

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

**Invasionsparameter einer humanen Mammakarzinomzelllinie
unter Therapie
mit synthetischen Serin- und Metalloproteinaseinhibitoren und
dem transfizierten löslichen uPA-Rezeptor**

Rita Sötl

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

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

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. A. Krüger

2. Univ.-Prof. Dr. M. Schmitt

3. Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel

Die Dissertation wurde am 29.10.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin
am 05.05.2004 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung

2 Einleitung

- 2.1. Invasion und Metastasierung von Tumorzellen
- 2.2. Serinproteasen und ihre natürlichen und synthetischen Inhibitoren
- 2.3. Metalloproteinasen und ihre natürlichen und synthetischen Inhibitoren
- 2.4. Interaktion beider Proteasensysteme und mögliche Therapieoptionen
- 2.5. Zielsetzung

3 Material und Methoden

- 3.1. Tumorzellsysteme
 - 3.1.1. Zelllinien
 - 3.1.2. Zellkultur
- 3.2. Proteaseinhibitoren
- 3.3. Nachweis von Proteasenmenge und Proteasenaktivität
 - 3.3.1. Zymographie
 - 3.3.2. uPA- und uPAR-ELISA
 - 3.3.3. Caseinolytischer Plaque Assay
 - 3.3.4. Fluoreszenzassay zur Bestimmung der Proteasenaktivität lebender Zellen
- 3.4. Tumorwachstum und Metastasierung *in vivo*
 - 3.4.1. Mausstämme
 - 3.4.2. Experimentelle Lungen- und Lebermetastasierung
 - 3.4.3. Experimentelles orthotopes Tumorwachstum
 - 3.4.4. Behandlung von Mäusen mit synthetischen Proteaseinhibitoren
 - 3.4.5. X-Gal Organfärbung
- 3.5. Gewebeaufschluß und Proteinbestimmung
- 3.6. Statistische Analyse

4 Ergebnisse

- 4.1. Sekretion von löslichem uPAR von MDA-MB-231 BAG und den transfizierten Zelllinien suPAR3 und suPAR10
- 4.2. Einfluss synthetischer Inhibitoren auf die Proteasensekretion von MDA-MB-231 BAG, suPAR3 und suPAR10
 - 4.2.1. uPA Sekretion
 - 4.2.2. MMP-2 und MMP-9 Sekretion
- 4.3. Nachweis der Proteasenaktivität der humanen Mammakarzinomzelllinie durch proteolytische Assays an lebenden Zellen
 - 4.3.1. Reduzierte caseinolytische Aktivität der suPAR Zelllinien
 - 4.3.2. Hemmung der caseinolytische Aktivität mit Aprotinin
 - 4.3.3. Hemmung der Kollagenaseaktivität von Mammakarzinomzellen durch suPAR Überexpression und Behandlung mit synthetischen Inhibitoren
- 4.4. Ergebnisse des Metastasierungsmodells *in vivo*
 - 4.4.1. Reduktion der experimentelle Metastasierung von Mammakarzinomzellen durch Überexpression von suPAR
 - 4.4.2. Reduktion des orthotopen Wachstums von Mammakarzinomzellen durch Überexpression von suPAR
- 4.5. Induktion von Lebermetastasen *in vivo* durch Batimastatbehandlung

5 Diskussion

- 5.1. Inhibition von Tumorwachstum und Metastasierung durch den löslichen uPAR
- 5.2. Kombinationstherapie, zur gleichzeitigen Inhibition des uPA- und des MMP-Systems
- 5.3. Induktion von Lebermetastasen durch Batimastat
- 5.4. Ausblick

6 Literaturverzeichnis

7 Abbildungsverzeichnis

8 Abkürzungen

9 Danksagung

10 Lebenslauf

1 Zusammenfassung

Die Serinprotease Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA) und die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) spielen bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen eine wichtige Rolle. Durch die Bindung von uPA an den zellständigen uPAR wird zudem effektiv die Plasminogenaktivierung eingeleitet. Plasmin wiederum ist an der Aktivierung von MMPs beteiligt. Diese Proteolysekaskade spielt eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung, da Proliferation, Migration und der Abbau der Extrazellulären Matrix dadurch ausgelöst werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Nacktmausmodell das metastatische Potenzial humaner Mammakarzinomzellen dadurch zu vermindern, dass sie mit einer löslichen Variante des uPAR (suPAR) transfiziert wurden und somit große Mengen an suPAR sezernieren. Die Interaktion von uPA mit dem im Perizellularraum dann im Überschuss vorliegendem suPAR soll die Bindung von uPA an den zellständigen uPAR unterbinden. Dieser Eingriff in die proteolytische Kaskade sollte zudem durch zusätzliche Behandlung der Mäuse mit einem Breitband MMP Inhibitor (Batimastat) verstärkt werden. *In vitro* konnte an speziell entwickelten Lebendzell-Assays eine signifikante Reduktion der Proteasenaktivität durch suPAR und Batimastat nachgewiesen werden. In einem Nacktmausmodell wurden Primärtumorwachstum und Metastasierung von MDA-MB-231 BAG Mammakarzinomzellen und von einer suPAR stark überexprimierenden Variante davon getestet. Es zeigte sich eine bis zu 40 % reduzierte Primärtumorgröße und eine bis zu 75 % reduzierte Lungenmetastasierung der suPAR transfizierten Zellen im Vergleich zur parentalen Zelllinie. Dieser antimetastatische Effekt konnte durch Batimastat nicht verstärkt werden. Behandlung mit dem MMP Inhibitor Batimastat führte zwar zur geringfügigen Verminderung der Zahl der Lungenmetastasen von parentalen MDA-MB-231 BAG Zellen, allerdings konnten in einer signifikanten Anzahl von Mäusen, die Batimastat injiziert bekommen hatten, Lebermetastasen der parentalen wie auch suPAR transfizierten Zellen beobachtet werden, die in den Kontrollen nie zu detektieren waren. Die Anzahl dieser neu auftretenden Lebermetastasen war bei den suPAR überexprimierenden Tumorzellen um ca. 50 % im Vergleich zur parentalen Zelllinie vermindert. Diese Arbeit zeigt erstmals, dass Überexpression einer löslichen Form des uPAR ein möglicher Ansatz in der Tumorthherapie darstellt und zeigte erstmals bedenkliche Nebenwirkungen der Breitbandhemmung von MMPs.

2 Einleitung

Das Mammakarzinom ist seit langer Zeit sowohl das häufigste Karzinom der weiblichen deutschen Bevölkerung als auch die häufigste Todesursache von Frauen zwischen dem 35. und 55. Lebensjahr. Insgesamt handelt es sich bei 25,9 % aller Krebsneuerkrankungen um Brustkrebs, bei Frauen unter 60 Jahren beträgt die Rate sogar 36 % (*Thomssen, 2002*). Jedes Jahr erkranken in Deutschland 125 von 100 000 Frauen neu an Brustkrebs. Das bedeutet, dass ungefähr jeder 10. Frau im Laufe ihres Lebens unter einem Mammakarzinom leidet. Die Inzidenz und die Mortalität sind die letzten 10 Jahre weitgehend stabil geblieben. (*Tumormanual München, 2003*). In der Rangfolge der Krebserkrankungen steht der Brustkrebs an erster Stelle (vor Darmkrebs, Leukämie, Corpuscarzinomen des Uterus, Magen und Bronchialkrebs).

Jährlich sterben in Deutschland ca. 19 000 Frauen am Mammakarzinom. Die Mortalität konnte die letzten Jahrzehnte in Deutschland trotz intensiver Forschung an Therapiemöglichkeiten nicht im erwarteten Maße gesenkt werden. Ursache dafür ist vor allem die Tatsache, dass gerade beim Mammakarzinom die okkulte Metastasierung einzelner Zellen in Leber, Knochen und Lunge eine große Rolle spielt. Zum Teil treten noch zehn oder mehr Jahre nach der Erstdiagnose Fernmetastasen auf. Die momentan gängigen Therapieschemata wie die operative brusterhaltende Therapie in Kombination mit Strahlen- und Chemotherapie konnten zumindest die Überlebenszeit der betroffenen Patienten deutlich verbessern (*Feige, 2001*). So erreichte die relative 5-Jahres-Überlebensrate, die in den USA um 1970 noch bei ca. 75% lag, in den 90er Jahren immerhin einen Wert von ca. 86%. In den europäischen Ländern sind diese Zahlen deutlich niedriger (*Thomssen, 2002*). Die nächsten Jahre werden zeigen, welche Erfolge durch den nun vermehrten Einsatz von Taxanen und Antrazyklinhaltiger Chemotherapien erzielt werden können, um das Auftreten von Fernmetastasen auch Jahre nach der Tumorerst diagnose zu verhindern. Da das Karzinom, meist auch bei etwas größeren Tumoren, lokal operativ gut und residuenfrei zu behandeln ist, und die meisten Frauen eher an den Organmetastasen sterben, wurde der Forschungsschwerpunkt in den letzten Jahren auf den Invasions- und Metastasierungsprozess der Tumorzellen gesetzt. Zu den gängigen

Therapieschemata zählt derzeit immer noch die Polychemotherapie mit CMF, welche das Sterberisiko abhängig vom Alter und Lymphknotenstatus der Patientin um maximal 27% senkt. Aggressivere Schemata, wie FEC enthalten Antrazykline und sollen das Sterberisiko um weitere ca. 20% senken (*Gravenbruch-Konferenz 2002, St. Gallener Konsens 2001*). Ein wichtiger Pfeiler in der Brustkrebstherapie stellt auch die endokrine Therapie mit Tamoxifen dar, durch die das Sterberisiko ebenfalls um 11-34 % reduziert werden kann. Da keine der genannten Therapiemöglichkeiten ein befriedigendes Ergebnis erzielt bleibt der Bedarf an neuen Therapieoptionen durchaus bestehen.

In diesem Zusammenhang wird der Fokus nun im Folgenden auf einige Proteasensysteme gerichtet, die eine wichtige Rolle bei der Tumorzellinvasion und Metastasierung spielen und die durch Degradation der Extrazellulärmatrix eine Invasion der Tumorzellen und einen Anschluss an das Blutgefäßsystem ermöglichen. Aus diesem Grunde bieten sie sich als Zielgrößen für eine antimetastatische Therapie an.

2.1. Invasion und Metastasierung von Tumorzellen

Während des Prozesses der Tumordinvasion und Metastasierung müssen die Tumorzellen um ihren Primärtumor zu verlassen und Kolonien in anderen Organen zu bilden, einige Barrieren überwinden. Vor allem die Extrazelluläre Matrix (EZM) und bei Karzinomen die Basalmembran müssen durchbrochen werden, sodass die einzelnen Tumorzellen den Anschluss zum Blut- und Lymphgefäßsystem des Körpers finden. Man kann davon ausgehen, dass sich ab einer bestimmten Tumorgroße täglich viele tausend Zellen auf den Weg machen um irgendwo Kolonien zu bilden (*Chambers et al., 1998*). Allerdings wird nur ein Bruchteil dieser Zellen tatsächlich zu einer Metastase führen. Eine entscheidende Rolle im Invasionsprozess spielen die von den Tumorzellen und zum Teil auch von den den Tumor umgebenden Bindegewebszellen (Fibroblasten) sezernierten Proteasen. Hier wiederum handelt es sich vor allem um Serin- und Metalloproteinasen.

Durch das Zusammenspiel der einzelnen Proteasensysteme wird das den Tumor umgebende Gewebe so verändert, das sich aktive Karzinomzellen vom Primärtumor absiedeln, in das umgebende Gewebe einwandern und die Basalmembran durchbrechen können. Über die Blut- und Lymphbahnen werden die Zellen dann in die unterschiedlichsten Organe geschwemmt. Dort verlassen die Zellen die Blutgefäße durch

Proteasenexpression wieder (*McKinnell, 1999*). Sie bilden Zellverbände und erreichen durch die Interaktion von Proteasen und Angiogenesefaktoren eine Einsprossung von neuen Gefäßen und somit eine gute Vaskularisierung.

Insgesamt setzt sich der Metastasierungsprozess aus der Abwanderung einzelner Tumorzellen vom Primärtumor, der Intravasation, dem Transport und Überleben der Tumorzellen im Blutgefäß, dem „Hängen bleiben“ in einzelnen Organen, der Extravasation und schließlich der Angiogenese zusammen. Wobei, wie die intravitale Videomikroskopie zeigt, der limitierende Schritt am ehesten das Überleben der Einzelzellen im Zielorgan ist (*Chambers, 1997*).

Auf diese Weise können im Körper einzelne Tumorzellkolonien (Metastasen) bestehen und wachsen bzw. ruhen, um dann zu einem späteren Zeitpunkt wieder zu proliferieren. Die Extrazelluläre Matrix besteht vor allem aus proteinhaltigen Komponenten, darunter die Kollagene Typ I, II, III, IV, VII und X, Proteoglykane, Fibronectin und Laminin. Das Kollagen Typ IV ist die Hauptkomponente der Basalmembran, die unter jeder Epithelschicht zu beobachten ist. Diese stellen die Substrate der Proteasensysteme dar (*DeClerck et al., 1996*).

2.2. Serinproteasen und ihre natürlichen und synthetischen Inhibitoren

Eine entscheidende Rolle in der Tumorzellinvasion und Metastasierung spielen die Serinproteasen (*Andreasen et al, 1997; Stetler-Stevenson et al, 1993*, darunter das Plasmin als eines der Potentesten. Das inaktive Plasminogen wird durch aktiviertes uPA zu Plasmin gespalten (*Blasi et al., 1999*). Die Aktivierung von uPA, welches selbst auch proteolytisch aktiv ist erfolgt u.a. durch das Andocken von pro-uPA an den membranständigen uPA-Rezeptor (uPAR) (*Andreasen et al., 1997*). Pro-uPA kann auch durch Plasmin aktiviert werden. Die proteolytische Aktivität von uPA wird durch die beiden Plasminogenaktivator Inhibitoren-1 und -2 (PAI-1 und PAI-2) gesteuert (*Andreasen et al., 2000*) Diese können an den uPA/uPAR Komplex binden und so einen inaktiven Rezeptor-Protease-Inhibitor Komplex bilden, der schließlich von der Tumorzelle aufgenommen wird (*Schmitt, 1997*). Die Inhibitoren binden auch an die gelöste Urokinase. PAI-1 kann neben der Inhibition von uPA, die Migration, Invasion und Angiogenese stimulieren (*Bajou et al., 1998*). PAI-2

scheint nur einen die Invasion hemmenden Effekt zu haben und eine Überexpression von PAI-2 in Melanomzellen hemmt deren metastatisches Potential in Mäusen (*Mueller et al. 1995*). Der uPA/uPAR-Komplex hat nicht nur eine starke proteolytische (Plasminaktivierende) Funktion, sondern bewirkt auch die Induktion von Zellproliferation, Adhäsion, Migration und Chemotaxis (*Blasi et al., 1999*). Für alle diese Wirkungsweisen des uPA/uPAR-Komplexes ist aber die Membranständigkeit des uPA-Rezeptors entscheidend. Ein uPAR, der von einer transfizierten Zelle löslich sezerniert wird, hat zwar weiterhin die Möglichkeit an uPA zu binden. Der oben beschriebene Effekt der Plasminaktivierung bleibt jedoch aus (*Wilhelm et al., 1994*). Der membranständige uPA/uPAR-Komplex spielt in mehrerer Hinsicht eine wichtige Rolle. Das am Rezeptor verankerte, aktivierte uPA ist entscheidend für die Spaltung von Plasminogen zu Plasmin (*Ellis et al., 1996*). Plasmin wiederum ist eine sehr potente Serinprotease die mehrere Anteile der Extrazellulären Matrix degradiert aber auch einzelne MMPs aktiviert, wie in Abbildung 1 dargestellt (*Festuccia et al., 1998*). Zusätzlich induziert der uPA/uPAR-Komplex ein intrazelluläres Signal, welches wiederum die Zellproliferation, Adhäsion und Migration verursacht (*Reuning et al., 1998; Fischer et al., 1998*). Grundlage dieser Arbeit war die Idee, dass ein löslicher Rezeptor, der von der Tumorzelle selbst, vor Ort gebildet wird das uPA abfängt und so die Bildung des membranständigen aktiven uPA/uPAR-Komplexes verhindert (*Wilhelm et al., 1994*).

Klinische Studien haben gezeigt, dass hohe Werte an uPA, PAI-1 und uPAR zusammen mit niedrigen Werten von PAI-2 mit einer schlechteren Prognose korrelieren, also Hinweise für high-risk Patienten sind (*Harbeck, 2001; Schmitt 1997*). Auch *in vitro* korreliert, vergleichbar zu den im Folgenden noch beschriebenen Metalloproteinasen, eine hohe Expression von uPA und uPAR mit der Malignität der Zellen.

Gerade diese sehr effektiven Proteasen bieten sich zur Entwicklung diverser, geeigneter Inhibitoren an (*Rabbani et al., 2002*). So werden seit Jahren in vielen präklinischen Studien verschiedene Inhibitoren, seien es Antikörper, Oligonucleotide oder synthetische Inhibitoren von z.B. uPA oder Plasmin untersucht. Es konnten häufig gute Ergebnisse bezüglich der Reduktion der Tumorinvasivität und Metastasierungsrate demonstriert werden (*Stonelakke et al., 1997; Della Porta et al., 1999*). In diesen Arbeiten wurde für die Hemmung der Serinproteasen Aprotinin eingesetzt. Dieser Wirkstoff wird aus

Rinderpankreas isoliert, ist also kein echter synthetischer Inhibitor und dient in der Forschung als potenter Inhibitor zum Nachweis des Effekts.

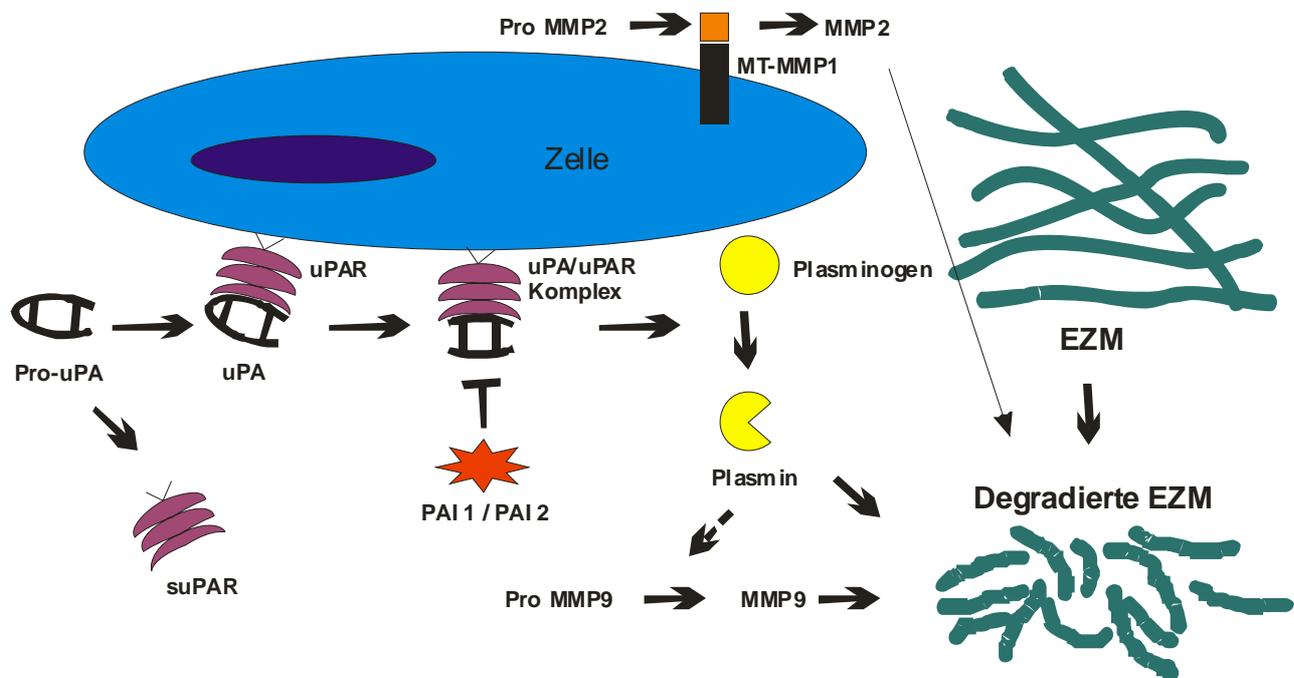


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Serinproteasenaktivierung und ihre Interferenz mit MMP-2 und MMP-9 im Abbau der extrazellulären Matrix.

uPA: urokinase plasminogen activator; uPAR: plasminogen activator Rezeptor; suPAR: löslicher uPAR; PAI: Plasminogen activator Inhibitor, MMP: Matrixmetalloproteinase.

2.3. Metalloproteinasen und ihre natürlichen und synthetischen

Inhibitoren

Die Matrixmetalloproteinasen sind in drei Hauptuntergruppen eingeteilt:

- (1) Interstitiale (MMP-1) und polymorphonukleare (MMP-8) Collagenasen, die hauptsächlich Kollagen Typ I-III degradieren.
- (2) Typ IV Kollagenasen (MMP-2 und MMP-9), die das Kollagen Typ IV der Basalmembran und Gelatin degradieren und in dieser Arbeit im Zusammenhang mit Karzinomen die wichtigsten Vertreter der MMPs sind.

(3) Stromelysine (MMP-3, MMP-7, MMP-10) deren Substrate unter anderem die Proteoglykane, Laminin, Fibronectin und einige Kollagene sind (Woessner, 1991). Insgesamt existieren über 20 MMPs (Freije et al., 2003). Für jede einzelne Matrixmetalloproteinase gibt es einen eigenen, unabhängigen Expressionskontrollmechanismus. Das bedeutet, dass die Tumorzellen eine unterschiedliche Vielfalt der bekannten MMPs produzieren. Studien zeigen, dass die Anzahl und Menge der produzierten MMPs mit der Malignität der Tumorzellen korreliert (Giambernardi, 1998). Je größer das Spektrum der exprimierten MMPs, desto aggressiver die Zelllinie. Es konnte gezeigt werden, dass mit der Progression des Zellphänotyps von normal zu maligne, die Anzahl und Menge der exprimierten MMPs zunahm. (Ray and Stetler-Stevenson, 1994). Tumore von hoher Malignität produzieren viele MMPs, niedrig maligne Tumore produzieren wenig MMPs. Auch mit der Tumorprogression steigt die Menge und die Anzahl der MMPs an (Chamber, 1997). Hauptdetektionsort der MMPs ist , ihrer Funktion entsprechend, der Tumorrand und die den Tumor umgebenden Stromazellen. Eine Überexpression diverser Onkogene (H-ras, v-sis) bewirkt eine Hochregulierung der MMP-9 Produktion (Troy, 1998).

Die MMP Gentranskription wird durch diverse extrazelluläre Stimuli, wie Cytokine (IL-4, IL-10) und Wachstumsfaktoren (EGF, TGF- α) induziert (Hidalgo, 2001).

Typ IV Kollagenasen werden in einer inaktiven Pro-Form sezerniert und müssen extrazellulär erst aktiviert werden (Chambers, 1997). Diese Aktivierung ist entscheidend für den Abbau der EZM. *In vitro* könne MMP-2 und MMP-9 durch Quecksilberverbindungen aktiviert werden. *In vivo* ist die Aktivierung noch nicht endgültig geklärt. Zum Teil wird eine MMP über eine aktivierte andere Matrixmetalloproteinase aktiviert, so aktiviert z.B. MT1-MMP die MMP-2 (Hidalgo, 2001).

MMPs sind an der Degradation der EZM, der Intravasation und der Extravasation am Zielorgan beteiligt. Besonders wichtig ist die Tatsache, dass MMPs wohl nicht nur an der Entstehung von Fernmetastasen, sondern auch am Wachstum des Primärtumors, bzw. der Metastasen eine Rolle spielen (Yu et al., 1997). MMPs können vom Serumproteinaseinhibitor α 2-Macroglobulin und von den verschiedenen TIMPs inhibiert werden (Yu et al., 1997). *In vivo* Studien mit rekombinantem TIMP-1 zeigten, dass bei i.p. Injektion von TIMP-1 die Metastasenzahl einer Mäusemelanomzelllinie abnimmt, bzw. bei i.p. Injektion von TIMP-1 Inhibitoren die Metastasenzahl zunimmt (Schultz et al., 1988).

In TIMP-1 überexprimierende Mäuse inokulierter Fibrosarkomzellen zeigten signifikant weniger cerebrale Metastasen als die mit der gleichen Zelllinie infizierten Wildtypkontrollen (Krüger *et al.*, 1997 und 1998). TIMP-1 überexprimierende Zelllinien bilden weniger und kleinere Metastasen (Koop *et al.*, 1994). Ähnliche Ergebnisse gibt es für TIMP-2 (Imren *et al.*, 1996). MMP Inhibitoren hemmen die Angiogenese. So konnte für TIMP-1 sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* eine Hemmung der Angiogenese gezeigt werden (Yu *et al.*, 1997).

Aufgrund des breiten Wirkungsspektrums der MMPs (Arthritis, Multiple Sklerose, Krebs) wurden die letzten Jahre viele synthetischen Inhibitoren für die MMPs entwickelt. An die jeweiligen Inhibitoren mussten hohe Anforderungen wie geringe Toxizität, hohe orale Bioverfügbarkeit und Wasserlöslichkeit, hohe Spezifität und einfache Herstellung gestellt werden. So wurden die letzten Jahre verschiedene synthetische MMP Inhibitoren entwickelt und getestet. Die MMP-Inhibitoren werden in drei pharmakologische Kategorien eingeteilt. 1. Collagenpeptidomimetische und -nichtpeptidomimetische, 2. Tetracyclinderivate und 3. Bisphosphonate. Ein Beispiel für die Tetracycline wäre Doxycyclin, welches inhibierende Effekte auf die MMP Produktion und Aktivität hat. In Phase I Studien zeigten die eigentlich nötigen, wirkungsvollen Dosen hohe Toxizität. Bisphosphonate werden vor allem zur Behandlung von osteolytischen Knochenmetastasen eingesetzt, haben aber auch einen MMP inhibitorischen Effekt. Die bekanntesten und in den meisten Studien verwendeten Inhibitoren sind Batimastat und Marimastat (Yu, 1997). Sie gehören zu den Collagenpeptidomimetischen Inhibitoren. Batimastat ist ein potenter, aber nicht sehr selektiver Inhibitor (inhibiert MMP-1,-2,-3,-7 und MMP-9). *In vitro* war Batimastat cytostatisch, aber nicht cytotoxisch. Batimastat zeigt in vereinzelt Studien eine Reduktion von Primärtumorwachstum, Metastasierung und sekundärem Tumorwachstum *in vivo*. Aufgrund der schlechten oralen Bioverfügbarkeit von Batimastat führte der Hersteller (British Biotech) mit Marimastat einen neueren Inhibitor mit einem ähnlichen Wirkspektrum, der aber oral verabreicht werden konnte, ein (Rasmussen *et al.*, 1997).

2.4. Interferenz beider Proteasensysteme und mögliche Therapieoptionen

Es gibt multiple Studien zur Produktion, Wirkungsweise, Inhibitionsmöglichkeit und -effekt der einzelnen Proteasensysteme, also entweder der Serinproteasen oder der Matrixmetalloproteinasen. Studien, bzw. wissenschaftliche Arbeiten, die sich mit dem Zusammenspiel z.B. der Serin- und der Metalloproteinasen beschäftigen, gibt es eher wenige (*Mazzieri et al. 1997; Scott et al. 2000; DeClerck et al., 1996*)).

Trotzdem gibt es einige eindeutige Hinweise, dass die Funktion der beiden Proteasensysteme eng miteinander vernetzt sind und so zum Beispiel durch die Hemmung des einen Proteasensystems ein zweites mit inhibiert wird.

Die zur Proteolyse, aber auch zur Proliferation, Migration, Angiogenese und Chemotaxis nötigen Proteasen werden von einer gemischten Zellproliferation gebildet. Beim Mammakarzinom wird z.B. uPAR vor allem von den Krebszellen und von Makrophagen gebildet. Die Urokinase wird von Tumorzellen und von Fibroblasten gebildet. MMP-2 (Gelatinase A) wird auch von den Fibroblasten gebildet und MMP-9 (Gelatinase B) wird von den Makrophagen produziert. PAI-1 wird in größeren Mengen unter anderem von Endothelzellen gebildet (*Dano et al., 1999*).

Die meisten MMPs sind nicht in hohen Konzentrationen in normalem Gewebe vorhanden und ihre Expression ist streng reguliert durch u.a. Wachstumsfaktoren und Zytokine (*Murphy et al., 1999*). Im Gegensatz dazu ist Plasminogen, die Vorstufe von Plasmin in fast allen Geweben in hoher Konzentration vorhanden. MMPs werden ähnlich wie pro-uPA als inaktive Proenzyme sezerniert in die extrazelluläre Umgebung. Dies ist wichtig für die Kontrolle ihrer Aktivität (*Mazzieri et al., 1997*). Extrazellulär erfolgt die Aktivierung der MMPs durch die proteolytische Entfernung der Propeptide (*Murphy et al., 1999*). Ein Weg zur Aktivierung von MMP-3 und MMP-9 ist über das durch den uPA/uPAR-Komplex aktivierte Plasmin (*Mazzieri et al., 1997*). Eine andere Möglichkeit zur MMP Aktivierung ist über die MT-MMPs (siehe Abbildung 1).

Bei Tumorzelllinien korreliert die Menge an sezernierten Serin- und Metalloproteinasen mit der Malignität. Ihre Funktion ist wohl eher komplementär, um die Tumprogression zu optimieren (*DeClerck et al., 1996*).

2.5. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es mit Hilfe eines Tumorzellmodells die Produktion, Aktivität und Modulation verschiedener Proteasen unter dem Eindruck verschiedener Proteaseinhibitoren zu überprüfen. Es wurde eigens dafür ein neuer Lebendzelle-Proteolyse-Assay entwickelt, der die Kollagenaseaktivität und die Effektivität verschiedener Inhibitoren bezüglich der Matrixmetalloproteinasen demonstrierte. Ein ähnliches System wurde mit Hilfe des caseinolytischen Assays zur Demonstration der Aktivität der Serinproteasen (uPA, Plasmin) angewendet. Nach dem Nachweis der Effektivität bestimmter Inhibitoren (Aprotinin und Batimastat) im life cell assay, erfolgte der Test *in vivo* an Nacktmäusen. Zusätzlich zu den zugefügten synthetischen Inhibitoren, wurde eine neue Zelllinie geschaffen, die den uPAR in löslicher Form produzierte. Vom suPAR wurde erwartet, dass er eine gewisse *scavenger* Funktion einnehmen würde, d.h. große Teile des freien uPA abfangen würde und somit die Karzinomzelle bezüglich ihrer Invasivität, Metastasierungsfreudigkeit und auch hinsichtlich ihres Primärtumorwachstums einschränken würde. Des Weiteren sollte eine den löslichen uPAR, als eine Art natürlichen Inhibitor für das System der Serinproteasen exprimierende Mammakarzinomzelllinie mit Batimastat, einem synthetischen Inhibitor der Matrixmetalloproteinasen behandelt werden, um eventuelle additive Effekte bzw. eine Hemmung der Metastasierung zu erreichen. Mit dieser Kombination erhoffte man sich die beiden wichtigsten Proteasensysteme bezüglich der Degradation der Extrazellulärmatrix und Basalmembran und somit die vielleicht wichtigsten und effektivsten Faktoren bezüglich Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen möglichst auszuschalten, bzw. deutlich zu reduzieren. Neu an dieser Arbeit sollte zum einen die Austestung der Effektivität des löslichen uPAR in Hinsicht auf Reduktion der Metastasen und Tumorgröße, aber auch die gleichzeitige Inhibition beider wichtiger Proteasensysteme sein. Gerade der Einsatz von Tumorzellen, die nach Transfektion bestimmte Inhibitoren wie z.B. TIMP-1, oder aber auch den suPAR produzieren sollen, helfen einen molekular-biologischen Ansatz zu finden, um die momentan gängige Krebstherapie um ein erfolgreiches biologisches Konzept zu erweitern.

3 Material und Methoden

3.1. Tumorzellsysteme

3.1.1. Zelllinien

Es wurde eine humane Mammacarcinomzelllinie, die bereits seit einigen Jahren von diversen Instituten bezüglich ihrer Invasivität, auch im Tierversuch getestet worden war, ausgewählt. Diese Zelllinie, MDA-MB-231 BAG war bereits mit dem *lacZ* Gen transfiziert (Brünner et al., 1992), das ein Anfärben und somit ein Zählen der Tumorzellen bzw. der Metastasen post mortem in den Organen erlaubt (Krüger et al., 1999).

Diese Zelllinie wurde vorab mit einem den suPAR kodierenden eukaryotischen Expressionsvektor transfiziert und einzelne Klone selektioniert (Krüger, 1999). Für die Experimente dieser Arbeit wurden zwei verschiedene den löslichen uPA Rezeptor in unterschiedlichen Mengen überexprimierenden Klone (suPAR 3 und suPAR10) ausgewählt.

3.1.2. Zellkultur

Alle MDA-MB-231 BAG Zelllinien (Brünner et al., 1992) und die den löslichen uPAR überexprimierenden Klone suPAR3 und suPAR10 wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, Karlsruhe), ergänzt mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, Gibco, Karlsruhe), 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 0,01 M HEPES (Gibco, Karlsruhe) und 0,5 mg/l Arginin und Asparagin bei 5% CO₂ und 37°C gezüchtet.

3.2. Proteaseinhibitoren

Als synthetische Proteaseinhibitoren wurde Aprotinin (Sigma, München) zur Inhibition der Serinproteasen verwendet. Die Dosierung *in vitro* lag bei 260 kallikrein inhibitory units (KIU)/ml Medium. Aprotinin ist wasserlöslich und konnte so in PBS oder DMEM

gelöst werden. Batimastat (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg), bzw. *in vitro* auch Marimastat (Roche Diagnostics, Penzberg) wurden zur Inhibition der Metalloproteinasen verwendet. Für die *in vitro* Experimente wurde Batimastat zunächst in Dimethylsulfoxid (3mg/ml) gelöst und so dem Medium zugegeben, das eine Endkonzentration von 3µg/ml Medium entstand. Marimastat wurde in einer Konzentration von 2µg/ml Medium verwendet. Alle diese Inhibitoren zeigten in der Zellkultur in der vorliegenden Konzentration keinen toxischen Effekt auf die Zellen, und es konnte auch kein unterschiedliches Zellwachstum nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). *In vivo* lag die Dosierung bei 30mg/kg KG der Maus, aufgelöst in 0,01 % Tween 20 (Sigma, München) in PBS, pH 7,4. Diese Menge ist für die Mäuse eine tolerable Dosierung, wie schon einige Arbeitsgruppen zeigten (*Della Porta et al., 1999; Eccles et al., 1996*). Da Batimastat schwer Wasserlöslich ist erfolgte vor der Injektion der Mäuse die Suspension des Wirkstoffes im Ultraschallbad.

3.3. Nachweis von Proteasenmenge und Proteasenaktivität

3.3.1. Zymographie

Die Zymographie erfolgte weitgehend nach der Methode von *Fridman et al., 1992* mit einigen Modifikationen. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das FCS freie Medium von den Zellen gesammelt und die Zellen in üblicher Weise von den Kulturschalen abgelöst und gezählt. Es wurde dann der FCS freie Zellüberstand von 2×10^5 Zellen in einer Pufferlösung bestehend aus 375mM Tris-HCl pH6,6, 60% Glycerin (Roth) und 12% SDS (Sigma) in Wasser auf ein 12% Sodiumdodecyl-Polyacrylamidgel aufgetragen. Dem Resolving-Gel waren 0,5mg/ml gelöste Gelatine (Sigma, München) zugefügt. Es erfolgte eine Elektrophorese bei 5°C. Danach wurde das Gel zunächst eine Stunde in einer 2,5%igen Triton X-100 in 50mM Tris-HCl (pH 7,5) Lösung gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation in einer 50mM Tris-HCl Lösung mit 5mM CaCl₂ und 0,2 M NaCl₂ über 24 h bei 37°C. In dieser Zeit degradieren die Gelatinasen (V.a. MMP-2 und MMP-9) die beigefügte Gelatine. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Gele mit einer Coomassieblaulösung (7 % Essigsäure, 43 % Methanol, 1,25%

Coomassie Brilliant Blau, Biorad) gefärbt und anschließend mit der gleichen Lösung nur ohne das Coomassie Brilliant Blau wieder entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren. Als MMP Standard wurde humanes rekombinantes MMP-2 und MMP-9 der Firma Diabor (Oulu, Finnland) verwendet.

3.3.2. uPA und uPAR ELISA

Für beide ELISAs wurden 5×10^5 Zellen in 2ml Medium auf 6 well plates für 24h inkubiert. Dann wurde das Medium entfernt und 10 min in einer Eppendorf Zentrifuge bei 2000 rpm (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde dann für den uPAR Elisa gesammelt. Die Zellen wurden mit EDTA-PBS abgelöst, bei 1000 rpm zentrifugiert und das Pellet dann in 500µl PBS/1% Triton X-100 resuspendiert und über Nacht bei 4°C und unter konstanter Bewegung gelöst. Es folgte eine Zentrifugation über 30min bei 14000 rpm in der Eppendorf Zentrifuge. Der gewonnene Überstand wurde sowohl für den uPA ELISA als auch zur Überprüfung der Menge an membrangebundenem uPAR verwendet. Die Durchführung der ELISAs für uPA und uPAR erfolgte streng nach den Protokollen, welche dem IMUBIND® uPA ELISA Kit #894 und dem IMUBIND® uPAR ELISA Kit #893 der Firma American Diagnostica Inc., Greenwich, CT, USA beigelegt waren.

Für den suPAR ELISA der Gewebeproben wurde der Gewebeaufschluss in TBS für 30min bei 14000rpm in der Eppendorf Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand, der dann nur die lösliche Form des uPAR enthält wurde dann nach einer Proteinbestimmung ebenfalls mit dem IMUBIND® uPAR ELISA Kit getestet.

Laut Herstellerangabe misst der uPA ELISA Kit sowohl freien uPA, als auch an uPAR, bzw. an suPAR gebundenen uPA.

3.3.3. Caseinolytischer Plaque Assay

Dieser Assay diente der Demonstration der Inhibitorenwirksamkeit in Anwesenheit der lebenden Zellen. Hierzu wurde spezielle, bei niedrigen Temperaturen schmelzende Agarose (low melt agarose, Sigma, München) in erwärmtem DMEM (Gibco, Karlsruhe) geschmolzen. 4,2ml von dieser flüssigen Agarose wurde zu 1,83ml PBS (pH 7,4, RT),

welche 32,78 % Earle`s Balanced Salzlösung (10X EBS, Gibco, Karlsruhe), 9,8mg/ml Na_2CO_3 , 1,8 $\mu\text{g/ml}$ humanes Plasminogen (Boehringer Roche Diagnostics, Penzberg) und 85,2mg/ml Milchpulver enthält, zugefügt. Diese Lösung wurde gut gemixt und dann vorsichtig in eine 6cm Petrischale gegossen. In dieser Petrischale wuchsen bereits seit 1-2 Wochen bis zu 50 einzelne Zellkolonien der jeweiligen Zellreihen. Vorher wurde das Medium abgesaugt und die Zellkolonien mit PBS gespült. Sobald die Agarose fest wurde wurden die Petrischalen bei 37°C ca. 12 h inkubiert. Dann zeigten sich rund um die Zellkolonien klare, lysierte Zonen. Dieser Assay erfolgte in An- und Abwesenheit von Plasminogen und zur Prüfung der Inhibitoren wurden die Proteinaseinhibitoren Aprotinin, Batimastat, Marimastat und die jeweiligen Inhibitorkombinationen der flüssigen Agarose in den oben beschriebenen Konzentrationen beigefügt.

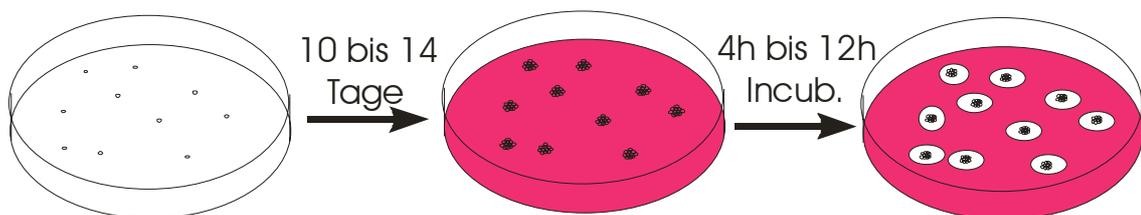


Abbildung 2: Caseinolytischer Plaque Assay: über die einzelnen Zellkolonien wird anstatt flüssigem Medium eine spezielle, bereits bei niedrigen Temperaturen schmelzende Agarose, der als Substrat für uPA Casein beigemischt wurde gegossen. Nach einigen Stunden Inkubation wird das trübe Casein gespalten und es entstehen klare Plaques, die gezählt werden können

3.3.4. Fluoreszenzassay zur Bestimmung der Proteasenaktivität lebender Zellen

Diese alternative Methode zur Prüfung der Wirkung von Proteaseinhibitoren auf die proteolytische Aktivität lebender Zellen wurde während der vorliegenden Arbeit etabliert und basiert auf einem speziell präpariertem DQTM-Kollagen Typ IV (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Dieses Kollagen ist mit Fluoreszein beladen. Durch die Anwesenheit von vielen Fluoreszeinmolekülen auf geringem Raum hebt sich die Fluoreszenz des Substrats im nicht degradierten Zustand auf. Erfolgt nun eine Spaltung des Kollagens durch Proteasen erhält man stark fluoreszierende Peptide und es kann die Fluoreszenzzunahme im Fluometer (Perkin Elmer HTS 7000 Bio Assay Reader) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3).

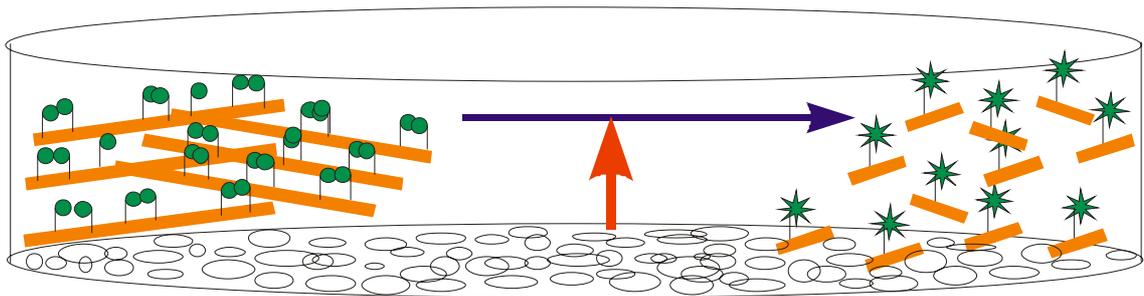


Abbildung 3: In einer 96-well-Platte wurden über einen Zellrasen der entsprechenden Zelllinie eine standardisierte Menge DMEM mit einer gewissen Menge des Fluoreszein gelabelten Kollagen Typ IV inkubiert. Durch die Degradation des Kollagens durch die Proteasen erfolgte eine Zunahme der Fluoreszenz, die proportional zur Aktivität der Proteasen im Fluometer dokumentiert werden konnte.

Der Anstieg der Fluoreszenz ist proportional zur Kollagenaseaktivität und die Substrate werden durch die Anwesenheit der Inhibitoren nicht irritiert. Für diesen Assay wurden 5µg DQ-Kollagen (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in 100µl phenolrot freiem Eagle Medium (Gibco, Karlsruhe) auf eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. In jede Vertiefung wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen und die entsprechenden Mengen an Inhibitoren (Konzentration wie oben beschrieben) und Plasminogen (1,8µg/ml, Boehringer Roche Diagnostics, Penzberg) gegeben. Die Zellen wurden dann bis zu 48h bei 37°C und 5%

CO₂ inkubiert und alle 12h im Fluoreszenz Reader gemessen. Die Messungen erfolgten jeweils bei einer Anregungswellenlänge von 492nm und einer Emissionswellenlänge von 535nm.

Analog hierzu wurde als Substrat auch Fluoreszein markiertes Casein (BODIPY FL Casein, Molecular Probes , Eugene, OR, USA) eingesetzt.

3.4. Tumorwachstum und Metastasierung *in vivo*

3.4.1. Mausstämme

Als Modell für das Studium von Tumorwachstum und Metastasierung von humanen Mammakarzinomzelllinien wurden weibliche, immunsupprimierte Nacktmäuse im Alter von 4 - 6 Wochen (CD1 nu-nu Mäuse von Charles River, Sulzfeld) verwendet. Die Haltung der Mäuse erfolgte in Käfigen mit Gruppen von 6-8 Mäusen. Die Nahrung der Mäuse war ausschließlich Wasser und übliches Trockenfutter.

3.4.2. Experimentelle Lungen- und Lebermetastasierung

MDA-MB-231 BAG ist eine Zelllinie, die in vorausgegangenen Experimenten anderer Arbeitsgruppen (*Brünner et al., 1992*) vor allem eine pulmonale Metastasierung, nach Injektion der Zellen in die Schwanzvene zeigte. Für unsere Experimente wurden entweder die Stammzelllinie MDA-MB-231 BAG, oder die transfizierten Zelllinien MDA-MB-231-BAG suPAR3 oder MDA-MB-231 BAG suPAR10 injiziert. Es wurden pro Maus 1×10^6 Zellen/ 200µl PBS in die Schwanzvene jeder Nacktmaus inokuliert. Nach 52 Tagen erfolgte die Tötung der Mäuse und die Organentnahme. Es wurde von jeder Maus die Leber und die Lunge entnommen. Ungefähr jeweils die Hälfte der Organe wurde in flüssigem Stickstoff für den Gewebeaufschluss eingefroren. Die andere Organhälfte wurde sofort mit X-Gal gefärbt.

3.4.3. Experimentelles orthotopes Tumorwachstum

Zur Untersuchung des Primärtumorwachstum von humanen Mammakarzinomzellen erfolgte die Injektion von jeweils 2×10^6 MDA-MB-231 BAG oder transfizierte suPAR10 bzw. suPAR3 Zellen in 100µl PBS in das perimammäre Fettgewebe der rechten Milchleiste der Maus. Zweimal pro Woche wurde das Tumorwachstum durch Messung der Tumorgröße mit einer Schiebelehre in allen drei Ebenen dokumentiert. Die Dokumentation erfolgte in einer Wachstumskurve, wobei aus den Messgrößen der Mittelwert gebildet wurde. Nach 52 Tagen wurden die Mäuse getötet und der Primärtumor und die Lungen entnommen. Die Hälfte des Primärtumors und jeweils ein Lungenflügel (um eine eventuelle spontane Metastasierung nachzuweisen) wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der andere Teil wurde mit X-Gal gefärbt.

3.4.4. Behandlung von Mäusen mit synthetischen Proteaseinhibitoren

Primär erfolgte die Injektion von 1×10^6 Zellen (MDA-MB-231 BAG und suPAR3) in die Schwanzvene. Den Mäusen beider Gruppen wurden dann täglich 30mg Batimastat /kg KG intraperitoneal injiziert. Auf eine Injektion von 0,01 % Tween in PBS ohne Batimastat als Kontrolle wurde verzichtet, da in mehreren Experimenten in der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass dies keinen Effekt auf Metastasierung oder Proteasenexpression hat. Ebenso haben diese vorausgegangenen Experimente bereits gezeigt, dass eine alleinige Batimastatinjektion (ohne vorausgehende Tumorzellinjektion) in dieser Dosierung für Mäuse gut tolerabel ist (*Della Porta et al, 1999, Krüger 2000*). Nach 52 Tagen erfolgte auch bei diesen Gruppen die Tötung der Mäuse und die Entnahme von Leber und Lunge. Die Organe wurden zum Teil in flüssigem Stickstoff gefroren und zum Teil mit X-Gal gefärbt.

3.4.5. X-Gal Organfärbung

Die entnommenen Organe wurden zunächst in eiskaltem PBS gewaschen und in 2% Paraformaldehyd, 0,1 M PIPES, pH 6,9, 2mM MgCl₂ und 1,25 mM EGTA, pH 8,0 bei 4°C für insgesamt 90 min inkubiert. Darauf folgt das dreimalige Waschen mit eiskaltem PBS. Anschließend wurden die Organe in der X-Gal Färbelösung

(5 mM $K_3 \{Fe(CN)\}_6$, 5mM $K Fe(CN)_6 \times 3 H_2O$, 2 mM $MgCl_2$, 0,01 % Natrium-Desoxycholat, 0,02 % NP40, 1 mg/ml X-Gal (Boehringer, Mannheim) bei 37°C für 12h inkubiert (Krüger et al., 1994)

Alle Organe wurden nach der Färbung auf Metastasen überprüft. Es wurden die makroskopisch erkennbaren Metastasen per Auge gezählt. Die Mikroskopischen Metastasen wurden mit dem Olympus Mikroskop gezählt und fotodokumentiert.

3.5. Gewebeaufschluss und Proteinbestimmung

Alle Organe wurden im gefrorenen Zustand mit Hilfe eines Dismembrators pulverisiert und das Gewebepulver sofort in kaltem TBS 1%, gelöst. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C in der Eppendorffzentrifuge wurde der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert. Das Pellet wurde mit Triton X-100, 2% in PBS ca. 12h bei 4°C unter konstanter Bewegung lysiert. Nach nochmaligem zentrifugieren bei 4°C, 14000rpm wird auch dieser Überstand bei -20°C aufbewahrt. Der lösliche uPAR ist nun in der TBS Lösung zu erwarten. Membrangebundener uPAR und uPA finden sich eher in den mit Triton gelösten Extrakten.

Von den Gewebeaufschlüssen erfolgt auch eine Proteinbestimmung. Hierfür wird ein üblicher Proteinbestimmungs kit (Pierce Protein Assay Reagent) verwendet. Es wird eine Inkubationslösung aus den Bestandteilen Pierce A und B hergestellt. In eine 96-well Platte wird die entsprechende Inkubationslösung vorpipettiert. Aus verdünntem Albumin wird eine Standardreihe hergestellt. Die Gewebeaufschlüsse werden stark verdünnt und auf die Platte aufgetragen. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei RT. Gemessen wird die Platte am nächsten Tag in einem üblichen ELISA Messgerät.

Der Proteinmenge entsprechend wurde der uPAR bzw. suPAR -Gehalt der Gewebeprobe mittels des oben beschriebenen IMUBIND® uPAR-ELISA Kit #893 der Firma American Diagnostica streng nach der dem Produkt beigefügten Protokoll bestimmt.

3.6. Statistische Analyse

Für normalverteilte Ergebnisse erfolgte die Anwendung des Student t-test.

Bei kleinen Gruppen wurde bei zwei Gruppen der Mann Whitney Test und für mehr wie zwei Gruppen die Kruskal-Wallis Analyse durchgeführt, um Unterschiede zwischen den Gruppen zu analysieren. Bei statistisch signifikantem Unterschied ($p < 0,05$) wurden paarweise Vergleiche mit der Methode nach van Dunn angestellt.

4 Ergebnisse

4.1. Sekretion von löslichem uPAR von MDA-MB-231 BAG und den transfizierten Zelllinien suPAR3 und suPAR10

Zunächst wurde die suPAR-Menge der Ausgangszelllinie MDA-MB-231 BAG (*Brügger et al., 1992*) bestimmt. Es fanden sich $3,4 \pm 0,6$ ng uPAR im Medium von 10^6 Zellen. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der suPAR-Menge des aufgrund von hohen uPAR-Mengen in ersten Tests ausgewählten Klons suPAR3. suPAR3 produzierte 1886 ± 45 ng uPAR pro 10^6 Zellen in 24 h. Um festzustellen, in wie weit die Ergebnisse direkt mit der Menge an suPAR korrelieren, bzw. ob es sich auch um ein absättigbares System handelt, wurde für einen Teil der Experimente auch ein eine mittlere Menge an suPAR produzierender Klon (suPAR10: 752 ± 33 ng uPAR/ 10^6 Zellen in 24h), ausgewählt. Diese Mengen wurden alle 15-20 Passagen mittels uPAR-ELISA überprüft und änderten sich nicht wesentlich.

Die Wachstumskurven der Zelllinien MDA 231 BAG und ihrer suPAR transfizierten Varianten suPAR3 und suPAR10 wurden überprüft (Abbildung 4) und es zeigte sich, dass eine Überproduktion an löslichem uPAR keinen Einfluss auf die Wachstumskurven, also auf die Zellproliferation hat.

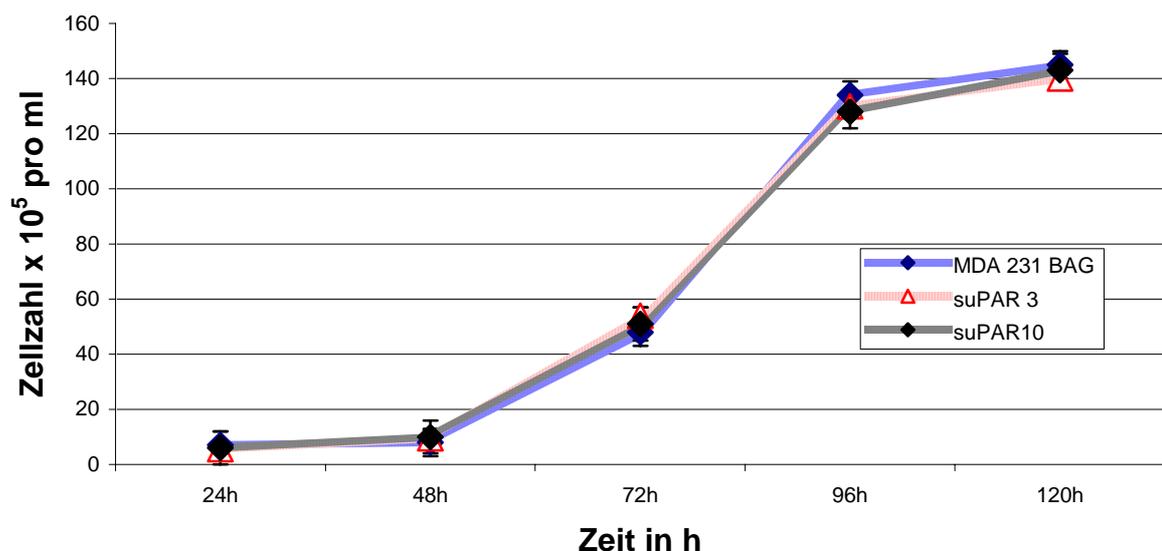


Abbildung 4: Wachstumskurven der Zelllinien MDA 231 BAG, suPAR3 und suPAR10. Alle drei Zelllinien wurden identisch kultiviert und alle 24 h gezählt. Es zeigt sich kein Unterschied in der Zellproliferation.

4.2 Proteasensekretion von MDA-MB-231 BAG, suPAR3 und suPAR10 in An- und Abwesenheit von synthetischen Inhibitoren

4.2.1. uPA Sekretion

Zur Detektion eventueller Unterschiede in der uPA Produktion erfolgte eine Messung der uPA Menge im Medium von 10^6 Zellen mittels uPA ELISA. Es zeigte sich wie in Abbildung 5 dargestellt kein signifikanter Unterschied in der uPA Menge. Es wurde auch nach einer Inkubation von 24h mit den Inhibitoren Aprotinin und Batimastat, bzw. deren Kombination die uPA Menge im Medium von 10^6 Zellen der parentalen Zelllinie und der transfizierten Zelllinie suPAR3 getestet. Auch hier fand sich kein Unterschied in der uPA Menge.

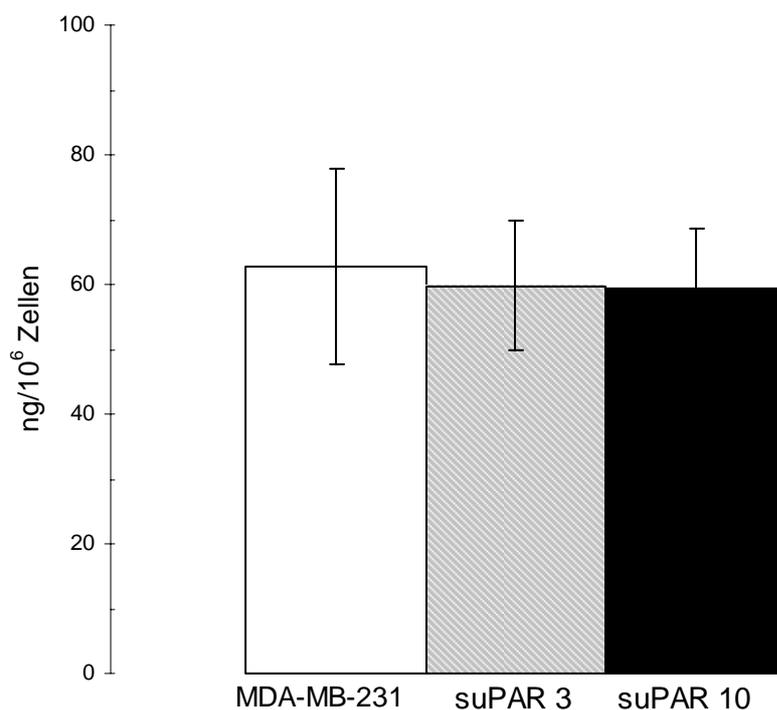


Abbildung 5: Sekretion von uPA in ng pro 10^6 Zellen durch die MDA-MB 231 BAG Mammakarzinomzellen und den suPAR transfizierten Zelllinien. uPA wurde durch einen ELISA in den Zellkulturüberständen der jeweiligen Zelllinie bestimmt. Es erfolgten jeweils drei unabhängige Experimente.

Der uPA ELISA misst allerdings, laut Herstellerangabe sowohl freies, als auch gebundenes uPA. Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl weder zwischen den Originalzellen und den transfizierten Zelllinien ein Unterschied in der uPA Menge besteht, als auch, dass der Einsatz von Inhibitoren bezüglich der uPA Menge keine Rolle spielt. In den weiteren Experimenten galt es dann abzuklären in wie weit sich die Proteasenaktivität verändert.

4.2.2. MMP-2 und MMP-9 Sekretion

Stellvertretend für die Gruppe der MMPs, die bei der Tumorprogression eine wichtige Rolle spielen erfolgte der Nachweis von MMP-2 und MMP-9 mittels Zymographie. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in den MMP-2 und MMP-9 Mengen im Medium zwischen MDA-MB-231 BAG und den transfizierten Zelllinien suPAR3 und suPAR10 (Abbildung 6).

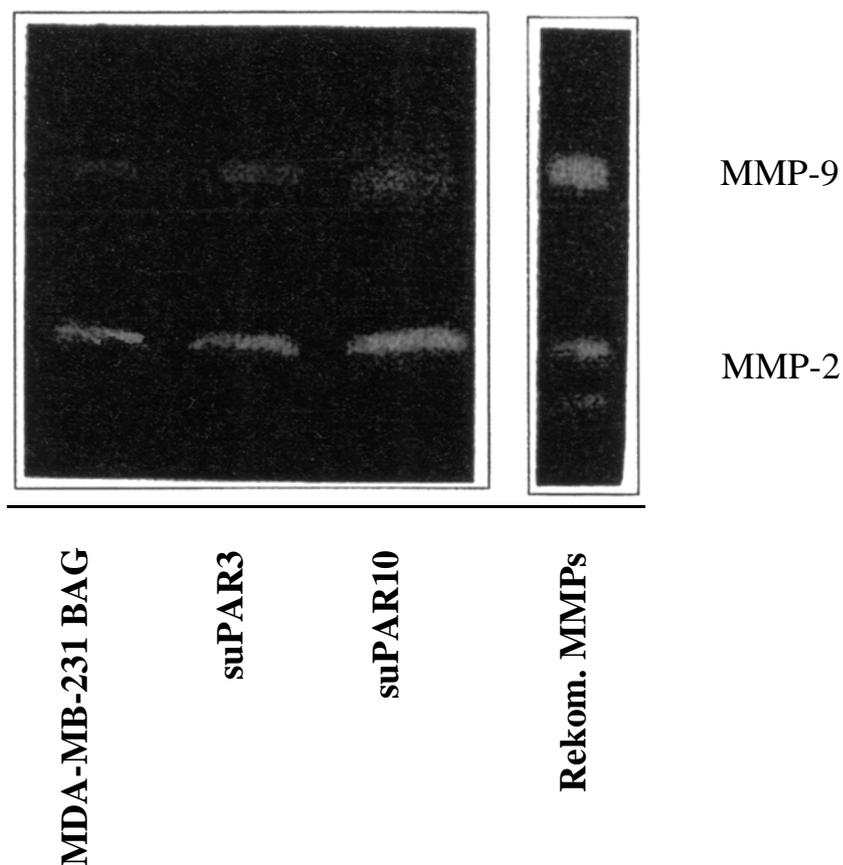


Abbildung 6:

Zymografie von Überständen von jeweils 2×10^4 Zellen der parentalen Zelllinie MDA-MB-231 BAG und der beiden mit dem löslichen uPAR transfizierten Varianten suPAR3 und suPAR10. Es dokumentiert die Sekretion von MMP-2 und MMP-9. Rekombinantes MMP-2 und MMP-9 wurde als Standard verwendet (rechts).

Zusätzlich wurde die Menge an produzierten MMPs nach 24stündiger Inkubation mit den Inhibitoren Aprotinin, Batimastat und deren Kombination (siehe Abbildung 7) bestimmt. Es wurden die parentale Zelllinie MDA 231 BAG und die transfizierte Zelllinie suPAR3 über 24h unter Anwesenheit der Inhibitoren inkubiert und anschließend die Menge an MMP-2 und MMP-9 im Medium bestimmt. Es konnten keine Unterschiede bezüglich der Menge an MMP-2 und MMP-9 nachgewiesen werden. Es zeigt sich also, dass eine Überexpression des löslichen uPAR nicht eine erhöhte MMP Produktion zur Folge hat. Des Weiteren hat die Anwesenheit spezieller Inhibitoren wie oben beschrieben bei keiner der Zelllinien eine Auswirkung auf die produzierte Menge an MMP-2 und MMP-9. Bezüglich der Effektivität der Inhibitoren ist bei diesem Experiment keine Aussage zu erwarten, da während der Elektrophorese über die SDS PAGE die Protease-Inhibitor Bindung wieder aufgespaltet wird.

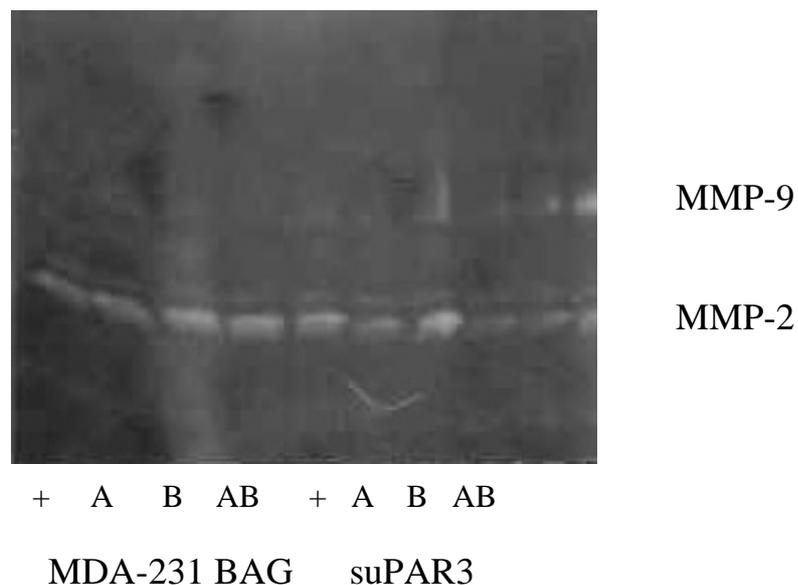


Abbildung 7:

Zymographie von Zellüberständen der parentalen Zelllinie MDA-MB-231 BAG und der suPAR transfizierten Zelllinie suPAR3. Es wurde jeweils der Überstand von 2×10^4 Zellen nach 24h Inkubation aufgetragen.

+ bedeutet ohne Anwesenheit von Inhibitoren, A: Aprotinin, B: Batimastat, AB: Aprotinin und Batimastat; die beiden rechten Reihen enthalten rekomb. MMP-2 und MMP-9

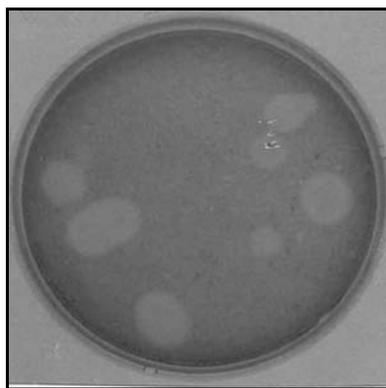
4.3. Nachweis der Proteasenaktivität der humanen Mammakarzinomzelllinie in Lebendzellassays

4.3.1. Reduzierte caseinolytische Aktivität der suPAR Zelllinien

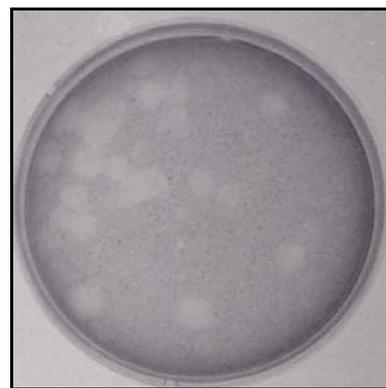
Die nachgewiesene Menge an Proteasen sagt nichts über ihre Aktivität und auch nichts über die Funktionsfähigkeit eines Inhibitors aus. In Anbetracht der geplanten Tierexperimente wollten wir die tatsächliche Aktivität der sezernierten Proteasen überprüfen und die Funktion der Inhibitoren unter kontinuierlicher Proteasenproduktion durch die Zelle testen. Die Aktivität von uPA und die Wirksamkeit der uPA-Inhibitoren kann mit dem Caseinolytischen Plaque Assay nachgewiesen werden.

In Anwesenheit von Plasminogen bilden sich bei diesem Assay rund um einzelne Zellkolonien lytische Plaques, da das Plasminogen durch das von der Zelle produzierte uPA in Plasmin gespalten wird und dies wiederum das Casein abbaut.

Der Vergleich der Plaques von MDA-MB-231 BAG und suPAR3 zeigte, dass die Plaques der mit dem löslichen uPAR transfizierten Zelllinie kleiner sind und zum anderen bei im Vergleich zur parentalen Zelllinie, gleicher Anzahl Zellkolonien deutlich weniger Plaques entstehen (Abbildung 8).



MDA-MB-231 BAG



3suPAR

Abbildung 8: Caseinolytischer Plaque Assay über Einzelzellkolonien der beiden Zelllinien in Anwesenheit von Plasminogen, nach 18h Inkubation bei 37°C. Nach proteolytischer Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin spaltet dies das in der Agarose vorhandene Casein. Dadurch entsteht ein gut sichtbarer klarer Hof rund um die Zellkolonien. Der Assay erfolgte sobald die Zellkolonien eine Größe von ca. 3 mm hatten.

In Zahlen ausgedrückt entstehen in Anwesenheit von Plasminogen bei 70 ± 5 % der Ausgangszelllinie und bei 50 ± 4 % von suPAR3 lytische Plaques. In Abwesenheit von Plasminogen lassen sich keine Plaques nachweisen

4.3.2. Caseinolytische Aktivität wird durch Aprotinin gehemmt

Sobald gleichmäßig große Zellkolonien der Tumorzellen gewachsen waren wurde die, das Plasminogen und die jeweiligen zu testenden Inhibitoren enthaltende Agarose gleichmäßig über die Zellen gegossen Auch hier kam es ohne Anwesenheit von Plasminogen zu keinerlei Plaquebildung. In Anwesenheit von Aprotinin wird bei allen getesteten Zelllinien die Plaqueentstehung vollständig gehemmt. Die Zugabe von Batimastat oder Marimastat hat andererseits auf die Anzahl und Größe der Plaques überhaupt keinen Einfluss, so dass das uPA System auch bei partiell inhibiertem MMP System unbeeinträchtigt zu funktionieren scheint. Es erfolgte auch der Versuch einer Kombinationstherapie mit Aprotinin und Batimastat. Wie man nach den Ergebnissen mit Aprotinin alleine erwarten konnte, fanden sich keinerlei lytische Plaques (Abbildung 9).

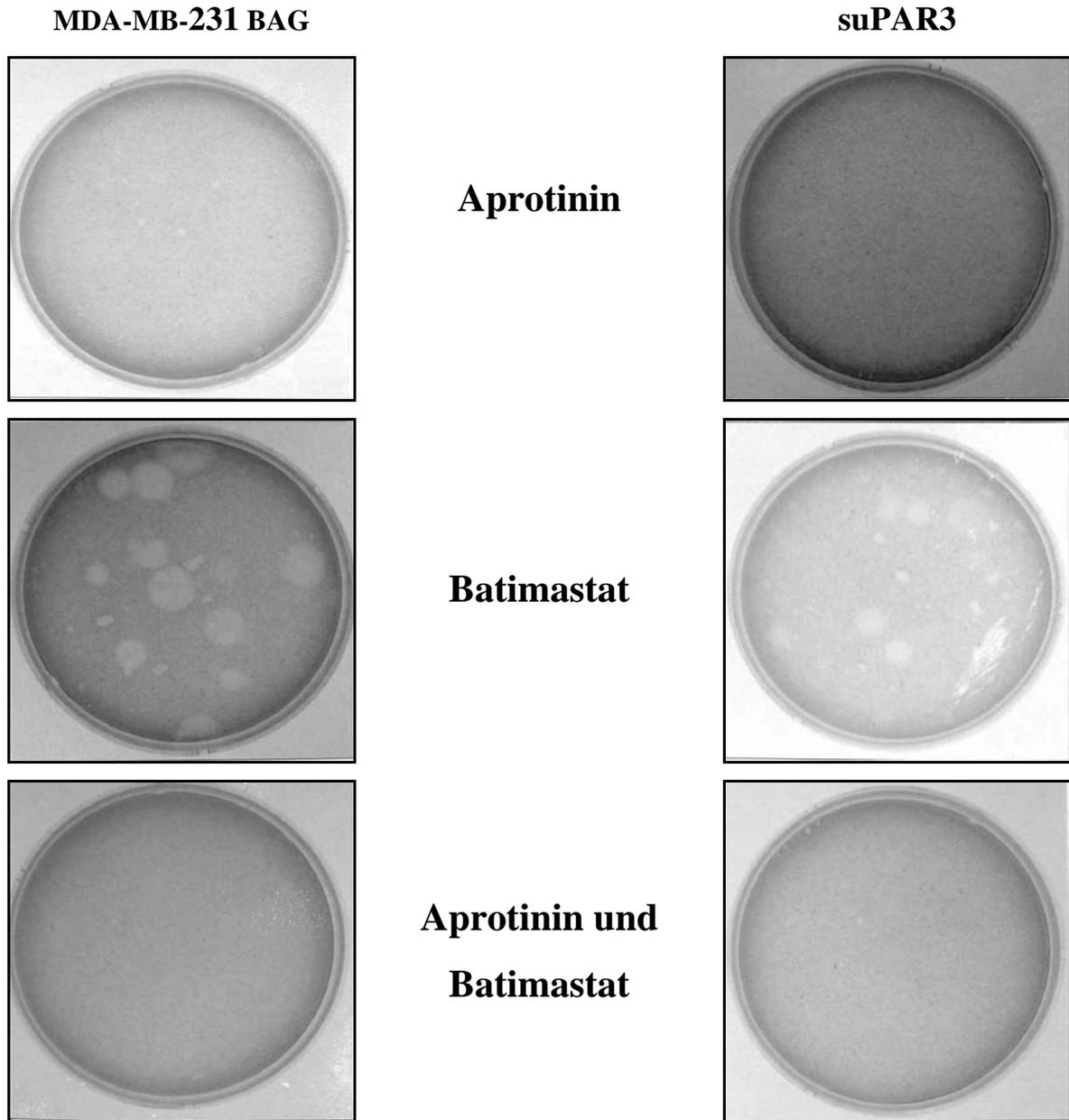


Abbildung. 9: Caseinolytischer Plaque Assay mit Inhibitoren (Aprotinin, Batimastat) in Anwesenheit von Plasminogen. Es wurden die Inhibitoren einzeln und in Kombination gleichmäßig unter die Agarose gemischt, Inkubation ca. 18h bei 37°C.

Basierend auf der neuen Methode des Kollagen-Fluoreszenz-Assays erfolgte analog zum Caseinolytischen Plaque Assay der Einsatz von fluoreszente Casein, wobei auch hier der Anstieg der Fluoreszenz direkt proportional zur Proteasenaktivität ist. Es zeigte sich wie in Abbildung 10 gezeigt eine Hemmung der caseinolytischen Aktivität um 60 % (suPAR3), bzw. 56 % (suPAR10) durch die Überexpression von suPAR in Gegenwart von Plasminogen. Ohne Plasminogen war die caseinolytische Aktivität der parentalen Zellen um ca. 70 % reduziert und die Überexpression an suPAR bewirkte eine zusätzliche Reduktion der proteolytischen Aktivität um ca. 40 %. Unter Einsatz von Aprotinin konnte keine wesentliche caseinolytische Aktivität bei der Ausgangszelllinie und ihren transfizierten Varianten mehr festgestellt werden. Batimastat hatte keinen Einfluß.

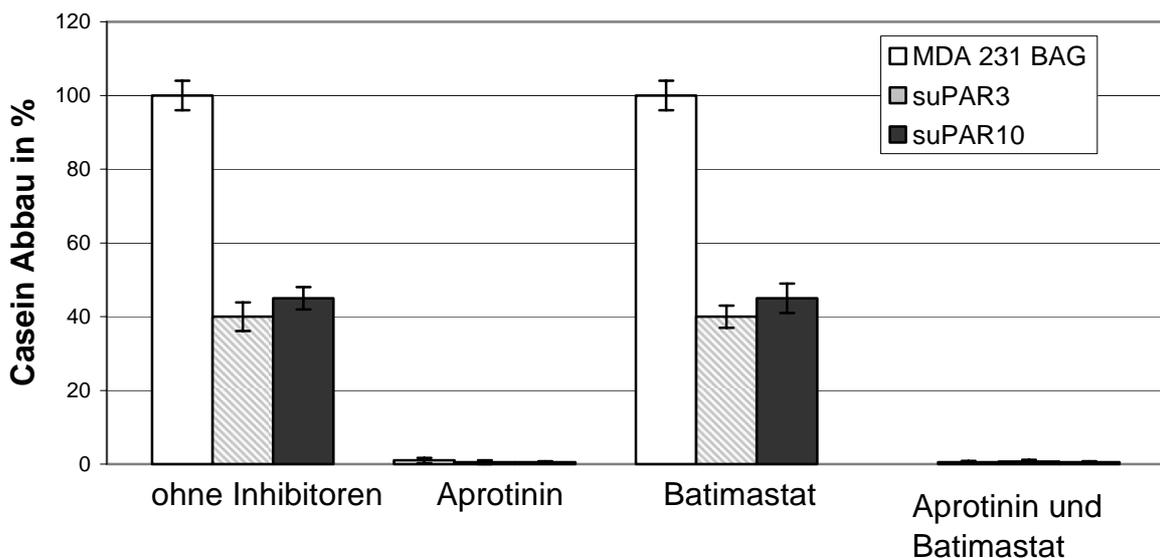


Abbildung. 10: Casein-Fluoreszenz-Assay mit Inhibitoren (A=Aprotinin, B=Batimastat) in Anwesenheit von Plasminogen. Messung nach 24h Inkubation bei 37°C. Die maximale Aktivität der Ausgangszelllinie wird mit 100% gleichgesetzt.

4.3.3. Kollagenaseaktivität von MDA-MB 231 BAG und ihren suPAR transfizierten Varianten

Zum Nachweis der Kollagenaseaktivität von lebenden Zellen wurde ein neuer Lebendzell-Assay entwickelt. Die Proteasen, die von den lebenden Zellen kontinuierlich während des Experiments abgegeben werden bewirken eine Spaltung des Kollagens Typ IV. Dieses Kollagen ist mit einem speziellen fluoreszierenden Farbstoff markiert, der durch die Spaltung des Kollagens seine fluoreszierende Aktivität erst richtig entfalten kann. Dabei ist der Fluoreszenzanstieg direkt proportional mit der Kollagen Degradation durch Kollagenasen. Die Überexpression von löslichem uPAR führte zu einer 30 %igen (suPAR3), bzw. zu einer 27 %igen (suPAR10) Reduktion der Kollagenaseaktivität der Tumorzellen, in Anwesenheit von Plasminogen (siehe Abbildung 11). Ohne Plasminogen war die Kollagenaseaktivität von allen drei Zelllinien um ca. 90 % reduziert und es zeigte sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien.

4.3.4. Kollagenaseaktivität der zwei Tumorzelllinien unter zusätzlichem Einsatz von synthetischen Proteaseinhibitoren

Ziel dieses Experimentes, war es zu überprüfen, ob Batimastat, als ein Gelatinaseinhibitor einen Effekt auf die proteolytische Aktivität der Zelllinien (MDA-MB-231 BAG, suPAR3 und suPAR10) hat. Alle drei Zelllinien wurden mit dem DQ-Collagen Typ IV in An- und Abwesenheit von Batimastat, bzw. auch von Aprotinin und deren Kombination inkubiert. Nach 24h führte Batimastat zu einer 20 %igen Reduktion der proteolytischen Aktivität der parentalen Tumorzelllinie und zu einer 45 %igen Reduktion der suPAR transfizierten Zelllinie suPAR3 (siehe Abbildung 11). Es zeigte sich also ein synergistischer Effekt von Batimastat und dem suPAR. Die Zugabe von Aprotinin einzeln oder in Kombination mit Batimastat bewirkte eine Reduktion der proteolytischen Aktivität der drei Zelllinien von über 90 %. Es zeigte sich also, dass eine Inhibition des Plasminaktivierungssystems auch eine große Auswirkung auf das Metalloproteinasesystem hat. bzw. Plasmin in der Degradation von Kollagen Typ IV auch eine Rolle spielt.

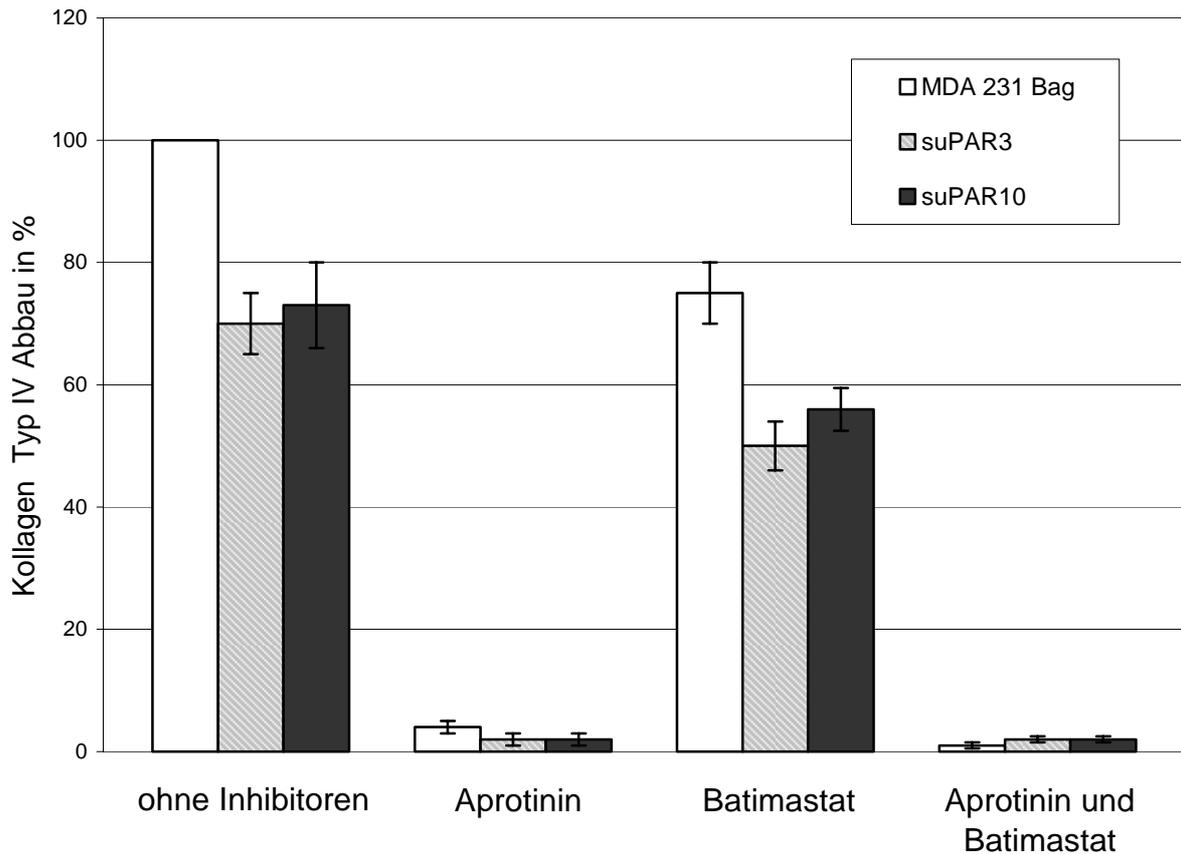


Abbildung 11: Proteolytische Aktivität der lebenden Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 BAG und ihrer transfizierten Varianten suPAR3 und suPAR10. Die lebenden Zellen werden mit einem speziell fluoreszenzmarkierten Kollagen Typ IV inkubiert und der Anstieg der Fluoreszenz ist direkt proportional zur Proteasenaktivität. Die maximale Aktivität der Ausgangszelllinie nach 24h wird dabei als 100 % genommen.

4.4. Ergebnisse des Metastasierungsmodells *in vivo*

4.4.1. Reduzierte experimentelle Metastasierung der suPAR transfizierten Mammakarzinomzellen

Nach den *in vitro* Ergebnissen sollte der Vergleich der einzelnen Zelllinien bezüglich ihres Primärtumorwachstums und ihrer Metastasierung *in vivo* erfolgen und auch die Wirksamkeit eines synthetischen Inhibitors, wie Batimastat im Tierexperiment überprüft werden. Es wurden zwei unabhängige Experimente geplant. Im ersten Versuch wurden die parentale Zelllinie MDA-MB-231 BAG und die stark den löslichen uPAR

überexprimierende Zelllinie suPAR3 verwendet. Für den Wiederholungsversuch wurde dann zusätzlich die Zelllinie suPAR10, eine den löslichen uPAR mittelmäßig überexprimierende Zelllinie ausgewählt. Damit sollte ein Einblick gewonnen werden, in wie weit die suPAR Menge eine Rolle spielt, oder ob das System völlig übersättigt ist, bzw. eine weitaus geringere Menge an suPAR längst ausreicht. Hierzu wurden 1×10^6 Zellen der jeweiligen Zelllinie in die Schwanzvene der Nacktmaus injiziert. Die Lungen der Mäuse wurden mit X-Gal gefärbt, um die Metastasen sichtbar zu machen. Es fanden sich (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13) in den mit suPAR3 und suPAR10 injizierten Mäuselungen deutlich weniger Metastasen (4/17 bei suPAR3; 3/10 bei suPAR10; 13/18 bei der parentalen Zelllinie MDA-MB-231 BAG). Lebermetastasen fanden sich nicht.

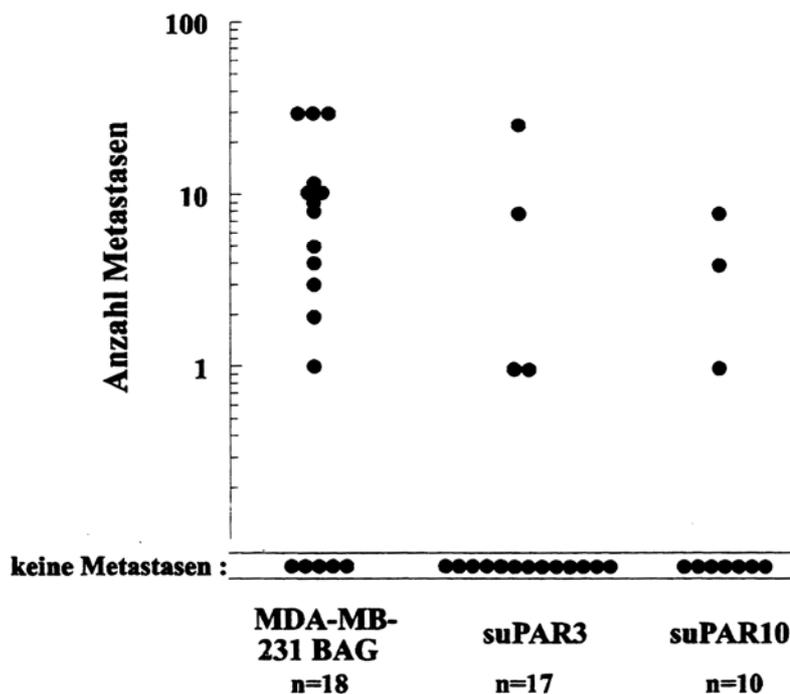


Abbildung 12: Effekt der Überexpression von löslichem uPAR auf die experimentelle Lungenmetastasierung. Die Anzahl der Metastasen wurde logarithmisch aufgetragen. Jeder Punkt entspricht der Metastasenanzahl in einer Lungenhälfte



Abbildung 13: Lungenhälften der Nacktmäuse des ersten Tierexperiments:

- a) Mäusegruppe, die mit der parentalen Zelllinie MDA-MB-231 BAG i.v. inokuliert wurden, nach X-Gal Färbung

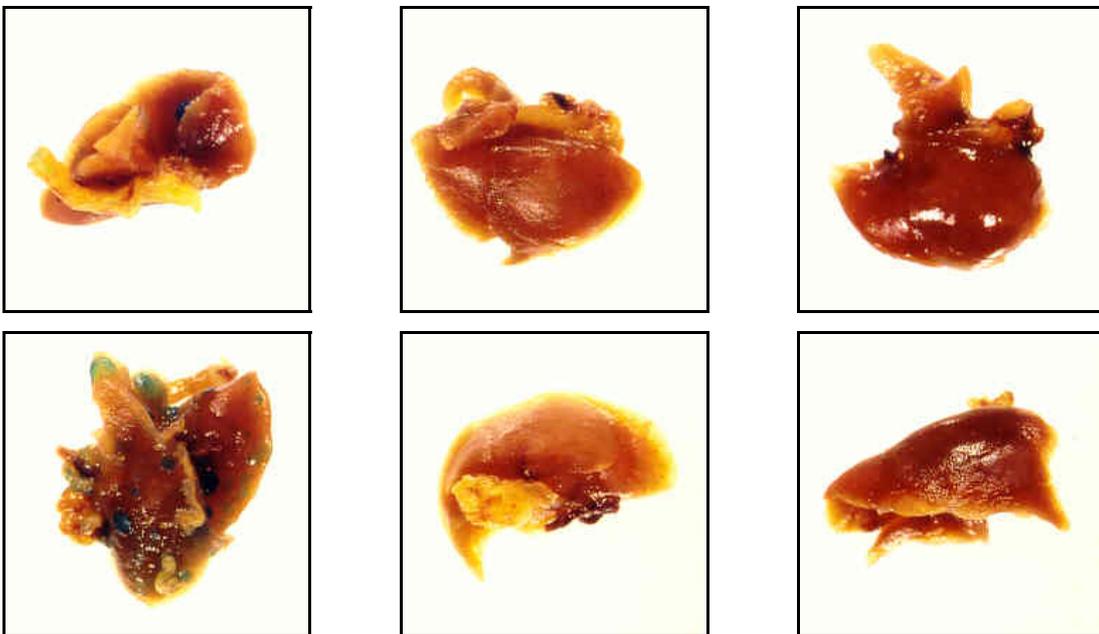


Abbildung 13:

- b) Lungenhälften aus mit suPAR3 injizierten Mäusen. Diese Lungenhälften zeigten makroskopisch und mikroskopisch deutlich weniger Metastasen, nach X-Gal Färbung

Überprüft man die Daten mit dem Kruskal-Wallis Test für nicht normalverteilte Daten zeigt sich, dass sich die drei Gruppen signifikant voneinander unterscheiden ($p = 0,0032$). Die Anwendung der Dunn Methode, einer nicht parametrischen paarweisen Vergleichsmethode ergab, dass sich die Gruppen suPAR3 ($p < 0,05$) und suPAR10 ($p < 0,05$) signifikant von der parentalen Kontrollgruppe unterscheiden.

4.4.2. Reduziertes orthotopes Wachstum der suPAR transfizierten Tumorzellen

Zum Vergleich des Primärtumorwachstums erfolgte die orthotope Injektion von 2×10^6 Tumorzellen zunächst von der parentalen Zelllinie MDA-MB-231 BAG und von suPAR3 in das perimammäre Fettgewebe der rechten Milchleiste. Im 2. Experiment wurde zusätzlich zu den beiden Zelllinien noch suPAR10 als Kontrolle injiziert. Nach 10 Tagen konnte man ein erstes subkutanes Tumorwachstum beobachten und dokumentieren. Es erfolgte ein regelmäßiges Messen der Tumordurchmesser (siehe Abbildung 14). Im ersten Experiment (7 Mäuse pro Gruppe) war nach 30 Tage der Tumordurchmesser der suPAR3 Gruppe um 40 % reduziert ($4,6 \text{ mm} \pm 0,42$, im Vergleich zu $7,8 \text{ mm} \pm 0,6$). Gegen Ende des Experimentes, am Tag 51 war der Tumordurchmesser des suPAR3 Tumors noch um 21 % reduziert ($7,9 \text{ mm} \pm 1,45$ bei suPAR3 und $9,9 \text{ mm} \pm 1,1$ bei der parentalen Zelllinie).

Im zweiten Experiment wurde ähnlich dem i.v. Metastasierungsexperiment zusätzlich die Zelllinie suPAR10 orthotop in die Milchdrüse injiziert. SuPAR10 produziert ungefähr eine Drittel der suPAR Menge, die suPAR3 bildet. Durch dieses zusätzliche Experiment sollte getestet werden, ob gerade beim Primärtumorwachstum die suPAR Mengen ab einer gewissen Höhe ausreichen und sich kein zusätzlicher Effekt mehr erzielen lässt. 10 Tage nach der Injektion von jeweils 2×10^6 Tumorzellen, konnte mit dem Vermessen des Primärtumors begonnen werden. Ab Tag 21 zeigte sich ein erster Effekt. Die Tumorgößen waren bei suPAR3 um 13 % geringer und um 19 % in der suPAR10 Gruppe. Nach 35 Tagen war das Maximum erreicht. In beiden suPAR transfizierten Zelllinien waren die Primärtumore um ca. 30 % kleiner. Am Tag 52 waren die suPAR3 Tumore um 39 %

kleiner, die suPAR10 Tumore noch um 24 %, im Vergleich zur parentalen Zelllinie MDA-MB-231 BAG.

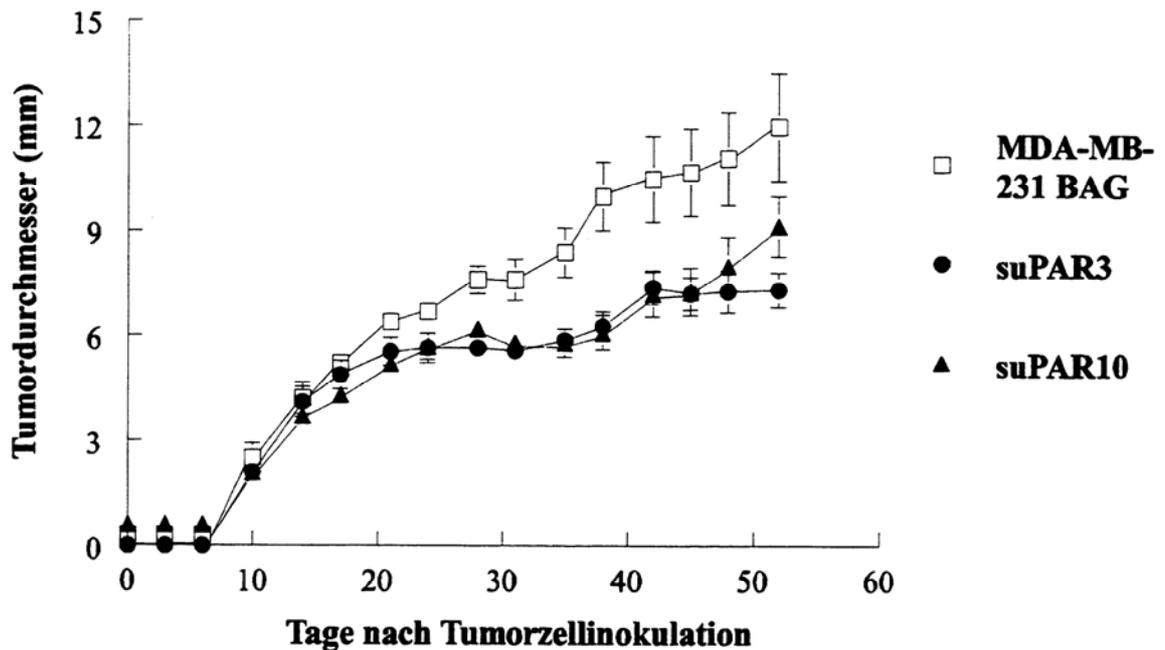


Abbildung 11: Darstellung des Wachstumsverlaufs der Primärtumoren von der parentalen Zelllinie MDA-MB-231-BAG und der transfizierten Zelllinien suPAR3 und suPAR10 (2. Experiment). Durch die Überexpression des löslichen uPAR ist das Tumorwachstum deutlich vermindert. Die von der suPAR10 produzierte Menge an löslichem uPAR scheint auszureichen um das System abzusättigen.

Nach ca. 52 Tagen wurden die Mäuse getötet. Die Primärtumore wurden zur Hälfte X-Gal gefärbt und aus der anderen Hälfte wurde ein Gewebeaufschluss gemacht und daraus wiederum per ELISA die uPAR-Menge gemessen. Es fanden sich hohe Mengen an suPAR in den Tumoren der suPAR3 transfizierten Zelllinien ($280,9 \pm 76,6$ ng uPAR/mg Gesamtprotein) im Vergleich zu den Primärtumoraufschlüssen der parentalen Zelllinie ($1,46 \pm 0,3$ ng uPAR/mg Gesamtprotein). Man kann also von einer stabilen suPAR Produktion auch im Tiermodell ausgehen. Eine spontane Metastasierung lies sich nicht nachweisen. Alle Lungen wurden X-Gal gefärbt, zeigten aber keine Metastasen.

4.5. Induktion von Lebermetastasen *in vivo* durch die zusätzliche Batimastatinjektion

Wie bereits *in vitro* sollte nun auch *in vivo* ein möglicher synergistischer Effekt des löslichen uPAR und Batimastat, als Matrixmetalloproteinaseinhibitor nachgewiesen werden. Hierzu wurden zusätzlich zu oben beschriebenem Tierexperiment bei einer Gruppe von Nacktmäusen, die entweder 1×10^6 MDA-MB-231 BAG Zellen oder die gleiche Anzahl suPAR3 Zellen in die Schwanzvene injiziert bekommen hatten, täglich eine standardisierte Dosis Batimastat (30 mg/kg) intraperitoneal injiziert.

Nach 52 Tagen erfolgte die Isolation der Organe. Wie erwartet fanden sich Lungenmetastasen, die durch die Batimastatbehandlung nur geringfügig reduziert wurde.

Allerdings konnte in einer signifikanten Anzahl der Batimastatbehandelten Mäuse ein Neuauftreten von Lebermetastasen beobachtet werden. Von den Mäusen, die die parentale Zelllinie MDA-MB-231 BAG i.v. und zusätzlich täglich Batimastat i.p. injiziert bekommen haben, zeigten 5 von 6 Mäusen Lebermetastasen (Abbildung 15)

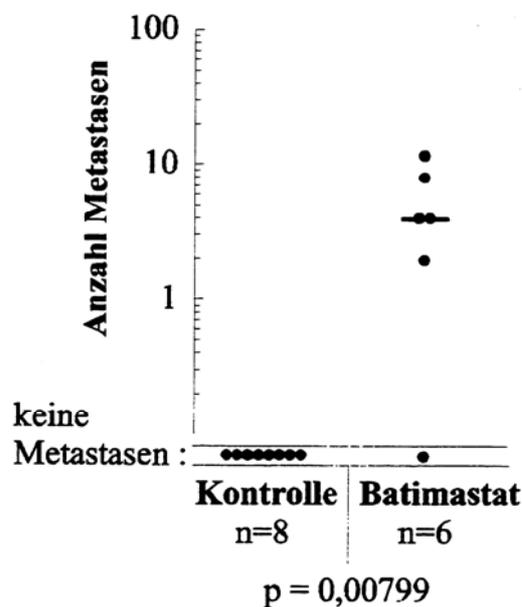


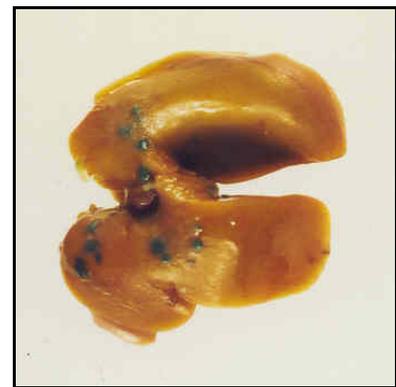
Abbildung 15: Effekt von Batimastat auf die experimentelle Metastasierung von human Mammakarzinomzellen in der Nacktmaus. Die Anzahl der X-Gal gefärbten Metastasen in der Kontrollgruppe (Kontrolle= MDA-MB-231 BAG Zellen ohne Batimastatbehandlung) und in der mit Batimastat behandelten Gruppe (Batimastat) wurde logarithmisch aufgetragen. Jeder Punkt entspricht der der Anzahl an gefundenen Metastasen in der Leber. Der Balken gibt den Median an. Die statistische Analyse erfolgte nach Mann-Whitney.

In der Gruppe der mit suPAR infizierten Mäuse fanden sich bei gleichzeitiger Batimastatinjektion bei 4 von 7 Mäusen Lebermetastasen. Die Metastasenanzahl zeigt die gleiche Tendenz. Die mittlere Anzahl an Lebermetastasen der parentalen Zelllinie liegt bei ca. 9 Metastasen. In der suPAR transfizierten Gruppe fanden sich im Durchschnitt nur ca. 4,5 Metastasen pro Mäuseleber.



ohne Batimastat

MDA-MB-231 BAG



mit Batimastat



ohne Batimastat

suPAR3



mit Batimastat

Abbildung 16: Induktion von Lebermetastasen durch die Behandlung mit Batimastat. Nach Beendigung des Tierexperiments wurden die Lebern, bis auf eine kleine Probe, die für Gewebeextrakte gefroren wurde X-Gal gefärbt. Die nicht mit Batimastat behandelten Mäuse zeigten keine Lebermetastasen.

5 Diskussion

5.1. Inhibition von Tumorwachstum und Metastasierung durch den löslichen uPA-Rezeptor

Die Spaltung der Extrazellulären Matrix scheint entscheidend für die Invasion und die Metastasierung der Krebszellen zu sein. Besonders wichtig ist das Zusammenspiel der Proteasen und hier spielen die Serinprotease Plasmin und einige Matrixmetalloproteinasen eine entscheidende Rolle. Die Aktivitäten dieser Proteasen sind durch viele Faktoren, wie Aktivatoren, Inhibitoren und zellständige Rezeptoren beeinflusst. Außerdem existiert ein komplexes Zusammenspiel zwischen den Tumorzellen und den nicht malignen Stromazellen in der Entwicklung und Regulation der extrazellulären Proteolyse (Dano, 1999).

Grundlage für diese Arbeit war unter anderem die Aussage, dass uPA und der uPAR einen großen Einfluss auf die Zellmigration haben und die Oberflächenproteolyse, Zelladhäsion und Chemotaxis regulieren (Blasi, 1999), also entscheidend am Invasions- und Metastasierungsprozess einer Krebszelllinie teilhaben.

In den Experimenten mit der den lösliche uPAR überexprimierende Zelllinie MDA-231 BAG 3suPAR konnte nun erstmals sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass durch die das uPA abfangende Funktion des löslichen uPA-Rezeptors sowohl das Tumorwachstum, als auch die Fernmetastasierung signifikant reduziert war. Durch den perizellulär frei flotierenden suPAR wird uPA abgefangen ohne dass die proteolytische Cascade aktiviert wird. Erst wenn das uPA an den membranständigen Rezeptor binden würde, wird es aktiviert und diese Aktivierung wiederum würde eine Umwandlung von Plasminogen zu der potenten Serinprotease Plasmin bewirken.

Dies ist für das Serinproteasensystem *in vivo* ein neuer Ansatz. Bis jetzt erfolgten in erster Linie Experimente mit extern zugeführten Antikörpern, bzw. mit natürlichen (Bajou *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1995; Krüger *et al.*, 1998) und synthetischen (Della Porta *et al.*, 1999) Inhibitoren gegen uPA und den uPAR, welche direkt mit der enzymatischen Aktivität der Proteasen interagieren. So bewirken auch uPAR-Antagonisten eine drastische Reduktion der Metastasierungsfähigkeiten, des Wachstums und der Vaskularisierung von Tumorzellen (Crowley *et al.*, 1993; Min *et al.*, 1996).

Auch die Inhibition von uPA oder uPAR durch antisense-RNA reduziert deutlich die Tumordinvasivität (*Kook et al., 1994*). Tressler et al. zeigten ebenfalls mit der humanen Mammakarzinomzelllinie MDA 231 unter Einsatz eines Urokinase Rezeptor Antagonisten für humane und murine Urokinase eine signifikante Inhibition des Primärtumorwachstums (human: 50% Reduktion, murin: 59% Reduktion). Dies ist ein Hinweis darauf dass *in vivo* sowohl das Plasminogenaktivierungssystem des Tumors, sondern auch das der Stromazellen eine Rolle spielt. Dies ist ein Ansatz der bezüglich des suPAR noch zu prüfen wäre.

Inzwischen konnte auch für eine humane Ovarialkarzinomzelllinie, die ebenfalls den löslichen uPAR überexprimiert nach intraperitonealer Injektion in die Nacktmaus eine Reduktion des intraperitonealen Wachstums der Tumorzellen (Tumormenge) und Streuung gezeigt werden (*Lutz et al., 2001*).

In vitro konnte gezeigt werden, dass sich die Mengen an Proteasen der parentalen Zelllinie und der beiden suPAR transfizierten Zelllinien nicht unterscheiden. Eine Überexpression an suPAR hat also beispielsweise nicht sofort eine Hochregulierung der uPA-Menge zur Folge. Die Effektivität der von den Tumorzellen der transfizierten Zelllinien (3suPAR und 10suPAR) gebildeten Proteasen war jedoch deutlich geringer im Vergleich zur parentalen Zelllinie. So zeigte der caseinolytische Plaque Assay der 3suPAR Linie deutlich weniger und vor allem deutlich schwächere Plaques als die Kolonien der Ausgangszelllinie. Der extra für diese Arbeit entwickelte Collagen Fluoreszenz Assay bestätigte die Ergebnisse auch für die Collagenaseaktivität der Zelllinien.

Diese gezeigten *in vitro* Ergebnisse weisen darauf hin, dass uPA weniger effizient an den membranständigen uPAR bindet und durch die somit verminderte Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin der ursprüngliche Abbau der EZM nicht mehr möglich ist. Der in den stabil transfizierten Zelllinien suPAR3 und suPAR10 stark überexprimierte lösliche uPAR hemmt bzw. unterbindet indirekt die proteolytische Aktivität da er einen Mangel an Substrat hervorruft. Gleichzeitig muss man davon ausgehen, dass die mangelnde Plasminaktivität, bzw. die reduzierte Menge an am membranständigen uPAR aktiviertem uPA eine Reduktion der Aktivierung von MMP-2 und MMP-9 zur Folge hat (*Mazzieri et al., 1997; Baramova et al., 1997*). Ähnliche *in vitro* Ergebnisse zeigten ebenfalls mit der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 BAG unter Zuführung spezifischer Antikörper gegen uPA und uPAR eine dosisabhängige stark reduzierte Invasion der Tumorzellen im

Invasion assay. Ähnliche Ergebnisse finden sich auch für die weniger uPA produzierende Zelllinie MDA 435 BAG (*Holst-Hansen et al., 1996*).

Alle drei Zelllinien (MDA-MB-231-BAG, 3suPAR und 10suPAR) zeigten *in vitro* die gleichen Wachstumskurven; die Zellproliferation war also unverändert. *In vivo* war das Wachstum der Primärtumore jedoch signifikant reduziert. Die Schlussfolgerung daraus kann sein, dass das Tumorstadium in der immundefizienten Maus nicht nur von der Proliferationsrate der Zelllinie abhängt, sondern auch von Faktoren wie Migration, Proteolyse, Chemotaxis und wahrscheinlich entscheidend von der Vaskularisation der Zellansammlungen.

Auch die Arbeitsgruppe um Rabbani konnte zeigen, dass eine den membranständigen uPAR überexprimierende Mammakarzinomzelllinie in die Milchleiste von Ratten injiziert, die zusätzlich mit einem polyklonalen Antikörper gegen den uPAR behandelt wurden, eine reduzierte Primärtumorgröße und weniger Metastasen als die Kontrollgruppe entwickelten. Der histologische Vergleich erbrachte in der mit dem Antikörper behandelten Gruppe eine erhöhte Tumornekrose, als Zeichen einer verstärkten Apoptose (*Rabbani et al. 2002*).

Im Gegensatz dazu konnten Xing et al an einer Rattenmammakarzinomzelllinie *in vivo* zeigen, dass es durch Überexpression des membranständigen uPAR zu gesteigerter Invasion, schnellerem Primärtumorwachstum und ausgedehnterer Metastasierung (Leber, Milz, Lymphknoten) kommt (*Xing et al., 1996*).

Es fanden sich in der Gruppe der mit den suPAR-überexprimierenden Mammakarzinomzellen injizierten Mäuse deutlich weniger Lungenfiliae, als bei der parentalen Zelllinie. Dabei handelt es sich um eine experimentelle Metastasierung. Die eigentlich ersten Schritte wie Migration einzelner Zellen vom Primärtumor und Intravasation werden übersprungen. Es wird nur der zweite Teil der Metastasierung, also Überleben und Transport im Gefäßsystem, Arrest im Kapillarsystem eines Organs, Extravasation, Zellproliferation und Neoangiogenese (*Chambers et al., 1997*) simuliert. Auch hier scheint das reduzierte Vorhandensein von aktiviertem Plasmin als Folge der Überproduktion des löslichen uPAR einen entscheidenden Einfluss zu haben. Welche Mechanismen hierdurch nur eingeschränkt funktionieren bleibt noch zu Erforschen. Den Hinweisen nach ist es wohl am ehesten die Extravasation, also das Durchwandern der Endothelzellen, die Neoangiogenese (*Mazar, 2001*) und die Chemotaxis (*Blasi, 1999*).

Warum trotzdem einige Lungenmetastasen trotz suPAR-Überexpression auftraten ist noch nicht geklärt, hängt aber vielleicht mit der Möglichkeit der Tumorzellen uPA auch ohne den uPAR an anderen Bindungsstellen an der Zelloberfläche zu aktivieren zusammen (Longstaff *et al.*, 1999).

In der Zelllinie 3suPAR ist die Menge an löslichem uPAR 523-fach erhöht, bei suPAR10 immerhin noch 209-fach im Vergleich zur Ausgangszelllinie. Trotz dieser ca. 40% reduzierten Menge an löslichem uPAR ist zwischen den beiden Zelllinien kein großer, bzw. signifikanter Unterschied in der Hemmung der Proteasenaktivität zu sehen. Es handelt sich wahrscheinlich um ein absättigbares System und es könnten noch weitere Zelllinien mit noch deutlich weniger Mengen an suPAR getestet werden.

5.2. Kombinationstherapie, zur gleichzeitigen Inhibition des uPA- und des MMP-Systems

In den ersten Experimenten dieser Arbeit ging es darum, zunächst *in vitro* die Effizienz der einzelnen Inhibitoren wie Aprotinin und Batimastat, indirekt aber auch den löslichen uPAR, als im weiteren Sinne von der Zelle selbst produzierten Inhibitor bezüglich ihrer Wirksamkeit zu testen. Durch die einzelnen Inhibitoren sollten jeweils die Serinproteasen oder die Matrixmetalloproteinasen gehemmt werden und somit eine Reduktion der proteolytischen Aktivität der Zellen, gleichbedeutend mit einer Reduktion der Metastasierungsfreudigkeit und der Invasivität der Tumorzellen erreicht werden. Es wurde zum einen die Bedeutung der Proteasensysteme einzeln, aber auch in Kombination untersucht. Zur gleichzeitigen Anwendung von Inhibitoren gegen das Serinproteasensystem und gegen das Metalloproteinasensystem gibt es kaum Studien (Della Porta *et al.*, 1999).

Zur Inhibition einzelner Proteasen gibt es auch in der Sparte der MMPs einige *in vivo* Studien. So konnte gezeigt werden, dass eine TIMP-4 transfizierte humane Mammakarzinomzelllinie (MDA 435) ein signifikant reduziertes Primärtumorvolumen hatte und auch deutlich reduzierte Lungen- und Lymphknotenmetastasen bildete (Wang *et al.*, 1997).

Zunächst konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von diversen Inhibitoren, bzw. durch die Überproduktion an löslichem uPAR die von der Zelle exprimierten Mengen der

einzelnen Proteasen nicht verändert werden. In den Experimenten zur Bestimmung der Proteasenmenge (ELISA, Zymogramm) werden sowohl gebundene, als auch ungebundene Enzyme registriert, bzw. wird während der Elektrophorese die Enzym/Inhibitor, bzw. Enzym/Rezeptor-Bindung getrennt. Die Menge an Proteasen bleibt gleich, es kommt also zu keiner Hoch- oder Herunterregulierung der inhibierten Protease bzw. auch nicht zu einer Veränderung der Proteasenmenge in einem anderen der untersuchten Systeme. Es wäre ja durchaus anzunehmen, dass das Tumorzellsystem auf die Inhibition eines bestimmten Stoffes mit der Hochregulierung einer ähnlich wirkenden anderen Protease reagiert.

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass eine humane Mammakarzinomzelllinie (MDA-435), orthotop in das perimammäre Fettgewebe einer Maus injiziert, bei zusätzlicher Batimastatinjektion i.p. zwar langsamer wächst, es aber keinesfalls zu einer Tumorrückbildung kommt. Bei der Ursachenforschung stellte sich heraus, dass es zu keiner Up-Regulation des humanen uPA der Tumorzellen kam, jedoch zu einer deutlichen Mehrproduktion des murinen uPA der Stromazellen (*Holst-Hansen et al., 2001*).

Die von uns verwendeten Inhibitoren wie Aprotinin und Batimastat wurden bereits von mehreren Arbeitsgruppen bezüglich ihrer Wirksamkeit und Toxizität *in vitro* und *in vivo* untersucht (*Mazzieri et al., 1997; Della Porta et al., 1999*).

Gerade die Kombination eines Matrixmetalloproteinaseinhibitors mit einem Serinproteainhibitor diente zur Überprüfung der Interaktion beider Proteasensysteme. So zeigte Mazzieri et al., dass Plasmin MMP-2 und MMP-9 aktiviert, wobei der membranständige uPA/uPAR-Komplex die beschleunigende Rolle spielt. Diese hier beschriebene Wirkung von Plasmin und uPA in der Aktivierung der MMPs kann unsere Ergebnisse, nämlich dass Aprotinin, welches auf die aktivierten MMP-2 und MMP-9 keinen inhibitorischen Effekt hat und trotzdem den Abbau von Fluorescein markiertem Kollagen Typ IV im Collagenaseassay zu einem sehr großen Prozentsatz hemmt, erklären. Allerdings gibt es auch Studien, die zeigen, dass uPA und Plasmin auch direkt am Abbau von Kollagen Typ IV beteiligt sein können. (*DeClerck et al., 1996*). So basiert der große inhibitorische Effekt von Aprotinin wohl auf beiden Wirkungsweisen, zum einen über die indirekte Hemmung der MMP-Aktivierung, zum anderen über den direkten Kollagenabbau. Einen ähnlich guten inhibitorischen Effekt erzielten wir mit Pefa, einem anderen, spezifischeren Serinproteaseninhibitor, den wir als Kontrolle einsetzten, um zu

zeigen, dass es sich nicht nur um einen direkt die Fluoreszenz reduzierenden Effekt des Aprotinin handelt (Daten nicht gezeigt).

Nach 24h zeigte die mit Batimastat inkubierte maternale Zelllinie eine um ca. 20% geringere kollagenolytische Aktivität im Vergleich zu ohne Inhibitoren. Inkubierte man die transfizierte Zelllinie 3suPAR noch zusätzlich mit Batimastat wurde die proteolytische Aktivität um ca. 45% reduziert, was für einen eindeutig synergistischen Effekt *in vitro* spricht.

Im Caseinolytischen-Plaue-Assay konnte im Gegenzug für das MMP-System gezeigt werden, dass Batimastat keinen inhibitorischen Effekt auf Anzahl und Größe der lytischen Plaques hat. Eine Aktivierung von Plasminogen oder uPA durch die MMPS ist somit weitgehend ausgeschlossen.

Zusätzlich ließen diese *in vitro* Ergebnisse die Annahme zu, dass eine Hemmung des uPA Systems deutlich effektiver und umfassender sein könnte, als die Hemmung einzelner MMPs.

Die physiologischen Mechanismen zur Aktivierung der MMPs sind sehr komplex und so immer noch wenig erforscht. Ein größeres Verständnis hier bedeutet aber auch bessere Therapieansätze (*Mazzieri et al., 1997*).

Der zweite Teil der Arbeit sollte nun die *in vitro* Ergebnisse auch *in vivo* bestätigen.

Vorausgehende Studien mit Aprotinin (*Della Porta et al., 1997*) und Amilorid (*Pilat et al., 1998*) zeigten keinen Effekt auf die Invasivität von Tumorzellen.

Eine Kombinationstherapie aus Batimastat und dem ACE-Hemmer Captopril war in der Maus in der Behandlung des Lewis Lungenkarzinoms durchaus erfolgreich und hatte sogar einen synergistischen Effekt (*Pronters et al., 1999*).

Anstelle eines synthetischen Inhibitors erfolgte unser Tierexperiment mit einer mit dem löslichen uPAR transfizierten humanen Mammakarzinomzelllinie. Der lösliche uPAR sollte einen Abfängereffekt auf das uPA haben und so im weiteren Sinne, indirekt auch inhibitorisch wirken. Die Ergebnisse mit einer deutlich reduzierten Invasivität, Metastasierungsrate und auch einem geringeren Primärtumorwachstum bei suPAR 3 transfizierten Mammakarzinomzellen bestätigen die wichtige Rolle, die der uPA in diesem Prozess einnimmt. Eine indirekte Hemmung diverser MMPs durch die Reduzierung von z.B. Plasmin kann nur angenommen werden. Um nach i.v. Injektion der Tumorzellen und somit nach angestrebter experimenteller Metastasierung das MMP-System noch zusätzlich

zu inhibieren erfolgte bei einem Teil der Mäuse die tägliche intraperitoneale Batimastatinjektion. Hier zeigt sich nur ein sehr geringer therapeutischer Effekt von Batimastat auf die Anzahl der Lungenfiliae. Allerdings zeigt sich hier kein synergistischer Effekt vom überexprimierenden löslichen uPAR und Batimastat.

Im Vergleich zu der Metastasenreduktion durch den löslichen uPAR bei suPAR transfizierten Zellen sind die Effekte von Batimastat *in vivo* geringer. Das ist ein weiterer Hinweis darauf, dass das Serinproteasensystem eine weitaus größere Rolle spielt.

5.3. Induktion von Lebermetastasen durch Batimastat

Batimastat wurde bereits in mehreren Studien getestet und gilt als Vorläufer des zwischenzeitlich in Phase II getesteten Marimastat. Da es eine schlechte orale Bioverfügbarkeit hat muss es intrapleurale oder intraperitoneal injiziert werden. Meistens wird dieser Inhibitor bei Mäusen intraperitoneal gespritzt. Beispielsweise wurden SCID Mäuse nach Implantation eines malignen Pancreastumors mit Batimastat i.p. behandelt. Dadurch konnte eine Bildung von Lungenmetastasen völlig unterdrückt werden (*Mirzaie et al., 2002*). Die Verbindung zwischen den MMPs und der Steuerung der Neoangiogenese ist sehr komplex und nicht nur auf das Entfernen der physikalischen Barriere (EZM, Basalmembran) beschränkt. MMPs sind auch in die Sekretion von bioaktiven Fragmenten und in die Abgabe von Wachstumsfaktoren und Angiogenesemediatoren involviert (*Werb et al. 1999*). Ähnliches gilt für das Serinproteasensystem. So wird die Chemotaxis durch den uPA/uPAR-Komplex induziert und auch die Adhäsion und Migration werden mit durch die Regulation von PAI-1 gesteuert (*Blasi, 1999*). Plasmin als Hauptvertreter der Serinproteasen degradiert vor allem die Proteine der extrazellulären Matrix (*Andreasen et al., 1997*).

Matrixmetalloproteinaseinhibitoren werden seit Mitte der Achtziger Jahre produziert. Solange die genaueren Zusammenhänge noch nicht wenigstens teilweise geklärt waren, wurden von der Industrie sehr breit inhibierende Wirkstoffe, wie z.B. Batimastat zur Verfügung gestellt. Analog zu Batimastat (British Biotech) gibt es von der Firma Bayer Bay 12-9566 und von der Firma Agouron AG3340. Auch diese MMP-Inhibitoren sind bereits in Phase II und III Studien getestet worden. Bay 12-9566 hat eine gute orale Bioverfügbarkeit bei tolerablen Nebenwirkungen wie Thrombozytopenie und

Transaminasenanstieg. Statt Batimastat kommt das oral resorbierbare Marimastat zum Einsatz, welches ab dem 2. Behandlungszyklus doch störenderer Nebenwirkungen wie Gewichtsabnahme, Arthritis, Arthralgien, Myalgien, Tendinitiden und gastrointestinaler Nebenwirkungen (*Hidalgo et al. 2001*) zeigt. In einer Phase II Studie mit Marimastat in der Behandlung eines Magenkarzinoms konnte zumindest eine Zunahme des fibrotischen Gewebes rund um den Tumor gezeigt werden. Alle Inhibitoren zeigten *in vitro* gute Ergebnisse bezüglich Reduktion der Tumormasse und Metastasierung (*Brown, 1999*) in klinischen Studien konnte diese Erfolge nur bedingt nachvollzogen werden (*Parson et al., 1996*).

Batimastat ist gut verträglich und hat bis auf abdominale Schmerzen nach Injektion keine systemischen toxischen Nebenwirkungen gezeigt.

Batimastat inhibiert ein breites Spektrum an MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP-7). Es ist ein potenter kompetitiver, aber reversibler Inhibitor.

In unseren *in vitro* Experimenten zeigten die mit Batimastat inkubierten Zellen eine reduzierte Proteasenaktivität; es fand sich aber kein Hinweis auf eine Hoch- oder Herunterregulation bestimmter Proteasen (eigenen nicht veröffentlichte Ergebnisse mittels Northern Blots). Nach dem *in vivo* Experiment in der Nacktmaus stellten wir fest, dass sich in den beiden mit Batimastat behandelten Mausgruppen, die zu Beginn des Experiments mit der parentale Zelllinie MDA-MB-231 Bag und der suPAR überexprimierenden Variante 3suPAR infiziert wurden eine signifikante Anzahl Lebermetastasen gefunden. Bis jetzt war für die genannte Zelllinie keine Leberfilialisierung beschrieben worden. Es fanden sich bei der ursprünglichen Zelllinie im Median 4 Lebermetastasen nach Batimastatbehandlung. Auch bei der löslichen uPAR überexprimierenden Zelllinie fanden sich nach zusätzlicher Batimastatinjektion Lebermetastasen. Im Median, also weniger wie bei der Ausgangszelllinie, so dass eine Möglichkeit besteht, dass der lösliche uPAR die Leberfilialisierung verhindert.

Diese Nebenwirkung von Batimastat konnte in anderen Tumormodellen bestätigt werden. So zeigten eine Ovarialkarzinom- und eine Ösophaguskarzinomzelllinie die intraperitoneal in die Nacktmaus inokuliert eigentlich große der Leber aufsitzende, Tumore mit nur oberflächlicher Invasion in die Leber. Die mit Batimastat behandelten Mäuse hatten Metastasen direkt im Leberparenchym, wobei die Leberkapsel histologisch intakt war und es sich so um hämatogene oder lymphogene Metastasen handeln muss (*Della Porta et al.,*

1999). In einem Lymphommodell, das bekannterweise in die Leber metastasiert wurden bei den mit Batimastat i.p. behandelten Mäusen eine höhere Anzahl an Lebermetastasen gefunden (*Krüger et al. 2000*).

Die Tumorzellen scheinen aus irgendeinem Grund unter Anwesenheit von Batimastat in der Leber besonders gut wachsen zu können. Eine zymografische Untersuchung von Leberextrakten aus dem Lymphomtumormodell zeigten eine Erhöhung von MMP-2 und MMP-9 unter Batimastattherapie (eigene nicht veröffentlichte Daten). Für die MDA-231-Bag Zellen lies sich dies nicht nachweisen. So stellte sich die Frage ob hier die MMPs bei der Extravasation und Zellproliferation eine Rolle spielen. Aber warum sollte ein MMP Inhibitor eine Hochregulierung von MMPs in der Leber bewirken? Diese Frage ist aktuell nicht zu beantworten.

Inzwischen konnten mittels Atlas Array Technik anhand aus den Lebern gewonnener mRNA verschiedenen Gene, wie z.B. bFGF (basic fibroblast growth factor) und Angiogenin, die in der Leber bei Batimastatinjektion überexprimiert werden, nachgewiesen werden (*Sopov, 2000*). Beide Gene sind die Angiogenese fördernd und können somit ein Wachstum von Tumorzellen in der Leber erklären.

Des Weiteren wurde mittels Northern Analyse eine Erhöhung des hepatocyte growth factors, der die Motilität von Krebszellen fördern kann nachgewiesen (*Krüger et al. 2000*). Ebenso wurde caspase-1, ein Molekül, das eine ganze Cascade von Cytokinen reguliert, incl. Interleukin-1, welches wiederum die Expression von MMP-9 steuert und so zu der Erhöhung an MMP-9 passt (*Vecil et al., 2000*).

In der Lunge wurden trotz Metastasierung all diese Gene nicht gefunden.

Die meisten Arbeitsgruppen beschreiben eine Reduktion des Primärtumors und eine geringerer Metastasierungsrate unter Batimastat (*Rasmussen et al.1997*).

Low et al. beschreiben für ein orthotop injiziertes Mammakarzinom gute Resultate bezüglich des Primärtumorwachstums. Die identischen Zelllinie nutzte die Arbeitsgruppe für ein malignes Aszitesmodell. Hier zeigte sich kein Effekt durch die Batimastatinjektion (*Low et al, 1996*).

Der Fakt das Batimastat eine Induktion von Lebermetastasen bewirken kann ist in Hinblick auf einzelne noch laufende Phase II und III Studien zu Marimastat ein Anlass zur Sorge.

5.4. Ausblick

Ohne Anschluß an das Blutgefäßsystem ist normales Gewebe und Tumorgewebe in Bezug auf Größe und Organisation limitiert (*Werb et al., 1999*). Dies mag ein sehr wichtiger Angriffspunkt bei der Suche nach neuen Therapieoptionen sein.

Inzwischen gibt es neue, viel spezifischere MMP-Inhibitoren. Arlt et al. konnten zeigen, dass neue MMP-Inhibitoren mit großer Selektivität und Spezifität z. B. für MMP-9 sehr viel effizienter Lebermetastasen *in vivo* verhindern (*Arlt et al., 2002*).

Die Schwierigkeit beim Einsatz solcher Inhibitoren im klinischen Alltag ist einen guten Marker zu finden der sicherer Auskunft über das Ansprechen es Tumors, bzw. über die Effektivität gibt. Es gibt einige Marker die hin und wieder dazu herangezogen werden. Dazu gehören beispielsweise die Tumormarker. Dies mag für einige Karzinome wie z.B. für das Ovarialkarzinom eine gute Möglichkeit sein. Bei vielen anderen Tumoren ist der Tumormarkeranstieg bzw. der Nicht-Anstieg sehr unspezifisch. Eine weitere Möglichkeit wäre die Messung von MMPs, wobei ein z.B. lokaler Anstieg der MMPs im Bereich von Mikrometastasen sicher nicht nachweisbar bzw. zugänglich ist. Der sicherste, aber am meisten zeitaufwendige Marker ist in diesem Zusammenhang immer noch die Registrierung des Überlebens. Es sollten wirklich nur Inhibitoren die das Überleben signifikant verlängern längerfristig zum Einsatz kommen. Hierzu müssen viele Studien durchgeführt werden. Entscheidend gerade bei den MMP-Inhibitoren ist die Kombinationstherapie. Wie in dieser Arbeit mehrmals erwähnt ist die Tumorprogression und Metastasierung ein Zusammenspiel aus verschiedenen Faktoren, gegen die einzeln unterschiedlich vorgegangen werden muss. Die Antwort darauf kann, bis ein ultimatives Krebsgen gefunden wird, nur die Kombinationstherapie sein.

Hier muss auch an die anderen Proteasen wie die Serinproteasen und die Cathepsine gedacht werden und auch an andere Faktoren in der Cascade der proteolytischen Aktivität einer Tumorzelle. Es wurde gezeigt, dass Interleukin-12 *in vivo* die Tumorrückbildung und Heilung einer experimentellen Mammakarzinomzelllinie bewirkt. Hierzu war allerdings eine lange, sehr toxische Behandlung nötig. Behandelte man die Mäuse kürzer mit Interleukin-12 kam es zu Tumorrezidiven nach Absetzen der Behandlung. Es wurde festgestellt, dass unter IL-12 Therapie am Tumor die Menge an MMP-9 abnahm und die Menge an TIMP-1 zunahm. Daraufhin erfolgte eine zusätzliche Kombinationstherapie mit

IL-12 und Batimastat. Mit dieser Kombination wurden bereits nach einer kurzen Behandlung sehr gute Tumorregressionsergebnisse bei deutlich reduzierter Toxizität erzielt und durch Batimastat wurde die Tumorregeneration nach Absetzen des IL-12 verhindert (Scott *et al.*, 2000). Das Interleukin-12 hat einen Antitumoreffekt bei starken Nebenwirkungen (Splenomegalie, Lebernekrose, Lethargie). Es fand sich ein antiangiogenetischer Effekt, der wohl auf zwei Mechanismen beruht. Die Menge an VEGF und an MMP-9 nimmt ab, die Menge an TIMP-1 nimmt zu. Histologisch fanden sich erhöhte Tumornekrosen, weniger Tumor, weniger Stroma und weniger Vaskularisation (Scott *et al.*, 2000).

Während den letzten Jahrzehnten basierte die Entdeckung von neuen Antikrebstherapien auf der Entwicklung von Stoffen die mit den unspezifischen Zellentwicklungsprozessen interferieren. Dazu gehören DNA Synthese, Mitose, Replikation und Funktion des Spindelapparates. Das sind die Angriffspunkte der heute gängigen Polychemotherapie. In den letzten Jahren haben neue Entdeckungen und Möglichkeiten in der Tumorbiologie besondere Prozesse aufgedeckt, die spezifischen Veränderungen von Krebszellen ausmachen. Dazu gehören Genmutationen, Neoangiogenese und die Überexpression von vielen Molekülen, die für die Tumordinvasion und Metastasierung entscheidend sind. Das sind alles Ansatzpunkte für neue Medikamente, die das Wachstum von malignen Tumoren verhindern ohne die gesunden Zellen zu beeinträchtigen.

Die genaue Einschätzung der Tumoraggressivität ist wichtig für die richtige Therapieentscheidung. Nach der Diagnose Brustkrebs und der ersten üblichen Behandlung wie Operation und Radiatio stellt sich immer die Frage ob alle Tumorzellen entfernt sind. Gerade beim Mammakarzinom ist ein Rezidiv lokal oder als Fernmetastase noch nach 20 Jahren möglich. Bis jetzt werden nur klinische und histologische Parameter und beim Mammakarzinom z.B. der Rezeptorstatus zur Festlegung des Therapiekonzeptes genutzt. Es sind aber noch weitere biologische Faktoren zur Abschätzung des Rezidivrisikos dringend nötig, um z.B. auch eine Überbehandlung zu vermeiden.

Hier ist das uPA System für die Beurteilung der Prognose ein wichtiges Instrument. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass hohe Levels an uPA, uPAR und PAI-1 im Tumor der Patientinnen mit einer schlechteren Prognose korrelieren. Das gilt auch bei negativem Lymphknotenstatus (Jänicke *et al.*, 2001; Harbeck *et al.*, 2001; Duffy, 2002).

Auch für die MMPs weiß man, dass je maligner die Zelllinie und je schlechter die Prognose, desto mehr MMPs (Menge und Vielfalt) werden von der Zelle produziert (*Giambernardi et al., 1998*). Hier ist der Schritt in den Klinikalltag aufgrund der Vielfalt deutlich komplizierter. Nach solchen Faktoren, die helfen das Risiko abzuschätzen muss noch mehr gesucht werden.

Eine Therapiemöglichkeit wird die nächsten Jahre zunehmend auch in der Behandlung von Tumorerkrankungen die Gentherapie darstellen. Mit Hilfe von Adeno- oder Retroviren könnten entsprechende inhibitorischen Stoffe in ausreichender Menge „vor Ort“ produziert werden. Der Einsatz von Antisense Oligonukleotiden könnte eine spezifische Hemmung bestimmter Zielproteine, also beispielsweise bestimmter Proteinase bewirken (*Li et al., 1998; Förstermann, 2003*).

Ein Allheilmittel wird auch die Behandlung mit Genen oder die biologische Therapie alleine nicht sein, aber vielleicht können durch effiziente Forschung noch weitere entscheidende Säulen in der Behandlung von Tumorpatienten gefunden werden.

6 Literaturverzeichnis

Afzal S, Lalani EN, Foulkes W, Boyce B, Tickle S, Cardillo MR, Baker T, Pingatelli M, Stamp GWH: Matrix Metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression and synthetic matrix metalloproteinase-2 inhibitor binding in ovarian carcinomas and tumor cell lines. *Laboratory investigation* 74: 406-421, 1996.

Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH: The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 57: 25-40, 2000.

Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ: The Urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72: 1-22, 1997.

Arlt M, Kopitz C, Pennington C, Watson KL, Krell HW, Bode W, Gansbacher B, Khokha R, Edwards DR, Kruger A: Increase in Gelatinase-specificity of Matrix Metalloproteinase Inhibitors Correlates with Antimetastatic Efficacy in a T-Cell Lymphoma Model. *Cancer Res* 62: 5543-5550, 2002.

Azzam HS, Arand G, Lippman ME, Thompson EW: Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production. *J Nat Canc Inst* 85: 1758- 1764,1993.

Bajou K, Noel A, Gerard RD, Brünner N, Holst-Hansen C, Skobe M, Fusenig N, Carmeliet P, Collen D, Foidart JM: Absence of host plasminogen activator inhibitor-1 prevents cancer invasion and vascularisation. *Nat Med* 4:923-928, 1998.

Baker T, Tickle S, Wasan H, Docherty A, Isenberg D, Waxman J: Serum metalloproteinases and their inhibitors: markers for malignant potential. *Br J Cancer* 70: 506-512, 1994.

Baramova EN, Bajou K, Remacle A, L'Hoir C, Krell HW, Weidle UH, Noel A, Foidart JM: Involvement of PA/Plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. FEBS Lett 405: 157-162, 1997.

Behrendt N, Dano K: Effect of purified, soluble urokinase receptor on the plasminogen pro-urokinase activation system. FEBS Lett 393: 31-36, 1996a.

Behrendt N, Ronne E, Dano K: Domain interplay in the urokinase receptor. J Biol Chem 271: 22885-22894, 1996b.

Bischof P, Martelli M, Campana A, Itoh Y, Ogata Y, Nagase H: Importance of matrix metalloproteinases in human trophoblast invasion. Early pregnancy 1: 263-269, 1995.

Blasi F: Proteolysis, cell adhesion, chemotaxis, and invasiveness are regulated by the u-PA-uPAR-PAI-1 system. Thrombosis Haemostasis 82(2): 298-304, 1999a.

Blasi F : The urokinase receptor. A cell surface regulated chemokine. APMIS 107:96-101, 1999b

Bouchet C, Spyrtos F, Martin PM, Hacene K, Gentile A, Oglobine J : Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitors PAI-1 and PAI-2 in breast carcinomas. Br J Cancer 69: 398-405, 1994.

Brown PD: Clinical Studies with matrix metalloproteinase inhibitors. APMIS 107: 174-180, 1999.

Brüner N, Thompson EW, Spang-Thomsen M, Rygaard J, Dano K, Zwiebel JA: *LacZ* transduced human breast cancer xenografts as an *in vivo* model for the study of invasion and metastasis. Eur J Cancer 28A, 12: 1989-1995, 1992.

Bugge Th, Kombrinck KW, Xiao Q, Holmbäck K, Daugherty C, Witte D, Degen JL: Growth and dissemination of Lewis lung carcinoma in plasminogen deficient mice. *Blood* 90: 4522-4531, 1997.

Casslen B, Bossmar T, Lecander I, Astedt B: Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in blood and tumour fluids of patients with ovarian cancer. *Eur J Cancer* 30A: 1302-1309, 1994.

Chambers AF, Matrisian LM : Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Canc Inst* 89 : 1260-1270, 1997.

Chavakis T, Kanse S, Yutzy B, Lijnen M, Preissner KT: Vitronectin concentrates proteolytic activity on the cell surface and extracellular matrix by trapping soluble urokinase receptor-urokinase complexes. *Blood* 91, 7: 1-9, 1998.

Chirivi RGS, Garofalo A, Crimmin MJ, Bawden L Stoppacciaro A, Brown PD, Giavazzi R: Inhibition of the metastatic spread and growth of B16-BL6 murine melanoma by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Int J Cancer* 58: 460-464, 1994.

Crowley CW, Cohen RL, Lucas BK, Lin G, Shuman MA, Levinson AD: Prevention of metastasis by inhibition of the Urokinase receptor. *Proc Natl Acad Sci* 80: 5021-5, 1993.

Dano K, Romer J, Nielsen B, Bjorn S, Pyke C, Rygaard J, Lund L: Cancer invasion and tissue remodelling- cooperation of protease systems and cell-types. *APMIS* 107: 120-127, 1999.

Davies B, Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow LG, Rubens RD, Balkwill FR: Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 67: 1126-1131, 1993.

DeClerck Y, Laug WE: Cooperation between matrix metalloproteinases and the plasminogen activator-plasmin system in tumor progression. *Enzyme Protein* 49: 72-84, 1996.

Della Porta P, Soeltl R, Krell HW, Collins K, O'Donoghue M, Schmitt M, Krüger A: Combined treatment with serin 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: 3809-3816, 1999.

Deryugina EI, Luo GX, Reisfeld R, Bourdon M, Strongin A: Tumor cell invasion through Matrigel is regulated by activated matrix-metalloproteinase-2. *Anticancer Res.* 17: 3201-3210, 1997.

Duffy MJ: Urokinase-type plasminogen activator: a potent marker of metastatic potential in human cancers. *Biochem Soc Trans* 30(2): 207-210, 2002.

Ellis V: Functional analysis of the cellular receptor for urokinase in plasminogen activation. Receptor binding has no influence on the zymogenic nature of pro-urokinase. *J Biol Chem* 271:14779-14784, 1996.

Feige A, Rempen A, Würfel W, Jawny J, Caffier H: *Frauenheilkunde*. 2. Auflage, Urban und Schwarzenberg, München, 2001.

Festuccia C, Dolo V, Guerra F, Violini S, Muzi P, Pavan A, Bologna M: Plasminogen activator system modulates invasive capacity and proliferation in prostatic tumor cells. *Clin Exp Metastasis* 16: 513-528, 1998.

Fischer K, Lutz V, Wilhelm O, Schmitt M, Graeff H, Heiss P, Nishiguchi T, Harbeck N, Kessler H, Luther T, Magdolen V, Reuning U: Urokinase induces proliferation of human ovarian cancer cells: characterization of structural elements required for growth factor function. *FEBS Lett* 438:101-105, 1998.

Foerstermann U. Gentherapie: Erste Erfolge- viele noch unerfüllte Hoffnungen. Deutsches Ärzteblatt 106/6: 270 – 273, 2003.

Freije JM, Balbin M, Pendas AM, Sanchez LM, Puente KS, Lopez-Otin: Matrix metalloproteinases and tumor progression. Adv Exp Med Biol 532: 91-107, 2003.

Giambernardi TA, Grant GM, Taylor GP, Hay RJ, Maher VM, McCormick JJ, Klebe RJ: Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. Matrix Biology 16: 483-496, 1998.

Guo Y, Mazar AP, Lebrun JJ, Rabbani SA: An antiangiogenic urokinase-derived peptide combined with Tamoxifen decreases tumor growth and metastasis in a syngeneic model of breast cancer. Cancer Res 62: 4678-4684, 2002.

Harbeck N, Alt U, Berger U, Kruger A, Thomssen C, Janicke F, Hofler H, Kates RE, Schmitt M: Prognostic impact of proteolytic factors (Urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor 1, and cathepsins B,D, and L) in primary breast cancer reflects effects of adjuvant systemic therapy. Clin Cancer Res 7(9): 2757-64, 2001.

Heussen C, Dowdle EB: Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. Analytical Biochemistry 102: 196-202, 1980.

Hidalgo M, Eckhardt SG: Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. J Nat Cancer Inst 93: 178-191, 2001.

Homepage: www.Krebsinfo.de (Tumorzentrum München) und www.mammakarzinom.de (Novartis Foundation)

Holst-Hansen C, Johannessen BE, Hoyer-Hansen G, Romer J, Ellis V, Brüner N: Urokinase-type plasminogen activation in three human breast cancer cell lines correlates with their *in vitro* invasiveness. Clin Exp Metastasis 14: 297-307, 1996.

Holst-Hansen C, Hamers MJAG, Johannessen BE, Brünner N, Stephens RW: Soluble urokinase receptor released from human carcinoma cells: a plasma parameter for xenograft tumour studies. *Br J Cancer* 81(2): 203-211, 1999.

Holst-Hansen C, Low JA, Stephens RW, Johnson MD, Carmelite P, Frandsen Th, Brünner N, Dickson RB: Increased stromal expression of murine urokinase plasminogen activator in a human breast cancer xenograft model following treatment with the matrix metalloprotease inhibitor, Batimastat. *Breast Cancer Res Treat* 68: 225-237, 2001.

Imren S, Kohn DB, Shimada H, Blavier L, DeClerck YA: Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 by retroviral-mediated gene transfer *in vivo* inhibits tumour growth and invasion. *Cancer Res* 56:2891-2895, 1996

Jänicke F, Prechtel A, Thomssen Ch, Harbeck, N, Meisner Ch, Untch M, Sweep CGJ, Selbmann, Graeff H, Schmitt M: Randomized adjuvant chemotherapy trial I high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type I. *J Nat Canc Inst* 93: 913-920, 2001.

Kook YM, Adamski J, Zelent A, Ossowski L: The effect of antisense inhibition of uPAR in human squamous cell carcinoma on malignancy. *EMBO J* 13: 3983-3991, 1994.

Koop S, Khokha R, Schmidt EE, MacDonald IC, Morris VL, Chambers AF: Overexpression of metalloproteinase inhibitor in B16F10 cells does not affect extravasation but reduces tumor growth. *Cancer Res* 54: 4791-4797, 1994.

Koretz K, Möller P, Schwartz-Albiez R: Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in human colorectal carcinoma tissue are not expressed by the tumour cells. *Eur J Cancer* 29A: 1184-1189, 1993.

Krüger A, Soeltl R, Sopov I, Kopitz Ch, Arlt M, Magdolen V, Harbeck N, Gänsbacher B, Schmitt M: Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor Batimastat promotes liver metastasis. *Cancer Res* 61: 1272-1275, 2001.

Krüger A, Soeltl R, Lutz V, Wilhelm OG, Magdolen V, Rojo EE, Hantzopoulos PA, Graeff H, Gänsbacher B, Schmitt M: Reduction of breast carcinoma tumor growth and lung colonization by overexpression of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (CD 87). *Cancer Gene Ther* 7(2) : 292-299, 2000.

Krüger A, Fata JE, Khokha R: Altered tumor growth and metastasis of a T-cell lymphoma in Timp-1 transgenic mice. *Blood* 90: 1993-2000, 1997.

Krüger A, Sanchez-Sweatman OH, Martin D.C., Fata JE, Ho AT, Orr FW, Rütter U, Khokha R: Host TIMP-1 overexpression confers resistance to experimental brain metastasis of a fibrosarcoma cell line. *Oncogene* 16: 2419-2423, 1998.

Krüger A, Schirmacher V, von Hoegen P: Scattered micrometastases visualized at the single-cell level: Detection and re-isolation of *lacZ*-labelled metastasized Lymphoma cells. *Int J Cancer* 58:275-284, 1994.

Krüger A: Modulation von Tumorwachstum und Metastasierung durch natürliche und synthetische Proteaseinhibitoren. Habilitation, Technischen Universität München, 1999.

Leber TM, Balkwill FR: Zymography: A single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gel. *Analytical Biochemistry* 249: 24-28, 1997.

Li H, Lu H, Griscelli F, Opolon P, Sun LQ, Ragot T, Legrand Y, Belin D, Soria J, Soria C, Perricaudet M, Yeh P: Adenovirus-mediated delivery of uPA/uPAR antagonist suppresses angiogenesis-dependent tumor growth and dissemination in mice. *Gene Ther* 5(8): 1105-1113, 1998.

Lijnen HR, van Hoef B, Soloway P, Collen D: Plasminogen/Plasmin system function in mice deficient in stromelysin-1 (MMP-3) or in tissue inhibitor of metalloproteinases type-1 (TIMP-1). *Fibrinolysis and Proteolysis* 12: 1-8, 1998.

Look MP, Foekens JA: Clinical relevance of the urokinase plasminogen activator system in breast cancer. *APMIS* 107: 150-159, 1999.

Loskutoff DJ, Linders M, Keijer J, Veerman H, van Heerikhuizen H, Pannekoek H: Structure of the human plasminogen activator inhibitor 1 gene: nonrandom distribution of introns. *Biochemistry* 26: 3763-3768, 1987.

Low JA, Johnson MD, Bone EA, Dickson RB: The matrix metalloproteinase inhibitor Batimastat (BB-94) retards human breast cancer solid tumor growth but not ascites formation in nude mice. *Clin Cancer Res* 2(7): 1207-1214, 1996.

Lutz V, Reuning U, Krüger A, Luther T, von Steinburg SP, Graeff H, Schmitt M, Wilhelm OG, Magdolen V: High level synthesis of recombinant soluble urokinase receptor (CD87) by ovarian cancer cells reduces intraperitoneal tumor growth and spread in nude mice. *Biol Chem* 382(5): 789-798, 2001.

Mazzieri R, Masiero L, Zanetta L, Monea S, Onisto M, Garbisa S, Mignatti P: Control of type IV collagenase activity system by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J* 16 (9), 2319-2332, 1997.

Meissauer A, Kramer M, Hofmann M, Erkell LJ, Jacob E, Schirmacher V, Brunner G: Urokinase-type and tissue-type plasminogen activators are essential for in vitro invasion of human melanoma cells. *Exp Cell Res* 192: 453-459, 1991.

v. Mickwitz G für die AGO-Organkommission Mamma: State of the Art Meeting Gravenbruch 2002; Aktuelle Empfehlungen zur Therapie primärer und fortgeschrittener Mammakarzinome. Zuckschwerdt; München, 2002.

Mignatti P, Robbins E, Rifkin DB: Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. *Cell* 47: 487-498, 1986.

Min MY, Doyle LV, Vit LR, Zanodella CL, Strattern-Thomm JR, Shuman MA, Rosenberg S: Urokinase receptor antagonists inhibit angiogenesis and primary tumor growth in syngenic mice. *Cancer Res.* 56: 2428-2433, 1996.

Mirzaie M, Herse B, Oster O, Schondube F: The matrix metalloproteinase inhibitor batimastat inhibits the lung colonisation of orthotopically implanted malignant pancreatic tumor cells in SCID mice. *Swiss Surg* 8(4): 165-170, 2002.

Moller LB: Structure and function of the urokinase receptor. *Blood Coag Fibr* 4: 293-303, 1993.

Mueller BM, Yu YB, Laug WE: Overexpression of plasminogen activator inhibitor 2 in human melanoma cells inhibits spontaneous metastasis in scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 205-209, 1995.

Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knäuper V, Atkinson S, Gavrilovic: Mechanism for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS* 107:38-44, 1999.

Naylor MS, Stamp GW, Davies BD, Balkwill FR: Expression and activity of MMPs and their regulators in ovarian cancer. *Int J Cancer* 58: 50-56, 1994.

Noel A, Hajitou A, L`Hoir M, Maquoi E, Baramova E, Lewalle JM, Remacle A, Kebers F, Brown P, Calberg-Bacq CM, Foidart JM: Inhibition of stromal matrix metalloproteases: Effects on breast-tumor promotion by fibroblasts. *Int J cancer* 76: 267-273, 1998.

Ossowski L, Clunie G, Masucci MT, Blasi F: *in vivo* paracrine interaction between urokinase and its receptor: Effect on tumor cell invasion. *J Cell Biol* 115/4:1107-1112, 1991.

Parsons SL, Watson SA, Griffin NR, Steele RJC: An open Phase I/II study of the oral matrix metalloproteinase inhibitor Marimastat in patients with inoperable gastric cancer. *Ann Oncol* 7: 47, 1996.

Pilat MJ, Lehr JE, Quigley MM, Pienta KJ: The effect of amiloride on the metastatic properties of prostate cancer in the Dunning rat model. *Oncol. Rep.* 5: 889-892, 1998.

Ploug M, Behrendt N, Lober D, Dano K: Protein structure and membrane anchorage of the cellular receptor for urokinase-type plasminogen activator. *Sem Thrombosis Haemostasis* 17:183-192, 1991.

Prontera C, Mariani B, Rossi C, Poggi A, Rotilio D: Inhibition of gelatinase A (MMP-2) by batimastat and captopril reduces tumor growth and lung metastases in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Int J Cancer* 81: 761-766, 1999.

Quax PHA, van Muijen GNP, Weening-Verhoeff EJD, Lund LR, Dano K, Ruiter DJ, Verheijen JH: Metastatic behaviour of human melanoma cell lines in nude mice correlates with urokinase-type plasminogen activator, its type-1 inhibitor, and urokinase-mediated matrix degradation. *J Cell Biology* 115:191-19, 1991.

Rabbani SA, Gladu J: Urokinase receptor antibody can reduce tumor volume and detect the presence of occult tumor metastases *in vivo*. *Cancer Res* 62: 2390-2397, 2002.

Rasmussen HS, Mccann P: Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on Batimastat and Marimastat. *Pharmacol Ther* 75: 69-75, 1997.

Ray JM and Stetler-Stevenson WG: The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 7: 2062-2072, 1994.

Reiter L, Kruithof E, Cajot JF, Sordat B: The role of the urokinase receptor in extracellular matrix degradation by HT29 human colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 53: 440-450, 1993.

Resnati M, Guttinger M, Valcamonica S, Sidenius N, Blasi F, Fazioli F: proteolytic cleavage of the urokinase receptor substitutes for the agonist-induced chemotactic effect. *EMBO J* 15,1572-1582, 1996.

Reuning U, Magdolen V, Wilhelm O, Fischer K, Lutz V, Graeff H, Schmitt M: Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor growth and metastasis. *Int j oncol* 13: 893-906, 1998.

Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Reuning U, Ulm K, Höfler H, Jänicke F, Graeff H: Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thrombosis Haemostasis* 78, 1: 285-296, 1997.

Schultz RM, Silberman S, Persky B, Bajkowski AS, Carmichael D: Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases in human amnion invasion and lung colonization by murine B6-F10melanoma cells. *Cancer Res.* 48: 5539-3345, 1988.

Scott KA, Holdsworth H, Balkwill Fr, Dias S: Exploiting changes the tumor microenviroment with sequential cytokine and matrix metalloprotease inhibitor treatment in a murine breast cancer model. *Br J Cancer* 83(11):1538-1543, 2000.

Shliom O, Huang M, Sachais B, Kuo A, Weisel JW, nagaswami C, Nassar T, Bdeir K, Hiss E, Gawlak S, Harris S, Mazar A, Higazi A: Novel interactions between urokinase and its receptor. *J Biol Chem* 275 (32): 24304-24312, 2000.

Sledge GW, Qulali M, Goulet R, Bone EA, Fife R: Effect of matrixmetalloproteinase inhibitor batimastat on breast cancer regrowth and metastasis in athymic mice. *J Nat Canc Inst* 87: 1546-1550, 1995.

Solberg H, Romer J, Brünner N, Holm A, Sidenius N, Dano K, Hoyer-Hansen G: A cleaved form of the receptor for urokinase-type plasminogen activator in invasive transplanted human and murine tumors. *Int J Cancer* 58: 877-881, 1994.

Sopov I: Differentielle Genexpression in der Leber in Abhängigkeit von Batimastat, einem synthetischen Inhibitor von Matrix Metalloproteinasen. Dissertation, Technische Universität München, 2001.

Sreenath T, Matrisian LM, Stetler-Stevenson W, Gattoni-Celli S, Pozzatti RO: Expression of matrix metalloproteinase genes in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential. *Cancer Res* 52: 4942-4947, 1992.

Stack MS, Ellerbroek SM, Fishman DA: The role of proteolytic enzymes in the pathology of epithelial ovarian carcinoma (Review): *Int J Oncology* 12: 569-576, 1998.

Stonelake PS, Jones CE, Neoptolemos JP, Baker PR: Proteinase inhibitors reduce basement membrane degradation by human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 75:951-959, 1997.

Sumiyoshi K, Serizawa K, Urano T, Takada Y, Takada A, Baba S: Plasminogen activator system in human breast cancer. *Int J Cancer* 50: 345-348, 1992.

Taraboletti G, Garofalo A, Belotti D, Drudis T, Borsotti P, Scanziani E, Brown PD, Giavazzi R: Inhibition of angiogenesis and murine hemangioma growth by Batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinase. *J Nat Cancer Inst* 87: 293-298, 1995.

Takemura M, Azuma C, Kimura T, Kanai T, Saji F, Tanizawa O: Type-IV collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinase in ovarian cancer tissues. *Int J Gyn Obst* 46: 303-309, 1994.

Thomssen Ch: Mammakarzinom: Inzidenz und Mortalität in den letzten 25 Jahren. Der Gynäkologe 35: 680-688, 2002.

Tessler RJ, Pitot PA, Stratton JR, Forrest LD, Zhuo D, Drummond RJ, Fong S, Doyle LV, Min HY, Rosenberg S: Urokinase receptor antagonists: discovery and application to *in vivo* models of tumor growth. APMIS 107:168-173, 1999.

Tumormanual Mammakarzinome; Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 9. Auflage. Zuckschwerdt ,München; 2003.

Uetsuji S, Yamamura M, Takai S, Hioki K, Yamamoto M: Effect of aprotinin on metastasis of Lewis lung tumor in mice. Surgery Today 22(5): 439-442, 1992.

Van Noorden CJF, Maede-Tollin LC, Bosman FT: Metastasis. American scientist 86, 130-141, 1998.

Vecil GG, Larsen PH, Corley SM, Herx LM, Besson A, Goodyer CG, Yong VW: Interleukin-1 is a key regulator of matrix-metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma *in vivo*. J. Neurosci. Res., 61:212-224, 2000.

Wang X, Fu X, Brown PD, Crimmin MJ, Hoffman RM: Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (Batimastat) inhibits human colon tumor growth and spread in a patient-like orthotopic model in nude mice. Cancer Res 54: 4726-4728, 1994.

Wang M, Liu YE, Greene J, Sheng S, Fuchs A, Rosen EM, Shi YE: Inhibition of tumor growth and metastasis of human breast cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 4. Oncogene 14: 2767-2774, 1997.

Werb Z: ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. Cell 91: 439-442, 1997.

Werb Z, Vu TV, Rinkenberger JL, Coussens LM: Matrix degrading proteases and angiogenesis during development and tumor formation. *APMIS* 107: 10-18, 1999.

Wilhelm O, Weidle U, Höhl S, Rettenberger P, Schmitt M, Graeff H: Recombinant soluble urokinase receptor as a scavenger for urokinase-type plasminogen activator (uPA). Inhibition of proliferation and invasion of human ovarian cancer cells. *FEBS Lett* 337: 131-134, 1994.

Wojtowicz-Praga S, Low J, Marshall J, Ness E, Dickson R, Barter J, McCann P, Moore J, Cole A, Hawkins MJ: Phase I trial of a novel matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) in patients with advanced cancer. *Investigational New Drugs* 14: 193-202, 1996.

Xing RH, Rabbani SA: Overexpression of urokinase receptor in breast cancer cells results in increased tumor invasion, growth and metastasis. *Int J Cancer* 67: 423-429, 1996.

Yu AE, Hewitt RE, Connor EW, Stetler-Stevenson WG: Matrix Metallo-proteinases - novel targets for directed cancer therapy. *Drugs & Aging* 11: 229-244, 1997.

Zubair AC, Ali SA, Rees RC, Goepel JR, Goyns MH: Investigation of the effect of BB-94 (Batimastat) on the colonization potential of human lymphoma cells in SCID mice. *Cancer Letters* 107: 91-95, 1996.

7 **Abbildungsverzeichnis**

2 **Einleitung**

Abb. 1: Schematische Darstellung des Zusammenspiels der Serin- und Matrixmetalloproteinasen und ihrer Inhibitoren beim Abbau der Extrazellulären Matrix

3 **Material und Methoden**

Abb.2: Schematische Darstellung des Caseinolytischen Plaque Assays

Abb. 3: Schematische Darstellung der Funktion des neu etablierten Kollagen-Fluoreszenz-Assays

4 **Ergebnisse**

Abb. 4: Sekretion von uPA durch MDA-MB-231 Bag Mammakarzinomzellen und der suPAR transfizierten Zelllinien, ELISA

Abb. 5: Sekretion von MMP-2 und MMP-9 durch die MDA-MB-231 Bag Zellen, Zymogramm

Abb. 6: Sekretion von MMP-2 und MMP-9 durch MDA-MB-231 Bag und 3suPAR unter Anwesenheit der Inhibitoren Aprotinin und Batimastat

Abb. 7: Caseinolytischer Plaque Assay von MDA-MB-231 Bag und 3suPAR

Abb. 8: Caseinolytischer Plaque Assay von MDA-MB-231 Bag und 3suPAR unter Anwesenheit der Inhibitoren Aprotinin und Batimastat

Abb. 9: Abbau von DQTM-Kollagen durch die Zelllinien MDA-MB-231 Bag, 3suPAR und 10 suPAR in Anwesenheit von Plasminogen unter Mitinkubation der Inhibitoren Aprotinin und Batimastat

Abb. 10a+b: Darstellung der Mäuselungen nach experimenteller Lungenmetastasierung durch MDA-MB-231 Bag und 3suPAR, lacZ-Färbung

Abb. 11: Effekt der suPAR-Überexpression auf die experimentelle Metastasierung in die Mäuselungen im Vergleich zur parentalen Zelllinie

- Abb. 12:** Verlauf des Primärtumorwachstum, der in die Milchleiste der Nacktmaus injizierten MDA-MB-231 Bag, 3suPAR und 10 suPAR Zellen über 52 Tage
- Abb. 13:** Effekt von Batimastat auf die experimentelle Metastasierung der humanen Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 Bag
- Abb. 14:** Darstellung von Mäuselebern von mit Batimastat behandelten Mäusen im Vergleich zu ohne Batimastatbehandlung

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildungen
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CMF	Cyclophosphamid, Methotrxat, 5- Fluoruracil
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbet Assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	fetales Kälberserum
FEC	5-Fluoruracil, Epirubicin, Cyclphosphamid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)1-Piperazin-Ethanolulfonsäure
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KIU	Kallikrein-Inhibiting Units
M	Molar
MMP	Matrix Metalloproteinase
MT-MMP	Membrane-Type Matrix Metalloproteinase
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases
Tris	Trihydroxymethylaminomethan

PAI	Plasminogenaktivator Inhibitor
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
RT	Raumtemperatur
U/min	Umdrehungen pro Minute
uPA	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (Urokinase)
uPAR	Urokinase-Rezeptor
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glaktopyranosid

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Achim Krüger für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, in seinen Labors in der Frauenklinik, dann im Institut für Experimentelle Onkologie zu arbeiten und für die konsequente und konstruktive Betreuung der Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. M. Schmitt, Herrn Prof. Dr. med. H. Graeff und Herrn Prof. Dr. med. B. Gänsbacher für die Möglichkeit diese Forschungsarbeiten an ihren Kliniken/Instituten durchzuführen.

Den Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik, insbesondere Dr. rer. nat. V. Lutz, Dr. rer. nat. S. Ried und Dr. med. S. Pildner von Steinburg für die gute Zusammenarbeit.

Der BTA der Arbeitsgruppe Krüger, Frau Katja Honert, für all die Geduld im Erklären und vor allem für die suPAR-Transfektion und Unterstützung bei den Tierexperimenten.

Frau Paola Della Porta, Ph.D. für die Einarbeitung im Labor.

Allen nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen, die mir bei der Durchführung der Arbeit geholfen haben.

Andrea, für die mühevollen Unterstützung bei der Niederschrift.

Meinem Freund Phillip für seine vielen Anregungen und seinen unerschütterlichen Beistand während der gesamten Dauer dieser Doktorarbeit.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mama und meinem Bruder Martin, die mich während des ganzen Studiums und während der Dauer dieser Doktorarbeit in jeder Weise tatkräftig unterstützt haben und ohne die Vieles nicht möglich gewesen wäre.

10 Lebenslauf

Rita Sötl

22.10.1973	geboren in München
1980 – 1984	Grundschule am Mariahilfplatz in München
1984 – 1993	Dante-Gymnasium in München (neusprachlich: Latein, Englisch, Italienisch)
1993	Allgemeine Hochschulreife
1993 – 1994	Studium der Humanmedizin in Saarbrücken/Homburg
1994 - 2000	Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
11/00	3. Staatsexamen in der Humanmedizin
01/2001-07/2002	Ärztin im Praktikum in der Frauenklinik des Klinikums Dachau
seit 07/2002	Assistenzärztin in der Frauenklinik Dachau