

Lehrstuhl für Organische Chemie
der Technischen Universität München

**Überexpression des membranverankerten- bzw. des
löslichen uPA-Rezeptors (CD87) in humanen Ovarialkarzinomzellen;
Einfluß auf Tumorausbreitung und Metastasierung**

Verena Lutz

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender : Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

Prüfer der Dissertation :

1. Univ.-Prof. Dr. Horst Kessler
2. Priv.-Doz. Dr. Viktor Magdolen

Die Dissertation wurde am 5.7.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 10.9.2001 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	
1. Einleitung und Stand der Wissenschaft	1
1.1 Die Entstehung von Tumoren	1
1.2 Das Ovarialkarzinom	3
1.3 Das Plasminogenaktivator-System	4
1.4 Der Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA) und die Inhibitoren PAI-1 und PAI-2	6
1.5 Der Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-Rezeptor (uPAR; CD87)	8
1.5.1 Strukturelle und biochemische Eigenschaften des uPAR	8
1.5.2 Weitere Auswirkungen der Bindung von uPA an uPAR	11
1.5.3 Interaktionen des uPAR mit weiteren Proteinen	12
1.5.4 Die lösliche Form des uPAR (suPAR)	13
1.6 Klinische Relevanz des Plasminogenaktivator-Systems	14
1.7 Biochemische und molekularbiologische Vorgehensweisen zur Inhibierung von uPA und uPAR	16
2. Zielsetzung der Arbeit	18
3. Material und Methoden	19
3.1 Chemikalien	19
3.2 Enzyme	20
3.3 Antikörper	20
3.4 <i>E. coli</i> -Stamm und <i>E. coli</i> -Medien	21
3.5 Expressionsvektor pRcRSV	21
3.6 Oligonukleotide für die PCR	22
3.7 Tumorzelllinien und Zellkulturmedien	22
3.8 Rekombinanter, löslicher, humaner uPAR	23
3.9 Molekularbiologische Methoden	24
3.10 Anzucht von transformierten <i>E. coli</i>	24
3.11 Mutagenese der uPAR-cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion	25
3.12 Sequenzierung der GPI-uPAR- und suPAR-cDNA	26
3.13 <i>Northern Blot</i>	26
3.14 Zellkultur-Methoden	28
3.15 Etablierung stabil transfizierter Tumorzellen	28
3.15.1 Transfektion von OV-MZ-6#8-Zellen	28
3.15.2 Transfektion von Raji-Zellen	29
3.16 Enzymimmunoassays (ELISA)	29

3.17	SDS-PAGE und Detektion der GPI-uPAR- und suPAR-Proteine mittels <i>Western Blot</i>	30
3.18	Nachweis von suPAR in den Zellkulturüberständen von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 mittels Phasentrennung	31
3.19	Wachstumskurven der GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8	32
3.20	Durchflußzytofluorometrie-Analysen von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8	32
3.20.1	Durchflußzytofluorometrie-Analyse mit pro-uPA-FITC	32
3.20.2	Durchflußzytofluorometrischer Kompetitionstest	33
3.21	Konfokale <i>Laserscanning</i> -Mikroskopie (CLSM)	33
3.22	Test der Plasminogen-Aktivierungskapazität auf GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8	34
3.23	Test auf zellspezifische fibrinolytische Aktivität von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8	35
3.24	Test des Apoptosestatus der GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 mittels TUNEL	35
3.25	Zelladhäsionstest mit GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8	36
3.26	Charakterisierung der Tumorigenität von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 im Nacktmausmodell	37
3.27	Bestimmung des uPAR-Antigengehaltes in Tumoraufschlüssen, Blut und Aszites von -mit GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten xenotransplantierten- Nacktmäusen	38
3.28	Statistische Methoden	38
4.	Ergebnisse	39
4.1	Herstellung von GPI-uPAR- und suPAR-cDNA-Expressionsvektoren	39
4.2	Herstellung stabiler GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8	41
4.3	Charakterisierung von stabilen GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 auf RNA- und Protein-Ebene	42
4.3.1	Quantifizierung des Antigengehaltes von uPAR und anderen Proteolysefaktoren in GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten	42
4.3.2	<i>Batch</i> -Transfektionen der humanen OV-MZ-6#8-Zelllinie mit GPI-uPAR- und suPAR-cDNA-Expressionsvektoren	44

4.3.3	Nachweis von uPAR-RNA mittels <i>Northern Blot</i> -Analyse	45
4.3.4	Spezifischer Nachweis von GPI-uPAR- und suPAR-Proteinen mittels <i>Western Blot</i> -Analyse	46
4.3.5	Nachweis von suPAR in Zellkulturüberständen von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten mittels Phasentrennung	47
4.4	Wachstumskinetik von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 und von GPI-uPAR-Transfektanten der humanen Raji-Zelllinie unter uPA-Stimulation	49
4.5	Funktionelle Tests der exprimierten GPI-uPAR- und suPAR-Proteine von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8	51
4.5.1	Nachweis des GPI-uPAR von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten mittels Durchflußzytofluorometrie-Analyse	51
4.5.2	Bestimmung der uPA-Bindungskapazität des suPAR von suPAR-Transfektanten mittels Durchflußzytofluorometrie-Analyse	53
4.5.3	Nachweis des GPI-uPAR von uPAR- und suPAR-Transfektanten mittels konfokaler <i>Laserscanning</i> -Mikroskopie (CLSM)	54
4.5.4	Bestimmung der uPA-abhängigen tumorzelloberflächenassoziierten Plasminogen-Aktivierungskapazität von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten	56
4.5.5	Nachweis der fibrinolytischen Aktivität von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten	57
4.5.6	Nachweis von apoptotischen GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten mittels TUNEL	59
4.5.7	Bestimmung der adhäsiven Eigenschaften von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten an dem ECM-Protein Vitronektin	59
4.6	Charakterisierung der <i>in vivo</i> -Tumorigenität von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8	61
4.6.1	Bestimmung der Tumorigenität von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 im Tiermodell	61
4.6.2	uPAR-Antigen-Nachweis in Tumorgewebeextrakten, Blut und Aszites aus mit GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten xenotransplantierten Nacktmäusen	65

5.	Diskussion	68
5.1	Auswirkungen der Überexpression von suPAR auf Proliferation, Plasmingenerierung und Tumorzellausbreitung von humanen Ovarialkarzinomzellen	69
5.2	Auswirkungen der Überexpression von GPI-uPAR auf Proliferation, Plasmingenerierung und Tumorzellausbreitung von humanen Ovarialkarzinomzellen	74
6.	Zusammenfassung	78
7.	Literatur	79
8.	Lebenslauf und Liste der Veröffentlichungen	94
9.	Danksagung	96

A	Adenin
Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
ATF	aminoterminales Fragment des uPA
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
C	Cytosin
Ci	Curie
CHO-uPAR	von <i>Chinese hamster cells</i> produzierter, humaner, löslicher uPAR
CLSM	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie
cpm	Impulse pro Minute
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	fluoreszenzassoziierter Zellsortierer
FCS	Fötale Kälberserum
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FITC-uPA	mit FITC konjugierter pro-uPA
G	Guanin
GAM	<i>Growth arrest medium</i> ; Zellkulturmedium, welches kein FCS und kein Antibiotikum enthält
GFD	<i>Growth factor-like domain</i> des uPA
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
GPI-uPAR	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-verankerter uPAR
h	Stunden
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HMW-uPA	<i>High-molecular-weight</i> uPA
IgG	Immunglobulin G

IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
kan	Kanamycin
K_D	Dissoziationskonstante
lac	Lactose Operon
MCS	<i>Multiple cloning site</i> ; multiple Klonierungsstelle
mAK	monoklonaler Antikörper
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloproteinase
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
kDa	Kilo Dalton
OD	optische Dichte
Oligonukleotid	Oligodesoxyribonukleotid
OV-MZ-6#8	humane Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 Klon 8
OV-RSV	Mit leerem Vektor-Plasmid transfizierte humane Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8
OV-suPAR	Mit humaner suPAR-cDNA transfizierte humane Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8, welche löslichen humanen uPAR exprimiert
OV-GPI-uPAR	Mit humaner uPAR-cDNA transfizierte humane Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8, welche membrangebundenen uPAR überexprimiert
PAA	Polyacrylamid
PAI-1	Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator Inhibitor Typ-1
PAI-2	Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator Inhibitor Typ-2
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pi-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pro-uPA	Proenzym des uPA
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
suPAR	löslicher uPAR, uPAR ohne GPI-Anker
T	Thymin
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	<i>Tissue factor</i>
tPA	<i>Tissue-type</i> Plasminogen-Aktivator
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
μ	Mikro
U	<i>Units</i>

uPA	Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator
uPAR	uPA-Rezeptor
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	Beta-Galaktosidase-Substrat

Aminosäuren

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

1. Einleitung und Stand der Wissenschaft

1.1 Die Entstehung von Tumoren

Unter einem Tumor versteht man eine durch progressive Proliferation entstandene gut- oder bösartige Geschwulst. Nahezu jedes Gewebe des menschlichen Körpers kann sich krebsartig verändern. In der Regel geht diese Veränderung von einer einzigen Zelle aus. Diese Transformation einer normalen Zelle zu einer Tumorzelle kann u. a. ausgelöst werden durch die Einwirkung von kanzerogenen Stoffen, DNA-Mutationen mittels UV-Strahlen, Verlust von Tumorsuppressor-Genen oder durch eine genetisch bedingte Imbalance von mehreren wichtigen, die Zelle steuernden Funktionen. Die dadurch entstehende tumorzelltypisch hohe Wachstumsrate der Tumorzellen führt zu einer Dysplasie, einer veränderten Morphologie des Gewebes. Haben tumorigen entartete, wachsende Zellen die sie umgebende Basalmembran noch nicht überwunden, spricht man von einem benignen Tumor. Die Basalmembran (bestehend aus Kollagen Typ IV und Glykoproteinen) ist die Barriere zur extrazellulären Matrix (EZM; zusammengesetzt aus Kollagen Typ I, III, V und VI, Fibrin, Fibronectin und Proteoglykanen wie Heparin und Heparinsulfat). Stehen die Tumorzellen unmittelbar davor, die Basalmembran zu durchbrechen, nennt man den Tumor *Carcinoma in situ*, also ein im Übergang zur Malignität befindlicher Tumor (Abb. 1). Maligne Tumoren haben die Basalmembran schon durchbrochen. Der Tumor wandert in fremde Gewebe ein und breitet sich dort aus (Invasion). Für die Invasionskapazität der Tumorzellen sind tumorzellspezifische verstärkte proteolytische Prozesse zur lokalen Auflösung der Basalmembran und der extrazellulären Matrix von entscheidender Bedeutung (Mignatti et al., 1986; Mignatti and Rifkin, 1993; Liotta et al., 1991; Andreasen et al., 1997; 2000).

Solide Tumoren können nur dann über einen kritischen Durchmesser von 1-2 mm hinaus wachsen, wenn sie die Neovaskularisierung induzieren können und über neu gebildete Gefäße mit genügend Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden (Folkman, 1995; Strömblad and Cherech, 1996).

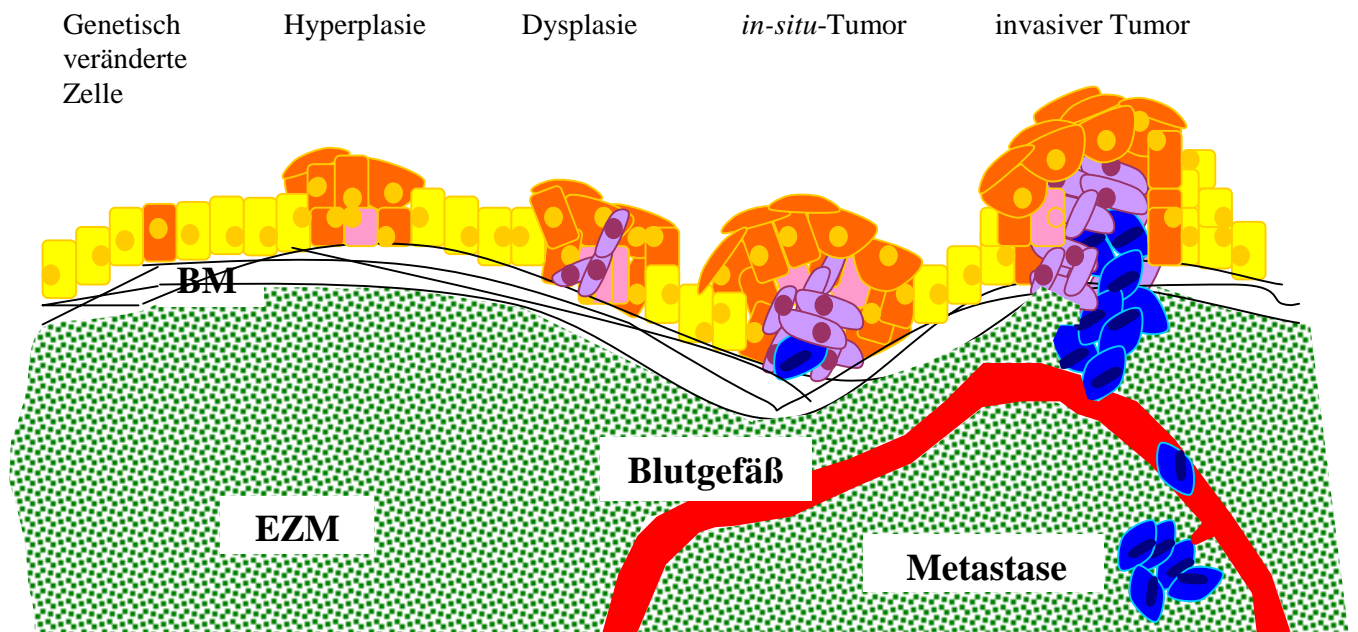


Abb. 1: Die Entstehung eines epithelialen Tumors und seiner Metastasen

Die orangefarbenen Zellen zeigen ein unkontrolliertes Wachstum, welches zu einer Hyperplasie und dann zu einer Dysplasie von Gewebe führt. Metastasierende Tumorzellen durchbrechen die Basalmembran, breiten sich in der extrazellulären Bindegewebsmatrix aus und dringen in die Blutgefäße ein. Über den Blutstrom gelangen sie an eine geeignete Stelle, an der sie das Blutgefäß verlassen, sich in das dortige Gewebe neu einnisten und eine Metastase bilden. Die unterschiedliche Farbgebung der Zellen stellt die Zunahme an verändertem Verhalten gegenüber der ursprünglichen Zellpopulation dar. BM = Basalmembran, EZM = extrazelluläre Matrix

Gelangen invasive Tumorzellen in Lymph- und / oder Blutgefäße, können sie an eine entfernte Stelle des Körpers gelangen, aus dem Gefäß wieder austreten und im dortigen Gewebe Tochtergeschwüre bilden (Metastasierung). Invasion und Metastasierung sind die entscheidenden Kriterien, in denen sich ein maligner von einem benignen Tumor unterscheidet.

1.2 Das Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom (Eierstockkrebs) ist nach Mamma-, Lungen- und Kolonkarzinom die vierthäufigste Tumorerkrankung bei Frauen in Industriestaaten (außer Japan). In den letzten Jahren wurde durch radikaleres operatives Vorgehen und adjuvante Chemotherapien mit Taxol- und Cisplatin-Verbindungen die Überlebensrate der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom verbessert. Dennoch liegt die Mortalitätsrate bei über 70% und ist nach wie vor die höchste unter den oben genannten Tumorarten. Das Ovarialkarzinom wird aufgrund des lange Zeit symptomlosen Krankheitsverlaufs und mangels signifikanter prognostischer Marker oft erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert.

Eine Besonderheit des Ovarialkarzinoms gegenüber vielen anderen Tumorarten ist die Ausbreitung in den Bauchraum und in die darin enthaltenen Organe. Nur sehr selten metastasiert diese Tumorart hämatogen oder lymphogen in Lunge, Gehirn oder Knochen. Seit 1985 wird das Ausmaß der Tumorausbreitung von den Ovarien ausgehend auf die umliegenden Organe (z.B. Uterus, Dünndarm, Magen, Leber) von der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) in verschiedene Stadien (I-IV) unterteilt. Dabei werden unter FIGO Ia und Ib alle Karzinome zusammengefaßt, welche auf die Ovarien beschränkt sind und noch von einer intakten Bindegewebskapsel umgeben sind. FIGO Ic-Karzinome sind wie folgt definiert: die Karzinome sind zwar auf die Ovarien beschränkt, die Kapsel ist aber bereits durchbrochen. Mit FIGO II (a, b, c) werden Karzinome bezeichnet, welche ein oder beide Ovarien betreffen und sich ins kleine Becken ausdehnen. Existiert bereits eine intraperitoneale Metastasierung außerhalb des kleinen Beckens und/oder Lymphknotenbefall, werden die Ovarialkarzinome in FIGO III a, b oder c eingeteilt. FIGO IV-Karzinome zeigen Fernmetastasen (Schmidt-Matthiesen, 1986).

Mit den Peritonealmetastasen tritt als Symptom oftmals ein maligner Erguß (Aszites) auf. 60%-70% der Ovarialkarzinome sind zur Zeit der Diagnose bereits in einem Stadium der intraabdominellen Ausbreitung, befinden sich also im Stadium FIGO III und IV.

1.3 Das Plasminogenaktivator-System

Die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen erfordert die Degradation von Proteinen der Basalmembran und der extrazellulären Matrix. Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigen, daß diese Abbauprozesse in erster Linie durch verschiedene zelloberflächenassoziierte proteolytische Systeme der Tumorzellen vermittelt werden. Diese Systeme zeichnen sich durch das Vorkommen von inaktiven Proteinase-Vorstufen (Proenzyme oder Zymogene) aus, welche von Tumor- und/oder Stromazellen synthetisiert und sezerniert werden. Die Aktivierung verläuft in einer kaskadenartigen Abfolge von proteolytischen Prozessen (Mignatti et al., 1986; Schmitt et al., 1992; Quax et al., 1992), wie sie z.B. auch während der Blutgerinnung oder der Komplementaktivierung ablaufen. Die verschiedenen Proteinase unterscheiden sich im Mechanismus der Peptidbindungsspaltung, in ihrer Lokalisation (intra-/extrazellulär) und in ihren Zielsubstraten. Man untergliedert die Klasse der Proteinase in Matrix-Metalloproteinase (MMPs, z.B. Kollagenase, Gelatinase und Stromelysin), Cysteinproteinase (z.B. Cathepsin B, H und L), Aspartatproteinase (z.B. Cathepsin D) und Serinproteinase (z.B. Plasmin, Urokinase-Typ Plasminogenaktivator [uPA]), und *Tissue*-Typ Plasminogenaktivator [tPA]).

Ein intensiv erforschtes proteolytisches System ist das Plasminogenaktivator/Plasmin-System, das wegen seiner Relevanz in der Tumorgenese eine besondere Bedeutung erlangt hat. Das Plasminogenaktivator-System hat seine ursprüngliche Aufgabe in Gewebeumbau- bzw. -abbauprozessen wie Embryogenese, Wundheilung oder Ovulation. Es besteht aus den Komponenten Plasmin, seinen Aktivatoren uPA und tPA sowie dem zellulären Rezeptor uPAR und den Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 (Vassalli et al., 1991; Andreasen et al., 1997; 2000; Schmitt et al., 1997; 2000; Reuning et al., 1998). Der Rezeptor für uPA, uPAR, spielt eine zentrale Rolle in der Plasmingenerierung, indem er uPA bzw. dessen Zymogen pro-uPA an die Zelloberfläche bindet. Dies bewirkt eine Fokussierung proteolytischer Enzymaktivität und eine Amplifikation der Plasminogenaktivierung im direkten Umfeld der Tumorzelle (Vassalli et al., 1985; Roldan et al., 1990).

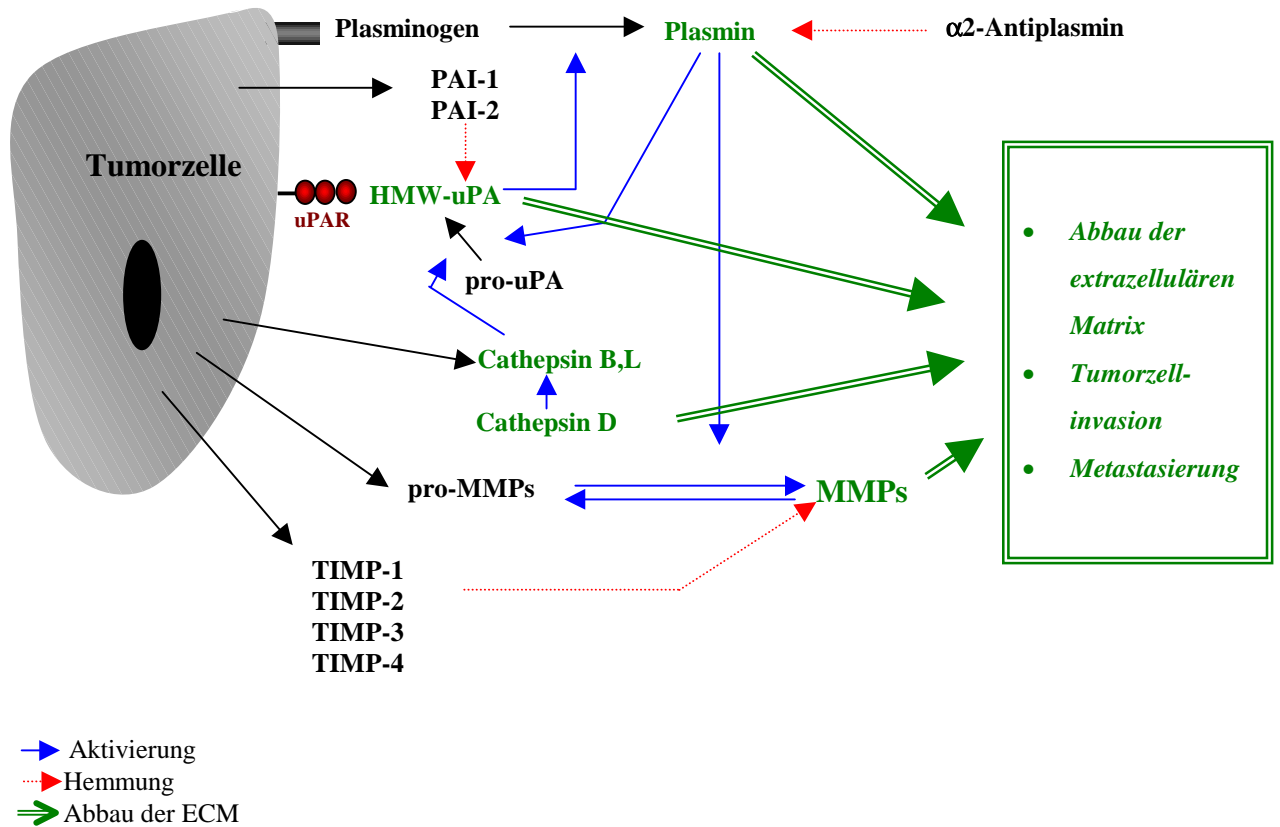


Abb. 2: Übersicht über verschiedene Systeme der tumorassoziierten Proteolyse

Von Tumor- bzw. auch von Stromazellen werden inaktive Vorstufen der Proteinasen (Proenzyme oder Zymogene) sezerniert und durch hydrolytische Spaltung einer Peptidbindung in aktive Proteinasen überführt. Pro-uPA wird z.B. von Plasmin und von den Cathepsinen B und L aktiviert. Das Plasminsystem spielt in der Tumorgenese eine wichtige Rolle, da Plasmin zahlreiche Komponenten der extrazellulären Matrix abbauen sowie auch Vorstufen der Matrixmetalloproteinase und pro-uPA aktivieren kann. uPA und Plasminogen werden durch spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche fokussiert und dort aktiviert. Die enzymatische Aktivität der Proteinase wird durch spezifische Inhibitoren reguliert, wobei uPA von PAI-1 und PAI-2, Plasmin von α 2-Antiplasmin und MMPs von TIMP-1, -2, -3 und -4 gehemmt werden.

Durch die Bindung von sezerniertem pro-uPA an den spezifischen Rezeptor uPAR, kann pro-uPA zu enzymatisch aktivem uPA durch z.B. Plasmin und Cathepsin B oder L umgesetzt werden (Goretzki et al., 1992; Kobayashi et al., 1991; Andreasen et al., 1997). uPA wiederum konvertiert z.B. Plasminogen zu Plasmin. Plasmin spaltet eine große Anzahl von extrazellulären Matrixproteinen, wie Fibrin, Fibronectin, Laminin und Vitronectin (Andreasen et al., 1997; Mignatti and Rifkin, 1993) und aktiviert Proenzyme der kollagenabbauenden Matrixmetalloproteinase (MMPs) (Mazzieri et al., 1997). Pro-MMPs können aber auch über

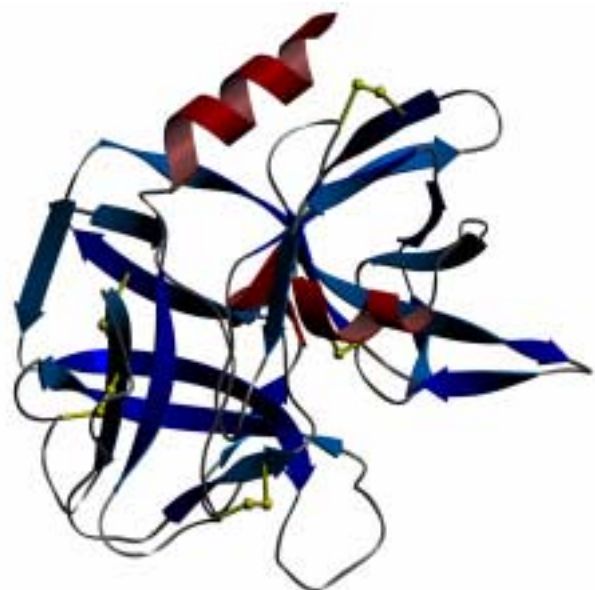
membranständige Matrixmetalloproteinasen (MT-MMPs) aktiviert werden (Seiki, 1999). Durch diese Interaktionen zwischen den verschiedenen proteolytischen Systemen und durch eine große Anzahl an Aktivatoren und Inhibitoren wird die proteolytische Aktivität von Tumorzellen sehr fein reguliert (Andreasen, et al., 1997; 2000; Reuning et al., 1998; Schmitt et al., 1997; 2000) (Abb. 2).

1.4 Der Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA) und die Inhibitoren PAI-1 und PAI-2

Der Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ (uPA) ist ein glykosyliertes, 52 kDa großes Protein und wurde ursprünglich aus Urin isoliert (Williams et al., 1951). uPA wird als einkettiges, proteolytisch inaktives Proenzym pro-uPA (52 kDa) u.a. von Nierentubulizellen, Fibroblasten und Tumorzellen sezerniert (Danø et al., 1985; Schmitt et al., 1992). uPA ist aus drei funktionellen Domänen aufgebaut: Die *growth factor-like domain* (GFD) ist 6 kDa (AS 1-48) groß und enthält die uPAR-Bindungsregion, welche von Aminosäure 19 bis 31 reicht (Magdolen et al., 1996). Die zweite Domäne ist die sogenannte Kringeldomäne (AS 49-131), welche Homologien zu den Kringeldomänen von Prothrombin und Plasmin(ogen) aufweist. Die katalytische (dritte) Domäne, deren Röntgenkristallstruktur in Abb. 3 zu sehen ist, stellt eine typische Serinproteinase-Domäne mit den Aminosäuren der katalytischen Triade dar (His 204; Asp 255 und Ser 356).

Abb. 3: Röntgenkristallstruktur der katalytischen Domäne von uPA

Röntgenkristallstruktur der katalytischen Domäne (AS 159 – AS 411) des Plasminogen-aktivators vom Urokinase-Typ (Spraggon et al., 1995). Diese uPA-Domäne ist ein sphärisches Protein, das sich aus zwei antiparallelen β -barrel-Subdomänen zusammensetzt. Das katalytische Zentrum mit den Aminosäuren der katalytischen Triade (His 204, Asp 255 und Ser 356) liegt zwischen den beiden Subdomänen.



Durch die Spaltung der Bindung Lys 158 – Ile 159, z.B. durch Plasmin, Trypsin, Kallikrein, Cathepsin B oder Cathepsin L entsteht aus dem einkettigen pro-uPA der zweikettige, enzymatisch aktive HMW-uPA (*high molecular weight-uPA*) (Kobayashi et al., 1991; Goretzki et al., 1992; Andreasen et al., 1997). HMW-uPA setzt sich aus der sogenannten A- und der B-Kette zusammen, welche durch eine Disulfidbrücke (Cys 148 – Cys 279) miteinander verknüpft sind. Die A-Kette besteht aus der GFD- und Kringel-, die B-Kette aus der Serinproteinasedomäne. Durch Spaltung von HMW-uPA zwischen Lys 135 – Lys 136 entsteht das sogenannte aminoternale Fragment (ATF) und der *low molecular weight-uPA* (LMW-uPA), der nicht mehr an uPAR binden kann, da die uPAR-Bindungsstelle im Bereich des ATF (Appella and Blasi, 1990; Magdolen et al., 1996) liegt. LMW-uPA beinhaltet die Serinproteinasedomäne, d.h. sie kann Plasminogen zu Plasmin aktivieren (Appella and Blasi, 1990).

Die Plasminogenaktivator-Inhibitoren PAI-1 und -2 bilden äquimolare, stabile Komplexe mit uPA. Sie gehören zur Klasse der Serpine (Serin-Proteinase-Inhibitoren). PAI-1 ist ein spezifischer Inhibitor des uPA und moduliert durch seine Interaktionen mit vielen weiteren Molekülen das uPA-System. PAI-1 ist ein glykosyliertes einkettiges Protein (52 kDa), welches von Blutplättchen, Endothelzellen und Tumorzellen exprimiert wird (Erickson et al., 1984; 1985; Kruithof et al., 1986). PAI-1 unterscheidet sich von allen anderen Serpinen dadurch, daß es nur eine sehr kurze Halbwertszeit von etwa 2 h aufweist, und dabei von einer aktiven in eine latente, inaktive Form übergeht (Erickson et al., 1985; Pannekoek et al., 1986). Durch Bindung an Heparin oder Vitronektin wird die aktive PAI-1-Form *in vivo* stabilisiert (Declerck et al., 1988; van Meijer and Pannekoek, 1995).

PAI-2 besitzt ein Molekulargewicht von 60 kDa und ist zu 38% mit PAI-1 identisch. PAI-2 ist unter physiologischen Bedingungen im Serum nicht nachweisbar, wird aber z.B. in der Schwangerschaft hauptsächlich von Trophoblastzellen der Plazenta exprimiert (Kawano et al., 1986).

1.5 Der Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-Rezeptor (uPAR; CD87)

1.5.1 Strukturelle und biochemische Eigenschaften des uPAR

Der Rezeptor für uPA, uPAR (CD87), wurde 1985 erstmals auf der Zelloberfläche von Monozyten und der promyeloiden Leukämiezelllinie U937 nachgewiesen (Vassalli et al., 1985; Stoppelli et al., 1985). Der uPAR ist ein cysteinreiches Protein und besteht aus drei strukturell homologen Domänen (Behrendt et al., 1991; 1996; Ploug et al., 1994). Der uPAR ist durch eine Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Einheit in der Zellmembran verankert (Ploug et al., 1991a; 1991b), welche sich am C-terminalen Ende von Domäne III befindet (Abb. 4 und 5 A). Der uPAR besitzt keine membrandurchspannende und deshalb auch keine intrazelluläre Domäne (Ploug et al., 1991a; 1991b).

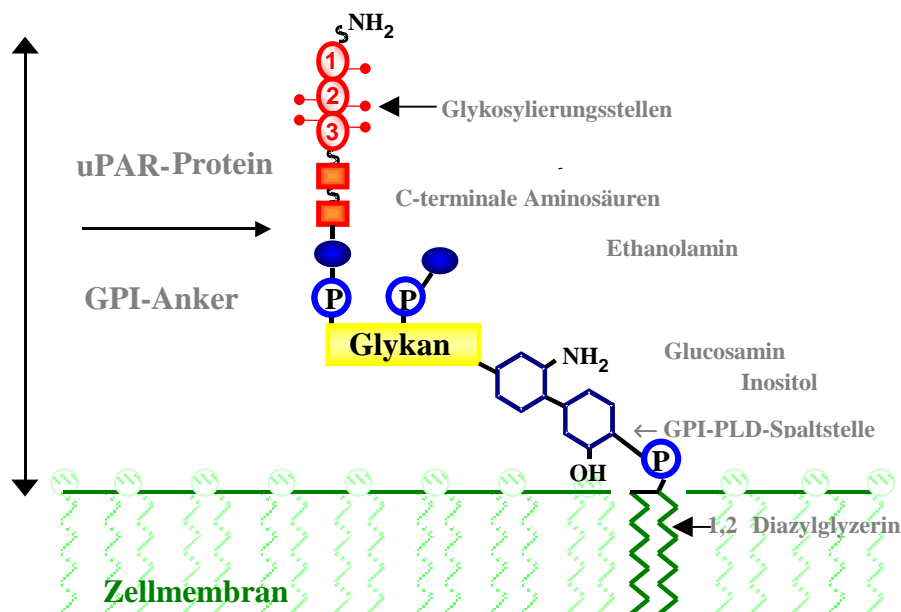


Abb. 4: Schema des uPAR

Die Darstellung zeigt die Domänenstruktur des uPAR und seine Verankerung in der Zellmembran über den Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker (Ploug et al., 1991b). Die Verbindung zwischen dem uPAR-Protein und dem Glykolipid besteht aus einem Phosphoethanolamin und der Glykaneinheit des Glykolipids. Die Fettsäuren der Diazylglyzerineinheit sind in den äußeren Anteil der Phospholipiddoppelschicht eingebettet.

Während der posttranslationalen Modifikation wird dem uPAR ein 22 Aminosäuren langes N-terminales Signalpeptid (335 AS – 22 AS = 313 AS) sowie 30 C-terminale Aminosäuren abgespalten (313 AS – 30 AS = 283 AS). An diesen neuen C-Terminus des uPAR (Aminosäure Gly 283) wird im endoplasmatischen Retikulum der GPI-Anker befestigt.

uPAR bindet sowohl das enzymatisch inaktive einzelsträngige pro-uPA sowie das enzymatisch aktive zweikettige HMW-uPA mit großer Affinität (Dissoziationskonstante K_d : 0,1-1,0 nM) (Stoppelli et al., 1985; Blasi, 1988). Die hauptsächliche uPA-Bindestelle liegt zwischen AS 50 und AS 66 des uPAR in Domäne I (Behrendt et al., 1991; Møller et al., 1993; Pöllänen et al., 1993; Ploug et al., 1998b; Luther et al., 1997; Gårdsvoll et al., 1999). Anhand neuester Studien konnte mittels der *photoaffinity labeling*-Methode und *cross-linking*-Experimenten mit radioaktivem ATF gezeigt werden, daß an der Bindung von uPA an uPAR auch die Domänen II und III beteiligt sind (Ploug et al., 1998b; Behrendt et al., 1996; Riitinen et al., 1996). Fehlen Domäne II und III, so sinkt die Bindungsaffinität des uPAR zu uPA um das 100- bis 1000fache (Behrendt et al., 1996; Ploug, 1998b).

Der uPAR ist ein hochglykosyliertes Protein mit einem heterogenen Molekulargewicht von 45 bis 60 kDa, in Abhängigkeit von seinem Glykosylierungsgrad (Roldan et al., 1990; Behrendt et al., 1990). Der uPAR besitzt fünf potentielle N-Glykosylierungsstellen, es sind jedoch nur vier (Domäne I: Asn 52; Domäne II: Asn 162; Asn 172; Domäne III: Asn 200; nicht aber Asn 233 in Domäne III) mit Oligosacchariden verknüpft (bestehend aus Galactose-, Mannose-, N-Acetylhexosamin- und Fucose-Einheiten) (Ploug et al., 1998a). Wird der uPAR *in vitro* vollständig deglykosyliert, besitzt er ein Molekulargewicht von 35 kDa (Estreicher et al., 1989). Vollständig deglykosyliert verliert der uPAR die Fähigkeit uPA zu binden, daher erscheint die Glykosylierung essentiell zu sein für die funktionelle Aktivität des uPAR gegenüber uPA. Die heterogene Glykosylierung erschwert die Kristallisation des uPAR für Untersuchungen mittels Röntgenstrukturanalyse. Es wurde jedoch eine Proteinstruktur mittels NMR-Technik (Nuclear Magnetic Resonance) von humanem CD59 ermittelt (Abb. 5 B), einem Mitglied der Ly-6/uPAR-Proteinsuperfamilie (Fletcher et al., 1994), welches mutmaßlich eine strukturelle Homologie zur Domäne I des uPAR besitzt (Ploug et al., 1995; 1998b).

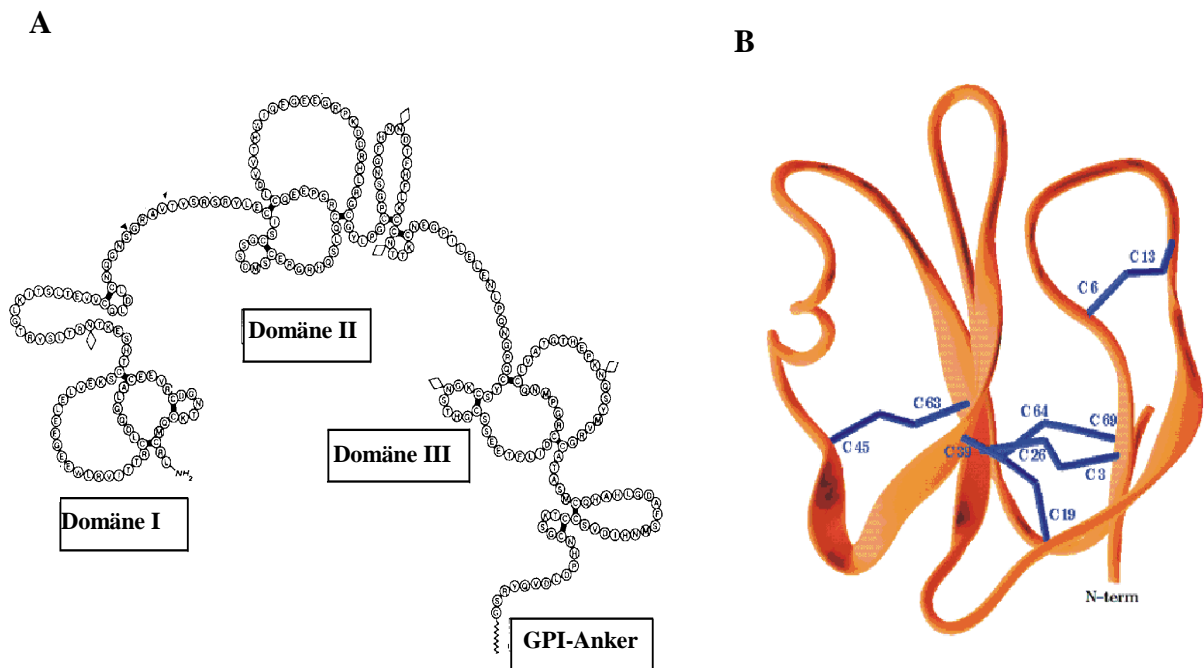


Abb. 5: Struktur des uPAR

(A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur des uPAR (Ploug et al., 1991a; 1994). Die Lage der Cysteinbrücken ist nur für Domäne I experimentell bestimmt worden. Die Struktur der Domänen II und III wurde aufgrund ihrer Homologie zur Domäne I vorhergesagt. Die Rauten kennzeichnen die Glykosylierungsstellen des uPAR. (B) Mittels NMR-Technologie ermittelte dreidimensionale Proteinstruktur von humanem CD59, welches zur gleichen Ly-6/uPAR-Proteinsuperfamilie wie auch uPAR gehört. CD59 ist ein GPI-verankertes Molekül der Komplementaktivierung. Es besteht allerdings nur aus einer Domäne, welche aber vermutlich eine strukturelle Homologie zu Domäne I des uPAR besitzt (Fletcher et al., 1994; Ploug et al., 1998b; 1995).

Neben dem humanen uPAR (Roldan et al., 1990) ist das Vorkommen von uPAR in anderen Spezies, z.B. in Rindern (Krätzschar et al., 1993), Mäusen (Kristensen et al., 1991), Ratten (Rabbani et al., 1994) und Hamstern (Fowler et al., 1998) beschrieben worden.

Befindet sich wenig oder kein uPAR auf der Zelloberfläche, wie z.B. mittels uPAR-*knock-out*-Mäusen untersucht werden konnte, zeigte sich erstaunlicherweise keine signifikante Beeinträchtigung der Mäuse bezüglich Entwicklung, Schwangerschaft und Blutgerinnung (Dewerchin et al., 1996).

1.5.2 Weitere Auswirkungen der Bindung von uPA an uPAR

Zusätzlich zum Einfluß auf die zelloberflächenassoziierte Proteinaseaktivität ist das uPA/uPAR-System an weiteren biologischen Prozessen beteiligt, wie z.B. uPAR-Internalisierung, Zellproliferation, Migration und Chemotaxis.

Untersuchungen zum Zusammenhang der Bindung von uPA an uPAR mit der Stimulation der Zellproliferation wurden von Rabbani et al. (1990) durchgeführt. Sie konnten zeigen, daß die mitogene Aktivität von uPA auf Osteosarkomzellen durch enzymatisch aktives und inaktives uPA ausgeübt wird. Zusätzliche Hinweise auf einen mitogenen Effekt der Interaktion von uPA mit zellgebundenem uPAR wurden von Fischer et al. (1998) erbracht, die zeigen konnten, daß die Proliferation von enzymatisch aktivem und inaktivem uPA oder rezeptorbindendem ATF auf humane Ovarialkarzinomzellen stimuliert wird.

Eine weitere Bedeutung bekommt die Bindung von uPA an uPAR in Gegenwart von PAI-1. Bindet PAI-1 an den uPA/uPAR-Komplex, kommt es zur Internalisierung dieses ternären Komplexes. Dies geschieht durch die Interaktion des ternären Komplexes mit CD91, dem α_2 -Makroglobulinrezeptor/*LDL-receptor related protein* (α_2 -MR/LRP) (Nykjaer et al., 1992). In der Zelle werden uPA und PAI-1 von uPAR abgetrennt und degradiert. Der uPAR wird größtenteils wieder an die Zelloberfläche gebracht („*recycling*“), wo er erneut pro-uPA binden kann (Cubellis et al., 1990; Nykjaer et al., 1997; Herz et al., 1992; Andreasen et al., 1994). Dieser Prozeß dient möglicherweise der Regulation des Plasminogenaktivator-Systems, da z.B. uPAR an einer anderen als der Internalisierungsstelle wieder an die Zelloberfläche gebracht werden kann, und es so zu einer Fokussierung der proteolytischen Aktivität kommen kann. Bindet PAI-2 an einen uPA/uPAR-Komplex, so wird dieser nicht internalisiert. uPA wird dabei in zwei Teile gespalten und dadurch inaktiviert (Ragno et al., 1995).

Die Bindung von uPA an uPAR ist auch im Zusammenhang mit der Adhäsion, Migration und Chemotaxis von Tumorzellen untersucht worden (Fazioli et al., 1997; Resnati et al., 1996; Gyetko et al., 1995). Die chemotaktische Domäne des uPAR (Aminosäure 84-92) liegt im kurzen Verbindungsbereich zwischen Domäne I und II (Fazioli et al., 1997). Dieser Bereich ist ein proteinasesensitiver Bereich von uPAR, welcher von uPA und anderen Proteinasen, auch wenn sie in physiologischen Konzentrationen vorliegen, effizient gespalten wird.

Synthetische Peptide, welche dieses Epitop enthalten, fördern z.B. die Chemotaxis von humanen THP-1 Zellen (Fazioli et al., 1997).

Der Interaktion des uPAR mit uPA kommt noch eine weitere Bedeutung hinzu. Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung von uPA an uPAR mehrere Signaltransduktionswege beeinflußt (Dumler et al., 1994; 1998; Bohuslav et al., 1995; Resnati et al., 1996; Wang, 2001), obwohl uPAR keine intrazelluläre Domäne besitzt und somit das Signal über Adaptorproteine in die Zelle gelangen muß (Dumler et al., 1993; 1994; 1999). Vor diesem Hintergrund wurde in den letzten Jahren berichtet, daß z.B. in Ovarialkarzinomzellen die Bindung von uPA an uPAR zur Induktion der Expression von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-fos führt (Dumler et al., 1994).

1.5.3 Interaktionen des uPAR mit weiteren Proteinen

Forschungsergebnisse der letzten Jahre weisen darauf hin, daß das Plasminogenaktivator-System eine biologisch wichtige Verbindung zwischen der perizellulären Proteolyse und der Adhäsion von Zellen darstellt. Dies zeigte sich darin, daß die Bindung von Zellen an Komponenten der EZM durch uPAR, PAI-1 und zelloberflächenassoziierte Adhäsionsrezeptoren der Integrinfamilie, beispielsweise β 1-, β 2- und β 3-Integrine, beeinflußt wird (Wei et al., 1996; May et al., 1998; Ghiso et al., 1999). Integrine binden an EZM-Proteine wie Vitronektin, Kollagen, Fibronektin und Fibrin. Außerdem verhindert die Bindung von uPAR an β 1-Integrin die β 1-integrinvermittelte Zelladhäsion an die EZM-Komponente Fibronektin (Wei et al., 1996; Preissner et al., 2000). Dies zeigt eine direkte Verbindung zwischen dem Plasminogenaktivator-System und integrinvermittelter Adhäsion und Migration von Zellen.

Neben Integrinen interagiert uPAR auch mit Vitronektin, einer Komponente der extrazellulären Matrix (Abb. 6) (Deng et al., 1994; Waltz et al., 1994; Kanse et al., 1996). Bindet uPA an uPAR, wird die Bindung des uPAR an Vitronektin verstärkt. Bei der Interaktion von uPAR mit Vitronektin konkurrieren uPAR und PAI-1 um dieselbe Bindungsstelle an der sog. Somatomedin-Domäne des Vitronektins und können somit die Interaktion von Vitronektin mit Integrinen unterbinden (Deng et al., 1994; Steffanson and Lawrence, 1996; Kanse et al., 1996; Sidenius et al., 2000).

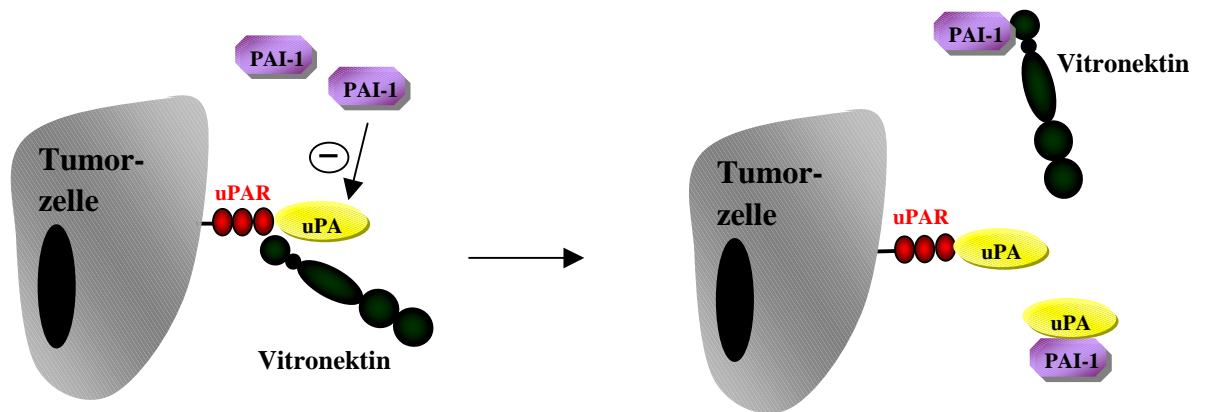


Abb. 6: Unterschiedliche Interaktionen von uPAR mit uPA, PAI-1 und Vitronektin

PAI-1 kann durch Konkurrenz mit uPAR um dieselbe Bindestelle des Vitronektins die uPAR/Vitronektin-Verbindung lösen, jedoch nur, wenn es im Überschuss gegenüber uPA vorhanden ist, denn uPA stabilisiert die uPAR/Vitronektin-Bindung. Jegliche mengenmäßige Veränderung dieser Komponenten zueinander führt zu einer Änderung des adhäsiven, migrativen und invasiven Verhaltens der Karzinomzelle.

PAI-1 konkurriert mit uPAR um die Bindung an Vitronektin und lockert so die uPA/uPAR/Vitronektin-Bindung. PAI-1 ermöglicht somit die Reduktion von uPAR-vermittelter Adhäsion auf Vitronektin (Abb. 6). Der uPAR/Integrin-Gehalt einer Tumorzelle einerseits und der PAI-1-Gehalt andererseits scheinen für eine kontrollierte Loslösung bzw. Anheftung der Zelle an die extrazelluläre Matrix verantwortlich zu sein (Loskutoff et al., 1999; Ossowski et al., 2000).

1.5.4 Die lösliche Form des uPAR (suPAR)

Der uPAR kommt nicht nur in der GPI-verankerten zellulären Form, sondern auch in einer zweiten, löslichen Form vor (suPAR). suPAR konnte im konditionierten Medium von einigen Zelllinien (Lau and Kim, 1994) sowie in Aszitesflüssigkeit und Blut von Ovarialkarzinompatientinnen identifiziert werden (Pedersen et al., 1993). Löslicher uPAR

konnte ebenfalls im Plasma von gesunden Personen nachgewiesen werden (Rønne et al., 1995). Möglicherweise existieren alternativ gespleißte Varianten des uPAR, welche keinen GPI-Anker aufweisen (Rønne et al., 1995; Sidenius et al., 2000). Tatsächlich konnten zumindest im Mausmodell zwei durch einen alternativen Spleißvorgang entstandene mRNAs für uPAR nachgewiesen werden (Kristensen et al., 1991; Pyke et al., 1993). *In vitro* kann der GPI-Anker von uPAR aber auch durch die Einwirkung der PI-spezifischen Phospholipase C gespalten werden (Pedersen et al., 1993). Es gibt außerdem Hinweise aus *in vitro*-Zellkulturexperimenten, daß eine zelluläre Phospholipase D für die Freisetzung von GPI-verankerten Proteinen verantwortlich ist (Brunner et al., 1994; Metz et al., 1994; Wilhelm et al., 1999). Die GPI-spezifische Phospholipase D spaltet den GPI-Anker zwischen Inositol und Phosphat (Metz et al., 1994), woraus ein löslicher uPAR mit einem C-terminalem Inositol-Glycan-Rest entsteht (Abb. 5).

Es konnte gezeigt werden, daß rekombinanter, funktionell aktiver suPAR *in vitro* freies extrazelluläres uPA bindet. Dadurch wird uPA dem zelloberflächenassoziierten uPAR entzogen (Wilhelm et al., 1994; Chavakis et al., 1998). Zusätzlich konnten Wilhelm et al. (1994) beobachten, daß die Zugabe von rekombinantem suPAR die uPA-induzierte Tumorzellproliferation und -invasion in eine künstliche EZM (Matrigel) inhibiert (Wilhelm et al., 1994).

1.6 Klinische Relevanz des Plasminogenaktivator-Systems

Das erhöhte Vorkommen einiger Komponenten von proteolytischen Systemen, insbesondere des Plasminogenaktivator-Systems, steht in enger Verbindung mit einem invasiven und aggressiven Phänotyp von Tumoren (Andreasen et al., 1996; Schmitt et al., 1997; Reuning et al., 1998). Deshalb wurden der Gehalt der Serinproteinase uPA, ihres membrangebundenen Rezeptors uPAR (CD87) und der Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 in vielen soliden malignen Tumoren bestimmt und die prognostische Relevanz von uPA, uPAR und PAI-1 für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben der Patienten untersucht. Es wurde gezeigt, daß uPA, uPAR und PAI-1 einen hohen klinischen Wert besitzen. Sie können zur Abschätzung der Wahrscheinlichkeit der Tumormetastasierung oder eines frühen Todes von Tumorpatienten

herangezogen werden (Duffy et al., 1990; Jänicke et al., 1991; Foekens et al., 1992; 1994; Nekarda et al., 1994).

Hohe uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Brust-, Cervix-, Blasen-, Nieren-, Magen-, Pankreas-, Kopf- und Hals- sowie in Leber-Karzinomgeweben sind gleichbedeutend mit einer Progression der Tumorerkrankung und einer schlechteren Prognose für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben des Patienten (Reuning et al., 1998; Schmalfeldt et al., 1995; Kuhn et al., 1999; Foekens et al., 1994; Schmitt et al., 1997; 2000).

Auch in Ovarialkarzinomen zeigten quantitative Untersuchungen der Komponenten des Plasminogenaktivator-Systems einen prognostischen Wert von uPA und PAI-1. Patientinnen mit erhöhten uPA- und PAI-1-Konzentrationen im Ovarialkarzinomgewebe haben eine schlechtere Prognose für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben als Patientinnen mit niedrigen uPA- und PAI-1-Werten (Schmalfeldt et al., 1995; Kuhn et al., 1999; Tecimer et al., 2000). Ein bereits etablierter Tumormarker beim Ovarialkarzinom ist das CA125. Der CA125-Gehalt im Blut von Patienten wird für die Therapieverlaufskontrolle bestimmt. Als weiterer möglicher Prognosemarker wurde die in nur 10 % der Ovarialkarzinompatientinnen vorkommende dominant genetische Prädisposition in den BRCA-1 und 2-Genen untersucht (Boyd et al., 1998).

Im Gegensatz zu den prognostischen Daten in Tumorgeweben für PAI-1 korrelieren hohe PAI-2-Antigenkonzentrationen mit einer guten Prognose des Patienten bezüglich des Gesamt- und rezidivfreien Überlebens (Duggan et al., 1997).

Eine Erhöhung des uPAR-Antigengehaltes im Tumor oder Serum von Darm- bzw. Brustkrebspatienten korreliert mit einer schlechten Prognose für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben der Patienten, jedoch besitzt dieser Biomarker nur eine relativ geringe Signifikanz (Stephens et al., 1998; 1999; Grondahl-Hansen et al., 1995; Mustjoki et al., 2000; Baker et al., 2000). In Tumorgewebeextrakten von Ovarialkarzinompatientinnen im fortgeschrittenen Stadium FIGO III ist im Vergleich zu benignem Ovarialkarzinomgewebe ebenfalls eine erhöhte uPAR-Konzentration festzustellen (Schmalfeldt et al., 1995). Es konnte außerdem gezeigt werden, daß die Überexpression von uPAR in disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit Magenkarzinomen zumindest ein frühes Rezidiv vorhersagt (Heiss et al., 1995; Andreasen et al., 1997; 2000).

Weitere klinische Studien zeigen, daß suPAR im Blut von Patienten mit Kolorektal- oder Ovarial-Karzinom zu detektieren ist (Stephens et al., 1998; 1999; Sier et al., 1998). Vergleicht man den suPAR-Gehalt im Serum und anderen Körperflüssigkeiten von Tumorpatienten mit der Patientenüberlebenszeit, so findet man, daß ein hoher suPAR-Gehalt als Hinweis für eine schlechte Prognose bzw. ein kürzeres Überleben herangezogen werden kann (Pedersen et al., 1993; Sier et al., 1998; Wahlberg et al., 1998; Brüner et al., 1999; Mustjoki et al., 2000). Die lösliche, GPI-ankerlose Form des uPAR (suPAR) ist auch im malignen Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen beschrieben worden, und es korreliert eine erhöhte suPAR-Konzentration mit einer schlechten Prognose der Patientin für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben (Pedersen et al., 1993; Sier et al., 1998; Wahlberg et al., 1998). Der Mechanismus, welcher den signifikant erhöhten suPAR-Gehalt im Blut und Aszites von Tumorpatienten verursacht, ist bislang noch ungeklärt (Brüner et al., 1999). Auch im Plasma von Patienten, welche an paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie - einer seltenen hämatologischen Stammzellkrankheit - leiden, wurde ein erhöhter Gehalt an suPAR gemessen, der auf einen Verlust der GPI-Anker-Synthese zurückzuführen ist (Yeh et al., 1994).

1.7 Biochemische und molekularbiologische Vorgehensweisen zur Inhibierung von uPA und uPAR

Die enge Korrelation zwischen einem erhöhten uPA-, PAI-1-, uPAR-Gehalt im Tumorgewebe und der Tumoraggressivität hat das Plasminogenaktivator-System in letzter Zeit ein potientes Ziel für therapeutische Maßnahmen werden lassen. So wurden im Laufe der letzten Jahre mehrere experimentelle Ansätze zur Reduktion der uPA/uPAR-Interaktionen auf Tumorzellen untersucht (Review: Mazar, 2001). Beispielsweise führte die Unterdrückung der uPA- und uPAR-Synthese mittels Antisense-Oligonukleotiden zu einem erniedrigten uPA- oder uPAR-Expressionsniveau und einer Reduktion der Invasivität von Ovarialkarzinomzellen (Wilhelm et al., 1995), von Fibroblasten (Quattrone et al., 1995) sowie von Glioblastomzellen (Mohan et al., 1999). Auch gegen uPA gerichtete Antikörper wurden eingesetzt, um die uPA/uPAR-Interaktion auf der Tumorzelloberfläche zu unterbinden, womit das invasive Potential, Zellproliferation und -adhäsion von humanen Tumorzellen sehr

effizient reduziert werden konnte (Ossowski and Reich, 1983). In einem weiteren Ansatz wurden durch die Blockierung der proteolytischen Aktivität von uPA mit dem Enzyminhibitor B-428 Mammakarzinomzellen in ihrem Wachstum gehemmt und außerdem die Invasivität dieser Zellen signifikant verringert (Xing et al., 1997). Durch den Einsatz von uPA-Analoga wie z.B. ATF als kompetitivem Liganden des uPAR läßt sich das invasive Potential von humanen Mammakarzinomzellen *in vitro* senken (Lu et al., 1994). Ferner interferieren kurze synthetische, von uPA abgeleitete Peptide mit der uPA/uPAR-Bindung (Magdolen et al., 1996; Bürgle et al., 1997) und reduzieren die Invasion von humanen Ovarialkarzinomzellen in der Nacktmaus (Kobayashi et al., 1993).

Eine weitere Möglichkeit, die Interaktion zwischen uPA und uPAR auf der Tumorzelloberfläche aufzuheben, bietet die Zugabe von löslichem uPAR (suPAR). suPAR bindet freies uPA, welches daraufhin nicht mehr der Bindung an den zelloberflächenassoziierten uPAR zur Verfügung steht. So demonstrierten *in vitro*-Experimente, daß Ovarialkarzinomzellen durch exogene Zugabe von suPAR ihr Wachstumsverhalten und invasives Potential signifikant verringern (Wilhelm et al., 1994).

2. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen war es, zu analysieren, ob durch Modulation der uPA/uPAR-Interaktion die Plasminogen-Aktivierungskapazität, das Tumorstadium und die Tumorausbreitung von humanen Ovarialkarzinomzellen beeinflusst wird. Im Rahmen dieser Dissertation sollte in einer Ovarialkarzinomzelllinie (OV-MZ-6#8) in parallelen Ansätzen sowohl die Auswirkung der GPI-uPAR-Überexpression als auch die Effekte der Expressionserhöhung des löslichen uPAR untersucht werden (Abb. 7).

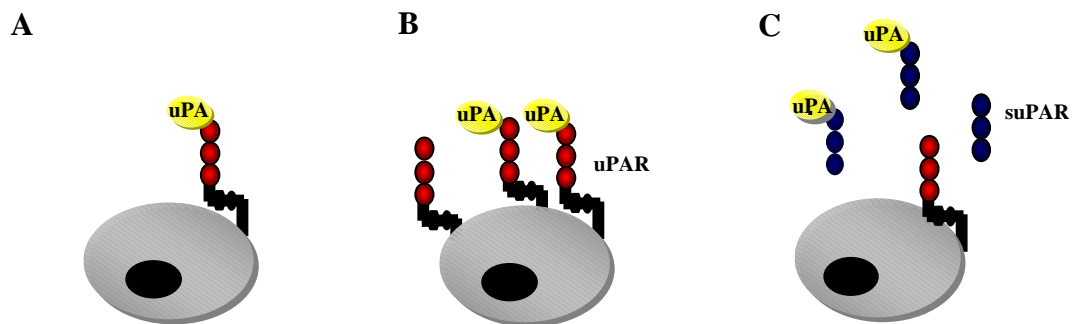


Abb. 7: Schematische Darstellung der Versuchsansätze dieser Arbeit

(A) Wildtypzelllinie OV-MZ-6#8

(B) GPI-uPAR-überexprimierende Ovarialkarzinomzelllinie

(C) suPAR-exprimierende Ovarialkarzinomzelllinie. suPAR verhindert die Bindung von uPA an zellgebundenen uPAR

Für diese Studien sollten mittels GPI-uPAR- bzw. suPAR-cDNA-Expressionsvektoren stabile GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 hergestellt, charakterisiert und folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Werden GPI-uPAR und suPAR in einer funktionell aktiven Form exprimiert ?
- Unterscheiden sich GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten in ihrer uPAR-Expression, in der Plasminogenaktivierung, und in ihrem Adhäsions- und Wachstumsverhalten ?
- Unterscheiden sich GPI-uPAR- bzw. suPAR-transfizierte Ovarialkarzinomzelllinien hinsichtlich Tumorstadium und -ausbreitung im Nacktmausmodell ?

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Agarose	Sigma, München
Ampicillin	Sigma, München
APS	Sigma, München
Bacto-Agar	Difco Laboratories, USA
Bacto-Hefeextract	Difco Laboratories, USA
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, USA
BCA-Proteintest	Pierce, Rockford, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma, München
<i>Complete</i> ; Proteinaseinhibitoren-Mix	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DEPC	Sigma, München
Desoxyribonukleotide (dNTP)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DMEM mit Glutamax	Gibco, Eggenstein
DMSO	Roth, Karlsruhe
DTT	Gibco, Eggenstein
EDTA	Biochrom, Berlin
ELISA Kit D-Dimer Test Gold EIA # 802	American Diagnostica, Greenwich, CT, USA
ELISA Kit uPA # 894	American Diagnostica, Greenwich, CT, USA
ELISA Kit uPAR # 893	American Diagnostica, Greenwich, CT, USA
ELISA Kit PAI-1 # 821	American Diagnostica, Greenwich, CT, USA
ELISA Kit tPA # 160	American Diagnostica, Greenwich, CT, USA
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS	Gibco, Eggenstein
Fibrinogen, F-3879	Sigma, München
Genitacin [®] , G 418-Sulfat	Gibco, Eggenstein
HBSS	Gibco, Eggenstein
HEPES	Gibco, Eggenstein
IPTG	Serva, Heidelberg
L-1450	Bachem, Heidelberg
L-Argininhydrochlorid	Sigma, München
L-Asparagin	Sigma, München
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Oligonukleotide	TOPLAB, Martinsried
PBS	Gibco, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	Serva, Heidelberg
PMA	Sigma, München
pRcRSV-Plasmid	Invitrogen, San Diego, USA
Polyacrylamid, Bisacrylamid 24:1	Roth, Karlsruhe
Propidiumjodid	Sigma, München
RPMI-1640 ohne Phenolrot	Gibco, Eggenstein

Triton X-100	Sigma, München
Triton X-114	Sigma, München
Tween 20	Sigma, München
X-Gal	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
XL1-Blue, superkompetente <i>E. coli</i> -Zellen	Stratagene, Heidelberg

Alle weiteren Chemikalien wurden in p.a. Qualität von der Firma Sigma, München, oder der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

3.2 Enzyme

Expand™ High Fidelity Taq Polymerase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
HMW-uPA	Curasan, Kleinostheim
Lysozym	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Plasmin, human	Sigma, München
Plasminogen, human	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Proteinase K	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
pro-uPA	Grünenthal, Stolberg
Restriktionsendonukleasen	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
RNase A	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Thrombin	Sigma, München
Trypsin	Biochrom, Berlin
T4-Ligase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

3.3 Antikörper

Die monoklonalen Antikörper (mAK) IID7 und IIIIF10, welche beide humanen uPAR detektieren, wurden von Dr. T. Luther, Dresden und Dr. V. Magdolen, München (Luther et al., 1997) entwickelt und für Versuche zur Verfügung gestellt. Peroxidase-gekoppeltes Kaninchen-anti-Maus-IgG, und FITC-konjugiertes F(ab')₂ Fragment Kaninchen-anti-Maus-IgG waren von Dianova, Hamburg. Ziege-anti-Maus-IgG, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff ALEXA-488 markiert ist, wurde von Molecular Probes, Leiden, Niederlande, bezogen.

3.4 *E. coli*-Stamm und *E. coli*-Medien

XL1-Blue	<p>Bullock et al., 1987 Genotyp : <i>supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, lac F'</i> <i>[proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15, Tn10(Tet^r)]</i> Der rekombinationsdefiziente Suppressor-Stamm wird zur Expression von Fremdproteinen (kodiert auf Plasmiden) verwendet. Die transfizierte DNA wird modifiziert, aber nicht restringiert. Der <i>E. coli</i>-Stamm besitzt die <i>lacZΔM15</i>-Mutation, welche die α-Komplementation des β-Galaktosidase-Gens ermöglicht. Auf X-Gal- und IPTG-haltigen Agarplatten können somit rekombinante Kolonien durch die Weiß/Blau-Selektion überprüft werden.</p>			
Medien für <i>E. coli</i>	LB-Medium (pro Liter)	Bacto-Trypton Bacto-Hefeextrakt NaCl NaOH (5 N)	10,0 g 5,0 g 10,0 g 0,2 ml	
	LB-Platten	Bacto-Agar in LB (w/v)	1,5 %	

Die Medien wurden vor Gebrauch autoklaviert.

3.5 Expressionsvektor pRcRSV

Das Plasmid pRcRSV ist ein eukaryontischer Expressionsvektor (Abb. 8) mit einer kurzen *Polylinker*-Sequenz, die eine Klonierung von cDNA-Sequenzen hinter einem starken viralen Promotor erlaubt (Gorman et al., 1982, Yamamoto et al., 1980). Die Enhancer-Promotor-Sequenzen stammen von dem Rous-Sarkoma-Virus und ermöglichen eine hohe Transkriptionsrate der rekombinanten DNA. Als Selektionsmarker für die Expression der klonierten DNA in eukaryontischen Zellen enthält das Plasmid das Neomycin-Resistenzgen. Für die Selektion auf pRcRSV in Zellkulturen wurde 100 µg Geneticin[®]/ml Zellkultur-Medium zugegeben. Der pRC/RSV-Expressionsvektor enthält das Ampicillin-Resistenzgen als prokaryontischen Selektionsmarker. Für die Selektion in Prokaryonten auf pRcRSV wurde 50 µg Ampicillin/ml Medium zugegeben.

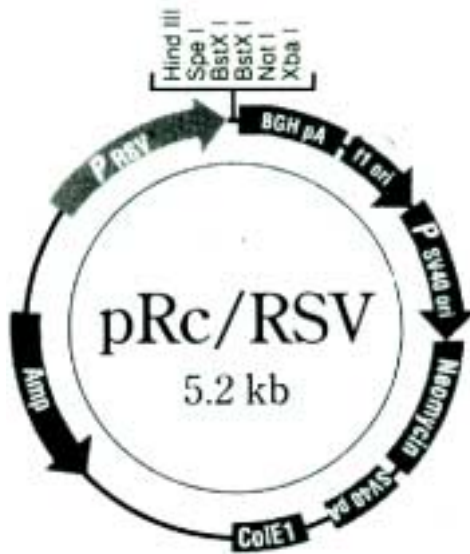


Abb. 8: Schema des Expressionsvektors pRcRSV

PRSV: Promotorsequenz des Rous-Sarkoma-Virus; BGHpA: Polyadenylierungssequenz; f1-ori: Replikationsursprung zur Bildung filamentöser Phagen; PSV40-ori: Replikationsursprung zur Neomycinresistenz; Neomycin: Neomycin oder Geneticin, bzw. G418-Resistenz; SV40 pA: Polyadenylierungssequenz; ColE1-ori: Replikationsursprung für *E. coli*; Amp: β -Lactamase-Gen

3.6 Oligonukleotide für die PCR

Die zur Amplifikation der cDNAs benötigten Oligonukleotide wurden von der Firma TOPLAB, Martinsried, bezogen. Die verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 1, Kapitel 4.1 aufgeführt.

3.7 Tumorzelllinien und Zellkulturmedien

Die humane Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 wurde aus Tumorzellen des Aszites einer 70-jährigen Patientin mit einem serös-papillärem Ovarialkarzinom FIGO IV von Möbus et al. (1992) etabliert. Diese Zelllinie wurde in der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der TU München subkloniert, charakterisiert und als OV-MZ-6#8-Zelllinie bezeichnet (Will et al., 1994; Fischer et al., 1998).

Die lymphoblastoide Suspensions-Zelllinie Raji wurde aus Burkitt Lymphom-Zellen eines männlichen Patienten etabliert und von ATCC, Rockland, USA, erworben.

Die Lymphomzelllinie U937 wurde aus einer pleuralen Effusion eines 37-jährigen männlichen Patienten mit diffusem Lymphom etabliert und von ATCC, Rockland, USA erworben.

Zelllinie	Zellkultur-Medium	Zusätze
OV-MZ-6#8-Zellen	Dulbecco's modified Eagle's Medium	10% (v/v) FCS (1000 U/ml) Penicillin/Streptomycin 10 mM Hapes 36 mg/l Asparagin 116 mg/l Arginin
Raji-Zellen U937-Zellen	RPMI 1640	10% (v/v) FCS 2 mM L-Glutamin

3.8 Rekombinanter, löslicher, humaner uPAR

Eine lösliche, verkürzte Form (Aminosäure (AS) 1–277) des humanen uPAR wurde in CHO-Zellen exprimiert (Chuchulowski et al., 1992), und aus dem Zellkulturüberstand durch Affinitätschromatographie mittels immobilisiertem HMW-uPA gereinigt (Wilhelm et al., 1994). Dieser rekombinante, lösliche uPAR (CHO-uPAR₁₋₂₇₇) wurde als positive Kontrolle für Versuche verwendet.

3.9 Molekularbiologische Methoden

Die aufgeführten Methoden wurden nach Sambrook et al. (1989) oder nach Angaben der Test-Produzenten / anderweitigen Autoren durchgeführt.

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

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (modifiziert nach Birnboim and Doly, 1979)

Reinigung von DNA (Phenol-Chloroform-Extraktion)

Fällung der DNA mit Ethanol oder Isopropanol

Restriktion und Ligation von DNA

Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose nach Tautz und Renz, 1983

Proteinbestimmung mit BCA-Protein-Assay-Reagenz, Pierce, Rockford, USA

3.10 Anzucht von transformierten *E. coli*

Für die Amplifikation rekombinanter Plasmid-DNA wurde diese in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue (superkompetente XL1-Blue *E. coli*-Zellen, Fa. Stratagene, Heidelberg) transformiert. Die transformierten Bakterien wurden auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Bakterien-Kolonie der Agarplatte wurde als Übernacht-Schüttelkultur (2 ml LB mit 100 µg Ampicillin/ml LB) bei 37 °C inkubiert. Aus dieser Bakterienkultur wurde die rekombinante Plasmid-DNA mittels Miniprep-Methode isoliert und durch Restriktionsanalyse überprüft.

Für eine Glycerinkultur wurden, nach Transformation der rekombinanten Plasmid-DNA in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue, aus jeweils einer Kolonie eine Bakterienkultur (2 ml LB mit 100 µg Ampicillin/ml LB) angelegt, 4-6 h kultiviert, mit 1 ml Glycerin (100%) gut vermischt und bei - 70 °C eingefroren. Transformierte Bakterien können auf diese Art bis zu 10 Jahre bei - 70 °C aufbewahrt werden.

3.11 Mutagenese der uPAR-cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur *in vitro*-Amplifikation von DNA und deren gleichzeitiger Mutagenese verwendet (Saiki et al., 1988). Die Mutagenese erfolgte mit Oligonukleotiden, welche eine veränderte Nukleotidsequenz gegenüber der Wildtyp-DNA-Sequenz besaßen. Die von den Oligonukleotiden ausgehenden, neu synthetisierten DNA-Stränge wiesen nach der PCR-Reaktion die mutagenisierten Stellen in der DNA auf.

Der PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 4,5 µl PCR-Puffer, 10-fach konzentriert (100 mM Tris-HCl; 15 mM MgCl₂; 500 mM KCl; 10 mg/ml Gelatine, pH 8,3)
- 1 µl cDNA (ca. 0,5 - 1 µg cDNA)
- 5 µl Nukleotidgemisch (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; je 2,5 mM)
- 5 µl Oligonukleotidlösung A (10 µM)
- 5 µl Oligonukleotidlösung B (10 µM)
- 24,5 µl steriles H₂O

Zu dem PCR-Ansatz wurde kurz vor dem PCR-Start folgender Taq-Ansatz zugegeben:

- 0,75 µl Expand™ High Fidelity Taq -Polymerase (5 U/µl)
- 0,5 µl Expand™ High Fidelity Taq-Puffer, 10-fach konzentriert
- 3,9 µl steriles H₂O

Die PCR-Reaktion wurde mit einem fünfminütigem Schritt bei 94 °C begonnen, um eine vollständige Denaturierung der DNA zu erreichen. Danach folgten 30 Zyklen zur DNA Amplifikation:

- 30 s Denaturierung bei 94 °C,
- 30 s Hybridisierung, bei mehreren Temperaturen, d.h. Zyklus 1-5 bei 40 °C, Zyklus 6-10 bei 45 °C und Zyklus 11-30 bei 55 °C
- 3 min Polymerasereaktion bei 72 °C

Danach wurde ein 10 minütiger Polymerasereaktionsschritt bei 72 °C angeschlossen.

Die PCR wurde im PCR-Cycler 2400 von Perkin-Elmer, Überlingen, durchgeführt. Anschließend wurde die amplifizierte, mutagenisierte DNA in einem 0,8%igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt und die DNA-Bande aus dem Agarosegel extrahiert. Die DNA wurde gefällt, mit 10 µg Proteinase K (5 µg/µl) in 100 µl Proteinase K-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA, pH 8,0; 0,5% (w/v) SDS) aufgenommen, 30 min bei 37 °C und danach

10 min bei 68 °C inkubiert. Durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Fällung der DNA wurden die Proteinase K-Enzyme wieder entfernt. Diese Behandlung der DNA ermöglichte die erfolgreiche Durchführung einer anschließenden Restriktion und Klonierung der DNA.

3.12 Sequenzierung der GPI-uPAR- und suPAR-cDNA

Alle cDNA-Sequenzierungen wurden von der Fa. TOPLAB, Martinsried, durchgeführt. Die cDNAs wurden mit der Methode nach Sanger et al. (1977) sequenziert und mit dem ABI PRISM 377 Genetic Analyzer von Perkin Elmer, Überlingen, analysiert.

3.13 Northern Blot

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Ovarialkarzinomzellen wurde nach der Methode von Chomczynski and Sacchi (1987) durchgeführt. Für die RNA-Präparation wurden 4×10^6 Ovarialkarzinomzellen durch Zugabe von 3 ml der Guanidiniumthiocyanat- und Phenolhaltigen-RNA-CleanTM-System-Lösung lysiert (RNA-CleanTM, AGS, Heidelberg). Das Zellysate wurde mit 0,1 Volumen Chloroform versetzt. Diese Lösung wurde 15 min bei $10.000 \times g$, 4 °C, zentrifugiert und die obere wäßrige (die RNA enthaltende) Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol wurde die RNA gefällt (15 min auf Eis) und durch einen Zentrifugationsschritt (15 min, $10.000 \times g$, 4 °C) präzipitiert. Das RNA-Präzipitat wurde zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl DEPC-behandeltem H₂O (1 ml DEPC in 1 Liter H₂O gelöst; DEPC inhibiert die RNasen, autoklaviert) über Nacht bei 4 °C gelöst. 15 µg RNA wurden auf einem formaldehydhaltigen Agarosegel nach Sambrook et al. (1989) aufgetrennt und die RNA mittels kapillarer Kräfte auf eine Nylonmembran (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) übertragen (Sambrook et al., 1989). Die Membran wurde anschließend 30 min bei 120 °C hitzefixiert. Danach wurde die Membran in einer Prähybridisierungslösung (10 ml Lösung enthalten 5 ml Formamid; 2,5 ml 5 M NaCl; 1,5 ml 50% (v/v) Dextransulfat; 0,5 ml

20% (w/v) SDS; 0,5 ml H₂O mit 40 µl tRNA (25 mg/ml, Gibco, Eggenstein)) und 100 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml, Sigma, Deisenhofen) bei 42 °C für 3 Stunden inkubiert. Die spezifische uPAR-Sonde wurde mit dem *Multiprime Labeling Kit* (Amersham, Braunschweig) nach Herstellerangaben radioaktiv markiert. Für die Hybridisierung der Membran mit der uPAR-Sonde wurden in die Prähybridisierungslösung 1×10^6 cpm der P³²-radioaktiv markierten Sonde zugegeben, und die Lösung mit der Membran über Nacht inkubiert. Zur Eliminierung der unspezifisch gebundenen RNA wurde die Membran 30 min bei 42 °C, 30 min bei 50 °C und anschließend 30 min bei 60 °C in einer 1 x SSC, 0,1%igen (w/v) SDS-haltigen Lösung gewaschen (SSC nach Sambrook et al., 1989). Anschließend wurde die Membran einem Film (Kodak, X-OMAT 50) exponiert.

3.14 Zellkultur-Methoden

Die humanen Ovarialkarzinom-, Raji- und U937-Zelllinien wurden in Falcon®-Gewebekulturflaschen (Becton-Dickinson, Heidelberg) in einer wasserdampfgesättigten 5% CO₂-Atmosphäre bei 37 °C in dem Brutschrank CO₂ Autozero (Heraeus Instruments, Hanau) kultiviert.

Die adhärenenten OV-MZ-6#8 Zellen wurden zur Subkultivierung mit einer 0,05%igen (v/v) EDTA/PBS-Lösung von den Böden der Kulturflaschen abgelöst. Für Experimente wurden nur solche Tumorzellen verwendet, die nicht über 80% konfluent gewachsen waren. Alle 6 Wochen wurden die Zellkulturen auf Mycoplasmenkontamination mit dem Mycoplasmentest BM Mycoplasma Detection Kit; der Firma Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, untersucht.

Die Suspensions-Zelllinie U937 wurde für uPAR-Studien in einer Konzentration von 3-5 x 10⁵ Zellen/ml Zellkultur-Medium mit 1 µM PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat-4-O-Methylether) für 72 h stimuliert. Nur adhärenente Zellen wurden für Versuche verwendet.

3.15 Etablierung stabil transfizierter Tumorzellen

3.15.1 Transfektion von OV-MZ-6#8-Zellen

Die stabile Transfektion von OV-MZ-6#8-Tumorzellen erfolgte mit Hilfe des kationischen Lipids Lipofectin™ (Gibco, Karlsruhe, Germany). 30 µl Lipofectin™ und 20 µg der jeweiligen cDNA wurden in jeweils 100 µl GAM separat 45 min bei RT inkubiert, anschließend zusammengegeben und nochmals 20 min bei RT inkubiert. Diese Mischung wurde zusammen mit 2,8 ml Zellkulturmedium auf Ovarialkarzinomzellen gegeben, welche in 10 cm Ø-Petrischalen (Falcon®, Heidelberg) gezüchtet worden waren. Acht Stunden nach der Transfektion wurde G 418 (1 µg/ml) als Selektionsantibiotikum dem Zellkulturmedium zugegeben und resistente Zellklone weiterkultiviert. Nach drei Wochen wurden die verbliebenen transfizierten Zellen auf 10 cm Ø-Petrischalen vereinzelt ausgesät, so daß im Laufe der nächsten Tage einzelne Zellklone heranwuchsen. Einzelne Zellklone wurden nach

einer einminütigen Behandlung mit 0,1% (v/v) Trypsin/PBS-Lösung von dem Boden der Zellkulturschale abgelöst, mit einer Pipettenspitze eingezogen und in jeweils eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte überführt. Nach 5-8 Tagen wurden die Zellklone mittels ELISA auf den Gehalt des Proteines untersucht, mit dessen cDNA die Zellen transfiziert worden waren. Hochexprimierende Zellklone wurden wiederum stark vereinzelt auf Petrischalen ausgesät. Um klonale Zelllinien zu erhalten wurde der oben beschriebene Prozeß fünfmal wiederholt.

3.15.2 Transfektion von Raji-Zellen

Die Transfektion von Raji-Zellen erfolgte mittels Elektroporation, wobei 20 µg cDNA bei 250 V und 940 µF mit Hilfe eines Elektroporators (Biorad Gene Pulser, München) in 5×10^6 Zellen eingebracht wurden. Nach einer Selektion über 2 Tage mit G 418 (1 µg/ml Medium) wurden die Zellen limitiert verdünnt, so daß theoretisch nur eine Zelle in eine Mikrotiterplattenvertiefung eingesät wurde. Nach 20-30 Tagen wurden die Zellklone mittels ELISA auf den Gehalt des Proteins untersucht, mit dessen cDNA die Zellen transfiziert worden waren. Diese limitierte Verdünnung wurde mit positiven Klonen fünfmal wiederholt.

3.16 Enzymimmunoassays (ELISA)

Die uPAR-, uPA-, PAI-1- und tPA-Antigenkonzentrationen wurden mit IMUBIND[®] ELISA-Tests (American Diagnostica Inc., Greenwich, CT) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Alle ELISA-Tests beruhen auf dem *Sandwich*-Prinzip, wobei ein spezifischer Antikörper in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten an das Plastik gebunden wurde, der wiederum das gesuchte Antigen aus der zu untersuchenden Probe erkennt und bindet. Danach werden alle nicht gebundenen Substanzen gewaschen, und ein zweiter, spezifischer, Peroxidase-gekoppelter Antikörper zugegeben. Nach der TMB-Substrat-Zugabe wird die Farbentwicklung des gespaltenen TMB-Substrates in einem Spektralphotometer *Microplate Titertek, Multiscan*, Flow Laboratories, Meckenheim, gemessen und mittels einer Eichkurve in eine Antigenkonzentration umgerechnet.

Der TF-ELISA wurde nach der von Albrecht et al. (1992) beschriebenen Methode im Institut für Pathologie, Dresden, durchgeführt.

Die ELISAs wurden zur Antigenbestimmung in Tumorzellextrakten und Tumorzellüberständen verwendet. Die Tumorzellen wurden dafür bei anfänglich ca. 50% Konfluenz in 6-*well*-Platten für 48 h kultiviert. Für den Zellkulturüberstand wurde 1 ml Zellkulturmedium pro Zellkulturplattenvertiefung entnommen und bei 400 x g in einer Tischzentrifuge für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Durchführung des ELISAs bei -80 °C gelagert.

Für die Antigenbestimmung in Tumorzellextrakten wurden die entsprechenden Zellen abgelöst und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Für den Zellaufschluß wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 250 µl PBS/1% (v/v) Triton X-100 resuspendiert und über Nacht bei 4 °C auf einem Rotationsrad inkubiert. Die Tumorzellextrakte wurden in einer Tischzentrifuge 30 min bei 10.000 x g, 4 °C, zentrifugiert und die Überstände bis zur Antigenbestimmung bei -80 °C gelagert.

Parallel zu den Antigenbestimmungen wurde jeweils eine Proteinkonzentrationsbestimmung der Zellkulturüberstände/Zellextrakte durchgeführt, um die Antigenkonzentrationen auf mg Gesamtprotein zu normalisieren.

3.17 SDS-PAGE und Detektion der GPI-uPAR- und suPAR-Proteine mittels *Western*

Blot

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) wurde in modifizierter Form zur Auftrennung von Proteingemischen durchgeführt. Dazu wurden gleiche Mengen Zellkulturüberstände oder -extrakte in einem 12%igem (v/v) diskontinuierlichen Polyacrylamidgel (d.h. Sammelgel 4% (v/v) Acrylamid; Trenngel 12% (v/v) Acrylamid) in einer Minigelapparatur (Mini-Protean II, Biorad, München) aufgetrennt. Die Herstellung der Gele und des Elektrophoresepuffers erfolgte nach Sambrook et al., 1989. Als Molekulargewichtsstandard wurde der *Rainbow-Marker* von Amersham, Braunschweig, verwendet.

Western Blot :

Der spezifische Nachweis des uPAR erfolgte durch die *semi dry*-Übertragung der aufgetrennten Proteine des Gels auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran (Fluorotrans™, Pall, Dreieich) mittels einer Immunoblot-Apparatur (WB Pharmacia Electrophoresis Unit 2117 Multiphor II). Dazu wurde als Anodenpuffer 20% (v/v) Methanol; 250 mM Borsäure; pH 9,0; und als Kathodenpuffer 5% (v/v) Methanol; 250 mM Borsäure; pH 9,0; verwendet. Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA/cm² Gelfläche für 90 min. Anschließend wurde zur Verminderung der unspezifischen Bindung des Antikörpers die PVDF-Membran für 1 h in PBS/5% (w/v) Magermilchpulver (Merck, Darmstadt) bei RT inkubiert. Der jeweilige Erstantikörper wurde in einer PBS/1% (w/v) Milchpulver-Lösung für 1 h mit der Membran inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/1% (w/v) Milchpulver-Lösung wurde der Zweitantikörper (Kaninchen-anti-Maus, 0,3 µg/ml, Kap. 3.3), welcher mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war, für 1 h zu der Membran gegeben. Danach wurde der Antikörperüberschuß durch dreimaliges Waschen mit PBS/1% (w/v) Milchpulver-Lösung entfernt. Zur Färbereaktion wurde das auf Luminol basierende ECL-Detektionsreagenz (Amersham, Braunschweig) zur Membran gegeben. Nach 1 min wurde ein Film (Kodak, X-OMAT 50) aufgelegt und der Film nach 5-10 min entwickelt.

3.18 Nachweis von suPAR in den Zellkulturüberständen von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 mittels Phasentrennung

Diese Methode ermöglicht die Trennung des detergenslöslichen GPI-verankerten uPAR von löslichem uPAR in Zellkulturüberständen. Die Phasentrennung von Zellkulturüberständen erfolgte nach der Methode von Bordier (1981). Dazu wurden Ovarialkarzinomzellen in T25-Zellkulturflaschen eingesät. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium gewechselt und die Tumorzellen für 48 h mit 2 ml frischem Zellkulturmedium inkubiert. Diese konditionierten Zellkulturüberstände wurden gesammelt und mit 2% (v/v) Triton X-114 und 1 x Proteinasen-Inhibitor-Mischung (*Complete*, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) versetzt. Die Proben wurden für 1 h bei 4 °C inkubiert und bei 10.000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde 5 min bei 37 °C erhitzt, und die detergenschaltige von der wäßrigen Phase durch 5 min Zentrifugation bei 10.000 x g, RT getrennt. Die detergenschaltige und die wäßrige Phase wurden mit einem Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 x Proteinase-Inhibitor-Mischung) auf gleiche Volumina angeglichen und der uPAR-Antigengehalt mittels ELISA bestimmt.

3.19 Wachstumskurven der GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8

Das Wachstumsverhalten von Zellkulturen über vier Tage wurde mittels *Cell titer 96 non-radioactive cell proliferation assay* (PROMEGA, Madison, WI, USA) analysiert. 2×10^4 Zellen/Vertiefung wurden in Mikrotiterplatten eingesät und mit einer tetrazoliumhaltigen Lösung inkubiert. Vitale Zellen setzen die Tetrazoliumkomponente in ein Formazanprodukt um. Dies stellt ein Maß für die metabolische Aktivität dar. Nach ein bis vier Tagen wird die Konzentration des gebildeten Formazanproduktes mittels Spektralphotometer ermittelt. Die charakteristische Formazanabsorptionsintensität ist direkt proportional zur Anzahl an lebenden Zellen.

3.20 Durchflußzytofluorometrie-Analysen der GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8

3.20.1 Durchflußzytofluorometrie-Analyse mit pro-uPA-FITC

Mit dieser Methode wurde die zelloberflächenassoziierte uPA-Bindungskapazität von GPI-uPAR-exprimierenden Ovarialkarzinomzellen ermittelt. Die Zellen, welche analysiert werden sollten, wurden gewaschen und von den Böden der Zellkulturflaschen mit 0,05% (v/v) EDTA/PBS abgelöst. Um die Gesamt-uPA-Bindungskapazität der Zellen zu ermitteln, wurde zuerst endogen produzierter, an GPI-uPAR gebundener uPA mittels kurzer Säurebehandlung abgelöst. Dazu wurden die Tumorzellen zuerst 1 min mit 0,5 ml

Glycinpuffer (50 mM Glycin-HCl; 100 mM NaCl; pH 3,0) behandelt, und anschließend mit 0,5 ml Neutralisationspuffer (500 mM HEPES; 100 mM NaCl; pH 7,5) 1 min inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS/0,1% (w/v) BSA gewaschen. $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden mit 67 ng/ml fluoreszente pro-uPA-FITC (Chuchulowski et al., 1992) in PBS/0,1% (w/v) BSA 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die zellassoziierte Fluoreszenz wurde mittels *Flow Cytometry* (FACS) mit dem *FACScan flow cytometer* (Becton-Dickinson, Heidelberg, *low power argon laser excitation* bei 488 nm) ermittelt.

Die spezifische Bindung des pro-uPA-FITC an den zellassoziierten GPI-uPAR wurde mit der Zugabe von 4 µg/ml (60facher Überschuß) von nicht-fluoreszente pro-uPA evaluiert. Die Autofluoreszenz wurde bestimmt, indem in einem separaten Versuchsansatz Tumorzellen ohne pro-uPA-FITC im FACS vermessen wurden. Die Vitalität der untersuchten Zellen wurde durch Zugabe von Propidiumjodid (8 µg/ml) bestimmt. Bei toten Zellen kann der Farbstoff in die Zellen eindringen und in die DNA interkalieren. Lebende Zellen werden nicht angefärbt. Die Versuchsauswertung erfolgte nur mit lebenden Zellen.

3.20.2 Durchflußzytofluorometrischer Konkurrenztest

Mit dieser Methode wurde die kompetitive Bindung von pro-uPA an löslichen uPAR oder zellassoziierten GPI-uPAR von U937-Zellen analysiert (Chuchulowski et al., 1992).

50 ng rekombinanter CHO-uPAR₂₇₇, bzw. 50 ng löslicher uPAR aus Zellkulturüberständen von Ovarialkarzinomzellen wurden mit 50 ng fluoreszente pro-uPA-FITC für 30 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. $2,5 \times 10^5$ PMA-stimulierte, säurebehandelte U937-Zellen wurden zur CHO-uPAR₂₇₇/pro-uPA- bzw. suPAR/pro-uPA-Mischung zugegeben und die resultierende zellgebundene Fluoreszenz im FACS gemessen.

3.21 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)

Mit dieser Methode wurde die zelloberflächenassoziierte uPA-Bindungskapazität von humanen Ovarialkarzinomzellen ermittelt. Das endogen produzierte,

zelloberflächenassoziierte uPA von Tumorzellen wurde mit einem Säureschritt von der Tumorzelloberfläche entfernt. Danach folgte eine 30minütige Inkubation der Tumorzellen mit dem uPAR-spezifischen Antikörper IIIIF10 (4 µg IIIIF10/2,5 x 10⁵ Zellen) in PBS/0,1% (w/v) BSA. Als Detektionsantikörper wurde ein ALEXA-488 gekoppelter Zweitantikörper eingesetzt (Endkonzentration 1 µg/ml), dessen fluoreszenter Farbstoff durch die Anregung des CLSM-Lasers langsamer ausbleicht wie z.B. das Fluorochrom FITC. Nach einer 30minütigen Inkubation des Zweitantikörpers bei RT folgte ein Waschschrift mit PBS/0,1% (w/v) BSA und anschließend die Analyse der vitalen Tumorzellen im konfokalen *Laserscanning*-Mikroskop (Axiovert, Zeiss, Oberkochen) mit der Lasereinheit der Fa. Leica, Heidelberg. Als Negativkontrollen wurden unbehandelte, bzw. nur mit dem Zweitantikörper inkubierte Tumorzellen untersucht.

3.22 Test der Plasminogen-Aktivierungskapazität auf GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8

Mit diesem Test wurde die uPA-vermittelte, tumorzellosoziierte Plasminogen-Aktivierungskapazität von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 untersucht. 10⁵ Zellen wurden pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde das endogen gebildete uPA von der Zelloberfläche mittels Säurebehandlung entfernt. Vor dem funktionellen Test wurden die Zellen 2 h bei 37 °C mit 10 nM HMW-uPA in GAM/0,1% (w/v) BSA inkubiert und anschließend überschüssiges uPA durch sechsmaliges Waschen mit HBSS entfernt. Danach wurden die GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten mit 100 µl Plasminogen (500 nM) in PBS/0,1% (w/v) BSA inkubiert. Nach 30 min Inkubationszeit wurde das chromogene Substrat L-1450 (H-Valin-Leucin-Lysin-p-Nitroanilin Dihydrochloride, Bachem, Heidelberg) in einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben, welches spezifisch vom gebildeten Plasmin in einen gelben Farbstoff (pNA = p-Nitroanilin) umgesetzt wird. Die Überstände wurden nach 1 h Inkubation bei 37 °C in eine neue Mikrotiterplatte übertragen und die Absorption des chromogenen Substrates bei der Wellenlänge 405 nm in einem Spektrophotometer gemessen (Photometer Titertek Multiscan,

Flow Laboratories, Meckenheim). Die Gehalt an umgesetzten chromogenen Substrat ist direkt proportional zur Plasminaktivität.

3.23 Test auf zellspezifische fibrinolytische Aktivität von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8

Die zellvermittelte fibrinolytische (proteolytische) Aktivität von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 wurde auf Fibringelen untersucht.

Die Fibringle wurden in einer 24-*well* Zellkulturplatte folgendermaßen hergestellt: In jede Vertiefung wurde eine Mischung aus 200 µl Fibrinogen (50 mg/ml PBS), 50 µl Thrombin (10 U/ml) und 50 µl CaCl₂ (150 mM) gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C bildeten sich aus der Mischung feste Fibringle. GPI-uPAR- und suPAR transfizierte Ovarialkarzinomzelllinien (4 x 10⁴ Zellen/Vertiefung) wurden auf die Fibringle ausgesät und in 0,5 ml DMEM-Zellkulturmedium mit 2 µg Plasminogen/ml inkubiert. Nach vier Stunden wurden die Zellkulturüberstände gesammelt, die Zelltrümmer durch Zentrifugation (5 min bei 400 x g) sedimentiert und die Überstände bei -20°C bis zur D-Dimer-Quantifizierung aufbewahrt. In den Überständen wurden die tumorzellgenerierten Fibrinabbauprodukte (D-Dimer) mittels ELISA quantitativ nachgewiesen (D-Dimertest Gold EIA test kit #802, American Diagnostica Inc., Greenwich, CT, USA).

3.24 Test des Apoptosestatus der GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 mittels TUNEL

Mit diesem Test erfolgte der Nachweis apoptotischer Zellen, d.h. Zellen, welche in den programmierten Zelltod gehen. Der Test beruht auf der TUNEL-Methode (*TdT-mediated dUTP nick end labeling*, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). 5 x 10⁴ Zellen der GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 wurden auf Lab-Tek[®] 4-Kammer-Chamberslides (Nunc, Wiesbaden) über Nacht gezüchtet

und mit 4% (v/v) Paraformaldehyd (30 min; RT) fixiert. Durch Inkubation der Tumorzellen mit einer terminalen Transferase wurden DNA-Einzelstrangbrüche in apoptotischen Zellen mit dUTP markiert. Dann wurde ein spezifischer, mit Peroxidase gekoppelter Antikörper zugegeben, welcher die markierten 3'OH-Enden der DNA-Einzelstrangbrüche erkennt. Anschließend wurde das Peroxidase-Substrat zugegeben. Apoptotischen Zellen, bzw. deren Zellkerne wurden durch diese Methode angefärbt, im Mikroskop analysiert und anschließend photographiert .

Als positive Kontrolle wurde in einem separaten Ansatz in GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 'künstliche' DNA-Strangbrüche durch Inkubation mit DNase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) erzeugt und mittels TUNEL-Methode detektiert.

3.25 Zelladhäsionstest mit GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8

Mit dem Zelladhäsionstest wurde die Bindungskapazität von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 an Vitronektin untersucht. Vitronektin wurde über Nacht in einer Konzentration von 10 µg/ml in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (100 µl/Vertiefung) eingebracht. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal gewaschen und die nicht-spezifischen Bindungsstellen der Vertiefungen durch Inkubation mit 2% (w/v) BSA/PBS für 2 h bei RT blockiert. $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden pro Vertiefung in 100 µl DMEM eingesät. Nach 1 h wurden die nicht adhärenierten Zellen durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die adhärenierten Zellen mit 50 µl Hexoaminidase-Substrat (15 mM p-Nitrophenol-N-acetyl-beta-D-glucosaminidin (Sigma, München); 0,5% (v/v) Triton X-100; 100 mM Na-Citrat-Puffer pH 5,0) 1 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Das Hexoaminidase-Reagenz wird nur von lebenden Zellen mit einem intakten Enzymesatz (N-acetyl-β-D-Hexoaminidase in den Lysosomen) prozessiert. Durch Zugabe von 100 µl Stop/Färbelösung (0,2 M NaOH; 5 mM EDTA) pro Vertiefung wurde eine proportional zur Zellmenge intensive Färbung sichtbar. Die Absorption der gelben Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm in einem Spektrophotometer gemessen (Photometer

Titertek Multiscan, Flow Laboratories, Meckenheim). Die Absorptionsintensität korreliert mit der Anzahl an vitalen, anhaftenden Zellen.

3.26 Charakterisierung der Tumorigenität von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 im Nacktmausmodell

Pathogenfreie, weibliche, athymische (*nu/nu*, CD1) Mäuse, 4-6 Wochen alt, wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen. Die Tierexperimente wurden unter keimreduzierten Bedingungen im Tierstall des Nuklearmedizinischen Instituts des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität, München, durchgeführt (Kooperation: Prof. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke).

Die GPI-uPAR-, suPAR-transfizierten OV-MZ-6#8-Zelllinien und Kontrollzelllinien wurden von den Zellkulturschalen abgelöst, mit PBS gewaschen und auf eine Zelldichte von $1,3 \times 10^7$ Zellen/300 μ l PBS eingestellt. Von dieser Tumorzellsuspension wurden pro Maus 300 μ l mit einer 20G (0,7x55)-Kanüle intraperitoneal injiziert. Die Mäuse wurden nach 6 Wochen getötet, die Gesamtsitus-, Tumor- und Peritoneum-Masse präpariert und gewogen. Die Gesamttumormasse errechnet sich additiv aus dem Gewicht des Tumors und dem Gewicht des befallenen Peritoneums. Ein Teil des Tumors wurde für uPAR-Antigenbestimmungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um auszuschließen, daß Größenunterschiede der Mäuse einen Einfluß auf die Tumorgewichtsangaben haben, wurde die Tumormasse als Ratio aus Gesamttumormasse zum Gesamtsitusgewicht berechnet.

3.27 Bestimmung des uPAR-Antigengehaltes in Tumoraufschlüssen, Blut und Aszites von -mit GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten xenotransplantierten-Nacktmäusen

Für die uPAR-Antigenbestimmung in humanen Maus-Xenotransplantattumoren wurden die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Tumorgewebe mittels eines Dismembrators (Braun, Melsungen) in gefrorenem Zustand pulverisiert. Das Pulver wurde in TBS-Puffer resuspendiert und in einer Tischzentrifuge 30 min bei 10.000 x g, 4 °C, zentrifugiert. Die Überstände, welche den löslichen uPAR aber nicht den GPI-verankerten uPAR enthielten, wurden zur suPAR-Antigenbestimmung in den uPAR-ELISA eingesetzt. Die verbleibenden Pellets wurden in TBS/1% (v/v) Triton X-100 resuspendiert, über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert und für 30 min bei 10.000 x g, 4 °C, zentrifugiert. Der uPAR-Antigengehalt wurde im Überstand dieser Lysate mittels ELISA bestimmt. Dieser ELISA detektiert nur humanen uPAR.

Aszites (wenn vorhanden) und Blut aus der Arteria carotis der Nacktmäuse wurde ebenfalls gesammelt. Der Aszites wurde 30 min bei 10.000 x g, 4 °C, zentrifugiert, und die Überstände wurden bis zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt. Das geronnene Blut wurde 15 min bei 400 x g zentrifugiert, und das Serum bei -80 °C eingefroren. Der uPAR-Antigengehalt von Aszites und Blut wurde mittels ELISA bestimmt.

3.28 Statistische Methoden

Der Median und die Standardabweichungen wurden mit Hilfe des Computerprogrammes Excel berechnet. Um die Signifikanz des Unterschiedes zwischen zwei Gruppen von Einzelwerten zu ermitteln, wurde die Wahrscheinlichkeit p nach dem Mann-Whitney U-Test, einem „*non-parametric rank*“-Test, berechnet. Dieser Test findet bei nichtverteilungsgleichen Stichproben geringer Anzahl Verwendung. Alle Werte $p < 0,05$ werden als signifikant betrachtet. Diese statistischen Berechnungen wurden in Kooperation mit Dr. Thomas Luther, Institut für Pathologie der TU Dresden, durchgeführt.

4. Ergebnisse

Ziel der in dieser Arbeit beschriebenen Studien war es, zu untersuchen, ob durch Modulation der uPAR-Expression in humanen Ovarialkarzinomzellen deren Plasminogen-Aktivierungskapazität, Proliferation- und Metastasierungsverhalten beeinflusst wird.

Dazu wurde in parallelen Ansätzen sowohl die Auswirkung der Erhöhung der GPI-uPAR-Expression als auch die der Überexpression des löslichen uPAR in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 untersucht.

4.1 Herstellung von GPI-uPAR- und suPAR-cDNA-Expressionsvektoren

Für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmide wurde eine uPAR-cDNA verwendet, welche aus humanem Ovarialtumorgewebe mittels RT-PCR von Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe isoliert worden war (Türkmen et al., 1997). Diese uPAR-cDNA kodiert für den kompletten, Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten uPAR (Aminosäure 1 bis 335).

Die GPI-uPAR-cDNA wurde mittels PCR-Technologie amplifiziert, wobei durch die verwendeten Oligonukleotide spezifische Restriktionsschnittstellen in die cDNA-Sequenz eingeführt wurden. Diese Restriktionsschnittstellen wurden für die Klonierung der cDNA in den Expressionsvektor benutzt (Abb. 9 und Tab. 1).

Für die Herstellung des suPAR-cDNA-Konstruktes (entspricht Aminosäure 1 bis 283) wurde mittels PCR-Technologie zusätzlich zur Einführung der Restriktionsschnittstellen im 3'-kodierenden Bereich der cDNA ein Stopkodon nach Aminosäure 283 eingefügt (Abb. 9 und Tab. 1).

Das natürlich vorkommende uPAR-Protein besteht aus 313 Aminosäuren, wobei posttranslational ein C-terminales Fragment von 30 Aminosäuren abgespalten wird und somit ein neuer C-Terminus entsteht, an dem der GPI-Anker angeheftet wird. In dem suPAR-cDNA-Konstrukt, welches hier beschrieben wird, ist die GPI-Verankerungsstelle noch vorhanden. Es wird dennoch kein GPI-Anker an dem suPAR-Protein befestigt, da die

Information zur Anheftung des Ankers zum Teil in dem abgespaltenen C-terminalen Fragment beinhaltet ist. Es wird somit in dem hier verwendeten Versuchsansatz ein suPAR-Protein synthetisiert, welches ähnlich der natürlich vorkommenden löslichen Form des uPAR ist, im Gegensatz zu dem bislang verwendeten suPAR₁₋₂₇₇, welcher sechs Aminosäuren kürzer ist (Rettenberger et al., 1996; Wilhelm et al., 1994).

A : PCR-Strategie zur Herstellung der GPI-uPAR-cDNA



B : PCR-Strategie zur Herstellung der suPAR-cDNA



Abb. 9 : Lokalisation der Oligonukleotide (Primer für die PCR) in der humanen uPAR-cDNA

Die Bezeichnungen der Oligonukleotide und deren Sequenzen sind in Tabelle 1 beschrieben. Die einzuführenden Restriktionsschnittstellen sind in fetter Schrift hervorgehoben. ODN = Oligonukleotid; ■ = kurzer Anteil der nicht kodierenden Region.

Oligonukleotid-Bezeichnung	Oligonukleotid-Sequenz
ODN 1	5' AATATA AAGCTT GAGCTGCCCTCGCGAC 3'
ODN 2	5' TTATAT TCTAGAT TCAGGTTTAGGTCCAG 3' <i>HindIII</i> <i>XbaI</i>
ODN 3	5' TTTTAT TCTAGAT TACCCACTGCGGTACTG 3' <i>XbaI</i>

Tab. 1 : Bezeichnung und Nukleotidsequenz der in der PCR eingesetzten Oligonukleotide.

Die Restriktionsschnittstellen, welche durch diese Oligonukleotide mittels PCR-Technologie in der uPAR-cDNA eingeführt wurden sind in fetter Schrift hervorgehoben. ODN = Oligonukleotid

Durch Ligation wurden die mutagenisierten uPAR-cDNAs (GPI-uPAR-cDNA und suPAR-cDNA) jeweils in den Expressionsvektor pRcRSV kloniert, welcher wegen seines starken viralen Promotors für die GPI-uPAR- und suPAR-Überexpression eingesetzt wurde.

Die GPI-uPAR-cDNA- bzw. suPAR-cDNA-tragenden Expressionsvektoren wurden in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert, amplifiziert, gereinigt und anschließend sequenziert. Die Sequenzanalyse zeigte, daß die gewünschten Mutagenesen erfolgt waren und daß in den sequenzierten Bereichen der suPAR-cDNA (nicht der GPI-uPAR-cDNA) zwei stille Punktmutationen (nt 30: CTG→CTA; nt 621: GAA→GAG) im Vergleich zur originalen uPAR-Sequenz (Roldan et al., 1990) aufzufinden waren, die allerdings zu keiner Veränderung in der Aminosäureabfolge der Proteine führen.

4.2 Herstellung stabiler GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8

OV-MZ-6#8-Zellen wurden mit GPI-uPAR-cDNA oder suPAR-cDNA transfiziert. Stabil transfizierte Zellklone wurden unter Genitocinselektion über 5 Runden etabliert. Die neuen klonalen Zelllinien wurden als OV-GPI-uPAR- und OV-suPAR-Transfektanten bezeichnet. Für Kontrollversuche wurde die Wildtyp-Zelllinie OV-MZ-6#8 mit dem *insert*-freien Expressionsvektor pRcRSV transfiziert. Es wurden ebenfalls klonale Zelllinien (über 5 Runden) selektioniert und als OV-RSV-Transfektanten bezeichnet. Die Kontrollzelllinien dienten in den folgenden Untersuchungen dem Ausschluß von Auswirkungen, welche eventuell durch den Transfektionsprozeß in den Zellen induziert werden.

4.3 Charakterisierung von stabilen GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 auf RNA- und Protein-Ebene

4.3.1 Quantifizierung des Antigengehaltes von uPAR und anderen Proteolysefaktoren in GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten

Die stabilen GPI-uPAR bzw. suPAR-Transfektanten der Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 wurden überprüft, ob sie das jeweilige transfizierte Gen in einer erhöhten Konzentration exprimieren. Dazu wurden die verschiedenen Zelllinien 48 h gezüchtet und der Anteil des suPAR in Zellkulturüberständen bzw. der GPI-uPAR-Antigengehalt in Zellextrakten mittels ELISA bestimmt. Die OV-suPAR-Zelllinien zeigten im uPAR-ELISA einen bis zu 2.500fachen Anstieg der suPAR-Konzentration im konditionierten Zellkulturüberstand (Tab. 2 A). Es wurde auch in den Ovarialkarzinomzellextrakten der OV-suPAR-Zelllinien eine erhöhte Menge uPAR nachgewiesen. Dies ist nicht auf einen Anstieg des zelloberflächenassoziierten, GPI-verankerten uPAR zurückzuführen, wie in FACS-Versuchen gezeigt werden konnte (s.u.), sondern möglicherweise auf endogen produzierten, jedoch noch nicht sezernierten suPAR.

In Zellextrakten von GPI-uPAR-überexprimierenden OV-MZ-6#8-Zelllinien konnte ein bis zu 500facher Anstieg des uPAR-Antigengehaltes (Tab. 2 B) und ein leichter Anstieg des uPAR-Gehaltes im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. OV-MZ-6#8-Zellen, welche nur mit dem Vektor transfiziert worden waren (OV-RSV-Zelllinien), zeigten in ihrem uPAR-Expressionsmuster keinen signifikanten Unterschied zur Wildtyp-Zelllinie OV-MZ-6#8.

Als Kontrolle für eine - möglicherweise durch die Transfektionen beeinflusste - Proteinexpression wurden in den verschiedenen Ovarialkarzinomzelllinien die Antigenkonzentrationen von uPA, PAI-1, tPA und *Tissue factor* (TF) mittels ELISA evaluiert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den uPA-, PAI-1-, tPA- und TF-Expressionsraten, verglichen mit den OV-RSV-Zelllinien und der Wildtyp-Zelllinie, gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

A :	Tumorzellen	Zelllinie #	uPAR im Zellüberstand (ng/10 ⁶ Zellen ± SD)	Erhöhung (x-fach)
	Parental	OV-MZ-6#8	0,64 ± 0,62	1
	Vektor	456	0,6 ± 0,66	1
		441	0,69 ± 0,6	1,1
	GPI-uPAR	621	119 ± 114	185
		625	102 ± 68	159
		674	135 ± 132	210
		685	11 ± 5,5	16
	suPAR	516	1426 ± 984	2227
		532	1267 ± 516	1978
		533	622 ± 583	970
		564	1594 ± 527	2490
B :	Tumorzellen	Zelllinie #	uPAR in Zell-Extrakten (ng/10 ⁶ Zellen ± SD)	Erhöhung (x-fach)
	Parental	OV-MZ-6#8	2,6 ± 0,8	1
	Vektor	456	2,6 ± 0,5	1
		441	4,5 ± 2,5	1,7
	GPI-uPAR	621	1289 ± 606	496
		625	904 ± 135	348
		674	422 ± 338	162
		685	2,4 ± 0,95	1
	suPAR	516	2802 ± 1649	1077
		532	2909 ± 1579	1118
		533	516 ± 270	198
		564	1913 ± 1359	735

Tab. 2: uPAR-Antigen-Konzentrationen von stabilen GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovariakarzinomzelllinie OV-MZ-6#8

uPAR-Antigen-Konzentrationen in konditionierten Zellkulturüberständen (A) und Zellkulturextrakten (B) der Wildtyp-Zelllinie OV-MZ-6#8 und den mit GPI-uPAR-, suPAR- oder vektortransfizierten OV-MZ-6#8-Zelllinien. OV-suPAR-Zelllinien zeigten einen signifikanten suPAR-Anstieg im Zellkulturüberstand, während OV-GPI-uPAR-Zelllinien einen stark erhöhten uPAR-Antigen-Gehalt in den Zellextrakten aufwiesen. Die Werte wurden mit dem uPAR-ELISA ermittelt. Standardabweichungen (= SD) wurden aus den Daten von vier unabhängigen Untersuchungen errechnet.

4.3.2 *Batch*-Transfektionen der humanen OV-MZ-6#8-Zelllinie mit GPI-uPAR- und suPAR-cDNA-Expressionsvektoren

Um das Verhalten stabil transfizierter GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten zu überprüfen bzw. die Effekte der Transfektion von GPI-uPAR-cDNA und suPAR-cDNA zu verifizieren, wurden auch sogenannte *Batch*-Transfektionen durchgeführt. Dabei wurden OV-MZ-6#8-Zellen mit der GPI-uPAR-cDNA, suPAR-cDNA oder der pRcRSV-DNA transfiziert. Allerdings wurde auf die Etablierung klonaler Zelllinien verzichtet und die nach erster Genitocin-Selektion erhaltenen Tumorzellen gleich auf den uPAR-Gehalt mittels uPAR-ELISA untersucht.

OV-MZ-6#8-Zellen, welche mit GPI-uPAR-, suPAR- oder pRcRSV-cDNA mittels *Batch*-Verfahren transfiziert wurden, zeigten das gleiche uPAR-Expressionsmuster wie die entsprechenden stabil transfizierten Zelllinien (Abb. 10). Der Gehalt an uPAR lag allerdings etwas niedriger als bei den stabil transfizierten Zelllinien, da bei den stabilen Zelllinien Zellklone selektiert wurden, welche große Mengen an GPI-uPAR bzw. suPAR exprimierten.

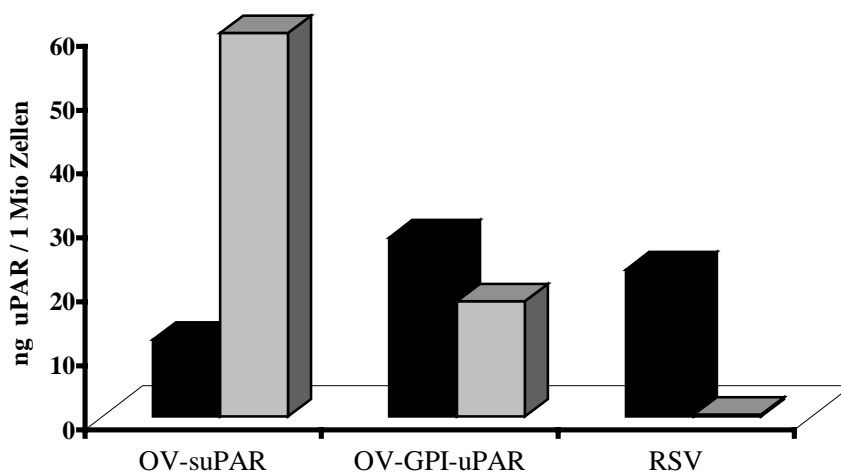


Abb. 10 : uPAR-Antigengehalt der *Batch*-transfizierten OV-MZ-6#8-Zellen

Der uPAR-Antigengehalt wurde mittels uPAR-ELISA ermittelt. OV-MZ-6#8-Zellen, welche mit GPI-uPAR-cDNA, suPAR-cDNA oder pRcRSV-DNA mittels *Batch*-Verfahren transfiziert waren, zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster des uPAR-Gehaltes im Zellextrakt und Zellkulturüberstand, wie die entsprechenden stabil transfizierten Zelllinien (Tab. 2). Schwarze Balken entsprechen dem uPAR-Gehalt im Zellextrakt, graue Balken dem uPAR-Gehalt im Zellkulturüberstand.

4.3.3 Nachweis von uPAR-RNA mittels *Northern Blot*-Analyse

Zur Charakterisierung der GPI-uPAR- und suPAR-Überexpression auf RNA-Ebene wurden *Northern Blot*-Analysen unternommen. Für diese *Northern Blot*-Analysen wurde RNA von je einer GPI-uPAR-, suPAR- und vektortransfizierten OV-MZ6#8-Zelllinie sowie von der Wildtyp-Zelllinie OV-MZ-6#8 extrahiert. Die Detektion der uPAR-RNA in der *Northern Blot*-Analyse erfolgte mit einer spezifischen uPAR-DNA-Sonde.

Die Konzentration der GPI-uPAR- und suPAR-mRNA in den entsprechenden Zelllinien war stark erhöht im Vergleich zu den Kontrollzelllinien OV-RSV und OV-MZ-6#8 (Abb. 11). Der *Northern Blot* mußte 8 Tage einem Film exponiert werden, bis das Signal der Kontrollzelllinien zu sehen war (Abb. 11 A Spur 1 und 2). Für die Normalisierung der eingesetzten RNA-Konzentrationen wurde die *Northern Blot*-Membran nachträglich mit einer GAPDH- (Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase)-DNA-Sonde hybridisiert (Abb. 11 B). Dieser Kontrollversuch bestätigte den Einsatz gleicher Mengen RNA.

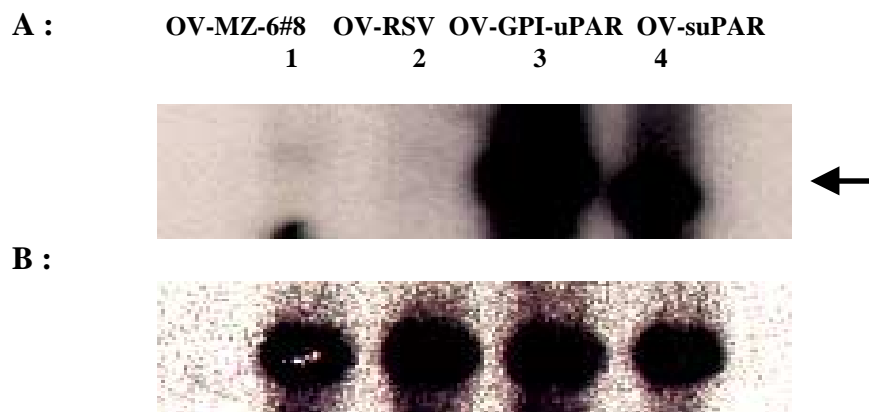


Abb. 11: *Northern Blot*-Analyse des uPAR-RNA-Gehalts der GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten

Nachweis der uPAR-RNA mittels *Northern Blot*-Analyse aus GPI-uPAR-, suPAR-, RSV-transsfizierten OV-MZ-6#8-Zelllinien oder Wildtyp-Zelllinie OV-MZ-6#8 (A). Spur 1 zeigt die RNA der OV-MZ-6#8-Zelllinie, Spur 2 die RNA aus OV-RSV-Zelllinie, in Spur 3 ist die RNA der OV-GPI-uPAR-Zelllinie und in Spur 4 die OV-suPAR-RNA aufgetragen. In allen Spuren wurden 15 µg RNA aufgetragen. Die uPAR-RNA ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Das Ergebnis der Hybridisierung mit einer GAPDH-Sonde ist in (B) gezeigt.

4.3.4 Spezifischer Nachweis von GPI-uPAR- und suPAR-Proteinen mittels

Western Blot-Analyse

Für die Darstellung der exprimierten GPI-uPAR- bzw. suPAR-Proteine mittels *Western Blot*-Analyse wurden Zellkulturextrakte und konditionierte Zellkulturüberstände auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die *Western Blot*-Analyse erfolgte mit dem monoklonalen, uPAR-spezifischen Antikörper IID7.

Die Detektion des uPAR-Proteins mittels *Western Blot*-Analyse ergab eine deutliche Erhöhung der uPAR-Konzentration in Extrakten der OV-GPI-uPAR- bzw. OV-suPAR-Zelllinien, verglichen mit dem Extrakt bzw. dem Zellkulturüberstand der OV-RSV-Zelllinie (Abb. 12 A). Die Analyse des Zellkulturüberstandes mittels *Western Blot* ergab eine leichte Erhöhung der suPAR-Konzentration im Zellkulturüberstand von OV-GPI-uPAR-Zelllinien und eine starke Erhöhung des suPAR-Gehaltes im Zellkulturüberstand von OV-suPAR-Zelllinien, verglichen mit dem Zellkulturüberstand der OV-RSV-Zelllinie (Abb. 12 B).

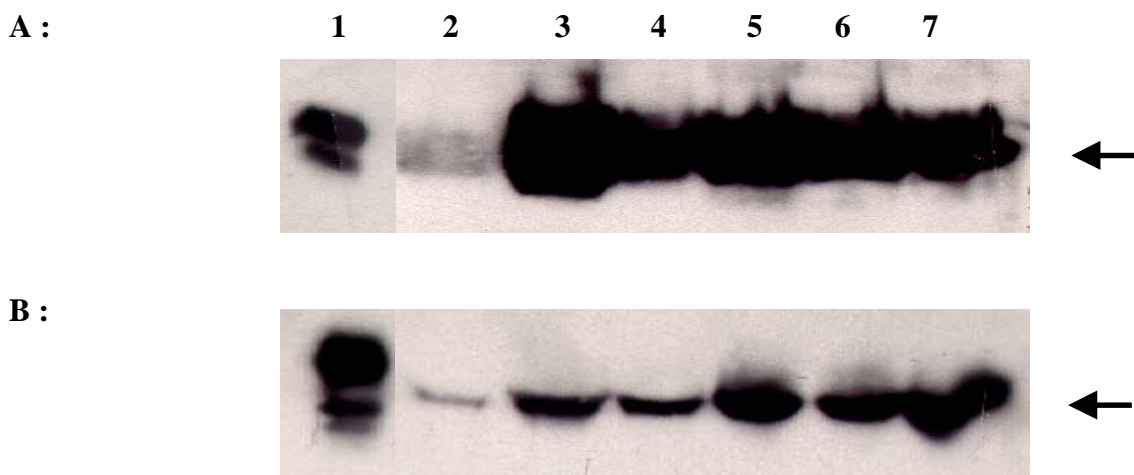


Abb. 12: Western Blot-Analyse der uPAR-Expression

Nachweis der uPAR-Protein-Expression mittels *Western Blot*-Analyse mit dem monoklonalen Antikörper IID7 in GPI-uPAR-, suPAR- oder vektortransfizierten OV-MZ-6#8-Zelllinien im Zellextrakt (A) und parallel im Zellkulturüberstand (B). Spur 1 zeigt die uPAR-Proteinbande von gereinigtem CHO-uPAR₁₋₂₇₇, Spur 2 die der OV-RSV-Zelllinie, Spur 3 die OV-GPI-uPAR-Zelllinie und Spur 4-7 verschiedene OV-suPAR-Zelllinien. In (A) sind in allen Spuren Extrakte aus jeweils 4×10^4 Zellen, in (B) jeweils $40 \mu\text{l}$ Zellkulturüberstand aufgetragen worden. Die uPAR-spezifische Bande (ca. 50 kDa) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Der uPAR-spezifische Antikörper IID7 erkennt eine Reihe von Proteinen aus den Zellextrakten (im Bereich zwischen 45 kDa und 60 kDa). Diese Proteine entsprechen verschiedenen Glykosylierungsvarianten des uPAR (Abb. 12).

4.3.5 Nachweis von suPAR in Zellkulturüberständen von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten mittels Phasentrennung

Um nachzuweisen, daß der von OV-suPAR-Zelllinien exprimierte suPAR ohne GPI-Anker exprimiert wird, wurden konditionierte Zellkulturüberstände mittels Phasenseparation in wasserlösliche und detergenslösliche Bestandteile aufgetrennt. Auch die Zellkulturüberstände der GPI-uPAR-überexprimierenden- und vektortransfizierten-Zelllinien wurden mit dieser Methode untersucht. Zellkulturüberstände, welche mit Triton X-114 angereichert wurden, weisen bei 4 °C eine homogene Phase auf, separieren aber bei 37 °C in eine wasser- und eine detergens-lösliche Phase (Bordier, 1981). Besitzt der uPAR noch einen GPI-Anker, kann er in der detergenslöslichen Phase detektiert werden; der GPI-ankerlose suPAR kann in der wäßrigen Phase mittels uPAR-ELISA nachgewiesen werden.

Die Charakterisierung der Zellkulturüberstände von OV-suPAR-Zelllinie ergab, daß über 90 % des uPAR-Antigens in der wäßrigen Phase gefunden wurde (Abb. 13). Im Zellkulturüberstand von OV-GPI-uPAR-Zelllinien konnte uPAR sowohl mit als auch ohne GPI-Anker nachgewiesen werden. Möglicherweise deutet dies auf eine Überlastung der zellulären GPI-Anker-Synthese hin. Die vektortransfizierte Zelllinie zeigte das gleiche Ergebnis wie die Wildtyp-Zelllinie OV-MZ-6#8.

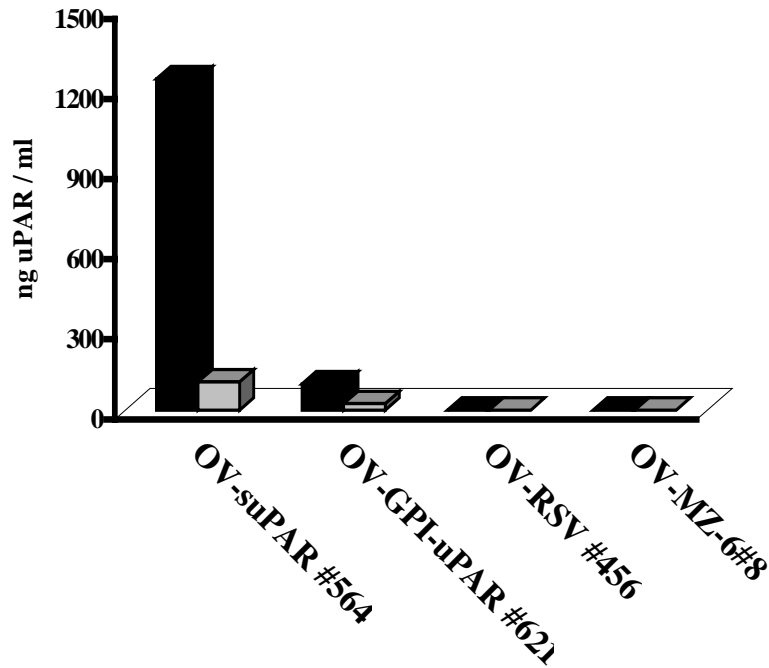


Abb. 13: Nachweis von GPI-uPAR und suPAR in den Zellkulturüberständen von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten mittels Phasentrennung

Das Diagramm zeigt den Anteil von GPI-verankertem uPAR und GPI-ankerlosem suPAR in Zellkulturüberständen von OV-GPI-uPAR-, OV-suPAR- sowie OV-RSV-Transfektanten und der Wildtyp-Zelllinie OV-MZ-6#8. Die suPAR exprimierende Zelllinie zeigte wie erwartet einen über 90%igen Anteil von GPI-ankerlosem uPAR im Zellkulturüberstand. Im Zellkulturüberstand der GPI-uPAR-überexprimierende Zelllinie konnte sowohl uPAR mit und ohne GPI-Anker detektiert werden. Die OV-RSV-Zelllinie zeigte das gleiche Ergebnis wie die Wildtyp-Zelllinie OV-MZ-6#8.

■ = Wäßrige Phase ■ = Detergens Phase

4.4 Wachstumskinetik von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 und von GPI-uPAR-Transfektanten der humanen Raji-Zelllinie unter uPA-Stimulation

Um den Einfluß der Expression des suPAR bzw. der Überexpression des GPI-uPAR in OV-MZ-6#8-Zellen auf das Wachstumsverhalten der Zelllinien zu untersuchen, wurde die Zellproliferation mittels eines *Cell titer 96 non-radioactive cell proliferation assay* über 4 Tage ermittelt. Die Proliferationsrate von OV-suPAR-Zelllinien war abhängig von ihrer suPAR-Expressionsrate. Je mehr suPAR von der jeweiligen Zelllinie produziert wurde, desto stärker war eine Reduktion der Wachstumsrate zu beobachten (Abb. 14) im Vergleich zur Wachstumsrate der vektortransfizierten Zelllinie und der Wildtyp-Zelllinie OV-MZ-6#8.

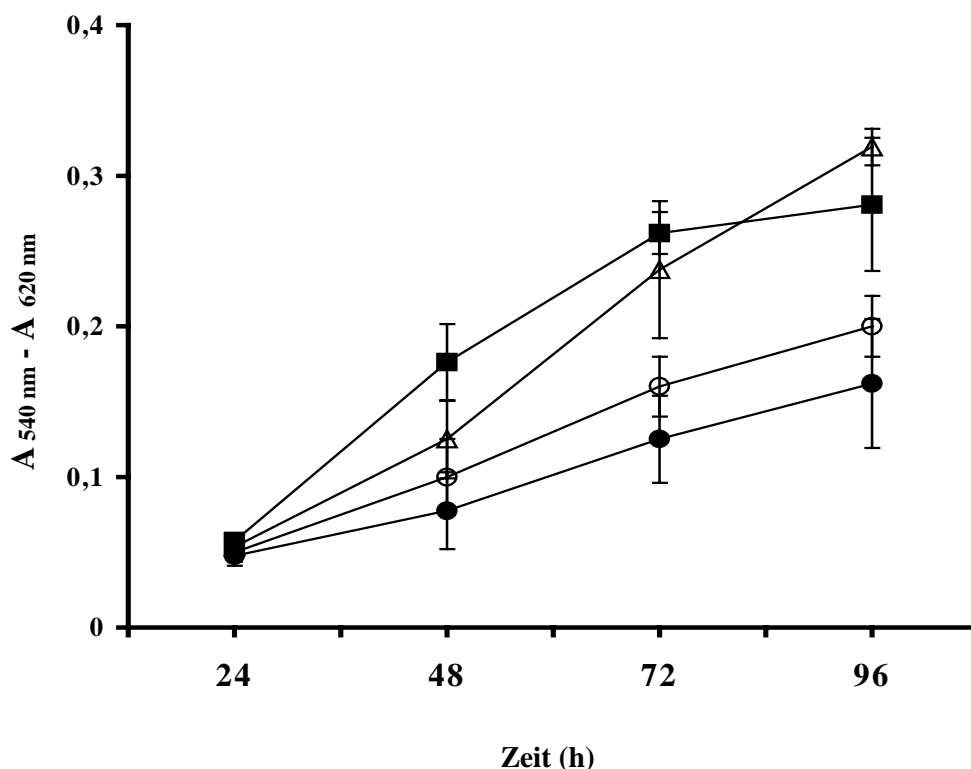


Abb. 14: Wachstumskinetik der OV-GPI-uPAR #621, OV-suPAR #564, OV-suPAR #532 und OV-RSV #456-Zelllinien

Die Wachstumsraten von OV-GPI-uPAR #621(△), OV-suPAR #564 (●); OV-suPAR #532 (○) und OV-RSV #456 (■)-Zelllinien wurden über den Zeitraum von 96 h mittels *Cell Proliferation Assay* ermittelt. Die OV-suPAR-Zelllinien zeigten eine verringerte Wachstumsrate im Vergleich zur GPI-uPAR-überexprimierende- oder der OV-RSV-Zelllinie. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen sind gezeigt (\pm SD).

Die Überexpression des GPI-uPAR führte zu keiner Veränderung der Proliferation verglichen mit der Kontroll-Zelllinie.

Für weitere Wachstumsstudien wurden lymphoblastoide Raji-Zellen, welche keinen GPI-uPAR exprimieren, mit dem für GPI-uPAR kodierenden Expressionsplasmid transfiziert. Stabil transfizierte Zellklone wurden unter Genitcinselektion über fünf Runden etabliert. Mit diesen Zellklonen konnte die Abhängigkeit der uPA-induzierten Zellproliferation von GPI-uPAR getestet werden, indem Raji-Zellen mit und ohne GPI-uPAR parallel untersucht wurden. Als Kontrolle wurden Raji-Zellen mit dem leeren Vektor pRcRSV transfiziert.

Raji-Zellen, welche mit GPI-uPAR-cDNA transfiziert waren, produzierten ca. 20 ng GPI-uPAR/mg Protein und zeigten nach Zugabe von 1 nM HMW-uPA oder ATF nach 96 h eine Zunahme der Zellzahl von 40% im Vergleich zu den gleich behandelten Wildtyp-Raji-Zellen und den vektortransfizierten Raji-Zellen, welche keinen GPI-uPAR exprimierten. Die Zugabe von LMW-uPA, der nicht mit GPI-uPAR interagiert, führte bei keinem der drei verschiedenen Rajiklone zu einem veränderten Proliferationsverhalten (Fischer et al., 1998).

4.5 Funktionelle Tests der exprimierten GPI-uPAR- und suPAR-Proteine von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8

Der funktionelle Nachweis der Bindungskapazität von überexprimierten GPI-uPAR- sowie suPAR-Proteinen wurde, wie in den folgenden Kapiteln beschrieben, mittels Durchflußzytofluorometrie und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) erbracht. Weiterhin wurde die fibrinolytische Aktivität und die adhäsiven Eigenschaften der GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 untersucht.

4.5.1 Nachweis des GPI-uPAR von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten mittels Durchflußzytofluorometrie-Analyse

Die durchflußzytofluorometrische Analyse (FACS) von Zellen ermöglicht die rasche Untersuchung von Proteinen auf der Zelloberfläche einzelner Zellen. Die Bindung des Liganden pro-uPA an seinen spezifischen Zelloberflächenrezeptor GPI-uPAR kann mit dieser Methode nachgewiesen werden. Es sollte untersucht werden, ob die GPI-uPAR-überexprimierenden OV-MZ-6#8-Zelllinien funktionell aktiven GPI-uPAR exprimieren, d.h. ob der GPI-uPAR pro-uPA effizient und sättigbar binden kann. Um die maximale pro-uPA-Bindungskapazität des zelloberflächenassoziierten GPI-uPAR zu bestimmen, wurden GPI-uPAR-transfizierte- und entsprechende Kontroll-Zelllinien zuerst durch eine kurze Säurebehandlung von rezeptorgebundenem endogen-produziertem uPA-Liganden befreit. Anschließend wurden die Zelllinien mit fluoreszenzfarbstoffmarkiertem pro-uPA-FITC inkubiert. Die zelloberflächenassoziierte Fluoreszenzintensität wurde mit einem Durchflußzytofluorometer gemessen.

Die OV-GPI-uPAR-Zelllinien zeigten eine bis zu 4,5fach erhöhte relative Fluoreszenzintensität, d.h. die pro-uPA-FITC-Bindungskapazität war deutlich höher als die von OV-MZ-6#8- oder vektortransfizierten-Zelllinien (Abb. 15). OV-suPAR-Zelllinien zeigten keine Erhöhung der pro-uPA-FITC-Bindung, verglichen mit der OV-RSV #456-Zelllinie und

der Wildtyp-Zelllinie OV-MZ-6#8. Dies bedeutet, daß die OV-suPAR-Zelllinien durch die Transfektion keine Veränderung der GPI-uPAR-Konzentration auf der Zelloberfläche im Vergleich zur Wildtyp-Zelllinie OV-MZ-6#8 aufwiesen. In diesem Versuchsaufbau kommt es zu keiner Intervention der zelloberflächenassoziierten GPI-uPAR/pro-uPA-Bindung durch den suPAR, da die suPAR-enthaltenden Zellkulturüberstände entfernt sind.

Die Spezifität der pro-uPA-FITC-Bindung wurde in Parallelansätzen in Anwesenheit eines 60fachen molaren Überschusses an unmarkiertem pro-uPA untersucht (Abb. 15). Die erhöhte pro-uPA-FITC-Bindungs Kapazität der OV-GPI-uPAR-Zelllinien konnte kompetitiert werden und beweist die spezifische Bindung des pro-uPA an zelloberflächenassoziierten GPI-uPAR.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist, daß rekombinanter, überexprimierter GPI-uPAR hinsichtlich der Bindung seines Liganden uPA, funktionell aktiv ist.

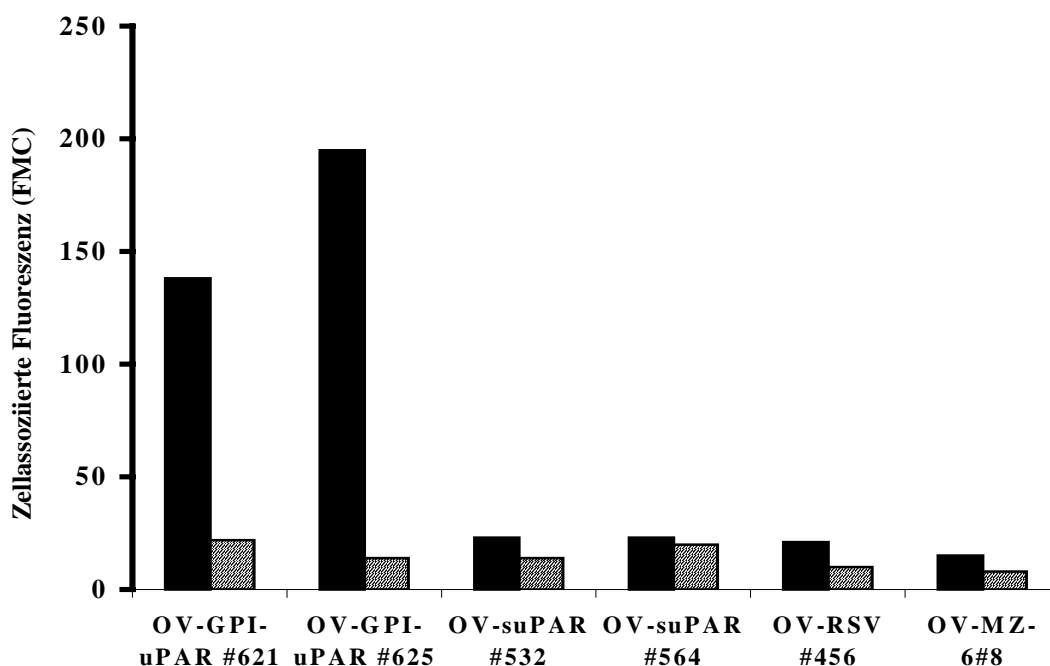


Abb. 15: Nachweis von funktionell aktivem GPI-uPAR mit pro-uPA-FITC

Ermittlung der pro-uPA-FITC-Bindung an zelloberflächenassoziierten GPI-uPAR von vitalen OV-GPI-uPAR-, OV-suPAR-, OV-RSV-Zelllinien und von der OV-MZ-6#8-Zelllinie (schwarze Balken). Die Analyse erfolgte mittels Durchflußzytofluorometrie (FACS). Die spezifische Bindung von pro-uPA-FITC an GPI-uPAR wurde durch die Zugabe eines 60fachen molaren Überschusses an unmarkiertem pro-uPA unterdrückt (schraffierte Balken). Die Autofluoreszenz der Zellen wurde in Parallelansätzen ohne pro-uPA-FITC-Zugabe ermittelt und die erhaltenen Werte wurden von den Meßwerten subtrahiert. FMC = *Fluorescence Mean Channel*

4.5.2 Bestimmung der uPA-Bindungskapazität des suPAR von suPAR-Transfektanten mittels Durchflußzytofluorometrie-Analyse

Um die funktionelle Bindung von uPA an suPAR von OV-suPAR-Zelllinien mittels Zytofluorometrie (FACS) zu zeigen, mußte ein anderer experimenteller Ansatz als für die Bestimmung der Bindungskapazität des GPI-uPAR gewählt werden.

Pro-uPA-FITC wurde mit suPAR enthaltenden Zellkulturüberständen von OV-suPAR-Zelllinien vorinkubiert und dann zu vitalen, GPI-uPAR-exprimierenden U937-Zellen zugegeben. Die anschließende FACS-Analyse ergab, daß die Bindung von pro-uPA-FITC an zelloberflächenassoziierten GPI-uPAR von U937-Zellen verhindert wurde, d.h. daß suPAR pro-uPA-FITC binden kann (Abb. 16). Die Effizienz der pro-uPA-FITC-Kompetition von suPAR der OV-suPAR-Zelllinien an zelloberflächenassoziierten GPI-uPAR von U937-Zellen war vergleichbar dem kompetitiven Effekt, der durch Zugabe gleicher Mengen rekombinanten CHO-suPAR₁₋₂₇₇ erreicht werden konnte.

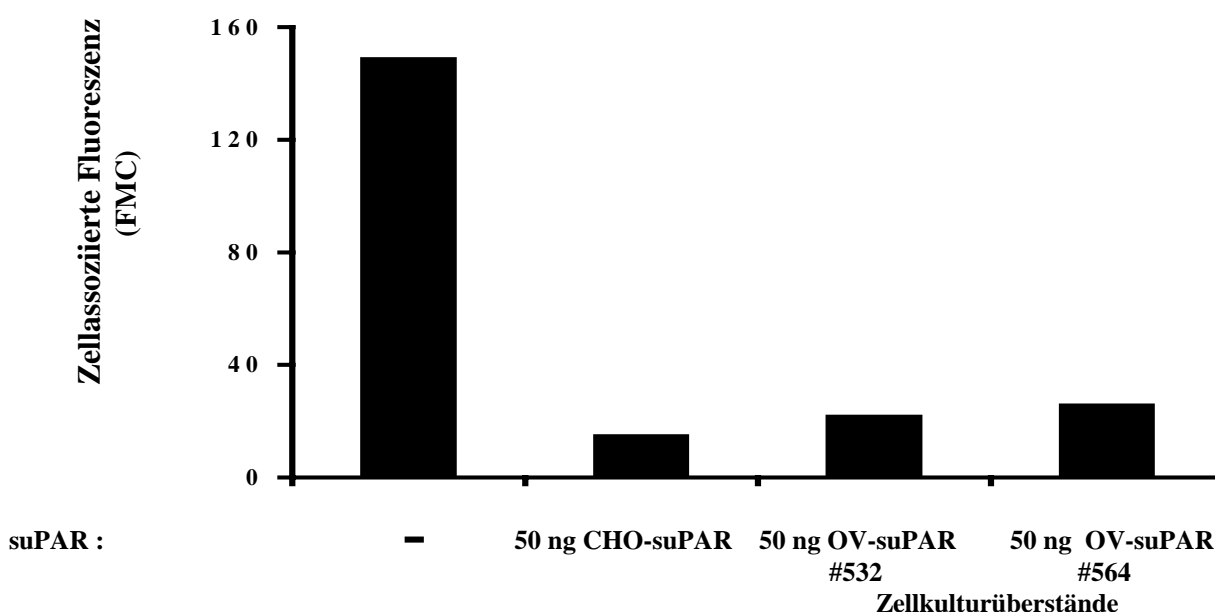


Abb. 16: Nachweis der uPA-Bindungskapazität des suPAR von suPAR-Transfektanten mittels Durchflußzytofluorometrie

Die Kompetition der Bindung von pro-uPA-FITC an zelloberflächenassoziiertem GPI-uPAR von U937-Zellen durch 50 ng suPAR-beinhaltenen Zellkulturüberständen von OV-suPAR-Zelllinien #532 und #564 sowie 50 ng rekombinanten CHO-suPAR₁₋₂₇₇ (von CHO-Zellen produziert) reduziert die Bindung von pro-uPA-FITC an U937-Zellen, verglichen mit der maximalen Bindungskapazität von pro-uPA-FITC an U937-Zellen (dargestellt in der ersten Säule). Die Autofluoreszenz von U937-Zellen wurde ohne pro-uPA-FITC-Zugabe ermittelt und die erhaltene Werte wurden von den Meßwerten subtrahiert. FMC = *Fluorescence Mean Channel*

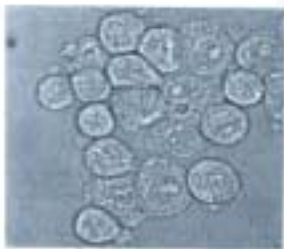
4.5.3 Nachweis des GPI-uPAR von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie (CLSM)

Die Lokalisation und Verteilung des GPI-uPAR auf der Zelloberfläche der in dieser Arbeit beschriebenen Zelllinien wurde mit der Methode der konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopie (CLSM) untersucht. Für diese Versuche wurden GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten mit dem monoklonalen uPAR-spezifischen Antikörper IIIIF10 inkubiert (Abb. 17). Die Wildtyp-Zelllinie OV-MZ-6#8, die vektortransfizierte Zelllinie und die suPAR-transfizierten OV-MZ-6#8-Zellen zeigten einen kaum detektierbaren GPI-uPAR-Gehalt auf der Zelloberfläche. Auf den GPI-uPAR-transfizierten Ovarialkarzinomzelllinien OV-GPI-uPAR #625 und #674 konnte jedoch der erhöhte GPI-uPAR-Gehalt auf der Tumorzelloberfläche deutlich gezeigt werden. Diejenigen Zellen, welche ohne Antikörper bzw. nur mit dem Zweitantikörper inkubiert worden waren, zeigten erwartungsgemäß keine Fluoreszenz.

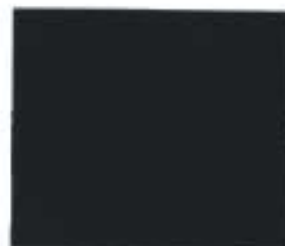
Ohne Antikörper



Nur 2. AB



OV-MZ-6#8



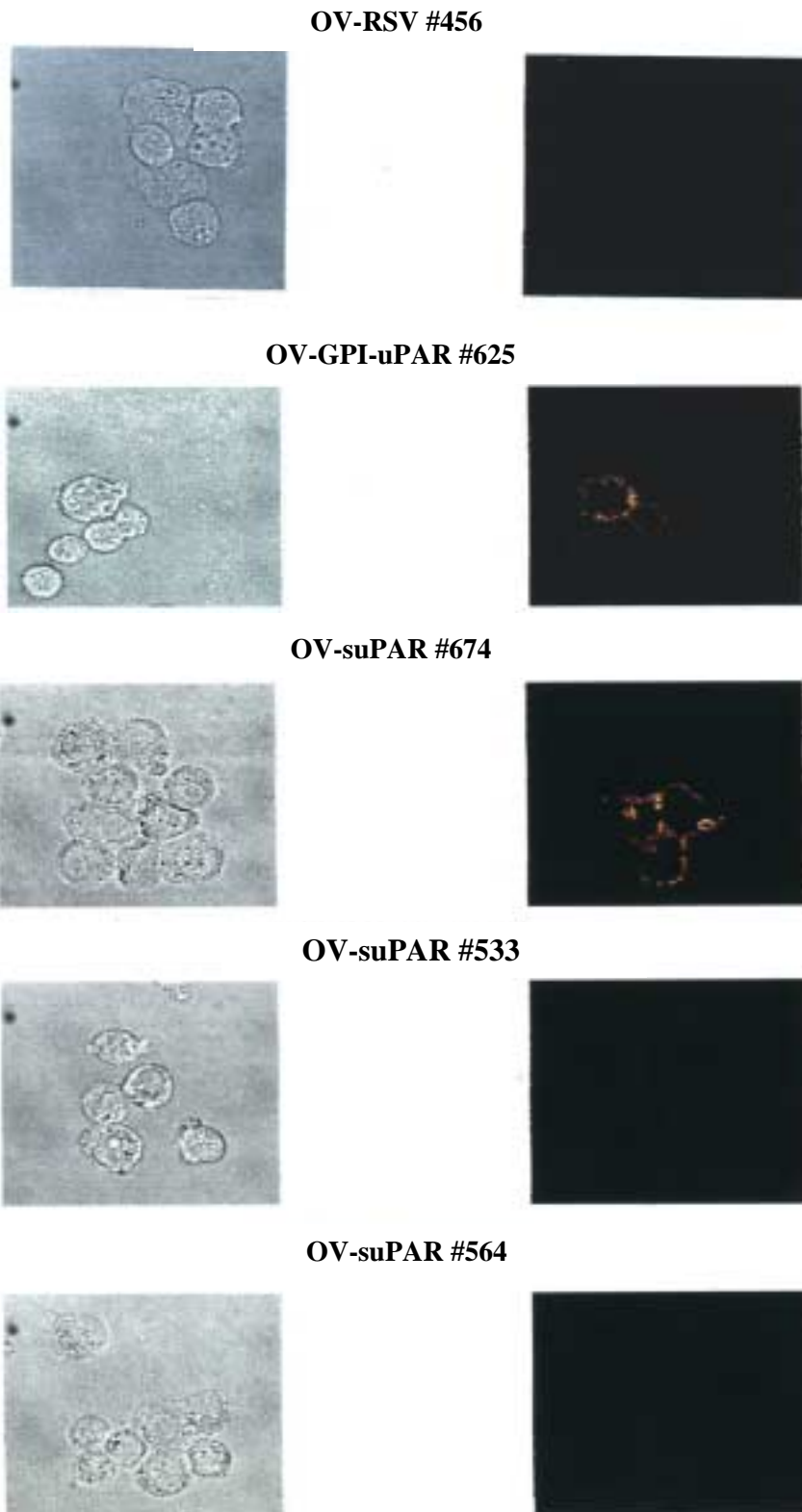


Abb. 17: Nachweis von zellassoziertem GPI-uPAR mit mAK IIIIF10 mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie (CLSM)

Nachweis von GPI-uPAR-Antigen mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie (CLSM) auf humanen Ovarialkarzinomzellen OV-MZ-6#8, welche mit suPAR-cDNA, GPI-uPAR-cDNA, oder Vektor-DNA stabil transfiziert wurden. Der Nachweis von uPAR erfolgte (nach uPA-Entfernung durch Säurebehandlung) durch Inkubation der Zellen mit dem uPAR-spezifischen Antikörper IIIIF10. Das schwarz-weiße Transmissionsbild ist links vom Fluoreszenzbild abgebildet. Die relative Fluoreszenzintensität wurde in eine Glühskala umgewandelt. Weiß bedeutet hohe Intensität, rot steht für niedrigere Intensität.

4.5.4 Bestimmung der uPA-abhängigen tumorzelloberflächenassoziierten Plasminogen-Aktivierungskapazität von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten

Nachdem die funktionelle Aktivität der überexprimierten GPI-uPAR- und suPAR-Proteine der GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten hinsichtlich uPA-Bindung gezeigt worden war, wurde der Einfluß der GPI-uPAR bzw. der suPAR-Expression auf die Plasminogen-Aktivierungskapazität an der Zelloberfläche der unterschiedlichen Zelllinien untersucht.

Für den Nachweis der uPA-abhängigen tumorzelloberflächenassoziierten Plasminogen-Aktivierungskapazität von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten wurde zunächst das endogen produzierte und zelloberflächengebundene uPA durch einen Säureschritt entfernt. Anschließend wurde HMW-uPA zugegeben, von den Zellen gebunden und ungebundenes uPA wieder entfernt. In diesem Versuchsaufbau kommt es zu keiner Intervention der zelloberflächenassoziierten GPI-uPAR/uPA-Bindung durch suPAR, da die suPAR-enhaltenden Zellkulturüberstände entfernt wurden. Das Ausmaß der Plasminogen-Aktivierung an der Zelloberfläche wurde schließlich durch Zugabe eines synthetischen chromogenen Substrates für Plasmin ermittelt.

Die OV-GPI-uPAR-Zelllinien zeigten eine bis zu dreifach höhere Plasminogen-Aktivierungskapazität im Vergleich zu OV-RSV- und Wildtyp-Zelllinien. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß eine erhöhte GPI-uPAR-Expression zu einer Erhöhung der zelloberflächenassoziierten Plasminogen-Aktivierung der Ovarialkarzinomzellen führt. OV-suPAR-Zelllinien zeigten keinen Unterschied in der Plasminogen-Aktivierung, verglichen mit den OV-RSV- und OV-MZ-6#8-Zelllinien (Abb. 18). Somit konnte neben der in Kapitel 4.5.1 beschriebenen FACS-Analyse mit einem unabhängigen System nachgewiesen werden, daß zelloberflächenassoziierte endogene GPI-uPAR-Expression durch die Überexpression von suPAR nicht beeinflusst wird. Eine unterschiedliche Plasminogen-Aktivierungskapazität zeigte sich nur bei den Zelllinien OV-GPI-uPAR und OV-MZ-6#8, die sich in der Expressionsrate von zelloberflächenassoziiertem-GPI-uPAR unterscheiden.

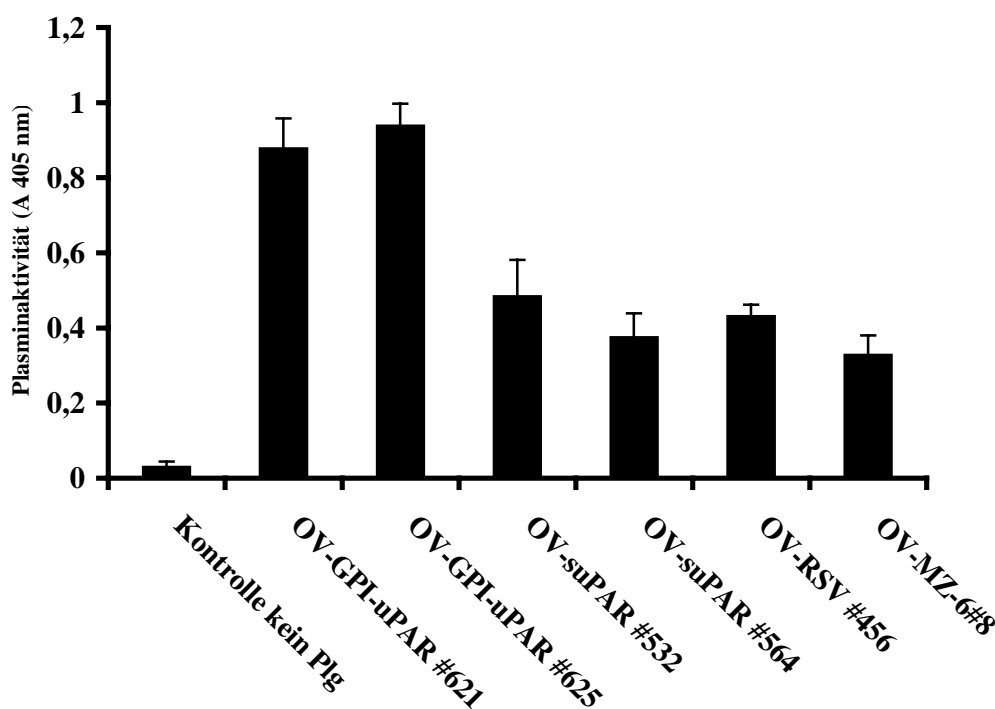


Abb. 18: Nachweis von zelloberflächenassoziiertes Plasminogen-Aktivierungskapazität

In diesem Test wurde die zelloberflächenassoziierte Plasminogen-Aktivierungskapazität von humanen Ovarialkarzinom Zelllinien OV-suPAR, OV-GPI-uPAR, OV-RSV und OV-MZ-6#8 untersucht. Die Zelllinien wurden mit HMW-uPA inkubiert, das ungebundene HMW-uPA wurde durch Waschen entfernt und danach Plasminogen zugegeben. Die Plasminogen-Aktivierung wurde anschließend mit dem Plasmin-spezifischen chromogenen Substrat L-1450 nach 1 h bei 405 nm gemessen. Die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sind gezeigt (\pm SD).

4.5.5 Nachweis der fibrinolytischen Aktivität von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten

Der Aspekt der fibrinolytischen Aktivität von Ovarialkarzinomzellen wurde bereits in früheren Studien der Arbeitsgruppe untersucht, da im Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen eine erhöhte Menge von Fibrinabbauprodukten (D-Dimere) detektiert werden konnte (Wilhelm et al., 1988; 1990).

OV-GPI-uPAR- und OV-suPAR-transfizierte Ovarialkarzinomzelllinien wurden auf Fibringelen ausgesät und die fibrinolytische Aktivität der Zellen untersucht, indem der Gehalt eines der Fibrin-Spaltprodukte (D-Dimer) in den Zellkulturüberständen gemessen wurde.

OV-GPI-uPAR-Karzinomzelllinien generierten bis zu 2,3fach mehr Fibrin-Spaltprodukte. suPAR-exprimierende Zelllinien erzeugten jedoch bis zu fünfmal weniger D-Dimer als die OV-RSV- und die Wildtyp-Zelllinie OV-MZ-6#8 (Abb. 19). Als Kontrolle des letzteren Ergebnisses wurden OV-MZ-6#8-Zellen zusammen mit 1 µg rekombinantem humanen suPAR₁₋₂₇₇ (von CHO-Zellen) auf die Fibringle gegeben, was zu einer ca. achtfachen Reduktion der Fibrindegradierung im Vergleich zu OV-MZ-6#8-Zellen führte. Die zugegebene suPAR₁₋₂₇₇-Konzentration entsprach etwa dem suPAR-Gehalt, welche von den OV-suPAR-Zelllinien produziert wurde.

Parallele Kontrollversuche mit dem vollständigen Versuchsansatz ohne Zellen führten zu keinem Fibrinabbau, bzw. zu keiner D-Dimer-Generierung.

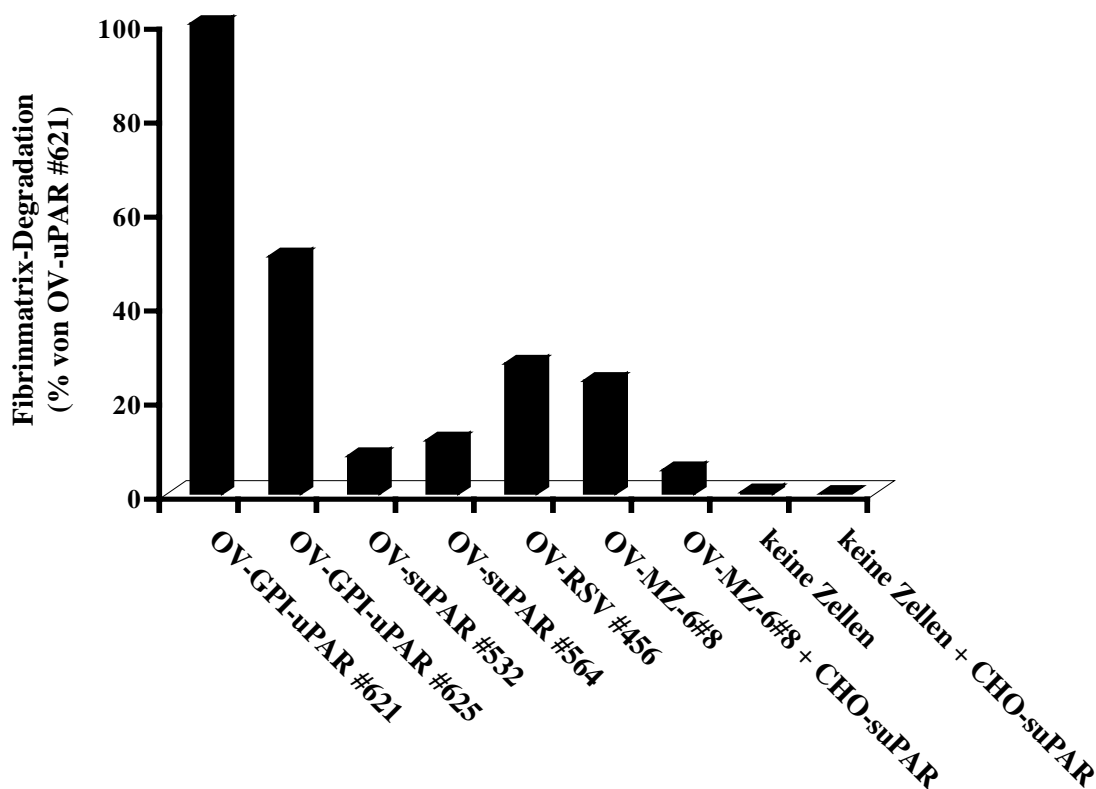


Abb. 19: Nachweis der fibrinolytischen Aktivität von GPI-uPAR-, und suPAR-Transfektanten mittels D-Dimer-Messung

In diesem Test wurde die fibrinolytische Aktivität von humanen Ovarialkarzinom Zelllinien OV-suPAR, OV-GPI-uPAR, OV-RSV und OV-MZ-6#8 untersucht. Die Zelllinien wurden auf einem Fibringel ausgesät. Das nach 4 h produzierte Fibrinabbauprodukt D-Dimer wurde mittels ELISA aus den Zellkulturüberständen ermittelt. Als Kontrolle wurden OV-MZ-6#8-Zellen mit rekombinantem humanem suPAR aus CHO-Zellen auf die Fibringle ausgesät. Die Antigen-Konzentrationen der OV-GPI-uPAR #621-Zelllinie wurden gleich 100% gesetzt, und die D-Dimer-Werte der anderen Zelllinien als prozentualer Anteil davon berechnet.

4.5.6 Nachweis von apoptotischen GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten mittels TUNEL

Um auszuschließen, daß einige Beobachtungen, wie die leicht erhöhte suPAR-Konzentration im Zellkulturüberstand der OV-GPI-uPAR-Zelllinien oder die reduzierte Proliferation der OV-suPAR-Zelllinien, durch eine erhöhte Apoptoserate erklärbar seien, wurden apoptotische Zellen mit Hilfe der TUNEL-Methode dargestellt.

Zur TUNEL-Analyse der Ovarialkarzinomzellen wurden die GPI-uPAR-, suPAR-, RSV-transfizierten OV-MZ-6#8-Zelllinien und die Wildtyp-Zelllinie auf *Chamberslides* angezüchtet und ihr DNA-Fragmentierungszustand (Kennzeichen der Apoptose) mittels immunologischen Nachweises der freien 3' OH-Enden der DNA dargestellt. Die apoptotischen Zellkerne (mit apoptotisch-fragmentierter DNA) werden bei dieser Methode braun angefärbt. Verglichen mit der positiven Kontrolle, in welcher künstlich DNA-Strangbrüche erzeugt wurden und die auch deutlich anfärbbar war, konnte in keiner der untersuchten GPI-uPAR-, suPAR-, RSV-transfizierten OV-MZ-6#8-Zelllinien oder der Wildtyp-Zelllinie apoptotische Zellen, bzw. eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen detektiert werden (Daten sind nicht gezeigt).

4.5.7 Bestimmung der adhäsiven Eigenschaften von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten an dem ECM-Protein Vitronektin

Der uPAR ist aufgrund seiner Fähigkeit, an Integrine und Vitronektin zu binden auch in adhäsive Prozesse involviert. Insofern lag es nahe, die adhäsiven Eigenschaften der GPI-uPAR- bzw. der suPAR-stabil-transfizierten OV-MZ-6#8-Zelllinien zu untersuchen.

Die oben genannten Zelllinien wurden in mit Vitronektin beschichtete Mikrotiterplatten ausgesät. Nach 1 h Adhäsion wurden die nicht adhärenen Zellen durch Waschen entfernt, die verbleibenden Zellen mit dem Hexoaminidase-Substrat (p-Nitrophenol-N-acetyl-beta-D-glucosaminidin) lysiert und quantifiziert.

OV-GPI-uPAR-Zelllinien zeigten in Korrelation mit ihrer GPI-uPAR-Expressionsrate und verglichen mit OV-RSV- und OV-MZ-6#8-Zelllinien eine erhöhte Adhäsion an mit BSA blockierten Vertiefungen (Daten nicht gezeigt) und an Vitronektin. Im Falle der OV-suPAR-

Zelllinie wurde jedoch auf Vitronektin (Abb. 20) eine gleiche bis leicht geringere Adhäsion im Vergleich zu den OV-RSV- und die OV-MZ-6#8-Zelllinien festgestellt.

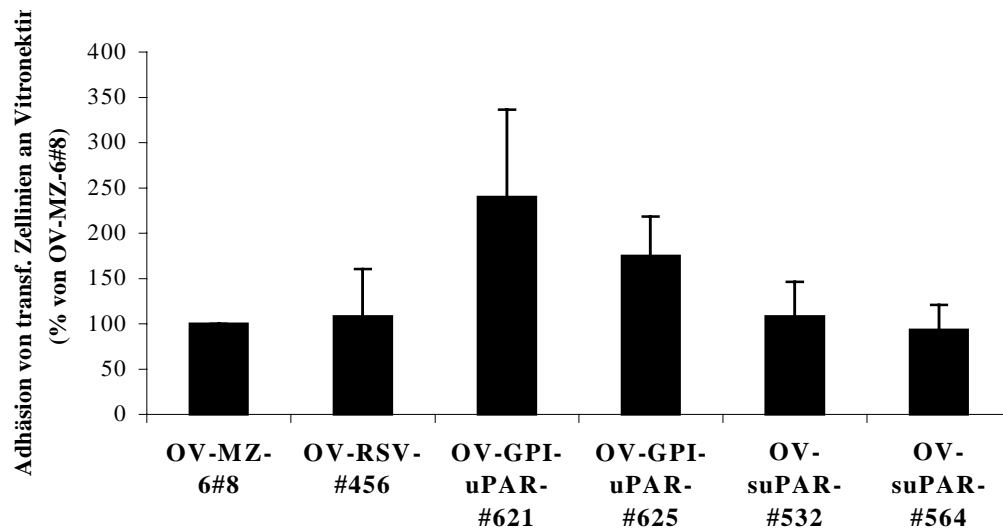


Abb. 20: Adhäsion von GPI-uPAR- bzw. suPAR-stabil-transfizierter OV-MZ-6#8-Zelllinien an Vitronektin

Die GPI-uPAR-, suPAR-, RSV-transfizierten OV-MZ-6#8 Zelllinien und die Wildtyp-Zelllinie wurden auf Vitronektin beschichteten Vertiefungen von Mikrotiterplatten ausgesät, die adhären Zellen nach 1 h mit dem Hexoaminidase-Substrat lysiert und die quantitativ mit der Zellzahl korrelierende Gelbfärbung bei 405 nm photometrisch detektiert. Als Kontrolle diente die Messung der Adhäsion in den mit PBS/2 % (w/v) BSA blockierten Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen sind gezeigt (\pm SD).

4.6 Charakterisierung der *in vivo*-Tumorigenität von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8

4.6.1 Bestimmung der Tumorigenität von GPI-uPAR- und suPAR-transfizierten Transfektanten der Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 im Tiermodell

In den vorangegangenen Kapiteln wurde der Einfluß der Überexpression von GPI-uPAR und die hohe Expression von suPAR in OV-MZ-6#8-Zellen *in vitro* auf wichtige Prozesse des Tumorzellwachstums, wie z.B. Matrixabbau oder Proliferationsverhalten gezeigt. Nun sollte das tumorigene Verhalten der GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten in Nacktmäusen untersucht werden. Nacktmäuse besitzen eine genetisch bedingte stark eingeschränkte Immunantwort, d.h. eine T-Zell-Defizienz. Wegen ihrer Unfähigkeit, injizierte fremde humane Zellen mit Hilfe ihres Immunsystems effektiv zu eliminieren, werden sie häufig in *in vivo*-Experimenten als Wirt für humane Tumoren verwendet.

In den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen wurden die transfizierten Ovarialkarzinomzellen intraperitoneal injiziert. Mit dieser Methode wurde das typische Invasionsverhalten des Ovarialkarzinoms in die Bauchhöhle simuliert, da das Ovarialkarzinom nur sehr selten hämatogen oder lymphogen metastasiert. Nach 6 Wochen wurden die Mäuse getötet und die Tumormasse bestimmt.

In einem initialen Experiment wurden Nacktmäuse mit jeweils OV-suPAR #564-, OV-GPI-uPAR #625- und OV-RSV #456-Zellen intraperitoneal inokuliert (n=3 in jedem Fall). Im Vergleich zu der generierten Tumormasse von OV-RSV #456-Zellen zeigten OV-suPAR #564-generierte Tumore ein geringes intraperitoneales Tumorstadium (86% Reduktion). OV-GPI-uPAR #625-Zellen generierten jedoch eine Tumormasse vergleichbar mit derjenigen der Kontrollzellen OV-RSV #456 (Daten sind nicht gezeigt).

In einer ausgedehnteren Studie wurden zwei unterschiedliche OV-suPAR-Zelllinien, OV-suPAR #564 (n=8) und OV-suPAR #532 (n=7) untersucht. Wiederum resultierte die intraperitoneale Injektion der OV-suPAR-Zelllinien in einer signifikant (70%) reduzierten Tumormasse (OV-suPAR #532, p=0,001; OV-suPAR #564, p=0,0023) verglichen mit der Tumormasse von Mäusen, welche mit der OV-RSV #456-Zelllinie (n=5) xenotransplantiert worden waren (Abb. 21). Die Werte wurden folgendermaßen evaluiert: der Maus-Gesamtsitus

wurde präpariert und gewogen. Anschließend wurde die Tumormasse und das befallene Peritoneum präpariert und gewogen. Als Ergebnis wurde der Quotient aus der jeweiligen Tumormasse und dem Gesamtsitusgewicht ermittelt (Abb. 21).

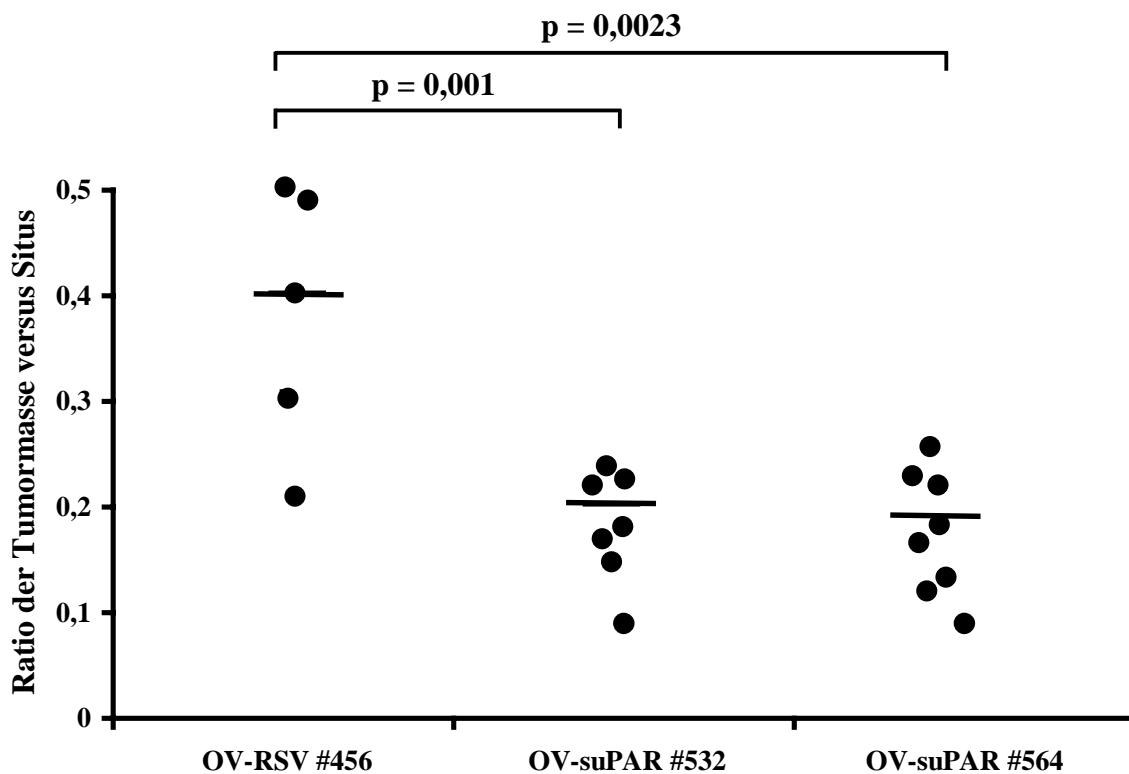


Abb. 21: *In vivo*-Tumorstadium von suPAR-Transfektanten der Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8
Tumormasse von suPAR-exprimierenden Ovarialkarzinomzellen, von denen jeweils 4×10^7 Zellen intraperitoneal in weibliche Nacktmäuse (*nu/nu*, CD1) injiziert wurden. Nach 6 Wochen wurden die Mäuse getötet und die Tumormasse bestimmt, die als Quotient von Tumorlast zum Gesamtsitusgewicht der jeweiligen Maus angegeben ist. Zwei unterschiedliche Zelllinien, OV-suPAR #564 ($n = 8$) und OV-suPAR #532 ($n = 7$), sind gezeigt und wurden mit den parallel ermittelten Ergebnissen von der OV-RSV #456-Zelllinie ($n = 5$) verglichen. Jeder Punkt entspricht den Daten einer Maus; der Median ist als Linie dargestellt.

Bezüglich der Verteilung der Tumormasse im Peritoneum wurde ein unterschiedliches Muster bei Mäusen beobachtet, welchen OV-suPAR- bzw OV-RSV-Zelllinien injiziert wurden: Im Fall der OV-RSV-Zelllinie konnte ein großer Primärtumor unterhalb der Leber und viele klar sichtbare Tumorzellkolonien beobachtet werden, die sich über das Peritoneum, das Mesenterium und das Zwerchfell ausgebreitet hatten. Bei den Mäusen, die OV-suPAR-Zellen erhalten hatten, konnte ein signifikant kleinerer Primärtumor und eine deutliche Reduktion der Größe und Anzahl von im Peritonealraum ausgebreiteten Tumorzellkolonien beobachtet werden (Abb. 22 A und C).

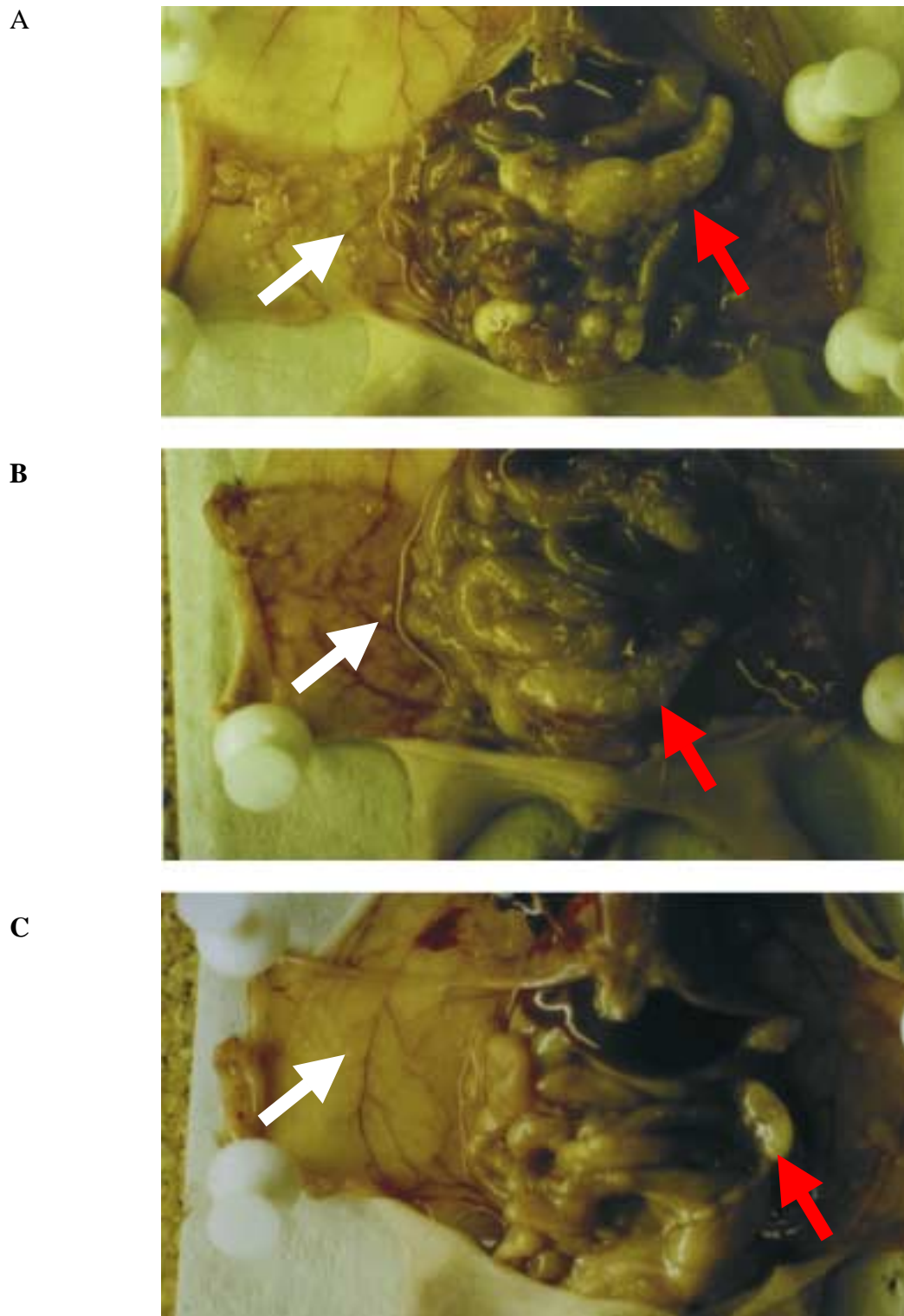


Abb. 22: Tumorausbreitung von GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten im Peritoneum von Nacktmäusen

Tumorausbreitung von stabil transfizierten Ovarialkarzinomzelllinien, welche intraperitoneal injiziert worden waren. A: Situs einer Nacktmaus, welcher OV-RSV #456-Kontrollzellen injiziert worden waren. B: Situs einer Maus, welche mit OV-GPI-uPAR #621-Ovarialkarzinomzellen xenotransplantiert worden war. C: Situs einer Maus, welcher OV-suPAR #532-Ovarialkarzinomzellen injiziert wurden. Der rote Pfeil deutet auf den soliden Tumor unterhalb der Leber, der weiße Pfeil zeigt die Peritonealabsiedelungen.

In zwei unabhängigen Experimenten wurden OV-GPI-uPAR #621-Zellen ($n = 8$ und $n = 7$) und OV-RSV #456-Zellen ($n = 8$ und $n = 5$) in Mäuse intraperitoneal injiziert und nach sechs Wochen die Tumormasse analysiert. Das Muster der von OV-GPI-uPAR #621-Zellen generierten Tumorausbreitung in der Peritonealhöhle der Mäuse ergab einen kompakten Tumor unter der Leber und viele Tumorzellkolonien auf dem Peritoneum, Mesenterium und dem Zwerchfell. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den Mäusen, welchen OV-RSV #456-Zellen injiziert worden waren (Abb. 22 A und B). Darüberhinaus ergab das Verhältnis aus Tumormasse und Gesamtsitusgewicht sowohl bei den Mäusen, welche OV-GPI-uPAR appliziert bekommen hatten, als auch bei den Mäusen, welche mit Vektorkontrollzelllinien xenotransplantiert worden waren, keinen statistisch signifikanten Unterschied (Abb. 23).

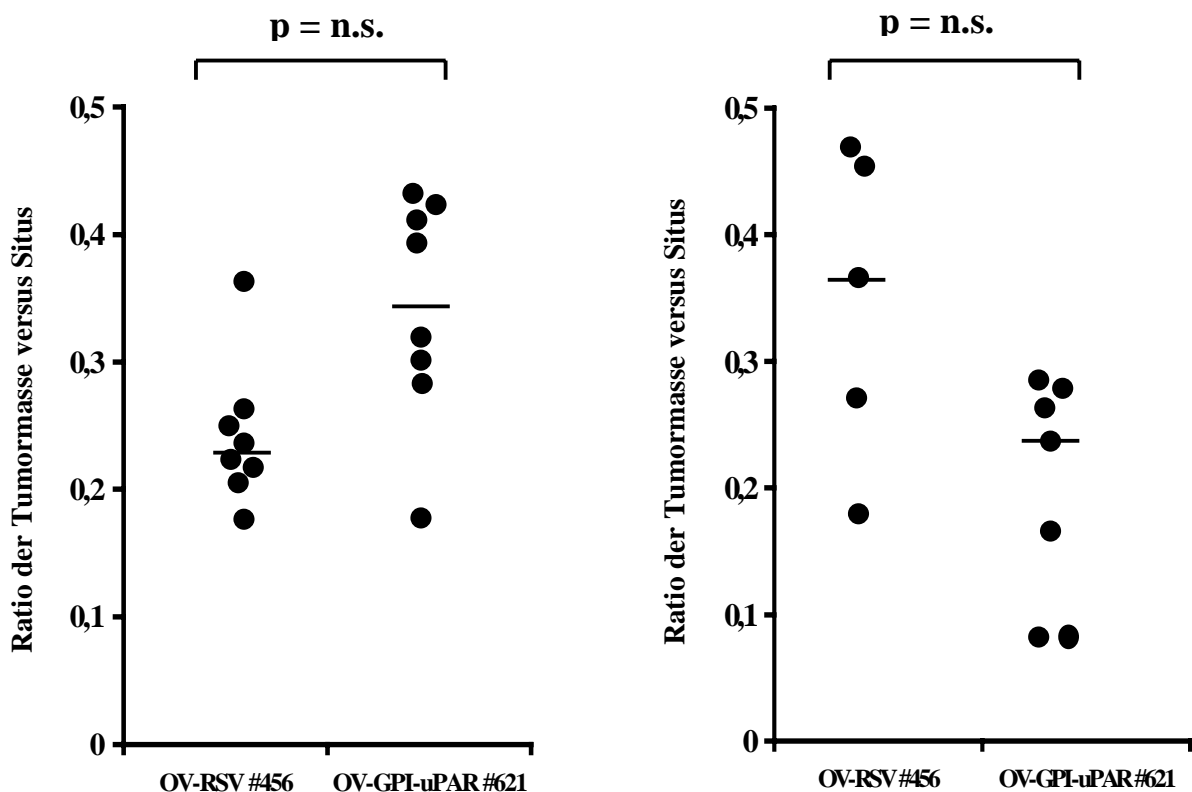


Abb. 23: *In vivo*-Tumorwachstum von GPI-uPAR-Transfektanten der Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8

4×10^7 Zellen wurden intraperitoneal in weibliche Nacktmäuse (*nu/nu*, CD1) injiziert. Nach 6 Wochen wurden die Mäuse getötet. Die Tumormasse wurde bestimmt, indem der Quotient von Tumorlast zum Gesamtsitusgewicht der jeweiligen Maus errechnet wurde. Zwei unabhängige Experimente mit der OV-GPI-uPAR #621-Zelllinie ($n = 8$ und $n = 7$) sind gezeigt und konnten mit den parallel ermittelten Ergebnissen von OV-RSV #456-Zelllinien ($n = 8$ und $n = 5$) verglichen werden. Jeder Punkt entspricht den Daten einer Maus; der Median ist als Linie dargestellt. n.s. = nicht signifikant

4.6.2 uPAR-Antigen-Nachweis in Tumorgewebeextrakten, Blut und Aszites aus mit GPI-uPAR- und suPAR-Transfektanten xenotransplantierten Nacktmäusen

Um die Expression des rekombinanten humanen GPI-uPAR und suPAR in den Xenotransplantaten der Nacktmäuse zu untersuchen, wurde der uPAR-Antigengehalt in den Tumorgewebeextrakten und im Blut der getöteten Mäuse mittels uPAR-ELISA bestimmt.

In Tumorgeweben, welche in Nacktmäusen von OV-suPAR #564- und #532-Zelllinien generiert worden waren, konnte ein hoher suPAR-Gehalt nachgewiesen werden (Abb. 24 A). Dies zeigt, daß suPAR während des Versuches in den Xenografts gebildet wurde. In entsprechenden Tumorextrakten der OV-GPI-uPAR #621- und OV-RSV #456-Zelllinien wurde deutlich weniger suPAR nachgewiesen (Abb. 24 A), jedoch war der suPAR-Gehalt in Extrakten von OV-GPI-uPAR #621-generierten Tumoren - verglichen mit OV-RSV #456-generierten Tumoren - leicht erhöht. Dies ist ein Effekt, der auch in der Zellkultur beobachtet werden konnte (Tab. 2 B).

Wie erwartet, konnte ein hoher GPI-uPAR-Gehalt in (mit Detergens behandelten) Tumorextrakten von OV-GPI-uPAR #621-generierten Tumoren nachgewiesen werden, vergleicht man sie mit den Tumorextrakten aus OV-RSV-Zellen generierten Tumorgeweben. Aber auch Extrakte von Tumoren, welche von OV-suPAR-Zelllinien in Mäusen generiert wurden, wiesen einen hohen uPAR-Antigengehalt auf (Abb. 24 B und Tab. 2 A).

In arteriellem Mäuseblut korrelierte der uPAR-Antigengehalt mit dem uPAR-Antigengehalt von Tumoren, welche mit detergensfreien Puffer extrahiert wurden (Abb. 24 C).

Einige Mäuse produzierten Aszites (OV-RSV: 5/13; OV-GPI-uPAR: 8/15; OV-suPAR: 2/15). Im jeweiligen Aszites der OV-GPI-uPAR-Zelllinien- und OV-suPAR-Zelllinien-tragenden Mäuse konnte ein annähernd gleicher suPAR-Antigengehalt gemessen werden, während im Aszites von Mäusen, welchen OV-RSV-Zellen injiziert waren, ein uPAR-Antigengehalt unterhalb der Detektionsgrenze gemessen werden ($<0,1$ ng/ml Aszites).

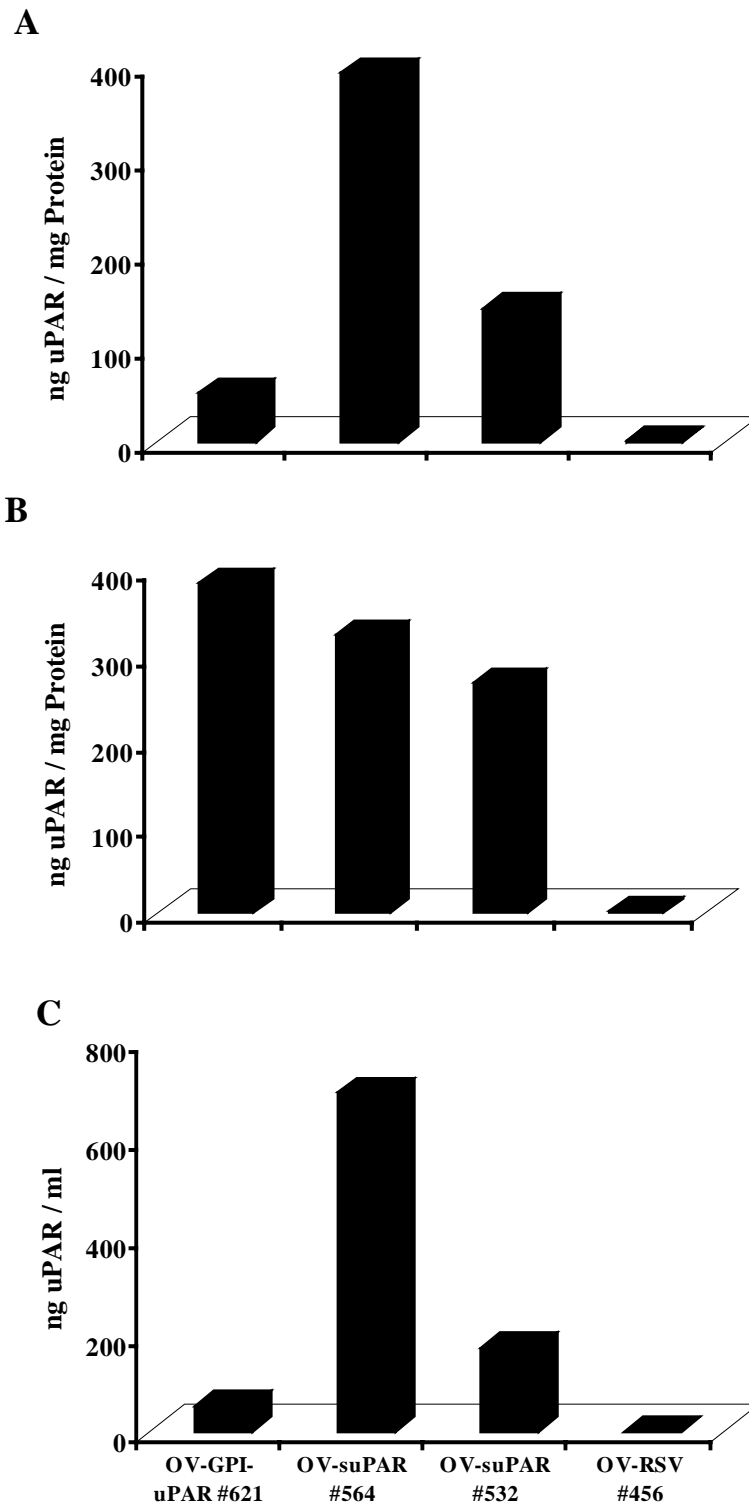


Abb. 24: uPAR-Antigengehalt in Maus-Xenografts und Blut

Der uPAR-Antigengehalt wurde mittels ELISA bestimmt. Es wurden nicht-detergenshaltige Tumorgewebeextrakte (A), detergenshaltige Tumorgewebeextrakte (B) und Blut (C) von Mäusen analysiert, welchen GPI-uPAR-, suPAR- und vektortransfizierte OV-MZ-6#8-Zelllinien intraperitoneal injiziert wurden.

In Tumoren, welche von OV-GPI-uPAR-, OV-suPAR und OV-RSV-Zelllinien in Nacktmäusen generiert wurden, konnte kein signifikanter Unterschied der Konzentration des Liganden von uPAR, uPA, beobachtet werden. Der uPA-Antigengehalt lag zwischen 20 – 30 ng uPA/mg Protein.

5. Diskussion

Bei malignen Tumoren ist das Wachstum des Primärtumorgewebes von Ablösevorgängen und Ausbreitung der Tumorzellen im Organismus begleitet. Die entscheidende Voraussetzung zur Tumorzellinvasion und Metastasierung ist die Fähigkeit der Tumorzellen, die extrazelluläre Matrix zu durchdringen. Dieser Prozeß wird durch verschiedenartige proteolytisch aktive Enzyme ermöglicht, die an der Tumorzelloberfläche lokalisiert sind, wie z.B. Enzyme des Plasminogenaktivator-Systems. Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigten, daß erhöhte Konzentrationen von Komponenten des Plasminogenaktivator-Systems in Primärtumoren von Patienten die Tumorzellausbreitung und Metastasierung fördern. Es konnte nachgewiesen werden, daß hohe Konzentrationen der Serinproteinase uPA, deren Rezeptor uPAR und Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 im Tumorgewebe mit einer schlechten Prognose für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben der Patienten korrelieren. Daraufhin wurde die Erforschung der Rolle des Plasminogenaktivator-Systems bei der Tumorzellinvasion und Metastasierung intensiviert. So konnte inzwischen gezeigt werden, daß die Bindung von uPA an die Tumorzelloberfläche durch seinen spezifischen Rezeptor, uPAR, einen entscheidenden Schritt in der Tumorzellinvasion, -proliferation und Metastasierung darstellt. Die Interaktion zwischen uPA und GPI-uPAR bewirkt eine Fokussierung und Verstärkung der Plasmingenerierung auf der Zelloberfläche (Liotta et al., 1991; Vassalli et al., 1991; Schmitt et al., 1992; Mignatti and Rifkin, 1993; Schmitt et al., 1997; Mazziari et al., 1997).

Die Effekte einer Hemmung der Bindung von uPA an GPI-uPAR und die Modulation der Expression von uPA und GPI-uPAR wurden in zahlreichen Studien untersucht. Ziel dieser verschiedenen experimentellen Vorgehensweisen war die Inhibierung der Plasminaktivität auf der Tumorzelloberfläche, die in unterschiedlichsten Tumormodellen zu einer Verminderung des invasiven Potentials der Tumorzellen führte. In der Literatur wurden bereits eine Reihe von Strategien zur Unterdrückung der Tumorausbreitung und -proliferation durch Hemmung des Plasminogenaktivator-Systems beschrieben (Mazar, 2001). Hierzu gehören z.B. die Applikation inhibitorisch wirkender Antikörper, welche die uPA-Aktivität von Tumorzellen reduzieren (Ossowski et al., 1983), synthetische *active site*-Inhibitoren für uPA (Rabbani et al., 1995) und Fusionsproteine aus dem uPAR-bindenden aminoterminalen Fragment von uPA und z.B.

Bikunin, einem Trypsin-Inhibitor (Crowley et al., 1993; Kobayashi et al., 1998). In früheren Arbeiten konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß Moleküle, welche die Interaktion zwischen uPA und zelloberflächengebundenem GPI-uPAR beeinträchtigen, z.B. ein von CHO-Zellen produzierter, löslicher uPAR oder ein monoklonaler, die uPA-Bindungsstelle in uPAR blockierender Antikörper, IIIIF10, die Zellproliferation und Invasion *in vitro* signifikant hemmen (Wilhelm et al., 1994; Fischer et al., 1998). Darüber hinaus konnte das Wachstum und die intraperitoneale Ausbreitung von Ovarialkarzinomzellen im Nacktmausmodell signifikant durch die Gabe von uPA-Antisense-Oligonukleotiden reduziert werden (Wilhelm et al., 1995).

Um den Einfluß der uPA/GPI-uPAR-Interaktion in der Tumorprogression untersuchen zu können, sollten in der vorliegenden Arbeit die uPA/GPI-uPAR-abhängigen tumorbiologischen Effekte in Ovarialkarzinomzellen einerseits durch die Überexpression der GPI-verankerten Form des uPAR und andererseits durch die sehr hohe Expression einer löslichen Form des uPAR (suPAR) moduliert werden. Als Modell für die Evaluierung der Rolle des uPAR in Tumorwachstum, Tumorzellausbreitung und -adhäsion von Ovarialkarzinomzellen diente die tumorigene und invasive Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8, welche eine relativ hohe uPA- und niedrige uPAR-Konzentration aufweist (Will et al., 1994; Fischer et al., 1998).

5.1 Auswirkungen der Überexpression von suPAR auf Proliferation, Plasmingenerierung und Tumorzellausbreitung von humanen Ovarialkarzinomzellen

Als Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit beschriebenen Studien dienten die Daten von Wilhelm et al. (1994). Sie zeigten, daß durch die Zugabe von gereinigtem rekombinanten humanen suPAR (aus CHO-Zellen) die Bindung von uPA an den zelloberflächengebundenen uPAR vermindert und in *in vitro*-Versuchen die Tumorzellproliferation und -invasion inhibiert wird. Das Wirkungsprinzip des suPAR ist das Abfangen von freiem, extrazellulärem uPA, das sodann nicht mehr für die Bindung an zelloberflächengebundenen GPI-uPAR zur Verfügung steht (*Scavenger*-Effekt). Dadurch kommt es zu einer Reduzierung der Plasmingenerierung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte dieser *Scavenger*-Effekt des suPAR nicht durch exogene Zugabe von suPAR, sondern durch die Überexpression von humanem suPAR durch die Ovarialkarzinomzellen selbst erreicht werden. Zusätzlich sollte der Einfluß großer Mengen an

suPAR in der Tumorzellumgebung auf Tumorzellwachstum und Metastasierung im Tiermodell untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß durch Transfektion eines für suPAR kodierenden Plasmids in Ovarialkarzinomzellen eine bis zu 2500fach erhöhte Expression von suPAR im Zellkulturüberstand erreicht werden konnte. In weiteren Experimenten zur Charakterisierung von suPAR-exprimierenden Ovarialkarzinomzelllinien zeigte sich, daß der suPAR, wie erwartet, in einer GPI-losen Form exprimiert wurde. Er erwies sich als funktionell aktiv, d.h. er konnte die Bindung von uPA an zelloberflächengebundenen uPAR um 60% - 75% reduzieren. Diese Daten entsprechen den Beobachtungen von Wilhelm et al. (1994), die durch Zugabe von rekombinantem CHO-uPAR₁₋₂₇₇ eine ca. 75%ige Reduktion der uPA Bindung an U937-Zellen erreichen, und mit diesen Daten die *Scavenger*-Funktion des suPAR beweisen. Ähnliche Ergebnisse wurden von Chavakis et al. (1998) beschrieben. Sie konnten die zelluläre Bindung von uPA an humane Endothelzellen durch Zugabe von suPAR um 50% - 70% verringern.

Die Überexpression von sezerniertem suPAR in Ovarialkarzinomzellen, welche mit der suPAR-cDNA transfiziert worden waren, führte zu einer deutlichen Reduktion der Fibrinmatrix-Degradationskapazität, verglichen mit der Wildtypzelllinie. Dies kann damit erklärt werden, daß suPAR durch Wegfangen des uPA die zellassozierte Plasminogen-Aktivierung stark herabsetzt. Dies weist darauf hin, daß suPAR-überexprimierende Ovarialkarzinomzellen weniger aktives Plasmin auf ihrer Zelloberfläche aufweisen als Wildtyp-Ovarialkarzinomzellen, da die Fähigkeit Fibrin zu degradieren ein direktes Maß der zelloberflächenassoziierten Plasminaktivität ist, und die Plasminaktivierung durch uPA an der Zelloberfläche verstärkt wird (Ellis et al., 1996). Übereinstimmend mit den hier gezeigten Daten konnte auch bei Mammakarzinomzellen, welche mit suPAR-cDNA transfiziert waren, eine erniedrigte Plasminaktivität in der Tumorzellumgebung nachgewiesen werden (Krüger et al., 2000).

suPAR-exprimierende Ovarialkarzinomzellen wiesen neben dem verminderten Abbauvermögen einer Fibrinmatrix auch ein signifikant verlangsamtes, konzentrationsabhängiges Proliferationsverhalten auf, vergleicht man sie mit der parentalen Zelllinie oder der Vektor-Kontrollzelllinie. Wir konnten beweisen, daß dieser Effekt nicht auf eine erhöhte Apoptoserate von suPAR-überexprimierenden Zellen zurückzuführen ist. Die geringere Proliferationsrate von suPAR-exprimierenden Ovarialkarzinomzelllinien steht in Übereinstimmung mit

vorhergegangenen *in vitro*-Studien unserer Arbeitsgruppe, in denen das Wachstum von Ovarialkarzinomzellen durch Zugabe von gereinigtem, rekombinanten uPAR (von CHO-Zellen) reduziert werden konnte (Wilhelm et al., 1994). An OV-MZ-6#8-Wildtypzellen konnte auch eine uPA-vermittelte mitogene Wirkung nachgewiesen werden, welche über die Bindung von uPA an uPAR induziert wird (Fischer et al., 1998; Rabbani et al., 1997). Dies weist darauf hin, daß eine Reduktion des Wachstumsverhaltens von suPAR-exprimierenden Ovarialkarzinomzellen auf das Abfangen von uPA durch suPAR zurückzuführen sein könnte.

Die *in vitro*-Daten dieser Arbeit hinsichtlich des *Scavenger*-Effekts von suPAR zeigen, daß durch die hohe Expressionsrate des suPAR in Ovarialkarzinomzellen sowohl die uPA-Bindung an den zellgebundenen GPI-uPAR sowie die Fähigkeit des GPI-uPAR, die proteinasenabhängige extrazelluläre Matrixdegradation zu vermitteln, erfolgreich und nahezu vollständig verhindert wird.

Die Basis für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen *in vivo*-Studien wurde ebenfalls durch Arbeiten von Wilhelm et al. (1994) geschaffen. Sie konnten mittels *in vitro*-Versuchen durch Zugabe von gereinigtem, rekombinanten suPAR eine Reduktion des invasiven Verhaltens von Ovarialkarzinomzellen in Matrigel erreichen. Wir studierten in einem *in vivo*-Mausmodell die Auswirkungen von suPAR-überexprimierenden Ovarialkarzinomzellen auf das Tumorwachstum und die Tumorausbreitung. Dazu wurden humane, suPAR-überexprimierende Ovarialkarzinomzellen in immundefiziente Nacktmäuse intraperitoneal inokuliert. Dieses Mausmodell stellt ein Modell für ein weit fortgeschrittenes Stadium des Ovarialkarzinoms dar, mit dem die Ausbreitung der Tumorzellen in den Bauchraum und in die intraperitonealen Organe studiert werden kann. Die intraperitoneale Injektion von invasiven und tumorigenen OV-RSV-Zellen in Nacktmäuse induzierte typischerweise einen großen, kompakten Primärtumor unterhalb der Leber und führte zur Ausbreitung vieler Tumorzellkolonien über das ganze Peritoneum, Mesenterium und Zwerchfell. Sobald jedoch die Ovarialkarzinomzelllinie zusätzlich zu der physiologischen Menge an membrangebundenem GPI-uPAR große Mengen an suPAR synthetisierte, konnte im Tiermodell eine auffallend starke, ca. 70%ige Reduktion der Tumorlast beobachtet werden. Dies steht möglicherweise im Zusammenhang mit der Beobachtung, daß die Interaktion zwischen uPA und GPI-uPAR zu einer Erhöhung von Tumorzellinvasion, -proliferation und -adhäsion führt (Kanse et al., 1996; Wei et al., 1996; Chang et al., 1998; Kroon

et al., 1999; Reuning et al., 1998; Blasi, 1999). Interessanterweise ruft uPA darüberhinaus in Abhängigkeit von der Bindung an GPI-uPAR eine mitogene Wirkung hervor (Fischer et al., 1998; Rabbani et al., 1997). In diesem Zusammenhang ist der Einfluß der hohen suPAR-Expression von Ovarialkarzinomzellen auf das intraperitoneale Tumorwachstum und die Tumorausbreitung in Nacktmäusen zumindest zum Teil auf die Konkurrenz mit der uPA-Bindung auf der Tumorzelloberfläche und somit auf die Verringerung der uPA-Bindungsstellen auf der Zelloberfläche durch suPAR zu erklären.

Dieses Konzept der Erniedrigung eines bedeutenden tumorrelevanten Faktors durch die Überexpression der löslichen Form des entsprechenden Rezeptors wurde auch an einem anderen Modell gezeigt: Goldman et al. (1998) konnten die Inhibition des Tumorwachstums und der Metastasierung in humanen Fibrosarkomzellen durch die Überexpression von löslichem *Vascular endothelial growth factor*-Rezeptor (sFLT-1) demonstrieren.

In einer weiteren Studie an einem Tumor anderer Herkunft und Pathogenese wurden humane Mammakarzinomzellen mit dem für humanen suPAR kodierenden Expressionsplasmid transfiziert (Krüger et al., 2000). Auch diese Zellen wurden auf Primärtumorwachstum und experimentelles Metastasierungsverhalten *in vivo* untersucht. In Übereinstimmung mit unseren Daten zeigte sich in diesen Experimenten, daß hohe Expressionsraten von suPAR mit einer Verringerung des Tumorwachstums assoziiert waren. Es konnte auch eine Reduzierung der Metastasierung in die Lunge beobachtet werden. Die Expression von suPAR führte, wie bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Daten hinsichtlich Reduktion der Plasminogen-Aktivierungskapazität von Ovarialkarzinomzellen durch suPAR, *in vitro* zu einer starken Reduktion der zelloberflächenassoziierten Plasminogen-Aktivierung. Jedoch wurde das Wachstumsverhalten der transfizierten Mammakarzinomzellen nicht signifikant beeinflusst. Aus diesem Grund sind die Auswirkungen des suPAR auf Tumorwachstum und experimentelle Metastasierung in dem Mammakarzinommodell nicht ausschließlich auf eine Hemmung der mitogenen Aktivität von uPA zurückzuführen (Krüger et al., 2000). Dies ist ein Beispiel dafür, daß die Übertragung von Ergebnissen, welche in Mammakarzinomzelllinien gewonnen wurden, aufgrund zelltypspezifischer Reaktionen auf andere Tumormodelle, wie z.B. Ovarialkarzinomzelllinien, nicht ohne weiteres möglich ist.

Neben der Ermittlung der Tumormasse von Mäusen, welche suPAR-exprimierende Ovarialkarzinomzelllinien trugen, wurde das Tumorgewebe und Blut dieser Mäuse auf ihren suPAR-Antigen-Gehalt untersucht. Die Messungen ergaben eine erhöhte suPAR-Konzentration im Tumorgewebe der Tiere. Dies läßt darauf schließen, daß die suPAR-Expression von suPAR-transfizierten OV-MZ-6#8-Zellen auch im *in vivo*-Tierexperiment fortgesetzt wurde.

Auch im Blut von Ovarial- und Kolonkarzinompatienten kann suPAR detektiert werden. Es wird in der Literatur diskutiert, daß dieser suPAR im Blut von Patienten möglicherweise durch Membran-*shedding* vom Primärtumor gelöst wird und somit ein indirektes Maß für die Tumorgröße ist (Sier et al., 1998; Stephens et al., 1998; Brünner et al., 1999). Der suPAR im Blut von Tumorpatienten konnte in einer funktionell aktiven, aber GPI-losen Form detektiert werden (Sier et al., 1998). Eine erhöhte Konzentration des löslichen uPAR im Blut geht hierbei signifikant mit einer schlechteren Prognose für das Gesamt- und rezidivfreie-Überleben der Patienten einher (Sier et al., 1998; Stephens et al., 1998; 1999; Brünner et al., 1999; Mustjoki et al., 2000).

Im Blut von Mäusen, welchen suPAR-exprimierende Ovarialkarzinomzellen inokuliert wurden, ist der suPAR-Gehalt ca. 100mal höher als im Blut von Patienten mit Ovarialkarzinom oder kolorektalen Tumoren. So kann möglicherweise nicht ausgeschlossen werden, daß ein konzentrationsabhängiger Effekt des suPAR existiert, wobei eine tumorfördernde Auswirkung bei niedrigem suPAR-Gehalt des Blutes und eine tumorverhindernde Wirkung bei höherem suPAR-Gehalt denkbar wäre. Ein weitere denkbare Erklärung der unterschiedlichen Effekte des suPAR könnte im Verhältnis des zellgebundenem GPI-uPAR zum Gehalt an löslichem uPAR in der Zellumgebung liegen. Der erhöhte Gehalt an löslichem uPAR im Blut von Tumorpatienten korreliert mit der Tumorgröße, d.h. je größer der Tumor, desto mehr Tumorzellen sind im Tumorpatienten vorhanden und desto höher ist der Gehalt an suPAR im Blut der Patienten. Möglicherweise ist das Verhältnis von GPI-uPAR zu suPAR in der direkten Tumorzellumgebung nicht stark verändert und die uPA/GPI-uPAR-Interaktion sowie die Tumorzellprogression durch suPAR eventuell nicht vermindert. Im Gegensatz dazu ist das Verhältnis von löslichem uPAR zu zellgebundenem GPI-uPAR bei den OV-suPAR-Zelllinien möglicherweise ein anderes. In der Tumorzellumgebung von OV-suPAR-Zelllinien steht dem GPI-uPAR-Gehalt viel mehr suPAR gegenüber, der uPA-abfangen kann, was vielleicht den tumorreduzierenden Effekt von großen Mengen suPAR in der Tumorzellumgebung erklären könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß durch die Überexpression von suPAR ein inhibitorischer Effekt auf das Wachstum und die Ausbreitung von Ovarialkarzinomzellen in Nacktmäusen zu sehen war. Dies unterstreicht die zentrale Rolle der uPA/uPAR-Interaktion im Zusammenhang mit tumorbiologischen Ereignissen. Die eventuelle therapeutische Nutzung des suPAR als *Scavenger* für uPA, z.B. innerhalb eines *in vivo*-Gentransfers durch virale oder nicht-virale Überträgersysteme, scheint eine vielversprechende Strategie zu sein, um im Tumorgeschehen nicht nur die uPA/GPI-uPAR-vermittelte Proteolyse, sondern auch Tumorzellwachstum und Metastasierungsprozesse zu inhibieren. Ein Einsatz von suPAR mit seiner Funktion als *Scavenger* für uPA als somatische Gentherapie bei soliden malignen Tumoren wäre durchaus denkbar. Somit ergibt sich ein neuer hoffnungsvoller, weiterführender Ansatz in der Erforschung neuer Therapieformen zur Bekämpfung des Ovarialkarzinoms.

5.2 Auswirkungen der Überexpression von GPI-uPAR auf Proliferation, Plasmingenerierung und Tumorzellausbreitung von humanen Ovarialkarzinomzellen

In früheren Arbeiten untersuchten Xing und Rabbani (1996) die Auswirkungen der Überexpression des zelloberflächenassoziierten GPI-uPAR auf tumorbiologische Prozesse. Sie konnten zeigen, daß Mammaadenokarzinomzellen, welche mit suPAR-cDNA transfiziert waren, einen 3- bis 5fach erhöhten GPI-uPAR-Gehalt gegenüber vektortransfizierten Kontrollzellen besaßen, und einen bis zu 5fach erhöhten invasiven und matrixdegradierenden Phänotyp *in vitro* aufwiesen. Ähnliche Studien an humanen Osteosarkomzellen zeigten, daß eine 2fache Überexpression von GPI-uPAR zu einer Steigerung der invasiven Kapazität *in vitro* führt (Karikó et al., 1993). Für weiterführende Studien wurden im Rahmen dieser Arbeit stabil transfizierte Ovarialkarzinomzellen (OV-GPI-uPAR) hergestellt, welche GPI-verankerten uPAR in hohem Maße überexprimieren (bis zu 500fache GPI-uPAR-Überexpression). Wie schon durch immunhistochemische Untersuchungen gezeigt werden konnte, ist nativer GPI-uPAR nicht ausschließlich in der Zellmembran lokalisiert, sondern ist auch im Zytoplasma zu detektieren (Luther et al., 1997; Hildenbrandt et al., 1998). Dieser zytoplasmatische Anteil des GPI-uPAR ist neu synthetisiertes GPI-uPAR-Protein, welches noch nicht vollständig posttranslational prozessiert bzw. noch nicht an die Zelloberfläche transportiert ist. Es ist daher nicht

überraschend, daß bei GPI-uPAR-überexprimierenden Ovarialkarzinomzelllinien beachtliche GPI-uPAR-Mengen intrazellulär detektiert werden. Dies spiegelt sich in der Beobachtung wieder, daß der GPI-uPAR-Gehalt der Ovarialkarzinomzellextrakte bis zu 500fach erhöht war, und nur ein Teil des GPI-uPAR funktionell aktiv an der Zelloberfläche lokalisiert war.

GPI-uPAR-überexprimierende Ovarialkarzinomzelllinien wiesen, wie erwartet, eine erhöhte *in vitro*-uPA-Bindekapazität auf und zeigten folglich sowohl eine hohe *in vitro*-Plasminogen-Aktivierungskapazität als auch ein erhöhtes Vermögen, eine Fibrinmatrix zu degradieren. Dies steht in Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Ergebnissen in anderen Zellarten der Gruppen um Xing und Karikó (Karikó et al., 1993; Xing et al., 1996). Auch die Adhäsion von GPI-uPAR-überexprimierenden Ovarialkarzinomzellen an Vitronektin ist im Vergleich zur Kontrollzelllinie erhöht. Dies steht in Übereinstimmung mit den Daten von Waltz et al. (1994) sowie Deng et al. (1994), die zeigen konnten, daß GPI-uPAR die Adhäsion von humanen Monozyten an Vitronektin verstärkt. Die GPI-uPAR-Überexpression von Ovarialkarzinomzellen hatte keinen Einfluß auf die Tumorzellproliferation. Es wäre denkbar, daß die durch Bindung von uPA an GPI-uPAR vermittelte Wachstumsstimulation der Ovarialkarzinomzellen schon in der Wildtypzelllinie OV-MZ-6#8 maximal ist und durch einen erhöhten GPI-uPAR-Gehalt auf der Tumorzelloberfläche nicht weiter gesteigert werden kann.

In *in vivo*-Studien analysierten Xing und Rabbani (1996) die GPI-uPAR-Überexpression von Mammaadenokarzinomzellen in einem syngenem Rattenmodell hinsichtlich Tumorwachstum, Tumorzellinvasion und Metastasierung. Zellklone, welche 3- bis 5fach erhöhte GPI-uPAR-Expression aufwiesen, generierten ein signifikant höheres Tumolvolumen verglichen mit vektortransfizierten Wildtypzelllinien nach der Inokulation der Tumorzellen in das Brustfettgewebe von Ratten. Zusätzlich wurde bei GPI-uPAR-überexprimierenden Mammaadenokarzinomzellen ein erhöhtes metastatisches Potential beobachtet. Überraschenderweise zeigten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten GPI-uPAR-überexprimierenden Ovarialkarzinomzellen im Nacktmausmodell ein Wachstumsverhalten, welches vergleichbar war mit dem Wachstumsverhalten der Wildtypzelllinie und der Kontrollzelllinie.

Acht der fünfzehn Tiere, denen OV-GPI-uPAR-Zellen injiziert wurden, entwickelten uPAR-haltigen Aszites. Dies könnte darauf hinweisen, daß die OV-MZ-6#8-Zellen und die transfizierten Zelllinien im Mausmodell einen ovarialkarzinomtypischen Krankheitsverlauf

verursachen. Es ist anzunehmen, daß die GPI-uPAR-Expressionsrate - im Zusammenspiel mit anderen Faktoren - der Wildtypzelllinie OV-MZ-6#8 eine maximale Tumorigenität, Invasivität und Proliferationsverhalten verleiht, so daß eine erhöhte GPI-uPAR-Expressionsrate nicht zu einer Erhöhung der Tumorausbreitung führt. Außerdem steht den Ovarialkarzinomzellen, welche GPI-uPAR überexprimieren, nicht mehr sezernierter uPA als den Wildtypzellen zur Verfügung. In diesem Zusammenhang darf man nicht außer acht lassen, daß die uPA/uPAR-Interaktion streng spezie-spezifisch ist. Maus-uPA bindet nicht an humanen uPAR und vice versa (Estreicher et al., 1989; Solberg et al., 1992). So konnte im Gegensatz zu dem untersuchten syngenem Rattenmodell (Xing et al., 1996) in dem in dieser Arbeit untersuchten xenogenen Ovarialkarzinommodell nur eine autokrine GPI-uPAR-Sättigung auftreten. Xing et al. (1996) diskutieren, daß in dem syngenem Rattenmodell die GPI-uPAR-überexprimierenden Mammaadenokarzinomzellen ihre Malignität steigern konnten, da sie das uPA der tumorzellumgebenden Stromazellen zusätzlich nutzen konnten. Deshalb könnte man vermuten, daß in der Wildtypzelllinie OV-MZ-6#8 der GPI-uPAR-Gehalt bezüglich des zur Verfügung stehenden uPA-Gehaltes - hinsichtlich maximaler autokriner Stimulation des Tumorzellwachstums und der -invasion - optimal ist.

Tumore, welche von OV-GPI-uPAR-Zelllinien in der Nacktmaus generiert wurden, wiesen erhöhte Konzentrationen von GPI-uPAR im Tumorgewebe sowie erhöhte Werte von suPAR im Tumorgewebe und in den Blutproben auf. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit Beobachtungen, daß der GPI-uPAR von der Tumorzelloberfläche durch Phospholipase D oder C oder durch proteolytische Spaltung nahe der carboxyterminalen Region des Proteins abgespalten wird und in das Blutgefäßsystem gelangt (Wilhelm et al., 1999; Ehlers et al., 1997; Metz et al., 1994). Wilhelm et al. (1999) konnten bei OV-MZ-6-Zellen einen Anstieg an löslichem uPAR im Zellkulturüberstand messen, wenn sie die Zellen mit einer cDNA transfizierten, welche für die GPI-spezifische Phospholipase D kodierte. Auch für weitere GPI-verankerte Proteine, wie die Alkalische Phosphatase, konnte in *in vitro*-Experimenten mit COS-1-Zellen gezeigt werden, daß Phospholipase D in Ablöseprozesse der GPI-verankerten Alkalischen Phosphatase von der Zellmembran involviert ist (Wilhelm et al., 1999; Metz et al., 1994; Küng et al., 1997).

Im Gegensatz zum prognostisch relevanten Gehalt von suPAR im Blut von Tumorpatienten konnte eine Korrelation zwischen dem Vorkommen des GPI-verankerten uPAR in Tumorgeweben und einer schlechten Prognose für das Überleben von Tumorpatienten noch nicht

ermittelt werden. Es wurden aber erhöhte uPAR-Konzentrationen in Tumorgeweben bei Ovarialkarzinom- und Kolorektalkarzinompatienten beschrieben (Pedersen et al., 1993; Schmalfeldt et al., 1995; Kuhn et al., 1999; Baker et al., 2000). Möglicherweise liegt dies daran, daß in der Analyse der Tumorgewebe-Homogenate nur ein Gemisch von uPAR aus Tumor- und Stromazellen gemessen werden kann, oder der tumorrelevante uPAR vermutlich nicht ausreichend von den Antikörpern in der ELISA-Analyse erkannt wird.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß am Modell des uPAR vielfältige *in vitro*- und *in vivo*-Experimente entworfen werden können, um die Aufgabe und die wichtige Rolle des uPAR in physiologisch und pathologisch wichtigen invasiven Prozessen zu untersuchen. Die uPAR-überexprimierenden Ovarialkarzinomzellen könnten in weiteren Studien mit Inhibitoren von Komponenten des Plasminogenaktivator-Systems sehr hilfreich sein.

6. Zusammenfassung

Die Fokussierung der Serinproteinase Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ (uPA) auf der Tumorzelloberfläche durch die Interaktion mit ihrem spezifischen Rezeptor (uPAR, CD87) ist ein wichtiger Schritt in der Tumordinvasion und der Metastasierung. Hohe Antigenkonzentrationen von uPA und seinem Inhibitor PAI-1 in Tumoren korrelieren mit einer schlechten Prognose der Patienten. Um den Einfluß des uPAR im Tumorwachstum und in der Tumorausbreitung zu untersuchen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die humane Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 stabil mit Expressionsplasmiden transfiziert, welche für den humanen GPI-verankerten uPAR (GPI-uPAR) bzw. für eine verkürzte, lösliche Form des uPAR (suPAR) kodieren.

OV-MZ-6#8-Zelllinien, welche den löslichen uPAR überexprimieren, zeigten eine bis zu 2500fache Erhöhung des suPAR-Gehaltes im Zellkulturüberstand. OV-MZ-6#8 Zelllinien, welche den GPI-verankerten uPAR überexprimieren, wiesen einen bis zu 500fachen Anstieg an GPI-uPAR in Zellextrakten auf.

Funktionelle Analysen ergaben, daß beide überexprimierten uPAR-Arten uPA binden können. OV-MZ-6#8-Zelllinien, welche GPI-uPAR überexprimieren, wiesen eine erhöhte Fibrinmatrix-Degradationsaktivität und zelloberflächenassoziierte Plasminogen-Aktivierungskapazität auf, während diejenigen Zelllinien, welche suPAR überexprimieren, eine reduzierte fibrinolytische Aktivität und eine verminderte Proliferationsrate zeigten.

Durch *in vivo*-Studien wurde das Tumorwachstum mittels intraperitonealer Injektion GPI-uPAR- und suPAR-transfizierter OV-MZ-6#8-Zelllinien in Nacktmäusen untersucht. OV-MZ-6#8-Zelllinien, welche suPAR in hohem Maße exprimieren, zeigten eine ca. 70%ige Reduktion der Tumormasse. GPI-uPAR-überexprimierende OV-MZ-6#8-Zelllinien unterschieden sich im Tumorwachstum nicht signifikant von der vektortransfizierten OV-MZ-6#8-Zelllinie und der Wildtypzelllinie. Sowohl GPI-uPAR als auch suPAR wurden in erhöhter Konzentration in Tumorextrakten und im Blut der Mäuse detektiert.

Die Ergebnisse demonstrieren die Fähigkeit des suPAR, uPA von der Zelloberfläche abzufangen und damit das Ovarialkarzinomwachstum und die Tumorausbreitung *in vivo* signifikant zu reduzieren.

7. Literatur

- Albrecht, S., T. Luther, H. Grossmann, C. Flossel, M. Kotsch, and M. Muller. 1992. An ELISA for tissue factor using monoclonal antibodies. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 3:263-270
- Andreasen, P.A., A. Riccio, and K.G. Welinder. 1986. Plasminogen activator inhibitor type-1: reactive center and amino-terminal heterogeneity determined by protein and cDNA sequencing. *FEBS Lett.* 209:213-218
- Andreasen, P.A., L. Sottrup-Jensen, L. Kjøller, A. Nykjær, S.K. Moestrup, C. Munch Petersen, and J. Gliemann. 1994. Receptor-mediated endocytosis of plasminogen activators and activator/inhibitor complexes. *FEBS Lett.* 338:293-245
- Andreasen, P.A., L. Kjøller, L. Christensen, and M.J. Duffy. 1997. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review. *Int. J. Cancer* 72:1-22
- Andreasen, P.A., R. Egelund, and H.H. Petersen. 2000. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell. Mol. Life. Sci.* 57:25-40
- Appella, E. and F. Blasi. 1990. Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J.* 9:467-474
- Baker, E.A., F.G. Bergin, and D.J. Leaper. 2000. Plasminogen activator system, vascular endothelial growth factor, and colorectal cancer progression. *Mol. Pathol.* 53:307-312
- Behrendt, N., E. Rønne, M. Ploug, T. Petri, D. Løber, L.S. Nielsen, W. Schleuning, F. Blasi, E. Appella, and K. Danø. 1990. The human receptor for urokinase plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 265:6453-6460
- Behrendt, N., M. Ploug, L. Patthy, G. Houen, F. Blasi, and K. Danø. 1991. The ligand-binding domain of the cell surface receptor for urokinase-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 266:7842-7847
- Behrendt, N., E. Rønne, and K. Danø. 1996. Domain interplay in the urokinase receptor. *J. Biol. Chem.* 271:22885-22894
- Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7:1513-1523
- Blasi, F. 1988. Surface receptors for urokinase plasminogen activator. *Fibrinolysis* 2:73-84

- Blasi, F. 1999. The urokinase receptor. A cell surface, regulated chemokine. *APMIS*. 107:96-101
- Bohuslav, J., V. Horejsi, C. Hansmann, J. Stöckl, U.H. Weidle, O. Majdic, I. Bartke, W. Knapp, and H. Stockinger. 1995. Urokinase plasminogen activator receptor, β 2-integrin, and src-kinases within a single receptor complex of human monocytes. *J. Exp. Med.* 181:1381-1390
- Bordier, C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256:1604-1607
- Boyd, J. 1998. Molecular genetics of hereditary ovarian cancer. *Oncology (Huntingt.)* 12:399-406
- Brunner, G., C.N. Metz, H. Nguyen, J. Gabilove, S.R. Patel, M.A. Davitz, D.B. Rifkin, and E.L. Wilson. 1994. An endogenous glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D releases basic fibroblast growth factor-heparan sulfate proteoglycan complexes from human bone marrow cultures. *Blood* 83:2115-2125
- Brüner, N., H.J. Nielsen, M. Hamers, I.J. Christensen, O. Thorlacius-Ussing, and R.W. Stephens. 1999. The urokinase plasminogen activator receptor in blood from healthy individuals and patients with cancer. *APMIS* 107:160-167
- Bullock, W.O. 1987. XL1-Blue. *Biotechniques* 5:376-378
- Bürge, M., M. Koppitz, C. Riemer, H. Kessler, B. König, U.H. Weidle, J. Kellermann, F. Lottspeich, H. Graeff, M. Schmitt, L. Goretzki, U. Reuning, O. Wilhelm, and V. Magdolen. 1997. Inhibition of the interaction of urokinase (uPA) with its receptor (uPAR, CD87) by synthetic peptides. *Biol. Chem.* 378:231-237
- Chang, A.W., A. Kuo, E.S. Barnathan, and S.S. Okada. 1998. Urokinase receptor-dependent upregulation of smooth muscle cell adhesion to vitronectin by urokinase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:1855-1860
- Chavakis, T., S.M. Kanse, B. Yutzy, H.R. Lijnen, and K.T. Preissner. 1998. Vitronectin concentrates proteolytic activity on the cell surface and extracellular matrix by trapping soluble urokinase receptor-urokinase complexes. *Blood* 7:1-9
- Chomczynski P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanat-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159
- Chuchulowski, N., M. Schmitt, P. Rettenberger, E. Schüren, N. Moniwa, L. Goretzki, O. Wilhelm, U. Weidle, F. Jänicke, and H. Graeff. 1992. Flow cytometric analysis of the urokinase receptor (uPAR) on tumor cells by fluorescent uPA-ligand or monoclonal antibody #3936. *Fibrinolysis (6 Supp.)* 4:95-102

- Crowly, C.W., R.L. Cohen, G. Liu, M.A. Shuman, and A.D. Levinson. 1993. Prevention of metastasis by inhibition of the urokinase receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5021-5025
- Cubellis, M.V., T.C. Wun, and F. Blasi. 1990. Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *EMBO J.* 9:1079-1085
- Danø, K., P.A. Andreasen, J. Grøndahl-Hansen, P. Kristensen, L.S. Nielsen, and L. Skriver. 1985. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.* 44:139-266
- Danø, K., M. Behrendt, N. Brønner, V. Ellis, M. Ploug, and C. Pyke. 1994. The urokinase receptor protein structure and role of plasminogen activator and cancer invasion. *Fibrinolysis* 8:189-202
- Danø, K., J. Rømer, B.S. Nielsen, S. Bjørn, C. Pyke, J. Rygaard, and L.R. Lund. 1999. Cancer invasion and tissue remodeling – cooperation of protease systems and cell types. *APMIS* 107:120-127
- della Porta, P., R. Soeltl, H.W. Krell, K. Collins, M. O'Donoghue, M. Schmitt, and A. Krüger. 1999. Combined treatment with serine protease inhibitor aprotinin and matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) does not prevent invasion of human esophageal and ovarian carcinoma cells in vivo. *Anticancer Res.* 19:3809-3818
- Deng, G., D.A. Waltz, R. Navaneetha, R.J. Drummond, S. Rosenberg, and H.A. Chapman. 1994. Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin. *J. Biol. Chem.* 169:32380-32388
- Deng, G., A. Curriden, A. Wang, S. Rosenberg, and D.J. Loskutoff. 1996. Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? *J. Cell Biol.* 134:1563-1571
- Declerck, P.J., M. De Mol, M.-C. Alessi, S. Baudner, E.-P. Paques, K.T. Preissner, G. Müller-Berghaus, and D. Collen. 1988. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor-1 binding protein from human plasma. Identification as a multimeric form of S protein (vitronectin). *J. Biol. Chem.* 263:15454-15461
- Dewerchin, M., A. Van Nufelen, G. Wallays, A. Bouche, L. Moons, P. Carmeliet, R.C. Mulligan, and D. Collen. 1996. Generation and characterisation of urokinase receptor-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 97:870-878
- Dougan, G. and M. Kehoe. 1984. *Meth. Microbiol.* 17:233-258
- Duffy, M.J., D. Reilley, C. O'Sullivan, N. O'Higgins, J.N. Fennelly, and P. Andreasen. 1990. Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res.* 50:6827-6829

- Duggan, C., T. Maquire, E. McDermott, N. O'Higgins, J.J. Fenelly, and M.J. Duffy. 1995. Urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor in breast cancer. *Int. J. Cancer* 61:579-600
- Duggan, C., S. Kennedy, D. Kramer, C. Barnes, P. Elvin, E. McDermott, N. O'Higgins, and M.J. Duffy. 1997. Plasminogen activator inhibitor type 2 in breast cancer. *Br. J. Cancer* 76:622-635
- Dumler, I., T. Petri, and W.D. Schleuning. 1993. Interaction of urokinase-type plasminogen activator (u-PA) with its cellular receptor (u-PAR) induces phosphorylation on tyrosine of a 38 kDa protein. *FEBS Lett.* 322:37-40
- Dumler, I., T. Petri, and W.D. Schleuning. 1994. Induction of *c-fos* in human ovarian cancer cells. *FEBS Lett.* 343:103-106
- Dumler, I., A. Weis, O.A. Mayboroda, C. Maasch, U. Jerke, H. Haller, and D.C. Gulba. 1998. The JAK/STAT pathway and urokinase receptor signaling in human vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 273:315-321
- Dumler, I., A. Kopmann, A. Weis, O.A. Mayboroda, K. Wagner, D.C. Gulba, and H. Haller. 1999. Urokinase activates the Jak/Stat signal transduction pathway in human vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:290-297
- Ehlers, M.R., S.L. Schwager, A.J. Chubb, R.R. Scholle, W.F. Brandt, and J.F. Riordan. 1997. Proteolytic release of membrane proteins: Studies on a membrane-protein-solubilizing activity in CHO cells. *Immunopharmacology* 36:271-278
- Ellis, V. 1996. Functional analysis of the cellular receptor for urokinase in plasminogen activation. Receptor binding has no influence on the zymogenic nature of pro-urokinase. *J. Biol. Chem.* 271:14779-14784
- Erickson, L.A., M.H. Ginsberg, and D.H. Loskutoff. 1984. Detection and partial characterization of an inhibitor of plasminogen activator in human platelets. *J. Clin. Invest.* 74:1465-1472
- Erickson, L.A., C.M. Hekman, and D.H. Loskutoff. 1985. The primary plasminogen activator inhibitors in endothelial cells, platelets, serum and plasma are immunologically related. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8710-8714
- Estreicher, A., A. Wohlwend, D. Belin, W.D. Schleuning, and J.D. Vassalli. 1989. Characterization of the cellular binding site for the urokinase-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 264:1180-1189
- Fazioli, F., M. Resnati, N. Sidenius, Y. Higashimoto, E. Appella, and F. Blasi. 1997. A urokinase-sensitive region of the human urokinase receptor is responsible for its chemotactic activity. *EMBO J.* 16:7279-7286

- Félez, J. 1998. Plasminogen binding to cell surfaces. Invited Review. *Fibrin. Proteol.* 12:183-189
- Fischer, K., V. Lutz, O. Wilhelm, M. Schmitt, H. Graeff, P. Heiss, T. Nishiguchi, N. Harbeck, H. Kessler, T. Luther, V. Magdolen, and U. Reuning. 1998. Urokinase induces proliferation of human ovarian cancer cells: characterization of structural elements required for growth factor function. *FEBS Lett.* 438:101-105
- Fletcher, C.M., R.A. Harrison, P.J. Lachmann, and D. Neuhaus. 1994. Structure of a soluble glycosylated form of the human complement regulatory protein CD95. *Structure* 2:185-199
- Foekens, J.A., M. Schmitt, W.L.J. van Putten, H.A. Peters, M. Bontebal, F. Jänicke, and J.G.M. Klijn. 1992. Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients. *Cancer Res.* 52:6101-6105
- Foekens, J.A., M. Schmitt, W.L.J. van Putten, H.A. Peters, F. Jänicke, and J.G.M. Klijn. 1994. Plasminogen activator inhibitor-1 and breast cancer metastasis. *J. Clin. Oncol.* 12:1648-1658
- Fowler, B., N. Mackmann, R.J. Palmer, and L.A. Miles. 1998. Binding of human single chain urokinase to chinese hamster ovary cells and cloning of hamster u-PAR. *Thromb. Haemost.* 80:148-154
- Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* 1:27-31
- Ganesh, S., C.F.M. Sier, M.H. Heerding, G. Griffioen, C. Lamers, and H.W. Verspaget. 1994. Urokinase receptor and colorectal cancer survival. *Lancet* 344:401-402
- Gårdsvoll, H., K. Danø, and M. Ploug. 1999. Mapping part of the functional epitope for ligand binding on the receptor for urokinase-type plasminogen activator by site directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 274:37995-38003
- Ghiso, J.A., K. Kovalski, and L. Ossowski. 1999. Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. *J. Cell Biol.* 147:89-104
- Goldman, C.K., R.L. Kendall, and G. Cabrera. 1998. Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8795-8800
- Gorman, C.M., G.T. Merlino, M.C. Willingham, I. Pastan, and B.H. Howard. 1982. The rous-sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6777-6781

- Grondahl-Hansen, J., H.A. Peters, W.L. Van Putten, M.P. Look, H. Pappot, E. Rønne, K. Danø, J.G. Klijn, N. Brüner, and J.A. Foekens. 1995. Prognostic significance of the receptor for urokinase plasminogen activator in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 1:1079-1086
- Goretzki, L., M. Schmitt, K. Mann, J. Calvete, N. Chuchulowski, M. Kramer, W.A. Günzler, F. Jänicke, and H. Graeff. 1992. Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. *FEBS Lett.* 297:112-118
- Gyetko, M.R., R.G. Sitrin, J.A. Fuller, R.F. Todd III, H. Petty, and T.J. Standiford. 1995. Function of the urokinase receptor (CD87) in neutrophil chemotaxis. *J. Leukoc. Biol.* 58: 533-538
- Heiss, M.M., H. Allgayer, K.U. Gruetzner, I. Finke, R. Babic, K.W. Jauch, and F.W. Schildberg. 1995. Individual development and u-PA receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer. *Nature Med.* 1:1035-1039
- Herz, J., D.E. Clouthier, and R.E. Hammer. 1992. LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* 71:411-421
- Hildenbrandt, R., W. Glienke, V. Magdolen, H. Graeff, H.J. Stutte, and M. Schmitt. 1998. Urokinase receptor localization in breast cancer and benign lesions assessed by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histochem. Cell Biol.* 110:27-32
- Holst-Hansen, C., B. Johannessen, G. Høyer-Hansen, J. Rømer, V. Ellis, and N. Brüner. 1996. Urokinase-type plasminogen activation in three human breast cancer cell lines correlates with their *in vitro* invasiveness. *Clin. Exp. Metastasis* 14:297-307
- Høyer-Hansen, G., N. Behrendt, M. Ploug, K. Danø and K.T. Preissner. 1997. The intact urokinase receptor is required for efficient vitronectin binding: receptor cleavage prevents ligand interaction. *FEBS Lett.* 420:79-85
- Jardi, M., J. Inglés-Esteve, M. Burgal, C. Azqueta, F. Velasco, C. López-Pedreira, L.A. Miles, and J. Felez. 1996. Distinct patterns of urokinase receptor (uPAR) expression by leucemic cells and peripheral blood cells. *Thromb. Haemost.* 76:1009-1019
- Jänicke, F., M. Schmitt, and H. Graeff. 1991. Clinical relevance of the urokinase-type and the tissue-type plasminogen activators and of their inhibitor PAI-1 in breast cancer. *Sem. Thromb. Hemost.* 17:303-312
- Kanse, S.M., C. Kost, O.G. Wilhelm, P.A. Andreasen, and K.T. Preissner. 1996. The urokinase receptor is a major vitronectin-binding protein on endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 244:344-353

- Karikó, K., A. Kuo, D. Boyd, S.S. Okada, D.B. Cines, and E.S. Barnathan. 1993. Overexpression of urokinase receptor increases matrix invasion without altering cell migration in a human osteosarcoma cell line. *Cancer Res.* 53:3109-3117
- Kawano, T., K. Morimoto, and Y. Uemura. 1968. Urokinase inhibitor in human placenta. *Nature* 217:253-254
- Kobayashi, H., M. Schmitt, L. Goretzki, N. Chuchulowski, J. Calvete, M. Kramer, W.A. Günzler, F. Jänicke, and H. Graeff. 1991. Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA). *J. Biol. Chem.* 266:5147-5152
- Kobayashi, H., H. Ohi, H. Shinohara, M. Sugimura, M. Fujie, T. Terao, M. Schmitt, L. Goretzki, N. Chuchulowski, and H. Graeff. 1993. Saturation of tumor cell surface receptors for the urokinase-type plasminogen activator by amino-terminal fragment and subsequent effect on reconstituted basement membranes invasion. *Br. J. Cancer* 67:537-544
- Kobayashi, H., D. Sugido, M.Y. She, H. Ohi, Y. Hirashima, H. Shinohara, M. Fujie, K. Shibata, and T. Terao. 1998. A bifunctional hybrid molecule of the amino-terminal fragment of urokinase and domain II of bikunin efficiently inhibits tumor cell invasion and metastasis. *Eur. J. Biochem.* 253:817-826
- Kotzsch, M., T. Luther, N. Harbeck, D. Ockert, V. Lutz, F. Noack, D. Grossmann, S. Albrecht, M.D. Kramer, A. Loßnitzer, M. Grosser, M. Schmitt, and V. Magdolen. 2000. New ELISA for quantification of human urokinase receptor (CD87) in cancer. *Int. J. Oncol.* 17:827-834
- Krätschmar, J., B. Haendler, S. Kojima, D.B. Rifkin, and W.D. Schleuning. 1993. Bovine urokinase-type plasminogen activator and its receptor: cloning and introduction by retinoic acid. *Gene* 125:177-183
- Kristensen P., J. Ericson, F. Blasi, and K. Danø. 1991. Two alternative spliced mouse urokinase receptor mRNAs with different histological localization in the gastrointestinal tract. *J. Cell Biol.* 115:1763-1771
- Kroon, M.E., P. Koolwijk, H. van Goor, U.H. Weidle, A. Collen, G. van der Pluijm, and V.W. van Hinsbergh. 1999. Role and localization of urokinase receptor in the formation of new microvascular structures in fibrin matrices. *Am. J. Pathol.* 154:1731-1742
- Krüger, A., R. Soeltl, V. Lutz, O.G. Wilhelm, V. Magdolen, E.E. Rojo, P.A. Hantzopoulos, H. Graeff, B. Gänsbacher, and M. Schmitt. 2000. Reduction of breast carcinoma tumor growth and lung colonization by overexpression of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87). *Cancer Gene Ther.* 7:292-299
- Kruithof, E.K.O., J.-D. Vassalli, W.D. Schleuning, R.J. Mattaliano, and F. Bachmann. 1986. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor from the histiocytic lymphoma cell line U-937. *J. Biol. Chem.* 261:11207-11213

- Küng, M., P. Bütikofer, U. Brodbeck, and B. Stadelmann. 1997. Expression of intracellular and GPI-anchored forms of GPI-specific phospholipase D in COS-1 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1357:329-338
- Kuhn, W., B. Schmalfeldt, U. Reuning, L. Pache, U. Berger, K. Ulm, N. Harbeck, K. Späthe, P. Dettmar, H. Höfler, F. Jänicke, M. Schmitt, and H. Graeff. 1999. Prognostic significance of urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc. *Brit. J. Cancer* 79:1746-1751
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lau, H.K., and M. Kim. 1994. Soluble urokinase receptor from fibrosarcoma HT-1080 cells. *Blood Coagul. Fibrinol.* 5:473-478
- Liotta, L.A., P.S. Steeg, and W.G. Stettler-Stevenson. 1991. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64:327-336
- Loskutoff, D. J., S.C. Curriden, G. Hu, and G. Deng. 1999. Regulation of cell adhesion by PAI-1. *APMIS* 107:54-61
- Low, M.G., and K.-S. Huang. 1991. Factors affecting the ability of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D to degrade the membrane anchors of cell surface proteins. *Biochem. J.* 279:483-493
- Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurements with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275
- Lu, H., P. Yeh, J.D. Guitton, C. Malibat, F. Desanlis, I. Maury, Y. Legrand, J. Soria, and C. Soria. 1994. Blockage of the urokinase receptor on cell surface, construction and characterization of a hybrid protein consisting of the N-terminal fragment of human urokinase and human albumin. *FEBS Lett.* 356:56-59
- Luther, T., V. Magdolen, S. Albrecht, M. Kasper, C. Riemer, H. Kessler, H. Graeff, M. Müller, and M. Schmitt. 1997. Epitope-mapped monoclonal antibodies as tools for functional and morphological analyses of the human urokinase receptor in tumor tissues. *Am. J. Pathol.* 150:1231-1244
- Mazar, A.P. 2001. The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) as a target for the diagnosis and therapy of cancer. *Anticancer drugs* 12:387-400
- Magdolen, V., P. Rettenberger, A. Lopens, H. Ohi, F. Lottspeich, J. Kellermann, S. Creutzburg, L. Goretzki, U.H. Weidle, O. Wilhelm, M. Schmitt, and H. Graeff. 1995. Expression of the human uPA receptor (uPAR) in *E. coli* and CHO cells: Purification of the recombinant proteins and generation of polyclonal antibodies in chicken. *Electrophoresis* 16:813-816

- Magdolen, V., P. Rettenberger, M. Koppitz, L. Goretzki, H. Kessler, U.H. Weidle, B. König and H. Graeff. 1996. Systematic mutational analysis of the receptor-binding region of the human urokinase-type plasminogen activator. *Eur. J. Biochem.* 237:743-751
- Magdolen, V., S. Albrecht, M. Kotzsch, C. Haller, M. Bürgle, U. Jakob, M. Großer, H. Kessler, H. Graeff, M. Müller, M. Schmitt, and T. Luther. 1998. Immunological and functional analyses of the extracellular domain of human tissue factor. *Biol. Chem.* 379:157-165
- May, A., S.M. Kanse, L.R. Lund, R.H. Gisler, B.A. Imhof, and K.T. Preissner. 1998. Urokinase receptor (CD87) regulates leucocyte recruitment via β_2 integrins in vivo. *J. Exp. Med.* 188:1029-1037
- Mazzieri, R., L. Maseiro, L. Zanetta, S. Monea, M. Onisto, S. Garbisa, and P. Mignatti. 1997. Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J.* 16:2319-2332
- Metz, C.N., G. Brunner, N.H. Chio-Muira, H. Nguyen, J. Gabrilove, I.W. Caras, N. Altszuler, D.B. Rifkin, E.L. Wilson, and M.A. Davitz. 1994. Release of GPI-anchored membrane proteins by a cell-associated GPI-specific phospholipase D. *EMBO J.* 13:1741-1751
- Mignatti, P., E. Robbins, and D.B. Rifkin. 1986. Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. *Cell* 47:487-498
- Mignatti, P., and D.B. Rifkin. 1993. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Reviews* 73:161-195
- Möbus, V., C.D. Gerharz, U. Press, T. Beck, W. Mellin, K. Pollow, P.G. Knapstein, and R. Kreienberg. 1992. Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* 52:76-84
- Mohan, P.M., S.S. Lakka, S. Mohanam, Y. Kin, R. Sawaya, A.P. Kyritsis, G.L. Nicolson, and J.S. Rao. 1999. Downregulation of the urokinase-type plasminogen activator receptor, through inhibition of translation by antisense oligonucleotide suppresses invasion of human glioblastoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 17:617-621
- Møller, L.B., J. Pöllänen, E. Rønne, E. Pedersen, and F. Blasi. 1993. N-linked glycosylation of the ligand binding domain of the human urokinase receptor contributes to the affinity for its ligand. *J. Biol. Chem.* 268:11152-11159
- Mustjoki, S., N. Sidenius, C.F.M. Sier, F. Blasi, E. Elonen, R. Alitalo, and A. Vaheri. 2000. Soluble urokinase receptor levels correlate with number of circulating tumor cells in acute myeloid leukemia and decrease rapidly during chemotherapy. *Cancer Res.* 60:7126-7123

- Nekarda, H., J. Siewert, M. Schmitt, and K. Ulm. 1994. Tumor-associated proteolytic factors u-PA and PAI-1 and survival in totally gastric cancer. *Lancet* 343:117-119
- Nykjaer, A., E. Petersen, C.M. Møller, P.H. Jensen, S.K. Moestrup, T.L. Holtet, M. Etzerodt, H.C. Thorgersen, M. Much, P.A. Andreasen, and J. Gliemann. 1992. Purified α 2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein binds urokinase plasminogen activator inhibitor type-1 complex. *J. Biol. Chem.* 276:14543-14546
- Nykjaer, A., M. Conese, E.I. Christensen, D. Olson, O. Cremora, J. Gliemann, and F. Blasi. 1997. Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *EMBO J.* 16:2610-2620
- Ossowski, L., and E. Reich. 1983. Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis. *Cell* 35:611-619
- Ossowski, L., and J. A. Aghuirre-Ghiso. 2000. Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr. Opin. in Cell Biol.* 12:613-620
- Pannekoek, H., H. Veerman, H. Lambers, P. Diergaarse, C.L. Verweij, A.J. Van Zonneveld, and J.A. Van Mourik. 1986. Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI): A new member of the serpin gene family. *EMBO J.* 5:2539-2544
- Pedersen, N., M. Schmitt, E. Rønne, M.I. Nicoletti, G. Høyer-Hansen, M. Conese, R. Giavazzi, K. Danø, W. Kuhn, F. Jänicke, and F. Blasi. 1993. A ligand-free, soluble urokinase receptor is present in the ascitic fluid from patients with ovarian cancer. *J. Clin. Invest.* 92:2160-2167
- Ploug, M., E. Rønne, N. Behrendt, A.L. Jensen, F. Blasi, and K. Danø. 1991a. Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.* 266:1926-1933
- Ploug, M., N. Behrendt, D. Løber, and K. Danø. 1991b. Protein structure and membrane anchorage of the cellular receptor for urokinase-type plasminogen activator. *Sem. Thromb. Hemost.* 17:183-193
- Ploug, M., H. Rahbek-Nielsen, V. Ellis, P. Roepstorff, and K. Danø. 1995. Chemical modification of the urokinase-type plasminogen activator and its receptor using tetranitromethane. Evidence for the involvement of specific tyrosine residues in both molecules during receptor-ligand interaction. *Biochemistry* 34:12524-12534
- Ploug, M., H. Rahbek-Nielsen, P.F. Nielsen, P. Roepstorff, and K. Danø. 1998a. Glycosylation profile of a recombinant urokinase-type plasminogen activator receptor expressed in chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 273:13933-13943

- Ploug, M. 1998b. Identification of specific sites involved in ligand binding by photoaffinity labeling of the receptor for the urokinase-type plasminogen activator. Residues located at equivalent positions in uPAR domains I and III participate in the assembly of a composite ligand-binding site. *Biochemistry* 37:16494-16505
- Pöllänen, J. 1993. The N-terminal domain of human urokinase receptor contains two distinct regions critical for ligand recognition. *Blood* 82:2719-2729
- Preissner K.T., S.M. Kanse, and A.E. May. 2000. Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:621-8.
- Pyke, C., J. Eriksen, H. Solberg, B. Schnack Nielsen, P. Kristensen, L.R. Lund, and K. Danø. 1993. An alternatively spliced variant of mRNA for the human receptor for urokinase plasminogen activator. *FEBS Lett.* 326:69-74
- Quattrone, A., G. Fibbi, E. Anichini, M. Pucci, A. Zamperini, S. Capaccioli, and M. Del Rosso. 1995. Reversion of the invasive phenotype of transformed human fibroblasts by anti-messenger oligonucleotide inhibition of urokinase receptor gene expression. *Cancer Res.* 55:90-95
- Quax, P.H.A., G.N.P. van Muijen, N. Pedersen, A.C.W. de Bart, Y. Schrauwen, G. Barlovatz-Meimon, F. Blasi, and J.H. Verheijen. 1992 The plasminogen activator system in extracellular matrix degradation. *Fibrinolysis (6 Suppl.)* 4:41-44
- Rabbani, S.A., J. Gladu, A.P. Mazar, J. Henkin, and D. Goltzman. 1997. Induction in human osteoblastic cells (SaOS2) of the early response genes fos, jun, and myc by the amino terminal fragment (ATF) of urokinase. *J. Cell Physiol.* 172:137-145
- Rabbani, S.A., P. Harakidas, D.J. Davidson, J. Henkin, and A.P. Mazar. 1995. Prevention of prostate cancer metastasis *in vivo* by a novel synthetic inhibitor of urokinase-type plasminogen activator (uPA). *Int. J. Cancer* 63:840-845
- Rabbani, S.A., N. Rajwans, A. Achbarou, K.K. Murthy, and D. Goltzmann. 1994. Isolation and characterization of multiple isoforms of the rat urokinase receptor in osteoblasts. *FEBS Lett.* 338:69-74
- Rabbani, S.A., J. Desjardins, A.W. Bell, D. Banville, A.P. Mazar, J. Henkin, and D. Goltzman. 1990. An aminoterminal fragment of urokinase isolated from a prostate cancer cell line (PC-3) is mitogenic for osteoblast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173:1058-1064
- Ragno, P., N. Montuori, and G. Rossi. 1995. Urokinase-type plasminogen activator/type-2 plasminogen-activator inhibitor complexes are not internalized upon binding to the urokinase-type plasminogen-activator receptor in THP-1 cells. Interaction of urokinase-type plasminogen-activator/type-2 plasminogen-activator inhibitor complexes with the cell surface. *Eur. J. Biochem.* 233:514-518

- Resnati, M., M. Guttinger, S. Valcamonica, N. Sidenius, F. Blasi, and F. Fazioli. 1996. Proteolytic cleavage of the urokinase receptor substitutes for the agonist-induced chemotactic effect. *EMBO J.* 15:1572-1582
- Rettenberger, P. 1996. Klonierung und Expression von Mutanten des humanen Plasminogenaktivators vom Urokinasetyp (uPA) und seines Rezeptors (uPAR) zur Analyse der uPA/uPAR-Interaction. Dissertation TU München
- Reuning, U., V. Magdolen, O. Wilhelm, K. Fischer, V. Lutz, H. Graeff, and M. Schmitt. 1998. Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (Review). *Int. J. Oncol.* 13:893-906
- Riitinen, L., P. Limongi, M.P. Crippa, M. Conese, L. Hernandez-Marrero, F. Fazioli, and F. Blasi. 1996. Removal of the domain D2 or D3 of the human urokinase receptor does not affect ligand affinity. *FEBS Lett.* 381:1-6
- Roldan, A.L., M.V. Cubellis, M.T. Mascucci, N. Behrendt, L.R. Lund, K. Danø, E. Appella, and F. Blasi. 1990. Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J.* 9:467-474
- Rønne, E., H. Pappot, J. Grøndahl-Hansen, G. Høyer-Hansen, N.E. Hansen, and K. Danø. 1995. The receptor for urokinase plasminogen activator is present in plasma from healthy donors and elevated in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Brit. J. Haematol.* 89:576-581
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467
- Schmalfeldt, B., W. Kuhn, U. Reuning, L. Pache, P. Dettmar, M. Schmitt, F. Jänicke, H. Höfler, and H. Graeff. 1995. Primary tumor and metastasis in ovarian cancer differ in their content of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and inhibitors types 1 and 2. *Cancer Res.* 55:3958-3963
- Schmidt-Matthiesen, H. 1986. Spezielle gynäkologische Onkologie II. Verlag Urban & Schwarzenberg, München. 2. Auflage
- Schmitt, M., F. Jänicke, and H. Graeff. 1992. Tumor-associated proteases. *Fibrinolysis (6 Suppl.)* 4:3-26
- Schmitt, M., N. Harbeck, C. Thomssen, O. Wilhelm, V. Magdolen, U. Reuning, K. Ulm, H. Höfler, F. Jänicke, and H. Graeff. 1997. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: Prognostic relevance and target for therapy. *Thromb. Haemost.* 78:285-296

- Schmitt, M., O.G. Wilhelm, U. Reuning, A. Krüger, N. Harbeck, E. Lengyel, H. Graeff, B. Gänsbacher, H. Kessler, M. Bürgle, J. Stürzebecher, S. Sperl, and V. Magdolen. 2000. The urokinase plasminogen activator system as a novel target for tumour therapy. *Fibrin. & Proteol.* 14:114-132
- Seiki, M. 1999. Membrane-type matrix-metalloproteinases. *APMIS* 107:111-116
- Sier, C.F.M., R. Stevens, J. Bizik, A. Mariani, M. Bassan, N. Pedersen, L. Frigerio, A. Ferrari, K. Danø, N. Brünner, and F. Blasi. 1998. The level of urokinase-type plasminogen activator receptor is increased in serum of ovarian cancer. *Cancer Res.* 58:1843-1849
- Sidenius, N., and F. Blasi. 2000. Domain I of the urokinase receptor (uPAR) is required for uPAR-mediated cell binding to vitronectin. *FEBS Lett.* 470:40-46
- Sidenius, N., C.F. Sier, and F. Blasi. 2000. Shedding and cleavage of urokinase receptor (uPAR): identification and characterization of uPAR fragments in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* 475:52-56
- Solberg, H., D. Løber, J. Eriksen, M. Ploug, E. Rønne, N. Behrendt, K. Danø, and G. Høyer-Hansen. 1992. Identification and characterization of the murine cell surface receptor for the urokinase-type plasminogen activator. *Eur. J. Biochem.* 205:451-458
- Spraggon, G., C. Phillips, U.K. Nowack, C.P. Ponting, D. Saunders, C.M. Dobson, D.I. Stuart, and E.Y. Jones. 1995. The crystal structure of the catalytic domain of human urokinase-type plasminogen activator. *Structure* 3:681-691
- Steffanson S., and D.A. Lawrence. 1996. The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha(v)beta(3) binding of vitronectin. *Nature* 383:441-443
- Stephens, R.W., H.J. Nielsen, I.J. Christensen, O. Thorlacius-Ussing, K. Danø, and N. Brünner. 1998. Soluble urokinase receptor in preoperative plasma is an independent prognostic variable in patients with colorectal cancer. *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* 39:#325
- Stephens, R.W., H.J. Nielsen, I.J. Christensen, O. Thorlacius-Ussing, S. Sorensen, K. Danø, and N. Brünner. 1999. Plasma urokinase receptor levels in patients with colorectal cancer: Relationship to prognosis. *J. Natl. Cancer Inst.* 19:869-874
- Stoppelli, M.P., A. Corti, A. Soffientini, G. Cassani, F. Blasi, and R.K. Assoian. 1985. Differentiation-enhanced binding of the amino-terminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4939-4943
- Strömblad S., and D.A. Cherch. 1996. Cell adhesion and angiogenesis. *Trends Cell Biol.* 6:462-468

- Tautz, D., and M. Renz. 1983. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal. Biochem.* 132:14-19
- Tecimer, C., D.L. Doering, L.J. Goldsmith, J.S. Meyer, G. Abdulhay, and J.L. Wittliff. 2000. Clinical relevance of urokinase-type plasminogen activator, its receptor and inhibitor type 1 in ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 10:372-381.
- Türkmen, B., M. Schmitt, B. Schmalfeldt, P. Trommler, W. Hell, S. Creutzburg, H. Graeff, and V. Magdolen. 1997. Mutational analysis of the genes encoding urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor (PAI-1) in advanced ovarian cancer. *Electrophoresis* 18:686-689
- van Meijer, M., and H. Pannekoek. 1995. Structure of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and its function in fibrinolysis: an update. Review. *Fibrinolysis* 9:263-276
- Vassalli, J.D., D. Baccino, and D.A. Belin. 1985. A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *J. Cell Biol.* 53:2553-2559
- Vassalli, J.D., A.P. Sappino, and D. Belin. 1991. The plasminogen activator/plasmin system. *J. Clin. Invest.* 88:1067-1072
- Wahlberg, K., G. Hoyer-Hansen, and B. Casslén. 1998. Soluble receptor for plasminogen activator in both full-length and a cleaved form is present in high concentration in cystic fluid from ovarian cancer. *Cancer Res.* 58:3294-3298
- Waltz D.A., L.Z. Sailor, and H.A. Chapman. 1993. Cytokines induce urokinase-dependent adhesion of human myeloid cells, a regulatory role for plasminogen activator inhibitors. *J. Clin. Invest.* 91:1541-1552
- Waltz, D.A., and H.A. Chapman. 1994. Reversible cellular adhesion to vitronectin linked to urokinase receptor occupancy. *J. Biol. Chem.* 269:14746-14750
- Wang, Y. 2001. The role and regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor gene expression in cancer invasion and metastasis. *Med. Res. Rev.* 21:146-170
- Wei, Y., M. Lukashev, D.I. Simon, S.C. Bodary, S. Rosenberg, M.V. Doyle, and H.A. Chapman. 1996. Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science* 273: 1551-1555
- Wilhelm, O., R. Hafter, E. Coppenrath, M.A. Pflanz, M. Schmitt, R. Babic, R. Linke, W. Gössner, and H. Graeff. 1988. Fibrin-fibronectin compounds in human ovarian tumor ascites and their possible relation to the tumor stroma. *Cancer Res.* 48:3507-3514
- Wilhelm, O., R. Hafter, A. Henschen, M. Schmitt, and H. Graeff. 1990. Role of plasmin in the degradation of the stroma-derived fibrin in human ovarian carcinoma. *Blood* 8:1673-1678

- Wilhelm, O., U. Weidle, S. Höhl, P. Rettenberger, M. Schmitt, and H. Graeff. 1994. Recombinant soluble urokinase receptor as a scavenger for urokinase-type plasminogen activator (uPA). Inhibition of proliferation and invasion of ovarian cancer cells. *FEBS Lett.* 337:131-134
- Wilhelm, O., M. Schmitt, S. Höhl, R. Senekowitsch, and H. Graeff. 1995. Antisense inhibition of urokinase reduces spread of human ovarian cancer in mice. *Clin. Exp. Metastasis* 13:296-302
- Wilhelm O.G., S. Wilhelm, G.M. Escott, V. Lutz, V. Magdolen, M. Schmitt, D.B. Rifkin, E.L. Wilson, H. Graeff, and G. Brunner. 1999. Cellular glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D regulates urokinase receptor shedding and cell surface expression. *J. Cell. Physiol.* 180:225-235
- Will, C., O. Wilhelm, S. Höhl, V. Möbus, U. Weidle, R. Kreienberg, F. Jänicke, M. Schmitt, and H. Graeff. 1994. Expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR) in human ovarian cancer cells and in vitro invasion capacity. *Int. J. Oncol.* 5:753-761
- Williams, J.R.B. 1951. The fibrinolytic activity of urine. *Br. J. Exp. Pathol.* 32:530-539
- Xing, R.H., and S.A. Rabbani. 1996. Overexpression of urokinase receptor in breast cancer cells results in increased tumor invasion, growth and metastasis. *Int. J. Cancer* 67:423-429
- Xing, R.H., A. Mazanar, J. Henkin, and S.A. Rabbani. 1997. Prevention of breast cancer growth, invasion, and metastasis by antiestrogen tamoxifen alone or in combination with urokinase inhibitor B-428. *Cancer Res.* 57:3585-3593
- Yamamoto, T., B. de Crombrughe, and I. Pastan. 1980. Identification of a functional promoter in the long terminal repeat of rous sarcoma virus. *Cell* 22:787-797
- Yeh, E.T.H., and W.F. Rosse. 1994. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the glycosylphosphatidyl anchor. *J. Clin. Invest.* 93:2305-2308
- Zagursky, R.J., and M.L. Berman. 1984. Cloning vectors that yield high levels of single-stranded DNA for rapid DNA sequencing. *Gene* 27:183-191

8. Lebenslauf

Persönliche Daten :

Name : Verena Lutz
Geburtsdatum/ - Ort : 18.11.1969, Villingen-Schwenningen
Eltern : Dr. Hans-Dieter Lutz, Wirtschaftsprüfer
Sigrid Lutz, geb. Haigis

Schulbildung :

1976 - 1980 Besuch der Klosterring Grund - und Hauptschule, Villingen-Schwenningen
1980 - 1986 Besuch des Gymnasiums am Romäusring, Villingen-Schwenningen
1986 - 1989 Besuch des Wirtschaftsgymnasiums, Villingen-Schwenningen
Abschluß : Allg. Hochschulreife

Hochschulausbildung :

1989 - 1994 Studium der Molekularbiologie an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau
Studienschwerpunkte :
Molekularbiologie, Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und Pharmazeutische Biologie
1995 Diplom der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau in den Fächern Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und Pharmazeutische Biologie
1995 Diplomarbeit am Biochemischen Institut der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau bei Prof. Dr. J. Schröder
Thema : Cytochrom P450 Flavonoid 3',5'-Hydroxylase - Funktionelle heterologe Expression in *Escherichia coli* als translationale Fusion mit der P450-Reduktase aus *Catharanthus roseus*

Promotion :

seit 1996 Anfertigung der Dissertation im Rahmen der Klinischen Forschergruppe (Leiter: Prof. Dr. H. Graeff und Prof. Dr. M. Schmitt) an der Frauenklinik der TU-München, Klinikum rechts der Isar, München

Berufspraxis :

seit 1.8.1999 Marketing- und Clinical Operations Manager-Tätigkeit in der Integrated Health Care Solutions-Oncology Gruppierung der Firma Roche Diagnostics GmbH, Penzberg.

Liste der Veröffentlichungen

- Jäger, W., B. Haase, **V. Lutz**, und F.W. Herberg. 1997. Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) mit SPR-Biosensortechnologie. *Biospektrum* 4:82-84
- Fischer, K., **V. Lutz**, O. Wilhelm, M. Schmitt, H. Graeff, P. Heiss, T. Nishiguchi, N. Harbeck, H. Kessler, T. Luther, V. Magdolen, and U. Reuning. 1998. Urokinase induces proliferation of human ovarian cancer cells: characterization of structural elements required for growth factor function. *FEBS Lett.* 438:101-105.
- Reuning, U., V. Magdolen, O. Wilhelm, K. Fischer, **V. Lutz**, H. Graeff, and M. Schmitt. 1998. Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (Review). *Int. J. Oncology* 13:893-906
- Wilhelm O.G., S. Wilhelm, G.M. Escott, **V. Lutz**, V. Magdolen, M. Schmitt, D.B. Rifkin, E.L. Wilson, H. Graeff, and G. Brunner. 1999. Cellular glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D regulates urokinase receptor shedding and cell surface expression. *J. Cell. Physiol.* 180:225-235
- Krüger, A., R. Soeltl, **V. Lutz**, O.G. Wilhelm, V. Magdolen, E.E. Rojo, P.A. Hantzopoulos, H. Graeff, B. Gänsbacher, and M. Schmitt. 2000. Reduction of breast carcinoma tumor growth and lung colonization by overexpression of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87). *Cancer Gene Ther.* 7:292-299
- Kotzsch, M., T. Luther, N. Harbeck, D. Ockert, **V. Lutz**, F. Noack, D. Grossmann, S. Albrecht, M.D. Kramer, A. Loßnitzer, M. Grosser, M. Schmitt, and V. Magdolen. 2000. New ELISA for quantification of human urokinase receptor (CD87) in cancer. *Int. J. Oncol.* 17:827-834
- Lutz, V.**, U. Reuning, A. Krüger, T. Luther, S. Pildner von Steinburg, H. Graeff, M. Schmitt, O.G. Wilhelm and V. Magdolen. 2001. High level synthesis of recombinant soluble urokinase receptor (CD87) by ovarian cancer cells reduces intraperitoneal tumor growth and spread in nude mice. *Biol. Chem.* 382:789-798

Patentanmeldung :

- Wilhelm, O., V. Magdolen, J. Stürzebecher, J. Foekens, **V. Lutz**. 1999. Novel Urokinase Inhibitors. PCT EP99 05145

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei :

- Prof. Dr. Henner Graeff für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Frauenklinik und sein stetes Interesse am Fortgang der Doktorarbeit.
- Prof. Dr. Manfred Schmitt für die Vergabe des Themas, für hilfreiche Diskussionen, Anregungen und kritischen Betrachtungen der Ergebnisse.
- Prof. Dr. Horst Kessler für die Vertretung der Doktorarbeit an der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München.
- PD Dr. Olaf G. Wilhelm, Dr. Viktor Magdolen und Dr. Ute Reuning für die Einweisung in das Thema und den dazugehörigen Arbeitsmethoden; für die vielen fachkundigen Ratschläge, Diskussionen und ein besonderes Dankeschön geht an Dr. Viktor Magdolen und Dr. Ute Reuning für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.
- Dr. Achim Krüger für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Tierexperimente.
- Prof. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke, Nuklearmedizinisches Institut des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität, München, für die Bereitstellung der Einrichtungen für die Tierexperimente.
- Dr. Stephanie Pildner von Steinburg für viele höchst informative Gespräche über den klinischen Hintergrund der Arbeit.
- Dr. Thomas Luther für die Bestimmungen der TF und CEA Konzentrationen und auch der statistischen Analyse der Mausdaten.
- Allen Laborkolleginnen und -kollegen für die Anregungen, Unterstützung bei den Experimenten und besonders für das angenehme und oft heitere Arbeitsklima.
- Meinen Eltern für ihre stete Unterstützung und Rainer für seine unermüdliche Hilfe am Computer, Geduld und seinen Optimismus.
- Besonderer Dank gilt der Mildred-Scheel-Stiftung, welche die Arbeit finanziell unterstützte.