.h. durch die

spezifische Hemmung von MMP-9 in den Wirtszellen wurde ein molekularer Phänotyp induziert der über IL-6 die Metastasierung der Leber förderte. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die Bestimmung der Serumwerte von IL-6 nicht nur bei den klassischen Entzündungskrankheiten sondern auch bei Krebs diagnostisch relevant sein könnte.

6.5. IL-6 kompensiert die verminderte Freisetzung von KitL in Mmp-9-defizienten Knochenmarkzellen

Bislang war bekannt, dass durch einen MMP-9-abhängigen Mechanismus hämatopoietische Stammzellen im Knochenmark, aus der Ruhenische in die Proliferationsnische überführt werden (Heissig et al., 2002; Heissig et al., 2003). Auslöser oder Voraussetzung für diese Transition ist die MMP-9-vermittelte Freisetzung des Membran gebundenen Kit-Liganden (Heissig et al., 2002). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wurde durch den *knockout* von *Mmp-9* die Menge an löslichem KitL im Knochenmark signifikant reduziert. KitL kann nach der Freisetzung an seinen Rezeptor c-Kit binden und durch diese Rezeptoraktivierung können mehrere unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden, unterhalb von c-Kit, aktiviert werden (Reber et al., 2006). Eine dieser Signaltransduktionskaskaden unterhalb von KitL/c-Kit ist der Jak/Stat3 Signaltransduktionsweg (Gotoh et al., 1996; Brizzi et al., 1999). Aus diesem Grund wäre in den *Mmp-9*-defizienten Mäusen eine Reduktion der Signaltransduktion über Stat3 zu erwarten gewesen.

Die Aktivierung und der Erhalt von Stat3 Signaltransduktion ist aber essentiell für das Überleben von Knochenmarkzellen. Es ist bekannt, dass mehrere apoptoseinhibierende Faktoren zu den Stat3 regulierten Genen gehören (Amin et al., 2004). Hiermit übereinstimmend wurde gezeigt, dass eine gezielte Hemmung von Stat3 Signaltransduktion zum apoptotischen Absterben von Tumorzellen führen kann (Niu et al., 1999). Ein ähnlicher Effekt konnte durch die Überexpression einer dominant negativen Form von Stat3 in hämatopoietischen Stammzellen erzielt werden (Chung et al., 2006). Die Überexpression dieser Stat3-Mutante induzierte einen regenerativen Defekt und führte zum Absterben der hämatopoietischen Zellen. So sind hämatopoietische Stamm- oder Vorläuferzellen, die unter verminderter Aktivierung von Stat3 leiden, auf die Aktivierung von Kompensationsmechanismen angewiesen. Da es verschiedene Aktivatoren von Stat3 gibt, könnte das Fehlen oder die Reduktion eines Faktors durch die vermehrte Expression eines anderen Stat3-Aktivators ausgeglichen werden. Zwei Faktoren die Stat3 aktivieren können sind KitL und IL-6 (Ren et al., 2003). Die signifikant erhöhten Werte von IL-6 im Knochenmark und im Serum

von *Mmp-9*-defizienten Mäusen, könnten in diesem Zusammenhang als Kompensation für die reduzierte KitL/c-Kit Signaltransduktion über Stat3 verstanden werden, um das Überleben der Knochenmarkszellen sicherzustellen (Abb. 6.3).

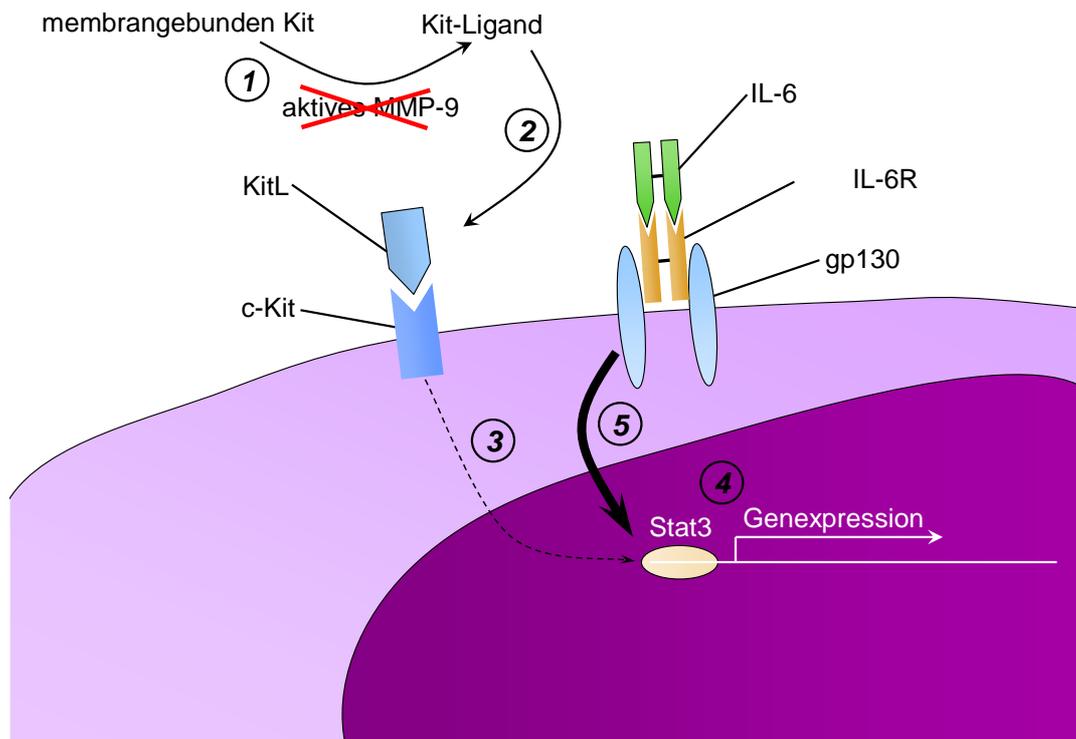


Abbildung 6.3: Kompensation der reduzierten Signaltransduktion von KitL/c-Kit in *Mmp-9*-defizienten Mäusen durch IL-6

1. Der *knockout* oder die spezifische Hemmung von MMP-9 führt zu einer reduzierten Freisetzung von aktivem Kit-Liganden. 2. – 3. Reduzierte Signaltransduktion über c-Kit würde eine verringerte Stat3-vermittelte Genexpression (4.) zur Folge haben. Da Stat3 Signaltransduktion für die Homöostase des Knochenmarks essentiell ist, muss diese durch die Induktion von IL-6 Signaltransduktion (5.), kompensiert werden.

Eine gegenseitige Regulation von KitL/c-Kit und IL-6/IL-6-Rezeptor Signaltransduktion konnte in dieser Arbeit *in vitro* nachgewiesen werden. Eine Interaktion von IL-6 und KitL wurde bereits von Ren et al. beschrieben (Ren et al., 2003). In dieser Untersuchung wurde festgestellt, dass der Proliferationsdefekt von Hepatozyten in IL-6-defizienten Mäusen, durch systemische Gabe von rekombinantem KitL aufgehoben werden kann.

6.6. Die spezifische Hemmung von Wirts- und Tumorzell-MMP-9 reduziert die Metastasierung der Leber

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass IL-6 die Expression von MMP-9 in Tumorzellen steigerte. Eine expressionsfördernde Wirkung von IL-6 auf MMP-9 wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt (Kossakowska et al., 1999), und die metastasierungsfördernde Wirkung von MMP-9 wurde vielfach beschrieben (Arlt et al., 2002; Deryugina und Quigley, 2006). Erhöhte Werte von MMP-9 im Plasma von Krebspatienten korrelieren oft mit der Progression der jeweiligen malignen Tumorerkrankung (Bjorklund und Koivunen, 2005). Bei Brustkrebs, Lungenkrebs, dem kolorektalen Karzinom, dem Kolonkarzinom und dem Non-Hodgkin Lymphom sind die Werte von MMP-9 im Tumorgewebe oder im Plasma mit schlechten Prognosen für die Patienten, die unter den jeweiligen Krankheiten leiden, assoziiert (Bjorklund und Koivunen, 2005). Auf Grund dieser Tatsachen ist es nicht verwunderlich, dass durch die Gabe von spezifischen, synthetischen MMP-9 Inhibitoren die Metastasierung der Leber reduziert werden kann (Arlt et al., 2002). Die Spezifität dieser Inhibitoren gegenüber MMP-9 korreliert mit ihrer anti-metastatischen Effizienz, was auf eine fördernde Rolle von MMP-9 bei der Metastasierung der Leber hinweist.

Auf Grund der komplexen Interaktionen innerhalb des Protease-Netzwerks, wurde jedoch bereits zuvor die Hypothese aufgestellt, dass auch eine spezifische Hemmung zu unerwarteten Nebenwirkungen führen kann (Overall und Kleinfeld, 2006b), und wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, führte die spezifische Hemmung von Wirtszell-Mmp-9 zur Induktion der Lebermetastasierung. Der Grund warum die spezifischen Inhibitoren dennoch anti-metastatisch wirksam sind, ist der Mechanismus der zur Induktion der Metastasierung führte. Die veränderte Wirtsumgebung in den *Mmp-9*-defizienten Mäusen induzierte eine verstärkte Expression von Mmp-9 in den Tumorzellen. Durch Applikation eines spezifischen Inhibitors in ausreichend hoher Dosis, wird zwar der identifizierte Kompensationsmechanismus ausgelöst, aber gleichzeitig wird das zusätzlich exprimierte MMP-9 durch den Inhibitor gehemmt. Diese Ergebnisse zeigen auf, dass zumindest durch eine kurzfristige Gabe einer hohen Dosis eines spezifischen Mmp-9-Inhibitors die Metastasierung der Leber unterdrückt werden könnte. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass nach einer längerfristigen Applikation des Inhibitors die Nebenwirkungen die anti-metastatische Wirkung aufheben würden. Wie durch den *knockout* von *Mmp-9* gezeigt, führte eine lebenslange spezifische Hemmung von Wirtszell-Mmp-9 zu einer wesentlich stärkeren Induktion der IL-6 Expression.

6.7. Tumorzell-Mmp-9 fördert die Metastasierung der Leber

Als Grund der verstärkten Lebermetastasierung in *Mmp-9*-defizienten Mäusen wurde eine IL-6-vermittelte Induktion der Mmp-9 Expression in den Tumorzellen identifiziert. Die metastasierungsfördernde Rolle von MMP-9 wird seit langem diskutiert und durch klinische Studien unterstützt (Bjorklund und Koivunen, 2005). Die Expression von MMP-9 konnte bei Brust-, Lungen-, Haut- und Prostatakrebs nachgewiesen werden (Egeblad und Werb, 2002; Bjorklund und Koivunen, 2005). Beim kolorektalen Karzinom wurde die Expression von MMP-9 im Primärtumorgewebe mit der Entwicklung von Metastasen in der Leber korreliert (Zeng et al., 1996; Mook et al., 2004). In tierexperimentellen Untersuchungen konnte die Metastasierung durch MMP-9 spezifische Inhibitoren reduziert werden (Arlt et al., 2002; Krüger et al., 2005). In diesen Studien wurde jedoch nicht zwischen den MMP-9 Beiträgen von Wirts- oder Tumorzellen differenziert und wie hier gezeigt, scheint hauptsächlich das MMP-9 das von den Tumorzellen exprimiert wird, für die Förderung der Metastasierung der Leber verantwortlich zu sein. Die metastasierungsfördernde Rolle von Tumorzell-Mmp-9 konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden (Hua und Muschel, 1996; London et al., 2003). In anderen Studien wurde nachgewiesen, dass durch Überexpression von MMP-9 in Tumorzellen die Metastasierung von Lymphomzellen verstärkt wird (Aoudjit et al., 1999), und nahezu alle isolierten malignen Tumorzelllinien exprimieren *in vitro* MMP-9 (Deryugina und Quigley, 2006). Auch die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf einen fördernden Beitrag von Tumorzell-MMP-9 bei der Metastasierung der Leber hin. Die Expression von MMP-9 durch die Tumorzellen wurde bereits bei verschiedenen Krebsarten, wie bei Brustkrebs, dem Pankreaskarzinom oder dem malignen Melanom nachgewiesen (Pyke et al., 1992; Gress et al., 1995; van den Oord et al., 1997; Lebeau et al., 1999). Jedoch gerade beim Kolorektalkarzinom, das besonders häufig in die Leber metastasiert, zeigte die Lokalisation von MMP-9 in klinischen Proben in den bislang durchgeführten Studien, dass MMP-9 nicht wie erwartet von den Tumorzellen, sondern hauptsächlich von Immunzellen, endothelialen Zellen oder Fibroblasten, exprimiert wird (Zeng und Guillem, 1996; Bjorklund und Koivunen, 2005; Illemann et al., 2006). Dies stellte anfänglich die Relevanz von Tumorzell-MMP-9 bei der Lebermetastasierung, wie sie hier gefunden wurde, in Frage. Durch die Analyse von metachronen Lebermetastasen von Kolorektalkarzinompatienten konnte jedoch in dieser Arbeit zum ersten Mal eine Tumorzellexpression von MMP-9 bei der Lebermetastasierung nachgewiesen werden.

Die hier erhaltenen Ergebnisse widersprechen nicht den Untersuchungen anderer Gruppen, die sich hauptsächlich auf stromale Zellen, als Quelle von MMP-9 konzentrierten. Die Tatsache, dass andere Untersuchungen eine exklusive Expression von MMP-9 in Tumor infiltrierenden Makrophagen, in Lebermetastasen von Patienten des kolorektalen Karzinoms, nachgewiesen wurde (Illemann et al., 2006), könnte dadurch erklärt werden, dass in diesen Studien hauptsächlich synchrone Lebermetastasen untersucht wurden. Bei den hier untersuchten Proben handelte es sich ausschließlich um Proben metachroner Kolorektalkarzinom-Lebermetastasen, die als metastatische Rezidive oder als initiale Metastasen lange nach Diagnose oder der chirurgischen Entfernung des Primärtumors auftreten. Dies ist insofern interessant, da die divergenten Mmp-9 Expressionsmuster synchroner und metachroner Lebermetastasen auf eine unterschiedliche Art der Entstehung beider Metastasentypen hinweisen könnten.

In einer Studie von Derjugina et al. wurde jedoch auch für MMP-9, exprimiert durch die Tumorzellen, ein hemmender Effekt auf die Metastasierung beschrieben (Deryugina et al., 2005). In dieser Untersuchung führte die Suppression der MMP-9 Expression in den Tumorzellen mit shRNAi-Technologie zu einer Steigerung der Intravasation im Chorioallantoismembran Hühnereimodell. Das in dieser Studie verwendete Modell weist jedoch große Unterschiede zu dem Modell auf, das in dieser Arbeit verwendet wurde (Deryugina et al., 2005). Zudem wurden hier hauptsächlich die Einflüsse von Tumorzell-MMP-9 auf die späten Schritte der metastatischen Kaskade untersucht, und durch die Verwendung eines experimentellen Tumormodells wurde der Schritt der Intravasation ausgelassen. Dies belegt erneut, dass MMP-9 in den verschiedenen Phasen der Metastasierung unterschiedlich zu deren Effizienz beitragen kann.

Dies verdeutlicht, wie wichtig es war, ein Tumormodell auszuwählen das es erlaubte, die unterschiedlichen Phasen der späten metastatischen Kaskade getrennt zu betrachten. Die Wiedergabe der Dynamik der Lebermetastasierung war wichtig, um untersuchen zu können, ob MMP-9 eventuell zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich zur Metastasierung beiträgt. Durch Verwendung eines etablierten T-Zell Lymphom Modells, konnte festgestellt werden, dass die Expressionsmaxima von MMP-9 mit den Zeitpunkten der invasiven Ausbreitung der Tumorzellen korrelierten. Dies implizierte gezielte Beiträge von Tumorzell-MMP-9 zur Invasivität der Tumorzellen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der historischen Rolle von MMP-9, als Molekül, das durch Abbau der EZM die Invasion von Tumorzellen begünstigt (Liotta et al., 1980; Bjorklund und Koivunen, 2005). Die hier durchgeführten Nachweise beruhten auf der hohen Reproduzierbarkeit und der hohen

räumlichen und zeitlichen Auflösung, auf histologischer und molekularer Ebene, des verwendeten Modells. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieses Modell auch eine natürliche Immunantwort initiierte. Dies ist besonders wichtig, da bei allen untersuchten klinischen Proben von Lebermetastasen stets eine starke Infiltration von Immunzellen festgestellt wurde (Zeng und Guillem, 1996; Illemann et al., 2006). Ein weiterer Vorteil dieses Modells liegt in seiner kurzen Dauer. Andere Modelle mögen eventuell die klinische Situation besser wiedergeben, aber diese Modelle sind oft äußerst komplex und erstrecken sich über Zeiträume von mehreren Wochen (Heijstek et al., 2005). Diese Modelle sind jedoch eher geeignet den Beitrag von Mmp-9 zum Auswachsen von Metastasen oder Tumoren zu untersuchen. So konnte Gorden et al. zeigen, dass Mmp-9 exprimiert durch die Wirtszellen zum Auswachsen von Metastasen in der Leber beiträgt (Gorden et al., 2007). Auf Grund der kurzen Dauer und der hohen Aggressivität des verwendeten Modells eignet sich dieses Modell mehr für die Untersuchung invasiver Vorgänge, und ist weniger geeignet für die Bestimmung der Beiträge von Faktoren zum Auswachsen von Metastasen.

Zudem erbrachte die Kombination des verwendeten Modells mit der shRNAi Technik den Vorteil, dass Klone mit unterschiedlicher Expression von MMP-9 isoliert werden konnten, wodurch eine Korrelation der Expression von Tumorzell-MMP-9 mit dem metastatischem Potential der Tumorzellen nachgewiesen wurde. Dies zeigte eindeutig, dass Tumorzell-MMP-9 bei der Lebermetastasierung ein Zielgen einer anti-metastatischen Therapie sein könnte.

7. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die spezifische Hemmung von MMP-9 in den Tumorzellen eine effiziente anti-metastatische Wirkung erzielt werden kann. Gleichzeitig führte jedoch die spezifische Hemmung von MMP-9 in Wirtszellen zur Aktivierung eines Kompensationsmechanismus in den hämatopoietischen Zellen, in dessen Folge, durch die Anreicherung von IL-6 im Serum, die Metastasierung in die Leber gesteigert wurde. Diese Ergebnisse verdeutlichen die zweigeteilte Rolle von MMP-9 und zeigen, dass anti-metastatische Strategien, basierend auf der Hemmung von MMP-9, zwar angewandt werden können, diese aber sehr genau geplant werden müssen. Diese Arbeit zeigt auf, dass die anti-metastatische Wirkung der Hemmung von MMP-9 mit zwei unterschiedlichen Ansätzen ausgenutzt werden kann.

Eine Möglichkeit wäre die Applikation eines synthetischen Inhibitors oder Antikörpers in hoher Dosis. Diese Strategie würde zwar zur Auslösung des hier beschriebenen Kompensationsmechanismus führen, doch durch die hohe Dosis könnte die Invasivität der Tumorzellen signifikant reduziert werden und gleichzeitig würde auch das zusätzlich exprimierte MMP-9, induziert durch den Kompensationsmechanismus, gehemmt werden. Bei diesem Ansatz müsste zuerst geklärt werden, welche Folgen sich aus einer längerfristigen Applikation eines spezifischen, pharmakologischen MMP-9-Inhibitors für den Organismus ergeben würden. Eine weitaus bessere Strategie wäre eine gezielte Hemmung von MMP-9 in den Tumorzellen. Voraussetzung einer solchen Strategie wäre eine Applikationsmethode die es ermöglicht synthetische Inhibitoren gezielt in die Umgebung von Tumoren zu verbringen oder dort erst zu aktivieren. Eine solche Strategie könnte auch durch gezieltes Einbringen inhibitorischer Nukleinsäuresequenzen (z.B. shRNAs) in die Tumorzellen verwirklicht werden. Hierfür könnten beispielsweise virale Systeme verwendet werden die spezifisch Tumorzellen infizieren. Im Fall der viralen Systeme müssen jedoch erst noch Methoden entwickelt werden, die die Sicherheit dieser Systeme gewährleisten können.

Mit dieser Methode könnte die invasive Ausbreitung von Tumorzellen signifikant reduziert werden und gleichzeitig auch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Nebenwirkungen reduziert werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, kann hierdurch, durch unterbinden der Invasivität der Tumorzellen, ein bedeutender anti-metastatischer Effekt erzielt werden. Demzufolge muss es nicht immer das Ziel anti-metastatischer Therapien sein, das Tumorwachstum zu verlangsamen oder Tumorzellen abzutöten, sondern eine Verlängerung des Überlebens von Patienten könnte eventuell auch dadurch erreicht werden, wenn es gelänge, die invasive Ausbreitung von Tumorzellen zu unterbinden.

8. Literaturverzeichnis

- Acuff, H. B., Carter, K. J., Fingleton, B., Gorden, D. L., und Matrisian, L. M. (2006).** Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Res* 66, 259-266.
- Ahmad, A., and Hart, I. R. (1997).** Mechanisms of metastasis. *Crit Rev Oncol Hematol* 26, 163-173.
- Amin, H. M., McDonnell, T. J., Ma, Y., Lin, Q., Fujio, Y., Kunisada, K., Leventaki, V., Das, P., Rassidakis, G. Z., Cutler, C., et al. (2004).** Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G(1) cell cycle arrest in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene* 23, 5426-5434.
- Aoudjit, F., Masure, S., Opdenakker, G., Potworowski, E. F., und St-Pierre, Y. (1999).** Gelatinase B (MMP-9), but not its inhibitor (TIMP-1), dictates the growth rate of experimental thymic lymphoma. *Int J Cancer* 82, 743-747.
- Apte, R. N., Dotan, S., Elkabets, M., White, M. R., Reich, E., Carmi, Y., Song, X., Dvozkin, T., Krelin, Y., und Voronov, E. (2006).** The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev* 25, 387-408.
- Arlt, M., Kopitz, C., Pennington, C., Watson, K. L., Krell, H. W., Bode, W., Gansbacher, B., Khokha, R., Edwards, D. R., und Krüger, A. (2002).** Increase in Gelatinase-specificity of Matrix Metalloproteinase Inhibitors Correlates with Antimetastatic Efficacy in a T-Cell Lymphoma Model. *Cancer Res* 62, 5543-5550.
- Ashizawa, T., Okada, R., Suzuki, Y., Takagi, M., Yamazaki, T., Sumi, T., Aoki, T., und Ohnuma, S. (2005).** Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) in the spread of gastric cancer: role of IL-6 as a prognostic factor. *Gastric Cancer* 8, 124-131.
- auf dem Keller, U., Doucet, A., und Overall, C. M. (2007).** Protease research in the era of systems biology. *Biol Chem* 388, 1159-1162.
- Balkwill, F. (2004).** Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4, 540-550.
- Beart, R. W., Jr. (2007).** Multidisciplinary management of patients with advanced rectal cancer. *Clin Cancer Res* 13, 6890s-6893s.
- Belluco, C., Nitti, D., Frantz, M., Toppan, P., Basso, D., Plebani, M., Lise, M., und Jessup, J. M. (2000).** Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 7, 133-138.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., und Hanahan, D. (2000).** Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2, 737-744.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., und Hannon, G. J. (2001).** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Bird, N. C., Mangnall, D., und Majeed, A. W. (2006).** Biology of colorectal liver metastases: A review. *J Surg Oncol* 94, 68-80.
- Bjorklund, M., und Koivunen, E. (2005).** Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1755, 37-69.

- Boyle, P., und Ferlay, J. (2005).** Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 16, 481-488.
- Bramhall, S. R., Hallissey, M. T., Whiting, J., Scholefield, J., Tierney, G., Stuart, R. C., Hawkins, R. E., McCulloch, P., Maughan, T., Brown, P. D., et al. (2002).** Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial. *Br J Cancer* 86, 1864-1870.
- Brew, K., Dinakarpanian, D., und Nagase, H. (2000).** Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477, 267-283.
- Brizzi, M. F., Dentelli, P., Rosso, A., Yarden, Y., und Pegoraro, L. (1999).** STAT protein recruitment and activation in c-Kit deletion mutants. *J Biol Chem* 274, 16965-16972.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., und Agami, R. (2002a).** Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2, 243-247.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., und Agami, R. (2002b).** A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- Chambers, A. F., und Matrisian, L. M. (1997).** Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89, 1260-1270.
- Chan, C. C., Menges, M., Orzechowski, H. D., Orendain, N., Pistorius, G., Feifel, G., Zeitz, M., und Stallmach, A. (2001).** Increased matrix metalloproteinase 2 concentration and transcript expression in advanced colorectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis* 16, 133-140.
- Chantrain, C. F., Shimada, H., Jodele, S., Groshen, S., Ye, W., Shalinsky, D. R., Werb, Z., Coussens, L. M., und DeClerck, Y. A. (2004).** Stromal matrix metalloproteinase-9 regulates the vascular architecture in neuroblastoma by promoting pericyte recruitment. *Cancer Res* 64, 1675-1686.
- Chen, J., Shinkai, Y., Young, F., und Alt, F. W. (1994).** Probing immune functions in RAG-deficient mice. *Curr Opin Immunol* 6, 313-319.
- Choti, M. A., und Bulkley, G. B. (1999).** Management of hepatic metastases. *Liver Transpl Surg* 5, 65-80.
- Christodoulou, C., und Choy, E. H. (2006).** Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med* 6, 13-19.
- Christofori, G. (2006).** New signals from the invasive front. *Nature* 441, 444-450.
- Chung, Y. J., Park, B. B., Kang, Y. J., Kim, T. M., Eaves, C. J., und Oh, I. H. (2006).** Unique effects of Stat3 on the early phase of hematopoietic stem cell regeneration. *Blood* 108, 1208-1215.
- Clinchy, B., Fransson, A., Druvefors, B., Hellsten, A., Hakansson, A., Gustafsson, B., Sjodahl, R., und Hakansson, L. (2007).** Preoperative interleukin-6 production by mononuclear blood cells predicts survival after radical surgery for colorectal carcinoma. *Cancer* 109, 1742-1749.
- Conzelmann, M., Linnemann, U., und Berger, M. R. (2005).** Molecular detection of clinical colorectal cancer metastasis: how should multiple markers be put to use? *Int J Colorectal Dis* 20, 137-146.
- Coussens, L. M., Fingleton, B., und Matrisian, L. M. (2002).** Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295, 2387-2392.
- Coussens, L. M., Tinkle, C. L., Hanahan, D., und Werb, Z. (2000).** MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103, 481-490.

- Coussens, L. M., und Werb, Z. (2002).** Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860-867.
- de Visser, K. E., Korets, L. V., und Coussens, L. M. (2005).** De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* 7, 411-423.
- Deryugina, E. I., und Quigley, J. P. (2006).** Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 25, 9-34.
- Deryugina, E. I., Zijlstra, A., Partridge, J. J., Kupriyanova, T. A., Madsen, M. A., Papagiannakopoulos, T., und Quigley, J. P. (2005).** Unexpected effect of matrix metalloproteinase down-regulation on vascular intravasation and metastasis of human fibrosarcoma cells selected *in vivo* for high rates of dissemination. *Cancer Res* 65, 10959-10969.
- Desai, M. J., Kim, A., Fall, P. C., und Wang, D. (2007).** Optimizing quality of life through palliative care. *J Am Osteopath Assoc* 107, ES9-14.
- DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., und Calos, M. P. (1987).** Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7, 379-387.
- Egeblad, M., und Werb, Z. (2002).** New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-174.
- Ernst, P. B., und Gold, B. D. (2000).** The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol* 54, 615-640.
- Festuccia, C., Angelucci, A., Gravina, G. L., Biordi, L., Millimaggi, D., Muzi, P., Vicentini, C., und Bologna, M. (2005).** Epidermal growth factor modulates prostate cancer cell invasiveness regulating urokinase-type plasminogen activator activity. EGF-receptor inhibition may prevent tumor cell dissemination. *Thromb Haemost* 93, 964-975.
- Fidler, I. J. (2002).** The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation* 70, 498-505.
- Fidler, I. J. (2003).** The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3, 453-458.
- Fingleton, B. (2003).** Matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy: the current situation and future prospects. *Expert Opin Ther Targets* 7, 385-397.
- Fingleton, B. (2007).** Matrix metalloproteinases as valid clinical targets. *Curr Pharm Des* 13, 333-346.
- Fitzpatrick, F. A. (2001).** Inflammation, carcinogenesis and cancer. *Int Immunopharmacol* 1, 1651-1667.
- Folgueras, A. R., Pendas, A. M., Sanchez, L. M., und Lopez-Otin, C. (2004).** Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 48, 411-424.
- Fusai, G., und Davidson, B. R. (2003).** Management of colorectal liver metastases. *Colorectal Dis* 5, 2-23.
- Gabay, C. (2006).** Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 8 Suppl 2, S3.
- Gearing, A. J., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J., Davidson, A. H., Drummond, A. H., Galloway, W. A., Gilbert, R., Gordon, J. L., und et al. (1994).** Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* 370, 555-557.

- Geiser, A. G., Anderson, M. J., und Stanbridge, E. J. (1989).** Suppression of tumorigenicity in human cell hybrids derived from cell lines expressing different activated ras oncogenes. *Cancer Res* 49, 1572-1577.
- George, D. J., Halabi, S., Shepard, T. F., Sanford, B., Vogelzang, N. J., Small, E. J., und Kantoff, P. W. (2005).** The prognostic significance of plasma interleukin-6 levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer: results from cancer and leukemia group B 9480. *Clin Cancer Res* 11, 1815-1820.
- Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W. G., und Quaranta, V. (1997).** Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* 277, 225-228.
- Goldring, M. B., und Goldring, S. R. (2007).** Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 213, 626-634.
- Gomez, D. E., Alonso, D. F., Yoshiji, H., und Thorgeirsson, U. P. (1997).** Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74, 111-122.
- Gorden, D. L., Fingleton, B., Crawford, H. C., Jansen, D. E., Lepage, M., und Matrisian, L. M. (2007).** Resident stromal cell-derived MMP-9 promotes the growth of colorectal metastases in the liver microenvironment. *Int J Cancer* 121, 495-500.
- Gotoh, A., Takahira, H., Mantel, C., Litz-Jackson, S., Boswell, H. S., und Broxmeyer, H. E. (1996).** Steel factor induces serine phosphorylation of Stat3 in human growth factor-dependent myeloid cell lines. *Blood* 88, 138-145.
- Grams, F., Brandstetter, H., D'Alo, S., Geppert, D., Krell, H. W., Leinert, H., Livi, V., Menta, E., Oliva, A., Zimmermann, G., et al. (2001).** Pyrimidine-2,4,6-Triones: a new effective and selective class of matrix metalloproteinase inhibitors. *Biol Chem* 382, 1277-1285.
- Gress, T. M., Muller-Pillasch, F., Lerch, M. M., Friess, H., Buchler, M., und Adler, G. (1995).** Expression and in-situ localization of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 62, 407-413.
- Gupta, G. P., und Massague, J. (2006).** Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679-695.
- Guy, C. T., Cardiff, R. D., und Muller, W. J. (1992).** Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol Cell Biol* 12, 954-961.
- Hamano, Y., Zeisberg, M., Sugimoto, H., Lively, J. C., Maeshima, Y., Yang, C., Hynes, R. O., Werb, Z., Sudhakar, A., und Kalluri, R. (2003).** Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell* 3, 589-601.
- Hamilton, A. J., und Baulcombe, D. C. (1999).** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- Hanahan, D., und Weinberg, R. A. (2000).** The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Handsley, M. M., und Edwards, D. R. (2005).** Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 115, 849-860.

- Heath, E. I., Burtness, B. A., Kleinberg, L., Salem, R. R., Yang, S. C., Heitmiller, R. F., Canto, M. I., Knisely, J. P., Topazian, M., Montgomery, E., et al. (2006).** Phase II, parallel-design study of preoperative combined modality therapy and the matrix metalloprotease (mmp) inhibitor prinomastat in patients with esophageal adenocarcinoma. *Invest New Drugs* 24, 135-140.
- Heijstek, M. W., Kranenburg, O., and Borel Rinkes, I. H. (2005).** Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Dig Surg* 22, 16-25.
- Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M. A., et al. (2002).** Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109, 625-637.
- Heissig, B., Werb, Z., Rafii, S., and Hattori, K. (2003).** Role of c-kit/Kit ligand signaling in regulating vasculogenesis. *Thromb Haemost* 90, 570-576.
- Hidalgo, M., and Eckhardt, S. G. (2001).** Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 93, 178-193.
- Hiratsuka, S., Nakamura, K., Iwai, S., Murakami, M., Itoh, T., Kijima, H., Shipley, J. M., Senior, R. M., and Shibuya, M. (2002).** MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2, 289-300.
- Holmbeck, K., Bianco, P., Caterina, J., Yamada, S., Kromer, M., Kuznetsov, S. A., Mankani, M., Robey, P. G., Poole, A. R., Pidoux, I., et al. (1999).** MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 99, 81-92.
- Hua, J., and Muschel, R. J. (1996).** Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system. *Cancer Res* 56, 5279-5284.
- Huber, M. A., Kraut, N., and Beug, H. (2005).** Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17, 548-558.
- Hunter, K., Welch, D. R., and Liu, E. T. (2003).** Genetic background is an important determinant of metastatic potential. *Nat Genet* 34, 23-24; author reply 25.
- Illemann, M., Bird, N., Majeed, A., Sehested, M., Laerum, O. D., Lund, L. R., Dano, K., and Nielsen, B. S. (2006).** MMP-9 is differentially expressed in primary human colorectal adenocarcinomas and their metastases. *Mol Cancer Res* 4, 293-302.
- Ito, T., and Ikeda, U. (2003).** Inflammatory cytokines and cardiovascular disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2, 257-265.
- Itoh, T., Tanioka, M., Matsuda, H., Nishimoto, H., Yoshioka, T., Suzuki, R., and Uehira, M. (1999).** Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin Exp Metastasis* 17, 177-181.
- Itoh, T., Tanioka, M., Yoshida, H., Yoshioka, T., Nishimoto, H., and Itohara, S. (1998).** Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 58, 1048-1051.
- Jaeck, D., Bachellier, P., Guiguet, M., Feldo, M., Vaillant, J. C., Balladur, P., and Nordlinger, B. (1997).** Survival benefit of repeat liver resection for recurrent colorectal metastases: 143 cases. *Wiad Lek* 50 Suppl 1 Pt 1, 102-104.
- Jainchill, J. L., Aaronson, S. A., and Todaro, G. J. (1969).** Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* 4, 549-553.

- Jamison, R. L., Donohue, J. H., Nagorney, D. M., Rosen, C. B., Harmsen, W. S., and Ilstrup, D. M. (1997).** Hepatic resection for metastatic colorectal cancer results in cure for some patients. *Arch Surg* 132, 505-510; discussion 511.
- Kaplan, R. N., Psaila, B., and Lyden, D. (2006a).** Bone marrow cells in the 'pre-metastatic niche': within bone and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 25, 521-529.
- Kaplan, R. N., Rafii, S., and Lyden, D. (2006b).** Preparing the "soil": the premetastatic niche. *Cancer Res* 66, 11089-11093.
- Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D. D., Jin, D. K., Shido, K., Kerns, S. A., et al. (2005).** VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438, 820-827.
- Kleifeld, O., Kotra, L. P., Gervasi, D. C., Brown, S., Bernardo, M. M., Fridman, R., Mobashery, S., and Sagi, I. (2001).** X-ray absorption studies of human matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) bound to a highly selective mechanism-based inhibitor. comparison with the latent and active forms of the enzyme. *J Biol Chem* 276, 17125-17131.
- Knupfer, H., and Preiss, R. (2007).** Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). *Breast Cancer Res Treat* 102, 129-135.
- Koki, A. T., and Masferrer, J. L. (2002).** Celecoxib: a specific COX-2 inhibitor with anticancer properties. *Cancer Control* 9, 28-35.
- Kollet, O., Shivtiel, S., Chen, Y. Q., Suriawinata, J., Thung, S. N., Dabeva, M. D., Kahn, J., Spiegel, A., Dar, A., Samira, S., et al. (2003).** HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 112, 160-169.
- Kopitz, C., Anton, M., Gansbacher, B., and Krüger, A. (2005).** Reduction of experimental human fibrosarcoma lung metastasis in mice by adenovirus-mediated cystatin C overexpression in the host. *Cancer Res* 65, 8608-8612.
- Kopitz, C., Gerg, M., Bandapalli, O. R., Ister, D., Pennington, C. J., Hauser, S., Flechsig, C., Krell, H. W., Antolovic, D., Brew, K., et al. (2007).** Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. *Cancer Res* 67, 8615-8623.
- Kosmider, S., and Lipton, L. (2007).** Adjuvant therapies for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 13, 3799-3805.
- Kossakowska, A. E., Edwards, D. R., Prusinkiewicz, C., Zhang, M. C., Guo, D., Urbanski, S. J., Grogan, T., Marquez, L. A., and Janowska-Wieczorek, A. (1999).** Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 94, 2080-2089.
- Krelin, Y., Voronov, E., Dotan, S., Elkabets, M., Reich, E., Fogel, M., Huszar, M., Iwakura, Y., Segal, S., Dinarello, C. A., and Apte, R. N. (2007).** Interleukin-1beta-driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. *Cancer Res* 67, 1062-1071.
- Krüger, A., Arlt, M. J., Gerg, M., Kopitz, C., Bernardo, M. M., Chang, M., Mobashery, S., and Fridman, R. (2005).** Antimetastatic activity of a novel mechanism-based gelatinase inhibitor. *Cancer Res* 65, 3523-3526.

- Krüger, A., Schirmacher, V., und Khokha, R. (1998).** The bacterial *lacZ* gene: an important tool for metastasis research and evaluation of new cancer therapies. *Cancer Metastasis Rev* 17, 285-294.
- Krüger, A., Schirmacher, V., und von Hoegen, P. (1994).** Scattered micrometastases visualized at the single-cell level: detection and re-isolation of *lacZ*-labeled metastasized lymphoma cells. *Int J Cancer* 58, 275-284.
- Krüger, A., Soeltl, R., Sopov, I., Kopitz, C., Arlt, M., Magdolen, V., Harbeck, N., Gansbacher, B., und Schmitt, M. (2001).** Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor batimastat promotes liver metastasis. *Cancer Res* 61, 1272-1275.
- Lang, R. (2005).** Tuning of macrophage responses by Stat3-inducing cytokines: molecular mechanisms and consequences in infection. *Immunobiology* 210, 63-76.
- Lauta, V. M. (2001).** Interleukin-6 and the network of several cytokines in multiple myeloma: an overview of clinical and experimental data. *Cytokine* 16, 79-86.
- Lebeau, A., Nerlich, A. G., Sauer, U., Lichtinghagen, R., und Lohrs, U. (1999).** Tissue distribution of major matrix metalloproteinases and their transcripts in human breast carcinomas. *Anticancer Res* 19, 4257-4264.
- Lemaitre, V., und D'Armiento, J. (2006).** Matrix metalloproteinases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78, 1-10.
- Levi, E., Fridman, R., Miao, H. Q., Ma, Y. S., Yayon, A., und Vlodavsky, I. (1996).** Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7069-7074.
- Levy, A. T., Cioce, V., Sobel, M. E., Garbisa, S., Grigioni, W. F., Liotta, L. A., und Stetler-Stevenson, W. G. (1991).** Increased expression of the Mr 72,000 type IV collagenase in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res* 51, 439-444.
- Lin, T., Zhang, W., Fan, Y., und Mulholland, M. (2007).** Interleukin-1beta and interleukin-6 stimulate matrix metalloproteinase-9 secretion in cultured myenteric glia. *J Surg Res* 137, 38-45.
- Liotta, L. A., und Stetler-Stevenson, W. G. (1990).** Metalloproteinases and cancer invasion. *Semin Cancer Biol* 1, 99-106.
- Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C. M., und Shafie, S. (1980).** Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284, 67-68.
- London, C. A., Sekhon, H. S., Arora, V., Stein, D. A., Iversen, P. L., und Devi, G. R. (2003).** A novel antisense inhibitor of MMP-9 attenuates angiogenesis, human prostate cancer cell invasion and tumorigenicity. *Cancer Gene Ther* 10, 823-832.
- Lopez-Otin, C., und Matrisian, L. M. (2007).** Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 7, 800-808.
- Lubbe, W. J., Zhou, Z. Y., Fu, W., Zuzga, D., Schulz, S., Fridman, R., Muschel, R. J., Waldman, S. A., und Pitari, G. M. (2006).** Tumor epithelial cell matrix metalloproteinase 9 is a target for antimetastatic therapy in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 12, 1876-1882.
- Lund, L. R., Romer, J., Bugge, T. H., Nielsen, B. S., Frandsen, T. L., Degen, J. L., Stephens, R. W., und Dano, K. (1999).** Functional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing. *Embo J* 18, 4645-4656.

- Manes, S., Llorente, M., Lacalle, R. A., Gomez-Mouton, C., Kremer, L., Mira, E., und Martinez, A. C. (1999).** The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J Biol Chem* 274, 6935-6945.
- Mantovani, A., Schioppa, T., Porta, C., Allavena, P., und Sica, A. (2006).** Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 25, 315-322.
- Martin, M. D., Carter, K. J., Jean-Philippe, S. R., Chang, M., Mobashery, S., Thiolloy, S., Lynch, C. C., Matrisian, L. M., und Fingleton, B. (2008).** Effect of ablation or inhibition of stromal matrix metalloproteinase-9 on lung metastasis in a breast cancer model is dependent on genetic background. *Cancer Res* 68, 6251-6259.
- McCawley, L. J., und Matrisian, L. M. (2001).** Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 13, 534-540.
- McQuibban, G. A., Butler, G. S., Gong, J. H., Bendall, L., Power, C., Clark-Lewis, I., und Overall, C. M. (2001).** Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem* 276, 43503-43508.
- McQuibban, G. A., Gong, J. H., Tam, E. M., McCulloch, C. A., Clark-Lewis, I., und Overall, C. M. (2000).** Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 289, 1202-1206.
- Mook, O. R., Frederiks, W. M., und Van Noorden, C. J. (2004).** The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1705, 69-89.
- Mott, J. D., und Werb, Z. (2004).** Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16, 558-564.
- Nagase, H. (1997).** Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 378, 151-160.
- Nagase, H., Visse, R., und Murphy, G. (2006).** Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69, 562-573.
- Nagase, H., und Woessner, J. F., Jr. (1999).** Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274, 21491-21494.
- Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L., und Matrisian, L. M. (2000).** Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18, 1135-1149.
- Nemunaitis, J., Poole, C., Primrose, J., Rosemurgy, A., Malfetano, J., Brown, P., Berrington, A., Cornish, A., Lynch, K., Rasmussen, H., *et al.* (1998).** Combined analysis of studies of the effects of the matrix metalloproteinase inhibitor marimastat on serum tumor markers in advanced cancer: selection of a biologically active and tolerable dose for longer-term studies. *Clin Cancer Res* 4, 1101-1109.
- Newell, K. J., Witty, J. P., Rodgers, W. H., und Matrisian, L. M. (1994).** Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis. *Mol Carcinog* 10, 199-206.
- Nguyen, T. H. (2004).** Mechanisms of metastasis. *Clin Dermatol* 22, 209-216.
- Niu, G., Heller, R., Catlett-Falcone, R., Coppola, D., Jaroszeski, M., Dalton, W., Jove, R., und Yu, H. (1999).** Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor *in vivo*. *Cancer Res* 59, 5059-5063.

- Ogata, Y., Enghild, J. J., und Nagase, H. (1992).** Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 267, 3581-3584.
- Opdenakker, G., Van den Steen, P. E., und Van Damme, J. (2001).** Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol* 22, 571-579.
- Ornstein, D. L., und Cohn, K. H. (2002).** Balance between activation and inhibition of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is altered in colorectal tumors compared to normal colonic epithelium. *Dig Dis Sci* 47, 1821-1830.
- Overall, C. M., und Dean, R. A. (2006).** Degradomics: Systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 25, 69-75.
- Overall, C. M., und Kleifeld, O. (2006a).** Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy. *Br J Cancer* 94, 941-946.
- Overall, C. M., und Kleifeld, O. (2006b).** Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 6, 227-239.
- Pantel, K., und Brakenhoff, R. H. (2004).** Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 4, 448-456.
- Parkin, D. M. (2001).** Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2, 533-543.
- Pavlaki, M., und Zucker, S. (2003).** Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPIs): the beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials. *Cancer Metastasis Rev* 22, 177-203.
- Pearson, B., Wolf, P.L., und Vazquez, J. (1963)** A Comparative Study of a series of new indolyl compounds to lacolize beta-Galactosidase in tissues. *Lab Invest.* 12,1249-59.
- Polette, M., Gilbert, N., Stas, I., Nawrocki, B., Noel, A., Remacle, A., Stetler-Stevenson, W. G., Birembaut, P., und Foidart, M. (1994).** Gelatinase A expression and localization in human breast cancers. An in situ hybridization study and immunohistochemical detection using confocal microscopy. *Virchows Arch* 424, 641-645.
- Polette, M., Nawrocki-Raby, B., Gilles, C., Clavel, C., und Birembaut, P. (2004).** Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oncol Hematol* 49, 179-186.
- Pyke, C., Ralfkiaer, E., Huhtala, P., Hurskainen, T., Dano, K., und Tryggvason, K. (1992).** Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res* 52, 1336-1341.
- Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S., und Golub, T. R. (2003).** A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33, 49-54.
- Ranuncolo, S. M., Armanasco, E., Cresta, C., Bal De Kier Joffe, E., und Puricelli, L. (2003).** Plasma MMP-9 (92 kDa-MMP) activity is useful in the follow-up and in the assessment of prognosis in breast cancer patients. *Int J Cancer* 106, 745-751.
- Rasheed, S., Nelson-Rees, W. A., Toth, E. M., Arnstein, P., und Gardner, M. B. (1974).** Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* 33, 1027-1033.
- Rasmussen, H. S., und McCann, P. P. (1997).** Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on batimastat and marimastat. *Pharmacol Ther* 75, 69-75.

- Reber, L., Da Silva, C. A., und Frossard, N. (2006).** Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol* 533, 327-340.
- Rees, M., Plant, G., und Bygrave, S. (1997).** Late results justify resection for multiple hepatic metastases from colorectal cancer. *Br J Surg* 84, 1136-1140.
- Ren, X., Hogaboam, C., Carpenter, A., und Colletti, L. (2003).** Stem cell factor restores hepatocyte proliferation in IL-6 knockout mice following 70% hepatectomy. *J Clin Invest* 112, 1407-1418.
- Rose-John, S., Waetzig, G. H., Scheller, J., Grotzinger, J., und Seegert, D. (2007).** The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 11, 613-624.
- Schonbeck, U., Mach, F., und Libby, P. (1998).** Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol* 161, 3340-3346.
- Shacter, E., und Weitzman, S. A. (2002).** Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park)* 16, 217-226, 229; discussion 230-212.
- Shariat, S. F., Bensalah, K., Karam, J. A., Roehrborn, C. G., Gallina, A., Lotan, Y., Slawin, K. M., und Karakiewicz, P. I. (2007).** Preoperative plasma HER2 and epidermal growth factor receptor for staging and prognostication in patients with clinically localized prostate cancer. *Clin Cancer Res* 13, 5377-5384.
- Shirabe, K., Takenaka, K., Gion, T., Fujiwara, Y., Shimada, M., Yanaga, K., Maeda, T., Kajiyama, K., und Sugimachi, K. (1997).** Analysis of prognostic risk factors in hepatic resection for metastatic colorectal carcinoma with special reference to the surgical margin. *Br J Surg* 84, 1077-1080.
- Sica, A., Rubino, L., Mancino, A., Larghi, P., Porta, C., Rimoldi, M., Solinas, G., Locati, M., Allavena, P., und Mantovani, A. (2007).** Targeting tumour-associated macrophages. *Expert Opin Ther Targets* 11, 1219-1229.
- Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M., und Kingsman, A. J. (1995).** A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* 23, 628-633.
- Sorsa, T., Tjaderhane, L., und Salo, T. (2004).** Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis* 10, 311-318.
- Stamenkovic, I. (2000).** Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 10, 415-433.
- Stamenkovic, I. (2003).** Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 200, 448-464.
- Sternlicht, M. D., and Werb, Z. (2001).** How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516.
- Streuli, C. (1999).** Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 11, 634-640.
- Strongin, A. Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B. L., Grant, G. A., und Goldberg, G. I. (1995).** Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270, 5331-5338.

- Sunami, E., Tsuno, N., Osada, T., Saito, S., Kitayama, J., Tomozawa, S., Tsuruo, T., Shibata, Y., Muto, T., und Nagawa, H. (2000).** MMP-1 is a prognostic marker for hematogenous metastasis of colorectal cancer. *Oncologist* 5, 108-114.
- Talvensaari-Mattila, A., Paakko, P., und Turpeenniemi-Hujanen, T. (1999).** MMP-2 positivity and age less than 40 years increases the risk for recurrence in premenopausal patients with node-positive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 58, 287-293.
- Tchetverikov, I., Lard, L. R., DeGroot, J., Verzijl, N., TeKoppele, J. M., Breedveld, F. C., Huizinga, T. W., und Hanemaaijer, R. (2003).** Matrix metalloproteinases-3, -8, -9 as markers of disease activity and joint damage progression in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 62, 1094-1099.
- Tlsty, T. D., und Coussens, L. M. (2006).** Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol* 1, 119-150.
- Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P., und Sharp, P. A. (1999).** Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* 13, 3191-3197.
- van den Oord, J. J., Paemen, L., Opdenakker, G., und de Wolf-Peeters, C. (1997).** Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. *Am J Pathol* 151, 665-670.
- Van den Steen, P. E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P. M., Dwek, R. A., und Opdenakker, G. (2002).** Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37, 375-536.
- Van den Steen, P. E., Proost, P., Wuyts, A., Van Damme, J., und Opdenakker, G. (2000).** Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96, 2673-2681.
- Vihinen, P., und Kahari, V. M. (2002).** Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* 99, 157-166.
- Visse, R., und Nagase, H. (2003).** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92, 827-839.
- Vu, T. H., Shipley, J. M., Bergers, G., Berger, J. E., Helms, J. A., Hanahan, D., Shapiro, S. D., Senior, R. M., und Werb, Z. (1998).** MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93, 411-422.
- Wagenaar-Miller, R. A., Gorden, L., und Matrisian, L. M. (2004).** Matrix metalloproteinases in colorectal cancer: is it worth talking about? *Cancer Metastasis Rev* 23, 119-135.
- Wagener, C. (1999).** *Molekulare Onkologie*, 2 edn (Stuttgart, Georg Thieme Verlag).
- Weinberg, R. A. (2006).** *The Biology of Cancer*, 1 edn (New York, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC).
- Xu, J., Rodriguez, D., Petitclerc, E., Kim, J. J., Hangai, M., Moon, Y. S., Davis, G. E., Brooks, P. C., und Yuen, S. M. (2001).** Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *J Cell Biol* 154, 1069-1079.
- Yee, J. K., Miyahara, A., LaPorte, P., Bouic, K., Burns, J. C., und Friedmann, T. (1994).** A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9564-9568.

- Yu, Q., und Stamenkovic, I. (2000).** Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14, 163-176.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., und Bartel, D. P. (2000).** RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.
- Zeng, Z. S., und Guillem, J. G. (1995).** Distinct pattern of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 mRNA expression in human colorectal cancer and liver metastases. *Br J Cancer* 72, 575-582.
- Zeng, Z. S., und Guillem, J. G. (1996).** Colocalisation of matrix metalloproteinase-9-mRNA and protein in human colorectal cancer stromal cells. *Br J Cancer* 74, 1161-1167.
- Zeng, Z. S., Huang, Y., Cohen, A. M., und Guillem, J. G. (1996).** Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase-9. *J Clin Oncol* 14, 3133-3140.
- Zucker, S., Cao, J., und Chen, W. T. (2000).** Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* 19, 6642-6650.
- Zucker, S., und Vacirca, J. (2004).** Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23, 101-117.
- zur Hausen, H. (2003).** Krebs, eine Herausforderung für die Forschung. *Spektrum der Wissenschaft Spezial Krebsmedizin II*, 6-11.

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 2.1: Die metastatische Kaskade	11
Abbildung 2.2: Darstellung des schematischen Aufbaus der MMPs	16
Tab. 4.1: Zellkulturmedien der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien	38
Tabelle 4.2 Agarosekonzentrationen für die Separationen von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe	52
Tabelle 4.3: Zusammenfassung der Restriktionsverdau	53
Tabelle 4.4: Zusammenfassung der Ligationsansätze	55
Abbildung 4.1 Aufbau der verwendeten shRNAs	56
Tabelle 4.5: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel bei der Zymographie	63
Tabelle 4.6: Zusammensetzung von Trenngel (10 %) und Sammelgel bei den Western Analysen	64
Tabelle 4.7: Verdünnung der bei Western Analysen verwendeten Antikörper	65
Tabelle 4.8: Antikörperverdünnungen IHC	68
Abbildung 5.1: Veränderung der Genexpressionssignatur metastasierungsassoziierter Gene durch den <i>knockout</i> von <i>Mmp-9</i>	72
Abbildung 5.2: Der <i>knockout</i> von <i>Mmp-9</i> induziert die Aktivität des <i>Mmp-9</i> -Promotors	73
Abbildung 5.3: Induktion der Lebermetastasierung von CT26-L murinen Kolonrektalkarzinomzellen durch den <i>knockout</i> von <i>Mmp-9</i>	75
Abbildung 5.4: Induktion der Lebermetastasierung von HT1080 humanen Fibrosarkomzellen durch den <i>knockout</i> von <i>Mmp-9</i>	77
Abbildung 5.5: Der <i>knockout</i> von <i>Mmp-9</i> fördert die Lebermetastasierung von L-CI.5s T-Zell Lymphomzellen	78
Abbildung 5.6: Induktion von Migration und Matrigel™-Invasion von L-CI.5s Zellen durch rekombinantes IL-6	80
Abbildung 5.7: Induktion der Invasion und Migration von CT26- und HT1080-Zellen durch IL-6	81
Abbildung 5.8: Induktion der IL-6 Expression in hämatopoietischen Zellen und erhöhte IL-6 Serumlevel in <i>Mmp-9-knockout</i> Mäusen	83
Abbildung 5.9: Induktion der Stat3 Signaltransduktion in Knochenmarkzellen von <i>Mmp-9</i> - defizienten Mäusen	85
Abbildung 5.10: Induktion der IL-6 Expression in <i>Mmp-9</i> -defizienten Knochenmarkzellen	86
Abbildung 5.11: Kompensation der reduzierten KitL/c-Kit Signaltransduktion durch Induktion der IL-6 Expression in Knochenmarkzellen	87
Abbildung 5.12: Induktion der IL-6 Expression in Knochenmarkzellen durch spezifische Hemmung von <i>Mmp-9</i>	89
Abbildung 5.13: Induktion der <i>Mmp-9</i> Expression in Tumorzelllinien durch Inkubation mit rekombinatem IL-6	90
Abbildung 5.14: Nachweis der Induzierbarkeit des <i>Mmp-9</i> Promotorkonstruktes in L-CI.5s- Zellen	92
Abbildung 5.15: Induktion der <i>Mmp-9</i> mRNA Expression in den Tumorzellen durch die Mikroumgebung der <i>Mmp-9</i> -defizienten Mäuse	93
Abbildung 5.16: Design der shRNAs gegen murines <i>Mmp-9</i>	94
Abbildung 5.17: Nachweis der <i>knockdown</i> Effizienzen der shRNA kodierenden retroviralen Vektoren in murinen Fibroblasten	95
Abbildung 5.18: <i>Knockdown</i> von <i>Mmp-9</i> mRNA in L-CI.5s T-Zell Lymphom Zellen	96
Abbildung 5.19: Suppression des Metastasierungs-fördernden Effekts der <i>Mmp-9</i> -defizienten Mikroumgebung durch den <i>knockdown</i> von <i>Mmp-9</i> in den Tumorzellen	97

Abbildung 5.20: Lokalisation von <i>MMP-9</i> mRNA Expression in den Tumorzellen von Lebermetastasen von Kolorektalkarzinompatienten	99
Abbildung 5.21: Korrelation der <i>Mmp-9</i> Expression mit den invasiven Phasen eines T-Zell Lymphom <i>in vivo</i> Invasions-Modells.....	102
Abbildung 5.22: Lokalisation von <i>Mmp-9</i> in L-CI.5s T-Zell Lymphomzellen <i>in vivo</i>	104
Abbildung 5.23: Nachweis von <i>Mmp-9 knockdown</i> und Überexpression in L-CI.5s-Zellen <i>in vitro</i>	105
Abbildung 5.24: Förderung der Metastasierung der Leber durch Tumorzell- <i>Mmp-9</i>	106
Abbildung 5.25: Förderung der Mikrometastasierung der Leber durch Tumorzell- <i>Mmp-9</i>	107
Abbildung 5.26: Nachweis der Heterogenität der <i>Mmp-9 knockdown</i> Zelllinie	108
Abbildung 5.27: Korrelation zwischen der Tumorzell- <i>Mmp-9</i> Expression und dem metastatischen Potential der Tumorzellen bei der Lebermetastasierung	110
Abbildung 6.1: Veränderung der Homöostase durch eine spezifische Hemmung von <i>MMP-9</i>	113
Abbildung 6.2: Das extrazelluläre regulatorische Netzwerk aus Proteasen und ihren Substraten	120
Abbildung 6.3: Kompensation der reduzierten Signaltransduktion von <i>KitL/c-Kit</i> in <i>Mmp-9</i> -defizienten Mäusen durch <i>IL-6</i>	123

10. Abkürzungsverzeichnis

Arg	Arginin
Asp	Asparagin
BBMM	<i>basal bonemarrow medium</i>
BCA	Bizinkoniniksäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum Albumin
CBD	<i>collagen binding domain</i>
CD	<i>Caesarean derived</i> (CD1nu/nu)
CD	<i>cluster of differentiation</i> ; Differenzierungsmarker
cDNA	codogene DNA
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i> , Kälber intestinale alkaline Phosphatase
CysC	Cystatin C
DEPC	Diethylen-Pyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbeccos modified Eagles Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethyl diamintetraacetat
Egf	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMT	epitheliale mesenchymale Transition
EtOH	Ethanol
env	<i>envelope</i> Proteine
EZM	extrazelluläre Matrix
FAM	Carboxylfluorescein
FKS	Fötale Kälberserum
gag	gruppenspezifisches Antigen
HEBS	<i>HEPES buffered saline</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney cells</i> , humane embryonale Nierenzellen
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfon-Säure
HGF	<i>Hepatocyte growth factor, scatter factor</i> , Hepatozyten Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
IMEM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>

i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MEM	<i>modified Eagles medium</i>
mg	Milligram
ml	Milliliter
MMP	Matrix Metalloproteinase
MMPI	Matrix Metalloproteinase Inhibitor
MR	<i>magnetic resonance</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MT-MMP	Membran Typ-Matrix Metalloproteinase
mu	murin
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
PAA	Polyakrylamid
pA, polyA	Polyadenylierungssignal
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCI	Phenolchloroformisoamylalkohol
P_{CMV}	CMV Promotor
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasen-Kettenreaktion
pg	Pikogramm
pol	Polymerase
PymT	Polyoma middle T
RISC	<i>RNAi induced silencing complex</i>
RT	Raumtemperatur
SDF	<i>stromal cell derived factor</i>
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i>
siRNA	<i>small inhibitory RNA</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
US	Ultraschall
UTAP	<i>CT during arterial portography</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TAMRA	Tetramethylrhodanin-5-carbonyl-azid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer

TGF	<i>transforming growth factor</i> , transformierender Wachstumsfaktor
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNFα	Tumor Nekrose Faktor α
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn *Prof. Dr. Achim Krüger* für die außerordentliche Betreuung und für die Möglichkeit, meine Arbeit unter seiner Leitung durchgeführt zu haben. Seine enorme Unterstützung und seine vielen kritischen Ratschläge trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Mein Dank gilt weiterhin Frau *Prof. Dr. Hannelore Daniel* für ihre Unterstützung und ihre Betreuung dieser Arbeit. Ohne ihre Hilfe wäre die Anfertigung dieser Arbeit am Klinikum rechts der Isar nicht möglich gewesen.

Bei Herrn *Prof. Dr. Bernd Gänsbacher* bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München, und für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut durchgeführt haben zu können.

Bei Frau *Dr. Charlotte Kopitz* möchte ich mich für die ihre fachlichen Ratschläge und für ihre Hilfe beim Schreiben mehrerer wissenschaftlicher Publikationen bedanken.

Frau *Dr. Susanne Schaten* bin ich dankbar für die Einarbeitung in die Techniken der Immunhistochemie und der *in situ* Hybridisierung.

Den Technischen Assistentinnen Frau *Stephanie Hahn*, Frau *Mareike Lehnhoff* und Frau *Katja Honert* möchte ich ganz herzlich für die tatkräftige technische Unterstützung danken. Bei Frau *Katja Honert* möchte ich mich zudem für die Einarbeitung in die Zellkulturtechniken bedanken.

Zusätzlich möchte ich mich ganz besonders bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, insbesondere bei Herrn *Dr. Matthias Arlt*, für die Unterstützung bei den Tierversuchen, kritische Anmerkungen und hilfreiche Diskussionen bedanken.

Für die Serviceleistungen die die Versuchsdurchführungen wesentlich erleichtert haben möchte ich Herr *Josef Straßmair*, Herrn *Anton Steger* und stellvertretend für alle Mitarbeiter des Tierstalles Frau *Rosi Bergmeyer* danken.

Stellvertretend für die Sekretärinnen möchte ich mich bei Frau *Brigitte Kätzel* bedanken, die für einen reibungslosen Ablauf verwaltungstechnischer Vorgänge gesorgt hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau *Prof. Dr. Lisa Coussens* für die Überlassung der *Mmp-9-knockout* Mäuse. Ohne diesen Beitrag wäre die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn *Prof. Dr. Dylan Edwards* möchte ich für die Bereitstellung des Plasmids pBS-Gel2-SK, der Sequenz der murinen Mmp-9 TaqMan™ Primer und Probe Sequenzen und für die Einführung in die TaqMan™-Technologie danken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn *PD Dr. Björn Brücher*, Herrn *Dr. Manfred Stangl*, Herrn *PD Dr. Karsten Brand*, Herrn *Dipl. Biol. Christoph Kahlert* und Herrn *Claus Hann von Weyhern* für die Überlassung der Patientenproben bedanken.

Bei Herrn *Prof. Dr. Yves St-Pierre* bedanke ich mich für die Bereitstellung des murin *Mmp-9/Luciferase* Promotorkonstruktes.

Mein besonderer Dank gilt Frau *cand. med. Laura Bickel* und Herrn *Dipl. Ing. Florian Schelter* für das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit bedanke ich mich bei der Deutschen Krebshilfe, Mildred Scheel Stiftung, an *Prof. Dr. Achim Krüger*, sowie dem *Cancerdegradom* des *Framework Programme 6* der Europäischen Union an *Prof. Dr. Achim Krüger*.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern *Siglinde* und *Reinhold Gerg* für ihre grenzenlose Unterstützung und für die Förderung meines Weges bedanken.

12. Anhang

I. Verzeichnis der Bezugsquellen von Chemikalien und Reagenzien

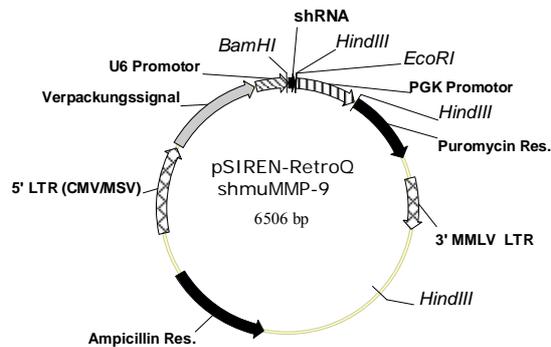
Absolve	Nen™ life Science Products, Zaventem, Belgien
Agarose (Gelelektrophorese) SeaKem® LE Agarose	Cambrex, Rockland, USA
Ampicillin, Ampicillin-Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat, $\geq 98\%$, $H_8N_2O_8S_2$)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Avidin	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
Bacto™ Agar	BD, Heidelberg, Deutschland
Bacto™ Tryptone	BD, Heidelberg, Deutschland
Bact™ Yeast Extract	BD, Heidelberg, Deutschland
Biotin	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Bromphenolblau (3', 3'', 5', 5''- Tetrabromphenolsulfon-phthalein, $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$), Für die Molekularbiologie	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
<i>calf intestine alkaline phosphatase</i> (CIAP), 1U/ μ	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Chloroform	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
CIAP Puffer (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Coomassie® Brilliant Blau R-250	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4), Zur Analyse	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dimethylformamid (DMF), Für die Molekularbiologie, 99%	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO, C_2H_6OS), Sterilfiltriert	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), Zur Analyse	Merck, Schwalbach, Deutschland
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DTT (1,4-Dithio-DL-threitol, $C_4H_{10}O_2S_2$)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$, Ethylendiamintetraessigsäure) reinst	Merck, Schwalbach, Deutschland
Eisessig (Essigsäure, CH_3COOH) zur Analyse, 100%, wasserfrei	Merck, Schwalbach, Deutschland
Ethanol (EtOH, C_2H_5OH) Zur Analyse, > 99,9%	Merck, Schwalbach, Deutschland
Ethidiumbromid ($C_{12}H_{20}BrN_3$)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Formaldehyd (Formalin, CH_2O), 36,5-38% (w/v)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Formamid	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Fungizone (500 x, Amphotericin B)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland

G418 (Neomycin Analogon)	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Gelatin (from porcine scin)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Gibco™Opti-MEM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glutaraldehyd (C ₅ H ₈ O ₂), 50% (w/v), Photographic grade	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
HEPES (N-(2-Hydroxyethyl-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure, C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S), > 99,5%	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HeringSperm DNA	Roche, Mannheim, Deutschland
Isopropanol, Für technische und Laborzwecke	Apotheke des Klinikums rechts der Isar
Kaiser's Glycerin Gelatine	Merck, Schwalbach, Deutschland
Kaliumacetat (K-Acetat, C ₂ H ₃ KO ₂), reinst	Fluka, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid (KCl), > 99,5%	Fluka, Buchs, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Fluka, Buchs, Schweiz
Kaliumferricyanid (K ₃ Fe(CN) ₆), Minimum 99%	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Kaliumferrocyanid (K ₄ Fe(CN) ₆), Minimum 99%	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Kalziumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ x 2H ₂ O), zur Analyse	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂), zur Analyse	Merck, Schwalbach, Deutschland
Magnesiumchloridhexahydrat (MgCl x 6 H ₂ O)	Merck, Schwalbach, Deutschland
Magnesiumsulfatheptahydrat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	Merck, Schwalbach, Deutschland
Mayer's Hämalaun Lösung	Apotheke des Klinikums rechts der Isar
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Methanol, zur Analyse, >99,8 %	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Methyl-Paraben	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Na-Acetat (CH ₃ COONa), Wasserfrei, zur Analyse	Merck, Schwalbach, Deutschland
Natrium-Carboxymethylzellulose	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl), reinst	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Natriumcitrat (Na-Citrat, Tri-Natriumcitrat dihydrat, C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2 H ₂ O), Für die Molekularbiologie	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Deoxycholat (C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄), >98,5%	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS, C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S), Ultra, > 99%	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO ₃)	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid (NaOH), reinst	Merck, Schwalbach, Deutschland
Nonidet P40 (Nonylphenylpolyethylenglykol, NP40)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
OCT-compound	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande

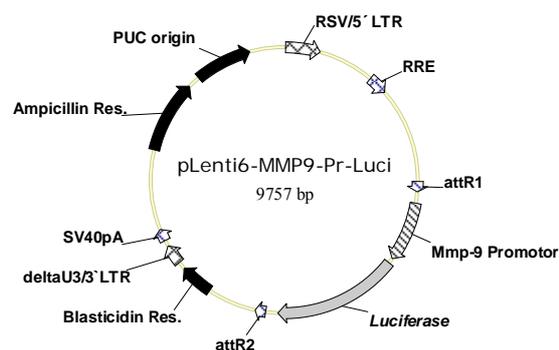
PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenol (C ₆ H ₆ O, flüssig, wassergesättigt)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid, C ₇ H ₇ FO ₂ S)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Polyacrylamid-Lösung (40%), Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Propyl-Paraben	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Random Hexamere	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Reverse Transkriptase (aus MMLV)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Reverse Transkriptase Puffer (5x)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
RNase A (37,4 mg/ml)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Rnase-Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Roticlear	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Schwalbach, Deutschland
T4 DNA-Ligase (1 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4 DNA-Ligase (5 U/μl)	Roche, Mannheim, Deutschland
TaqMan™ Master Mix (10x)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, ≈ 99%, C ₆ H ₁₆ N ₂)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
TRIS Base (TRIZMA base, C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
TRIS/HCl (TRIZMA/HCl, C ₄ H ₁₁ NO ₃ x HCl)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Triton X-100 (Polyethylenglykol-Mono-[p-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenyl]-Ether, C ₃₄ H ₆₂ O ₁₁)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Trizol® Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20 (Polyoxyethylensorbitanmonooleat)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Tween-80 (Polyoxyethylensorbitanmonooleat)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside, C ₁₄ H ₁₅ BrClNO ₆)	Roche, Penzberg, Deutschland

II. Übersicht über die klonierten Plasmide und viralen Vektoren

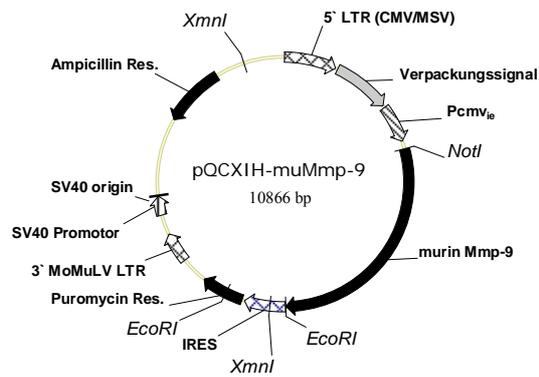
pSIREN-RetroQ-shmuMmp-9: Dieser Vektor wurde durch das Einfügen einer anti-Mmp-9 shRNA in den retroviralen Vektor pSIREN-RetroQ hergestellt. Die shRNA wurde über die Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* eingefügt. Die shRNAs wurden bereits mit den passenden 3'- und 5'-Überhängen synthetisiert.



pLenti-MMP-9-Pr-Luci: Dieser lentivirale Vektor kodiert für das murine Mmp-9 Promotor/Luciferase Konstrukt. Das Promotorkonstrukt wurde mittels Clonase Reaktion aus dem Ausgangsvektor pEnt4-MMP-9-Pr-Luci in den lentiviralen Vektor pLenti/Block-iT-Dest überführt. Der Ausgangsvektor wurde von Fr. Petra Bäumlner (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TU München) zur Verfügung gestellt.



pQCXIH-muMmp-9: Dieser retrovirale Vektor kodiert für die murine Mmp-9 cDNA. Die murine Mmp-9 cDNA wurde von Prof. Dr. Dylan Edwards (University of East Anglia, Norwich, UK) im Plasmid pGel2-SK(-) zur Verfügung gestellt. Die cDNA wurde durch NotI und EcoRI Verdau aus dem Plasmid pGel2-SK(-) ausgeschnitten und über diese Restriktionsstellen in den retroviralen Vektor eingefügt.



Lebenslauf

Name	Gerg
Vornamen	Michael
Familienstand	ledig
Geburtsdatum	22.Mai.1978
Geburtsort	Starnberg
Nationalität	deutsch
Eltern	Reinhold Gerg und Siglinde Gerg geb. Kostalek
01.08.1984- 30.07.1988	Bürgermeister-Prandl-Grundschule Penzberg
01.08.1988- 26.06.1997	Naturwissenschaftliches Gymnasium Penzberg
26.06. 1997	Allgemeine Hochschulreife
01.09. 1997- 30.09.1998	Wehrersatzdienst am Krankenhaus Penzberg
01.10.1998- 12.09. 2003	Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Regensburg
01.10. 2000	Vordiplom Biologie
12.09. 2003	Diplom Biologie
01.12.2003- 14.12.2007	Wissenschaftliche Mitarbeit im Labor von apl.-Prof. Dr. Achim Krüger am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München zur Vorbereitung der Promotion
seit 01.03.2008	Gruppenleiter bei Roche Diagnostics GmbH, Penzberg

III. Eigene Publikationen

Publikationen

Schillinger, U., Wexel, G., Hacker, C., Kullmer, M., Koch, C., **Gerg, M.**, Vogt, S., Ueblacker, P., Tischer, T., Hensler, D., Wilisch, J., Aigner, J., Walch, A., Stemberger, A., and Plank, C., **2008**. A Fibrin Glue Composition as Carrier for Nucleic Acid Vectors. *Pharm Res.* Sep 10. [ebub ahead of print]

Kopitz, C., **Gerg, M.**, Gänsbacher, B. und Krüger, A., **2008**. Plasminogen activator inhibitor-2 but not cystatin C inhibits the pro-metastatic activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the liver. *Hum Gene Ther.* Aug 5. [epub ahead of print]

Gerg, M., Kopitz, C., Schaten, S., Tschukes, A., Kahlert, C., Stangl, M., Hann von Weyhern, C.W., Brücher, B.L.D.M., Edwards, D.R., Brand, K., und Krüger, A., **2008**. Distinct functionality of tumor cell-derived gelatinases during formation of liver metastases. *Mol. Can. Res.* 6(3) : 341-51

Kopitz, C., **Gerg, M.**, Bandapally Reddy, O., Ister, D., Pennington, C.J., Hauser, S., Flechsig, C., Krell, H.-W., Antolovic, D., Brew, K., Nagase, H., Stangl, M., Hann von Weyhern, C.W., Brücher, B.L.D.M., Brand, K., Coussens, L.M., Edwards, D.R., und Krüger, A. **2007**. Timp-1 promotes liver metastasis by induction of HGF-signaling. **Cancer Res.** 67(18) : 8615-8623

Krüger, A., Arlt, MJ., **Gerg, M.**, Kopitz, C., Bernardo, MM., Chang, M., Mobashery, S., und Fridman, R., **2005**. Anitmetastatic activity of a novel mechanism-based gelatinase inhibitor. **Cancer Res.** 65(9) : 3523-3526