



Fakultät für Medizin
Institut für Experimentelle Onkologie und Molekulare Immunologie
der Technischen Universität München

**Leberspezifische Mechanismen
der TIMP-1-induzierten Metastasierung
im Kontext
des duktales Adenokarzinoms des Pankreas**

Barbara Theresia Grünwald

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. *rer. nat.*)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. R. R. Rad
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. A. Krüger
2. Univ.-Prof. Dr. W. Liebl
3. Priv.-Doz. Dr. D. Jenne,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 18.08.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 25.02.2016 angenommen.

Meinen Eltern

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der promotionsführenden Einrichtung bzw. Fakultät für Medizin der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel: 'Leberspezifische Mechanismen der TIMP-1-induzierten Metastasierung im Kontext des pankreatischen duktales Adenokarzinoms' am Institut für Experimentelle Onkologie und Molekulare Immunologie unter der Anleitung und Betreuung durch Prof. Dr. Dr. Achim Krüger ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumnidatei der TUM bin ich

einverstanden

nicht einverstanden

München, 28. April 2016

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Zusammenfassung	v
1. Einleitung	1
1.1. <i>Tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i> (TIMP-1)	1
1.1.1. Metalloproteinaseabhängige Funktionen von TIMP-1	1
1.1.2. Rezeptorvermittelte Signalfunktionen von TIMP-1	3
1.1.3. Funktionen von TIMP-1 in der Tumorprogression	4
1.1.4. Funktionen von TIMP-1 in der Metastasierung	6
1.2. Mechanismen organspezifischer Metastasierung	6
1.2.1. Die prämetastatische Nische	7
1.2.2. Ausbildung einer prämetastatischen Nische	8
1.2.3. Die prämetastatische Nische in der Leber	9
1.3. Die Leber als Zielorgan der Metastasierung	10
1.3.1. Anatomische und hämodynamische Eigenschaften	11
1.3.2. Besonderheiten der hepatischen Mikroumgebung	11
1.4. Aktivierte <i>Hepatic Stellate Cells</i> (HSCs) in der Metastasierung	12
1.4.1. Mechanismen der HSC Aktivierung	12
1.4.2. Prometastatische Funktionen von HSCs	14
1.5. Pankreaskarzinom	15
1.5.1. Prognose und Metastasierung des Pankreaskarzinoms	15
1.5.2. Entstehung des Pankreaskarzinoms	15
1.5.3. Murine Modellsysteme des Pankreaskarzinoms	16
1.5.4. TIMP-1 im Pankreaskarzinom	17
1.6. Ziel dieser Arbeit	19
2. Material und Methoden	21
2.1. Material	21
2.1.1. Chemikalien	21
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	23
2.1.3. Geräte	24
2.1.4. Software	25
2.1.5. Lösungen und Puffer	25
2.1.6. Antikörper	26
2.1.7. Verwendete Kits	26
2.2. Patientenproben	27
2.2.1. Verwendete Gewebe	27
2.2.2. Klinische Daten	27

Inhaltsverzeichnis

2.3.	Tierexperimentelle Methoden	28
2.3.1.	Verwendete Versuchstiere	28
2.3.2.	Adenovirale Transduktion von Mäusen	30
2.3.3.	Subkutanes (s.c.) NIH3T3 Tumormodell zur Überexpression von TIMP-1	30
2.3.4.	Adenovirale Überexpression von TIMP-1 in Mäusen über neun Tage	31
2.3.5.	Adenovirale Überexpression von (N-)TIMP-1 in Mäusen über drei Tage	31
2.3.6.	Adenovirale Überexpression von TIMP-1 in Mäusen bei gleichzeitigem <i>knock-down</i> von CD63	32
2.3.7.	Adenovirale Überexpression von TIMP-1 in CD63 <i>knock-out</i> Mäusen	33
2.3.8.	Adenovirale Überexpression von TIMP-1 in Mäusen unter Wortmannin Behandlung	33
2.3.9.	Probennahme	34
2.4.	Histologische Methoden	34
2.4.1.	Paraffineinbettung von Leberstücken	34
2.4.2.	Herstellung und Vorbehandlung von Paraffinschnitten	34
2.4.3.	SiriusRed Färbung	35
2.4.4.	Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten	36
2.4.5.	Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten	37
2.4.6.	<i>Histoscoring</i> -Analyse	38
2.5.	<i>Ex vivo</i> -Isolation von HSCs aus Mäusen	39
2.6.	Methoden der Zellkultur	41
2.6.1.	Zelllinien	41
2.6.2.	Kultivierung von Zellen	43
2.6.3.	Kotransfektion zur Produktion lentiviraler Partikel	44
2.6.4.	Transduktion adhärenter Zellen	46
2.6.5.	Analyse der Zellmotilität mittels TransWell Assays	46
2.6.6.	Analyse der Zellwachstums mittels AlamarBlue	46
2.7.	Molekularbiologische Methoden	47
2.7.1.	Proteinaufarbeitung aus Zellen	47
2.7.2.	Proteinbestimmung mit dem BCA Kit	47
2.7.3.	<i>Enzym-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	48
2.7.4.	SDS-Gelelektrophorese	49
2.7.5.	<i>Western Blot</i>	51
2.7.6.	RNA Isolation aus Geweben und Zellen	52
2.7.7.	Agarose-Gelelektrophorese	53
2.7.8.	Reverse Transkriptions-PCR	54
2.7.9.	Expressionsanalyse mittels Quantitativer RT-PCR (qRT-PCR)	55
2.7.10.	Bestimmung von Genexpressionsprofilen mit <i>Low Density Arrays</i>	57
2.8.	Statistische Methoden	58

3. Ergebnisse	59
3.1. Expression von TIMP-1 im humanem PDAC und Korrelation mit der Anwesenheit von Lebermetastasen	59
3.1.1. TIMP-1 Expression in Vorläuferläsionen des humanen PDAC	59
3.1.2. Analyse der TIMP-1 Expression im invasiven, humanen PDAC	60
3.1.3. Korrelation von TIMP-1 Plasmaspiegeln und MN-Status in PDAC Patienten	62
3.2. Expression von TIMP-1 in einem murinen PDAC Modell	64
3.3. Aktivierung von HSCs in Mäusen mit hohen, tumorsezernierten TIMP-1 Spiegeln	67
3.4. Aktivierung von HSCs durch TIMP-1	68
3.4.1. Aktivierung von HSCs in AdTIMP-1-transduzierten Mäusen	68
3.4.2. Erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern in aufgereinigten HSC Fraktionen aus Mäusen mit hohen TIMP-1 Spiegeln	70
3.4.3. Aktivierung von HSCs durch TIMP-1 <i>in vitro</i>	72
3.5. Regulation und Wichtigkeit von TIMP-1 bei der Aktivierung von HSCs	73
3.5.1. Autoregulation von TIMP-1 in HSCs	73
3.5.2. Reduktion von Aktivierungsmarkern in humanen HSCs mit TIMP-1 <i>knock-down</i>	75
3.5.3. Wiederherstellung der Expression von Aktivierungsmarkern in HSCs mit TIMP-1 <i>knock-down</i> durch rekTIMP-1	78
3.5.4. Induktion von Aktivierungsmarkern in humanen HSCs mit TIMP-1 Überexpression	79
3.6. Funktionelle Eigenschaften TIMP-1-aktivierter HSCs	81
3.6.1. Identifizierung TIMP-1-induzierter prometastatischer Faktoren in HSCs	81
3.6.2. Effekte von TIMP-1 auf die Motilität humaner HSCs	85
3.6.3. Unabhängigkeit der Proliferation humaner HSCs von TIMP-1	87
3.7. Abhängigkeit der TIMP-1-induzierten HSC Aktivierung von der C-terminalen Domäne	88
3.7.1. Abhängigkeit der HSC-aktivierenden Effekte von TIMP-1 <i>in vitro</i> von der Anwesenheit der C-terminalen Domäne	88
3.7.2. Abhängigkeit der HSC-aktivierenden Effekte von TIMP-1 <i>in vivo</i> von der Anwesenheit der C-terminalen Domäne	91
3.8. Einfluss des PI3K Signalweges in TIMP-1-aktivierten HSCs	94
3.8.1. Induktion des PI3K Signalweges in HSCs durch TIMP-1	94
3.8.2. PI3K Aktivierung in HSCs <i>in vivo</i> durch C-TIMP-1.	97
3.8.3. Bedeutung des PI3K Signalweges in der TIMP-1-induzierten HSC-Aktivierung <i>in vitro</i>	98
3.8.4. Bedeutung des PI3K Signalweges in der TIMP-1-induzierten HSC-Aktivierung <i>in vivo</i>	100
3.8.5. Reduktion des TIMP-1-induzierten Anhaftens von Pankreaskarzinomzellen in der Leber durch Inhibition von PI3K	101
3.9. CD63-Abhängigkeit der HSC-aktivierenden Effekte von TIMP-1	102
3.9.1. CD63-Abhängigkeit der HSC-aktivierenden Effekte von TIMP-1 <i>in vitro</i>	102

Inhaltsverzeichnis

3.9.2. CD63-Abhängigkeit der HSC-aktivierenden Effekte von TIMP-1 <i>in vivo</i>	104
3.9.3. Reduktion des TIMP-1-induzierten Anhaftens von Pankreaskarzinomzellen in der Leber durch <i>knock-down</i> von CD63 in der Leber	106
4. Diskussion	107
4.1. TIMP-1 aktiviert HSCs	107
4.2. TIMP-1 aktiviert HSCs über Interaktion mit CD63 und anschließende Aktivierung des PI3K Signalweges	111
4.3. Aktivierte HSCs sind Teil der TIMP-1-induzierten prämetastatischen Nische in der Leber	115
4.4. Die TIMP-1-induzierte, HSC-vermittelte Ausbildung einer prämetastatischen Nische fördert die frühe und effiziente Metastasierung des PDAC .	117
4.5. Anwendbarkeit der identifizierten Mechanismen über das PDAC hinaus .	120
4.6. Ausblick	120
Abkürzungsverzeichnis	122
Abbildungsverzeichnis	123
Tabellenverzeichnis	125
Literaturverzeichnis	126
Danksagung	144
A. Anhang	146
A.1. Literaturrecherche zur Auswahl von Zielgenen für die LDA Analyse	146
A.2. Lebenslauf	148
A.3. Publikationsverzeichnis	149

Zusammenfassung

Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) kann die Metastasierung in die Leber durch Ausbildung einer prämetastatischen Nische fördern. Hohe Plasmaspiegel von TIMP-1 sind bei Patienten mit pankreatischem duktalem Adenokarzinom (PDAC) mit schlechter Prognose assoziiert. PDAC ist eine aggressive maligne Erkrankung, die außergewöhnlich früh und effizient in die Leber metastasiert. Aktivierte *hepatic stellate cells* (HSCs) wurden kürzlich als Bestandteil einer hepatischen prämetastatischen Nische bei PDAC identifiziert. In dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass die TIMP-1-induzierte, HSC-vermittelte Ausbildung einer prämetastatischen Nische zur Lebermetastasierung des PDAC beiträgt. Hierfür wurden die Plasmaspiegel von TIMP-1 während der Progression von PDAC ermittelt, und Mäuse mit hohen TIMP-1 Spiegel in wurden auf HSC Aktivierung hin untersucht. Die Effekte von TIMP-1 auf humane HSCs wurden *in vitro* getestet, indem HSCs mit rekombinanten TIMP-1 Varianten stimuliert oder die endogene TIMP-1 Expression der Zellen lentiviral manipuliert wurde. Anschließend wurden Genexpression, intrazelluläre Signalwege, Proliferation und Motilität der HSCs untersucht. Identifizierte Schlüsselfaktoren (CD63 und Phosphoinositol-3-kinase (PI3K)) wurden *in vitro* und *in vivo* manipuliert, um ihren funktionellen Beitrag zu den beobachteten Effekten zu testen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die pankreatischen und systemischen TIMP-1 Spiegel während der Entwicklung von PDAC anstiegen. Hohe systemische TIMP-1 Spiegel bei PDAC Patienten waren mit der Anwesenheit von Lebermetastasen assoziiert. In der TIMP-1-induzierten prämetastatischen Nische in der Leber kam es zur Aktivierung von HSCs und TIMP-1-aktivierte HSCs trugen zur Ausbildung einer rezeptiven Leberumgebung bei, in die vermehrt PDAC Zellen einwandern konnten. Hohe TIMP-1 Spiegel aktivierten HSCs im Mausmodell, auch in Abwesenheit eines Tumors, und TIMP-1 als einzelner Faktor war ausreichend, humane HSCs *in vitro* zu aktivieren. Der TIMP-1-aktivierte HSC Phänotyp war gekennzeichnet durch eine verstärkte Motilität sowie prometastatische Genexpression. Die endogene TIMP-1 Expression in HSCs war zudem positiv autoreguliert und diente der autokrinen Erhaltung des aktivierten Zustands. TIMP-1 aktivierte HSCs durch Interaktion mit dem Tetraspanin CD63 und anschließende Aktivierung des PI3K Signalwegs. Die TIMP-1/CD63 Interaktion in der Leber sowie funktionelle PI3K waren nötig für das TIMP-1-induzierte Einwandern von Tumorzellen. Die Ausbildung einer TIMP-1-induzierten, HSC-vermittelten hepatischen prämetastatischen Nische ist demnach ein leberspezifischer Mechanismus der TIMP-1-induzierten Metastasierung und bietet eine Erklärung für die frühe und effiziente Metastasierung des PDAC in die Leber.

1. Einleitung

1.1. *Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1)*

TIMP-1 wurde als physiologischer, endogener Kollagenaseinhibitor entdeckt [Woolley *et al.*, 1975]. Inzwischen ist bekannt, dass TIMP-1 ein Inhibitor mit weitaus breiterem Substratspektrum ist. TIMP-1 kann die Aktivität nahezu aller bekannten, nicht membranengebundenen Metalloproteinasen aus der Familie der Matrix Metalloproteinasen (MMPs) [Visse und Nagase, 2003] sowie der membranständigen Metalloprotease *adisintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10)* hemmen [Amour *et al.*, 2000]. TIMP-1 ist, wie die anderen bisher bekannten Mitglieder der TIMP-1 Familie (TIMP-2, -3, -4) aus zwei Domänen aufgebaut [Brew *et al.*, 2000]. Beide Domänen enthalten je sechs Cysteinreste und bilden über diese je drei Disulfidbrücken aus [Brew *et al.*, 2000]. Die N-terminale Domäne von TIMP-1 inhibiert Metalloproteinasen durch Koordination des Zn^{2+} -Ions im aktiven Zentrum der Metalloprotease mit den Amino- und Carbonylgruppen der Disulfidbrücken ausbildenden Aminosäuren [Nagase *et al.*, 2006]. Die Funktion der C-terminalen Domäne war länger unbekannt. Kürzlich wurde gezeigt, dass es sich um eine Signaldomäne handelt, die einen membranständigen Interaktionspartner bindet, das Tetraspanin CD63, und so intrazelluläre Signalwege aktiviert [Jung *et al.*, 2006]. CD63 war lange der einzige bekannte Membranrezeptor von TIMP-1. Während des Verfassens dieser Arbeit wurde veröffentlicht, dass CD74 ein weiterer Interaktionspartner der C-terminalen Domäne von TIMP-1 ist [Moreira *et al.*, 2015]. Die Struktur von TIMP-1 erlaubt die analytische Trennung N- und C-terminal vermittelter Prozesse, da die N-terminale Domäne als unabhängige proteaseinhibitorische Einheit falten kann [Nagase *et al.*, 2006].

1.1.1. Metalloproteaseabhängige Funktionen von TIMP-1

Die Funktionen von TIMP-1 sind vielfältig, denn TIMP-1 kann durch seine Funktion als Proteaseinhibitor auf verschiedene metalloproteaseabhängige Prozesse Einfluss nehmen. Metalloproteinasen prozessieren ein breites Spektrum von bioaktiven Substraten [Rodriguez *et al.*, 2010]. Die resultierende Modulation des lokalen Signalmi-

1. Einleitung

lieus im Gewebe durch Metalloproteinasen wirkt auf die gesamte Gewebemöostase ein [Rodriguez *et al.*, 2010]. Vor allem die Mitglieder der Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind dafür bekannt, nahezu alle bekannten Extrazellulären Matrix (EZM)-Proteine prozessieren zu können und so unter physiologischen sowie pathologischen Bedingungen den Auf-, Ab- und Umbau von EZM zu regulieren [Page-McCaw *et al.*, 2007]. MMPs bilden dadurch bioaktive *de novo* EZM-Spaltprodukte, die auto- und/oder parakrin auf die umliegenden Zellen wirken. So spaltet beispielsweise MMP-9 aus Kollagen Typ IV das antiangiogene Molekül Tumstatin ab [Hamano *et al.*, 2003]. MMPs können darüber hinaus latente, EZM-sequestrierte Signalmoleküle freisetzen [Page-McCaw *et al.*, 2007], so z.B. *vascular endothelial growth factor -A* (VEGF-A) [Lee *et al.*, 2005]. Das Substratspektrum von MMPs geht außerdem weit über EZM Moleküle hinaus und umfasst lösliche Zytokine oder Wachstumsfaktoren, die durch die proteolytische Prozessierung sowohl aktiviert als auch inaktiviert werden können [Page-McCaw *et al.*, 2007]. Das proteolytische Abspalten (*Shedding*) bioaktiver Moleküle von der Zellmembran ist eine weitere zentrale Funktion von MMPs [Blobel, 2002]. Die biologische Aktivität vieler membranständiger Wachstumsfaktoren, wie *tumor necrosis factor α* (TNF α), wird durch deren Abspaltung von der Zelloberfläche hergestellt, da sie erst anschließend ihren Rezeptor binden können. Die Aktivität solcher membranständigen Wachstumsfaktoren kann daher durch Metalloproteinasen positiv reguliert werden [Blobel, 2002]. Metalloproteinasen können jedoch auch eine negative Regulation von Signalwegen bewirken, indem sie die Rezeptoren für Zytokine und Wachstumsfaktoren von der Zelloberfläche entfernen [Blobel, 2002]. Die membranständigen ADAMs spielen hierbei eine große Rolle. Insbesondere ADAM-10 und ADAM-17 modulieren eine Vielzahl von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Membranrezeptoren und nehmen so auf verschiedene zelluläre Prozesse Einfluss [Blobel, 2002]. TIMP-1 beeinflusst die Aktivität von Metalloproteinasen im Gewebe und somit das Ausmaß der EZM-Proteolyse in der zellulären Peripherie. TIMP-1 kann dadurch auf zelluläre Prozesse wie Migration, Wachstum oder Überleben einwirken [Ries, 2014]. TIMP-1 inhibiert zudem das membranständige ADAM-10, eine *Sheddase* des HGF Rezeptors Met und aktiviert so beispielsweise den *hepatocyte growth factor* (HGF) Signalweg [Kopitz *et al.*, 2007; Schelter *et al.*, 2011a]. Die Modulation all dieser metalloproteinaseabhängigen Signaltransduktionsprozesse wird als „indirekte“ Signalwirkung von TIMP-1 bezeichnet und trägt zur Erklärung der Vielzahl von Funktionen von TIMP-1 bei [Ries, 2014].

1.1.2. Rezeptorvermittelte Signalfunktionen von TIMP-1

TIMP-1 kann, zusätzlich zur oben beschriebenen antiproteolytischen Funktion, als zytokinartiges Signalmolekül auf Zellen wirken [Chirco *et al.*, 2006]. Diese Funktion von TIMP-1 beeinflusst direkt das Verhalten und den Phänotyp von Zellen [Chirco *et al.*, 2006]. Eine C-terminal vermittelte, antiapoptotische Wirkung von TIMP-1 wurde im Detail in Brustepithelzellen untersucht [Li *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2005] und so konnte das Tetraspanin CD63 als membranständiger Interaktionspartner von TIMP-1 identifiziert werden [Jung *et al.*, 2006]. Tetraspanine, wie CD63, werden anhand ihrer typischen Struktur, bestehend aus vier Transmembrandomänen, definiert [Zöller, 2009; Hemler, 2005]. Die Funktionen von Tetraspaninen umfassen die Modulation von Zelldifferenzierung, -wachstum und -motilität [Maecker *et al.*, 1997]. Einige Tetraspanine werden nur von speziellen Zelltypen exprimiert, während andere ubiquitär vorhanden sind, wie auch CD63 [Maecker *et al.*, 1997]. CD63 kommt sowohl auf der Zelloberfläche als auch in Exosomen und Lysosomen vor [Pols und Klumperman, 2009]. Auf der Zelloberfläche bilden Tetraspanine ein wichtiges Strukturelement für andere Membranproteine, das sog. *tetraspanin web* [Rubinstein *et al.*, 1996]. Durch die starke Assoziation von Tetraspaninen untereinander sowie mit Interaktionspartnern bilden sich innerhalb der Zellmembran Mikrodomänen aus [Rubinstein *et al.*, 1996]. Mikrodomänen bieten eine Basis für ausgeprägte Wechselwirkungen zwischen Tetraspaninen, Integrinen und anderen Interaktionspartnern und vermitteln so eine effiziente Übertragung extrazellulärer Stimuli auf intrazelluläre Signalkomponenten [Hemler, 2005]. CD63 ist für die Zellsignaltransduktion innerhalb der Mikrodomänen von besonderem Interesse, da es mit einer Vielzahl von Proteinen interagieren kann [Pols und Klumperman, 2009]. TIMP-1 kann über seinen C-Terminus an CD63 binden und so als Signalmolekül intrazelluläre Signalwege aktivieren, wie beispielsweise *extracellular-signal regulated kinase* (ERK) [Chirco *et al.*, 2006], *focal adhesion kinase* (FAK) und Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) [Stetler-Stevenson, 2008]. CD74 wurde kürzlich als weiterer Interaktionspartner der C-terminalen Domäne von TIMP-1 identifiziert [Moreira *et al.*, 2015]. Die Funktionen der TIMP-1/CD74 Interaktion sind derzeit erheblich weniger gut charakterisiert. Moreira *et al.* (2015) konnten jedoch bereits zeigen, dass CD74 eine Rolle in der TIMP-1-vermittelten Chemoresistenz von Brustkrebszellen spielt und für die Internalisierung von TIMP-1 notwendig ist. TIMP-1 kann zudem über die Interaktion mit CD74 den intrazellulären Akt Signalweg aktivieren [Moreira *et al.*, 2015]. Zusammen bilden die rezeptorvermittelten direkten und die metalloproteinaseabhängigen indirekten Signalfunktionen von TIMP-1 die molekulare Grundlage für dessen pleiotrope Funktionen (**Abb. 1.1**). Die Zuordnung beobachteter Effekte zur C- bzw. N-terminalen Domäne bildet daher

1. Einleitung

häufig den ersten Schritt in der Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bei der Untersuchung spezifischer Funktionen von TIMP-1.

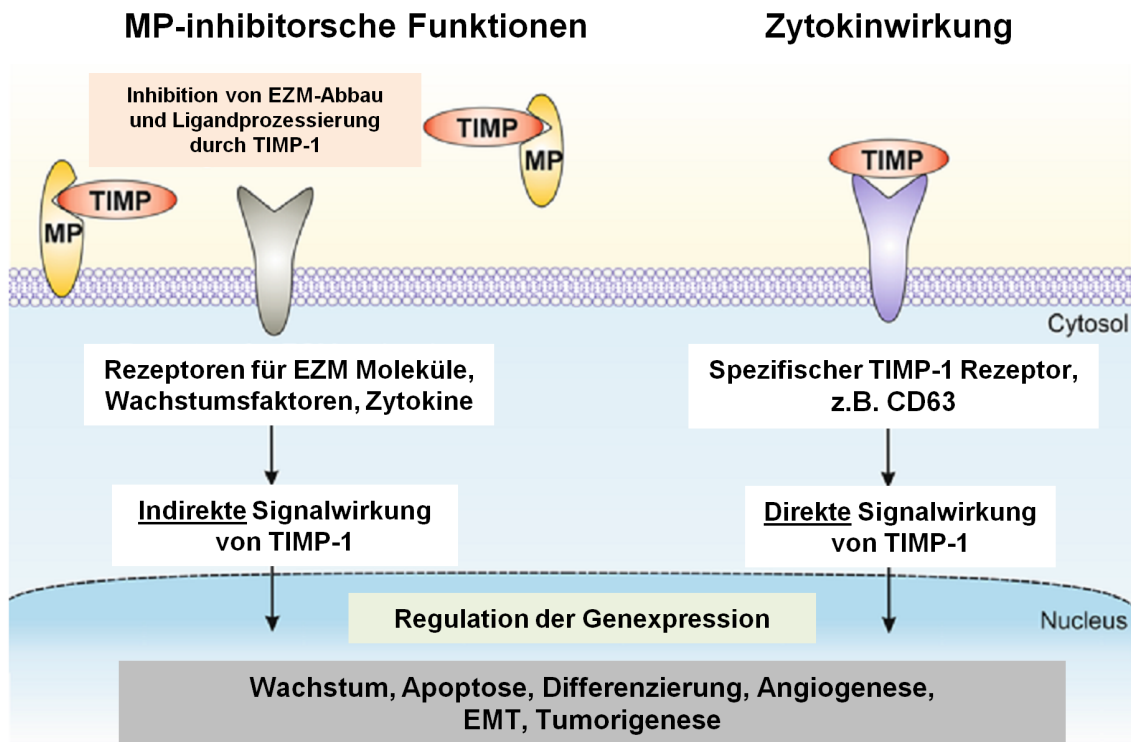


Abbildung 1.1. – Direkte und indirekte Signalfunktionen von TIMP-1. TIMP-1 kann durch die metalloproteinaseinhibitorische Funktion in den Abbau von EZM und die Prozessierung von Liganden eingreifen und so bestehende Signalwege beeinflussen. TIMP-1 wirkt dadurch als indirektes Signalmolekül. TIMP-1 kann des Weiteren selbst als zytokinartiges Signalmolekül an Rezeptoren wie CD63 an der Zelloberfläche binden und so direkte Signalfunktionen ausüben. Auf diese beiden Arten kann TIMP-1 auf zelluläre Prozesse, wie u.a. Wachstum, Apoptose und Differenzierung, Einfluss nehmen (nach [Ries, 2014]).

1.1.3. Funktionen von TIMP-1 in der Tumorprogression

Die Rolle von TIMP-1 in der Progression maligner Erkrankungen war lange Zeit kontrovers diskutiert: MMPs spielen bei invasiven Prozessen in Tumorprogression und Metastasierung eine essentielle Rolle, so dass zunächst vermutet wurde, TIMP-1 könnte durch seine antiproteolytische Funktion als Tumorsuppressor fungieren [Khokha und Denhardt, 1989; Khokha und Waterhouse, 1994]. Einigen Studien unterstützten diese Sichtweise, da sie auf eine antitumorigene und antimetastatische Funktion von TIMP-1 hindeuteten. Eine TIMP-1 Überexpression in der Leber führte beispielsweise zu einer Reduktion der SV40 *large T-Antigen*-induzierten Entstehung hepatozellulärer Karzino-

1. Einleitung

me, während eine reduzierte TIMP-1-Expression in einer schnelleren Tumorinitiation und -progression resultierte [Martin *et al.*, 1996]. Dies steht jedoch in Kontrast zur klinischen Realität, in der hohe Spiegel von TIMP-1 mit verringertem Überleben korrelieren, beispielsweise bei Magenkarzinom [de Mingo *et al.*, 2007], Kolorektalkarzinom [Birgisson *et al.*, 2010], Lungenkrebs [Ylisirniö *et al.*, 2000] und Pankreaskarzinom [Mroczek *et al.*, 2009; Poruk *et al.*, 2013]. Auch wenn TIMP-1 in gewissen Kontexten scheinbar tumorhemmend wirken kann, überwiegt offensichtlich die tumorfördernde Wirkung hoher TIMP-1 Spiegel im Patienten. Die Beobachtung, dass TIMP-1 als bekannter Breit-spektrum-inhibitor der protumorigenen und prometastatischen MMPs [Edwards *et al.*, 2008] dennoch mit verschlechterter Prognose für Krebspatienten einhergeht, wurde als TIMP-1 *Paradoxon* beschrieben [Kopitz *et al.*, 2007] und ist bis heute Gegenstand intensiver Forschung. Verschiedene Mechanismen der tumorfördernden Effekte von TIMP-1 konnten inzwischen aufgeklärt werden. Die C-terminal vermittelte, direkte Signalwirkung von TIMP-1 kann stressassoziierte Signalwege in Tumorzellen induzieren [Schel-ter *et al.*, 2011b; Cui *et al.*, 2014], sowie antiapoptotisch und überlebensfördernd wirken [Li *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 2006]. TIMP-1 wirkt als Tumorzell-Stressfaktor, der über die Induktion von *hypoxia-inducible factor 1* α (HIF1 α) in Lymphomzellen deren Invasivität steigert [Schel-ter *et al.*, 2011b]. Die Induktion von HIF1 α wird durch die TIMP-1/CD63 Interaktion und eine Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges vermittelt [Cui *et al.*, 2014]. TIMP-1 löst dadurch erhöhte microRNA-210 (miR-210) Mengen in der Zelle aus und die resultierende Repression verschiedener miR-210 Zielgene fördert Primärtumorwachstum und Angiogenese [Cui *et al.*, 2014]. Die TIMP-1/CD63 Interaktion steigert außerdem die Anoikisresistenz von Melanomzellen [Toricelli *et al.*, 2013]. TIMP-1 kann zudem *via* CD63 eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) in Tumorzellen auslösen und so promigratorisch [D'Angelo *et al.*, 2014] sowie proinvasiv [Jung *et al.*, 2012] wirken. Die antiproteolytischen Effekte von TIMP-1 können ebenfalls tumorfördernd wirken. TIMP-1 inhibiert ADAM-10 und stabilisiert so Met auf der Zelloberfläche. TIMP-1 induziert dadurch den *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) Signalweg [Kopitz *et al.*, 2007; Schel-ter *et al.*, 2011a]. Die HGF/Met-Achse spielt eine zentrale Rolle in der Tumorprogression, da sie promigratorisch, proinvasiv, proliferativ und überlebensfördernd auf Tumorzellen wirkt [Gherardi *et al.*, 2012]. TIMP-1 löst durch die Stabilisierung von Met einerseits eine prometastatische Veränderung der hepatischen Mikroumgebung aus [Kopitz *et al.*, 2007] und steigert andererseits durch die Stabilisierung von Met auf Tumorzellen deren metastatisches Potential [Schel-ter *et al.*, 2011a]. Die Inhibition der EZM-spaltenden MMPs durch TIMP-1 kann ebenfalls zur Tumorprogression beitragen, da TIMP-1 so eine Stabilisierung tumorfördernder Kollagene vermitteln kann [Rhee *et al.*, 2004].

1.1.4. Funktionen von TIMP-1 in der Metastasierung

Ein Großteil der Krebspatienten verstirbt an Metastasen [Gupta und Massagué, 2006]. Die oben erwähnte deutliche Assoziation hoher TIMP-1 Spiegel mit schlechter Prognose weist somit auf eine metastasierungsfördernde Wirkung von TIMP-1 hin. In der Tat zeigt sich, dass hohe TIMP-1 Mengen in Patienten mit der Anwesenheit von Metastasen [Ree *et al.*, 1997; McCarthy *et al.*, 1999; Seubert *et al.*, 2015] sowie mit dem Auftreten von Rezidiven assoziiert sind [Talvensaaari-Mattila und Turpeenniemi-Hujanen, 2005; Kuvaja *et al.*, 2008; Seubert *et al.*, 2015]. Die oben erläuterten Effekte von TIMP-1 auf das Verhalten von Tumorzellen wirken sich auch auf deren metastatisches Potential aus [Schelter *et al.*, 2011a; Toricelli *et al.*, 2013]. Vielmehr als die Aggressivität der Tumorzellen selbst scheint jedoch deren Interaktion mit der Umgebung im sekundären Organ den Erfolg des metastatischen Prozesses zu bestimmen [Chambers *et al.*, 2002; Irmisch und Huelsken, 2013]. TIMP-1 ist ein zentraler Regulator der Gewebemöostase [Edwards *et al.*, 2008] und hat dadurch großes Einflusspotential auf die Beschaffenheit der lokalen Mikroumgebung. Studien zur Auswirkung hoher systemischer TIMP-1 Spiegel auf die Metastasierung zeigen, dass TIMP-1 spezifisch die Lebermetastasierung fördert [Kopitz *et al.*, 2007; Seubert *et al.*, 2015]. Dies spricht nicht für einen allgemeinen Effekt von TIMP-1 auf das metastatische Potential von Tumorzellen, sondern für gewebespezifische Effekte. TIMP-1 löst tatsächlich spezifisch in der Leber, aber nicht in der Lunge, eine prometastatische Umgebung aus [Kopitz *et al.*, 2007; Seubert *et al.*, 2015]. Auch klinische Daten zeigen eine Assoziation von TIMP-1 mit der Metastasierung in die Leber [Seubert *et al.*, 2015] sowie mit Rezidiven, die von der Leber ausgehen [Bunatova *et al.*, 2012; Seubert *et al.*, 2015]. Effekte auf hepatische Zellpopulationen, die diese TIMP-1-induzierten Veränderungen der hepatischen Mikroumgebung und die Leberspezifität der TIMP-1-induzierten Metastasierung erklären können, sind bisher noch nicht bekannt.

1.2. Mechanismen organspezifischer Metastasierung

Die spezifische Förderung der Lebermetastasierung durch TIMP-1 ist derzeitiger Gegenstand der Forschung. Zu den Mechanismen organspezifischer Metastasierung ist bisher jedoch allgemein wenig bekannt. Die meisten soliden Tumore weisen eine gewisse Neigung auf, bevorzugt in bestimmte Organe zu metastasieren [Fidler, 2003]. Stephen Paget formulierte bereits im Jahr 1889 die sog. *Seed and Soil* Hypothese, basierend auf der Beobachtung, dass Brustkrebs bevorzugt in Leber und Knochen aber nicht in die Milz metastasiert [Paget, 1889]. Diese besagt, dass disseminierte Tumor-

1. Einleitung

zellen (*Seed*) ein Organ (*Soil*) nur dann erfolgreich besiedeln können, wenn sie dort passende Wachstumsbedingungen vorfinden [Paget, 1889]. Die Gegenhypothese besagt, dass die Blutfließrichtung und die Anordnung von Kapillarbetten im Organismus das Hängenbleiben von Tumorzellen bestimmen, und deren Auswachsen ein zufälliger, ungerichteter Prozess ist. Letzterer Ansatz findet sicherlich im Fall von lokalen Metastasen Anwendung. Die Interaktion von Tumorzellen mit der Mikroumgebung des sekundären Organs scheint bei der Ausbildung distanter Metastasen hingegen von größerer Bedeutung zu sein [Fidler, 2003]. Endothelien verschiedener Organe exprimieren unterschiedliche Zelladhäsionsmolekülmuster, über die das Anhaften der Tumorzellen vermittelt oder gehemmt werden kann [Brown und Ruoslahti, 2004]. Die Expression des CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) auf Tumorzellen befähigt diese beispielsweise zur Besiedelung von Organen, die den Liganden SDF-1 exprimieren, wie die Leber oder das Knochenmark [Geiger und Peeper, 2009]. Die postulierte Wichtigkeit der Beschaffenheit des sekundären Organs wird durch diese Erkenntnisse weiter untermauert. Beide eingangs erwähnten Hypothesen schließen sich jedoch auch bei der Ausbildung distanter Metastasen keinesfalls aus. Blutfluss und mechanische Aspekte bestimmen die Anzahl von Tumorzellen, die in ein Organ gelangt. Die Interaktionen zwischen Tumorzellen und sekundärem Organ bestimmen wiederum die Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Auswachsens dieser Tumorzellen [Fidler, 2003]. Bisher ist allerdings kaum bekannt, welche molekularen und zellulären Mechanismen einer erfolgreichen Interaktion von Tumorzellen mit der Mikroumgebung des sekundären Organs zugrunde liegen und so den Gewebetropismus von Tumoren bestimmen.

1.2.1. Die prämetastatische Nische

Diverse Studien zu den Mechanismen organspezifischer Metastasierung haben die Hypothese untersucht, dass Tumorzellen ein organspezifisches metastatisches Potential besitzen [Kang *et al.*, 2003; Minn *et al.*, 2005]. Tumorzellen könnten beispielsweise ein Repertoire an Adhäsionsmolekülen besitzen, das die Besiedlung bestimmter Organe erlaubt [Kang *et al.*, 2003; Minn *et al.*, 2005]. Bei den hierbei identifizierten Faktoren, die mit organspezifischer Metastasierung assoziiert waren, handelte es sich jedoch häufig um lösliche Proteine (z.B. IL-11, CTGF [Kang *et al.*, 2003]). Dies deutet nicht, wie anfangs vermutet, auf adhäsionsabhängige Prozesse hin. Lösliche tumorsezernierte Faktoren können jedoch, wie kürzlich bekannt wurde, durch Ausbildung einer sog. prämetastatischen Nische die Metastasierung in bestimmte Organ fördern [Kaplan *et al.*, 2006b, 2005]. Die vom Primärtumor sezernierten Faktoren verändern hierbei die Mikroumgebung des sekundären Organs solchermaßen, dass es für die Aufnahme von

1. Einleitung

Tumorzellen empfänglicher wird [Kaplan *et al.*, 2005]. Die Ausbildung prämetastatischer Nischen ist in der Bestimmung des Metastasierungsmusters dominant über die Eigenschaften der Tumorzellen. Vorbehandlung von Mäusen mit melanomkonditioniertem Medium, und den darin enthaltenen tumorzellsezernierten löslichen Faktoren, eröffnete einer Lungenkarzinomzelllinie das vergleichsweise breite Metastasierungsspektrum der Melanomzellen [Kaplan *et al.*, 2005]. Das Metastasierungsspektrum von Melanomzellen in Mäusen wurde durch Vorbehandlung der Tiere mit Lungenkarzinomzellmedium hingegen stark eingeschränkt [Kaplan *et al.*, 2005]. In der Biologie beschreibt "Nische" im weitesten Sinne einen Bereich, der aufgrund seiner spezifischen Eigenschaften für das Überleben einer bestimmten Art von Organismen förderlich ist [Whittaker, 1973]. Eine Nische ist, im Gegensatz zum "Habitat", ein funktioneller Begriff, der die Anforderungen und Bedürfnisse einer Art beschreibt. Hieraus folgt, dass Nischen nicht besetzt werden können, sondern durch die Interaktion dieser Organismen mit ihrer Umwelt gebildet werden müssen [Whittaker, 1973]. Die Projektion auf die Prozesse der Metastasierung legt nahe, dass die Veränderung des sekundären Organs durch tumorsezernierte Faktoren eine Voraussetzung für das spätere, erfolgreiche Ansiedeln der Tumorzellen ist [Kaplan *et al.*, 2005]. Fehlen diese Nischen, können Melanomzellen beispielsweise nur noch in wenige Organe metastasieren [Kaplan *et al.*, 2005]. Das Modell der prämetastatischen Nische bietet zwei neue Konzepte für das Verständnis der Prozesse der Metastasierung an. **(I)** Ein neuer *zeitlicher* Aspekt, da der Prozess der Vorbereitung des sekundären Organs in die **prämetastatische** Phase eingeordnet wird, d. h. vor dem Eintreffen der Tumorzellen im sekundären Organ. Die Prozesse der Metastasierung beginnen demnach nicht sequentiell nach der lokalen Invasion eines Primärtumors, sondern parallel dazu. **(II)** Der *funktionelle* Aspekt einer **rezeptiven Mikroumgebung**, die vermehrt Tumorzellen aufnimmt. Diese Mikroumgebung ist dominant über die intrinsischen Eigenschaften der Tumorzellen und bestimmt dadurch deren Metastasierungsmuster [Kaplan *et al.*, 2005]. Die Ausbildung prämetastatischer Nischen bietet demnach Erklärungsansätze für organspezifische Metastasierungsmuster, da tumorsezernierte Faktoren scheinbar auf spezifische, zukünftige Zielorgane der Metastasierung einwirken.

1.2.2. Ausbildung einer prämetastatischen Nische

Die Ausbildung der rezeptiven Mikroumgebung im sekundären Organ wird durch sog. Nischenfaktoren vermittelt [Peinado *et al.*, 2011]. Bisherige Studien zur Ausbildung einer prämetastatischen Nische fokussierten sich meist auf die Lunge, so dass alle bisher bekannten Nischenfaktoren ursprünglich in diesem Kontext beschrieben wurden.

1. Einleitung

Wichtige molekulare Nischenfaktoren sind u.a. die S100 Zytokine A8 und A9 (S100A8, S100A9), Serumamyloid A3 (SAA3) [Hiratsuka *et al.*, 2008], TGF β und TNF α [Hiratsuka *et al.*, 2006], sowie Fibronectin, MMP-9, SDF-1 und VEGF [Kaplan *et al.*, 2005]. Die bisher identifizierten Zelltypen schließen aktivierte Fibroblasten sowie myeloide Zellen, v. a. neutrophile Granulozyten, und endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark mit ein [Wels *et al.*, 2008]. In einer Studie von Kaplan *et al.* (2005) ist gezeigt, dass die Initiierung sog. prämetastatischer *Cluster* im sekundären Organ durch aktivierte Fibroblasten erfolgt, die in ihrer unmittelbaren Umgebung vermehrt Fibronectin ablagern. Aktivierte Fibroblasten veranlassen einen Umbau des lokalen Stromas in der prämetastatischen Nische und sezernieren chemotaktische Faktoren. Dadurch tragen aktivierte Fibroblasten zur Rekrutierung von myeloiden Zellen und endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark bei [Psaila *et al.*, 2006]. Die prometastatische Modifikation der EZM in der prämetastatischen Lunge kann nicht nur durch aktivierte Fibroblasten vor Ort erfolgen, sondern auch durch primärtumorsezernierte Enzyme. Hypoxische Primärtumore bilden vermehrt Lysyloxidase (LOX), die in der prämetastatischen Lunge akkumuliert und durch Vernetzung von Kollagenen die EZM Struktur solchermaßen verändert, dass myeloide Zellen verstärkt einwandern können [Erlor *et al.*, 2009]. Nicht nur lösliche Proteine, sondern auch primärtumorsezernierte Mikrovesikel, v. a. Exosomen, wurden als wichtige Mediatoren der Auslösung einer prämetastatischen Nische identifiziert [Peinado *et al.*, 2012].

1.2.3. Die prämetastatische Nische in der Leber

Kürzlich wurde gezeigt, dass die metastasierungsfördernde Wirkung von TIMP-1 auf die Leber auf der Auslösung einer hepatischen prämetastatischen Nische beruht [Seubert *et al.*, 2015]. Die prämetastatische Nische in der Leber ist vergleichsweise wenig erforscht. TIMP-1 ist der einzige bisher bekannte Faktor, der eine rezepptive Nische in der Leber auslösen kann. Besondere Bedeutung kommt hierbei der Beobachtung zu, dass primärtumorsezerniertes TIMP-1 ausreichend und notwendig ist, eine gesteigerte Suszeptibilität der Leber für Tumorzellen zu vermitteln [Seubert *et al.*, 2015]. Die TIMP-1-induzierte Suszeptibilität der Leber geht mit der Induktion verschiedener typischer Nischenfaktoren, wie SDF-1, TGF β , S100A8, Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und Fibronectin, sowie einer Infiltration durch neutrophile Granulozyten einher [Seubert *et al.*, 2015]. Eine der wenigen anderen Studien zur hepatischen prämetastatischen Nische zeigt, dass ein Kolorektalkarzinommodell, das besonders effizient in die Leber metastasiert, verglichen zum parentalen Modell verstärkt Nischenfaktoren exprimiert [Zhang *et al.*, 2013]. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die pul-

1. Einleitung

monalen Nischenfaktoren S100A8, S100A9, SAA3, MMP-9, und VEGF-A auch bei der Metastasierung in die Leber eine Rolle spielen [Zhang *et al.*, 2013]. Die Beteiligung von CXC-Motiv-Chemokinligand-1 (CXCL1) und dem zugehörigen CXC-Motiv-Chemokinrezeptor-2 (CXCR2) sowie neutrophilen Granulozyten in der Bildung einer prämetastatischen Nische in der Leber wurde in einer dritten Studie gezeigt [Yamamoto *et al.*, 2008]. Kürzlich zeigten Costa-Silva *et al.* (2015), dass Exosomen aus pankreatischen duktalem Adenokarzinomen (engl. *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*, PDAC) spezifisch in der Leber eine prämetastatische Nische initiieren. Hierbei fusionieren *macrophage migration inhibitory factor* (MIF)-reiche Exosomen mit Kupferzellen, welche daraufhin TGF β freisetzen und so HSCs aktivieren. Die PDAC-aktivierten HSCs bilden Fibronectin *Cluster* aus und fördern dadurch die Adhäsion myeloider Zellen aus dem Knochenmark [Costa-Silva *et al.*, 2015]. Die Ausbildung prämetastatischer Nischen kann somit auch in der Leber die organspezifische Besiedlung durch Tumorzellen vermitteln. Die Prozesse, die zur Ausbildung einer prämetastatischen Nische in der Leber führen, sind bisher jedoch nicht erforscht.

1.3. Die Leber als Zielorgan der Metastasierung

Die Leber ist bei 30-70 % der Krebspatienten (abhängig von der Art des Primärtumors) zum Zeitpunkt des Todes von Metastasen befallen und stellt somit das zweithäufigste Zielorgan der Metastasierung dar [Pickren *et al.*, 1982]. Lediglich Lymphknoten sind noch häufiger von Metastasen betroffen [Pickren *et al.*, 1982]. Metastasen in der Leber sind meistens über mehrere Leberlappen verteilt, was die Resektion dann unmöglich macht [Gilbert *et al.*, 1982]. Tumore mit besonders hoher Prävalenz von Lebermetastasen sind Melanome, gastrointestinale Tumore, Brust- und Lungenkarzinome, sowie Sarkome [Pickren *et al.*, 1982]. Adenokarzinome, maligne Tumore entstammend aus Drüsengewebe, machen eine Vielzahl der Krebserkrankungen in Lunge, Gastrointestinaltrakt und Brust aus [Riede und Schaefer, 1999]. Hess *et al.* (2006) zeigten in einer umfassenden Studie mit über 4000 Patienten, dass v. a. bei gastrointestinalen Adenokarzinomen Lebermetastasen sehr prävalent sind. Das Pankreaskarzinom zeigte hierbei eine ungewöhnliche Selektivität, da 74 % der untersuchten Pankreaskarzinompatienten ausschließlich Lebermetastasen aufwiesen [Hess *et al.*, 2006].

1.3.1. Anatomische und hämodynamische Eigenschaften

Die Mechanismen, die die Leber als sekundäres Zielorgan so attraktiv für zirkulierende Tumorzellen machen, sind bisher nicht vollständig geklärt. Die Leber besitzt verschiedene spezifische Eigenschaften, welche die Ausbildung von Metastasen begünstigen können. Die zentrale Position der Leber im Blutkreislauf sowie die physiologischen Anpassungen des Endothels an die Funktion als Entgiftungsorgan sorgen dafür, dass Tumorzellemboli effizient in den dortigen Kapillarsystemen arretiert werden [Vidal-Vanaclocha, 2008]. Die Leber filtert venöses Blut aus diversen Bauch- und Verdauungsorganen (Magen, Dünndarm, Dickdarm, Teile des Mastdarms, Bauchspeicheldrüse und Milz). Das Kapillarbett der Leber bilden die Sinusoide, die von fenestrierten lebersinusoidalen Endothelzellen sowie leberspezifischen Makrophagen, sog. Kupfferzellen, ausgekleidet werden [Vidal-Vanaclocha, 2008]. Die für die Filterfunktion notwendige anastomotische Anordnung vernetzter sinusoidaler Kapillaren innerhalb der Leberlobuli macht den Blutfluss in den Mikrokapillaren der Leber langsam und turbulent [Vidal-Vanaclocha, 2008]. Kupfferzellen und HSCs können die Lebersinusoide auf verschiedene Stimuli hin verengen und den Blutfluss in der Leber dadurch weiter verlangsamen [Vidal-Vanaclocha, 2008]. Die Leber ist somit einerseits ausgesprochen gut zugänglich für zirkulierende Tumorzellen, andererseits unterstützt sie durch ihre Filtrationsfähigkeit aktiv das mechanische Abfangen zirkulierender Tumorzellen [Vidal-Vanaclocha, 2008].

1.3.2. Besonderheiten der hepatischen Mikroumgebung

Zusätzlich zu den anatomischen und hämodynamischen Faktoren, die eine Anreicherung von Tumorzellen in der Leber begünstigen, spielt auch die einzigartige funktionelle hepatische Mikroumgebung eine entscheidende Rolle im Anhaften und Überleben von Tumorzellen [Barbera-Guillem *et al.*, 1991]. Tumorzellen treten in den Sinusoiden mit lebersinusoidalen Endothelzellen und Kupfferzellen in Kontakt [Barbera-Guillem *et al.*, 1991]. Diese Zellen exprimieren eine Vielzahl von Zelladhäsionsmolekülen, um im gesunden Organismus die effiziente Aufnahme sowie den Abbau von zirkulierenden Immunzellen, toten Zellen und Mikroorganismen vermitteln zu können [Barbera-Guillem *et al.*, 1991]. Dadurch bieten sie vielfältige Interaktionsflächen für das Anhaften von Tumorzellen in der Leber [Barbera-Guillem *et al.*, 1991]. Die anschließende Etablierung metastatischer Kolonien ist jedoch ein ineffizienter Prozess. Nur ein kleiner Teil der ankommenden Tumorzellen, beispielsweise 0.02 % intraportal injizierter Melanomzellen [Weiss, 1994], kann erfolgreich Makrometastasen in der Leber ausbilden. Das Überleben der Tumorzellen ist hierbei der limitierende Faktor und dieser Prozess wird maßgeb-

lich durch die Tumor-Stroma Interaktion beeinflusst [Weiss, 1994]. Ein erfolgreiches Zusammenspiel von Tumor- und lokalen Stromazellen ermöglicht Überleben und Wachstum metastasierter Tumorzellen im sekundären Organ [Sleeman, 2012]. Die endogene Stromazusammensetzung eines Organs sowie tumorfördernde Veränderungen der lokalen Mikroumgebung sind hierfür zentrale Faktoren [Sleeman, 2012]. Verschiedene parenchymale (v. a. Hepatozyten) sowie nicht-parenchymale Zelltypen der Leber (v. a. Portalfibroblasten und perisinusoidal gelegene HSCs) können ein förderliches Milieu für das Überleben und Wachsen von Tumorzellen ausbilden [Vidal-Vanaclocha, 2008]. Im Besonderen werden HSCs aufgrund ihrer speziellen biologischen Eigenschaften als treibende Kraft in der prometastatischen Leberumgebung postuliert [Olaso *et al.*, 1997; Vidal-Vanaclocha, 2008].

1.4. Aktivierte *Hepatic Stellate Cells* (HSCs) in der Metastasierung

1.4.1. Mechanismen der HSC Aktivierung

HSCs sind im Disse Raum lokalisiert, d. h. zwischen Hepatozyten und sinusoidalen Endothelzellen, und machen in der normalen Leber nur 5-8 % der Zellen aus [Friedman, 2008]. Im ruhenden, physiologischen Zustand speichern HSCs Vitamin A und üben eine perizytenartige Funktion aus [Friedman, 2008]. Die Aktivierung von HSCs ist Teil einer wohldefinierten Gewebeantwort der Leber, die bei Beschädigungen ausgelöst wird [Friedman, 2008]. Aktivierte HSCs zeichnen sich durch eine gesteigerte Proliferation und Motilität sowie massive Fibrogenese und die Produktion bioaktiver Moleküle aus [Friedman, 2008]. Markermoleküle für aktivierte HSCs sind daher oft mit Zellmotilität assoziiert, wie *αsmooth muscle actin* (α SMA), Desmin und Nestin. Weitere bekannte HSC Aktivierungsmarker weisen auf den fibrogenen Phänotyp der Zellen hin und hängen mit der Fähigkeit zum Auf- bzw. Umbau von EZM zusammen, wie z. B. Kollagen Typ 1a1 (engl. *Collagen 1a1* (Col1a1)) und verschiedene MMPs sowie auch TIMP-1 [Friedman, 2008]. Die Initiierung der HSC Aktivierung erfolgt über parakrine Stimuli, meist aus Kupferzellen, beschädigten Hepatozyten [Reeves und Friedman, 2002] oder über tumorzellsezernierte Faktoren [Olaso *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2011]. Die wichtigsten bisher bekannten HSC-aktivierenden Faktoren sind *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) und $TGF\beta$ [Friedman, 2008], jedoch wirken auch oxidativer Stress [Friedman, 2000] und inflammatorische Mediatoren, wie $TNF\alpha$ [Lee *et al.*, 1995], aktivierend. Nach der Initiierung der Aktivierung wirken parakrine sowie autokrine Signale zusammen, um

1. Einleitung

den aktivierten Zustand von HSCs aufrecht zu erhalten. HSCs stimulieren hierbei die eigene Aktivierung über autokrine Schleifen, u.a. über $TGF\beta$ [Cui *et al.*, 2003], während Kupffer-Zellen und eingewanderte Immunzellen anhaltende parakrine Signale liefern [Lee und Friedman, 2011]. Aktivierte HSCs wirken stark auf die hepatische Mikroumgebung ein, da sie exzessiv EZM aufbauen und bioaktive Moleküle wie Wachstumsfaktoren und Zytokine produzieren können (**Abb.1.2**, [Reeves und Friedman, 2002]). Welche Mechanismen zur Deaktivierung von HSCs führen ist kaum bekannt. Man geht davon aus, dass ein Teil der aktivierten HSCs zurück in den ruhenden Phänotyp differenzieren kann, während der Großteil apoptotisch wird [Friedman, 2008].

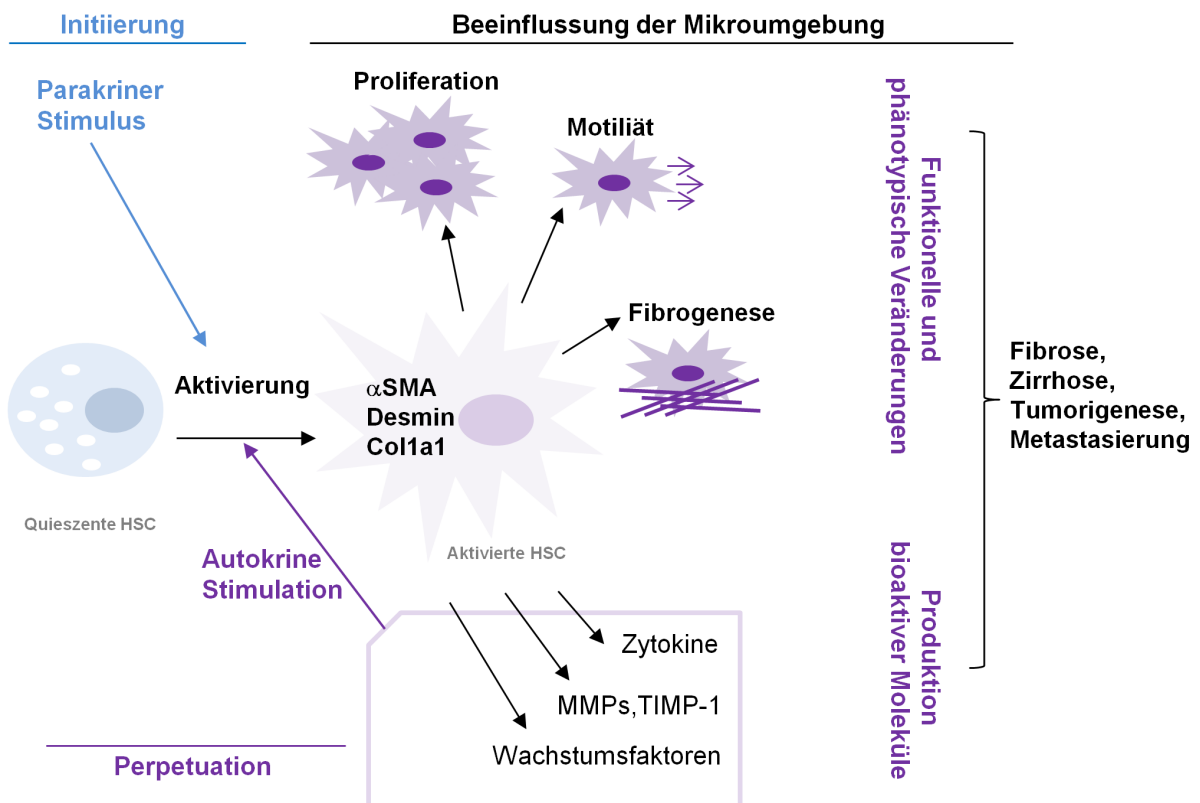


Abbildung 1.2. – Aktivierung von HSCs. Parakrine Stimuli initiieren die Aktivierung von HSCs und lösen die Transdifferenzierung der ruhenden, Vitamin A-reichen Zellen zu einem myofibroblastenartigen, bioaktiven Phänotyp aus. Hauptmerkmale des veränderten Phänotyps sind eine gesteigerte Proliferation, Kontraktilität, Chemotaxis und Fibrogenese, in Kombination mit einer gesteigerten Fähigkeit zur Umsetzung von EZM. Dies ist gekennzeichnet durch die Expression von MMPs und TIMP-1 sowie bioaktiver Faktoren. Die resultierende Beeinflussung der Mikroumgebung durch aktivierte HSCs trägt durch autokrine Stimulationsschleifen zur Erhaltung des aktivierten HSC Phänotyps bei und treibt zudem verschiedene Erkrankungen voran (nach Friedman, 2000).

1.4.2. Prometastatische Funktionen von HSCs

Aktivierete HSCs können aufgrund ihrer oben beschriebenen biologischen Eigenschaften diverse tumorfördernde Funktionen einnehmen. HSCs *in vitro* fördern über lösliche Faktoren die Invasivität und das Wachstum von Cholangiokarzinomzellen [Okabe *et al.*, 2009], hepatozellulären Karzinomzellen [Amann *et al.*, 2009] und Kolorektalkarzinomzellen [Shimizu *et al.*, 2000]. Koimplantation von HSCs mit Tumorzellen steigert Tumorstromawachstum und Angiogenese *in vivo* [Shimizu *et al.*, 2000; Amann *et al.*, 2009; Okabe *et al.*, 2011]. Verschiedene klinische Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen HSC Aktivierung mit der Rückfall- sowie Sterbewahrscheinlichkeit bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom [Ju *et al.*, 2009] sowie mit einer ungünstigeren Prognose für Patienten mit intrahepatischem Cholangiokarzinom [Okabe *et al.*, 2009]. Erkrankungen, die durch exzessive HSC Aktivierung gekennzeichnet sind, wie Fibrose und Zirrhose, stellen bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung hepatozellulärer Karzinome dar [Bataller und Brenner, 2005; De Minicis *et al.*, 2011]. HSCs nehmen in der metastasierungsfördernden Interaktion mit Tumorzellen vier Hauptfunktionen ein: (i) Versorgung von Tumorzellen mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen (ii) Ausbildung eines reaktiven Tumorstromas (iii) Förderung der Angiogenese und (iv) Unterdrückung der antitumoralen Immunantwort [Kang *et al.*, 2011]. HSCs können nicht nur während des Auswachsens metastatischer Kolonien in der Leber, sondern auch in der frühen, avaskulären Phase maßgeblich zu Tumorzellinvasion und -wachstum beitragen [Van den Eynden *et al.*, 2013]. Die von HSCs produzierten EZM Moleküle, wie z.B. Fibronectin, bilden das Stroma etablierter metastatischer Kolonien und können zudem bereits das Anhaften sowie das Integrin-*signalling*-vermittelte Überleben zirkulierender Tumorzellen fördern [Ruoslahti, 1999]. Eine Unterdrückung der antitumoralen Immunantwort durch HSCs kann gerade bei der Ankunft der Tumorzellen im Organ eine große Rolle spielen [Van den Eynden *et al.*, 2013]. Aufgrund der zentralen Rolle von HSCs in der Ausbildung einer tumorfördernden Mikroumgebung in der Leber wurde vermutet, dass HSCs effektiv zur Ausbildung prämetastatischer Nischen in der Leber beitragen können [Wels *et al.*, 2008]. Wenige Studien haben sich bisher damit befasst, untermauerten jedoch die Hypothese. Tumoraktivierte HSCs können demnach durch die Sezernierung von VEGF-A eine proangiogene Funktion in der hepatischen prämetastatischen Nische einnehmen [Olaso *et al.*, 2003]. HSCs spielen, wie zuvor erwähnt, eine wichtige Rolle in der exosomeninduzierten prämetastatischen Nische in der Leber bei PDAC, indem sie zur Ausbildung von Fibronectin-*Clustern* beitragen [Costa-Silva *et al.*, 2015]. HSCs sind außerdem eine leberspezifische Zellpopulation [Friedman, 2008] und könnten somit wichtig für organspezifische metastasierungsfördernde Mechanismen sein.

Die Rolle von HSCs in der prämetastatischen Nische in der Leber ist jedoch, über die wenigen oben erwähnten Studien hinaus, bisher kaum unbekannt.

1.5. Pankreaskarzinom

1.5.1. Prognose und Metastasierung des Pankreaskarzinoms

Die Hauptmerkmale des PDAC sind eine überaus schlechte Prognose, und eine frühe, effiziente Metastasierung [Tamburrino *et al.*, 2014], v. a. in die Leber [Hess *et al.*, 2006]. Die Inzidenz des PDAC deckt sich nahezu vollständig mit der Mortalität und das mittlere Fünf-Jahres-Überleben liegt bei unter 6 %. PDAC ist dadurch beispielsweise die vierthäufigste Krebstodesursache in den USA [Hartley *et al.*, 2015]. Die aktuell verfügbaren chemotherapeutischen Behandlungsoptionen sind jedoch enttäuschend und verlängern das mittlere Überleben im Bereich von Wochen bis Monaten [Hartley *et al.*, 2015]. Einzig die Weiterentwicklung chirurgischer Prozesse bei der Tumorentfernung erreichte eine effektive Verbesserung der Überlebensraten [Chang *et al.*, 2008]. Bei 80 % der Patienten ist die Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose bereits metastasiert und daher inoperabel [Tamburrino *et al.*, 2014]. Die Ursachen hierfür liegen zum einen in der späten Diagnose, denn die Erkrankung verläuft lange Zeit asymptomatisch und das Pankreas liegt tief im Retroperitonealraum [Hartley *et al.*, 2015]. Zum anderen weist das PDAC eine extrem hohe metastatische Effizienz auf [Tamburrino *et al.*, 2014]. Das häufigste und oftmals einzige Zielorgan von Pankreaskarzinometastasen ist die Leber: Über 70 % der Patienten weisen *post mortem* einzig in der Leber Metastasen auf (**Abb.1.3**, [Hess *et al.*, 2006]). Die Mechanismen, die dieser metastatischen Effizienz sowie Selektivität für die Leber zugrunde liegen sind bisher nicht geklärt und derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

1.5.2. Entstehung des Pankreaskarzinoms

Das Pankreas ist ein Drüsenorgan und Teil des Verdauungstraktes. Es besteht aus einem endokrinen Kompartiment, das Hormone wie Insulin, Glukagon und Somatostatin sezerniert, sowie aus einem exokrinen Kompartiment, das eine wichtige Rolle in der Verdauung von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen einnimmt [Lüllmann-Rauch, 2006]. Der exokrine Teil des Pankreas macht dabei nahezu 90 % der Gesamtmasse aus und enthält zwei Hauptzellpopulationen: Azinuszellen, welche die Verdauungssäfte produzieren, und Duktzellen, welche die anatomische Struktur für die Ableitung dieser Verdauungssäfte in den Verdauungstrakt bilden [Lüllmann-Rauch, 2006]. Duktzellen

1. Einleitung

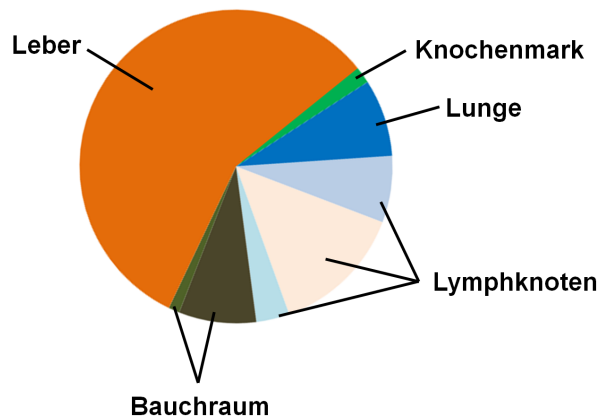


Abbildung 1.3. – Prävalenz von Lebermetastasen bei Pankreaskarzinom. Abgebildet ist die relative Häufigkeit von *post mortem* festgestellten Metastasen in Pankreaskarzinompatienten (nach [Hess *et al.*, 2006]).

gelten nach derzeitigem Kenntnisstand als zellulärer Ursprung des PDAC. Zwar sind verschiedene Arten maligner Erkrankungen des Pankreas bekannt, PDAC ist jedoch die bei weitem häufigste Form und macht etwa 95 % der diagnostizierten Tumore aus [Hansel *et al.*, 2003]. In der Entstehung des PDAC sind drei Arten von Vorläuferläsionen beschrieben: Muzinös-cystische Neoplasien, intraduktal-papilläre muzinöse Neoplasien und pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN) [Hruban *et al.*, 2004]. PanINs sind die häufigsten, nicht-invasiven Vorläuferläsionen des PDAC und verlaufen über verschiedene Vorstufen von PanIN1A bis PanIN3 (**Abb.1.4**). Die Inzidenz von PanINs steigt mit dem Alter sowie nach dem Auftreten einer Chronischen Pankreatitis (CP), die daher als entzündliche Vorstufe des Pankreaskarzinoms angesehen wird [Hruban *et al.*, 2004].

1.5.3. Murine Modellsysteme des Pankreaskarzinoms

Aussagekräftige *in vivo* Modelle sind von essentieller Bedeutung für die Onkologie, um die heterogenen, dynamischen sowie systemischen Prozesse abbilden zu können, die das Fortschreiten einer Krebserkrankung bestimmen [Olive und Tuveson, 2006]. Die C57BL/6J-Pdx1-Cre-Kras^{+/*LSL-G12D*}Trp53^{+/*LSL-R172H*} (KPC)-Maus ist ein häufig verwendetes, funktionell genetisches Modell zur Erforschung des PDAC [Olive und Tuveson, 2006]. Das KPC Modell basiert auf der konditionellen Expression der konstitutiv aktivierten G12D-Mutante des *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (Kras) Onkogens sowie der inaktivierten R172H-Mutante des Tumorsuppressors *transformation-related protein* (Trp)53 unter Kontrolle des jeweils endogenen Promotors [Hingorani

1. Einleitung

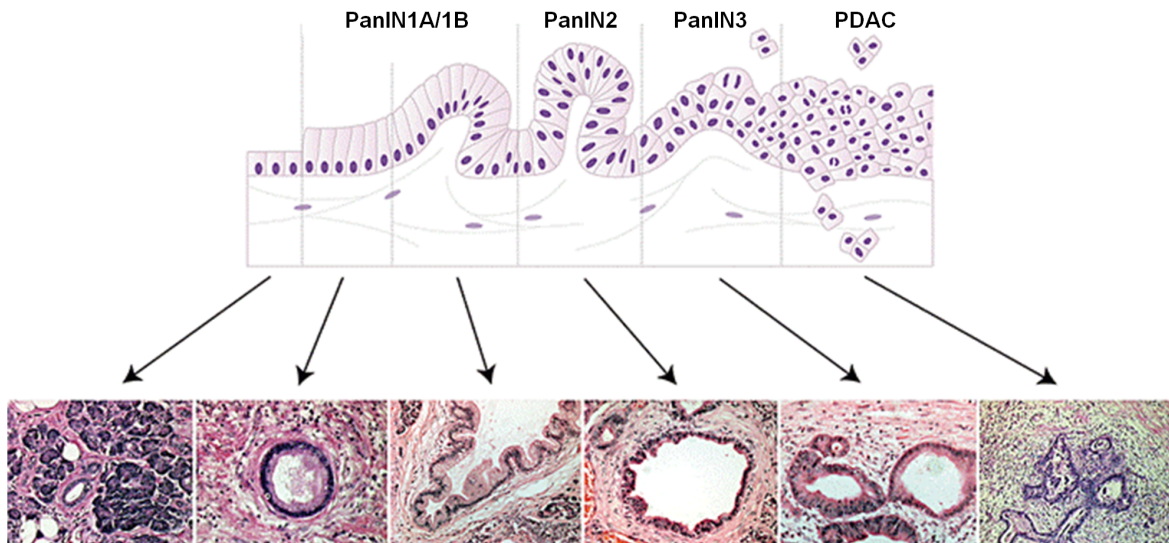


Abbildung 1.4. – PanIN-basiertes Progressionsmodell des PDAC (aus Chang *et al.*, 2008).

et al., 2005]. Die Aktivierung der mutierten Allele erfolgt durch die Cre Rekombinase-vermittelte Entfernung eines loxP-stop-loxP Allels. Die Expression der Cre Rekombinase findet unter der Kontrolle des *pancreatic and duodenal homeobox 1* (Pdx-1) Promotors statt. Pdx-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der während der Entwicklung von Pankreas und Darmrohr aktiv ist; die Rekombination und somit Aktivierung der mutierten Allele sind dadurch auf diese Organe beschränkt [Hingorani *et al.*, 2005]. Der Krankheitsverlauf im murinen KPC Modell gleicht in vielerlei Hinsicht der Progression des humanen PDAC. Die Tiere entwickeln im Anschluss an eine chronische Pankreatitis prä-maligne Läsionen, die den humanen PanIN Stadien stark ähneln. Nach 12-14 Wochen kommt es zu invasivem PDAC, das im Alter von 16-20 Wochen beginnt, zu metastasieren [Hingorani *et al.*, 2005]. Die Tumore zeigen eine ähnlich moderat differenzierte Histopathologie mit extensiver Desmoplasie und metastasieren vorwiegend in Leber und Lunge [Hingorani *et al.*, 2005].

1.5.4. TIMP-1 im Pankreaskarzinom

Die Plasmalevel von TIMP-1 sind in Pankreaskarzinompatienten erhöht [Mroczko *et al.*, 2009; Joergensen *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2011; Poruk *et al.*, 2013] und von prognostischem Wert (**Abb.1.5**, [Mroczko *et al.*, 2009; Poruk *et al.*, 2013]). Es gibt wenige funktionelle Untersuchungen zu den Effekten von TIMP-1 auf Pankreaskarzinomzellen

1. Einleitung

und deren Ergebnisse sind teils widersprüchlich. Eine Studie zeigte, dass die Überexpression von TIMP-1 in Pankreaskarzinomzellen zur Reduktion von Tumorwachstum, Metastasierung und Angiogenese führte [Bloomston *et al.*, 2002]. Dieselbe Gruppe berichtete allerdings im Jahr 2005, dass im identischen experimentellen Aufbau ein *Knock-down* von TIMP-1 denselben Effekt zeigte wie die Überexpression [Bloomston *et al.*, 2005]. Eine neuere Studie zeigte, dass es Effekte von TIMP-1 auf das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen gibt, die jedoch abhängig waren von der Anwesenheit einer K-Ras (G12D) Mutation [Botta *et al.*, 2013]. Diese wenig prominenten Effekte von TIMP-1 auf Pankreaskarzinomzellen stehen in Einklang mit dem Umstand, dass auch zwischen klinikopathologischen Eigenschaften von Pankreastumoren, wie Tumorgrad, und TIMP-1 kein Zusammenhang zu bestehen scheint [Gress *et al.*, 1995].

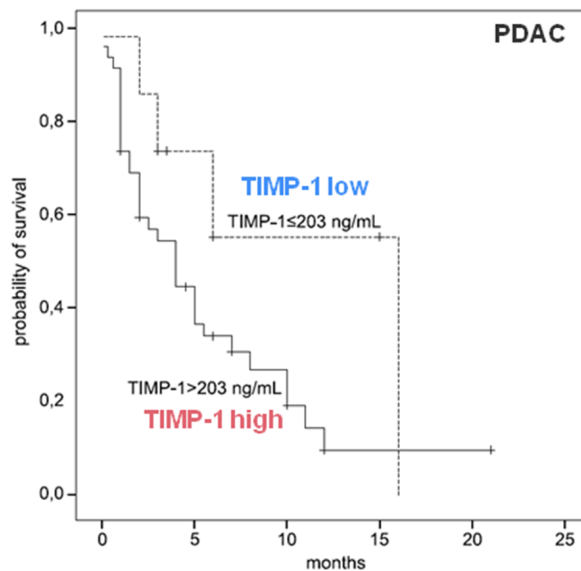


Abbildung 1.5. – TIMP-1 Plasmalevel und Überleben bei PDAC. Plasmaspiegel über 203 ng/ml sind mit einer verringerten Überlebenschance von PDAC Patienten assoziiert (aus Mroczko *et al.*, 2009).

Mit Blick auf die hohe Prävalenz von Lebermetastasen bei Pankreaskarzinom [Hess *et al.*, 2006] und deren fatalen Einfluss auf das Überleben der Patienten, ist jedoch gerade die leberspezifische metastasierungsfördernde Funktion von TIMP-1 [Kopitz *et al.*, 2007; Seubert *et al.*, 2015] von großem Interesse, wurde aber bisher nicht untersucht.

1.6. Ziel dieser Arbeit

TIMP-1 kann die Metastasierung in die Leber durch die Ausbildung einer prämetastatischen Nische begünstigen und spielt als negativ prognostischer Marker bei PDAC möglicherweise eine Rolle in der Progression dieser Erkrankung. In dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob es klinische oder präklinische Hinweise auf eine funktionelle Rolle von TIMP-1 in der frühen und effizienten Lebermetastasierung des PDAC gibt. Die pankreatischen und systemischen TIMP-1 Mengen im Plasma sollten während der Entwicklung der Erkrankung in KPC Mäusen ermittelt und korreliert werden. Diese Untersuchung sollte zeigen, ob und wann die systemischen TIMP-1 Spiegel bei PDAC ansteigen und ob Veränderungen der systemischen TIMP-1 Spiegel auf das erkrankte Pankreas zurückgeführt werden können. Die TIMP-1 Expression im prä-malignen Pankreas sollte mittels IHC in Gewebeproben von humanen Patienten mit PanIN Läsionen untersucht werden. Zur Klärung eines funktionellen Zusammenhangs von TIMP-1 mit der Progression des PDAC sollte die Assoziation der TIMP-1 Expression mit klinikopathologischen Parametern getestet werden. Einen wichtigen Teilaspekt dieser Arbeit sollte zudem die Klärung molekularer und zellulärer Mechanismen der TIMP-1-induzierten Ausbildung einer prämetastatischen Nische in der Leber bilden. Aktivierte HSCs lagen hierbei im besonderen Fokus, da sie eine leberspezifische Zellpopulation mit hohem Einflusspotential auf die Ausbildung einer pathologischen Mikroumgebung sind. Es sollte untersucht werden, ob es zur Aktivierung von HSCs in der TIMP-1-induzierten prämetastatischen Nische kommt und ob TIMP-1 selbst, oder nur in Wechselwirkung mit anderen Faktoren aus dem Tumor, HSCs aktivieren kann. Zur detaillierten Untersuchung der Effekte von TIMP-1 auf HSCs sollten die Zellen aus Mäusen mit hohen TIMP-1 Spiegeln isoliert und charakterisiert werden. Der direkte Einfluss erhöhter TIMP-1 Mengen auf Aktivierungsmerkmale von HSCs sollte mit Hilfe der immortalisierten HSC Zelllinie LX2 sowie primären HSCs aus PDAC Patienten *in vitro* untersucht werden. Der TIMP-1-induzierte Phänotyp von HSCs sollte hierbei bzgl. der Expression von Aktivierungsmarkern sowie möglichen funktionellen Veränderungen (Zellwachstum, Motilität, Genexpression) beschrieben werden. Aktivierte HSCs exprimieren selbst hohe Mengen von TIMP-1. Daher sollte geklärt werden, welche Funktion TIMP-1 als autokriner Faktor in der HSC Aktivierung einnimmt. Zur Aufklärung des zugrunde liegenden molekularen Mechanismus sollte getestet werden, ob die beobachteten Effekte der proteaseinhibitorischen bzw. der Signaldomäne von TIMP-1 zugeordnet werden können. Intrazelluläre Signalwege und die Rolle des zugehörigen Interaktionspartners CD63 sollten hierbei ebenfalls untersucht werden. Darüber hinaus sollte getestet werden, ob Effekte von TIMP-1 auf HSCs im Zusammenhang mit der

1. Einleitung

TIMP-1-induzierten Lebermetastasierung von Pankreaskarzinomzellen stehen. Die Untersuchung der Rolle von TIMP-1 in der Lebermetastasierung des Pankreaskarzinoms und die Identifizierung zugrunde liegender Mechanismen sollte einen Beitrag zum Erkennen möglicher molekularer und zellulärer Ursachen für die Fatalität dieser Erkrankung leisten. Über den Kontext des Pankreaskarzinoms hinaus sollten die gewonnenen Erkenntnisse das Verständnis der TIMP-1-induzierten Ausbildung einer rezeptiven, prä-metastatischen Nische verbessern.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen sind in Tab. 2.1 zusammengefasst.

Chemikalie	Hersteller, Firmensitz, Land
Absolve	NEN Life Science Products, Zaventem, Belgien
Agar (Bacto)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Agarose	peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Azeton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Desoxyadenosintriphosphat (dATP)	Thermo Fisher, Waltham, USA
Desoxycytosintriphosphat (dCTP)	Thermo Fisher, Waltham, USA
Desoxyguanintriphosphat (dGTP)	Thermo Fisher, Waltham, USA
Desoxythymintriphosphat (dTTP)	Thermo Fisher, Waltham, USA
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 98 % (EtOH abs.)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70 % (EtOH 70 %)	Apotheke des Klinikums Rechts der Isar
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Formalin 40 % (w/v)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Glutaraldehyd, 50 %	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

2. Material und Methoden

Glyzerin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt (Bacto)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Incidin [®] perfekt	Ecolab, Wien, Österreich
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaiser's Glyzeringelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol (MeOH)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Natrium-Deoxycholat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nonidet [®] P40 (NP-40)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Nukleasefreies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Polyacrylsäure (PAA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Roticlear [®]	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Saures Hämalaun nach Meyer	Apotheke des Klinikums Rechts der Isar
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) 94-97 % (v/v)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Triton X-100	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Trizol [®] -Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypton (Bacto)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Tween20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 37 % (v/v)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)	Thermo Fisher, Waltham, USA

Tabelle 2.1. – Verwendete Chemikalien

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

In Tab. 2.2 sind alle im Labor verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Gegenstand	Hersteller, Firmensitz, Land
Alufolie	Fora, Radolfzell, Deutschland
Entsorgungsbeutel	TPP Plastic Products, Trasadingen, Schweiz
Parafilm M	Pechiney, Düsseldorf, Deutschland
Holzspatel	MedPlus Medizintechnik, Dresden, Deutschland
Aerogard Tips (1-40 μ l)	Alpha Laboratories, Hampshire, England
Aerogard Tips (1-250 μ l)	Alpha Laboratories, Hampshire, England
Multigard Barrier Tips (100-1000 μ l)	Sorenson Bioscience, Salt Lake City, USA
Ungestopfte Pipettenspitzen	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Multipettenaufsätze	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
2 ml Injektionsspritzen	Braun, Melsungen, Deutschland
Kanülen Sterican (20x0,4mm)	Braun, Melsungen, Deutschland
Skalpell	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Kryomolds (25x20x5mm)	Sakura Finetek, Heppenheim, Deutschland
Mikrotommesser S35 Feather Safety	Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
SuperFrost [®] Plus Objektträger	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Deckgläser (10x40mm)	Menzel, Braunschweig, Deutschland
0,2 ml PCR-Tubes	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
2 ml Kryotubes	TPP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz
2,5 ml Kryostube mit Silikondichtung	nerbe plus, Winsen an der Luhe, Deutschland
Organgefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
MicroAmp Optical 96- <i>well</i> Plates	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
96- <i>well</i> Plate Verschlussfolie	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
96- <i>well</i> Platten	PerkinElmer LAS, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
24- <i>well</i> Platten	TPP Plastic Products, Trasadingen, Schweiz
6- <i>well</i> Platten	TPP Plastic Products, Trasadingen, Schweiz
6 cm, 10 cm, 15 cm Petrischalen	TPP Plastic Products, Trasadingen, Schweiz
Sterilfilter Stericups	Millipore, Eschweiler, Deutschland
Nitrozellulose-Membran	Amersham Biosciences, Piscataway, USA

2. Material und Methoden

Paraffineinbettkassette	Medite, Burgdorf, Deutschland
Tissue Tek	Sakura Finetek, Heppenheim, Deutschland
Zirconiumsilicatkügelchen	Biospec Products Inc., Bartlesville, USA
Gazin Mullkompreesse	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, Deutschland

Tabelle 2.2. – Verwendete Verbrauchsmaterialien

2.1.3. Geräte

Tab.2.3 zeigt alle verwendeten Labor- und optischen Geräte.

Gerät	Hersteller, Firmesitz, Land
Neubauer Zählkammer	Assistent, Sondheim, Deutschland
Scientific CO ₂ Water Jacketed Incubator	Thermo Quest, Egelsbach, Deutschland
Blottinggerät Trans-Blot [®] SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Gelgießvorrichtung mit Zubehör	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Vertikale Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Zentrifuge J2-HS	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge2.0	Thermo Fisher Scientific Inc., Ulm, Deutschland
Sterilbank Hera Safe	Heraeus Sepatech, Düsseldorf, Deutschland
Paraffin Embedding System Dispenser Unit TBS88	Medite, Burgdorf, Deutschland
Kryostat-Mikrotom HM500 OM	Microm International, Walldorf, Deutschland
Paraffin-Mikrotom HM355	Microm International, Walldorf, Deutschland
Paraffin-Streckbad TFB35	Medite, Burgdorf, Deutschland
Minibeadbeater	Biospec Products Inc., Bartlesville, USA
TaqMan ABI PRISM 7900HT	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
PCR Cycler	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
ImmunoWash Model 1575	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Rotlichtlampe R95E	Philips, Hamburg, Deutschland
Spectrophotometer DU [®] 640	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Wallac Victor2 1420	PerkinElmer, Rodgau, Deutschland
Auflichtmikroskop SZX9	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland
Durchlichtmikroskop DRMB	Leica AG, Solms, Deutschland
Zellkulturmikroskop Zeiss Axiovert 25	Carl Zeiss, Hallbergmoos, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axiovert135	Carl Zeiss, Hallbergmoos, Deutschland

2. Material und Methoden

Coolpix 4500 Digital Camera	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Kodak Image Station 440 CF	Kodak, Stuttgart, Deutschland

Tabelle 2.3. – Verwendete Geräte

2.1.4. Software

Verwendete Software für Datenaquisition und -auswertung ist in Tab. 2.4 aufgeführt.

Software, Version	Hersteller
AxioVision 4.5	Carl Zeiss, Hallbergmoos, Deutschland
Kodak 1D 3.5 Image Software	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Microsoft Office 2003	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
SDS2.2	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
StepOne Software	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
ImageJ	National Institutes of Health, USA

Tabelle 2.4. – Verwendete Software

2.1.5. Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden mit H₂O bidest. angesetzt und Stammlösungen ggf. mit H₂O bidest. weiter verdünnt. Im Folgenden sind Standardlösungen und Puffer gelistet, die bei verschiedenen Methoden eingesetzt wurden. Spezielle Lösungen und Puffer sind bei der zugehörigen Methode aufgeführt.

10x PBS	1,35 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ und 14 mM K ₂ HPO ₄
PBS-T	0,2 % (v/v) Tween20 in 1xPBS
10x TBS	0,5 M Tris und 1,5 M NaCl, pH 7,6 mit HCl
TBS-T	0,1 % (v/v) Tween20 in 1xTBS
TE Puffer	10 mM Tris und 1 mM EDTA, pH 7,5

2.1.6. Antikörper

Tab. 2.5 zeigt alle für diese Arbeit verwendeten Antikörper und die zugehörigen Bezugsquellen sowie Bestellnummern.

Anwendung	Antigen	Bezugsquelle	Bestellnummer/Referenz
IHC			
<i>primär</i>	Desmin	SCBT	sc-7559
	α SMA	abcam	ab5694
	TIMP-1	Gillian Murphy	[Hembry <i>et al.</i> , 1985]
	GFP	Fitzgerald	70R-GG001
<i>sekundär (biotinyliert)</i>	Ziegen-IgG	R&D (Kit)	CTS008
	Kaninchen-IgG	R&D (Kit)	CTS005
	Schaf-IgG	Dako	E0466
	Kaninchen-IgG	Dako	E0432
Western Blot			
<i>primär</i>	p110 α	CST	#4249
	p110 β	CST	#3011
	p110 γ	CST	#5405
	P-p85	CST	#4228
	ERK1/2	CST	#9102
	P-ERK1/2	CST	#4376
	α Tubulin	Millipore	CP06
<i>sekundär (HRP-konjugiert)</i>	Kaninchen-IgG	CST	#7074
	Maus-IgG	CST	#7076

Tabelle 2.5. – Verwendete Antikörper

2.1.7. Verwendete Kits

Tab. 2.6 zeigt alle für diese Arbeit verwendeten Kits und die zugehörigen Bezugsquellen.

Kit	Hersteller, Firmensitz, Land
<i>High-Capacity RT Kit</i>	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
<i>RNeasy Midi Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Pierce[®] BCA Proteine Assay</i>	Thermo Fisher, Ulm, Deutschland

2. Material und Methoden

<i>Clarity Chemiluminescence Kit</i>	BioRad, München, Deutschland
<i>Rabbit AEC Cell& tissue staining Kit</i>	R&D, Wiesbaden, Deutschland
<i>Goat AEC Cell&tissue staining Kit</i>	R&D, Wiesbaden, Deutschland
DAB Substrat	Dako, Hamburg, Deutschland
AEC Substrat	Dako, Hamburg, Deutschland
DuoSet <i>human</i> TIMP-1 ELISA Kit	R&D, Wiesbaden, Deutschland
OptiEIA TMB Substrat	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 2.6. – Verwendete Kits

2.2. Patientenproben

2.2.1. Verwendete Gewebe

Formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben von Pankreaskarzinompatienten wurden von Prof. Irene Esposito (Institut für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie, Klinikum rechts der Isar (München, Deutschland)) für immunhistochemische Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die Proben stammten von 13 Patienten mit PanIN Vorläuferläsionen sowie 74 Patienten mit invasivem, histologisch bestätigtem PDAC. Plasmaproben von 25 Patienten mit histologisch bestätigtem Pankreaskarzinom wurden während dieser Arbeit in Kollaboration mit Prof. Martignoni (Chirurgische Klinik des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland) gesammelt. Alle Patienten waren über die Eingriffe informiert und haben schriftliche Einwilligungserklärungen unterzeichnet, die am Institut für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie bzw. an der Chirurgischen Klinik des Klinikum rechts der Isar (München, Deutschland) hinterlegt sind. Die Verwendung von humanem Material für die durchgeführten Analysen wurde durch das lokale Ethikkomitee der Technischen Universität München (Deutschland) genehmigt (Ethikvotum #1946/07).

2.2.2. Klinische Daten

Das Ausmaß der Erkrankung eines PDAC Patienten wird derzeit anhand von zwei klinikopathologischen Parametern ermittelt, (i) dem *tumor node metastasis* (TNM)-Status als Maß für die Ausbreitung der Erkrankung [Sobin *et al.*, 2011] und (ii) dem Tumorgrad als Maß für die Dedifferenzierung des Tumors [Wasif *et al.*, 2010].

2. Material und Methoden

Der NM-Status beschreibt die Ausbreitung in sekundäre Organe, wobei N für Lymphknoten (engl. *node*) steht und M für distante Metastasen. Daraus ergibt sich der NM Status: Nx/Mx, kann nicht festgestellt werden; N0/M0, kein Befall der Lymphknoten und keine Fernmetastasen; N1/M0, Befall der Lymphknoten, aber keine Fernmetastasen; N1/M1, Befall der Lymphknoten und Fernmetastasen (inoperabel) [Wasif *et al.*, 2010]. Die zu den Plasmaproben gehörigen klinischen Daten zum NM-Status der Patienten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Olga Prokopchuk und Herrn Oleksii Prokopchuk (Chirurgische Klinik des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland) gesammelt.

Die Dedifferenzierung eines Tumors beschreibt die morphologische und funktionelle Abweichung der Tumorzellen von den normalen Zellen desselben Gewebes; der histologische Grad bei PDAC wird anhand der Anteils drüsenartig differenzierten Gewebes am Tumor bestimmt: Bestehen >95 % des Tumors aus Drüsen gilt er als gut differenziert (Grad 1), bei 50 %–95 % Drüsenanteil als mäßig differenziert (Grad 2) und mit <50 % Drüsengewebeanteil als wenig differenziert (Grad 3). Der Tumorgrad der Gewebeproben für immunhistochemische Untersuchungen wurde von Prof. Irene Esposito (Institut für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie, Klinikum rechts der Isar (München, Deutschland) bestimmt.

2.3. Tierexperimentelle Methoden

Ein Hauptteil dieser Arbeit umfasste die Untersuchung des Einflusses hoher TIMP-1 Spiegel auf die Aktivierung von HSCs und des Einflusses TIMP-1-aktivierter HSCs auf die Metastasierung in verschiedenen Mausmodellen. Die Inokulation von Tumorzellen (i.v. sowie s.c) und die Inokulation von Adenoviren (i.v.) wurde stets von Prof. Achim Krüger (Institut für Experimentelle Onkologie und Molekulare Immunologie, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland) durchgeführt.

2.3.1. Verwendete Versuchstiere

Die Haltung und Pflege der Mäuse erfolgte unter Standardbedingungen im *specified pathogen free* (SPF)-Tierstall des Zentrums für Präklinische Forschung (ZPF) des Klinikums Rechts der Isar durch ausgebildete Versuchstierpfleger.

Versuchsmäuse von kommerziellen Anbietern

Weibliche DBA/2 bzw. C57BL/6J Mäuse im Alter von 6-8 Wochen wurden von Charles River, Sulzfeld, Deutschland bezogen. Die Tiere wurden vor Beginn der Experimente für eine Woche an die neuen Haltungsbedingungen gewöhnt. Die Verteilung der Tiere auf experimentelle Gruppen erfolgte stets zufällig.

Mäuse aus eigener Zucht

Folgende Linien wurden für diese Arbeit am Zentrum für Präklinische Forschung des Klinikums rechts der Isar (München) gezüchtet:

- **CD63^{ko}**: Diese Linie weist eine Nullmutation im CD63 Gen auf, da Exon 2 durch eine Neomycin-Kassette ersetzt wurde [Schröder *et al.*, 2009]. Als Kontrollen dienten *Littermates* mit intakten CD63 Wildtyp Allelen (CD63^{wt}). Die Versuchstiere waren 8-11 Wochen alt. Es wurden männliche und weibliche Mäuse verwendet.
- **KPC**: Diese Linie weist eine aktivierende G12D Punktmutation im Onkogen *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (Kras) sowie eine inaktivierende R172H Punktmutation im Tumorsuppressorgen *transformation-related protein 53* (Trp53) auf. Beide Gene werden konditionell durch Cre Rekombinase unter der Kontrolle des pankreasspezifischen Promotors *pancreatic and duodenal homeobox 1* (Pdx1) im Pankreas exprimiert und führen dort zur spontanen Ausbildung von Karzinomen. Die LSL-Konstrukte liegen jeweils *upstream* von Exon 1 im natürlichen murinen Kras *locus* (Chromosom 6) bzw. im natürlichen murinen Trp53 *locus* (Chromosom 11). Die Lokalisation des Pdx-1-Cre Konstrukts im Genom ist zufällig [Hingorani *et al.*, 2005]. Es wurden männliche und weibliche KPC Tiere im Alter von 5-6, 8-10 oder 12-14 Wochen verwendet. Gesunde *Littermates* dienten als Kontrollen.
- **KPCxTIMP-1^{ko}**: Diese Linie wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Einkreuzen der KPC Linie in TIMP-1 *knock-out* Mäuse (B6.129S4-Timp1tm1Pds/J, [Soloway *et al.*, 1996], bezogen von Jackson Laboratories, Maine, USA) generiert. Es wurden männliche und weibliche KPCxTIMP-1^{ko} im Alter von 12-14 Wochen verwendet.

Alle Linien wurden im C57BL/6J Stammhintergrund [Dietrich *et al.*, 1996] generiert bzw. waren vor Erhalt der Tiere für diese Arbeit in diesen rückgekreuzt worden [Hingorani *et al.*, 2005; Schröder *et al.*, 2009] und sind daher *syngen* zu den verwendeten 9801-eGFP Zellen (siehe 2.6.1, Seite 41).

2.3.2. Adenovirale Transduktion von Mäusen

Rekombinante Adenoviren sind ein gut etabliertes Vehikel für den Transfer von Nukleinsäuren in Säugerzellen im lebenden Organismus und daher auch im Mausmodell, v.a. aufgrund der effizienten Transgenexpression, der Transduktion sich teilender sowie sich nicht teilender Zellen und der Breite des Wirtszellspektrums [Benihoud *et al.*, 1999].

Spezielle Lösungen:

- PBS²⁺: 0,068 mM CaCl₂, 0,49 mM MgCl₂ in PBS-Dulbecco, sterilfiltriert

Intravenös (i.v.) injizierte adenovirale Vektoren weisen einen starken Lebertropismus auf [Mowa *et al.*, 2010]. Adenoviral übertragene sezernierte Transgenprodukte, wie z.B. TIMP-1, sind über mehrere Wochen systemisch verfügbar [Elezkurtaj *et al.*, 2004], während die adenovirale Übertragung von RNAi-Vektoren eine leberspezifische Manipulation des Wirtsgens erlaubt [Mowa *et al.*, 2010]. Für die Etablierung einer Überexpression von TIMP-1 bzw. N-TIMP-1 sowie eines *knock-downs* von CD63 in Mäusen wurden E1- und E3-deletierte und daher nicht-replikative humane Adenoviren vom Serotyp 5 verwendet [Hitt *et al.*, 1997]. Bei AdTIMP-1 bzw. AdN-TIMP-1 handelt es sich um Adenoviren mit einer Transgenkassette für die Expression von humanem TIMP-1 bzw. der N-terminalen Domäne von TIMP-1 (N-TIMP-1) unter Kontrolle eines CMV-Promotors [Kopitz *et al.*, 2007]. Als Nullvirus-Kontrolle wurde AddI70-3 verwendet, dieses trägt kein Transgen [Bett *et al.*, 1994]. Bei AdshCD63 und der zugehörigen Kontrolle AdshNT handelt es sich um kommerziell erhältliche Adenoviren der Firma Sirion Biotech, Martinsried, Deutschland. Die CsCl-Aufreinigung der für diese Arbeit verwendeten Adenoviren sowie die Bestimmung des Hexontiters zur Ermittlung der *infectios units* (ifu) wurden von Frau Katja Honert (Institut für Experimentelle Onkologie und Molekulare Immunologie, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland) durchgeführt und dokumentiert. Das jeweilige Adenovirus wurde in PBS²⁺ auf die in der jeweiligen Versuchsanordnung angegebenen Dosis verdünnt und i.v. in die Schwanzvene der Mäuse injiziert, nachdem diese zur Dilatation der Venen 20 min mit Rotlicht erwärmt worden waren.

2.3.3. Subkutanen (s.c.) NIH3T3 Tumormodell zur Überexpression von TIMP-1

Zur Untersuchung der Effekte hoher primärtumorsezernierter TIMP-1 Spiegel auf die HSC Aktivierung wurden s.c. 1×10^6 NIH3T3 Zellen mit TIMP-1 Überexpression bzw. Leervektorkontrolle in SCID Mäuse (n = 5 pro Gruppe) injiziert. Nach 28 Tagen hatten sich Tumore mit einem Durchmesser von 1-1,3 cm gebildet und die Tiere wurden für die Probennahme (siehe 2.3.9, Seite 34) geopfert.

2. Material und Methoden

Gruppe	Tag 0	Tag 28
I	1x10 ⁶ NIH3T3 SF/empty	Versuchsende
II	1x10 ⁶ NIH3T3 SF/TIMP-1	-"-

Tabelle 2.7. – Tierversuchsanordnung zur Überexpression von TIMP-1 s.c. NIH3T3 Tumoren

2.3.4. Adenovirale Überexpression von TIMP-1 in Mäusen über neun Tage

Zur Untersuchung der Effekte hoher TIMP-1 Spiegel auf die HSC Aktivierung über einen Zeitraum von neun Tagen wurden DBA/2 Mäuse (n = 5 pro Gruppe) i.v. mit AdTIMP-1 bzw. Addl70-3 transduziert. Nach je drei, sechs und neun Tagen wurde eine Versuchstiergruppe für die Probennahme (siehe 2.3.9, Seite 34) geopfert.

Gruppe	Tag 0	Tag 3, Tag 6, Tag 9
I	3x10 ⁹ ifu Addl70-3	Versuchsende
II	3x10 ⁹ ifu AdTIMP-1	-"-

Tabelle 2.8. – Tierversuchsanordnung zur adenoviralen Überexpression von TIMP-1 in Mäusen über 9 Tage

Dieser Versuch wurde von Frau Julia Kobuch geleitet und zusammen mit Frau Haissi Cui (Institut für Experimentelle Onkologie und Molekulare Immunologie, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland) durchgeführt.

2.3.5. Adenovirale Überexpression von (N-)TIMP-1 in Mäusen über drei Tage

Die Effekte hoher TIMP-1 Spiegel auf die HSC Aktivierung über einen Zeitraum von drei Tagen wurden in DBA/2 und C57BL/6 Mäusen (n = 5 pro Gruppe) untersucht. Die Tiere wurden i.v. mit AdTIMP-1 und AdN-TIMP-1 bzw. Addl70-3 transduziert und nach drei Tagen für die Probennahme (siehe 2.3.9, Seite 34) geopfert. Zur Isolation von HSC Fraktionen aus derselben Versuchsanordnung wurden in einem zweiten Experiment

2. Material und Methoden

C57BL/6 Mäusen (n = 5 pro Gruppe) i.v. mit AdTIMP-1 und AdN-TIMP-1 bzw. Addl70-3 transduziert und nach drei Tagen für die Isolation von HSCs (siehe 2.5, Seite 39) geopfert.

Gruppe	Tag 0	Tag 3
I	2x10 ⁹ ifu Addl70-3	Versuchsende
II	2x10 ⁹ ifu AdTIMP-1	-"-
III	2x10 ⁹ ifu AdN-TIMP-1	-"-

Tabelle 2.9. – Tierversuchsanordnung zur adenoviralen Überexpression von TIMP-1 in Mäusen über 3 Tage

2.3.6. Adenovirale Überexpression von TIMP-1 in Mäusen bei gleichzeitigem *knock-down* von CD63

Zur Untersuchung der Effekte von CD63 in der TIMP-1-induzierten Lebermetastasierung sowie HSCs-Aktivierung wurde gleichzeitig mit AdTIMP-1 ein CD63 *knock-down* Adenovirus (AdshCD63) verabreicht. Dies wurde in C57BL/6 Mäusen (n = 5 pro Gruppe) untersucht. Den Tieren wurde i.v. ein Gemisch aus Addl70-3/AdshNT (als Kontrolle), AdTIMP-1/AdshNT bzw. AdTIMP-1/AdshCD63 injiziert. Drei Tage nach Virusinokulation wurden 1x10⁶ 9801-eGFP Zellen in 200 µl PBS i.v. in die Schwanzvene inokuliert, 24 h später wurden die Tiere geopfert und Proben genommen (siehe 2.3.9, Seite 34).

Gruppe	Tag -3	Tag 0	Tag 1
I	0,7x10 ⁹ ifu Addl70-3 , 1,3x10 ⁹ ifu AdshNT	1x10 ⁶ 9801-eGFP	Versuchsende
II	0,7x10 ⁹ ifu AdTIMP-1 , 1,3x10 ⁹ ifu AdshNT	-"-	-"-
III	0,7x10 ⁹ ifu AdTIMP-1 , 1,3x10 ⁹ ifu AdshCD63	-"-	-"-

Tabelle 2.10. – Tierversuchsanordnung zur Überexpression von TIMP-1 bei gleichzeitigem *knock-down* von CD63 in Mäusen

2.3.7. Adenovirale Überexpression von TIMP-1 in CD63 *knock-out* Mäusen

Zur Untersuchung der Effekte von CD63 in der TIMP-1-induzierten Lebermetastasierung sowie HSCs-Aktivierung wurde CD63 *knock-out* Mäusen AdTIMP-1 verabreicht.

Drei Tage nach Virusinokulation wurden 1×10^6 9801-eGFP Zellen in 200 μ l PBS i.v. in die Schwanzvene inokuliert, 24 h später wurden die Tiere geopfert und Proben genommen (siehe 2.3.9, Seite 34).

Gruppe	Genotyp	Tag -3	Tag 0
I	Wildtyp	2×10^9 ifu AdTIMP-1	Versuchsende
II	CD63 <i>knock-out</i>	2×10^9 ifu AdTIMP-1	-"-

Tabelle 2.11. – Tierversuchsanordnung zur Überexpression von TIMP-1 bei gleichzeitigem *knock-down* von CD63 in Mäusen

2.3.8. Adenovirale Überexpression von TIMP-1 in Mäusen unter Wortmannin Behandlung

Zur Untersuchung der Rolle des PI3K-Signalweges in der TIMP-1-induzierten Lebermetastasierung sowie HSCs-Aktivierung wurden AdTIMP-1- bzw. kontrolltransduzierte C57BL/6 Mäuse mit dem PI3K Inhibitor Wortmannin behandelt. Die Tiere wurden täglich intraperitoneal (i.p.) mit 1 mg/kg/Tag Wortmannin in 1.25 %DMSO/PBS behandelt bzw. mit 1.25 %DMSO/PBS als Vehikelkontrolle. Die Behandlung begann einen Tag vor Virusinokulation und endete einen Tag vor Inokulation der Tumorzellen. Drei Tage nach Virusinokulation wurden 1×10^6 9801-eGFP Zellen in 200 μ l PBS i.v. inokuliert, 24 h später wurden die Tiere für die Probennahme (siehe 2.3.9, Seite 34) geopfert.

Gruppe	ab Tag -4	Tag -3	Tag 0	Tag 1
I	DMSO	2×10^9 ifu AdTIMP-1	1×10^6 9801-eGFP	Versuchsende
II	Wortmannin	-"-	-"-	-"-

Tabelle 2.12. – Tierversuchsanordnung zur Überexpression von TIMP-1 unter Wortmannin-Behandlung

2.3.9. Probennahme

Die Versuchsmäuse wurden durch CO₂ getötet. Die Blutentnahme erfolgt sofort mit EDTA-gespülten Spritzen aus der Bauchvene (*Vena cava inferior*). Das entnommene Vollblut wurde auf Eis gelagert, bis nach Zentrifugation bei 500 g für 5 min Plasma abgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Zwei 3-4 mm breite Randstücke des linken Leberlappens (*Lobus sinister*) und der kaudale Leberlappen (*Lobus caudatus*) wurden in Schraubgefäßen ebenfalls schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das mittlere Stück des linken Leberlappens wurde in vier ca. 2 mm dicke Scheiben zerteilt, von denen je zwei (i) für Kryoschnitte in Tissue Tek Gefrierschutzmedium eingebettet, auf Trockeneis schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert wurden bzw. (ii) für die spätere Einbettung in Paraffin zunächst in Fixierlösung (siehe 2.4.1, Seite 34) aufgenommen wurden.

2.4. Histologische Methoden

2.4.1. Paraffineinbettung von Leberstücken

Murine Gewebeproben wurden in Biopsiekapseln über Nacht in Fixierlösung (2 % (v/v) Formaldehyd in 1xPBS) bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag in PBS zur Entwässerung gegeben. Anschließend wurden die Proben aus dem 60°C Schrank abgeholt, am *Dispenser Unit* in ein auf 60°C vorgewärmtes Paraffinbad gelegt. Die Gewebestücke wurden in einer Einbettschale ausgerichtet und diese mit Paraplast (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) ausgegossen.

2.4.2. Herstellung und Vorbehandlung von Paraffinschnitten

Die in Paraffin eingebetteten Leberpräparate (siehe 2.4.1, Seite 34) wurden in ein Paraffinmikrotom eingespannt und Schnitte von 2 µm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden zum Glätten mit Hilfe eines angefeuchteten Seidenpapierstreifens in 42°C warmes H₂O bidest. überführt, dann auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank aufgebacken. Ab dem nächsten Tag wurden die Schnitte für die weitere Verwendung im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert oder sofort verwendet.

2. Material und Methoden

Im Vorfeld aller histochemischer sowie immunhistochemischer Methoden wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert und rehydriert nach folgendem Schema:

3x 5 min	Roticlear®
2x 5 min	EtOH abs.
2x 5 min	EtOH 90 %
1x 5 min	EtOH 70 %
1x 5 min	H ₂ O bidest.

2.4.3. SiriusRed Färbung

Die SiriusRed Färbung ist eine gut etablierte histochemische Kollagenfärbung.

Spezielle Lösungen:

- **Pikro-SiriusRed Lösung:**
1 % DirectRed80 in gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung (1,3 % in H₂O bidest.)
- **Angesäuertes Wasser:**
0,5 % Essigsäure in H₂O bidest.

Färbung: Anschließend an die Vorbehandlung der Paraffinschnitte (siehe 2.4.2) wurden diese für 10 min in Saurem Hämalaun nach Mayer inkubiert. Die Differenzierung der Färbung erfolgte unter fließendem Leitungswasser. Die Schnitte wurden anschließend für 1 h in Pikro-SiriusRed Lösung gefärbt, dreimal in angesäuertem Wasser gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (jeweils drei min in 70 % Ethanol, 2x 90 % Ethanol, 2x 100 % Ethanol). Die Proben wurden mit Roticlear geklärt und mit Eukit eingedeckt, sodass sie im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert werden konnten.

2.4.4. Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten

Zur gewebespezifischen Lokalisation von Proteinen wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Die immunhistochemische Detektion von GFP erfolgte auf Paraffinschnitten muriner Leberproben. Die immunhistochemische Färbung von TIMP-1 erfolgte auf Paraffinschnitten von *Tissue Microarrays* mit Gewebestanzungen humaner Patienten und wurde mit Hilfe von Frau Sandra Hiltensberger (Institut für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie, Klinikum rechts der Isar (München, Deutschland)) etabliert und durchgeführt.

Spezielle Lösungen:

- **Citratpuffer:** 0.1 M Zitronensäure in H₂O bidest., pH 6,0
- **Peroxidase-Block Lösung:** 3 % H₂O₂ in H₂O bidest.
- **AEC Substratlösung:** 30 µl AEC pro 1 ml Substratpuffer (Dako, Hamburg, Deutschland)

In Tab.2.5, Seite 26 sind die hierbei verwendeten Antikörper näher spezifiziert. Anschließend an die Vorbehandlung (siehe 2.4.2) erfolgte die Antigen-Demaskierung in Citratpuffer für 4x 7 min bei 680 W in der Mikrowelle, nach 2x 5 min Waschen in TBS bei Raumtemperatur und das Blockieren endogener Peroxidaseaktivität durch fünfminütige Inkubation mit Peroxidase-Block Lösung. Nach 2x 5 min Waschschritten in TBS wurde der jeweilige primäre Antikörper (siehe Tab.2.14) aufgetragen. Nach Inkubation bei 4°C über Nacht wurden die Schnitte 2x 5 min in TBS-T gewaschen und der entsprechende Sekundärantikörper (siehe Tab.2.14) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Primärantikörper		Sekundärantikörper	
anti-TIMP-1	1:400 in TBS	anti-Schaf	1:200 in TBS
anti-eGFP	1:500 in TBS	anti-Kaninchen	1:1000 in TBS

Tabelle 2.14. – Verwendete Antikörperkombinationen und -verdünnungen für immunhistochemische Färbungen auf Paraffinschnitten

Nach einem erneuten Waschschriff für 5 min in TBS-T wurde der 1:500 in TBS verdünnte HRP-Complex aufgetragen, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und ungebundene Moleküle für 3x5 min mit PBS-T abgewaschen. Die Farbentwicklung erfolgte

durch Auftropfen von AEC Substratlösung (50 μ l DAB pro ml Substratpuffer), nach 3-10 min wurde die Reaktion durch Überführen der Objektträger in Leitungswasser gestoppt. Nach der Kerngegenfärbung mit Saurem Hämalaun nach Meyer wurden die Schnitte für 10 min unter fließendem Leitungswasser differenziert und mit auf 40°C vorgewärmter Kaiser's Glyzeringelatine eingedeckt. Die Objektträger wurden 24 h später außen mit H₂O bidest. gereinigt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

2.4.5. Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten

Die immunhistochemische Detektion α SMA und Desmin in murinen Leberproben erfolgte auf Kryoschnitten. Die hierbei verwendeten Antikörper sind in Tab.2.5 (Seite 26) näher spezifiziert.

Spezielle Lösungen:

- **Avidin Blocking Lösung** (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
- **Biotin Blocking Lösung** (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
- **Peroxidase-Block Lösung:** 0,3 % H₂O₂ in Methanol
- **AEC Substralösung:** 30 μ l AEC pro 1 ml Substratpuffer (Dako, Hamburg, Deutschland)

Die Anfertigung von 5 μ m dicken Kryoschnitten der zuvor in Tissue-Tek eingebetteten Leberpräparate (siehe 2.3.9, Seite 34) erfolgte im Kryostatmikrotom bei einer Objekttemperatur von -16°C und einer Messertemperatur von -20°C. Die angefertigten Schnitte wurden auf SuperFrost® Plus Objektträger aufgezogen, mind. 45 bei Raumtemperatur getrocknet, auf Trockeneis langsam eingefroren und bis zur Färbung bei -80°C gelagert.

Färbung: Die zuvor angefertigten Kryoschnitte wurden für mind. 15 bei Raumtemperatur aufgetaut, 10 min in -20°C kaltem Aceton fixiert, wiederum für mind. 15 min an der Luft getrocknet und anschließend für 10 min in 1xTBS rehydriert. Das Blockieren endogener Peroxidaseaktivität erfolgte während einer 5-minütigen Inkubation mit Peroxidase-Block Lösung. Nach zwei Waschschritten mit 1xTBS wurde die Avidin Blocking Lösung aufgetropft, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und überschüssige Lösung in zwei Waschschritten mit 1xTBS entfernt. Genauso verlief die Blockierung

2. Material und Methoden

endogenen Biotins. Die jeweiligen primären Antikörper (siehe Tab.2.15) wurden anschließend aufgetragen, über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag dreimal in TBS-T abgewaschen. Dann wurden die jeweiligen Sekundärantikörper (siehe Tab.2.15) aufgetragen und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Primärantikörper		Sekundärantikörper	
anti-Desmin	1:200 in 1 %BSA/TBS	anti-Ziege	R&D Kit, unverdünnt
anti- α SMA	1:200 in 1 %BSA/TBS	anti-Hase	R&D Kit, unverdünnt

Tabelle 2.15. – Verwendete Antikörperkombinationen und -verdünnungen für immunhistochemische Färbungen auf Kryoschnitten

Überschüssiger Sekundärantikörper wurde zweimal mit 1xTBS abgewaschen bevor der HRP-Complex (1:500 in 1xTBS) aufgetragen wurde. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Schnitte vor der anschließenden Farbentwicklung zweimal mit TBS gewaschen. Die Farbentwicklung erfolgte durch Auftropfen von AEC Substratlösung, nach etwa 3 min wurde die Reaktion in Leitungswasser gestoppt. Ebenso wie bei Parraffinschnitten wurden die Schnitte nach anschließender Kerngegenfärbung mit Saurem Hämalalaun nach Meyer für 10 min unter leicht fließendem Leitungswasser gebläut und mit auf 40°C vorgewärmter Kaiser's Glyzeringelatine eingedeckt. Nach ca. 24 h bei Raumtemperatur wurden die Objektträger außen mit H₂O bidest. gereinigt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

2.4.6. Histoscore-Analyse

Zur Beurteilung der Färbung wurde eine Bewertungsskala mit einem *Histoscore* von 0 bis 3 erstellt. Die Werte für den *Histoscore* ergaben sich nach Auswertung der Farbtintensität der gefärbten Zellen. Zur Abschätzung des Gesamtfärbemenge wurde die Anzahl der gefärbten Zellen mit einbezogen und ein Erweiterter *Histoscore* ermittelt. Dieser ergab sich aus

$$\text{Histoscore}_{(\text{Farbtintensität})} * \text{Score}_{(\text{PositiveZellen})}$$

und lag somit im numerischen Bereich von 0 bis 12. Die Auswertung wurde betreut und unterstützt von Dr. Susanne Haneder (Institut für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland).

Histoscore		Positive Zellen	
Keine Färbung	0	Keine	0
Schwache Färbung	1	<10 %	1
Mäßige Färbung	2	10-50 %	2
Starke Färbung	3	50-80 %	3
		>80 %	4

Tabelle 2.16. – Bewertungsskalen zur Quantifizierung immunhistochemischer Analysen

Die Durchführung dieser Versuche wurde durch Prof. Irene Esposito und Frau Dr. Sonja Berchtold (Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie, Klinikum rechts der Isar) im Rahmen einer Kollaboration unterstützt.

2.5. *Ex vivo*-Isolation von HSCs aus Mäusen

Zur detaillierteren Charakterisierung von HSCs aus Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln (siehe 2.3.5, Seite 31) wurde ein Protokoll zu deren Aufreinigung anhand differentieller Zentrifugation nach Liu *et al.* (2011) etabliert. Die Durchführung dieser Versuche wurde durch Herrn Matthias Stahl im Rahmen eines Forschungspraktikums am Institut für Experimentelle Onkologie und Molekulare Immunologie (Klinikum rechts der Isar, München) unterstützt.

Spezielle Lösungen:

- **OptiPrep:**
60 % (w/v) Iodixanol in Wasser (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland)
- **Percoll:**
23 % (w/w) Silika-Partikel in Wasser (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland)
- **HEPES Puffer:**
8 g NaCl, 0,2 g KCl, 40 mg Na₂HPO₄, 2,4 g HEPES in 1l H₂O, steril filtriert
- **HEPES/EDTA:** HEPES Puffer, 2 mM EDTA
- **HEPES/Ca²⁺/Liberase:** HEPES Puffer, 5 mM CaCl₂, 23 mg/l Liberase (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland)

2. Material und Methoden

- **HPC Medium:**
DMEM, 20 mM L-Glutamin, 5 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
- **HSCs Medium:**
DMEM, 20 mM L-Glutamin, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
- **B-PBS:** 0,1 % BSA in PBS, steril filtriert
- **MACS Puffer:** 0,5 % BSA, 2 mM EDTA in PBS
- **30 % OptiPrep working solution (WS):** 1 vol OptiPrep, 1 vol 2x PBS
 - 17,6 % OptiPrep:** 17,6 ml 30 % WS + 12,4 ml PBS
 - 8,2 % OptiPrep:** 8,2 ml 30 % WS + 21,8 ml PBS
- **Percoll/PBS:** 9 mL Percoll + 1 mL 10x PBS

Durchführung: Sofort nach Tötung der Tiere durch CO₂ wurden diese unter einer Rotlichtlampe platziert, der Bauchraum geöffnet und die *Vena cava inferior* mit einer Venenverweilkanüle (Neoflon, 0,7 x 19 mm, BD, Heidelberg, Deutschland) kanuliert. Die Nadel wurde entfernt und der Katheter mit Nylonfaden fixiert. Über diesen Zugang wurde eine retrograde Perfusion der Leber gestartet, angetrieben durch eine Peristaltikpumpe bei einer Fließrate von 7 ml/min. Sobald eine Füllung der Leber zu beobachten war, wurde die *Vena portae* gekappt, um das Ausfließen der Perfusionsflüssigkeit zu ermöglichen. Die Perfusion erfolgte in drei Schritten, zunächst 40 ml HEPES/EDTA, dann 15 ml HEPES Puffer, anschließend mit 45 ml HEPES/Ca²⁺/Liberase. Alle Lösungen waren zuvor mittels Ultraschall entgast, auf 45°C vorgewärmt worden und befanden sich während der Perfusion in einem 45°C warmen Wasserbad. Nach Ende der Perfusion wurde die Leber entnommen, in einer 6 cm Schale mit 7 ml 37°C warmem HPC Medium bedeckt und mechanisch dissoziiert indem die Glisson Kapsel aufgerissen und die bereits stark enzymatisch voneinander losgelösten Zellen mit der runden Seite einer Pinzette herausgestrichen wurden. Die Zellsuspension wurden nun in ein 50 ml Falcon überführt, mit 4°C kaltem HSCs Medium auf 50 ml aufgefüllt, nacheinander durch 70 µm und 40 µm *Cell Strainer* geführt und auf Eis gehalten, bis solcherweise Zellsuspensionen von insg. 4 Tieren gesammelt worden waren. Ab hier wurden alle Lösungen stets auf 4°C gekühlt verwendet, die Zellen auf Eis gehalten und Zentrifugationsschritte ebenfalls bei 4°C durchgeführt. Währenddessen wurde alle 15 min der Überstand von den abgesetzten Zellsuspensionen abgenommen, das *Pellet* mit 50 ml HPC Medium

2. Material und Methoden

resuspendiert, sodass am Ende aus der Rohsuspension 2 *Pellets* und 2x 50 ml Überstand pro Leber entstanden waren. Die *Pellets* aus der Rohsuspension wurden verwendet, um Hepatozyten zu isolieren. Hierfür wurden die *Pellets* in 10 ml Percoll/PBS zusammengeführt, 10 ml HPC Medium zugegeben und die Suspension für 5 min bei 50 g zentrifugiert und ohne Bremse ausschwingen lassen. Nicht-beschädigte Hepatozyten pelletieren bei diesem Schritt; der Überstand wurde vollständig abgenommen und das *Pellet* nochmals mit 40 ml B-PBS für 5 min bei 50 g gewaschen. Anschließend wurden die Zellen zu je 2×10^6 schockgefroren für die spätere RNA Isolation (siehe 2.7.6, Seite 52). Die beiden Überstände pro Leber aus der Rohsuspension wurden weiterverwendet, um HSCs zu isolieren. Zunächst wurde verschleppte Hepatozyten bei Zentrifugation für 10 min bei 58 g eliminiert, die enthaltenen nicht-parenchymalen Zellen für 10 min bei 400 g pelletiert und beide *Pellets* in 20 ml MACS Puffer vereinigt. Bei 10 min 200 g wurde Zelltrümmer und beschädigte Zellen abgereichert, das *Pellet* in 6 ml 17,6 % OptiPrep resuspendiert, über einen $40 \mu\text{m}$ *Cell Strainer* in einem 50 ml Falcon unter 6 ml 8,2 % OptiPrep geschichtet. Zuletzt wurde 2 ml B-PBS als oberste Schicht auf den diskontinuierlichen Gradienten geladen, bevor dieser bei 1400 g für 25 min zentrifugiert und ohne Bremse ausgeschwungen wurde. Nach diesem Schritt sammeln sich HSCs der Grenzschicht zwischen B-PBS und 8,2 % OptiPrep. Von dort wurde die HSC Fraktion mit einer Pipette abgenommen und mit 40 ml B-PBS für 10 min bei 1400 g gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für die spätere RNA Isolation (siehe 2.7.6, Seite 52) schockgefroren.

2.6. Methoden der Zellkultur

2.6.1. Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende Zellsysteme verwendet:

293T Bei 293T Zellen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) handelt es sich um adherent wachsende, embryonale Nierenepithelzellen humanen Ursprungs. Diese Zelllinie ist stabil mit dem adenoviralen E1A-Gen und dem SV40 T-Antigen transduziert und wird aufgrund ihrer leichten Kultivierbarkeit sowie Transfizierbarkeit häufig als Verpackungszelllinie für die Produktion lentiviraler Virionen verwendet [DuBridge *et al.*, 1987].

2. Material und Methoden

NIH3T3 NIH3T3 Zellen (ATCC, Manassas, USA) sind murine Fibroblasten, die aus einer primären Embryonenzellkultur von NIH/Swiss Mäusen isoliert wurden [Jainchill *et al.*, 1969]. Die Zelllinie bildet nach subkutaner Injektion tastbare Tumore aus, die jedoch nicht metastasieren können [Greig *et al.*, 1985]. Daher wurden die Zellen stabil mit einem Konstrukt zur Überexpression von TIMP-1 transduziert (siehe 2.6.4, Seite 46) und in einem Primärtumormodell eingesetzt, um erhöhte tumorsezernierte TIMP-1 Spiegel in der Abwesenheit zirkulierender Tumorzellen zu erzielen (siehe 2.3.3, Seite 30).

9801 Die 9801-Zelllinie ist eine murine Pankreaskarzinomzelllinie, die aus einer Lebermetastase einer KPC Maus [Hingorani *et al.*, 2005] isoliert und freundlicherweise von PD Dr. Jens T. Siveke (Medizinische Klinik und Poliklinik, Technische Universität München) zur Verfügung gestellt wurde. Die Zelllinie ist *syngen* zu C57BL/6 Mäusen und wurde stabil GFP-markiert (siehe 2.6.4, Seite 46) in experimentellen Metastasierungsassys eingesetzt (siehe 2.3.8 und 2.3.6, Seite 33).

LX2 LX2 Zellen sind eines der am häufigsten verwendeten HSC Systeme. Sie gehen zurück auf die Zelllinie LX1, welche durch Immortalisierung primärer humaner HSCs mit dem SV40 T Antigen entstanden ist. Unter stark reduzierten Serumbedingungen (1 % FCS) wurde eine Sublinie von LX1 selektioniert und klonal expandiert, diese ist bekannt als LX2 [Xu *et al.*, 2005]. Da LX2 Zellen standardmäßig unter reduzierten Serumbedingungen bei 2 % FCS kultiviert werden, weisen sie einen vergleichsweise wenig aktivierten Phänotyp auf [Xu *et al.*, 2005].

Primäre HSCs Primäre HSCs (pHSCs) wurden von Dr. Mert Erkan (Chirurgische Klinik des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland) aus einer Leberbiopsie eines PDAC Patienten isoliert [Erkan *et al.*, 2010] und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Patient war über den Eingriff informiert und hat eine schriftliche Einwilligungserklärungen unterzeichnet, die an der Chirurgischen Klinik des Klinikums rechts der Isar (München, Deutschland) hinterlegt ist. Die Verwendung dieses humanen Materials für die durchgeführten Analysen wurde durch die Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar, München (Deutschland), unter Ethikvotum #5510/12 freigegeben.

2.6.2. Kultivierung von Zellen

Spezielle Lösungen:

- **PBS-Dulbecco** (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- **Trypsin/EDTA Lösung:** 0,02 % (w/v) EDTA, 0,05 % (w/v) Trypsin, pH 7,4 (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Alle verwendeten Zellen wurden routinemäßig drei Mal wöchentlich von Frau Katja Honert (Institut für Experimentelle Onkologie und Molekulare Immunologie, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland) passagiert. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte antibiotikafrei in Brutschränken bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ in den folgenden Kulturmedien:

Zelllinie(n)	Medium	Zusätze
293T	DMEM	10 % (v/v) FCS, 20 mM L-Glutamin, 100 mM Hepes, 0,55 mM Asparagin und 0,27 mM Arginin
9801L	DMEM	10 % (v/v) FCS, 1xNEAA
LX2	DMEM	2 % (v/v) FCS, 20 mM L-Glutamin
pHSCs	DMEM/F12	20 % (v/v) FCS

Tabelle 2.17. – Verwendete Zellkulturmedien

Die verwendeten Medienzusätze wurden von folgenden Quellen bezogen:

Reagenz	Hersteller, Firmensitz, Land
DMEM Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
F12 Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
FCS	CellSystems, St. Katharinen, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Hepes	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
100x NEAA	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
L-Asparagin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
L-Arginin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Tabelle 2.18. – Medienzusätze für die Zellkultur

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen waren frei von Mycoplasmen. Das monatliche Testen der Zellen mit dem MycoTrace Kit (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) wurde von Frau Katja Honert (Institut für Experimentelle Onkologie und Molekulare Immunologie, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland) durchgeführt und dokumentiert.

2.6.3. Kotransfektion zur Produktion lentiviraler Partikel

Spezielle Reagenzien:

- **Lipofectamine 2000** (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- **GIBCO OptiMEM Medium** (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Ein Teilbereich dieser Arbeit umfasste die stabile funktionell genetische Manipulation von Zellen anhand lentiviraler Transduktion. Die Produktion von Virionen erfolgte in der Verpackungszelllinie 293T [DuBridge *et al.*, 1987]. Die Kotransfektion des Transferplasmids zusammen mit einem Gemisch aus Verpackungsplasmiden ermöglicht das Einbringen des Transgens in Virionen, die sich nach Lyse der 293T Verpackungszellen im Überstand anreichern. Die verwendeten Verpackungsplasmide kodieren alle Gene, die für die Herstellung eines nicht-replikativen Minimallentiviruses nötig sind: pRSV-rev trägt Gene *gag* und *pol* für äußere Hüllproteine, pRSV-rev kodiert die Reverse Transkriptase, welche die spätere Insertion des Transgens in die Zielzellen ermöglicht. Das Pseudotyping-Plasmid pMD.G trägt das *env*-Gen des *Vesikulären Stromatitis Virus* und ermöglicht die Transduktion einer Vielzahl von Zielzellen, die durch HIV-basierte Virionen nicht möglich wäre [Aiken, 1997]. Für die Herstellung lentiviraler Partikel wurden tags zuvor 5×10^6 293T-Zellen pro Transfektion in 10 cm Petrischalen ausgesät. Am nächsten Tag wurde morgens das Medium gewechselt, 3 h bevor die Zellen transfiziert wurden. Pro Transfektion wurde je $36 \mu\text{l}$ Lipofectamine 2000 mit 1,5 ml OptiMEM Medium gemischt und mind. 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen. Währenddessen wurden das jeweilige Transferplasmid mit dem benötigten Gemisch aus Verpackungsplasmiden ebenfalls in 1,5 ml OptiMEM pipettiert. Siehe Tab. 2.19 für eine Übersicht der verwendeten Plasmide.

2. Material und Methoden

Plasmide	Menge	Funktion
Transfer	10 μg	genetische Manipulation
Verpackung		
pMD.GP	6,6 μg	Verpackungsplasmid, kodiert für <i>gag</i> und <i>pol</i>
pRSV-rev	5 μg	Verpackungsplasmid, kodiert für <i>rev</i>
pMD.G	3 μg	Verpackungsplasmid, kodiert für <i>env</i> aus VSVG

Tabelle 2.19. – Lentivirale Verpackungsplasmide für die Herstellung von Virionen

Die in dieser Arbeit verwendeten Transferplasmide zur funktionell genetischen Manipulation diverser Zielgene sind im folgenden aufgeführt (2.20, Seite 45).

Plasmid	Verwendung	Bezugsquelle
pHIV7/SFeGFP	GFP-Markierung	Klinikum Rechts der Isar, München
pHIV7-SF/TIMP-1	TIMP-1 Überexpression	Klinikum Rechts der Isar, München
pHIV7-SF/empty	Leervektorkontrolle	Klinikum Rechts der Isar, München
pLK0.1/shTIMP-1#29 (TRCN0000052429)	<i>knock-down</i> von TIMP-1	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
pLK0.1/shTIMP-1#31 (TRCN0000052431)	<i>knock-down</i> von TIMP-1	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
pLK0.1/shCD63#49 (TRCN0000007849)	<i>knock-down</i> von CD63	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
pLK0.1/shCD63#51 (TRCN0000007851)	<i>knock-down</i> von CD63	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
pLK0.1/shNT	<i>Non-targeting</i> Kontrolle	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Tabelle 2.20. – Verwendete Transferplasmide

Das Lipofectamine-OptiMEM-Gemisch und das Lipofectamine-Plasmid-Gemisch wurden nun in einem 15 ml Falcon gemischt und 20 min im Dunkeln unter der Sterilbank zur Bildung der DNA-Lipofectamine-Komplexe belassen. Während der Inkubationszeit wurde das Medium von den 293T Zellen abgenommen und durch 5 ml OptiMEM mit 10 % FCS ersetzt, bevor die DNA-Lipofectamine-Komplexe in OptiMEM tropfenweise auf die Zellen gegeben wurden. Am nächsten Morgen wurde das Medium abgenommen und durch 10 ml frisches 293T Medium ersetzt.

Insgesamt 48 h nach der Kotransfektion wurde überprüft, ob die 293T Zellen vollständig lysiert waren und anschließend der Virusüberstand vorsichtig abgenommen. Nach

Sterilfiltration durch einen 0,45 μm Filter wurden 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen abgefüllt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.6.4. Transduktion adhärenter Zellen

Spezielle Reagenzien:

- **Polybren:** 800 $\mu\text{g/ml}$ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- **Puromycin:** 10 mg/ml (InvivoGen, Toulouse, Frankreich)

Die Zielzellen wurden am Vortag auf 6 cm Petrischalen ausgelegt. Für jede Infektion wurde ein 1 ml Aliquot Virusüberstand (siehe 2.6.3, Seite 44) auf Eis aufgetaut und je 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybren zugegeben. Die Zielzellen wurden einmal mit warmem PBS gewaschen, dann der Virusüberstand mit Polybren zugegeben und für 2 h unverdünnt auf den Zellen belassen. Die Platte wurde alle 15-20 min geschwenkt, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Nach Ablauf einer Infektionszeit von 2 h wurden jeweils 4 ml warmes Medium zugegeben. Die Negativ-Selektion nicht-transduzierter Zellen erfolgte mit Puromycin. Selektionsbedingungen wurden aufrecht erhalten bis 48 h nachdem die Zellen einer nicht-transduzierten Kontrolle vollständig abgestorben waren.

2.6.5. Analyse der Zellmotilität mittels TransWell Assays

Die TransWell Inserts (Durchmesser 6,5 mm, Porengröße 3 μm) wurden in 24-*well* Platten vorgelegt und anschließend 5×10^5 LX2 Zellen in 300 μl FCS-freiem Medium zugegeben. Die Inserts wurden nun in die Vertiefungen einer 24-*well* Platte gegeben, in die 1 ml FCS-haltiges Medium vorgelegt worden war. Nach 16 h im Brutschrank, wurde das Medium aus den Inserts entfernt und nicht migrierte Zellen unter Zuhilfenahme eines Wattestäbchens entfernt. Die an der unteren Seite der Membran anhaftenden Zellen wurden anschließend für 60 sec mit Methanol fixiert und 2 min mit 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI in PBS gefärbt. Migrierte Zellen wurden in 10 mikroskopischen Sichtfeldern quantifiziert.

2.6.6. Analyse der Zellwachstums mittels AlamarBlue

Das Wachstum von Zellen wurde mittels AlamarBlue Assays bestimmt. 5000 Zellen in 90 μl Zellkulturmedium je *well* wurden in 96-*well* Platten ausgelegt. Je Messpunkt wurden zwischen 5 und 7 *wells* angesetzt. Nach 0 h, 24 h und 48 h wurden 10 μl AlamarBlue in die *wells* gegeben. Eine Stunde später wurde die Absorption bei 570 nm 0,1 Sekunden lang gemessen (Wallac Victor, PerkinElmer, Weiterstadt, Deutschland). Die

gemessenen Absorptionen wurden auf die Absorption des reinen Zellkulturmediums ohne Zellen normalisiert. Die Durchführung dieser Versuche wurde durch Frau Katharina Stutzer im Rahmen ihrer Masterarbeit am Institut für Experimentelle Onkologie und Molekulare Immunologie (Klinikum rechts der Isar, München) unterstützt.

2.7. Molekularbiologische Methoden

2.7.1. Proteinaufarbeitung aus Zellen

Für die anschließende *Western Blot* Analyse wurde zunächst Gesamtprotein aus Zellen aufgearbeitet.

Spezielle Materialien:

- **1x RIPA Puffer:**
150 mM (w/v) NaCl, 1 % (w/v) NP40, 0,1 % (w/v) SDS, 0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholat, 50 mM Tris/HCl
- 100x Proteaseinhibitor (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 50x Phosphataseinhibitor (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- **Lysepuffer:** 1x RIPA Puffer, 1x Proteaseinhibitor, 1x Phosphataseinhibitor

Die Zellen wurden mit 2x 10 ml 4°C kaltem PBS-Dulbecco gewaschen, dieses dann vollständig abgenommen und pro 10 cm Schale 100 μ l Lysepuffer zugegeben. Das geringe Volumen wurde durch Schwenken verteilt, anschließend wurde für 5 min auf Eis inkubiert bevor die Zellen in Lysepuffer mit einem Zellschaber von der Schale entfernt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nochmals 5 min auf Eis inkubiert wurden. Anschließend wurde das Zellysat mit Ultraschall (2x 10 sec) weiter aufgeschlossen, eingefroren und nach dem Auftauen bei 4°C für 10 min bei 16.100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin vorsichtig abgenommen und entweder direkt weiterverarbeitet oder in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt

2.7.2. Proteinbestimmung mit dem BCA Kit

Die sog. BCA-Reaktion erlaubt den quantitativen Nachweis von Proteinen. Zweiwertige Kupferionen in der Lösung reagieren quantitativ mit Protein zu einwertigen Kupferionen. Dabei entsteht ein violetter Farbstoff, dessen Absorption bei 570 nm photometrisch

2. Material und Methoden

ausgewertet werden kann. Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen mit dem BCA Kit wurden die zu bestimmenden Proben zunächst 1:100 in H₂O bidest. verdünnt. Als Standard wurden in Dupletts je 10 μ l BSA-Lösungen der Konzentrationen 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml und 0,0625 mg/ml in 96-*well* Platten vorgelegt. Von den 1:100 verdünnten Proben wurden ebenfalls 10 μ l Dupletts vorgelegt. Die BCA Lösung wurde stets frisch angesetzt (Lösung 1:Lösung 2 in Verhältnis 50:1), gemischt und jeweils 200 μ l auf die vorgelegten Proben bzw. den Standard gegeben. Die Farbreaktion wurde für 30 min bei 37°C vervollständigt und anschließend die Absorptionen bei 570 nm mit dem Wallac Luminometer ausgelesen. Die Werte des Standards wurden gemittelt und anhand der zugehörigen Konzentration eine lineare Eichgerade errechnet, anhand der die Proteinkonzentration in den Proben ermittelt werden konnte. Die Datenauswertung erfolgte mit *Microsoft Excel*.

2.7.3. Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung von TIMP-1 Konzentrationen wurde das DuoSet ELISA Kit (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Spezielle Lösungen:

- **StopSolution:** 2 N H₂SO₄ = 1 M H₂SO₄ (10,4 ml 95-97 % H₂SO₄ in 89,6 ml H₂O bidest.)
- **WashPuffer:** 0,05 % Tween20 in PBS
- **ReagentDiluent:** 1 % BSA in PBS, sterilfiltriert
- **OptiEIA TMB Substrat** (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Durchführung:

Der lyophilisierte primäre Antikörper wurde zu 360 μ g/ml in PBS gelöst, der sekundäre Antikörper zu 9 μ g/ml in ReagentDiluent. Der Waschschrift zwischen Zugabe unterschiedlicher Reagenzien war stets identisch: Die Platte wurde in den AutoWasher gestellt, je dreimal mit je 400 μ l pro *well* WashPuffer gewaschen und auf ein Papiertuch ausgeklopft. Am Vorabend einer ELISA Messung wurden 96-*well* Platten mit auf 2 μ g/ml in PBS verdünntem primärem Antikörper beschichtet (je 100 μ l pro *well*), mit Parafilm M verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Morgen folgte ein Waschschrift. Zum Absättigen unspezifischer Bindestellen wurden 100 μ l ReagentDiluent pro *well* zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt

2. Material und Methoden

von einem Waschschrift. Der im Kit enthaltene TIMP-1 Standard wurde in Dupletts mit den Konzentrationen 2000 pmol/ml, 1000 pmol/ml, 500 pmol/ml, 250 pmol/ml, 125 pmol/ml und 62,5 pmol/ml verdünnt in ReagentDiluent aufgetragen. Die Platte wurde anschließend mit Parafilm verschlossen und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden 100 μ l/well sekundärer Antikörper mit einer Konzentration von 50 ng/ml in Reagent Diluent zugegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von einem Waschschrift. Nun wurden pro well 100 μ l der Streptavidin-HRP Komplex (1:200 in Reagent Diluent) aufgetragen, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und überschüssiges Protein in einem Waschschrift entfernt. Währenddessen wurden entsprechende Aliquots der Lösungen A und B aus dem TMB Substrat Kit auf Raumtemperatur erwärmt und kurz vor der Zugabe auf die Platte 1:1 gemischt. Pro well wurden 100 μ l Substratlösung aufgetragen und 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 50 μ l StopSolution unterbrochen wurde. Die Absorptionen bei 450 nm wurden sofort mit dem Wallac Luminometer ausgelesen, die Auswertung des Standards und der gemessenen Proben erfolgte anhand einer logistischen Regressionskurve mit vier Parametern (4-PL *curve fitting*) mit dem *ReaderFit Online Tool* (<https://www.readerfit.com>).

2.7.4. SDS-Gelelektrophorese

Vorbereitend für die *Western Blot* Analyse erfolgte die elektrophoretische Auftrennung von Zellprotein in einem SDS-Gel.

Spezielle Lösungen:

- **Acrylamid:**
40 %, AppliChem, Darmstadt, Deutschland
- **APS Lösung:**
10 % (w/v) APS (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) in H₂O bidest.
- **TEMED:**
Tetramethylethyldiamin, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
- **SDS-Trenngelpuffer:**
0,4 % (v/v) SDS, 1,5 M (w/v) Tris/HCl pH 8,6
- **SDS-Sammelgelpuffer:**
0,5 M (w/v) Tris/HCl pH 6,8

2. Material und Methoden

- **Lämmli-Puffer:**

0,002 % (w/v) Bromphenolblau, 0,07 % (w/v) Glycerin, 0,03 % (w/v) SDS, 0,2 M (w/v) Tris, 0,05 % (v/v) Mercaptoethanol

- **Elektrophoresepuffer:**

1,442 % (w/v) Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, 0,303 % (w/v) Tris

- **Längenstandard:**

Prestained Protein Molecular Weight Marker (BioRad, München, Deutschland)

Herstellung der SDS-Gele:

Nach dem Mischen der Ingredienzien (siehe Tab. 2.21) wurde das 10 %-ige Trenngel in Gelkassetten (Bio-Rad, München, Deutschland) mit einem Glasplattenabstand von 1,5 mm gegossen und noch flüssig mit Isopropanol überschichtet, um Bläschen zu zerstören und eine ideale Kante zu erzeugen. Nach Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, mit H₂O bidest. gewaschen und das Sammelgel in die Vorrichtung gegossen. Ein Kamm wurde eingesetzt und nach dem Festwerden der Gele war eine anschließende Benutzung möglich oder die Gele wurden zum Schutz vor Austrocknung in mit Elektrophoresepuffer getränkte Papiertücher gewickelt und in einer Plastiktüte bei 4°C für bis zu 14 Tage gelagert.

Ingredienz	Trenngel	Sammelgel
H ₂ O bidest.	5 ml	3.05 ml
Sammelgelpuffer	-	1.25 ml
Trenngelpuffer	2.5 ml	-
Acrylamid	2.5 ml	0.625 ml
APS Lösung	57.5 μ l	50 μ l
TEMED	15 μ l	5 μ l

Tabelle 2.21. – Pipettierschema zur Herstellung von SDS-Gelen

SDS-Gelelektrophorese:

Das zuvor extrahierte Zelllysate (siehe 2.7.1, Seite 47) wurde auf den enthaltenen Proteingehalt hin analysiert (siehe 2.7.2, Seite 47) und auf eine Konzentration von 1,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in Lämmli-Puffer eingestellt, sodass am Ende 50 μg Protein in 40 μl pro Gel tasche geladen werden konnten. Zuvor wurde das Protein in Lämmli-Puffer für 5 min bei 95°C denaturiert und reduziert. Pro Gel wurde jeweils in eine Tasche 5 μl Längenstandard aufgetragen und die Gelelektrophorese gestartet. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V über 2,5 h.

2.7.5. Western Blot

Zum spezifischen Nachweis von Zielproteinmengen wurden *Western Blot* Analysen durchgeführt. **Spezielle Lösungen und Materialien:**

- **Blottingpuffer:**
1,12 % (w/v) Glycin, 10 % (v/v) Methanol, 0,3 % (w/v) Tris
- **TBS-Tween (TBS-T):**
0,1 % (v/v) Tween20 in TBS
- **5 % BSA/TBS-T:**
5 % (w/v) BSA, in TBS-T, steril filtriert
- **2,5 % BSA/TBS-T:**
5 % BSA/TBS-T 1:1 in TBS-T
- **NC-Membran:** Nitrozellulose-Membran (Amersham, Braunschweig, Deutschland)

Das Gel wurde, anschließend an die SDS-Gelelektrophorese (siehe 2.7.4, Seite 49), zusammen mit der NC-Membran und den Filterpapieren für 15 min in Blottingpuffer äquilibriert. Für den Transfer der Proteine vom Gel auf die NC-Membran wurde eine Semi-DryBlot Apparatur verwendet. In diese wurden (auf die unten liegende, mit Blottingpuffer befeuchtete Kathode) getränktes Filterpapier, NC-Membran, SDS-Gel, und zuletzt wieder Filterpapier geschichtet. Anschließend wurden Luftblasen durch Überrollen mit einer Pipette entfernt, auch die Anode mit Blottingpuffer befeuchtet, aufgesetzt und für 70 min bei 15 V geblottet. Mittels Ponceau S wurde die Übertragung der Proteine auf die Membran überprüft, das Ponceau S mit TBS-T wieder abgewaschen und die NC-Membran in 5 %-BSA/TBST Raumtemperatur für 1-5 h geblockt. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min mit TBS-T wurde die NC-Membran mit entsprechend verdünntem Primärantikörper (in 5 %-BSA/TBS-T) vollständig bedeckt und bei 4°C über

2. Material und Methoden

Nacht geschwenkt. Am nächsten Tag wurde nach dreimaligem Waschen in TBS-T für jeweils 10 min der entsprechend verdünnte Sekundärantikörper (in 2,5 %BSA/TBS-T) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert.

Primärantikörper	in 5 %BSA/TBS	Sekundärantikörper	in 2,5 %BSA/TBS
anti-p110 α	1:2000	anti-Kaninchen IgG	1:5000
anti-p110 β	1:2000	anti-Kaninchen IgG	1:5000
anti-p110 γ	1:2000	anti-Kaninchen IgG	1:5000
anti-P-p85	1:2000	anti-Kaninchen IgG	1:5000
anti-ERK1/2	1:2000	anti-Kaninchen IgG	1:5000
anti-P-ERK1/2	1:2000	anti-Kaninchen IgG	1:5000
anti- α Tubulin	1:1000	anti-Maus IgG	1:10.000

Tabelle 2.22. – Verwendete Antikörperkombinationen und -verdünnungen für *Western Blot* Analysen

Der chemilumineszenzbasierte Nachweis erfolgte nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T mit Hilfe des *Clarity Western ECL* Substrat-Kits. Zunächst wurden Lösung 1 und Lösung 2 in gleichem Volumenanteil miteinander in einem licht-geschützten Reaktionsgefäß vermischt. Die Blots wurden anschließend in einer aufgeschnittenen Plastiktüte mit der Detektionslösung versetzt und das entstehende Chemolumineszenzsignal mit Hilfe eine *ChemiDoc Station* (BioRad, München, Deutschland) detektiert.

2.7.6. RNA Isolation aus Geweben und Zellen

Für die anschließende qRT-PCR Analyse wurde zunächst RNA aus Geweben oder Zellen isoliert. RNA aus Geweben wurde von Frau Katja Honert (Institut für Experimentelle Onkologie und Molekulare Immunologie, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland) isoliert.

Spezielle Materialien:

- **Trizol:**
Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
- **Zirkoniumkugeln:**
10 mm Zirconia/Silica *Beads*, Biospec Products, Bartlesville, USA

Gewebeaufschluss in Trizol: Für die Isolation von RNA aus Leberproben wurde ein 3-4 mm³ großes Stück des linken Leberlappens von Mäusen aufgearbeitet (siehe 2.3.9, Seite 34). In ein 2 ml Kryogefäß mit Silikondichtung wurden wenige Zirkoniumkugeln vorgelegt. Je Gewebestück wurde 1 ml Trizol zugegeben und auf Eis durchgekühlt. Die bis dahin bei -80°C gelagerten Gewebestücke wurden in flüssigem Stickstoff transportiert, direkt in das kalte Trizol gegeben und zügig in den Minibeadbeater eingespannt. Durch 15 sec langes Schütteln wurde homogenisiert, wobei durch die Zirkoniumkugeln das Gewebe zerkleinert und die Zellen aufgeschlossen wurden. Das Homogenisat wurde 10 min auf Eis gestellt und dann zur Abtrennung von Geweberesten und der Zirkoniumkugeln bei 16.100 g und 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

Zellaufschluss in Trizol: Die Zellen wurden mit 10 ml 4°C kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde unter dem Abzug 1 ml Trizol pro 10 cm Schale zugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

RNA Extraktion: Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform zugegeben und die Suspension 15 Sekunden mit einem Vortexer gemischt. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurde bei 14000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Währenddessen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß 500 µl Isopropanol vorgelegt. Nach der Zentrifugation wurde die obere, farblose Phase abgenommen und in das vorbereitete 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach Mischen der Reaktionslösung wurde das Gemisch 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt (16.100 g, 4 °C, 10 min) an. Der daraus resultierende Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Dem *Pellet* wurde 1 ml 80 % Ethanol zugegeben. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 8000 g und 4°C wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das RNA-*Pellet* wurde anschließend 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und abschließend in 30-100 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert.

2.7.7. Agarose-Gelelektrophorese

Spezielle Lösungen:

- **TAE Puffer:**
40 mM Tris-Base, 20 mM Essigsäure und 1 mM EDTA
- **5x RNA Auftragspuffer:**
0,125 % (w/v) Bromphenolblau, 50 mM H₂O₂ und 50 % (v/v) Glycerin
- **6x DNA Loading Dye:** Thermo Fisher, Waltham, USA

2. Material und Methoden

- **1 kb DNA ladder:** GeneRuler, Thermo Fisher, Waltham, USA
- **100 bp DNA ladder:** GeneRuler, Thermo Fisher, Waltham, USA

Zur Überprüfung der Integrität frisch isolierter RNA wurde die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Zur Herstellung der Agarosegele wurden stets 1 % (w/v) Agarose in 1xTAE Puffer eingewogen, mehrmals aufgeköcht und etwa 50 ml in einen Gelschlitten gegossen. Im Gelschlitten wurden der Agaroselösung 2,5 μ l der EtBr-Stammlösung (0,05 % (w/v) Ethidiumbromid) zugegeben, mit der Pipettenspitze leicht vermischt und der Kamm eingesetzt. Nach Auspolymerisieren des Gels wurde dieses samt Schlitten in die Elektrophoresekammer überführt und mit 1xTAE Puffer bedeckt. Die aufzutrennende RNA wurde zuvor mit 5x RNA Auftragspuffer gemischt, die elektrophoretische Auftrennung erfolgte stets bei 120 V für 20 min.

2.7.8. Reverse Transkriptions-PCR

Für anschließende Expressionsanalysen mittels qRT-PCR musste die isolierte RNA zu cDNA umgeschrieben werden. Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch bestimmt, in nukleasefreiem Wasser auf 400 ng/ μ l eingestellt, erneut photometrisch überprüft und anschließend 1:4 in nukleasefreiem Wasser auf 100 ng/ μ l weiter verdünnt. Die Konzentration sowie RNA Integrität aller Proben wurden visuell auf einem Agarosegel (siehe 2.7.7, Seite 53) überprüft. Auf 100 ng/ μ l eingestellte, nicht-degradierte RNA wurde in die Reverse Transkriptionsreaktion eingesetzt. Hierfür wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Darmstadt) gemäß Herstellerangaben verwendet. Pro Ansatz wurde 1 μ g RNA zu cDNA umgeschrieben:

Ingredienz	Volumen
RNA (100ng/ μ l)	10 μ l
10x RT-Puffer	2 μ l
25x dNTP-Mix (100mM)	0,8 μ l
10x RT-random primers	2 μ l
MultiScribe Reverse Transkriptase	1 μ l
RNase Inhibitor	1 μ l
Nuklease-freies Wasser	3,2 μ l

Tabelle 2.23. – Reaktionsansatz für die Reverse Transkription

2. Material und Methoden

Die Reaktion wurde in 0,2 ml Reaktionsgefäßen angesetzt. Die Reverse Transkription der RNA zu cDNA erfolgte während folgender Temperaturschritte in einem PCR Cycler:

Temperatur:	25°C	37°C	85°C	4°C
Dauer:	10 min	120 min	5 sec	∞

Die solchermaßen gewonnene cDNA wurde bei -20°C gelagert und bei Gebrauch stets auf Eis gehalten.

2.7.9. Expressionsanalyse mittels Quantitativer RT-PCR (qRT-PCR)

Zur Expressionsanalyse mittels qRT-PCR wurden entweder vorgefertigte *Primer-Probe*-Ansätze (Applied Biosystems) oder separate bestellte *Primer* in Kombination mit *Probes* aus der *Roche Universal Probe Library* verwendet, in beiden Fällen jedoch in Kombination mit dem *FastStart Universal Mastermix* (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland). Die jeweiligen Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Vorgefertigte <i>Primer-Probe</i>-Mixe: (Applied Biosystems)		Separat geordnete <i>Primer</i>: <i>Roche Universal Probe Library</i>	
MasterMix	12,5 µl	MasterMix	12,5 µl
<i>Primer-Probe</i> -Mix	1,25 µl	<i>Forward Primer</i>	0,25 µl
Nuklease-freies Wasser	1,25 µl	<i>ReversePrimer</i>	0,25 µl
		<i>Probe</i>	0,25 µl
		Nuklease-freies Wasser	1,75 µl
Gesamtvolumen:	15 µl		15 µl

Tabelle 2.25. – Reaktionsansätze für die qRT-PCR

Die verwendete cDNA wurde als *template* für den 18S Assay 1:500 in nukleasefreiem Wasser verdünnt, für alle weiteren Assays 1:100. Jeweils 10 µl cDNA Verdünnung wurden in Triplets in die *wells* einer MicroAmp Optical 96-*well* Reaction Plate vorgelegt und 15 µl MasterMix zugegeben. Die Platte wurde verschlossen und kurz abzentrifugiert. Die quantitative RT-PCR Reaktion lief im TaqMan Cycler 7900HT ABI Prism

2. Material und Methoden

(Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) bei folgenden Temperaturen ab:

Temperatur	Zeit	Zyklen
50° C	2 min	1
95°C	10 min	1
95°C	15 sec	50
60°C	1 min	

Zur Expressionsanalyse mittels qRT-PCR wurden separat bestellte *Primer* (metabion international AG, Martinsried, Deutschland) in Kombination mit *Probes* aus der murinen Universal Probe Library (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) verwendet. Tab.2.27 enthält die Sequenzen der *Primer* sowie die dazu verwendeten *Probes*.

Zielgen	Spezies	Primersequenz	Probennummer
TIMP-1	murin	F: tcactaactcttttccatcagtc	#77
		R: cttgacaagcaggaatggt	
CD63	murin	F:gttccttctgtgaaccaccag	#12
		R: gagcaaaaactgacacactca	
α SMA	murin	F: ccc acc cag agt gga gaa	#20
		R: acatagctggagcagcgtct	
Desmin	murin	F: gcgtgacaacctgatagacg	#110
		R: gttggatttctctctgtagttg	
Col1a1	murin	F: catgttcagctttgtggacct	#68
		R: gcagctgacttcagggatgt	
Nestin	murin	F: tcccttagtctggaagtggcta	#75
		R: ggtgtctgcaagcgagagtt	
VEGF	murin	F: ttaaacgaacgtacttcagatg	#4
		R: agaggctggtcccga	
EGF	murin	F: agtcagaccgaaagagctgtg	#76
		R: cctgggaattgcaaacagt	
TGF β	murin	F: tggagcaacatgtggaactc	#72
		R: cagcagccggtaccaag	
PDGF-B	murin	F: gtgcgacctccaacctga	#63
		R: ggctcatctcacctcacatct	
LOX	murin	F:caggctgcacaatttcacc	#48
		R: caaacaccaggtacggcttt	

2. Material und Methoden

S100A4	murin	F: ggagctgcctagcttctctg R: tcctggaagtcaacttcattgtc	#56
TIMP-1	human	F: gggcttcaccaagacctaca R: tgcaggggatggataaaca	#76
CD63	human	F: tgaatgtgtgaagtcttgctc R: caatcagtcccactgcaca	#18
α SMA	human	F: cccaccagagtgaggagaa R: acatagctggagcagcgtct	#20
Desmin	human	F: aacaattggctgccttc R: acgcatctcctcgttga	#1
Col1a1	human	F: agtgaagcaggcaaacct R: ctcgccagggaaacctct	#50
Nestin	human	F: ctgcgggctactgaaaagt R: gagcatctggctctgtagg	#2
VEGF	human	F: ttaaacgaacgtactgcagatg R: gagagatctggtcccgaaa	#69
EGF	human	F: agtgcaccactgcacaac R: caattgcaaagttctgctca	#29
TGF β	human	F: cacgtggagctgtaccagaa R: cagccggttgctgaggta	#72
PDGF-B	human	F: ctggcatgcaagtgtgagac R: cgaatggcaccagagttt	#68
LOX	human	F: tgggaatggcacagttgtc R: aaacttgcttgtggccttc	#82
S100A4	human	F: cttgcacacgctgttgctat R: gagtactgtggaaggtggaca	#81

Tabelle 2.27. – Primer-Probe-Kombinationen, *F.*, forward Primer, *R.*, reverse Primer

Die Datenaquisition erfolgte mit dem *low density array upgrade* der Sequence Detection Software SDS2.2, die Darstellung als Balkendiagramm wurde in *Excel* vorgenommen.

2.7.10. Bestimmung von Genexpressionsprofilen mit *Low Density Arrays*

Die vergleichende Bestimmung von Genexpressionsprofilen von HSC Fraktionen aus Mäusen wurde mittels qRT-PCR basierten *low density arrays* (LDAs) von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) gemäß der Herstellerangaben durchgeführt. Diese

Technologie ermöglicht die simultane, quantitative Analyse mehrerer ausgewählter Gene. Als *Template* wurde cDNA der jeweiligen Zellfraktion von sechs Tieren zu gleichen Mengenteilen gemischt. Hierfür wurden die 18S rRNA Mengen (welche als proportional zur mRNA Menge angenommen wurde) mittels qRT-PCR absolut quantifiziert und als Grundlage für das Errechnen der Mischverhältnisse verwendet. In jedem Port wurden 50 ng solchermaßen gepoolter cDNA in 50 μ l nukleasefreien Wasser und 50 μ l 2xTaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen. Die Datenaquisition erfolgte mit dem *low density array upgrade* der Sequence Detection Software SDS2.2.

2.8. Statistische Methoden

Für die statistische Analyse normal verteilter, zweiteiliger Datensätze wurde der *Student's* T-Test verwendet. Drei- und mehrteilige Datensätze wurden einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen und ggf. signifikant unterschiedliche Gruppen anschließend per *Student's* T-Test identifiziert. Für die statistische Analyse nicht normal verteilter, zweiteiliger Datensätze wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant erachtet. Für die Untersuchung der Abhängigkeit zweier Parameter wurde die Methode der *Pearsons* R Korrelationen angewandt. R Werte > 0,5 wurden als mäßige Korrelation angenommen, R Werte > 0,8 als starke Korrelation.

3. Ergebnisse

3.1. Expression von TIMP-1 im humanem PDAC und Korrelation mit der Anwesenheit von Lebermetastasen

3.1.1. TIMP-1 Expression in Vorläuferläsionen des humanen PDAC

Die Expression von TIMP-1 zu frühen Zeitpunkten der Tumorprogression wurde in Gewebeproben von 13 Patienten mit histopathologisch bestätigten PanIN Läsionen immunhistochemisch analysiert. Dabei wurde untersucht, ob TIMP-1 bereits in PanIN Vorläuferläsionen exprimiert wird und auf welche Zellen im entartenden Gewebe die Expression zurückgeht.

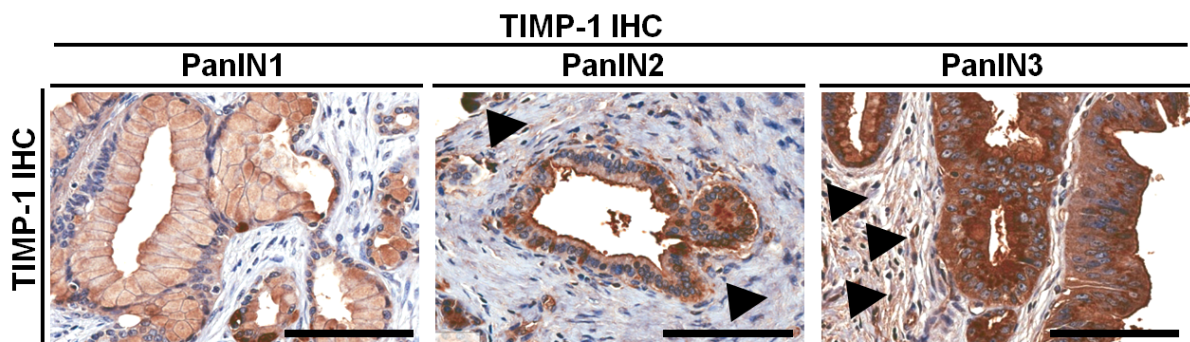


Abbildung 3.1. – TIMP-1 Expression in fortschreitenden PanIN Läsionen des Menschen. Gewebeproben von 13 Patienten mit histopathologisch bestätigten PanIN Läsionen wurden mittel IHC auf die Expression von TIMP-1 hin untersucht. Gezeigt sind jeweils repräsentative Aufnahmen der TIMP-1 Expression in PanIN1, PanIN2 und PanIN3 Läsionen. Pfeile zeigen auf stromale Bereich mit TIMP-1 Expression; *Balken*, 100 μm .

TIMP-1 war bereits im PanIN1 Stadium in epithelialen Zellen detektierbar und die TIMP-1 Expression in diesen Zellen stieg in der Progression zu PanIN3 an (**Abb.3.1**). In allen

3. Ergebnisse

Stadien war eine luminale, in die duktale Struktur hinein gerichtete Lokalisation der TIMP-1 Expression zu beobachten (**Abb.3.1**). Das gering reaktive Stroma in PanIN1 Läsionen wies lediglich eine geringe TIMP-1 Immunreaktivität auf. Mit zunehmender Entartung des Gewebes, ab dem PanIN2 Stadium, war ein beginnender stromaler Beitrag zur TIMP-1 Expression zu beobachten (**Abb.3.1**).

3.1.2. Analyse der TIMP-1 Expression im invasiven, humanen PDAC

Zur Abschätzung eines möglichen Einflusses von TIMP-1 auf die Dedifferenzierung von PDAC Tumoren wurde zunächst die TIMP-1 Expression in Geweben von 74 Patienten immunhistochemisch analysiert. Es zeigte sich, dass zwischen den einzelnen Individuen eine starke Heterogenität in der TIMP-1 Expression bestand (**Abb.3.2**).

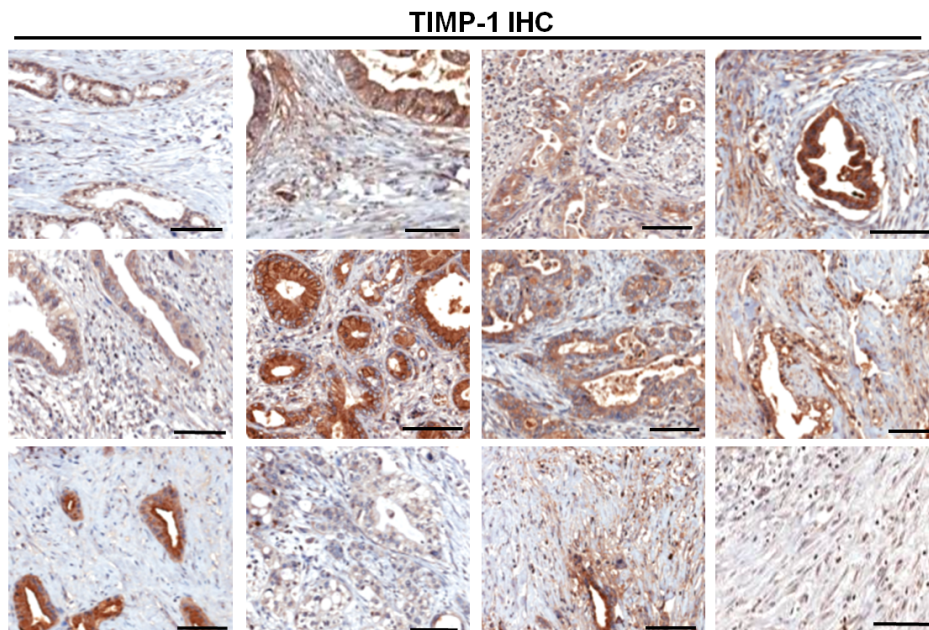


Abbildung 3.2. – Heterogenität der TIMP-1 Expression in invasivem, humanem PDAC. Die Expression von TIMP-1 wurde in Gewebeproben von Patienten (n = 74) mit histopathologisch bestätigtem invasivem PDAC mittel IHC untersucht. Gezeigt sind repräsentative Bildausschnitte von zwölf Patienten, um die Heterogenität der TIMP-1 Expression in verschiedenen humanen PDAC Tumoren wiederzugeben.

3. Ergebnisse

Diese Unterschiede in der TIMP-1 Expression wurden mittels *Histoscoring* anhand der Expressionsstärke (**Abb.3.3, A**) semiquantitativ erfasst. In allen analysierten Geweben von PDAC Patienten zeigte sich eine Immunreaktivität gegen TIMP-1. Nur 23 % dieser Patienten wiesen eine schwache TIMP-1 Färbung auf, während 41,9 % eine mittlere und 35,1 % eine starke TIMP-1 Färbung aufwiesen (**Abb.3.3, B**).

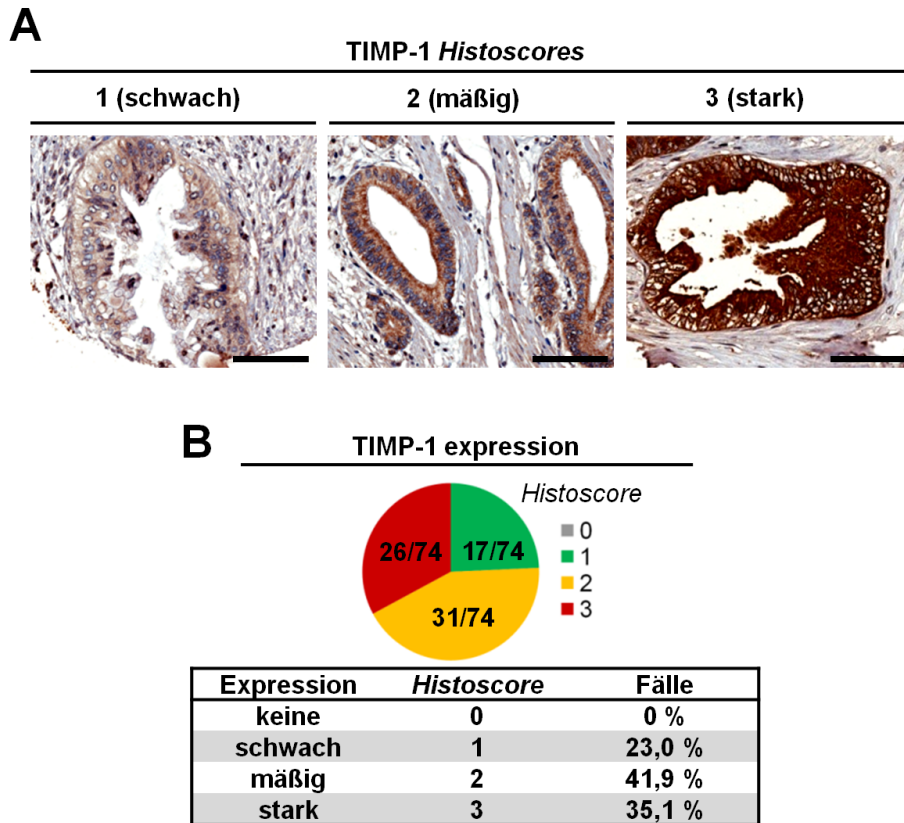


Abbildung 3.3. – Quantifizierung der TIMP-1 Expression in humanem PDAC. TIMP-1 wurde in Gewebeproben von 74 Patienten mit histopathologisch bestätigtem invasivem PDAC mittel IHC detektiert. **(A)** Durchführung der *Histoscoring* Analyse; repräsentative Bilder. Die TIMP-1 Expressionsstärke wurde semi-quantitativ erfasst mit *Histocores* von 0-3, wobei der *Score* 0 bei keiner (nicht gezeigt), *Score* 1 bei *schwacher* (linkes Bild), *Score* 2 bei *mäßiger* (mittleres Bild) und *Score* 3 bei *starker* (rechtes Bild) Immunreaktivität vergeben wurde. **(B)** Ergebnisse der *Histoscoring* Analyse in den 74 humanen PDAC Proben. Die relative TIMP-1 war schwach/*Histocore* 1 in 17 Fällen (bzw. 23.0 % der Patienten), mäßig/*Histocore* 2 in 31 Fällen (bzw. 41.9 % der Patienten) und stark/*Histocore* 3 in 26 Fällen (bzw. 35.1 % der Patienten).

Diese unterschiedlichen TIMP-1 Mengen individueller Patienten wurden anschließend mit dem jeweiligen Tumorgrad korreliert. Der Tumorgrad ist ein klinikopathologischer Parameter für die Dedifferenzierung eines Tumors [Bosman *et al.*, 2010]. Die tumorale TIMP-1 Menge der untersuchten Individuen wurde zunächst durch die Ermittlung eines

3. Ergebnisse

Erweiterten *Histoscores* abgeschätzt. Bei dieser Analyse wird neben der Intensität der Färbung auch der Anteil gefärbter Zellen mit einbezogen (siehe Abschnitt 2.16, Seite 39). Es zeigte sich eine leicht inverse Korrelation der TIMP-1 Menge in tumorzellreichen Bereichen mit dem Tumorgrad (**Abb.3.4, A**). Die TIMP-1 Menge in stromalen Bereichen wies keine Korrelation mit dem Tumorgrad auf (**Abb.3.4, B**).

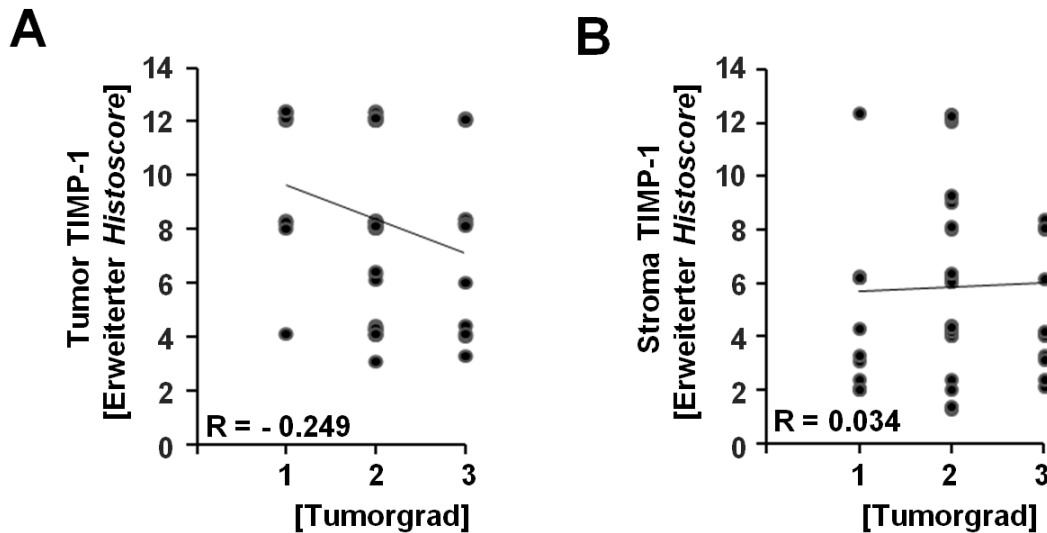


Abbildung 3.4. – Keine Korrelation von TIMP-1 *Histoscores* und Tumorgrad in humanem PDAC. TIMP-1 wurde in Gewebeproben von 74 Patienten mit histopathologisch bestätigtem invasivem PDAC mittel IHC detektiert. Anschließend wurde eine *Histoscore* Analyse durchgeführt. **(A,B)** Erweiterte TIMP-1 *Histoscores* **(A)** tumoraler und **(B)** stromaler Bereiche aufgetragen gegen den Tumorgrad in 74 PDAC Gewebeproben (Grad 1: n = 11; Grad 2: n = 40; Grad 3: n = 13). *Pearson's R* Korrelation: **(A)** R = - 0,249 **(B)** R = 0,034.

3.1.3. Korrelation von TIMP-1 Plasmaspiegeln und MN-Status in PDAC Patienten

Zur Abschätzung des Einflusses von TIMP-1 auf die Metastasierung des Pankreaskarzinoms wurden die TIMP-1 Expression im Plasma von 25 PDAC Patienten analysiert. Diese Patienten wiesen unterschiedliche MN-Stadien auf (N0: kein Befall von Lymphknoten, N1: Befall von Lymphknoten, M0: keine distanten Metastasen, M1: distante Metastasen, [Sobin *et al.*, 2011]).

3. Ergebnisse

Mit zunehmendem NM-Status in PDAC Patienten, d. h. im Verlauf der Erkrankung, zeigte sich ein Anstieg der durchschnittlichen TIMP-1 Plasmaspiegel (**Abb.3.5, A**), wobei diese Unterschiede statistisch nicht signifikant waren. Patienten mit Lebermetastasen wiesen hingegen signifikant höhere TIMP-1 Plasmaspiegel als Patienten ohne Lebermetastasen auf (**Abb.3.5, B**).

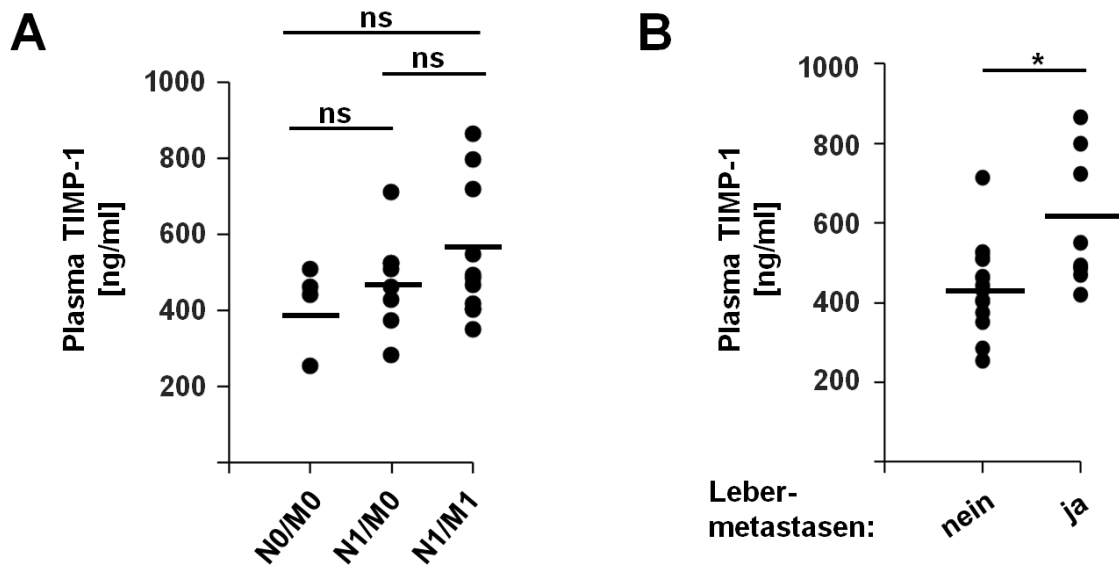


Abbildung 3.5. – Korrelation der TIMP-1 Plasmaspiegel mit der Anwesenheit von Lebermetastasen in PDAC Patienten. TIMP-1 Mengen wurden mittels ELISA im Plasma von PDAC Patienten (n = 25) bestimmt. **(A)** Auftragung der TIMP-1 Plasmaspiegel gegen den NM-Status der Patienten. *N0*, keine Metastasen in Lymphknoten; *N1*, Metastasen in Lymphknoten; *M0*, keine Fernmetastasen; *M1*, Fernmetastasen; *Balken*, Mittelwerte: *N0/M0* 417 \pm 40; *N1/M0* 478 \pm 45; *N1/M1* 542 \pm 52 ng/ml. ns, nicht signifikant; Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA): *N0/M0* vs. *N1/M0*: p = 0,432; *N1/M0* vs. *N1/M1*: p = 0,370; *N0/M0* vs. *N1/M1*: p = 0,140. **(B)** Auftragung der TIMP-1 Plasmaspiegel von Patienten mit und ohne Lebermetastasen. *Balken*, Mittelwerte: Keine Lebermetastasen 444 \pm 29 ng/ml; mit Lebermetastasen 600 \pm 60 ng/ml. *, p < 0,5; *Student's t* -Test.

Die Analyse von humanem Patientenmaterial hatte gezeigt, dass (i) TIMP-1 bereits in den Vorläuferläsionen des PDAC detektierbar war, (ii) alle untersuchten Fälle von invasivem PDAC TIMP-1 Immunreaktivität aufwiesen, (iii) kein Zusammenhang mit der Tumorentartung zu erkennen war, jedoch (iv) eine signifikante Assoziation erhöhter TIMP-1 Plasmaspiegel in PDAC mit der Anwesenheit von Lebermetastasen bestand.

3.2. Expression von TIMP-1 in einem murinen PDAC Modell

Das KPC Mausmodell (siehe 1.5.3, Seite 16) wurde verwendet, um die lokalen und systemischen Mengen von TIMP-1 im Verlauf des PDAC sowie die Auswirkungen auf HSC Aktivierung im folgenden detaillierter untersuchen zu können.

Die TIMP-1 Mengen im Pankreas von KPC Mäusen wurden zunächst in unterschiedlichen Altersgruppen untersucht. Diese Altersgruppen repräsentieren die wichtigsten Krankheitsstadien: 5-6 Wochen, Chronische Pankreatitis (CP); 8-10 Wochen, PanIN Läsionen; 12-14 Wochen, invasives PDAC [Hingorani *et al.*, 2005]. Die TIMP-1 Mengen wurden mittels ELISA bestimmt und mit den Werten gesunder *Littermates* verglichen. Es zeigte sich bereits im CP Stadium bei KPC Mäusen ein eineinhalbfacher Anstieg von TIMP-1 verglichen zu gesunden *Littermates* (**Abb.3.6**). Mit dem Fortschreiten der Erkrankung zeigte sich dreimal mehr TIMP-1 im Pankreas im PanIN Stadium und eine rund zwanzigfache Erhöhung der pankreatischen TIMP-1 Menge bei invasivem PDAC (**Abb.3.6**).

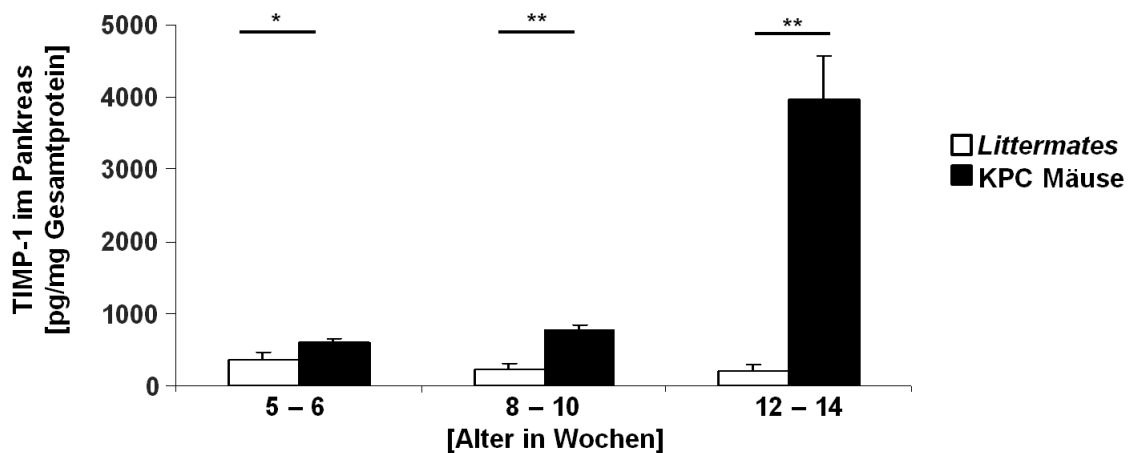


Abbildung 3.6. – Expression von TIMP-1 im Pankreas im Verlauf der Erkrankung in KPC Mäusen. TIMP-1 Mengen wurden mittels ELISA in Pankreaslysat von KPC Mäusen und gesunden *Littermates* unterschiedlicher Altersgruppen bestimmt. 5 - 6 Wochen, Chronische Pankreatitis (n = 5); 8 - 10 Wochen, PanIN Läsionen (n = 6); 12 - 14 Wochen, invasives PDAC (n = 6). Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler. *, p <0,5; **, p <0,1; Student's t -Test.

3. Ergebnisse

Aufgrund auf der Beobachtung, dass die TIMP-1 Mengen im erkrankten Pankreas in KPC Mäusen anstiegen (**Abb.3.6**) wurde vermutet, dass dies auch zum Anstieg der systemischen TIMP-1 Mengen führen könnte. Um dies zu testen, wurden zunächst die TIMP-1 Spiegel in Plasmaproben derselben Tiere ermittelt.

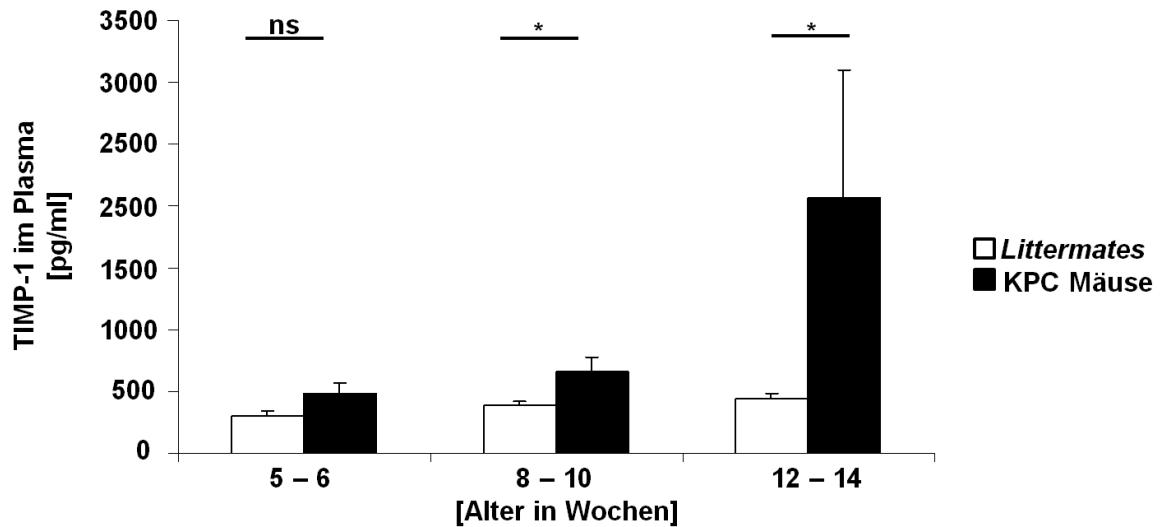


Abbildung 3.7. – Plasmaspiegel von TIMP-1 im Verlauf der Erkrankung in KPC Mäusen. TIMP-1 Mengen wurden mittels ELISA im Plasma von KPC Mäusen und gesunden *Littermates* unterschiedlicher Altersgruppen bestimmt. *5 - 6 Wochen*, Chronische Pankreatitis (n = 5); *8 - 10 Wochen*, PanIN Läsionen (n = 6); *12 - 14 Wochen*, invasives PDAC (n = 6). Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler. n.s.; nicht signifikant; *, p < 0.5; *Student's t*-Test.

Nicht nur die pankreatischen TIMP-1 Mengen (**Abb.3.6**), sondern auch die Plasmaspiegel von TIMP-1 stiegen während des Krankheitsverlaufs in KPC Mäusen an: Verglichen zu den gesunden Geschwistern waren die TIMP-1 Plasmaspiegel in KPC Tieren bereits im CP Stadium eineinhalbfach erhöht, wobei dies nicht signifikant war (**Abb.3.7**). Mit fortschreitender Erkrankung zeigte sich im PanIN Stadium eine fast zweifach, signifikant erhöhte Menge von TIMP-1 im Plasma von KPC Mäusen. KPC Mäuse mit invasiven PDAC Läsionen wiesen rund fünffach erhöhte TIMP-1 Mengen im Plasma auf (**Abb.3.7**).

3. Ergebnisse

Um den möglichen Zusammenhang zwischen der TIMP-1 Mengen in Pankreas und Plasma von KPC Mäusen statistisch zu überprüfen, wurde eine *Pearsons R* Korrelation ermittelt. Es ergab sich ein R Wert von 0,924. Dies wies auf eine starke Korrelation beider Parameter hin (**Abb.3.8**).

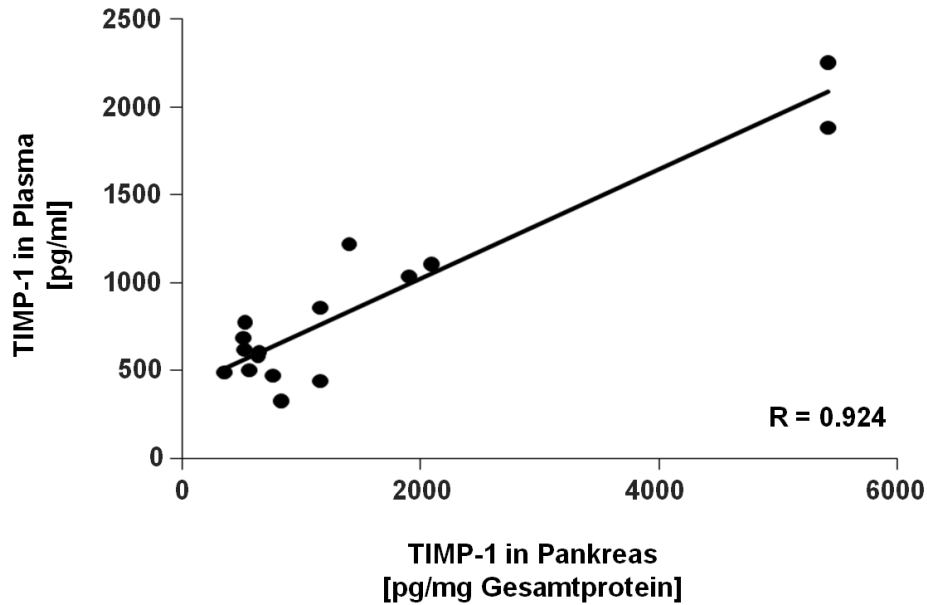


Abbildung 3.8. – Korrelation von TIMP-1 in Pankreas und Plasma von KPC Mäusen. TIMP-1 Mengen wurden mittels ELISA im Plasma bzw. im erkrankten Pankreas von KPC Mäusen (n = 17) unterschiedlichen Alters ermittelt und sind gegeneinander aufgetragen. *Pearsons R* Korrelation, R = 0,924.

3.3. Aktivierung von HSCs in Mäusen mit hohem, tumorsezernierten TIMP-1 Spiegeln

Um zu überprüfen, ob es (i) zu einer Aktivierung von HSCs in KPC Mäusen kommt und ob dies (ii) TIMP-1-abhängig ist, wurde die Expression der HSC Aktivierungsmarker α SMA und Desmin [Friedman, 2008] mittels IHC auf Leberschnitten untersucht. Es zeigte sich eine verstärkte Expression beider Proteine in der Leber von KPC Mäusen (**Abb.3.9**). Die PDAC-induzierte HSC Aktivierung war in TIMP-1-defizienten KPC Mäusen reduziert (**Abb.3.9**). Dies wies darauf hin, dass die PDAC-induzierte HSC Aktivierung in KPC Mäusen von der Anwesenheit von TIMP-1 abhängig war.

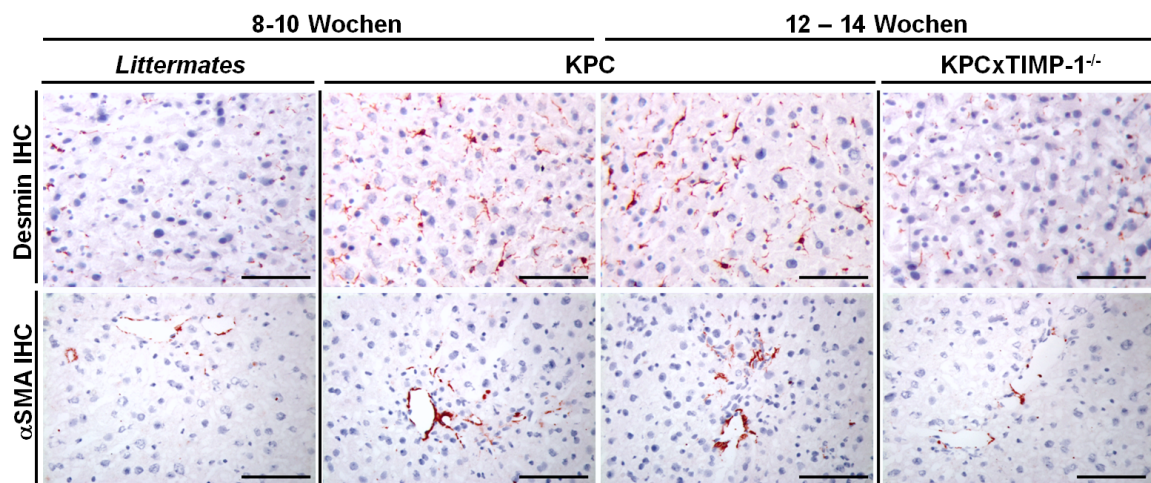


Abbildung 3.9. – Histologischen Anzeichen für HSC Aktivierung in KPC Mäusen abhängig vom TIMP-1 Genotyp. KPC Mäuse und gesunde *Littermates* unterschiedlicher Altersgruppen und mit unterschiedlichen TIMP-1 Genotypen wurden auf histologische Anzeichen für HSC Aktivierung hin untersucht. *8 - 10 Wochen*, PanIN Läsionen (n = 6); *12 - 14 Wochen*, invasives PDAC (n = 6). *TIMP-1^{-/-}*, homozygoter TIMP-1 *knock-out* (n = 5) IHC Nachweis der Expression von Desmin (*oben*) bzw. α SMA (*unten*). Gezeigt sind repräsentative Bilder. *Balken*, 100 μ m.

Um daher zu überprüfen, ob durch tumorsezerniertes TIMP-1 eine Aktivierung von HSCs in der Leber ausgelöst werden kann, wurde das nicht-metastatische NIH3T3 Modell verwendet. SCID Mäuse mit TIMP-1-überexprimierenden subkutanen Tumoren zeigten bei einem Tumordurchmesser von 1 cm stark erhöhte systemische TIMP-1 Spiegel (**Abb.3.10, A**). Die Tiere wurden anschließend auf histologische Anzeichen für HSC Aktivierung untersucht. Die IHC Analyse der Leber zeigte eine verstärkte Expression von α SMA und Desmin bei Mäusen mit TIMP-1-überexprimierenden Tumoren, verglichen zur Leervektorkontrolle (**Abb.3.10, B**).

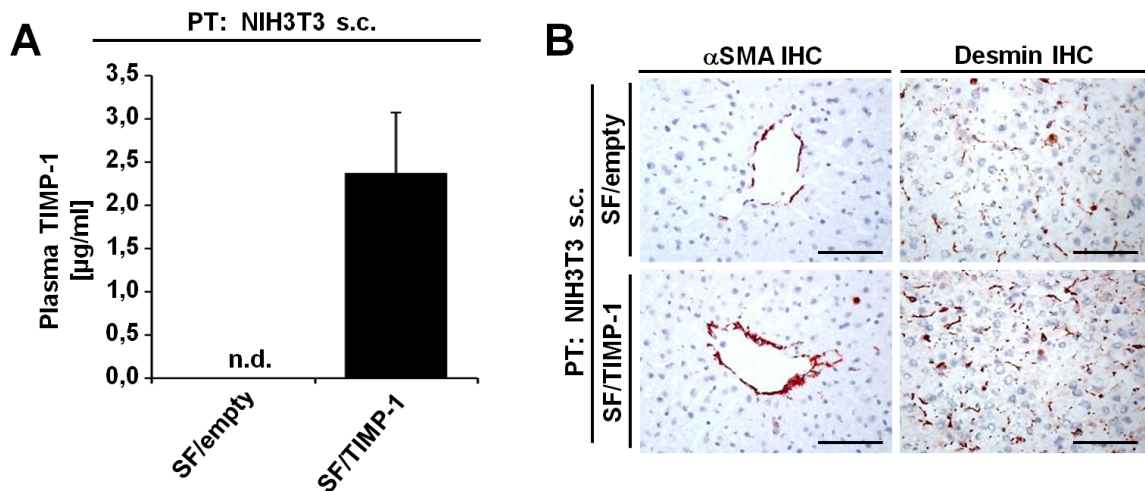


Abbildung 3.10. – HSC Aktivierung in SCID Mäusen mit TIMP-1-überexprimierenden NIH3T3 Tumoren. NIH3T3 Zellen wurden s.c. in die Nackenfalte von SCID Mäusen inokuliert. 28 Tage später wurden **(A)** die TIMP-1 Level im Plasma mittels ELISA bestimmt. **(B)** die Leber auf HSC Aktivierung hin untersucht. IHC Nachweis der Expression von Desmin (*rechts*) bzw. α SMA (*links*). Gezeigt sind repräsentative Bilder. *Balken*, 100 μ m. **(A,B)** SF/TIMP-1, TIMP-1 Überexpression; SF/empty, Leervektorkontrolle; PT, Primärtumor; s.c., subkutan.

Zusammengefasst deuteten diese Beobachtungen darauf hin, dass tumorsezerniertes TIMP-1 zur Aktivierung von HSC in der Leber führen kann.

3.4. Aktivierung von HSCs durch TIMP-1

3.4.1. Aktivierung von HSCs in AdTIMP-1-transduzierten Mäusen

Um untersuchen zu können, ob TIMP-1 als alleiniger Faktor ausreichend ist, um die Aktivierung von HSC in der Leber zu induzieren, wurden das zuvor beschriebene adenovirale Transduktionsmodell unter Verwendung TIMP-1-kodierender Vektoren (AdTIMP-1) verwendet [Kopitz *et al.*, 2007; Seubert *et al.*, 2015]. Jeweils an Tag drei, sechs und neun nach AdV-Inokulation wurden die Tiere geopfert und auf histologische Anzeichen von HSC Aktivierung hin untersucht. Aktivierte HSCs produzieren große Mengen an EZM [Friedman, 2008], daher wurden mittels SiriusRed Färbung Kollagene in der Leber

3. Ergebnisse

sichtbar gemacht. Außerdem wurden die HSC Aktivierungsmarker α SMA und Desmin [Friedman, 2008] mittels IHC detektiert.

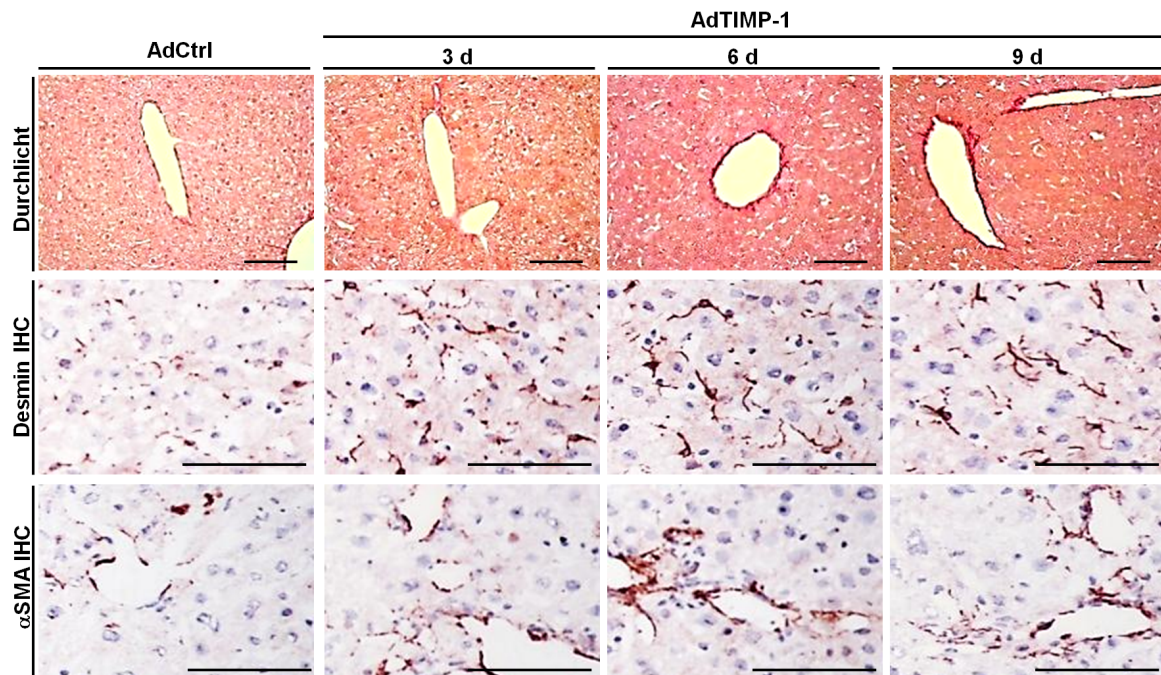


Abbildung 3.11. – Histologischen Anzeichen für HSC Aktivierung in AdTIMP-1-transduzierten Mäusen. DBA/2 Mäuse ($n = 5$ pro Zeitpunkt) wurden mit AdTIMP-1 bzw. Leervirus (AdCtrl) transduziert und drei, sechs bzw. neun Tage nach Virusinokulation auf histologische Anzeichen für HSC Aktivierung hin untersucht. SiriusRed Färbung für die Sichtbarmachung von Gesamtkollagen (*oben*); IHC Nachweis der Expression von Desmin (*mitte*) bzw. α SMA (*unten*). Gezeigt sind repräsentative Bilder. *Balken*, 100 μ m.

Diese Analysen zeigten, dass die Kollagenmenge, sowie die Expression der HSC Aktivierungsmarker α SMA und Desmin in Mäusen mit hohen TIMP-1 Spiegel erhöht waren und über die Zeit weiter anstiegen (**Abb.3.11**). Dies wies darauf hin, dass eine ektopische Expression von TIMP-1 ausreichend war, HSCs in Mäusen zu aktivieren.

3.4.2. Erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern in aufgereinigten HSC Fraktionen aus Mäusen mit hohen TIMP-1 Spiegeln

Die bisher bekannten HSC Aktivierungsmarker, wie α SMA und Desmin, weisen nicht ausschließlich HSCs nach, sondern können auch von anderen Leberzellen exprimiert werden [Li *et al.*, 2007]. Zur spezifischeren und detaillierteren Charakterisierung von HSCs in der TIMP-1- induzierten prämetastatischen Nische wurde zunächst ein Isolationsprotokoll (siehe 2.5, Seite 39) etabliert, das die Anreicherung von HSCs anhand der zelltypspezifisch relativ geringen Dichte, die aufgrund intrazellulärer Fetttröpfchen zustande kommt, erlaubt [Liu *et al.*, 2011]. In diesen Fetttröpfchen gespeichertes Vitamin A weist eine hohe Eigenfluoreszenz auf und emittiert nach Anregung bei etwa 330 nm im gelb-grünen Bereich. Diese für HSCs hochspezifische Eigenschaft ermöglicht über die Anreicherung hinaus auch deren eindeutige Identifizierung [Friedman, 2008]. Anhand dieser Vitamin A Autofluoreszenz wurden die isolierten HSC Fraktionen auf Reinheit überprüft (**Abb.3.12**), diese betrug stets über 90%.

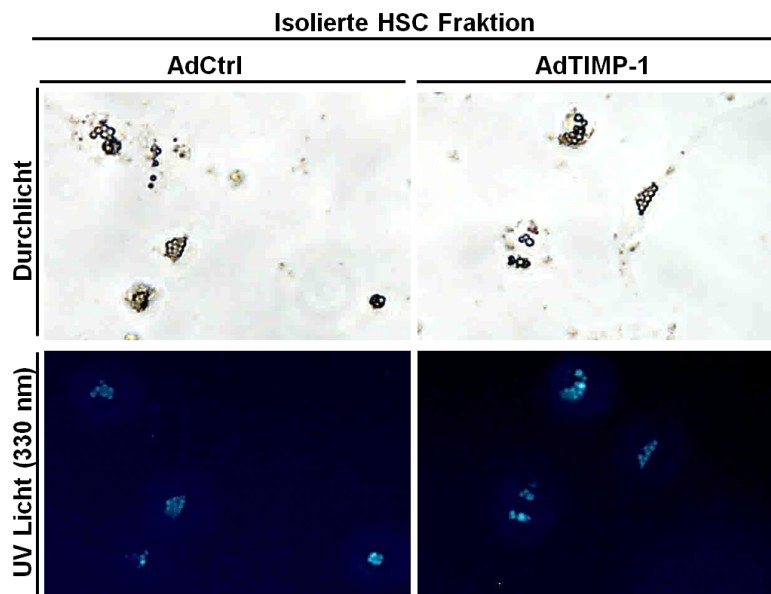


Abbildung 3.12. – Aufgereinigte HSC Fraktionen aus AdTIMP-1-transduzierten Mäusen. Mäuse (n = 6) wurde mit AdTIMP-1 bzw. Leervirus (AdCtrl) transduziert. Drei Tage später wurden HSC Fraktionen aufgereinigt. Überprüfung der Reinheit anhand der charakteristischen Morphologie (*oben*) und Vitamin A-basierten Auto-Fluoreszenz der intrazellulären Fetttröpfchen nach Anregung bei 330 nm (*unten*) 24 h nach Isolation. Gezeigt sind repräsentative Bilder.

3. Ergebnisse

Mit Hilfe dieser HSC Fraktionen sollte nun überprüft werden, ob der *in situ* beobachteten Anstieg von α SMA, Desmin und der Menge abgelagerter Kollagene in der Leber AdTIMP-1-transduzierter Mäuse (**Abb.3.11**) tatsächlich auf HSCs zurückzuführen ist. Aus AdTIMP-1-transduzierten C57BL/6 sowie DBA/2 Mäusen wurden drei Tage nach Adenovirusinokulation *ex vivo* HSC Fraktionen aufgereinigt und mittels qRT-PCR auf die Expression verschiedener Aktivierungsmarker hin untersucht. Hierbei bestätigte sich eine erhöhte Expression von α SMA und Desmin in HSCs aus Mäusen mit hohen TIMP-1 Spiegeln (**Abb.3.13**). Auch die Aktivierungsmarker Col1a1 und Nestin zeigten einen TIMP-1-induzierten Anstieg (**Abb.3.13**).

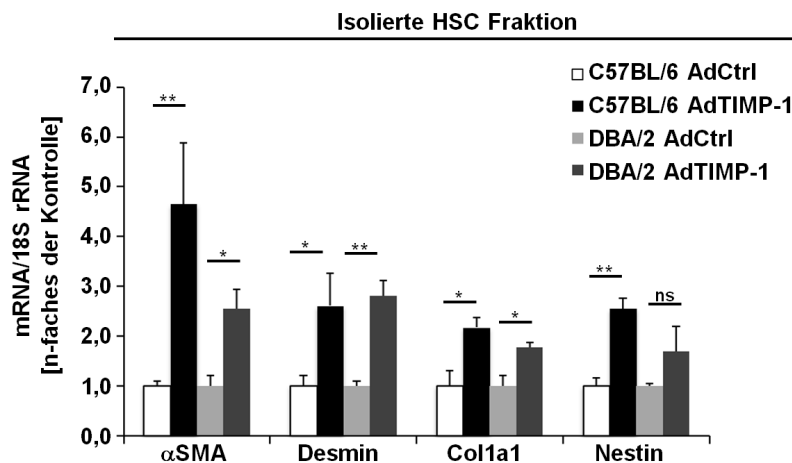


Abbildung 3.13. – Erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern in HSC Fraktionen aus AdTIMP-1-transduzierten Mäusen. DBA/2 bzw. C57BL/6 Mäuse (n = 6) wurde mit AdTIMP-1 bzw. Leervirus (AdCtrl) transduziert. Drei Tage später wurden HSC Fraktionen aufgereinigt. Untersuchung der Expression von Aktivierungsmarkern in isolierten HSCs Fraktion. Analyse der mRNA Mengen von α SMA, Desmin, Col1a1 und Nestin mittels qRT-PCR. Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler. n.s.; nicht signifikant; *, p < 0,5; **, p < 0,1 ; Student's t -Test.

3.4.3. Aktivierung von HSCs durch TIMP-1 *in vitro*

Die bisherigen Analysen lieferten Hinweise, dass HSCs durch hohe TIMP-1 Mengen aktiviert werden (**Abbn. 3.11 und 3.13**). Im Gewebeverband ist es zunächst nicht möglich, zu unterscheiden, ob es sich um einen direkten Effekt von TIMP-1 handelt oder umliegende Zelltypen involviert sind, die ihrerseits auf TIMP-1 reagieren und anschließend aktivierend auf HSCs wirken. *In vitro* wurde daher untersucht, ob erhöhte TIMP-1 Mengen direkt auf HSCs wirken und zu deren Aktivierung führen können. Die immortalisierte humane HSCs Zelllinie LX2 [Xu *et al.*, 2005] wurde für 24 h mit 500 ng/ml rekTIMP-1 inkubiert. Die anschließende Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR zeigte einen signifikanten, eineinhalb- bis zweifachen Anstieg der mRNA Expression der Aktivierungsmarker α SMA, Desmin, Col1a1 und Nestin in TIMP-1-stimulierten LX2 Zellen (**Abb.3.14, A**).

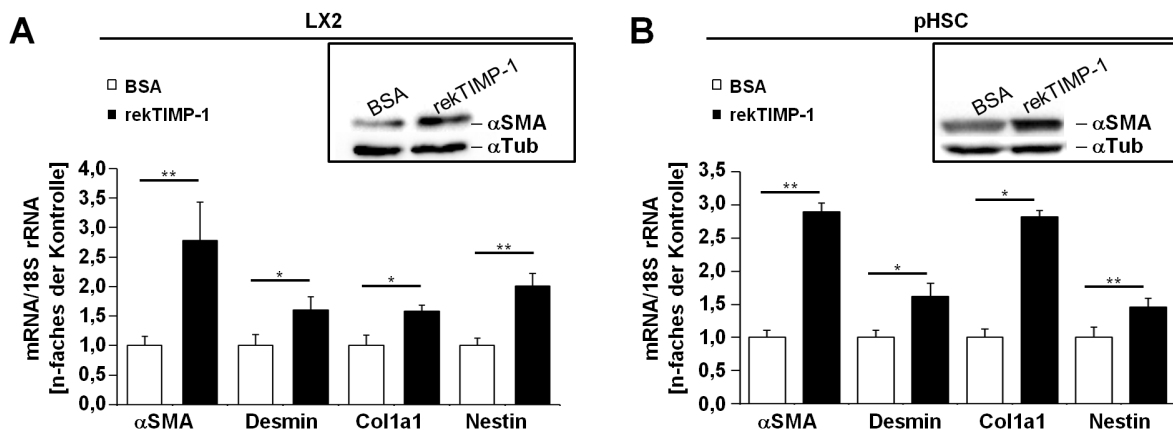


Abbildung 3.14. – Erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern in humanen HSCs nach Stimulation mit rekTIMP-1. HSCs wurden für 24 h mit 500 ng/ml rekTIMP-1 bzw. BSA (als Kontrolle) inkubiert und auf Veränderungen in der Expression von Aktivierungsmarkern hin untersucht. Quantifizierung der mRNA Mengen von α SMA, Desmin, Col1a1 und Nestin mittels qRT-PCR sowie der Proteinmengen von α SMA mittels Western Blot (**A**) in LX2 Zellen bzw. (**B**) in pHSCs. (**A,B**) Balkendiagramme, abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler; *Inserts*, gezeigt sind repräsentative *Western Blots*; *, $p < 0,5$; **, $p < 0,1$; *Student's t* -Test.

Primäre, aus einem PDAC Patienten isolierte HSCs (pHSCs) wurden ebenfalls mit 500 ng/ml rekTIMP-1 inkubiert und derselben Analyse unterzogen. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg der mRNA Expression von α SMA, Desmin, Col1a1 und Nestin (**Abb.3.14, B**). Die Induktion von Aktivierungsmarkern in HSCs durch rekTIMP-1 wurde nochmals auf Proteinebene überprüft. Die α SMA Proteinmengen wurden hierfür mittels

Western Blot analysiert. Dies zeigte ebenfalls einen Anstieg der α SMA Menge in LX2 Zellen und pHSCs, ausgelöst durch Stimulation mit rekTIMP-1 (**Abb.3.14, A und B, Insert**). Hohe TIMP-1 Mengen in der zellulären Umgebung waren demnach ausreichend, um HSCs zu aktivieren.

3.5. Regulation und Wichtigkeit von TIMP-1 bei der Aktivierung von HSCs

3.5.1. Autoregulation von TIMP-1 in HSCs

Exogenes rekTIMP-1 förderte die Aktivierung von HSCs (**Abb.3.14**). Es ist jedoch bekannt, dass TIMP-1 von aktivierten HSCs selbst exprimiert wird [Friedman, 2008]. Daher wurde untersucht, wie die Expression von TIMP-1 in HSCs unter Einfluss hoher TIMP-1 Mengen reguliert ist. HSC Fraktionen aus C57BL/6- sowie DBA/2-AdTIMP-1 Mäusen wurden zunächst mittels qRT-PCR Analyse auf Veränderungen der endogenen, murinen TIMP-1 Expression überprüft. Es zeigte sich eine Induktion der TIMP-1 Expression in HSC Fraktionen aus AdTIMP-1-transduzierten Lebern (**Abb.3.15, A**). Um zu überprüfen, ob dies ein direkter Effekt von TIMP-1 auf HSCs ist, wurden LX2 Zellen sowie pHSCs mit rekTIMP-1 inkubiert und mittels qRT-PCR Analyse auf Veränderungen in der endogenen TIMP-1 Expression hin überprüft. Die Inkubation mit rekTIMP-1 löste einen signifikanten, knapp zweifachen Anstieg der endogenen TIMP-1 Expression in LX2 Zellen aus (**Abb.3.15, B**). Die Inkubation von pHSCs mit rekTIMP-1 führte hingegen zu keinem Anstieg der endogenen TIMP-1 Expression (**Abb.3.15, C**). Um zu testen, ob auch autokrin wirksames TIMP-1 zu einer Autoregulation der TIMP-1 Expression in LX2 Zellen führt, wurden LX2 SF/TIMP-1 Zellen untersucht. Zur Unterscheidung der endogenen TIMP-1 prä-mRNA Expression von der Transkription der lentiviral eingebrachten TIMP-1 cDNA in LX2 SF/TIMP-1 Zellen wurden exonübergreifende qRT-PCR *Primer* verwendet. Erhöhte Mengen an autokrin wirksamem TIMP-1 bei stabiler Überexpression führten zu einer dauerhaften Hochregulation der endogenen TIMP-1 Transkription in LX2 Zellen (**Abb.3.15, D**). Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass die Expression von TIMP-1 in LX2 Zellen und murinen HSC Fraktionen aus Mäusen mit hohen TIMP-1 Spiegel n positiv autoreguliert war, während pHSCs keine Autoinduktion der TIMP-1 Expression zeigten.

3. Ergebnisse

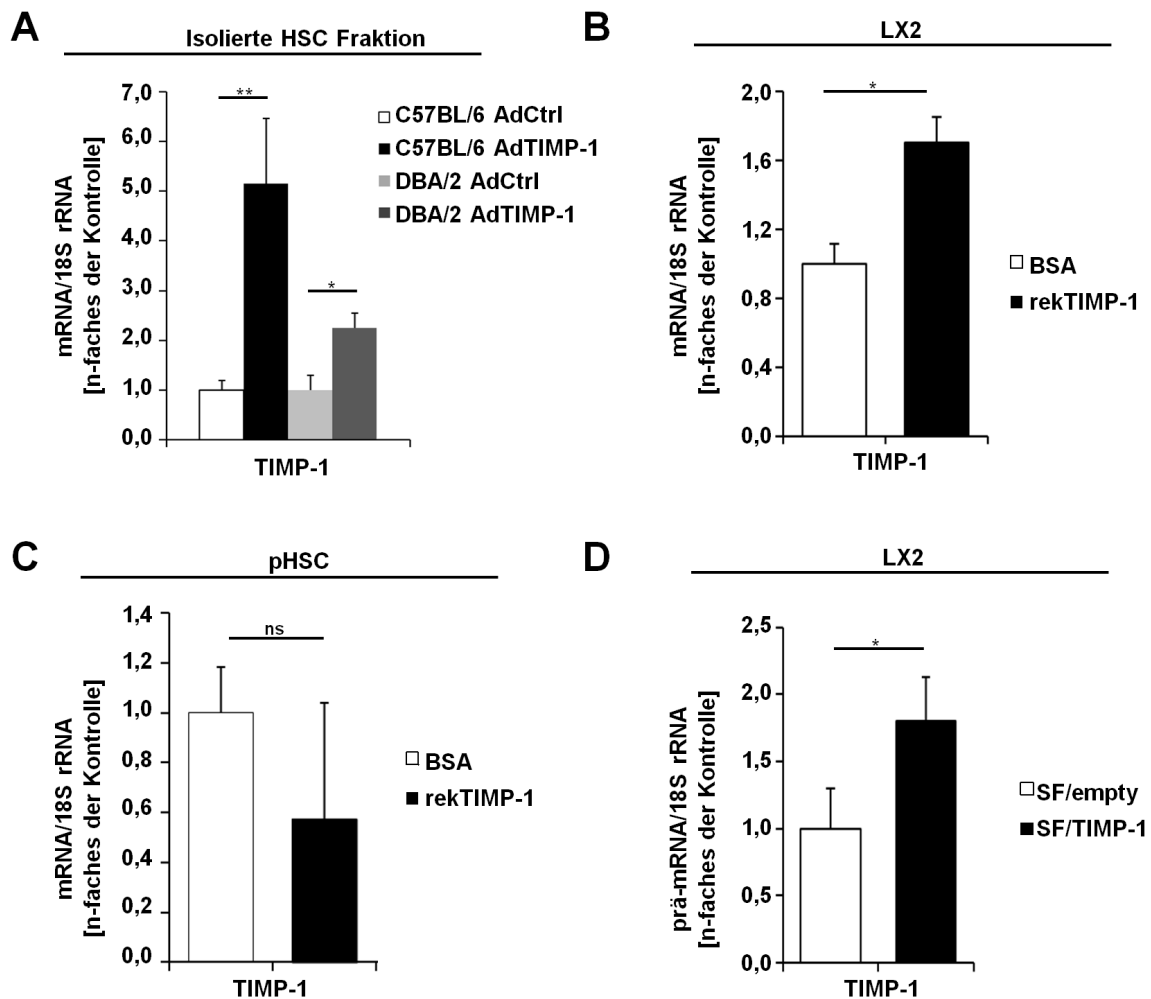


Abbildung 3.15. – Autoregulation von TIMP-1 in HSCs. HSCs wurden auf verschiedene Arten erhöhten TIMP-1 Mengen ausgesetzt und anschließend auf Veränderungen in der endogenen TIMP-1 Expression hin untersucht. **(A)** DBA/2 bzw. C57BL/6 Mäuse (n = 6) wurde mit AdTIMP-1 bzw. Leervirus (AdCtrl) transduziert; nach drei Tagen wurden HSC Fraktionen aufgereinigt und auf Veränderungen der endogenen, murinen TIMP-1 mRNA untersucht. **(B)** LX2 Zellen wurden für 24 h mit 500 ng/ml rekTIMP-1 bzw. BSA (als Kontrolle) inkubiert; anschließend wurden TIMP-1 mRNA Mengen quantifiziert. **(C)** pHSCs wurden für 24 h mit 500 ng/ml rekTIMP-1 bzw. BSA (als Kontrolle) inkubiert; anschließend wurden die TIMP-1 mRNA Mengen quantifiziert. **(D)** LX2 Zellen wurden lentiviral mit einem Konstrukt zur Überexpression von TIMP-1 cDNA (*SF/TIMP-1*) bzw. einer Leervektorkontrolle (*SF/empty*) transduziert und anschließend auf Veränderungen endogener TIMP-1 prä-mRNA hin untersucht. **(A-D)** Quantifizierung mittels qRT-PCR, abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler. ns, nicht signifikant, *, $p < 0,5$; **, $p < 0,1$; Student's t -Test.

3.5.2. Reduktion von Aktivierungsmarkern in humanen HSCs mit TIMP-1 knock-down

Die zuvor gezeigten Beobachtungen deuteten darauf hin, dass die Expression von TIMP-1 in HSCs positiv autoregulierte ist. Autokrine Stimulation ist bekanntermaßen ein zentraler Mechanismus in der Aufrechterhaltung des Aktivierungsstatus von HSCs [Reeves und Friedman, 2002]. Daher wurde vermutet, dass auch TIMP-1 eine Rolle in der Erhaltung des HSC Aktivierungsstatus spielen könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde getestet ob eine Reduktion der TIMP-1 Expression, und somit der autokrinen Stimulation, zu einem verringerten Aktivierungsstatus von HSCs führt.

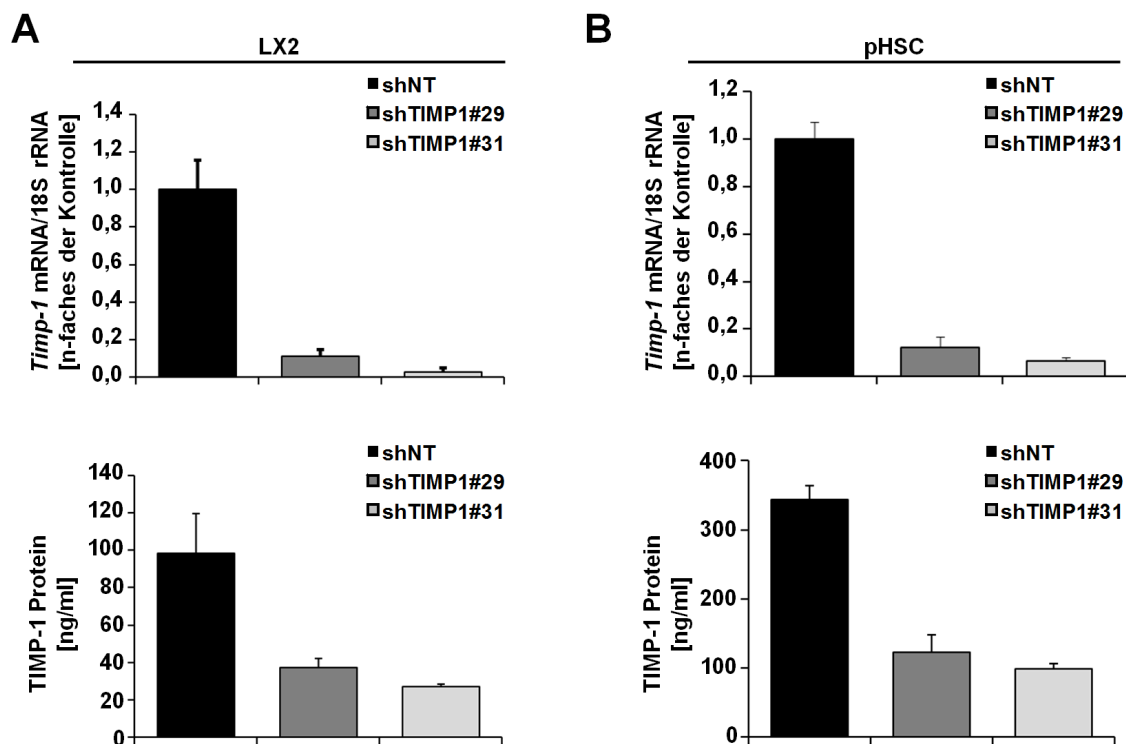


Abbildung 3.16. – knock-down von TIMP-1 in humanen HSCs. HSCs wurden lentiviral mit zwei TIMP-1 knock-down Konstrukten (*shTIMP-1#29*, *shTIMP-1#31*) bzw. einem Konstrukt zur Expression unspezifischer shRNA (*shNT*) transduziert. **(A)** Nachweis des TIMP-1 knock-downs in LX2 Zellen. **(B)** Nachweis des TIMP-1 knock-downs in pHSCs. **(A,B)** Quantifizierung der TIMP-1 Expression mittels qRT-PCR (*oben*) und ELISA (*unten*). Abgebildet sind Mittelwerte + Standardfehler.

Die endogene TIMP-1 Expression von HSCs wurde hierfür zunächst durch lentiviralen, shRNA-basierten knock-down von TIMP-1 mit zwei unabhängigen shRNA Konstrukten (*shTIMP-1#29* und *shTIMP-1#31*) reduziert. Der knock-down von TIMP-1 wurde in

3. Ergebnisse

LX2 Zellen und pHSCs etabliert. Eine erfolgreiche Repression der TIMP-1 Expression wurde mittels qRT-PCR und ELISA überprüft. Sowohl LX2 shTIMP-1#29 als auch LX2 shTIMP-1#31 Zellen wiesen eine verglichen zur unspezifischen shRNA Kontrolle (shNT) reduzierte Expression von TIMP-1 mRNA bzw. reduzierte TIMP-1 Proteinmengen im Zellkulturüberstand auf (**Abb.3.16, A**). Ebenso konnte in pHSCs mit beiden Konstrukten (shTIMP-1#29, shTIMP-1#31) ein *knock-down* von TIMP-1 etabliert werden (**Abb.3.16, B**).

In diesen Zelllinien wurden anschließend die Auswirkungen des TIMP-1 *knock-downs* auf die Expression von HSC Aktivierungsmarkern untersucht. Die Repression der endogenen TIMP-1 Expression in pHSCs führte zu einer signifikant verringerten Expression der Aktivierungsmarker α SMA, Desmin, Col1a1 und Nestin in den Zellen (**Abb.3.17**).

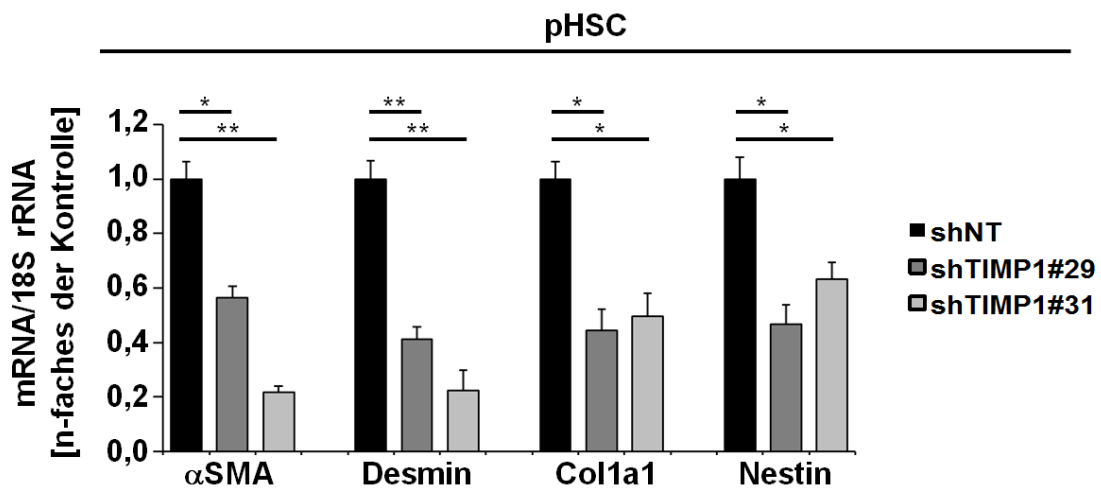


Abbildung 3.17. – Reduktion von Aktivierungsmarkern in pHSCs mit TIMP-1 *knock-down*. pHSCs wurden lentiviral mit zwei TIMP-1 *knock-down* Konstrukten (*shTIMP-1#29*, *shTIMP-1#31*) bzw. einem Konstrukt zur Expression unspezifischer shRNA (*shNT*) transduziert und anschließend auf die Expression von Aktivierungsmarkern hin überprüft. Analyse der mRNA Mengen von α SMA, Desmin, Col1a1 und Nestin mittels qRT-PCR. Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler. *, $p < 0,5$; **, $p < 0,1$; Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA).

3. Ergebnisse

Der Einfluss einer reduzierten endogenen TIMP-1 Expression durch *knock-down* auf die Expression von HSC Aktivierungsmarkern wurde ebenfalls in LX2 Zellen überprüft. Die Reduktion der TIMP-1 Expression mit beiden shRNA Konstrukten führte auch in LX2 Zellen zu einer verringerten Expression von α SMA (**Abb.3.18, A**) sowie von Desmin (**Abb.3.18, B**) auf etwa die Hälfte .

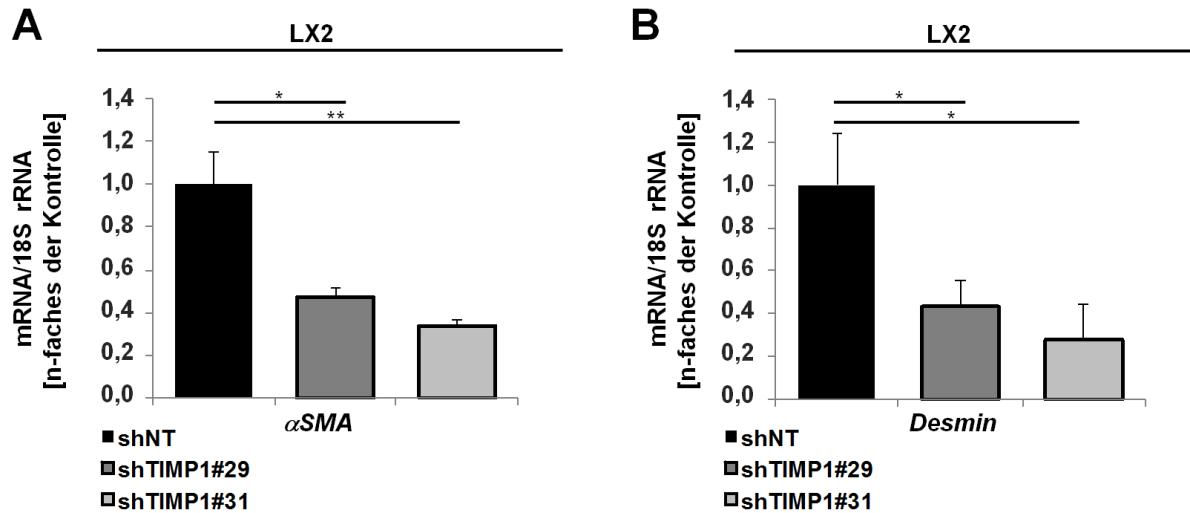


Abbildung 3.18. – Reduktion von Aktivierungsmarkern in LX2 Zellen mit TIMP-1 knock-down. LX2 Zellen wurden lentiviral mit zwei TIMP-1 *knock-down* Konstrukten (*shTIMP-1#29*, *shTIMP-1#31*) bzw. einem Konstrukt zur Expression unspezifischer shRNA (*shNT*) transduziert und anschließend auf die Expression der Aktivierungsmarker (**A**) α SMA und (**B**) Desmin hin überprüft. Analyse der mRNA Mengen mittels qRT-PCR. Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler. *, $p < 0,5$; **, $p < 0,1$; Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA).

3.5.3. Wiederherstellung der Expression von Aktivierungsmarkern in HSCs mit TIMP-1 *knock-down* durch rekTIMP-1

Um zu überprüfen, ob rekTIMP-1 und endogene TIMP-1 Expressionslevel gleichermaßen die Aktivierung von HSCs beeinflussen, wurden die bei *knock-down* Zellen reduzierten TIMP-1 Spiegel im Zellkulturmedium durch Zugabe von rekTIMP-1 ausgeglichen. Dies war ausreichend, um die Expression von α SMA (**Abb.3.19, A**) und Desmin (**Abb.3.19, B**) wieder auf vergleichbare Level wie in der shNT Kontrolle anzuheben.

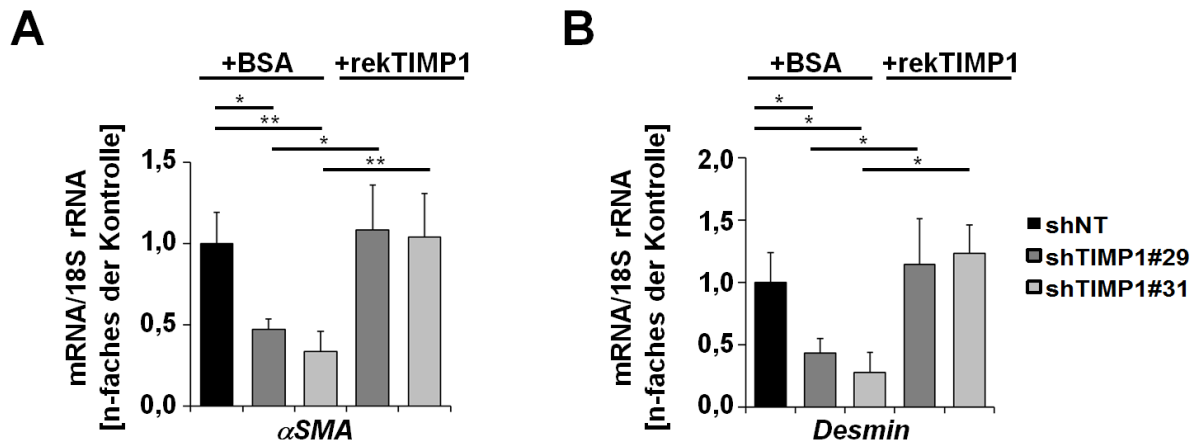


Abbildung 3.19. – Wiederherstellung der Expression von Aktivierungsmarkern in HSCs mit TIMP-1 *knock-down* durch rekTIMP-1. LX2 Zellen mit *knock-down* von TIMP-1 (*shTIMP-1#29*, *shTIMP-1#31*) bzw. *shNT* Kontrollzellen wurden mit und ohne Zugabe von *rekTIMP-1* bzw. *BSA* (als Kontrolle) auf die Expression von Aktivierungsmarkern untersucht. qRT-PCR-Analyse der mRNA Mengen von **(A)** α SMA und **(B)** Desmin. Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler. *, $p < 0,5$; **, $p < 0,1$; Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA).

3.5.4. Induktion von Aktivierungsmarkern in humanen HSCs mit TIMP-1 Überexpression

Der *knock-down* von TIMP-1 führte zur Deaktivierung von HSCs (**Abb.3.18**). Im nächsten Schritt wurden nun die Effekte erhöhter TIMP-1 Expression auf HSCs untersucht. Hierfür wurde eine stabile Überexpression von TIMP-1 in LX2 Zellen bzw. pHSCs etabliert (LX2 SF/TIMP-1 bzw. pHSCs SF/TIMP-1).

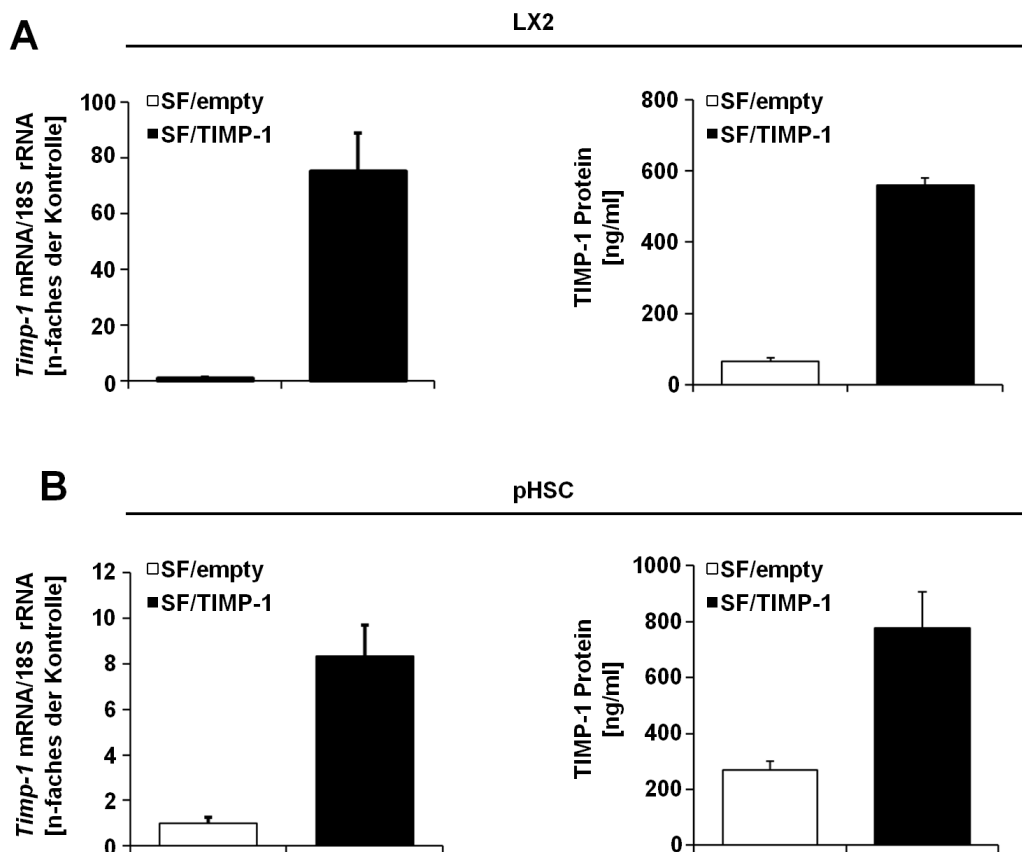


Abbildung 3.20. – Überexpression von TIMP-1 in HSCs. HSCs wurden lentiviral mit einem Konstrukt zur Überexpression von TIMP-1 (*SF/TIMP-1*) bzw. einer Leervektorkontrolle (*SF/empty*) transduziert. **(A)** Nachweis der Überexpression in LX2 Zellen. **(B)** Nachweis der Überexpression in pHSCs. **(A,B)** Quantifizierung der TIMP-1 Expression mittels qRT-PCR (*links*) und ELISA (*rechts*). Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler.

Die Zellen wurden lentiviral mit einem Konstrukt zur Expression von TIMP-1 cDNA unter der Kontrolle eines SF-Promotors transduziert. Die erfolgreiche Etablierung einer stabilen Überexpression wurde mittels qRT-PCR und ELISA überprüft. LX2 SF/TIMP-1 Zellen zeigten, verglichen zur Leervektor transduzierten Zelllinie LX2 SF/empty, eine erhöhte TIMP-1 Expression auf mRNA-Ebene und eine Erhöhung der TIMP-1 Menge

3. Ergebnisse

im Zellkulturüberstand (**Abb.3.20, A**). Auch pHSCs SF/TIMP-1 Zellen wiesen, verglichen zu pHSCs SF/empty, eine erhöhte Expression von TIMP-1 mRNA und TIMP-1 Protein auf (**Abb.3.20, B**).

Die Auswirkungen der TIMP-1 Überexpression auf die Expression von HSC Aktivierungsmarkern wurden anschließend mittels qRT-PCR überprüft. Es zeigte sich, dass sowohl LX2 Zellen als auch pHSCs mit TIMP-1 Überexpression erhöhte Mengen an α SMA, Desmin, Col1a1 und Nestin mRNA aufwiesen, verglichen zu den jeweiligen leervektortransduzierten Kontrollen (**Abb.3.21, A und B**). Zur weiteren Überprüfung wurden zusätzlich die α SMA Proteinmengen per Western Blot untersucht. Diese Analyse zeigte ebenfalls einen Anstieg von α SMA in LX2 Zellen und pHSCs mit TIMP-1 Überexpression (**Abb.3.21, A und B, Insert**).

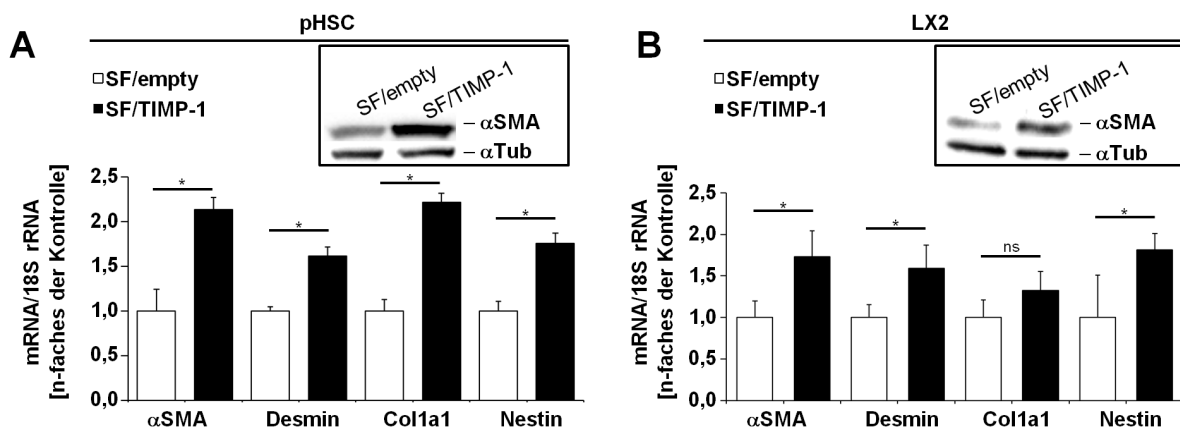


Abbildung 3.21. – Anstieg von Aktivierungsmarkern in humanen HSCs mit TIMP-1 Überexpression. HSCs wurden lentiviral mit einem Konstrukt zur Überexpression von TIMP-1 (*SF/TIMP-1*) bzw. einer Leervektorkontrolle (*SF/empty*) transduziert und anschließend auf Veränderungen in der Expression von Aktivierungsmarkern hin untersucht. Quantifizierung der mRNA Mengen von α SMA, Desmin, Col1a1 und Nestin mittels qRT-PCR sowie der Proteinmengen von α SMA mittels Western Blot (**A**) in LX2 Zellen bzw. (**B**) in pHSCs. (**A,B**) Balkendiagramme, abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler; *Inserts*, gezeigt sind repräsentative *Western Blots*; *, $p < 0,5$; **, $p < 0,1$; *Student's t* -Test.

3.6. Funktionelle Eigenschaften TIMP-1-aktivierter HSCs

3.6.1. Identifizierung TIMP-1-induzierter prometastatischer Faktoren in HSCs

Aktivierete HSCs exprimieren eine Vielzahl bioaktiver Faktoren und wirken so auf die Leberumgebung ein [Friedman, 2008]. Zur funktionellen Charakterisierung von HSCs in der TIMP-1-induzierten prämetastatischen Nische wurde ein Genexpressionsprofil mit Fokus auf HSC Aktivierungsmarker und prometastatische Gene erstellt. Hierfür wurden qRT-PCR basierte *Low Density Arrays* (LDAs) verwendet. Um den Aktivierungsstatus von HSCs sowie deren möglichen prometastatischen Einfluß auf die Leberumgebung zu untersuchen, wurden 60 Gene ausgewählt. Zur Auswahl der Gene wurde zunächst eine Literaturrecherche durchgeführt. Hierbei wurden alle derzeit bekannten HSC Aktivierungsmarker zusammen gestellt, sowie Gene die mit HSC-assoziierten Erkrankungen wie Fibrose zusammenhängen. Des weiteren wurde eine Auswahl prometastatischer Zielgene identifiziert, die entweder als Nischenfaktor, d. h. als Effektormoleküle in der Ausbildung einer prämetastatischen Nische, beschrieben wurden und/oder zudem als Faktor in Zusammenhang mit der Metastasierung von Tumorzellen identifiziert wurden (siehe A.1, Seite 146).

Die zuvor aus C57BL/6 sowie DBA/2 Mäusen drei Tage nach AdTIMP-1 Transduktion aufgereinigten HSC Fraktionen (**Abb.3.12**) wurden nun für die Erstellung eines Genexpressionsprofils mit Fokus auf HSC Aktivierungsmarker und prometastatische Gene verwendet. Diese Untersuchung zeigte weitreichende TIMP-1-induzierte Veränderungen in der Genexpression von HSCs aus beiden Mausstämmen, wobei in C57BL/6 Mäusen insgesamt mehr Gene eine Veränderung aufwiesen (z.B. TIMP-2, TLR2, VEGF-B; **Abb.3.22**). Für die LDA-Analyse wurden cDNA *pools* (bestehend aus cDNAs von sechs Mäusen pro Gruppe zu gleichen Mengenanteilen, siehe 2.7.10, Seite 57) verwendet, sodass im nächsten Schritt die erhaltenen Ergebnisse durch Einzelanalysen validiert und einer statistischen Analyse zugänglich gemacht wurden. Gleichzeitig sollten unter den diversen *in vivo* induzierten prometastatische Genen solche identifiziert werden, die direkt durch TIMP-1 reguliert und daher auch *in vitro* verändert exprimiert werden.

3. Ergebnisse

	C57BL/6	DBA/2		C57BL/6	DBA/2		C57BL/6	DBA/2
α SMA	4,7	1,5	MMP2	induziert	2,2	Selectin E	1,6	11,9
ADAM10	1,8	1,3	MMP9	0,6	0,2	Selectin P	3,3	3,1
ADAM17	1,6	1,0	NCAM	2,2	1,8	Serpin A3	1,8	0,7
CAIX	1,9	1,3	NCX	2,0	1,7	PAI	1,0	4,2
CCL2	3,0	1,8	Nestin	2,6	1,7	Serpin G1	1,6	1,3
CCL5	0,7	0,5	PDGF-A	1,4	0,9	Osteonektin	1,5	0,9
CD63	1,5	1,1	PDGF-B	1,8	1,6	Osteopontin	1,5	2,0
CFB	2,2	1,4	PDGF-C	0,5	0,5	TGF β 1	2,7	1,2
Col1a1	2,6	2,8	PDGFR	1,6	1,3	Thrombopoietin	2,2	0,3
Col4a5	1,1	1,6	tPA	1,5	1,4	TIMP-1	2,2	5,2
CXCL1	0,9	1,2	uPA	3,4	4,3	TIMP-2	1,4	1,0
CXCL12	1,1	1,2	uPAR	3,6	2,6	TIMP-3	1,4	1,4
CXCL14	0,6	n.d.	PPAR- γ	2,2	2,5	TLR2	1,9	1,2
CXCL2	0,7	0,2	CD133	2,6	1,2	TLR4	1,8	1,4
Desmin	2,5	2,1	COX-2	0,2	5,2	TLR6	2,0	1,0
EGF	1,6	1,4	S100A4	2,0	1,1	TNF	1,8	1,7
L1CAM	1,4	2,4	S100A6	2,1	1,2	VEGF-A	1,9	1,4
LOX	2,2	2,9	S100A8	2,2	1,4	VEGF-B	2,1	1,1
MMP13	4,8	6,5	S100A9	3,5	15,3	VEGF-C	0,4	1,2
MMP14	1,6	1,1	SAA3	9,3	4,5	Vimentin	1,7	2,0

<0,7	<1	>1,4	>5
------	----	------	----

Abbildung 3.22. – LDA Analyse von Aktivierungsmarkern und prometastatischen Genen in aufgereinigten HSC Fraktionen aus Mäusen mit hohen TIMP-1 Spiegel. DBA/2 bzw. C57BL/6 Mäuse (n = 6) wurde mit AdTIMP-1 bzw. Leervirus (AdCtrl) transduziert. Drei Tage später wurden HSC Fraktionen aufgereinigt und einer qRT-PCR-basierten Genexpressionsanalyse unterzogen. Quantifizierung von Aktivierungsmarkern und prometastatischen Genen mittels TaqMan *Low Density Arrays* (LDA). Alle gemessenen Werte wurden auf 18S RNA normiert und sind als Vielfaches der Expression in AdCtrl-transduzierten Mäusen dargestellt. Farbkodierung: hellgrün, <0,7-fach; dunkelgrün, <1,0-fach; schwarz, >1,0- bis <1,4-fach; dunkelrot, >1,4; hellrot, >5.

In Mehrfachbestimmungen mit *single target Gene Expression Assays* wurde nach prometastatische Genen gesucht, welche sowohl *in vivo* in der Maus als auch *in vitro* in humanen Zellen durch TIMP-1 induziert waren. Unter Berücksichtigung dieser Vorgaben wurden die Faktoren TGF β , VEGF-A, EGF, PDGF, S100A4 und LOX identifiziert. Die Untersuchung dieser Gene zeigte eine signifikante TIMP-1-induzierte Steigerung der Expression in HSC Fraktionen aus der Maus (**Abb.3.23, A**) sowie in kultivierten humanen HSCs (**Abb.3.23, B**). Somit induzierte TIMP-1 die Expression von Nischenfaktoren und prometastatischen Genen in HSCs *in vitro* und *in vivo*.

3. Ergebnisse

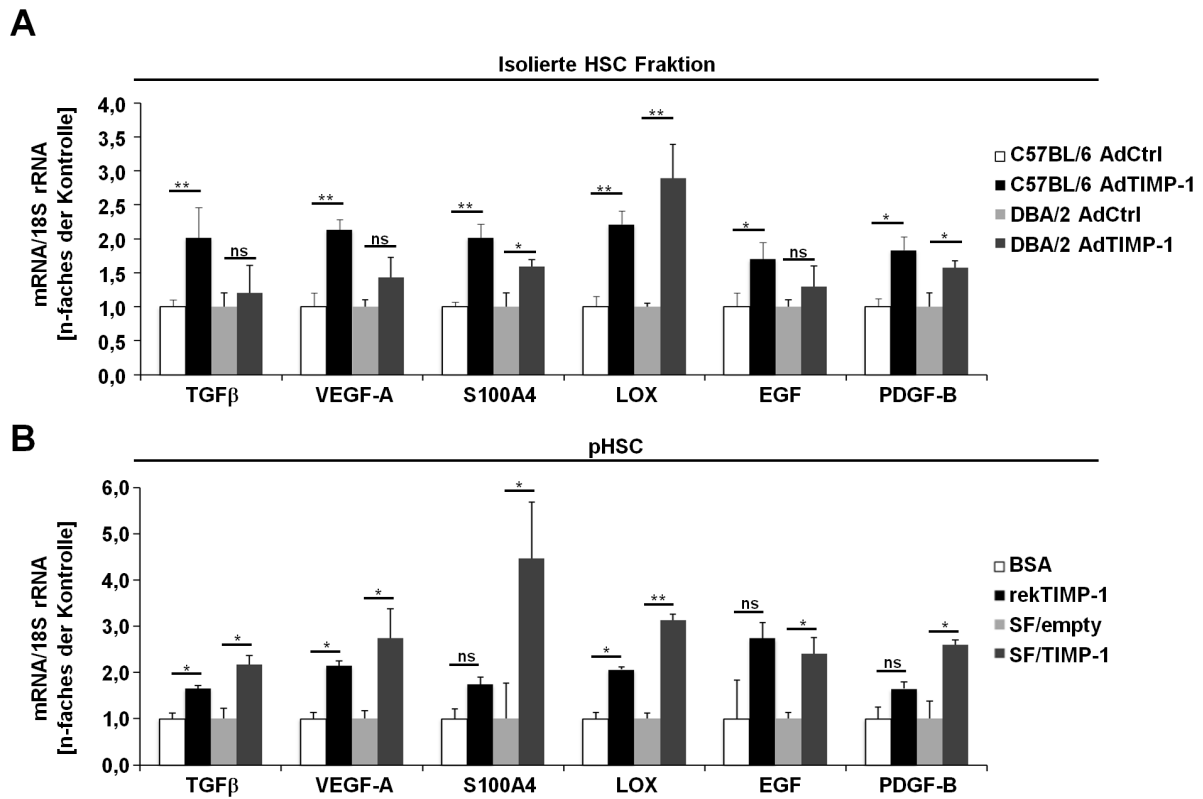


Abbildung 3.23. – Identifizierung TIMP-1-induzierter prometastatischer Gene in murinen sowie humanen HSCs. HSCs wurden auf verschiedene Arten erhöhten TIMP-1 Mengen ausgesetzt und anschließend die Expression pro-metastatischer Gene untersucht. **(A)** DBA/2 bzw. C57BL/6 Mäuse ($n = 6$) wurde mit AdTIMP-1 bzw. Leervirus (AdCtrl) transduziert; nach drei Tagen wurden HSC Fraktionen aufgereinigt und auf die endogene, murine TIMP-1 mRNA untersucht. **(B)** LX2 Zellen nach Inkubation mit rekTIMP-1 (BSA als Kontrolle) bzw. mit Überexpression von TIMP-1 (*SF/TIMP-1* bzw. Leervektorkontrolle *SF/empty*). **(A-B)** Quantifizierung von TGFβ, VEGF-A, EGF, PDGF, S100A4 und LOX mRNA mittels qRT-PCR, abgebildet sind Mittelwerte + Standardfehler. ns, nicht signifikant; *, $p < 0,5$; **, $p < 0,1$; Student's t -Test.

3. Ergebnisse

Um die Abhängigkeit der endogenen Expression dieser prometastatischen Gene und Nischenfaktoren von der endogenen TIMP-1-Expression der HSCs zu testen, wurden HSCs mit TIMP-1 *knock-down* (**Abb.3.17**) untersucht. Es zeigte sich, dass die Expression der prometastatischen Faktoren TGF β , VEGF-A, EGF, PDGF, S100A4 und LOX durch den *knock-down* von TIMP-1 in HSCs signifikant reduziert wurde (**Abb.3.24**). Die endogene Expression prometastatischer Nischenfaktoren in HSCs war demnach abhängig von TIMP-1.

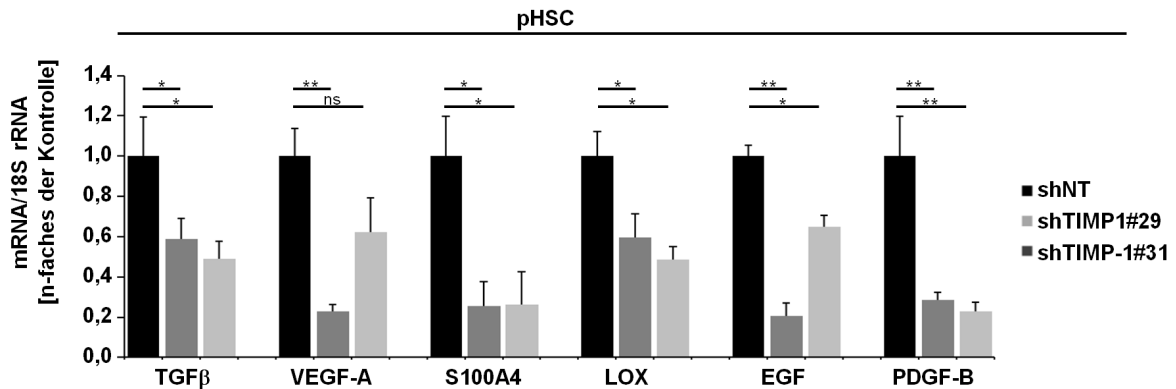


Abbildung 3.24. – Reduzierte Expression prometastatischer Gene in humanen HSCs mit TIMP-1 *knock-down*. pHSCs wurden lentiviral mit zwei TIMP-1 *knock-down* Konstrukten (*shTIMP-1#29*, *shTIMP-1#31*) bzw. einem Konstrukt zur Expression unspezifischer shRNA (*shNT*) transduziert. Anschließend wurde die Expression verschiedener prometastatischer Gene quantifiziert. Analyse der mRNA Mengen von TGF β , VEGF-A, EGF, PDGF, S100A4 und LOX mittels qRT-PCR. Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler. ns, nicht signifikant; *, $p < 0,5$; **, $p < 0,1$; Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA).

3.6.2. Effekte von TIMP-1 auf die Motilität humaner HSCs

Die funktionellen Eigenschaften aktivierter HSCs, neben der Produktion bioaktiver Moleküle, schließen auch eine gesteigerte Proliferation sowie eine erhöhte Motilität mit ein [Friedman, 2008]. Eine detailliertere Charakterisierung des TIMP-1-induzierten Phänotyps von HSCs wurde daher mittels funktioneller *in vitro* Assays zur Untersuchung dieser Parameter durchgeführt. Zunächst wurde getestet, ob der TIMP-1-aktivierte Phänotyp von HSCs (**Abb.3.21**) Veränderungen in der Motilität aufweist. Zu diesem Zweck wurde die Migration von LX2 Zellen in einem FCS-Gradienten mittels *TransWell* Assays analysiert. Diese Analyse zeigte, dass hohe TIMP-1 Expression zu einer gesteigerten Motilität von HSCs führte (**Abb.3.25, A**). Der deaktivierte HSC Phänotyp nach *knock-down* von TIMP-1 (**Abb.3.17**) wies hingegen eine reduzierte Motilität auf (**Abb.3.25, B**).

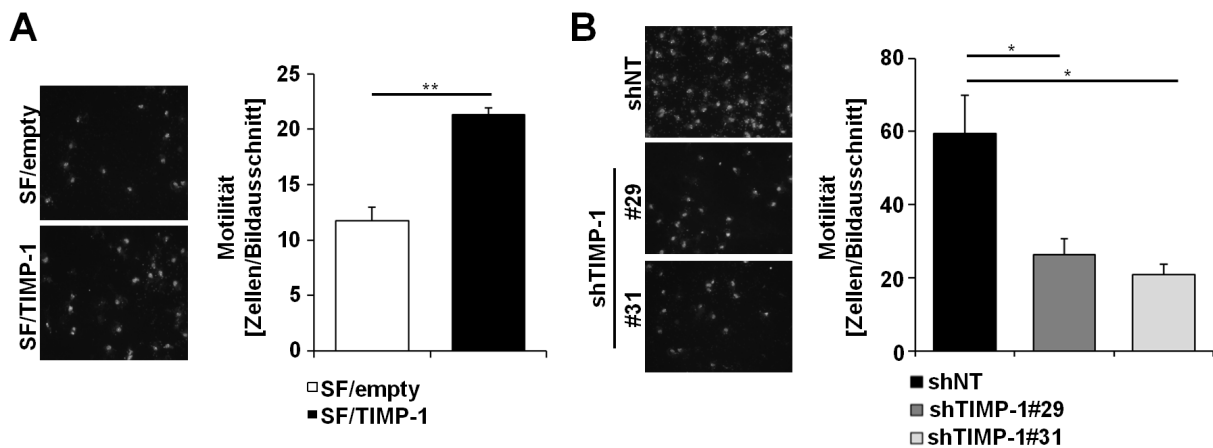


Abbildung 3.25. – Beeinflussung der Motilität humaner HSCs durch Manipulation der TIMP-1 Expressionslevel. LX2 Zellen mit veränderter endogener TIMP-1 Expression wurden auf Veränderungen ihrer Motilität untersucht. **(A)** LX2 Zellen mit TIMP-1 Überexpression (*SF/TIMP-1*) bzw. Leervektorkontrollzellen (*SF/empty*).**, $p < 0,1$; Student's t -Test **(B)** LX2 Zellen mit TIMP-1 *knock-down* (*shTIMP-1#29*, *shTIMP-1#31*) bzw. Expression unspezifischer shRNA (*shNT*). **(A,B)** Untersuchung der *TransWell*-Migration. Repräsentative Bilder von Zellen an der Membranunterseite (*links*); Balkendiagramme (*rechts*): Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler. *, $p < 0,5$; Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA).

3. Ergebnisse

Wie zuvor für die Expression von Aktivierungsmarkern gezeigt (**Abb.3.19**), sollte auch die Abhängigkeit der HSC Motilität von den autokrin verfügbaren TIMP-1 Mengen getestet werden. Die TIMP-1 Spiegel im Zellkulturmedium von TIMP-1 *knock-down* Zellen wurden hierfür zunächst durch Zugabe von rekTIMP-1 aufgefüllt. Die anschließend durchgeführten Untersuchung der Zellen in *TransWell Assays* zeigte, dass rekTIMP-1 die verringerte Motilität der *knock-down* Zellen wieder an die der shNT Kontrollen angleichen konnte (**Abb.3.26**).

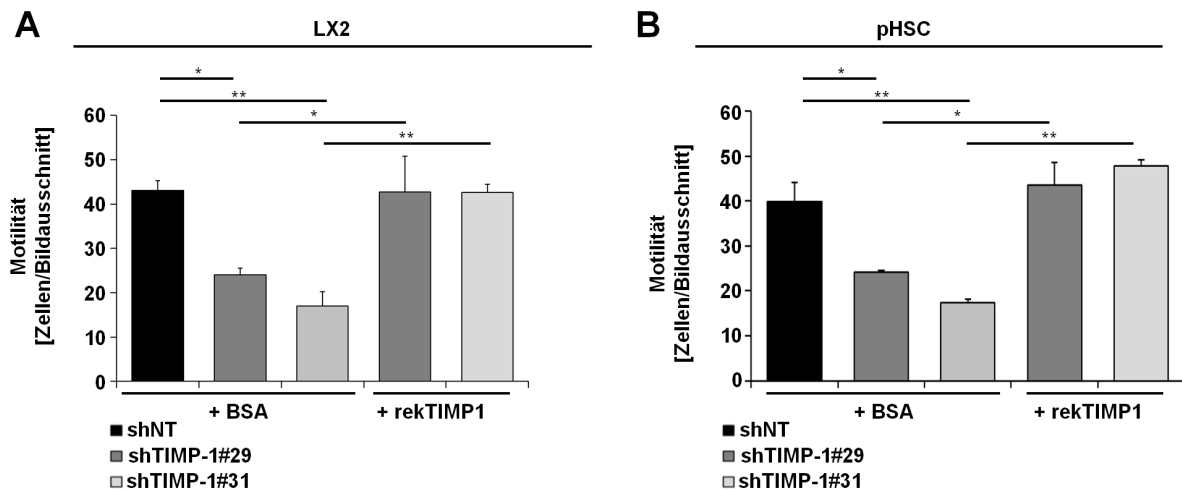


Abbildung 3.26. – Wiederherstellung der Motilität in HSCs mit TIMP-1 *knock-down* durch rekTIMP-1. HSCs mit *knock-down* von TIMP-1 (*shTIMP-1#29*, *shTIMP-1#31*) bzw. *shNT* Kontrollzellen wurden mit und ohne Zugabe von *rekTIMP-1* bzw. *BSA* (als Kontrolle) auf die Motilität hin untersucht. **(A)** LX2 Zellen. **(B)** pHSCs. Untersuchung der *TransWell*-Migration. Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler. *, $p < 0,5$; **, $p < 0,1$; Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA).

3.6.3. Unabhängigkeit der Proliferation humaner HSCs von TIMP-1

Die Aktivierung von HSCs kann zu einer verstärkten Proliferation dieser Zellen führen [Friedman, 2008]. Daher wurden die Auswirkungen von TIMP-1 auf das Wachstum von HSCs untersucht. In AlamarBlue Assays zeigten sich keine Auswirkungen veränderter TIMP-1 Expression in LX2 Zellen auf deren Wachstum relativ zur Kontrolle, weder für die Überexpression von TIMP-1 (**Abb.3.27, A**) noch bei einem *knock-down* (**Abb.3.27, B**).

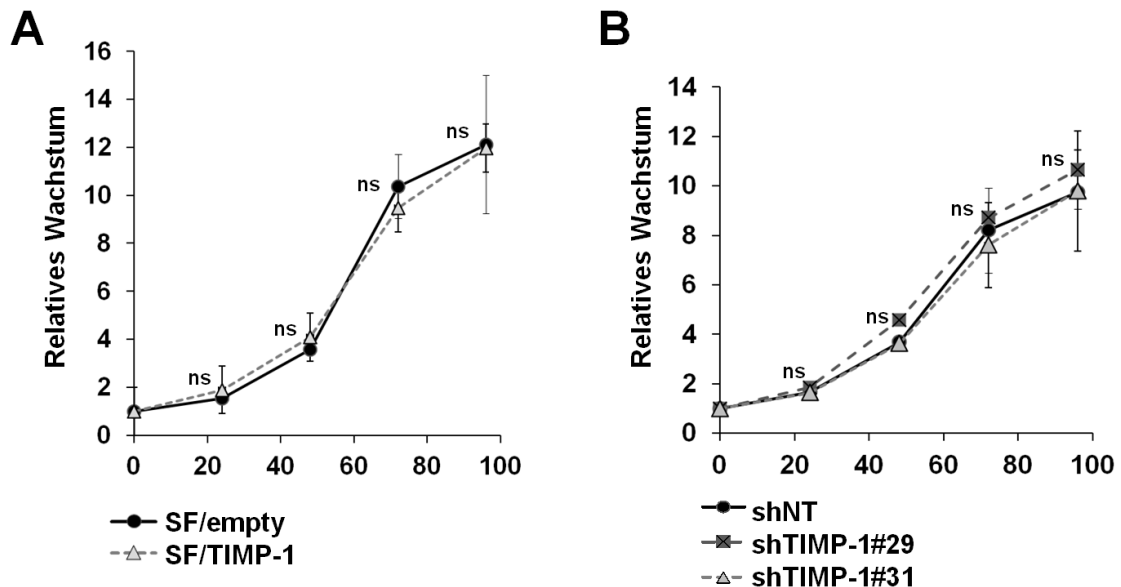


Abbildung 3.27. – Keine Beeinflussung der Proliferation humaner HSCs durch Manipulation der TIMP-1 Expressionslevel. LX2 Zellen mit veränderter endogener TIMP-1 Expression wurden auf Veränderungen im Zellwachstum untersucht. **(A)** LX2 Zellen mit TIMP-1 Überexpression (*SF/TIMP-1*) bzw. Leervektorkontrollzellen (*SF/empty*) *ns*, nicht signifikant; *Student's t*-Test. **(B)** LX2 Zellen mit TIMP-1 *knock-down* (*shTIMP-1#29*, *shTIMP-1#31*) bzw. Expression unspezifischer shRNA (*shNT*). *ns*, nicht signifikant; Ein-faktorielle Varianzanalyse (ANOVA). **(A,B)** Untersuchung des Wachstums mittels Alamar-Blue Assays. Die gemessenen Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle (A, *SF/empty*; B, *shNT*) normiert und sind als Relatives Wachstum dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte +/-Standardfehler.

3.7. Abhängigkeit der TIMP-1-induzierten HSC Aktivierung von der C-terminalen Domäne

3.7.1. Abhängigkeit der HSC-aktivierenden Effekte von TIMP-1 *in vitro* von der Anwesenheit der C-terminalen Domäne

Die bisherigen Analysen zeigten, dass TIMP-1 ein wichtiger autokriner Faktor in der Regulation der HSC Aktivierung war und zur Auslösung eines motilen, prometastatischen HSCs Phänotyps führte. Die nächsten Schritte wurden nun auf die Aufklärung des zugrunde liegenden molekularen Mechanismus fokussiert. Zur Klärung des Beitrags eines möglichen antiproteolytischen Mechanismus als Grundlage der TIMP-1-induzierten HSC Aktivierung wurden daher zunächst die Effekte von rekombinatem N-TIMP-1 (rekN-TIMP-1) auf HSCs *in vitro* im Vergleich zu rekTIMP-1- und unstimulierten Zellen untersucht.

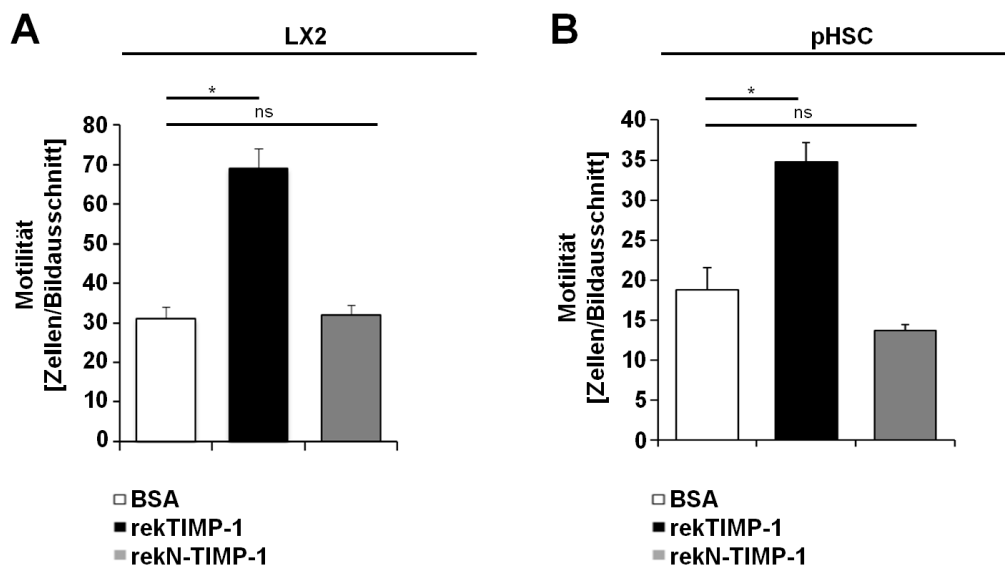


Abbildung 3.28. – Keine Beeinflussung der Motilität humaner HSCs durch Stimulation von rekN-TIMP-1. HSCs wurden für 24 h mit 500 ng/ml rekTIMP-1, rekN-TIMP-1 bzw. BSA (als Kontrolle) inkubiert und auf Veränderungen in der Motilität untersucht. **(A,B)** Untersuchung der *TransWell*-Migration von **(A)** LX2 Zellen und **(B)** pHSCs. Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler; ns, nicht signifikant; *, $p < 0,5$; **, $p < 0,1$; Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA).

Die Effekte auf die Motilität von HSCs wurden zuerst untersucht. Stimulation von HSCs mit rekTIMP-1 steigerte deren Motilität (**Abb.3.28, A und B**). Es zeigte sich jedoch kein

3. Ergebnisse

Einfluss von N-TIMP-1 auf die Zellmotilität, weder in LX2 Zellen (**Abb.3.28, A**), noch in pHSCs (**Abb.3.28, B**).

Anschließend wurde der Einfluss von rekN-TIMP-1 auf die Expression von HSC Aktivierungsmarkern untersucht. Während die Expression von HSC Aktivierungsmarkern durch rekTIMP-1 deutlich induziert wurde (**Abb.3.29, A und B**), war kein Einfluss von rekN-TIMP-1 auf die Expression der Aktivierungsmarker α SMA, Desmin, Col1a1 und Nestin zu beobachten, weder in LX2 Zellen (**Abb.3.29, A**) noch in pHSCs (**Abb.3.29, B**).

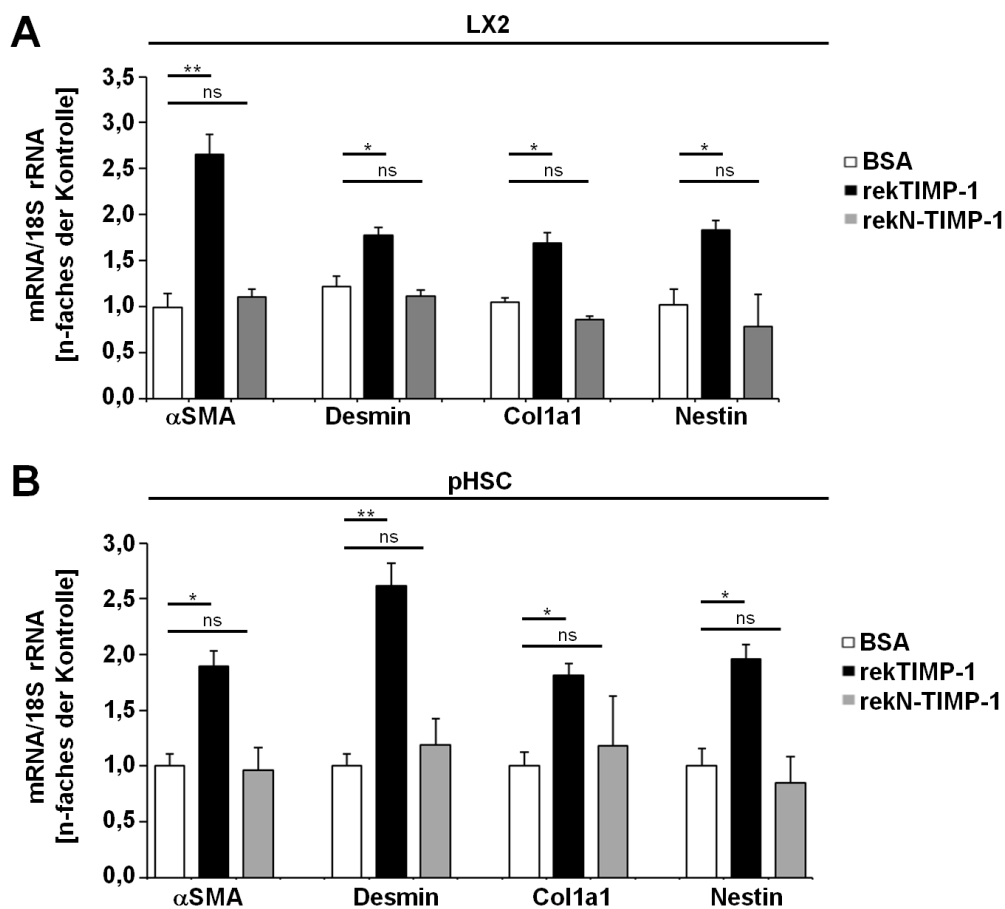


Abbildung 3.29. – Keine Beeinflussung der Aktivierung humaner HSCs durch Stimulation mit rekN-TIMP-1. HSCs wurden für 24 h mit 500 ng/ml rekTIMP-1, rekN-TIMP-1 bzw. BSA (als Kontrolle) inkubiert und auf Veränderungen in der Expression von Aktivierungsmarkern untersucht. **(A,B)** Untersuchung der *TransWell*-Migration. **(A,B)** Quantifizierung der mRNA Mengen von α SMA, Desmin, Col1a1 und Nestin in **(A)** LX2 Zellen und **(B)** pHSCs mittels qRT-PCR. Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler; ns, nicht signifikant; *, $p < 0,5$; **, $p < 0,1$; Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA).

3. Ergebnisse

Der Einfluss von rekN-TIMP-1 auf die Expression von Nischenfaktoren und prometastatischen Genen in HSCs wurde ebenfalls untersucht. Die durch rekTIMP-1 ausgelöste Induktion der prometastatischen Gene $TGF\beta$, VEGF-A, EGF, PDGF, S100A4 und LOX (**Abb.3.30**) war in rekN-TIMP-1-stimulierten pHSCs nicht zu beobachten (**Abb.3.30**).

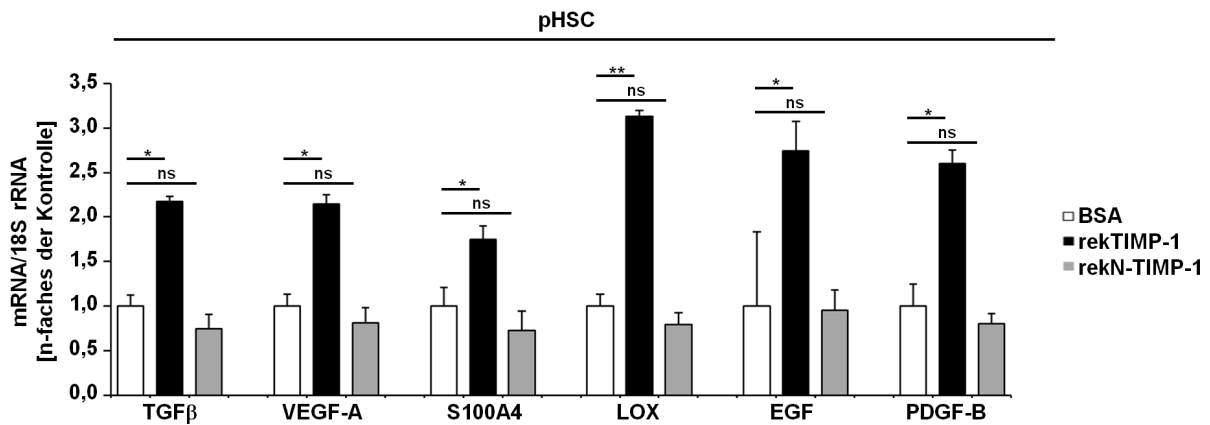


Abbildung 3.30. – Keine Beeinflussung der Expression prometastatischer Gene in humanen HSCs durch Stimulation mit rekN-TIMP-1. pHSCs wurden für 24 h mit 500 ng/ml rekTIMP-1, rekN-TIMP-1 bzw. BSA (als Kontrolle) inkubiert und auf Veränderungen in der Expression von prometastatischer Gene hin überprüft. Quantifizierung von $TGF\beta$, VEGF-A, EGF, PDGF, S100A4 und LOX mRNA mittels qRT-PCR, abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler. ns, nicht signifikant, *, $p < 0,5$; **, $p < 0,1$; Student's t -Test.

Zusammengefasst wurden keine Effekte von rekN-TIMP-1 auf Aktivierungsmerkmale von HSCs (Motilität, Expression von Aktivierungsmarkern und/oder prometastatischen Genen) *in vitro* beobachtet, weder in LX2 Zellen, noch in pHSCs. Die N-terminale Domäne von TIMP-1 war demnach nicht ausreichend, um die Effekte von TIMP-1 auf die Aktivierung von HSCs *in vitro* zu vermitteln, was auf eine Abhängigkeit von der C-terminalen Domäne hinwies.

3.7.2. Abhängigkeit der HSC-aktivierenden Effekte von TIMP-1 *in vivo* von der Anwesenheit der C-terminalen Domäne

Zur weiteren Aufklärung des molekularen Mechanismus der TIMP-1-induzierten HSC Aktivierung wurde nun überprüft, ob die TIMP-1-vermittelte HSC Aktivierung auch *in vivo* von der Anwesenheit der C-terminalen Domäne abhängig ist.

Die Spiegel von TIMP-1 sowie nun auch von N-TIMP-1 (AdN-TIMP-1) wurden durch adenoviralen Gentransfer in Mäusen erhöht. Drei Tage nach Transduktion wurden die Tiere geopfert und auf histologische Anzeichen von HSC Aktivierung hin untersucht. Wie zuvor war eine Induktion der α SMA sowie Desmin Expression in Mäusen mit hohen TIMP-1 Spiegeln zu beobachten (**Abb.3.31**). Die Überexpression der N-terminalen Domäne führte jedoch zu keinen Unterschieden in der Expression der HSC Aktivierungsmarker α SMA und Desmin in der Leber (**Abb.3.31**).

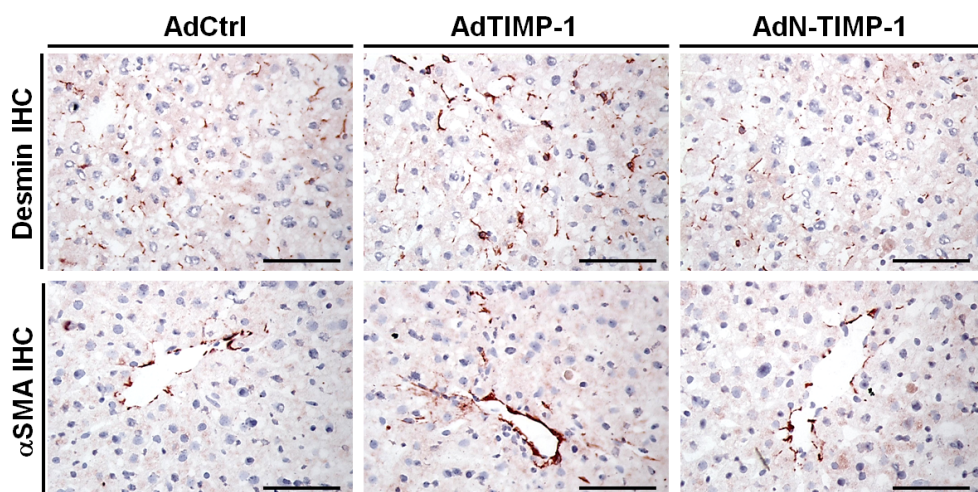


Abbildung 3.31. – Keine Beeinflussung der HSC Aktivierung in Mäusen mit hohen N-TIMP-1 Spiegel. C57BL/6 Mäuse (n = 5 pro Zeitpunkt) wurde mit AdTIMP-1, AdN-TIMP-1 bzw. Leervirus (AdCtrl) transduziert und drei Tage nach Virusinokulation auf Anzeichen für HSC Aktivierung hin untersucht. IHC Nachweis der Expression von Desmin (*oben*) bzw. α SMA (*unten*) in der Leber von AdTIMP-1, AdN-TIMP-1 bzw. AdCtrl-transduzierten Mäusen. Gezeigt sind repräsentative Bilder. *Balken*, 100 μ m.

Zur genaueren Überprüfung dieser Beobachtung wurden aus AdTIMP-1- und AdN-TIMP-1-transduzierten Mäusen HSC Fraktionen isoliert und mittels qRT-PCR auf die Expression von Aktivierungsmarkern hin untersucht. Es zeigten sich auch in diesem

3. Ergebnisse

Experiment eine signifikante Induktion der Aktivierungsmarker α SMA, Desmin, Col1a1 und Nestin in AdTIMP-1 Mäusen verglichen zu AdCtrl-transduzierten Tieren (**Abb.3.32**). Die Expression dieser HSC Aktivierungsmarker war bei HSC Fraktionen aus AdN-TIMP-1 Mäusen jedoch im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert (**Abb.3.32**).

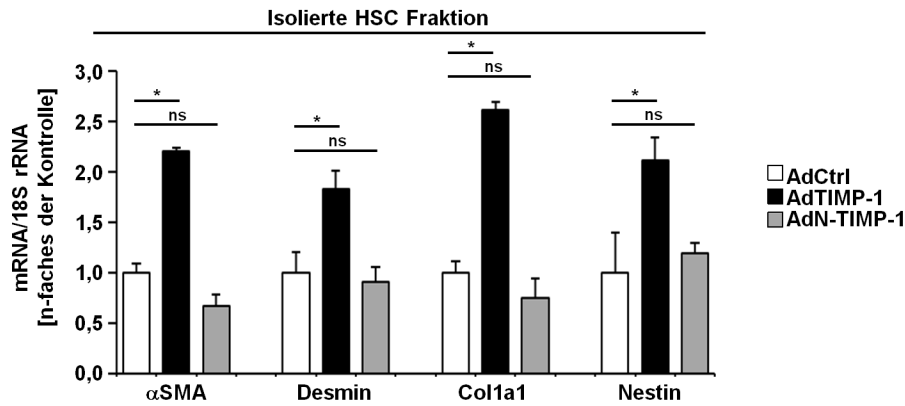


Abbildung 3.32. – Keine Beeinflussung der Expression von Aktivierungsmarkern in HSC Fraktionen aus Mäusen mit hohen N-TIMP-1 Spiegel. C57BL/6 Mäuse (n = 5) wurden mit AdTIMP-1, AdN-TIMP-1 bzw. Leervirus (AdCtrl) transduziert und drei Tage nach Virusinokulation auf Anzeichen für HSC Aktivierung hin untersucht. Expression von Aktivierungsmarkern in isolierten HSC Fraktionen. Analyse der mRNA Mengen von α SMA, Desmin, Col1a1 und Nestin mittels qRT-PCR. Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler. n.s.; nicht signifikant; *, p < 0,5; *Student's t* -Test.

Die isolierten HSC Fraktionen wurden ebenfalls auf Expression der zuvor identifizierten TIMP-1-induzierten prometastatischen Faktoren TGF β , VEGF-A, EGF, PDGF, S100A4 und LOX hin untersucht. Auch hier war eine Induktion der Expression in HSCs aus AdTIMP-1-transduzierten Mäusen zu beobachten (**Abb.3.33**). Die Expression dieser prometastatischen Gene war in HSCs aus AdN-TIMP-1-transduzierten Mäusen jedoch nicht verändert bzw. im Vergleich zu AdCtrl-transduzierten Tieren tendenziell rückläufig (**Abb.3.33**).

3. Ergebnisse

Die N-terminale Domäne von TIMP-1 allein konnte demnach keinen der bisher identifizierten Effekte von TIMP-1 auf HSCs (Induktion von Aktivierungsmarkern, prometastatischer Genexpression sowie erhöhte Motilität) auslösen, weder *in vitro* noch *in vivo*. Dies legte nahe, dass der molekulare Mechanismus der TIMP-1-induzierten HSC Aktivierung von der Anwesenheit der C-terminalen Domäne abhängig ist.

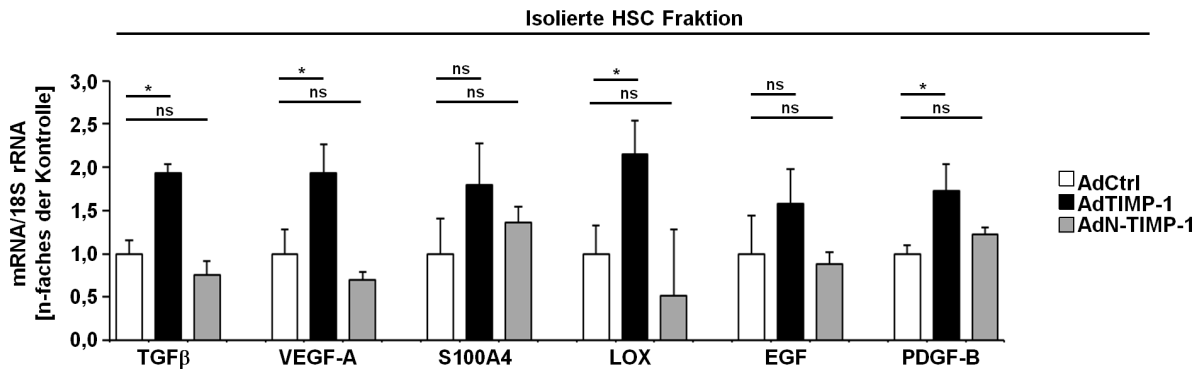


Abbildung 3.33. – Unveränderte Expression prometastatischer Gene in aufgereinigten HSC Fraktionen aus Mäusen mit hohen TIMP-1 Spiegel. C57BL/6 Mäuse (n = 5 pro Zeitpunkt) wurde mit AdTIMP-1, AdN-TIMP-1 bzw. Leervirus (AdCtrl) transduziert, drei Tage nach Virusinokulation wurden HSC Fraktionen aufgereinigt und die Expression prometastatischer Gene untersucht. Quantifizierung von TGFβ, VEGF-A, EGF, PDGF, S100A4 und LOX mRNA mittels qRT-PCR. Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler. n.s.; nicht signifikant; *, p < 0,5; Student's t -Test.

3.8. Einfluss des PI3K Signalweges in TIMP-1-aktivierten HSCs

3.8.1. Induktion des PI3K Signalweges in HSCs durch TIMP-1

Die C-terminalen Domäne ist wichtig für die direkte Signalfunktion von TIMP-1, d. h. die Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch Interaktion mit einem Membranrezeptor [Chirco *et al.*, 2006]. TIMP-1 kann über die Interaktion der C-terminalen Domäne mit CD63 u.a. den PI3K Signalweg aktivieren [Cui *et al.*, 2014]. Bisher bekannte Mechanismen zur Aktivierung von HSCs laufen ebenfalls über intrazelluläre Signalwege ab, beispielsweise führt die PDGF-B/PDGFR-Interaktion zur Aktivierung des PI3K- und des ERK-Signalwegs [Friedman, 2008]. So wurde im Folgenden untersucht, ob es unter Einfluss von TIMP-1 zur Induktion HSC-aktivierender Signaltransduktionswege kommt.

Zunächst wurde der PI3K Signalweg in LX2 Zellen nach Stimulation mit rekTIMP-1 per Immunoblotting untersucht. Die Aktivität der PI3K wird über Heterodimere aus den katalytischen Untereinheiten $p110\alpha$, $p110\beta$ bzw. $p110\gamma$ mit der regulatorischen $p85$ Untereinheit bestimmt, wobei die Aktivität von $p85$ durch Phosphorylierung am Threonin in Position 458 (T458) reguliert ist [Sotsios und Ward, 2000]. LX2 Zellen zeigten nach Zugabe von rekTIMP-1 erhöhte Mengen von $p110\alpha$, $p110\beta$ und $p110\gamma$ sowie von T458-phosphoryliertem $p85$ (P- $p85$) (**Abb.3.34, A**). Der PI3K Signalweg wurde demnach durch TIMP-1 in LX2 Zellen aktiviert. Um zu testen, wie sich erhöhten Mengen an endogenem TIMP-1 auf die Aktivierung von PI3K auswirken wurden LX2 Zellen mit TIMP-1-Überexpression (SF/TIMP-1) derselben Analyse unterzogen. Diese Analysen zeigten ebenfalls einen TIMP-1-induzierten Anstieg der $p110\alpha$, $p110\beta$ und $p110\gamma$ Mengen sowie von P- $p85$ (**Abb.3.34, B**). Verglichen zu den Effekten durch exogenes TIMP-1 war eine stärkere PI3K-Aktivierung durch hohe endogene TIMP-1 Level zu beobachten.

Die Effekte hoher endogener TIMP-1 Spiegel in LX2 Zellen auf die Aktivierung von ERK1/2 per (Phospho-)Immunoblotting wurden ebenfalls untersucht. ERK1/2 sind Teil des MAPK-Signalwegs und werden durch Phosphorylierung am Threonin in Position 202 und Tyrosin in Position 204 (T202/Y204) im Falle von ERK1 bzw. in den Positionen 185 und 187 (T185/Y187) im Falle von ERK2 aktiviert [Meloche und Pouyssegur, 2007]. Diese Analyse zeigte, dass keine Aktivierung von ERK1/2 in LX2 Zellen durch hohe endogene TIMP-1 Spiegel stattfindet (**Abb.3.34, C**).

3. Ergebnisse

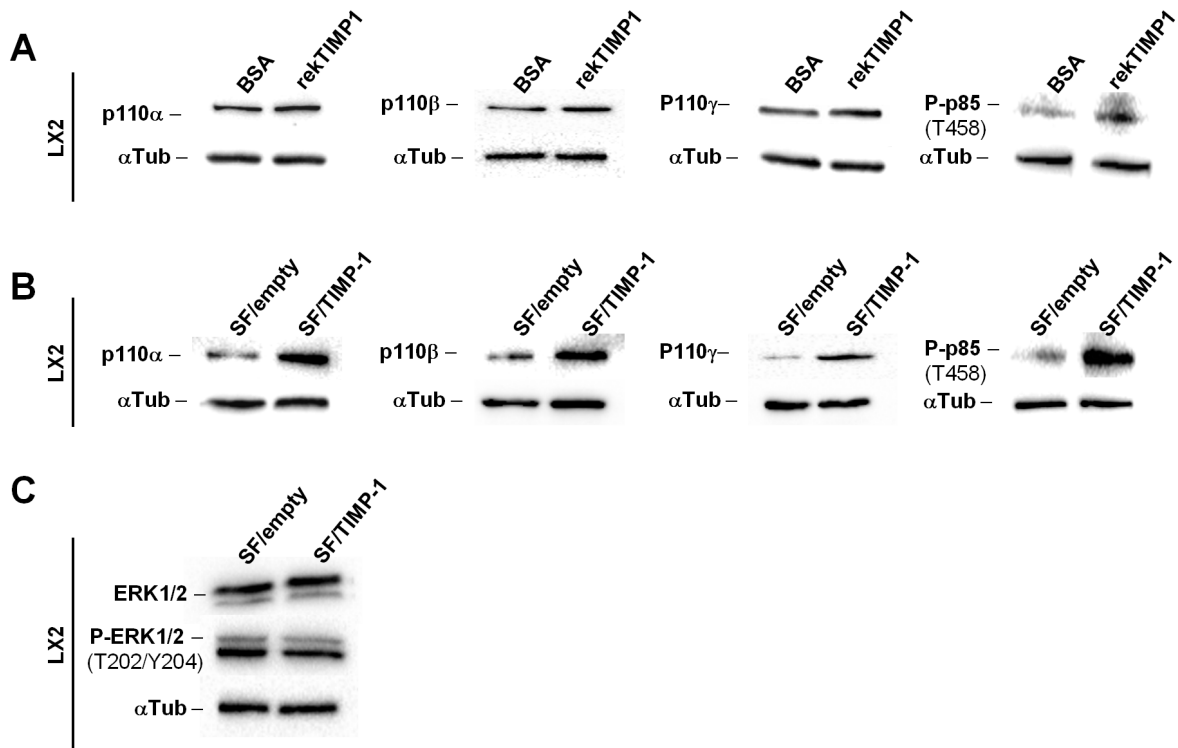


Abbildung 3.34. – Induktion des PI3K Signalweges in LX2 Zellen durch TIMP-1. LX2 Zellen wurden erhöhten TIMP-1 Mengen ausgesetzt und anschließend auf die Aktivierung intrazellulärer Signalwege hin untersucht. **(A)** LX2 Zellen nach Inkubation mit 500 ng/ml rekTIMP-1 bzw. BSA (als Kontrolle). **(B,C)** LX2 Zellen mit Überexpression von TIMP-1 (*SF/TIMP-1*) bzw. Leervektorkontrolle (*SF/empty*). **(A,B)** (Phospho-)Immunoblotting Analyse des PI3K Signalweges anhand von p110 α , p110 β und p110 γ sowie phosphoryliertem p85 (P-p85). **(C)** (Phospho-)Immunoblotting Analyse von ERK1/2. **(A-C)** Gezeigt sind repräsentative *Western Blots*. α Tub, α Tubulin (Ladkontrolle).

3. Ergebnisse

Um zelllinienspezifische Effekte auszuschließen, wurde die Aktivierung des PI3K Signalweges unter Einfluss von TIMP-1 in pHSCs überprüft. Es zeigte sich ein sehr ähnliches Bild: In pHSCs waren nach Zugabe von rekTIMP-1 die Mengen von p110 α , p110 β und p110 γ sowie von T458-phosphoryliertem p85 (P-p85) erhöht (**Abb.3.35, A**). Ebenfalls bestätigte sich, dass eine Überexpression von TIMP-1 eine Aktivierung von PI3K auslöste, denn auch pHSC SF/TIMP-1 Zellen wiesen einen Anstieg der p110 α , p110 β und p110 γ Mengen sowie von P-p85 Mengen auf (**Abb.3.35, B**).

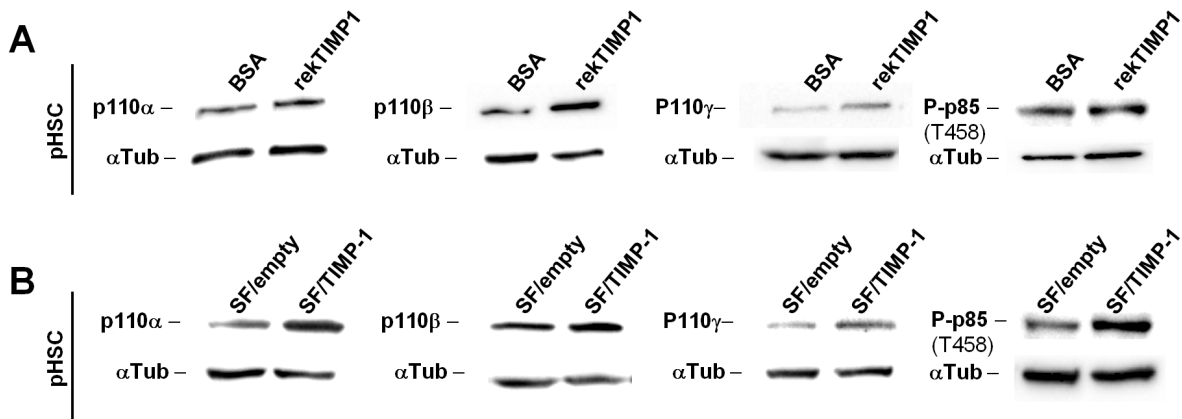


Abbildung 3.35. – Induktion des PI3K Signalweges in pHSCs durch TIMP-1. pHSCs wurden erhöhten TIMP-1 Mengen ausgesetzt und anschließend auf die Aktivierung des PI3K Signalwege hin untersucht. **(A)** pHSCs nach Inkubation mit 500 ng/ml rekTIMP-1 bzw. BSA (als Kontrolle). **(B,C)** pHSCs mit Überexpression von TIMP-1 (*SF/TIMP-1*) bzw. Leervektorkontrolle (*SF/empty*). **(A,B)** (Phospho-)Immunoblotting Analyse von p110 α , p110 β und p110 γ sowie phosphoryliertem p85 (P-p85). Gezeigt sind repräsentative *Western Blots*. α Tub, α Tubulin (Ladekontrolle).

3.8.2. PI3K Aktivierung in HSCs *in vivo* durch C-TIMP-1.

Um die Rolle von PI3K in der TIMP-1-induzierten HSC Aktivierung besser einschätzen zu können, wurde getestet, (i) ob die Induktion des Signalweges durch TIMP-1 auch *in vivo* auftritt und (ii) ob die Aktivierung des PI3K Signalweges von der Anwesenheit der C-terminalen Domäne von TIMP-1 abhängig ist. Hierzu wurde Zelllysat von HSC Fraktionen aus AdTIMP-1 und AdN-TIMP-1 Mäusen per (Phospho)- Immunoblotting untersucht. HSC Fraktionen aus AdTIMP-1 Mäusen wiesen höhere Mengen an p110 α , p110 β und p110 γ sowie P-p85 auf als solche aus AdCtrl-transduzierten Tieren (**Abb.3.36**). Die Mengen an p110 α , p110 β und p110 γ und P-p85 in HSCs Lysaten aus AdN-TIMP-1 Mäusen waren unverändert verglichen zur Kontrolle (**Abb.3.36**) und dementsprechend deutlich geringer als in HSCs aus AdTIMP-1 Mäusen (**Abb.3.36**). Dies zeigt, dass die TIMP-1-vermittelte Aktivierung von PI3K in HSCs *in vivo* abhängig von der C-terminalen Domäne ist .

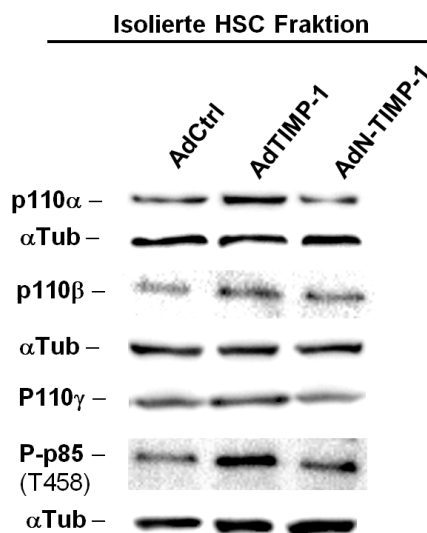


Abbildung 3.36. – Abhängigkeit der TIMP-1-vermittelten PI3K Aktivierung in HSCs *in vivo* von der C-terminalen Domäne. C57BL/6 Mäuse (n = 5 pro Zeitpunkt) wurden mit AdTIMP-1, AdN-TIMP-1 bzw. Leervirus (AdCtrl) transduziert. Drei Tage nach Virusinokulation wurden HSC Fraktionen isoliert und auf Aktivierung des PI3K Signalwege untersucht. (Phospho-)Immunoblotting Analyse von p110 α , p110 β und p110 γ sowie phosphoryliertem p85 (P-p85). Gezeigt sind repräsentative *Western Blots*. α *Tub*, α Tubulin (Ladekontrolle).

3.8.3. Bedeutung des PI3K Signalweges in der TIMP-1-induzierten HSC-Aktivierung *in vitro*

TIMP-1 induzierte über die C-terminale Domäne den PI3K Signalweg in HSCs (**Abb.3.36**). PI3K ist ein zentrales Regelglied in der Etablierung eines aktivierten HSCs Phänotyps [Friedman, 2008] und könnte somit eine funktionelle Rolle in der TIMP-1-induzierten HSC Aktivierung einnehmen. Um dies genauer zu untersuchen, wurde getestet, ob die Inhibition von PI3K den TIMP-1-induzierten HSCs Phänotyp *in vitro* blockieren kann. Zur Inhibition von PI3K stehen verschiedene synthetische Inhibitoren zur Verfügung, u.a. Wortmannin und LY294002 [Masamune *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2004].

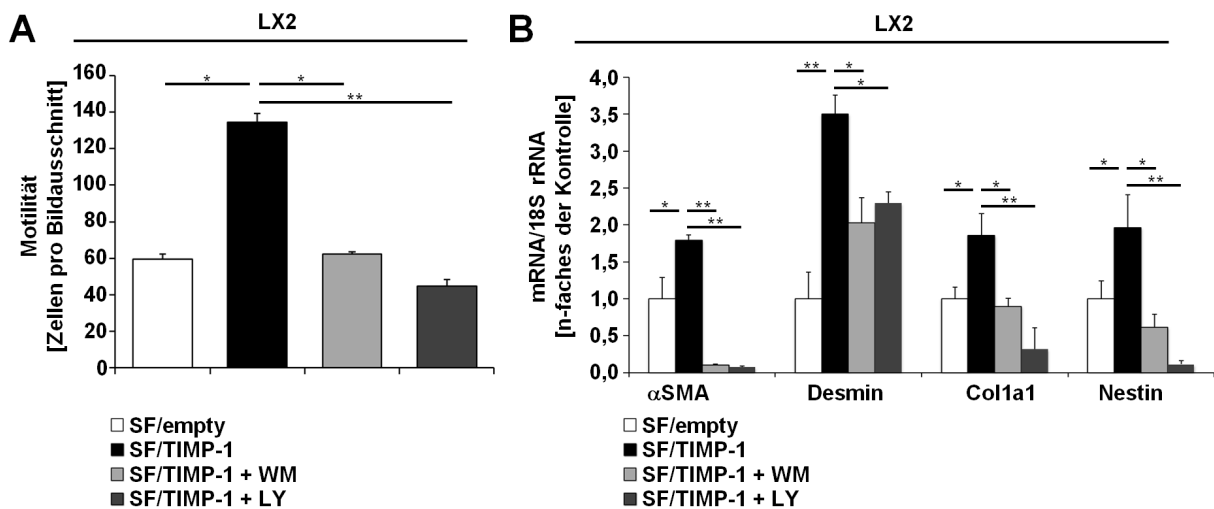


Abbildung 3.37. – Keine Induktion von Aktivierung und Motilität humaner HSCs durch TIMP-1 in Anwesenheit synthetischer PI3K Inhibitoren. LX2 Zellen mit Überexpression von TIMP-1 (*SF/TIMP-1*) bzw. die zugehörige Leervektorkontrolle (*SF/empty*) wurden mit PI3K Inhibitoren behandelt. Anschließend wurden die Zellen auf Veränderungen in der Motilität und der Expression von Aktivierungsmarkern hin untersucht. **(A)** Untersuchung der *TransWell*-Migration nach Zugabe von 100 nM Wortmannin bzw. 10 μ M LY294002. **(B)** Quantifizierung der mRNA Mengen von α SMA, Desmin, Col1a1 und Nestin mittels qRT-PCR. 100 nM Wortmannin bzw. 10 μ M LY294002 wurden 24 h vor der Analyse dem Medium zugefügt. **(A,B)** Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler; WM; Wortmannin; LY, LY294002; *, $p < 0,5$; **, $p < 0,1$; *Student's t*-Test.

LX2 Zellen mit TIMP-1-Überexpression bzw. Kontrollzellen wurden mit den PI3K Inhibitoren Wortmannin oder LY294002 bzw. DMSO (Vehikelkontrolle) inkubiert und anschließend auf Veränderungen des TIMP-1-induzierten Phänotyps untersucht. Es zeigte sich mit beiden PI3K Inhibitoren eine Blockierung der TIMP-1-induzierten Migration von LX2 Zellen (**Abb.3.37, A**). Die parallele Analyse der Expression von Aktivierungsmarkern

3. Ergebnisse

in gleich behandelten Zellen zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion des TIMP-1-induzierten Anstiegs der Expression von α SMA, Desmin, Col1a1 und Nestin durch Zugabe von Wortmannin sowie von LY294002 (**Abb.3.37, B**). Die TIMP-1-induzierte Expression der prometastatischen Gene TGF β , VEGF-A, EGF, PDGF, S100A4 und LOX in LX2 SF/TIMP-1 Zellen wurde durch Zugabe von Wortmannin sowie LY294002 ebenfalls signifikant reduziert (**Abb.3.38**).

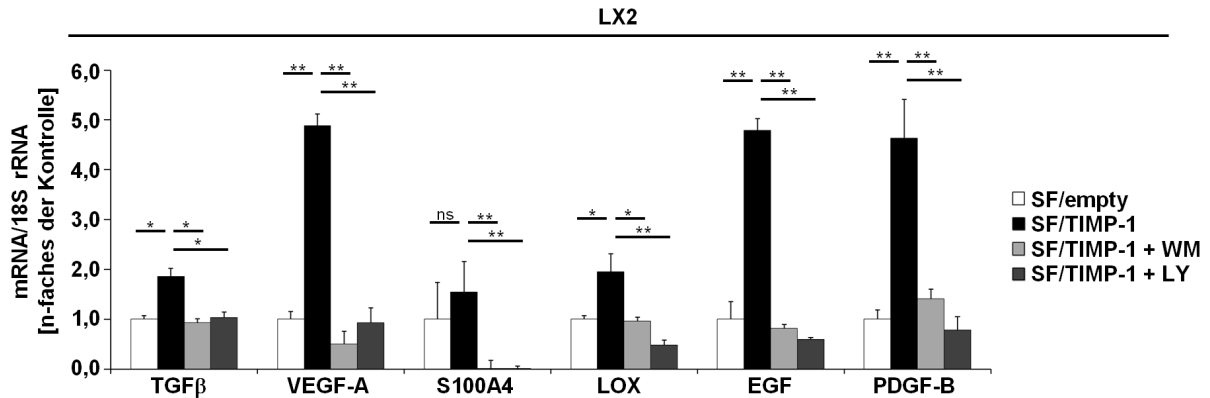


Abbildung 3.38. – Keine Induktion prometastatischer Gene in humanen HSCs durch TIMP-1 in Anwesenheit synthetischer PI3K Inhibitoren. LX2 Zellen mit Überexpression von TIMP-1 (*SF/TIMP-1*) bzw. die zugehörige Leervektorkontrolle (*SF/empty*) wurden mit PI3K Inhibitoren behandelt. Anschließend wurde die Expression prometastatischer Gene quantifiziert. Untersuchung der mRNA Mengen von TGF β , VEGF-A, EGF, PDGF, S100A4 und LOX mittels qRT-PCR. 100 nM Wortmannin bzw. 10 μ M LY294002 wurden 24 h vor der Analyse dem Medium zugefügt. (**A,B**) Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler; WM; Wortmannin; LY, LY294002; ns, nicht signifikant; *, $p < 0,5$; **, $p < 0,1$; *Student's t* -Test.

3.8.4. Bedeutung des PI3K Signalweges in der TIMP-1-induzierten HSC-Aktivierung *in vivo*

Zur eingehenderen Untersuchung der Rolle von PI3K in der TIMP-1-induzierten Aktivierung von HSCs sollten die *in vitro* beobachteten Effekte *in vivo* überprüft werden. AdTIMP-1 bzw. AdCtrl-transduzierte Mäuse wurden daher über drei Tage mit DMSO (Vehikelkontrolle) bzw. Wortmannin behandelt, anschließend geopfert und auf histologische Anzeichen für HSC Aktivierung hin untersucht. Es zeigte sich, dass die gesteigerte Expression von α SMA sowie von Desmin in AdTIMP-1- verglichen zu AdCtrl-transduzierten Tieren durch Behandlung mit Wortmannin unterdrückt wurde (**Abb.3.39**).

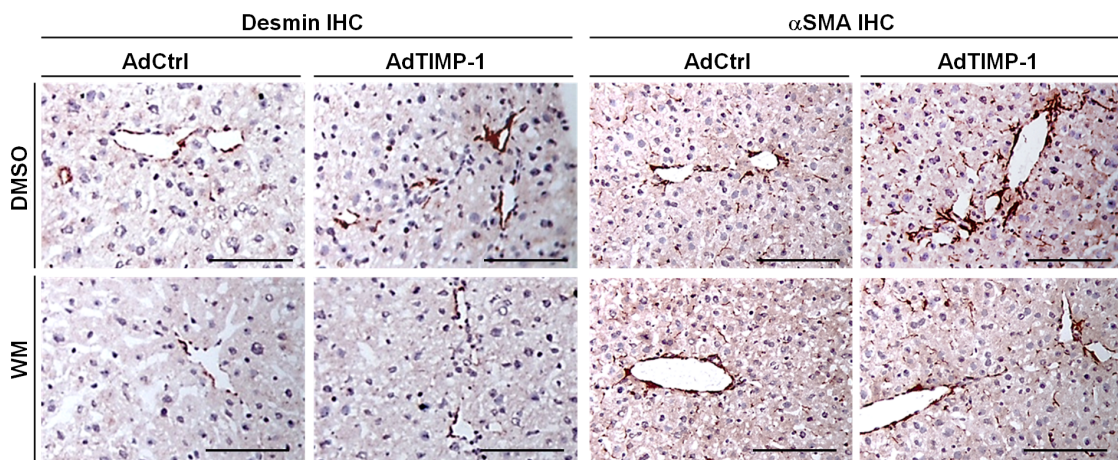


Abbildung 3.39. – Reduzierte HSC Aktivierung in wortmanninbehandelten Mäusen mit hohen TIMP-1 Spiegeln. AdTIMP-1- bzw. Leervirus(AdCtrl)-transduzierte C57BL/6 Mäuse (n = 5) wurden mit PI3K Inhibitor behandelt und drei Tage nach Virusinokulation auf Veränderungen in der HSC Aktivierung hin untersucht. Behandlung mit 1 mg/kg/Tag Wortmannin in 2,5 %DMSO/PBS bzw. Vehikelkontrolle (2,5 %DMSO/PBS) begann 24 h vor Virusinokulation. IHC Nachweis der Expression von Desmin (*links*) bzw. α SMA (*rechts*) in der Leber. Gezeigt sind repräsentative Bilder. WM, Wortmannin; DMSO, Vehikelkontrolle; Balken, 100 μ m.

3.8.5. Reduktion des TIMP-1-induzierten Anhaftens von Pankreaskarzinomzellen in der Leber durch Inhibition von PI3K

Zur Untersuchung der Effekte von PI3K in der Ausbildung einer suszeptiblen, prometastatischen Leberumgebung wurde der Einfluss der wortmanninvermittelten Inhibition der TIMP-1-induzierten HSC Aktivierung auf die Suszeptibilität der Leber in einem experimentellen Metastasierungsassay untersucht.

Es zeigte sich, dass die Metastasierung in Wortmannin-behandelten Mäusen mit hohen TIMP-1 Spiegel signifikant um etwa 70 % reduziert war. (**Abb.3.40**)

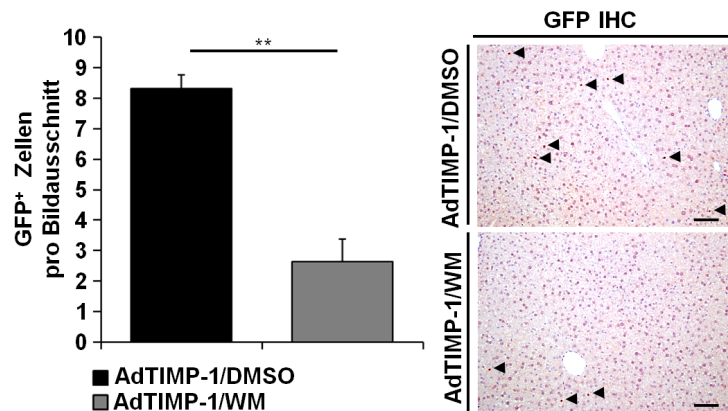


Abbildung 3.40. – Reduzierte Metastasierung in wortmanninbehandelten AdTIMP-1 Mäusen. AdTIMP-1-transduzierte C57BL/6 Mäuse (n = 5) wurden mit PI3K Inhibitor behandelt und drei Tage nach Virusinokulation auf Veränderungen in der Suszeptibilität der Leber gegenüber Pankreaskarzinomzellen untersucht. Behandlung mit 1 mg/kg/Tag Wortmannin in 2.5 %DMSO/PBS bzw. Vehikelkontrolle (2.5 %DMSO/PBS) von 24 h vor Virusinokulation bis 24 h vor i.v. Inokulation von 1×10^6 9801-eGFP Zellen. (*links*): IHC-basierte Quantifizierung extravadiierter 9801-eGFP Zellen in der Leber. Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler; *WM*; Wortmannin; *DMSO*, Vehikelkontrolle; **, $p < 0,1$. *rechts*: Gezeigt sind repräsentative Bilder. *WM*, Wortmannin; *DMSO*, Vehikelkontrolle; *Balken*, 100 μm .

3.9. CD63-Abhängigkeit der HSC-aktivierenden Effekte von TIMP-1

3.9.1. CD63-Abhängigkeit der HSC-aktivierenden Effekte von TIMP-1 *in vitro*

Bisher war nicht geklärt, wie die Effekte der C-terminalen Domäne von TIMP-1 auf den intrazellulären PI3K Signalweg übertragen werden. Das Tetraspanin CD63 ist ein C-terminaler Interaktionspartner von TIMP-1, der eine TIMP-1-induzierte Aktivierung intrazellulärer Signalwege auslösen kann [Jung *et al.*, 2006], darunter auch PI3K [Chirico *et al.*, 2006]. Nun wurde untersucht, ob die TIMP-1-induzierte Aktivierung von HSCs abhängig von CD63 ist.

Zunächst wurde ein *knock-down* von CD63 in LX2 Zellen sowie pHSCs etabliert. Beide verwendeten shRNA Konstrukte (shCD63#49 und shCD63#51) erreichten eine Repression der mittels qRT-PCR detektierbaren CD63 mRNA Menge in LX2 Zellen (**Abb.3.41, A**) und in pHSCs (**Abb.3.41, B**).

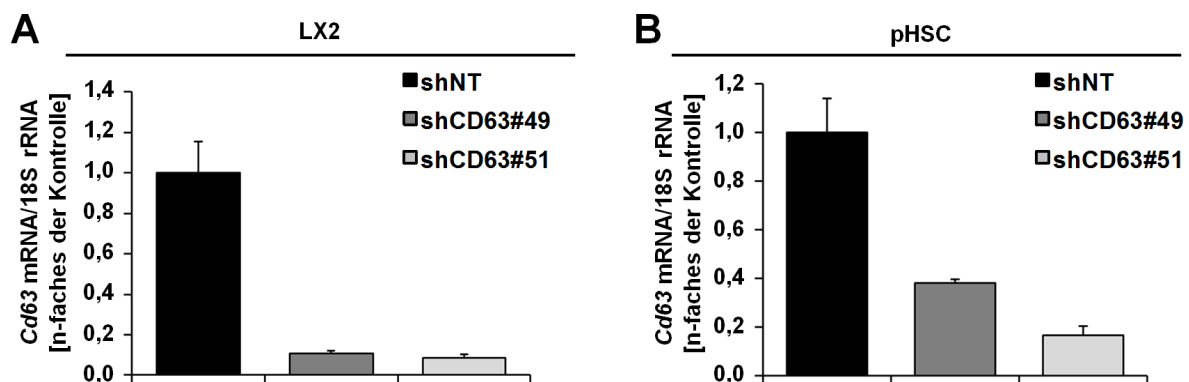


Abbildung 3.41. – Knock-down von CD63 in humanen HSCs. HSCs wurden lentiviral mit zwei TIMP-1 *knock-down* Konstrukten (*shCD63#49*, *shCD63#51*) bzw. einem Konstrukt zur Expression unspezifischer shRNA (*shNT*) transduziert. **(A)** Nachweis des CD63 *knock-downs* in LX2 Zellen. **(B)** Nachweis des CD63 *knock-downs* in pHSCs. **(A,B)** Quantifizierung der CD63 mRNA Expression mittels qRT-PCR. Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler.

3. Ergebnisse

Anschließend wurde überprüft, ob CD63 für die TIMP-1-induzierte Migration von HSCs notwendig ist. Es zeigte sich, dass der *knock-down* von CD63 die TIMP-1-induzierte Motilität von HSCs blockierte, sowohl in LX2 Zellen (**Abb.3.42**) als auch in pHSCs (**Abb.3.42**).

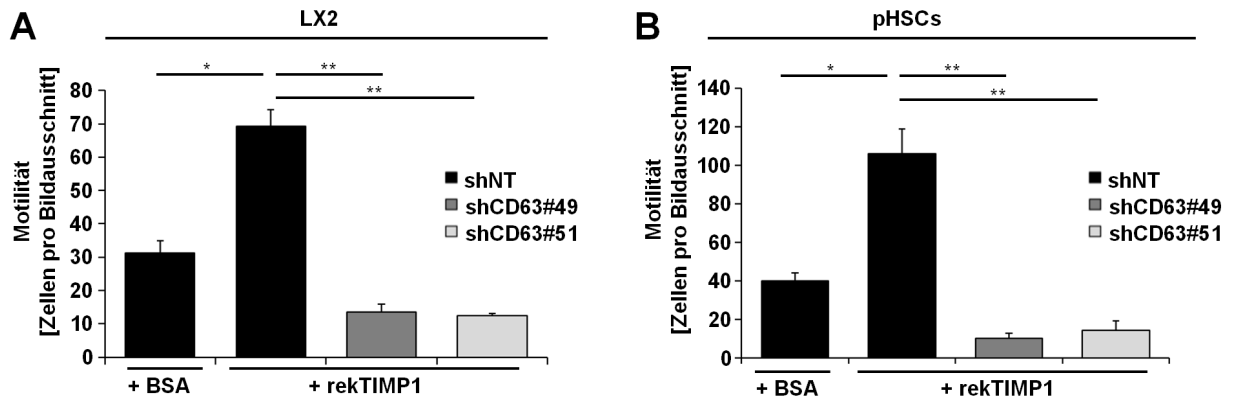


Abbildung 3.42. – Keine Induktion der Motilität von HSCs mit CD63 *knock-down* durch rekTIMP-1. HSCs mit *knock-down* von CD63 (*shCD63#49*, *shCD63#51*) bzw. *shNT* Kontrollzellen wurden mit und ohne Zugabe von *rekTIMP-1* bzw. *BSA* (als Kontrolle) auf die Motilität hin untersucht. **(A)** Motilität von LX2 Zellen mit CD63 *knock-down* in An- bzw. Abwesenheit von *rekTIMP-1*. **(B)** Motilität von pHSCs mit CD63 *knock-down* in An- bzw. Abwesenheit von *rekTIMP-1*. **(A,B)** Untersuchung der *TransWell*-Migration. Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler. *, $p < 0,5$; **, $p < 0,1$; Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA).

3.9.2. CD63-Abhängigkeit der HSC-aktivierenden Effekte von TIMP-1 *in vivo*

Die Rolle von CD63 als Mediator der TIMP-1-induzierten HSC Aktivierung wurde nun eingehender *in vivo* untersucht. Zunächst wurde getestet, ob die genetische Ablation von CD63 mit der TIMP-1-induzierte Aktivierung von HSC *in vivo* interferieren kann. CD63 *knock-out* Mäuse bzw. Wildtyp *Littermates* wurden mit AdCtrl bzw. AdTIMP-1 transduziert und nach drei Tagen auf HSC Aktivierung hin untersucht. Die anschließende IHC Analyse ergab, dass in CD63 *knock-out* Mäusen der TIMP-1-induzierte Anstieg der HSC Aktivierungsmarker α SMA und Desmin reduziert war (**Abb.3.43**).

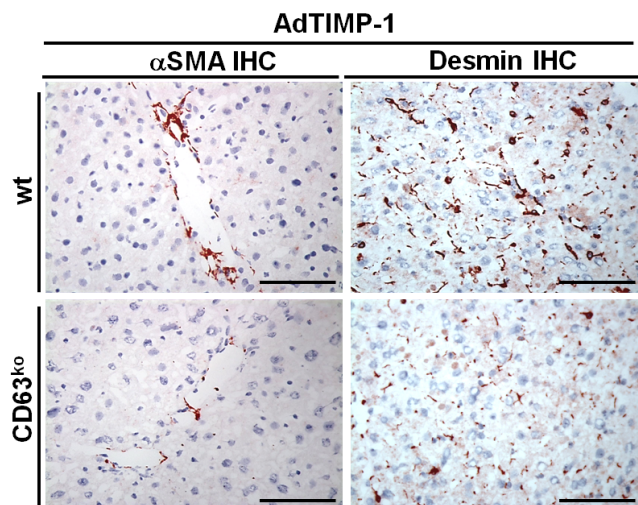


Abbildung 3.43. – Abhängigkeit der HSC-aktivierenden Effekte von TIMP-1 vom CD63-Genotyp *in vivo*. Mäuse mit unterschiedlichem CD63 Genotyp wurden mit AdCtrl bzw. AdTIMP-1 transduziert und drei Tage nach Virusinokulation auf Anzeichen für HSC Aktivierung in der Leber untersucht. IHC Nachweis der Expression von α SMA (*links*) bzw. Desmin (*rechts*) in der Leber. Gezeigt sind repräsentative Bilder.

Intravenös verabreichte adenovirale Vektoren weisen einen starken Lebertropismus auf, was eine effiziente RNAi-basierte Manipulation hepatischer Zielgene ermöglicht [Mowa *et al.*, 2010]. Dieser Umstand wurde ausgenutzt, um eine topische, effiziente Manipulation von CD63 in der Leber zu erreichen.

3. Ergebnisse

Adenovirus mit shRNA gegen CD63 wurde intravenös inokuliert und dadurch eine Reduktion der mittels qRT-PCR detektierbaren hepatischen CD63 mRNA um etwa 90 % erreicht (**Abb.3.44, A**). Die Analyse der Tiere auf histologische Anzeichen von HSC Aktivierung ergab, dass die Unterdrückung von CD63 in der Leber den TIMP-1-induzierten Anstieg der HSC Aktivierungsmarker α SMA und Desmin blockierte (**Abb.3.44, B**).

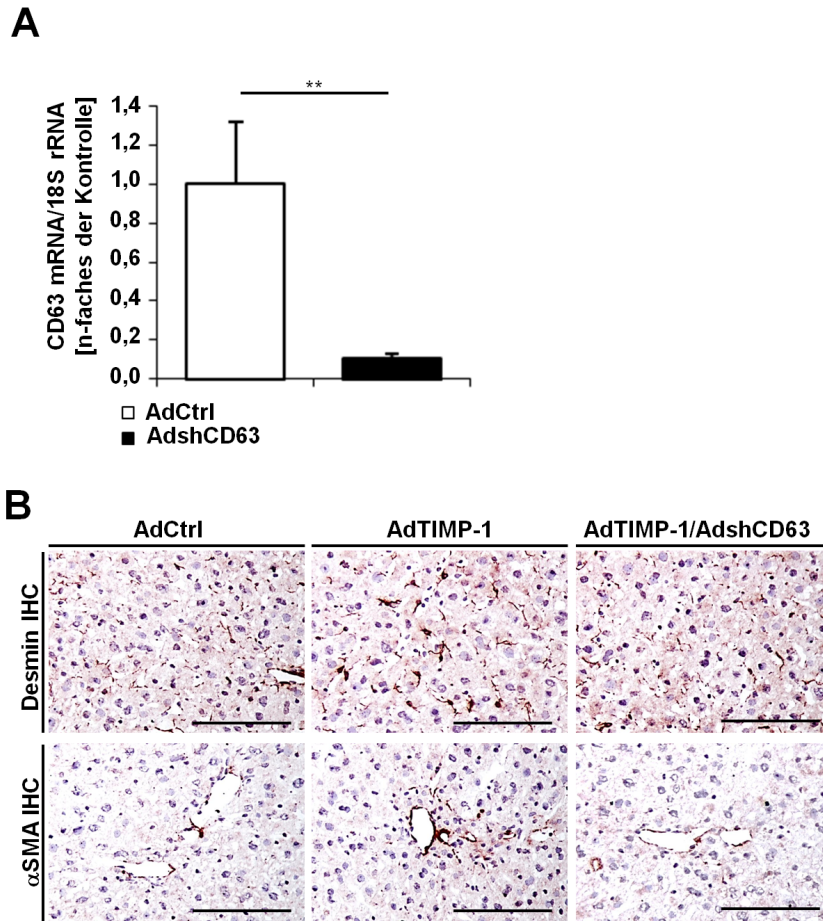


Abbildung 3.44. – Abhängigkeit der HSC-aktivierenden Effekte von TIMP-1 von hepatischem CD63 *in vivo*. C57BL/6 Mäuse (n = 5) wurden mit AdCtrl, AdTIMP-1 bzw. AdTIMP-1/AdshCD63 transduziert und drei Tage nach Virusinokulation auf Anzeichen für HSC Aktivierung in der Leber untersucht. **(A)** Nachweis des CD63 *knock-downs in vivo*. Quantifizierung von CD63 in Gesamt-mRNA der Leber mittels qRT-PCR. Abgebildet sind Mittelwerte +Standardfehler; **, p < 0,1; **Student's t** -Test. **(B)** IHC Nachweis der Expression von Desmin (*oben*) bzw. α SMA (*unten*) in der Leber. Gezeigt sind repräsentative Bilder.

3.9.3. Reduktion des TIMP-1-induzierten Anhaftens von Pankreaskarzinomzellen in der Leber durch *knock-down* von CD63 in der Leber

Um die Rolle von CD63 in der Ausbildung einer suszeptiblen, prometastatischen Leberumgebung zu untersuchen, wurden die Auswirkungen des AdshCD63-vermittelten *in vivo knock-downs* von CD63 auf die AdTIMP-1-induzierte Suszeptibilität der Leber überprüft. Hierzu wurden AdCtrl,- AdTIMP-1- und AdTIMP-1/AdshCD63-behandelte Tiere in einem experimentellen Metastasierungssassay untersucht. Es zeigte sich, dass die TIMP-1-induzierte Suszeptibilität der Leber gegenüber Tumorzellen in shCD63-behandelten Mäusen signifikant um etwa 50 % reduziert war (**Abb.3.45**). Dies deutet darauf hin, dass die TIMP-1-induzierte Ausbildung einer rezeptiven Mikroumgebung in der Leber abhängig von CD63 ist.

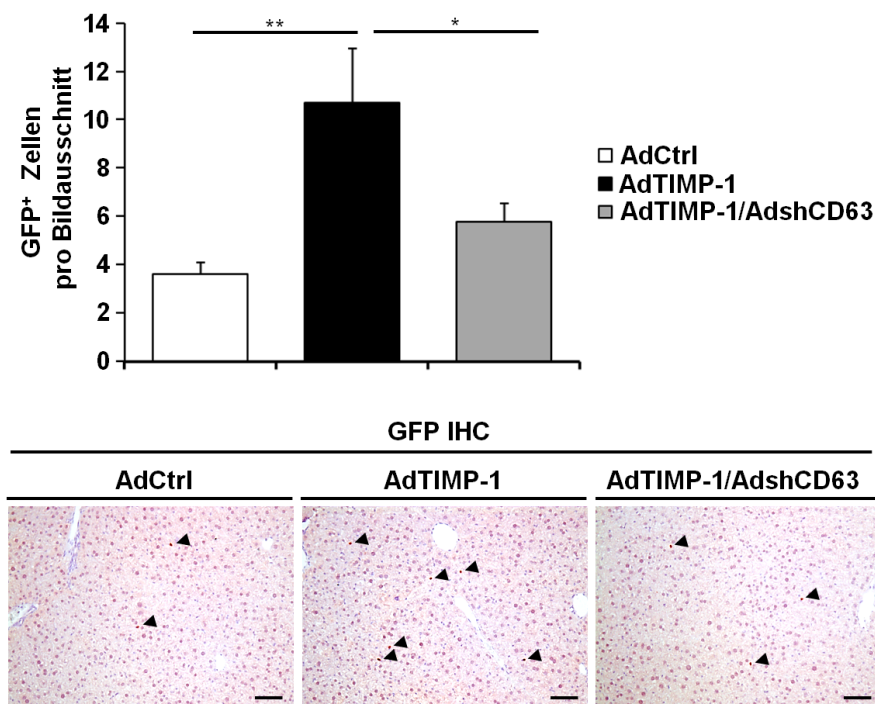


Abbildung 3.45. – Abhängigkeit der prometastatischen Effekte von TIMP-1 *in vivo* von der Anwesenheit von CD63 in der Leber. C57BL/6 Mäusen (n = 5) wurde AdCtrl, AdTIMP-1 bzw. AdTIMP-1/AdshCD63 injiziert, drei Tage nach Virusinokulation wurde die Suszeptibilität der Leber gegenüber Pankreaskarzinomzellen untersucht. Inokulation von 1×10^6 9801-eGFP Zellen i.v., 24 h später Analyse der Lebersuszeptibilität. (oben) IHC-basierte Quantifizierung extravadiierter 9801-eGFP Zellen in der Leber. Abgebildet sind Mittelwerte + Standardfehler; *, $p < 0,5$; **, $p < 0,1$; Student's t-Test. (unten) Gezeigt sind repräsentative Bilder. Balken, 100 μm .

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals einen molekularen und zellulären Mechanismus in der Ausbildung einer prämetastatischen Nische in der Leber durch einen klinisch relevanten Prognosemarker des PDAC, TIMP-1. Die Untersuchung möglicher leberspezifischer Mechanismen in der TIMP-1-induzierten prämetastatischen Nische zeigte erstmals, dass aktivierte HSCs Bestandteil der durch TIMP-1 veränderten Mikroumgebung der Leber sind. TIMP-1 selbst wurde als der HSC-aktivierende Faktor identifiziert und der zugrunde liegende Mechanismus konnte aufgeklärt werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, aktivierte TIMP-1 HSCs durch Interaktion mit CD63 und die anschließende Aktivierung des PI3K Signalweges. Aktivierte HSCs trugen zur TIMP-1-induzierten Ausbildung einer rezeptiven Leberumgebung bei, die vermehrt Tumorzellen aufnahm. Durch Aufklärung dieser bisher unbekannt, HSC-aktivierenden Funktion von TIMP-1 wurde erstmals die Beteiligung einer leberspezifischen Zellpopulation in der TIMP-1-induzierten Metastasierung gezeigt. Dadurch wurde zudem gezeigt, dass die metastasierungsfördernden Effekte hoher systemischer TIMP-1 Spiegel von der Interaktion mit CD63 in der Leber abhängig sind. Die Untersuchung dieser neuen Funktionen von TIMP-1 im Kontext des PDAC zeigte, dass es zur Ausbildung einer TIMP-1-induzierten, HSC-vermittelten prämetastatischen Nische bei PDAC kommt. Dieser TIMP-1- und HSC-abhängige metastasierungsfördernde Prozess fand bereits während der Entwicklung des PDAC statt, und bietet daher eine Erklärung für die besonders frühe und effiziente Metastasierung dieser Erkrankung in die Leber.

4.1. TIMP-1 aktiviert HSCs

Die PDAC-induzierte Aktivierung von HSCs in KPC Mäusen war von der Anwesenheit von TIMP-1 abhängig. TIMP-1 schien daher ein möglicher HSC-aktivierender Faktor bei PDAC zu sein. Eine TIMP-1-vermittelte Aktivierung von HSCs wurde kürzlich ebenfalls in einer Studie zu TIMP-1-überexprimierenden, hepatozellulären Karzinomen beschrieben [Song *et al.*, 2015b], wobei der Tumorentität entsprechend in jener Studie lokale Effekte in der Leber betrachtet wurden. Die Möglichkeit der Aktivierung von

4. Diskussion

HSCs durch TIMP-1 aus einem entfernten Tumor, wie bei PDAC im Pankreas, war bisher nicht bekannt. Eine Voraussetzung dafür, dass TIMP-1 auf HSCs in der entfernten Leber wirken kann, ist jedoch, dass TIMP-1 bei PDAC endokrin sezerniert wird. Der Verlauf der pankreatischen und systemischen TIMP-1 Mengen während der Entwicklung von PDAC konnte in einem funktionell genetischen spontanen murinen PDAC Modell (KPC Mäuse) untersucht werden. Die TIMP-1 Plasmaspiegel in KPC Mäusen stiegen an und korrelierten nahezu vollständig mit den jeweiligen Mengen im erkrankten Pankreas. In den gesunden *Littermates* der KPC Tiere blieben die pankreatischen und systemischen TIMP-1 Spiegel mit ansteigendem Alter unverändert gering. TIMP-1 ist bekanntermaßen im gesunden Gewebe kaum exprimiert, wird aber durch entzündliche Prozesse stark induziert [Lambert *et al.*, 2004]. Der Anstieg systemischer TIMP-1 Spiegel in KPC Mäusen ging somit auf eine endokrine Sezernierung durch das erkrankte Pankreas zurück. Die TIMP-1-abhängige Aktivierung von HSCs in KPC Mäusen wurde demnach wahrscheinlich durch das ansteigende TIMP-1 aus dem entartenden Pankreasgewebe ausgelöst. Das KPC Modell war jedoch ungeeignet, um zu untersuchen, ob von einem entfernten Tumor sezerniertes TIMP-1 in der Lage ist, über die Distanz HSCs in der Leber zu aktivieren. Eine Dissemination von Tumorzellen aus dem Pankreas findet in diesem Modell mit großer Wahrscheinlichkeit sehr früh statt [Rhim *et al.*, 2012]. Mögliche Effekte zirkulierender Tumorzellen auf die Aktivierung von HSCs in der Leber konnten daher im KPC Modell nicht ausgeschlossen und daher nicht von den Effekten endokrin wirksamer, erhöhter TIMP-1 Spiegel getrennt werden. Daher wurde ein nicht-metastatisches Primärtumormodell (NIH3T3, [Seubert *et al.*, 2015]) herangezogen. Im NIH3T3 Modell zeigte sich, dass von einem entfernten Tumor endokrin sezerniertes TIMP-1 ausreichend war, um HSCs in der Leber zu aktivieren. Ob TIMP-1 selbst aktivierend auf HSCs wirkte oder durch mögliche Wechselwirkung mit anderen tumorsezernierten Faktoren, konnte in diesen Modellen allerdings nicht unterschieden werden. Die Hypothese, dass TIMP-1 alleine als HSC-aktivierender Faktor wirken kann, wurde daher in einem tumorfreien, adenoviralen Überexpressionsmodell überprüft. Die ektopische Überexpression von TIMP-1 in Mäusen war ausreichend, eine gesteigerte Expression von HSC Aktivierungsmarkern auszulösen. Dies wies darauf hin, dass TIMP-1 als einzelner Faktor ausreichend für die Aktivierung von HSCs war. Demnach war die HSC-aktivierende Funktion von TIMP-1 unabhängig von Wechselwirkungen mit anderen tumorsezernierten Faktoren. In einem ähnlichen, adenoviralen Überexpressionsmodell wurden auch die HSC-aktivierenden Effekte von PDGF-C demonstriert und zusätzlich unter Verwendung stabil transgener Mäuse, die eine hepatische PDGF-C Überexpression unter Kontrolle des Albuminpromotors aufwiesen, überprüft [Campbell *et al.*, 2005]. Es ist bereits bekannt, dass auch die albuminpromotervermittelte TIMP-1

4. Diskussion

Überexpression im Mausmodell in Zusammenhang mit der Aktivierung von HSCs steht und die Ausprägung experimenteller Fibrose fördert [Yoshiji *et al.*, 2000] bzw. die Auflösung eines bestehenden fibrotischen Zustandes verlangsamt [Yoshiji *et al.*, 2002]. Der Nachweis der HSC Aktivierung *in situ* erfolgt derzeit üblicherweise mittels IHC unter Verwendung von Markerproteinen wie α SMA und Desmin sowie durch den histochemischen Nachweis ansteigender Kollagenmengen [Friedman, 2008]. Diese Methoden wurden auch in der vorliegenden Arbeit verwendet, jedoch weisen sie nicht völlig spezifisch HSCs nach, denn auch andere Zellen der Leber exprimieren diese Proteine, beispielsweise portale Fibroblasten und Myofibroblasten [Li *et al.*, 2007]. Derzeit ist allerdings kein HSC-spezifisches Protein bekannt [Motoyama *et al.*, 2014]. Um deren Aktivierungsstatus dennoch eindeutig überprüfen zu können, wurden HSCs daher aus AdTIMP-1-transduzierten Mäusen isoliert. Dies ist anhand der spezifisch sehr geringen Dichte von HSCs mittels Dichtegradienten möglich [Liu *et al.*, 2011]. Isolierte HSCs können dann anhand der Autofluoreszenz Vitamin A-reicher Fetttropfchen [Friedman, 2008] eindeutig identifiziert werden. Die Genexpressionsanalyse dieser HSC Fraktionen zeigte, dass HSCs aus Mäusen mit adenoviraler Überexpression von TIMP-1 einen erhöhten Aktivierungsstatus aufwiesen. Dies bestätigte die Vermutung, dass TIMP-1 als einzelner Faktor, in Abwesenheit eines Tumors, HSCs aktivieren kann. Effekte von TIMP-1 auf umliegende Zellen, die möglicherweise mit HSCs interagieren, können im AdTIMP-1-Modell allerdings nicht ausgeschlossen werden. Intravenös applizierte adenovirale Vektoren weisen einen Lebertropismus auf [Mowa *et al.*, 2010]. Die resultierende lokale Überexpression von TIMP-1 in der Leber kann einerseits direkt auf HSCs wirken, andererseits Effekte auf umliegende Zellen haben, die dann wiederum auf HSCs wirken können. TIMP-1 wirkt beispielsweise mitogen auf Hepatozyten [Mohammed *et al.*, 2005] und Hepatozyten stehen in starker Wechselwirkung mit HSCs [Friedman, 2008]. Auch unerwünschte Nebeneffekte der Virusinfektion könnten die Aktivierung von HSCs im AdTIMP-1-Modell beeinflussen. Hepatozyten können im Rahmen der adenoviralen Transduktion beschädigt werden [Shayakhmetov *et al.*, 2004] und beschädigte Hepatozyten wiederum können zur Aktivierung von HSCs führen [Friedman, 2008]. Mögliche direkte Effekte von TIMP-1 auf die HSC Aktivierung wurden daher in kultivierten HSCs *in vitro* untersucht. Immortalisierte und primäre HSCs wurden mit rekTIMP-1 stimuliert und zeigten daraufhin eine Steigerung des Aktivierungsstatus. Der rekTIMP-1-aktivierte HSC Phänotyp *in vitro* war charakterisiert durch eine gesteigerte Expression bekannter HSC Aktivierungsmarker, u. a. α SMA und Desmin, sowie durch funktionelle Veränderungen, d. h. eine gesteigerte Motilität der HSCs und die Produktion bioaktiver Faktoren. Ruhende HSCs in der Maus wurden *de novo* durch TIMP-1 aktiviert während der geringe Aktivierungsstatus von LX2 Zellen [Xu *et al.*, 2005] sowie

4. Diskussion

der stark kulturaktivierte Zustand von pHSCs [Bachem *et al.*, 2005] durch Stimulation mit rekTIMP-1 weiter angehoben wurde. Der HSC-aktivierende Effekt von TIMP-1 war demnach spezies- und zelllinienunabhängig, und in HSCs mit unterschiedlichen basalen Aktivierungszuständen zu beobachten. Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass TIMP-1 aktivierend auf HSCs selbst und nicht über umliegende Leberzellen wirkte. Dafür sprach auch, dass die Kinetik der TIMP-1-induzierten Aktivierung von HSCs relativ schnell und mit den Effekten anderer bekannter HSC-aktivierender Faktoren wie PDGF-B vergleichbar war [Marra *et al.*, 1997, 1999]. Bereits nach 24 h zeigten sich TIMP-1-induzierte Effekte auf die Aktivierung von HSCs *in vitro* und nach drei Tagen auf HSCs *in vivo*. Die bisher verwendeten Modellsysteme konnten zeigen, dass hohe TIMP-1 Mengen in der Umgebung von HSCs eine direkte, HSC-aktivierende Funktion ausüben. Aktivierte HSCs exprimieren allerdings auch selbst hohe Mengen an TIMP-1 [Yoshiji *et al.*, 2000; Friedman, 2008]. HSCs können zudem durch autokrine Stimulation ihren Aktivierungszustand aufrecht erhalten, beispielsweise in Abwesenheit parakriner Stimuli [Reeves und Friedman, 2002]. Falls TIMP-1 tatsächlich HSCs aktivieren kann, müssten Effekte von autokrin wirksamem TIMP-1 auf den Aktivierungsstatus der Zellen zu erwarten sein. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden die endogenen TIMP-1 Expressionslevel in HSCs lentiviral manipuliert. Erhöhte endogene TIMP-1 Expression förderte den Aktivierungsstatus und die Motilität von HSCs in vergleichbarem Maße wie eine Stimulation mit rekTIMP-1. TIMP-1 konnte demnach nicht nur als endo- bzw. parakriner, sondern auch als autokriner Faktor HSCs aktivieren. Bei *knock-down* der endogenen TIMP-1 Expression etablierte sich ein deaktivierter HSC Phänotyp mit verringerter Motilität. Dies zeigte, dass der HSC Aktivierungsstatus, in Abwesenheit anderer TIMP-1 Quellen, von der autokrinen TIMP-1 Stimulation abhängig war. Auch aus der Literatur ist ein solcher Zusammenhang bereits bekannt, da der Transfer von siRNA gegen TIMP-1 in die fibrotische Leber zur Deaktivierung von HSCs und dadurch zur Auflösung der Fibrose führt [Wang *et al.*, 2013]. Zugabe von rekombinantem TIMP-1 zu den *knock-down* Zellen stellte deren Aktivierungsstatus wieder her. Die Quelle von TIMP-1 (para- oder autokrin) war demnach nicht entscheidend für die Etablierung eines aktivierten HSC Phänotyps, sondern das extrazelluläre TIMP-1 Milieu, zu dem verschiedene Quellen beitragen können. Zusammengefasst zeigte sich in verschiedenen Modellen zur Erhöhung der TIMP-1 Mengen (Primärtumore, Adenovirus, rekTIMP-1 und funktionell genetische Manipulation der endogenen Expressionslevel von HSCs) stets ein Zusammenhang von TIMP-1 mit dem Aktivierungsstatus von HSCs sowie funktionellen Aktivierungsmerkmalen wie Motilität und der Expression bioaktiver Faktoren. TIMP-1 aktivierte HSCs demnach als parakriner, tumorsezernierter sowie als autokriner Faktor und unabhängig von anderen Faktoren oder Zelltypen. Dies legt nahe,

dass es in der TIMP-1-induzierten Aktivierung von HSCs zu einem Wechselspiel zwischen para- und autokrinen Signalen kommen kann. Die Effekte einer initialen, endo- oder parakrinen Stimulation können demnach durch autokrines TIMP-1 aufrechterhalten werden. TIMP-1 kann daher nicht nur in hoher Konzentration HSCs aktivieren, sondern daraufhin als wichtiger autokriner Faktor zur Erhaltung des aktivierten Zustands beitragen. Die hier gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass TIMP-1 als treibende Kraft in der HSC Aktivierung und somit möglicherweise in der Progression HSC-vermittelter Erkrankungen der Leber wirken kann. Diese neu identifizierte, aktive Rolle von TIMP-1 in der HSC Aktivierung bietet einen Erklärungsansatz für den bekannten, aber ungeklärten klinischen Zusammenhang zwischen TIMP-1 und der Schwere des Verlaufs HSC-assoziiierter Erkrankungen, wie Fibrose [Hemmann *et al.*, 2007], Zirrhose [Busk *et al.*, 2014] und Hepatitis [Valva *et al.*, 2011].

4.2. TIMP-1 aktiviert HSCs über Interaktion mit CD63 und anschließende Aktivierung des PI3K Signalweges

TIMP-1 aktivierte den PI3K Signalweg in HSCs, im Mausmodell sowie in humanen immortalisierten und primären HSCs *in vitro*. PI3K ist gut beschrieben als zentraler Signalweg in der HSC Aktivierung [Friedman, 2008] und kam daher auch als Mediator der TIMP-1-vermittelten HSC Aktivierung in Frage. PI3K wird beispielsweise auch durch PDGF aktiviert und spielt eine funktionelle Rolle in der PDGF-vermittelten HSC Aktivierung [Masamune *et al.*, 2003; Friedman, 2008]. Die Aktivierung des PI3K Signalweges durch TIMP-1 wurde zudem bereits in Tumorzellen gut beschrieben, u. a. kürzlich in Lungenkarzinomzellen [Cui *et al.*, 2014]. TIMP-1 kann neben PI3K auch weitere Signalwege aktivieren, wie beispielsweise ERK [Chirco *et al.*, 2006], die ebenfalls eine Rolle in der HSC Aktivierung spielen könnten [Masamune *et al.*, 2003]. Der ERK Signalweg wurde allerdings nicht durch TIMP-1 in HSCs aktiviert. Dieses Ergebnis könnte auf die Ursachen der differentiellen Rolle von TIMP-1 in der Proliferation und Migration von HSCs hinweisen. Es wurde beschrieben, dass PI3K und ERK im Kontext der PDGF-induzierten Aktivierung von *pancreatic stellate cells* (PSCs) nicht sequentiell, sondern parallel angesprochen werden [Masamune *et al.*, 2003]. ERK wird für PDGF-induzierte Proliferation von PSCs benötigt, während PI3K wichtig für PDGF-induzierte Migration ist und nur marginalen Einfluss auf das Wachstum der Zellen ausübt [Masamune *et al.*, 2003]. Auch für HSCs wurde beschrieben, dass ERK wichtiger für die Proliferation der

4. Diskussion

Zellen ist als für deren Motilität [Marra *et al.*, 1999]. Dies könnte den TIMP-1-induzierten Phänotyp erklären. TIMP-1 veranlasste keine Aktivierung von ERK und keine Veränderung des Zellwachstums, löste jedoch die Aktivierung von PI3K aus und förderte die Migration. Somit wäre denkbar, dass der selektive Effekt von TIMP-1 auf HSC Motilität anhand des angesprochenen *down-stream* Signalweges PI3K vermittelt wurde. Die selektive Aktivierung der PI3K durch TIMP-1 war demnach ein erster Hinweis auf eine Rolle dieses Signalweges in der TIMP-1-induzierten HSC Aktivierung. Die mögliche Wichtigkeit von PI3K für die Ausbildung des TIMP-1-aktivierten HSC Phänotyps wurde mit Hilfe der synthetischen Inhibitoren Wortmannin und LY294002 untersucht. Beide PI3K Inhibitoren konnten die TIMP-1-induzierte HSC Aktivierung, Motilität und Expression bioaktiver Faktoren *in vitro* effektiv hemmen. Die Behandlung von Mäusen mit Wortmannin war ausreichend, um die TIMP-1-induzierte Aktivierung von HSCs *in vivo* zu blockieren. Diese Hinweise sprachen für eine funktionelle Rolle des PI3K Signalweges in der TIMP-1-induzierten HSC Aktivierung. Die Bedeutung der mit Wortmannin und LY294002 gewonnenen Erkenntnisse muss jedoch sehr kritisch abgewägt werden. Beide Inhibitoren gehören einerseits zu den bekanntesten und am häufigsten verwendeten PI3K Inhibitoren [McNamara und Degterev, 2011] und wurden bereits im Kontext der HSC Aktivierung [Gentilini *et al.*, 2000; Gäbele *et al.*, 2005] sowie der Inhibition TIMP-1-induzierter Signalwege [Cui *et al.*, 2014] beschrieben. Andererseits sind Wortmannin und LY294002 nicht vollständig selektiv für PI3K und inhibieren zu einem gewissen Grad auch verwandte Proteine wie mTOR und PI4K [McNamara und Degterev, 2011]. Daher können Effekte auf verwandte Signalwege, die möglicherweise auch eine Rolle bei der HSC Aktivierung spielen, hier aber nicht betrachtet wurden, nicht ausgeschlossen werden. Die intraperitoneale Gabe von Wortmannin muss ebenfalls sehr kritisch eingeordnet werden, da die Effekte eines systemisch verfügbaren PI3K Inhibitors weder auf die Leber noch auf HSCs beschränkt sind. Eine spezifische Rolle der PI3K in der TIMP-1-induzierten HSC Aktivierung konnte hierbei also nicht eindeutig gezeigt werden. Adenovirale Überexpression von N-TIMP-1 war allerdings nicht in der Lage, den PI3K Signalweg zu aktivieren und führte auch zu keiner Aktivierung von HSCs. Die TIMP-1-induzierte Aktivierung von PI3K sowie die Aktivierung von HSCs *in vivo* waren somit strikt abhängig von der Anwesenheit der C-terminalen Signaldomäne, was für die Wichtigkeit TIMP-1-induzierter Signalwege in der HSC Aktivierung sprach. Auch hier galten die zuvor bereits diskutierten Limitationen des adenoviralen Modellsystems, so dass diese Beobachtungen ebenfalls durch Stimulation kultivierter HSCs mit rekN-TIMP-1 *in vitro* überprüft wurden. Diese Versuche bestätigten, dass N-TIMP-1 nicht ausreichend für eine Aktivierung von HSCs war und zeigten, dass die C-terminal lokalisierte Signalfunktion von TIMP-1 für die Aktivierung von HSCs wichtig war. Ein

4. Diskussion

Interaktionspartner der C-terminalen Domäne, der die Signalwirkung von TIMP-1 und deren Übertragung auf intrazelluläre Signalwege vermittelt [Jung *et al.*, 2006], ist das Tetraspanin CD63. Die TIMP-1-induzierte HSC Aktivierung konnte in CD63 *knock-out* Mäusen nicht stattfinden, was auf eine funktionelle Rolle dieses Proteins hinweist. Die Verwendung von CD63 *knock-out* Mäusen muss allerdings kritisch betrachtet werden. CD63 ist ein ubiquitäres Protein [Maecker *et al.*, 1997] mit vielseitigen Funktionen [Pols und Klumperman, 2009] und die Abwesenheit eines ausgeprägten Phänotyps bei vollständiger genetischer Deletion von CD63 weist auf eine Kompensation der Funktionen, möglicherweise durch andere Tetraspanine, hin. Durch Anwendung adenoviraler Vektoren für den *knock-down* von CD63 *in vivo* eröffneten sich für die experimentelle Adressierung dieses Problems interessante Möglichkeiten. Zum einen erlaubte die Transduktion von Mäusen mit AdshCD63 eine konditionelle Manipulation von CD63. Zum anderen erlaubt der Lebertropismus systemisch applizierter Adenoviren im Falle RNAi-basierter Anwendungen eine effektive, leberspezifische Wegnahme von Zielmolekülen [Mowa *et al.*, 2010]. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die metastasierungsfördernden Effekte hoher systemischer TIMP-1 Spiegel von der Interaktion mit CD63 in der Leber abhängig waren. Ebenso wie bei der zuvor diskutierten adenoviralen Überexpression von Proteinen können jedoch auch beim *knock-down* von Zielproteinen Effekte auf umliegende Zellpopulationen nicht ausgeschlossen werden. Die Wichtigkeit von CD63 in der TIMP-1-induzierten HSC Aktivierung wurde daher in kultivierten HSCs *in vitro* überprüft. HSCs mit *knock-down* von CD63 konnten nicht mehr auf Stimulation mit TIMP-1 reagieren. Dies zeigte, dass die HSC-aktivierenden Effekte von TIMP-1 von der Anwesenheit von CD63 auf HSCs abhängig waren. Der *knock-down* von CD63 alleine reduzierte die basale Motilität von HSCs, was möglicherweise auf eine Durchbrechung der autokrinen TIMP-1-vermittelten Aktivierung durch die Wegnahme von CD63 hindeutet. Die Rolle von CD63 in der Motilität von HSCs wurde bereits gezeigt [Mazzocca *et al.*, 2002], wobei in jener Studie ein inhibitorischer Antikörper gegen CD63 verwendet wurde. Der hier gezeigten Rolle von CD63 in der TIMP-1-induzierten Motilität von HSCs widerspricht eine kürzlich publizierte Studie. Diese führte antifibrotische und antimigratorische Effekte von Adiponektin auf HSCs *in vitro* auf eine gesteigerte TIMP-1 Expression der Zellen und auf die TIMP-1/CD63 Interaktion zurück [Ramezani-Moghadam *et al.*, 2015]. Die Autoren postulierten daraufhin eine antimigratorische Funktion von CD63 in HSCs sowie eine antifibrotische Rolle von TIMP-1 in diesem Kontext [Ramezani-Moghadam *et al.*, 2015]. Diese Beobachtungen basierten auf einem Antikörper zur Blockierung der TIMP-1/CD63 Interaktion, der CD63 allerdings intrazellulär bindet, während die TIMP-1 Bindestelle extrazellulär an der Zelloberfläche liegt [Toricelli *et al.*, 2013]. Der verwendete Antikörper wurde bezüglich der angenom-

4. Diskussion

menen blockierenden Funktion in der Studie nicht näher charakterisiert und auch in anderen Studien sowie vom Hersteller nicht als blockierend beschrieben. Dies zieht die mit Hilfe dieses Antikörpers gewonnen Erkenntnisse in Zweifel. Unterschiede im experimentellen Aufbau könnten die Diskrepanzen zu den in der vorliegenden Arbeit mittels funktionell genetischer shRNA-basierter Manipulation von CD63 gewonnenen Ergebnisse erklären. Die Studie von Ramezani-Moghadam *et al.* (2015) steht allerdings in direktem Widerspruch zu Untersuchungen von Mazzocca *et al.* (2002), die unter Verwendung eines bekannten, inhibitorischen Antikörpers gegen CD63 den gegenteiligen Effekt, nämlich eine Reduktion der Motilität, beobachteten. Die von Ramezani-Moghadam *et al.* (2015) postulierte protektive Rolle von TIMP-1 als antifibrotischer Faktor steht zudem in Gegensatz zu den bekannten antiproteolytischen, fibrosefördernden Funktionen von TIMP-1 [Iredale, 1997] und einer Vielzahl klinischer Daten zur Rolle von TIMP-1 in HSC-assoziierten Erkrankungen [Hemmann *et al.*, 2007; Valva *et al.*, 2011; Busk *et al.*, 2014]. Zusammengefasst unterstützen bereits publizierte Studien und die Ergebnisse dieser Arbeit demnach die Auffassung einer aktiven Rolle der TIMP-1/CD63 Interaktion in der Aktivierung von HSCs. Der Umstand, dass TIMP-1 *in vitro* den PI3K Signalweg in HSCs aktivierte und die TIMP-1 vermittelte Aktivierung von HSCs durch Inhibition von PI3K blockiert wurde, weist zudem darauf hin, dass TIMP-1 effektiv über diesen Signalweg als Aktivator auf die Zellen wirkt, auch wenn bei der verwendeten systemischen Applikation eines PI3K Inhibitors *in vivo* Effekte auf andere Organe und umliegende Zellen nicht auszuschließen sind. Die HSC-spezifische Inhibition von PI3K *in vivo* wäre mit Hilfe eines konditionellen *knock-out* Modells möglich, jedoch ist derzeit kein solches bekannt. Zusammengefasst zeigten die bisher diskutierten Ergebnisse, dass TIMP-1 über C-terminale Bindung an den TIMP-1 Rezeptor CD63 und die anschließende Aktivierung des PI3K Signalweges HSCs aktivierte. Dies untermauert ein Modell, in dem TIMP-1 als wichtiger endo- und parakriner sowie autokriner Faktor die Aktivierung von HSCs vorantreiben und erhalten kann. Die in dieser Arbeit gezeigte Aktivierung von HSCs durch TIMP-1 anhand der Interaktion mit dem membranständigen Rezeptor CD63 und anschließender Aktivierung eines intrazellulären Signalwegs unterstützt die oben diskutierte Rolle von TIMP-1 als einzelner Faktor, der in der Lage ist, HSCs zu aktivieren. Die Effekte von CD63 und der TIMP-1/CD63-Interaktion sind bisher vornehmlich auf Tumorzellen untersucht worden [Li *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2014]. Somit stellt die Rolle von CD63 in der HSC-vermittelten Ausbildung einer prometastatischen Mikroumgebung in der Leber durch TIMP-1 eine neuartige, metastasierungsfördernde Funktion von CD63 dar.

4.3. Aktivierte HSCs sind Teil der TIMP-1-induzierten prämetastatischen Nische in der Leber

Die Blockade der TIMP-1-induzierten HSC Aktivierung durch Wegnahme der identifizierten Mediatoren (CD63, PI3K) störte die TIMP-1-induzierte Ausbildung einer suszeptiblen Leberumgebung, in die vermehrt PDAC Zellen einwanderten. Dies deutete auf eine funktionelle Rolle TIMP-1-aktivierter HSCs in der Ausbildung der TIMP-1-induzierten prämetastatischen Nische hin. Es ist jedoch sehr wenig zur prämetastatischen Nische in der Leber und somit zu den möglichen Funktionen aktivierter HSCs in diesem Kontext bekannt. Um die Wichtigkeit von HSCs in der TIMP-1-induzierten Metastasierung besser einschätzen zu können, wären effektive Depletionsmethoden von Vorteil, jedoch sind die analytischen Methoden zur Manipulation und Analyse von HSCs derzeit noch beschränkt. Das beste derzeit verfügbare Modell ist eine transgene Mauslinie, die unter Kontrolle des GFAP Promotors *Herpes Simplex Virus Thymidinkinase* (HSV-Tk) exprimiert und so HSCs gegenüber Ganciclovir sensitiviert, so dass sie unter Behandlung absterben [Puche *et al.*, 2013]. Die Überprüfung der hier gezeigten Beobachtungen in diesem Modell wäre möglicherweise für zukünftige Studien von Interesse. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich der TIMP-1-aktivierte HSC Phänotyp durch die Expression verschiedener Nischenfaktoren auszeichnete. Nischenfaktoren sind lösliche, bioaktive Moleküle, die eine funktionelle, prämetastatische Nische ausbilden können [Kaplan *et al.*, 2006b]. Die TIMP-1-induzierte Expression von Nischenfaktoren in HSCs wies darauf hin, dass TIMP-1-aktivierte HSCs funktionell zur prämetastatischen Konditionierung der Leber beitragen können. Dafür sprach ebenfalls, dass aktivierte HSCs einen bioaktiven Phänotyp annehmen und über die Sezernierung löslicher Faktoren sowie von EZM Proteinen einen drastischen Einfluss auf ihre Mikroumgebung ausüben [Friedman, 2008]. Eine mögliche Beteiligung von HSCs in der Ausbildung einer hepatischen prämetastatischen Nische wurde aufgrund dieser zentralen Rolle in der Leberhomöostase bereits mehrmals vermutet [Kaplan *et al.*, 2006a; Wels *et al.*, 2008; Psaila und Lyden, 2009], ist bisher jedoch kaum untersucht worden. Kürzlich zeigte eine Studie, dass aktivierte HSCs in der Tat eine wichtige Rolle in der durch PDAC Exosomen vermittelten Ausbildung einer prämetastatischen Nische in der Leber spielen [Costa-Silva *et al.*, 2015]. Die vorliegende Arbeit zeigte nun erstmalig ein Expressionsprofil von *ex vivo*-isolierten HSCs aus einer prämetastatischen Nische. Bisher identifizierte Faktoren in der prämetastatischen Leber wurden keiner bestimmten Zellpopulation zugeordnet, mit der Ausnahme des EZM-Proteins Fibronektin. Hier zeigten Costa-Silva *et al.* (2015) eine Kolo-kalisation mit α SMA, so dass mit großer Wahrscheinlichkeit HSCs die Quel-

4. Diskussion

le von Fibronectin in der prämetastatischen Leber sind. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte LDA Analyse der Genexpression von HSCs aus der TIMP-1-induzierten prämetastatischen Nische zeigte umfangreiche, über Nischenfaktoren hinausgehende, TIMP-1-induzierte Veränderungen auf. Dies deckt sich mit Berichten über den Umfang, in welchem sich die Genexpression von HSCs bei Aktivierung verändern kann [Ji *et al.*, 2012] und war ein weiterer Hinweis darauf, wie drastisch die Veränderungen der lokalen Gewebemöostase der Leber durch TIMP-1-aktivierte HSCs sein können. Zu den durch TIMP-1 in HSCs induzierten Faktoren gehörte auch TIMP-1 selbst. HSCs in Mäusen reagierten auf erhöhte TIMP-1 Mengen nach adenoviraler Transduktion mit gesteigerter TIMP-1 Expression. Diese Beobachtung wurde ebenfalls *in vitro* in kultivierten HSCs nach Stimulation mit rekTIMP-1 überprüft und so zeigte sich, dass hohe TIMP-1-Mengen die TIMP-1 Expression in HSCs weiter anregen. Dies wies auf eine Autoregulation von TIMP-1 in HSCs hin. Dafür sprach auch, dass die endogen transkribierten TIMP-1 prä-mRNA Mengen in HSCs mit lentiviraler TIMP-1 Überexpression erhöht waren. Andere autokrin wirksame HSC-aktivierende Faktoren wie z.B. TGF β sind ebenfalls positiv autoreguliert [Cui *et al.*, 2003]. Kultur-aktivierte pHSC, die vergleichsweise große Mengen von TIMP-1 produzierten, konnten die endogene Expression bei Stimulation mit rekombinantem TIMP-1 jedoch nicht weiter anheben, zeigten aber eine Steigerung des Aktivierungsstatus. Die TIMP-1 Expression in HSCs war demnach zum einem nicht unbegrenzt autoreguliert und zum anderen nicht vollständig assoziiert mit der Aktivierung, was im Gegensatz zur häufigen Verwendung von TIMP-1 als Aktivierungsmarker für HSCs [Friedman, 2008] steht. Möglicherweise besteht eine Assoziation der Expression von TIMP-1 und anderen Aktivierungsmarkern in HSCs nur zu frühen Phasen der Aktivierung. Ab einer gewissen Aktivierungsschwelle werden HSCs möglicherweise insensitiv gegenüber der autoregulatorischen jedoch nicht der HSC-aktivierenden Funktion von TIMP-1. Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse auf eine funktionelle Rolle TIMP-1-aktivierter HSCs in der prämetastatischen Konditionierung der Leber durch Expression von Nischenfaktoren und durch autoregulatorische Amplifikation systemischer TIMP-1 Mengen in der Leber hin. Zwar konnte keine unspezifische Depletion der Zellpopulation durchgeführt werden, aber die Blockierung der HSC Aktivierung war ausreichend, die TIMP-1-induzierte Suszeptibilität der Leber gegenüber Tumorzellen zu reduzieren. Aktivierte HSCs tragen demnach zur Ausbildung der TIMP-1-induzierten prämetastatischen Nische in der Leber bei. Die Autoregulation der TIMP-1 Expression in HSCs in der TIMP-1-induzierten prämetastatischen Nische ist mechanistisch von Bedeutung, denn dies weist darauf hin, dass tumorinduzierte Veränderungen der systemischen TIMP-1 Spiegel durch eine HSC-vermittelte autoregulatorische Schleife in der Leber amplifiziert werden können und die TIMP-1-

induzierte Nische in der Leber nach erfolgreicher Initiation selbsterhaltend ist. Die hier gezeigte TIMP-1-induzierte HSC-vermittelte Ausbildung einer hepatischen prämetastatischen Nische zeigt erstmalig die Beteiligung eines hepatischen Kompartiments in der metastasierungsfördernden Wirkung von TIMP-1. Zudem sind HSCs eine leberspezifische Zellpopulation [Friedman, 2008], so dass deren Aktivierung durch TIMP-1 einen organspezifischen Prozess darstellt. Somit konnte erstmals ein Prozess in der TIMP-1-induzierten Metastasierung aufgedeckt werden, der möglicherweise deren Leberspezifität erklären kann. Das Konzept der prämetastatischen Nische bietet verschiedene Erklärungsansätze für organspezifische Metastasierung, jedoch sind bisher kaum konkrete Mechanismen bekannt, die dies begründen konnten. Für PDAC-sezernierte Exosomen, die ebenfalls zur Auslösung einer hepatischen prämetastatischen Nische führen, ist beispielsweise gezeigt worden, dass sie die Lunge zu großen Teilen passieren und anschließend spezifisch mit Kupferzellen in der Leber fusionierten [Costa-Silva *et al.*, 2015]. Die Ursachen hierfür sind bisher jedoch ungeklärt. Die Aktivierung organspezifischer Zellpopulationen durch metastasierungsfördernde Faktoren, wie die hier gezeigte Aktivierung von HSCs durch TIMP-1, könnte eine Erklärung für die leberspezifische Metastasierung bieten. Somit stellt der hier gezeigte Mechanismus einen der wenigen bisher bekannten, organspezifischen metastasierungsfördernden Prozesse im Kontext der prämetastatischen Nische dar.

4.4. Die TIMP-1-induzierte, HSC-vermittelte Ausbildung einer prämetastatischen Nische fördert die frühe und effiziente Metastasierung des PDAC

Hohe TIMP-1 Plasmaspiegel von PDAC Patienten waren mit der Anwesenheit von Lebermetastasen assoziiert, was auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen TIMP-1 und der prävalenten Lebermetastasierung des PDAC hinwies. Die Vermutung lag nahe, dass die TIMP-1-induzierte, HSC-vermittelte Ausbildung einer prämetastatischen Nische in der Leber hierbei eine Rolle spielt. Die untersuchten Plasmaproben von PDAC Patienten erlauben jedoch keine Aussage zu prämetastatischen Prozessen, denn bei einem Großteil der PDAC Patienten ist die Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose bereits metastasiert [Tamburrino *et al.*, 2014]. Es scheint allerdings ohnehin keine ausgeprägte, prämetastatische Phase beim Pankreaskarzinom zu geben, wie diverse Studien kürzlich nahe legten [Seton-Rogers, 2012; Rhim *et al.*, 2012; Imai *et al.*, 2014]. Präaligne Zellen disseminieren unerwartet früh aus dem entartenden Pankre-

4. Diskussion

as, weit vor der histologischen Detektierbarkeit von Tumoren [Rhim *et al.*, 2012; Imai *et al.*, 2014]. Demnach muss die Anwendbarkeit des Konzepts einer prämetastatischen Nische bei Pankreaskarzinom kritisch betrachtet werden, da vermutlich zu jedem Zeitpunkt des Krankheitsverlaufs bereits disseminierte prä maligne Zellen zirkulieren. Die Etablierung der rezeptiven Nische kann somit bei PDAC eben nicht gemäß der Modellvorstellung in Abwesenheit von Tumorzellen in einer prämetastatischen Phase stattfinden. Gerade im Kontext dieser frühen Dissemination kann jedoch die Ausbildung einer rezeptiven Mikroumgebung im Zielorgan der Metastasierung eine entscheidende Rolle spielen. Die prämetastatische Nische erlaubt möglicherweise das frühe Anhaften vergleichsweise schwacher, nicht vollständig transformierter prä maligner Tumorzellen im sekundären Organ, die ansonsten noch nicht in der Lage wären, zu metastasieren. Nicht vollständig transformierte Zellen sind umso wahrscheinlicher auf eine erfolgreiche Interaktion mit der Mikroumgebung im sekundären Organ angewiesen, um überleben zu können. Das Hauptzielorgan prä maligner, vom Pankreas disseminierter Zellen im Mausmodell ist, gemäß der Studie von Rhim *et al.* (2012), die Leber. Die Leber ist des weiteren anatomisch prädestiniert als (prä)metastatisches Zielorgan für das Pankreaskarzinom, da beide Organe über die Portalvene direkt verbunden sind [Lüllmann-Rauch, 2006]. Aus dem Pankreas sezernierte Faktoren und disseminierte Zellen treffen also in höchster Konzentration auf die Leber. Voraussetzung für einen Einfluss einer TIMP-1-induzierten HSC-vermittelten prämetastatischen Nische auf das extrem frühe Anhaften von Pankreaskarzinomzellen in der Leber ist jedoch die Anwesenheit des Proteins zu frühen Krankheitsstadien, um auf die Leber und die Metastasierung in dieses Organ Einfluss zu nehmen. Die systemischen TIMP-1 Spiegel stiegen bereits im Stadium der chronischen Pankreatitis in KPC Mäusen an und auch von humanen Patienten mit chronischer Pankreatitis wurden erhöhte TIMP-1 Plasmaspiegel berichtet [Pan *et al.*, 2011, 2012; Lekstan *et al.*, 2013]. Auch die TIMP-1-abhängige Aktivierung von HSCs im KPC Modell fand bereits zu frühen Krankheitsstadien statt. Zusammengefasst scheint gerade aufgrund der Abwesenheit einer prämetastatischen Phase bei PDAC die Bedeutung einer TIMP-1-induzierten, HSC-vermittelten Ausbildung einer rezeptiven Leberumgebung besonders groß. Diese rezeptive Lebernische kann früh prä maligne Zellen aus dem Pankreas aufnehmen und deren Überleben fördern, so dass sie eine Erklärung für die frühe und prävalente Metastasierung dieser Erkrankung in die Leber bietet. Die Einordnung der HSC-aktivierenden Funktion von TIMP-1 und der dadurch ausgelösten prometastatischen Veränderungen der HSC Genexpression in den Kontext der Ausbildung einer prämetastatischen Nische bei PDAC ist in **Abb.4.1** zusammengefasst. So wird ein Modell vorgeschlagen, in dem TIMP-1 aus dem erkrankten Pankreas zur Erhöhung des systemischen TIMP-1 Spiegel führt und

4. Diskussion

dadurch die Aktivierung von HSCs und die Bildung einer prämetastatischen Nische in der Leber auslöst. Hierbei wirkt CD63 in der Leber als essentieller Mediator einer PI3K-vermittelten Aktivierung von HSCs durch systemisches TIMP-1. Der TIMP-1-aktivierte HSC Phänotyp ist motil und exprimiert verschiedene Nischenfaktoren, so dass er über Veränderung der hepatischen Mikroumgebung zur Ausbildung einer prämetastatischen Nische beitragen kann. Zudem wird das endokrin vom Tumor ausgeschüttete TIMP-1 in einer HSC-vermittelten positiv rückgekoppelten Schleife lokal amplifiziert, was eine Selbsterhaltung der TIMP-1-induzierten Nische ermöglicht.

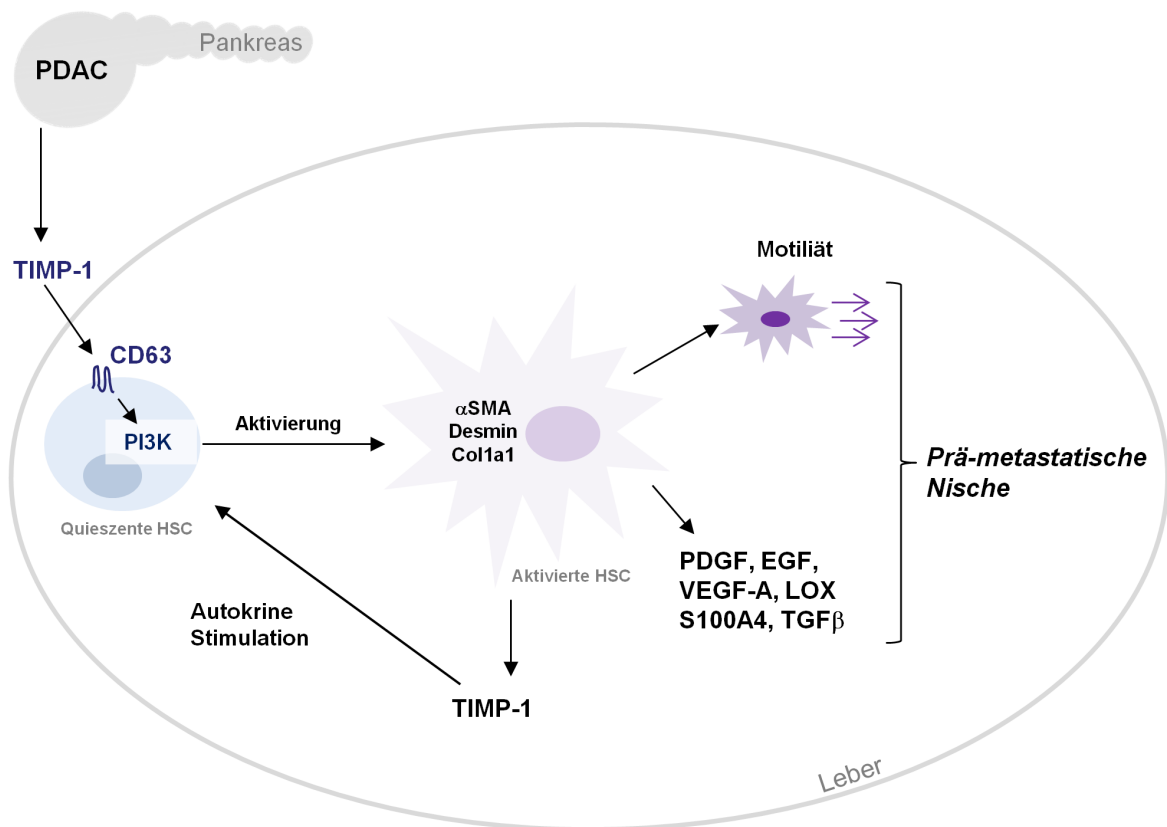


Abbildung 4.1. – Vorgeschlagenes Modell zur TIMP-1-induzierten HSC-vermittelten prämetastatischen Nische in der Leber bei PDAC. TIMP-1 aus dem erkrankten Pankreas wirkt auf hepatisches CD63 und induziert über die Aktivierung von PI3K einen aktivierten, motilen, prometastatischen HSC Phänotyp. TIMP-1-aktivierte HSCs führen über Veränderung der hepatischen Mikroumgebung zur Ausbildung einer prämetastatischen Nische. Das endokrin vom Tumor ausgeschüttete TIMP-1 wird in der Leber durch eine HSC-vermittelte positiv rückgekoppelte Schleife lokal amplifiziert, was zur Selbsterhaltung der TIMP-1-induzierten Nische beiträgt.

4.5. Anwendbarkeit der identifizierten Mechanismen über das PDAC hinaus

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte der TIMP-1-induzierten Ausbildung einer prämetastatischen Nische im Kontext des PDAC betrachtet, da für diese Erkrankung die klinische Relevanz besonders hoch ist. Der hier identifizierte Mechanismus der HSC-vermittelten Ausbildung einer prämetastatischen Nische durch TIMP-1 ist jedoch nicht auf das Pankreaskarzinom beschränkt. Die TIMP-1 Spiegel sind in verschiedenen Tumorerkrankungen erhöht und mit einer schlechten Prognose assoziiert [Ylisirniö *et al.*, 2000; de Mingo *et al.*, 2007; Birgisson *et al.*, 2010]. Im Kolorektalkarzinom, das ebenfalls eine hohe Prävalenz von Lebermetastasen aufweist, ist die Interaktion von Tumorzellen mit aktivierten HSCs während der Metastasierung bereits gut charakterisiert [Eveno *et al.*, 2015; Illemann *et al.*, 2015] und hohe TIMP-1 Spiegel sind in dieser Tumorentität ebenfalls mit der Anwesenheit von Lebermetastasen assoziiert [Zeng *et al.*, 1995; Bunatova *et al.*, 2012; Seubert *et al.*, 2015]. Dies weist darauf hin, dass TIMP-1 auch in anderen Tumorentitäten durch Aktivierung von HSCs und Ausbildung einer hepatischen prämetastatischen Nische die Metastasierung in die Leber fördern könnte. Nicht nur bei Krebserkrankungen ist die Expression von TIMP-1 dereguliert, sondern auch bei verschiedensten anderen Pathologien, wie beispielsweise akuten bzw. chronischen Entzündungen und bakteriellen sowie viralen Infektionen [Khokha *et al.*, 2013], Fibrose [Iredale, 1997] und Autoimmunerkrankungen [Korematsu *et al.*, 2012]. Diese Erkrankungen stellen somit möglicherweise einen Risikofaktor für die Ausbildung von Lebermetastasen dar, und daher ist eine sorgfältige Evaluierung der diagnostischen Relevanz von TIMP-1 in einem breiteren klinischen Kontext sicherlich von Interesse.

4.6. Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass TIMP-1 durch die Aktivierung von HSCs die Ausbildung einer rezeptiven Leberumgebung auslösen und so die frühe und effiziente Metastasierung des Pankreaskarzinoms fördern kann. Dies wurde vornehmlich in Mausmodellen untersucht und in weiterführenden Studien sollte geklärt werden, ob dies von klinischer Relevanz ist, um die Bedeutung von TIMP-1 als Risikofaktor für die extrem frühe Metastasierung des Pankreaskarzinoms abschätzen zu können. Das in dieser Arbeit entwickelte Modell der TIMP-1-induzierten prämetastatischen Nische in der Leber bei Pankreaskarzinom bietet diverse therapeutische Ansatzpunkte. Zum einen eröffnen die identifizierten Mediatoren die Möglichkeit zur therapeutischen Interferenz *down-stream*

4. Diskussion

von TIMP-1, welches selbst aufgrund seiner zentralen Rolle beim Erhalt der Gewebemöostase [Edwards *et al.*, 2008] als Zielstruktur sehr kritisch betrachtet werden muss. So sind inhibitorische Antikörper gegen CD63 verfügbar [Mazzocca *et al.*, 2002] sowie selektive, bioverfügbare synthetische PI3K Inhibitoren der nächsten Generation [McNamara und Degterev, 2011]. Die TIMP-1-induzierten Nischenfaktoren könnten möglicherweise ebenfalls therapeutisch genutzt werden. Die hier gezeigten Ergebnisse weisen zudem auf die Möglichkeit hin, dass durch eine transiente Interferenz mit TIMP-1 in der Leber die Selbsterhaltung der prämetastatischen Nische durchbrochen werden könnte.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
α SMA	<i>αsmooth muscle actin</i>
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CD63	<i>Cluster of differentiation 63</i>
cm	Zentimeter
Col1a1	<i>collagen type 1a1</i>
CP	Chronische Pankreatitis
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
d	Tag(e)
d. h.	das heißt
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
etc.	<i>etcetera</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
g	Gramm
G	Guanin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIF1 α	<i>hypoxia-inducible factor 1 α</i>
HSC(s)	<i>hepatic stellate cell(s)</i>
ifu	<i>infectious units</i>
IHC	Immunhistochemie
i.v.	intravenös
Kras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
l	Liter
LOX	Lysyloxidase
Lsg.	Lösung
M	molar (mol/l)

Abkürzungsverzeichnis

mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
nt	Nukleotid
PDAC	<i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
Pdx-1	<i>pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI3K	Phosphoinositol-3-kinase
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
s.c.	<i>subcutaneous</i>
SDF-1	<i>stromal-derived factor-1</i>
sec	Sekunde(n)
T	Thymin
TGF β	<i>transforming growth factorβ</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factorα</i>
Trp53	<i>transformation-related protein 53</i>
U	Uracil
V	Volt
v. a.	vor allem
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

1.1. Direkte und indirekte Signalfunktionen von TIMP-1.	4
1.2. Aktivierung von HSCs.	13
1.3. Prävalenz von Lebermetastasen bei Pankreaskarzinom.	16
1.4. PanIN-basiertes Progressionsmodell des PDAC.	17
1.5. TIMP-1 Plasmalevel und Überleben bei PDAC.	18
3.1. TIMP-1 Expression in fortschreitenden PanIN Läsionen des Menschen. .	59
3.2. Heterogenität der TIMP-1 Expression in invasivem, humanem PDAC. . .	60
3.3. Quantifizierung der TIMP-1 Expression in humanem PDAC.	61
3.4. Keine Korrelation von TIMP-1 <i>Histoscores</i> und Tumorgrad in humanem PDAC.	62
3.5. Korrelation der TIMP-1 Plasmaspiegel mit der Anwesenheit von Lebermetastasen in PDAC Patienten.	63
3.6. Expression von TIMP-1 im Pankreas im Verlauf der Erkrankung in KPC Mäusen.	64
3.7. Plasmaspiegel von TIMP-1 im Verlauf der Erkrankung in KPC Mäusen. .	65
3.8. Korrelation von TIMP-1 in Pankreas und Plasma von KPC Mäusen. . . .	66
3.9. Histologischen Anzeichen für HSC Aktivierung in KPC Mäusen abhängig vom TIMP-1 Genotyp.	67
3.10. HSC Aktivierung in SCID Mäusen mit TIMP-1-überexprimierenden NIH3T3 Tumoren.	68
3.11. Histologischen Anzeichen für HSC Aktivierung in AdTIMP-1-transduzierten Mäusen.	69
3.12. Aufgereinigte HSC Fraktionen aus AdTIMP-1-transduzierten Mäusen. . .	70
3.13. Erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern in HSC Fraktionen aus AdTIMP-1-transduzierten Mäusen.	71
3.14. Erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern in humanen HSCs nach Stimulation mit rekTIMP-1.	72
3.15. Autoregulation von TIMP-1 in HSCs.	74
3.16. <i>Knock-down</i> von TIMP-1 in humanen HSCs.	75
3.17. Reduktion von Aktivierungsmarkern in pHSCs mit TIMP-1 <i>knock-down</i> . .	76
3.18. Reduktion von Aktivierungsmarkern in LX2 Zellen mit TIMP-1 <i>knock-down</i> . 77	
3.19. Wiederherstellung der Expression von Aktivierungsmarkern in HSCs mit TIMP-1 <i>knock-down</i> durch rekTIMP-1.	78
3.20. Überexpression von TIMP-1 HSCs.	79
3.21. Anstieg von Aktivierungsmarkern in humanen HSCs mit TIMP-1 Überexpression.	80
3.22. LDA Analyse von Aktivierungsmarkern und prometastatischen Genen in aufgereinigten HSC Fraktionen aus Mäusen mit hohen TIMP-1 Spiegel. 82	

3.23. Identifizierung TIMP-1-induzierter prometastatischer Gene in murinen sowie humanen HSCs.	83
3.24. Reduzierte Expression prometastatischer Gene in humanen HSCs mit TIMP-1 <i>knock-down</i>	84
3.25. Beeinflussung der Motilität humaner HSCs durch Manipulation der TIMP-1 Expressionslevel.	85
3.26. Wiederherstellung der Motilität von HSCs mit TIMP-1 <i>knock-down</i> durch rekTIMP-1.	86
3.27. Keine Beeinflussung der Proliferation humaner HSCs durch Manipulation der TIMP-1 Expressionslevel.	87
3.28. Keine Beeinflussung der Motilität humaner HSCs durch Stimulation mit rekN-TIMP-1.	88
3.29. Keine Beeinflussung der Aktivierung humaner HSCs durch Stimulation mit rekN-TIMP-1.	89
3.30. Keine Beeinflussung der Expression prometastatischer Gene in humanen HSCs durch Stimulation mit rekN-TIMP-1.	90
3.31. Keine Beeinflussung der HSC Aktivierung in Mäusen mit hohen N-TIMP-1 Spiegeln.	91
3.32. Keine Beeinflussung der Expression von Aktivierungsmarkern in HSC Fraktionen aus Mäusen mit hohen N-TIMP-1 Spiegeln.	92
3.33. Unveränderte Expression prometastatischer Gene in aufgereinigten HSC Fraktionen aus Mäusen mit hohen TIMP-1 Spiegeln.	93
3.34. Induktion des PI3K Signalweges in LX2 Zellen durch TIMP-1.	95
3.35. Induktion des PI3K Signalweges in pHSCs durch TIMP-1.	96
3.36. Abhängigkeit der TIMP-1-vermittelten PI3K Aktivierung in HSCs <i>in vivo</i> von der C-terminalen Domäne.	97
3.37. Keine Induktion von Aktivierung und Motilität humaner HSCs durch TIMP-1 in Anwesenheit synthetischer PI3K Inhibitoren.	98
3.38. Keine Induktion prometastatischer Gene in humanen HSCs durch TIMP-1 in Anwesenheit synthetischer PI3K Inhibitoren.	99
3.39. Reduzierte HSC Aktivierung in wortmanninbehandelten Mäusen mit hohen TIMP-1 Spiegeln.	100
3.40. Reduzierte Metastasierung in wortmanninbehandelten AdTIMP-1 Mäusen.	101
3.41. <i>Knock-down</i> von CD63 in humanen HSCs.	102
3.42. Keine Induktion der Motilität von HSCs mit CD63 <i>knock-down</i> durch rekTIMP-1.	103
3.43. Abhängigkeit der HSC-aktivierenden Effekte von TIMP-1 vom CD63-Genotyp <i>in vivo</i>	104
3.44. Abhängigkeit der HSC-aktivierenden Effekte von TIMP-1 von hepatischem CD63 <i>in vivo</i>	105
3.45. Abhängigkeit der prometastatischen Effekte von TIMP-1 <i>in vivo</i> von der Anwesenheit von CD63 in der Leber.	106
4.1. Vorgeschlagenes Modell zur TIMP-1-induzierten HSC-vermittelten prämetastatischen Nische in der Leber bei PDAC.	119

Tabellenverzeichnis

2.1. Verwendete Chemikalien	22
2.2. Verwendete Verbrauchsmaterialien	24
2.3. Verwendete Geräte	25
2.4. Verwendete Software	25
2.5. Verwendete Antikörper	26
2.6. Verwendete Kits	27
2.7. Tierversuchsanordnung zur Überexpression von TIMP-1 s.c. NIH3T3 Tu- moren	31
2.8. Tierversuchsanordnung zur adenoviralen Überexpression von TIMP-1 in Mäusen über 9 Tage	31
2.9. Tierversuchsanordnung zur adenoviralen Überexpression von TIMP-1 in Mäusen über 3 Tage	32
2.10. Tierversuchsanordnung zur Überexpression von TIMP-1 bei gleichzeiti- gem <i>knock-down</i> von CD63 in Mäusen	32
2.11. Tierversuchsanordnung zur Überexpression von TIMP-1 bei gleichzeiti- gem <i>knock-down</i> von CD63 in Mäusen	33
2.12. Tierversuchsanordnung zur Überexpression von TIMP-1 unter Wortmannin- Behandlung	33
2.14. Verwendete Antikörperkombinationen und -verdünnungen für immunhi- stochemische Färbungen auf Paraffinschnitten	36
2.15. Verwendete Antikörperkombinationen und -verdünnungen für immunhi- stochemische Färbungen auf Kryoschnitten	38
2.16. Bewertungsskalen zur Quantifizierung immunhistochemischer Analysen .	39
2.17. Verwendete Zellkulturmedien	43
2.18. Medienzusätze für die Zellkultur	43
2.19. Lentivirale Verpackungsplasmide für die Herstellung von Virionen	45
2.20. Verwendete Transferplasmide	45
2.21. Pipettierschema zur Herstellung von SDS-Gelen	50
2.22. Verwendete Antikörperkombinationen und -verdünnungen für <i>Western</i> <i>Blot</i> Analysen	52
2.23. Reaktionsansatz für die Reverse Transkription	54
2.25. Reaktionsansätze für die qRT-PCR	55
2.27. <i>Primer-Probe-Kombinationen, F.; forward Primer, R.; reverse Primer</i> . .	57
A.1. Auswahl HSC aktivierungs- und metastasierungsassoziierter Gene für die LDA Analyse	147

Literaturverzeichnis

- Acharyya, S., Oskarsson, T., Vanharanta, S., Malladi, S., Kim, J., Morris, P. G., Manova-Todorova, K., Leversha, M., Hogg, N., Seshan, V. E., Norton, L., Brogi, E., und Masagué, J. (2012). A cxcl1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell*, 150(1):165–178.
- Aiken, C. (1997). Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (hiv-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets hiv-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for nef and the sensitivity to cyclosporin a. *J Virol*, 71(8):5871–5877.
- Amann, T., Bataille, F., Spruss, T., Mühlbauer, M., Gäbele, E., Schölmerich, J., Kiefer, P., Bosserhoff, A.-K., und Hellerbrand, C. (2009). Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, 100(4):646–653.
- Amour, A., Knight, C. G., Webster, A., Slocombe, P. M., Stephens, P. E., Knäuper, V., Docherty, A. J., und Murphy, G. (2000). The in vitro activity of adam-10 is inhibited by timp-1 and timp-3. *FEBS Lett*, 473(3):275–279.
- Bachem, M. G., Schünemann, M., Ramadani, M., Siech, M., Beger, H., Buck, A., Zhou, S., Schmid-Kotsas, A., und Adler, G. (2005). Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology*, 128(4):907–921.
- Barbera-Guillem, E., Rocha, M., Alvarez, A., und Vidal-Vanaclocha, F. (1991). Differences in the lectin-binding patterns of the periportal and perivenous endothelial domains in the liver sinusoids. *Hepatology*, 14(1):131–139.
- Bataller, R. und Brenner, D. A. (2005). Liver fibrosis. *J Clin Invest*, 115(2):209.
- Benihoud, K., Yeh, P., und Perricaudet, M. (1999). Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol*, 10(5):440–447.
- Bergmann, F., Wandschneider, F., Sipos, B., Moldenhauer, G., Schniewind, B., Welsch, T., Schirrmacher, P., Klöppel, G., Altevogt, P., Schäfer, H., und Sebens Mürköster, S. (2010). Elevated I1cam expression in precursor lesions and primary and metastatic tissues of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Rep*, 24(4):909–915.
- Bett, A. J., Haddara, W., Prevec, L., und Graham, F. L. (1994). An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(19):8802–8806.

- Birgisson, H., Nielsen, H. J., Christensen, I. J., Glimelius, B., und Brünner, N. (2010). Preoperative plasma timp-1 is an independent prognostic indicator in patients with primary colorectal cancer: a prospective validation study. *Eur J Cancer*, 46(18):3323–3331.
- Blobel, C. (2002). Functional and biochemical characterization of adams and their predicted role in protein ectodomain shedding. *Inflammation Res*, 51(2):83–84.
- Bloomston, M., Shafii, A., Zervos, E., und Rosemurgy, A. S. (2005). Timp-1 antisense gene transfection attenuates the invasive potential of pancreatic cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Am J Surg*, 189(6):675–679.
- Bloomston, M., Shafii, A., Zervos, E. E., und Rosemurgy, A. S. (2002). Timp-1 overexpression in pancreatic cancer attenuates tumor growth, decreases implantation and metastasis, and inhibits angiogenesis. *J Surg Res*, 102(1):39–44.
- Bosman, F. T., Carneiro, F., Hruban, R. H., Theise, N. D., et al. (2010). *WHO classification of tumours of the digestive system*. Number Ed. 4. World Health Organization.
- Botta, G. P., Reichert, M., Reginato, M. J., Heeg, S., Rustgi, A. K., und Lelkes, P. I. (2013). Erk2-regulated timp1 induces hyperproliferation of k-ras(g12d)-transformed pancreatic ductal cells. *Neoplasia*, 15(4):359–372.
- Bourd-Boittin, K., Basset, L., Bonnier, D., L'Helgoualc'h, A., Samson, M., und Théret, N. (2009). Cx3cl1/fractalkine shedding by human hepatic stellate cells: contribution to chronic inflammation in the liver. *J Cell Mol Med*, 13(8a):1526–1535.
- Brew, K., Dinakarpanian, D., und Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et biophysica acta*, 1477(1-2):267–283.
- Brown, D. M. und Ruoslahti, E. (2004). Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell*, 5(4):365–374.
- Bunatova, K., Pesta, M., Kulda, V., Topolcan, O., Vrzalova, J., Sutnar, A., Treska, V., Pecen, L., und Liska, V. (2012). Plasma timp1 level is a prognostic factor in patients with liver metastases. *Anticancer Res*, 32(10):4601–4606.
- Busk, T. M., Bendtsen, F., Nielsen, H. J., Jensen, V., Brünner, N., und Møller, S. (2014). Timp-1 in patients with cirrhosis: relation to liver dysfunction, portal hypertension, and hemodynamic changes. *Scand J Gastroenterol*, 49(9):1103–1110.
- Campbell, J. S., Hughes, S. D., Gilbertson, D. G., Palmer, T. E., Holdren, M. S., Haran, A. C., Odell, M. M., Bauer, R. L., Ren, H.-P., Haugen, H. S., Yeh, M. M., und Fausto, N. (2005). Platelet-derived growth factor c induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(9):3389–3394.
- Chafe, S. C., Lou, Y., Sceneay, J., Vallejo, M., Hamilton, M. J., McDonald, P. C., Bennewith, K. L., Möller, A., und Dedhar, S. (2015). Carbonic anhydrase ix promotes myeloid-derived suppressor cell mobilization and establishment of a metastatic niche by stimulating g-csf production. *Cancer Res*, 75(6):996–1008.

- Chambers, A. F., Groom, A. C., und MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2(8):563–572.
- Chang, D. K., Merrett, N. D., Biankin, A. V., und , N. S. W. P. C. N. (2008). Improving outcomes for operable pancreatic cancer: is access to safer surgery the problem? *J Gastroenterol Hepatol*, 23(7 Pt 1):1036–1045.
- Chen, Y.-X., Weng, Z.-H., und Zhang, S.-L. (2012). Notch3 regulates the activation of hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol*, 18(12):1397–1403.
- Cheng, J., Imanishi, H., Liu, W., Iwasaki, A., Ueki, N., Nakamura, H., und Hada, T. (2002). Inhibition of the expression of alpha-smooth muscle actin in human hepatic stellate cell line, li90, by a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, ns-398. *Biochem Biophys Res Commun*, 297(5):1128–1134.
- Chirco, R., Liu, X.-W., Jung, K.-K., und Kim, H.-R. C. (2006). Novel functions of timp3 in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev*, 25(1):99–113.
- Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B. K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M. T., Molina, H., Xiang, J., Zhang, T., Theilen, T.-M., Garcia-Santos, G., Williams, C., Ararso, Y., Huang, Y., Rodrigues, G., Shen, T.-L., Labori, K. J., Lothe, I. M. B., Kure, E. H., Hernandez, J., Doussot, A., Ebbesen, S. H., Grandgenett, P. M., Hollingsworth, M. A., Jain, M., Mallya, K., Batra, S. K., Jarnagin, W. R., Schwartz, R. E., Matei, I., Peinado, H., Stanger, B. Z., Bromberg, J., und Lyden, D. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol*, 17(6):816–826.
- Cox, T. R., Bird, D., Baker, A.-M., Barker, H. E., Ho, M. W.-Y., Lang, G., und Erler, J. T. (2013). LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res*, 73(6):1721–1732.
- Cui, H., Seubert, B., Stahl, E., Dietz, H., Reuning, U., Moreno-Leon, L., Ilie, M., Hofman, P., Nagase, H., Mari, B., *et al.* (2014). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 induces a pro-tumourigenic increase of mir-210 in lung adenocarcinoma cells and their exosomes. *Oncogene*, 34(28):3640–50.
- Cui, X., Shimizu, I., Lu, G., Itonaga, M., Inoue, H., Shono, M., Tamaki, K., Fukuno, H., Ueno, H., und Ito, S. (2003). Inhibitory effect of a soluble transforming growth factor beta type ii receptor on the activation of rat hepatic stellate cells in primary culture. *J Hepatol*, 39(5):731–737.
- D’Angelo, R. C., Liu, X.-W., Najy, A. J., Jung, Y. S., Won, J., Chai, K. X., Fridman, R., und Kim, H.-R. C. (2014). Timp-1 via twist1 induces emt phenotypes in human breast epithelial cells. *Mol Cancer Res*, 12(9):1324–1333.
- de Mingo, M., Morán, A., Sánchez-Pernaute, A., Iniesta, P., Díez-Valladares, L., Pérez-Aguirre, E., de Juan, C., García-Aranda, C., Díaz-López, A., García-Botella, A., Martín-Antona, E., Benito, M., Torres, A., und Balibrea, J. L. (2007). Expression of mmp-9 and timp-1 as prognostic markers in gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 54(73):315–319.

- De Minicis, S., Marzioni, M., Saccomanno, S., Rychlicki, C., Agostinelli, L., Trozzi, L., Benedetti, A., und Svegliati-Baroni, G. (2011). Cellular and molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis leading to liver cancer. *Transl Gastrointest Cancer*, 1(1):88–94.
- Dietrich, W. F., Miller, J., Steen, R., Merchant, M. A., Damron-Boles, D., Husain, Z., Dredge, R., Daly, M. J., Ingalls, K. A., O'Connor, T. J., *et al.* (1996). A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature*, 380(6570):149–152.
- 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(1):379–387.
- Edwards, D., Hoyer-Hansen, G., Blasi, F., und Sloane, B. F. (2008). *The cancer degrome: proteases and cancer biology*. Springer Science & Business Media.
- Elezkurtaj, S., Kopitz, C., Baker, A. H., Perez-Cantó, A., Arlt, M. J. E., Khokha, R., Gansbacher, B., Anton, M., Brand, K., und Krüger, A. (2004). Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the liver: efficient protection against t-cell lymphoma and colon carcinoma metastasis. *J Gene Med*, 6(11):1228–1237.
- Erkan, M., Weis, N., Pan, Z., Schwager, C., Samkharadze, T., Jiang, X., Wirkner, U., Giese, N. A., Ansorge, W., Debus, J., Huber, P. E., Friess, H., Abdollahi, A., und Kleeff, J. (2010). Organ-, inflammation- and cancer specific transcriptional fingerprints of pancreatic and hepatic stellate cells. *Mol Cancer*, 9:88.
- Erler, J. T., Bennewith, K. L., Cox, T. R., Lang, G., Bird, D., Koong, A., Le, Q.-T., und Giaccia, A. J. (2009). Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell*, 15(1):35–44.
- Eveno, C., Hainaud, P., Rampanou, A., Bonnin, P., Bakhouché, S., Dupuy, E., Contre-res, J.-O., und Pocard, M. (2015). Proof of prometastatic niche induction by hepatic stellate cells. *J Surg Res*, 194(2):496–504.
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3(6):453–458.
- Friedman, S. L. (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*, 275(4):2247–2250.
- Friedman, S. L. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*, 88(1):125–172.
- Gäbele, E., Reif, S., Tsukada, S., Bataller, R., Yata, Y., Morris, T., Schrum, L. W., Brenner, D. A., und Rippe, R. A. (2005). The role of p70s6k in hepatic stellate cell collagen gene expression and cell proliferation. *J Biol Chem*, 280(14):13374–13382.
- Geiger, T. R. und Peeper, D. S. (2009). Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1796(2):293–308.

- Gentilini, A., Marra, F., Gentilini, P., und Pinzani, M. (2000). Phosphatidylinositol-3 kinase and extracellular signal-regulated kinase mediate the chemotactic and mitogenic effects of insulin-like growth factor-1 in human hepatic stellate cells. *J Hepatol*, 32(2):227–234.
- Gherardi, E., Birchmeier, W., Birchmeier, C., und Woude, G. V. (2012). Targeting met in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer*, 12(2):89–103.
- Ghosh, A. K. und Vaughan, D. E. (2012). Pai-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol*, 227(2):493–507.
- Gilbert, H., Kagan, A., und Hintz, B. (1982). *Patterns of metastases. Liver metastases*. Hall Medical Publishers, Boston, USA, pp 19–39.
- Greig, R. G., Koestler, T. P., Trainer, D. L., Corwin, S. P., Miles, L., Kline, T., Sweet, R., Yokoyama, S., und Poste, G. (1985). Tumorigenic and metastatic properties of normal ras-transfected NIH/3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(11):3698–3701.
- Grek, C. L., Townsend, D. M., Uys, J. D., Manevich, Y., Coker, 3rd, W. J., Pazoles, C. J., und Tew, K. D. (2012). S-glutathionylated serine proteinase inhibitors as plasma biomarkers in assessing response to redox-modulating drugs. *Cancer Res*, 72(9):2383–2393.
- Gress, T. M., Müller-Pillasch, F., Lerch, M. M., Friess, H., Bächler, 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(4):407–413.
- Gupta, G. P. und Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4):679–695.
- 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 $\alpha 3$ chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via $\alpha v \beta 3$ integrin. *Cancer Cell*, 3(6):589–601.
- Hansel, D. E., Kern, S. E., und Hruban, R. H. (2003). Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 4:237–256.
- Hartley, M. L., Bade, N. A., Prins, P. A., Ampie, L., und Marshall, J. L. (2015). Pancreatic cancer, treatment options, and GI-4000. *Hum Vaccin Immunother*, 11(4):931–937.
- Hazra, S., Miyahara, T., Rippe, R. A., und Tsukamoto, H. (2004). PPAR γ and hepatic stellate cells. *Comp Hepatol*, 3 Suppl 1:S7.
- He, C., He, P., Liu, L. P., und Zhu, Y. S. (2001). Analysis of expressions of components in the plasminogen activator system in high- and low-metastatic human lung cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 127(3):180–186.

- Hembry, R. M., Murphy, G., und Reynolds, J. J. (1985). Immunolocalization of tissue inhibitor of metalloproteinases (timp) in human cells. characterization and use of a specific antiserum. *J Cell Sci*, 73:105–119.
- Hemler, M. E. (2005). Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(10):801–811.
- Hemmann, S., Graf, J., Roderfeld, M., und Roeb, E. (2007). Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis: a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol*, 46(5):955–975.
- Hess, K. R., Varadhachary, G. R., Taylor, S. H., Wei, W., Raber, M. N., Lenzi, R., und Abbruzzese, J. L. (2006). Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer*, 106(7):1624–1633.
- Higazi, A. A., El-Haj, M., Melhem, A., Horani, A., Pappo, O., Alvarez, C. E., Muhanna, N., Friedman, S. L., und Safadi, R. (2008). Immunomodulatory effects of plasminogen activators on hepatic fibrogenesis. *Clin Exp Immunol*, 152(1):163–173.
- Hingorani, S. R., Wang, L., Multani, A. S., Combs, C., Deramaudt, T. B., Hruban, R. H., Rustgi, A. K., Chang, S., und Tuveson, D. A. (2005). Trp53^{r172h} and Kras^{G12d} cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*, 7(5):469–483.
- Hiratsuka, S., Watanabe, A., Aburatani, H., und Maru, Y. (2006). Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol*, 8(12):1369–1375.
- Hiratsuka, S., Watanabe, A., Sakurai, Y., Akashi-Takamura, S., Ishibashi, S., Miyake, K., Shibuya, M., Akira, S., Aburatani, H., und Maru, Y. (2008). The s100a8-serum amyloid a3-tlr4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol*, 10(11):1349–1355.
- Hitt, M. M., Addison, C. L., und Graham, F. L. (1997). Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells. *Adv Pharmacol*, 40:137–206.
- Hou, Y., Zou, Q., Ge, R., Shen, F., und Wang, Y. (2012). The critical role of cd133(+)/cd44(+)/high tumor cells in hematogenous metastasis of liver cancers. *Cell Res*, 22(1):259–272.
- Hruban, R. H., Takaori, K., Klimstra, D. S., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., Biankin, S. A., Compton, C., Fukushima, N., Furukawa, T., *et al.* (2004). An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol*, 28(8):977–987.
- Huang, C.-Y., Fong, Y.-C., Lee, C.-Y., Chen, M.-Y., Tsai, H.-C., Hsu, H.-C., und Tang, C.-H. (2009). Ccl5 increases lung cancer migration via pi3k, akt and nf- κ b pathways. *Biochem Pharmacol*, 77(5):794–803.

- Hudson, B. D., Kulp, K. S., und Loots, G. G. (2013). Prostate cancer invasion and metastasis: insights from mining genomic data. *Brief Funct Genomics*, 12(5):397–410.
- Illemann, M., Eefsen, R. H. L., Bird, N. C., Majeed, A., Osterlind, K., Laerum, O. D., Alpizar-Alpizar, W., Lund, I. K., und Høyer-Hansen, G. (2015). Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 expression in colorectal cancer liver metastases is associated with vascular structures. *Mol Carcinog*, doi: 10.1002/mc.22269.
- Imai, K., Karasaki, H., Ono, Y., Sasajima, J., Chiba, S.-i., Funakoshi, H., Muraki, M., Hanaoka, H., Furukawa, T., Furukawa, H., *et al.* (2014). Metachronous pancreatic cancer originating from disseminated founder pancreatic intraductal neoplasias (panins): Study using human specimen to reconsider mode of pancreatic cancer progression and recurrence. *Journal Pathol: Clin Res*, 1(2):76–8.
- Inoue, M., Sawada, T., Uchima, Y., Kimura, K., Nishihara, T., Tanaka, H., Yashiro, M., Yamada, N., Ohira, M., und Hirakawa, K. (2005). Plasminogen activator inhibitor-1 (pai-1) gene transfection inhibits the liver metastasis of pancreatic cancer by preventing angiogenesis. *Oncol Rep*, 14(6):1445–1451.
- Iredale, J. P. (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 29(1):43–54.
- Irmisch, A. und Huelsken, J. (2013). Metastasis: New insights into organ-specific extravasation and metastatic niches. *Exp Cell Res*, 319(11):1604–1610.
- Jainchill, J. L., Aaronson, S. A., und Todaro, G. J. (1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol*, 4(5):549–553.
- Ji, J., Yu, F., Ji, Q., Li, Z., Wang, K., Zhang, J., Lu, J., Chen, L., E, Q., Zeng, Y., und Ji, Y. (2012). Comparative proteomic analysis of rat hepatic stellate cell activation: a comprehensive view and suppressed immune response. *Hepatology*, 56(1):332–349.
- Joergensen, M. T., Brünner, N., und De Muckadell, O. B. S. (2010). Comparison of circulating mmp-9, timp-1 and ca19-9 in the detection of pancreatic cancer. *Anticancer Res*, 30(2):587–592.
- Ju, M.-J., Qiu, S.-J., Fan, J., Xiao, Y.-S., Gao, Q., Zhou, J., Li, Y.-W., und Tang, Z.-Y. (2009). Peritumoral activated hepatic stellate cells predict poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma after curative resection. *Am J Clin Pathol*, 131(4):498–510.
- Jung, K.-K., Liu, X.-W., Chirco, R., Fridman, R., und Kim, H.-R. C. (2006). Identification of cd63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J*, 25(17):3934–3942.
- Jung, Y. S., Liu, X.-W., Chirco, R., Warner, R. B., Fridman, R., und Kim, H.-R. C. (2012). Timp-1 induces an emt-like phenotypic conversion in mdck cells independent of its mmp-inhibitory domain. *PLoS One*, 7(6):e38773.

- Kang, N., Gores, G. J., und Shah, V. H. (2011). Hepatic stellate cells: Partners in crime for liver metastases? *Hepatology*, 54(2):707–713.
- Kang, Y., Siegel, P. M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S. M., Cordon-Cardo, C., Guise, T. A., und Massagué, J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*, 3(6):537–549.
- Kaplan, R. N., Psaila, B., und Lyden, D. (2006a). Bone marrow cells in the 'pre-metastatic niche': within bone and beyond. *Cancer Metastasis Rev*, 25(4):521–529.
- Kaplan, R. N., Rafii, S., und Lyden, D. (2006b). Preparing the soil: the premetastatic niche. *Cancer Res*, 66(23):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., Zhu, Z., Hicklin, D., Wu, Y., Port, J. L., Altorki, N., Port, E. R., Ruggero, D., Shmelkov, S. V., Jensen, K. K., Rafii, S., und Lyden, D. (2005). Vegfr1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438(7069):820–827.
- Khokha, R. und Denhardt, D. T. (1989). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases: a review of their role in tumorigenesis and tissue invasion. *Invasion Metastasis*, 9(6):391–405.
- Khokha, R., Murthy, A., und Weiss, A. (2013). Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 13(9):649–665.
- Khokha, R. und Waterhouse, P. (1994). The role of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in specific aspects of cancer progression and reproduction. *J Neurooncol*, 18(2):123–127.
- Kim, S. und Karin, M. (2011). Role of tlr2-dependent inflammation in metastatic progression. *Ann N Y Acad Sci*, 1217:191–206.
- Kim, S., Takahashi, H., Lin, W.-W., Descargues, P., Grivennikov, S., Kim, Y., Luo, J.-L., und Karin, M. (2009). Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through tlr2 to stimulate metastasis. *Nature*, 457(7225):102–106.
- Kopitz, C., Gerg, M., Bandapalli, O. R., Ister, D., Pennington, C. J., Hauser, S., Flechsig, C., Krell, H.-W., Antolovic, D., Brew, K., Nagase, H., Stangl, M., von Weyhern, C. W. H., Brücher, B. L. D. M., Brand, K., Coussens, L. M., Edwards, D. R., und Krüger, A. (2007). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. *Cancer Res*, 67(18):8615–8623.
- Korematsu, S., Ohta, Y., Tamai, N., Takeguchi, M., Goto, C., Miyahara, H., Kawano, T., und Izumi, T. (2012). Cell distribution differences of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in patients with kawasaki disease. *Pediatr Infect Dis J*, 31(9):973–974.

- Kuvaja, P., Talvensaari-Mattila, A., und Turpeenniemi-Hujanen, T. (2008). High preoperative plasma timp-1 is prognostic for early relapse in primary breast carcinoma. *Int J Cancer*, 123(4):846–851.
- Lambert, E., Dassé, E., Haye, B., und Petitfrère, E. (2004). Timps as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*, 49(3):187–198.
- Lee, K. S., Buck, M., Houglum, K., und Chojkier, M. (1995). Activation of hepatic stellate cells by tgf alpha and collagen type i is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest*, 96(5):2461–2468.
- Lee, S., Jilani, S. M., Nikolova, G. V., Carpizo, D., und Iruela-Arispe, M. L. (2005). Processing of vegf-a by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol*, 169(4):681–691.
- Lee, S. H., Seo, G. S., Park, Y. N., Yoo, T. M., und Sohn, D. H. (2004). Effects and regulation of osteopontin in rat hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol*, 68(12):2367–2378.
- Lee, U. E. und Friedman, S. L. (2011). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 25(2):195–206.
- Lekstan, A., Olakowski, M., Jabłońska, B., Łabuzek, K., Olakowska, E., Filip, I., und Lampe, P. (2013). Concentration of gelatinases and their tissue inhibitors in pancreatic inflammatory and neoplastic tumors and their influence on the early postoperative course. *Pol Przegl Chir*, 85(2):65–72.
- Li, G., Fridman, R., und Kim, H.-R. C. (1999). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Res*, 59(24):6267–6275.
- Li, Z., Dranoff, J. A., Chan, E. P., Uemura, M., Sévigny, J., und Wells, R. G. (2007). Transforming growth factor-beta and substrate stiffness regulate portal fibroblast activation in culture. *Hepatology*, 46(4):1246–1256.
- Lin, H., Zhang, Y., Wang, H., Xu, D., Meng, X., Shao, Y., Lin, C., Ye, Y., Qian, H., und Wang, S. (2012). Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 transfer suppresses malignant behaviors of colorectal cancer cells. *Cancer Gene Ther*, 19(12):845–851.
- Liu, L., Chen, X., Wang, Y., Qu, Z., Lu, Q., Zhao, J., Yan, X., Zhang, H., und Zhou, Y. (2014). Notch3 is important for tgf- β -induced epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer bone metastasis by regulating zeb-1. *Cancer Gene Ther*, 21(9):364–372.
- Liu, W., Hou, Y., Chen, H., Wei, H., Lin, W., Li, J., Zhang, M., He, F., und Jiang, Y. (2011). Sample preparation method for isolation of single-cell types from mouse liver for proteomic studies. *Proteomics*, 11(17):3556–3564.
- Liu, X.-W., Taube, M. E., Jung, K.-K., Dong, Z., Lee, Y. J., Roshy, S., Sloane, B. F., Fridman, R., und Kim, H.-R. C. (2005). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells from extrinsic cell death: a potential oncogenic activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Cancer Res*, 65(3):898–906.

- Lüllmann-Rauch, R. (2006). *Taschenlehrbuch Histologie*. Thieme, Stuttgart, Deutschland.
- Lyu, X.-J., Li, H.-Z., Ma, X., Li, X.-T., Gao, Y., Ni, D., Shen, D.-L., Gu, L.-Y., Wang, B.-J., Zhang, Y., und Zhang, X. (2015). Elevated s100a6 (calcyclin) enhances tumorigenesis and suppresses cxcl14-induced apoptosis in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*, 6(9):6656–6669.
- Maecker, H. T., Todd, S. C., und Levy, S. (1997). The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *The FASEB Journal*, 11(6):428–442.
- Marra, F., Arrighi, M. C., Fazi, M., Caligiuri, A., Pinzani, M., Romanelli, R. G., Efsen, E., Laffi, G., und Gentilini, P. (1999). Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factor's actions in hepatic stellate cells, and is induced by in vivo liver injury in the rat. *Hepatology*, 30(4):951–958.
- Marra, F., Gentilini, A., Pinzani, M., Choudhury, G. G., Parola, M., Herbst, H., Dianzani, M. U., Laffi, G., Abboud, H. E., und Gentilini, P. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase is required for platelet-derived growth factor's actions on hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 112(4):1297–1306.
- Martin, D. C., Rüther, U., Sanchez-Sweatman, O. H., Orr, F. W., und Khokha, R. (1996). Inhibition of sv40 t antigen-induced hepatocellular carcinoma in timp-1 transgenic mice. *Oncogene*, 13(3):569–576.
- Masamune, A., Kikuta, K., Satoh, M., Kume, K., und Shimosegawa, T. (2003). Differential roles of signaling pathways for proliferation and migration of rat pancreatic stellate cells. *Tohoku J Exp Med*, 199(2):69–84.
- Mazzocca, A., Carloni, V., Sciammetta, S. C., Cordella, C., Pantaleo, P., Caldini, A., Gentilini, P., und Pinzani, M. (2002). Expression of transmembrane 4 superfamily (tm4sf) proteins and their role in hepatic stellate cell motility and wound healing migration. *J Hepatol*, 37(3):322–330.
- McCarthy, K., Maguire, T., McGreal, G., McDermott, E., O'Higgins, N., und Duffy, M. J. (1999). High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predict poor outcome in patients with breast cancer. *Int J Cancer*, 84(1):44–48.
- McNamara, C. R. und Degterev, A. (2011). Small-molecule inhibitors of the pi3k signaling network. *Future Med Chem*, 3(5):549–565.
- Meloche, S. und Pouyssegur, J. (2007). The erk1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the g1- to s-phase transition. *Oncogene*, 26(22):3227–3239.
- Minn, A. J., Kang, Y., Serganova, I., Gupta, G. P., Giri, D. D., Doubrovin, M., Ponomarev, V., Gerald, W. L., Blasberg, R., und Massagué, J. (2005). Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest*, 115(1):44–55.

- Mohammed, F. F., Pennington, C. J., Kassiri, Z., Rubin, J. S., Soloway, P. D., Ruther, U., Edwards, D. R., und Khokha, R. (2005). Metalloproteinase inhibitor timp-1 affects hepatocyte cell cycle via hgf activation in murine liver regeneration. *Hepatology*, 41(4):857–867.
- Moreira, J. M., Høeberg, M., Lademann, U. U., Viuff, B., Jensen, L. V., Stenvang, J., Nygård, S. B., Ørum-Madsen, M. S., Vistesén, M. V., Fuglsang, A. T., *et al.* (2015). Abstract p5-07-08: Identification and characterization of a new timp-1 binding protein. *Cancer Res*, 75(9 Supplement):P5–07.
- Motoyama, H., Komiya, T., Thuy, L. T. T., Tamori, A., Enomoto, M., Morikawa, H., Iwai, S., Uchida-Kobayashi, S., Fujii, H., Hagihara, A., Kawamura, E., Murakami, Y., Yoshizato, K., und Kawada, N. (2014). Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver. *Lab Invest*, 94(2):192–207.
- Mowa, M. B., Crowther, C., und Arbuthnot, P. (2010). Therapeutic potential of adenoviral vectors for delivery of expressed rna1 activators. *Expert Opin Drug Deliv*, 7(12):1373–1385.
- Mroczko, B., Lukaszewicz-Zajac, M., Wereszczynska-Siemiatkowska, U., Groblewska, M., Gryko, M., Kedra, B., Jurkowska, G., und Szmítkowski, M. (2009). Clinical significance of the measurements of serum matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor (tissue inhibitor of metalloproteinase-1) in patients with pancreatic cancer: metalloproteinase-9 as an independent prognostic factor. *Pancreas*, 38(6):613–618.
- Murata, S., Maruyama, T., Nowatari, T., Takahashi, K., und Ohkohchi, N. (2014). Signal transduction of platelet-induced liver regeneration and decrease of liver fibrosis. *Int J Mol Sci*, 15(4):5412–5425.
- Nagase, H., Visse, R., und Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and timp-1. *Cardiovasc Res*, 69(3):562–573.
- Nakamura, T., Arii, S., Monden, K., Furutani, M., Takeda, Y., Imamura, M., Tominaga, M., und Okada, Y. (1998). Expression of the na⁺/ca²⁺ exchanger emerges in hepatic stellate cells after activation in association with liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(9):5389–5394.
- Okabe, H., Beppu, T., Hayashi, H., Horino, K., Masuda, T., Komori, H., Ishikawa, S., Watanabe, M., Takamori, H., Iyama, K.-i., und Baba, H. (2009). Hepatic stellate cells may relate to progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol*, 16(9):2555–2564.
- Okabe, H., Beppu, T., Hayashi, H., Ishiko, T., Masuda, T., Otao, R., Horlad, H., Jono, H., Ueda, M., Phd, S. S., Ando, Y., und Baba, H. (2011). Hepatic stellate cells accelerate the malignant behavior of cholangiocarcinoma cells. *Ann Surg Oncol*, 18(4):1175–1184.
- Olaso, E., Salado, C., Egilegor, E., Gutierrez, V., Santisteban, A., Sancho-Bru, P., Friedman, S. L., und Vidal-Vanaclocha, F. (2003). Proangiogenic role of tumor-activated

- hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. *Hepatology*, 37(3):674–685.
- Olaso, E., Santisteban, A., Bidaurrazaga, J., Gressner, A. M., Rosenbaum, J., und Vidal-Vanaclocha, F. (1997). Tumor-dependent activation of rodent hepatic stellate cells during experimental melanoma metastasis. *Hepatology*, 26(3):634–642.
- Olive, K. P. und Tuveson, D. A. (2006). The Use of Targeted Mouse Models for Preclinical Testing of Novel Cancer Therapeutics. *Clin Cancer Res*, 12(18):5277–5287.
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J., und Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(3):221–233.
- Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev*, 8(2):98–101.
- Pan, S., Chen, R., Brand, R. E., Hawley, S., Tamura, Y., Gafken, P. R., Milless, B. P., Goodlett, D. R., Rush, J., und Brentnall, T. A. (2012). Multiplex targeted proteomic assay for biomarker detection in plasma: a pancreatic cancer biomarker case study. *J Proteome Res*, 11(3):1937–1948.
- Pan, S., Chen, R., Crispin, D. A., May, D., Stevens, T., McIntosh, M. W., Bronner, M. P., Ziogas, A., Anton-Culver, H., und Brentnall, T. A. (2011). Protein alterations associated with pancreatic cancer and chronic pancreatitis found in human plasma using global quantitative proteomics profiling. *J Proteome Res*, 10(5):2359–2376.
- Panigrahy, D., Singer, S., Shen, L. Q., Butterfield, C. E., Freedman, D. A., Chen, E. J., Moses, M. A., Kilroy, S., Duensing, S., Fletcher, C., Fletcher, J. A., Hlatky, L., Hahnfeldt, P., Folkman, J., und Kaipainen, A. (2002). Ppargamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J Clin Invest*, 110(7):923–932.
- Peinado, H., Alexandrowic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., Garcia-Santos, G., Ghajar, C. M., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B. A., Callahan, M. K., Yuan, J., Martins, V. R., Skog, J., Kaplan, R. N., Brady, M. S., Wolchok, J. D., Chapman, P. B., Kang, Y., Bromberg, J., und Lyden, D. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine*, 18(6):883–891.
- Peinado, H., Lavotshkin, S., und Lyden, D. (2011). The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol*, 21(2):139–146.
- Perepelyuk, M., Terajima, M., Wang, A. Y., Georges, P. C., Janmey, P. A., Yamauchi, M., und Wells, R. G. (2013). Hepatic stellate cells and portal fibroblasts are the major cellular sources of collagens and lysyl oxidases in normal liver and early after injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 304(6):G605–G614.

- Pickren, J., Tsukada, Y., und Lane, W. (1982). *Liver metastasis. Analysis of autopsy data*. GK Hall and Company, Boston, US, pp 2–18.
- Pols, M. S. und Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin cd63. *Exp Cell Res*, 315(9):1584–1592.
- Poruk, K. E., Firpo, M. A., Scaife, C. L., Adler, D. G., Emerson, L. L., Boucher, K. M., und Mulvihill, S. J. (2013). Serum osteopontin and timp-1 as diagnostic and prognostic biomarkers for pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*, 42(2):193.
- Psaila, B., Kaplan, R. N., Port, E. R., und Lyden, D. (2006). Priming the 'soil' for breast cancer metastasis: the pre-metastatic niche. *Breast Dis*, 26:65–74.
- Psaila, B. und Lyden, D. (2009). The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*, 9(4):285–293.
- Puche, J. E., Lee, Y. A., Jiao, J., Aloman, C., Fiel, M. I., Muñoz, U., Kraus, T., Lee, T., Yee, H. F., und Friedman, S. L. (2013). A novel murine model to deplete hepatic stellate cells uncovers their role in amplifying liver damage in mice. *Hepatology*, 57(1):339–350.
- Qian, B.-Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L. R., Kaiser, E. A., Snyder, L. A., und Pollard, J. W. (2011). Ccl2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*, 475(7355):222–225.
- Ramezani-Moghadam, M., Wang, J., Ho, V., Iseli, T. J., Alzahrani, B., Xu, A., Van der Poorten, D., Qiao, L., George, J., und Hebbard, L. (2015). Adiponectin reduces hepatic stellate cell migration by promoting tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (timp-1) secretion. *J Biol Chem*, 290(9):5533–5542.
- Ree, A. H., Florenes, V. A., Berg, J. P., Maelandsmo, G. M., Nesland, J. M., und Fodstad, O. (1997). High levels of messenger rnas for tissue inhibitors of metalloproteinases (timp-1 and timp-2) in primary breast carcinomas are associated with development of distant metastases. *Clin Cancer Res*, 3(9):1623–1628.
- Reeves, H. L. und Friedman, S. L. (2002). Activation of hepatic stellate cells—a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci*, 7:808–26.
- Reister, S., Kordes, C., Sawitza, I., und Häussinger, D. (2011). The epigenetic regulation of stem cell factors in hepatic stellate cells. *Stem Cells Dev*, 20(10):1687–1699.
- Rhee, J.-S., Diaz, R., Korets, L., Hodgson, J. G., und Coussens, L. M. (2004). Timp-1 alters susceptibility to carcinogenesis. *Cancer Res*, 64(3):952–961.
- Rhim, A. D., Mirek, E. T., Aiello, N. M., Maitra, A., Bailey, J. M., McAllister, F., Reichert, M., Beatty, G. L., Rustgi, A. K., Vonderheide, R. H., Leach, S. D., und Stanger, B. Z. (2012). Emt and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*, 148(1-2):349–361.

- Riede, U. und Schaefer, H. (1999). *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Thieme, Stuttgart, Deutschland.
- Ries, C. (2014). Cytokine functions of timp-1. *Cell Mol Life Sci*, 71(4):659–672.
- Roderburg, C., Urban, G.-W., Bettermann, K., Vucur, M., Zimmermann, H., Schmidt, S., Janssen, J., Koppe, C., Knolle, P., Castoldi, M., Tacke, F., Trautwein, C., und Luedde, T. (2011). Micro-rna profiling reveals a role for mir-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology*, 53(1):209–218.
- Rodriguez, D., Morrison, C. J., und Overall, C. M. (2010). Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochimica et biophysica acta*, 1803(1):39–54.
- Rubinstein, E., Le Naour, F., Lagaudrière-Gesbert, C., Billard, M., Conjeaud, H., und Boucheix, C. (1996). Cd9, cd63, cd81, and cd82 are components of a surface tetraspan network connected to hla-dr and vla integrins. *Eur J Immunol*, 26(11):2657–2665.
- Ruoslahti, E. (1999). Fibronectin and its integrin receptors in cancer. *Adv Cancer Res*, 76:1–20.
- Schelter, F., Grandl, M., Seubert, B., Schaten, S., Hauser, S., Gerg, M., Boccaccio, C., Comoglio, P., und Krüger, A. (2011a). Tumor cell-derived timp-1 is necessary for maintaining metastasis-promoting met-signaling via inhibition of adam-10. *Clin Exp Metastasis*, 28(8):793–802.
- Schelter, F., Halbgewachs, B., Bäuml, P., Neu, C., Görlach, A., Schrözlmaier, F., und Krüger, A. (2011b). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1-induced scattered liver metastasis is mediated by hypoxia-inducible factor-1alpha. *Clin Exp Metastasis*, 28(2):91–99.
- Schröder, J., Lüllmann-Rauch, R., Himmerkus, N., Pleines, I., Nieswandt, B., Orinska, Z., Koch-Nolte, F., Schröder, B., Bleich, M., und Saftig, P. (2009). Deficiency of the tetraspanin cd63 associated with kidney pathology but normal lysosomal function. *Mol Cell Biol*, 29(4):1083–1094.
- Seton-Rogers, S. (2012). Metastasis: Navigating uncharted territory. *Nat Rev Cancer*, 12(3):151–151.
- Seubert, B., Cui, H., Simonavicius, N., Honert, K., Schäfer, S., Reuning, U., Heikenwalder, M., Mari, B., und Krüger, A. (2014). Tetraspanin cd63 acts as a pro-metastatic factor via β -catenin stabilization. *Int J Cancer*, 136(10):2304–15.
- Seubert, B., Grünwald, B., Kobuch, J., Cui, H., Schelter, F., Schaten, S., Siveke, J. T., Lim, N. H., Nagase, H., Simonavicius, N., et al. (2015). Tissue inhibitor of metalloproteinases (timp)-1 creates a premetastatic niche in the liver through sdf-1/cxcr4-dependent neutrophil recruitment in mice. *Hepatology*, 61(1):238–248.

- Shayakhmetov, D. M., Li, Z.-Y., Ni, S., und Lieber, A. (2004). Analysis of adenovirus sequestration in the liver, transduction of hepatic cells, and innate toxicity after injection of fiber-modified vectors. *J Virol*, 78(10):5368–5381.
- Shimizu, S., Yamada, N., Sawada, T., Ikeda, K., Kawada, N., Seki, S., Kaneda, K., und Hirakawa, K. (2000). In vivo and in vitro interactions between human colon carcinoma cells and hepatic stellate cells. *Jpn J Cancer Res*, 91(12):1285–1295.
- Singh, B., Berry, J. A., Shoher, A., Ayers, G. D., Wei, C., und Lucci, A. (2007). Cox-2 involvement in breast cancer metastasis to bone. *Oncogene*, 26(26):3789–3796.
- Skobe, M., Hawighorst, T., Jackson, D. G., Prevo, R., Janes, L., Velasco, P., Riccardi, L., Alitalo, K., Claffey, K., und Detmar, M. (2001). Induction of tumor lymphangiogenesis by vegf-c promotes breast cancer metastasis. *Nat Med*, 7(2):192–198.
- Sleeman, J. P. (2012). The metastatic niche and stromal progression. *Cancer Metastasis Rev*, 31(3-4):429–440.
- Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., und Wittekind, C. (2011). *TNM classification of malignant tumours*. John Wiley & Sons.
- Soloway, P. D., Alexander, C. M., Werb, Z., und Jaenisch, R. (1996). Targeted mutagenesis of timp-1 reveals that lung tumor invasion is influenced by timp-1 genotype of the tumor but not by that of the host. *Oncogene*, 13(11):2307–2314.
- Song, J., Ge, Z., Yang, X., Luo, Q., Wang, C., You, H., Ge, T., Deng, Y., Lin, H., Cui, Y., *et al.* (2015a). Hepatic stellate cells activated by acidic tumor microenvironment promote the metastasis of hepatocellular carcinoma via osteopontin. *Cancer letters*, 356(2):713–720.
- Song, T., Dou, C., Jia, Y., Tu, K., und Zheng, X. (2015b). Timp-1 activated carcinoma-associated fibroblasts inhibit tumor apoptosis by activating sdf1/cxcr4 signaling in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 6(14):12061–79.
- Soria, G. und Ben-Baruch, A. (2008). The inflammatory chemokines ccl2 and ccl5 in breast cancer. *Cancer letters*, 267(2):271–285.
- Sotsios, Y. und Ward, S. G. (2000). Phosphoinositide 3-kinase: a key biochemical signal for cell migration in response to chemokines. *Immunol Rev*, 177:217–235.
- Stetler-Stevenson, W. G. (2008). Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Science signaling*, 1(27):re6.
- Sun, H., Oudit, G. Y., Ramirez, R. J., Costantini, D., und Backx, P. H. (2004). The phosphoinositide 3-kinase inhibitor ly294002 enhances cardiac myocyte contractility via a direct inhibition of ik,slow currents. *Cardiovasc Res*, 62(3):509–520.
- Talvensaari-Mattila, A. und Turpeenniemi-Hujanen, T. (2005). High preoperative serum timp-1 is a prognostic indicator for survival in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, 89(1):29–34.

- Tamburrino, D., Partelli, S., Crippa, S., Manzoni, A., Maurizi, A., und Falconi, M. (2014). Selection criteria in resectable pancreatic cancer: a biological and morphological approach. *World J Gastroenterol*, 20(32):11210–11215.
- Tanjore, H. und Kalluri, R. (2006). The role of type iv collagen and basement membranes in cancer progression and metastasis. *Am J Pathol*, 168(3):715–717.
- Toricelli, M., Melo, F. H. M., Peres, G. B., Silva, D. C. P., und Jasiulionis, M. G. (2013). Timp1 interacts with beta-1 integrin and cd63 along melanoma genesis and confers anoikis resistance by activating pi3-k signaling pathway independently of akt phosphorylation. *Mol Cancer*, 12:22.
- Valva, P., Casciato, P., Diaz Carrasco, J. M., Gadano, A., Galdame, O., Galoppo, M. C., Mullen, E., De Matteo, E., und Preciado, M. V. (2011). The role of serum biomarkers in predicting fibrosis progression in pediatric and adult hepatitis c virus chronic infection. *PLoS One*, 6(8):e23218.
- Van den Eynden, G. G., Majeed, A. W., Illemann, M., Vermeulen, P. B., Bird, N. C., Høyer-Hansen, G., Eefsen, R. L., Reynolds, A. R., und Brodt, P. (2013). The multifaceted role of the microenvironment in liver metastasis: biology and clinical implications. *Cancer Res*, 73(7):2031–2043.
- Vidal-Vanaclocha, F. (2008). The prometastatic microenvironment of the liver. *Cancer Microenvironment*, 1(1):113–129.
- Visse, R. und Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 92(8):827–839.
- Wang, K., Lin, B., Brems, J. J., und Gamelli, R. L. (2013). Hepatic apoptosis can modulate liver fibrosis through timp1 pathway. *Apoptosis*, 18(5):566–577.
- Wasif, N., Ko, C. Y., Farrell, J., Wainberg, Z., Hines, O. J., Reber, H., und Tomlinson, J. S. (2010). Impact of tumor grade on prognosis in pancreatic cancer: should we include grade in ajcc staging? *Ann Surg Oncol*, 17(9):2312–2320.
- Weiss, L. (1994). Inefficiency of metastasis from colorectal carcinomas. In *Hepatobiliary Cancer*, pages 1–11. Springer.
- Wels, J., Kaplan, R. N., Rafii, S., und Lyden, D. (2008). Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev*, 22(5):559–574.
- Whittaker, R. (1973). Niche, habitat, and ecotope. *The American Naturalist*, 107(955):321–338.
- Woolley, D. E., Roberts, D. R., und Evanson, J. M. (1975). Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 66(2):747–754.
- Xu, L., Hui, A., Albanis, E., Arthur, M., O'Byrne, S., Blaner, W., Mukherjee, P., Friedman, S., und Eng, F. (2005). Human hepatic stellate cell lines, lx-1 and lx-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut*, 54(1):142–151.

- Yamada, T., Oshima, T., Yoshihara, K., Tamura, S., Kanazawa, A., Inagaki, D., Yamamoto, N., Sato, T., Fujii, S., Numata, K., Kunisaki, C., Shiozawa, M., Morinaga, S., Akaike, M., Rino, Y., Tanaka, K., Masuda, M., und Imada, T. (2010). Overexpression of mmp-13 gene in colorectal cancer with liver metastasis. *Anticancer Res*, 30(7):2693–2699.
- Yamamoto, M., Kikuchi, H., Ohta, M., Kawabata, T., Hiramatsu, Y., Kondo, K., Baba, M., Kamiya, K., Tanaka, T., Kitagawa, M., und Konno, H. (2008). Tsu68 prevents liver metastasis of colon cancer xenografts by modulating the premetastatic niche. *Cancer Res*, 68(23):9754–9762.
- Yang, X., Zhang, Y., Hosaka, K., Andersson, P., Wang, J., Tholander, F., Cao, Z., Morikawa, H., Tegnér, J., Yang, Y., Iwamoto, H., Lim, S., und Cao, Y. (2015). Vegf-b promotes cancer metastasis through a vegf-a-independent mechanism and serves as a marker of poor prognosis for cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(22):2900–2909.
- Ylisirniö, S., Höyhty, M., und Turpeenniemi-Hujanen, T. (2000). Serum matrix metalloproteinases -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases -1, -2 in lung cancer—timp-1 as a prognostic marker. *Anticancer Res*, 20(2B):1311–1316.
- Yoshiji, H., Kuriyama, S., Miyamoto, Y., Thorgeirsson, U. P., Gomez, D. E., Kawata, M., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Tsujinoue, H., Nakatani, T., Thorgeirsson, S. S., und Fukui, H. (2000). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology*, 32(6):1248–1254.
- Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Nakatani, T., Tsujinoue, H., Yanase, K., Namisaki, T., Imazu, H., und Fukui, H. (2002). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology*, 36(4 Pt 1):850–860.
- Zarrabi, K., Dufour, A., Li, J., Kuscü, C., Pulkoski-Gross, A., Zhi, J., Hu, Y., Sampson, N. S., Zucker, S., und Cao, J. (2011). Inhibition of matrix metalloproteinase 14 (mmp-14)-mediated cancer cell migration. *J Biol Chem*, 286(38):33167–33177.
- Zeng, Z. S., Cohen, A. M., Zhang, Z. F., Stetler-Stevenson, W., und Guillem, J. G. (1995). Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 rna in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. *Clin Cancer Res*, 1(8):899–906.
- Zhang, Y., Davis, C., Ryan, J., Janney, C., und Peña, M. M. O. (2013). Development and characterization of a reliable mouse model of colorectal cancer metastasis to the liver. *Clin Exp Metastasis*, 30(7):903–918.
- Zöller, M. (2009). Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer*, 9(1):40–55.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater *Prof. Dr. rer. nat. Achim Krüger* für die außerordentlich engagierte Betreuung. Ich danke für die wertvolle Chance, eine interessante Aufgabenstellung frei und eigenverantwortlich bearbeiten zu dürfen, und seinen enormen Einsatz, mich dabei stets kritisch zu hinterfragen, geduldig zu betreuen und zu unterstützen. Sein unermüdliches Feilen und Polieren an wissenschaftlichen Ideen und Texten ermöglichten es, komplexe Projekte sowie deren Darstellung in Manuskripten und Präsentationen flexibel und zugleich präzise zu entwickeln. Gleichzeitig bin ich ihm für die vielen hilfreichen technischen Ratschläge, die Einarbeitung in tierexperimentelle Methoden, die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Tierversuche, und hierbei vor allem für die Inokulation der Viren und Tumorzellen, sehr dankbar. Die zahlreichen Vorarbeiten aus seiner Gruppe und die dort gut etablierten Methoden ermöglichten ein effizientes Bearbeiten vieler Fragestellungen. Die umfassenden Einblicke in das Betreuen von Studenten, in das Verfassen von Anträgen, in internationale Projekte und *Meetings* sowie die jährliche Teilnahme an der *Winterschool* in Tiers waren sehr wertvolle Erfahrungen für mich. Für all die Möglichkeiten, die Zusammenarbeit, das entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung möchte ich mich daher von Herzen bei ihm bedanken.

Den weiteren Mitgliedern meines *Thesis Committees*, *Prof. Dr. Wolfgang Liebl*, *PD Dr. Dieter Jenne* und *PD Dr. Klaus-Peter Janssen* danke ich ebenfalls herzlich für die Unterstützung und Ratschläge sowie das Aufbringen ihrer wertvollen Zeit.

Allen Kooperationspartnern möchte ich für die erfolgreiche gemeinsame Arbeit danken. Ich bedanke mich bei *Prof. Dr. Irene Esposito*, *Prof. Dr. Marc Martignoni*, *Dr. Olga Prokochuk* sowie *PD Dr. Klaus-Peter Janssen* für die Bereitstellung von Patientenmaterial und bei *Prof. Dr. Mert Erkan* für die Bereitstellung der Primärkulturen hepatischer *Stellate Cells*. *Prof. Dr. Irene Esposito* danke ich zudem für die fachliche und personelle Hilfe bei den immunhistochemischen Färbungen und der Analyse der von ihr bereit gestellten Gewebeproben. Das von *Prof. Hideaki Nagase* und *Prof. Gillian Murphy* zur Verfügung gestellte rekombinante TIMP-1 war unersetzlich für diese Arbeit. *Prof. Paul Saftig* möchte ich für die wertvolle Bereitstellung der CD63 *knock-out* Mäuse danken, sowie *Prof. Jens Siveke* für die Bereitstellung der KPC Mauslinie.

Meinen Kollegen *Susanne Schaten*, *Katja Honert*, *Sonja Berchtold* und *Klaus Mantwill* sowie *Haissi Cui*, *Julia Jobuch*, *Bastian Seubert* und *Dirk Weinspach* danke ich für die jahrelange, nette und erfolgreiche Zusammenarbeit und ihren großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit.

Danksagung

Sonja Berchtold danke ich für eine langjährige, freundschaftliche und erfolgreiche Kollaboration und die vielseitige Hilfe und Unterstützung, v.a. bei der Zucht transgener Mäuse, in der späteren Zusammenarbeit in der AG Krüger. Klaus Mantwill danke ich ebenfalls für seine umfangreiche Hilfe bei der Genotypisierung von Mäusen, sowie für Rat und Tat und Zuspruch. *Dr. Susanne Schaten* danke ich herzlichst für ihre Hilfe und Freundlichkeit, ihre Expertise und die sorgfältige Einführung in die Methoden der Immunhistochemie. Mein Dank gilt *Katja Honert* für die Einführung in die Methoden der Zellkultur, ihre Unterstützung bei der Durchführung von Experimenten und insbesondere für ihre Hilfsbereitschaft, Freundlichkeit und Zuverlässigkeit. Das Betreuen von Masterstudenten und Praktikanten war mir eine große Freude und ich möchte mich herzlich bei *Veronika Harant, Ria Spallek, Monika Frühschütz, Annique Hunger, Katharina Stutzer, Dirk Hoffmann, Laura Borth, Christian Urban, Maria Höninger, Mathias Stahl, Kaarin Ahomaa, Jana Ködel, Sonja Fischer,* und *Chris Hermann* für ihren großen Einsatz und die sehr spaßige Zusammenarbeit bedanken.

Mein Dank gilt allen Mitgliedern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Molekulare Immunologie für eine ausgesprochen gute Arbeitsatmosphäre. Den Institutsleitern, *Prof. Dr. Bernd Gänsbacher* und später *Prof. Dr. Percy Knolle*, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an ihrem Institut durch- bzw. fortzuführen. *Prof. Dr. Percy Knolle* danke ich zudem für seine vielseitige fachliche wie finanzielle Unterstützung. *Dr. Martina Anton, Dr. Dirk Wohlleber* und *Dr. Bastian Höchst* danke ich für ihre unkomplizierte Art und die nette wissenschaftliche Zusammenarbeit. Für technische Unterstützung und/oder Hilfe bei administrativen Belangen danke ich *Dr. Anton Steger, Daniel Schätzlein, Silke Hegenbarth, Sepp Strassmeier, Edelburga Hammerschmid, Brigitte Kätzel, Sandra Kimmerle* und *Jacqueline Weber*. Über diese konkreten Anlässe hinaus möchte ich mich bei wirklich allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für eine witzige und angenehme gemeinsame Zeit bedanken.

Ich danke den Tierpflegern des Zentrums für Präklinische Forschung, insbesondere *Michaela Müller* und *Rosi Bergmeyer*, für ihre Hilfe und ihr großes Engagement.

Sonja, Veronika, Ria und *Martin* haben viel Zeit und Mühe in das Korrekturlesen dieser Arbeit gesteckt. Euch tausend Dank dafür!

Das Fundament, auf dem ich stehe, sind meine liebevolle Familie und meine lieben Freunde. Ich bin zutiefst dankbar dafür. *Martin* gilt mein ganz besonderer Dank für den unermüdlichen Rückhalt, die Unterstützung und seinen unerschütterlichen Glauben an mich.

A. Anhang

A.1. Literaturrecherche zur Auswahl von Zielgenen für die LDA Analyse

Protein	Assay ID	HSC Aktivierung/Fibrose	Nischenfaktor	Metastasierung
α SMA	Mm01546133_m1	[Friedman, 2008]		
ADAM10	Mm00545742_m1	[Bourd-Boittin <i>et al.</i> , 2009]		
ADAM17	Mm00456428_m1	[Bourd-Boittin <i>et al.</i> , 2009]		
CAIX	Mm00519870_m1		[Chafe <i>et al.</i> , 2015]	[Chafe <i>et al.</i> , 2015]
CCL2	Mm99999056_m1		[Qian <i>et al.</i> , 2011]	[Qian <i>et al.</i> , 2011]
CCL5	Mm01302428_m1		[Soria und Ben-Baruch, 2008]	[Huang <i>et al.</i> , 2009]
CD63	Mm01966817_g1	[Mazzocca <i>et al.</i> , 2002]		[Seubert <i>et al.</i> , 2014]
CFB	Mm00433909_m1			[Hudson <i>et al.</i> , 2013]
Col1a1	Mm00801666_g1	[Friedman, 2008]		
Col4a5	Mm00801606_m1	[Roderburg <i>et al.</i> , 2011]		[Tanjore und Kalluri, 2006]
CXCL1	Mm00433859_m1		[Yamamoto <i>et al.</i> , 2008]	
CXCL12	Mm00445552_m1		[Psaila und Lyden, 2009]	
CXCL14	Mm00444699_m1			[Lyu <i>et al.</i> , 2015]
CXCL2	Mm00436450_m1			[Acharyya <i>et al.</i> , 2012]
Desmin	Mm00802455_m1	[Friedman, 2008]		
L1CAM	Mm00493049_m1			[Bergmann <i>et al.</i> , 2010]
LOX	Mm00495386_m1	[Perepelyuk <i>et al.</i> , 2013]	[Cox <i>et al.</i> , 2013]	
MMP13	Mm00439491_m1			[Yamada <i>et al.</i> , 2010]
MMP14	Mm00485054_m1			[Zarrabi <i>et al.</i> , 2011]
MMP2	Mm00439508_m1	[Friedman, 2008]		
MMP9	Mm00442991_m1	[Friedman, 2008]	[Psaila und Lyden, 2009]	
NCAM1	Mm01149710_m1	[Friedman, 2008]		
NCX	Mm00441524_m1	[Nakamura <i>et al.</i> , 1998]		
Nestin	Mm00450205_m1	[Friedman, 2008]		
NOTCH3	Mm01345646_m1	[Chen <i>et al.</i> , 2012]		[Liu <i>et al.</i> , 2014]
PDGF-A	Mm00435540_m1	[Friedman, 2008]		
PDGF-B	Mm00440678_m1	[Friedman, 2008]		
PDGF-C	Mm00480205_m1	[Friedman, 2008]		
PDGFR β	Mm01262489_m1	[Friedman, 2008]		
tPA	Mm00476931_m1	[Higazi <i>et al.</i> , 2008]		[He <i>et al.</i> , 2001]
uPA	Mm00447054_m1	[Higazi <i>et al.</i> , 2008]		[He <i>et al.</i> , 2001]
uPAR	Mm00440911_m1			[He <i>et al.</i> , 2001]
PPAR γ	Mm01184322_m1	[Hazra <i>et al.</i> , 2004]		[Panigrahy <i>et al.</i> , 2002]
CD133	Mm00477115_m1	[Reister <i>et al.</i> , 2011]		[Hou <i>et al.</i> , 2012]
COX-2	Mm00478374_m1	[Cheng <i>et al.</i> , 2002]		[Singh <i>et al.</i> , 2007]
S100A4	Mm00803371_m1		[Psaila und Lyden, 2009]	
S100A6	Mm00771682_g1		[Psaila und Lyden, 2009]	
S100A8	Mm01220132_g1		[Hiratsuka <i>et al.</i> , 2008]	
S100A9	Mm00656925_m1		[Hiratsuka <i>et al.</i> , 2008]	
SAA3	Mm00441203_m1		[Hiratsuka <i>et al.</i> , 2008]	
Selectin E	Mm00441278_m1		[Psaila und Lyden, 2009]	
Selectin P	Mm00441295_m1		[Psaila und Lyden, 2009]	
Serpin A3	Mm00776439_m1			[Grek <i>et al.</i> , 2012]
PAI-1	Mm00435860_m1	[Ghosh und Vaughan, 2012]		[Inoue <i>et al.</i> , 2005]
Osteonektin	Mm00486332_m1	[Ju <i>et al.</i> , 2009]		
Osteopontin	Mm00436767_m1	[Lee <i>et al.</i> , 2004]	[Psaila und Lyden, 2009]	[Song <i>et al.</i> , 2015a]
TGF β 1	Mm00441724_m1	[Friedman, 2008]	[Psaila und Lyden, 2009]	
Thrombopoietin	Mm00437040_m1	[Murata <i>et al.</i> , 2014]		

A. Anhang

TIMP-1	Mm00441818_m1	[Friedman, 2008]		
TIMP-2	Mm00441825_m1	[Friedman, 2008]		
TIMP-3	Mm00441827_m1		[Kim <i>et al.</i> , 2009]	[Lin <i>et al.</i> , 2012]
TLR2	Mm00442346_m1		[Psaila und Lyden, 2009]	[Kim und Karin, 2011]
TLR4	Mm00445273_m1		[Hiratsuka <i>et al.</i> , 2008]	
TLR6	Mm02529782_s1			[Lin <i>et al.</i> , 2012]
TNF α	Mm00443258_m1	[Friedman, 2008]	[Psaila und Lyden, 2009]	
VEGF-A	Mm00437304_m1	[Friedman, 2008]	[Psaila und Lyden, 2009]	
VEGF-B	Mm00442102_m1			[Yang <i>et al.</i> , 2015]
VEGF-C	Mm00437313_m1		[Psaila und Lyden, 2009]	[Skobe <i>et al.</i> , 2001]
Vimentin	Mm00449201_m1	[Friedman, 2008]		

Tabelle A.1. – Auswahl HSC aktivierungs- und metastasierungsassoziierter Gene für die LDA Analyse

A.2. Lebenslauf

Name: Barbara Theresia Grünwald
Geburtsdatum: 22. Februar 1985
Geburtsort: Landshut
Familienstand: Ledig
Wohnort: München

Akademischer Werdegang:

- *ab 12/2011:* Promotion am Institut für Experimentelle Onkologie und Molekulare Immunologie, Klinikum rechts der Isar der TU München
- *2008-2011:* Master of Science in Molekularer Biotechnologie
TU München, Abschlussnote: 1,1
Schwerpunkte: Bioinformatik, Molekulare Medizin, Mikrobiologie, Pharmakologie
- *2005-2008:* Bachelor of Science in Molekularer Biotechnologie
TU München, Abschlussnote: 2,0
- *1996-2004:* Akademische Hochschulreife (Abitur)
Dom Gymnasium, Freising, Abschlussnote: 2,1
Leistungskurse: Latein, Biologie

Studienbegleitende Praktika:

- *01/2011-09/2011:* Hilfwissenschaftlerin am Institut für Experimentelle Onkologie, Klinikums rechts der Isar, TU München
- *05/2010-09/2010:* Praktikantin am Lehrstuhl für Bioinformatik, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU München
- *12/2009-12/2010:* Hilfwissenschaftlerin am Institut für Pathologie, Helmholtz Zentrum München
- *04/2009-05/2009:* Praktikantin am Institut für Sensorische Biologie, Céntrico de Investigación Principe Felipe, Valencia (Spanien)

A.3. Publikationsverzeichnis

Promotionsbezogene Publikationen

- Die wesentlichen Teile der vorliegenden Arbeit werden derzeit als Publikation verfasst: **Grünwald B**, Harant V, Berchtold S, Spallek R, Stutzer K, Kobuch J, Cui H, Schaten S, Prokopchuk O, Martignoni M, Esposito I, Saftig P, Heikenwalder M, Erkan M, Siveke J, Knolle P, Wohlleber D, Krüger A. *TIMP-1 signaling via CD63 activates hepatic stellate cell thereby promoting metastasis of PDAC by formation of a hepatic pre-metastatic niche*.
- Seubert* B, **Grünwald*** B, Kobuch* J, Cui* H, Schelter F, Schaten S, Siveke JT, Lim NH, Nagase H, Simonavicius N, Heikenwalder M, Reinheckel T, Sleeman JP, Janssen KP, Knolle PA, Krüger A. (2015) *Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 creates a premetastatic niche in the liver through SDF-1/CXCR4-dependent neutrophil recruitment in mice*. Hepatology. 61(1):238-48.

Weitere Publikationen

- **Grünwald B**, Schlage P, Krüger A, auf dem Keller, U. (2015) *MMPs: From genomics to degradomics*. in: Matrix Metalloproteinase Biology, First Edition. Edited by Irit Sagi and Jean Gaffney. Published by John Wiley & Sons, Inc.
- Berchtold S, **Grünwald B**, Krüger A, Reithmeier A, Hähl T, Cheng T, Feuchtinger A, Born D, Erkan M, Kleeff J, Esposito I. (2014) *Collagen type V promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Cancer Lett. 356:721-32.
- Ludyga* N, **Grünwald*** B, Azimzadeh O, Englert S, Höfler H, Tapio S, Aubele M. (2012) *Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses*. Virchows Arch. 460(2):131-40.
- Kobuch J, Cui H, **Grünwald B**, Saftig P, Knolle PA, Krüger A. (2015) *TIMP-1 signaling via CD63 triggers granulopoiesis and neutrophilia in mice*. Haematologica. doi: haematol.2014.121590.

* Gleichbeteiligte Koautoren