

Department Chemie  
und  
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung  
der  
Technischen Universität München

**Modulation der experimentellen Metastasierung  
einer humanen Fibrosarkomzelllinie  
durch adenoviralen Gentransfer  
natürlicher Proteaseinhibitoren in das Maus-Wirtsgewebe**

***Charlotte Christine Kopitz***

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. A. Krüger
2. Univ.-Prof. Dr. W. Hiller
3. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Die Dissertation wurde am 17.02.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Chemie am 06.06.2005 angenommen.

*Für meinen Mann Razak, meine Eltern und meine Brüder*

<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>2</b>
2.1 Krebserkrankungen: Einführung und Begriffsbestimmung.....	2
2.2 Die metastatische Kaskade.....	3
2.3 Metastasierungsmodelle.....	6
2.3.1 Bedeutung von Markergenen zur Detektion von Metastasen <i>in vivo</i> .....	7
2.3.2 Das HT1080 Fibrosarkom-Modell.....	8
2.4 Bedeutung von Proteasen bei der Metastasierung.....	9
2.4.1 Die Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und ihre endogenen Inhibitoren.....	9
2.4.1.1 Bedeutung von MMPs und ihrer natürlichen Inhibitoren bei Krebs.....	11
2.4.1.2 Behandlung der Tumorprogression mit natürlichen MMP-Inhibitoren.....	13
2.4.2 Das Plasmin-Aktivator (PA)-System und seine natürlichen Inhibitoren.....	14
2.4.2.1 Bedeutung des PA-Systemes und seiner natürlichen Inhibitoren bei Krebs.....	17
2.4.2.2 Behandlung der Tumorprogression mit natürlichen Inhibitoren des PA-Systemes.....	19
2.4.3 Die lysosomalen Cysteinproteasen (CPs) und ihre natürlichen Inhibitoren.....	20
2.4.3.1 Bedeutung lysosomaler CPs und ihrer natürlichen Inhibitoren bei Krebs.....	22
2.4.3.2 Behandlung der Tumorprogression mit natürlichen Inhibitoren der lysosomalen CPs.....	23
2.5 Interaktionen zwischen Proteasefamilien.....	24
2.6 Adenoviraler Gentransfer.....	27
2.6.1 Struktur von Adenoviren.....	27
2.6.2 Der Infektionszyklus von Adenoviren.....	28
2.6.3 Grundlagen zur Generierung rekombinanter replikationsdefizienter Adenoviren.....	29
2.6.4 Verwendung von Adenoviren zum Gentransfer <i>in vivo</i> .....	30
<b>3 Ziel dieser Arbeit</b> .....	<b>31</b>
<b>4 Material und Methoden</b> .....	<b>32</b>
4.1 Tierexperimentelle Methoden.....	32
4.1.1 Verwendete Versuchstiere.....	32
4.1.2 HT1080 <i>Xenograft</i> -Metastasierungsmodell.....	32
4.2 Zellexperimentelle Methoden.....	34
4.2.1 Verwendete Zelllinien.....	34
4.2.1.1 HT1080 Zellen.....	34
4.2.1.2 HEK 293 Zellen.....	34
4.2.2 Zellkulturmedien.....	35

4.2.3	Allgemeine Lösungen für die Zellkultur .....	35
4.2.4	Kultivierung der Zellen .....	35
4.2.5	Bestimmung der Zellzahl .....	36
4.2.6	<i>lacZ</i> -Markierung der HT1080 Zellen .....	36
4.2.6.1	Transfektion von HT1080 Zellen mit Lipofektamin .....	36
4.2.6.2	Isolierung von Klonen mit Klonierungszyklindern .....	37
4.2.6.3	Subklonierung von HT1080pLZ12-Klonen .....	37
4.2.7	X-Gal Färbung .....	37
4.2.7.1	X-Gal Färbung von Zellen .....	37
4.2.7.2	X-Gal Färbung von Organen .....	38
4.3	Mikrobiologische Methoden .....	38
4.3.1	Verwendete Bakterien .....	38
4.3.1	DH10B .....	38
4.3.2	Top10 .....	38
4.3.3	MAX Efficiency® Stbl2™ Cells .....	38
4.3.2	Kultivierung von Bakterien .....	39
4.3.2.1	Verwendete Kulturmedien, Kulturplatten und Antibiotika .....	39
4.3.3	Verwendete Plasmide .....	39
4.3.3.1	pLZ12 .....	39
4.3.3.2	pSecTag2/HygroB .....	41
4.3.3.3	pGEMhTIMP-1 .....	41
4.3.3.4	AdenoX™ System .....	42
4.3.3.5	AdMax™ System .....	43
4.3.4	Verwendete cDNAs .....	44
4.3.4.1	TIMP-1 .....	44
4.3.4.2	Cystatin C .....	44
4.3.4.3	PAI-2 .....	44
4.3.5	Transformationen .....	44
4.3.5.1	Transformation von Top10 und DH10B .....	44
4.3.5.2	Transformation von Stbl2™ (pAdenoX-Plasmide) .....	45
4.4	Adenovirale Methoden .....	45
4.4.1	Verwendete Adenoviren .....	45
4.4.1.1	AdβGal .....	45
4.4.1.2	Addl70-3 .....	45
4.4.2	Transfektion von HEK 293 Zellen mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation .....	46
4.4.3	Infektion adenovitraler Verpackungszellen (HEK 293 Zellen) .....	46
4.4.4	Herstellung von <i>crude stocks</i> .....	47
4.4.5	Adenovirus-Banding (Reinigung) .....	47
4.4.6	Adenovirus-Titration ( <i>plaque assay</i> ) .....	48
4.4.7	Plaque Reinigung .....	49
4.4.8	Kontroll-Untersuchung der Plaque-Viren .....	50
4.4.9	Infektion von HT1080 Zellen und Herstellung von Zellüberständen für biochemische Untersuchungen .....	50

4.5	Molekularbiologische Methoden.....	51
4.5.1	Präparation, Analyse und Manipulation von Nukleinsäuren.....	51
4.5.1.1	Agarosegelelektrophorese.....	51
4.5.1.2	Restriktionsverdau.....	53
4.5.1.3	PCR.....	53
4.5.1.4	Klenow-Behandlung.....	54
4.5.1.5	Behandlung mit alkalischer Phosphatase.....	54
4.5.1.6	PCI-Extraktion/Ethanol-Fällung.....	54
4.5.1.7	Separation und Reinigung von DNA-Fragmenten mittels präparativer Gele und QIAquick® Gel Extraction Kit.....	55
4.5.1.8	Ligation von DNA-Fragmenten.....	55
4.5.2	Isolierung von Nukleinsäuren.....	56
4.5.2.1	Isolierung genomischer DNA aus Zellen.....	56
4.5.2.2	Minipräparation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse.....	57
4.5.2.3	CsCl-Präparation von Plasmiden.....	57
4.5.2.4	RNA-Isolierung aus Gewebe.....	59
4.5.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	59
4.5.3.1	Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegel.....	59
4.5.3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Bestimmung der optischen Dichte (OD).....	59
4.5.4	Quantitative RT-PCR (TaqMan™).....	60
4.5.4.1	Reverse Transkription.....	60
4.5.4.2	Durchführung der RT-PCR.....	60
4.6	Biochemische Methoden.....	61
4.6.1	Aufarbeitung von Proteinen aus Gewebe.....	61
4.6.1.1	Aufarbeitung von Proteinen für Zymographien und ELISA.....	61
4.6.1.2	Aufarbeitung von Leberprotein für HGF-ELISA.....	61
4.6.2	Proteinbestimmung mit BCA™ von Pierce.....	62
4.6.3	Zymographie.....	62
4.6.3.1	MMP-Zymographie.....	64
4.6.3.2	Plasmin-Zymographie.....	64
4.6.3.3	Plasminogen-Umsetzungsversuche und densitometrische Auswertung.....	64
4.6.3.4	Plasminogen-Aktivator-Zymographie.....	65
4.6.3.5	Cystatin-Zymographie (reverse Papain-Zymographie).....	65
4.6.3.6	Reverse MMP-Zymographie.....	66
4.6.3.7	SDS-Kontrollgele für reverse Zymographien.....	66
4.6.4	MMP-9 Aktivitätsassay.....	66
4.6.5	<i>Enzyme Linked Immuno Sandwich Assays</i> (ELISAs).....	67
4.6.5.1	TIMP-1 ELISA.....	67
4.6.5.2	Cystatin C ELISA.....	67
4.6.5.3	PAI-2 ELISA.....	67
4.6.5.4	Cathepsin B und L ELISA.....	68
4.6.5.5	HGF ELISA.....	68
4.7	Statistische Methoden.....	68

<b>5 Ergebnisse</b>	<b>69</b>
5.1 Funktionelle rekombinante Adenoviren welche natürliche Proteinaseinhibitoren exprimieren	69
5.1.1 Konstruktion des TIMP-1 kodierenden Adenovirus (AdTIMP-1)	69
5.1.2 Konstruktion des PAI-2 kodierenden Adenovirus (AdPAI-2)	71
5.1.3 Konstruktion des Cystatin C kodierenden Adenovirus (AdCysC)	73
5.1.4 Nachweis der inhibitorischen Aktivität der von den rekombinanten Adenoviren kodierten Inhibitoren	74
5.2 Signifikante Hemmung der experimentellen HT1080-Lungenmetastasierung durch prophylaktische Überexpression von TIMP-1	77
5.3 Transduktion von Leber und Lunge und hohe TIMP-1 Konzentrationen im Serum durch adenoviralen Gentransfer von TIMP-1	79
5.4 Verstärkte Expression von MMP-9 durch Überexpression von TIMP-1	81
5.5 TIMP-1 Überexpression kompensiert verstärkte MMP-9 Expression	82
5.6 Korrelation der Urokinase (uPA) Expression und der Anzahl an HT1080 Metastasen in der Lunge	84
5.7 Additiver anti-metastatischer Effekt durch simultane prophylaktische Überexpression von TIMP-1 und PAI-2	85
5.8 Transduktion von Leber und Lunge und hohe Transgen Konzentrationen im Serum durch adenoviralen Gentransfer von PAI-2 und TIMP-1	88
5.9 Unveränderte Expression der Plasminogen-Aktivatoren trotz Überexpression von PAI-2	91
5.10 Verstärkte Expression von Gelatinasen durch Überexpression von PAI-2	92
5.11 Nachweis der PAI-2 bzw. TIMP-1 Aktivität <i>ex vivo</i>	93
5.12 Korrelation der Cathepsin B Expression und der Anzahl an HT1080 Metastasen in der Lunge	98
5.13 Verstärkte Expression von Cathepsin B durch Überexpression von TIMP-1	99
5.14 Signifikante Reduktion der experimentellen HT1080 Lungenmetastasierung durch prophylaktische Überexpression von Cystatin C	101
5.15 Induktion von HT1080 Makrometastasen in der Leber durch simultane Überexpression von TIMP-1 und Cystatin C	104
5.16 Transduktion von Leber und Lunge und Sezernierung der Transgene in das Serum durch adenoviralen Gentransfer von Cystatin C und TIMP-1	107
5.17 Verstärkte Expression von Cathepsin B in der Leber durch Überexpression von Cystatin C	109
5.18 Verstärkte Expression von tPA durch simultane Überexpression von TIMP-1 und Cystatin C	112
5.19 Unterdrückung der durch Ko-Expression von TIMP-1 und Cystatin C induzierten Leber-Makrometastasierung durch additive Überexpression von PAI-2	114
5.20 Vergleich aller in dieser Arbeit verwendeten Behandlungen hinsichtlich der Reduktion von HT1080 Lungenmetastasen	116
5.21 Nachweis des Gentransfers und der Transgen Überexpression in Tieren der Dreifachbehandlung	120

5.22	Verstärkte HGF Expression in der Leber durch simultane Überexpression von TIMP-1 und Cystatin C .....	122
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>124</b>
6.1	Vergleich der anti-metastatischen Potenz von TIMP-1, PAI-2 und Cystatin C .....	125
6.2	Additive Reduktion der experimentellen HT1080 Lungenmetastasierung durch simultane Überexpression von zwei natürlichen Inhibitoren verschiedener tumorassoziierter Proteasefamilien .....	131
6.3	Verstärkte Expression von Proteasen durch Überexpression natürlicher Proteaseinhibitoren .....	132
6.4	Abhängigkeit der durch simultane Cystatin C und TIMP-1 Expression induzierten HT1080 Leber-Makrometastasierung von Plasminogen-Aktivatoren .....	136
6.5	HT1080 Makrometastasierung der Leber korreliert mit erhöhtem Gehalt an HGF .....	141
6.6	Ausblick .....	143
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>145</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>159</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>162</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>165</b>
<b>Anhang:</b>		
I	Verzeichnis der Bezugsquellen von Chemikalien und Reagenzien .....	I
II	Übersicht über die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide und Adenoviren .....	IV
III	Lebenslauf .....	IX
IV	Eigene Publikationen .....	X

## 1 Zusammenfassung

Metastasierung ist die Haupttodesursache bei Krebspatienten. Unregulierte proteolytische Aktivität von Matrix Metalloproteinasen (MMPs), papainähnlichen Cysteinproteinasen (CPs) sowie des Plasminogen-Aktivator (PA)-Systems trägt zum Abbau von Extrazellulärer Matrix und somit zur Metastasierung bei. Unter physiologischen Bedingungen ist die Aktivität dieser Proteasen von ihren natürlichen Inhibitoren, im Fall der MMPs von *tissue inhibitors of metalloproteinasen* (TIMPs), des PA-Systems von PA-Inhibitoren (PAIs) und der papainähnlichen CPs von Cystatinen, reguliert. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirksamkeit einer prophylaktischen Überexpression der natürlichen Inhibitoren TIMP-1, PAI-2 bzw. Cystatin C zur Reduktion der experimentellen Metastasierung einer humanen Fibrosarkomzelllinie (HT1080). Für den Gentransfer wurden funktionelle adenovirale Vektoren generiert welche die cDNAs von *TIMP-1*, *PAI-2* bzw. *Cystatin C* kodieren. Die prophylaktische Überexpression aller drei Inhibitoren wurde durch systemischen Gentransfer drei Tage vor der intravenösen Inokulation der *lacZ*-markierten Tumorzellen erzielt. Die Überexpression von TIMP-1, PAI-2 bzw. Cystatin C führte zu einer signifikanten Reduktion der Lungenmetastasierung (93%, 52% bzw. 92%) im Vergleich zur Kontrolle. Die Überexpression von TIMP-1 sowie von PAI-2 führte zu einem Anstieg der MMP-9 Expression. Die durch den Gentransfer erzielte TIMP-1 Überexpression war jedoch ausreichend, diese Nebenwirkung zu kompensieren. Durch eine simultane Überexpression von PAI-2 und TIMP-1 stellte sich eine signifikante, additive Reduktion der Lungenmetastasierung ein: nur in einer von 14 Lungen dieser Gruppe konnten Metastasen gefunden werden. Da die Überexpression von TIMP-1 ebenfalls zu einem Anstieg der Cathepsin B Expression führte, wurde die anti-metastatische Potenz der simultanen Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 untersucht. Dabei zeigte sich, dass diese Kombination die Lungenmetastasierung signifikant um 98% im Vergleich zur Kontrolle reduzierte, jedoch bei 42% der Tiere in den Lebern die Formation von Makrometastasen induzierte. Da dieses mit einem Anstieg der Expression des *tissue-type* Plasminogen-Aktivators korreliert war, wurde die simultane Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 um die Expression von PAI-2 erweitert, welches die induzierte Leber-Makrometastasierung unterdrückte. In dieser Arbeit wurde erstmalig eine additive anti-metastatische Wirksamkeit durch simultane Inhibition verschiedener Proteasefamilien durch ihre natürlichen Inhibitoren gezeigt. Durch Analyse der Expression tumorassoziierter Proteasen wurde gezeigt, dass die Überexpression natürlicher Inhibitoren die Expression inhibierter Proteasen sowie Proteasen anderer Familien verstärkt. Es konnte daher die Notwendigkeit einer simultanen Inhibition mehrerer Proteasefamilien zur Unterdrückung tumorfördernder Nebenwirkungen hervorgehoben werden.

## 2 Einleitung

### 2.1 Krebserkrankungen: Einführung und Begriffsbestimmung

Maligne Tumorerkrankungen sind in Mitteleuropa nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit 25% die zweithäufigsten Todesursachen (zur Hausen, 2003). Unter Tumoren versteht man eine abnorme Vergrößerung eines Gewebes, verursacht durch autonome, progressive und verstärkte Proliferation von Körperzellen (Wagener, 1999). Maligne Tumoren unterscheiden sich von benignen Tumoren durch ihr invasives Wachstum, welches in der Regel zur Ausbildung von Tochtergeschwüren in sekundären Organen, so genannten Metastasen, führt. Maligne Tumorerkrankungen werden als Krebs bezeichnet. Die der Erkrankung zugrunde liegende Umwandlung einer nicht-pathogenen Körperzelle in eine pathogene Tumorzelle wird Transformation genannt (Wagener, 1999). Der genetische Defekt der zur Transformation von Körperzellen führt und somit zu unkontrollierter Proliferation, kann sowohl durch Kanzerogene hervorgerufen werden als auch vererbt worden sein, in letzterem Fall spricht man von genetischer Disposition (Wagener, 1999). Genetische Disposition ist nur in 5% aller Fälle die Ursache für Krebserkrankungen, als Hauptursache für Tumoren gelten Kanzerogene (Blettner, 2003).

Mit konventionellen Therapien beträgt die Heilungsrate bei Krebs 45%, wobei diese aus der einfachen oder kombinierten Anwendung von Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie bestehen (Wedding und Höffken, 2003). Im Falle von malignen Tumorerkrankungen sind in der Regel bereits vor der Entdeckung des Primärtumors Tumorzellen in sekundäre Organe eingedrungen und liegen dort ruhend (*dormant*) vor oder sind bereits zu Tochtertumoren (Metastasen) ausgewachsen (McKinell, 1999). In solchen Fällen ist die chirurgische Entfernung des Primärtumors nicht ausreichend, eine Heilung zu gewährleisten. Die konventionelle Behandlung gegen ausgebildete Metastasen ist die Chemo- bzw. Radiotherapie bei welchen die im Patienten verstreut vorliegenden Tumorzellen eliminiert werden sollen (Wedding und Höffken, 2003). Eine prophylaktische Anwendung dieser beiden Behandlungen ist jedoch nicht ratsam, da diese sehr starke Nebenwirkungen aufweisen (Wedding und Höffken, 2003; Pantel und Brakenhoff, 2004). Um eine Prognose für den Patienten erstellen zu können werden Primärtumoren und lokale Lymphknoten nach der chirurgischen Entfernung histologisch beurteilt. Dabei wird der Phänotyp des Primärtumors hinsichtlich invasiven Wachstums untersucht, sowie in den Lymphknoten das Vorkommen von Metastasen überprüft, um das metastatische Potential der Tumorzellen, d.h. ihrer Fähigkeit den Primärtumorverband zu verlassen und sekundäre Organe zu besiedeln, zu bestimmen (Pantel und Brakenhoff, 2004). Neben

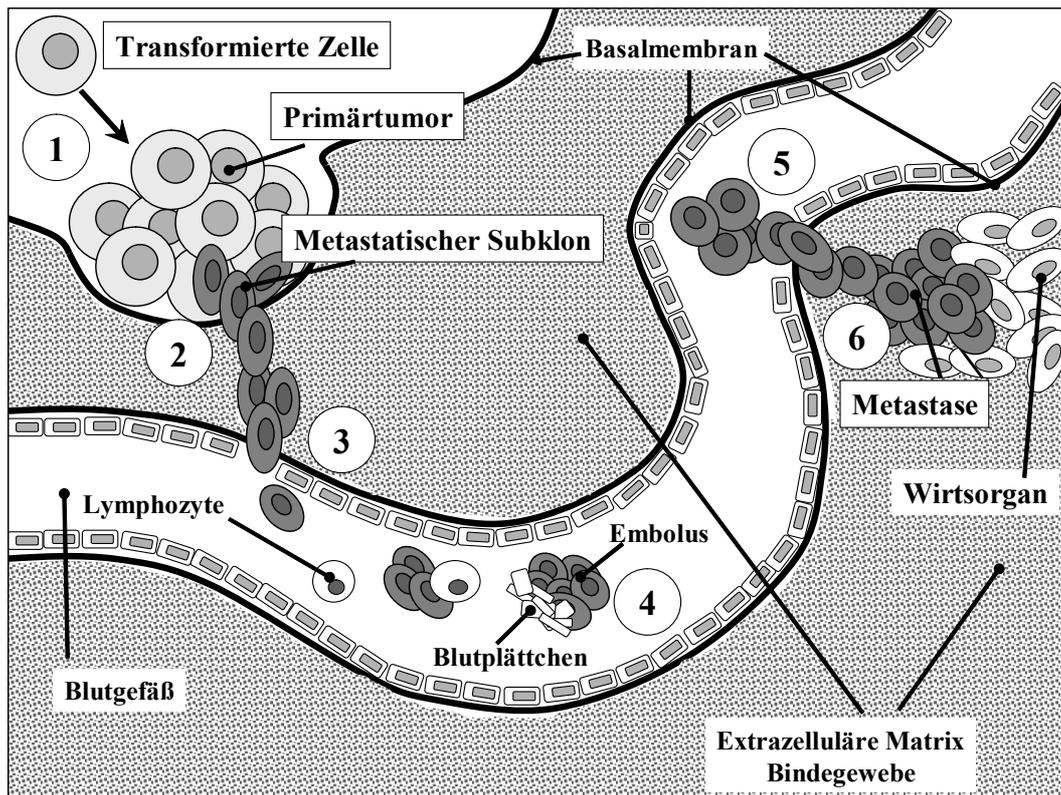
diesen histologischen Faktoren wurden in den letzten Jahren Proteine charakterisiert, welche mit der Progression von Tumoren korrelieren und somit zur Abschätzung des metastatischen Potentials der Tumorzellen herangezogen werden können. Alle Faktoren die zur Einschätzung des Krankheitsverlaufes bei Krebspatienten und somit zur Festlegung der Therapieform führen, werden prognostische Marker genannt. Trotz der immer genaueren Prognose und der konventionellen Therapien stellt die Metastasierung mit 90% noch immer die Haupttodesursache bei Krebspatienten dar (Gibbs, 2003, Pantel and Brakenhoff, 2004). Ein genaueres Verständnis der bei der Metastasierung ablaufenden Prozesse ist dringend erforderlich, um neue effiziente Behandlungsstrategien zu entwickeln.

### **2.2 Die metastatische Kaskade**

Wie in Abbildung 2.1 für ein Karzinom dargestellt, kann der Progress der Metastasierung in einzelne aufeinander folgende Abschnitte aufgeteilt werden und wird als metastatische Kaskade bezeichnet. Unter Karzinomen versteht man Tumoren, welche aus der Transformation von Endothelzellen hervorgegangen sind (Wagener, 1999). Durch weitere Veränderungen des Genoms einzelner Zellen dieses Karzinoms, kann es zur Ausbildung eines metastatischen Subklons kommen. Die darauf folgende metastatische Kaskade untergliedert sich in folgende Schritte:

#### a) *Invasion (Abb. 2.1, 2)*

Bei der Invasion müssen sich Tumorzellen vom Primärtumorverband ablösen, die Basalmembran durchdringen und Bindegewebe sowie extrazelluläre Matrix (*extracellular matrix*, ECM) erschließen (McKinell, 1999). Unter ECM versteht man alle von Zellen sezernierten, extrazellulär vorkommenden und immobilisierten Proteine. Basalmembranen sind dünne Flächen bestehend aus ECM auf welchen Epithel- und Endothelzellen aufliegen und diese von dem sie umgebenen Gewebe abgrenzen (Egeblad and Werb, 2002). Um die Basalmembran zu penetrieren, müssen Tumorzellen zunächst an diese anheften. Dieses wird von Rezeptoren und Integrinen auf den Oberflächen der Tumorzellen vermittelt (Günthert, 1997; Lauwaet et al., 2000). Für den Abbau der Bestandteile der Basalmembran, vornehmlich Typ IV Kollagene, aber auch Laminin, Fibronektin und Proteoglykane, sind Enzyme notwendig, die diese Substanzen spalten können, so genannte Proteasen (McKinell, 1999). Da Typ IV Kollagene der Hauptbestandteil von Basalmembranen sind, sind vor allem Proteasen die speziell diesen Bestandteil abbauen können für eine erfolgreiche Penetration der Basalmembran erforderlich.



**Abbildung 2.1. Die metastatische Kaskade.** 1. Auswachsen einer transformierten Zelle zu einem Primärtumor, 2. Invasion, 3. Intravasation, 4. Zirkulation der Tumorzellen, 5. Extravasation und 6. Etablierung der Tumorzellen in einem sekundären Organ. Die Abbildung wurde nach McKinell, 1999, erstellt. Für genauere Erklärungen siehe Text.

Die wichtigsten tumorassoziierten Proteasen sind die Matrix Metalloproteinasen, die Cysteinproteasen und Faktoren des Plasminogen-Aktivator-Systems (Magdolen et al., 2002). Da diese Proteasen nicht nur bei diesem Schritt der Metastasierung von Bedeutung sind, wird auf diese in Abschnitt 2.4 ausführlich eingegangen. Ist die Basalmembran beschädigt, können Zellen des metastatischen Subklons in das Bindegewebe eindringen. Diese Zellen zeichnen sich durch ihre Motilität aus, welche von chemischen Lockstoffen sowie von Zytokinen und den jeweils entsprechenden Rezeptoren auf den Tumorzellen abhängig ist (Lauwaet et al., 2000; Günthert, 1997). Durch die dadurch ausgelösten Signaltransduktionswege kommt es zur Expression von Faktoren wie z.B. Proteinasen, welche für die Bewegung von Tumorzellen durch Gewebe notwendig sind (Günthert, 1997).

#### b) *Intravasation* (Abb. 2.1, 3)

Am Ende einer erfolgreichen Invasion steht die Penetration des Gefäßsystems. Diese wird Intravasation genannt. Die Intravasation ist von ähnlichen Faktoren wie die Invasion abhängig: Abbau von ECM und Motilität der Tumorzellen (McKinell, 1999).

### c) *Zirkulation der Tumorzellen (Abb. 2.1, 4)*

Nachdem Tumorzellen in das Gefäßsystem eingedrungen sind kommt es zur Interaktion mit den dort enthaltenen Wirtszellen. Tumorzellen können sich im Blutgefäßsystem aneinanderheften und auch Lymphozyten des Wirtes werden in diesen Komplex integriert. Dieser kann von Blutplättchen umschlossen werden und einen so genannten Tumor-Embolus ausbilden, wobei dieser durch einen fibrinhaltigen Thrombus stabilisiert werden kann. Dieser Komplex kann mit den Endothelzellen von Kapillaren interagieren und diese zu einem Zurückweichen und Freilegen der Basalmembran anregen (McKinnell, 1999).

### d) *Extravasation (Abb. 2.1, 5)*

Der Prozess bei dem die Tumorzellen das Gefäßsystem verlassen wird als Extravasation bezeichnet. Die gleichen Faktoren, welche die Tumorzellen befähigten in das Gefäßsystem einzudringen, ermöglichen ihnen auch die Extravasation (Günthert, 1997).

### d) *Etablierung der Tumorzellen im sekundären Organ (Abb. 2.1, 6)*

Nachdem die Tumorzellen in sekundäre Organe gelangt sind können sie dort durch Proliferation einen Tochtertumor (Metastase) ausbilden oder auf unbestimmte Zeit ruhend (*dormant*) im Gewebe verbleiben. Das Auswachsen einer Metastase ist von verschiedenen Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren und Proteasen abhängig (Günthert, 1997). Aufgrund einer Limitation von Nährstoffen, welche nur durch Diffusion von Blutgefäßen in das Bindegewebe gelangen, ist die Größe zu der die Metastasen auswachsen können begrenzt. Nur die Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) kann diese Mangelversorgung, welche ab einer Größe von 1-2 mm zur Ausbildung von Nekrosen führt, verhindern (Folkman, 1986).

Die Untersuchung der bei der Metastasierung ablaufenden Prozesse benötigt adäquate Modelle, in welchen die einzelnen Schritte der Tumorprogression rekapituliert werden bzw. einzelne Abschnitte der Progression gesondert betrachtet werden können.

### 2.3 Metastasierungsmodelle

Um die bei der Metastasierung vorgehenden Prozesse genauer bestimmen bzw. um neue anti-metastatische Therapien entwickeln zu können, ist man auf Tiermodelle angewiesen, welche ein möglichst genaues Abbild der im Krebspatienten ablaufenden Prozesse widerspiegeln. Die komplexen Vorgänge der Tumorprogression lassen sich *in vitro*, d.h. in Zellkulturen, nur unzureichend nachstellen. So zeigte keines von 171 in der Klinik erfolgreich eingesetzten Standard-Zytotoxika eine Selektivität gegenüber verschiedenen, ausgewählten Brustkrebs- und Melanomzelllinien *in vitro* (Freije et al., 1997). Wären diese Reagenzien im Vorfeld der klinischen Studien nur mittels Zellkultur untersucht worden, wäre keines dieser Medikamente jemals in Patienten verwendet worden. Die Verwendung einfacher *in vitro* Methoden kann für den Test einer Hypothese verwendet werden, da aber die Wirtsumgebung von Tumoren bzw. Metastasen einen Einfluss auf die in den Tumoren ablaufenden Prozessen hat, ist es angebracht, die durch *in vitro* Analysen gewonnenen Erkenntnisse *in vivo* zu bestätigen (Eccles, 2001). Die Bearbeitung einer bestimmten Fragestellung benötigt jedoch die Auswahl des adäquaten Tumormodelles, da jedes Tumormodell Vor- und Nachteile aufweist (Eccles, 2001).

Man unterscheidet syngene Tumormodelle, d.h. Modelle in denen Tumorzellen und Wirt der gleichen Spezies bzw. Stamm entstammen, von so genannten *Xenograft*-Modellen in welchen humane Tumorzellen in immundefizienten Tieren verwendet werden (Watson und Morris, 2001). Der Vorteil von *Xenograft*-Modellen ist, dass humane Tumorzellen untersucht werden, und die Ergebnisse leichter auf den Menschen übertragbar sind. *Xenograft*-Modelle müssen vor allem dann verwendet werden, wenn human-spezifische Therapeutika verwendet werden. Der Nachteil dieser Modelle besteht darin, dass immundefiziente Tiere verwendet werden müssen und somit ein Beitrag des Wirtsimmunsystemes nicht (im vollem Umfang) untersucht werden kann. In syngen Tumormodellen hingegen können immunkompetente Tiere verwendet und somit Beiträge des Immunsystems untersucht werden. Allerdings zeichnen sich syngene Modelle in der Regel durch einen sehr aggressiven Krankheitsverlauf aus, was nur einen begrenzten Zeitraum zur Beobachtung und Untersuchung der Tumorprogression ermöglicht (Watson und Morris, 2001).

Man unterscheidet zudem die so genannte spontane und experimentelle Metastasierung (Eccles, 2001). Bei der spontanen Metastasierung kommt es zur Metastasierung ausgehend von einem wachsenden Primärtumor, wobei dieser unterschiedlich generiert werden kann: a) spontane Ausbildung von Tumoren durch Kanzerogene oder künstliche Mutation des Genoms des Tieres (Guy und Cardoso, 2001) oder b) durch Inokulation von Tumorzellen (meist sub-

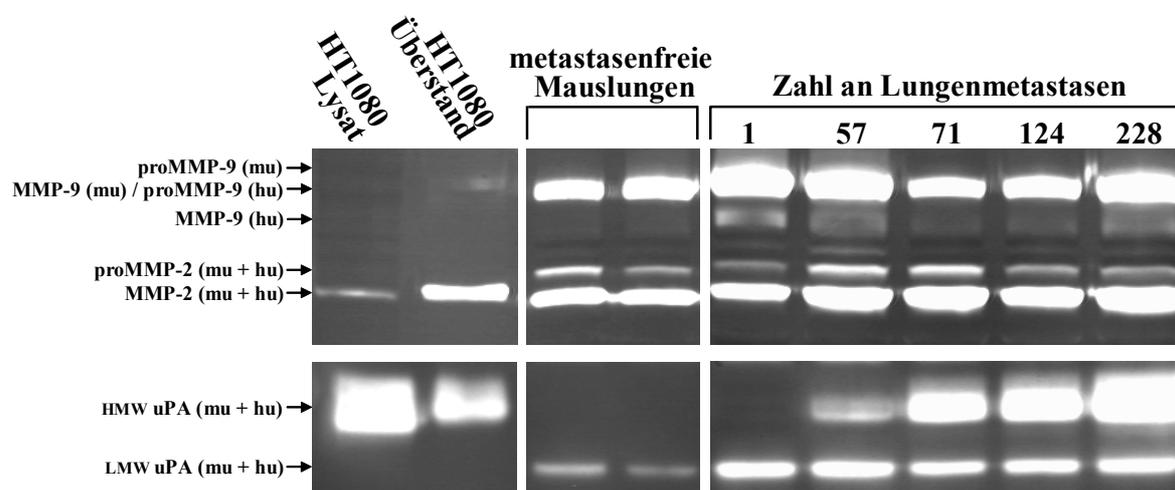
kutan, intramuskulär oder intradermal, Price, 2001). Bei der experimentellen Metastasierung werden Tumorzellen intravaskulär appliziert, wodurch die Generierung der Metastasen im Gegensatz zur spontanen Metastasierung von im Primärtumor ablaufenden Prozessen wie z.B. der Proliferation oder Angiogenese unabhängig ist (Price, 2001). Viele Therapeutika haben einen Einfluss auf das Primärtumor-Wachstum. Spontane Metastasierung ist u. a. von der Größe der Tumoren abhängig. In Modellen spontaner Metastasierung kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass bei gleichzeitiger Veränderung des Tumor-Wachstums und des metastatischen Potentials der Tumorzellen, dieses veränderte metastatische Potential nur eine Reflektion des veränderten Primärtumor-Wachstums darstellt. Obwohl die spontane Metastasierung das der Klinik nähere Modell darstellt, ist die experimentelle Metastasierung besser geeignet die anti-metastatische Wirksamkeit einer Behandlung zu untersuchen. Die experimentelle Metastasierung beinhaltet die Prozesse die zum Arrest der Tumorzellen in der Zirkulation, ihrer Extravasation und Etablierung im Zielorgan der Metastasierung führen (Price, 2001). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein Modell experimenteller Metastasierung verwendet um das anti-metastatische Potential natürlicher Proteaseinhibitoren zu untersuchen. Bei allen Metastasierungsmodellen stellt die Detektion der Metastasen ein Problem dar. Nicht alle Läsionen und Schwellungen die in Organen gefunden werden sind Metastasen (Eccles, 2001).

### **2.3.1 Bedeutung von Markergenen zur Detektion von Metastasen *in vivo***

Eine Möglichkeit die Detektion von Tumorzellen zu erleichtern stellt die genetische Markierung der zu inokulierenden Tumorzellen dar (Eccles, 2001). Hierfür werden leicht nachzuweisende Gene anderer Spezies, so genannte Markergene, in das Genom der Tumorzellen eingeschleust. Das  $\beta$ -D-Galaktosidase kodierende Gen *lacZ* aus *E. coli* stellt ein solches Markergen dar. Die intrazelluläre Hydrolyse des chromogenen Substrates X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) durch  $\beta$ -D-Galaktosidase führt zur Präzipitation von Indigo in den Zellen, welches als blauer Farbstoff sichtbar wird (Pearson et al., 1963). Das exprimierte *lacZ*-Protein ist im Zytoplasma der Zellen lokalisiert, durch das Anfügen einer kurzen Sequenz des nukleären SV40 *large T* Antigen an das *lacZ*-Gen wird das Genprodukt in den Nukleus transportiert. Diese Form des *lacZ*-Genes wird *nls-lacZ* (*nuclear leader sequence-lacZ*) genannt (Krüger et al., 1999). Durch die Markierung von Tumorzellen mit dem *lacZ*-Gen können Tumorzellen nach X-Gal Färbung der metastasenträgenden Organe *ex vivo* bis auf Einzelzellebene nachgewiesen werden (Krüger et al., 1999).

### 2.3.2 Das HT1080 Fibrosarkom-Modell

Fibrosarkome sind Tumoren, welche aus der Transformation von Bindegewebszellen hervorgegangen sind (Wagener, 1999). Daher handelt es sich bei diesen, ebenso wie bei Karzinomen, um solide Tumoren. HT1080-Zellen sind humane Fibrosarkomzellen, welche aus einem malignen Primärtumor eines Patienten isoliert wurden (Rasheed, et al., 1974). Nach intravenöser Applikation dieser Zellen kommt es zur Ausbildung von Lungen- und Lebermetastasen. Während die Tumorzellen in der Leber in der Regel einzellig vorliegen (als Mikrometastasen bezeichnet), wachsen die Lungenmetastasen zu vielzelligen Makrometastasen aus (Schweinitz et al., 2004; Arlt, 2004; Nagel, 2004). HT1080-Zellen exprimieren *in vitro* eine Vielzahl von Proteasen, unter anderem Matrix Metalloproteinasen (MMPs, Nagel, 2004; Arlt, 2004), Urokinase (*urokinase-type plasminogen activator*, uPA, Schweinitz et al., 2004; Nagel, 2004) wie auch Cathepsine (Sokol et al., 2004), weshalb sie sich für die Untersuchung tumorassoziierter Proteasen bzw. deren Inhibition sehr gut eignen. In früheren Studien mit diesem Tumormodell konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass es im Verlauf der Metastasierung der Lunge zu einem Anstieg an Gelatinasen (MMP-2 und -9) kommt (Abb. 2.2, Arlt, 2004).



**Abbildung 2.2. Expression von Gelatinasen in HT1080-Metastasen tragenden Lungen.** Links: HT1080-Zellen sezernieren Gelatinasen in das Kulturmedium. Mitte: Expression von Gelatinasen in Lungen tumorfreier Mäuse. Rechts: Expression von Gelatinasen in metastasentragenden Lungen. mu: murin; hu: human; Abbildung aus Arlt et al., 2004.

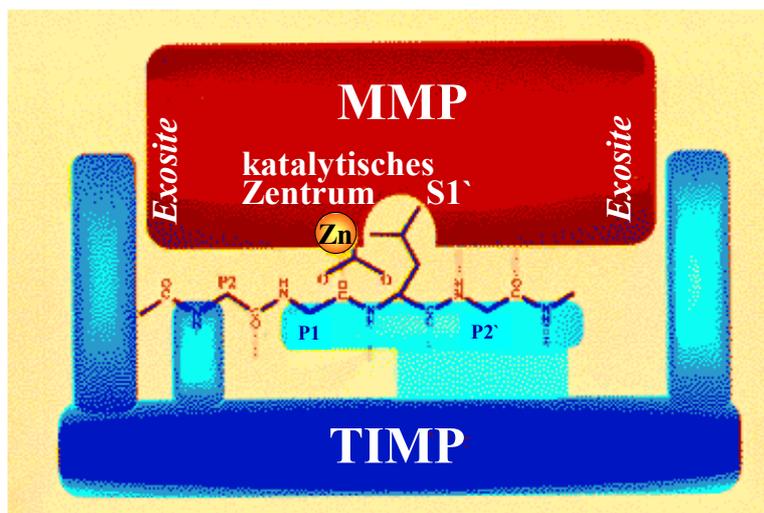
### 2.4 **Bedeutung von Proteasen bei der Metastasierung**

Der Um- bzw. Abbau von ECM und Basalmembranen ist ein wichtiger Bestandteil vieler physiologischer Prozesse und unterliegt einer strengen Regulierung. Unkontrollierte proteolytische Aktivität und somit verstärkter Umsatz der ECM spielt eine bedeutende Rolle bei der Tumorprogression, wie es unter 2.2 bereits beschrieben wurde. Die wichtigsten Proteasen die mit der verstärkten proteolytischen Aktivität bei der Tumorprogression in Zusammenhang gebracht werden und daher als tumorassoziiert bezeichnet werden, sind die Matrix Metalloproteinasen (MMPs), das Plasminogen-Aktivator-System (PA-System) und Cysteinproteasen (CPs, Magdolen et al., 2002).

#### 2.4.1 **Die Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und ihre endogenen Inhibitoren**

Das Gleichgewicht zwischen MMP-Aktivität und Inhibition durch natürliche Inhibitoren ist die Voraussetzung für den geregelten Ablauf zahlreicher physiologischer Prozesse, wie Embryonalentwicklung, Morphogenese, Reproduktion und Gewebe-Resorption und -Umbau (Nagase und Woessner, 1999; Gomez et al., 1997). Durch Überexpression von MMPs verursacht unregulierte proteolytische Aktivität spielt bei verschiedenen pathologischen Prozessen, wie bei rheumatischer Arthritis, Osteoarthritis, Peridontitis, Autoimmunerkrankungen der Haut und malignen Tumorerkrankungen, eine bedeutende Rolle (Vihinen und Kähäri, 2002).

Gegenwärtig sind 24 Matrix Metalloproteinasen (MMPs) in Wirbeltieren beschrieben, von welchen 23 in Menschen gefunden wurden. Die Signaturen nach welchen Proteinasen dieser Familie zugeordnet werden sind folgende: a) Sequenz-Homologie mit MMP-1 (Kollagenase-1), b) dem *cystein-switch-motif* im Propeptid (mit Ausnahme von MMP-23) und c) dem Zink-Bindungs-Motiv in der katalytischen Domäne (Visse und Nagase, 2003). MMPs enthalten neben dem Zinkion des aktiven Zentrums ein weiteres, strukturelles Zinkion und zwei bis drei strukturelle Kalziumionen in jedem Molekül, demzufolge ist die Anwesenheit von Kalzium- und Zinkionen für die Aktivität von MMPs notwendig (Bode und Huber, 2000). Generell bestehen MMPs aus der Pro-Domäne, der katalytischen Domäne, einer Verbindungsregion (*hinge region*) und der Hämopexin-Domäne (mit Ausnahme der Matrilysine). Auf der Basis ihrer Substratspezifität, Sequenz-Homologien und Domänen-Organisation werden die Vertebraten MMPs in sechs Gruppen unterteilt: Kollagenasen (MMP-1, -8, -13), Gelatinasen (MMP-2, -9), Stromelysine (MMP-3, -10), Matrilysine (MMP-7, -26), Membran-Typ MMPs (MT-MMPs: MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25) und andere MMPs (Visse und Nagase, 2003).



**Abbildung 2.3. Schematische Darstellung der MMP-Inhibition durch TIMPs.** TIMP ist blau, MMP rot dargestellt. Ein Teil der N-terminalen Domäne des TIMP-Moleküls lagert sich in das aktive Zentrum der MMP ein. Periphere *loops* des TIMP interagieren mit *exosites*. Zn: Zinkion des katalytischen Zentrums. Genauere Beschreibung siehe Text (aus Bode und Huber, 2000).

MMPs, mit Ausnahme von Matrilysin (MMP-7), werden als inaktives Zymogen (proMMP) sezerniert und von Proteinasen verschiedener Familien, z.B. Plasmin und MMPs, durch entfernen der pro-Domäne aktiviert (Bode und Huber, 2000; Nagase und Woessner, 1999).

MMPs werden unter normalen physiologischen Bedingungen von ihren natürlichen Breit-spektrum-Inhibitoren, nämlich den  $\alpha$ 2-Makrotubulinen, dem membrangebundenem MMP-Inhibitor RECK (Reversions-induzierendes Cysteine-reiches Protein mit Kazal-Motiven) und den *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs), reguliert (Egeblad und Werb, 2002). Es sind vier verschiedene TIMPs im Menschen bekannt (TIMP-1 – TIMP-4). Alle vier Isoformen haben verschiedene strukturelle Eigenschaften gemeinsam: a) 12 Cystein-Reste in konservierten Regionen der Inhibitoren welche sechs Disulfidbrücken ausbilden, b) Organisation in eine N- und C-terminale Domäne, c) eine Konsensus-Sequenz, VIRAK, in der N-terminalen Domäne und d) eine aus 29 Aminosäuren bestehende *leader*-Sequenz, welche bei der Reifung des Proteins entfernt wird (Gomez et al., 1997).

TIMPs inhibieren MMPs durch Ausbilden eines starken aber nicht-kovalenten 1:1 stoichiometrischen Komplexes (Brand, 2002). Hierbei lagert sich die lange Kante der keilförmigen N-terminalen Domäne in das gesamte katalytische Zentrum und die Substrat-Bindungsfurche der zu inhibierenden MMP ein. Periphere Schleifen (*loops*) der N- und der C-terminalen Domäne interagieren mit *exosites* der MMP (Abb. 2.3). Diese Art der Inhibition, substratähnliche Interaktion mit dem aktiven Zentrum zusammen mit additiven Interaktionen mit *exosites*, wird als quasi-Substrat-ähnlich bezeichnet (Bode und Huber, 2000). Neben der Inhibition aktiver

MMPs kann TIMP-1 an proMMP-9 binden und dessen Aktivierung inhibieren. Diese Inhibition erfolgt über eine Interaktion der Hämopexin-Domäne von MMP-9 und der C-terminalen Domäne des TIMP-1-Moleküls (Nagase und Brew, 2002). TIMP-1 kann im Gegensatz zu TIMP-2 keine MT-MMPs inhibieren (Visse und Nagase, 2003). Durch die Bindung an MT1-MMP ist TIMP-2 an der zelloberflächengebundenen Aktivierung von proMMP-2 beteiligt, wobei proMMP-2 in einem tertiären Komplex mit TIMP-2 und MT1-MMP von einem weiteren, aktiven MT1-MMP-Molekül aktiviert wird. Dabei erfolgt die Bindung von proMMP-2 an TIMP-2 durch eine Interaktion der Hämopexin-Domäne des MMP-2 und der C-terminalen Domäne des TIMP-2 (Nagase und Woessner, 1999).

TIMP-1 wird von verschiedenen Zelltypen in einer Vielzahl von Geweben sezerniert. Neben der MMP-Inhibition besitzt TIMP-1 proliferationssteigernde Wirkung in einer Reihe von Zelltypen. Diese Wachstumsfaktor-ähnliche Funktion von TIMP-1 auf verschiedene Zelltypen wird vermeintlich durch die Bindung von TIMP-1 an einen Zellrezeptor hervorgerufen (Hornebeck, 2003). Bis vor kurzem wurde angenommen, dass diese Eigenschaft unabhängig von der MMP-Inhibition und vermutlich auf dem C-Terminus lokalisiert ist (Chesler et al., 1995). Vor kurzem konnte jedoch gezeigt werden, dass auch die Inhibition von MMPs durch TIMP-1 die Zellproliferation steigern kann (Porter et al., 2004).

### *2.4.1.1 Bedeutung von MMPs und ihrer natürlichen Inhibitoren bei Krebs*

Bei malignen Tumoren kann unregulierte Aktivität von MMPs die Metastasierung von Tumorzellen fördern indem Bestandteile der ECM und der Basalmembranen abgebaut werden. Dieser Abbau ist bei nahezu jeder Stufe der metastatischen Kaskade notwendig, von den ersten Schritten der Invasion bis zum Auswachsen von etablierten Metastasen (Brand, 2002). MMPs sind bei dem Abbau der ECM von besonderer Bedeutung, da nur Mitglieder dieser Gruppe fibrilläres Kollagen jedes Typs verdauen können (Vihinen und Kähäri, 2002; Stetler-Stevenson and Yu, 2001; Coussens et al., 2002). In Krebspatienten ist bei nahezu jeder Krebsform die Expression von MMPs erhöht, und in der Regel ergab sich eine Korrelation zwischen MMP Überexpression und schlechter Prognose für den Patienten (Egeblad und Werb, 2002; Vihinen und Kähäri, 2002; Ruokolainen, et al., 2004). Paradoxerweise ist auch die Überexpression von TIMP-1 in vielen Tumorerkrankungen mit einer schlechten Prognose assoziiert, z.B. bei Brustkrebs (Nakopoulou et al., 2002; McCarthy et al., 1999; Schrohl et al., 2004), Ovarialkarzinomen (Manenti et al., 2003), Magenkrebs (Yoshikawa et al., 2001; Yoshikawa et al., 2000), Lungenkrebs (Ylisirniö et al., 2001), Rektalkarzinomen (Holten-

Andersen et al., 2004; Yukawa et al., 2001) und Nierenzellkarzinomen (Kallakury et al., 2001). Ob es sich hierbei um einen direkten Effekt der TIMP-1 Überexpression auf die Tumorprogression handelt oder ob die erhöhte Expression von TIMP-1 nur eine Reflektion der verstärkten MMP-Expression darstellt wurde in der Regel nicht weiter untersucht (Magdolen et al., 2002). In manchen Studien konnte jedoch eine Ko-Expression von MMPs und TIMPs nachgewiesen werden (Kallakury et al., 2001; Kuitinen et al., 2003). In Patienten mit non-Hogkin's Lymphomen konnte ein Trend für eine bessere Prognose beobachtet werden, wenn in Patienten mit hoher MMP-9 Expression TIMP-1 koexprimiert wurde (Kuitinen et al., 2003). Andere Studien zeigen, dass ein Ungleichgewicht von MMP und TIMP Expression mit schlechter Prognose für den Patienten korreliert ist (Zhang et al., 2003; Giannelli, et al., 2004; Monier, et al., 2002). Im Falle von Brustkrebspatientinnen konnte gezeigt werden, dass das Ungleichgewicht zwischen proMMP-9 und TIMP-1 Gehalt nach chirurgischer Entfernung des Primärtumors nicht mehr aufrechterhalten wurde. Durch reduzierte MMP-9 und gleichzeitig erhöhte TIMP-1 Expression stellte sich bei diesen Patientinnen ein neues Gleichgewicht ein (Giannelli, et al., 2004). Ein erhöhter Gehalt an TIMPs in aggressiven Primärtumoren, welche große Mengen an MMPs exprimieren, könnte zudem ein notwendiger Faktor sein, innerhalb des Tumorverbandes eine möglichst „physiologische“ Umgebung zu schaffen (Brand, 2002), in diesem Falle würde die TIMP-Expression einen Schutz des Primärtumorgewebes darstellen.

In Tiermodellen konnte die Bedeutung der MMPs nicht nur für die Metastasierung sondern auch für Tumorwachstum und Angiogenese belegt werden. Die Metastasierung von Tumorzellen wurde verstärkt, wenn Tumorzellen MMPs überexprimierten, umgekehrt konnte die Metastasierung reduziert werden wenn die Expression bzw. die Aktivität von MMPs reduziert wurde (Egeblad und Werb, 2002). Es bleibt anzumerken, dass nicht nur die von Tumorzellen exprimierten MMPs die Metastasierung fördern. So wird das *in vivo* Wachstum von Brustkarzinomzellen von MMP-11 *knock out*-Fibroblasten im Gegensatz zu wildtyp-Fibroblasten nicht unterstützt. Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung von durch Wirtszellen produzierte MMPs ergab sich bei der Verwendung von MMP-2 bzw. MMP-9 *knock out*-Mäusen, in welchen die experimentelle Metastasierung von Tumorzellen im Vergleich zu den wildtyp Mäusen reduziert ist (Egeblad und Werb, 2002). Die Überexpression von MMP-3 bzw. MMP-14 führt in Brustgewebe von Mäusen zur Bildung spontaner Tumoren. Dieses deutet auf weitere Funktionen der MMPs abgesehen von ECM Abbau hin (Egeblad und Werb, 2002). Durch Verwendung verschiedener *knock out*-Mäuse in denen jeweils eine bestimmte MMP (MMP-2, -3, -7, -11) entfernt wurde, konnte gezeigt werden, dass MMPs nicht nur an der Metastasier-

nung beteiligt sind, sondern auch am Primärtumorwachstum, welches in den verwendeten *knock out*-Mäusen verglichen zu den Kontrollen reduziert war (Coussens et al., 2002). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass MMPs an der Regulierung von Zelltod, Zellproliferation, Angiogenese und Metastasierung beteiligt sind (Coussens et al., 2002; Vihinen und Kähäri, 2002; Sounni et al., 2003). Diese Funktionen können durch die Prozessierung von nicht-Matrix Proteinen, wie Chemokinen, Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Adhäsionsmolekülen oder apoptotischen Mediatoren, vermittelt werden oder durch Freisetzung von in der ECM eingebetteten Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren (Egeblad und Werb, 2002). Es ist jedoch wichtig festzustellen, dass es sich bei den MMPs um eine Familie von Proteinasen handelt, die ein großes Spektrum an Funktionen erfüllt, welche unter anderem auf den unterschiedlichen Substratspezifitäten der einzelnen MMPs beruhen. Dadurch fördern nicht alle MMPs die Tumorprogression, sondern in manchen Fällen führen MMPs zu einer Reduktion der Progression. Dieses wird durch die Tatsache reflektiert, dass die Überexpression von einzelnen MMPs in Tumorpatienten nicht immer mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Vihinen und Kahäri, 2002). Die genauen Auswirkungen einzelner MMPs auf die Tumorprogression müssen jedoch in der Zukunft noch intensiv untersucht werden (Egeblad und Werb, 2002).

Eine anti-proteolytische Therapie gerichtet gegen MMPs scheint dennoch ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung der Tumorprogression zu sein, da sowohl Studien aus der Klinik sowie präklinische Versuche in Tiermodellen die Bedeutung der MMPs bei der Tumorprogression unterstreichen.

### 2.4.1.2 *Behandlung der Tumorprogression mit natürlichen Inhibitoren der MMPs*

Für alle TIMPs konnte *in vitro* gezeigt werden, dass ihre Überexpression durch Tumorzellen die Invasivität der so manipulierten Zellen hemmt (Brand, 2002). Damit konnte im Prinzip gezeigt werden, dass auch die Überexpression von TIMP-1, trotz der in der Klinik beobachteten Korrelation von Überexpression und schlechter Prognose, die Invasion von Tumorzellen inhibieren kann. Eine Reihe von Arbeitsgruppen versuchte diese Ergebnisse in *in vivo* Modelle zu übertragen. Die Überexpression von TIMP-1 durch Tumorzellen führte *in vivo* zu einer Reduktion der Anzahl sowie der Größe von Metastasen, konnte aber auch zu verstärktem Primärtumorwachstum führen (Brand, 2002). Da TIMP-1 einen wachstumsfördernden Einfluss haben kann (Hayakawa et al., 1992), könnte die Expression von TIMP-1 durch die Tumorzellen zu dem verstärkten Primärtumorwachstum geführt haben. Allerdings unterdrückte

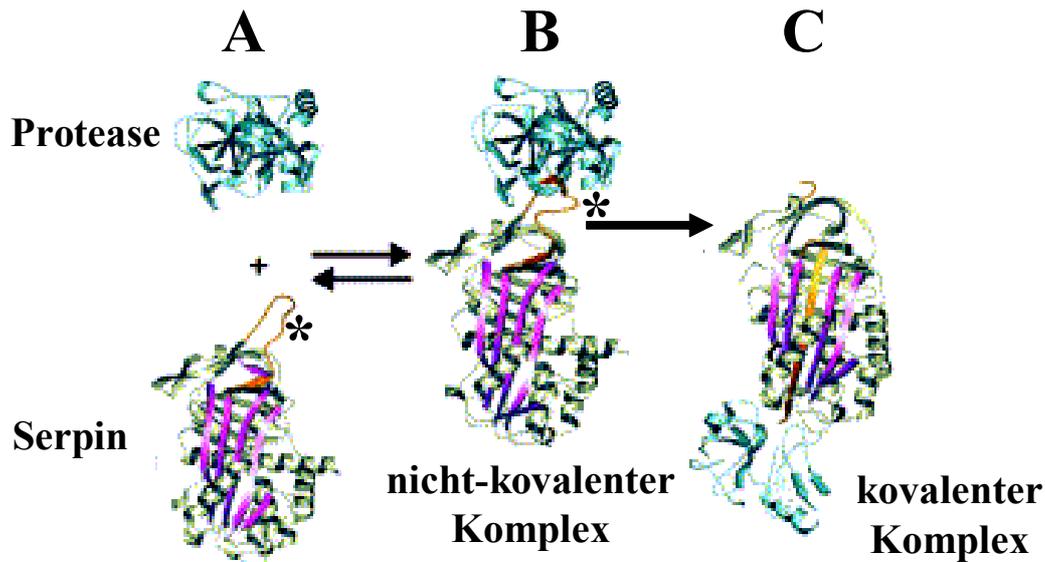
die Überexpression von Timp-1 in der Leber transgener Mäuse die Generierung und Progression hepatozellulärer Karzinome, welche durch das virale SV40 T-Antigen induziert wurden (Martin et al., 1996). Da bei diesem Tumormodell Hepatozyten transformiert wurden, erfolgte die Reduktion des Tumorwachstums trotz der Überexpression von Timp-1 durch die transformierten Zellen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Überexpression von Timp-1 durch Tumorzellen nicht *per se* zu einer Steigerung des Primärtumorwachstums führt. Die Verwendung von transgenen Mäusen konnte auch die anti-metastatische Wirksamkeit von Timp-1 belegen. So schützte die Überexpression von Timp-1 im Gehirn dieses Organ vor der experimentellen Metastasierung syngener Fibrosarkomzellen (FS/L10, Krüger et al., 1998). In einem anderen syngenen Tumormodell konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Timp-1 das Primärtumorwachstum von T-Zell Lymphomzellen und die von diesen ausgehende spontane Metastasierung unterdrückte, während die Expression von Timp-1 nicht ausreichte die experimentelle Metastasierung der gleichen Zelllinie zu reduzieren (Krüger et al., 1997). In einer aktuellen Studie konnten wir zeigen, dass die aggressive experimentelle Metastasierung dieser T-Zell Lymphomzellen durch eine deutlich stärkere, prophylaktische Überexpression von TIMP-1, erzielt durch den adenoviralen Gentransfer von *TIMP-1*, signifikant um 94% reduziert werden konnte (Elezkurtaj et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit sollte u. a. untersucht werden, ob der durch adenoviralen Gentransfer von TIMP-1 erzielte Therapieerfolg in einem T-Zell Lymphom-Modell auf die experimentelle Metastasierung eines soliden Tumors übertragbar ist.

### **2.4.2 Das Plasminogen-Aktivator (PA)-System und seine natürlichen Inhibitoren**

Das Plasminogen-Aktivator (PA)-System spielt durch die Aktivierung von Plasminogen eine zentrale Rolle bei dem Abbau von Fibrin in Blutgerinnseln, sowie bei der Embryonalentwicklung, Zellmigration, Gewebeumbau, Ovulation und Wundheilung. Unregulierte Aktivität des PA-Systems ist mit einer Reihe von pathologischen Prozessen, wie rheumatischer Arthritis, Entzündungsreaktionen der Haut, Alzheimers Krankheit, Multipler Sklerose und der Tumorphysion, assoziiert (Blasi und Carmeliet, 2002).

Das Plasmin-Aktivator System besteht aus Plasminogen, den Plasminogenaktivatoren (PAs) des *tissue-type* (tPA) und des *urokinase-type* (Urokinase, uPA) und dem Urokinase-Rezeptor (uPAR). uPA wird als inaktives einkettiges Protein (pro-uPA) sezerniert und erst die proteolytische Spaltung von pro-uPA durch Plasmin oder Cysteinproteasen führt zur Generierung der zweikettigen aktiven Form, bei welchen die beiden Ketten durch eine Disulfidbrücke verbun-

den sind und welches als hochmolekulares-uPA (*high molecular weight*-, HMW-uPA) bezeichnet wird (Schmitt et al., 2000). Anders als uPA ist tPA bereits in seiner einkettigen Form (*single chain*-tPA, sc-tPA) proteolytisch aktiv (Renatus et al., 1997). Die Generierung einer zweikettigen Form (*two chain*-tPA, tc-tPA) durch Plasmin, Kallikrein oder Faktor Xa, bei der ebenfalls die beiden Ketten durch eine Disulfidbrücke verbunden sind, (Schmaier, 2000; Pryzdial, et al., 1995), führt zu einer Steigerung der tPA-Aktivität um das 5-10-fache (Renatus et al., 1997). PAs bestehen aus folgenden Domänen: a) Signalpeptid, welches bei der Reifung des Proteins entfernt wird, b) Wachstumsfaktor ähnliche Domäne (*growth factor like domain*, GFD), c) *kringle*-Domäne und d) der Serinproteinasendomäne welches das katalytische Zentrum enthält (Bürgle et al., 2002, Pennica et al., 1983). Im Falle von uPA wird das Fragment bestehend aus GFD und *kringle* Domäne als Aminoterminales Fragment (ATF) bezeichnet und kann als Spaltprodukt vorliegen. Die verbliebene Serinproteasendomäne wird dann niedermolekulares-uPA (*low molecular weight*-, LMW-uPA) genannt (Reuning et al., 1998). Neben den bereits beschriebenen Domänen enthält tPA zusätzlich eine Fibronectin-Domäne, sowie eine zweite *kringle*-Domäne (Pennica et al., 1983; Byeon und Llinas, 1991). Vermittelt von einer Bindungsstelle lokalisiert in der GFD kann uPA an seinen membranständigen Rezeptor uPAR binden. Durch das Binden von uPA an uPAR wird die proteolytische Aktivität von uPA verstärkt und diese gleichzeitig auf der Zelloberfläche lokalisiert (Reuning et al., 2003; Schmitt et al., 2000). Neben dieser proteolytischen Aktivität induziert das Binden von uPA an seinen Rezeptor Zellproliferation, Adhäsion, Migration und Chemotaxis (Reuning et al., 2003). Der uPAR ist durch einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Zellmembran verbunden und besteht aus drei homologen Domänen. Keine dieser Domänen besitzt eine von den anderen Domänen unabhängige Bindungsstelle für die uPA/uPAR Interaktion, da alle drei Domänen für eine hoch-affine Interaktion benötigt werden (Magdolen et al., 2002). Die Plasmin-Aktivierung durch tPA wird verstärkt wenn tPA an Fibrin oder Heparin bindet. An der Interaktion von Fibrin bzw. Heparin mit tPA sind sowohl die Fibronectin-Domäne als auch die *kringle*-Domänen des tPA beteiligt (Eastman et al., 1992; Bennett et al., 1991). Aktive PAs können durch proteolytische Spaltung von einkettigem Plasminogen aktives zweikettiges Plasmin generieren. Plasminogen besteht aus einer PAN-Domäne und fünf *kringle*-Domänen (Castellino und McCane, 1997; Tordai et al., 1999), wird in der Leber synthetisiert und ist im Blut und anderen Körperflüssigkeiten detektierbar (Bürgle et al., 2002). Zudem kann aus Plasmin der Angiogenese-inhibierende Faktor Angiostatin generiert werden. Angiostatin wird durch proteolytische Spaltung von Plasmin generiert (Stathakis et



**Abbildung 2.4. Schematische Darstellung des Inhibitions-Mechanismus von Serpinen.** A. Der RCL des Serpins ahmt ein Substrat der Ziel-Proteinase nach, B. Das RCL lagert sich in das katalytische Zentrum der Proteinase ein und wird durch diese geschnitten (roter Abschnitt des RCL), C. Nach dem Schnitt des RCL kommt es zu einer Esterbindung zwischen Proteinase und Serpin und zum Verschieben der Proteinase entlang des Serpins zum entgegengesetzten Pol des Serpins. Genauere Beschreibung siehe Text. Das RCL (gelb) ist zusätzlich durch einen Stern markiert: (Abbildung abgeändert aus: Ye und Goldsmith, 2001)

al., 1997) und besteht zum Großteil aus den *kringle*-Domänen I-IV (Cao et al., 1996.). Es gibt einige Hinweise, dass u.a. MMP-9 zur Freisetzung von Angiostatin führt (Pozzi et al., 2002). Plasmin kann verschiedene Bestandteile der ECM abbauen und diverse Proteasen, wie uPA, tPA und MMPs, aktivieren (Schmitt et al., 2000). Zu den Substraten der PAs zählen neben Plasminogen auch Bestandteile der ECM (Reuning et al., 1998).

Unter normalen physiologischen Bedingungen wird die proteolytische Aktivität der PAs, und somit auch indirekt die von Plasmin, von ihren endogenen Inhibitoren, nämlich Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAIs), reguliert. Es sind zwei PAIs in Menschen bekannt (PAI-1 und PAI-2). Beide Inhibitoren gehören zur Serinproteinasen Inhibitor Superfamilie (Serpine; Reuning et al., 1998). Ungefähr 500 Serpine konnten bisher in Tieren, Pflanzen und Viren identifiziert werden (van Gent et al., 2003). Vertebraten Serpine haben verschiedene strukturelle Eigenschaften gemeinsam: a) Sequenzhomologien, b) Aufbau des Proteins aus drei  $\beta$ -Faltblättern und acht oder neun  $\alpha$ -Helices, c) den *reactive center loop* (RCL) welcher von der Zielproteinase geschnitten wird und d) den einzigartigen „Selbstmord“-Substrat-ähnlichen Inhibitionsmechanismus (van Gent et al., 2003; Silverman et al., 2001).

PAIs inhibieren PAs durch Ausbilden eines 1:1 stoichiometrischen Komplexes, wobei sowohl ungebunden vorliegendes tPA und uPA wie auch uPAR-gebundenes uPA inhibiert wird (Reuning et al., 1998). Hierbei lagert sich der auf der Oberfläche des Moleküls exponierte

*reactive center loop* (RCL) der PAIs in das katalytische Zentrum der PAs ein (Magdolen et al., 2002). Anschließend bildet der Inhibitor, nachdem er initial zwischen den Aminosäuren R380 und T381 der RCL geschnitten wurde, eine kovalente Bindung zwischen der Karboxylgruppe des RCL des Inhibitors und der Hydroxylgruppe des katalytischen Serin-Restes des Plasminogen-Aktivators aus (Magdolen et al., 2002). Durch den Verdau des Moleküls wird die Position des RCL verändert, wodurch die inhibierte Proteinase entlang des Inhibitors verschoben wird. Dieses führt zur Ausbildung eines unter physiologischen Bedingungen stabilen Serinproteinasen/Serpin-Komplexes durch Ausbildung einer kovalenten Ester-Bindung (Abb. 2.4; Magdolen et al., 2002; Bode und Huber, 2000). Für das Serpin ist dieser Vorgang irreversibel. Nach dem Schnitt der RCL und der Konformationsänderung des Moleküls kann kein aktiver Inhibitor wiederhergestellt werden, daher werden Serpine auch als „Selbstmord“-Inhibitoren (*suicide inhibitors*) bezeichnet (Ye und Goldsmith, 2001). Die Inhibition des uPAR-gebundenen uPAs sowohl durch PAI-1 als auch durch PAI-2 führt zur Internalisierung des Komplexes, wobei uPA und PAIs anschliessend in Lysosomen vorliegen und dort degradiert werden, während der uPAR recycelt wird und nach kurzer Zeit erneut auf der Zelloberfläche präsent ist (Reuning et al., 2003; Al-Ejeh, et al., 2004).

Nur ca. 20% des PAI-2-Proteins werden glykosyliert und sezerniert. Die PAI-2 Proteine liegen daher überwiegend unglykosyliert und intrazellulär lokalisiert vor, während PAI-1 effizient sezerniert wird. Daher kann PAI-2 unter normalen physiologischen Bedingungen nicht im Blut nachgewiesen werden (Schmitt et al., 2000). Im Gegensatz zu PAI-1, welches an Integrine und Vitronektin binden kann, sind Interaktionen mit ECM- oder Zelloberflächen-Molekülen für PAI-2 bisher nicht beschrieben worden (Magdolen et al., 2002). Neben der extrazellulären Inhibition der Plasminogen-Aktivatoren ist PAI-2 auch intrazellulär an physiologischen Prozessen beteiligt. Es wurde bereits gezeigt, dass PAI-2 Zellen vor Apoptose schützt, zudem scheint PAI-2 antiviral zu wirken (Magdolen et al., 2002).

### 2.4.2.1 Die Bedeutung des PA-Systems und seiner natürlichen Inhibitoren bei Krebs

In Tumorbiopsien von Patienten mit verschiedenen Krebserkrankungen konnte eine erhöhte Expression von Faktoren des Plasminogen-Aktivator-Systemes, nämlich uPA, uPAR und PAI-1 im Vergleich zu gesunden Geweben gefunden werden. Durch uPAR-vermittelte Lokalisation der proteolytischen Aktivität von uPA auf den Zelloberflächen uPAR exprimierender Tumorzellen, kann dieses proteolytische System eine gerichtete Invasion der Tumorzellen ermöglichen (Reuning et al., 1998). So ist es nicht überraschend, dass die Expression von

uPA und uPAR mit einer schlechten Prognose für die Patienten assoziiert ist und es bei diesen Patienten verstärkt zur Ausbildung von Metastasen bzw. zu einer Neubildung des chirurgisch entfernten Primärtumors kommt (Reuning et al., 1998). Die Expression der natürlichen Inhibitoren dieses Systems ist in unterschiedlicher Weise beeinflusst. Ähnlich wie für TIMP-1 beobachtet, korreliert die Expression von PAI-1 mit einer schlechten Prognose für Patienten mit verschiedenen Krebserkrankungen (Reuning et al., 1998). Auch hier scheint die lokale Inhibition der proteolytischen Aktivität im Primärtumor zur Ausbildung einer annähernd „physiologischen“ Umgebung zu führen, welche die Generierung von Tumor-Stroma bzw. Blutgefäßen begünstigt (Reuning et al., 1998). Zudem beeinflusst PAI-1 die Tumorzell-Migration und das Anhaften (*attachment*) der Tumorzellen an ECM und Basalmembranen, da es ebenso wie der uPAR an Vitronektin bindet und folglich mit diesem um die Bindung konkurriert (Reuning et al., 1998). Im Gegensatz zu einer schlechten Prognose die mit der Überexpression von PAI-1 korreliert ist, vermittelt die Expression von PAI-2 eine gute Prognose für Brustkrebspatientinnen, Patienten mit Kleinzell-Lungenkrebs oder Ovarialkarzinomen (Reuning et al., 1998; Magdolen et al., 2002). In Patienten mit Kolorektal- oder Endometrial-Karzinomen hingegen ist die Expression von PAI-2 mit einer schlechten Prognose für die Patienten assoziiert (Magdolen et al., 2002).

In Zellkultur und in Tiermodellen konnte die Bedeutung des Plasminogen-Aktivator-Systemes bei der Tumorprogression genauer bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass Faktoren des PA-Systems in *attachment*, Migration, Chemotaxis, Angiogenese und Proliferation von Tumorzellen *in vitro* bzw. *in vivo* involviert sind (Reuning et al., 1998; Blasi und Carmeliet, 2002), wobei die meisten dieser Effekte auf die Bindung von uPA an uPAR zurückzuführen sind (Schmitt et al., 2000). Die Verwendung von uPAR-Antagonisten führte *in vivo* zur Reduktion des Primärtumorwachstums, der Angiogenese und der spontanen Metastasierung und führte zu einem Anstieg von Nekrose bzw. Apoptose in Primärtumoren (Schmitt et al., 2000; Reuning et al., 2003). Ähnliche Effekte auf Tumorwachstum und Metastasierung wurden beobachtet, wenn gegen uPA oder uPAR gerichtete antisense-mRNA verwendet wurde (Reuning et al., 1998; Lakka et al., 2003), im Gegensatz dazu wurde die Invasivität und die Proliferation von Tumorzellen durch die Transfektion mit *uPA* und *uPAR* cDNA *in vitro* und *in vivo* verstärkt (Reuning et al., 1998).

Da sowohl Studien aus der Klinik sowie präklinische Versuche in Tiermodellen die Bedeutung des PA-Systemes bei der Tumorprogression unterstreichen, scheint eine gegen das PA-System gerichtete anti-proteolytische Therapie ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung der Tumorprogression zu sein.

### 2.4.2.2 *Behandlung der Tumorprogression mit natürlichen Inhibitoren des PA-Systems*

Wie bereits angesprochen, konkurriert PAI-1 mit uPAR um die Bindung an Vitronektin und beeinflusst somit die Migration bzw. das *attachment* von Tumorzellen sowie die Angiogenese von Tumoren (Magdolen et al., 2002). In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Effekte von PAI-1 auf die Angiogenese dosisabhängig sind: In physiologischer Konzentration wirkt PAI-1 pro-angiogenetisch, während es in höheren Dosen anti-angiogenetisch wirkt (Devy et al., 2002). In PAI-1 *knock out* Mäusen konnten die durch die klinischen Studien erwarteten pro-tumorigenen Eigenschaften bestätigt werden: In diesen Mäusen wird die lokale Invasion von murinen malignen Keratinozyten unterdrückt und ihre Vaskularisation verhindert. Diese anti-tumorigenen Effekte wurden durch den systemischen adenoviralen Gentransfer von *PAI-1* aufgehoben, welches den direkten Zusammenhang zwischen den Beobachtungen und dem Fehlen von *PAI-1* herstellte (Bajou et al., 1998). Die durch adenoviralen Gentransfer erzielte Überexpression von PAI-1 bzw. PAI-2 in HT1080-Zellen führt zu einer gleichstarken Reduktion der Invasivität der Zellen *in vitro* und nach subkutaner Inokulation dieser Tumorzellen in Nacktmäuse auch *in vivo*. Im Gegensatz zu den durch Manipulation der Tumorzellen erzielten Therapieerfolgen war nur der systemische Gentransfer von PAI-2 in der Lage, die Metastasierung zu inhibieren (Praus et al., 1999). In einem Modell mit uvealen Melanomzellen führten sowohl die intratumorale intraoculare sowie die systemische Applikation eines PAI-1 kodierenden Adenovirus zur Reduktion von spontanen Lebermetastasen (Ma et al., 1997). Ebenso wie für die Expression von PAI-1 gibt es für PAI-2 Hinweise für gegensätzliche Effekte auf die Tumorprogression. So führte die Überexpression von PAI-2 in der Epidermis transgener Mäuse zu einer verstärkten chemisch-induzierten Papilloma-Bildung. Nur in diesen Mäusen entwickelten sich aus manchen Papillomae Karzinome, während dieses in den Kontrollen nicht erfolgte. Da natürliches PAI-2 überwiegend intrazellulär vorliegt, ist dieser beobachtete Effekt unabhängig von der Inhibition der extrazellulären PAs. Der Vergleich der Papillomae von PAI-2 transgenen Mäusen und von Kontrolltieren ergab, dass der pro-tumorigene Effekt von PAI-2 auf eine reduzierte Apoptose zurückzuführen war (Zhou et al., 2001). Daher sollte in der vorliegenden Arbeit das Konzept einer prophylaktischen Überexpression sezernierungsoptimierten PAI-2-Proteins durch die Wirtszellen verwendet werden, um die anti-metastatische Wirksamkeit von PAI-2 zu untersuchen.

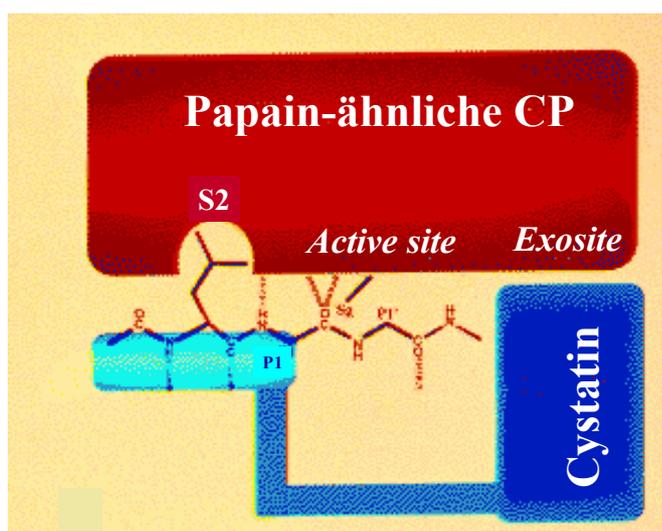
### 2.4.3 Die lysosmalen Cystein-Proteasen (CPs) und ihre natürlichen Inhibitoren

Lysosomale Cysteinproteasen (CPs) spielen eine zentrale Rolle bei physiologischen Prozessen wie intrazellulärem Proteinabbau (Cathepsin B, H, L), Umbildung von Knochen (Cathepsin K), bei der Kontrolle der Antigenpräsentation (Cathepsin S, Abrahamson et al., 2003) und bei der Apoptose (Cathepsin B, Foghsgaard et al., 2002). Neben diesen sind lysosomale CPs an der intrazellulären aber extralysosomalen Aktivierung von Proteinen beteiligt, wie z.B. der Aktivierung von Prorenin zu Renin und der Aktivierung von Thyroglobulin, einem Ausgangsstoff für Thyroid-Hormone (Turk et al., 2000). Liegen papainähnliche, lysosomale CPs extrazellulär vor können sie Bestandteile der ECM abbauen (Turk et al., 2000). Die verstärkte Aktivität von lysosomalen CPs wurde mit einer Reihe von Krankheiten, nämlich rheumatischer Arthritis, Osteoarthritis, Neurologischen Erkrankungen, Osteoporose und Tumorerkrankungen assoziiert (Turk et al., 2001; Berdowska 2004).

Gegenwärtig sind elf humane lysosomale Cysteinproteinasen im Menschen bekannt. Die Signaturen nach denen diese papainähnlichen Cysteinproteasen (CPs), auch Cathepsine genannt (Turk et al., 2000), den lysosomalen CPs zugeordnet werden sind folgende: a) Aminosäure-Homologien zu Papain, b) Anordnung in zwei Domänen, der so genannten linken- (L-) und rechten (R-) Domäne und c) der *V-shape active site cleft* an der Fläche zwischen diesen beiden Domänen (Turk et al., 2001). Lysosomale CPs sind optimal aktiv in den Lysosomen, da in diesen Vesikeln niedrige pH-Werte vorliegen. Generell bestehen die papainähnlichen CPs aus einer pro-Domäne sowie der von den drei  $\alpha$ -Helices dominierten L-Domäne und der auf einem  $\beta$ -barrel-Motiv basierenden R-Domäne und werden als inaktives Zymogen (pro-Cathepsin) translatiert. Die Aktivierung erfolgt u. a. durch Proteasen, hauptsächlich durch CPs (Turk et al., 2000).

Die Aktivität lysosomaler CPs wird unter normalen physiologischen Bedingungen von ihren natürlichen Breitspektrum-Inhibitoren, den Cystatinen reguliert, von welchen zwölf im Menschen bekannt sind (Abrahamson et al., 2003). Die Cystatine untergliedern sich in die so genannten Stefine, Kininogene und Cystatine (Turk et al., 2001). Stefine (Stefin A und B) sind Typ I Cystatine und intrazelluläre Inhibitoren, Cystatine des Typs II (Cystatin C, D, E (M), F, G, S, SN und SA) sind extrazelluläre Inhibitoren und multi-Domänen Cystatine des Typs III (L (*low molecular weight*)- und H (*high molecular weight*)-Kininogene) sind intravaskuläre Inhibitoren der CPs (Abrahamson et al., 2003). Cystatine des Typs II haben folgende strukturelle Eigenschaften gemeinsam: a) Sequenzhomologien, b) Signal-Peptid welches zur Sezernierung des Inhibitors führt, c) Aufbau des Proteins aus einer einzelnen Domäne und d) zwei sogenannte *intrachain* Disulfidbrücken welche am C-Terminus lokalisiert sind (Magdo-

len et al., 2002). Cystatine inhibieren CPs durch Ausbildung eines 1:1 stoichiometrischen Komplexes, wobei die Inhibition von drei hoch-konservierten Bereichen des Cystatin-Moleküls vermittelt wird: a) eine Region nahe dem N-Terminus, b) dem so genannten ersten *hairpin loop* mit der konservierten Region Gln-Xaa-Val-Xaa-Gly und c) dem so genannten zweiten *hairpin loop*, welcher ein Pro-Trp Paar enthält (Magdolen et al., 2002). Alle drei Regionen enthalten zahlreiche hydrophobe Reste, welches darauf hinweist, dass hydrophobe Interaktionen bei der Inhibition von CPs durch Cystatine eine bedeutende Rolle spielen (Magdolen et al., 2002). Bei den Cystatinen handelt es sich um *exosite-binding* Inhibitoren. Dabei bindet der Inhibitor mit den bereits erwähnten Strukturen nicht direkt im katalytischen Zentrum sondern an benachbarten Regionen. Dadurch wird der Zugang von größeren Substratmolekülen zu dem aktiven Zentrum der inhibierten Cysteinproteinase verhindert, ohne dass das katalytische Zentrum direkt blockiert ist (Abb. 2.5; Bode und Huber, 2000). Cystatin C kann in nahezu allen Geweben und Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden (Abrahamson et al., 1986; Grubb, 2000) und ist nicht nur an der Regulation der proteolytischen Aktivität zelleigener CPs beteiligt, sondern auch an der Bekämpfung mikrobieller Infektionen indem es parasitäre wie auch bakterielle Cysteinproteasen inhibiert (Abrahamson et al., 2003). Von Cystatinen ist zudem bekannt, dass sie die adenovirale Protease, welche für die Reifung von Adenoviren notwendig ist, inhibieren können, und somit die Infektion dieses Virus lokal begrenzt (Ruzindana-Umunyana und Weber, 2001). Unabhängig von der inhibitorischen Aktivität kann Cystatin C die Expression von Cytokinen, z.B. Interleukin-6, steigern (Kato et al., 2000).



**Abbildung 2.5. Schematische Darstellung der Inhibition von papainähnlichen CPs durch Cystatine.** Blau dargestellt Cystatin, rot dargestellt papainähnliche CP. Cystatin blockiert Zugang zur *active site* der Proteinase durch Bindung an benachbarten Regionen der *active site*. Genauere Beschreibung siehe Text (aus Bode und Huber, 2000).

### 2.4.3.1 Bedeutung lysosomaler CPs und ihrer natürlichen Inhibitoren bei Krebs

Unregulierte proteolytische Aktivität kann häufig zu pathologischen Veränderungen führen und lysosomale CPs stellen hierbei keine Ausnahme dar. Bei verschiedenen Tumorerkrankungen ist die Expression und Aktivität von lysosomalen CPs mit dem metastatischen Phänotyp der Tumoren assoziiert, was zu der Hypothese führte, dass lysosomale CPs die Metastasierung fördern (Kos und Lah, 1998). Diese Hypothese steht im Gegensatz zu früheren Ansichten, nach denen lysosomale CPs, da sie nur intrazellulär vorkommen, ausschließlich *house-keeping* Funktionen übernehmen würden (zusammengefasst in Bromme und Kaleta, 2002). Neuere klinische Studien haben jedoch gezeigt, dass in Patienten verschiedener Krebserkrankungen die Expression von Cathepsin B, H und/oder L erhöht ist, wie z.B. bei Lungenkrebs (Kayser et al., 2003), Brustkrebs (Levicar et al., 2002), Kolorektalkarzinomen (Troy et al., 2003) und Prostatakarzinomen (Miyake et al., 2004). Diese Cathepsine werden bei einigen Tumorerkrankungen sezerniert und sind im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten der Patienten nachweisbar (Joyce und Hanahan, 2004; Miyake et al., 2004; Nagai et al., 2003). So scheint ein extrazellulärer Nachweis von Cathepsinen mit einer negativen Prognose für den Patienten einherzugehen (Kos et al., 2000). An der Tumorprogression sind diese Proteasen durch direkten Abbau der ECM sowie durch Aktivierung anderer Proteasen beteiligt (Turk et al., 2000). Für Cathepsin B konnte gezeigt werden, dass die Sezernierung dieses vornehmlich lysosomalen Proteins in Tumorzellen durch zwei verschiedene Mechanismen erfolgt: zum einen durch Freisetzung von aktivem Cathepsin B durch lysosomale Exozytose, zum anderen durch veränderten intrazellulären Transport welcher zur Sezernierung von proCathepsin B führt (Podgorski und Sloane, 2003). Paradoxerweise wurden neben der Korrelation von Cathepsin B Expression und Invasivität der Tumoren auch Studien veröffentlicht welche zeigten, dass eine verringerte Expression von Cathepsin B mit verstärkter Lymphknoten-Metastasierung bei den Patienten assoziiert ist (Shiraishi et al., 1998). Dieses Ergebnis könnte sich durch die Tatsache erklären lassen, dass Cathepsin B an der TNF (Tumor Nekrose Faktor)  $\alpha$ -induzierten Apoptose beteiligt sein kann, da Cathepsin B zur Expression eines *second messengers* dieses Signaltransduktionsweges führt (Foghsgaard et al., 2002). Dieses könnte auch erklären, dass die Expression von Cystatinen bei einigen Tumorerkrankungen mit schlechten Prognosen assoziiert werden (Kos et al., 1997; Kos et al., 2000; Strojjan et al., 2004; Takeuchi et al., 2001). Da der Zusammenhang zwischen der beobachteten erhöhten Expression von Cystatinen und Expression von lysosomalen CPs in diesen Studien nicht untersucht wurde, könnte es sich bei der gesteigerten Expression der Cystatine auch um eine Reflektion der verstärkten proteolytischen Aktivität durch CPs handeln. Zudem wird disku-

tiert, ob die erhöhten Serumlevel an Cystatin C in Krebspatienten auf eine veränderte Filtrationsrate durch Erkrankungs- oder Therapie-bedingte Schädigung der Glomeruli zurückzuführen ist (Stabuc et al., 2000).

In Zellkultur und in Tierversuchen konnte die Bedeutung von lysosomalen CPs bei der Tumorprogression bestätigt werden. So inhibierte die stabile Transfektion von Tumorzellen mit *antisense* Cathepsin B cDNA ihre Invasion *in vitro* (Krueger et al., 1999) während die Überexpression von Cathepsin B durch Tumorzellen zu einer verstärkten Invasion *in vitro* führte (Coulibaly et al., 1999). Dabei kann sowohl das intra- als auch das extrazellulär vorliegende Cathepsin B zur Invasivität von Tumorzellen *in vitro* beitragen (Premzl et al., 2003). *In vivo* konnte die Bedeutung von Cathepsin B und L bei der Metastasierung durch eine Korrelation zwischen ansteigendem metastatischem Potential verschiedener Tumorzelllinien und steigender Cathepsin B bzw. L Expression belegt werden (Tzanakakis et al., 2004; Zajc et al., 2002). Durch spezifische Inhibition von Cathepsin L mit einem synthetischen Inhibitor (Katanuma et al., 2002) bzw. durch Cathepsin L *antisense* cDNA (Levicar et al., 2003) konnte die experimentelle Metastasierung von Tumorzellen reduziert werden, sowie durch ein Anti-Cathepsin L Einzelstrang-Fragment Primärtumorwachstum und Angiogenese inhibiert werden (Roussellet et al., 2004).

Da sowohl in der Klinik als auch in präklinischen Studien gezeigt werden konnte, dass lysosomale CPs an der Tumorprogression beteiligt sind, erscheint eine gegen diese Proteasen gerichtete anti-proteolytische Behandlung vielversprechend.

### 2.4.3.2 Behandlung der Tumorprogression mit natürlichen Inhibitoren der lysosomalen CPs

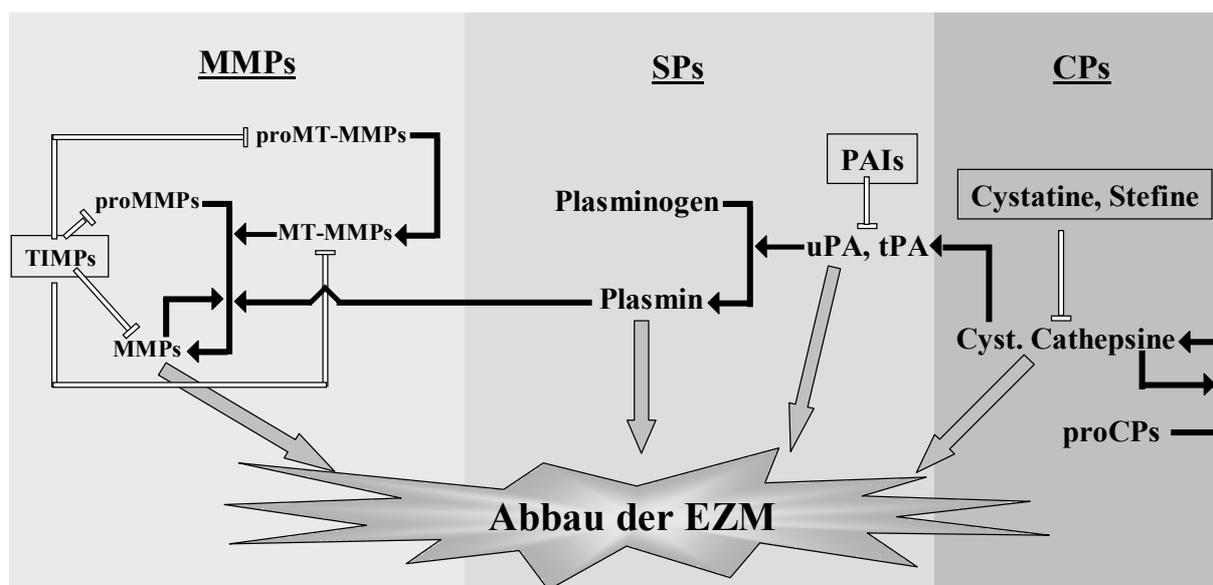
Einige Forschergruppen haben bereits natürliche Proteaseinhibitoren der lysosomalen CPs verwendet um die Invasivität von Tumorzellen zu inhibieren, insgesamt sind im Vergleich zu Untersuchungen mit TIMP-1 bzw. PAIs nur sehr wenige Studien veröffentlicht worden. Bei diesen Studien wurden jeweils die Tumorzellen manipuliert, welche anschließend die jeweiligen natürlichen Inhibitoren überexprimierten. *In vitro* führte die Überexpression von Hühner Cystatin zu einer Reduktion der Invasion von Prostatakarzinomzellen (Collela und Casey, 2003) und die Überexpression von humanem Cystatin C zu einer Reduktion der Invasion von humanen Fibrosarkomzellen (HT1080, Sokol et al., 2004), murinen Squamous Karzinomzellen (Coulibaly et al., 1999), ras transformierten humanen Brustepithelzellen (Premzl et al., 2001) und humanen Kolonkarzinomzellen (Corticchiato et al., 1992). *In vivo* konnte durch Überexpression von humanem Cystatin C das Primärtumorwachstum von Glioblastomzellen

(Konduri et al., 2002) sowie die experimentelle Metastasierung von Melanomzellen (Cox et al., 1999) inhibiert werden.

## **2.5 Interaktionen zwischen Proteasfamilien**

Da Tumorzellen im Verlauf der Metastasierung auf eine Vielzahl verschiedener Bestandteile der ECM und der Basalmembranen treffen, überrascht es nicht, dass Tumorzellen nicht auf die proteolytische Aktivität einer einzelnen Protease angewiesen sind, sondern dass eine Reihe von Proteasen, welche zudem von verschiedenen Protease-Familien stammen können, im metastatischen Prozess involviert sind. Durch die vielfältigen Interaktionen der Proteasen verschiedener Familien miteinander bildet sich ein komplexer Zusammenhang zwischen diesen einzelnen Familien aus (Abb. 2.6 und DeClerck et al., 1997). Neben der Tatsache, dass MMPs, Plasmin, uPA und die lysosomalen CPs verschiedene Spezifitäten gegenüber Bestandteilen der ECM haben und sich somit optimal bei dem Abbau der ECM ergänzen (DeClerck et al., 1997), wird die Aktivität von verschiedenen Proteasen durch Proteasen anderer Familien reguliert, wie es in Abbildung 2.6 schematisch dargestellt ist. So aktiviert Plasmin verschiedene proMMPs (proMMP-1, proMMP-3, proMMP-7, proMMP-9, proMMP-10, proMMP-13; Visse und Nagase, 2003), kann aber auch TIMP-2 abbauen und somit zu einem zusätzlichem Anstieg der MMP-Aktivität wie auch zu reduzierter proMMP-2 Aktivierung führen (DeClerck et al., 1997). Somit ist das PA-System an der Regulierung der Aktivität von MMPs beteiligt (Abb. 2.6). Aktive MMPs hingegen aktivieren ihrerseits eine Reihe anderer MMPs. (Visse und Nagase, 2003), zudem ist die Aktivität von MMP-12 am *shedding* des uPAR und somit an Angiogenese und Chemotaxis beteiligt (Andolfo et al., 2002; D'Alessio et al., 2004). Lysosomale CPs (Cathepsin B und L) hingegen können pro-uPA aktivieren (Schmitt et al., 1997), wodurch es zu einem Anstieg an Plasmin- und in letzter Konsequenz MMP-Aktivität führen kann. Somit haben die lysosomalen CPs sowohl Einfluss auf die proteolytische Aktivität des Plasminogen-Aktivator-Systems als auch auf die Aktivität der MMPs (Abb. 2.6).

Da verschiedene Proteasen bei physiologischen Prozessen gemeinsam agieren, wie z.B. der Wundheilung oder Embryonalentwicklung (Günthert et al., 1997), ist es nicht verwunderlich, dass die Expression verschiedener Proteinasen durch ein und den gleichen Mechanismus reguliert werden kann. So werden beispielsweise über den *hepatocyte growth factor* (HGF/*scatter factor*)-Signaltransduktionsweg verschiedene Proteinasen gemeinsam reguliert. Die Bindung von HGF an seinen Zellrezeptor c-Met in verschiedenen Tumorzelllinien führt zu einem Anstieg der Expression verschiedener MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9



**Abbildung 2.6. Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen den einzelnen Proteasefamilien.** Dargestellt sind die Zusammenhänge zwischen den in dieser Arbeit untersuchten tumorassoziierten Proteasen und ihrer natürlichen Inhibitoren. Links: MMPs, mitte: das PA-System und rechts: lysosomale CPs. Nicht berücksichtigt wurde bei dieser Abbildung der Beitrag von TIMP-2 an der Aktivierung von proMMP-2. Genauere Beschreibung siehe Text.

und MMP-14; Kermorgant et al., 2001; Monvoisin et al., 2002; Bennett, et al., 2000; Fujiuchi et al., 2003; Harvey et al., 2000) und von Faktoren des Plasminogen-Aktivator-Systems (uPA, uPAR und PAI-1; Tacchini et al., 2004; Tacchini et al., 2003; Hall et al., 2004; Fujiuchi et al., 2003). Durch die Tatsache, dass dieser Signaltransduktionsweg sowohl zu einem Anstieg der MMP-Expression als auch Expression von Bestandteilen des PA-Systems führt, lässt sich die durch HGF verstärkte Aktivierung von proMMP-2 und -9 erklären (Park et al., 2003). Plasmin kann wie beschrieben proMMP-9 und MT1-MMP (MMP-14) aktivieren. Aktives MT1-MMP aktiviert wiederum in einem Komplex zusammen mit TIMP-2 proMMP-2 (Visse und Nagase, 2003). Die Relevanz dieses Signaltransduktionsweges bei der Tumorprogression wird u.a. in der Tatsache widerspiegelt, dass der Gehalt an HGF in Brustkrebspatientinnen erhöht ist (Tuck et al., 1996).

Da in der Regel Proteinasen unterschiedlicher Familien an der Tumorprogression beteiligt sind, erscheint es sinnvoll kombinatorische Therapien, d.h. simultane anti-proteolytische Behandlungen von zwei oder drei proteolytischen Systemen hinsichtlich eines additiven Therapieerfolges zu untersuchen. In einer früheren Studie konnten wir zeigen, dass die intraperitoneale Ausbreitung und Wachstum von Ovarialkarzinomzellen in Nacktmäusen durch die Überexpression multifunktionaler Inhibitoren, bestehend aus N-terminalem TIMP-1 bzw. -3, der uPAR-Bindungsstelle des uPA und Hühner Cystatin C, im Vergleich zu der Kontrolle reduziert wurde (Krol et al., 2003 a). Da hier jedoch keine Kontrollen zur Wirksamkeit der einzel-

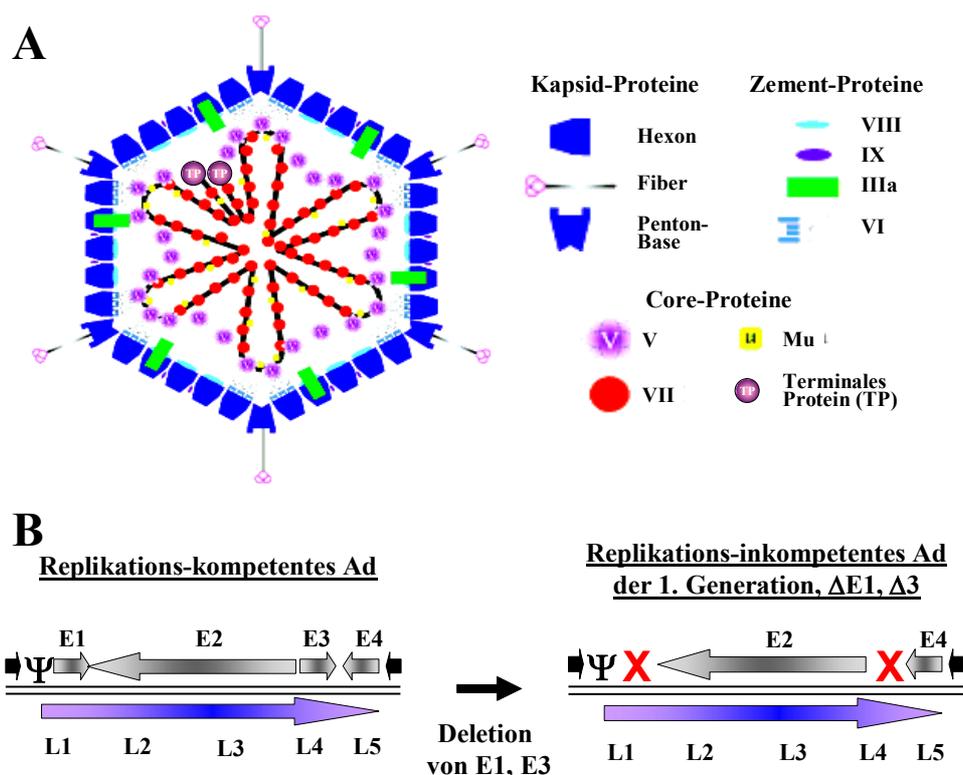
nen Bestandteile der multifunktionalen Inhibitoren verwendet wurden, lassen sich aus diesem Experiment keine Rückschlüsse auf einen additiven Therapieerfolg durch Inhibition mehrerer tumorassoziierter proteolytischer Systeme ziehen. Ähnliche Ergebnisse konnten kürzlich von einer weiteren Arbeitsgruppe ermittelt werden. Durch die Inhibition der mRNA Expression von uPAR und MMP-9 in Glioblastomzellen konnte das intracraniale Tumorwachstum dieser Zellen im Vergleich zur Kontrolle reduziert werden, jedoch fehlten auch hier die Kontrollen zur Wirksamkeit der einzelnen Reduktion von MMP-9 bzw. uPAR. *In vitro* konnte allerdings durch simultane Reduktion der MMP-9 und uPAR mRNA eine additive Inhibition der Invasivität der Glioblastomzellen im Vergleich zu den einzelnen mRNA-Reduktionen gezeigt werden (Lakka et al., 2003). Die von der gleichen Arbeitsgruppe durchgeführte simultane Reduktion der Cathepsin B und uPAR bzw. Cathepsin B und MMP-9 mRNA in Glioblastomzellen hingegen zeigte sowohl *in vitro* eine additive Reduktion der Invasivität als auch *in vivo* einen additiven Effekt hinsichtlich der Reduktion des Tumorwachstums (Gondi et al., 2004; Lakka et al., 2004).

Da bisher keine systematische Studie zur anti-metastatischen Wirksamkeit der Inhibition mehrerer Proteasefamilien veröffentlicht wurde, sollte dieses im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgen. Hierfür sollten die verschiedenen natürlichen Proteaseinhibitoren von den Wirtszellen überexprimiert und sezerniert werden um eine Anreicherung der transgenen Inhibitoren im Blut der Mäuse zu erhalten. Dieses Konzept der Inhibition wurde von uns „prophylaktische Überexpression“ genannt. Um diese zu erreichen sollte ein adenoviraler Gentransfer der Inhibitoren erfolgen. In früheren Studien konnten wir durch systemischen adenoviralen Gentransfer hohe Transgenlevel im Serum der behandelten Tiere erreichen (Elezkurtaj et al., 2004).

## 2.6 Adenoviraler Gentransfer

### 2.6.1 Struktur von Adenoviren

Adenoviren haben eine charakteristische Morphologie mit einem icosahedrischen Kapsid. Dieses ist aus drei Hauptbestandteilen, den Hexonen (Protein II), den Penton-Basen (III) und den Fibern (inkl. Fiber-Knopf, IV), zusammen mit einigen Nebenbestandteilen, VI, VIII, IX, IIIa und IVa, aufgebaut (Abb. 2.7, A). Das Virusgenom besteht aus linearer, doppelsträngiger DNA, wobei beide DNA-Stränge Proteine kodieren. Die Enden der DNA bestehen aus invertierten DNA Wiederholungen (*inverted terminal repeats*, ITR) an welche jeweils ein terminales Protein (TP) bindet, welches u.a. die Integration des Virusgenoms in das Wirtsgenom verhindert. Die DNA ist assoziiert mit dem Protein VII und dem Peptid mu ( $\mu$ ) und wird durch ein weiteres Protein (V) mit dem Protein VI des Kapsides verbunden (Abb. 2.7, A). Zusammen mit der DNA wird eine vom Virus kodierte Protease (adenovirale Cysteinprotease) im Kapsid verpackt. Diese Protease ist für die Reifung der adenoviralen Partikel zu infektiösen Viren notwendig, da sie einige adenovirale Strukturproteine prozessiert (Russell, 2000).



**Abbildung 2.7. Schematische Darstellung des Aufbaus von Adenoviren.** A. Struktur eines Adenovirus (Russell, 2000). B. Organisation eines Adenovirus (nach Shenk, 1996). Genauere Beschreibung siehe Text.

### 2.6.2 Der Infektionszyklus von Adenoviren

Der adenovirale Infektionszyklus kann in zwei Abschnitte untergliedert werden. Die erste bzw. frühe Phase beinhaltet die Aufnahme des Virus durch die Wirtszelle, den Transport des viralen Genoms in den Nukleus und die selektive Transkription der frühen Gene. Diese ersten Schritte manipulieren die Wirtszelle, sodass diese in der zweiten bzw. späten Phase das virale Genom effizient repliziert und die späten Gene transkribiert und translatiert werden. Dieses führt zur Zusammensetzung der Strukturproteine und Reifung der Adenoviren im Nukleus der infizierten Zelle (Russell, 2000).

#### a) Frühe Phase

Die Adsorption der Adenoviren des humanen Subtyps C an die Zielzelle erfolgt über den Knopf des Virus-Fibers und dem so genannten Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor (CAR) auf der Zelloberfläche (Russell, 2000). Nach erfolgter Adsorption interagiert die Penton-Base mit Integrinen der Zelloberfläche wodurch es zur endozytotischen Aufnahme des Virus durch die Zelle kommt (Russell, 2000). Durch das saure Milieu in den Endosomen kommt es vermittelt durch die Penton-Basen zum Abbau des Endosoms und Freisetzung der viralen Partikel (Shenk, 1996). Im Zytoplasma wird dann das adenovirale Kapsid abgebaut. An diesem Prozess ist unter anderem die adenovirale Protease beteiligt. Im Anschluß wird der Core-Protein-DNA-Komplex des Virus zur Kernmembran befördert. Das virale Genom wird durch eine Kernpore in den Nukleus transportiert wo die primären Transkriptionsschritte eingeleitet werden. Die ersten Gene welche transkribiert werden wurden als *early genes* (E) 1-4 bezeichnet (Abb.2.7, B). E1 dient der Regulation der Transkription viraler DNA, es führt zum Eintritt der infizierten Zelle in die S-Phase und verhindert die Apoptose der infizierten Zelle und wird als erstes virales Gen transkribiert. Das Gen E2 kodiert Proteine zur DNA-Replikation, ein Einzelstrang-DNA-Bindeprotein, DNA-Polymerase und das Terminale Protein (TP) welche die Transkription der späten (*late*) Gene ermöglichen. Die Produkte des E3-Gens dienen der Modulation der Immunantwort des Wirtsorganismus und der Virusfreisetzung. Die Genprodukte von E4 haben multifunktionelle Aufgaben wie die Regulation der Transkription, dem mRNA Transport und der DNA-Replikation (Russell, 2000).

#### b) Späte Phase

Die *late genes* (L) stehen unter Kontrolle des *major late* Promotors (MLP) dessen Aktivität durch die Expression der E-Gene unterdrückt ist. Nach Beginn der Replikation des viralen Genoms kommt es zur Expression von IVa und IX, welche den MLP spezifisch aktivieren. Daraufhin kommt es zur Expression aller L-Gene (L1-L5, Abb. 2.7, B), welche die Struktur-

proteine und die adenovirale Protease kodieren (Russell, 2000). Die im Zytoplasma translatierten Strukturproteine setzen sich direkt nach ihrer Produktion zu kleinen Untereinheiten zusammen, die ebenso wie die virale Protease, in den Nukleus transportiert werden in welchem der Zusammenbau der viralen Partikel erfolgt. Hierbei findet zunächst der Aufbau der Kapside statt, in welche die DNA im Anschluss eingefädelt wird (Russell, 2000). Für diesen Schritt ist das im linken Ende des viralen Genoms vorhandene Verpackungssignal notwendig, da an dieses DNA-Motiv Proteine binden, welche die Interaktion zwischen DNA und Kapsid ermöglichen (Ostapchuk und Hearing, 2003). Am Ende des Zusammenbaus erfolgt die Reifung des Partikels bei welcher unter anderem die Proteine VI, VII und VIII von der adenoviralen Protease prozessiert werden, welches zur Stabilisierung des Partikels und zu seiner Virulenz führt. Der Transport und die Freisetzung der reifen Viren erfolgt unter Abbau von Komponenten des zellulären Zytoskeletts (Shenk, 1996). Durch den Verlust eines intakten Zytoskeletts kommt es zu einer phänotypischen Veränderung der infizierten Zelle, bei welchem sich die Zellen abkugeln. Dieses wird als zytopathischer Effekt (*cytopathic effect*, CPE) bezeichnet (Hitt et al., 1995).

### 2.6.3 Grundlagen zur Generierung rekombinanter replikationsdefizienter Adenoviren

Für die Herstellung von adenoviralen Vektoren werden humane Adenoviren der Serotypen 2 und 5 verwendet. Als Schutz vor unkontrollierbarer Ausbreitung der Infektion im Wirt werden nur replikationsdefiziente Viren verwendet. Um dieses zu erreichen werden bei adenoviralen Vektoren der ersten Generation die E1 sowie fakultativ die E3 Region entfernt (Abb. 2.7 B, unten). Da die Genprodukte der E1 Region, wie oben beschrieben, als Transaktivatoren der weiteren frühen sowie der späten Genexpression dienen, führt die Deletion der E1 Region zu einer Replikationsdefizienz des manipulierten Virus (Hitt et al., 1995). Die Genprodukte der E3 Region dienen der Unterdrückung einer Immunantwort durch den Wirt, welche bei der Produktion von Adenoviren in der Zellkultur nicht nötig ist. Die Deletion von E1 und E3 ermöglicht das Einfügen eines Transgens bis zu einer Größe von 8 kb (Hitt et al., 1995). Da für die Produktion der rekombinanten Viren die Genprodukte der E1-Region notwendig sind, müssen sogenannte adenovirale Verpackungszelllinien verwendet werden, welche die adenovirale E1 Region stabil exprimieren (Graham et al., 1977). Da gezeigt werden konnte, dass sich der für die Adsorption der humanen Adenoviren des Subtyps 5 an der Zelloberfläche notwendige CAR auch an der Ausbildung von *tight junctions* beteiligt (Honda et al., 2000; Cohen et al., 2001), konnten die jahrelangen Beobachtungen erklärt werden, dass sich die

Verpackungszellen nach Ausbilden von Zellkontakten nur schwer infizieren lassen (Hitt et al., 1995).

### **2.6.4 Verwendung von Adenoviren zum Gentransfer *in vivo***

Mitglieder der Adenovirus-Familie (Adenoviridae) infizieren ein weites Spektrum an sich teilender bzw. nicht-teilender Zellen, sogar solche aus hochdifferenzierten Geweben wie Skelett-Muskeln, Lungen, Gehirn, Herz und Lebern. Da das Genom dieser Viren in den Nukleus der Wirtszelle transportiert und sehr effizient repliziert wird, stellen sie einen guten Kandidaten für den Transfer therapeutischer Gene dar (Russell, 2000). Die systemische Applikation von rekombinanten Adenoviren führt zu einer hohen Expression des Transgens drei Tage nach dem Gentransfer, und sezernierte Transgene lassen sich trotz der transienten Expression für vier Wochen im Serum der Tiere nachweisen (Jaffe et al., 1992).

Adenovirale Vektoren lösen *in vivo* Immunantworten im Wirt aus, da fast jeder Organismus bereits Antikörper gegen Adenoviren besitzt und die Antigene auch auf den Vektoren präsent sind (Russell, 2000). Dadurch ist die Verwendung adenoviraler Vektoren für den Gentransfer im Menschen umstritten. Die intravenöse Applikation von Adenoviren führt zu einer hohen Transduktionsrate der Leber, zu einer starken Expression des Transgens und zu hohen Konzentrationen des Transgens im Serum transduzierter Tiere, wie wir dies bereits für den Gentransfer von TIMP-1 zeigen konnten (Elezkurtaj et al., 2004). Daher sollte trotz der bekannten Nebenwirkungen eines adenoviralen Gentransfers dieser verwendet werden, um das Konzept einer prophylaktischen Überexpression natürlicher Proteaseinhibitoren durch den Wirt zur Reduktion der Metastasierung zu überprüfen.

### 3 Ziel dieser Arbeit

Wie in der Einleitung ausführlich dargestellt, sind verschiedene proteolytische Systeme an der Tumorprogression und Metastasierung beteiligt. Ziel dieser Arbeit war die systematische Untersuchung der Möglichkeiten einer anti-proteolytischen Therapie zur Unterdrückung der experimentellen Metastasierung einer humanen Fibrosarkom-Zelllinie. Um die anti-metastatische Wirksamkeit einer prophylaktischen Überexpression natürlicher Proteaseinhibitoren durch den Wirt untersuchen zu können, mussten zunächst Vektoren zum Transfer der therapeutischen Gene konstruiert werden. Hierfür sollten adenovirale Vektoren generiert werden, welche die cDNAs für *TIMP-1*, *PAI-2* bzw. *Cystatin C* kodieren. Wobei die cDNAs von *PAI-2* bzw. *Cystatin C* hinsichtlich effizienterer Sezernierung manipuliert werden sollten, da natürliches PAI-2 nur zu ca. 20% sezerniert wird bzw. die Anreicherung von Cystatin C in adenoviralen Verpackungszellen die Reifung der Viren inhibieren könnte. Der adenovirale Gentransfer ermöglicht eine effiziente Transduktion der Leber *in vivo* welches zu einer starken, jedoch transienten Expression und Sezernierung des Transgens und somit letztendlich zu einer systemischen Anreicherung der natürlichen Inhibitoren im Blut der transduzierten Mäuse führt. Zunächst sollte überprüft werden, ob sich die in unseren früheren Studien erzielte potente Reduktion der experimentellen Metastasierung muriner T-Zell Lymphomzellen durch prophylaktische Überexpression von TIMP-1 auf ein Modell mit Zellen eines soliden Tumors übertragen lässt. Hierfür sollte die humane Fibrosarkomzelllinie HT1080 mit dem *lacZ*-Gen markiert werden, um nach intravenöser Applikation der Tumorzellen die Detektion der Metastasen in den Organen des Wirtstieres zu erleichtern. Neben der Wirksamkeit von TIMP-1 zur Behandlung der Metastasierung sollten die Auswirkungen der Überexpression von TIMP-1 auf die Expression der MMPs sowie anderer tumorassoziiertes Proteasen überprüft werden. Neben der prophylaktischen Überexpression von TIMP-1 sollte die Wirksamkeit der Inhibition des Plasminogen-Aktivator-Systems bzw. lysosomaler Cysteinproteasen durch Überexpression von PAI-2 bzw. Cystatin C ermittelt werden, und diese mit der anti-metastatischen-Potenz des TIMP-1-Gentransfers verglichen werden. Zuvor sollte jedoch evaluiert werden, ob PAs bzw. papainähnliche Cathepsine potentielle Zielmoleküle für eine anti-proteolytische Therapie darstellen. Auch für PAI-2 und Cystatin C sollte untersucht werden, ob ihre Überexpression Auswirkungen auf die Expression der von ihnen inhibierten Proteasen bzw. auf die Expression anderer tumorassoziiertes Proteasen hat. Zusätzlich sollte evaluiert werden, ob die simultane Überexpression von zwei bzw. drei natürlichen Inhibitoren eine additive anti-metastatische Wirksamkeit im Vergleich zu den jeweiligen Einzel- bzw. Doppelbehandlungen aufweist.

## 4 Material und Methoden

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

### 4.1 Tierexperimentelle Methoden

#### 4.1.1 **Verwendete Versuchstiere**

CD1 *nu/nu* Mäuse wurde von Charles River, Sulzfeld, Deutschland bezogen. Diese immundefizienten Auszucht-Mäuse wurden aus dem Mausstamm CD1 (*Caesarean Derived 1*) durch Transfer des *nude* Genes mittels einer Reihe von Kreuzungen und Rückkreuzungen generiert. CD1 *nu/nu* sind athymisch und daher immundefizient, unfähig T-Zellen zu produzieren. Die Mäuse wurden unter Standardbedingungen gehalten.

#### 4.1.2 **HT1080 Xenograft-Metastasierungsmodell**

CD1 *nu/nu* Mäuse wurden prophylaktisch mit Adenoviren (Ad) behandelt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden, nach einigen Vorversuchen, alle in dieser Arbeit durchgeführten Behandlungen in einem Tierversuch durchgeführt. Jeder Maus wurde eine Gesamtvirusdosis von  $6 \times 10^9$  pfu intravenös (i.v.) in die Schwanzvene appliziert. Es wurden AdTIMP-1, ein Ad kodierend für humanes TIMP-1, AdPAI-2, ein Ad kodierend für humanes PAI-2, AdCysC, ein Ad kodierend für humanes Cystatin C, sowie Addl70-3, ein Ad ohne Transgen (Bett et al., 1994), verwendet. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Behandlungen ist in Tab. 4.1 zusammengefasst. Drei Tage nach der Virusapplikation wurden einige Mäuse pro Gruppe zur Bestimmung der Transgen-Mengen geopfert und Lebern, Lungen und Serum entnommen. Von jedem Organ wurden mehrere Stücke in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Zur Generierung experimenteller Metastasen wurden den verbliebenen transduzierten Mäusen  $1 \times 10^6$  *lacZ*-markierte humane Fibrosarkomzellen (HT1080pLZ12/K15-1) i.v. inokuliert. 21 Tage nach der Tumorzellinokulation, zu einem Zeitpunkt an dem die Metastasen in der Lunge zu einer Größe von mehr als 0,1 mm ausgewachsen und Mikrometastasen in den Lebern detektierbar waren (Schweinitz et al., 2004; Nagel, 2004; Arlt, 2004), wurden die Mäuse geopfert und Lebern, Lungen, und Blut entnommen. Bei drei Tieren pro Gruppe wurde die Leber vor der Entnahme mit Zellkultur-PBS (s. S. 35) perfundiert. Hierfür wurde eine i.v. Venenverweilkanüle (Neoflon<sup>TM</sup>, 0,7 x 19

mm, BD, Heidelberg, Deutschland) in die Vena cava caudalis eingeführt, mit Zwirn fixiert und durch diesen Zugang die Leber mit 100 ml PBS gespült. Bei allen Tieren wurden die großen Leberlappen und die linken Lungenflügel X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) gefärbt (siehe 4.2.7), um die Metastasen zu detektieren. Makrometastasen auf der gesamten Oberfläche des linken Lungenflügels bzw., falls vorhanden, auf der Leber wurden mittels eines Steromikroskops (25-fache Vergrößerung, Stereomikroskop SZX, Olympus, Tokyo, Japan) ausgezählt und fotografiert, sowie die Mikrometastasierung der Leber fotografiert und qualitativ bewertet. Alle metastasenfrenen Organe wurden ausgezählt. Die nicht zur Färbung dienenden Organstücke wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Zur Herstellung von Serumproben wurde das abgenommene Blut 12 h bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach dem Klotten des Blutes wurden die Proben zentrifugiert ( $200 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 1 h, Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und das separierte Serum in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Serumproben wurden bis zur Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Tabelle 4.1. Behandlungsschema

Behandlungsgruppe	Applizierte Adenoviren			
	Add170-3	AdTIMP-1	AdPAI-2	AdCysC
Kontrolle	$6 \times 10^9$ pfu	-	-	-
TIMP-1	$4 \times 10^9$ pfu	$2 \times 10^9$ pfu	-	-
PAI-2	$4 \times 10^9$ pfu	-	$2 \times 10^9$ pfu	-
Cystatin C	$4 \times 10^9$ pfu	-	-	$2 \times 10^9$ pfu
TIMP-1 + PAI-2	$2 \times 10^9$ pfu	$2 \times 10^9$ pfu	$2 \times 10^9$ pfu	-
TIMP-1 + Cystatin C	$2 \times 10^9$ pfu	$2 \times 10^9$ pfu	-	$2 \times 10^9$ pfu
PAI-2 + Cystatin C	$2 \times 10^9$ pfu	-	$2 \times 10^9$ pfu	$2 \times 10^9$ pfu
TIMP-1 + Cystatin C + PAI-2	-	$2 \times 10^9$ pfu	$2 \times 10^9$ pfu	$2 \times 10^9$ pfu

## 4.2 Zellexperimentelle Methoden

### 4.2.1 **Verwendete Zelllinien**

#### 4.2.1.1 *HT1080 Zellen*

HT1080 Zellen sind humane Fibrosarkomzellen. Diese wurden von Agnes Noel (Université Liège, Lüttich, Belgien) zur Verfügung gestellt. Bei diesen Zellen handelt es sich um adhären wachsende Zellen hervorgegangen aus Bindegewebe mit aktiviertem *N-ras* Onkogen (Geiser et al., 1989). Diese Zelllinie stammt von einem 35 jährigen männlichen kaukasischen Patienten und wurde von S. Rasheed generiert (Rasheed, et al., 1974) und ist tumorigen in Nacktmäusen (Geiser et al., 1989). Diese Zellen wurden nach der erfolgreichen Markierung mit dem *lacZ*-Gen (HT1080pLZ12/K15-1) bei den Tierversuchen verwendet.

#### 4.2.1.2 *HEK 293 Zellen*

HEK 293 Zellen sind humane, embryonale Nierenzellen (*human embryonic kidney cells*), epithelialen Ursprungs, welche die adenovirale E1 Region des Ad5 stabil exprimieren. Diese Zelllinie wurde von F. L. Graham generiert (Graham et al., 1977). Das linke Ende der Ad5 Sequenz, Nukleotide 1-4344, ist in das Chromosom 19 integriert (Louis et al., 1997). Daher dient diese Zelllinie als adenovirale Verpackungszelllinie für E1-deletierte Adenoviren. Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene Seitenlinien dieser Zelllinie verwendet, die sich hinsichtlich ihrer Proliferation, Infizierbarkeit, Transfizierbarkeit und Adhärenz unterschieden.

#### *HEK 293-Clontech Zellen:*

HEK 293-Clontech Zellen wurden von der Firma Clontech (Heidelberg, Deutschland) als Bestandteil des Adeno-X<sup>TM</sup> Expression System erworben. Sie zeichneten sich durch eine höhere Proliferation, Infizier- und Transfizierbarkeit als HEK 293-MA (siehe unten) aus, zeigten im Vergleich zu diesen jedoch eine geringere Adhärenz. Daher wurden diese Zellen für Transfektionen bzw. Ko-Transfektionen und zur Herstellung von Adenoviren (Ad, siehe 4.4.2.), sowie für die Amplifikation der Ad (siehe 4.4.3) verwendet.

#### *HEK 293-MA Zellen:*

HEK 293-MA Zellen wurden von Martina Anton (TU München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Diese Seitenlinie, direkt von F. L. Graham stammend, ist deutlich adhärenter als die von Clontech erworbene Zelllinie und wurde daher für alle Titrations (siehe 4.4.6) und Plaque-Reinigungen (siehe 4.4.7) verwendet.

### 4.2.2 Zellkulturmedien

Tab. 4.2: Zellkulturmedien für die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Medium
HT1080 und HT1080pLZ12/K15-1	DMEM <sup>A</sup> , 10 % (v/v) FKS (PAA Gold) <sup>B</sup> , 100 mM HEPES <sup>C</sup> , 20 mM L-Glutamin <sup>A</sup> , 0,55 mM Asparagin <sup>D</sup> , 0,27 mM Arginin <sup>D</sup>
HEK 293-Clontech	DMEM <sup>A</sup> , 10 % (v/v) nordamerikanisches FKS <sup>B</sup> , 20 mM Glutamin <sup>A</sup> , 100 U Penicillin/ml, 100 µg Streptomycin /ml <sup>A</sup>
HEK 293-MA	MEM Earle <sup>A</sup> , 10 % (v/v) nordamerikanisches FKS <sup>B</sup> , 20 mM Glutamin <sup>A</sup>

<sup>A</sup> Biochrom AG, Berlin, Deutschland, <sup>B</sup> PAA, Linz, Österreich, <sup>C</sup> Gibco, Karlsruhe, Deutschland, <sup>D</sup> Sigma, Deisenhofen, Deutschland

### 4.2.3 Allgemeine Lösungen für die Zellkultur

- Zellkultur-PBS (*phosphat buffered saline*, pH 7,4, Biochrom, Berlin, Deutschland)
- PBS<sup>2+</sup> (0,068 mM CaCl<sub>2</sub> und 0,49 mM MgCl<sub>2</sub> in PBS):

68 mM CaCl<sub>2</sub>-Stammlösung: 5 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O in 500 ml ddH<sub>2</sub>O

49 mM MgCl<sub>2</sub>-Stammlösung: 5 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O in 500 ml ddH<sub>2</sub>O

Diese Stammlösungen wurden mittels Stericups<sup>TM</sup> (Porengröße 0,22 µm, Millipore, Eschborn, Deutschland) sterilfiltriert.

Zur Herstellung von PBS<sup>2+</sup> wurden je 5 ml der CaCl<sub>2</sub>- und der MgCl<sub>2</sub>-Stammlösung zu 500 ml Zellkultur-PBS gegeben.

- Trypsin/EDTA-Lösung:  
0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA, pH 7,4 (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Trypanblau-Lösung: 0,4% (w/v) Trypanblau (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

### 4.2.4 Kultivierung der Zellen

Alle Zelllinien wurden in Brutschränken (*Firma Scientific CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator*, Thermo Quest, Egelsbach, Deutschland) mit 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle verwendeten Zellen wurden auf handelsüblichen Zellkulturschalen kultiviert und nach Standardprotokollen drei Mal wöchentlich passagiert, wobei bei allen Zelllinien die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung von den Schalen gelöst wurden.

### 4.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm<sup>2</sup> Fläche (Assistent, Sondheim, Deutschland) verwendet. Die Zellsuspension wurde nach dem Ablösen mit einem Volumenteil Trypanblau-Lösung versetzt. Es wurden die lebenden Zellen von je zwei diagonal gegenüberliegenden großen Kästchen (0,0025 mm<sup>2</sup>) gezählt. Somit betrug das ausgezählte Volumen bei der Tiefe von 0,1 mm pro Kästchen 0,00025 mm<sup>3</sup> entsprechend 0,1 µl. Um die Zellzahl pro ml zu erhalten musste die in einem Kästchen gezählte Zellzahl mit dem Faktor 10<sup>4</sup> multipliziert werden. Da die Zellen vor dem Zählen 1:2 mit Trypanblau verdünnt wurden, ergibt sich die Zellzahl pro ml aus der Summe der auf beiden Feldern gezählten Zellen multipliziert mit 1 x 10<sup>4</sup>.

### 4.2.6 *lacZ*-Markierung der HT1080 Zellen

#### 4.2.6.1 *Transfektion von HT1080 mit Lipofektamin*

24 h vor der Transfektion wurden drei 6 cm Schalen mit je 2 x 10<sup>5</sup> HT1080 Zellen beschickt, zwei Stunden vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Für die Transfektion wurden 300 µl Opti-MEM in ein *well* einer 24-*well*-Platte gegeben und diesem 10 µl Lipofektamin-Reagenz zugefügt. In einem zweiten *well* wurden 300 µl Opti-MEM mit 1,2 µg pLZ12-Plasmid (s. 4.3.3.1) versetzt. Der Inhalt beider *wells* wurde 15 min vor der Transfektion gemischt und bis zur Transfektion bei RT inkubiert. Das Medium der HT1080 Zellen wurde abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen, anschließend wurden die 600 µl Opti-Mem/DNA/Lipofektamin-Gemisch zugegeben. Es wurden zwei parallele Transfektionen sowie eine Negativkontrolle, bei der Opti-MEM/Lipofektamin-Gemisch ohne DNA zugegeben wurde, durchgeführt. Nach 5,5 h Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde das Opti-MEM-Gemisch abgesaugt, die Zellen ein Mal mit Medium gewaschen und 4 ml Komplettmedium (siehe Tab. 4.2) zugegeben. Zwei Tage später wurden die Zellen 1:5 gesplittet. Die Zellen wurden anschließend mit Neomycin (G418) selektioniert, da das Plasmid pLZ12 eine Neomycin-Resistenz vermittelt. Das G418-Selektionsmedium (Komplettmedium mit 1000 µg G418/ml) wurde zwei Mal wöchentlich erneuert. Waren alle Zellen der Negativplatte abgestorben erfolgte der Mediumwechsel gegen Komplettmedium ohne Selektionsgift. Die Zellen wurden unter normalen Kulturbedingungen auf der Schale belassen, bis sich deutlich sichtbare Kolonien gebildet hatten.

### 4.2.6.2 Isolierung von Klonen mit Klonierungszyklindern

Um zu gewährleisten, dass beim Isolieren nur jeweils eine Kolonie von der Kulturschale gelöst wurde, wurden Klonierungszyklinder verwendet. Für das Isolieren von Zellkolonien mit diesen Zylindern wurde von den Zellen zunächst das Medium entfernt und die Zellen ein Mal mit PBS gewaschen. Die Klonierungszyklinder (5 mm Durchmesser) wurden dann mit etwas Silikonpaste auf die vorher auf der Unterseite der Kulturschalen markierten Kolonien gesetzt. Um die Zellen von der Schale zu lösen, wurden in die Zylinder jeweils 50 µl Trypsin/EDTA-Lösung gegeben. Die gelösten Zellen wurden dann mit 50 µl Kompletmedium (siehe Tab. 4.2) vorsichtig resuspendiert und auf zwei 24 wells verteilt, welche bereits mit je 1 ml Kompletmedium beschickt waren. Ein 24-well diente dem Nachweis des *lacZ*-Gens (X-Gal-Färbung siehe 4.2.7), das zweite well diente bei positivem Ergebnis der Amplifizierung der Zellen. Klon 15 zeigte die stärkste Expression des Transgenes, jedoch exprimierten nicht 100% der Zellen das Transgen. Daher erfolgte eine Subklonierung.

### 4.2.6.3 Subklonierung von HT1080pLZ12-Klonen

Für die Subklonierung des stabil mit pLZ12 transfizierten Zellklons HT1080pLZ12/K15 wurden von diesem 40 Zellen auf einer 10 cm Schale ausgesät. Nachdem diese Zellen zu Klonen ausgewachsen waren, wurden diese mittels Klonierungszyklindern isoliert (siehe 4.2.6.2). Bei dieser Subklonierung konnte ein Subklon generiert werden, bei welchem 100% der Zellen das *lacZ*-Gen stark exprimierten. Dieser Klon (HT1080pLZ12/K15-1) wurde amplifiziert und für die Tierversuche verwendet.

## 4.2.7 X-Gal Färbung

### 4.2.7.1 X-Gal-Färbung von Zellen

Für die X-Gal-Färbung wurden die Zellen zwei Mal mit PBS<sup>2+</sup> gewaschen und anschließend mit Fixierlösung (135 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2% (w/v) Formaldehyd, 0,2% (w/v) Glutaraldehyd) für 10 min fixiert. Die Fixierlösung wurde entfernt und die Zellen wurden drei Mal mit PBS<sup>2+</sup> gewaschen. X-Gal-Stammlösung (4 % (w/v) X-Gal in DMF) und X-Gal-Ausgangsfärbelösung (135 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 2,5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,0005% (v/v) Na-deoxycholat, 0,001% (v/v) NP40, pH=7,1) wurden 1:40 gemischt und auf die Zellen

gegeben. Die Färbung erfolgte über Nacht bei 37°C. Anschließend wurde die Färbelösung abgenommen und den Zellen PBS<sup>2+</sup> zugegeben.

### 4.2.7.2 X-Gal-Färbung von Organen

Die Organe wurden direkt nach der Präparation ein Mal in PBS gewaschen und anschließend 1-1,5 h in Fixierlösung fixiert. Die Organe wurden drei Mal mit PBS gespült um die Fixierlösung restlos zu entfernen. X-Gal-Stammlösung (s.o.) und X-Gal-Ausgangsfärbelösung (s.o.) wurden 1:40 gemischt und Organe in dieser Lösung 6 h bei 37°C gefärbt.

## 4.3 Mikrobiologische Methoden

### 4.3.1 **Verwendete Bakterien**

#### 4.3.1.1 *DH10B*

Der *E. coli* Stamm DH10B zeichnet sich durch eine hohe Transformationseffizienz aus (Donahue und Bloom, 1998). DHB10 wurden in chemisch-kompetenter Form (hergestellt nach Standard-Protokollen) bei der Transformation von pShuttle- und pKA1-Konstrukten verwendet.

#### 4.3.1.2 *Top10*

Der *E. coli* Stamm Top10 wird von der Firma Invitrogen für die Transformation von pSecTag2/Hygro Plasmiden empfohlen. Daher wurde dieser Stamm, ebenfalls in chemisch-kompetenter Form (nach Standardprotokollen), in dieser Arbeit für die Transformation der pSecTag2/HygroB-Konstrukte verwendet. Der Genotyp der Top10- ähnelt dem der DH10B-Bakterien. Top10-Bakterien sind besonders gut für die Transformation unmethylierter DNA geeignet.

#### 4.3.1.3 *MAX Efficiency® Stbl2™ Cells*

Diese chemisch-kompetenten Zellen sind speziell für die Klonierung unstabiler Inserts generiert und von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen worden. Der veränderte Genotyp dieser *E. coli* reduziert rekombinationsbedingte Deletionen der transformierten Plasmide (Trinh, et al., 1994; Strader und Howell, 1997). Aufgrund dieser erhöhten Stabilität der transformierten Plasmid DNA wurden diese Bakterien, wie von der Firma Clontech empfohlen, für die Transformation von pAdenoX<sup>TM</sup>-Konstrukten und pBHGlox, ΔE1,E3,Cre verwendet.

### 4.3.2 Kultivierung von Bakterien

DH10B und Top10 wurden bei 37°C, StB12<sup>TM</sup> bei 30°C, in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten kultiviert. Flüssigkulturen wurden in einem Bakterien-Schüttel-Inkubator (Series 25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Inc., New Jersey, USA) kultiviert und stets verwendet, wenn sich die Bakterien in logarithmischer Wachstumsphase befanden, LB-Agar-Platten wurden in einem Wärmeschrank bei entsprechender Temperatur inkubiert.

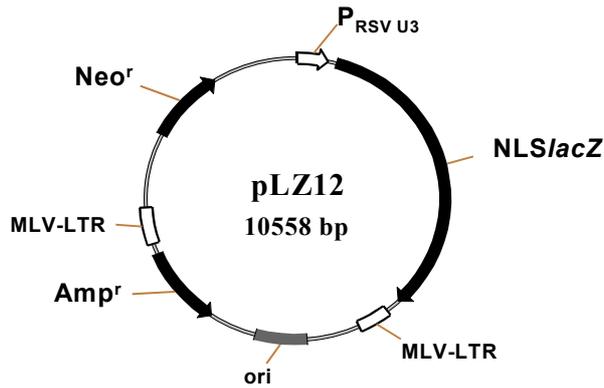
#### 4.3.2.1 Verwendete Kulturmedien, Kulturplatten und Antibiotika

- LB-Medium:
  - 10 g Bacto<sup>TM</sup>-Tryptone/1000 ml
  - 5 g Bacto<sup>TM</sup> Yeast Extract/1000 ml
  - 5 g NaCl/1000 mlAlle Substanzen wurden eingewogen, mit ddH<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert. Medium wurde bis zur Verwendung bei RT gelagert.
- SOC-Medium: von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen
- LB-Agarplatten:
  - LB-Medium mit 18 g Bacto<sup>TM</sup> Agar/1000 ml
- Ampicillin Stock-Lösung (1000x):
  - 10% (w/v) Ampicillin: 1 g Ampicillin/10 mlAmpicillin wurde in ddH<sub>2</sub>O gelöst und anschließend bei –20°C in Aliquots gelagert.
- Kanamycin Stock Lösung (1000x):
  - 5% (w/v) Kanamycin: 0,5 g Kanamycin/10 mlKanamycin wurde in ddH<sub>2</sub>O gelöst und anschließend bei –20°C in Aliquots gelagert.

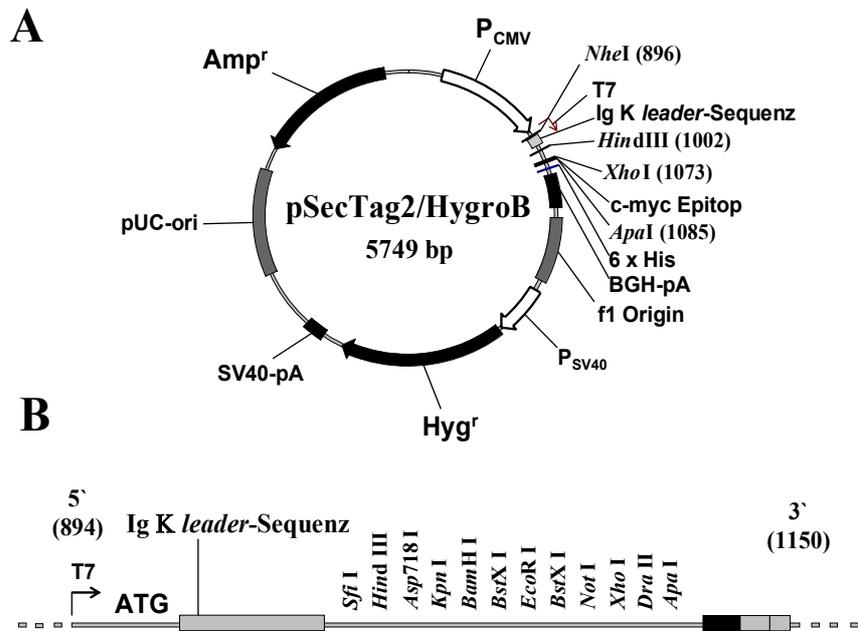
### 4.3.3 Verwendete Plasmide

#### 4.3.3.1 pLZ12

Bei pLZ12 handelt es sich um ein retrovirales Plasmid beruhend auf dem murinen Leukämie Virus (MLV). Zwischen 5`LTR und 3`LTR befindet sich das *nls-lacZ*-Gen unter Kontrolle eines RSV Promotors. Die Neomycin-Resistenz befindet sich unter Kontrolle der 5`LTR (s. Abb. 4.1). Das Plasmid enthält ausserhalb der retroviralen Sequenzen eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion transformierter *E. coli*. Die Konstruktion des Plasmides wurde von Galileo, et al. 1990 publiziert. Dieses Plasmid wurde von Joshua Sanes (Washington University School of Medicine, St. Louis, USA) zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 4.1. Schematische Darstellung von pLZ12.** Plasmidkarte mit den für diese Arbeit notwendigen Elementen.  $Neo^r$ : Neomycin-Resistenz,  $P_{RSVU3}$ : RSVU3-Promotor,  $NLSlacZ$ : nuclear leader sequence-lacZ, MLV: Murine Leukaemia Virus, LTR: long terminal repeat,  $Amp^r$ : Ampicillin-Resistenz.



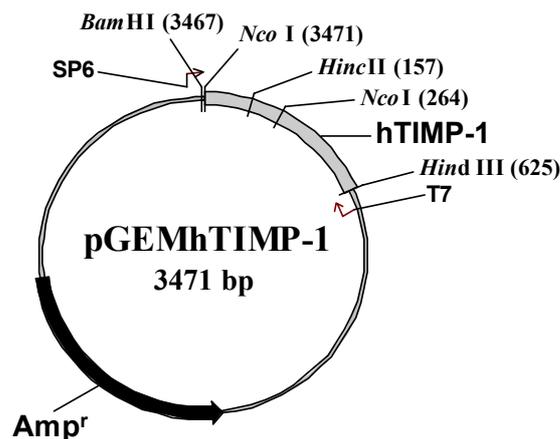
**Abbildung 4.2. Schematische Darstellung von pSecTag2/HygroB.** A. Plasmidkarte mit den für diese Arbeit wichtigen Restriktionsschnittstellen und Elementen. B. Vergrößerter Ausschnitt des Plasmides von Basenpaar 894 bis Basenpaar 1150, inklusive des Startkodons, der Igk leader-Sequenz und MCS (*multiple cloning site*).  $Amp^r$ : Ampicillin-Resistenz,  $P_{CMV}$ : CMV Promotor, pA: Polyadenylierungssignal,  $Hyg^r$ : Hygromycin Resistenz.

4.3.3.2 *pSecTag2/HygroB*

Bei *pSecTag2/Hygro B* (Invitrogen, Heidelberg, Deutschland, Abb. 4.2 A) handelt es sich um ein eukaryotisches Expressionsplasmid welches speziell konstruiert wurde, die Sezernierung von eingefügten Transgenen zu gewährleisten. Hierfür befindet sich 5' der *multiple cloning site* (MCS) aber 3' des Startkodons eine IgK *leader*-Sequenz (Abb. 4.2 B). Es gibt drei verschiedene *pSecTag2/Hygro* Plasmide (A, B, C), welche sich in einer Kasette unterschiedlicher Länge innerhalb der MCS unterscheiden. Diese Varianz dient der Klonierung, da das Transgen im Leseraster zu dem Startkodon eingefügt werden muß. In der vorliegenden Arbeit wurde *pSecTag2/Hygro B* verwendet. Dieses Plasmid enthält wie *pLZ12* eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion transformierter *E. coli*.

4.3.3.3 *pGEMhTIMP-1*

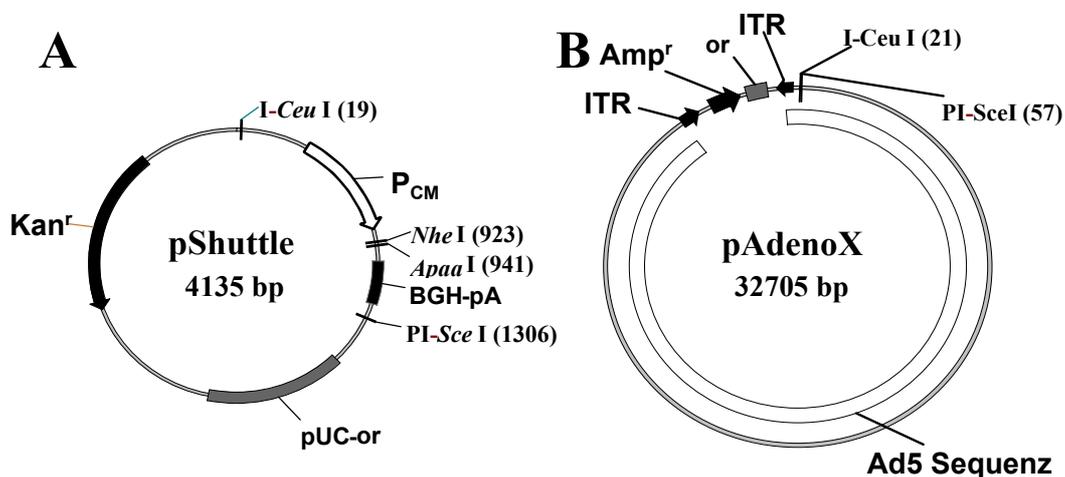
Das Plasmid *pGEMhTIMP-1* wurde von Dylan Edwards (University of East Anglia, Norwich, GB) zur Verfügung gestellt, die Konstruktion des Plasmides ist in Parkes et al., 2002 publiziert. In diesem Plasmid befindet sich die TIMP-1 cDNA zwischen einer *Bam*HI und einer *Hind*III Schnittstelle (s. Abb. 4.3). Diese cDNA entspricht der *reviewed reference sequence* von NCBI (siehe NM\_003254). Das Plasmid enthält zur Selektion transformierter *E. coli* eine Ampicillin-Resistenz.



**Abbildung 4.3. Schematische Darstellung von *pGEMhTIMP-1*.** Plasmidkarte mit den für diese Arbeit wichtigen Restriktionsschnittstellen und Elementen. Amp<sup>r</sup>: Ampicillinresistenz.

4.3.3.4 AdenoX<sup>TM</sup> System

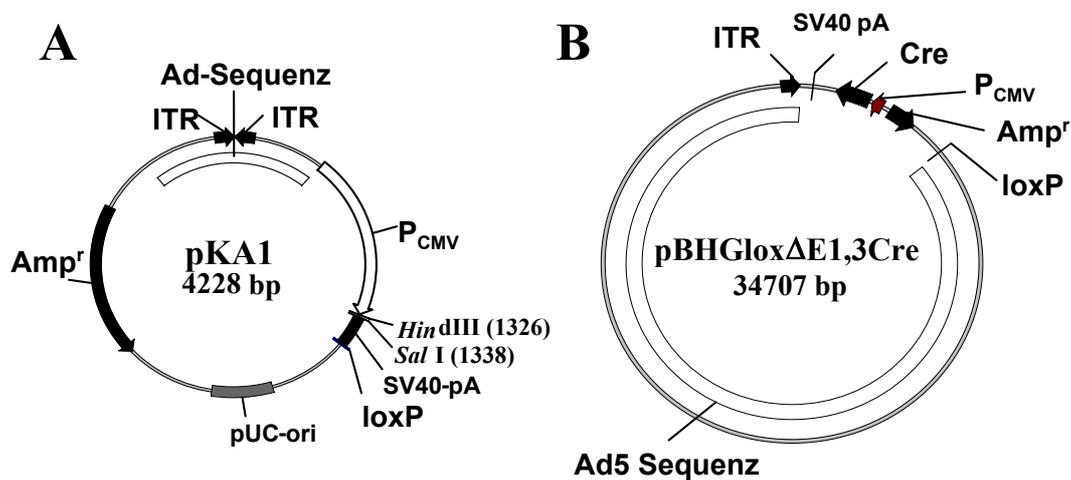
Das Adeno-X<sup>TM</sup> System wurde von Clontech (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Dieses System besteht aus einem adenoviralen *shuttle* Plasmid (pShuttle, Abb. 4.4, A) und einem adenoviralen *backbone* Plasmid (pAdenoX, Abb. 4.4, B). Das Plasmid pShuttle enthält eine MCS zwischen einem humanen CMV Promotor und dem BGH-Polyadenylierungssignal. 5' des Promotors befinden sich eine I-*CeuI* Schnittstelle, 3' des BGH-polyA befindet sich eine PI-*SceI* Schnittstelle. Das Plasmid enthält eine Kanamycin-Resistenz zur Selektion transformierter *E. coli*. Das pAdeno-X Plasmid kodiert die adenoviralen Sequenzen (Ad5) von linker ITR (*internal terminal repeat*) bis Nukleotid 341, von Nukleotid 3524-28133 und von Nukleotid 30819 bis zum rechten Ende des adenoviralen Genoms (Mizuguchi und Kay, 1998). Zusätzlich enthält das Plasmid eine I-*CeuI* und PI-*SceI* Schnittstelle zum Einfügen der Transgenkassette in die entsprechende Stelle des adenoviralen Genoms (E1) sowie eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion transformierter *E. coli*. Zwischen der I-*CeuI* und PI-*SceI* Schnittstelle des pAdenoX befindet sich eine *SwaI* Schnittstelle (Mizuguchi und Kay, 1998). Im Anschluß an die Ligation von pAdeno-X und Transgen-Kassette wurden die Ligationsansätze mit *SwaI* verdaut. Das fertige Konstrukt wurde mit *PacI* geschnitten und in HEK 293 Zellen transfiziert (siehe Tab. 4.5 und Abschnitt 4.4.2).



**Abbildung 4.4. Das pAdenoX<sup>TM</sup> Systems.** Plasmidkarten mit den für diese Arbeit wichtigen Restriktionsschnittstellen und Elementen. A. pShuttle, B. pAdenoX. Kan<sup>r</sup>: Kanamycin-Resistenz, pA: *polyadenylation signal*, P<sub>CMV</sub>: CMV Promotor, ITR: *internal terminal repeats*, Amp<sup>r</sup>: Ampicillin-Resistenz.

4.3.3.5 AdMax<sup>TM</sup> System (Microbix, Toronto, Kanada)

Das AdMax<sup>TM</sup> System wurde von der Firma Microbix (Toronto, Kanada) bezogen. Der murine CMV Promotor des adenoviralen *shuttle* Plasmids, pDC315, wurde gegen einen humanen CMV Promotor ausgetauscht (persönliches Gespräch Martina Anton, TU München, Deutschland), dieses Plasmid trägt die Bezeichnung pKA1. Das Plasmid pKA1 (Abb. 4.5 A) wurde von Martina Anton zur Verfügung gestellt. Das pKA1 Plasmid enthält zwischen dem humanen CMV-Promotor und dem SV-40 Polyadenylierungssignal eine *HindIII* und eine *SalI* Schnittstelle. 3' des polyA verfügt das Plasmid über eine *loxP site* (*locus of crossing over*). Dieses *shuttle* Plasmid enthält zudem das linke und das rechte Ende des adenoviralen Genoms (Ad5) inkl. der *internal terminal repeats* (ITRs) und dem Verpackungssignal (Ng et al., 2000). Zur Selektion transformierter *E. coli* ist eine Ampicillin-Resistenz vorhanden (Abb. 4.5 A). Das adenovirale *backbone* Plasmid dieses Systems, pBHGlox,ΔE1,E3,Cre enthält die Ad5-Sequenz von Nukleotid 1339-28133 und 30818 bis zum rechten Ende des Genoms (Ng et al., 2000; Bett et al., 1994). Neben diesen Sequenzen verfügt dieses Plasmid über das *Cre* (*causes recombination*)-Gen unter Kontrolle eines CMV Promotors 5' des *loxP*, sowie eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion transformierter *E. coli* (Abb. 4.5 B).



**Abbildung 4.5. Das AdMax<sup>TM</sup> System.** Plasmidkarten mit den für diese Arbeit wichtigen Restriktionsschnittstellen und Elementen. A. pKA1, B. pBHGlox,ΔE1,E3,Cre. ITR: *internal terminal repeats*, P<sub>CMV</sub>: CMV Promotor, loxP: *locus of crossing over*, Amp<sup>r</sup>: Ampicillin-Resistenz, pA: Polyadenylierungssignal, Cre: *causes recombination*.

#### 4.3.4 Verwendete cDNAs

##### 4.3.4.1 TIMP-1

Die cDNA für humanes TIMP-1 stammte aus dem Plasmid pGEMhTIMP-1 (siehe 4.3.3.3).

##### 4.3.4.2 Cystatin C

Die cDNA für humanes Cystatin C wurde von Ernst-August Auerswald (LMU, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um eine synthetische cDNA für Cystatin C (siehe NCBI X12763; Abrahamson et al., 1988). Das von dieser cDNA kodierte Protein entspricht in seiner Aminosäure-Sequenz der in NCBI veröffentlichten *reviewed reference sequence* (NP\_000090). Für diese Arbeit wurden die Nukleotide 68-425 der synthetischen cDNA verwendet, welche die Aminosäuren (aa) 27 bis 146 des humanen Cystatin C Proteins kodieren, d.h. die aa kodierend für den Inhibitor ohne *leader*-Sequenz und ohne nicht-kodierende Bereiche (siehe NP\_000090).

##### 4.3.4.3 PAI-2

Die cDNA von humanem PAI-2 wurde von Viktor Magdolen (TU München, Deutschland) zur Verfügung gestellt, die Generierung dieser cDNA ist in Mühlenweg et al., 2000 beschrieben. Die Nukleotid-Sequenz dieser cDNA entspricht der von Antalis et al., 1988 veröffentlichten Sequenz (siehe NCBI J03603). Entsprechend dieser Sequenz wurden in dieser Arbeit das cDNA-Fragment zwischen den Nukleotiden 53-1296 verwendet. Die der von Antalis et al. veröffentlichten cDNA entsprechende Aminosäuren-Abfolge ist mit dem Protein der *reviewed reference sequence* (NP\_002566) identisch. Entsprechend diesem Protein wurden die aa 2 bis 415 verwendet.

#### 4.3.5 Transformationen

##### 4.3.5.1 Transformation von Top10 und DH10B

1-100 ng der zu transformierenden DNA wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf 50 µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und 50 µl der chemisch kompetenten Zellen (DH10B bzw. Top10) zugeben. Dieses DNA-Bakterien Gemisch wurde 30 min auf Eis, 90 s bei 42°C und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden in 14 ml Bakterienröhrchen überführt und 500 µl LB-Medium zugegeben. Diese Erholungskultur inkubierte für 1 h bei 37°C. 100-500 µl dieser Bakteriensuspension wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum (100 µg Ampicillin /ml bzw. 50 µg Kanamycin /ml) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht

bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurden die Bakterienkolonien mit sterilen Pipettenspitzen isoliert.

### 4.3.5.2 Transformation von StB1 2<sup>TM</sup> (pAdenoX-Plasmide)

Der chemisch-kompetente *E. coli* Stamm StB12<sup>TM</sup> wurde er in der vorliegenden Arbeit für die Amplifikation der pAdeno-X<sup>TM</sup>-Konstrukte verwendet. Der Ligationsansatz wurde zunächst 1:5 mit TE-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH=7,5) verdünnt. 1-10 ng DNA der Ligation wurden zu 100 µl auf Eis aufgetauten StB12<sup>TM</sup> in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und dieser Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß erfolgte für 25 s der *heat shock* bei 42 °C, die Bakterien wurden 2 min auf Eis inkubiert und anschließend zur Erholung 900 µl SOC-Medium zugegeben und die Bakterien bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 100, 200, 300 und 400 µl der Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten mit 100 µg Ampicillin/ml ausplattiert. Die Platten wurden für mindestens 20 h bei 30°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterienkolonien mit sterilen Pipettenspitzen gepickt.

## 4.4 Adenovirale Methoden

### 4.4.1 **Verwendete Adenoviren**

#### 4.4.1.1 *Adβ-Gal*

Bei Adβ-Gal handelt es sich um ein replikationsdefektes Adenovirus welches das *E. coli lacZ* Gen kodiert (Jaffe et al., 1992). Dieses Virus wurde von Karsten Brand (Universität Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt und in dieser Arbeit für die Bestimmung der Transduktionseffizienz von Adenoviren *in vitro* verwendet.

#### 4.4.1.2 *Add170-3*

Bei Add170-3 handelt es sich um ein E1 und E3 deletiertes Kontroll-Adenovirus ohne Transgen (Bett et al., 1994). Add170-3 wurde von Martina Anton (TU München, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

#### 4.4.2 Transfektion von HEK 293 Zellen mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation

Für diese Transfektion wurden einen Tag vor der Transfektion HEK 293-Clontech Zellen in 6 cm Schalen ausgesät, wobei aus einer zu 90% konfluenten 15 cm Schale 20 x 6 cm Schalen ausgelegt wurden. So war gewährleistet, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von ca. 40% aufwiesen. Pro Transfektionsansatz wurde eine 6 cm Schale mit HEK 293 Zellen ausgelegt. Am Tag der Transfektion wurden pro Schale 500 µl HEBS (HEPES buffered saline: 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,75 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7,6 mM Glukose, pH=7,05) und 5 µl HeringSperm-DNA-Lösung (0,2% (w/v) HeringSperm DNA, 15 mM NaCl, 1,5 mM Na-Citrat, pH=7,0, als Träger-DNA) in ein 15 ml Röhrchen gegeben und dieses mittels eines Vortexers für 1 min gründlich gemischt. Anschließend wurde dem Gemisch die zu transfizierende DNA (DNA-Mengen s. Tab. 4.3) und tropfenweise 25 µl 2,5 M Kalziumchlorid-Lösung zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Transfektionsansätze auf je eine 6 cm Schale getropft und diese 8-16 h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde das Medium abgesaugt und frisches Kulturmedium (siehe Tab. 4.2) mit 2% (v/v) FKS zugegeben. Die Schalen verblieben im Brutschrank, bis alle Zellen einer Schale den durch adenovirale Replikation ausgelösten zytopathischen Effekt (*cytopathic effect*, CPE) aufwiesen.

Tab. 4.3: Bei Transfektionen von HEK 293 eingesetzte DNA Mengen

Transfektion bzw. Ko- Transfektion	DNA-Menge [µg]	
	Plasmid 1	Plasmid 2
pAdX/PAI-2	pAdX/PAI-2: 5 µg ( <i>PacI</i> verdaut)	-
pKA1/hTIMP-1 mit pBHGlox	pKA1/hTIMP-1: 7,5 µg	pBHGlox: 7,5 µg
pKA1/CysC mit pBHGlox	pKA1/CysC: 10 µg	pBHGlox: 10 µg

#### 4.4.3 Infektion adenoviraler Verpackungszellen (HEK 293 Zellen)

Das Infektionsprotokoll wurde entsprechend Hitt et al. (1995) durchgeführt. Die Infektionen von HEK 293-Clontech Zellen erfolgten mit Virusüberständen, *crude stocks* (s.4.4.4) oder gereinigtem Virus (s. 4.4.5). 24 Stunden vor der Infektion wurden HEK 293-Clontech Zellen in Zellkulturschalen des gewünschten Durchmessers ausgelegt. Eine 15 cm Schale 80% kon-

fluenter Zellen wurde entweder auf 14-18 x 6 cm Schalen oder auf 10-12 x 10 cm Schalen verteilt. Für die Infektion von 15 cm Schalen wurden die Zellen wie für eine normale Passage ausgelegt und die Zellen infiziert wenn diese ca. 70% konfluent waren. Infektionen von 6 cm Schalen erfolgten mit einem Volumen von 200 µl, Infektionen von 10 cm Schalen mit 1 ml und 15 cm Schalen mit 2 ml. Für die Infektion wurde das Medium abgenommen, die Viruslösung zugegeben und die Schalen 30 min im Brutschrank inkubiert, wobei die Schalen nach 15 min geschwenkt wurden, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Anschließend wurden die Schalen mit frischem Medium aufgefüllt. Zellen, die mit Virusüberständen oder *crude stocks* infiziert wurden, erhielten Kulturmedium (siehe Tabelle 4.2) mit 2 % (v/v) FKS. Zellen, die mit gereinigtem Ad infiziert wurden um Virus zu amplifizieren und zu reinigen, erhielten Kulturmedium (siehe Tabelle 4.2) mit 5 % (v/v) *Horse* (Pferde) Serum. Die infizierten Zellen wurden im Brutschrank kultiviert, bis alle Zellen einer Infektion CPE zeigten. Im Anschluss wurden entweder die Virusüberstände direkt für weitere Infektionen verwendet oder die Zellen wurden zu *crude stocks* verarbeitet und für spätere Infektionen oder Virusreinigungen bei -80°C eingefroren.

### 4.4.4 Herstellung von *crude stocks*

Für die Herstellung von *crude stocks* nach Hitt et al. (1995) wurden die infizierten, CPE zeigenden Zellen mit 1500 x g für 20 min abzentrifugiert (Megafuge 2.0R, Heraeus, Düsseldorf, Deutschland). Anschließend wurde das Zellpellet entweder in PBS<sup>2+</sup>, 10% (v/v) Glycerin oder in 0,1 M TRIS, pH 8,0 resuspendiert. In PBS<sup>2+</sup>, 10% (v/v) Glycerin aufgenommenen Zellen dienten weiteren Infektionen. In 0,1 M TRIS, pH 8,0 aufgenommene Zellen wurden für Ad-Banding (Reinigungen) verwendet. Beide Arten von *crude stocks* wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

### 4.4.5 Ad-Banding (Reinigung)

Das Ad-Banding wurde nach Hitt et al. (1995) durchgeführt. Für die Herstellung der für die Tierversuche notwendigen Virusmengen mit ausreichend hohen Titern wurden 100 x 15 cm Zellkulturschalen mit HEK 293-Clontech Zellen infiziert. Was einer Zellzahl von ca.  $1 \times 10^{10}$  entsprach. Die Zellen wurden mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 10 infiziert (s.4.4.3). Die wie unter 4.4.4 beschrieben gewonnenen *crude stocks* wurden aufgetaut, 1/10 Volumen 5% (w/v) Na-Deoxycholat zugegeben und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 400 µl 2 M MgCl<sub>2</sub> und 200 µl DNaseI Lösung (1% (w/v) DNase, 20 mM TRIS, 50

mM NaCl, 1 mM DTT, 0,01% (w/v) BSA, 50% (v/v) Glycerin, pH=7,4) zugefügt. Das 50 ml Schraubdeckelröhrchen wurde gründlich geschwenkt und bei 37°C 60 min inkubiert. Die Zelltrümmer wurden anschließend abzentrifugiert (1500 x g, 15 min, 5 °C, Megafuge 2.0R, Heraeus, Düsseldorf, Deutschland) und je ca. 15 ml des virushaltigen Überstandes auf einen geschichteten CsCl Gradienten gegeben. Zur Herstellung dieser Gradienten wurden CsCl-Lösungen verschiedener Dichten übereinander in ein 25 x 89 mm Ultra-Clear<sup>TM</sup>-Zentrifugenröhrchen (Beckman, Krefeld, Deutschland) geschichtet. Die unterste Phase bestand aus 3 ml CsCl-Lösung, Dichte 1,5 (90,8 g CsCl + 109,2 g 10 mM TRIS, pH 8,0), die mittlere Phase aus 10 ml CsCl-Lösung, Dichte 1,35 (70,4 g CsCl + 129,6 g 10 mM TRIS, pH 8,0) und die oberste Phase schließlich aus 10 ml CsCl-Lösung, Dichte 1,25 (54,0 g CsCl + 146,0 g 10 mM TRIS, pH 8,0). Die Zentrifugenröhrchen wurden austariert und in einem Ausschwingrotor (Sw32Ti, Beckman, Krefeld, Deutschland) in geschlossenen Patronen zentrifugiert (30.000 U/min, 2 h, 10 °C, Optima<sup>TM</sup> LE-80K Ultrazentrifuge, Beckman, Krefeld, Deutschland). Bei diesem Zentrifugationsschritt sammelten sich die fertig gereiften Viren aufgrund ihrer spezifischen Dichte an der Grenze zwischen den CsCl-Lösungen mit den Dichten 1,25 und 1,35. Diese deutlich sichtbare Virusbande wurde vorsichtig mit einer Kanüle abgenommen und in ein frisches Ultra-Clear<sup>TM</sup>-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Viruslösung wurde mit CsCl-Lösung (Dichte 1,35) aufgefüllt, die Röhrchen austariert und zentrifugiert (30.000 U/min, Sw32Ti, 20-26 h, 10 °C, Optima<sup>TM</sup> LE-80K Ultrazentrifuge, Beckman, Krefeld, Deutschland). Nach 20-26 h hatte sich ein CsCl-Gradient aufgebaut wodurch sich evt. mitabgenommene leere Viruspartikel von ausgereiften Viruspartikeln unterscheiden lassen. Diese Virusbande wurde abgenommen und für 24 h gegen 0,01 M TRIS, pH 8,0 in einer Gamma-bestrahlten Dialysekassette mit einer Molekulargewichts-Ausschlussgrenze von 10.000 (Slide-A-Lyzer<sup>TM</sup>, Pierce, Rockford, USA) dialysiert, wobei der Dialysepuffer vier Mal ausgewechselt wurde.

### 4.4.6 Adenovirus-Titration (*plaque assay*)

Die Adenovirus-Titration wurde nach Hitt et al. (1995) durchgeführt. Am Vortag der Titration wurden pro Titration 12-16 Schalen mit einem Durchmesser von 6 cm mit HEK 293-MA Zellen beschickt. Hierfür wurden die Zellen einer 15 cm Schale (95% konfluent) auf 12 Schalen eines Durchmessers von 6 cm verteilt. 24 h später erfolgte die Titration. Für die Erstellung einer Verdünnungsreihe wurde für den ersten Verdünnungsschritt 90 µl PBS<sup>2+</sup> mit 10 µl des zu titrierenden Ad gemischt. Die nachfolgenden Verdünnungsschritte erfolgten mit je 540 µl

PBS<sup>2+</sup> und 60 µl Ad-Lösung der vorangegangenen Verdünnung. Es wurden stets zwei unabhängige Verdünnungsreihen erstellt und die Infektionen jeder Verdünnungsreihe erfolgten in Doppelansätzen. Die Infektionen wurden mit je 200 µl der entsprechenden Verdünnung (in der Regel 10<sup>-7</sup>-10<sup>-10</sup>) 30 min im Brutschrank durchgeführt (siehe 4.4.3). Nach der Infektion wurde der *overlay* durch Mischen gleicher Teile aufgekochter und 30 min bei 42°C abgekühlter 1% (w/v) Zellkultur-Agarose und 2 x MEM Earle Medium (siehe unten) hergestellt. Es wurden je 10 ml *overlay* auf die Schalen gegeben und dieser außerhalb der Sterilbank bei RT inkubiert bis der *overlay* erstarrt war. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert und die Plaques (durch Zellyse entstandene Löcher im Zellrasen) nach sieben und zehn Tagen ausgezählt und der Titer berechnet.

### *Bestimmung des Titers:*

Titer [pfu/ml] = Mittelwert der Plaques pro Schale [pfu] x Verdünnungsfaktor x 5 / 1 [ml]

### *2 x MEM Earle Medium (für 100 ml):*

76,2 ml MEM Earle (Biochrom, Berlin)  
9 ml 10 x MEM (+Earle, w/o L-Glutamin, w/o NaHCO<sub>3</sub>, Gibco, Karlsruhe, Deutschland)  
2,5 ml 7,5% (w/v) NaHCO<sub>3</sub>  
300 µl Fungizone  
1,5 ml Penicillin/Streptomycin (100000 U/ml/10 µg/ml; Biochrom, Berlin)  
1,5 ml 2 M Glutamin (Biochrom, Berlin)  
1,5 ml 5% (w/v) *Yeast extract*  
7,5 ml *Horse Serum*

### **4.4.7 Plaque Reinigung**

Für die Isolierung einzelner Viren aus einer Ad-Population wurde eine sogenannte Plaque Reinigung (Hitt et al., 1995) durchgeführt. Hierfür wurde eine Plaque Titration (siehe 4.4.6) durchgeführt, wobei einzelne Infektionsereignisse in Plaques sichtbar gemacht werden. Jedes vereinzelt vorliegende Plaque wurde 8-14 Tage nach der Titration mittels gestopfter Pasteurpipetten isoliert, d.h. der Ad-haltige *overlay* wurde direkt über dem zu isolierenden Plaque bis zu den Zellen ausgestochen und in 500 µl PBS<sup>2+</sup>, 10 % Glycerin überführt. Um die Viren aus der Agarose freizusetzen, wurden die isolierten Plaques drei Mal in flüssigen Stickstoff eingefroren und anschließend aufgetaut. Mit diesen Plaques konnten dann HEK 293 Zellen infiziert werden.

### 4.4.8 Kontroll-Untersuchung der Plaque-Viren

Um die Viren hinsichtlich ihres Genoms untersuchen zu können, mussten zunächst HEK 293-Clontech Zellen infiziert werden. Pro Plaque wurden die Zellen einer 6 cm Schale wie unter 4.4.3 beschrieben infiziert. Zeigten alle Zellen einer Schale CPE, wurde die genomische DNA der Zellen zusammen mit der viralen DNA wie unter 4.5.2.1 beschrieben isoliert. Jeweils 5 µl der DNA wurden mittels Restriktionsenzymen, in dieser Arbeit wurden für diese Verdauung *XhoI*, *HindIII* bzw. *PvuI* verwendet, analysiert. Die Restriktionen wurden wie unter 4.5.1.2 beschrieben durchgeführt, wobei den Verdauen zusätzlich Pronase (zum Abbau der terminalen Proteine gebunden an die ITRs) und RNase (zum Abbau der zellulären RNA) zugegeben wurde. Die genauen Angaben zu den Verdauen sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst. Für die elektrophoretische Auftrennung wurden 0,8% (w/v) Agarose/TAE Gele verwendet (siehe Abschnitt 4.5.1.1). Die Ergebnisse der Restriktionsverdauung sind im Anhang II abgebildet.

### 4.4.9 Infektion von HT1080 Zellen und Herstellung von Zellüberständen für biochemische Untersuchungen

Für die adenovirale Infektion von Zielzellen wurden je  $1 \times 10^5$  HT1080 Zellen in einem *well* einer 6-*well*-Platte 24 h vor der Infektion ausgesät, wobei eine zusätzliche Schale, welche zur Bestimmung der Zellzahl zum Zeitpunkt der Infektion diente, angesetzt wurde. Die Zellen dieser Schale wurden unmittelbar vor der Infektion gezählt (s. 4.2.5) und anhand dieser Zellzahl die einzusetzende Virusmenge berechnet. Die Zellen wurden mit AdTIMP-1, AdCysC bzw. AdPAI-2 und als Kontrollen mit Ad170-3 und Adβ-Gal mit MOIs 5, 10, 25, 50, 100 bzw. 200 infiziert. Die Infektion erfolgte analog zu der unter 4.4.3 beschriebenen Infektion von HEK 293 Zellen. Die Infektion erfolgte mit einem Volumen von 200 µl und im Anschluss an die Infektion wurden die *wells* mit 2 ml Komplettmedium (s. Tabelle 4.2) aufgefüllt. 12 h nach der Infektion erfolgte ein Mediumwechsel gegen je 2 ml FKS-freies Medium, wobei die Zellen zuvor zwei Mal mit PBS gewaschen wurden. 48 h nach diesem Mediumwechsel wurden die Überstände abgenommen, zentrifugiert (400 x g, 10 min, 4°C, Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), auf Eis aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Die Zellen jeder Schale wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA abgelöst und ausgezählt (siehe 4.2.5).

## 4.5 Molekularbiologische Methoden

### 4.5.1 Präparation, Analyse und Manipulation von Nukleinsäuren

#### 4.5.1.1 Agarosegelelektrophorese

Agarosegele wurden mit TAE-Puffer (40 mM TRIS-Acetat, 1 mM EDTA, pH=8,5) hergestellt. Die Agarosekonzentration richtete sich dabei nach der Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente, diese Angaben sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Für kleine Agarosegele wurden 40-50 ml Agarose/TAE aufgekocht und mit 2-2,5 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (0,05% (w/v) Ethidiumbromid) versetzt, für große Gele wurden 300 ml Agaroselösung und 20 µl Ethidiumbromid-Stammlösung verwendet. Die DNA-Proben wurden 1:6 (v/v) mit 6 x DNA-Probenpuffer (60% (v/v) Glycerin, 60 mM EDTA, 0,15% (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Als Standards wurden kommerziell erhältliche 1 kb bzw. 100 bp DNA Leitern (NEB, Frankfurt a. M., Deutschland; Gibco, Eggenstein, Deutschland) verwendet. Für die Analyse von DNA-Fragmenten erfolgte der Lauf in TAE-Puffer (s.o.) bei einer Spannung von 60-80 V für 0,5 -1,5 h bei kleinen Geleinheiten, mit einer Spannung von 30-50 V über Nacht bei großen Geleinheiten. Für die Trennung von DNA-Fragmenten für eine anschließende Gelextraktion erfolgte die Elektrophorese bei 40 V bis die zu extrahierenden Fragmente deutlich aufgetrennt waren. Durch das Einbetten des Ethidiumbromids in die Agarose konnte die DNA in den Gelen direkt visualisiert werden. Die Gele wurden in einer Geldokumentationskammer (Biocapture, LTF, Wasserburg, Deutschland) illuminiert und die leuchtenden Banden mittels einer Kamera aufgenommen. Der Visualisierung von DNA-Fragmenten zu Extraktion erfolgte auf einem UV-Tisch.

Tabelle 4.4: Adäquate Agarosekonzentrationen für die Separation von DNA-Fragmenten verschiedener Größe

Agarose [% (w/v)]	Effektiver Separations-Bereich [kb]
0,5	1-30
0,8	0,8-12
1,0	0,5-10
1,2	0,4-7
1,5	0,2-3

## 4. Material und Methoden

Tabelle 4.5: Zusammenfassung aller Restriktionsverdaue dieser Arbeit

	Restriktions- enzym	Eingesetzte Menge an		10 x Puffer	Sonstige Zusätze	Temperatur
		Restriktions- enzym	DNA			
E I N Z E L V E R D A U E	<i>Apa</i> I*	1 µl	3-4 µg	A*	-	30 °C
		2 µl	> 10 µg			
	<i>Bam</i> H I*	1 µl	1-4 µg	B*	-	37 °C
	<i>Bgl</i> II*	1 µl	1-4 µg	H*	-	37 °C
	<i>Cla</i> I*	1 µl	1-2 µg	H*	-	37 °C
	<i>Eco</i> R I*	1 µl	1-2 µg	H*	-	37 °C
	<i>Hind</i> III*	0,5 µl	< 1 µg	B*	-	37 °C
		1 µl	1-2 µg			
		2 µl	5-10 µg			
		2 µl	5 µl Virus-Plaque			
	<i>Nhe</i> I*	1 µl	3-4 µg	A*	-	37 °C
		2 µl	12 µg			
	<i>Pac</i> I**	1µl	5 µg	I**	-	37 °C
	<i>Pvu</i> I****	2 µl	5 µl Virus-Plaque	R+****	10 x Pronase#	37 °C
	<i>Sal</i> I*	0,5 µl	0,5 µg	H*	-	37 °C
<i>Swa</i> I*	1 µl	< 1 µg	H*	10 x BSA*	25 °C	
<i>Xba</i> I*	0,5 µl		H*	-	37 °C	
<i>Xho</i> I*	1 µl	1-0,5 µg 5 µg	H*	-	37 °C	
	2 µl	5-10 µg				
	2 µl	5 µl Virus-Plaque				
D O P P E L V E R D A U E	<i>Apa</i> I* + <i>Nhe</i> I*	1 µl 1 µl	1-4 µg	A*	-	1 h 30 °C, 2 h 37 °C
	<i>Bam</i> H I* + <i>Hind</i> III*	1 µl 1 µl	4 µg	B*	-	37 °C
	<i>Bgl</i> II* + <i>Xho</i> I*	1 µl 1 ml	1-4 µg	H*	-	37 °C
	<i>Eco</i> R I* + <i>Xho</i> I*	1 µl 1 µl	2 µg	H*	-	37 °C
	<i>Hind</i> III* + <i>Sal</i> I*	0,5 µl 0,5 µl	0,5 µg	H*	-	37 °C
	<i>Hind</i> III* + <i>Xho</i> I*	1 µl 1 µl	2 µg	B*	-	37 °C
	I- <i>Ceu</i> I*** + PI- <i>Sce</i> I***	2 µl 0,5 µl	1-2 µg	DDB***	10 x BSA*	37 °C
		6 µl 1,5 µl	10 µg			
	<i>Sal</i> I + <i>Xba</i> I	0,5 µl 0,5 µl	0,5 µg	H*	-	37 °C

\* Roche, Penzberg, Deutschland; \*\* NEB, Frankfurt a. M., Deutschland; \*\*\* Clontech, Heidelberg, Deutschland, \*\*\*\* NBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland, # 10 x Pronase: 0,5% (w/v) Pronase, 10 mM TRIS, pH=7,5

Die Ergebnisse aller in dieser Arbeit durchgeführten Kontrollverdaue sind im Anhang dieser Arbeit abgebildet.

## 4.5.1.2 Restriktionsverdau

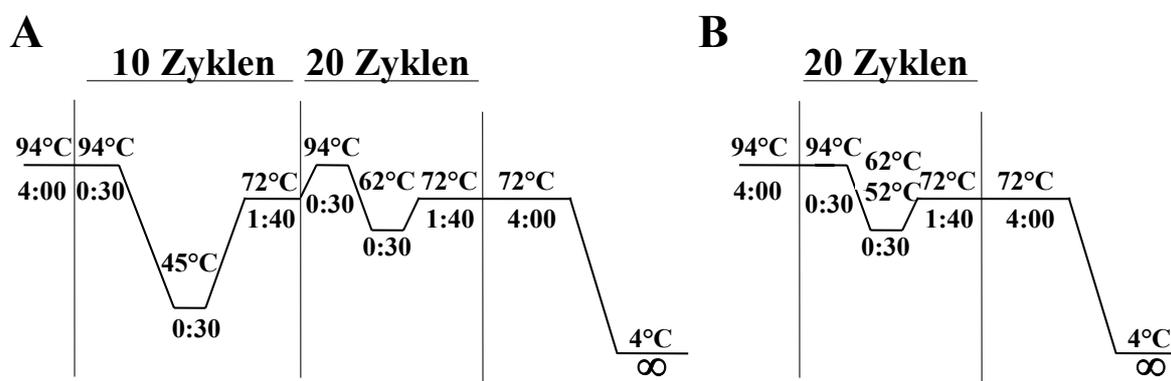
Der Verdau von DNA mittels Restriktionsenzymen erfolgte durch Inkubation der DNA mit dem gewünschten Restriktionsenzym unter den für das Restriktionsenzym optimalen Bedingungen. Dazu gehörten die Zusammensetzung des Puffers in dem die Restriktion stattfand sowie die Inkubationstemperatur. Die genauen Angaben zu den in dieser Arbeit vorgenommenen Restriktionsverdauen sind in Tab. 4.5 zusammengefasst.

## 4.5.1.3 PCR

Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion, *polymerase chain reaction*) wurde mit Standardansätzen (s. unten) durchgeführt. Das für die Amplifikation der cDNAs verwendete PCR-Programm ist in Abb. 4.6, A, das PCR-Programm zur Analyse der adenoviralen DNA ist in Abb. 4.6, B dargestellt. Die verwendeten Primer (siehe Tab. 4.6) wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert und bezogen.

*Standardansatz:*

- 1-10 ng DNA bzw. 1 µl „Plaque“-DNA
- 5 µl 10 pmol/µl forward primer
- 5 µl 10 pmol/µl reverse primer
- 5 µl 2,5 mM (jedes) dNTPs
- 5 µl 10 x *Pfu* Puffer incl. MgCl<sub>2</sub>
- 1 U *Pfu* DNA-Polymerase
- mit nuclease-freiem H<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt



**Abbildung 4.6. PCR-Programme.** A. PCR-Programm zur Amplifizierung von Cystatin C und PAI-2 cDNA. Denaturierung erfolgte bei 94°C, Anbinden der Primer bei den ersten 10 Zyklen bei 45°C, bei den folgenden 20 bei 62°C, Elongation der DNA erfolgte bei 72°C. B. PCR-Programm zur Analyse der adenoviralen DNA. Denaturierung erfolgte bei 94°C, Anbinden der Primer bei 62°C (AdCysC-Analyse) bzw. bei 52°C (AdTIMP-1 und AdPAI-2 Analyse), Elongation der DNA erfolgte bei 72°C.

Tabelle 4.6: In dieser Arbeit verwendete PCR-Primer

Primer	Sequenz	Verwendung
PAI-2 <i>forward</i>	5' ttatt AAG CTT <u>gag gat ctt ttgt gtg gca a</u> `3	Amplifikation der cDNA
PAI-2 <i>reverse</i>	5' ttatt CTC GAG <u>tta ggg tga gca aaa tet gcc</u> `3	
Cystatin C <i>forward</i>	5' ttatt AAG CTT <u>tct tct ccg ggt aaa ccg cc</u> `3	Amplifikation der cDNA Analyse der Ad-DNA
Cystatin C <i>reverse</i>	5' ttatt CTC GAG <u>c taa gcg tcc tgg caa gta ga</u> `3	
P <sub>CMV</sub> <i>forward</i>	5' <u>agt gaa ccg tca gat cg</u> `3	Analyse der AdTIMP-1 DNA
SV40 pA <i>reverse</i>	5' <u>acc tac act gtt gcc tgt gag</u> `3	
BGH pA <i>revers</i>	5' <u>tag aag gca cag tcg agg</u> `3	Analyse der AdPAI-2 DNA
T7 <i>forward</i>	5' <u>taa tac gac tca cta tag gg</u> `3	

Großbuchstaben: Anzufügende Restriktionsschnittstellen, unterstrichen: an cDNA bindende Sequenzen, kursiv: Stopkodons.

#### 4.5.1.4 Klenow-Behandlung

Die vor einer Klenow-Behandlung stattfindende Restriktion der DNA erfolgte in einem Volumen von 20 µl. Nach dem Verdau wurde diesem Ansatz 2 µl 0,5 mM dNTP-Lösung und 1 µl Klenow-Fragment (2 U) zugegeben. Die Reaktion erfolgte bei 37°C für 1 h. Anschließend wurde das Klenow-Fragment für 10 min bei 65°C inaktiviert.

#### 4.5.1.5 Behandlung mit Alkalischer Phosphatase

Zur Dephosphorylierung von DNA wurde CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*) verwendet. Die Dephosphorylierung erfolgte direkt im Anschluss an einen Verdau. Dazu wurde dem Restriktionsansatz 1 µl CIAP (1 U) zugegeben und dieser 30 min bei 37°C inkubiert. Wurde diese Behandlung nach einer Klenow Anwendung durchgeführt, so wurde die DNA vorher PCI gereinigt und anschließend gefällt (siehe 4.5.1.6). Das DNA-Pellet wurde in 10 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und 2 µl 10 x CIAP-Puffer, 7 µl ddH<sub>2</sub>O und 1 µl CIAP zugegeben. Die Inkubation erfolgte analog zu dem Vorgehen der Dephosphorylierung im direkten Anschluß an einen Verdau. Zum Entfernen der Phosphatase wurde eine PCI-Extraktion mit anschließender EtOH-Fällung durchgeführt.

#### 4.5.1.6 PCI-Extraktion/Ethanol-Fällung

Mittels Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1, PCI) wurden DNA-Lösungen von Proteinkontaminationen gereinigt. Zum Entfernen von Salzen und kleinen organischen Molekülen erfolgte im Anschluß eine Ethanol-Fällung. Die DNA in Restriktions-, Ligations-, Dephospho-

rylierungs- und Klenow-Ansätzen wurde zunächst mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt. Diesen wurden 200 µl PCI zugegeben. Die beiden Lösungen wurden durch mehrmaliges invertieren der Reaktionsgefäße gemischt und die Phasen anschließend durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 6100 x g, Centrifuge 5415, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) voneinander getrennt. Die obere, wässrige DNA-enhaltende Phase wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurde 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat, pH 5,0 und 4 Volumen 100 % (v/v) Ethanol (EtOH) zugegeben. Bei der Fällung sehr kleiner DNA Mengen (< 200ng) wurde 1 µl 2% (w/v) Glykogen zugegeben. Die Fällung erfolgte entweder 1 h bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C. Nach der Fällung wurde die DNA abzentrifugiert (6100 x g, 30 min, 4°C, s.o.), 1 x mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen (5 min, 6100 x g, 4 °C, s.o.) und nach dem Entfernen des EtOH 5 min luftgetrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 10 µl ddH<sub>2</sub>O re-suspendiert.

### *4.5.1.7 Separation und Reinigung von DNA Fragmenten mittels Präparativer Gele und QIAquick® Gel Extraction Kit*

Die durch einen Restriktionsverdau gewonnenen zu isolierenden DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.5.1.1). Im Anschluss an die Elektrophorese wurde die zu isolierende DNA-Bande auf einem UV-Tisch mittels eines Skalpell aus geschnitten. Die Reinigung der DNA mittels QIAquick® Gel Extraction Kit (Katalognummer: 75144, Qiagen, Hilden, Deutschland) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Alle für diese Methode notwendigen Reagenzien und Materialien waren Bestandteil des Kits. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O. Da die DNA Konzentration nach dieser Aufreinigung sehr gering war, wurde diese visuell mittels Agarosegelen bestimmt.

### *4.5.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten*

Für die Ligation von geschnittenen Plasmiden und Inserts wurde ein Standardprotokoll verwendet (Sambrook et al., 1989). DNA-Mengen, molare Verhältnisse zwischen Plasmid und Insert und verwendete Menge an T4-Ligase sind für alle Ligationen dieser Arbeit in Tabelle 4.7 zusammengefasst. Ligationen fanden in einem Volumen von 25 µl mit 5 µl 5 x T4-Ligasepuffer, DNA und T4-Ligase über Nacht bei 16°C statt. Bis zur Transformation wurden die Ligationen bei 4°C gelagert.

Tabelle 4.7: Zusammenfassung der Ligationsansätze dieser Arbeit

Ligation	Vektor:Insert	Vektor	Insert	Ligase
pST2/HB/hCysC	1:10	200 ng pST2/HB	52,8 ng hCysC	1 µl T4 DNA-Ligase
pST2/HB/PAI-2	1 :10	200 ng pST2/HB	414 ng PAI-2	1 µl T4 DNA-Ligase
pKA1/TIMP-1	1 :20	6,5 ng pKA1	20 ng TIMP-1	1 µl T4 DNA-Ligase
pKA1/hCysC	1 :20	8,7 ng pKA1	20 ng hCysC	1 µl T4 DNA-Ligase
pShuttle/PAI-2	1 :20	11,6 ng pShuttle	80 ng PAI-2	1 µl T4 DNA-Ligase
pAdX/PAI-2	1:20	81,8 ng pAdX	150 ng PAI-2	2 µl T4 DNA-Ligase

## 4.5.2 Isolierung von Nukleinsäuren

### 4.5.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Zellen

Mit Plaques infizierte, CPE zeigende HEK 293 Zellen wurden für 30 min auf der Sterilbank inkubiert, damit sich alle bereits gelösten Zellen absetzen konnten. Anschließend wurde mit einer 5 ml Stabpipette vorsichtig 4 ml Medium abgenommen, dieses mit 10% Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren. Im Falle einer korrekten Restriktionsanalyse wurde dieses Medium für die Amplifikation des Virus verwendet. Das restliche auf der Schale verbliebene Medium wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt, den Zellen 500 µl Pronase-SDS-Lösung (10 mM TRIS, 10 mM EDTA, 0,5% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) Pronase, pH=7,5) zugegeben und diese 4-18 h im Brutschrank inkubiert. Diese viskose Lösung wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, 500 µl Phenol zugegeben und 2 min vorsichtig geschwenkt. Die Phasen wurden mittels Zentrifugation getrennt (6100 x g, 15 min, 15°C, Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und die obere DNA enthaltende Phase in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Diesem wurde 10% (v/v) 3 M Na-Acetat (pH=4,8) zugesetzt, und das Reaktionsgefäß wurde komplett mit 100% EtOH gefüllt. Das Reaktionsgefäß wurde solange invertiert bis DNA-Fäden zu sehen waren, diese mittels einer Pipettenspitze aus dem Gefäß gefischt und in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml 100% EtOH gegeben. Dieser Vorgang – Fischen der DNA und Waschen in 100% EtOH – wurde vier Mal wiederholt. Es folgte ein Waschschritt mit 70% (v/v) EtOH. Die DNA wurde im Anschluss in 50 µl TE-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH=8,0) aufgenommen und für 20 min bei 45°C im Heizblock gelöst. Bis zur weiteren Untersuchung wurde die DNA bei -20 °C eingefroren.

### 4.5.2.2 *Minipräparation von Plasmid DNA mittels alkalischer Lyse*

Für die Minipräparationen transformierter Bakterien (siehe 4.3.5) wurden die Bakterienkolonien in je 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C bzw. im Fall von Transformationen mit pAdeno-X-Konstrukten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien aus 1,5 ml der Kulturen abzentrifugiert (6100 x g, 10 min, 4°C, Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und das Medium verworfen. Die Bakterien wurden in je 150 µl Resuspensionspuffer (25 mM TRIS, 10 mM EDTA, 50 mM Glukose, pH=8,0) aufgenommen und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden je 150 µl alkalines SDS (0,2 N NaOH, 1% (w/v) SDS) zu den Bakterien gegeben, die Gefäße geschwenkt und 5 min auf Eis inkubiert. Jedem Reaktionsgefäß wurden 250 µl Neutralisierungspuffer (3 M Kaliumacetat, 9,5% (v/v) Essigsäure) zugesetzt, der Inhalt gemischt und die Ansätze 5 min auf Eis inkubiert. Die entstandenen Präzipitate wurden abzentrifugiert (6100 x g, 10 min, 4°C, s.o.) und der Überstand in frische Reaktionsgefäße überführt. Den Überständen wurden je 550 µl PCI zugeben, und die Reaktionsgefäße 1 min invertiert, anschließend wurden die Phasen mittels Zentrifugation (15 min, 6100 x g, 4°C, s.o.) getrennt. Die wässrige, DNA-enhaltende obere Phase wurde in ein frisches Gefäß überführt und DNA wurde mittels Zugabe von 50 µl 3 M Na-Acetat, pH=4,8 und 1 ml 100% EtOH gefällt. Die Gefäße wurden geschwenkt und DNA abzentrifugiert (30 min, 6100 x g, 4°C, s.o.). Die Überstände wurden abgenommen und die Pellets mit je 400 µl 70% (v/v) EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 6100 x g, RT, s.o.). Der Überstand wurde verworfen und die DNA-Pellets 10 min bei RT getrocknet. Die DNA wurde in je 15 µl TE-RNase-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 2% (w/v) RNaseA, pH=8,0) resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

### 4.5.2.3 *CsCl-Präparation von Plasmiden*

Für die CsCl-Präparation von Plasmiden wurden 500-1000 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit dem zu amplifizierenden Bakterien angeimpft und über Nacht im Bakterienschüttler bei 37°C bzw. im Fall von pAdenoX-Plasmiden und pBHGlox,Cre,ΔE1,E3 bei 30°C inkubiert. Die Bakterien wurden in 500 ml Zentrifugenflaschen abzentrifugiert (10 min, 4400 x g, 4°C, J2-HS Zentrifuge, Beckman, Krefeld, Deutschland) und das Medium verworfen. Für das Durchführen einer CsCl-Gradienten-Reinigung erfolgte zunächst die Präparation der Nukleinsäuren mittels *Large Scale Birnboim* (Birnboim und Doly, 1979). Die Bakterien-Pellets wurden in je 40 ml Lysozympuffer (25 mM TRIS, 10 mM EDTA, 50 mM Glukose, 0,5% (w/v) Lyszym, pH=8,0) resuspendiert, 20 min bei RT

inkubiert und anschließend je 80 ml frisch angesetztes alkalisches SDS (0,2 N NaOH, 1% (w/v) SDS) zugegeben. Die Ansätze wurden 10 min auf Eis inkubiert, je 60 ml Neutralisierungspuffer (3 M Kaliumacetat, 9,5% (v/v) Essigsäure) zugegeben, 30 min auf Eis inkubiert und je 10 ml ddH<sub>2</sub>O zugefügt. Anschließend wurden die Präzipitate abzentrifugiert (30 min, 17.000 x g, 4°C, s.o.), die DNA enthaltenden Überstände durch einen Gazefilter in neue 500 ml Zentrifugenflaschen überführt und diesen je 100 ml Isopropanol zugegeben. Nach 30 min Fällung bei RT wurde die DNA abzentrifugiert (30 min, 17000 x g, RT, s.o.). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet 20 min bei RT luftgetrocknet. Die trockenen Pellets wurden in je 8 ml 0,1 x SSC (15 mM Natriumchlorid, 1,5 mM Natriumcitrat) resuspendiert. Je DNA-Präparation wurden 8 g CsCl in 50 ml Schraubdeckelröhrchen eingewogen, das gelöste Pellet zugegeben und das CsCl gelöst. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Röhrchen zentrifugiert (15 min, 3700 x g, RT, Varifuge 3.0R, Heraeus, Düsseldorf, Deutschland), die Überstände abgenommen und in 8,9 ml *Optisealtubes* (Beckman, Krefeld, Deutschland) mit je 200 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (0,05% (w/v) Ethidiumbromid) gegeben. Diese *Optisealtubes* wurden mit 0,1 x SSC, 100% (w/v) CsCl bis zum Rand aufgefüllt, austariert und verschlossen. Zum Aufbau des CsCl-Gradienten zum Trennen der unterschiedlichen Nukleinsäuren (genomische Bakterien DNA, transformierte Plasmid DNA und RNA) wurden die Röhrchen in einem Festwinkelrotor (Ti80-Rotor, Beckman, Krefeld, Deutschland) zentrifugiert (16-20 h, 55.000 U/min; 14°C, Optima TM LE-80K Ultrazentrifuge, Beckman, Krefeld, Deutschland). Nach 16-20 h Zentrifugation wurden die Plasmid DNA-Banden mit Kanülen abgenommen und in 50 ml Röhrchen mit 1,5 ml CsCl-gesättigtem Isopropanol (siehe unten) überführt. Das Entfernen des Ethidiumbromids erfolgte durch wiederholte Waschschriffe mit CsCl-gesättigtem Isopropanol. Im Anschluss wurden zum Fällen der DNA drei Volumen TE-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH=8,0) und acht Volumen 100% Ethanol zugegeben. Die DNA wurde abzentrifugiert (30 min, 3700 x g, RT, Varifuge 3.0R, Heraeus, Hanau, Deutschland), die Pellets zwei Mal mit 5 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen, zentrifugiert (5 min, 3700 x g, RT, Varifuge 3.0R, Heraeus, Hanau, Deutschland) und nach dem Abnehmen des Ethanols 20 min luftgetrocknet. Je nach Pelletgröße wurden diese in 200-500 µl 0,1 x SSC (s.o.) gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20 °C eingefroren oder bei 4°C gelagert.

*CsCl-gesättigtes Isopropanol:*

50 ml 25 mM TRIS, 10 mM EDTA, pH 8,0 wurde solange CsCl zugesetzt bis dieses nicht mehr in Lösung ging und ausfiel. Anschließend wurden 50 ml Isopropanol zugegeben und der Inhalt der Flasche geschüttelt. Nach dem Absetzen des Salzes konnte das Isopropanol verwendet werden.

#### 4.5.2.4 RNA Isolation aus Gewebe

Für die Isolierung von RNA aus Geweben wurde das RNeasy® Midi Kit von Qiagen (Katalognummer: 75144, Hilden, Deutschland) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Alle für diese Methode notwendigen Reagenzien und Materialien waren Bestandteil des Kits. Die isolierte RNA wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 4.5.3 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

#### 4.5.3.1 Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegel

Für die visuelle Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten wurden 1% (v/v) Agarose-Gele verwendet auf welchen neben den zu bestimmenden Fragmenten drei verschiedene Konzentrationen Lambda *Hind*III Marker (NEB, Frankfurt a. M., Deutschland) als Referenz DNA aufgetragen wurden. Es wurden stets 250, 500 und 750 ng des Markers und 1-4  $\mu\text{l}$  der DNA-Fragmente aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde die Leuchtintensität der zu bestimmenden Bande mit denen der Markerbanden verglichen. Der unbekanntes Konzentration wurde eine Markerbande mit gleicher Leuchtintensität zugeordnet und die DNA-Konzentration nach folgender Formel berechnet:

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

$C_X$  = Konzentration des zu Bestimmenden Fragmentes

$G_{\text{Lambda}}$  = Gesamtgröße der Phagen DNA

$G_M$  = Größe der Markerbande mit gleicher Leuchtintensität

$C_M$  = Eingesetzte DNA Menge des Markers

$V$  = eingesetztes Volumen des Fragmentes

#### 4.5.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Bestimmung der optischen Dichte (OD)

Die aus einer CsCl-Präparation (s. 4.5.2.3) stammende DNA wurde zunächst 1:100 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Die verdünnte DNA wurde am Photometer (DU® 640 Spectrophotometer, Beckman, Krefeld, Deutschland) in einer 100  $\mu\text{l}$  Küvette vermessen. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm liefert die DNA-Konzentration, während der Quotient aus der  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  Aufschluß über die Reinheit der DNA gibt, bei DNA sollte dieser 1,8, bei RNA 2,0 betragen. Eine  $\text{OD}_{260}$  von 1 entspricht 50  $\mu\text{g}$  dsDNA/ml bzw. 40  $\mu\text{g}$  RNA/ml (Sambrook et al., 1989).

#### 4.5.4 Quantitative RT-PCR (TaqMan™)

##### 4.5.4.1 Reverse Transkription

Es wurde jeweils 1 µg der Gesamt-mRNA revers transkribiert. Hierfür wurde Reverse Transkriptase (aus MMLV) verwendet. 1 µg mRNA wurde mit nukleasefreiem Wasser auf 9 µl aufgefüllt, 2 µl *random* Hexamere zugegeben und 10 min bei 70°C inkubiert. Anschl. wurden je Ansatz 4 µl 5 x Reverse Transkriptase-Puffer, 2 µl DTT, 1 µl 10 mM (jedes) dNTPs, 1 µl reverse Transkriptase und 1 µl RNase Inhibitor zugegeben und die Ansätze 1 h bei 42°C inkubiert.

##### 4.5.4.2 Durchführung der RT-PCR

Die RT-PCR wurde in 96-well Platten (Optical™ Plates, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Für die 18S Analyse wurde als Standards 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 und 0,03125 ng Gesamt cDNA eingesetzt, für alle anderen Analysen wurden als Standard 20, 10, 5, 2, 1 und 0,5 ng cDNA verwendet. Für die Bestimmung der unbekanntenen Proben wurden für 18S 2 µl 1:100 (v/v) verdünnte cDNA der reversen Transkription, für alle anderen Analysen 10 µl 1:100 (v/v) verdünnte cDNA eingesetzt. Standards und Proben wurden, wenn nötig, mit nukleasefreiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Als Negativ-Kontrolle wurden 10 µl nukleasefreies Wasser verwendet. Ansätze: Entsprechende cDNA mit 900 nM *reverse* Primer, 900 nM *forward* Primer in 1x TaqMan™ PCR Master Mix. Verwendete Primer und Probes sind nachstehend aufgeführt. Die quantitative *real-time* PCR erfolgte mit dem Standard TaqMan™-Programm SDS2.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Auswertung erfolgte mit Software SDS2.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland).

##### Verwendete Primer und Probes:

- 18S: 18S Primer und Probe wurden von Applied Biosystems (Assay ID: Hs99999901\_s1; Reporter: VIC und Quencher: TAMRA) erworben.
- murines MMP-9: Sequenzen für die murinen MMP-9 Primer und Probe wurde von Caroline Pennington (University of East Anglia, Norwich, GB) bezogen. Synthese erfolgte durch Applied Bisystems (Darmstadt, Deutschland):  
Forward Primer: 5'-CGAACTTCGACACTGACAAGAAGT-`3; Reverse Primer: 5'-GC ACGCTGGAATGATCTAAGC-`3; Probe: 5'-FAM-TCTGTCCAGACCAAGGGTACA GCCTGTTC-TAMRA-`3

- humanes PAI-2: Primer und Probe wurden von Applied Biosystems (Assay ID: Hs00234032\_m1, Reporter: VAM, Quencher: non-Fluorescent (nF)) erworben.
- humanes TIMP-1: TIMP-1 Primer und Probe wurde von Applied Biosystems (Assay ID: Hs01092511\_m1, Reporter: VAM, Quencher: nF) erworben.
- Humanes Cystain C: Primer und Probe wurden von Applied Biosystems nach der synthetischen cDNA Sequenz entworfen (Forward Primer: 5'-GCCGCGTCTGGTTGGT-`3; Reverse Primer: 5'-GCACGACGAACACCTTCTTCT-`3; Probe: 5'-VAM-TCCGATGG ACGCTTCT -nF) und synthetisiert.

### 4.6 Biochemische Methoden

#### 4.6.1 **Aufarbeitung von Proteinen aus Gewebe**

##### 4.6.1.1 *Aufarbeitung von Proteinen für Zymographien und ELISA*

Schockgefrorenen Gewebestücke wurden, wie unter 4.1.2 beschrieben, je nach Größe in 300-800 µl Triton X-100-Extraktionspuffer (50 mM TRIS, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 200 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, pH=7,5) aufgearbeitet. Für jedes Gewebestück wurde ein Kryo-Schraubdeckelgefäß mit Silikon-Dichtring (Nerbe plus, Winsen a. d. Luhe, Deutschland) mit Zirkonium-Kugeln (0,1 mm Durchmesser, Biospec Products, Bartlesville, USA) beschickt und 4°C kalter Extraktionspuffer zugegeben. Die gefrorenen Gewebestücke wurden in einem Minibeadbeater<sup>TM</sup> (Biospec Products, Bartlesville, USA) 20 s homogenisiert. Homogenate wurden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (6100 x g, 10 min, 4°C, Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die Überstände wurden auf Eis aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

##### 4.6.1.2 *Aufarbeitung von Leberprotein für HGF-ELISA*

Die schockgefrorenen Leberproben perfundierter Mäuse (siehe 4.1.2) wurden für die Verwendung im HGF-ELISA in Tween-Extraktionspuffer (20 mM TRIS, 2 M NaCl, 0,1% (v/v) Tween-80, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, pH=7,5) aufgeschlossen. Hierfür wurden die Organe zunächst gewogen, in Behandlungsgruppen zusammengefasst und in 4 Volumen (w/v) Tween-Extraktionspuffer mit einem Minibeadbeater<sup>TM</sup> wie unter 4.6.1.1 beschrieben aufgearbeitet. Die Proteinhomogenate wurden nach der Zentrifugation bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren. Die Reinigung dieser Gewebeproben erfolgte mit HiTrap<sup>TM</sup> Heparin-Säulen (Amersham, Braunschweig, Deutschland). Hierfür wurden die Homogenate 1:4 (v/v) mit Proben-Puffer (20 mM TRIS, 0,1% (v/v) Tween-80, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, pH=7,5)

verdünnt. Die Heparin-Säulen wurden mit 10 ml Adsorptions-Puffer (20 mM TRIS, 0,5 M NaCl, 0,1% (v/v) Tween-80, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, pH=7,5) equilibriert. Die gesamten Leber-Homogenate wurden auf die Säulen geladen und die Säulen anschließend mit 10 ml Adsorptions-Puffer gewaschen. Zum Eluieren der HGF-haltigen Proteinfraction wurden 5 ml Tween-Extraktionspuffer auf die Säule gegeben. Die ersten 0,5 ml wurden verworfen und die restlichen (HGF enthaltenden) 4,5 ml aufgefangen. Die HGF-haltigen Proben wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Durchführung des HGF-ELISAs gelagert. Die Säulen wurden mit 5 ml Tween-Extraktionspuffer und 10 ml Adsorptions-Puffer gewaschen und in 20% EtOH bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 4.6.2 Proteinbestimmung mit BCA<sup>TM</sup> von Pierce

Für die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentrationen für ELISA und Zymographien wurde ein Bizinkoniniksäure Reagenz, BCA<sup>TM</sup>, der Firma Pierce (Rockford, IL, USA) verwendet. Folgende BSA (bovines Serum Albumin)-Konzentrationen wurden als Standards verwendet: 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 und 0,0625 mg BSA/ml. Leberproben wurden vor Bestimmung der Proteinkonzentration 1:100 (v/v) und Lungen 1:10 (v/v) mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Die Durchführung der Proteinbestimmung erfolgte in einer 96-well Platte. Zu 10  $\mu\text{l}$  Standard oder verdünnter Probe wurden 200  $\mu\text{l}$  frisch angesetztes Reagenz (1 Teil BCA-Lösung 1 + 49 Teile BCA-Lösung 2) gegeben. Nach 30 min Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurde die Absorption bei 570 nm gemessen (Wallac Victor<sup>2</sup>, Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland) und mittels SigmaPlot Software eine Eichgerade erstellt sowie die Konzentrationen in den Proben berechnet.

### 4.6.3 Zymographie

Bei der zymographischen Analyse (Zymographie) werden Substrate für Proteinasen in SDS-Polyakrylamidgele eingebettet. Diese werden von entsprechenden Proteasen der aufgetragenen Probe abgebaut. Bei reversen Zymographien werden Proteasen entweder zusätzlich im Zymogramm eingebettet oder die Zymogramme in proteasehaltigen Puffern inkubiert. Standardprotokoll: Zunächst wurden die entsprechenden Trenngele (s. Tabelle 4.8) gegossen und nach deren Polymerisation mit Sammelgel (6,1 ml ddH<sub>2</sub>O, 2,5 ml 0,5 M TRIS, pH=6,8, 0,4% SDS, 50  $\mu\text{l}$  10% APS, 10  $\mu\text{l}$  TEMED) überschichtet. Proben wurden 1:4 (v/v) mit nicht-reduzierendem 6 x SDS-Probenpuffer (250 mM TRIS, 40% (v/v) Glycerin, 8% (w/v) SDS, 0,15% (w/v) Bromphenolblau, pH=6,8) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Lauf der Gele

#### 4. Material und Methoden

Tabelle 4.8: Zusammensetzung der Trenngele für die in dieser Arbeit durchgeführten Zymographien

Lösungen	Zymogramm-Art (für je 2 Trenngele)					
	MMP	reverses MMP	uPA	Plasmin	Cystatin	SDS-Gel
40% (w/v) PAA(29:1)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
1,5 M TRIS pH=8,6, 0,4% (w/v) SDS	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-	2,5 ml
1,5 M TRIS, 0,4% SDS, 0,4% Casein	-	-	-	-	2,5 ml	-
100x Gelatin	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	-	-
ddH <sub>2</sub> O	4,9 ml	3,9 ml	4,8 ml	4,9 ml	5,0 ml	4,95 ml
Plasminogen (454 µg/ml)	-	-	83 µl	-	-	-
MMP-2 (5 µg/ml)	-	200 µl	-	-	-	-
10% (w/v) APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

erfolgte in Mini-Protean III Systemen (BioRad, München, Deutschland) oder Midi-Gel Apparaturen (Biometra, Göttingen, Deutschland) in SDS-Elektrophorese-Puffer (50 mM TRIS, 14,4% (w/v) Glycerin, 1% (w/v) SDS). Als Standard wurde je Gel 12 µl Precision Plus Protein Standard (BioRad, München, Deutschland) verwendet, Positiv-Kontrollen sind bei den jeweiligen Methoden vermerkt. Nach dem Lauf wurden die Proteine in den Zymogrammen renaturiert (entsprechende Renaturierungspuffer siehe Tabelle 4.9) und anschließend bei 37°C in entsprechendem Entwicklungspuffer (siehe Tabelle 4.9) inkubiert. Während der Inkubation in Entwicklungspuffer konnten die im Gel bzw. Puffer vorhandenen Proteinasen die entsprechenden Substrate abbauen. Anschließend wurden die Gele für mindestens 1 h mit Coomassie-Färbelösung (0,2% (w/v) Coomassie Brilliant-Blau, 10% (v/v) Eisessig, 30% (v/v) Iso-propanol) gefärbt und anschließend in Entfärber (10% (v/v) Eisessig, 10% (v/v) Isopropanol) aufgenommen und solange entfärbt, bis sich ein guter Kontrast zwischen Banden und Hintergrund ausgebildet hatte. Durch die Denaturierung der Proteine durch SDS dissoziieren TIMPs bzw. PAIs von den inhibierten Proteasen (Snoek-van Beurden und Von den Hoff, 2005; Granelli-Piperno und Reich, 1978), sodass mittels Zymographie die Gesamtmenge an den jeweiligen Proteasen und Inhibitoren nachgewiesen werden kann. Im Falle von Cystatinen ist die Dissoziation abhängig von der Affinität zwischen dem entsprechenden Inhibitor und der inhibierten Protease (Michcaud et al., 1996).

### 4.6.3.1 MMP-Zymographie

Bei der MMP-Zymographie wurde Gelatin als Substrat in das Trenngel eingebettet (siehe Tab. 4.8). Nach dem Lauf wurden Gele im entsprechenden Renaturierungs- (2 x 15 min) und Entwicklungspuffer (19 h, 37°C, siehe Tabelle 4.9) inkubiert. Es wurden Zellüberstände (8 µl), Serum (5 µl 1:50 (v/v) verdünnt), Leberproteine (25 µg/Probe) und Lungenproteine (25 µg/Probe) mittels dieser Zymographie untersucht. Als Positiv-Kontrolle wurden pro Gel 10 µl HT1080-Zellüberstand verwendet. Durch Denaturierung der proMMPs mit anschließender Renaturierung kommt es zur autokatalytischen Aktivierung der proMMPs *in situ* (innerhalb der elektrophoretisch isolierten Bande), wodurch bei der MMP-Zymographie sowohl pro- als auch aktive MMPs nachweisbar sind (Snoek-van Beurden und Van den Hoff, 2005).

### 4.6.3.2 Plasmin-Zymographie

Die Plasmin-Zymographie entspricht der MMP-Zymographie bis auf die Zusammensetzung von Renaturierungs- und Entwicklungspuffer, welchem EDTA zugesetzt wurde (siehe Tabelle 4.9). Die Plasminzymographie wurde für Serumproben (5 µl 1:20 (v/v) verdünnt/Probe) und Zellüberstände (10 µl/Probe) verwendet. Als Positiv-Kontrolle wurde pro Gel 2 µg Plasminogen verwendet.

### 4.6.3.3 Plasminogen-Umsetzungsversuche und densitometrische Auswertung

Diese Methode wurde in dieser Arbeit entwickelt, um die inhibitorische Aktivität von PAI-2 *in vitro* und *in vivo* nachweisen zu können. Für die Plasminogen-Umsetzungsversuche wurden Plasmin-Zymogramme verwendet. Je 10 µl Zellüberständen (AdPAI-2 bzw. Add170-3 transduzierter HT1080 Zellen) wurden 0,9 µg Plasminogen zugefügt und diese bei 37°C für 3 h inkubiert. Für die Untersuchung von Serumproben wurden zu je 5 µl 1:20 (v/v) verdünnten Serum 2 ng uPA und 0,9 µg Plasminogen zugesetzt und diese bei 37°C für 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein Plasmin-Zymogramm aufgetragen und in entsprechenden Puffern inkubiert (s. Tabelle 4.9). Auf den Zymogrammen konnte Plasminogen und Plasmin detektiert werden, deren Banden durch die entsprechenden Kontrollen (s.u.) zugeordnet werden konnten. Die Intensitäten der einzelnen Banden wurden densitometrisch (Kodak 1D Version 3.4.5. Software) bestimmt. Als Positiv-Kontrollen wurde je Gel 2 µg Plasminogen bzw. 2 µg uPA-aktiviertes Plasminogen (3 h mit 2 ng uPA bei 37°C) verwendet.

Tabelle 4.9: Renaturierungs- und Entwicklungspuffer der jeweiligen Zymographien

Zymogramm Typ	Renaturierungspuffer	Entwicklungspuffer	Beschreibung
MMP	50 mM Tris HCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 200 mM NaCl, 2,5% Triton X-100, pH 7,5	50 mM Tris HCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 200 mM NaCl, pH 7,5	Alle MMPs sind in diesem Puffer aktiv
Reverses MMP	50 mM Tris HCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 200 mM NaCl, 2,5% Triton X-100, pH 7,5	50 mM Tris HCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 200 mM NaCl, pH 7,5	Alle MMPs sind in diesem Puffer aktiv
uPA	100 mM TRIS HCl, 100 mM EDTA, 2,5% Triton X-100, pH 7,5	100 mM TRIS HCl, 100 mM EDTA, pH 7,5	Durch EDTA sind MMPs nicht aktiv
Plasmin	100 mM TRIS HCl, 100 mM EDTA, 2,5% Triton X-100, pH 7,5	100 mM TRIS HCl, 100 mM EDTA, pH 7,5	Durch EDTA sind MMPs nicht aktiv
Cystatin	2,5% Triton X-100	340 mM NaCl, 66 mM KCl, 80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 36 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2 mM Cystein, 1 mM EDTA, 0,001% (w/v) Papain, pH=6,0	Durch Papain im Entwicklungspuffer wird Casein im Gel abgebaut

#### 4.6.3.4 Plasminogen-Aktivator-Zymographie

Neben Gelatin ist bei dieser Zymographie dem Trenngel Plasminogen (1,38 µg/Tenngel) zugefügt (siehe Tabelle 4.8). Plasminogen-Aktivatoren welche mit den Proben aufgetragen werden, können nach Lauf und Renaturierung (2 x 15 min, Puffer s. Tab.4.9) während der Inkubation in entsprechendem Entwicklungspuffer (19 h, 37°C, s. Tab. 4.9) das Plasminogen zu Plasmin aktivieren, welches das Gelatin effizient abbaut. Bei dieser Zymographie wurden Zellüberstände (10 µl/Probe), Serum (5 µl 1:20 (v/v) verdünnt/Probe), Leberproteine (7,5 µg/Probe) und Lungenproteine (7,5 µg/Probe) verwendet. Als Positiv-Kontrolle wurden je Gel 0,1 ng uPA verwendet.

#### 4.6.3.5 Cystatin-Zymographie (reverse Papain-Zymographie)

Bei der Cystatin-Zymographie handelt es sich um eine reverse-Papain-Zymographie. Diese Methode wurde nach Krol et al., 2003 b durchgeführt. Bei dieser Zymographie wird Casein als Substrat im Trenngel eingebettet (siehe Tabelle 4.8). Die Proteine wurden nach dem Lauf renaturiert (2 x 30 min, Puffer siehe Tab. 4.9) und anschließend 2 h in papainhaltigem Entwicklungspuffer (siehe Tab. 4.9) bei 37°C inkubiert. Für diese Zymographie wurden nur Zellüberstände (10 µl/Probe) verwendet.

### 4.6.3.6 Reverse MMP-Zymographie

Diese Zymographie entspricht in der Durchführung der MMP-Zymographie, jedoch wurde in das Gel zusätzlich zu dem Gelatin MMP-2 eingebettet (siehe Tabelle 4.8). Diese Zymographie wurde nur mit Zellüberständen (10 µl/Probe) durchgeführt.

### 4.6.3.7 SDS-Kontrollgele für reverse Zymographien

Für die reversen Zymogramme wurden zusätzlich Kontrollgele angefertigt. Hierbei wurden gleiche Proben mit gleichen Mengen auf SDS-Acrylamidgele (ohne Substrate) aufgetragen (siehe Tabelle 4.8). Die Gele wurden wie die jeweiligen reversen Zymogramme behandelt.

## 4.6.4 MMP-9 Aktivitätsassay

Zum Nachweis der MMP-9 Aktivität in Lebern und Lungen AdTIMP-1 bzw. Add170-3 transduzierter Mäuse wurde der MMP-9-Aktivitätsassay von Amersham (Braunschweig, Deutschland) verwendet. Folgende Reagenzien und Materialien sind in diesem System enthalten: Antikörper-beschichtete 96-well Platte, APMA, Waschpuffer, *Assay Buffer*, chromogenes Substrat und rekombinantes MMP-9. In diesem humanen Aktivitätsassay kann sowohl murines proMMP-9 als auch murines MMP-9 an den Antikörper binden (Angabe des Herstellers). Es wurde jeweils die MMP-9-Aktivität von 80 µg Lungen- bzw. 100 µg Leberprotein bestimmt, wobei drei verschiedene Ansätze durchgeführt wurden: a) Bestimmung des Gesamt-MMP-9 Gehaltes der Proben, b) Bestimmung des aktiven MMP-9 Proteins in den Proben und c) Bestimmung der proMMP-9 Aktivierbarkeit im Gesamt-Protein. Für c) wurde das Gesamt-Protein mit APMA (Aminophenylmercuriacetat, Endkonzentration 2 mM) 2 h bei 37°C aktiviert. Aktiviertes Protein für den Ansatz c) und nicht-aktiviertes Protein für die Ansätze a) und b) wurde jeweils in ein *well* einer Antikörper-beschichteten 96-well Platte gegeben (je *well* 80 bzw. 100 µg Protein in 50 µl *assay buffer*), 16 h bei 4°C inkubiert und anschließend vier Mal mit Waschpuffer gewaschen um die nicht Antikörper-gebundenen Proteine, inklusive des MMP-9 gebundenen TIMP-1 (Angabe des Herstellers), zu entfernen. Anschließend wurde für die Ansätze b) und c) pro *well* 50 µl *assay buffer* und für den Ansatz a) 50 µl 2 mM APMA (in *assay buffer*) zugegeben. Die Platte wurde 2 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluß wurde in jedes *well* 50 µl chromogenes Substrat zugegeben. Nach 7 h Inkubation bei 37°C in einer feuchten Kammer wurde die MMP-9 Aktivität durch Messen der Absorption bei 405 nm (Wallac Victor<sup>2</sup>, Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland) bestimmt.

Der *assay* wurde in Duplikaten durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde rekombinantes MMP-9 verwendet.

### 4.6.5 *Enzyme Linked Immuno Sandwich Assays (ELISAs)*

Die Messung der Absorption erfolgte bei allen Systemen mit Wallac Victor<sup>2</sup> (Perkin Elmar, Weiterstadt, Deutschland). Das Erstellen der Eichgeraden und die Auswertung erfolgte jeweils mit der SigmaPlot Software.

#### 4.6.5.1 *TIMP-1 ELISA*

Für die Bestimmung des Gehaltes an humanem TIMP-1 Protein in Zellüberständen und Seren wurde das *tissue inhibitor of metalloproteinases-1* (TIMP-1), human, Biotrak, ELISA system (Amersham, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Alle benötigten Reagenzien und TIMP-1 Antikörper-beschichtete 96-well Platte waren in diesem System enthalten. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Überstände AdTIMP-1 infizierter HT1080 Zellen wurden  $10^{-3}$ - $10^{-5}$ , Kontrollen 1:20 verdünnt. Seren AdTIMP-1 infizierter Mäuse wurden  $5 \times 10^{-5}$ - $5 \times 10^{-6}$ , Seren von Mäusen anderer Behandlungsgruppen 1:20 verdünnt.

#### 4.6.5.2 *Cystatin C ELISA*

Zur Bestimmung des humanen Cystatin C-Proteins in Zellüberständen und Seren wurde der humane Cystatin C ELISA Test der Firma KRKA (Ljubljana, Slovenien) verwendet. Alle benötigten Reagenzien und Cystatin C Antikörper-beschichtete 96-well Platte waren in diesem System enthalten. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Überstände AdCysC infizierter HT1080 Zellen wurden 1:50-1:1000, Kontrollen 1:20 verdünnt. Seren AdCysC transduzierter Mäuse wurden 1:500, Seren von Mäusen anderer Behandlungsgruppen 1:20 verdünnt.

#### 4.6.5.3 *PAI-2 ELISA*

Zur Bestimmung des humanen PAI-2-Proteins in Zellüberständen und Seren wurde das Immunobind® PAI-2 ELISA Kit (American Diagnostica, Greenwich, USA) verwendet. Alle benötigten Reagenzien und PAI-2 Antikörper-beschichtete 96-well Platte waren in diesem System enthalten. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Überstände AdPAI-2

infizierter HT1080 Zellen wurden  $2 \times 10^{-2}$ -  $10^{-3}$ , Kontrollen 1:5 verdünnt. Seren AdPAI-2 infizierter Mäuse wurden  $10^{-4}$ - $10^{-5}$ , Seren von Mäusen anderer Behandlungsgruppen wurden 1:20 verdünnt.

### 4.6.5.4 *Cathepsin B und L ELISA*

Zur Bestimmung des Cathepsin B- bzw. L-Gehaltes in Seren, Lebern und Lungen wurden der humane Cathepsin B ELISA Test und der humane Cathepsin L ELISA Test der Firma KRKA (Ljubljana, Slovenien) verwendet. Diese Systeme detektieren nicht nur die humanen Formen sondern auch die jeweiligen murinen Cathepsine (Angabe des Herstellers). Alle benötigten Reagenzien und Cathepsin Antikörper-beschichtete 96-well Platten waren in den Systemen enthalten. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Seren wurden 1:10, Leberproteine 1:20 und Lungenproteine 1:20 verdünnt.

### 4.6.5.5 *HGF ELISA*

Zur Bestimmung des HGF in Lebern wurde der Ratten HGF-ELISA des *Institute of Immunology Co.* (Tokyo, Japan) verwendet, in welchem alle für diesen Assay notwendigen Reagenzien sowie die Antikörper beschichtete 96-well Platte enthalten waren. Da dieser ELISA die gleiche Reaktivität gegenüber Ratten und murinem HGF zeigt, konnte er für die in dieser Arbeit notwendigen Bestimmungen verwendet werden. Die Durchführung des ELISAs erfolgte nach den Angaben des Herstellers nach Methode A mit unverdünnten HGF-Eluaten aus 4.6.1.2. Die ermittelten HGF-Konzentrationen wurden anhand der für die HGF-Reinigung eingesetzten Lebermengen normiert. Nach Vorgabe des Herstellers wurde der HGF-Gehalt als Ratten HGF dargestellt.

## 4.7 Statistische Methoden

Für die statistische Analyse normalverteilter Daten wurde der Student's T-Test, für nicht normalverteilte Daten der Mann-Whitney-Test verwendet. Für die statistische Analyse zu den Häufigkeitsverteilungen metastasenfrier Lungen pro Gruppe wurde der Mantel-Haenzesl-Test verwendet.

## 5 Ergebnisse

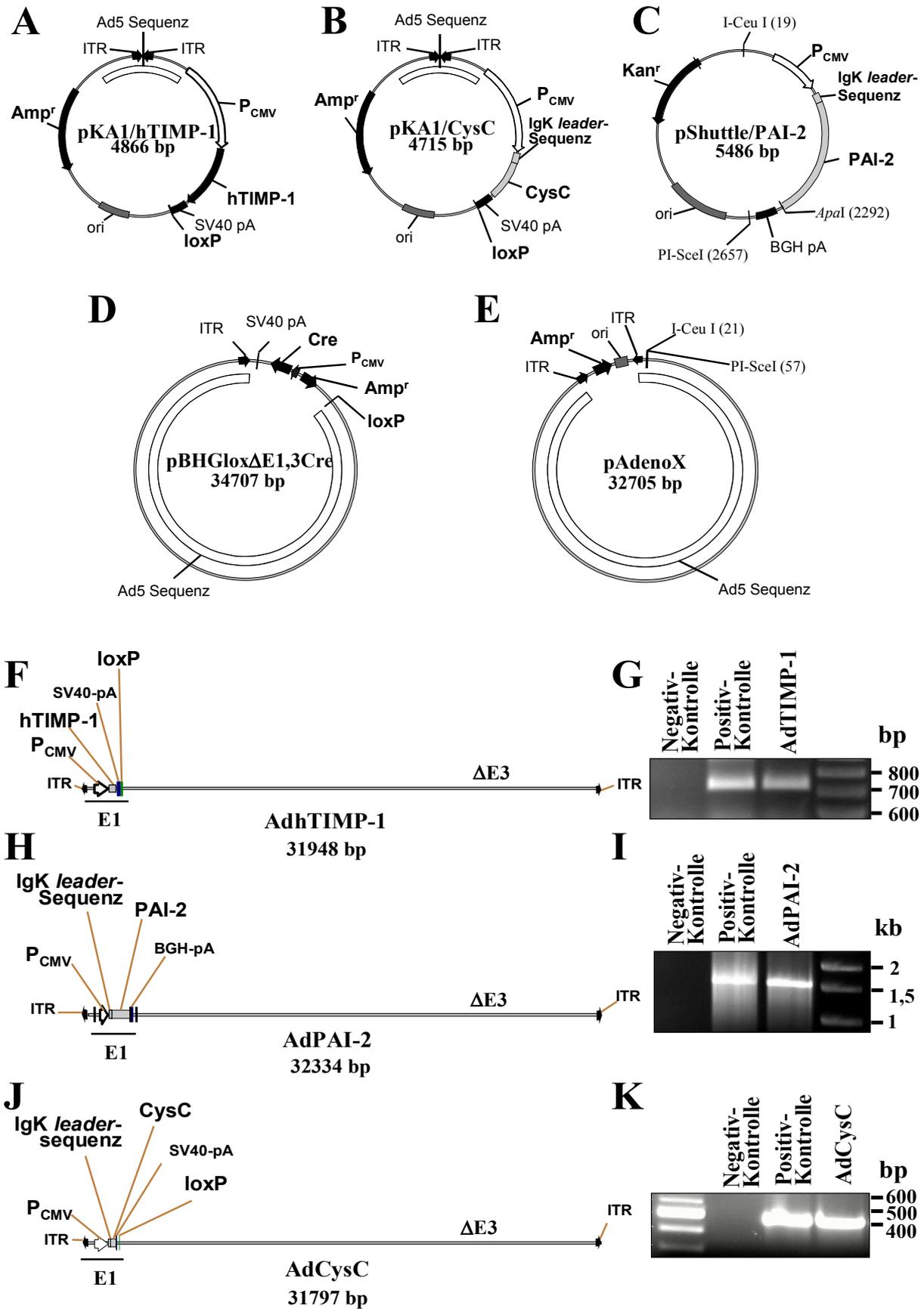
### 5.1 Funktionelle rekombinante Adenoviren welche natürliche Proteaseinhibitoren exprimieren

Um den antimetastatischen Effekt einer prophylaktischen Überexpression natürlicher Proteaseinhibitoren im Wirtsgewebe untersuchen zu können, mussten für den *in vivo* Gentransfer zunächst adenovirale Vektoren hergestellt werden die die entsprechenden cDNAs exprimieren können.

#### 5.1.1 Konstruktion des TIMP-1 kodierenden Adenovirus (AdTIMP-1)

Um ein Adenovirus herzustellen, welches die humane *TIMP-1* cDNA kodiert, wurde die cDNA von *TIMP-1* zunächst in das adenovirale *shuttle* Plasmid pKA1 kloniert. Hierfür wurde das Plasmid pGEMhTIMP-1 mittels *Bam*HI am 5' Ende der *TIMP-1* cDNA geschnitten und anschließend zum Abbau des entstandenen Überhangs mit Klenow-Fragment behandelt. Um die *TIMP-1* cDNA auszuschneiden erfolgte ein zweiter Verdau mit *Hind*III. Dieses Enzym schneidet am 3' Ende der *TIMP-1* cDNA. Das Plasmid pKA1 wurde mit *Sal*I geöffnet, mit Klenow-Fragment behandelt und anschließend ebenfalls mit *Hind*III verdaut. Das TIMP-1 DNA-Fragment und das geschnittene pKA1 wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese und anschließender Gelextraktion isoliert, ligiert und in DH10B transformiert. Die Plasmid DNA wurde aus einzelnen transformierten Bakterien-Kolonien isoliert, die Plasmide durch Restriktionsverdau kontrolliert und ein das Plasmid pKA1/TIMP-1 (Abb. 5.1 A) enthaltender Klon amplifiziert und das Plasmid mittels CsCl-Präparation gereinigt.

**Abbildung 5.1 (siehe nächste Seite). Konstruktion der Adenoviren kodierend für TIMP-1, sezernierungs-optimiertes PAI-2 bzw. sezernierungs-optimiertes Cystatin C.** A-C. Schematische Darstellung der klonierten adenoviralen *shuttle* Plasmide: A. pKA1/TIMP-1, B. pKA1/CystatinC, C. pShuttle/PAI-2. D-E. Schematische Darstellung der für die Generierung der rekombinanten Adenoviren notwendigen adenoviralen *backbone* Plasmide pBHGloxΔE1,E3,Cre (D) bzw. pAdenoX (E). F,H,J. Schematische Darstellung der generierten rekombinanten Adenoviren. F. TIMP-1 kodierend (AdTIMP-1), H. PAI-2 kodierend (AdPAI-2), J. Cystatin C kodierend (AdCysC). G, I, K. Nachweis der entsprechenden Transgene in den generierten Ad mittels PCR. Für die PCR der entsprechenden Ad wurde die aus Plaque-infizierten HEK 293 Zellen isolierte genomische DNA verwendet. Als Positivkontrollen wurden die jeweiligen *shuttle* Plasmide, als Negativkontrollen H<sub>2</sub>O verwendet. G. Nachweis von TIMP-1 in AdTIMP-1, Primer: P<sub>CMV</sub>-*forward* und SV40pA-*revers*, Größe des PCR Produktes 723 bp. I. Nachweis von PAI-2 in AdPAI-2, Primer: T7-*forward* und BGHpA-*revers*, Größe des PCR Produktes: 1606 bp. K. Nachweis von Cystatin C in AdCysC, Primer: Cystatin C-*forward* und Cystatin C-*revers*, Größe des PCR Produktes 464 bp. Amp<sup>r</sup>: Ampicillin Resistenz, ITR: *internal terminal repeats*, P<sub>CMV</sub>: CMV Promotor, CysC: Cystatin C, Kan<sup>r</sup>: Kanamycin Resistenz, pA: polyadenylierungs-Signal.



Die Generierung rekombinanter Adenoviren erfolgte durch Ko-Transfektion des adenoviralen *shuttle*-Plasmides pKA1/TIMP-1 (Abb. 5.1. A) mit dem adenoviralen *backbone*-Plasmid pBHGlox, $\Delta$ E1, $\Delta$ E3,Cre (Abb. 5.1. D) in HEK 293 Zellen. Durch das von pBHGlox, $\Delta$ E1, $\Delta$ E3,Cre in eukaryotischen Zellen exprimierte *Cre*-Protein, welches Endonukleasen- und Ligasenfunktion besitzt, kommt es zu einer gerichteten Rekombination an den Zielstrukturen des *Cre*-Protein, den so genannten loxP (*locus of crossing over*)-Seiten. Diese befindet sich im Plasmid pKA1/TIMP-1 3' des Polyadenylierungs-Signals und des Transgens (Ab. 5.1 A) bzw. in pBHGlox, $\Delta$ E1, $\Delta$ E3,Cre 3' der Ampicillin-Resistenz (Abb. 5.1 D). Durch diese Rekombination entsteht ein bis auf die Gene von E1 und E3 komplettes virales Genom, welches in der E1-Region TIMP-1 unter der Kontrolle eines humanen CMV-Promotors exprimiert. Durch die Expression des E-1-Gens durch die adenoviralen Verpackungszellen HEK 293 wurden von den transfizierten Zellen rekombinante Adenoviren produziert. Nach der durch die Virus-Replikation ausgelösten Lyse der Zellen wurden diese rekombinanten Adenoviren in das Medium freigesetzt. Durch Infektion von HEK 293 Zellen mit diesem virushaltigen Medium wurde das Virus amplifiziert, einzelne infektiöse Partikel mittels Plaque-Reinigung isoliert und diese anschließend mittels Restriktionsanalyse kontrolliert (siehe Anhang II). Zum Nachweis des Transgens wurde zusätzlich eine PCR (Abb. 5.1 G) durchgeführt. Das so generierte und überprüfte Virus AdTIMP-1 (Abb. 5.1 F) wurde für die Verwendung *in vitro* und *in vivo* amplifiziert, gereinigt und der Titer mittels Plaque-Titration bestimmt.

### 5.1.2 Konstruktion des PAI-2 kodierenden Adenovirus (AdPAI-2)

Da PAI-2 zu 80% intrazellulär vorliegt und keine endogene *leader*-Sequenz enthält, musste für den geplanten gentherapeutischen Ansatz, bei dem die Wirtszellen humanes PAI-2 überexprimieren und in den perizellulären Raum abgegeben sollten, eine Sezernierungs-optimierte Form von PAI-2 generiert werden. Hierfür wurde die *PAI-2* cDNA zunächst in das Plasmid pSecTag2/Hygro B 3' der darin enthaltenen Igk-*leader* Sequenz eingefügt. Damit die cDNA im Leseraster zu dem 5' der *leader*-Sequenz liegenden Startkodon kloniert werden konnte, wurden der cDNA mittels PCR Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, 5' *Hind*III und 3' *Xho*I, angehängt. Die so generierte cDNA und pSecTag2/Hygro B wurden mit *Hind*III und *Xho*I geschnitten. Das die *PAI-2* cDNA enthaltende DNA-Fragment und das geöffnete pSec-Tag2/Hygro B-Plasmid wurden mittels Gelelektrophorese und Gelextraktion isoliert, ligiert und in Top10 transformiert. Die Plasmid DNA wurde aus einzelnen transformierten Bakteri-

en-Kolonien isoliert, die Plasmide mittels Restriktionsverdauen kontrolliert und ein das Plasmid pSecTag2/HygroB/PAI-2 (siehe Anhang II) enthaltender Klon amplifiziert und das Plasmid mittels CsCl-Präparation gereinigt.

Im nächsten Schritt wurde die *PAI-2* cDNA zusammen mit der *IgK-leader*-Sequenz in das Plasmid pShuttle kloniert. Hierfür wurde pSecTag2/HygroB/PAI-2 5' des Startkodons mit *NheI* und 3' der *PAI-2* cDNA mit *ApaI* geschnitten. Das Plasmid pShuttle wurde ebenfalls mit *NheI* und *ApaI* geschnitten und anschließend dephosphoryliert. Das die *IgK-leader*-Sequenz und die *PAI-2* cDNA enthaltende DNA-Fragment und das geöffnete pShuttle-Plasmid wurden mittels Gelelektrophorese und Gelextraktion isoliert, ligiert und in DH10B transformiert. Die Plasmid DNA wurde aus einzelnen transformierten Bakterien-Kolonien isoliert, die Plasmide mittels Restriktionsverdauen kontrolliert und ein das Plasmid pShuttle/PAI-2 (Abb. 5.1 C) enthaltender Klon amplifiziert und das Plasmid mittels CsCl-Präparation gereinigt. Durch den Verdau mit *I-CeuI* und *PI-SceI* wurde die *IgK-leader*-Sequenz/*PAI-2* Kasette zusammen mit dem CMV-Promotor und dem BGH Polyadenylierungs-Signal ausgeschnitten und das Plasmid zusätzlich durch *ClaI* verdaut um eine Ligation des Plasmid-*backbones* mit dem geschnittenen pAdenoX zu verhindern. Anschließend wurde die DNA PCI gereinigt und gefällt. Das adenovirale *backbone* Plasmid pAdenoX (Abb. 5.1 E) wurde ebenfalls mit *I-CeuI* und *PI-SceI* geschnitten, dephosphoryliert, PCI gereinigt und gefällt. Im Anschluss erfolgte die Ligation. Da das Plasmid pAdenoX zwischen der *I-CeuI* und *PI-SceI* Schnittstelle eine *SwaI* Schnittstelle enthält, wurde die ligierte DNA PCI gereinigt, gefällt und mit *SwaI* verdaut, um die Transformation der Bakterien mit ungeschnittenem pAdenoX zu verhindern. Die verdaute DNA wurde PCI gereinigt und gefällt und anschließend in StB12<sup>TM</sup>-Bakterien transformiert. Die Plasmid DNA einzelner transformierter Bakterien-Kolonien wurde isoliert, die Plasmide mittels Restriktionsverdauen kontrolliert, ein das Plasmid pAdenoX/PAI-2 (siehe Anhang II) enthaltender Klon amplifiziert und das Plasmid mittels CsCl-Präparation gereinigt.

Zur Herstellung von rekombinanten Adenoviren wurde dieses Plasmid, welches bis auf die Gene von E1 und E3 einem kompletten adenoviralen Genom entsprach und in der E1-Region die *PAI-2* cDNA unter Kontrolle eines humanen CMV-Promotors exprimierte, mit *PacI* linearisiert und in HEK 293 Zellen transfiziert. Durch die Expression von E1 in den adenoviralen Verpackungszellen HEK 293 wurden von diesen adenovirale Partikel produziert, welche nach der durch die Virus-Replikation ausgelösten Lyse der Zellen in das Medium freigesetzt wurden. Durch Infektion von HEK 293 Zellen mit diesem virushaltigen Medium wurde das Virus

amplifiziert, einzelne infektiöse Partikel mittels Plaque-Reinigung isoliert und diese anschließend mittels Restriktionsanalysen kontrolliert (siehe Anhang II). Zum Nachweis des Transgens wurde zusätzlich eine PCR (Abb. 5.1 I) durchgeführt. Das so generierte und überprüfte Virus AdPAI-2 (Abb. 5.1. H) wurde für die Verwendung *in vitro* und *in vivo* amplifiziert, gereinigt und der Titer mittels Plaque-Titration bestimmt.

### 5.1.3 Konstruktion des Cystatin C kodierenden Adenovirus (AdCysC)

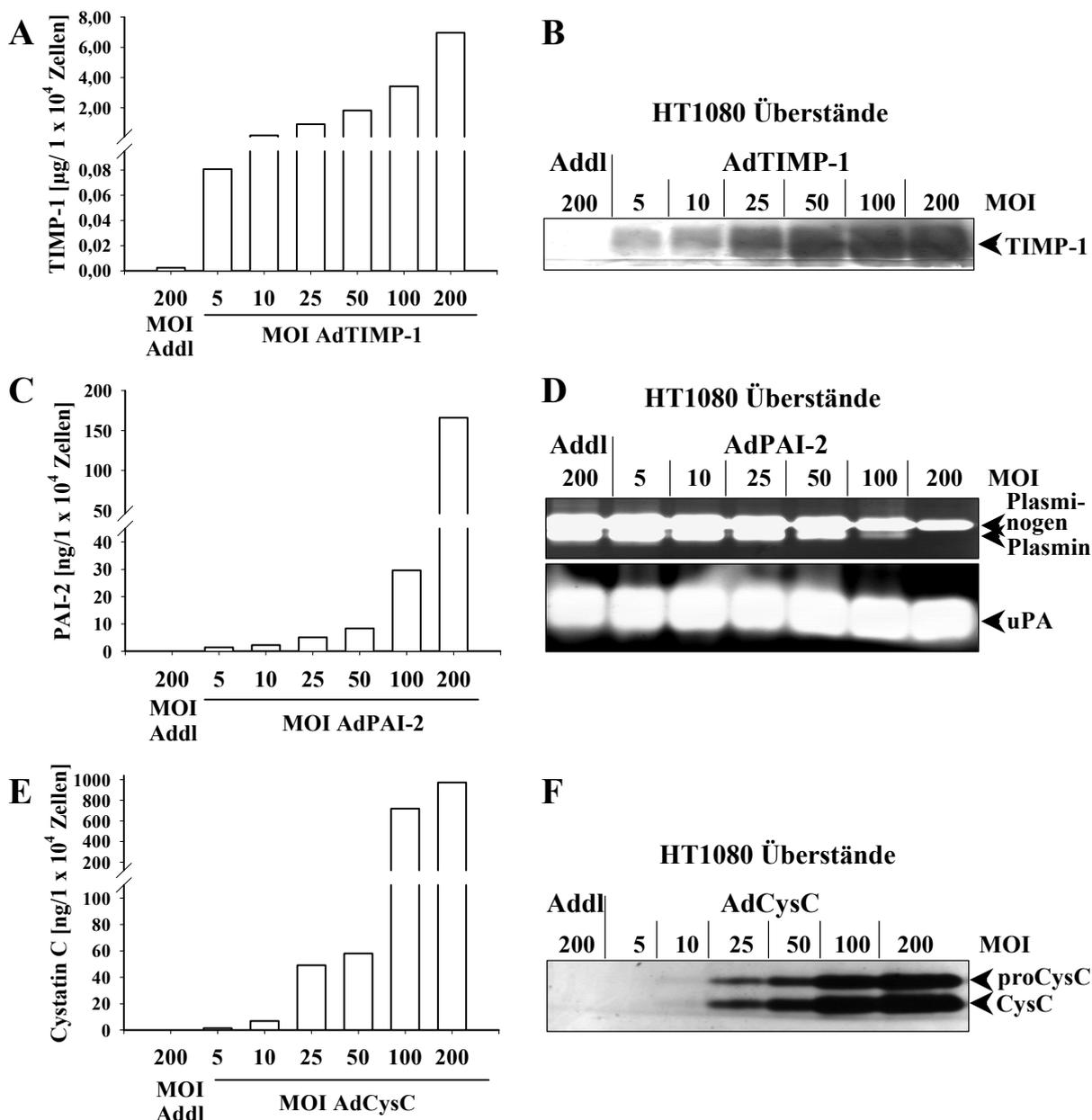
Da Cystatin C die adenovirale Cysteinproteinase hemmt, welche für die Reifung der Adenoviren notwendig ist, sollte die Sezernierung von Cystatin C optimiert werden, um eine Anreicherung von Cystatin C im Zytoplasma zu verhindern. Hierfür wurde die *Cystatin C* cDNA zunächst in das Plasmid pSecTag2/Hygro B 3' der darin enthaltenen Igk-*leader*-Sequenz kloniert. Damit die cDNA im Leseraster zu dem 5' der *leader*-Sequenz liegendem Startkodon eingefügt werden konnte, wurden der cDNA mittels PCR Erkennungssequenzen für Re-striktionsenzyme, 5' für *Hind*III und 3' für *Xho*I, angehängt. Die *Cystatin C* cDNA und pSecTag2/Hygro B wurden dann mit *Hind*III und *Xho*I geschnitten. Das die *Cystatin C* cDNA enthaltende DNA-Fragment und das geöffnete pSecTag2/Hygro B-Plasmid wurden mittels Gelelektrophorese und Gelextraktion isoliert, ligiert und in Top10 transformiert. Die Plasmid DNA einzelner transformierter Bakterien-Kolonien wurde isoliert, die Plasmide mittels Restriktionsverdauen kontrolliert, ein das Plasmid pSecTag2/HygroB/Cystatin C (siehe Anhang II) enthaltender Klon amplifiziert und das Plasmid mittels CsCl-Präparation gereinigt.

Im nächsten Schritt wurde die *Cystatin C* cDNA zusammen mit der Igk-*leader* Sequenz in das adenovirale *shuttle* Plasmid pKA1 kloniert. Hierfür wurde pSecTag2/HygroB/Cystatin C 5' des Startkodons mit *Nhe*I und 3' der *Cystatin C* cDNA mit *Apa*I geschnitten, während pKA1 durch *Hind*III linearisiert wurde. Die entstandenen Überhänge wurden durch Klenow-Fragment abgebaut bzw. aufgefüllt und pKA1 im Anschluss dephosphoryliert. Das *Cystatin C* enthaltende DNA-Fragment und das geschnittene pKA1 wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese und anschließender Gelextraktion gereinigt, ligiert und in DH10B transformiert. Die Plasmid DNA wurde aus einzelnen transformierten Bakterien-Kolonien isoliert, die Plasmide mittels Restriktionsverdauen kontrolliert (siehe Anhang II), ein das Plasmid pKA1/Cystatin C (Abb. 5.1 B) enthaltender Klon amplifiziert und das Plasmid mittels CsCl-Präparation gereinigt.

Zur Generierung rekombinanter Adenoviren wurde dieses adenovirale *shuttle* Plasmid mit dem adenoviralen *backbone* Plasmid pBHGlox, $\Delta$ E1, $\Delta$ E3,Cre (Abb. 5.1. D) in HEK 293 Zellen ko-transfiziert. Durch das von pBHGlox, $\Delta$ E1, $\Delta$ E3,Cre in eukaryotischen Zellen exprimierte Cre-Protein, welches Endonukleasen- und Ligasenfunktion besitzt, kam es zu einer gerichteten Rekombination an den Zielstrukturen des Cre-Proteins, den so genannten loxP-Seiten. Diese befindet sich im Plasmid pKA1/CysC 3' des Polyadenylierungs-Signals und des Transgens (Ab. 5.1 B) bzw. in pBHGlox, $\Delta$ E1, $\Delta$ E3,Cre 3' der Ampicillin-Resistenz (Abb. 5.1 D). Durch diese Rekombination entsteht ein bis auf E1 und E3 komplettes adenovirales Genom, welches in der deletierten E1 Region die *Cystatin C* cDNA unter Kontrolle eines humanen CMV-Promotors exprimiert. Durch die Expression des E1-Gens durch die adenoviralen Verpackungszellen HEK 293 wurden von den transfizierten Zellen rekombinante Adenoviren produziert. Nach der durch die Virus-Replikation ausgelösten Lyse der Zellen wurden diese rekombinanten Adenoviren in das Medium freigesetzt. Durch Infektion von HEK 293 Zellen mit diesem virushaltigen Medium wurde das Virus amplifiziert, einzelne infektiöse Partikel mittels Plaque-Reinigung isoliert und diese anschließend mittels Restriktionsanalyse kontrolliert (siehe Anhang II). Zum Nachweis des Transgens wurde zusätzlich eine PCR (Abb. 5.1 K) durchgeführt. Das so generierte und überprüfte Virus AdPAI-2 (Abb. 5.1. J) wurde für die Verwendung *in vitro* und *in vivo* amplifiziert, gereinigt und der Titer mittels Plaque-Titration bestimmt.

### **5.1.4 Nachweis der inhibitorischen Aktivität der von den rekombinanten Adenoviren kodierten Inhibitoren**

Bevor diese Adenoviren für den *in vivo* Gentransfer eingesetzt werden konnten, musste überprüft werden, ob von diesen sezernierbare und inhibitorisch aktive Transgene kodiert werden. Um dieses zu untersuchen wurden HT1080 Zellen mit verschiedenen *multiplicities of infection* (MOI) *in vitro* infiziert und die durch die transduzierten Zellen in das Kultur-Medium sezernierten Inhibitoren quantifiziert und ihre Aktivität nachgewiesen. Infektionen mit einem  $\beta$ -Galaktosidase kodierenden Adenovirus (Ad $\beta$ -Gal) mit verschiedenen MOIs hatte zuvor gezeigt, dass sich HT1080 Zellen im Vergleich zu anderen Zelllinien sehr gut transduzieren ließen, weshalb sie für diese *in vitro* Untersuchungen verwendet wurden (Abbildung nicht gezeigt).



**Abbildung 5.2. Nachweis von Sezernierung und Aktivität der einzelnen Transgene nach adenoviralem Gentransfer *in vitro*.** HT1080 Zellen wurden mit AdTIMP-1, AdPAI-2 bzw. AdCysC mit MOIs von 5, 10, 25, 50, 100 und 200 infiziert. Als Kontrolle wurden HT1080 Zellen mit Addl70-3 mit einer MOI von 200 infiziert. A, C, E. Quantifizierung der sezernierten Inhibitoren mittels ELISA (humanes TIMP-1 (A), humanes PAI-2 (C) und humanes Cystatin C (E)). Dargestellt wurde jeweils das sezernierte Transgen pro  $1 \times 10^4$  Zellen. B. Nachweis der inhibitorischen Aktivität von TIMP-1. Reverse MMP-Zymographie von Überständen AdTIMP-1 transduzierter HT1080 Zellen. Es wurden je  $10 \mu\text{l}$  pro Infektion aufgetragen. Inhibition des dem Zymogramm zugesetzten MMP-2 durch TIMP-1 ist als dunkle Bande (28 kD) zu erkennen. D. Nachweis der inhibitorischen Aktivität von PAI-2. Inhibition der Plasminogen-Aktivierung durch PAI-2. Für die Plasminogen-Aktivierung wurden zu je  $10 \mu\text{l}$  Überstand  $0,9 \mu\text{g}$  Plasminogen zugefügt, diese 3 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend die Plasminogen-Aktivierung zymographisch untersucht (obere Bande: *singlechain* Plasminogen, untere Bande aktives *twochain* Plasmin; obere Abbildung). Zur Kontrolle wurden je  $10 \mu\text{l}$  der Überstände auf ein uPA-Zymogramm aufgetragen (HMW-uPA: 50 kD, untere Abbildung). F. Nachweis der inhibitorischen Aktivität von Cystatin C. Reverse Papain-Zymographie von Überständen AdCysC transduzierter HT1080 Zellen. Es wurden je  $10 \mu\text{l}$  pro Infektion aufgetragen. Inhibition des dem Entwicklungspuffer zugesetzten Papain durch Cystatin C sind als dunkle Banden zu erkennen (unprozessiertes (pro) Cystatin C: 16,8 kD und Cystatin C: 11 kD).

Mit den rekombinanten Viren AdTIMP-1, AdPAI-2 bzw. AdCysC transduzierte HT1080 Zellen sezernierten mit steigender MOI zunehmende Mengen des entsprechenden Transgens in das Kulturmedium (Abb. 5.2). Dabei sezernierten AdTIMP-1 transduzierte Zellen 30 Mal mehr TIMP-1 (Abb. 5.2. A) als PAI-2 von AdPAI-2 transduzierten HT1080 Zellen sezerniert wurde (Abb. 5.2. C) bzw. sieben Mal so viel TIMP-1 wie Cystatin C von AdCysC transduzierten Zellen (Abb. 5.2. E) sezerniert wurde. Um auszuschließen, dass die verstärkte Expression der jeweiligen Inhibitoren auf die adenovirale Transduktion der Zellen und nicht auf die Expression des Transgens zurückzuführen war, wurden HT1080 Zellen zur Kontrolle mit den gleichen MOIs eines Adenovirus ohne Transgen (Addl70-3) transduziert. Da es durch die Transduktion der Zellen mit Addl70-3 bei keiner verwendeten Dosis zu einer Verstärkung der Expression der Inhibitoren kam (Abbildung nicht gezeigt), wurden in der Abbildung 5.2 nur die endogenen Inhibitor-Konzentrationen in den Zellüberständen der Kontrollen transduziert mit einer MOI von 200 dargestellt (Abb. 5.2, A, C, E; jeweils der linke Balken).

Die inhibitorische Aktivität der einzelnen Transgene konnte mit entsprechenden Methoden bestätigt werden. Mittels reverser MMP-Zymographie konnte die Aktivität von TIMP-1 (Abb. 5.2 B) und durch reverse Papain-Zymographie die Aktivität von Cystatin C (Abb. 5.2. D) nachgewiesen werden. Auf den SDS-Kontrollgelen, auf welchen die entsprechenden Proben in gleicher Menge aufgetragen wurden, konnten in den Größenbereichen der Inhibitoren keine Banden angefärbt werden (Abbildung nicht gezeigt) womit es sich bei den Banden in den reversen Zymogrammen jeweils um den Nachweis der inhibitorischen Aktivität des entsprechenden Transgens handelte. Durch die Inhibition der jeweils zugegebenen Protease, MMP-2 zum Nachweis der TIMP-1 Aktivität bzw. Papain zum Nachweis der Cystatin C Aktivität, wurde der Abbau des dem Gel zugefügten Substrats durch die sezernierten Transgene verhindert und das dort verbliebene Substrat angefärbt.

Die Bestätigung der inhibitorischen Aktivität von PAI-2 erfolgte durch Nachweis einer reduzierten uPA-Aktivität. Da uPA einerseits Plasminogen aktivieren kann und andererseits von PAI-2 inhibiert wird, kann bei konstanter uPA- und Plasminogen-Konzentration die inhibitorische Aktivität von PAI-2 ermittelt werden, indem die Fähigkeit von uPA zur Plasmin-Generierung gemessen wird. Hierfür wurde den Überständen von AdPAI-2 transduzierten HT1080 Zellen Plasminogen zugesetzt, welches von dem von den Zellen sezerniertem aktiven HMW-uPA (hochmolekulares-, *high molecular weight*-uPA) aktiviert wurde. Anschließend wurde die Plasmin-Generierung zymographisch bestimmt. Um die Größen von Plasminogen und Plasmin bestimmen zu können, wurde humanes Plasminogen bzw. durch uPA aktiviertes humanes Plasminogen aufgetragen. Die Plasmin-Generierung in Zellüberständen AdPAI-2

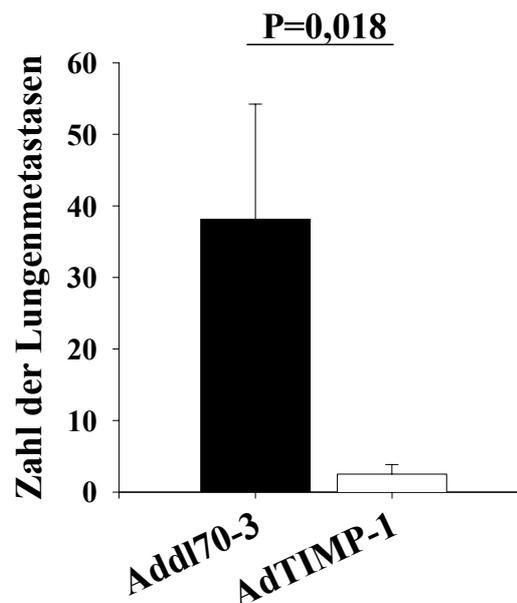
transduzierter HT1080 Zellen wurde mit steigenden PAI-2 Konzentrationen reduziert, bis schließlich bei einer MOI von 200 keine Plasmin Aktivierung mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 5.2 F, oben). Das zur Kontrolle angefertigte uPA-Zymogramm, in welchem durch Dissoziation des uPA/PAI-2-Komplexes das gesamte uPA detektiert werden kann, zeigte, dass in allen Zellüberständen gleiche uPA Mengen enthalten waren. Somit war die beobachtete Reduktion der Plasminogen-Aktivierung auf die Inhibition von uPA durch PAI-2 zurückzuführen und beruhte nicht auf einer veränderten uPA Aktivität (Abb. 5.2 F, unten). Auch veränderte Mengen an endogenem Plasminogen bzw. Plasmin hatten keinen Einfluss auf das erzielte Ergebnis, da in keinem der verwendeten Zellüberständen endogenes Plasminogen oder Plasmin nachweisbar war (Abbildung nicht gezeigt).

Nachdem die Funktionalität der konstruierten rekombinanten Adenoviren *in vitro* nachgewiesen wurde, konnten diese für den *in vivo* Gentransfer der entsprechenden natürlichen Proteaseinhibitoren verwendet werden. Aufgrund früherer Studien in denen eine prophylaktische Überexpression von TIMP-1 die experimentelle Metastasierung eines T-Zell Lymphoms stark inhibierte (Elezkurtaj et al., 2004) und der Tatsache, dass in einer vorangegangenen Arbeit für das verwendete HT1080 Modell ein Anstieg der Gelatinasenexpression durch die Metastastasierung gezeigt werden konnte (Arlt, 2004), sollte zunächst die anti-metastatische Wirksamkeit des adenoviralen Gentransfers von TIMP-1 *in vivo* ausgetestet werden.

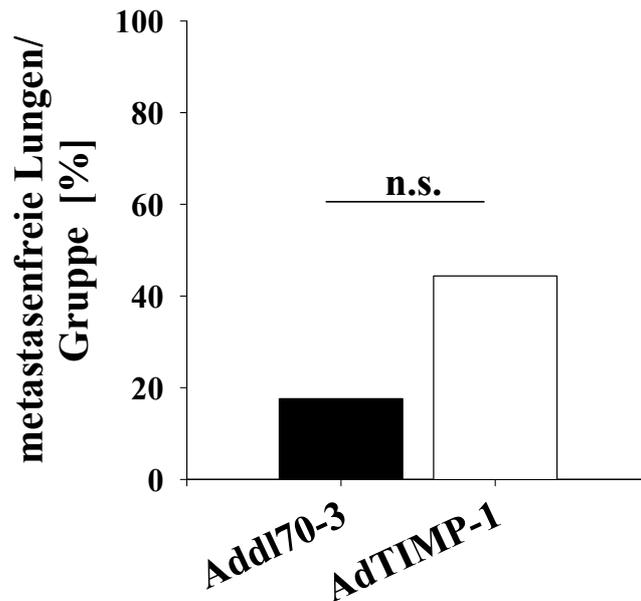
### **5.2 Signifikante Hemmung der experimentellen HT1080-Lungenmetastasierung durch prophylaktische Überexpression von TIMP-1**

Um zu untersuchen, ob sich der in früheren Studien durch prophylaktische Überexpression von TIMP-1 erzielte Therapieerfolg in einem experimentellen Metastasierungsmodell mit murinen T-Zell Lymphom-Zellen (Elezkurtaj et al., 2004) auf ein Modell mit Zellen eines soliden Tumors übertragen lässt, sollte in der vorliegenden Arbeit die potentielle anti-metastatische Wirksamkeit von TIMP-1 in einem experimentellen Metastasierungsmodell humaner Fibrosarkomzellen bestimmt werden. Hierfür wurden zunächst, um die Detektion von Metastasen zu erleichtern, humane Fibrosarkomzellen (HT1080) mit *lacZ* markiert. Dazu wurde diese Zelllinie mit einem *lacZ* kodierenden eukaryotischen Expressionsplasmid (pLZ12) transfiziert und ein *lacZ* transfizierter Klon (HT1080pLZ12/K15-1) für die experimentelle Metastasierung verwendet.

Um eine möglichst hohe TIMP-1 Expression im Wirtsgewebe zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation zu erreichen, wurden CD1 *nu/nu* Mäuse drei Tage vor der Tumorzellinokulation mit AdTIMP-1, bzw. zur Kontrolle mit einem Adenovirus ohne Transgen (Add170-3), transduziert. Die dadurch erzielte prophylaktische Überexpression führte zu einer Reduktion der Anzahl experimenteller HT1080pLZ12/K15-1 Lungenmetastasen um 93% im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 5.3; Fotografien repräsentativer X-Gal gefärbter Lungen s. Abb. 5.26). Diese anti-metastatische Potenz spiegelte sich sogar in einem Anstieg der metastasenfrien Lungen in der AdTIMP-1 behandelten Gruppe im Vergleich zu der Add170-3 transduzierten Kontrolle wider. Der Anteil der metastasenfrien Tiere hatte sich verdoppelt, erreichte jedoch nicht statistische Signifikanz (Abb. 5.4).



**Abbildung 5.3. Prophylaktische TIMP-1 Überexpression inhibierte die experimentelle Lungenmetastasierung durch HT1080 Zellen signifikant.** Drei Tage vor der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  *lacZ*-markierter HT1080pLZ12/K15-1 Zellen) wurden CD1 *nu/nu* Mäuse mit AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Add170-3) bzw. Add170-3 ( $6 \times 10^9$  pfu) i.v. behandelt. 21 Tage nach der Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert, die Lungen entnommen und X-Gal gefärbt. Die Metastasen auf der gesamten Oberfläche der linken Lunge wurden gezählt. Mittelwerte (AdTIMP-1  $2,5 \pm 1,4$ ,  $n=10$ ; Add170-3  $38,1 \pm 16,1$ ,  $n=16$ ), Standardfehler und Ergebnis der statistischen Analyse sind dargestellt.

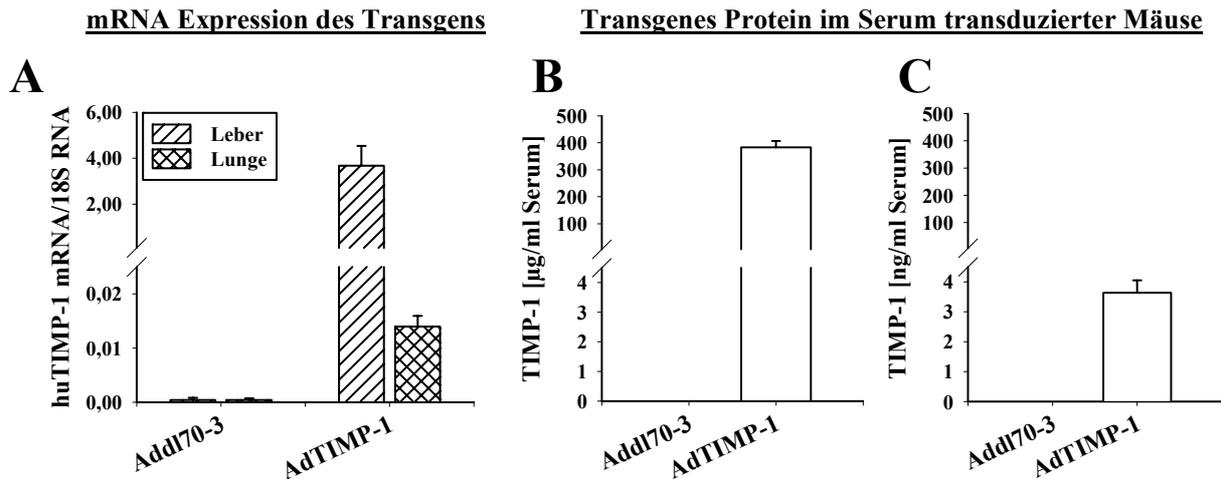


**Abbildung 5.4. Prophylaktische TIMP-1 Überexpression erhöhte die Anzahl metastasenfreier Lungen.** Drei Tage vor der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  *lacZ*-markierter HT1080pLZ12/K15-1 Zellen) wurden CD1 *nu/nu* Mäuse mit AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Add170-3) bzw. Add170-3 ( $6 \times 10^9$  pfu) i.v. behandelt. 21 Tage nach der Tumorzellinokulation wurden die Tiere ge-opfert, die Lungen entnommen und X-Gal gefärbt. Prozentualer Anteil metastasenfreier Lungen pro Gruppe (Add170-3: 18,8%, n=16; AdTIMP-1: 40,0%, n=10) und Ergebnis der statistischen Analyse sind dargestellt. n.s. = nicht signifikant.

### **5.3 Transduktion von Leber und Lunge und hohe TIMP-1 Konzentrationen im Serum durch adenoviralen Gentransfer von TIMP-1**

Um den durch adenoviralen Gentransfer von TIMP-1 erzielten Therapieerfolg auf die prophylaktische Überexpression von TIMP-1 zurückführen zu können, musste die Überexpression von TIMP-1 im Wirt nachgewiesen werden.

Zum Nachweis der Transduktion der Tiere durch AdTIMP-1 bzw. der Überexpression des Transgens, sollte die Expression des humanen Transgens in Lungen und Lebern auf RNA Ebene nachgewiesen werden bzw. das durch den transduzierten Wirt sezernierte TIMP-1 Protein im Serum quantifiziert werden. Mittels quantitativer RT-PCR (TaqMan™) wurde der relative Anteil humaner TIMP-1 mRNA in Lebern und Lungen transduzierter Mäuse drei Tage nach dem Gentransfer bestimmt. Dabei zeigte sich, dass neben der erwarteten Expression von TIMP-1 in der Leber auch in der Lunge humane TIMP-1 mRNA nachgewiesen werden konnte. Dabei war die TIMP-1 Expression in der Lunge jedoch um 99% geringer als in der Leber (Abb. 5.5. A). Zum gleichen Zeitpunkt, d.h. drei Tage nach dem Gentransfer, konnten

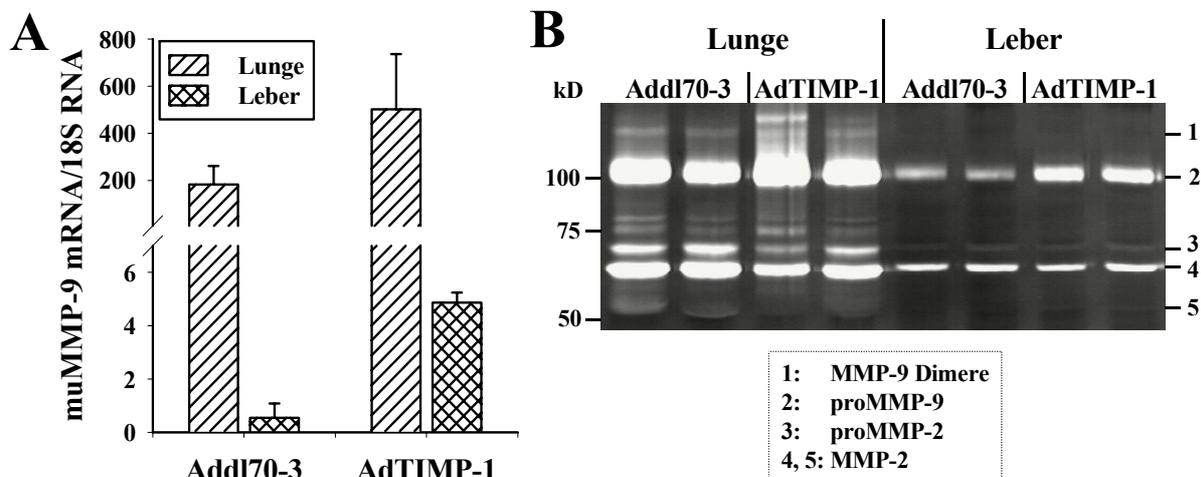


**Abbildung 5.5. Nachweis der TIMP-1 *in vivo* Transgenexpression.** Drei Tage vor der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  *lacZ*-markierter HT1080pLZ12/K15-1 Zellen) wurden CD1 *nu/nu* Mäuse mit AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Add170-3/Maus) bzw. Add170-3 ( $6 \times 10^9$  pfu/Maus) i.v. behandelt. Drei Mäuse pro Gruppe wurden zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation geopfert und Lungen und Lebern entnommen, die restlichen Mäuse wurden 21 Tage nach der Tumorzellinokulation euthanisiert und Serum entnommen. A. Gesamt-RNA aus Lebern bzw. Lungen von je drei Add170-3 bzw. TIMP-1 transduzierten Mäusen (drei Tage nach Gentransfer) wurde isoliert und die TIMP-1 mRNA Expression mittels TaqMan<sup>TM</sup> bestimmt. Als Kontrolle wurde 18S RNA quantifiziert und Mittelwerte und Standardfehler des relativen Anteils humaner (hu) TIMP-1 mRNA zu 18S RNA dargestellt (Add170-3: Leber  $0,0004 \pm 0,0006$ , Lunge  $0,0004 \pm 0,0005$ ; AdTIMP-1: Leber  $3,68 \pm 0,86$ , Lunge  $0,014 \pm 0,002$ ). B-C. Bestimmung des humanen TIMP-1 Protein Gehaltes im Serum AdTIMP-1 bzw. Add170-3 transduzierter Mäuse. B. TIMP-1 Gehalt im Serum von je drei Mäusen, geopfert zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation, d.h. drei Tage nach dem Gentransfer (Add170-3:  $0,00 \pm 0,00 \mu\text{g/ml}$ ; AdTIMP-1:  $383,10 \pm 23,91 \mu\text{g/ml}$ ). C. TIMP-1 Protein im Serum transduzierter Mäuse (Add170-3:  $0,00 \pm 0,00 \mu\text{g/ml}$ , n=5; AdTIMP-1:  $3,64 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$ , n=10) 21 Tage nach Tumorzellinokulation, 24 Tage nach dem Gentransfer.

extrem hohe Konzentrationen an humanem TIMP-1 Protein im Serum, im Durchschnitt  $383 \mu\text{g}$  pro ml Serum, nachgewiesen werden (Abb. 5.5. B). Selbst zu Tierversuchsende, d.h. 24 Tage nach dem Gentransfer und 21 Tage nach der Tumorzellinokulation, konnten trotz der transienten Expression des Transgens bei jeder AdTIMP-1 transduzierten Maus noch beachtliche Mengen an systemischem humanem TIMP-1, im Durchschnitt  $3,6 \mu\text{g}$  pro ml Serum, gemessen werden (Abb. 5.5 C). Um zu untersuchen, welchen Einfluss eine so starke Überexpression eines Proteinaseinhibitors auf die Expression der von ihm inhibierten Proteinasen nimmt, wurde als nächstes exemplarisch die Expression von MMP-9 untersucht.

#### 5.4 Verstärkte Expression von MMP-9 durch Überexpression von TIMP-1

Um den Einfluss der TIMP-1 Überexpression auf die Expression von MMPs zu untersuchen, wurde exemplarisch die Expression von MMP-9 untersucht. Hierfür wurde drei Tage nach dem Gentransfer die Gesamt-RNA aus Lungen und Lebern AdTIMP-1 bzw. zur Kontrolle aus Addl70-3 (Kontrollvirus ohne Transgen) transduzierten Mäusen isoliert. Die Expression von murinem MMP-9 wurde zunächst auf RNA Ebene mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die Expression von MMP-9 durch die Überexpression von TIMP-1 in der Lunge um das 2,7-fache (Abb. 5.6 A) und in der Leber, mit einer um 99% stärkeren Expression von TIMP-1 (Abb. 5.5 A), sogar um das 9-fache anstieg (Abb. 5.6. A). Um zu untersuchen, ob sich diese gesteigerte mRNA Expression von MMP-9 auch auf Proteinebene widerspiegelte, wurde von den entsprechenden Tieren Gesamt-Protein aus Lebern und Lungen isoliert und diese mittels MMP-Zymographie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass auch auf Proteinebene die Expression von MMP-9 durch TIMP-1 Überexpression verstärkt war. Sowohl in Lebern als auch Lungen war deutlich mehr proMMP-9 in



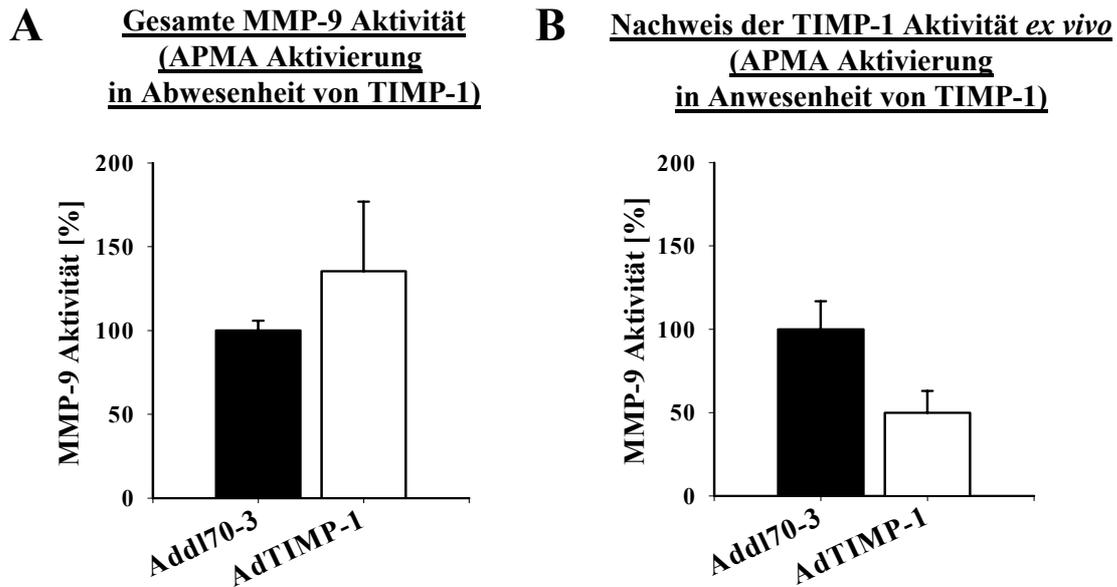
**Abbildung 5.6. Verstärkte MMP-9 Expression in Leber und Lunge durch Überexpression von TIMP-1.** Je drei Mäusen wurde AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus) bzw. Addl70-3 ( $6 \times 10^9$  pfu/Maus) in die Schwanzvene injiziert. Nach drei Tagen wurden die Mäuse geopfert und Lungen und Lebern entnommen. A. Quantitative MMP-9 RT-PCR (TaqMan<sup>TM</sup>). Gesamt-RNA wurde aus Lebern und Lungen aufgearbeitet und mittels quantitativer RT-PCR die Expression muriner (mu) MMP-9 mRNA bestimmt. Als Kontrolle wurde 18S RNA quantifiziert und Mittelwerte und Standardfehler des relativen Anteils muMMP-9 mRNA zu 18S RNA von je drei Mäusen pro Gruppe dargestellt (Addl70-3: Lunge  $183,04 \pm 78,63$ , Leber  $0,54 \pm 0,54$ ; AdTIMP-1: Lunge  $502,27 \pm 233,58$ , Leber  $4,88 \pm 0,38$ ). B. Zymographische Untersuchung der Expression von Gelatinasen. Protein wurde aus Lebern und Lungen aufgearbeitet, Gesamtproteinmenge bestimmt und je 25  $\mu$ g Leber- bzw. Lungenprotein auf MMP-Zymogramme aufgetragen. Dargestellt sind Zymogramme mit je zwei repräsentativen Tieren pro Gruppe. Links: Lunge, rechts: Leber.

Gewebeproben AdTIMP-1 transduzierter Mäuse (Abb. 5.6. B, Spuren 2 und 3 bzw. 7 und 8 von links) zu erkennen als in solchen von Addl70-3 transduzierten Tieren (Abb. 5.6 B, Spuren 1 und 2 bzw. 5 und 6 von links). In keiner Behandlungsgruppe konnte in Leber bzw. Lunge zymographisch aktives MMP-9 detektiert werden, welches aufgrund seiner geringeren Größe als Bande unterhalb des proMMP-9 sichtbar wäre (Abb. 5.6).

Um zu ermitteln, ob die durch prophylaktische Überexpression von TIMP-1 erzielten TIMP-1 Konzentrationen im Zielorgan der Metastasierung ausreichend waren, die erhöhten MMP-9 Konzentrationen zu kompensieren, wurde die MMP-9 Aktivität in den Lungen AdTIMP-1 bzw. Addl70-3 transduzierter Tiere ermittelt.

### **5.5 TIMP-1 Überexpression kompensiert verstärkte MMP-9 Expression**

Um die Auswirkungen der durch die TIMP-1 Überexpression ausgelösten Verstärkung der MMP-9 Expression beurteilen und den durch TIMP-1 Überexpression erzielten anti-metastatischen Effekt erklären zu können, sollte die inhibitorische Kapazität des überexprimierten TIMP-1 in der Lunge evaluiert werden. Hierfür wurde Protein aus Lungen AdTIMP-1 bzw. Addl70-3 transduzierter Mäuse isoliert und in einem MMP-9 Aktivitätsassay getestet. Dieser Aktivitätsassay beruht im Wesentlichen auf der Bindung von MMP-9 an einen MMP-9-spezifischen Antikörper. Da sowohl aktives MMP-9 als auch proMMP-9 an diesen Antikörper binden kann, ist es mit dieser Methode möglich sowohl das endogene aktive MMP-9 einer Gewebeprobe als auch den Gesamt-MMP-9 Gehalt, d.h. die Summe aus aktivem MMP-9 und proMMP-9, zu bestimmen. Um das aktive MMP-9 zu bestimmen wird nach dem Entfernen sämtlicher anderen Proteine des Homogenates, inklusive des an proMMP-9 gebundenen TIMP-1, ein chromogenes Substrat zugegeben. Der Umsatz dieses chromogenen Substrates ist das Maß für die MMP-9 Aktivität. Um den Gesamt-MMP-9 Gehalt zu bestimmen erfolgt vor der Zugabe des Substrates die Aktivierung des antikörpergebundenen proMMP-9. Durch eine leichte Abwandlung dieser Methode kann dieser Aktivitätsassay zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität des überexprimierten TIMP-1 Proteins genutzt werden. Hierbei erfolgt die Aktivierung des proMMP-9 im Lungenhomogenat, d.h. dass TIMP-1 Moleküle noch an proMMP-9 gebunden vorliegen. Eine reduzierte Aktivierung von proMMP-9 in diesem Aktivierungsansatz verglichen mit der Aktivierbarkeit von antikörpergebundenem proMMP-9 repräsentiert die inhibitorische Aktivität des überexprimierten TIMP-1.



**Abbildung 5.7. Überexpression von TIMP-1 führt zur Inhibition der proMMP-9 Aktivierung.** Aus Lungen von je drei AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.) bzw. Addl70-3 ( $6 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.) transduzierten Mäusen wurde drei Tage nach der Transduktion Gesamt-Protein isoliert. Die MMP-9 Aktivität in je 80  $\mu$ g Protein pro Lunge und Ansatz wurde in einem MMP-9 Aktivitätsassay bestimmt. Die in Lungen aus Addl70-3 transduzierten Mäusen gemessene Gesamt-MMP-9 Aktivität wurde als 100% gesetzt. Die Mittelwerte und Standardfehler der relativen MMP-9 Aktivität pro Gruppe wurden dargestellt. A. Nachweis des Gesamt-Gehaltes an MMP-9 in den eingesetzten Lungen durch APMA Aktivierung des antikörpergebundenen proMMP-9 (Addl70-3:  $100,00 \pm 5,75\%$ ; AdTIMP-1:  $135,33 \pm 41,53\%$ ). B. Nachweis der Inhibition der proMMP-9 Aktivierung durch überexprimiertes TIMP-1. Gesamt-Lungenprotein wurde vor Verwendung im Aktivitätsassay mit APMA behandelt. Anschließend wurde das aktive MMP-9 im Aktivitäts-assay bestimmt (Addl70-3:  $100,00 \pm 16,86\%$ ; AdTIMP-1:  $49,84 \pm 13,17\%$ ).

Zunächst wurde die Aktivität des in der Lunge endogen vorkommenden aktiven MMP-9 ermittelt. Es zeigte sich, dass trotz des Anstieges an proMMP-9 in den TIMP-1 behandelten Tieren ebenso wie in der Addl70-3 transduzierten Kontrolle kein aktives MMP-9 detektierbar war (Abbildung nicht gezeigt). Dieses bestätigt das mittels MMP-Zymographie ermittelte Ergebnis. In den MMP-Zymogrammen konnte nur die pro-Form, aber kein aktives MMP-9 detektiert werden (Abb. 5.6 B). Durch Aktivierung des proMMP-9 in Abwesenheit des überexprimierten TIMP-1 Proteins konnte auch die durch die Überexpression von TIMP-1 ausgelöste Zunahme an proMMP-9 Protein bestätigt werden (Abb.5.7 A). Da TIMP-1 an proMMP-9 binden und dessen Aktivierung inhibieren kann, sollte festgestellt werden, ob die Überexpression von TIMP-1 ausreichend war die Aktivierung von proMMP-9 zu inhibieren. Hierfür erfolgte die Aktivierung des proMMP-9 in Anwesenheit des überexprimierten TIMP-1 Proteins. Dieser Ansatz zeigte, dass trotz des deutlich höheren proMMP-9 Gehaltes

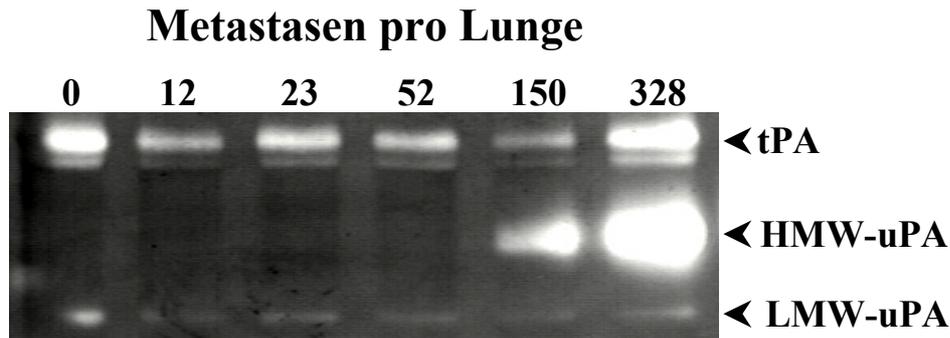
in den Lungen TIMP-1 transduzierter Mäuse von diesem nur 36% aktiviert werden konnten, welches 50% des aktivierbaren proMMP-9 der Addl70-3 transduzierten Kontrolle entsprach (Abb. 5.7 B). In den TIMP-1 transduzierten Lungen war demnach 64% des proMMP-9 an TIMP-1 gebunden. In TIMP-1 transduzierten Lebern, wo ein um den Faktor drei stärkerer Anstieg der MMP-9 Expression im Vergleich zu den Lungen gefunden wurde, konnte ebenfalls kein endogen aktives MMP-9 detektiert werden, während in Addl70-3 transduzierten Lebern endogen aktives MMP-9 nachweisbar war (Abbildung nicht gezeigt).

Mit diesem Nachweis der TIMP-1 Transgenaktivität *ex vivo* konnte gezeigt werden, dass trotz der durch die TIMP-1 Überexpression ausgelösten erhöhten Expression von MMP-9 ausreichend TIMP-1 in Lungen und Lebern vorhanden war MMPs zu inhibieren. Der durch adenoviralen Gentransfer von TIMP-1 erzielte Therapieerfolg konnte demnach auf die anti-proteolytische Aktivität von TIMP-1 zurückgeführt werden. Da proMMPs unter anderem von Plasmin aktiviert werden, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob Plasminogen-Aktivatoren im verwendeten Metastasierungsmodell eine Rolle spielen.

### **5.6 Korrelation der Urokinase (uPA) Expression und der Anzahl an HT1080 Metastasen in der Lunge**

Um festzustellen, ob andere Proteaseklassen ebenfalls ein Ziel für eine anti-proteolytische Therapie der Metastasierung darstellen könnten, wurden zunächst die Plasminogen-Aktivatoren (PAs) untersucht. Da PAs zur Generierung von aktivem Plasmin führen, welches eine Reihe von proMMPs aktiviert, sind PAs indirekt an der Aktivierung einiger MMPs beteiligt. Daher sollte überprüft werden, ob im verwendeten Metastasierungsmodell PAs im Zielorgan der Metastasierung exprimiert werden bzw. ob ihre Expression von der HT1080 Metastasierung beeinflusst wird.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung, erfolgte die Isolation von Gesamt-Protein aus metastasenträgenden Lungen von Mäusen welche drei Tage vor der Inokulation von HT1080pLZ12/K15-1 Zellen mit dem Kontrollvirus Addl70-3 transduziert wurden. Um die Proben hinsichtlich ihrer Metastasenzahl zymographisch untersuchen zu können wurden nur die jeweils rechten Lungenflügel aufgearbeitet und die jeweils linken Lungenflügel X-Gal gefärbt und die Anzahl der Metastasen auf ihnen bestimmt. Mittels einer PA-Zymographie konnte gezeigt werden, dass mit steigender Zahl an Lungenmetastasen der Gehalt an HMW-uPA (hochmolekulares-, *high molecular weight*-uPA) in den Lungen zunahm, während der

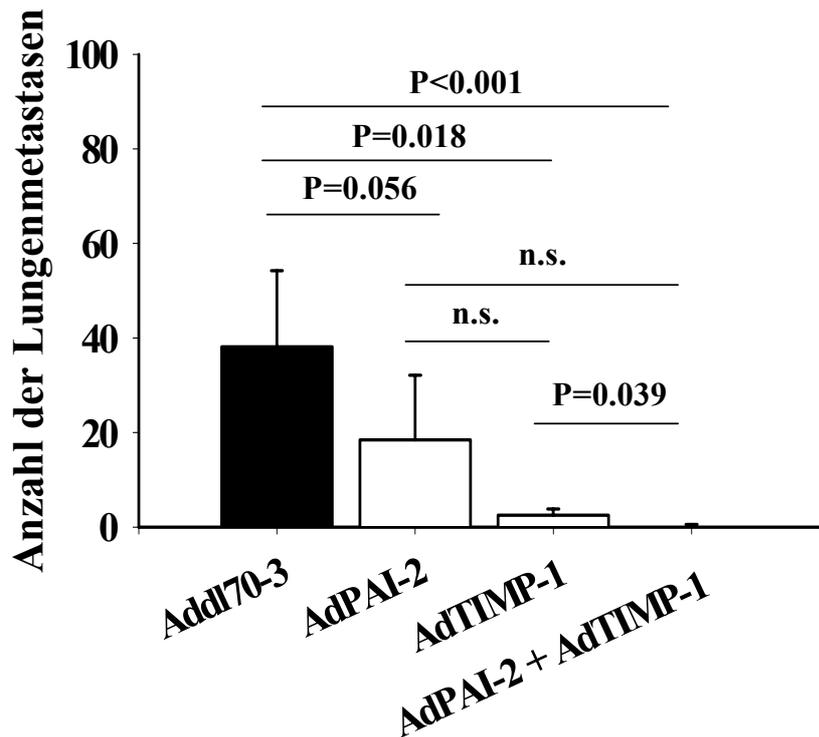


**Abbildung 5.8. Anzahl der HT1080 Lungenmetastasen korrelierte mit uPA Gehalt in der Lunge.** CD1 *nu/nu* Mäuse wurden drei Tage vor der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  *lacZ*-markierter HT1080pLZ12/K15-1 Zellen/Maus i.v.) mit Addl70-3 transduziert ( $6 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.). 21 Tage nach der Tumorzellinokulation wurden die Lungen entnommen und der linke Lungenflügel X-Gal gefärbt um die Metastasen zu quantifizieren, während aus dem rechten Lungenflügel Protein isoliert wurde. Gesamt-Protein wurde quantifiziert und Lungenproteine ( $7,5 \mu\text{g}/\text{Probe}$ ) auf ein PA-Zymogramm aufgetragen. Als Kontrolle wurde eine Addl70-3 transduzierte Maus die keine Tumorzellen erhielt verwendet.

Anteil von LMW-uPA (niedermolekulares-, *low molecular weight*-uPA) bzw. tPA von der Anzahl der Metastasen unabhängig war (Abb. 5.8). Es bleibt darauf hinzuweisen, dass mit der PA-Zymographie die jeweiligen murinen und humanen Spezies der PAs nicht unterschieden werden können, da sowohl bei uPA als auch tPA das humane und murine Protein gleiche Größen aufweisen. Der Anstieg von uPA in der Lunge könnte demnach aus einer Zunahme der Wirts- und/oder der Tumorzell-Expression resultieren. Durch die Korrelation von HMW-uPA Expression und HT1080 Metastasenzahl in der Lunge stellt uPA jedoch ein potentielles Zielmolekül für eine anti-proteolytische Therapie der Metastasierung im verwendeten Modell dar.

### **5.7 Additiver anti-metastatischer Effekt durch simultane prophylaktische Überexpression von TIMP-1 und PAI-2**

Da PAs zur Generierung von aktivem Plasmin führen, welches eine Reihe von proMMPs aktiviert, sind PAs indirekt an der Aktivierung einiger MMPs beteiligt. In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibition der MMPs durch prophylaktische Überexpression von TIMP-1 zu einer starken Reduktion der HT1080 Lungenmetastasierung führte (siehe Abschnitt 5.2) und, dass die Expression von uPA im verwendeten Tiermodell im Zielorgan durch die Metastasierung ansteigt (siehe Abschnitt 5.6). Daher sollte als nächstes untersucht werden, ob auch die Inhibition des PA-Systems, welches durch Aktivierung von MMPs eine diesem

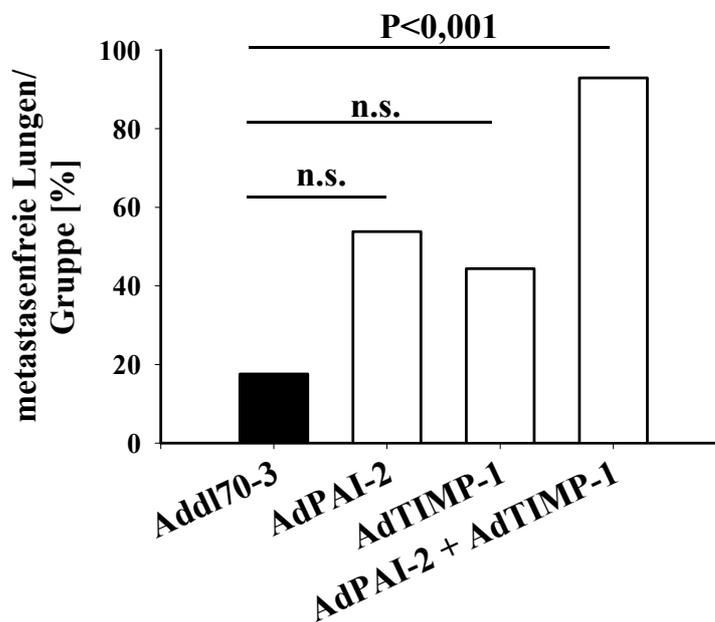


**Abbildung 5.9. Additiver Effekt bei der Reduktion von HT1080 Lungenmetastasen durch Doppelbehandlung mit AdTIMP-1 und AdPAI-2.** Drei Tage vor der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  *lacZ*-markierter HT1080pLZ12/K15-1 Zellen) wurden CD1 *nu/nu* Mäuse mit AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus), AdPAI-2 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus), AdTIMP-1 + AdPAI-2 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $2 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus) bzw. als Kontrolle mit Addl70-3 ( $6 \times 10^9$  pfu/Maus) i.v. behandelt. 21 Tage nach der Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert und die Lungen entnommen. Die linke Lungenhälfte wurde X-Gal gefärbt. Alle Metastasen auf der Oberfläche der linken Lungenhälfte wurden ausgezählt. Mittelwerte, Standardfehler (Addl70-3:  $38,1 \pm 16,1$ ,  $n=16$ ; AdTIMP-1:  $2,5 \pm 1,4$ ,  $n=10$ ; AdPAI-2:  $18,5 \pm 13,7$ ,  $n=13$ ; AdTIMP-1 + AdPAI-2:  $0,3 \pm 0,3$ ,  $n=14$ ) und Ergebnis der statistischen Analyse sind dargestellt. n.s.: nicht signifikant.

System übergeordnete Rolle einnimmt, effektiv die Metastasierung von HT1080 Zellen reduzieren kann. Daher sollte untersucht werden, ob eine prophylaktische Überexpression von PAI-2, einem natürlichen Inhibitor der PAs, ebenso effektiv in der Reduktion der experimentellen Metastasierung ist wie der zuvor untersuchte Gentransfer von TIMP-1. Da nicht alle proMMPs von Plasmin aktiviert werden sollte zusätzlich untersucht werden, ob die simultane Überexpression von PAI-2 und TIMP-1 einen additiven therapeutischen Effekt aufweist. Um eine möglichst hohe PAI-2 bzw. TIMP-1 Expression im Wirtsgewebe zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation zu erreichen, wurden CD1 *nu/nu* Mäuse drei Tage vor der Inokulation von HT1080pLZ12/K15-1 Zellen mit AdPAI-2, AdTIMP-1 bzw. einer Kombination aus AdPAI-2 und AdTIMP-1 und zur Kontrolle mit einem Virus ohne Transgen (Addl70-3) transduziert. Die erzielte prophylaktische Überexpression von PAI-2 führte zu einer signifikanten Re-

duktion der Anzahl experimenteller Lungenmetastasen um 52% im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 5.9; für Fotografien repräsentativer X-Gal gefärbter Lungen siehe Abb. 5.26). Diese anti-metastatische Potenz spiegelte sich sogar in einem Anstieg der metastasenfrieren Lungen in der AdPAI-2 transduzierten Gruppe im Vergleich zu der Addl70-3 transduzierten wider (Abb. 5.10).

Die Simultane Überexpression von PAI-2 und TIMP-1 führte zu einer additiven therapeutischen Wirkung. Diese Doppelbehandlung reduzierte die Lungenmetastasierung signifikant um 99% verglichen zur Kontrolle und war um 47% effektiver in der Reduktion der HT1080 Lungenmetastasen als die Einzelbehandlung mit AdPAI-2 und um 7% signifikant antimetastatisch wirksamer als die Einzelbehandlung mit AdTIMP-1 (Abb. 5.9). Die anti-metastatische Potenz der simultanen Überexpression von humanem PAI-2 und TIMP-1 führte sogar zu einem signifikanten fünffachen Anstieg metastasenfrieren Lungen im Vergleich zur Addl70-3 transduzierten Kontrolle, während die Anzahl metastasenfrieren Lungen durch alleinige TIMP-1 bzw. PAI-2 Expression im Vergleich zur Kontrolle zwar erhöht war, jedoch in beiden Fällen keine statistische Signifikanz erreichte (Abb. 5.10).



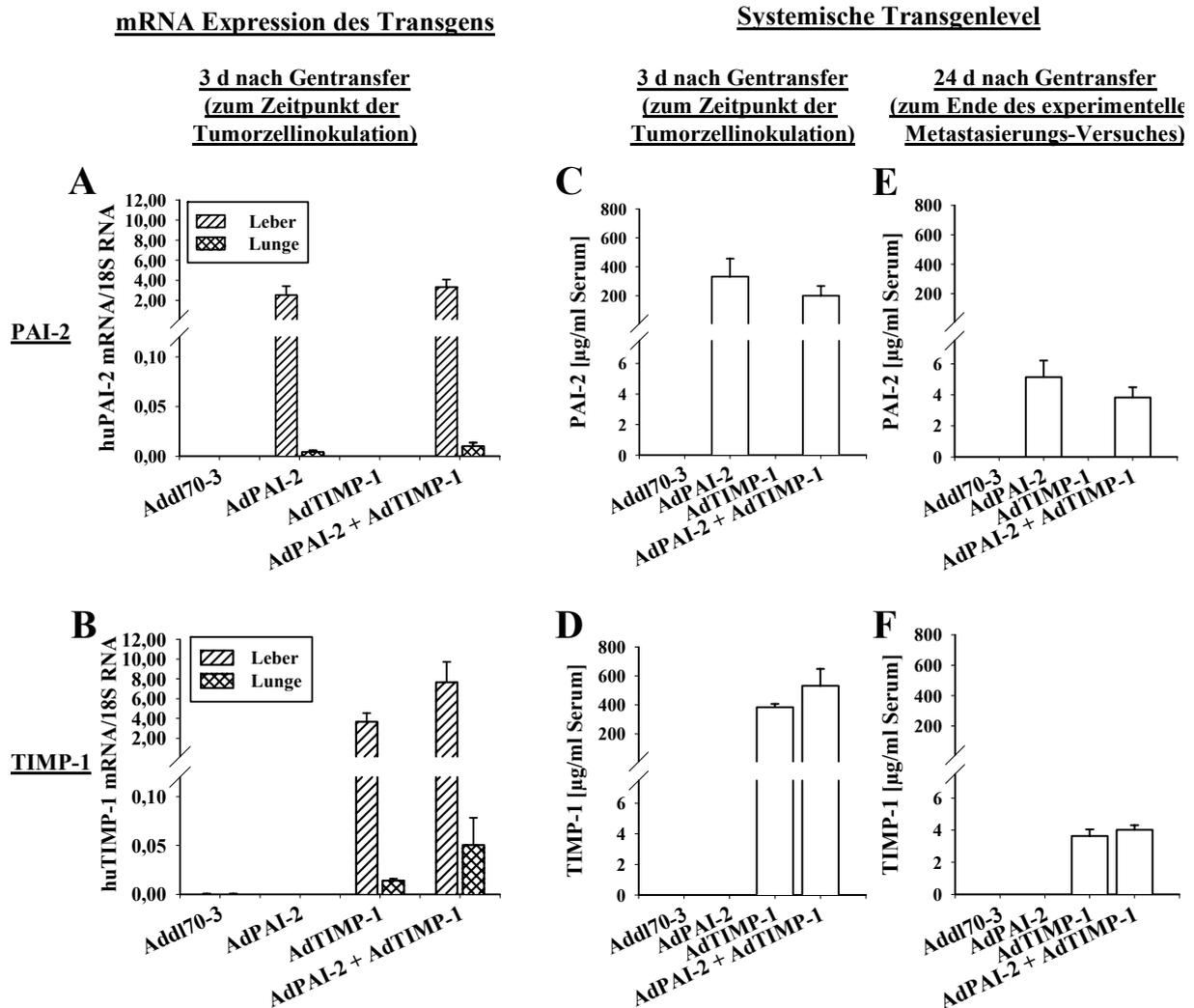
**Abbildung 5.10. Signifikante Zunahme der Anzahl metastasenfrieren Lungen durch die simultane Überexpression von TIMP-1 und PAI-2.** Drei Tage vor der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  lacZ-markierter HT1080lacZK15 Zellen) wurden CD1 *nu/nu* Mäuse mit AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3, n=10), AdPAI-2 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3, n=13), AdTIMP-1 + AdPAI-2 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $2 \times 10^9$  pfu Addl70-3, n=14) bzw. als Kontrolle mit Addl70-3 ( $6 \times 10^9$  pfu, n=16) i.v. behandelt. 21 Tage nach der Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert und die Lungen entnommen. Die linke Lungenhälfte wurde X-Gal gefärbt und Anzahl metastasenfrieren Lungen gezählt. Dargestellt wurde der prozentuale Anteil metastasenfrieren Lungen pro Gruppe (Addl70-3: 18,8%, AdPAI-2: 53,8%, AdTIMP-1: 40,0%, AdPAI-2 + AdTIMP-1: 92,9%).

Es kann zusammengefasst werden, dass die Überexpression von PAI-2 die HT1080 Lungenmetastasierung im Vergleich zur Kontrolle reduzierte, dass PAI-2 im Vergleich zu TIMP-1 eine geringere anti-metastatische Potenz im verwendeten Modell aufwies und, dass die zusätzliche Expression von PAI-2 die anti-metastatische Wirksamkeit von TIMP-1 erhöhte. Um diese Ergebnisse auf den Gentransfer von PAI-2 bzw. auf den von PAI-2 und TIMP-1 zurückführen zu können, musste sowohl die PAI-2 als auch die TIMP-1 Überexpression im Wirt nachgewiesen werden.

### **5.8 Transduktion von Leber und Lunge und hohe Transgen Konzentrationen im Serum durch adenoviralen Gentransfer von PAI-2 und TIMP-1**

Als nächstes sollte untersucht werden, ob der beobachtete additive anti-metastatische Effekt durch Behandlung mit AdPAI-2 und AdTIMP-1 tatsächlich durch die simultane Überexpression von TIMP-1 und PAI-2 erzielt wurde oder ob in der Doppelbehandlung eines der beiden Transgene in deutlich höherer Konzentration vorlag als in der jeweiligen Einzelbehandlung. In diesem Falle könnte der additive anti-metastatische Effekt nicht mehr allein auf die Ko-Expression der beiden Inhibitoren zurückgeführt werden.

Zum Nachweis der Transduktion der Tiere durch AdPAI-2 und/oder AdTIMP-1 bzw. der Überexpression der Transgene, sollte die Expression dieser humanen Gene in Lungen und Lebern auf RNA Ebene nachgewiesen werden bzw. das durch den transduzierten Wirt sezernierte PAI-2 und/oder TIMP-1 Protein im Serum quantifiziert werden. Mittels quantitativer RT-PCR (TaqMan™) wurde der relative Anteil humaner PAI-2 bzw. TIMP-1 mRNA in Lebern und Lungen transduzierter Mäuse drei Tage nach dem Gentransfer bestimmt. Dabei zeigte sich, dass AdPAI-2, wie auch zuvor AdTIMP-1, Leber und Lunge transduzierte wobei auch hier die Expression in der Leber um 99% stärker war als in der Lunge (Abb. 5.11 A). In der TIMP-1 Einzelbehandlung wurde ungefähr die gleiche Menge an TIMP-1 mRNA gefunden, wie PAI-2 mRNA in Organen von AdPAI-2 transduzierten Tieren (Abb. 5.11 A und B). In der Doppelbehandlung war mehr TIMP-1 mRNA enthalten, als in den Proben der TIMP-1 Einzelbehandlung. Dieser Unterschied war jedoch weder in Lunge noch Leber signifikant ( $P = 0,4$  bzw.  $P = 0,1$ ; Abb. 5.11 B).



**Abbildung 5.11. Nachweis der TIMP-1 und PAI-2 *in vivo* Transgenexpression.** Drei Tage vor der Tumorzellinokulation wurden CD1 *nu/nu* Mäuse mit AdPAI-2 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.), AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.), AdPAI-2 + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.) bzw. als Kontrolle mit Addl70-3 ( $6 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.) transduziert. Drei Mäuse pro Gruppe wurden zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation geopfert und Lungen, Lebern und Serum entnommen, die restlichen Mäuse wurden 21 Tage nach der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  HT1080pLZ12/K15-1/Maus, i.v.) geopfert und Serum entnommen. A-B. Gesamt-RNA aus Lebern bzw. Lungen von je drei Tieren pro Gruppe (drei Tage nach Gentransfer) wurde isoliert und die humane (hu) PAI-2- bzw. huTIMP-1 mRNA Expression mittels quantitativer RT-PCR (TaqMan™) bestimmt. Als Kontrolle wurde 18S RNA bestimmt und Mittelwerte und Standardfehler des relativen Anteils von huPAI-2 bzw. huTIMP-1 mRNA dargestellt. A. Relativer Anteil an huPAI-2 mRNA (Leber: Addl70-3:  $0 \pm 0$ ; AdPAI-2:  $2,54 \pm 0,90$ ; AdTIMP-1:  $0 \pm 0$ ; AdPAI-2 + AdTIMP-1:  $3,34 \pm 0,75$ ; Lunge: Addl70-3:  $0 \pm 0$ ; AdPAI-2:  $0,004 \pm 0,001$ ; AdTIMP-1:  $0 \pm 0$ ; AdPAI-2 + AdTIMP-1:  $0,01 \pm 0,003$ ). B. Relativer Anteil an huTIMP-1 mRNA (B, Leber: Addl70-3:  $0 \pm 0$ ; AdPAI-2:  $0 \pm 0$ , AdTIMP-1:  $3,68 \pm 0,86$ ; AdPAI-2 + AdTIMP-1:  $7,65 \pm 2,07$ ). C-F. Quantitative Bestimmung der sezernierten humanen Transgene im Serum transduzierter Mäuse. C-D. PAI-2 (C) bzw. TIMP-1 (D) Gehalt im Serum von je drei Mäusen zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation (PAI-2: Addl70-3:  $0 \pm 0$ ; AdPAI-2:  $333,41 \pm 122,97$ ; AdTIMP-1:  $0 \pm 0$ ; AdPAI-2 + AdTIMP-1:  $200,54 \pm 67,51$  µg/ml; TIMP-1: Addl70-3:  $0 \pm 0$ ; AdPAI-2:  $0 \pm 0$  µg/ml; AdTIMP-1:  $383,10 \pm 23,91$  µg/ml; AdPAI-2 + AdTIMP-1:  $532,40 \pm 115,59$  µg/ml). E-F. PAI-2 (E) bzw. TIMP-1 (F) Gehalt im Serum von transduzierten Mäusen, 21 Tage nach Tumorzellinokulation, 24 Tage nach dem Gentransfer. (PAI-2: Addl70-3:  $0 \pm 0$ , n = 3; AdPAI-2:  $5,15 \pm 1,07$ , n = 13; AdTIMP-1:  $0 \pm 0$ , n = 3; AdPAI-2 + AdTIMP-1:  $3,83 \pm 0,67$  µg/ml Serum, n = 14; TIMP-1: Addl70-3:  $0 \pm 0$ , n = 3; AdPAI-2:  $0 \pm 0$ , n = 3; AdTIMP-1:  $3,64 \pm 0,41$ , n = 10; AdPAI-2 + AdTIMP-1:  $4,02 \pm 0,29$  µg/ml, n=14).

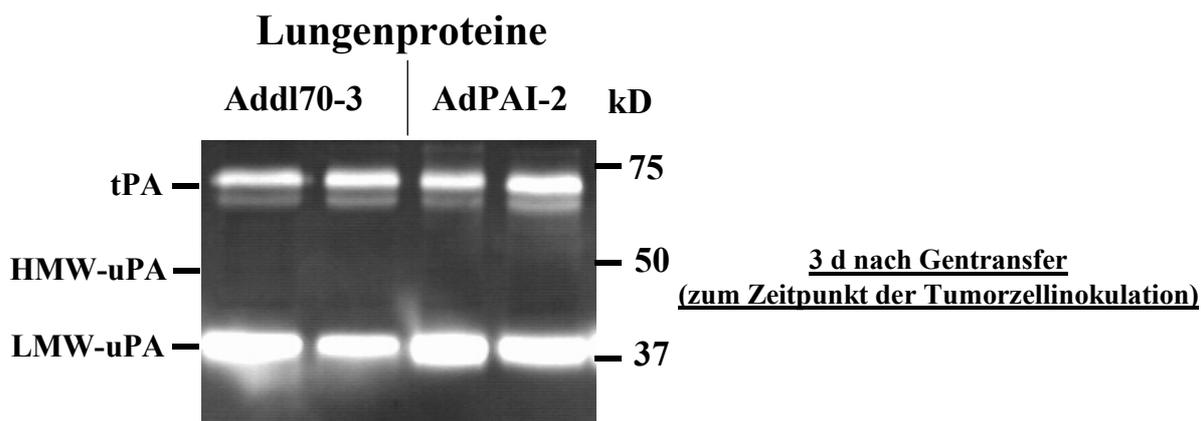
Zum gleichen Zeitpunkt, d.h. drei Tage nach dem Gentransfer, konnten extrem hohe Konzentrationen an humanem PAI-2 bzw. TIMP-1 Protein im Serum nachgewiesen werden (Abb. 5.11 C und D). In den PAI-2 überexprimierenden Tieren wurde durchschnittlich 267 µg PAI-2 pro ml Serum gefunden wobei es keine signifikanten Unterschiede zwischen den systemischen PAI-2 Konzentrationen der Einzel- bzw. Doppelbehandlung gab ( $P = 0,343$ ; Abb. 5.11 C). Auch die Unterschiede zwischen dem TIMP-1 Gehalt im Serum AdTIMP-1 transduzierter Mäuse unterschied sich nicht signifikant von dem im Serum simultan TIMP-1 und PAI-2 überexprimierender Tiere ( $P = 0,200$ ; Abb. 5.11 D). Demnach beeinflusste die gleichzeitige Transduktion des Wirtsgewebes mit AdPAI-2 und AdTIMP-1 nicht die Expression der einzelnen Transgene. Die mit dem jeweiligen Adenovirus transduzierten Tiere exprimierten selbst zu Tierversuchsende, d.h. 24 Tage nach dem Gentransfer und 21 Tage nach der Tumorzellinokulation, noch die entsprechenden Transgene. Zu diesem Zeitpunkt konnten im Serum trotz der transienten Expression der Transgene bei jeder AdPAI-2 bzw. AdTIMP-1 transduzierten Maus noch beachtliche Mengen des entsprechenden Inhibitors gemessen werden. Die PAI-2 Konzentrationen betragen durchschnittlich 4,5 µg pro ml Serum, die TIMP-1 Konzentrationen durchschnittlich 3,8 µg pro ml Serum (Abb. 5.11 E und F). Auch zu diesem Zeitpunkt waren die Unterschiede des systemischen PAI-2 (Abb. 5.11 E) bzw. TIMP-1 Proteins (Abb. 5.11 F) zwischen den jeweiligen Einzelbehandlungen und der Doppelbehandlung nicht signifikant ( $P = 0,695$  bzw.  $P = 0,255$ ).

Somit beruhte der beobachtete additive anti-metastatische Effekt auf der simultanen Überexpression von PAI-2 und TIMP-1, da die Expressionen der Transgene in den jeweiligen Einzel- und Doppelbehandlungen ein gleiches Niveau besaßen. Da, exemplarisch für die Expression von MMP-9, beobachtet werden konnte, dass die Überexpression von TIMP-1 die Expression der durch diesen Inhibitor inhibierten Proteasen erhöhte, sollte nun untersucht werden, ob die Überexpression von PAI-2 die Expression der durch ihn inhibierten Plasminogen-Aktivatoren beeinflusste.

### 5.9 Unveränderte Expression der Plasminogen-Aktivatoren trotz Überexpression von PAI-2

Da TIMP-1 die Expression einer von ihm inhibierten Proteinase (MMP-9) steigerte (siehe Abschnitt 5.4), sollte der Einfluss der PAI-2 Überexpression auf die Expression der Plasminogen-Aktivatoren (PAs) untersucht werden. Hierfür wurde drei Tage nach dem Gentransfer Gesamt-Protein aus Lungen AdPAI-2 bzw. zur Kontrolle aus Addl70-3 (Kontrollvirus ohne Transgen) transduzierten Mäusen isoliert und die Expression der Plasminogen-Aktivatoren zymographisch analysiert. Die Überexpression von PAI-2 hatte drei Tage nach dem adenoviralen Gentransfer von PAI-2 in das Wirtsgewebe, d.h. zu einem Zeitpunkt mit sehr hohen Transgen-Konzentrationen (Abb. 5.11), verglichen mit der Addl70-3 transduzierten Kontrolle keinen Einfluss auf die Expression der Plasminogen-Aktivatoren (Abb. 5.12). Es konnte in den Lungen aller Tiere ein annähernd gleicher Gehalt an tPA (Doppelbande bestehend aus Einzelstrang und Doppelstrang-tPA) und LMW-uPA gefunden werden.

Da Plasmin unter anderem MMPs aktiviert, könnte sich eine PAI-2-vermittelte Inhibition der PAs, und somit letztendlich der Plasmin-Aktivität, auch inhibierend auf das MMP-System auswirken. Weil bereits festgestellt wurde, dass die Inhibition der MMPs durch TIMP-1 zu einem Anstieg der MMP-9 Expression führte sollte nun festgestellt werden, ob PAI-2 ebenfalls die MMP-9 Expression beeinflusste.

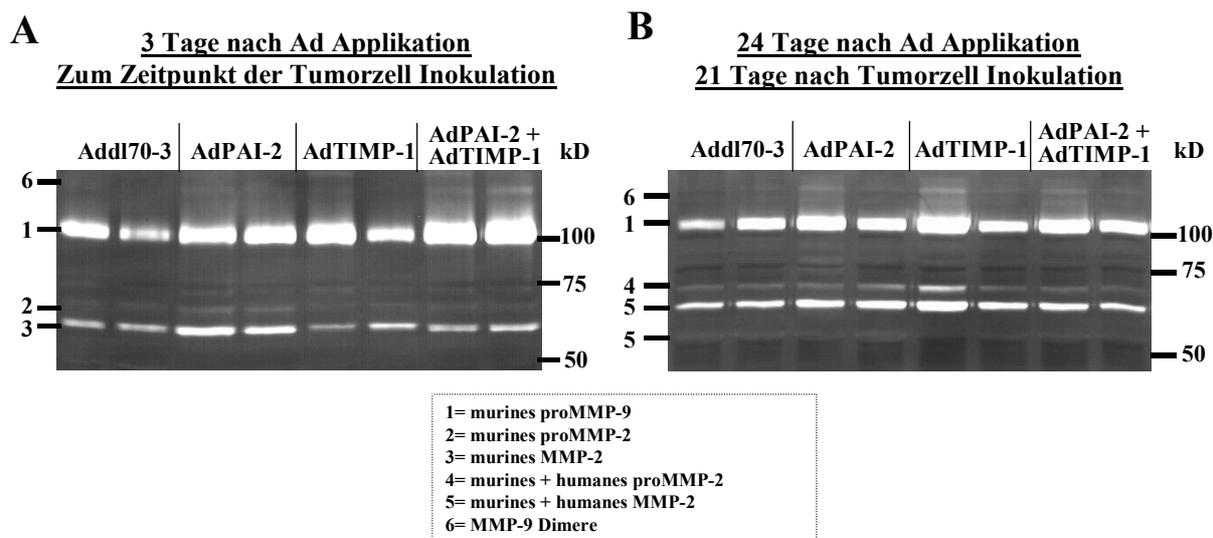


**Abbildung 5.12. Expression von Plasminogen-Aktivatoren in der Lunge nach prophylaktischer Überexpression von PAI-2.** CD1 *nu/nu* Mäuse wurden mit AdPAI-2 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.) bzw. als Kontrolle mit Addl70-3 ( $6 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.) transduziert. Drei Tage nach dem Gentransfer wurden die Mäuse geopfert und die Lungen entnommen und Protein isoliert. Gesamt-Protein wurde quantifiziert und Lungenproteine (7,5 µg/Probe) auf PA-Zymogramme aufgetragen. Dargestellt ist ein PA-Zymogramm mit je zwei repräsentativen Lungen pro Gruppe. HMW: *high molecular weight*, LMW: *low molecular weight*.

### 5.10 Verstärkte Expression von Gelatinasen durch Überexpression von PAI-2

Da die TIMP-1 Überexpression die Expression von MMP-9 steigerte und nicht ausgeschlossen werden kann, dass dieses von der Inhibition der MMP-Aktivität durch TIMP-1 vermittelt wird, sollte im folgenden untersucht werden, ob auch die Überexpression von PAI-2, welches indirekt zu einer Inhibition der proMMP-Aktivierung führen kann, einen Einfluss auf die MMP-9 Expression ausübte.

Hierfür wurde Protein aus AdPAI-2, AdTIMP-1, AdPAI-2 und AdTIMP-1 bzw. zur Kontrolle aus Addl70-3 transduzierten Lungen drei Tage nach dem Gentransfer isoliert. Die MMP-Zymographie dieser Proben ergab, dass die Überexpression von PAI-2 ebenfalls die MMP-9 Expression erhöhte, welches in der Zunahme dem durch TIMP-1 Überexpression ausgelösten Anstieg entsprach (Abb. 5.13 A). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass durch PAI-2 Überexpression ebenfalls die Expression von MMP-2 gesteigert wurde. In Lungen welche



**Abbildung 5.13. Überexpression von humanem PAI-2 erhöhte die Gelatinasen Expression in der Lunge.** Drei Tage vor der Tumorzellinokulation wurden CD1 *nu/nu* Mäuse mit AdPAI-2 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.), AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.), AdPAI-2 + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.) bzw. als Kontrolle mit Addl70-3 ( $6 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.) transduziert. Drei Mäuse pro Gruppe wurden zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation, die restlichen Mäuse 21 Tage nach der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  HT1080pLZ12/K15-1 Zellen/Maus, i.v.) geopfert und Lungen entnommen. Protein wurde aus den Lungen aufgearbeitet, Gesamtproteinmenge bestimmt und je 25 µg Lungenprotein pro Probe auf MMP-Zymogramme aufgetragen. Gelatinasen Expression in Lungen transduzierter Mäuse zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation (A) bzw. zum am Ende des experimentellen Metastasierungsversuches (B). Dargestellt sind Zymogramme mit je zwei repräsentativen Lungen pro Gruppe.

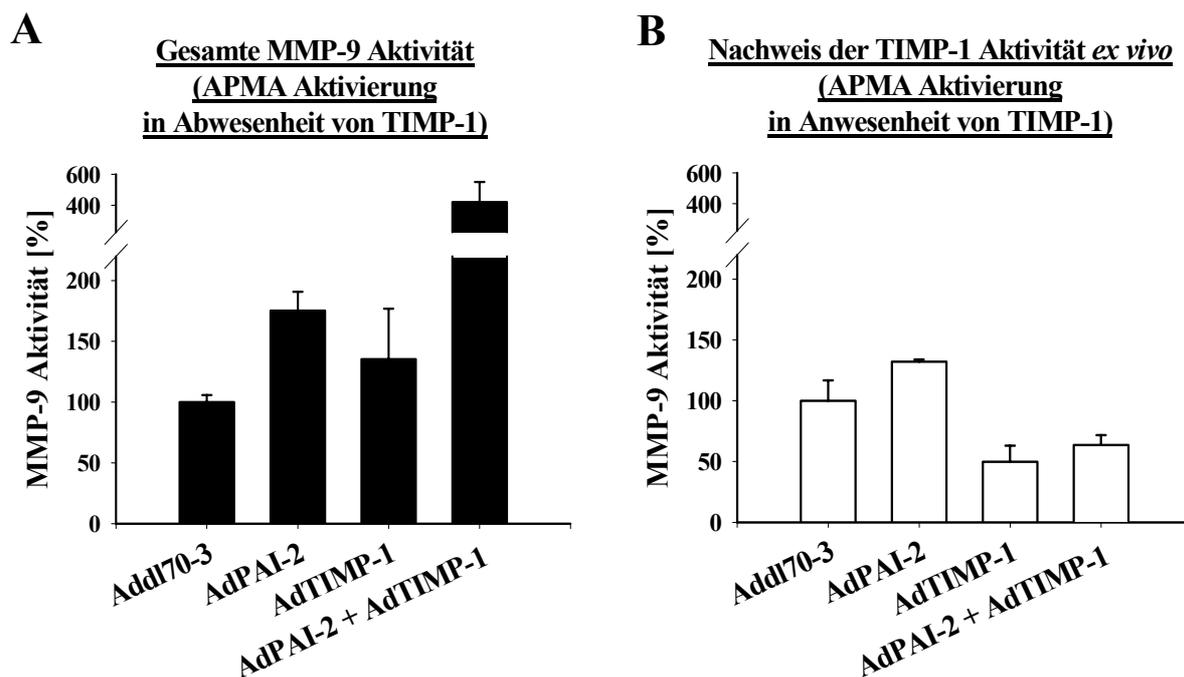
simultan TIMP-1 und PAI-2 überexprimierten konnte ein additiver Effekt beider Transgene auf die Erhöhung der MMP-9 Expression erfasst werden (Abb. 5.13 A). Selbst 24 Tage nach dem Gentransfer, am Ende des experimentellen Metastasierungsversuches, konnte trotz transienter Expression der Transgene in ungefähr 50% der AdPAI-2, AdTIMP-1 bzw. AdPAI-2 und AdTIMP-1 transduzierten Lungen im Vergleich zu den Kontrollen (Addl70-3) noch erhöhte murine proMMP-9 Mengen detektiert werden (Abb. 5.13 B). In keiner der getesteten Lebern konnte zymographisch aktives MMP-9 detektiert werden, während aktives MMP-2 in allen Lungen detektierbar war (Abb. 5.13 A und B).

Um zu ermitteln, ob die durch prophylaktische Überexpression von TIMP-1 in der Einzel- bzw. in der Doppelbehandlung erzielten TIMP-1 Konzentrationen im Zielorgan der Metastasierung ausreichend waren, die durch TIMP-1 bzw. simultane TIMP-1 und PAI-2 Expression erhöhten MMP-9 Konzentrationen zu kompensieren, sollte die MMP-9 Aktivität in den Lungen AdTIMP-1, AdPAI-2 bzw. AdPAI-2 und AdTIMP-1 transduzierter Tiere bestimmt werden.

### **5.11 Nachweis der PAI-2 bzw. TIMP-1 Aktivität *ex vivo***

Um die Auswirkungen der durch die TIMP-1 bzw. durch PAI-2 Überexpression ausgelösten Verstärkung der MMP-9 Expression beurteilen zu können, sollte die inhibitorische Kapazität des überexprimierten TIMP-1 Proteins in Lungen der entsprechenden Einzelbehandlung bzw. der Doppelbehandlung bestimmt werden. Hierfür wurde Protein aus Lungen AdPAI-2, AdTIMP-1, AdPAI-2 und AdTIMP-1 bzw. Addl70-3 transduzierter Mäuse isoliert und in einem MMP-9 Aktivitätsassay getestet.

Im ersten Schritt wurde die Aktivität des in der Lunge endogen vorkommenden aktiven MMP-9 ermittelt. Es zeigte sich, dass trotz des Anstieges an proMMP-9 in den PAI-2, TIMP-1 bzw. PAI-2 und TIMP-1 überexprimierenden Tieren ebenso wie in der Addl70-3 transduzierten Kontrolle kein aktives MMP-9 detektierbar war (Abbildung nicht gezeigt). Dieses entsprach dem Ergebnis der zymographischen Untersuchung der Proben, bei welcher nur murines proMMP-9 detektiert werden konnte (Abb. 5.13). Durch Aktivierung des proMMP-9 nach Entfernung des überexprimierten TIMP-1 Proteins konnte die im Zymogramm detektierte Zunahme von proMMP-9, ausgelöst durch die Überexpression von PAI-2 bzw. TIMP-1, bestätigt werden. Der additive Anstieg der MMP-9 Expression in Lungen der Doppelbehandlung konnte ebenfalls reproduziert werden (Abb. 5.14 A). Die Überexpression von PAI-2



**Abbildung 5.14. Nachweis der TIMP-1 Transgenaktivität ex vivo.** Aus Lungen von je drei AdPAI-2 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.), AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.), AdPAI-2 + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.) bzw. zur Kontrolle mit Addl70-3 ( $6 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.) transduzierten Mäusen wurde drei Tage nach der Transduktion Gesamt-Protein isoliert. Die MMP-9 Aktivität in je 80  $\mu$ g Protein pro Lunge und Ansatz wurde in einem MMP-9 Aktivitätsassay bestimmt. Die in Lungen aus Addl70-3 transduzierten Mäusen gemessene Gesamt-MMP-9 Aktivität wurde als 100% gesetzt. Die Mittelwerte und Standardfehler der relativen MMP-9 Aktivität der einzelnen Behandlungsgruppen wurde dargestellt. A. Nachweis des Gesamt-Gehaltes an MMP-9 in den eingesetzten Lungen durch APMA-Aktivierung des antikörpergebundenen proMMP-9 (Addl70-3:  $100\% \pm 5,75\%$ ; AdPAI-2:  $175,34 \pm 15,46\%$ ; AdTIMP-1:  $135,33\% \pm 41,53\%$ ; AdPAI-2 + AdTIMP-1:  $420,12 \pm 130,56\%$ ). B. Nachweis der Inhibition der proMMP-9 Aktivierung durch überexprimiertes TIMP-1. Gesamt-Lungenprotein wurde vor Verwendung im Aktivitätsassay (in Anwesenheit von TIMP-1) mit APMA behandelt. Anschließend wurde die Aktivität des MMP-9 im Aktivitätsassay bestimmt (Addl70-3:  $100\% \pm 16,86\%$ ; AdPAI-2:  $132,13 \pm 1,78\%$ ; AdTIMP-1:  $49,85\% \pm 13,17\%$ ; AdPAI-2 + AdTIMP-1:  $63,58 \pm 4,72\%$ ).

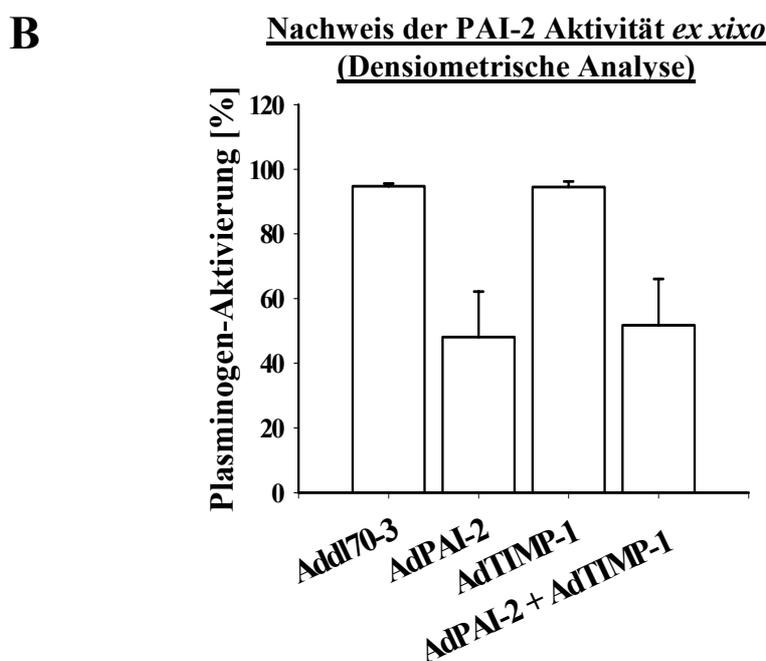
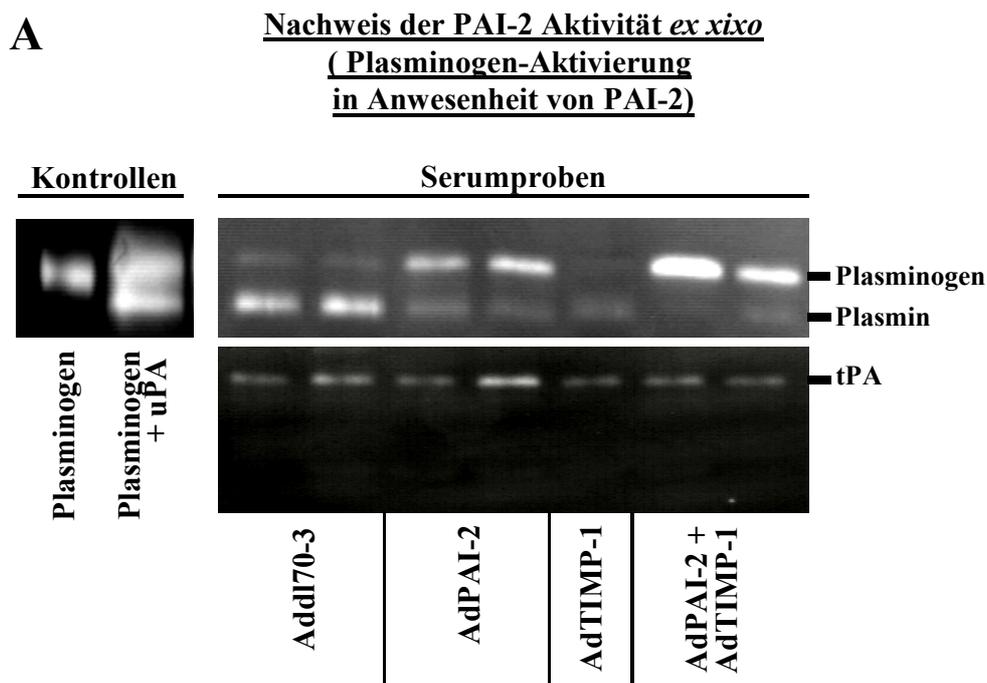
führte zu einem Anstieg des proMMP-9 Proteins um den Faktor 1,8, die Expression von TIMP-1 zu einem Anstieg um den Faktor 1,4 und die simultane Expression von TIMP-1 und PAI-2 sogar zu einem Anstieg um den Faktor 4,2 (Abbildung 5.14 A). Da TIMP-1 an proMMP-9 binden und dessen Aktivierung inhibieren kann, sollte festgestellt werden, ob die Überexpression von TIMP-1 ausreichend war die Aktivierung von proMMP-9 zu inhibieren. Um diese Frage zu beantworten wurde das proMMP-9 Protein in einem weiteren Ansatz in Anwesenheit des überexprimierten TIMP-1 bzw. PAI-2 Proteins aktiviert. Dieser Ansatz zeigte, dass trotz des deutlich höheren proMMP-9 Gehaltes in den Lungen welche TIMP-1 überexprimierten die proMMP-9 Aktivierung signifikant reduziert war. In der TIMP-1 Behand-

lung wurden nur 37% des gesamten proMMP-9 aktiviert, welches 50% der MMP-9 Aktivität der Add170-3 transduzierten Kontrolle entsprach. In der Doppelbehandlung konnten nur 15% des gesamten proMMP-9 aktiviert werden, welches 64% der MMP-9 Aktivität der Add170-3 transduzierten Kontrolle entsprach (Abb. 5.14 B). In den TIMP-1 transduzierten Lungen war demnach in der Einzelbehandlung 63% bzw. in der Doppelbehandlung 85% des proMMP-9 an TIMP-1 gebunden. Auch in diesem Ansatz spiegelte sich der in der Zymographie gefundene Anstieg der MMP-9 Expression durch Überexpression von PAI-2 im Vergleich zur Kontrolle wider (Abb. 5.14. B). Die Aktivierung des proMMP-9 war jedoch in dieser Gruppe in Anwesenheit aller Proteine, inkl. des überexprimierten PAI-2 Proteins, gegenüber der proMMP-9 Aktivierung in Abwesenheit aller Proteine des Lungenhomogenates um 25% reduziert. Dieses könnte den Beitrag des durch endogenes Plasmin aktivierbaren proMMP-9 Proteins dargestellt haben (Abb. 5.14 A und B). In TIMP-1 transduzierten Lebern, sowohl der Einzelbehandlung als auch der kombinativen Behandlung mit AdPAI-2, konnte wie in der Lunge kein endogen aktives MMP-9 detektiert werden, während in AdPAI-2 bzw. Add170-3 transduzierten Lebern endogen aktives MMP-9 nachweisbar war (Abbildung nicht gezeigt).

Mit dem Nachweis der TIMP-1 Transgenaktivität in Lunge und Leber *ex vivo* konnte gezeigt werden, dass trotz der erhöhten Expression von proMMP-9, sowohl in der Einzelbehandlung wie auch in der Doppelbehandlung mit PAI-2, ausreichend TIMP-1 Protein in Lungen und Lebern vorhanden war um MMPs zu inhibieren.

Da die prophylaktische Überexpression von PAI-2 zu einer signifikanten Reduktion der Lungenmetastasierung führte, sollte im weiteren untersucht werden, ob die Aktivität von PAI-2 ausreichend war uPA und somit die Aktivierung von Plasminogen zu inhibieren, um einen direkten Zusammenhang zwischen anti-proteolytischer Aktivität und anti-metastatischer Wirksamkeit herstellen zu können.

Um die inhibitorische Wirksamkeit des überexprimierten PAI-2 Proteins *ex vivo* bestimmen zu können, wurden Seren aus AdPAI-2, AdTIMP-1, AdPAI-2 und AdTIMP-1 bzw. zur Kontrolle aus Add170-3 transduzierten Mäusen drei Tage nach dem Gentransfer gewonnen. Diesen Seren wurde zum Nachweis der PAI-2 Aktivität uPA und Plasminogen zugesetzt. Die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin durch uPA wurde zymographisch analysiert und der prozentuale Anteil aktivierten Plasminogens durch densitometrische Vermessung der im Zymogramm sichtbaren Banden bestimmt. Die Zymographie zeigte, dass in Seren von Tieren welche PAI-2 überexprimierten deutlich weniger des exogen zugesetzten Plasminogens aktiviert wurde als in Seren Add170-3 bzw. AdTIMP-1 transduzierter Mäuse (Abb. 5.15 A,



**Abbildung 5.15 Nachweis der PAI-2 Transgenaktivität *ex vivo*.** Aus je vier mit AdPAI-2 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.), AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.), AdPAI-2 + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.) bzw. zur Kontrolle mit Addl70-3 ( $6 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.) transduzierten Mäusen wurde drei Tage nach der Transduktion Serum gewonnen. Zu je 5  $\mu$ l des 1:20 verdünnten Serums wurden 0,9  $\mu$ g Plasminogen und 1 ng uPA zugegeben und diese für 3 h bei 37°C zur Aktivierung des Plasminogens inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Plasmin-Zymogramme aufgetragen. A. Nachweis der Plasminaktivierung mittels Zymographie (oben rechts). Als Kontrolle wurde 2  $\mu$ g Plasminogen sowie 2  $\mu$ g Plasminogen mit 2 ng uPA (3h bei 37°C inkubiert) aufgetragen (oben links). Kontrolle der Expression endogener Plasminogenaktivatoren durch PA-Zymographie von je 5  $\mu$ l der 1:20 verdünnten, für die Plasminaktivierung verwendeten Serumproben (unten). Dargestellt sind Zymogramme mit für jede Gruppe repräsentativen Proben. B. Densiometrische Auswertung der Plasminogen-Aktivierung von je vier Tieren pro Gruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler des prozentualen Anteils an generiertem Plasmin pro Gruppe (Addl70-3:  $94,73 \pm 0,83\%$ ; AdPAI-2:  $48,10 \pm 14,06\%$ ; AdTIMP-1:  $94,52 \pm 1,69\%$ ; AdPAI-2 + AdTIMP-1:  $51,75 \pm 14,30\%$ ).

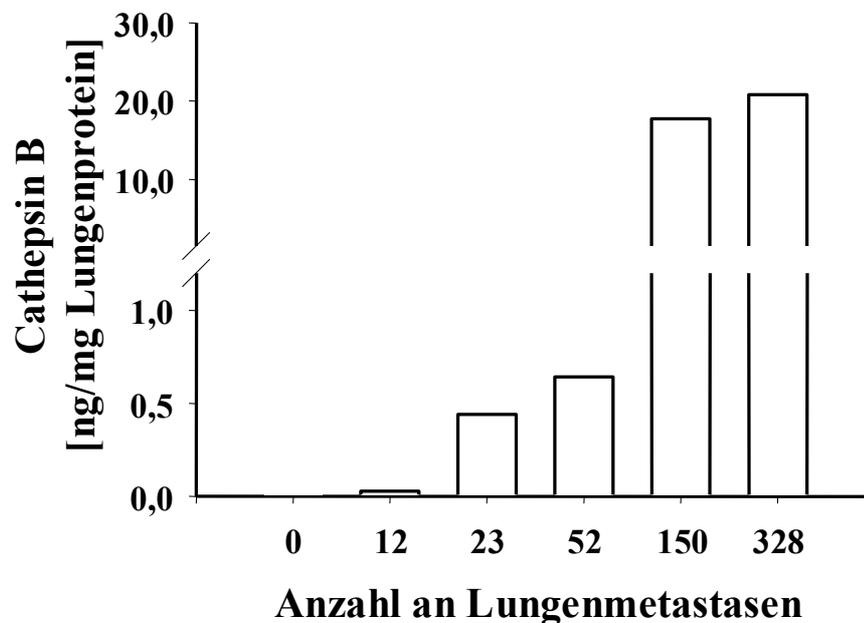
oben). Die Densiometrische Auswertung von je vier Proben je Gruppe zeigte, dass die Aktivierung des Plasminogens signifikant um 49% bzw. 45% in der AdPAI-2 Einzelbehandlung bzw. Doppelbehandlung mit TIMP-1 im Vergleich zur Kontrolle reduziert war (in beiden Fällen:  $P = 0,029$ ). Wie erwartet wurde bei der Verwendung von Seren aus AdTIMP-1 transduzierten Mäusen kein Unterschied in der Plasmin-Generierung im Vergleich zu den Kontrollvirus behandelten Mäusen gefunden ( $P = 0,886$ ; Abb. 5.15 B).

Um auszuschließen, dass die reduzierte Aktivierung von Plasminogen auf einer reduzierten Expression der endogenen Plasminogen-Aktivatoren oder veränderten Mengen an endogenem Plasminogen beruhte, wurde jede verwendete Serumprobe zusätzlich zur Kontrolle auf ein Plasmin-Aktivator- bzw. Plasmin-Zymogramm aufgetragen. Dabei zeigte sich, dass bei keiner verwendeten Serumprobe AdPAI-2 transduzierter Mäuse die endogene tPA Expression niedriger war als in den Ad170-3 bzw. AdTIMP-1 transduzierten Tieren (Abb. 5.15 A, unten), sowie, dass mit den verwendeten Konzentrationen kein endogenes Plasminogen oder Plasmin nachweisbar war (Abbildung nicht gezeigt). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des transgenen PAI-2 Proteins für die Reduktion der Plasminogen-Aktivierung verantwortlich sein musste. Mit diesem Nachweis der PAI-2 Transgenaktivität *ex vivo* konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von PAI-2 *in vivo* ausreichend war selbst zusätzlich zu den endogenen PAs zugefügtes uPA zu inhibieren. Der durch adenoviralen Gentransfer von PAI-2 erzielte Therapieerfolg konnte demnach auf die anti-proteolytische Aktivität von PAI-2 zurückgeführt werden.

Durch den Nachweis der PAI-2 und TIMP-1 Transgenaktivität *ex vivo* konnte gezeigt werden, dass der additive Therapieerfolg durch simultane Überexpression von PAI-2 und TIMP-1 vermutlich auf die anti-proteolytische Aktivität der beiden Transgene zurückzuführen war. Da papainähnliche Cysteinproteinasen, wie Cathepsin B und L, sowohl die Aktivität des PA-Systemes als auch die der MMPs beeinflussen können, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob diese Cathepsine im verwendeten Metastasierungs-Modell eine Rolle spielen.

### 5.12 Korrelation der Cathepsin B Expression und der Anzahl an HT1080 Metastasen in der Lunge

Um festzustellen, ob weitere Proteaseklassen ebenfalls ein Ziel für eine anti-proteolytische Therapie der Metastasierung darstellen könnten, wurde im nächsten Abschnitt die Expression von Cathepsin B und L untersucht. Da diese Cysteinproteasen pro-uPA aktivieren und aktives uPA zur Generierung aktiven Plasmins führt welches wiederum eine Reihe von proMMPs aktiviert, sind Cathepsin B und L indirekt an der Aktivierung von Plasmin und an der von MMPs beteiligt. Daher sollte überprüft werden, ob im verwendeten Metastasierungsmodell diese Cathepsine im Zielorgan der Metastasierung exprimiert werden bzw. ob ihre Expression von der HT1080 Metastasierung beeinflusst wird.



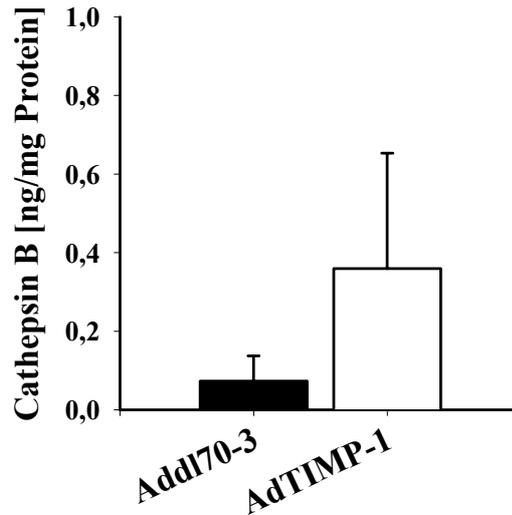
**Abbildung 5.16. Anzahl der HT1080 Lungenmetastasen korrelierte mit Cathepsin B Gehalt in der Lunge.** CD1 *nu/nu* Mäuse wurden drei Tage vor der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  *lacZ*-markierter HT1080pLZ12 Zellen/Maus i.v.) mit Addl70-3 transduziert ( $6 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.). 21 Tage nach der Tumorzellinokulation wurden die Lungen entnommen der linke Lungenflügel wurde X-Gal gefärbt und die Metastasen quantifiziert während aus dem rechten Lungenflügel Protein isoliert wurde. Gesamt-Protein wurde mit BCA<sup>TM</sup> ermittelt und der Cathepsin B Gehalt in den Lungen mittels ELISA bestimmt, wobei sowohl humanes wie auch murines Cathepsin B detektiert wurde. Als Kontrolle wurde eine Addl70-3 transduzierte Maus die keine Tumorzellen erhielt verwendet. Dargestellt ist die Cathepsin B Konzentration in ng pro mg Gesamtprotein gegenüber der Anzahl an Lungenmetastasen.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung erfolgte die Isolierung von Gesamt-Protein aus metastasentragenden Lungen von Mäusen welche drei Tage vor der Inokulation von HT1080pLZ12/K15-1 Zellen mit dem Kontrollvirus Add170-3 transduziert wurden. Um die Proben hinsichtlich ihrer Metastasenzahl untersuchen zu können wurde nur aus den jeweils rechten Lungenflügeln Protein aufgearbeitet und die jeweils linken Lungenflügel X-Gal gefärbt um die Anzahl der Metastasen auf ihnen zu bestimmen. Mittels ELISA Systemen für Cathepsin B bzw. L, welche sowohl die murinen als auch humanen Spezies der getesteten Cathepsine detektierten, konnte gezeigt werden, dass mit steigender Zahl an Lungenmetastasen die Expression von Cathepsin B zunahm (Abb. 5.16), während die Lungenmetastasierung die Expression von Cathepsin L in der Lunge nicht beeinflusste (Abbildung nicht gezeigt). Durch die Korrelation von Cathepsin B Expression und HT1080 Metastasenzahl in der Lunge stellt Cathepsin B ein potentielles Zielmolekül für eine anti-proteolytische Therapie der Metastasierung im verwendeten Modell dar.

Da Cathepsin B ein potentieller Aktivator von pro-uPA und somit indirekter Aktivator von Plasminogen und proMMPs ist sollte nachträglich untersucht werden, wie sich die Inhibition des MMP-Systems durch TIMP-1 Überexpression bzw. Inhibition des PA-Systems durch PAI-2 Überexpression auf die Expression von Cathepsin B auswirkte.

### **5.13 Verstärkte Expression von Cathepsin B durch Überexpression von TIMP-1**

Cathepsin B nimmt eine dem PA-System und den MMPs übergeordnete Position ein, da seine Aktivität zu einer verstärkten Aktivität sowohl von uPA als auch von MMPs führt. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von Cathepsin B mit der Anzahl der HT1080 Metastasen in der Lunge korrelierte (siehe Abschnitt 5.12). Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Überexpression von TIMP-1 bzw. PAI-2 einen Einfluss auf die Expression von Cathepsin B hatte. Um diese Fragestellung zu untersuchen wurde Protein aus metastasentragenden Lungen 21 Tage nach der Tumorzellinokulation isoliert, wobei diese Tiere drei Tage vor der Inokulation von HT1080/pLZ12K15-1 mit AdTIMP-1 bzw. AdPAI-2 transduziert wurden. Zur Kontrolle wurde aus metastasentragenden Lungen welche mit einem Virus ohne Transgen (Add170-3) transduziert wurden Protein isoliert. Da bereits gezeigt wurde, dass Cathepsin B mit der Anzahl der Lungenmetastasen korrelierte wurden solche Lungen der Kontrolle ausgewählt die in ihrer Metastasenzahl denen der Behandlungen entsprachen. Daher wurde das Protein nur aus den jeweils rechten



**Abbildung 5.17. TIMP-1 Überexpression führte zu einem Anstieg des Cathepsin B Gehaltes in der Lunge.** CD1 *nu/nu* Mäuse wurden drei Tage vor der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  *lacZ*-markierter HT1080pLZ12/K15-1 Zellen/Maus i.v.) mit AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.) bzw. zur Kontrolle mit Addl70-3 ( $6 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.) transduziert. 21 Tage nach der Tumorzellinokulation wurden die Lungen entnommen, jeweils der linke Lungenflügel X-Gal gefärbt und die Metastasen ausgezählt während aus dem rechten Lungenflügel Protein isoliert wurde. Gesamt-Protein wurde quantifiziert und der Cathepsin B Gehalt in den Lungen mittels ELISA ermittelt. Mittelwerte und Standardfehler der Cathepsin B Konzentrationen in Lungen mit annähernd gleichen Metastasenzahlen wurden dargestellt (Addl70-3:  $0,06 \pm 0,05$  ng/mg Protein, n=4, 0, 1, 12 und 23 Metastasen; AdTIMP-1:  $0,36 \pm 0,29$  ng/mg Protein, n=4, 0, 1, 2 und 5 Metastasen).

Lungenflügel isoliert und Cathepsin B Protein mittels ELISA bestimmt, während die jeweils linken Lungenflügel für die Quantifizierung der Metastasen X-Gal gefärbt wurden. Die Bestimmung des Cathepsin B Proteingehaltes in den entsprechenden Lungen ergab, dass trotz gleicher oder geringerer Metastasenzahl in Lungen AdTIMP-1 transduzierter Mäuse die mehr als fünffache Menge an Cathepsin B detektiert werden konnte (Abb. 5.17). Demnach führte die Überexpression von TIMP-1 in metastasentragenden Organen zu einem Anstieg der Cathepsin B Expression während die Überexpression von PAI-2 keinen Einfluss auf den Cathepsin B Gehalt in der Lunge hatte. In allen verwendeten Lungenproben der AdPAI-2 transduzierten Tiere konnte kein Cathepsin B gefunden werden, welches die Reduktion der Lungenmetastasen reflektierte (Abbildung nicht gezeigt).

Dadurch, dass bereits gezeigt werden konnte, dass Cathepsin B ein potentielles Zielmolekül für eine anti-proteolytische Therapie der Metastasierung darstellt (siehe Abschnitt 5.12) lag es nahe die anti-metastatische Potenz der prophylaktischen Überexpression eines natürlichen Inhibitors von Cathepsin B, Cystatin C, mit der von TIMP-1 zu vergleichen. Da die Überex-

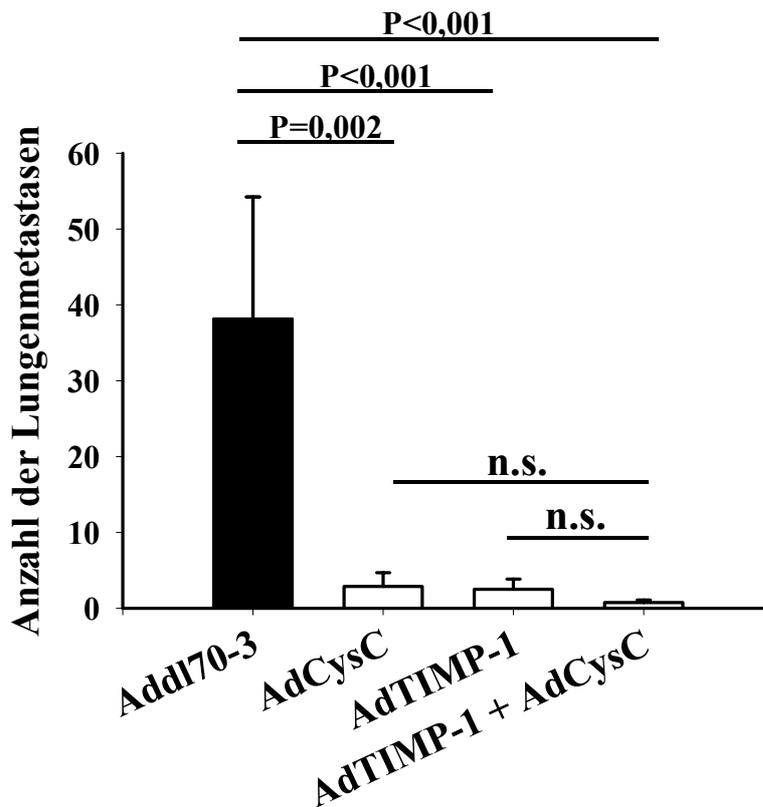
pression von TIMP-1 zu einem Anstieg der Cathepsin B Expression führte sollte ferner untersucht werden, ob die zusätzliche simultane Überexpression von Cystatin C zu einem additiven anti-metastatischen Effekt führen könnte indem es die TIMP-1 vermittelte Nebenwirkung ausgleicht.

### **5.14 Signifikante Reduktion der experimentellen HT1080 Lungenmetastasierung durch prophylaktische Überexpression von Cystatin C**

Da die Expression von Cathepsin B in der Lunge mit der Anzahl der Lungenmetastasen im verwendeten Modell korrelierte, sollte untersucht werden, ob eine prophylaktische Überexpression von Cystatin C, einem natürlichen Inhibitor von papainähnlichen Cysteinproteasen und somit auch von Cathepsin B, ebenso effektiv in der Reduktion der experimentellen Metastasierung ist wie der zuvor untersuchte Gentransfer von TIMP-1 bzw. PAI-2. Zusätzlich wurde der Effekt einer simultanen Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 auf die Metastasierung der Fibrosarkomzellen untersucht, um den durch TIMP-1 Überexpression ausgelösten Anstieg an Cathepsin B Protein in der Lunge zu kompensieren um somit eventuell einen additiven anti-metastatischen Effekt herbeizuführen.

Um eine möglichst hohe Cystatin C bzw. TIMP-1 Expression im Wirtsgewebe zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation zu erreichen wurden CD1 *nu/nu* Mäuse drei Tage vor der Inokulation von HT1080pLZ12/K15-1 Zellen mit AdCysC, AdTIMP-1, einer Kombination aus AdCysC und AdTIMP-1 bzw. zur Kontrolle mit einem Virus ohne Transgen (Add170-3) behandelt. Die durch den adenoviralen Gentransfer erzielte prophylaktische Überexpression von Cystatin C führte zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl experimenteller Lungenmetastasen um 92% im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 5.18; für Fotografien repräsentativer X-Gal gefärbter Lungen siehe Abb. 5.26). Diese anti-metastatische Potenz spiegelte sich sogar in einem signifikanten Anstieg der metastasenfrenen Lungen um das vierfache im Vergleich zur Add170-3 transduzierten Kontrolle auf insgesamt 75% metastasenfrenen Lungen in der AdCysC transduzierten Gruppe wider (Abb. 5.19).

Die simultane Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 führte zu einer additiven Reduktion der Lungenmetastasierung. Im Vergleich zu der Cystatin C Einzelbehandlung war die Doppelbehandlung um 84% effektiver in der Reduktion der HT1080 Lungenmetastasierung bzw. im Vergleich zur TIMP-1 Einzelbehandlung um 70% wirksamer, dieser additive anti-metastatische Effekt erreichte jedoch nicht statistische Signifikanz ( $P = 0,889$  bzw.  $P = 0,261$ ; Abb. 5.18).

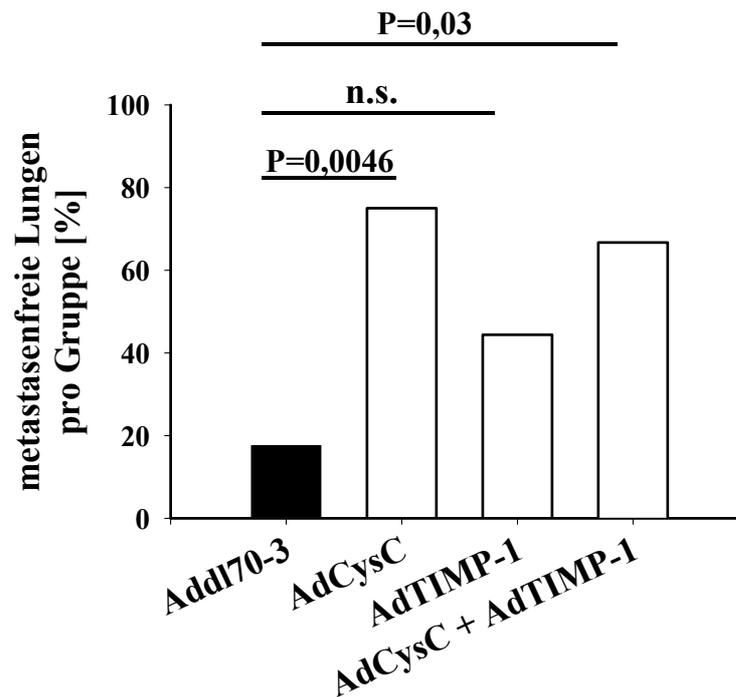


**Abbildung 5.18. Prophylaktische Cystatin C Überexpression inhibierte die experimentelle Lungenmetastasierung durch HT1080 Zellen signifikant.** Drei Tage vor der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  lacZ-markierter HT1080pLZ12/K15-1 Zellen/Maus i.v.) wurden CD1 *nu/nu* Mäuse mit AdCys ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $4 \times 10^9$  pfu Add170-3/Maus), AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Add170-3/Maus), AdCysC-1 + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu Add170-3/Maus) bzw. als Kontrolle mit Add170-3 ( $6 \times 10^9$  pfu/Maus) i.v. behandelt. 21 Tage nach der Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert und die Lungen entnommen. Die jeweils linke Lungenhälfte wurde X-Gal gefärbt. Alle Metastasen auf der Oberfläche der linken Lungenhälfte wurden ausgezählt. Mittelwerte, Standardfehler (Add170-3:  $38,1 \pm 16,1$ ,  $n=16$ ; AdCysC:  $2,9 \pm 1,8$ ,  $n=16$ ; AdTIMP-1:  $2,5 \pm 1,4$ ,  $n=10$ ; AdCysC + AdTIMP-1:  $0,8 \pm 0,4$ ,  $n=12$ ) und Ergebnis der statistischen Analyse sind dargestellt.

Die anti-metastatische Potenz der simultanen Überexpression von humanem Cystatin C und TIMP-1 führte, ebenso wie die alleinige Überexpression von Cystatin C, zu einem signifikanten Anstieg metastasenfrier Lungen um mehr als das dreifache im Vergleich zu der Add170-3 transduzierten Kontrolle auf insgesamt 68% (Abb. 5.19).

Neben den Lungen wurden in allen Behandlungsgruppen dieser Arbeit zum Ende des experimentellen Metastasierungs-Versuches auch die Lebern entnommen und diese zum Nachweis von Metastasen X-Gal gefärbt. Bei diesem Metastasierungsmodell kommt es zur Ausbildung von Makrometastasen in der Lunge, während in der Leber die Tumorzellen einzellig vorliegen. In keiner bisher erwähnten Behandlungsgruppe konnte ein deutlicher Effekt der Überex-

pression der jeweiligen Proteinaseinhibitoren auf diese Mikrometastasierung beobachtet werden. Dennoch sollten auch eventuelle Auswirkungen der Überexpression von Cystatin C alleine bzw. in Kombination mit TIMP-1 auf die Lebermetastasierung der Fibrosarkomzellen begutachtet werden.

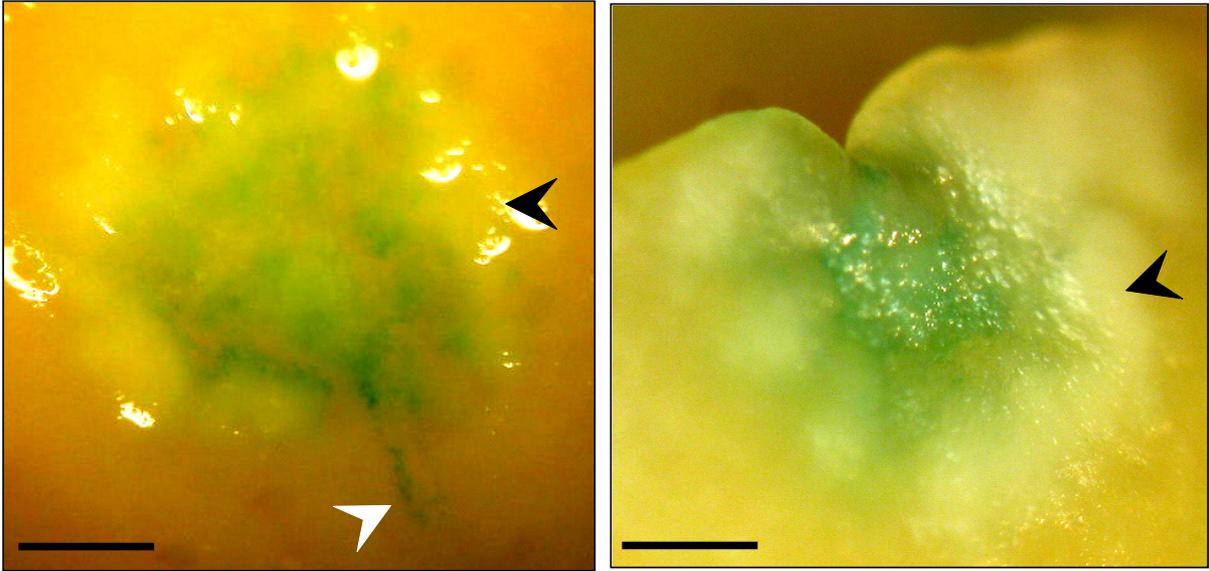


**Abbildung 5.19. Signifikante Zunahme der Anzahl metastasenfreier Lungen durch die Überexpression von Cystatin C.** Drei Tage vor der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  lacZ-markierter HT1080pLZ12/K15-1 Zellen/Maus i.v.) wurden CD1 *nu/nu* Mäuse mit AdCysC ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.), AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.), AdCysC + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.) bzw. als Kontrolle mit Addl70-3 ( $6 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.) behandelt. 21 Tage nach der Tumorzellinkulation wurden die Tiere geopfert und die Lungen entnommen. Die linke Lungenhälfte wurde X-Gal gefärbt und die Anzahl metastasenfreier Lungen gezählt. Dargestellt wurde der prozentuale Anteil metastasenfreier Lungen pro Gruppe (Addl70-3: 18,8%, n=16; AdCysC: 75,0%, n=16; AdTIMP-1: 40,0%, n=10; AdCysC + AdTIMP-1: 66,7%, n=12) und die Ergebnisse der statistischen Analyse. n.s. = nicht signifikant.

### **5.15 Induktion von HT1080 Makrometastasen in der Leber durch simultane Überexpression von TIMP-1 und Cystatin C**

In dem verwendeten experimentellen Metastasierungsmodell erfolgt die Metastasierung hauptsächlich in die Lunge, wo die Metastasen zu Makrometastasen, d.h. zu Metastasen einer Größe von mindestens 0,1 mm auswachsen. Neben der Lunge stellt aber auch die Leber einen Zielort der Metastasierung dar, hier liegen die Tumorzellen jedoch einzellig vor, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass diese Zellen ruhend (*dormant*) im Gewebe vorliegen. Bei allen in dieser Arbeit bisher durchgeführten gentherapeutischen Ansätzen wurden neben den Lungen stets auch die Lebern entnommen und zur Bewertung der Metastasierung X-Gal gefärbt. Die qualitative Begutachtung der Lebern AdTIMP-1-, AdPAI-2-, AdTIMP-1 und AdPAI-2- bzw. Add170-3 transduzierter Mäuse ergab keine deutlichen Hinweise einer therapievermittelten Reduktion der HT1080 Mikrometastasierung der Leber. Auch bei Cystatin C überexprimierenden Tieren ergab sich kein Hinweis auf reduzierte Mikrometastasierung. Bei Mäusen hingegen welche drei Tage vor der Tumorzellinokulation sowohl mit AdCysC als auch AdTIMP-1 transduziert wurden, konnte eine Induktion von Makrometastasen in der Leber beobachtet werden. In dieser Behandlungsgruppe konnten in 42% der Tiere Makrometastasen in der Leber gefunden werden, wobei im Durchschnitt bei diesen Tieren 17 Makrometastasen pro Leber detektiert wurden (Abb. 5.20). Diese Metastasen waren in der Regel von deutlich sichtbaren Kapseln umgeben (Abb. 5.21). In einigen Fällen waren die Metastasen vollständig von einer Kapsel umgeben (Abb. 5.21, rechts), in anderen Fällen umgab die Metastasen keine vollkommen geschlossene Kapsel (Abb. 5.21, links). Nur, wenn die Metastasen nicht vollständig von einer Kapsel umgeben waren, konnte eine sekundäre Invasion von HT1080-Zellen in das sie umgebene Lebergewebe beobachtet werden (Abb. 5.21, rechts, mit weissem Pfeil markiert). In keiner anderen Behandlungsgruppe konnten Makrometastasen in der Leber gefunden werden, wodurch unterstrichen wurde, dass die simultane Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 zu dieser starken Nebenwirkung führte. Diese war zudem organspezifisch, da in der gleichen Behandlungsgruppe eine sehr starke Reduktion der HT1080 Metastasierung der Lunge im Vergleich zur Kontrolle erreicht wurde (siehe Abschnitt 5.14). Um sowohl den für die Lunge erzielten Therapieerfolg als auch die in der Leber auftretende Makrometastasierung der Überexpression beider Transgene zuordnen zu können, musste zunächst die Expression beider Transgene *in vivo* nachgewiesen werden.



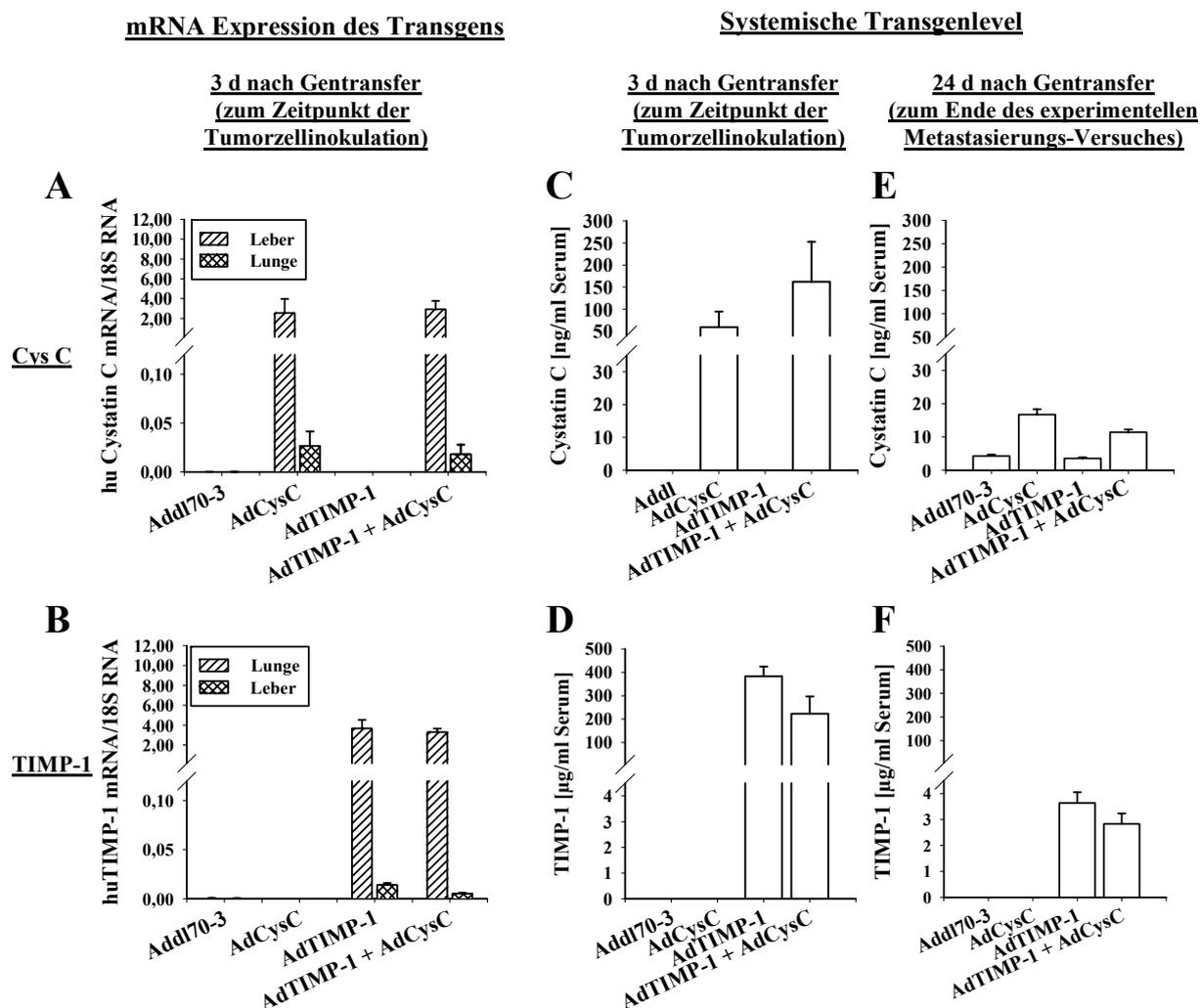


**Abbildung 5.21. Vergrößerte Aufnahme der durch simultane Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 induzierten HT1080 Leber-Makrometastasen.** Drei Tage vor der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  *lacZ*-markierter HT1080pLZ12/K15-1 Zellen/Maus i.v.) wurden CD1 *nu/nu* Mäuse mit AdCysC + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu Add170-3/Maus i.v.) behandelt. 21 Tage nach der Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert und die Lebern entnommen. Die Lebern wurden X-Gal gefärbt und die Makrometastasen an einem Stereomikroskop fotografiert. Dargestellt sind repräsentative Metastasen. Balken = 0,6 mm. Schwarze Pfeile markieren Kapsel, weisse Pfeile sekundäre Invasion der HT1080 Zellen.

### **5.16 Transduktion von Leber und Lunge und Sezernierung der Transgene in das Serum durch adenoviralen Gentransfer von Cystatin C und TIMP-1**

Als nächstes sollte untersucht werden ob der beobachtete anti-metastatische Effekt durch Cystatin C tatsächlich auf der Überexpression dieses Inhibitors beruhte. Zudem sollte überprüft werden, ob die durch simultane Überexpression von TIMP-1 und Cystatin C additiv reduzierte HT1080 Lungenmetastasierung bzw. die induzierte Makrometastasierung der Leber auf der Überexpression beider Transgene beruhte. Es musste ausgeschlossen werden, dass in der Doppelbehandlung eines der beiden Transgene in deutlich höherer oder niedrigerer Konzentration vorlag als in der jeweiligen Einzelbehandlung. Sollte eines der beiden Transgene in der Doppelbehandlung im Vergleich zu der entsprechenden Einzelbehandlung in veränderter Konzentration vorliegen, könnten die beobachteten Effekte nicht mehr allein auf die simultane Überexpression beider Transgene zurückgeführt werden.

Zum Nachweis der Transduktion von Leber bzw. Lunge durch AdCysC und/oder AdTIMP-1 bzw. zum Nachweis der Überexpression der Transgene, sollte die Expression beider humanen Gene in Lungen und Lebern auf RNA Ebene nachgewiesen werden, bzw. das durch den transduzierten Wirt sezernierte Cystatin C und/oder TIMP-1 Protein im Serum quantifiziert werden. Mittels quantitativer RT-PCR (TaqMan<sup>TM</sup>) wurde der relative Anteil humaner Cystatin C bzw. TIMP-1 mRNA in Lebern und Lungen transduzierter Mäuse drei Tage nach dem Gentransfer bestimmt. Dabei zeigte sich, dass AdCysC, wie auch zuvor AdPAI-2 bzw. AdTIMP-1, Leber und Lunge transduzierte wobei auch hier die Expression in der Leber um 99% stärker war als in der Lunge (Abb. 5.22 A). In den TIMP-1 transduzierten Organen wurden ungefähr die gleichen Mengen an TIMP-1 mRNA gefunden, wie Cystatin C mRNA in Organen von AdCysC transduzierten Tieren (Abb. 5.22 A, B). Auf Proteinebene hingegen wurde deutlich mehr TIMP-1 als Cystatin C Protein im Serum entsprechend behandelter Mäuse gefunden. Die Überexpression von TIMP-1 führte drei Tage nach dem Gentransfer zu durchschnittlich 303 µg pro ml Serum (Abb. 5.22 D) während die Überexpression von Cystatin C zum gleichen Zeitpunkt nur zu 60 ng pro ml Serum führte (Abb. 5.22 C). Dieses bedeutet, dass der Gehalt an Cystatin C in entsprechend behandelten Mäusen um  $6 \times 10^3$  geringer war als der des TIMP-1 Proteins in TIMP-1 überexprimierenden Tieren (Abb. 5.22 C, D; bitte die unterschiedlichen Einheiten (TIMP-1, µg; Cystatin C ng) der Y-Achse zu beachten). Am Tierversuchsende, d.h. 21 Tage nach der Tumorzellinokulation bzw. 24 Tage nach dem Gentransfer, konnten in AdTIMP-1 transduzierten Tieren noch deutliche Mengen an humanem TIMP-1, durchschnittlich 3,2 µg pro ml Serum nachgewiesen werden (Abb. 5.22 F). Der Gehalt an humanem Cystatin C Protein in AdCysC transduzierten Mäusen war hingegen nur



**Abbildung 5.22. Nachweis der Cystatin C und TIMP-1 *in vivo* Transgenexpression.** Drei Tage vor der Tumorzellinokulation wurden CD1 *nu/nu* Mäuse mit AdCysC ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.), AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.), AdCysC + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.) bzw. als Kontrolle mit Addl70-3 ( $6 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.) behandelt. Drei Mäuse pro Gruppe wurden zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation geopfert und Lungen, Lebern und Serum entnommen, die restlichen Mäuse wurden 21 Tage nach der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  HT1080pLZ12/K15-1/Maus, i.v.) geopfert und Serum entnommen. A-B. Gesamt-RNA aus Lebern bzw. Lungen von je drei Tieren pro Gruppe (drei Tage nach Gentransfer) wurde isoliert und die humane (hu) Cystatin C bzw. huTIMP-1 mRNA Expression mittels quantitativer RT-PCR (TaqMan<sup>TM</sup>) bestimmt. Als Kontrolle wurde 18S RNA quantifiziert und Mittelwerte und Standardfehler des relativen Anteils von huCystatin C bzw. huTIMP-1 mRNA zu 18S RNA dargestellt. A. Relativer Anteil an huCystatin C mRNA (Leber: Addl70-3:  $0,0001 \pm 0,0001$ ; AdCysC:  $2,56 \pm 1,41$ ; AdTIMP-1:  $0,000 \pm 0,000$ ; AdCysC + AdTIMP-1:  $2,93 \pm 0,82$ ; Lunge: Addl70-3:  $0,0001 \pm 0,0001$ ; AdCysC:  $0,027 \pm 0,015$ ; AdTIMP-1:  $0,000 \pm 0,000$ ; AdCysC + AdTIMP-1:  $0,018 \pm 0,010$ ). B. Relativer Anteil an huTIMP-1 mRNA (Leber: Addl70-3:  $0 \pm 0$ ; AdCysC:  $0 \pm 0$ ; AdTIMP-1:  $3,68 \pm 0,86$ ; AdCysC + AdTIMP-1:  $3,30 \pm 0,36$ ; Lunge: Addl70-3:  $0 \pm 0$ ; AdCysC:  $0 \pm 0$ ; AdTIMP-1:  $0,014 \pm 0,002$ ; AdCysC + AdTIMP-1:  $0,005 \pm 0,0009$ ). C-F. Quantitative Bestimmung der sezernierten humanen Transgene im Serum transduzierter Mäuse. C-D. Cystatin C (C; Addl70-3:  $0 \pm 0$ ; AdCysC:  $59,62 \pm 17,71$  ng/ml; AdTIMP-1:  $0 \pm 0$ ; AdCysC + AdTIMP-1:  $162,22 \pm 52,29$  ng/ml) bzw. TIMP-1 (D; Addl70-3:  $0 \pm 0$ ; AdCysC:  $0 \pm 0$ ; AdTIMP-1:  $383,10 \pm 23,91$  µg/ml; AdCysC + AdTIMP-1:  $223 \pm 42,36$  µg/ml) Gehalt im Serum von je drei Mäusen zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation, d.h. drei Tage nach dem Gentransfer. E-F. Cystatin C (E, Addl70-3:  $4,27 \pm 0,46$  ng/ml, n=4; AdCysC:  $16,73 \pm 1,61$  ng/ml, n=16; AdTIMP-1:  $3,56 \pm 0,30$  ng/ml, n=4; AdCysC + AdTIMP-1:  $11,43 \pm 0,83$ , n=12, ng/ml) bzw. TIMP-1 (F; Addl70-3  $0 \pm 0$ , n=4; AdCysC:  $0 \pm 0$ , n=4; AdTIMP-1:  $3,64 \pm 0,041$  µg/ml Serum, n=10; AdCysC + AdTIMP-1:  $2,83 \pm 0,40$  µg/ml Serum, n=12) Protein im Serum transduzierter Mäuse 21 Tage nach Tumorzellinokulation, 24 Tage nach dem Gentransfer.

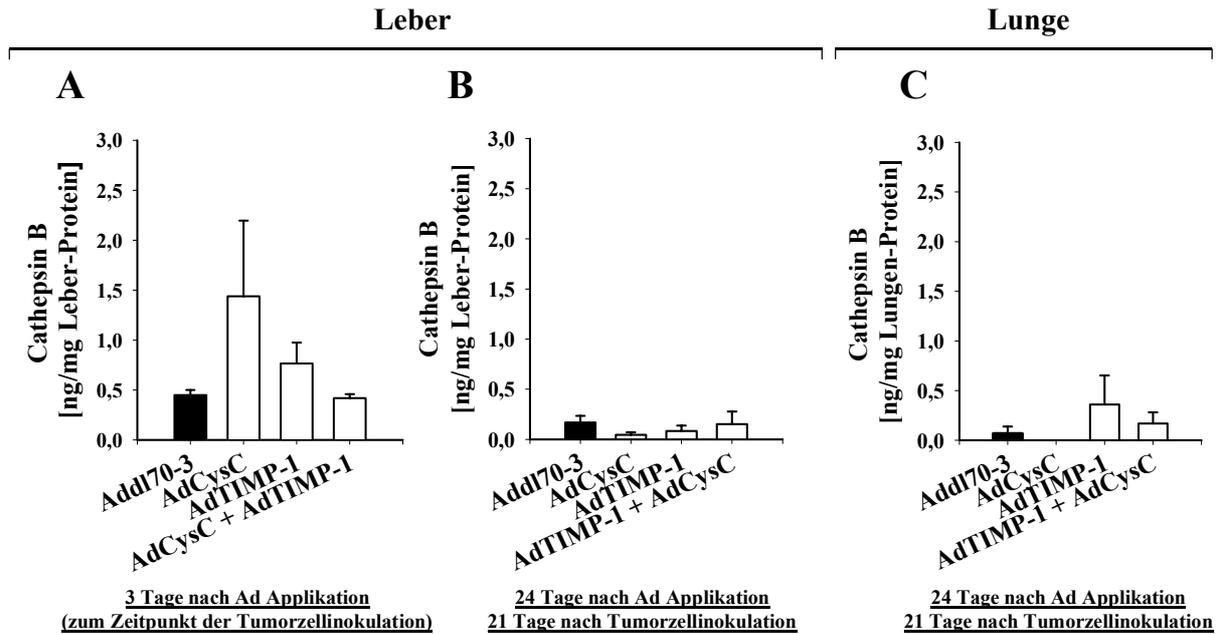
geringfügig höher, als das in den Addl70-3 transduzierten Mäusen durch die humanen Fibrosarkom-Metastasen sezernierte humane Cystatin C (Abb. 5.22 E). Die Zunahme an humanem Cystatin C Protein im Serum AdCysC transduzierter Mäuse um den Faktor 3,8 in der Einzel- bzw. um den Faktor 2,7 in der Doppelbehandlung im Vergleich zur Kontrolle war in beiden Fällen signifikant ( $P = 0,003$  bzw.  $P = 0,002$ ). Sowohl für TIMP-1 als auch für Cystatin C waren die Unterschiede in der Expression zwischen den Einzel- und Doppelbehandlungen weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene signifikant (alle  $P > 0,05$ , Abb. 5.22 A-F). Daher wurde gezeigt, dass auch bei diesem adenoviralen Gentransfer die gleichzeitige Transduktion des Wirtsgewebes durch zwei Viren mit verschiedenen Transgenen die Expression der einzelnen Transgene nicht beeinflusste und somit die durch Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 ausgelösten Effekte auf die simultane Überexpression der beiden Transgene zurückzuführen waren.

Da die simultane Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 zu einer Induktion von Leber-Makrometastasen führte, sollte im folgenden Abschnitt untersucht werden, ob eventuell eine veränderte Expression von Proteasen Auslöser dieser Nebenwirkung sein könnte.

### **5.17 Verstärkte Expression von Cathepsin B in der Leber durch Überexpression von Cystatin C**

Da die Überexpression des natürlichen MMP-Inhibitors TIMP-1 zu einem Anstieg der Expression des von ihm inhibierten MMP-9 führte, sollte untersucht werden, ob die Überexpression von Cystatin C ebenfalls zu einem Anstieg der Expression von ihm inhibierter Proteasen führt. Da die Ko-Expression von Cystatin C und TIMP-1 zur Induktion von Makrometastasen in der Leber führte, sollte unter anderem untersucht werden, ob ein durch diese simultane Überexpression ausgelöster Anstieg an Cathepsin B zu dieser Nebenwirkung beigetragen haben könnte.

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurde exemplarisch die Expression von Cathepsin B untersucht. Hierfür wurde Protein aus Lungen und Lebern AdCysC-, AdTIMP-1-, AdCysC und AdTIMP-1- bzw. zur Kontrolle aus Addl70-3 transduzierten Mäuse gewonnen und in einem Cathepsin B ELISA untersucht. In metastasenfrenen Tieren konnte drei Tage nach dem adenoviralen Gentransfer von Cystatin C bei allen untersuchten Lebern, wo die Expression von Cystatin C um 99% stärker war als in den Lungen, höhere Cathepsin B Konzentrationen gefunden werden als in der Addl70-3 transduzierten Kontrolle, wobei ein starker statistischer



**Abbildung 5.23. Cathepsin B Expression in Lungen und Lebern nach Transduktion mit AdCysC und AdTIMP-1.** Drei Tage vor der Tumorzellinokulation wurden CD1 *nu/nu* Mäuse mit AdCysC ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.), AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.), AdCysC + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.) bzw. als Kontrolle mit Addl70-3 ( $6 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.) behandelt. Drei Mäuse pro Gruppe wurden zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation geopfert und Lungen und Lebern entnommen, die restlichen Mäuse wurden 21 Tage nach der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  HT1080pLZ12/K15-1/Maus, i.v.) geopfert und ebenfalls Lungen und Lebern entnommen. Aus jeweils dem rechten Lungenflügel bzw. eines kleinen Stücks der Leberunterseite wurde Gesamtprotein gewonnen und dieses in einem Cathepsin B ELISA analysiert. Der linke Lungenflügel bzw. die restliche Leber wurde zur Quantifizierung der Metastasen X-Gal gefärbt. Dargestellt wurde jeweils der Gehalt an Cathepsin B in ng pro mg Gesamt-Protein. A. Mittelwerte und Standardfehler des Cathepsin B Proteins in Lebern von je drei Tieren der jeweiligen Gruppe zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation (Addl70-3:  $0,45 \pm 0,05$  ng/mg Protein; AdCysC:  $1,44 \pm 0,76$  ng/mg Protein; AdTIMP-1:  $0,77 \pm 0,21$  ng/mg Protein; AdCysC + AdTIMP-1:  $0,42 \pm 0,04$  ng/mg Protein). B. Mittelwerte und Standardfehler des Cathepsin B Proteins in je drei Lebern der jeweiligen Gruppe, 21 Tage nach der Tumorzellinokulation, 24 Tage nach dem Gentransfer (Addl70-3:  $0,17 \pm 0,07$  ng/mg Protein; AdCysC:  $0,05 \pm 0,03$  ng/mg Protein; AdTIMP-1:  $0,08 \pm 0,05$  ng/mg Protein; AdCysC + AdTIMP-1:  $0,15 \pm 0,12$  ng/mg Protein). C. Mittelwerte und Standardfehler des Cathepsin B Proteins von Lungen der Behandlungsgruppen mit gleichen oder geringeren Metastasenzahlen als die Addl70-3 Kontrolle, 21 Tage nach der Tumorzellinokulation, 24 Tage nach dem Gentransfer (Addl70-3:  $0,06 \pm 0,05$  ng/mg Protein, n=4, 0, 1, 12 und 23 Metastasen; AdCysC:  $0 \pm 0$  ng/mg Protein, n=3, 0, 0, und 4 Metastasen; AdTIMP-1:  $0,36 \pm 0,29$  ng/mg Protein, n=4, 0, 1, 2 und 5 Metastasen; AdCysC + AdTIMP-1:  $0,40 \pm 0,35$  ng/mg Protein, n=3, 0, 0, 4 Metastasen).

Trend erreicht wurde ( $P = 0,057$ , Abb. 5.23 A). In tumorfreien Lungen konnte hingegen kein Anstieg der Cathepsin B Expression beobachtet werden. Zum gleichen Zeitpunkt konnte bei keiner Behandlungsgruppe in den Lungen Cathepsin B detektiert werden (Abbildung nicht gezeigt). Die Expression von Cathepsin B in TIMP-1 transduzierten Lebern war leicht erhöht, in der Doppelbehandlungsgruppe mit AdCysC und AdTIMP-1 konnten jedoch keine erhöhten Werte für die Cathepsin B Expression gefunden werden (Abb. 5.23 A).

Da TIMP-1 zu einem Anstieg der Cathepsin B Expression in metastasenträgenden Lungen führte, sollte zusätzlich die Cathepsin B Konzentration in Lungen der AdCysC, AdTIMP-1 bzw. AdCysC und AdTIMP-1 Behandlungen 21 Tage nach der Inokulation der HT1080pLZ12/K15-1 Zellen bestimmt werden. Zur Kontrolle wurde die Cathepsin B Konzentration in Lungen aus Add170-3 transduzierten Mäusen ermittelt. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Cathepsin B Expression mit der Anzahl der Lungenmetastasen korrelierte wurden solche Lungen der Kontrolle ausgewählt, die in ihrer Metastasenzahl denen aus den Behandlungsgruppen entsprachen. Daher wurde das Protein nur aus den jeweils rechten Lungenflügeln isoliert und die Menge des Cathepsin B Proteins mittels ELISA bestimmt, während die jeweils linken Lungenflügel für die Quantifizierung der Metastasen X-Gal gefärbt wurden. Dabei stellte sich heraus, dass in allen TIMP-1 transduzierten Lungen, sowohl der Einzel- als auch Doppelbehandlung, mit gleicher oder geringerer Metastasenzahl als in der Kontrolle, deutlich mehr Cathepsin B nachgewiesen werden konnte als in den Lungen der Kontrolle (Abb. 5.23 C). In den Lebern hingegen konnte zum gleichen Zeitpunkt, d.h. 21 Tage nach der Tumorzellinokulation und 24 Tage nach dem adenoviralen Gentransfer, in allen Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Cathepsin B mehr gefunden werden (alle  $P > 0,4$ ; Abb. 5.23 B). Zu diesem Zeitpunkt wurde aufgrund der transienten Expression der Transgene nur noch 27% der nach drei Tagen gemessenen Cystatin C Konzentration erreicht (siehe Abschnitt 5.16), welches erklären könnte, dass nunmehr in den AdCysC transduzierten Lebern keine verstärkte Cathepsin B Expression mehr detektiert wurde.

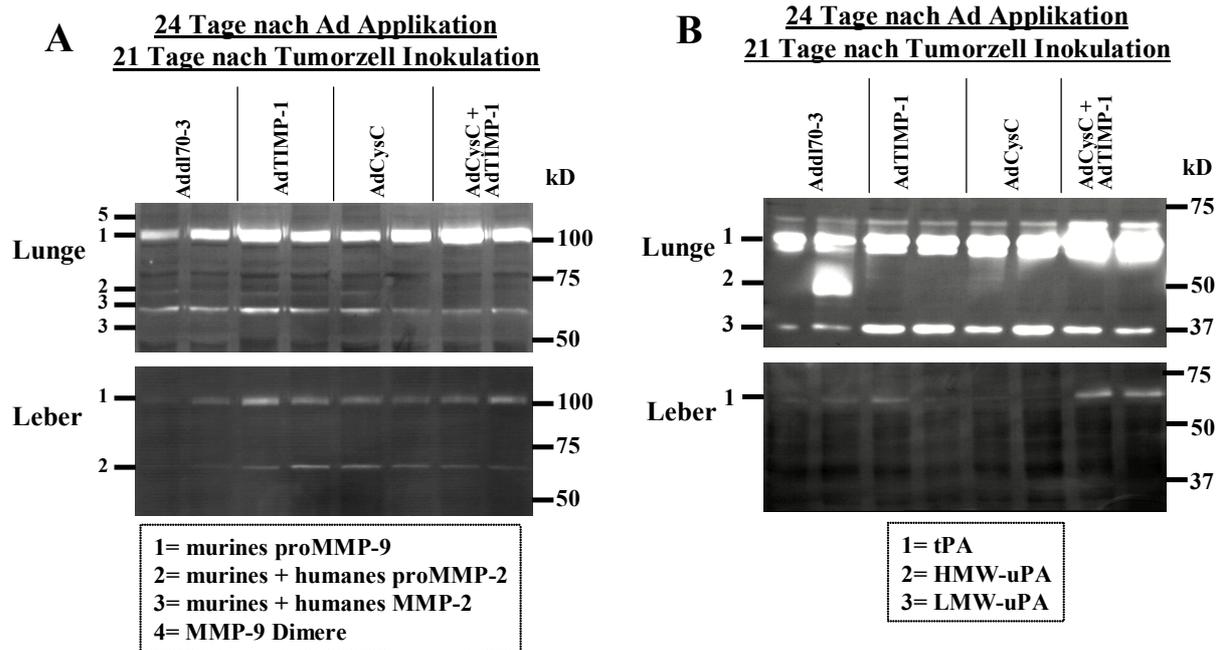
Da die Behandlung mit AdCysC zu dem höchsten Anstieg an Cathepsin B in den Lebern zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation führte, die alleinige Überexpression von Cystatin C jedoch kein Einfluss auf die Metastasierung der Leber besaß, scheint der Cathepsin B Anstieg nicht ausschließlich die Ursache für die Induktion der Makrometastasierung in der Leber zu sein. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Inhibition von zwei Proteasesystemen, d.h. des MMP-Systems und der Cysteinproteasen, zu einem Anstieg an Gelatinasen

bzw. Plasminogen-Aktivatoren führte, um zu beurteilen, ob evt. eines dieser Proteasesysteme an der Ausbildung der Makrometastasen in der Leber beteiligt sein könnte.

### **5.18 Verstärkte Expression von tPA durch simultane Überexpression von TIMP-1 und Cystatin C**

Da die Menge an Cathepsin B Protein in der Lunge mit der Anzahl an Lungenmetastasen korrelierte und TIMP-1 zusätzlich die Expression von Cathepsin B in der Lunge erhöhte, wurde angenommen, dass die simultane Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 eine additive anti-metastatische Wirksamkeit entfalten würde. In dem verwendeten Metastasierungsmodell wurde die Lungenmetastasierung, wie angenommen, durch diese Behandlung stark reduziert, jedoch kam es bei 42% der Tiere dieser Gruppe zur Generierung von Makrometastasen in der Leber. Durch die Überexpression von TIMP-1 kam es zum einem zu einem Anstieg der Expression von MMP-9 in Lunge und Leber, zum anderen zu einem Anstieg von Cathepsin B in der Lunge. In der Doppelbehandlung mit AdTIMP-1 und AdCysC sollten diese Effekte ausgelöst von TIMP-1 durch die überexprimierten Inhibitoren jedoch kompensiert werden. Für den TIMP-1-induzierten Anstieg der MMP-9 Expression konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass das überexprimierte TIMP-1 Protein ausreichend vorhanden war, diese Nebenwirkung zu kompensieren. Nun sollte untersucht werden, ob sich dieser MMP-9 Expressions-fördernde Effekt von TIMP-1 auch in der Kombination mit Cystatin C einstellte. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob durch die simultane Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 die Expression der Plasminogen-Aktivatoren beeinflusst wurde, da die Inhibition von Cysteinproteinasen auch die Aktivität des PA-Systems beeinflusst.

Um diese Fragestellungen zu beantworten wurde Protein aus Lungen und Lebern AdCysC, AdTIMP-1, AdCysC und AdTIMP-1 bzw. zur Kontrolle aus Add170-3 behandelte Mäuse gewonnen und mittels MMP- bzw. PA-Zymographie analysiert. Auch in Lungen und Lebern von mit AdCysC und AdTIMP-1 transduzierten Mäusen konnte erneut ein Anstieg der MMP-9 Expression beobachtet werden, der selbst zum Ende des experimentellen Metastasierungsversuches noch in ca. 50% der Tiere nachweisbar war (Abb. 5.24 A). Durch das Testen dieser Proben im MMP-9 Aktivitätsassay konnte jedoch gezeigt werden, dass auch in dieser Gruppe die Menge an transgenem TIMP-1 Protein ausreichend war die proMMP-9 Aktivierung in Lungen und Lebern zu inhibieren (Abbildung nicht gezeigt). Der Nachweis der Plasminogen-Aktivatoren in Lebern und Lungen AdCysC und/oder AdTIMP-1 transduzierter Tiere ergab,



**Abbildung 5.24. Expression der Gelatinasen bzw. Plasminogen-Aktivatoren in AdTIMP-1 und AdCysC behandelten Mäusen am Ende des experimentellen Metastasierungsversuches.** Drei Tage vor der Tumorzellinokulation wurden CD1 *nu/nu* Mäuse mit AdCysC ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.), AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.), AdCysC + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.) bzw. als Kontrolle mit Addl70-3 ( $6 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus, i.v.) behandelt. 21 Tage nach der Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert und Lungen und Lebern entnommen. Aus diesen Organen wurde Gesamt-Protein gewonnen und dieses zymographisch analysiert. A. Expression der Gelatinasen in Lungen (oben) und Lebern (unten). Es wurden je 25  $\mu$ g Protein pro Probe auf MMP-Zymogramme aufgetragen. B. Expression der PAs in Lungen (oben) und Lebern (unten). Es wurden je 7,5  $\mu$ g Protein pro Probe auf PA-Zymogramme aufgetragen. Dargestellt sind jeweils zwei repräsentative Proben je Gruppe.

dass nur in Tieren welche Cystatin C und TIMP-1 überexprimierten die Expression von tPA erhöht war (Abb. 5.24 B, Spuren 1 und 2 von rechts). Die Expression von tPA war in dieser Gruppe sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch zu den Einzelbehandlungen deutlich verstärkt. In der Leber war dieser Anstieg besonders deutlich zu erkennen, da außer in der Doppelbehandlung bei allen anderen Tieren kein oder nur sehr wenig tPA detektierbar war (Abb. 5.24 B, unten). Auch in der Lunge, wo ein höheres Basislevel an tPA detektiert wurde als in der Leber, war die verstärkte Expression von tPA deutlich zu erkennen (Abb. 5.24 B, oben). Im Serum der mit den entsprechenden Viren transduzierten Mäuse konnten keine veränderten Mengen an tPA nachgewiesen werden (Abbildung nicht gezeigt), wodurch die in den Organen gefundenen Anstiege an tPA keine Reflektion des tPA-Gehaltes des Blutes darstellten. Es konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass die uPA Expression in der Lunge mit der Anzahl an HT1080 Metastasen korrelierte (siehe Abschnitt 5.6). Da die Über-

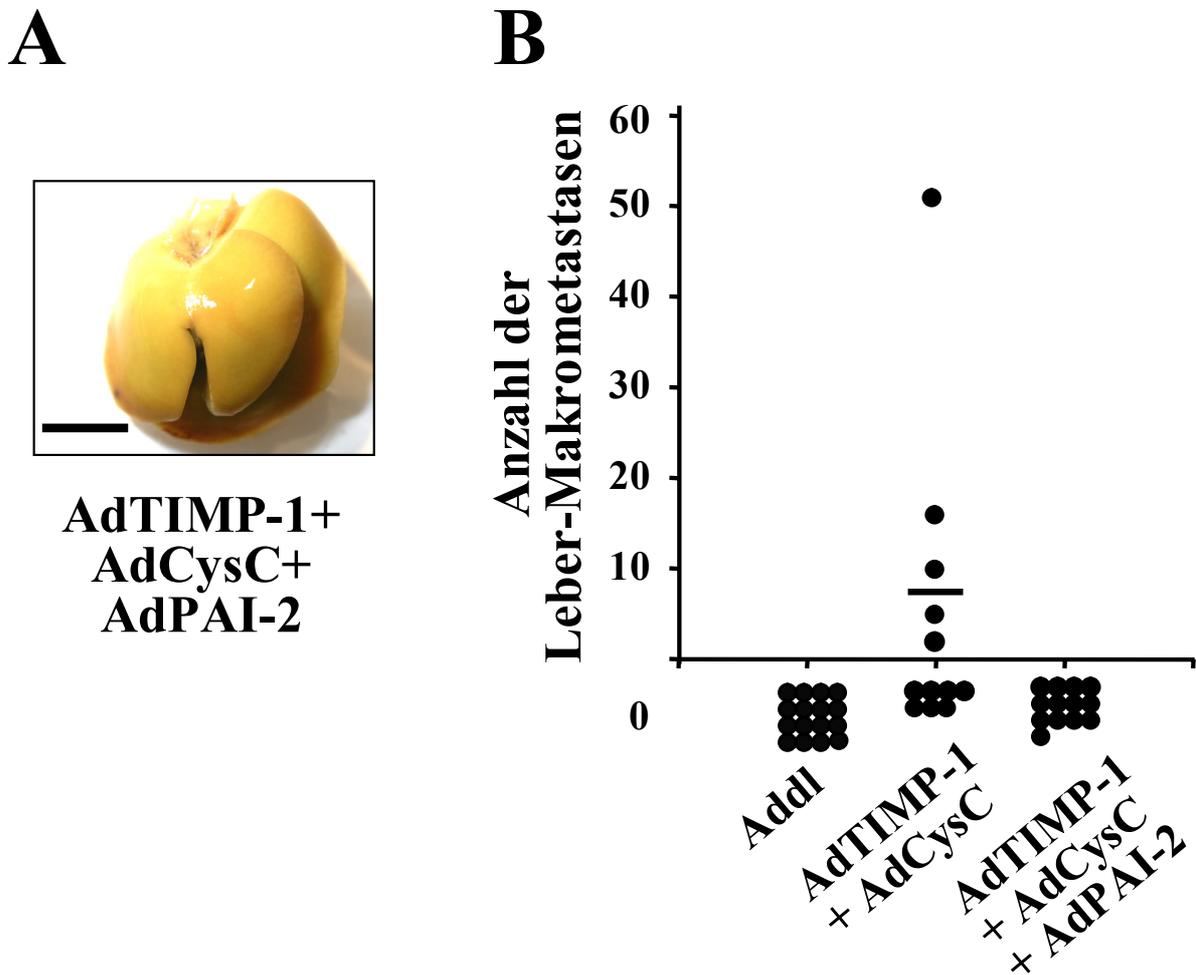
expression von TIMP-1 und/oder Cystatin C die Lungenmetastasierung deutlich reduzierte, konnte in Lungen dieser Behandlungsgruppen kein uPA nachgewiesen werden, während in Kontrollen mit hoher Metastasenzahl uPA zymographisch detektierbar war (Abb. 5.24 B).

Mit tPA konnte hingegen ein Faktor identifiziert werden, der mit der simultanen Expression von Cystatin C und TIMP-1 und somit auch mit der Leber-Makrometastasierung korrelierte. Daher sollte, um den Zusammenhang zwischen tPA-Aktivität und Makrometastasierung der Leber näher zu untersuchen, zusätzlich zu Cystatin C und TIMP-1 ein natürlicher Inhibitor von tPA, PAI-2, im Wirtsgewebe überexprimiert werden.

### **5.19 Unterdrückung der durch Ko-Expression von TIMP-1 und Cystatin C induzierten Leber-Makrometastasierung durch additive Überexpression von PAI-2**

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben führte die simultane Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 zu einer Induktion von HT1080 Makrometastasen in der Leber (siehe Abschnitt 5.15). In dieser Behandlungsgruppe konnte zudem ein Anstieg an tPA in den Lebern festgestellt werden, was vermuten lässt, dass die Aktivität von tPA an der Ausbildung dieser Makrometastasen beteiligt sein könnte. Durch zusätzliche Überexpression von PAI-2, einem natürlichen Inhibitor von tPA, sollte nun überprüft werden, ob sich die durch TIMP-1 und Cystatin C vermittelte Nebenwirkung in der Leber reduzieren lässt wenn PAs inhibiert werden. Um eine möglichst hohe PAI-2, Cystatin C bzw. TIMP-1 Expression im Wirtsgewebe zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation zu erreichen, wurden CD1 *nu/nu* Mäuse drei Tage vor der Inokulation von HT1080pLZ12/K15-1 Zellen mit den entsprechenden Viren transduziert. 21 Tage nach der Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert, die Lebern entnommen und X-Gal gefärbt. Es zeigte sich, dass die zusätzliche Expression von PAI-2 die durch simultane Überexpression von TIMP-1 und Cystatin C-induzierte Makrometastasierung der Leber unterdrückte. In der Dreifachbehandlung konnten, ebenso wie in der Addl70-3 transduzierten Kontrolle, keine HT1080 Makrometastasen in der Leber gefunden werden (Abb. 5.25). Dieses Ergebnis bestätigte, dass Plasminogen-Aktivatoren an der Ausbildung dieser TIMP-1 und Cystatin C-vermittelten Nebenwirkung beteiligt waren.

Neben den Auswirkungen der Inhibition von drei tumorassoziierten Protease-Systemen auf die Leber-Metastasierung sollte im folgenden überprüft werden, ob die Inhibition dieser drei Proteasefamilien gegenüber den Einzel- bzw. Doppelbehandlungen eine additive anti-metastatische Wirksamkeit in der Lunge entfaltetete.



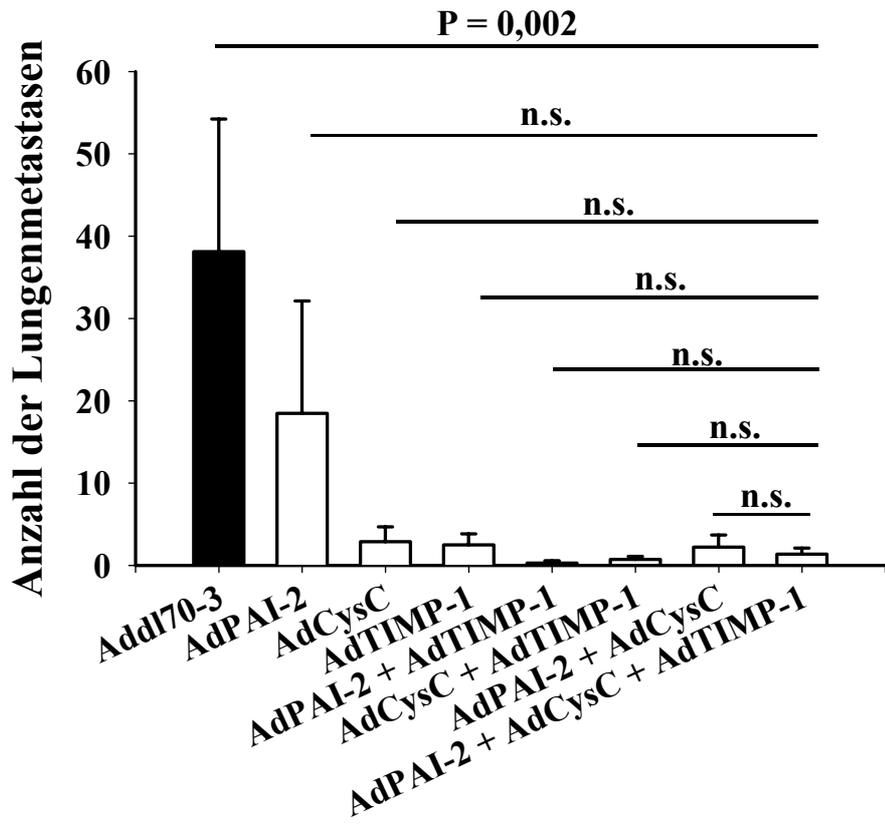
**Abbildung 5.25. Additive Überexpression von PAI-2 unterdrückte die durch simultane Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 induzierte Makrometastasierung der Leber.** Drei Tage vor der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  *lacZ*-markierter HT1080pLZ12/K15-1 Zellen/Maus i.v.) wurden CD1 *nu/nu* Mäuse mit AdCysC + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.), AdCysC + AdTIMP-1 + AdPAI-2 ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2/Maus i.v.) bzw. als Kontrolle mit Addl70-3 ( $6 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.) behandelt. 21 Tage nach der Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert und die Lebern entnommen. Die Lebern wurden X-Gal gefärbt und die Anzahl an Makrometastasen ( $>0,1$  mm) wurden gezählt. A. Fotografie einer repräsentativen X-Gal gefärbten Leber der Dreifachbehandlung (Fotografien repräsentativer Lebern der Addl70-3 bzw. AdCysC + AdTIMP-1 Behandlungsgruppe sind in Abb. 5.20 dargestellt). B. Anzahl der Makrometastasen auf der Leber jedes Tieres. Dargestellt wurde der Wert für jede Maus der angegebenen Behandlungsgruppen. Balken markiert den Mittelwert der Doppelbehandlung. Balken=8 mm.

### **5.20 Vergleich aller in dieser Arbeit verwendeten Behandlungen hinsichtlich der Reduktion von HT1080 Lungenmetastasen**

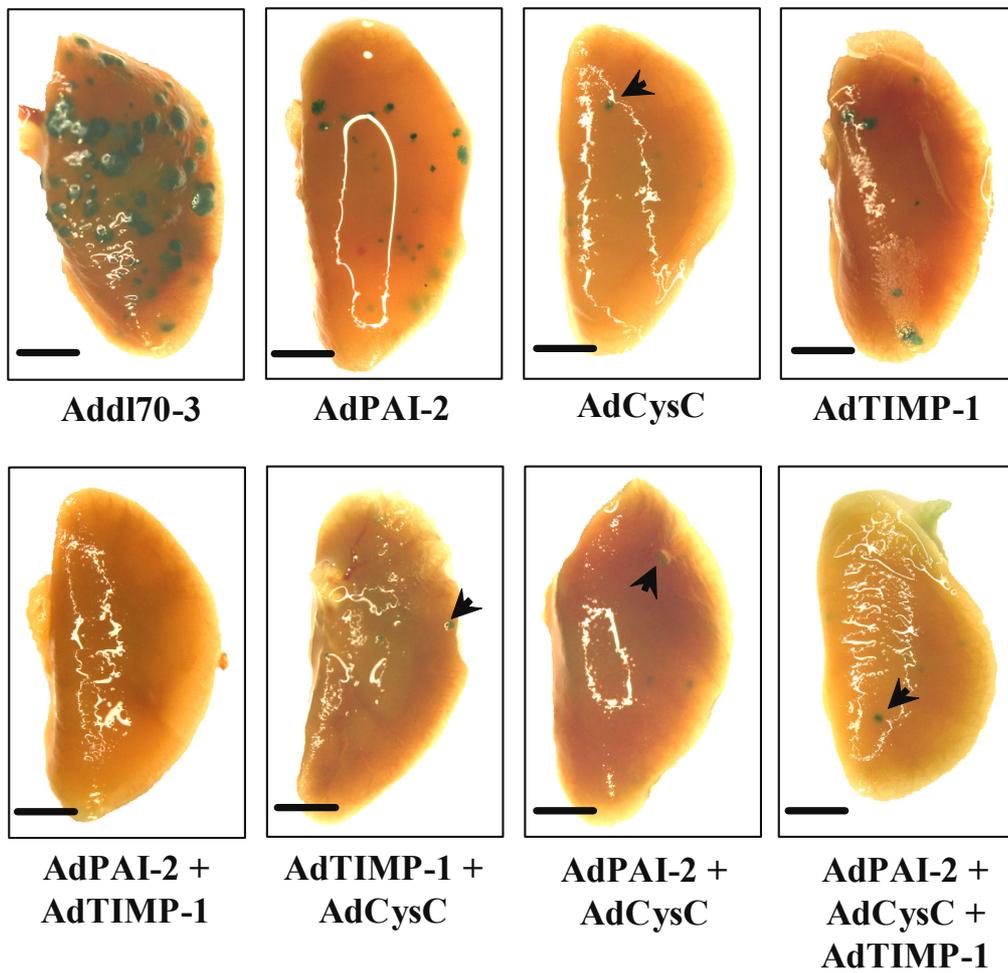
Nachdem bereits die Inhibition von jeweils zwei tumorassoziierten Protease-Systemen zu einer additiven Reduktion der Lungenmetastasierung der verwendeten Fibrosarkomzellen führte, sollte überprüft werden, ob die zusätzliche Inhibition eines dritten Systems einen zusätzlichen additiven anti-metastatischen Effekt aufwies. Um eine möglichst hohe Expression der Inhibitoren im Wirtsgewebe zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation zu erreichen, wurden CD1 *nu/nu* Mäuse drei Tage vor der Inokulation von HT1080pLZ12/K15-1 Zellen mit AdCysC, AdTIMP-1, AdPAI-2 und allen Kombinationsmöglichkeiten bzw. zur Kontrolle mit Addl70-3 behandelt. 21 Tage nach der Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert, die Lungen entnommen und zur Quantifizierung der Metastasierung X-Gal gefärbt. Dabei ergab sich, dass die in dieser Arbeit bisher nicht erwähnte simultane Überexpression von PAI-2 und Cystatin C die Metastasierung in die Lunge signifikant um 94% im Vergleich zur Kontrolle inhibierte sich aber gegenüber den Einzelbehandlungen kein signifikanter additiver Effekt herausstellte, obwohl die Reduktion der Lungenmetastasen durch diese Behandlung im Vergleich zur alleinigen Expression von PAI-2 um 88% im Vergleich zur alleinigen Überexpression von Cystatin C um 23% effektiver war (Abb. 5.26).

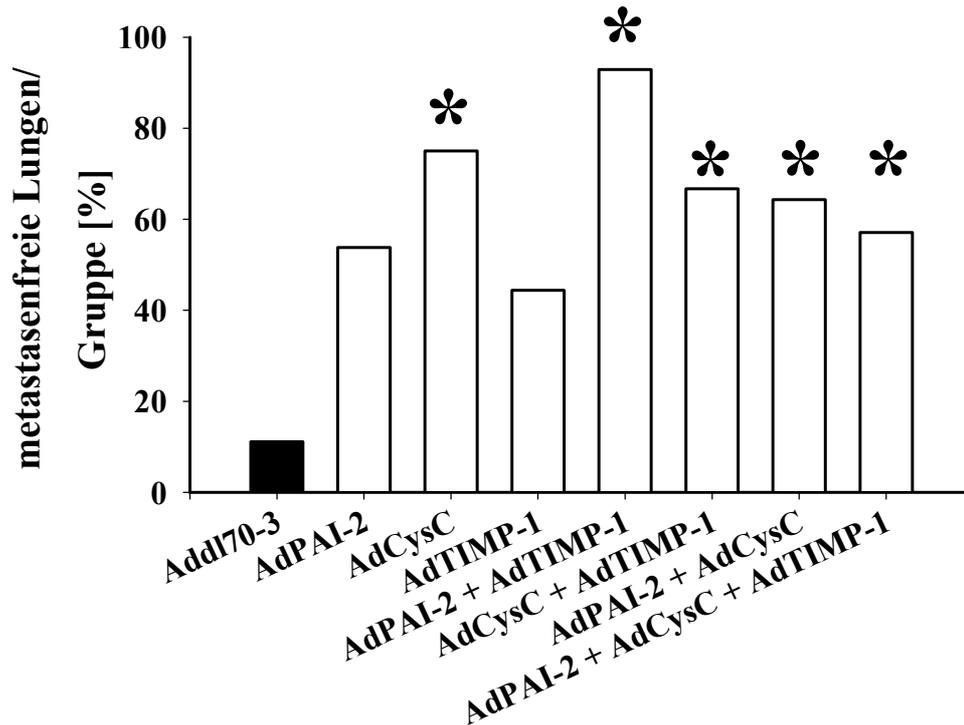
**Abbildung 5.26. (siehe nächste Seite). Simultane Überexpression von TIMP-1, Cystatin C und PAI-2 inhibierte die experimentelle Lungenmetastasierung durch HT1080 Zellen signifikant.** Drei Tage vor der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  *lacZ*-markierter HT1080pLZ12/K15-1 Zellen/Maus) wurden CD1 *nu/nu* Mäuse mit AdPAI-2 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.), AdCysC ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus), AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus), AdPAI-2 + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.), AdCysC-1 + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus), AdPAI-2 + AdCysC ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $2 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.), AdPAI-2 + AdCysC + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $2 \times 10^9$  pfu /AdTIMP-1/Maus i.v.) bzw. als Kontrolle mit Addl70-3 ( $6 \times 10^9$  pfu/Maus i.v.) behandelt. 21 Tage nach der Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert und die Lungen entnommen. Die linke Lungenhälfte wurde X-Gal gefärbt. A. Anzahl der Lungenmetastasen. Alle Metastasen auf der Oberfläche der linken Lungenhälfte wurden ausgezählt. Mittelwerte, Standardfehler (Addl70-3:  $38,1 \pm 16,1$ , n=16; AdPAI-2:  $18,5 \pm 13,7$ , n=13; AdCysC:  $2,9 \pm 1,8$ , n=16; AdTIMP-1:  $2,5 \pm 1,4$ , n=10; AdPAI-2 + AdTIMP-1:  $0,3 \pm 0,3$ , n=14; AdCysC + AdTIMP-1:  $0,8 \pm 0,4$ , n=12; AdPAI-2 + AdCysC:  $2,2 \pm 1,5$ , n=14; AdPAI-2 + AdCysC + AdTIMP-1:  $1,4 \pm 0,7$ , n=13) und Ergebnis der statistischen Analyse sind dargestellt. B. X-Gal gefärbte Lungen. Fotografien repräsentativer X-Gal gefärbter Lungen je Gruppe. Balken = 2,5 mm. n.s.: nicht signifikant.

**A**



**B**



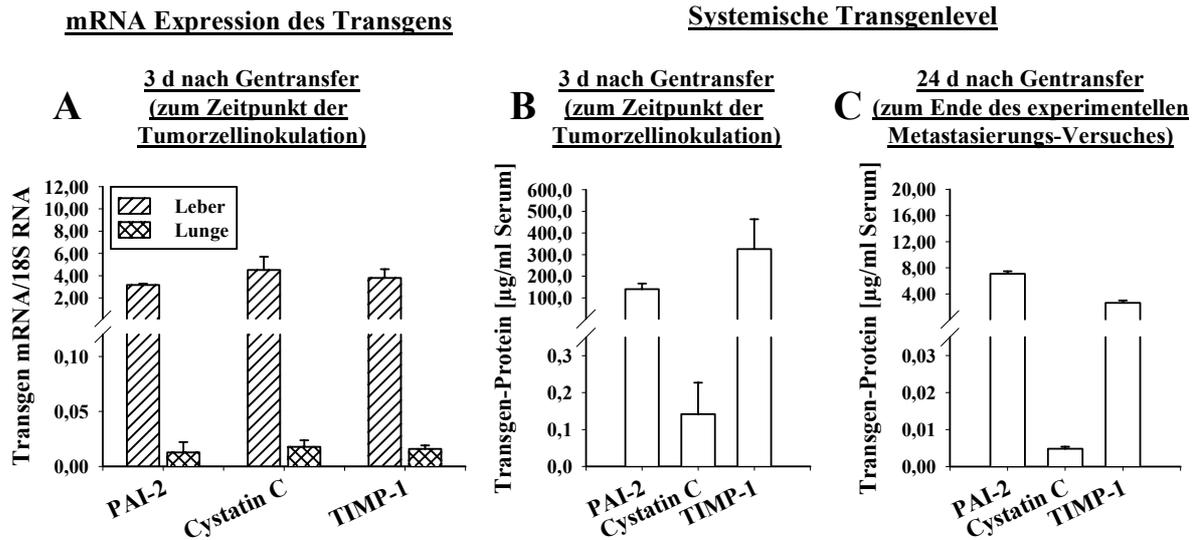


**Abb. 5.27. Simultane Überexpression von TIMP-1, Cystatin C und PAI-2 steigerte die Anzahl metastasenfreier Lungen signifikant im Vergleich zur Kontrolle.** Drei Tage vor der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  *lacZ*-markierter HT1080pLZ12/K15-1 Zellen/Maus) wurden CD1 *nu/nu* Mäuse mit AdPAI-2 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.), AdCysC ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus), AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus), AdPAI-2 + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.), AdCysC + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus), AdPAI-2 + AdCysC ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $2 \times 10^9$  pfu Addl70-3/Maus i.v.), AdPAI-2 + AdCysC + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $2 \times 10^9$  pfu /AdTIMP-1/Maus i.v.) bzw. als Kontrolle mit Addl70-3 ( $6 \times 10^9$  pfu/Maus i.v.) behandelt. 21 Tage nach der Tumorzellinokulation wurden die Tiere geopfert und die Lungen entnommen. Die linke Lungenhälfte wurde X-Gal gefärbt, die Anzahl metastasenfreier Organe bestimmt und der prozentuale Anteil metastasenfreier Lungen pro Gruppe dargestellt (Addl70-3: 18,8%, n=16; AdPAI-2: 53,8%, n=13; AdCysC: 75,0%, n=16; AdTIMP-1: 40,0%, n=10; AdPAI-2 + AdTIMP-1: 92,9%, n=14; AdCysC + AdTIMP-1: 66,7%, n=12; AdPAI-2 + AdCysC: 64,3%, n=14; AdPAI-2 + AdCysC + AdTIMP-1: 61,5%, n=13). Sterne: Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (AdCysC:  $P = 0,0046$ ; AdPAI-2 + AdTIMP-1:  $P = 0,00022$ ; AdCysC + AdTIMP-1:  $P = 0,03$ ; AdPAI-2 + AdCysC:  $P = 0,03$ ; AdPAI-2 + AdCysC + AdTIMP-1:  $P = 0,03$ ).

Die simultane Inhibition der MMPs, der papainähnlichen CPs und des PA-Systems besaß verglichen mit der Kontrolle sowie mit allen Einzelbehandlungen eine größere anti-metastatische Wirksamkeit. Die Anzahl der HT1080 Lungenmetastasen war durch die Dreifachbehandlung verglichen mit der Addl70-3 transduzierten Kontrolle signifikant um 96% effektiver (Abb. 5.26), verglichen mit der jeweils alleinigen Überexpression von PAI-2, Cystatin C bzw. TIMP-1 war die Dreifachbehandlung trotz einer um 92%, 52% bzw. 45% höheren Wirksamkeit nicht signifikant (alle  $P > 0,47$ ; Abb. 5.26). Ein additiver Effekt bei der Reduktion der Lungenmetastasen durch die simultane Überexpression von PAI-2, Cystatin C und TIMP-1 im Vergleich zu den Doppelbehandlungen konnte nur im Vergleich mit der Überexpression von PAI-2 und Cystatin C beobachtet werden. In diesem Fall war die Dreifachbehandlung um 37% wirksamer, erreichte aber keine statistische Signifikanz ( $P = 0,961$ ; Abb. 5.26). Die anti-metastatische Wirksamkeit der simultanen Überexpression aller drei Inhibitoren führte zu einem signifikanten Anstieg der metastasenfremen Lungen um einen Faktor von 3,3 im Vergleich zur Kontrolle auf einen Anteil von metastasenfremen Lungen pro Gruppe von 62% (Abb. 5.27). Auffallenderweise war bei allen Gruppen bei denen Cystatin C überexprimiert wurde die Anzahl metastasenfrem Lungen signifikant im Vergleich zur Kontrolle erhöht, der stärkste Anstieg metastasenfrem Lungen wurde jedoch durch die simultane Überexpression von PAI-2 und TIMP-1 erzielt (Abb. 5.27). Um die durch die Dreifachbehandlung erzielten Effekte auf die Lungen- und Leber-Metastasierung auf die Expression aller drei Transgene zurückführen zu können, musste als nächstes überprüft werden, ob die Expressionen der einzelnen Transgene dort in gleicher Stärke erfolgte wie in den entsprechenden Doppel- bzw. Einzelbehandlungen.

### **5.21 Nachweis des Gentransfers und der Transgen Überexpression in Tieren der Dreifachbehandlung**

Als nächstes sollte untersucht werden, ob der beobachtete anti-metastatische Effekt in der Lunge bzw. die Unterdrückung der durch Cystatin C und TIMP-1 ausgelösten Makrometastasierung der Leber tatsächlich auf der zusätzlichen Überexpression von PAI-2 basierte. Hierfür musste überprüft werden, ob die Expression der drei Transgene in der Dreifach-, Doppel- bzw. in den entsprechenden Einfachbehandlungen jeweils gleich stark war, um auszuschließen, dass die für die Dreifachbehandlung mit PAI-2, Cystatin C und TIMP-1 beobachteten Effekte auf Unterschieden der Inhibitor-Konzentrationen zwischen den entsprechenden Behandlungsgruppen beruhten. Um dieses zu untersuchen sollte die Expression aller drei



**Abbildung 5.28. Nachweis der PAI-2, Cystatin C und TIMP-1 *in vivo* Transgenexpression in den Mäusen der Dreifachbehandlung.** Drei Tage vor der Tumorzellinokulation wurden CD1 *nu/nu* Mäuse mit AdPAI-2, AdCysC und AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1/Maus i.v.) transduziert. Drei Mäuse wurden zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation geopfert und Lungen, Lebern und Serum entnommen, die restlichen Mäuse wurden 21 Tage nach der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  HT1080pLZ12/K15-1/Maus, i.v) geopfert und Serum entnommen. A. Gesamt-RNA aus Lebern bzw. Lungen von drei Tieren wurde isoliert und die humane (hu) PAI-2, huCystatin C bzw. huTIMP-1 mRNA Expression mittels quantitativer RT-PCR (TaqMan<sup>TM</sup>) bestimmt. Als Kontrolle wurde 18S RNA bestimmt und Mittelwerte und Standardfehler des relativen Anteils von huPAI-2 (Lunge:  $0,013 \pm 0,009$ ,  $n=3$ ; Leber:  $3,16 \pm 0,12$ ,  $n=3$ ), huCystatin C (Lunge:  $0,018 \pm 0,006$ ,  $n=3$ ; Leber:  $4,51 \pm 1,19$ ,  $n=3$ ) bzw. huTIMP-1 (Lunge:  $0,016 \pm 0,003$ ,  $n=3$ ; Leber:  $3,79 \pm 0,79$ ,  $n=3$ ) mRNA zu 18S RNA dargestellt. B-C. Quantitative Bestimmung der sezernierten humanen Transgene im Serum transduzierter Mäuse mittels ELISA Systemen. B. PAI-2 ( $140,5 \pm 25,8$   $\mu\text{g/ml Serum}$ ), Cystatin C ( $141,70 \pm 85,60$  ng/ml Serum) bzw. TIMP-1 ( $326,1 \pm 137,1$   $\mu\text{g/ml Serum}$ ) Gehalt im Serum von drei Mäusen zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation, d.h. drei Tage nach dem Gentransfer. C. PAI-2 ( $7,1 \pm 0,38$   $\mu\text{g/ml Serum}$ ,  $n=13$ ), Cystatin C ( $6,23 \pm 0,56$  ng/ml Serum,  $n=13$ ) bzw. TIMP-1 ( $2,63 \pm 0,38$   $\mu\text{g/ml Serum}$ ,  $n=13$ ) Gehalt im Serum transduzierter Mäuse 21 Tage nach der Tumorzellinokulation, 24 Tage nach dem Gentransfer.

Transgene in Lungen und Lebern auf RNA Ebene nachgewiesen werden, sowie das humane PAI-2, Cystatin C bzw. TIMP-1 Protein im Serum von mit allen drei Adenoviren behandelten Mäusen quantifiziert werden. Mittels quantitativer RT-PCR (TaqMan<sup>TM</sup>) wurde der relative Anteil humaner PAI-2, humaner Cystatin C bzw. humaner TIMP-1 mRNA in Lebern und Lungen transduzierter Mäuse drei Tage nach dem Gentransfer bestimmt. Dabei zeigte sich, dass auch in der Dreifachbehandlung alle drei Viren Lebern und Lungen transduzierten wobei auch hier die Expression in der Leber jeweils um 99% stärker war als in der Lunge. Die Expression aller drei Transgene war sowohl in den Lebern als auch in den Lungen gleich stark, womit erneut gezeigt werden konnte, dass die Transduktion der Organe mit einem Adenovirus nicht die Transduktion des jeweiligen Organs durch ein weiteres Adenovirus beeinflusste (Abb. 5.28 A). Die Expressionsstärken der einzelnen Transgene in der Dreifachbehandlung

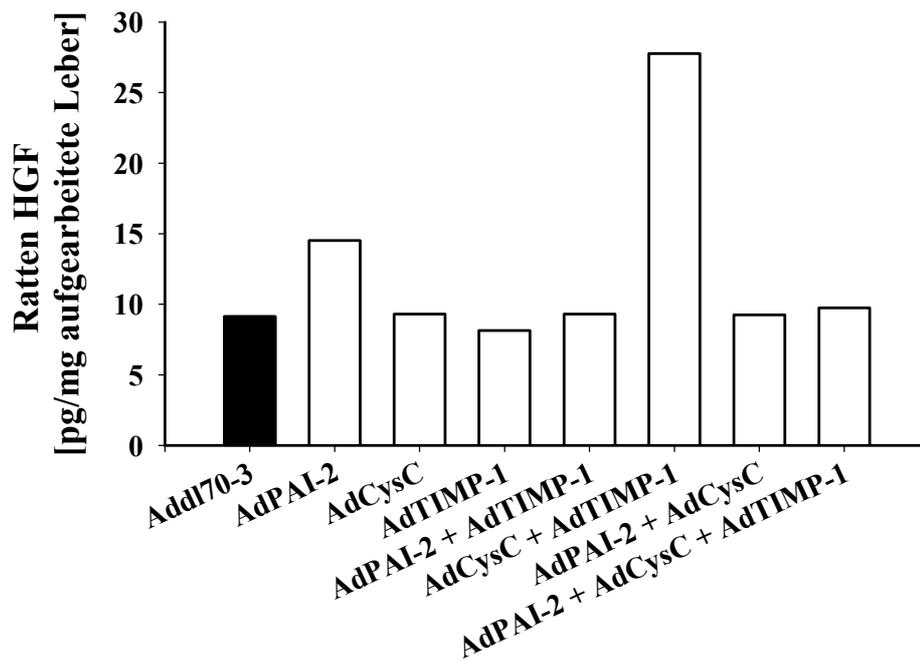
unterschieden sich auf RNA-Ebene nicht signifikant von denen in den entsprechenden Doppel- und Einzelbehandlungen (alle  $P > 0,05$ ; Abb. 5.28 A, vgl. mit Abb. 5.11 und 5.22 jeweils A und B). Auf Proteinebene wurde in der Dreifachbehandlung, wie zuvor, deutlich weniger Cystatin C Protein im Serum der Mäuse gefunden als PAI-2 und TIMP-1 Protein. Zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation, d.h. drei Tage nach dem Gentransfer, war der Gehalt an Cystatin C um das  $2,3 \times 10^3$  geringer als der des TIMP-1 und um  $1 \times 10^3$  geringer als der des PAI-2 Proteins (Abb. 5.28 B). Am Tierversuchsende, d.h. 21 Tage nach der Tumorzellinokulation bzw. 24 Tage nach dem Gentransfer, konnten noch deutliche Mengen an humanem TIMP-1 bzw. PAI-2, durchschnittlich  $2,6 \mu\text{g TIMP-1/ml}$  bzw.  $7,1 \mu\text{g PAI-2/ml Serum}$  nachgewiesen werden, während der humane Cystatin C Gehalt, mit durchschnittlich  $6,23 \text{ ng Cystatin C/ml Serum}$ , in den behandelten Mäusen nur geringfügig höher war, als das durch die humanen Fibrosarkomzellen sezernierte humane Cystatin C (Abb. 5.28 C, vgl. mit 5.22 E). Dieser Unterschied der Cystatin C Konzentration in der Dreifachbehandlung war im Vergleich zu den Werten der Kontrolle jedoch signifikant erhöht ( $P = 0,014$ ). Die Unterschiede der systemischen Inhibitor-Konzentrationen zwischen den mit AdCysC, AdPAI-2 und AdTIMP-1 transduzierten Tieren und den entsprechenden Einzel- und Doppelbehandlungen waren in der Regel nicht signifikant. Eine Ausnahme stellt die PAI-2-Konzentration zu Tierversuchsende dar, bei welcher in der Dreifachbehandlung signifikant mehr Protein nachweisbar war als in allen Einzel- bzw. Doppelbehandlungen mit PAI-2 (alle  $P < 0,05$ ; Abb. 5.28 C, vgl. mit Abb. 5.11 E).

Durch die Analyse der Transgenexpressionen konnte ausgeschlossen werden, dass das Fehlen eines additiven anti-metastatischen Effektes in der Lunge durch die Dreifachbehandlung gegenüber den Doppelbehandlungen auf einer reduzierten Expression eines der drei Transgene beruhte. Da die Expression von TIMP-1 und Cystatin C in der Doppelbehandlung sowie der Dreifachbehandlung ein gleiches Niveau besaß, konnte gezeigt werden, dass die Unterdrückung der durch simultane Überexpression von TIMP-1 und Cystatin C ausgelösten Leber-Makrometastasierung auf der zusätzlichen Überexpression von PAI-2 beruhte, wodurch die Beteiligung der Plasminogen-Aktivatoren an dieser Nebenwirkung bestätigt werden konnte. Um den Gründen welche zur Steigerung der tPA Expression in TIMP-1 und Cystatin C überexprimierenden Mäusen auf die Spur zu kommen sollte zunächst das Vorkommen an HGF (Hepatozyten Wachstumsfaktor, *hepatocyte growth factor*) in der Leber entsprechend transduzierter Mäuse bestimmt werden. HGF, auch *scatter factor* genannt, ist ein Faktor der nach Binden an seinen Zelloberflächen-Rezeptor (cMet) die Expression von Plasminogen-Aktivatoren steigern kann.

### **5.22 Verstärkte HGF-Expression in der Leber durch simultane Überexpression von TIMP-1 und Cystatin C**

Da die Überexpression von TIMP-1 bzw. PAI-2 zu einem Anstieg der MMP-9 Expression führte sowie die simultane Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 zusätzlich zu einem erhöhten Gehalt an tPA in der Leber, sollte im nächsten Schritt die Expression von HGF bestimmt werden. Es ist bekannt, dass der HGF-Signaltransduktionsweg sowohl die Expression von Plasminogen-Aktivatoren als auch die von MMPs, u.a. MMP-9, regulieren kann. Das HGF-Protein wurde in den Lebern der mit den verschiedenen rekombinanten Adenoviren bzw. Virus-Kombinationen transduzierten Lebern quantifiziert. Hierfür wurde Protein aus Lebern aller Behandlungsgruppen 21 Tage nach der Tumorzellinokulation, d.h. 24 Tage nach dem adenoviralen Gentransfer, gewonnen, gereinigt und in einem Ratten HGF ELISA System, welches mit gleicher Effektivität das murine HGF misst, analysiert. In Lebern der Kontrolle und aller Behandlungsgruppen, mit Ausnahme der simultan Cystatin C und TIMP-1 überexprimierenden Lebern, wurde im Durchschnitt 10 pg HGF pro mg Leber gefunden, wobei unter diesen Gruppen der HGF Anteil in den AdPAI-2 transduzierten Lebern mit 14,53 pg HGF pro mg Leber am höchsten war. Ein sehr deutlicher Anstieg der HGF Expression konnte jedoch in mit AdCysC und AdTIMP-1 transduzierten Lebern gefunden werden. Mit 27,76 pg HGF pro mg Leber war dort mehr als die doppelte Menge an HGF vorhanden als in allen anderen Behandlungsgruppen (Abb. 5.29).

Dieses Ergebnis gibt einen ersten Hinweis, dass die HT1080 Makrometastasierung der Leber mit einer verstärkten Expression von HGF assoziiert ist. Der kausale Zusammenhang kann aber mit der alleinigen Analyse des HGF zu Tierversuchsende nicht hergestellt werden.



**Abbildung 5.29. Simultane Überexpression von TIMP-1 und Cystatin C führte zu einem Anstieg an HGF (*scatter factor*) in der Leber.** Drei Tage vor der Tumorzellinokulation wurden je drei CD1 *nu/nu* Mäuse mit AdPAI-2 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $4 \times 10^9$  pfu Adl70-3/Maus i.v.), AdCysC ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $4 \times 10^9$  pfu Adl70-3/Maus, i.v.), AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $4 \times 10^9$  pfu Adl70-3/Maus, i.v.), AdPAI-2 + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu Adl70-3/Maus i.v.), AdCysC + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1 +  $2 \times 10^9$  pfu Adl70-3/Maus, i.v.), AdPAI-2 + AdCysC ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $2 \times 10^9$  pfu Adl70-3/Maus i.v.), AdPAI-2 + AdCysC + AdTIMP-1 ( $2 \times 10^9$  pfu AdPAI-2 +  $2 \times 10^9$  pfu AdCysC +  $2 \times 10^9$  pfu AdTIMP-1/Maus i.v.) bzw. als Kontrolle mit Adl70-3 ( $6 \times 10^9$  pfu Adl70-3/Maus, i.v.) transduziert. Die Mäuse wurden 21 Tage nach der Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^6$  HT1080pLZ12/K15-1/Maus, i.v.) geopfert, Lebern mit PBS perfundiert und entnommen. Die Leberstücke wurden gewogen, Gesamt-Protein gewonnen und dieses mittels einer HiTrap<sup>TM</sup> Heparin Säule gereinigt. HGF im gereinigten Protein wurde mittels eines Ratten HGF ELISA Systemes, welches ebenfalls murines HGF detektiert, bestimmt. Die dem Ratten-HGF entsprechende ermittelte Konzentration der drei gepoolten Proben pro mg der für die Proteingewinnung eingesetzten Leber wurde dargestellt (Adl70-3: 9,14 pg/mg; AdPAI-2 14,53 pg/mg; AdCysC: 9,92 pg/mg; AdTIMP-1 8,13 pg/mg; AdPAI-2 + AdTIMP-1: 9,30 pg/mg; AdCysC + AdTIMP-1: 27,76 pg/mg; AdPAI-2 + AdCysC: 9,25 pg/mg; AdPAI-2 + AdCysC + AdTIMP-1: 9,74 pg/mg).

## 6 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Konzept einer prophylaktischen Überexpression natürlicher Inhibitoren tumorassoziierter Proteinasen, nämlich *tissue inhibitor of metalloproteinases-1* (TIMP-1) gerichtet gegen Matrix Metalloproteinasen (MMPs), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-2 (PAI-2) gerichtet gegen Plasminogen-Aktivatoren (PAs) und Cystatin C gerichtet gegen papainähnliche Cysteinproteasen (CPs), durch das Wirtsgewebe zum Schutz des Wirtes vor Metastasierung bearbeitet. Dabei wurde erstmals systematisch die anti-metastatische Wirksamkeit dieser drei Inhibitoren einzeln und in Kombination in einem experimentellen Metastasierungsmodell verglichen. Dabei konnte für das verwendete Metastasierungsmodell humaner Fibrosarkomzellen (HT1080) in Nacktmäusen gezeigt werden, dass von diesen drei Inhibitoren Cystatin C in der einzelnen Anwendung die stärkste anti-metastatische Potenz besaß, wenngleich alle Inhibitoren sehr effektive anti-metastatische Transgene darstellten. Bei der Verwendung von Inhibitor-Kombinationen konnte erstmals gezeigt werden, dass die simultane Inhibition von zwei Proteasefamilien durch natürliche Proteaseinhibitoren eine additive anti-metastatische Wirksamkeit *in vivo* entfaltet. Zudem konnten behandlungsbedingte Veränderungen der Expression tumorassoziierter Proteasen aufgedeckt werden, sowie ein durch simultane Überexpression von TIMP-1 und Cystatin C vermittelten organspezifischen Effekt auf die Metastasierung. Die Kombination von TIMP-1 und Cystatin C reduzierte signifikant die Anzahl an Lungenmetastasen, induzierte jedoch die Formation von Makrometastasen in der Leber. Es konnte gezeigt werden, dass diese Nebenwirkung in der Leber mit einem Anstieg der tPA Expression assoziiert war sowie, dass die zusätzliche Behandlung mit PAI-2 die Formation der Makrometastasen unterdrückte. Diese Ergebnisse zeigten zum einen, dass die simultane Inhibition mehrerer Proteasefamilien einen additiven therapeutischen Effekt bei der Behandlung der Metastasierung entfalten, zum anderen konnte die absolute Notwendigkeit belegt werden, dass die Auswirkungen einer anti-proteolytischen Behandlung auf die Expression verschiedener tumorrelevanter Proteasen untersucht werden muss, um sich eventuell auftretender tumorfördernder Nebenwirkungen bewusst zu sein und gegebenenfalls in einem Therapieansatz durch weitere Maßnahmen zu kompensieren.

### **6.1 Vergleich der anti-metastatischen Potenz von TIMP-1, PAI-2 und Cystatin C**

Die Überexpression bzw. unregulierte Aktivität von MMPs (Vihinen und Kahäri, 2002), lysosomalen CPs (Kayser et al., 2003; Nagai et al., 2003; Levicar et al., 2002; Troy et al., 2003) bzw. Bestandteilen des PA-Systems (Reuning et al., 1998) ist mit einer schlechten Prognose für Patienten verschiedener Tumorerkrankungen assoziiert. In Tiermodellen konnte die Bedeutung der verschiedenen Proteasesysteme bei Tumorwachstum und Metastasierung bestätigt werden (Magdolen et al., 2002), sodass das Konzept einer anti-proteolytischen Krebstherapie entwickelt wurde. Die Verwendung der natürlichen Inhibitoren dieser tumorassoziierten Proteasesysteme, welche unter physiologischen Bedingungen die Aktivität der Proteasen regulieren (Egeblad und Werb, 2002; Reuning et al., 1998; Abrahamson et al., 2003), schien ein guter Ansatz für dieses Konzept darzustellen.

Während *in vitro* die Überexpression von TIMP-1 (Brand, 2002), PAI-2 (Reuning et al., 1998; Laug et al., 1993) bzw. Cystatin C (Coulibaly et al., 1999; Corticchiato et al., 1992) durch Tumorzellen zu einer Reduktion ihrer Invasivität führte, konnte die Verwendung dieser Inhibitoren *in vivo* unterschiedliche Einflüsse auf die Tumorprogression entfalten. Alle drei Inhibitoren konnten Tumorwachstum bzw. Metastasierung verschiedener Tumorzellen inhibieren (Brand, 2002; Reuning et al., 1998; Konduri et al., 2002; Cox et al., 1999), in manchen Fällen führte die Überexpression von TIMP-1 bzw. PAI-2 jedoch zu verstärkter Tumorprogression (Brand et al., 2002; Zhou et al., 2001). In der Regel erfolgten diese pro-tumorigenen Auswirkungen wenn die Inhibitoren von den Tumorzellen produziert wurden (Goss et al., 1998; Hewitt et al., 2000; Guedez et al., 2001; Zhou et al., 2001), welches sich dadurch erklären läßt, dass TIMP-1 proliferationssteigernde Eigenschaften besitzt (Hayakawa, et al., 1992) und sowohl TIMP-1 als auch PAI-2 anti-apoptotisch wirksam sind (Murphy et al., 2002; Magdolen et al., 2002). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Wirksamkeit einer prophylaktischen Überexpression von TIMP-1, PAI-2 bzw. Cystatin C durch die Wirtszellen hinsichtlich ihrer anti-metastatischen Wirksamkeit untersucht werden.

Bisher wurde keine Studie veröffentlicht, in welcher die anti-metastatische Wirksamkeit von natürlichen Inhibitoren, gerichtet gegen verschiedene Proteasefamilien, in einem Metastasierungsmodell verglichen wurden. Um eine effektive anti-proteolytische Behandlung gewährleisten zu können musste zunächst die Expression der Zielproteasen im verwendeten Metastasierungsmodell bestätigt werden. Es ist bekannt, dass HT1080 Zellen *in vitro* MMPs (Nagel, 2004; Arlt, 2004), lysosomale Cathepsine (Sokol et al., 2004) und Faktoren des PA-Systems (Schweinitz et al., 2004; Nagel, 2004) exprimieren sowie, dass die Expression von MMPs und

uPA durch die HT1080 Lungenmetastasierung verstärkt wird (Schweinitz et al., 2004; Arlt et al., 2004). In dieser Arbeit konnte die Assoziation von uPA Expression und Lungenmetastasierung bestätigt werden, sowie die Korrelation von Cathepsin B Expression und Lungenmetastasierung gefunden werden. Daher bot sich dieses Metastasierungsmodell für den systematischen Vergleich der anti-metastatischen Wirksamkeit von TIMP-1, Cystatin C und PAI-2 an. Zunächst wurde untersucht, ob sich die von uns in einem anderen experimentellen Metastasierungsmodell mit murinen T-Zell Lymphomzellen erzielte therapeutische Wirksamkeit der prophylaktischen Überexpression von TIMP-1 (Elezkurtaj et al., 2004) auf ein Modell mit Zellen eines soliden Tumors übertragen ließ. Es konnte gezeigt werden, dass die prophylaktische Überexpression von TIMP-1 die experimentelle Metastasierung der humanen Fibrosarkomzellen mit 93% ebenso potent reduzierte wie zuvor die experimentelle Metastasierung der murinen T-Zell Lymphomzellen mit 94% (Elezkurtaj et al., 2004). Da das Hauptzielorgan der Metastasierung im humanen Fibrosarkommodell die Lunge, im T-Zell Lymphom hingegen die Leber darstellt (Krüger et al., 1997; Elezkurtaj et al., 2004), scheint die Wirksamkeit von TIMP-1 organunspezifisch zu sein. Dieses wird dadurch bestätigt, dass auch die experimentelle Metastasierung von murinen Fibrosarkomzellen in Timp-1 überexprimierende Gehirne transgener Mäuse reduziert wird (Krüger et al., 1998). Demnach scheint TIMP-1 ein potentes therapeutisches Gen zu sein, welches eine Vielzahl von Organen schützen kann. Es bleibt anzumerken, dass die Transduktion der Lunge durch das TIMP-1 kodierende adenovirale Konstrukt deutlich geringer war, als die der Leber. Der therapeutische Erfolg der prophylaktischen Überexpression von TIMP-1 auf die Lungenmetastasierung von HT1080-Zellen kann entweder auf dieser, wenn auch geringen, Transduktion beruhen oder auf den sehr hohen TIMP-1 Konzentrationen im Blut transduzierter Tiere zum Zeitpunkt der Tumorzellinokulation. Kürzlich wurde veröffentlicht, dass in transgenen Mäusen mit hoher Expression von TIMP-1 in der Leber, und somit erhöhten Konzentrationen an TIMP-1 im Blut der Tiere, die spontane Lungenmetastasierung durch murine Melanomzellen reduziert war. In anderen transgenen Mäusen mit lokaler Überexpression von TIMP-1 in der Lunge und folglich geringeren TIMP-1 Konzentrationen im Blut, war die Lungen-Metastasierung der Melanomzellen nicht beeinflusst (de Lorenzo et al., 2003). Diese Veröffentlichung weist darauf hin, dass auch in der vorliegenden Arbeit vermutlich die hohen TIMP-1 Level im Serum für den Therapieerfolg verantwortlich waren.

Die Überexpression von PAI-2 reduzierte ebenfalls die HT1080 Metastasierung der Lunge signifikant um 52% im Vergleich zur Kontrolle, war jedoch damit weniger effektiv als TIMP-1. Da PAs Plasminogen aktivieren, welches wiederum eine Reihe von proMMPs aktiviert

(Visse und Nagase, 2003) wurde erwartet, dass die Überexpression von PAI-2 eine mindestens gleich starke anti-metastatische Potenz aufweist wie die von TIMP-1. Da im verwendeten Tumormodell gezeigt werden konnte, dass die Zahl der Lungenmetastasen mit der Expression von uPA korrelierte, scheint dieses Molekül an dem Prozess der Metastasierung beteiligt zu sein. Allerdings wurde bei dieser Analyse ein später Zeitpunkt der Metastasierung betrachtet, der zeitlich von der Extravasation der Tumorzellen entfernt war, um auch die Effekte einer anti-proteolytischen Therapie auf die Schritte die zur Etablierung der Metastasen im Wirtorgan führen untersuchen zu können. Daher könnte die verstärkte Expression von uPA am Ende des experimentellen Metastasierungsversuches auch die Beteiligung von uPA an diesen späteren Prozessen, wie der Etablierung und dem Wachstum der Metastasen, belegen. Einige Ergebnisse belegen diese Überlegung: so war in uPA *knock out* Mäusen das Primärtumorwachstum humaner Brustkarzinomzellen signifikant reduziert, während das Fehlen von uPA kaum Einfluss auf die Metastasierung dieser Zellen hatte (Frandsen et al., 2001). Im Gegensatz zu dieser Untersuchung konnte eine andere Arbeitsgruppe kürzlich zeigen, dass die spontane Metastasierung in uPA *knock out* Mäusen, ausgehend von MMTV-PyMT-induzierten Mammarkarzinomen, signifikant reduziert wurde. Da das Primärtumorwachstum in dieser Studie unbeeinflusst war, scheint es sich hierbei um einen direkten Effekt auf die Metastasierung zu handeln. Die Autoren haben jedoch in dieser Studie das Volumen der Lungenmetastasen und nicht ihre Anzahl bestimmt (Almholt et al., 2005). So könnte die durch uPA *knock out* erzielte Reduktion der Lungenmetastasierung sowohl aus der Inhibition einer oder mehrerer Schritte der metastatischen Kaskade resultieren, aber auch aus reduziertem Wachstum der Lungenmetastasen. In einer früheren Dissertation in unserer Arbeitsgruppe, in welcher das ebenfalls in der vorliegenden Arbeit verwendete humane Fibrosarkommodell verwendet wurde, wurde gefunden, dass die experimentelle Metastasierung durch einen spezifischen synthetischen uPA Inhibitor sowie durch einen uPAR-Antikörper stärker reduziert wurde, als durch einen Gelatinase-spezifischen synthetischen MMP-Inhibitor (Arlt, 2004). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der in dieser Arbeit gefundenen stärkeren anti-metastatischen Potenz des natürlichen MMP-Inhibitors TIMP-1 im Vergleich zu dem natürlichen Inhibitor der PAs, PAI-2. Im Gegensatz zu dem dort verwendeten synthetischen Inhibitor von MMPs, Ro206-0222, welcher eine hohe Spezifität gegenüber MMP-9 besitzt (Arlt et al., 2002), handelt es sich bei dem natürlichen Inhibitor TIMP-1 um einen Inhibitor, der trotz einer leichten Tendenz zu erhöhter Inhibition von MMP-9 alle MMPs, mit Ausnahme der MT-MMPs, mit Ki-Werten von 0,1-2,8 nM inhibiert (Nagase und Brew, 2002). Die vornehmliche Inhibition von MMP-9 durch den synthetischen Inhibitor war demnach im verwendeten Metastasierungsmodell hu-

maner Fibrosarkomzellen weniger effektiv als die Breitspektrum-Inhibition mehrerer MMPs durch TIMP-1. Dieses Ergebnis war überraschend, konnten wir doch in einer früheren Studie in dem in unserer Arbeitsgruppe etablierten Metastasierungsmodell muriner T-Zell Lymphomzellen zeigen, dass eine erhöhte MMP-9-Spezifität von synthetischen MMP-Inhibitoren zu einer verstärkten anti-metastatischen Wirksamkeit führte. In dem murinen T-Zell Lymphom Modell konnte im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit verwendeten Modell humaner Fibrosarkomzellen jedoch eine Korrelation von MMP-9 Expression in der Leber und Anzahl der Lymphom-Metastasen in der Leber gefunden werden (Arlt et al., 2002). Die Tatsache, dass der Breitspektrum-Inhibitor TIMP-1 im Vergleich zu dem MMP-9-spezifischen Inhibitor effizienter die Metastasierung der humanen Fibrosarkomzellen reduzierte, lässt darauf schließen, dass in diesem Modell MMP-9 nicht die bedeutende Rolle zukommt wie im T-Zell Lymphommodell. Da wir jedoch im Prinzip zeigen konnten, dass eine Spezifitätsoptimierung von MMP-Inhibitoren gegenüber der Breitspektrum-inhibition von MMPs eine höhere therapeutische Wirksamkeit erzielt, müssten weitere Studien durchgeführt werden, um die in dem HT1080-Modell relevanten MMPs zu identifizieren. So könnten auch in diesem Modell, durch Verwendung spezifischerer MMP-Inhibitoren, eventuelle Nebenwirkungen einer Breitspektrum-inhibition von MMPs reduziert werden. Ein weiterer Hinweis auf eine gesteigerte anti-metastatische Wirksamkeit spezifitätsoptimierter Proteaseinhibitoren, stellt die Verwendung spezifitätsoptimierter Serinproteinaseninhibitoren (SP-Inhibitoren) dar. Ähnlich wie für die Ergebnisse zu den MMP-9-spezifitätsoptimierten Inhibitoren konnten wir mit synthetischen SP-Inhibitoren zeigen, dass ihre anti-metastatische Wirksamkeit im murinen T-Zell Lymphommodell mit steigender Faktor (F) X-Spezifität zunahm, und dadurch FX als ein neues Zielmolekül für eine anti-proteolytische Behandlung im verwendeten Modell identifizieren (Banke et al., 2003).

Im HT1080 Metastasierungsmodell konnte durch Verwendung eines synthetischen uPA-spezifischen Inhibitors die Lungenmetastasierung um 95% (Schweinitz et al., 2004) bzw. durch die Verwendung eines uPAR-Antikörpers um 71% (Arlt, 2004) reduziert werden. Diese Behandlungen besaßen demnach eine größere anti-metastatische Wirksamkeit als die in dieser Arbeit verwendete prophylaktische Überexpression von PAI-2, welche eine Reduktion der Lungenmetastasierung um 51% im Vergleich zur Kontrolle erreichte. Obwohl es sich bei dem synthetischen Inhibitor um einen uPA-spezifischen Inhibitor handelt, ist es möglich, dass er noch weitere SPs inhibieren kann, und somit zu der erhöhten Reduktion im Vergleich zu PAI-2 führte. Der uPAR-Antikörper hingegen besitzt eine größtmögliche Spezifität gegenüber uPAR und verhindert das Binden von uPA an uPAR. Eine Vielzahl der tumorfördernden Ei-

genschaften des PA-Systems, wie Angiogenese-, Chemotaxis-, Tumorzellmigration-, sowie Tumorzelladhäsion, werden dem Binden von uPA an seinen Rezeptor uPAR zugeschrieben (Schmitt et al., 2000). Im Gegensatz zu dem von Matthias Arlt verwendeten uPAR-Antikörper kann PAI-2 zwar die proteolytische Aktivität von uPA inhibieren, nicht aber die Bindung von uPA an uPAR. Von PAI-1 ist bereits seit längerer Zeit bekannt, dass seine Bindung an den uPA/uPAR-Komplex zur Internalisierung dieses tertiären Komplexes führt, wonach PAI-1 und uPA in Lysosomen degradiert werden, während der uPAR durch einen Transportmechanismus erneut auf der Zelloberfläche präsentiert wird (Reuning et al., 1998). Bis vor kurzem wurde angenommen, dass dieses uPAR-Recycling ein ausschließlich von PAI-1 geförderter Mechanismus ist. Vor kurzem wurde gezeigt, dass auch der tertiäre Komplex aus uPA/uPAR und PAI-2 internalisiert wird. Da dabei ähnliche Transportmechanismen verwendet werden wie bei der PAI-1-vermittelten Internalisierung, wird davon ausgegangen, dass auch durch Bindung von PAI-2 an den uPA/uPAR-Komplex uPAR recycelt wird (Al-Ejeh, et al., 2004). Demnach würde eine Überexpression von PAI-2 zu einer Konservierung des uPAR auf der Zelloberfläche führen, welches die geringere anti-metastatische Effizienz von PAI-2 gegenüber dem uPAR-Antikörper im humanen Fibrosarkommodell erklären könnte. Die Verwendung einer Vielzahl an uPA- bzw. uPAR-Antagonisten (Reuning et al., 2003), rekombinantem PAI-2 (Shinkfield et al., 1992), sowie die Überexpression von PAI-2 durch Tumorzellen (Reuning et al., 1998) bzw. der systemische adenovirale Gentransfer von PAI-2 oder PAI-1 (Praus et al., 1999; Ma et al., 1997), führten in den verwendeten Tiermodellen jeweils zu reduziertem Tumorwachstum bzw. inhibierter spontaner Metastasierung. Da bei allen diesen Studien das Primärtumorwachstum inhibiert war, kann man nicht ausschließen, dass es sich bei der reduzierten spontanen Metastasierung um eine Reflektion des verringerten Primärtumorwachstums handelt. Es konnte durch diese Studien aber eindeutig belegt werden, dass die Inhibition des uPA/uPAR-Systemes zu verringertem Tumorwachstum führt. Um zu überprüfen, ob uPA im verwendeten Tumormodell das Wachstum der HT1080 Lungenmetastasen beeinflusst, müssten Untersuchungen zur Größenbestimmung der Metastasen in PAI-2 behandelten Tieren bzw. den Kontrolltieren erfolgen.

Im Gegensatz zu PAI-2 war die prophylaktische Überexpression von Cystatin C mit 92% nahezu ebenso effektiv in der Reduktion der Anzahl von HT1080 Lungenmetastasen wie die Überexpression von TIMP-1. Die anti-metastatische Potenz der Überexpression von Cystatin C spiegelte sich sogar in dem signifikanten Anstieg des Anteils metastasenfrier Lungen auf insgesamt 75% metastasenfrier Lungen innerhalb dieser Behandlungsgruppe im Vergleich zu der Kontrolle mit nur 18,8% metastasenfrieren Lungen wider. Die Zunahme metastasenfrier

Lungen durch TIMP-1 sowie die durch PAI-2 Überexpression im Vergleich zur Kontrolle war hingegen nicht signifikant. Demnach besitzt Cystatin C unter den getesteten drei therapeutischen Transgenen die stärkste anti-metastatische Potenz. Dieses Ergebnis bestätigt die gegenüber den anderen Proteasefamilien übergeordnete Rolle von lysosomalen CPs. Da Cathepsin B und L uPA Aktivieren können (Schmitt et al., 2000; Turk et al., 2000), tragen diese Cathepsine neben dem direkten Abbau von Bestandteilen der ECM an deren Abbau indirekt durch Aktivierung des PA-Systems und der proMMPs bei (Turk et al., 2000). In Krebspatienten mit invasiven Duktalkarzinomen konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Expression eines anderen natürlichen Inhibitors lysosomaler CPs, Cystatin M, bei zwei Dritteln der getesteten Tumorbiopsien unterdrückt war, während in normalen Brustepithelzellen dieser Inhibitor stets exprimiert wurde (Zhang et al., 2004). Auch in einem Tierversuch konnte die Bedeutung der Cathepsin-Inhibition durch Cystatin M belegt werden. Stabil Cystatin M Überexprimierende Brustkarzinomzellen zeigten ein signifikant reduziertes Tumorstadium nach orthotoper Inokulation der Zellen in immunsupprimierte Mäuse, verglichen zu den MOCK transfizierten Tumorzellen (Zhang et al., 2004). Im Gegensatz zu der eben zitierten Studie, wurden in der vorliegenden Arbeit die Wirts- und nicht die Tumorzellen manipuliert. Bei diesem von uns erarbeiteten Konzept der prophylaktischen Überexpression von Cystatin C wird das Wirtsgewebe manipuliert, sodass es den transgenen Inhibitor exprimiert und sezerniert. Dadurch wurden bei diesem Therapieansatz nur lysosomale Cathepsine der Wirtszellen sowie extrazellulär vorliegende papainähnliche CPs inhibiert. Dieses Konzept stellt insofern eine adäquate Behandlungsstrategie für die Verwendung von Cystatinen dar, da Cathepsine proapoptisch wirken können (Foghsgaard et al., 2002) und sich somit deren Inhibition in Tumorzellen anti-apoptisch und somit pro-tumorigen auswirken könnte. Zudem wurde Cystatin C kürzlich als ein transformierender Wachstumsfaktor- (*transforming growth factor*-, TGF)-beta Rezeptor Antagonist identifiziert und ein Cystatin C-vermittelter *Feedback*-Mechanismus gefunden, welcher zur Inhibition des TGF-beta vermittelten Signaltransduktion führt (Sokol und Schiemann, 2004). TGF-beta ist ein multifunktionales Zytokin, für welches tumorfördernde Eigenschaften beschrieben sind (Kaklamani und Pasche, 2004). Unter normalen physiologischen Bedingungen liegen lysosomale Cathepsine, so wie es ihr Name impliziert, lysosomal vor (Kos und Lah, 1998). Unter pathologischen Bedingungen wie Krebserkrankungen hingegen liegen diese Proteinasen auch extrazellulär und z.T. sogar systemisch vor (Nagai et al., 2003; Kos et al., 2000; Miyake et al., 2004; Joyce und Hanahan, 2004). In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Überexpression und Sezernierung von Cystatin C durch Wirtszellen eine mögliche Therapie der Metastasierung bei genau diesen

Patienten darstellen könnte, wobei hauptsächlich die extrazellulär vorliegenden Cathepsine inhibiert würden.

## **6.2 Additive Reduktion der experimentellen HT1080 Lungenmetastasierung durch simultane Überexpression von zwei natürlichen Inhibitoren verschiedener tumorassoziierter Proteasenfamilien**

In der Regel ist das metastatische Potential einer malignen Tumorerkrankung nicht nur mit der Expression einer einzelnen Protease assoziiert. Bei einer Reihe von Tumorerkrankungen werden Proteasen verschiedener Familien zusammen überexprimiert (DeClerck et al., 1997). Da sich Proteasen verschiedener Familien in ihren Substratspezifitäten überschneiden, z.B. können Kollagen Typ IV und Glykoproteine sowohl von MMP-2 und -9 als auch Plasmin und Cathepsin B gespalten werden (DeClerck et al., 1997; Noel et al., 1999), könnte die Inhibition einer Familie durch die proteolytische Aktivität einer anderen teilweise oder ganz kompensiert werden. Daher wurde die Strategie einer simultanen Inhibition mehrerer Proteasenfamilien zur anti-proteolytischen Behandlung der Tumorprogression entwickelt.

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die simultane Überexpression von zwei bzw. drei natürlichen Proteaseinhibitoren eine additive anti-metastatische Wirkung entfaltet. Die simultane prophylaktische Überexpression von TIMP-1 und PAI-2, TIMP-1 und Cystatin C, Cystatin C und PAI-2, sowie Cystatin C, PAI-2 und TIMP-1 zeigten eine additive Reduktion der HT1080-Lungenmetastasierung im Vergleich zu den einzelnen Überexpressionen. Allerdings war der additive Effekt nur im Fall von TIMP-1 und PAI-2 signifikant. Von allen in dieser Arbeit verwendeten Inhibitor-Kombinationen besaß die simultane prophylaktische Überexpression von TIMP-1 und PAI-2 die größte anti-metastatische Wirkung. In dieser Gruppe konnte nur bei einer von vierzehn Mäusen Metastasen in der Lunge nachgewiesen werden. Bis vor kurzer Zeit gab es nur wenige Studien die die simultane Inhibition mehrerer Proteasenfamilien untersuchten. *In vitro* konnte kürzlich durch systematische Reduktion der mRNA von Cathepsin B, uPAR und MMP-9 mittels siRNA (*small inhibitory RNA*) bzw. antisense mRNA gezeigt werden, dass jede Kombination von zwei dieser siRNAs bzw. antisense mRNAs die Invasivität additiv im Vergleich zu der Verwendung der jeweils einzelnen siRNA bzw. antisense mRNA reduzierte (Lakka, et al., 2003; Lakka et al., 2004; Gondi et al., 2004), welches darauf hinweist, dass die im verwendeten experimentellen Metastasierungsmodell erzielten anti-metastatischen Wirkungen auf eine Reduktion der ECM Abbau zurückzuführen sein könnten. In der vorliegenden Arbeit konnte für die effektivste Therapie, Über-

expression von TIMP-1 und PAI-2, die anti-proteolytische Wirksamkeit der Inhibitoren *ex vivo* nachgewiesen werden. Sowohl die Aktivierung von proMMP-9 als die von Plasminogen war im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert. In den meisten Studien wird ein *in vivo* Effekt der Proteaseninhibition gezeigt, nicht aber der Nachweis dieser Inhibition *ex vivo* geliefert (z.B. Goss et al., 1998; Elezkurtaj et al., 2004; Li et al., 1998; Zacchigna et al., 2004; Praus et al., 1999). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit einfache Methoden zum Nachweis der inhibitorischen Aktivität von TIMP-1 bzw. PAI-2 *ex vivo* durch Abwandlung etablierter Methoden geschaffen. Dadurch war es möglich nachzuweisen, dass die überexprimierten Inhibitoren in ausreichender Dosis vorlagen, um die proteolytische Aktivität *in vivo* zu reduzieren, wodurch in der vorliegenden Arbeit ein direkter Zusammenhang zwischen anti-proteolytischer Aktivität und anti-metastatischer Potenz postuliert werden kann.

Kürzlich konnte ein additiver Effekt auf die Reduktion des Tumorwachstums orthotop inokulierter Glioblastomzellen durch simultane Reduktion von uPAR und Cathepsin B bzw. MMP-9 und Cathepsin B gezeigt werden (Lakka et al., 2004; Gondi et al., 2004). Ebenso wie in der soeben erwähnte Studie, wurde bisher die Strategie einer simultanen Inhibition mehrerer Proteasenfamilien zur anti-proteolytischen Behandlung der Tumorprogression *in vivo* nur hinsichtlich reduziertem Tumorwachstums angewendet (Krol et al., 2003 a; Lakka et al., 2003; Lakka et al., 2004; Gondi et al., 2004). Bisher wurde noch kein additiver anti-metastatischer Effekt einer simultanen Inhibition mehrerer Proteasenfamilien durch Verwendung natürlicher Inhibitoren veröffentlicht.

### **6.3 Verstärkte Expression von Proteasen durch Überexpression natürlicher Proteaseinhibitoren**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von TIMP-1 zu einem Anstieg der MMP-9 Expression in Lungen und Lebern transduzierter Mäuse führte. Dass die prophylaktische Überexpression von TIMP-1 ausreichend war diesen Anstieg an MMP-9 zu kompensieren, konnte durch die Verwendung eines MMP-9-Aktivitätsassay festgestellt werden. In der Lunge konnte sowohl in den Kontrollen als auch in den TIMP-1 transduzierten Tieren kein aktives MMP-9 nachgewiesen werden. Zudem war die Aktivierung von proMMP-9 in den TIMP-1 überexprimierenden Tieren sowohl in der Lunge als auch in der Leber reduziert. In den Lebern TIMP-1 transduzierter Mäuse konnte außerdem festgestellt werden, dass die Expression von TIMP-1 die Generierung aktiven MMP-9 inhibierte, da nur in der Kon-

trolle aktives MMP-9 nachweisbar war. Diese Erkenntnis kann die erzielten Therapieerfolge im humanen Fibrosarkommodell sowie im murinen Lymphommodell (Elezkurtaj et al., 2004) trotz eines Anstiegs der MMP-9 Expression erklären.

Neben der für TIMP-1 beschriebenen anti-metastatischen Wirksamkeit in Tierversuchen (Brand, 2002), kann TIMP-1 Überexpression pro-tumorigene Effekte aufweisen (Goss et al., 1998; Hewitt et al., 2000; Guedez et al., 2001) und ist in einer Reihe von Tumorerkrankungen mit einer negativen Prognose für die Patienten verbunden (Vihinen und Kähäri, 2002; Ruokolainen, et al., 2004). Bisher wurden diese Effekte alleinig auf die beschriebenen pro-proliferativen und anti-apoptischen Effekte von TIMP-1 zurückgeführt. Der in dieser Arbeit gezeigte Anstieg der MMP-9 Expression, könnte eine weitere Erklärung für diese Beobachtungen darstellen. Dabei ergibt sich die Hypothese, dass diese pro-tumorigenen Effekte ausgelöst werden würden, wenn die Menge des überexprimierten TIMP-1 Proteins nicht ausreichend wäre, die zusätzliche Expression von MMP-9 zu inhibieren. Tatsächlich scheint die Wirksamkeit von TIMP-1 dosisabhängig zu sein. So war die Expression von Timp-1 in transgenen Mäusen nicht ausreichend die experimentelle Metastasierung der verwendeten murinen T-Zell Lymphomzellen zu reduzieren (Krüger et al., 1997), die vielfach höhere Expression von TIMP-1 erzielt durch adenoviralen Gentransfer war jedoch ausreichend die Metastasierung im gleichen Tiermodell zu unterdrücken (Elezkurtaj et al., 2004). Der Vergleich zweier transgener Mausstämme welche unterschiedliche Mengen an TIMP-1 überexprimieren ergab, dass die spontane Entstehung intestinaler Tumoren in dem Stamm mit höherer TIMP-1 Expression unverändert, in den Mäusen mit niedrigerer TIMP-1 Expression jedoch signifikant erhöht war (Goss et al., 1998). In einer weiteren Studie wurde durch Überexpression von TIMP-1 durch kolorektale Tumorzellen ihr intraperitoneales Wachstum und die Leber-Metastasierung reduziert. Im Gegensatz dazu konnte die intraperitoneale Applikation rekombinanten TIMP-1s, welche zu deutlich niedrigeren intraperitonealen TIMP-1 Konzentrationen führte als die stabile Überexpression durch die Tumorzellen, das intraperitoneale Wachstum und Metastasierung der kolorektalen Tumorzellen nicht reduzieren (Yamauchi et al., 2001). Um die genauen Auswirkungen zwischen der TIMP-1-Dosis und der MMP-9 Expression auf die Tumorprogression erfassen zu können, sind jedoch weitere Studien notwendig. Für TIMP-1 wird jedoch auch diskutiert, dass die Auswirkungen einer Überexpression in verschiedenen Stadien der Tumorprogression unterschiedlich sind. Einerseits kann TIMP-1 die Tumorigenität durch verstärkte Proliferation und das Auftreten von chromosomalen Veränderungen in prä-malignen Zellen, und somit das Risiko einer malignen Konvertierung der Zellen erhöhen, andererseits kann TIMP-1 die MMP-Aktivität inhibieren (Rhee et al., 2004). In dieser Studie

war die Inhibition von MMPs durch TIMP-1 jedoch nicht ausreichend, die spontane Metastasierung der Tumorzellen zu reduzieren (Rhee et al., 2004). Alle diese Veröffentlichungen sowie unsere eigene Untersuchungen weisen darauf hin, dass TIMP-1 über verschiedene Mechanismen in einer dosisabhängigen Weise pro- und anti-tumorigene Effekte aufweisen kann. Wir konnten bereits zeigen, dass die Breitspektrum-inhibition von MMPs durch den synthetischen MMP-Inhibitor Batimastat zu einer verstärkten Metastasierung im T-Zell Lymphommodell führte (Krüger et al., 2001), welches zu der Vermutung führt, dass die Breitspektrum-inhibition von MMPs durch TIMP-1 zu den oben beschriebenen Nebenwirkungen führen könnte. Tatsächlich haben wir Batimastat-ähnliche Ergebnisse im Metastasierungsmodell mit murinen T-Zell Lymphomzellen gefunden. In diesem Modell kam es durch prophylaktische Überexpression von TIMP-1 in der Leber, erzielt durch adenoviralen Gentransfer von  $2 \times 10^9$  pfu pro Maus, zu einer Reduktion der erfolgreichen Extravasation der systemisch inokulierten T-Zell Lymphomzellen, jedoch wurde durch die Überexpression von TIMP-1 die sekundäre Invasion der Tumorzellen drastisch erhöht, welches netto zu einer höheren Tumorzell-Belastung der Leber führte (bisher unveröffentlichte Daten). Hierbei bleibt anzumerken, dass eine deutlich höhere Expression von TIMP-1, erreicht durch den adenoviralen Gentransfer von  $2,5 \times 10^{10}$  pfu pro Maus, wie bereits oben erwähnt, die Makrometastasierung sowie die sekundäre Invasion der Lymphomzellen signifikant gegenüber der Kontrolle reduzierte (Elezkurtaj et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde durch die alleinige Überexpression von TIMP-1 kein pro-metastatischer Effekt beobachtet, obwohl diejenige Virusdosis ( $2 \times 10^9$  pfu pro Maus) verwendet wurde, welche im T-Zell Lymphommodell zu der erhöhten Mikrometastasierung führte. In der vorliegenden Studie wurde die Lungenmetastasierung von HT1080 Zellen durch TIMP-1 signifikant gegenüber der Kontrolle reduziert und die Mikrometastasierung der Leber durch TIMP-1 nicht beeinflusst. Diese dosisabhängigen Auswirkungen einer prophylaktischen Überexpression von TIMP-1 können demnach vom verwendeten Metastasierungsmodell bzw. dem Zielorgan der Metastasierung abhängig sein, da wir bisher nur bei der Lebermetastasierung im Lymphommodell einen dosisabhängigen tumorfördernden Einfluss von TIMP-1 beobachten konnten. Um zu untersuchen, ob die pro-metastatischen Eigenschaften von TIMP-1 Organ- bzw. Modell-abhängig sind, müssten weitere Metastasierungsmodelle verwendet werden, in welchen die Zielorgane der Metastasierung möglichst Lunge und Leber sind, bzw. die Applikation der HT1080 Zellen derart verändert werden, dass es zu einer verstärkten Ausbildung von Metastasen in der Leber kommt, wie z.B. direkte Inokulation der Zellen in die zur Leber führenden Blutgefäße. Damit könnten durch Verwendung

ein und dergleichen Tumorzelllinie mögliche Organ-spezifische Effekte der TIMP-1 Überexpression auf die Metastasierung untersucht werden.

Neben der Überexpression von TIMP-1 führte auch die von PAI-2 zu einem Anstieg der MMP-9 Expression, jedoch war hier zusätzlich die von MMP-2 erhöht. Da Plasmin essentiell an der Aktivierung verschiedener MMPs beteiligt ist (Visse und Nagase, 2003) und durch die Überexpression von PAI-2 *in vivo* nachweislich weniger Plasmin generiert wurde, könnte es sich bei dem Anstieg der Expression der Gelatinasen durch PAI-2 Überexpression, ebenso wie bei dem Anstieg der MMP-9 Expression durch TIMP-1 Überexpression, um einen regulatorischen Mechanismus handeln, welcher durch verringerte MMP-Aktivität ausgelöst wurde. Es ist bereits bekannt, dass Abbauprodukte der ECM zu einem Anstieg der Expression verschiedener Proteasen führen können. So können Fibronectin-Fragmente die Expression von MMP-1, -3 (Yasuda et al., 2003; Saito et al., 1999), -9 (Saito et al., 1999) und -13 (Kong et al., 2004 a; Loeser et al., 2003; Yasuda et al., 2003) in verschiedenen Zelllinien induzieren. Es konnte auch gezeigt werden, dass MMPs ein Laminin-Fragment generieren, welches nach Bindung an den EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptor über einen MEK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signaltransduktionsweg die Expression von MMP-2 induzieren kann (Shenk et al., 2003). Damit ist im Prinzip gezeigt, dass die Aktivität von Proteasen an der Regulation der Expression von Proteasen beteiligt ist. Auch die Behandlung mit synthetischen Breitspektrum-Inhibitoren der MMPs kann zu einem Anstieg der MMP-9 Expression führen, ein weiteres Indiz, dass reduzierte MMP-Aktivität zu einem Anstieg der MMP-9 Expression führt. Inkubation von HT1080-Zellen mit dem synthetischen MMP-Inhibitor GI129471 führte zu einem Anstieg der MMP-9 Expression *in vitro*, während die Zugabe von rekombinantem TIMP-1 keinen Einfluss auf die Expression von MMP-9 *in vitro* hatte (Maquoi et al., 2002). *In vivo* konnte unsere Arbeitsgruppe einen Anstieg der MMP-9 Expression in Lebern Batimastat-behandelter Mäuse beobachten (Krüger et al., 2001).

Zusätzlich zu den beobachteten Effekten von PAI-2 und TIMP-1 auf die Expression der Gelatinasen, verstärkte TIMP-1 die Expression von Cathepsin B. Dieses ist ebenso wie die verstärkte Expression von MMP-9 eine bisher unbeschriebene Nebenwirkung der TIMP-1 Überexpression. Anders als für die Überexpression von MMP-9, welche auch bei der Verwendung von synthetischen Inhibitoren beobachtet werden konnte, sind solche Ergebnisse für die Expression von synthetischen MMP-Inhibitoren bisher nicht beschrieben. In der Regel werden in Studien mit MMP-Inhibitoren bzw. Inhibitoren des PA-Systems nur die Auswirkungen auf MMPs und Faktoren des PA-Systems beschrieben. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die absolute Notwendigkeit einer genauen Analyse der Effekte einer anti-proteolytischen

Behandlung auf die Expression möglichst vieler tumorassoziierter proteolytischer Systeme. Zudem veranschaulichen diese Nebenwirkungen die von DeClerck bereits 1997 beschriebene enge Vernetzung der verschiedenen Proteinasefamilien.

#### **6.4 Abhängigkeit der durch simultane Cystatin C und TIMP-1 Überexpression induzierten HT1080 Leber-Makrometastasierung von Plasminogen-Aktivatoren**

Die stärkste in dieser Arbeit beobachtete Nebenwirkung stellt die durch simultane Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 induzierte Makrometastastasierung der Leber dar. Diese HT1080 Makrometastasen in der Leber waren sogar größer, als die in den Lungen gefundenen Metastasen. In keiner anderen Behandlungsgruppe dieser Arbeit bzw. in keinem früheren experimentellen Metastasierungsversuch mit HT1080 Zellen die jemals in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden konnten Makrometastasen in der Leber gefunden werden (Schweinitz et al., 2004; Arlt, 2004; Nagel, 2004). Dieses stellt die Besonderheit dieses Ergebnisses heraus. Eine Induktion von Metastasen in der Leber konnte von uns ausschließlich durch die Verwendung von Batimastat beobachtet werden. Ebenso wie im verwendeten humanen Fibrosarkom bei der simultanen Überexpression von TIMP-1 und Cystatin C, konnte bei der Behandlung mit Batimastat die experimentelle Metastasierung humaner Brustkarzinomzellen in die Lunge, dem Zielort der Metastasierung, signifikant reduziert werden, jedoch wurden in der Leber Makrometastasen induziert (Krüger et al., 2001). Auch in diesem Modell konnten bis zu diesem Zeitpunkt in unserer Arbeitsgruppe keine Leber-Makrometastastasierung detektiert werden.

Auffallend war, dass die HT1080 Metastasen in der Leber von einer Kapsel umgeben waren. In verschiedenen Tumormodellen wurde gezeigt, dass die Überexpression von Proteaseinhibitoren zur Ausbildung von den Tumor umgebenden Kapseln führt. Die Überexpression von PAI-2 (Kruithof et al., 1995; Mueller et al., 1995; Laug et al., 1993) bzw. TIMP-2 (Kruithof et al., 1995) durch Tumorzellen führte zur Ausbildung kollagener Kapseln die Tumor- und Wirtsgewebe voneinander trennten. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Einkapselung der HT1080 Metastasen in der Leber durch die anti-proteolytische Aktivität eines oder beider Transgene hervorgerufen worden sein kann. Es müssen jedoch Immuno-Histochemische Analysen folgen, um die genaue Zusammensetzung dieser Kapseln zu untersuchen. In Patientenstudien konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung fibrinhaltiger Kapseln um hepatozelluläre Tumoren eine chemische und mechanische Barriere der lokalen Invasion darstellen (Lunevicius et al., 2001). In dieser Arbeit konnte belegt werden, dass die Ein-

kapselung der Tumoren die sekundäre Infiltration von HT1080-Zellen in das Lebergewebe inhibierte. Eine sekundäre Invasion durch HT1080-Zellen konnte nur beobachtet werden, wenn die Ausbildung der Kapsel nicht vollständig war.

Im verwendeten experimentellen Metastasierungsmodell humaner Fibrosarkomzellen kommt es in der Regel zu einer Mikrometastasierung der Leber (Nagel, 2004; Arlt, 2004), welche in der vorliegenden Arbeit durch keinen der verwendeten Inhibitoren reduziert werden konnte. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Induktion der Makrometastasen in der Leber mit größerer Wahrscheinlichkeit durch verstärkte Proliferation entstanden war und weniger wahrscheinlich auf verstärkter Extravasation beruhte. In allen anderen Behandlungsgruppen und durchgeführten Experimenten liegen HT1080 Zellen in der Leber einzellig vor und scheinen nicht teilungsaktiv zu sein. Ruhende Tumorzellen in sekundären Organen zeichnen sich dadurch aus, dass sie netto kein Wachstum zeigen. Dieses heisst nicht, dass sie nicht teilungsaktiv sind, sondern dass sich bei diesen Zellen Proliferation und Apoptose die Waage halten (Holmgren et al., 1995). Es ist jedoch auch gezeigt worden, dass einige ruhende Tumorzellen in der Leber tatsächlich über längere Zeit, in diesem Fall über elf Wochen, nach der Inokulation, nicht-teilungsaktiv vorliegen. Konventionelle Behandlungen welche nur teilungsaktive Tumorzellen eliminieren, sind demnach nicht in der Lage diese teilungsinaktiven, jedoch vitalen Tumorzellen zu eliminieren (Naumov et al., 2002). Intrinsische Veränderungen der Tumorzellen oder der sie umgebenden Mikroumgebung des Wirtes kann zu einer Induktion des Wachstum dieser ruhenden Tumorzellen führen (Naumov et al., 2001). Es ist bereits mehrfach gezeigt worden, dass auch nicht-metastasierende Zellen wenn sie systemisch inokuliert werden effektiv extravadiieren können (Morris *et al.*, 1994; Koop *et al.*, 1995; Koop *et al.*, 1996; Chambers and Matrisian, 1997; Luzzi *et al.*, 1998). Diese Studien zeigen, dass Extravasation von Tumorzellen und Metastasierung nicht gleichbedeutend sind. Chambers und Mitarbeiter haben bereits 2001 postuliert, dass die Regulation des Wachstums von Tumorzellen in sekundären Organen die erfolgreiche Metastasierung bestimmt. Diese Regulation wurde in drei Schlüsselschritte unterteilt: Überleben einiger einzelner Tumorzellen im sekundären Organ, Proliferation einiger dieser Zellen und schließlich Angiogenese dieser sekundären Tumoren (Chambers et al., 2001). Es konnte auch gezeigt werden, dass reduzierte Apoptose im Zielorgan metastatische und nicht-metastatische Melanomzellen unterscheidet (Kim et al., 2004). Die Formation von HT1080 Mikrometastasen in der Leber scheint von Proteasen unabhängig zu sein, da alle in dieser Arbeit verwendeten natürlichen Inhibitoren tumorassoziierter Proteasen die Mikrometastasierung der Leber nicht reduzieren konnten. Daher scheinen Extravasations-unabhängige Prozesse für die Ausbildung der Makrometastasen in TIMP-1- und Cysta-

tin C Überexprimierenden Lebern verantwortlich gewesen zu sein. Da in der vorliegenden Arbeit die Metastasierung der Lunge durch Proteaseinhibitoren signifikant reduziert wurde, und eine frühere Studie zeigte, dass die anti-metastatische Wirkung eines synthetischen MMP-Inhibitors deutlich effektiver ist, wenn dieser vor der systemischen Inokulation der HT1080 Zellen verabreicht wurde, im Vergleich zu einem Behandlungsstart nach der Tumorzellinokulation (Arlt, 2004), scheint die reduzierte Metastasierung der Lunge durch HT1080 Zellen, im Gegensatz zu der der Leber, auf verringerter erfolgreicher Extravasation der Zellen zu beruhen. Zu diesem Prozess zählt nicht nur die Extravasation als solche, vielmehr gehen dabei auch diejenigen Prozesse ein, welche zu dem Überleben der Tumorzellen in der Lunge führten. Dabei können Proteasen z.B. durch Freisetzen von Wachstumsfaktoren und Chemokinen aus der ECM zu verstärkter Proliferation beitragen, wie es für MMPs bereits beschrieben ist (Egeblad und Werb, 2002). Vorläufige Untersuchungen zu der Kinetik der HT1080-Lungenmetastasierung haben uns gezeigt, dass sechs Stunden nach der systemischen Inokulation der Tumorzellen eine sehr große Menge an einzellig vorliegenden HT1080-Zellen in der Lunge gefunden werden können, welche in ihrer Anzahl deutlich über der zu Tierversuchsende zählbaren Anzahl an Makrometastasen liegt. Bereits kurze Zeit später, können nur noch vereinzelt Tumorzellen in der Lunge gefunden werden, welche im Verlauf des Experimentes zu Makrometastasen auswachsen (bisher unveröffentlichte Daten). Da in dem in dieser Arbeit verwendeten Metastasierungsmodell in der Leber in der Regel nur einzelne HT1080 Zellen vorkommen, deren Extravasation und Überleben von Proteinaseen unabhängig zu sein scheint, könnte die Formation der Makrometastasen in diesem Organ ein Resultat induzierter Proliferation und/oder verringerter Apoptose ruhender HT1080-Zellen durch Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 in ihrer Mikroumgebung sein.

Für TIMP-1 ist bereits mehrfach und an verschiedenen Zelllinien eine proliferationssteigernde Wirkung beschrieben worden (Hayakawa, et al., 1992; Porter et al., 2004). Zudem ist bekannt, dass TIMP-1 die Apoptose verschiedener Zelllinien *in vitro* (Lee et al., 2003; Murphy et al., 2002; Vorotnikova et al., 2004; Yoshiji et al., 2002) reduziert. In TIMP-1 transgenen Mäusen wurde in einem Modell spontaner Transformation von Brustepithelzellen die Apoptose in den aus diesen transformierten Zellen entstandenen Tumoren, im Vergleich zu Tumoren aus den Kontrolltieren, inhibiert (Yamazaki et al., 2004). Kürzlich wurde veröffentlicht, dass TIMP-1 einen von Proliferationssteigerung und Apoptosereduktion unabhängigen pro-tumorigenen Effekt aufweist. Überexpression von Timp-1 führt zu einer verstärkten Bildung aggressiver desmoider Tumoren in transgenen Mäusen, ohne dass Proliferation bzw. Apoptose in Tumoren aus transgenen Mäusen gegenüber Tumoren aus den Kontrolltieren verändert ist. Der ge-

naue Wirkungsmechanismus von Timp-1 wurde jedoch nicht gefunden (Kong et al., 2004 b). Da in der vorliegenden Arbeit die Leber-Makrometastasierung jedoch nur nach zusätzlicher Expression von Cystatin C erfolgte, müssen neben TIMP-1 induzierten Mechanismen weitere Faktoren eine Rolle spielen. Kürzlich wurde veröffentlicht, dass Cystatine mit MMPs interagieren. Fetunin A, ein Mitglied der Cystatin-Superfamilie, verhindert nach Binden an MMP-9 die autolytische Degradation von MMP-9 ohne die gelatinolytische Aktivität von MMP-9 zu behindern. Es konnte zudem gezeigt werden, dass auch Cystatin C an MMP-9 binden kann, was vermuten lässt, dass auch Cystatin C aktives MMP-9 konserviert (Ray et al., 2003). Demnach könnte Cystatin C die Auswirkungen der durch TIMP-1 induzierten MMP-9 Überexpression verstärkt haben. Zudem kann Cystatin C durch Inhibition von Cathepsin B, welches pro-apoptotisch wirksam ist (Foghsgaard et al., 2002), anti-apoptotisch wirken und somit einen proliferationssteigernden bzw. anti-apoptotischen Effekt von TIMP-1 verstärken. In dieser Arbeit wurde Cystatin C durch die Wirtszellen exprimiert, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer anti-apoptotischen Wirkung in den Tumorzellen reduziert wurde, jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Erhöhtes Vorkommen an Cystatin C im Serum von Krebspatienten ist zudem mit einer schlechten Prognose für Patienten verschiedener Krebserkrankungen assoziiert (Kos et al., 1997; Kos et al., 2000; Strojan et al., 2004; Takeuchi et al., 2001). Es wurde bisher jedoch noch nicht gezeigt, dass Cystatin C direkt an der verstärkten Tumorprogression in diesen Patienten beteiligt ist. Zwar könnte Cystatin C wie bereits beschrieben anti-apoptotisch wirken, jedoch wurden bisher keine Patientenstudien veröffentlicht, welche diesen Zusammenhang – Cystatin C Überexpression und reduzierte Apoptose – zeigen. Es ist jedoch bekannt, dass reduzierte Filtration durch Glomeruli zu einer Anreicherung von Cystatin C im Blut von Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion führt. Bei akutem Nierenversagen kann der Gehalt an Cystatin C im Blut zur frühen Diagnostik verwendet werden und kann sogar ein bis zwei Tage früher verwendet werden als der bisher eingesetzte Marker Creatinin (Herget-Rosenthal et al., 2004). Chemotherapie ist assoziiert mit nieren-toxischen Nebenwirkungen. In Kindern mit Leukämien bzw. soliden Tumoren wurde der Cystatin C Gehalt im Serum vor und nach Chemotherapie ermittelt. Dabei ergab sich, dass nach einer Chemotherapie der Gehalt an Cystatin C im Serum stark zunahm und mit der verringerten Filtrationsrate durch die geschädigten Nieren korrelierte (Bardi et al., 2004). Daher erscheint es notwendig, bei Studien, welche die Expressionen von Cystatinen bei Krebspatienten untersuchen zwischen Patienten vor bzw. nach einer Chemotherapie zu unterscheiden. In Cystatin C *knock out* Mäusen wurde die experimentelle Lungenmetastasierung muriner Melanomzellen im Vergleich zu der Lungenmetastasierung in wildtyp Mäusen reduziert (Huh et

al., 1999). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit gefundenen anti-metastatischen Wirksamkeit der Cystatin C Überexpression durch den Wirt. In der eben zitierten Arbeit war zu verschiedenen Zeitpunkten, von 15 Minuten bis zwei Wochen nach der Tumorzellinokulation, in den Cystatin C *knock out* Mäusen die Anzahl der Lungenmetastasen signifikant erhöht. Allerdings räumen die Autoren ein, dass die Unterschiede der Metastasenzahl zwischen den beiden Mauslinien weniger stark ausgeprägt waren, wenn *lacZ*-markierte Melanomzellen verwendet wurden, welches ihnen erlaubte auch kleinere Metastasen zu zählen (Huh et al., 1999). Aus diesem Ergebnis lässt sich folgern, dass in der Cystatin C *knock out* Gruppe mehr Mikrometastasen detektiert wurden als in der Kontrolle. Dieses deutet daraufhin, dass eventuell ein reduziertes Wachstum der Tumorzellen in Cystatin C-defizienten Tieren zu der reduzierten Metastasenzahl führte. Im Umkehrschluss könnte also angenommen werden, dass die Expression von Cystatin C in den wildtyp-Mäusen die Proliferation der Melanomzellen unterstützte. Die beobachtete Induktion der Makrometastasierung durch HT1080 Zellen in simultan TIMP-1 und Cystatin überexprimierenden Lebern könnte demnach aus einer Kombination reduzierter Apoptose und verstärkter Proliferation, vermittelt durch beide Transgene, resultieren. Es müssen jedoch Immunohistochemische Analysen durchgeführt werden, um die Proliferations- und Apoptose-Rate von HT1080 Zellen in den unterschiedlich transduzierten Lebern zu bestimmen. Hierfür sollte allerdings ein Zeitpunkt gewählt werden an welchem die induzierten Makrometastasen in der Leber noch nicht formiert sind, um möglichst die Proliferation bzw. Apoptose einzellig vorliegender HT1080 Zellen ermitteln zu können. Nur so ist ein direkter Vergleich zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen möglich. Auf diese Weise könnte überprüft werden, ob die hier diskutierte Hypothese, nämlich dass verstärktes Wachstum der Tumorzellen zu der Makrometastasierung führte und nicht verstärkte Extravasation der Zellen, stimmt.

Da die Expression von Proteasen, wie bereits beschrieben, zu einer Proliferationssteigerung durch Freisetzen bzw. Aktivierung von Wachstumsfaktoren führen können, wurden verschiedene tumorassoziierte Proteasen hinsichtlich veränderter Expression durch simultane TIMP-1 und Cystatin C Expression untersucht. Die Analyse dieser tumorassoziierten Proteasen ergab, dass von allen untersuchten Parametern (MMP-9, MMP-2, Cathepsin B, Cathepsin L, uPA, tPA), nur tPA mit der Formation von Leber-Makrometastasen assoziiert war. Durch simultane Überexpression von TIMP-1 und Cystatin C kam es zu einem höheren Gehalt an tPA in tumortragenden Tieren. Zur Überprüfung ob tPA bzw. PAs im Allgemeinen an der Formation der Makrometastasen beteiligt waren, wurde der natürliche Inhibitor von PAs, PAI-2, zusätzlich zu Cystatin C und TIMP-1 überexprimiert. Durch diese zusätzliche Überexpression von

PAI-2 konnte gezeigt werden, dass PAs essentiell an der durch TIMP-1 und Cystatin C ausgelösten Leber-Makrometastasierung beteiligt waren. Die Inhibition von PAs führte zur Unterdrückung dieser Nebenwirkung. *In vitro* wurde bereits gezeigt, dass HT1080-Zellen auf RNA Ebene tPA exprimieren (Sugiura et al., 1999). Wie bereits unter 2.1 diskutiert scheinen PAs am Wachstum von Tumoren beteiligt zu sein, was ebenfalls darauf hinweist, dass eine Proliferationssteigerung ruhender Zellen Auslöser der Makrometastasierung der Leber war. Da tPA auf Proteinebene als einziger PA mit der durch Überexpression von TIMP-1 und Cystatin C ausgelösten Makrometastasierung korrelierte, schien dieser PA bei der vorliegenden Nebenwirkung von größerer Bedeutung zu sein als uPA. In Leukämien können erhöhte Konzentrationen an tPA in cerebrospinaler Flüssigkeit nachgewiesen werden (Teesalu et al., 2002), im Serum von Ovarialkarzinompatientinnen stellt tPA sogar einen negativen prognostischen Marker dar (Borgfeldt et al., 2003) zudem wird die tPA Expression in Nervenzellen mit einer Reihe von neuronalen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht (Teesalu et al., 2002).

Neben den bisher beschriebenen Mechanismen welche zur Ausbildung von Makrometastasen notwendig sind, Extravasation der Tumorzellen, Überleben der Tumorzellen im Wirtsorgan und Proliferation der Zellen, gibt es einen weiteren notwendigen Faktor. Da Sauerstoff und Nährstoffe aus dem Gefäßsystem nur durch wenige Zellschichten diffundieren, müssen Metastasen ab einer Größe von 1 mm zusätzlich durch neu gebildete Blutgefäße versorgt werden, da es anderenfalls zu Mangelversorgung der Tumorzellen und Ausbildung von Nekrosen kommt (Folkmann, 1986). Da die HT1080 Makrometastasen in simultan TIMP-1 und Cystatin C überexprimierenden Lebern in der Regel größer als 1 mm waren, müsste in weiteren Untersuchungen ermittelt werden, ob diese Metastasen von neugebildeten Blutgefäßen (An-giogenese) versorgt werden oder, ob in größeren Metastasen nekrotische Areale in den Metastasen entdeckt werden können, welches auf eine Mangelversorgung der Metastasen hinweisen würde.

### **6.5 HT1080 Makrometastasierung der Leber korreliert mit erhöhtem Gehalt an HGF**

Ein Signaltransduktionsweg welcher sowohl zu einer verstärkten Expression von MMPs (Harvey et al., 2000; Monvoisin et al., 2002; Bennett, et al., 2000) sowie zu der von Faktoren des PA-Systems (Tacchini et al., 2004; Hall et al., 2004) führen kann, ist der HGF (Hepatozyten-Wachstumsfaktor, *hepatocyte growth factor*)-Signaltransduktionsweg. Daher wurde in Lebern aller Behandlungsgruppen, am Ende des experimentellen Metastasierungsmodells humaner Fibrosarkomzellen, die HGF-Konzentration ermittelt. Dabei zeigte sich, dass nur in

der simultan Cystatin C und TIMP-1 überexprimierenden Gruppe erhöhte Mengen an HGF nachweisbar waren. Da in der Gruppe mit zusätzlicher Überexpression von PAI-2 kein HGF-Anstieg nachweisbar war könnte es sein, dass nicht die simultane Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 zu dem Anstieg der HGF-Konzentration führte sondern, dass die HGF Expression von der Makrometastasierung ausgelöst wurde. Um diese Frage zu beantworten müsste die HGF-Konzentration in AdCysC und/oder AdTIMP-1 transduzierten Lebern ohne Tumorzellen bestimmt werden. Da tPA ebenfalls mit der Makrometastasierung der Leber korreliert, könnte ebenso tPA zu dem Anstieg von HGF geführt haben, was auch die unveränderten HGF-Konzentrationen in den Lebern der Dreifachbehandlung erklären könnte. HGF wird als pro-Form sezerniert und kann von verschiedenen Proteasen aktiviert werden, unter anderem von tPA (Marx et al., 1993). Aktives HGF kann nach Bindung an seinen Rezeptor c-Met Signaltransduktionskaskaden auslösen, die wie beschrieben, zu einem Anstieg der Proteinase-Expression führen kann. Um die genauen Zusammenhänge zwischen HGF und der Makrometastasierung zu klären, bedarf es noch einiger Untersuchungen.

Der Zusammenhang zwischen HGF und Proteinasen scheint komplizierter zu sein als bisher angenommen. HGF führt zu einem Anstieg der Expression verschiedener Proteinasen, wie z.B. MMP-9 (Kermorgant et al., 2001; Bennett, et al., 2000), PAs (Hall et al., 2004; Tacchini et al., 2004) und zu verstärkter Aktivierung von Plasminogen (Jeffers et al., 1996). Einige dieser Proteinasen können proHGF aktivieren und somit HGF-Signaltransduktionen verstärken, wie z.B. PAs. Andererseits führt die Expression von MMP-9 und Plasminogen zu einer vermeintlich erhöhten Generierung von Angiostatin (Pozzi et al., 2002), welches wiederum *in vitro* selektiv die HGF-Signaltransduktion in Zellen der glatten Muskulatur und Endothelzellen inhibiert (Wajih und Sane, 2003). Es bedarf also noch einiger Studien, die komplexen Zusammenhänge zwischen der Aktivität von Proteinasen und HGF erklären zu können. Auffallenderweise ergibt sich durch den erhöhten Gehalt an HGF eine erneute Parallele zu der Inhibition von MMPs durch Batimastat. Wir konnten einen Anstieg an HGF durch Batimastat Behandlung in den Lebern der behandelten Mäuse finden (Krüger et al., 2001). Aufgrund der vielen Parallelen zwischen der Behandlung mit Batimastat und der mit Cystatin C und TIMP-1, scheint die Breitspektrum-Inhibition von MMPs zumindest teilweise Auslöser der in dieser Arbeit beobachteten Nebenwirkung zu sein. Wir konnten für synthetische Inhibitoren bereits zeigen, dass im murinen T-Zell Lymphommodell die beobachteten Nebenwirkungen einer MMP-Inhibition ausblieben, wenn MMP-9-spezifische MMP-Inhibitoren verwendet wurden (Arlt et al., 2002). Um zu prüfen, ob sich auch hier Parallelen zwischen der „synthetischen“ und „natürlichen“ Inhibition von MMPs ergeben, müsste zunächst die für das HT1080-Modell

metastasenfördernden MMPs identifiziert werden und anschliessend TIMP-1 Mutanten verwendet werden, welche hinsichtlich ihrer Spezifität gegenüber diesen MMPs optimiert sind. In einer bisher unveröffentlichten Studie konnten wir zeigen, dass die prophylaktische Überexpression von TIMP-1 zu einem Anstieg der HGF-Expression in der Leber führte und diese nach der Inokulation muriner T-Zell Lymphomzellen noch verstärkt wurde. In der vorliegenden Arbeit konnte zu Tierversuchsende keine erhöhte HGF Expression in den TIMP-1 überexprimierenden Lebern gefunden werden. Im Gegensatz zu dem murinen T-Zell Lymphommodell, in welchem sich die Metastasen bereits sechs Tage nach Tumorzellinokulation formiert haben und somit die Tiere bereits neun Tage nach dem Gentransfer geopfert und der HGF Gehalt in der Leber bestimmt wurde, erfolgte die Präparation der Mäuse im HT1080-Metastasierungsmodell erst 24 Tage nach dem Gentransfer. Berücksichtigt man also diese Ergebnisse, erscheint es notwendig eine Studie durchzuführen, bei welcher Tiere im humanen Fibrosarkommodell bereits zu früheren Zeitpunkten geopfert werden um den genauen Verlauf der Metastasierung sowie der HGF Expression ermitteln zu können.

### 6.6 Ausblick

Das in dieser Arbeit überprüfte Konzept einer prophylaktischen Überexpression natürlicher Proteaseinhibitoren stellt einen viel versprechenden Ansatz einer anti-proteolytischen Therapie der Metastasierung dar. In dieser Arbeit konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Überexpression natürlicher Proteaseinhibitoren zu Nebenwirkungen hinsichtlich der Expression tumorassoziiertes Proteasen führen kann. Daher scheint die simultane Inhibition mehrerer Proteasefamilien eine wertvolle Strategie zu sein, die durch Inhibition eines Proteasesystems ausgelösten Steigerungen von Proteasen anderer Familien zu kompensieren. Diese konnte bereits durch die erfolgreiche additive Behandlung der experimentellen Lungenmetastasierung der verwendeten HT1080-Zellen durch Überexpression von TIMP-1 und PAI-2, sowie für die Reduktion der als Nebenwirkung durch simultane Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 aufgetretenen Makrometastasierung der Leber durch zusätzliche Überexpression von PAI-2 gezeigt werden. Um eine eventuelle allgemeine Wirksamkeit der simultanen Überexpression verschiedener natürlicher Inhibitoren zu untersuchen, müssen in der Zukunft zusätzlich noch andere Metastasierungsmodelle verwendet werden. Die Untersuchung der Mechanismen welche zu der verstärkten Protease-Expression durch Überexpression natürlicher Inhibitoren geführt haben, müssen noch genauestens untersucht werden. Eine Möglichkeit stellt dabei die Verwendung so genannter Micro-Fluid-Cards<sup>TM</sup> dar. Bei diesen Karten handelt es

sich um eine quantitative *real-time* PCR bei der gleichzeitig mehr als 380 cDNAs untersucht werden können. In unserem Institut steht eine solche Anwendung in Kürze zur Verfügung. Mittels dieser Technik werden wir Gewebeproben der in dieser Arbeit behandelten Tiere hinsichtlich Faktoren von Signaltransduktionen und weiteren Proteasen untersuchen. Der Vergleich von metastasenfremen sowie metastasentragenden Organen der verschiedenen Behandlungsgruppen soll uns Aufschluss über die den Nebenwirkungen zugrunde liegenden Regulationen geben.

Um zu untersuchen welchen Einfluss die PAs auf die Ausbildung von Metastasen haben, sollen in Zukunft *knock out* Mäuse verwendet werden bzw. hinsichtlich eines PA *knock outs* manipulierte Tumorzellen. Der Vergleich zwischen den Auswirkungen des uPA *knock outs* in den Wirtsorganen und den Tumorzellen soll uns die Bedeutung der von Tumor- bzw. Wirtszellen-produzierten PAs bei der Tumorprogression vermitteln. Ein adäquates Konzept wurde von uns für die Untersuchung von MMP-9 erarbeitet. Für den *knock out* von Proteasen in Tumor- bzw. Wirtszellen stehen uns bereits lentivirale Vektoren zur Verfügung welche siRNAs (*small inhibitory RNA*) kodieren können. Durch diese siRNA kodierenden Vektoren soll nach Transduktion der Tumor- bzw. Wirtszellen spezifisch die Ziel mRNA reduziert werden.

Durch die vielen Parallelen zwischen der Breitspektrum-Inhibition von MMPs durch Batimastat bzw. Cystatin C und TIMP-1, sollen in zukünftigen Studien spezifitätsoptimierte TIMP-1-Mutanten verwendet werden. Es soll überprüft werden, ob die bei Verwendung synthetischer MMP-9-spezifitätsoptimierter Inhibitoren erreichte Verstärkung der anti-metastatischen Effizienz auf natürliche Inhibitoren übertragbar ist. In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits, unter meiner Anleitung, ein Adenovirus konstruiert, welches eine spezifitätsoptimierte Variante von TIMP-1 kodiert. Die cDNA dieser TIMP-1-Mutante wurde in den Arbeitsgruppen von Keith Brew und Hideaki Nagase konstruiert und uns zur Verfügung gestellt.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abrahamson, M., Alvarez-Fernandez, M. und Nathanson C.M. (2003).** Cystatins. *Biochem. Soc. Symp.*, **70**: 179-199.
- Abrahamson, M., Dalboge, H., Olafsson, I., Carlsen, S. und Grubb, A. (1988).** Efficient production of native, biologically active human cystatin C by *Escherichia coli*. *F.E.B.S. Lett.*, **236**: 14-18.
- Abrahamson, M., Barrett, J.A., Salvesen, G. und Grubb A. (1986).** Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentration in body fluids. *J. Biol. Chem.*, **261**: 11282-11289.
- Al-Ejeh, F., Croucher, D. und Ranson, M. (2004).** Kinetic analysis of plasminogen activator inhibitor type-2: urokinase complex formation and subsequent internalisation by carcinoma cell lines. *Exp. Cell Res.*, **297**: 259-271.
- Almholt, K., Lund, L.R., Rygaard, J., Nielsen, B.S., Dano, K., Romer, J. und Johnson, M. (2005).** Reduced metastasis of transgenic mammary cancer in urokinase-deficient mice. *Int. J. Cancer*, **113**: 525-532.
- Andolfo, A., English, W.R., Resnati, M., Murphy, G., Blasi, F. und Sidenius, N. (2002).** Metalloproteases cleave the urokinase-type plasminogen activator receptor in the D1-D2 linker region and expose epitopes not present in the intact soluble receptor. *Thromb. Haemost.*, **88**: 298-306.
- Antalis, T.M., Clark, M.A., Barnes, T., Lehrbach, P.R., Devine, P.L., Schevzov, G., Goss, N.H., Stephens, R.W. und Tolstoshev, P. (1988).** Cloning and expression of a cDNA coding for a human monocyte-derived Plasminogen activator inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**: 985-989.
- Arlt, M.J.E. (2004).** Kombination spezifitätsoptimierter Proteaseinhibitoren als effiziente anti-metastatische Therapie in präklinischen Modellen. Dissertation.
- Arlt, M., Kopitz, C., Pennington, C., Watson, K.L., Krell, H.W., Bode, W., Gansbacher, B., Khokha, R., Edwards, D.R., und Krüger, A. (2002).** Increase in Gelatinase-specificity of Matrix Metalloproteinase Inhibitors Correlates with Antimetastatic Efficacy in a T-Cell Lymphoma Model. *Cancer Res.*, **62**: 5543-5550.
- Bajou, K., Noel, A., Gerard, R.D., Masson, V., Brünner, N., Holst-Hansen, C., Skobe, M., Fusenig, N.E., Carmeliet, P., Collen, D. und Foidard, J.M. (1998).** Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat. Med.*, **4**: 923-928.
- Banke, I.J., Arlt, M.J., Pennington, C., Kopitz, C., Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Gansbacher, B., Quigley, J.P., Edwards, D.R., Sturzebecher, J., and Krüger, A. (2003).** Increase of anti-metastatic efficacy by selectivity- but not affinity-optimization of synthetic serine protease inhibitors. *Biol. Chem.*, **384**: 1515-1525.
- Bardi, E., Bobok, I., Olah, A.V., Olah, E., Kappelmayer, J. und Kiss, E. (2004).** Cystatin C is a suitable marker of glomerular function in children with cancer. *Pediatr. Nephro.*, **19**: 1145-1157.
- Bennett, J.H., Morgan, M.J., Whawell, S.A., Atkin, P., Roblin, P., Furness, J. und Speight, P.M. (2000).** Metalloproteinase expression in normal and malignant oral keratinocytes: stimulation of MMP-2 and -9 by scatter factor. *Eur. J. Oral. Sci.*, **108**: 281-291.
- Bennett, W.F., Paoni, N.F., Keyt, B.A., Botstein, D., Jones, A.J.S., Presta, L., Wurm, F.M. und Zoller, M.J. (1991).** High resolution analysis of functional determinants on human tissue-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.*, **266**: 5191-5201.
- Berdowska, I. (2004).** Cysteine proteases as disease markers. *Clin. Chim. Acta*, **342**: 41-69.

- Bett, A.J., Haddara, W., Prevec, L. und Graham, F.L. (1994).** An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**: 8802-8806.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res.*, **7**: 1513-1519.
- Blasi, F. und Carmeliet, P. (2002).** uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**: 932-943.
- Blettner, M. (2003).** Krebs, Riskante Umwelt-riskantes Verhalten. *Spektrum der Wissenschaft Spezial Krebsmedizin II*, 34-38.
- Bode, W. und Huber, R. (2000).** Structural basis of endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim. Biophys. Acta*, **1477**: 241-252.
- Borgfeldt, C., Bendahl, P.O., Ferno, M. und Casslen, B. (2003).** High preoperative plasma concentration of tissue Plasminogen activator (tPA) is an independent marker for shorter overall survival in patients with ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, **91**: 112-117.
- Brand, K. (2002).** Cancer gene therapy with tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). *Curr. Gene Ther.*, **2**: 255-271.
- Bromme, D. und Kaleta, J. (2002).** Thiol-dependent cathepsins: pathophysiological implications and recent advances in inhibitor design. *Curr. Pharm. Des.*, **8** : 1639-1658.
- Bürgle, M., Sperl, S., Stürzebecher, J., Krüger, A., Schmalix, W., Kessler, H., Moroder, L., Magdolen, V., Wilhelm, O.G. und Schmitt, M. (2002).** The urokinase-type plasminogen activator (uPA) system: a new target for tumor therapy. In: Smith, J. und Simons, C. (Hrsg.), *Proteinase and Peptidase Inhibition, Recent Potential Targets for Drug Development*. Taylor and Francis, London und New York, 231-248.
- Byeon, I.J. und Llinas, M. (1991).** Solution structure of tissue-type plasminogen activator kringle 2 domain complexed to 6-aminohexanoic acid an antifibrinolytic drug. *J. Mol. Biol.*, **222**: 1035-1051.
- Cao, Y., Ji, R.W., Davidson, D., Schaller, J., Marti, D., Sohndel, S., McCance, S.G., O'Reilly, M.S., Llinas, M. und Folkman, J. (1996).** Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **271**: 29461-29467.
- Castellino, F.J. und McCane, S.G. (1997).** The kringle domains of human Plasminogen. *Ciba. Found. Symp.*, **212**: 60-65.
- Chambers, A.F., Naumov, G.N., Varghese, H.J., Nadkarni, K.V., MacDonald, I.C. und Groom, A.C. (2001).** Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, **10**: 243-255.
- Chambers, A. F., und Matrisian, L. M. (1997).** Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **89**: 1260-1270.
- Chesler, L., Dolde, D.W., Bersch, N. und Johnson, M.D. (1995).** Metalloproteinase inhibition and erythroid potentiation are independent activities of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Blood*, **86**: 4506-4515.
- Cohen, C.J., Shieh, J.T.C., Pickles, R.J., Okegawa, T., Hsieh, J.T. und Bergelson, J.M. (2001).** The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**: 15191-15196.
- Colella, R. und Casey, S.F. (2003).** Decreased activity of cathepsin L + B and decreased invasive ability of PC3 prostate cancer cells. *Biotech. Histochem.*, **78**: 101-108.
- Corticchiato, O., Cajot, J.F., Abrahamson, M., Chan, S.J., Keppler, D. und Sordat, B. (1992).** Cystatin C and Cathepsin B in human colon carcinoma: expression by cell lines and matrix degradation. *Int. J. Cancer*, **52**: 645-652.

- Coulibaly, S., Schwihla, H., Abrahamson, M., Albini, A., Cerni, C., Clark, J.L., Ng, K.M., Katunuma, N., Schlappack, O., Glossl, J. und Mach, L. (1999).** Modulation of invasive properties of murine squamous carcinoma cells by heterologous expression of cathepsin B and cystatin C. *Int. J. Cancer*, **83**: 526-531.
- Coussens, L.M., Fingleton, B. und Matrisian, L.M. (2002).** Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*, **295**: 2387-2392.
- Cox, J.L., Sexton, P.S., Green, T.J. und Darmani, N.A. (1999).** Inhibition of B16 melanoma metastasis by overexpression of the cysteine proteinase inhibitor cystatin C. *Melanoma Res.*, **9**: 369-374.
- D'Alessio, S., Fibbi, G., Cinelli, M., Guiducci, S., Del Rosso, A., Margheri, F., Serrati, S., Pucci, M., Kahaleh, B., Fan, P., Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Matucci-Cerinic, M. und Del Rosso, M. (2004).** Matrix metalloproteinase 12-dependent cleavage of urokinase receptor in systemic sclerosis microvascular endothelial cells results in impaired angiogenesis. *Arthritis. Rheum.*, **50**: 3275-3285.
- De Lorenzo, M.S., Ripoll, G.V., Yoshiji, H., Yamazaki, M., Thorgeirsson, U.P., Alonso, D.F. und Gomez, D.E. (2003).** Altered tumor angiogenesis and metastasis of B16 melanoma in transgenic mice overexpressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *In Vivo*, **17**: 45-50.
- DeClerck, Y., Imren, S., Montgomery, M.P., Mueller, B.M., Reisfeld, R.A. und Laug, W.E. (1997).** Proteases and protease inhibitors in tumor progression. In: Church et al. (Hrsg.) *Chemistry and Biology of Serpins*, Plenum Press, New York, 89-97.
- Devy, L., Blacher, S., Grignet-Debrus, C., Bajou, K., Masson, V., Gerard, R.D., Gils, A., Carmeliet, G., Carmeliet, P., DeClerck, P.J., Noel, A. und Foidart, J.M. (2002).** The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *F.A.S.E.B. J.*, **16**: 147-154.
- Donahue, R.A., Jr. und Bloom, F.R. (1998).** Transformation efficiency of E. coli electroporated with large plasmid DNA. *Focus®*, **20**: 77-79.
- Eastman, D., Wurm, F.M., Van Reis, R. und Higgins, D.L. (1992).** A region of tissue plasminogen activator that affects plasminogen activation differentially with various fibrin(ogen)-related stimulators. *Biochemistry*, **31**: 419-422.
- Eccles, S.A. (2001).** Basic principles for the study of metastasis using animal models. In: Brooks, S.A. und Schumacher, U (Hrsg.) *Metastasis Research Protocols, Volume 2, Analysis of Cell Behavior In Vitro and In Vivo*. Humana Press, Totowa, New Jersey, 161-171.
- Egeblad, M. und Werb, Z. (2002).** New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer.*, **2**: 161-174.
- Elezkurtaj, S., Kopitz, C., Baker, A.H., Perez-Canto, A., Arlt, M.J.E., Khokha, R., Gansbacher, B., Anton, M., Brand, K. und Krüger, A. (2004).** Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the liver: efficient protection against T-cell lymphoma and colon carcinoma metastasis. *J. Gene Med.*, **6**: 1228-1237.
- Foghsgaard, L., Lademann, D., Wissing, D., Poulsen, B. und Jäättelä, M. (2002).** Cathepsin B mediates tumor necrosis factor-induced arachidonic acid release in tumor cells. *J. Biol. Chem.*, **277**: 39499-39506.
- Folkman, J. (1986).** How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res.*, **46**: 467-473.
- Frandsen, T.L., Holst-Hansen, C., Nielsen, B.S., Christensen, I.J., Nyengaard, J.R., Carmeliet, P. und Brünner, N. (2001).** Direct evidence of the importance of stromal urokinase plasminogen activator (uPA) in the growth of an experimental human breast cancer using a combined uPA gene-disrupted and immunodeficient xenograft model. *Cancer Res.*, **61**: 532-537.

- Freije, J.M.P., Lawrence, J., Hollingshead, M.G. (1997).** Identification of compounds with preferential inhibitory activity against low-Nm-23 expressing breast carcinoma and melanoma cell lines. *Nat. Med.*, **3**: 395-400.
- Fujiuchi, Y., Nagakawa, O., Murakami, K., Fuse, H. und Saiki, I. (2003).** Effect of hepatocyte growth factor on invasion of prostate cancer cell lines. *Oncol. Rep.*, **10**: 1001-1006.
- Galileo, D.S., Gray, G.E., Owens, G.C., Majors, J. und Sanes, J.R. (1990).** Neurons and glia arise from a common progenitor in chicken optic tectum: demonstration with two retroviruses and cell type-specific antibodies, *Procl. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**: 458-462.
- Geiser, A.G., Anderson, M.J. und Stanbridge, E.J. (1989).** Suppression of tumorigenicity in human cell hybrids derived from cell lines expressing different activated ras oncogenes. *Cancer Res.* **49**: 1572-1577.
- Giannelli, G., Erriquez, R., Fransvea, E., Daniele, A., Trerotoli, P., Schittulli, F., Grano, M., Quaranta, M. und Antonaci, S. (2004).** Proteolytic imbalance is reversed after therapeutic surgery in breast cancer patients. *Int. J. Cancer*, **109**: 782-785.
- Gibbs, W.W. (2003).** Krebs, Chaos in der Erbsubstanz. *Spektrum der Wissenschaft Spezial Krebsmedizin II*, 12-22.
- Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H. Und Thorgeirsson, U.P. (1997).** Tissue Inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.*, **74** : 111-122.
- Gondi, C.S., Lakka, S.S., Dinh, D.H., Olivero, W.C., Gujrati, M. und Rao, J.S. (2004).** RNAi-mediated inhibition of Cathepsin B and uPAR leads to decreased cell invasion, angiogenesis, and tumor growth in gliomas. *Oncogene*, **23**: 8486-84896.
- Goss, K.J.H., Brown, P.D. und Matrisian, L.M. (1998).** Differing effects of endogenous and synthetic inhibitors of metalloproteinases on intestinal tumorigenesis. *Int. J. Cancer*, **78**: 629-635.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977).** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.*, **36**: 59-72.
- Granelli-Piperno, A. und Reich, E. (1978).** A study of proteases and protease-inhibitor complexes in biological fluids. *J. Exp. Med.*, **148**: 223-234.
- Grubb, A. (2000).** Cystatin C – properties and use as diagnostic marker. *Advan. Clin. Chem.*, **35**: 63-99.
- Guedez, L., McMarlin, A.J., Kingma, D.W., Bennett, T.A., Stetler-Stevenson, M. und Stetler-Stevenson, W.G. (2001).** Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 alters the tumorigenicity of Burkitt's lymphoma via divergent effects on tumor growth and angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, **158**: 1207-1215.
- Günthert, U. (1997).** Biologie der Metastasierung und Tumorangiogenese. In: Ostendorf, P.C. und Seeber, S.(Hrsg.) *Hämatologie und Onkologie*. Urban und Schwarzenberg, München, 160-167.
- Guy, C.T. und Cardoso, G. (2001).** Transgenic animal models. . In: Brooks, S.A. und Schumacher, U (Hrsg.) *Metastasis Research Protocols, Volume 2, Analysis of Cell Behavior In Vitro and In Vivo*. Humana Press, Totowa, New Jersey, 231-205.
- Hall, C.L., Tsan, R., Mugnai, G., Mazar, A., Radinsky, R. und Pettaway, C.A. (2004).** Enhanced invasion of hormone refractory prostate cancer cells through hepatocyte growth factor (HGF) induction of urokinase-type plasminogen activator (u-PA). *Prostate*, **59**: 167-176.
- Harvey, P., Clark, I.M., Jaurand, M.C., Warn, R.M. and Edwards, D.R. (2000).** Hepatocyte growth factor/scatter factor enhances the invasion of mesothelioma cell lines and the expression of matrix metalloproteinases. *Br. J. Cancer*, **83**: 1147-1153.

- Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E. und Iwata, K. (1992).** Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in skin. *F.E.B.S. Lett.*, **298**: 29-32.
- Herget-Rosenthal, S., Marggraf, G., Husing, J., Goring, F., Pietruck, F., Janssen, O., Philipp, T. und Kribben, A. (2004).** Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int.*, **66**: 1115-1122.
- Hewitt, R.E., Brown, K.E., Corcoran, M. und Stetler-Stevenson, W.G. (2000).** Increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 (TIMP-1) in a more tumourigenic colon cancer cell line. *J. Pathol.*, **192**: 455-459.
- Hitt, M., Bett A.J., Addison, C.L., Prevec, L. und Graham, F.L. (1995).** Techniques for human adenovirus vector construction and characterization. In: Adolph, K.W. (Hrsg.) *Viral Gene Techniques*, Vol. 7, Academic Press, San Diego, 13-30.
- Holmgren, L., O'Reilly, M.S. und Folkman, J. (1995).** Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat. Med.*, **1**: 149-153.
- Holten-Andersen, M., Christensen, I.J., Nilbert, M., Bendahl, P.O., Nielsen, H.J., Brünner, N. und Fernebro, E. (2004).** Association between preoperative plasma levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and rectal cancer patient survival: a validation study. *Eur. J. Cancer*, **40** : 64-72.
- Honda, T., Saitoh, H., Masuko, M., Abe, T.K., Tominaga, K., Kozakai, I., Kobayashi, K., Kumanishi, T., Watanabe, Y.G., Odani, S. und Kuwano, R. (2000).** The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Brain Res. Mol.*, **77** : 19-28.
- Hornebeck, W. (2003).** Down-regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. *Pathol. Biol.*, **51**: 569-573.
- Huh, C.G., Hakansson, K., Nathanson, C.M., Thorgeirsson, U.P., Jonsson, N., Grubb, A., Abrahamson, M. und Karlsson, S. (1999).** Decreased metastatic spread in mice homozygous for null allele of the cystatin C protease inhibitor gene. *Mol. Pathol.*, **52**: 332-340.
- Ito, H., Duxbury, M., Benoit, E., Farivar, R.S., Gardner-Thorpe, J., Zinner, M.J., Ashley, S.W. und Whang, E.E. (2003).** Fibronectin-induced COX-2 mediates MMP-2 expression and invasiveness of rhabdomyosarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **318**: 594-600.
- Jaffe, H.A., Danel, C., Longenecker, G., Metzger, M., Setoguchi, Y., Rosenfeld, M.A., Gant, T.W., Thorgeirsson, S.S., Stratford-Perricaudet, L.D. Perricaudet, M. et al. (1992).** Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver. *Nat. Genet.*, **1**: 372-378.
- Jeffers, M., Rong, S. und Vande Woude, G.F. (1996).** Enhanced tumorigenicity and invasion-metastasis by hepatocyte growth factor/scatter factor-met signalling in human cells concomitant with induction of the urokinase proteolysis network. *Mol. Cell Biol.*, **16**: 1115-1125.
- Jones, N. und Shenk, T. (1978).** Isolation of deletion and substitution mutants of adenovirus type 5. *Cell*, **13**: 181-188.
- Joyce, J.A. und Hanahan, D. (2004).** Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. *Cell Cycle*, **3**: ahead of print.
- Kaklamani, V.G. und Pasche, B. (2004).** Role of TGF-beta in cancer and the potential for therapy and prevention. *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, **4**: 649-661.
- Kallakury, B.V.S., Karikhalli, S., Haholu, A., Sheehan, C.E., Azumi, N. und Ross, J.S. (2001).** Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, **7**: 3113-3119.

- Katanuma, N., Tsuge, H., Nukatsuka, M., Asao, T. und Fukushima, M. (2002).** Structure-based design of specific cathepsin inhibitors and their application to protection of bone metastases of cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **397**: 305-311.
- Kato, T., Imatani, T., Miura, T., Minaguchi, K., Saitoh, E. und Okuda, K. (2000).** Cytokine-inducing activity of family 2 cystatins. *Biol. Chem.*, **381**: 1143-1147.
- Kayser, K., Richter, N. Hufnagl, P., Kayser, G., Kos, J. Und Werle, B. (2003).** Expression, proliferation activity and clinical significance of cathepsin B and cathepsin L in operated lung cancer. *Anticancer Res.*, **23**: 2767-2772.
- Kermorgant, S., Aparicio, T., Dessirier, V., Lewin, M.J.M. und Lehy, T. (2001).** Hepatocyte growth factor induces colonic cancer cell invasiveness via enhanced motility and protease overproduction. Evidence for PI3 kinase and PKC involvement. *Carcinogenesis*, **22**: 1035-1042.
- Kim, J.W., Wong, C.W., Goldsmith, J.D., Song, C., Fu, W., Allion, M.B., Herlyn, M., Al-Mehdi, A.B. und Muschel, R.J. (2004).** Rapid apoptosis in the pulmonary vasculature distinguishes non-metastatic from metastatic tumor-cells. *Cancer Lett.*, **213**: 203-212.
- Konduri, S.D., Yanamandra, N., Siddique, K., Joseph, A. Dinh, D.H., Olivero, W.C., Gujrati, M., Kouraklis, G., Swaroop, A., Kyritsis, A.P. und Rao, J.S. (2002).** Modulation of cystatin C expression impairs the invasive and tumorigenic potential of human glioblastoma cells. *Oncogene*, **21**: 8705-8712.
- Kong, W., Longaker, M.T. und Lorenz, H.P. (2004) a.** Cyclophilin C-associated protein is a mediator for fibronectin fragment-induced MMP-13 expression. *J. Biol. Chem.*, **279**: 55334-55340.
- Kong, Y., Poon, R., Nadesan, P., Di Muccio, T., Fodde, R., Khokha, R. Und Alman, B.A. (2004) b.** Matrix metalloproteinase activity modulates tumor size, cell motility, and cell invasiveness in murine aggressive fibromatosis. *Cancer Res.*, **64**: 5795-5803.
- Koop, S., Schmidt, E. E., MacDonald, I. C., Morris, V. L., Khokha, R., Grattan, M., Leone, J., Chambers, A. F., and Groom, A. C. (1996).** Independence of metastatic ability and extravasation: metastatic ras- transformed and control fibroblasts extravasate equally well. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**: 11080-11084.
- Koop, S., MacDonald, I.C., Luzzi, K., Schmidt, E.E., Morris, V.L., Grattan, M., Khokha, R., Chambers, A.F., and Groom, A.C. (1995).** Fate of melanoma cells entering the microcirculation: over 80 % survive and extravasate. *Cancer Res.*, **55**: 2520-2523.
- Kos, J., Krasovec, M., Cimerman, N., Nielsen, H.J., Christensen, I.J. und Brunner, N. (2000).** Cysteine proteinase inhibitors stefin A, stefin B, and cystatin C in sera from patients with colorectal cancer: relation to prognosis. *Clin. Cancer Res.*, **6**: 505-511.
- Kos, J. und Lah, T.T. (1998).** Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer. *Oncol. Rep.*, **6**: 1349-1361.
- Kos, J., Stabuc, B., Schweiger, A., Krasovec, M., Cimerman, N., Kopitar-Jerala, N. und Vrhovc, I. (1997).** Cathepsin B, H and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients. *Clin. Cancer Res.*, **3**: 1815-1822.
- Krol, J., Kopitz, C., Kirschenhofer, A., Schmitt, M., Magdolen, U., Krüger, A., Magdolen, V. (2003) a.** Inhibition of intraperitoneal tumor growth of human ovarian cancer cells by bi- and trifunctional inhibitors of tumor-associated proteolytic systems. *Biol. Chem.*, **384**: 1097-1102.
- Krol, J., Sato, S., Rettenberger, P., Assfalg-Machleidt, I., Schmitt, M., Magdolen, V., Magdolen, U. (2003) b.** Novel bi- and trifunctional inhibitors of tumor-associated proteolytic systems. *Biol. Chem.*, **384**: 1085-1096.
- Krüger, A., Soeltl, R., Sopov, I., Kopitz, C., Arlt, M., Magdolen, V., Harbeck, N., Gansbacher, B. und Schmitt, M. (2001).** Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor batimastat promotes liver metastasis. *Cancer Res.*, **61**: 1272-1275.

- Krüger, A., Schirmacher, V. und Khokha, R. (1999).** The bacterial lacZ gene: An important tool for metastasis research and evaluation of new cancer therapies. *Cancer Metastasis Rev.*, **17**: 285-294.
- Krüger, A., Sanchez-Sweatman, O.H., Martin, D.C., Fata, J.E., Ho, A.T., Orr, F.W., Rüther, U. und Khokha, R. (1998).** Host TIMP-1 overexpression confers resistance to experimental brain metastasis of a fibrosarcoma cell line. *Oncogene*, **16**: 2419-2423.
- Krüger, A., Fata, J.E. und Khokha, R. (1997).** Altered tumor growth and metastasis of a T-cell lymphoma in Timp-1 transgenic mice. *Blood*, **90**: 1993-2000.
- Krueger, S., Haeckel, C., Buehling, F. und Roessner, A. (1999).** Inhibitory effects of antisense cathepsin B cDNA transfection on invasion and motility in a human osteosarcoma cell line. *Cancer Res.*, **59**: 6010-6014.
- Kruithof, E.K., Baker, M.S. und Bunn, C.L. (1995).** Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood*, **86**: 4007-4027.
- Kuittinen, O., Apaja-Sarkkinen, M. und Turpeenniemi-Hujanen, T. (2003).** Gelatinases (MMP-2 and MMP-9), TIMP-1 expression and the extent of neovascularization in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Eur. J. Haematol.*, **71**: 91-99.
- Lakka, S.S., Gondi, C.S., Yanamandra, N., Olivero, W.C., Dinh, D.H., Gujrati, M. und Rao, J.S. (2004).** Inhibition of Cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene*, **23**: 4681-4689.
- Lakka, S.S., Gondi, C.S., Yanamandra, N., Dinh, D.H., Olivero, W.C., Gujrati, M. und Rao, J.S. (2003).** Synergistic downregulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 in SNB19 glioblastoma cells efficiently inhibits glioma cell invasion, angiogenesis, and tumor growth. *Cancer Res.*, **63**: 2454-2461.
- Laug, W.E., Cao, X.R., Yu, Y.B., Shimada, H. und Kruithof, E.K. (1993).** Inhibition of invasion of HT1080 sarcoma cells expressing recombinant plasminogen activator inhibitor 2. *Cancer Res.*, **15**: 6051-6017.
- Lauwaet, T., Oliveira, M.J., Mareel, M. und Leroy, A. (2000).** Molecular mechanisms of invasion by cancer cells, leukocytes and microorganisms. *Microbes Infect.*, **2**: 923-931.
- Lee, S.J., Yoo, H.J., Bae, Y.S., Kim, H.J. und Lee, S.T. (2003).** TIMP-1 inhibits apoptosis in breast carcinoma cells via a pathway involving pertussis toxin-sensitive G protein and c-Src. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312**: 1196-201.
- Levicar, N., Dewey, R.A., Daley, E., Bates, T.E., Davies, D., Kos, J., Pilkington, G.J. und Lah, T.T. (2003).** Selective suppression of cathepsin L by antisense cDNA impairs human brain tumor cell invasion in vitro and promotes apoptosis. *Cancer Gene Ther.*, **10**: 141-151.
- Levicar, N., Kos, J., Blejec, A., Golouh, R., Vrhovec, I., Frkovic-Grazio, S. und Lah, T.T. (2002).** Comparison of potential biological markers cathepsin B, cathepsin L, stefin A, and stefin B with urokinase and plasminogen activator inhibitor-1 and clinicopathological data of breast carcinoma patients. *Cancer Detect. Prev.*, **26**: 42-49.
- Li, H., Lu, H., Griscelli, F., Opolon, P., Sun, L.Q., Ragot, T., Legrand, Y., Belin, D., Soria, J., Perricaudet, M. und Yeh, P. (1998).** Adenovirus-mediated delivery of an uPA/uPAR antagonist suppresses angiogenesis-dependent tumor growth and dissemination in mice. *Gene Ther.*, **5**: 1105-1113.
- Loeser, R.F., Forsyth, C.B., Samarel, A.M. und Im, H-J. (2003).** Fibronectin fragment activation of proline-rich tyrosine kinase PYK2 mediates integrin signals regulating collagenase-3 expression by human chondrocytes through a protein kinase C-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, **278**: 24577-24585.

- Louis, N., Evelegh, C. und Graham FL (1997).** Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*, **233**: 423-429.
- Lunevicius, R., Nakanishi, H., Ito, S., Kozaki, K., Kato, T., Tatematsu, M. und Yasui, K. (2001).** Clinicopathological significance of fibrotic capsule formation around liver metastasis from colorectal cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **127**: 193-199.
- Luzzi, K. J., MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Morris, V. L., Chambers, A. F., and Groom, A. C. (1998).** Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am. J. Pathol.*, **153**: 865-873.
- Ma, D., Gerard, R.D., Li, X.Y., Alizadeh, H. und Niederkorn, J.Y. (1997).** Inhibition of metastasis of intraocular melanomas by adenovirus-mediated gene transfer of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) in an athymic mouse model. *Blood*, **90**: 2738-2746.
- Magdolen, U., Krol, J., Sato, S., Mueller, M.M., Sperl, S., Krüger, A., Schmitt, M. und Magdolen, V. (2002).** Natural inhibitors of tumor associated proteases. *Radiol. Oncol.*, **36**: 131-143.
- Manenti, L., Paganoni, P., Floriani, I., Landoni, F., Torri, V., Buda, A., Taraboletti, G., Labianca, R., Belotti, D. Und Giavazzi, R. (2003).** Expression levels of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in the plasma of patients with ovarian carcinoma. *Eur. J. Cancer*, **39**: 1948-1956.
- Maquoi, E., Munaut, C., Colige, A., Lambert, C., Frankenne, F., Noel, A., Grams, F., Krell, H.W. und Foidart, J.M. (2002).** Stimulation of matrix metalloproteinase-9 expression in human fibrosarcoma cells by synthetic matrix metalloproteinase inhibitors. *Exp. Cell Res.*, **275**: 110-121.
- Martin, D.C., Rüther, U., Sanchez-Sweatman, O.H., Orr, F.W. und Khokha, R. (1996).** Inhibition of SV40 T antigen-induced hepatocellular carcinoma in Timp-1 transgenic mice. *Oncogene*, **13**: 569-576.
- Marx, W.M., Zarnegar, R. und Michalopoulos, G.K. (1993).** Activation of hepatocyte growth factor by the Plasminogen activators uPA and tPA. *Am. J. Pathol.*, **143**: 949-958.
- McCarthy, K., Maguire, T., McGreal, G., McDermott, E., O'Higgins, N. und Duffy, M.J. (1999).** High levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 predict poor outcome in patients with breast cancer. *Int. J. Cancer*, **84**: 44-48.
- McKinell, R.G.(1999):** Metastasis. In: McKinnell, R.G., Parchment, R.E., Perantoni, A.O. und Pierce, G.B. *The Biological Basis of Cancer*. 2. Auflage, Cambridge University Press, New York, 50-68.
- Michcaud, D., Cantin, D., Raworth, A. und Rain, V. (1996).** Assessing the stability of cystatin/cystein complex using denaturing gelatin-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **17**: 74-79.
- Miyake, H., Hara, I. und Eto, H. (2004).** Serum level of Cathepsin B and its density in men with prostate cancer as novel markers of disease progression. *Anticancer Res.*, **24**: 2573-2577.
- Mizuguchi, H. und Kay, M.A. (1998).** Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. *Hum. Gene Ther.*, **9**: 2577-2583.
- Monier, F., Mollier, S., Guillot, M., Rambeaud, J.J., Morel, F. und Zaouni, P. (2002).** Urinary release of 72 and 92 kD gelatinases, TIMPs, N-GAL and conventional prognostic factors in urothelial carcinomas. *Eur. Urol.*, **42**: 356-363.
- Monvoisin, A., Bisson, C., Si-Tayeb, K., Balabaud, C., Desmouliere, A. und Rosenbaum, J. (2002).** Involvement of matrix metalloproteinase type-3 in hepatocyte growth factor-induced invasion of human hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, **97**: 157-162.

- Morris, V.L., Koop, S., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Grattan, M., Percy, D., Chambers, A.F., and Groom, A.C. (1994).** Mammary carcinoma cell lines of high and low metastatic potential differ not in extravasation but in subsequent migration and growth. *Clin. Exp. Metastasis*, **12**: 357-367.
- Mueller, B.M., Yu, Y.B. und Laug, W.E. (1995).** Overexpression of plasminogen activator inhibitor 2 in human melanoma cells inhibits spontaneous metastasis in scid/scid mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**: 205-209.
- Mühlenweg, B., Guthaus, E., Arroyo de Prada, N., Schmitt, M., Schmiedeberg, N., Kotzsch, M., Creutzburg, S., Kramer, M.D., Kessler, H., Wilhelm, O.G. und Magdolen, V. (2000).** Epitope mapping of monoclonal antibodies directed to PAI-1 using PAI-1/PAI-2 chimera and PAI-1-derived synthetic peptides. *Thromb. Res.*, **98**: 73-81.
- Murphy, F.R., Issa, R., Zhou, X., Ratnarajah, S., Nagase, H., Arthur, M.J.P., Benyon, C. und Iredale, J.P. (2002).** Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition. *J.Biol. Chem.*, **277**:11069-11076.
- Nagai, A., Terashima, M., Harada, T., Shimode, K., Takeuchi, H., Murakawa, Y., Nagasaki, M., Nakano, A. und Kobayashi, S. (2003).** Cathepsin B and H activities and cystatin C concentrations in cerebrospinal fluid from patients with leptomeningeal metastasis. *Clin. Chim. Acta*, **329**: 53-60.
- Nagase, H. und Brew, K. (2002).** Engineering of tissue inhibitor of metalloproteinases mutants as potential therapeutics. *Arthritis Res.*, **4**: 51-61.
- Nagase, H. und Woessner, J.F. (1999).** Matrix Metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, **274**: 21491-21494.
- Nagel, J. (2004).** Modulation des metastatischen Potenzials einer humanen Fibrosarkomzelllinie durch Ko-Expression von TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1) und einer löslichen Form des Urokinase-Rezeptors. Dissertation.
- Nakopoulou, L., Giannopoulou, I., Stefanaki, K., Panayotopoulou, E., Tsirmpa, I., Alexandrou, P., Mavrommatis, J., Katararou, S. und Davaris, P. (2002).** Enhanced mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in breast carcinomas is correlated with adverse prognosis. *J. Pathol.*, **197**: 307-313.
- Naumov, G.N., MacDonald, I.C., Weinmeister, P.M., Kerkvliet, N., Nadkarni, K.V., Wilson, S.M., Morris, V.L., Groom, A.C. and Chambers, A.F. (2002).** Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy. *Cancer Res.*, **62**: 2162-2168.
- Naumov, G.N., MacDonald, I.C., Chambers, A.F. und Groom, A.C. (2001).** Solitary cancer cells as a possible source of tumor dormancy? *Semin. Cancer Biol.*, **11**: 271-276.
- Ng, P., Patks, R.J., Cummings, D.T., Eveleigh, C.M. und Graham, F.L. (2000).** An enhanced system for construction of adenoviral vectors by the two-plasmid rescue method. *Hum. Gene Ther.*, **11**: 693-699.
- Noel, A., Gilles, C., Bajou, K., Devy, L., Kebers, F., Lewalle, J.M., Maquoi, E., Munaut, C., Remacle, A. Und Foidart, J.M. (1999).** Emerging roles for proteinases in cancer. *Inv. Mest.*, **17**: 221-239.
- Ostapchuk, P. und Hearing, P. (2003).** Regulation of adenovirus packaging. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **272**: 165-185.
- Pantel, K. und Brakenhoff, R.H. (2004).** Dissecting the metastatic cascade. *Nat. Rev. Cancer*, **4**: 448-456.

- Park, Y.H., Ryu, H.S., Choi, D.S., Chang, K.H., Park, D.W. und Min, C.K. (2003).** Effects of hepatocyte growth factor on the expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors during the endometrial cancer invasion in a three-dimensional coculture. *Int. J. Gynecol. Cancer*, **13**: 53-60.
- Parke, R., Meng, Q.M., Siapati, K.E., McEwan, J.R. und Hart, S.L.(2002)** High efficiency transfection of porcine vascular cells in vitro with a synthetic vector system. *J. Gene Med.*, **4**: 292-299.
- Pearson, B., Wolf, P.L. und Vazques, J. (1963).** A comparative study of a series of new indolyl compounds to localize  $\beta$ -galactosidase in tissues. *Lab. Invest.*, **12**: 1249-1259.
- Pennica, D., Homes, W.E., Kohr, W.J., Harkins, R.N., Vehar, G.A., Ward, C.A., Bennett, W.F., Yelverton, E., Seeburg, P.H., Heyneker, H.L., Goeddel, D.V. und Collen, D. (1983).** Cloning and expression of human tissue type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature*, **301**: 214-221.
- Podgorski, I. Und Sloane, B.F. (2003).** Cathepsin B and its role(s) in cancer progression. *Biochem. Soc. Symp.*, **70**: 263-276.
- Porter, J.F., Shen, S. und Denhardt, D.T. (2004).** Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 stimulates proliferation of human cancer cells by inhibiting a metalloproteinase. *Br. J. Cancer*, **90**: 463-470.
- Pozzi, A., LeVine, W.F., Gardner, H.A. (2002).** Low plasma levels of matrix metalloproteinase 9 permit increased tumor angiogenesis. *Oncogene*, **21**: 272-281.
- Praus, M., Wauterickx, K., Collen, D. und Gerard, R.D. (1999).** Reduction of tumor cell migration and metastasis by adenoviral gene transfer of plasminogen activator inhibitors. *Gene Ther.*, **6**: 227-236.
- Premzl, A., Zavasnik-Bergant, V., Turk, V. und Kos, J. (2003).** Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neoT cells through reconstituted extracellular matrix in vitro. *Exp. Cell Res.*, **283**: 206-214.
- Premzl, A., Puizdar, V., Zavasnik-Bergant, T., Kopitar-Jerala, N., Lah, T.T., Katunuma, N., Sloane, B.F., Turk, V. und Kos, J. (2001).** Invasion of ras-transformed breast epithelial cells depends on the proteolytic activity of cysteine and aspartic proteinases. *Biol. Chem.*, **382**: 853-857.
- Price, J.E. (2001).** Xenograft models in immunodeficient animals, I. Nude mice: spontaneous and experimental metastasis models. In: Brooks, S.A. und Schumacher, U (Hrsg.) *Metastasis Research Protocols, Volume 2, Analysis of Cell Behavior In Vitro and In Vivo*. Humana Press, Totowa, New Jersey, 205-214.
- Pryzdial, E.L., Bajzar, L. und Nesheim, M.E. (1995).** Prothrombinase components can accelerate tissue plasminogen activator-catalyzed plasminogen activation. *J. Biol. Chem.*, **270**: 17871-17877.
- Rasheed, S., Nelson-Rees, W.A., Toth, E.M., Arnstein, P. und Gardner, M.B. (1974).** Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer*, **33**: 1027-1033.
- Ray, S., Lukyanov, P. und Ochieng, J. (2003).** Members of the cystatin superfamily interact with MMP-9 and protect it from autolytic degradation without affecting its gelatinolytic activities. *Biochim. Biophys. Acta*, **1652**: 91-102.
- Renatus, M., Engh, R.A., Stubbs, M.T., Huber, R., Fischer, S., Kohnert, U. und Bode, W. (1997).** Lysine 156 promotes the anomalous proenzyme activity of tPA: X-ray crystal structure of single-chain human tPA. *E.M.B.O. J.*, **16**: 4797-4805.

- Reuning, U., Sperl, S., Kopitz, C., Kessler, H., Krüger, A., Schmitt, M. und Magdolen, V. (2003).** Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): development of antagonists of uPA/uPAR interaction and their effects in vitro and in vivo. *Curr. Pharm. Des.*, **9**: 1529-1543.
- Reuning, U., Magdolen, V., Wilhelm, O.G., Fischer, K., Lutz, V., Graeff, H. und Schmitt, M. (1998).** Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis. *Int. J. Oncol.*, **13**: 893-906.
- Rhee, J.S., Diaz, R., Korets, L., Hodgson, J.G. und Coussens, L.M. (2004).** TIMP-1 alters susceptibility to carcinogenesis. *Cancer Res.*, **64**: 952-961.
- Rousselet, N., Mills, L., Jean, D., Tellez, C., Bar-Eli, M. und Frade, R. (2004).** Inhibition of tumorigenicity and metastasis of human melanoma cells by anti-cathepsin L single chain variable fragment. *Cancer Res.*, **64**: 146-151.
- Ruokolainen, H., Pääkkö, P. und Turpeenniemi-Hujanen, T. (2004).** Expression of Matrix metalloproteinase-9 in head and neck squamous cell carcinoma: a potential marker for prognosis. *Clin. Cancer Res.*, **10**: 3110-3116.
- Russell, W.C. (2000).** Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.*, **81**: 2573-2604.
- Ruzindana-Umunyana, A. und Weber, J.M. (2001).** Interactions of human lacrimal and salivary cystatins with adenovirus endopeptidase. *Antiviral Res.*, **51**: 203-214.
- Saito, S., Yamaji N, Yasunaga K, Saito T, Matsumoto S, Katoh M, Kobayashi S, Masuho Y. (1999).** The fibronectin extra domain A activates matrix metalloproteinase gene expression by an interleukin-1-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, **274**: 30756-30763.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989)** In: Sambrook, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (Hrsg.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Auflage, Cold Spring Harbor Press, New York.
- Schmaier, A.H. (2000).** Plasma kallikrein/kinin system: a revised hypothesis for its activation and its physiologic contributions. *Curr. Opin. Haematol.*, **7**: 261-265.
- Schmitt, M., Wilhelm, O.G., Reuning, U., Krüger, A., Harbeck, N., Lengyel, E., Graeff, H., Gänsbacher, B., Kessler, H., Bürgle, M., Stürzebecher, J., Sperl, S. und Magdolen, V. (2000).** The urokinase plasminogen activator system as a novel target for tumor therapy. *Fibrinolysis and Proteolysis*, **14**: 114-132.
- Schmitt, M., Harbeck, N., Thomssen, C., Wilhelm, O., Magdolen, V., Reuning, U., Ulm, K., Höfler, H., Jänicke, F. und Graeff, H. (1997).** Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb. Haemost.*, **78**: 285-296.
- Schrohl, A.S., Holten-Andersen, M.N., Peters, H.A., Look, M.P., Meijer-van Gelder, M.E., Klijn, J.G.M., Brünner, N. und Foekens, J.A. (2004).** Tumor tissue levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as a prognostic marker in primary breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, **10**: 2289-2298.
- Schweinitz, A., Steinmetzer, T., Banke, I.J., Arlt, M.J.E., Stürzebecher, A., Schuster, O., Geissler, A., Giersiefen, H., Zeslawska, E., Jacob, U., Krüger, A. und Stürzebecher, J. (2004).** Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastatic agents. *J. Biol. Chem.*, **279**: 33613-33622.
- Shenk, S., Hintermann, E., Bilban, M., Koshikawa, N., Hojilla, C., Khokha, R. und Quantara, V. (2003).** Binding to EGF receptor of a laminin-5 EGF-like fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution. *J. Cell Biol.*, **161**: 197-209.

- Shenk, T. (1996).** Adenoviridae: The viruses and their replication. In: Fields, B.N., Knipe, D.M. und Howley, P.M. (Hrsg.) *Fields Virology*, 3. Auflage, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2111-2148.
- Shinkfield, M.N.F., Burnand, K.G., Balance, D.J., Zitka, M. und Eastham, D. (1992).** The effect of recombinant plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2) on the growth of a human tumour cell line in vitro and in vivo. *Fibrinolysis*, **6**: 59-65.
- Shiraishi, T., Mori, M., Tanaka, S., Sugimachi, K. und Akiyoshi, T. (1998).** Identification of cystatin B in human esophageal carcinoma, using differential displays in which the gene expression is related to lymph-node metastasis. *Int. J. Cancer*, **79**: 175-178.
- Silverman, G.A., Bird, P.I., Carrell, R.W., Church, F.C., Coughlin, P.B., Gettins, P.G.W., Irving, J.A., Lomas, D.A., Luke, C.J., Moyer, R.W., Pemberton, P.A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G.S., Travis, J. Und Whisstock, J.C. (2001).** The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. *J. Biol. Chem.*, **276**: 33292-33296.
- Snoek-van Beurden, P.A.M. und Von den Hoff, J.W. (2005).** Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Bio. Techniques*, **38**: 73-83.
- Sokol, J.P. und Schiemann, W.P. (2004).** Cystatin C antagonizes transforming growth factor  $\beta$  signaling in normal and cancer cells. *Mol. Cancer Res.*, **2**: 183-195.
- Sounni, N.E., Janssen, M., Foidart, J.M. und Noel, A. (2003).** Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol.*, **22**: 55-61.
- Stabuc, B., Vrhovec, L., Stabuc-Silih und Cizej, T.E. (2000).** Improved prediction of decreased creatinine clearance by serum cystatin C: use in cancer patients before and during chemotherapy. *Clin. Chem.*, **46**: 193-197.
- Stathakis, P., Fitzgerald, M., Matthias, L.J., Chesterman, C.N. und Hogg, P.J. (1997).** Generation of angiostatin by reduction and proteolysis of plasmin. Catalysis by a plasmin reductase secreted by cultured cells. *J. Biol. Chem.*, **272**: 20641-20645.
- Stetler-Stevenson, W.G. and Yu, A.E. (2001).** Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Semin. Cancer Biol.*, **11**: 143-152.
- Strader, M.B. und Howell, E.E. (1997).** Stable maintenance of a tandem array of four R67 dihydrofolate reductase genes. *Focus®*, **19**: 24-25.
- Strojan, P., Svetic, B., Smid, L. und Kos, J. (2004).** Serum cystatin C in patients with head and neck carcinoma. *Clin. Chim. Acta*, **344**: 155-161.
- Sugiura, Y., Ma, L., Sun, B., Shimada, H., Laug, W.E., Seeger, R.C. und DeClerck, Y.A. (1999).** The plasminogen-plasminogen activator (PA) system in neuroblastoma: role of PA inhibitor-1 in metastasis. *Cancer Res.*, **59**: 1327-1336.
- Tacchini, L., De Ponti, C., Matteucci, E., Follis, R. Und Desiderio, M.A. (2004).** Hepatocyte growth factor-activated NF-kappaB regulates HIF-1 activity and ODC expression, implicated in survival, differently in different carcinoma cell lines. *Carcinogenesis*, **25**: 2089-2100.
- Tacchini, L., Matteucci, E., De Ponti, C. Und Desiderio, M.A. (2003).** Hepatocyte growth factor signaling regulates transactivation of genes belonging to the plasminogen activation system via hypoxia inducible factor-1. *Exp. Cell Res.*, **290**: 391-401.
- Takeuchi, M., Fukuda, Y., Nakano, I., Katano, Y. und Hayakawa, T. (2001).** Elevation of serum cystatin C concentrations in patients with chronic liver disease. *Gastroenterol. Hepatol.*, **13**: 951-955.
- Teesalu, T., Kulla, A., Asser, T., Koskineniemi, M. und Vaheri, A. (2002).** Tissue plasminogen activator as a key effector in neurobiology and neuropathology. *Biochem. Soc. Trans.*, **30**: 183-189.

- Tordai, H., Banyai, L. und Patthy, L. (1999).** The PAN module: the N-terminal domains of plasminogen and hepatocyte growth factor are homologous with the apple domains of the prekallikrein family and with a novel domain found in numerous nematode proteins. *F.E.B.S. Lett.*, **461**: 63-67.
- Trinh, T., Jessee, J. und Bloom, F.R. (1994).** Stbl2<sup>TM</sup>: an Escherichia coli strain for the stable propagation of retroviral clones and direct repeat sequences. *Focus®* **16**: 78-80.
- Troy, A.M., Sheahan, K., Mulcahy, H.E., Duffy, M.J., Hyland, J.M.P. und O'Donoghue, D.P. (2003).** Expression of Cathepsin B and L antigen and activity is associated with early colorectal cancer progression. *Eur. J. Cancer*, **40** : 1610-1616.
- Tuck, A.B., Park, M., Sterns, E.E., Boag, A. und Elliott, B.E. (1996).** Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (met) in human breast carcinoma. *Am. J. Pathol.*, **148**: 225-232.
- Turk, V., Turk, B. und Turk, D. (2001).** Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *E.M.B.O. J.*, **20**: 4629-4633.
- Turk, B., Turk, D. und Turk, V. (2000).** Lysosomal cysteine proteinases: more than scavengers. *Biochim. Biophys. Acta*, **1477**: 98-111.
- Tzanakakis, G.N., Margioris, A.N., Tsatsakis, A.M. und Vezeridis, M.P. (2004).** The metastatic potential of human pancreatic cell lines in the liver of nude mice correlates well with Cathepsin B activity. *Int. J. Gastrointest. Cancer*, **34**: 27-38.
- Van Gent, D., Sharp, P., Morgan, K. und Kalsheker, N. (2003).** Serpins: structure, function and molecular evolution. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **35**: 1536-1547.
- Vihinen, P. und Kähäri, V.M. (2002).** Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int. J. Cancer*, **99**: 157-166.
- Visse, R. und Nagase, H. (2003).** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases, structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.*, **92** : 827-839.
- Vorotnikova, E., Tries, M. und Braunhut, S. (2004).** Retinoids and TIMP-1 prevent radiation-induced apoptosis of capillary endothelial cells. *Radiat. Res.*, **161**: 174-184.
- Wagner, C. (1999).** *Molekulare Onkologie*. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Wajih, N. und Sane, D.C. (2003).** Angiostatin selectively inhibits signaling by hepatocyte growth factor in endothelial and smooth muscle cells. *Blood*, **101**: 1857-1863.
- Watson, S.A. und Morris, T.M. (2001).** Theoretical considerations in using animal models of metastasis and brief methodology for in vivo colorectal cancer models in SCID and nude mice. In: Brooks, S.A. und Schumacher, U (Hrsg.) *Metastasis Research Protocols, Volume 2, Analysis of Cell Behavior In Vitro and In Vivo*. Humana Press, Totowa, New Jersey, 195-204.
- Wedding, U. und Höffken, K. (2003).** Krebs, Leben verlängern, Nebenwirkungen mindern. *Spektrum der Wissenschaft Spezial Krebsmedizin II*, 62-65.
- Yamauchi, K., Ogata, Y., Nagase, H. und Shirouzu, K. (2001).** Inhibition of liver metastasis from orthotopically implanted colon cancer in nude mice by transfection of the TIMP-1 gene into KM12SM cells. *Surg. Today*, **31**: 791-798.
- Yamazaki, M., Akahane, T., Buck, T., Yoshiji, H., Gomez, D.E., Schoeffner, D.J., Okajima, E., Harris, S.R., Bunce, O.R., Thorgeirsson, S.S. und Thorgeirsson, U.P. (2004).** Long-term exposure to elevated levels of circulating TIMP-1 but not mammary TIMP-1 suppresses growth of mammary carcinomas in transgenic mice. *Carcinogenesis*, **25**: 1735-1746.
- Yasuda, T., Shimizu, M., Nakagawa, T., Julovi, S.M. und Nakamura, T. (2003).** Matrix metalloproteinase production by COOH-terminal heparin-binding fibronectin fragment in rheumatoid synovial cells. *Lab. Invest.*, **83**: 153-162
- Ye, S. und Goldsmith, E.J. (2001).** Serpins and other covalent protease inhibitors. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**: 740-745.

- Ylisirniö, A., Höyhtyä, M., Mäkitaro, R., Pääkö, P., Risteli, J., Kinnula, V.L., Turpeenniemi-Hujanen, T. und Jukkola, A. (2001).** Elevated serum levels of type I collagen degradation marker ICTP and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 1 are associated with poor prognosis in lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, **7**: 1633-1637.
- Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshiji, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Nakatani, T., Tsujinoue, H., Yanase, K., Namisaki, T., Imazu, H. und Fukui, H. (2002).** Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology*, **36**: 850-860.
- Yoshikawa, T., Tsuburaya, A., Kobayashi, O., Sairenji, M., Motohashi, H., Yanoma, S. und Noguchi, Y. (2001).** Intratumoral concentrations of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 in patients with gastric carcinoma a new biomarker for invasion and its impact on survival. *Cancer*, **91**: 1739-1744.
- Yoshikawa, T., Tsuburaya, A., Kobayashi, O., Sairenji, M., Motohashi, H., Yanoma, S. und Noguchi, Y. (2000).** Prognostic value of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in plasma of patients with gastric cancer. *Cancer Lett.*, **151**: 81-86.
- Yukawa, N., Yoshikawa, T., Akaike, M., Sugimasa, Y., Tekemiya, S., Yanoma, S., Noguchi, Y. und Takanashi, Y. (2001).** Plasma concentration of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 in patients with colorectal carcinoma. *Br. J. Surg.*, **88**: 1596-1601.
- Zacchigna, S., Zentilin, L., Morini, M., Dell'Eva, R., Noonan, D.M., Albini, A. Und Giacca, M. (2004).** AAV-mediated gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 inhibits vascular growth and angiogenesis in vivo. *Cancer Gene Ther.*, **11**: 73-80.
- Zajc, I., Sever, N., Bervar, A. und Lah, T.T. (2002).** Expression of cystein peptidase cathepsin L and its inhibitors stefin A and B in relation to tumorigenicity of breast cancer cell lines. *Cancer Lett.*, **187**: 185-190.
- Zhang, J., Shridhar, R., Dai, Q., Song, J., Barlow, S.C., Yin, L., Sloane, B.F., Miller, F.R., Meschonat, C., Li, B.D.L., Abreo, F. und Keppler, D. (2004).** Cystatin M: A novel candidate tumor suppressor gene for breast cancer. *Cancer Res.*, **64**: 6957-6964.
- Zhang, S., Li, L., Lin, J.Y. und Lin, H. (2003).** Imbalance between expression of matrix-metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, **9**: 899-904.
- Zhou, H.M., Bolon, I., Nichols, A., Wohlwend, A. und Vasalli, J.D. (2001).** Overexpression of plasminogen activator inhibitor type 2 in basal keratinocytes enhances papilloma formation in transgenic mice. *Cancer Res.*, **61**: 970-976.
- Zöller, M. (2003).** Krebs, Verhängnisvolle Wanderschaft. *Spektrum der Wissenschaft Spezial Krebsmedizin II*, 24-27.
- zur Hausen, H. (2003).** Krebs, eine Herausforderung für die Forschung. *Spektrum der Wissenschaft Spezial Krebsmedizin II*, 6-11.

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b><u>Abbildung 2.1:</u></b>	Die Metastatische Kaskade.....	S. 4
<b><u>Abbildung 2.2:</u></b>	Expression von Gelatinasen in HT1080-Metastasen tragenden Lungen.....	S. 8
<b><u>Abbildung 2.3:</u></b>	Schematische Darstellung der MMP-Inhibition durch TIMPs.....	S. 10
<b><u>Abbildung 2.4:</u></b>	Schematische Darstellung des Inhibitions-Mechanismus von Serpinen.....	S. 16
<b><u>Abbildung 2.5:</u></b>	Schematische Darstellung der Inhibition von papainähnlichen CPs durch Cystatine.....	S. 21
<b><u>Abbildung 2.6:</u></b>	Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen den einzelnen Proteasefamilien.....	S. 25
<b><u>Abbildung 2.7:</u></b>	Schematische Darstellung des Aufbaus von Adenoviren.....	S. 27
<b><u>Tabelle 4.1:</u></b>	Behandlungsschema.....	S. 33
<b><u>Tabelle 4.2:</u></b>	Zellkulturmedien für die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.....	S. 35
<b><u>Abbildung 4.1:</u></b>	Schematische Darstellung von pLZ12.....	S. 40
<b><u>Abbildung 4.2:</u></b>	Schematische Darstellung von pSecTag2/HygroB.....	S. 40
<b><u>Abbildung 4.3:</u></b>	Schematische Darstellung von pGEMhTIMP-1.....	S. 41
<b><u>Abbildung 4.4:</u></b>	Das pAdenoX <sup>TM</sup> System.....	S. 42
<b><u>Abbildung 4.5:</u></b>	Das AdMax <sup>TM</sup> System.....	S. 43
<b><u>Tabelle 4.3:</u></b>	Bei Transfektionen von HEK 293 eingesetzte DNA Mengen.....	S. 46
<b><u>Tabelle 4.4:</u></b>	Adäquate Agarosekonzentrationen für die Separation von DNA-Fragmenten verschiedener Größe.....	S. 51
<b><u>Tabelle 4.5:</u></b>	Zusammenfassung aller Restriktionsverdau dieser Arbeit.....	S. 52
<b><u>Abbildung 4.6:</u></b>	PCR-Programme.....	S. 53
<b><u>Tabelle 4.6:</u></b>	In dieser Arbeit verwendete PCR-Primer.....	S. 54
<b><u>Tabelle 4.7:</u></b>	Zusammenfassung der Ligationsansätze dieser Arbeit.....	S. 56
<b><u>Tabelle 4.8:</u></b>	Zusammensetzung der Trenngele für die in dieser Arbeit durchgeführten Zymographien.....	S. 63
<b><u>Tabelle 4.9:</u></b>	Renaturierungs- und Entwicklungspuffer der jeweiligen Zymgraphien.....	S. 65
<b><u>Abbildung 5.1:</u></b>	Konstruktion der Adenoviren kodierend für TIMP-1, sezernierungs-optimiertes PAI-2 bzw. sezernierungs-optimiertes Cystatin C.....	S. 70
<b><u>Abbildung 5.2:</u></b>	Nachweis von Sezernierung und Aktivität der einzelnen Transgene nach adenoviralem Gentransfer <i>in vitro</i> .....	S.75

<b><u>Abbildung 5.3:</u></b>	Prophylaktische TIMP-1 Überexpression inhibierte die experimentelle Lungenmetastasierung durch HT1080 signifikant.....	S. 78
<b><u>Abbildung 5.4:</u></b>	Prophylaktische TIMP-1 Überexpression erhöhte die Anzahl metastasenfrier Lungen.....	S. 79
<b><u>Abbildung 5.5:</u></b>	Nachweis der TIMP-1 <i>in vivo</i> Transgenexpression.....	S. 80
<b><u>Abbildung 5.6:</u></b>	Verstärkte MMP-9 Expression in Leber und Lunge durch Überexpression von TIMP-1.....	S. 81
<b><u>Abbildung 5.7:</u></b>	Überexpression von TIMP-1 führt zur Inhibition der proMMP-9 Aktivierung.....	S. 83
<b><u>Abbildung 5.8:</u></b>	Anzahl der HT1080 Lungenmetastasen korrelierte mit uPA Gehalt in der Lunge.....	S. 85
<b><u>Abbildung 5.9:</u></b>	Additiver Effekt bei der Reduktion von HT1080 Lungenmetastasen durch Doppelbehandlung mit AdTIMP-1 und AdPAI-2.....	S. 86
<b><u>Abbildung 5.10:</u></b>	Signifikante Zunahme der Anzahl metastasenfrier Lungen durch die simultane Überexpression von TIMP-1 und PAI-2.....	S. 87
<b><u>Abbildung 5.11:</u></b>	Nachweis der TIMP-1 und PAI-2 <i>in vivo</i> Transgenexpression.....	S. 89
<b><u>Abbildung 5.12:</u></b>	Expression von Plasminogen-Aktivatoren in der Lunge nach prophylaktischer Überexpression von PAI-2.....	S. 91
<b><u>Abbildung 5.13:</u></b>	Überexpression von humanem PAI-2 erhöhte die Gelatinasen Expression in der Lunge.....	S. 92
<b><u>Abbildung 5.14:</u></b>	Nachweis der TIMP-1 Transgenaktivität <i>ex vivo</i> .....	S. 94
<b><u>Abbildung 5.15:</u></b>	Nachweis der PAI-2 Transgenaktivität <i>ex vivo</i> .....	S. 96
<b><u>Abbildung 5.16:</u></b>	Anzahl der HT1080 Lungenmetastasen korrelierte mit Cathepsin B-Gehalt in der Lunge.....	S. 98
<b><u>Abbildung 5.17:</u></b>	TIMP-1 Überexpression führte zu einem Anstieg des Cathepsin B Gehaltes in der Lunge.....	S. 100
<b><u>Abbildung 5.18:</u></b>	Prophylaktische Cystatin C Überexpression inhibierte die experimentelle Lungenmetastasierung durch HT1080 Zellen signifikant.....	S. 102
<b><u>Abbildung 5.19:</u></b>	Signifikante Zunahme der Anzahl metastasenfrier Lungen durch die Überexpression von Cystatin C.....	S. 103
<b><u>Abbildung 5.20:</u></b>	Simultane Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 induzierte die Formation von Makrometastasen in der Leber.....	S. 105
<b><u>Abbildung 5.21:</u></b>	Vergrößerte Aufnahme der durch simultane Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 induzierten HT1080 Leber-Makrometastasen.....	S. 106
<b><u>Abbildung 5.22:</u></b>	Nachweis der Cystatin C und TIMP-1 <i>in vivo</i> Transgenexpression.....	S. 108

<b><u>Abbildung 5.23:</u></b>	Cathepsin B Expression in Lungen und Lebern nach Transduktion mit AdCysC und AdTIMP-1.....	S. 110
<b><u>Abbildung 5.24:</u></b>	Expression der Gelatinasen bzw. Plasminogen-Aktivatoren in AdTIMP-1 und AdCysC behandelten Mäusen am Ende des experimentellen Metastasierungsversuches .....	S. 113
<b><u>Abbildung 5.25:</u></b>	Additive Überexpression von PAI-2 unterdrückte die durch simultane Überexpression von Cystatin C und TIMP-1 ausgelöste Makrometastasierung in die Leber.....	S. 115
<b><u>Abbildung 5.26:</u></b>	Simultane Überexpression von TIMP-1, Cystatin C und PAI-2 inhibierte die experimentelle Lungenmetastasierung durch HT1080 Zellen signifikant.....	S. 117
<b><u>Abbildung 5.27:</u></b>	Simultane Überexpression von TIMP-1, Cystatin C und PAI-2 steigerte die Anzahl metastasenfrier Lungen signifikant im Vergleich zur Kontrolle.....	S. 118
<b><u>Abbildung 5.28:</u></b>	Nachweis der PAI-2, Cystatin C und TIMP-1 <i>in vivo</i> Transgenexpression in den Mäusen der Dreifachbehandlung .....	S. 120
<b><u>Abbildung 5.29:</u></b>	Simultane Überexpression von TIMP-1 und Cystatin C führte zu einem Anstieg an HGF ( <i>scatter factor</i> ) in der Leber.....	S. 123

## 9 Abkürzungsverzeichnis

<b>aa</b>	<i>amino acids</i> , Aminosäuren
<b>Ad</b>	Adenovirus
<b>Amp<sup>r</sup></b>	Ampicillinresistenz
<b>ATF</b>	Aminoterminales Fragment
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BCA</b>	Bizinkoniniksäure
<b>BGH</b>	<i>bovine growth hormone</i> , bovines Wachstumshormon
<b>BSA</b>	bovines Serum Albumin
<b>CAR</b>	Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor
<b>CD</b>	<i>Caesarean derived</i>
<b>CIAP</b>	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i> , Kälber intestinale alkaline Phosphatase
<b>CMV</b>	Cytomegalievirus
<b>CP</b>	Cysteinproteinase
<b>CPE</b>	<i>cytopathic effect</i> , Zytopathischer Effekt
<b>Cre</b>	<i>causes recombination</i>
<b>CysC</b>	Cystatin C
<b>DMEM</b>	<i>Dulbeccos modified Eagles Medium</i>
<b>DMF</b>	Dimethylformamid
<b>DMSO</b>	Dimethylsukfoxid
<b>E1-4</b>	<i>early genes 1-4</i> , frühe Gene 1-4
<b>ECM</b>	<i>extracellular matrix</i> , Extrazelluläre Matrix
<b>E. coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EGF</b>	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
<b>ELISA</b>	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FAM</b>	Carboxylfluorescein
<b>FKS</b>	Fötales Kälberserum
<b>FX</b>	Faktor X
<b>GFD</b>	<i>growth factor like domain</i> , Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne
<b>GPI-Anker</b>	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
<b>HEBS</b>	<i>HEPES buffered saline</i>
<b>HEK</b>	<i>Human embryonic kidney cells</i> , humane embryonale Nierenzellen
<b>HGF</b>	<i>Hepatocyte growth factor, scatter factor</i> , Hepatozyten Wachstumsfaktor

<b>HMW-uPA</b>	<i>high molecular weight</i> uPA, hochmolekulares uPA
<b>hu</b>	human
<b>Hyg<sup>r</sup></b>	Hygromycin Resistenz
<b>i.v.</b>	intravenös
<b>ITR</b>	<i>internal terminal repeat</i>
<b>Kan<sup>r</sup></b>	Kanamycin Resistenz
<b>kb</b>	Kilobasen
<b>L1-5</b>	<i>late genes 1-5</i> , späte Gene 1-5
<b>LMW-uPA</b>	<i>low molecular weight</i> uPA, hochmolekulares uPA
<b>loxP</b>	<i>locus of crossing over</i>
<b>LTR</b>	<i>long terminal repeat</i>
<b>MCS</b>	<i>Multiple cloning site</i>
<b>MEK</b>	<i>mitogen-activated protein kinase</i> , Mitogen-aktivierte Kinase
<b>MEM</b>	<i>modified Eagles medium</i>
<b>MLP</b>	<i>major late</i> Promotor
<b>MLV</b>	Murines Leukämie Virus
<b>MMLV</b>	Maloney murines Leukämie Virus
<b>MMP</b>	Matrix Metalloproteinase
<b>MOI</b>	<i>multiplicities of infection</i>
<b>MT-MMP</b>	Membran Typ-Matrix Metalloproteinase
<b>mu</b>	murin
<b>Neo<sup>r</sup></b>	Neomycin (G418) Resistenz
<b>nF</b>	<i>non-fluorescent</i>
<b>nls</b>	<i>nuclear leader sequence</i> , nukleäre Leader Sequenz
<b>PA</b>	Plasminogen Aktivator
<b>pA, polyA</b>	Polyadenylierungssignal
<b>PAI</b>	Plasminogen Aktivator Inhibitor
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>PCI</b>	Phenolchloroformisoamylalkohol
<b>P<sub>CMV</sub></b>	CMV Promotor
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasen-Kettenreaktion
<b>Pfu</b>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<b>pfu</b>	<i>plaque forming units</i>
<b>RCL</b>	<i>reactive center loop</i>
<b>RSV</b>	Rous` Sarkoma Virus
<b>RT</b>	Raumtemperatur

<b>sc-tPA</b>	<i>Single chain-tPA</i> , einkettiges tPA
<b>SDS</b>	<i>sodiumdodecylsulfate</i>
<b>Serpin</b>	Serinproteinasen Inhibitor
<b>siRNA</b>	<i>small inhibitory RNA</i>
<b>SP</b>	Serinproteinase
<b>SV</b>	<i>simian virus</i>
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA Puffer
<b>TAMRA</b>	Tetramethylrhodanin-5-carbonyl-azid
<b>tc-tPA</b>	<i>two chain-tPA</i> , zweikettiges-tPA
<b>TE-Puffer</b>	TRIS-EDTA-Puffer
<b>TGF</b>	<i>transforming growth factor</i> , transformierender Wachstumsfaktor
<b>TIMP</b>	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i> (human)
<b>Timp</b>	murines TIMP
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
<b>TP</b>	Terminales Protein
<b>tPA</b>	<i>tissue-type plasminogen activator</i> , Gewebe-Typ Plasminogen Aktivator
<b>uPA</b>	<i>urokinase-type plasminogen activator</i> , Urokinase
<b>uPAR</b>	Urokinase-Rezeptor ( <i>urokinase-type plasminogen activator receptor</i> )

## 10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn *Priv. Doz. Dr. Achim Krüger* für die außerordentlich engagierte Betreuung und Unterstützung, für die kritischen Ratschläge, für die Überlassung der höchst interessanten Fragestellung und die Möglichkeit diese in seinem Labor durchführen zu können. Zudem möchte ich mich bei ihm für die Einarbeitung in tierexperimentelle Methoden und für die intravenösen Applikationen der Viren und Tumorzellen bedanken.

Bei Herrn *Prof. Dr. Wolfgang Hiller* möchte ich mich für die Kooperation die Mitbetreuung der vorliegenden Fakultäten übergreifenden Arbeit und deren Begutachtung bedanken.

Bei Herrn *Prof. Dr. Bernd Gänsbacher* bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München und für die Möglichkeit die in dieser Arbeit präsentierten Untersuchungen dort durchgeführt haben zu können.

Bei Frau *Priv. Doz. Dr. Martina Anton* möchte ich mich für die Einarbeitung in die Methoden der Adenovirologie, für viele Anregungen zu Herstellung von Adenoviren, sowie für die Überlassung des Kontrollvirus Add170-3 und das adenovirale *shuttle* Plasmid pKA1 bedanken.

Bei Herrn *Prof. Dr. Otto Petrowicz* möchte ich mich für die Durchführung des Mantel-Haenzesl-Testes bedanken.

Herrn *Dr. Bernd Mühlenweg*, derzeit Mitarbeiter der Wilex AG, danke ich für die Einarbeitung in molekularbiologische Methoden.

Den Technischen Assistentinnen Frau *Katja Honert* und Frau *Stephanie Laforsch* möchte ich ganz herzlich für die tatkräftige technische Unterstützung danken. Bei Frau *Katja Honert* möchte ich mich zudem für die Einarbeitung in die Zellkulturtechniken und bei Frau *Stephanie Laforsch* zusätzlich für das Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Bei Herrn *Dipl. Biol. Michael Gerg* möchte ich mich für die Einarbeitung in die TaqMan<sup>TM</sup> Analyse und für das Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Zusätzlich möchte ich mich ganz besonders bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die Unterstützung bei den Tierversuchen, kritische Anmerkungen und hilfreiche Diskussionen bedanken, insbesondere bei Herrn *Dr. Matthias Arlt*, Herrn *Dipl. Biol. Michael Gerg* und Frau *Dilek Ister*.

Zudem möchte ich auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung danken, welche durch Ratschläge und Hilfestellungen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, stellvertretend sollen hierfür Herr *Dipl. Biol. Klaus Mantwill* und Herr *Dr. Per Sonne Holm* genannt werden.

Den Mitarbeitern die durch ihre Serviceleistungen die Versuchsdurchführungen erheblich erleichtert haben soll an dieser Stelle ebenfalls gedankt werden, stellvertretend sollen hier Herr *Josef Straßmair*, für die Zellkultur Frau *Gerlinde Stejskal* sowie stellvertretend für alle Mitarbeiter des Tierstalles Frau *Rosi Bergmeyer* genannt sein.

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

Herrn *Priv. Doz. Viktor Magdolen* danke ich für die Überlassung der PAI-2 und Cystatin C cDNA.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Forschungsarbeit danke ich dem *Sonderforschungsbereiches 469* der *Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)* an *Priv. Doz. Dr. Achim Krüger*, sowie dem *Cancerdegradome* des *Framework Programme 6* der *Europäischen Union* an *Priv. Doz. Dr. Achim Krüger*.

Bei meinem Großonkel *Prof. Dr. Bernhard Kornhuber* bedanke ich mich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Bei meinen *Eltern* und meinen *Brüdern* möchte ich mich für ihre unerschöpfliche Unterstützung bedanken. Ganz besonders dankbar bin ich meinem Mann *Idris Razak Mohamed* für die aufgebrauchte Geduld und liebevolle Unterstützung ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## I Verzeichnis der Bezugsquellen von Chemikalien und Reagenzien

Agarose (Gelelektrophorese) SeaKem® LE Agarose	Cambrex, Rockland, USA
Agarose (Zellkultur) Peq Gold Universal Agarose	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Ampicillin, Ampicillin-Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat, ≥ 98%, H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub> )	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Bacto™ Agar	BD, Heidelberg, Deutschland
Bacto™ Tryptone	BD, Heidelberg, Deutschland
Bact™ Yeast Extract	BD, Heidelberg, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Bromphenolblau (3', 3'', 5', 5''-Tetrabromphenolsulfon-phthalein, C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S), Für die Molekularbiologie	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
<i>calf intestine alkaline phosphatase</i> (CIAP), 1U/μ	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Cäsiumchlorid (CsCl), > 98%	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Casein	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
CIAP Puffer (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Coomassie® Brilliant Blau R-250	Applichem, Darmstadt, Deutschland
L-Cystein	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), > 99%	Fluka, Buchs, Schweiz
Dimethylformamid (DMF), Für die Molekularbiologie, 99%	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO, C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS), Sterilfiltriert	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), Zur Analyse	Merck, Schwalbach, Deutschland
DNase I (bovine Pankreas Dnase I, 1,500 Kunitz units/mg protein)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DTT (1,4-Dithio-DL-threitol, C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> )	Applichem, Darmstadt, Deutschland
EDTA (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> , Ethylendiamintetraessigsäure) reinst	Merck, Schwalbach, Deutschland
Eisessig (Essigsäure, CH <sub>3</sub> COOH) zur Analyse, 100%, wasserfrei	Merck, Schwalbach, Deutschland
Ethanol (EtOH, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH) Zur Analyse, > 99,9%	Merck, Schwalbach, Deutschland
Ethidiumbromid (C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub> )	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
F11 (10x)	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Formaldehyd (Formalin, CH <sub>2</sub> O), 36,5-38% (w/v)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Fungizone (500 x, Amphotericin B)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
G418 (Neomycin Analogon)	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Gelatin (from porcine scin)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Gibco™ Opti-MEM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
D(+)-Glukose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ), reinst	Fluka, Buchs, Schweiz
Glutaraldehyd (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ), 50% (w/v), Photographic grade	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

## Anhang I: Bezugsquellen von Chemikalien u. Reagenzien

---

Glycerin (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ), wasserfrei	Fluka, Buchs, Schweiz
Glykogen, Typ II	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HEPES (N-(2-Hydroxyethyl-Piperazin-N`-2-Ethansulfonsäure, C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S), > 99,5%	Fluka, Buchs, Schweiz
HeringSperm DNA	Roche, Mannheim, Deutschland
Horse Serum	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Isopropanol, Für technische und Laborzwecke	Apotheke des Klinikums rechts der Isar
Kaliumacetat (K-Acetat, C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> KO <sub>2</sub> ), reinst	Fluka, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid (KCl), > 99,5%	Fluka, Buchs, Schweiz
Kaliumferricyanid (K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ), Minimum 99%	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Kaliumferrocyanid (K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ), Minimum 99%	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Kalziumchlorid-Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O), Zur Analyse	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Klenow-Fragment	Roche, Mannheim, Deutschland
Lipofekatamin-Reagenz, 2 mg/ml	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Lysozym, <i>From chicken egg white</i> , 159000 U/mg	Serva, Heidelberg, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ), Zur Analyse	Merck, Schwalbach, Deutschland
MMP-2 (aus humanen Fibroblasten)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Na-Acetat (CH <sub>3</sub> COONa), Wasserfrei, zur Analyse	Merck, Schwalbach, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl), reinst	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Natriumcitrat (Na-Citrat, Tri-Natriumcitrat dihydrat, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> x 2 H <sub>2</sub> O), Für die Molekularbiologie	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Deoxycholat (C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NaO <sub>4</sub> ), >98,5%	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS, C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S), Ultra, > 99%	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid (NaOH), reinst	Merck, Schwalbach, Deutschland
Nonidet P40 (Nonylphenylpolyethylenglykol, NP40)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Papain (aus)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Roche, Mannheim, Deutschland
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase Puffer incl. MgCl <sub>2</sub> (10x)	Roche, Mannheim, Deutschland
Phenol (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O, flüssig, wassergesättigt)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Plasminogen (aus <i>Papaya latex</i> )	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid, C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> FO <sub>2</sub> S)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Polyacrylamid-Lösung (40%), Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pronase	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Random Hexamere	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Reverse Transkriptase (aus MMLV)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Reverse Transkriptase Puffer (5x)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

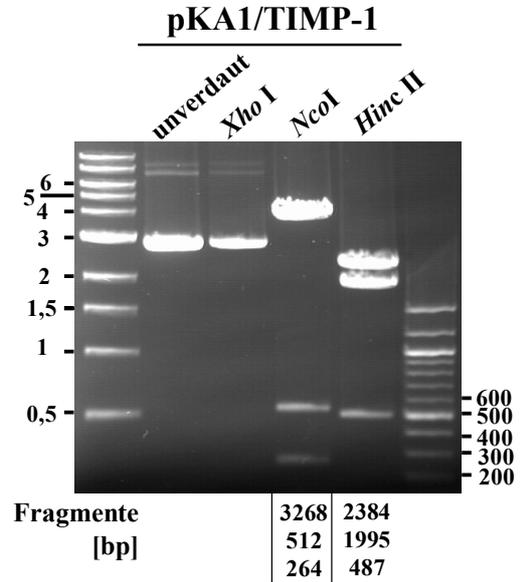
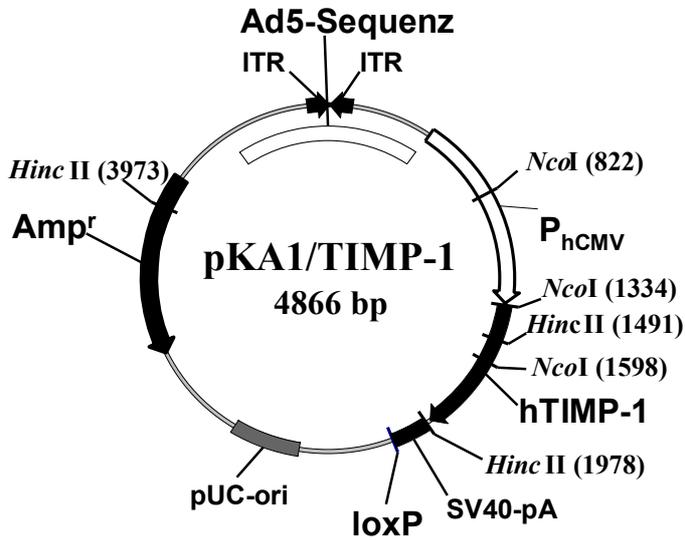
## Anhang I: Bezugsquellen von Chemikalien u. Reagenzien

---

RNase A (37,4 mg/ml)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Rnase-Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4 DNA-Ligase1 (10 <sup>3</sup> U/ml)	Roche, Mannheim, Deutschland
TaqMan™ Master Mix (10x)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, ≈ 99%, C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> )	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
TRIS Base (TRIZMA base, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
TRIS/HCl (TRIZMA/HCl, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> x HCl)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Triton X-100 (Polyethylenglykol-Mono-[p-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenyl]-Ether, C <sub>34</sub> H <sub>62</sub> O <sub>11</sub> )	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Tween-80 (Polyoxyethylensorbitanmonooleat)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Urokinase (uPA, aus humanem Urin, 500 U/mg Protein)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside, C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> BrClNO <sub>6</sub> )	Roche, Penzberg, Deutschland

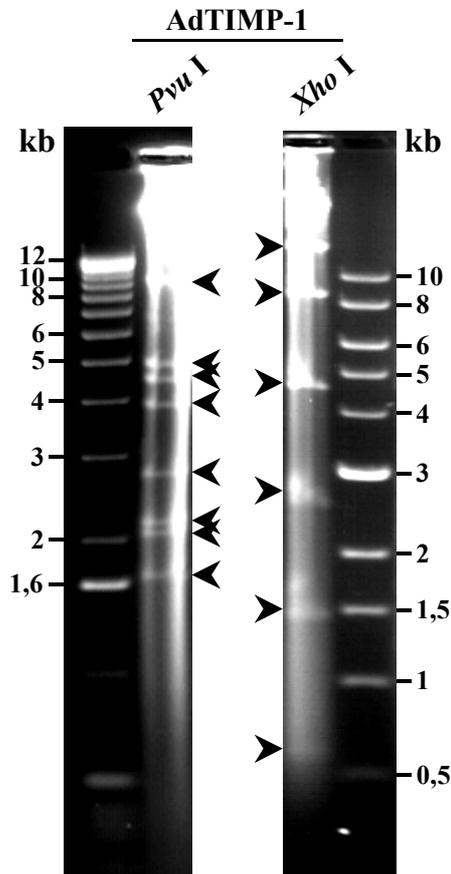
## II Übersicht über die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide und Adenoviren

### 1. pKA1/TIMP-1

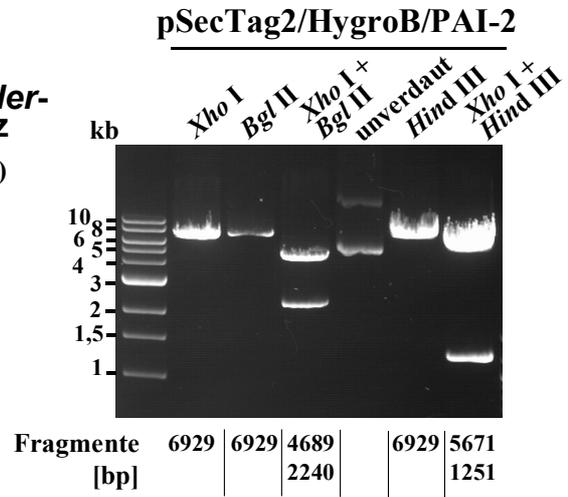
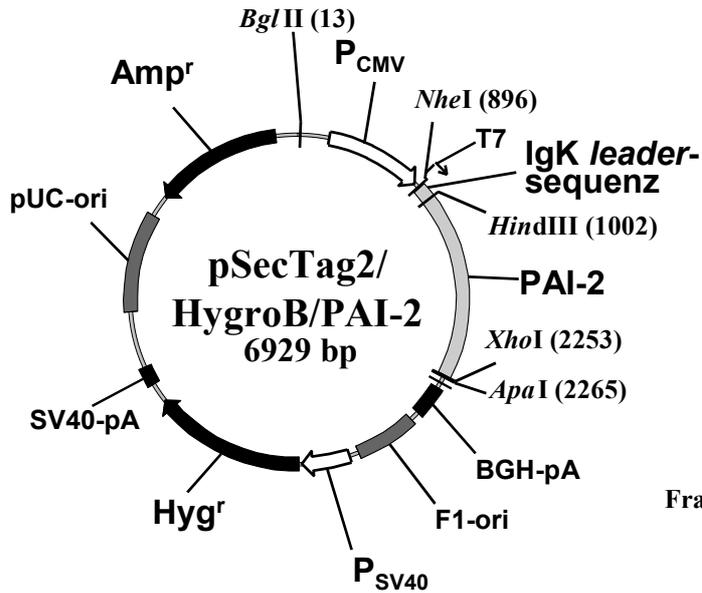


### 2. AdTIMP-1

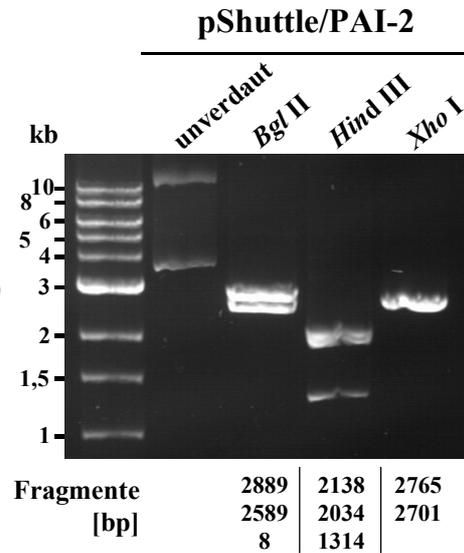
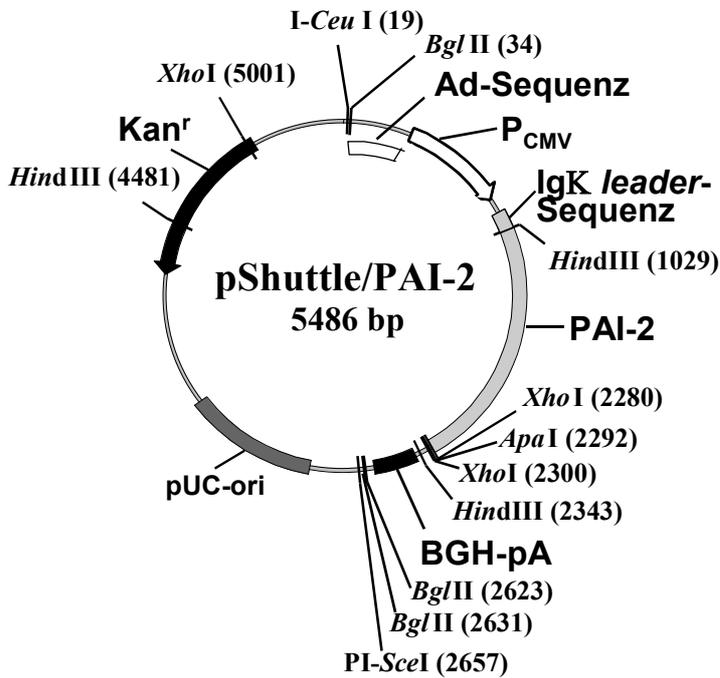
Zu erwartende Banden	
<i>PvuI</i>	<i>XhoI</i>
9776	14500
4990	8484
4553	4458
3852	2466
2782	1445
2174	595
2062	
1669	



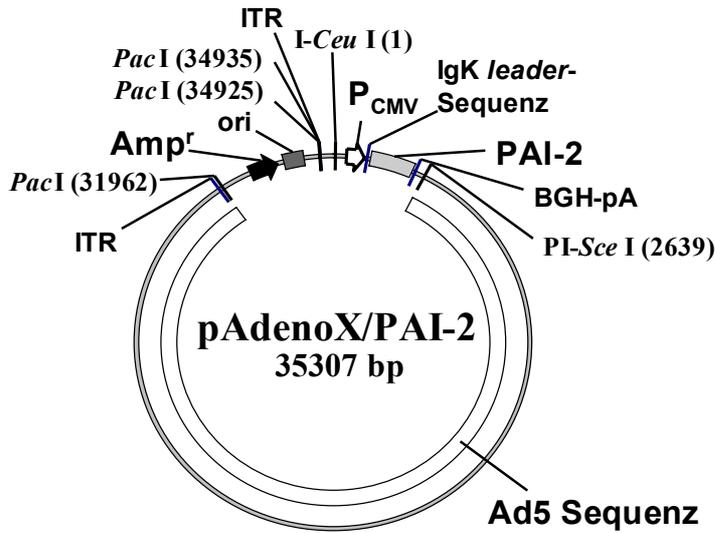
### 3. pSecTag2/HygroB/PAI-2



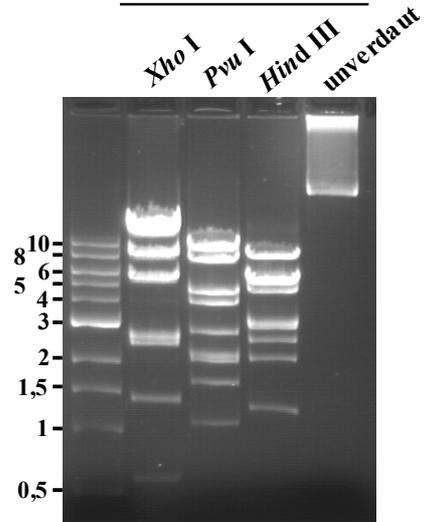
### 4. pShuttle/PAI-2



**5. pAdenoX/PAI-2**



**pAdenoX/PAI-2**



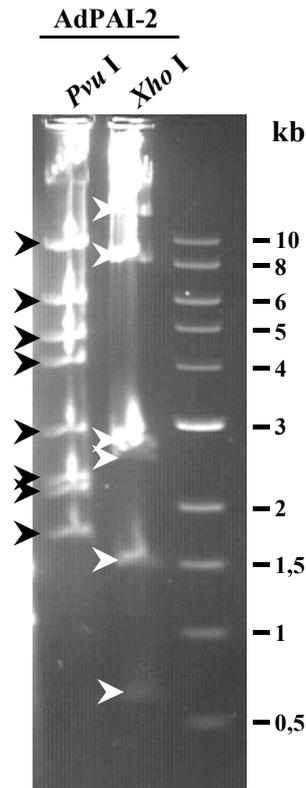
**Schnittstellen:**

- Hind III:** 1030, 2344, 5413, 10753, 12816, 12891, 17489, 25498, 28023, 30960
- Pvu I:** 5492, 7161, 11714, 13889, 17831, 20612, 22674, 32190, 33287
- Xho I:** 2281, 2301, 4960, 7426, 8871, 9466, 23966, 32012

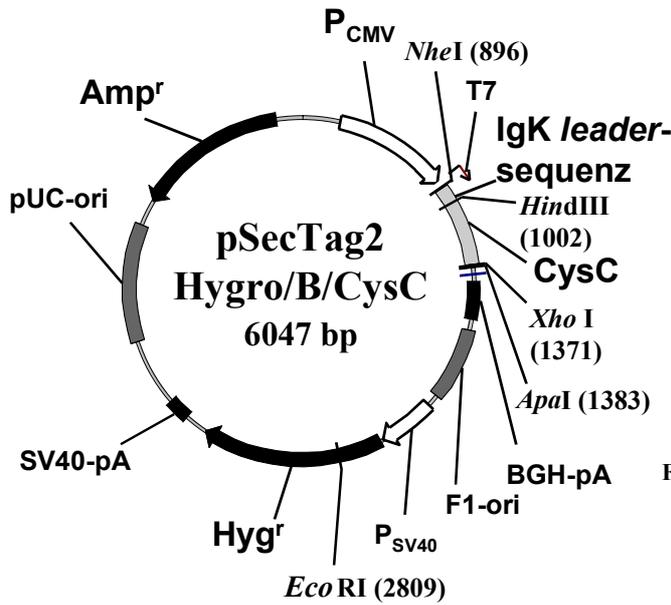
	14500	9516	8009
Fragmente	8046	7510	5377
[bp]	5576	4553	5222
	2659	3942	4598
	2466	2781	3069
	1445	2175	2937
	595	2062	2525
	20	1669	2081
		1097	1314
			75

**6. AdPAI-2**

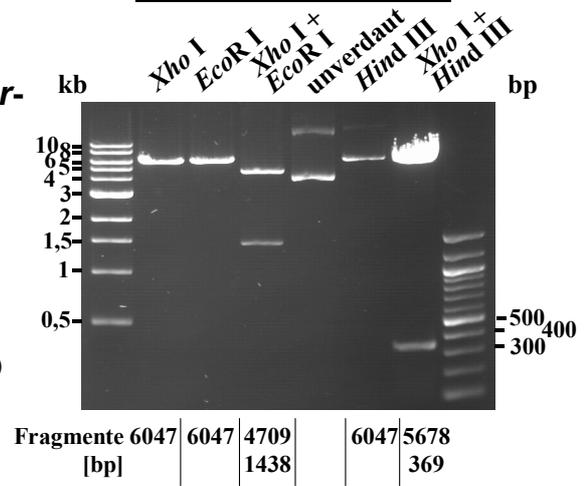
Zu erwartende Banden [bp]	
<i>PvuI</i>	<i>XhoI</i>
9306	14500
5846	8014
4553	2635
3942	2466
2782	1445
2174	595
2062	20
1669	



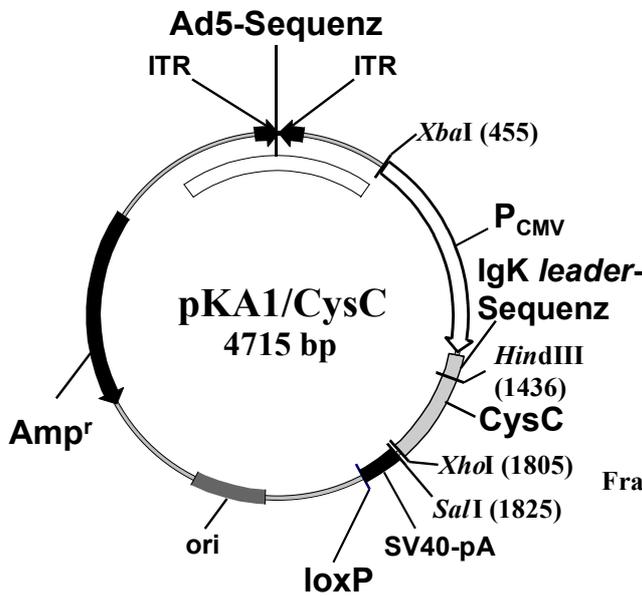
**7. pSecTag2/HygroB/CysC**



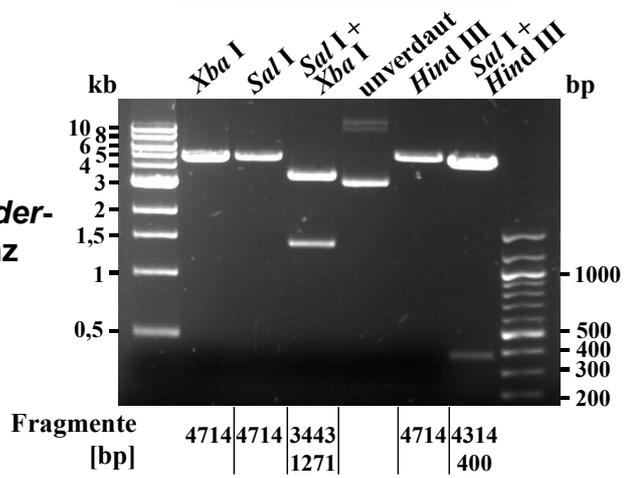
**pSecTag2/HygroB/CysC**



**8. pKA1/CysC**

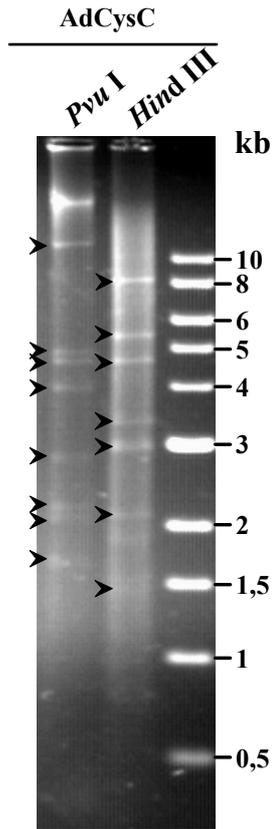


**pKA1/CysC**



**9. AdCysC**

Zu erwartende Banden	
<i>PvuI</i>	<i>HindIII</i>
9776	8010
4839	5322
4553	4597
3942	3324
2782	3011
2174	2937
2062	2081
1669	1436
	1003
	75



Zusatz:

*PvuI*-Verdau, 9776-Bande größer als erwartet, da vermutlich Terminales Protein nicht vollständig von der adenoviralen DNA entfernt wurde

*HindIII*-Verdau: Bande bei 1,8 kb resultiert aus dem Verdau der genomischen DNA der HEK 293 Zellen

### III Lebenslauf

<b>Name</b>	Kopitz
<b>Vornamen</b>	Charlotte Christine
<b>Familienstand</b>	Seit 01.06.2001 verheiratet mit Idris Razak Mohamed
<b>Geburtsdatum</b>	26.05.1974
<b>Geburtsort</b>	Berlin
<b>Nationalität</b>	Deutsch
<b>Eltern</b>	Michael Kopitz und Christine Kopitz geb. Duscheleit
<b>1980-1986</b>	Besuch der Reinhold-Otto-Grundschule in Berlin-Charlottenburg
<b>1986-1993</b>	Besuch des Erich-Hoepner-Gymnasiums in Berlin-Charlottenburg
<b>26.05.1993</b>	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife (Abitur)
<b>WS 1993-WS1999</b>	Studium der Biologie an der FU-Berlin
<b>20.06.1996</b>	Vordiplom der Biologie
<b>07.01.1999</b>	Diplom der Biologie
<b>01.01.1999-31.01.1999</b>	Wissenschaftliche Mitarbeit im Labor für klinische Gastroenterologie der 1. Medizinischen Klinik der Christian-Albrechts-Universität Kiel
<b>Seit 01.01.2000</b>	Beschäftigt am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapie-forschung der Technischen Universität München mit der Möglich-keit der Vorbereitung der Promotion

## IV Eigene Publikationen

### Paper

Die wesentlichen Teile *der vorliegenden Arbeit* werden gerade in Erstautorpublikationen verfasst. Die nachfolgend aufgeführten Publikationen sind durch Kooperationen mit anderen Projekten entstanden.

Krüger, A, Arlt, M.J.E., Michael Gerg, M., **Kopitz, C.**, Bernardo, M.M., Chang, M., Mobashery, S. und Rafael Fridman. Anti-metastatic activity of a novel mechanism-based gelatinase inhibitor. *Cancer Res.*, eingereicht.

Elezkurtaj, S., **Kopitz, C.**, Baker, A.H., Perez-Canto, A., Arlt, M.J.E., Khokha, R., Gansbacher, B., Anton, M., Brand, K. und Krüger, A. (2004). Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the liver: efficient protection against T-cell lymphoma and colon carcinoma metastasis. *J. Gene Med.*, **6**: 1228-1237.

Banke, I.J., Arlt, M.J., Pennington, C., **Kopitz, C.**, Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Gansbacher, B., Quigley, J.P., Edwards, D.R., Stürzebecher, J. und Krüger, A. (2003) Increase of anti-metastatic efficacy by selectivity- but not affinity-optimization of synthetic serine protease inhibitors. *Biol. Chem.*, **384**: 1515-1525.

Krol, J., **Kopitz, C.**, Kirschenhofer, A., Schmitt, M., Magdolen, U., Krüger, A. und Magdolen, V. (2003). Inhibition of intraperitoneal tumor growth of human ovarian cancer cells by bi- and trifunctional inhibitors of tumor-associated proteolytic systems. *Biol. Chem.*, **384**: 1097-1102.

Reuning, U., Sperl, S., **Kopitz, C.**, Kessler, H., Krüger, A., Schmitt, M. und Magdolen, V. (2003). Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): development of antagonists of uPA/uPAR interaction and their effects *in vitro* and *in vivo*. *Curr. Pharm. Des.*, **9**: 1529-1543.

Arlt, M., **Kopitz, C.**, Pennington, C., Watson, K.L., Krell, H.W., Bode, W., Gansbacher, B., Khokha, R., Edwards, D.R. und Krüger, A. (2002). Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model. *Cancer Res.*, **62**: 5543-5550.

Sato, S., **Kopitz, C.**, Schmalix, W.A., Muehlenweg, B., Kessler, H., Schmitt, M., Krüger, A. und Magdolen, V. (2002). High-affinity urokinase-derived cyclic peptides inhibiting urokinase/urokinase receptor-interaction: effects on tumor growth and spread. *F.E.B.S. Lett.*, **528**: 212-216.

Krüger, A., Soeltl, R., Sopov, I., **Kopitz, C.**, Arlt, M., Magdolen, V., Harbeck, N., Gansbacher, B. und Schmitt, M. (2001). Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor batimastat promotes liver metastasis. *Cancer Res.*, **61**: 1272-1275.

## **Abstracts für Vorträge und Poster**

- Kopitz, C.** und Krüger, A. Reduction of Experimental Fibrosarcoma Metastasis in Mice by Adenovirus-Mediated Cystatin C Overexpression in the Host. 3<sup>rd</sup> International Conference on Tumor Microenvironment: Progression, Therapy, and Prevention. Prag, Tschechische Republik, 12.10.-16.04.2004.
- Gerg, M., Arlt, M.J.E., Bernardo, M., **Kopitz, C.**, Fridman, R., Mobashery, S., and Krüger, A.. A Selective Mechanism-Based Inhibitor For Gelatinases Inhibits Metastasis And Increases Survival In A Mouse Model of T-Cell Lymphoma. 10<sup>th</sup> International Congress of the Metastasis Research Society. Genua, Italien, 17.-20.09.2004.
- Krüger, A., Arlt, M.J.E., Bernardo, M., Happle, C., **Kopitz, C.**, Brown, S., Mobashery, S. und Fridman, R. Anti-metastatic efficacy of a highly selective mechanism-based gelatinase inhibitor. 95<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Orlando, Florida, USA, 2004.
- Arlt, M.J.E., Bernardo, M., **Kopitz, C.**, Chang, M., Fridman, R., Mobashery, S. und Krüger, A. A highly selective mechanism-based gelatinase inhibitor: reduction of metastasis and increase of survival in a highly aggressive T-cell lymphoma model. 3<sup>rd</sup> Conference on Experimental and Translational Oncology, Kranjska Gora, März, 2004.
- Kopitz, C.**, Krüger, A., Kirschenhofer, A., Magdlen, U., Magdlen, V. und Krol, J. Inhibition of Intraperitoneal Tumor Growth of Human Ovarian Cancer Cells by Novel. Bi- and Trifunctional Inhibitors of Tumor-Associated Protolytic Systems. 20<sup>th</sup> Winter School on Proteinases and Their Inhibitors -Recent Developments-, Tiers, Italien, 05.03.-09.03.2003.
- Krüger, A., Arlt, M., Banke, I.J., **Kopitz, C.**, Bode, W., Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Krell, H.W. und Stürzebecher J. Anti-metastatic efficacy of synthetic protease inhibitors: superiority of specificity over affinity. 16<sup>th</sup> International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis, München, Deutschland, 08.09.-13.09.2002.
- Sato, S., **Kopitz, C.**, Schmalix, W., Muehlenweg, B., Kessler, H., Schmitt, M., Krüger, A. und Magdolen, V. High-affinity uPA-derived cyclic peptides inhibiting uPA/uPAR-interaction: effects on tumor growth and spread. 16<sup>th</sup> International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis, München, Deutschland, 08.09.-13.09.2002.
- Arlt, M., **Kopitz, C.**, Pennington, C., Watson, K.L.M., Krell, H.W., Bode, W., Gansbacher, B., Khokha, R., Edwards, D.R. und Krüger, A. Increase of gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with anti-metastatic efficacy in a T-cell lymphoma model. 16<sup>th</sup> International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis, München, Deutschland, 08.09.-13.09.2002.
- Kopitz, C.**, Arlt, M., Anton, M., Nagel, J., Baker, A.H., Khokha, R., Gansbacher, B., Brand, K., Krüger, A. Reduction of T-cell lymphoma liver metastasis by adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the liver. 16<sup>th</sup> International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis, München, Deutschland, 08.09.-13.09.2002.
- Krüger, A., Arlt, M., **Kopitz, C.**, Lundy, C., Gowing, K., Krell, H.W., Bode, W., Edwards, D.R., Khokha, R. und Gansbacher, B. Comparative analysis of anti-metastatic efficacy of different synthetic matrix metalloproteinase inhibitors: Influence on metastasis-promoting gene expression. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 43: 5262, San Francisco, USA, 06.04.-10.04.2002.

- Wosikowski, K., Foekens, J., **Kopitz, C.**, Krüger, A., Magdolen, V., Moroder, L., Probst, J., Sato, S., Schmalix, W., Schmitt, M., Setyono-Han, B., Sperl, S. und Stuerzebecher, J. Inhibitors of the urokinase-type plasminogen activator system. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 43: 791, San Francisco, USA, 06.04.-10.04.2002.
- Sato, S., **Kopitz, C.**, Schmalix, W., Muehlenweg, B., Kessler, H., Schmitt, M., Krüger, A. und Magdolen, V. Effects of two high affinity uPA-derived cyclic peptides inhibiting uPA/uPAR-interaction on tumor growth and spread. 2<sup>nd</sup> Conference on Experimental Tumour Biology, Bovec, Slovenien, 14.3.-17.03.2002.
- Kopitz, C.**, Arlt, M., Anton, M., Nagel, J., Baker, A.H., Khokha, R., Gansbacher, B., Brand, K. und Krüger, A. Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the liver protects against T-cell lymphoma metastasis. European Society of Gene Therapy, Antalya, Türkei, 01.11.-04.11.2001.
- Kopitz, C.**, Nagel, J., Arlt, M., Anton, M., Baker, A.H., Khokha, R., Gansbacher, B., Brand, K. und Krüger, A. Treatment of T-cell lymphoma liver metastasis by adenoviral transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1). International Proteolysis Society, Freising, Deutschland, 01.11.-04.11.2001.
- Arlt, M., **Kopitz, C.**, Lundy, C., Krell, H.W., Gansbacher, B., Edwards, D. und Krüger, A. Increase of gelatinase specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with anti-metastatic efficacy in a T-cell lymphoma model. International Proteolysis Society, Freising, Deutschland, 01.11.-04.11.2001.
- Krüger, A., Arlt, M., **Kopitz, C.**, Krell, H.W. und Gansbacher, B. Reduction of T-cell lymphoma metastasis directly correlates with gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors. Gordon Research Conference on Matrix Metalloproteinases, 13.05.-15.05.2001.
- Brand, K., **Kopitz, C.**, Elezkurtaj, S., Baker, A.H., Arlt, M., Anton, M., Gansbacher, B. und Krüger, A. Treatment of colorectal and lymphatic liver metastases by adenoviral transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (Timp-1) or Timp-2 into the liver tissue. Mol. Ther. 3: 885, Seattle, Washington, U.S.A., 30.05.-03.06.2001.
- Krüger, A., Arlt, M., **Kopitz, C.**, Schmeller, M., Scheuer, W., Krell, H.W. und Gansbacher, B. T-cell lymphoma metastasis: Increase with unspecific and reduction with specific matrix metalloproteinase inhibitors. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 42: 5097, New Orleans (LA), U.S.A., 24.03.-28.03.2001.
- Nagel, J., **Kopitz, C.**, Soeltl, R., Harbeck, N., Schmitt, M., Magdolen, V., Gansbacher, B. und Krüger, A. Inhibition of collagenolytic activity of soluble uPA receptor (suPAR)-overexpressing breast carcinoma cells is TIMP-1-independent. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 42: 274, New Orleans (LA), U.S.A., 24.03.-28.03.2001.
- Kopitz, C.**, Arlt, M., Anton, M., Baker, A.H., Gansbacher, B., Brand, K. und Krüger, A. Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the liver protects against invasion of T-cell lymphoma metastases. 19<sup>th</sup> Winter School on Proteinases and their Inhibitors Recent Developments, Tiers, Italien, 28.02.-04.03.2001.
- Kopitz, C.**, Arlt, M., Wedde, M., Podsiadlowski, L., Fröbius, A. und Vilcinskas, A. Infection of the greater wax moth *Galleria mellonella* with a baculovirus leads to induction of an insect metalloproteinase inhibitor (IMPI). 18<sup>th</sup> Winter School on Proteinases and their Inhibitors Recent Developments, Tiers, Italien, 08.03.-11.03.2000.

### **Buchbeiträge**

Kirschenhofer, A., Magdolen, V., Schmitt, M., Albrecht, S., Krol, J., Farthmann, J., **Kopitz, C.**, Prezas, P., Krüger, A., Luther, T. und Böttger, V. Recombinant single chain antibody scFv-IIIIF10 directed to human urokinase receptor. In: Mukhtar, H. und Labrie, F. (Hrsg.) Recent Research Developments in Cancer, Vol. 5, Kanada, 2003.

### **Preise**

Beste Präsentation eines Teilnehmers der Technischen Universität bei der „20<sup>th</sup> Winter School on Proteinases and Their Inhibitors -Recent Developments-“, Tiers, Italien, 05.03.-09.03.2003.

Poster Award, in recognition of scientific quality, style, and presentation of the abstract at the poster session of the 16<sup>th</sup> International Congress of the ISFP, International Society for Fibrinolysis and Proteolysis, München, Deutschland, 08.09.-13.09.2002.

Beste wissenschaftliche Arbeit bei der „19<sup>th</sup> Winter School on Proteinases and their Inhibitors -Recent Developments-“, Tiers, Italien, 28.02.-04.03.2001.