

Frauenklinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktorin: Univ-Prof. Dr. M. B. Kiechle)

**Quantifizierung und Charakterisierung der mRNA
Expression des Urokinase Rezeptors uPAR (CD87) in
Zelllinien und Tumorproben von Brustkrebs Patientinnen
mittels quantitativer *real-time* RT-PCR**

Anna Juliane Farthmann

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

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

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. V. Magdolen
2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 12.06.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 27.09.2006 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

	SEITE
1. EINLEITUNG	1
1.1. Bedeutung und Behandlung des Mammakarzinoms	1
1.2. Proteasen und ihre Bedeutung bei malignen Erkrankungen	5
1.2.1. uPA/PAI-System	6
1.2.2. Urokinasetyp Plasminogen Aktivator Rezeptor uPAR (CD87)	13
1.3. Zielsetzung der Arbeit	17
2. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	19
2.1. Patientenkollektive	19
2.1.1. Proben aus der Tumorbank der Frauenklinik Rechts der Isar, München	19
2.1.2. Proben aus der Universitätsklinik Dresden	19
2.1.3. Proben aus dem Erasmus Medical Center, Rotterdam, Niederlande	19
2.1.4. Proben aus dem Universitätsklinikum Nijmegen, Niederlande	19
2.2. Zelllinien	20
2.2.1. Zelllinien aus dem Klinikum Rechts der Isar	20
2.2.2. Zelllinien aus der Klinik für Dermatologie der Ludwig-Maximilians- Universität München	20
2.2.3. Zelllinien aus dem Universitätsklinikum Nijmegen, Niederlande	21
2.3. Material und Methoden	22
2.3.1. Tumorgewebe aus der Frauenklinik Rechts der Isar, München	22
2.3.1.1. Asservierung	22
2.3.1.2. Schneiden der Gewebeproben und Extraktion von RNA	22
2.3.1.3. Reverse Transkription der RNA	23
2.3.1.3.1. Versuchsaufbau der cDNA Synthese	25
2.3.2. Tumorgewebe aus anderen Laboren	26
2.3.2.1. Proben aus dem Universitätsklinikum Dresden	26
2.3.2.2. Proben aus dem Erasmus Medical Center Rotterdam, Niederlande	26
2.3.2.3. Proben aus dem Universitätsklinikum Nijmegen, Niederlande	26

2.3.3. Zellexperimente	27
2.3.3.1. Zellkultur	27
2.3.3.2. Extraktion von RNA	28
2.3.3.3. Reverse Transkription der RNA	29
2.3.3.4. ELISA für uPAR Antigen	29
2.3.4. Reinigung und Fragmentierung der uPAR Plasmide	30
2.3.5. Gelelektrophorese	33
2.3.6. Etablierung von quantitativen <i>real-time</i> RT-PCR Assays für uPAR-del5 und uPAR-wt mRNA	34
2.3.6.1. Design der Primer und Sonden	36
2.3.6.2. Versuchsaufbau der quantitativen <i>real-time</i> RT-PCR	38
2.3.6.3. Auswertung im LightCycler	40
2.3.6.4. Kontrolle auf Agarosegel	40
2.3.6.5. Sequenzierung von PCR-Produkten	41
2.3.7. Normalisierung der Daten gegen ein Housekeeping Gen	41
2.3.7.1. Housekeeping Gen h-G6PDH	42
2.3.8. Statistische Auswertung	42
3. ERGEBNISSE	43
3.1. Entwicklung von RT-PCR Assays für uPAR-del5 und uPAR-wt	43
3.2. Sensitivität der Assays	43
3.3. Spezifität der Assays	46
3.4. Reproduzierbarkeit der Assays	47
3.4.1. <i>Intraassay</i> -Variabilität	48
3.4.2. <i>Interassay</i> -Variabilität	48
3.5. Zellexperimente	51
3.5.1. Messungen von uPAR mRNA und Antigen in Zelllinien verschiedener Herkunft	51
3.5.2. Melanomzelllinien nach Behandlung mit siRNA	53
3.5.3. Mammakarzinomzellen nach Behandlung mit Kobalt	54
3.6. Experimente an Patientengewebe	55
3.6.1. Patientengewebe aus München	55
3.6.1.1. Vergleich Kryoschnitte und pulverisiertes Gewebe	56

3.6.2. Patientengewebe aus Dresden	57
3.6.3. Patientengewebe aus Rotterdam	58
3.6.4. Patientengewebe aus Nijmegen	58
3.6.5. Übersicht der uPAR mRNA Varianten in den verschiedenen untersuchten Kollektiven	60
4. DISKUSSION	61
5. ZUSAMMENFASSUNG	70
6. LITERATURVERZEICHNIS	71
7. ANHANG	90
8. LEBENSLAUF	92
9. DANKSAGUNG	93

1. EINLEITUNG

1.1. Bedeutung und Behandlung des Mammakarzinoms

In Deutschland wie auch in anderen westeuropäischen Ländern wird die Statistik der Todesursachen immer noch von den kardiovaskulären Erkrankungen, wie Herzinfarkten und Arteriosklerose, bestimmt. An zweiter Stelle rangieren die malignen Tumorerkrankungen, die eine wichtige Rolle in Bezug auf die Morbidität und die Mortalität in der Bevölkerung spielen. Dies hat nicht nur große soziale, sondern auch nicht zu unterschätzende volkswirtschaftliche Auswirkungen. Während bei Männern die häufigste Krebserkrankung das Bronchialkarzinom ist, erkrankt eine Frau am ehesten am Mammakarzinom (Quelle: Statistisches Bundesamt).

Das *Mammakarzinom*, also die maligne Entartung der Brustdrüse, ist auch weltweit die häufigste bösartige Erkrankung der Frau mit über 1 Million Neuerkrankungen pro Jahr (Ferlay et al. 2000). Im Jahr 1998 erkrankten 46295 Frauen in Deutschland. Das entsprach einem Anteil von 25,9 % aller Krebserkrankungen (Quelle: Statistisches Bundesamt). Jede neunte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs bei einem mittleren Erkrankungsalter von 63,5 Jahren (Quelle: Tumorregister München). Eines von 100 Mammakarzinomen tritt bei einem Mann auf und hat meist eine schlechtere Prognose als bei Frauen (Backe 2002).

Die *Ätiologie* des Mammakarzinoms ist nicht komplett geklärt, aber es sind Faktoren identifiziert worden, die das Erkrankungsrisiko erhöhen: familiäre Belastung, späte Menarche, wenige Schwangerschaften und kurze Stillphasen. Aufgrund dieser Parameter lässt sich das relative Risiko einer Frau abschätzen, an Brustkrebs zu erkranken (Armstrong et al. 2000). Während der Großteil der Tumoren sporadisch auftritt, liegt bei 5% der Neuerkrankungen eine Genmutation zugrunde. Zu den verantwortlichen Genen gehören unter anderem die *breast cancer genes* BRCA-1 und BRCA-2, aber auch das p53-Gen (Kenemans et al. 2004, Claus et al. 1994). Frauen, bei denen eine solche Genmutation bekannt ist, sollten in speziellen Risikoambulanzen betreut werden, um eine sinnvolle Prävention sicherstellen zu können.

Die *pathologische Einteilung* von Mammakarzinomen erfolgt nach der TNM-Klassifikation der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) analog zu anderen malignen Tumoren (UICC 2003). Histopathologisch werden die invasiven Formen (invasiv duktales und invasiv lobuläres Karzinom) von den nicht invasiven Vorstufen (duktales oder lobuläres *Carcinoma in situ*) sowie Sonderformen (z.B. medulläres Karzinom) unterschieden. Die Prognose ist bei den

tubulären, den muzinösen und den papillären Karzinomen mit Fünfjahres-Überlebensraten von 95% am besten (Bässler 1997).

Um die Mortalität von Brustkrebs zu verringern, ist eine sensitive und spezifische *Diagnostik* wichtig. Nur so kann die Erkrankung in ihren frühen Stadien therapiert werden, bevor es zu einer Aussaat von Tumorzellen im Körper gekommen ist. Der Goldstandard der Vorsorge ist neben der körperlichen Untersuchung weiterhin die Mammographie. Sie kann ergänzt werden durch Kernspintomographie, Sonographie und die Biopsie suspekter Herde. Während diese Methode in Ländern wie Schweden, Holland, England oder Frankreich im Rahmen eines *Screening*programmes fest etabliert ist, wird der Nutzen in Deutschland, verglichen mit den Risiken, weiterhin kontrovers diskutiert. Als Kritik wird die Strahlenbelastung angeführt. In Deutschland ist die *Screening*-Mammographie für Frauen im Alter von 50 bis 69 Jahren seit Januar 2004 in den Richtlinien des Gemeinsamen Bundesausschusses für die Früherkennung von Krebserkrankungen („Krebsfrüherkennungs-Richtlinien“) verankert, aber noch nicht flächendeckend umgesetzt (Kreienberg et al. 2004).

Begleitend zur initialen Therapie werden bei den Patientinnen nach Diagnosestellung *Staginguntersuchungen* durchgeführt: Sonographie der Leber, Röntgen des Thorax und Skelettszintigraphie. Dadurch erhält man Informationen über diejenigen Organe, in die Mammakarzinome gewöhnlich zuerst streuen. Diese Information ist einerseits wichtig, um das aktuelle Stadium der Erkrankung zu kennen und andererseits, um den Verlauf, z.B. während chemotherapeutischer Behandlung, beurteilen zu können. Im Knochenmark kann eine Dissemination vereinzelter Tumorzellen stattgefunden haben, die mit der Zytokeratinfärbung einer Knochenmarkpunktion nachweisbar sind (Braun et al. 2005). Ihre Bedeutung ist allerdings noch nicht komplett geklärt (Funke et al. 1998). Es gibt Hinweise, dass diese Dissemination bereits in sehr frühen Krankheitsstadien vorhanden sein kann (Schmidt-Kittler et al. 2003).

Die *Therapie* des Mammakarzinoms steht auf drei Säulen: der Chirurgie, der Chemotherapie und der Bestrahlung. Somit ist immer eine interdisziplinäre Zusammenarbeit verschiedener Fachrichtungen nötig. Die klassische Reihenfolge hat sich teilweise verändert, da immer häufiger vor der chirurgischen Therapie eine neoadjuvante Chemotherapie durchgeführt wird. Sie findet vor allem bei primär sehr großen Tumoren Anwendung, damit nach der Therapie

brusterhaltend operiert werden kann oder inoperable Tumoren in operable überführt werden können (Honig et al. 2004).

Ebenso wurde der *chirurgische Ansatz* in den vergangenen Jahren deutlich weiterentwickelt. Die brusterhaltende Therapie (BET) konnte sich gegenüber der Entfernung der gesamten Brust (*Ablatio mammae*) in der Mammachirurgie durchsetzen. Dies ist für die Patientinnen sehr viel weniger belastend und führt zu einem deutlich besseren kosmetischen Ergebnis. Da die Patientinnen in der Regel nach der BET eine Radiatio der Restbrust erhalten, unterscheidet sich das Rezidivrisiko zwischen beiden Verfahren nicht (Veronesi et al. 2002, Fisher et al. 2002). Ebenso wurde die Technik der Entfernung von axillären Lymphknoten modifiziert. Das Verfahren ist dadurch für die Patientin schonender geworden. In der Regel wird zu Beginn eine *Sentinel-Lymphknotenbiopsie* durchgeführt: die ersten drainierenden Lymphknoten werden radioaktiv markiert und aufgesucht. Nur wenn in diesen Gewebeproben Tumorzellen vorhanden sind, werden nachfolgend die axillären Lymphknoten *in toto* entfernt.

Das Grundprinzip einer *Radiatio* besteht darin, dass durch die Bestrahlung der Restbrust eventuell noch vorhandene Tumorzellen zerstört werden und so das lokale Tumorfeld kontrolliert wird. Dies spielt v.a. nach der brusterhaltenden Operation, bei ausgedehnten Tumoren aber auch nach der ablativen Therapie eine Rolle. Außer der Restbrust, bzw. der Thoraxwand, werden bei Tumorbefall die axillären Lymphabflusswege bestrahlt.

Die Rationale für eine zusätzliche systemische Therapie mit *Chemotherapeutika* besteht in der Annahme, dass eventuell bereits Tumorzellen im Körper gestreut haben, die sich mittels Routinediagnostik nicht nachweisen lassen. Nach einer unterschiedlich langen Latenzzeit können daraus Metastasen entstehen. Dies soll mit einer Chemotherapie verhindert werden. Für eine Chemotherapie gibt es die „klassischen“ Schemata: CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil), welches mittlerweile aber durch EC (Epirubicin und Cyclophosphamid), bzw. FEC (zusätzlich 5-Fluorouracil) abgelöst wurde. Bei Hochrisikopatientinnen, beispielsweise nodal-positiven Patientinnen wird in der Regel eine Taxanhaltige Polychemotherapie gewählt. Darüber hinaus werden in einer Reihe von klinischen Studien weitere Kombinationen getestet. Die Nebenwirkungen der Therapie, wie Erbrechen und Kopfschmerzen, können mittlerweile pharmakologisch abgeschwächt werden.

Neben der Histopathologie werden in die Entscheidung über eine chemotherapeutische Behandlung weitere *tumorbiologische Faktoren* einbezogen wie das Grading, also der Differenzierungsgrad der Krebszellen (G1-G3). Gering differenzierte Zellen (G3) zeichnen sich durch ein besonders aggressives Wachstum aus und stehen daher für einen prognostisch ungünstigen Tumor.

Des Weiteren wird immunhistochemisch untersucht, in welchem Ausmaß die Tumorzellen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren für Östrogen und/oder Progesteron exprimieren. Es wird zwischen hormonsensitiven und nicht-hormonsensitiven Tumoren unterschieden, aber es ist derzeit nicht eindeutig festgelegt, welcher Grenzwert zur Unterscheidung herangezogen werden sollte. Allerdings ist deutlich geworden, dass Patientinnen, deren Tumoren keine Hormonrezeptoren exprimieren, nicht von einer antihormonellen Therapie profitieren (Kaufmann et al. 2005). Bei immunhistochemisch nachgewiesener Hormonrezeptorpositivität erhält die Patientin entweder für fünf Jahre ein Antiöstrogen (z.B. Tamoxifen), oder einen Aromatasehemmer (z.B. Anastrozol), der die endogene Bildung von Östrogen verhindert. Beide Mittel entziehen dem Tumor den Wachstumsreiz und sollen somit ein Rezidiv verhindern oder zumindest das Fortschreiten der Erkrankung herauszögern. Mittlerweile gibt es auch sehr positive Daten für die erweiterte adjuvante antihormonelle Therapie (EAT, extended adjuvant therapy), also über 5 Jahre hinaus. In der MA-17 Studie konnte gezeigt werden, dass das Rezidivrisiko weiter gesenkt wurde (Goss et al. 2006).

Trastuzumab ist ein anderes Agens, das in den vergangenen Jahren einen neuen Ansatz in der Therapie geliefert hat. Es ist ein Antikörper gegen den Oberflächenrezeptor HER-2/neu, der in einem Teil der Tumoren exprimiert wird (Zhou et al. 2002, Duffy et al. 2005).

Dennoch gilt für die adjuvante Chemo- wie auch Radiotherapie, dass mehr Patientinnen behandelt werden als davon profitieren. Ein Teil der Frauen wird „übertherapiert“, da sie auch ohne die zusätzliche Therapie - mit ihren Nebenwirkungen und Gefahren - kein Rezidiv erleiden würden. Durch die postoperative Radiotherapie wird die Rate der lokalen und lokoregionären Rezidive auf ungefähr ein Drittel gesenkt, sowohl nach ablativer, wie auch nach brusterhaltender Operation (Whelan et al. 2000). Das bedeutet aber auch, dass viele Patientinnen mit der Operation geheilt sind und keine zusätzliche Therapie benötigen. Es ist daher von großem Interesse, Parameter zu etablieren, mit dem „high-risk“ Patientinnen identifiziert werden können, die von einer adjuvanten Therapie profitieren würden. Während

der Nodalstatus für die Prognose weiterhin den größten Stellenwert hat, fehlt immer noch ein gesicherter Faktor für die nodalnegative Patientinnen. Anhand der derzeit gebräuchlichen Prognosefaktoren wie Grading, TNM-Klassifikation, Tumorgröße oder Hormonrezeptorstatus gelingt diese Beurteilung nicht zuverlässig (Kute et al. 2004).

Um dieses Problem zu lösen, wird versucht, Gene zu identifizieren, deren Expression eine prognostische Relevanz bei nodalnegative Patientinnen hat. Paik et al. (2004) haben an einem Kollektiv von 668 Brustkrebspatientinnen die mRNA Expression von 21 Genen bestimmt, denen eine Rolle bei Invasion, Proliferation etc. zugeschrieben wird. Anhand dieser Daten ließen sich die Patientinnen in Gruppen mit hohem, mittlerem oder niedrigem Rezidivrisiko einteilen. Andererseits werden seit den späten 1980er Jahren die Antigenlevel der Serinprotease Urokinasetyp Plasminogen Aktivator (uPA) und ihres Inhibitors PAI-1 als Prognosefaktoren bestimmt, um eine weitere, adjuvante Therapie festzulegen. Man weiß, dass das uPA System eine essentielle Rolle im Fortschreiten einer Tumorerkrankung spielt (Andreasen et al. 1997, Schmitt et al. 1997). Des Weiteren scheint es auch prädiktiv für ein überdurchschnittliches Ansprechen auf eine Chemotherapie zu sein (Harbeck et al. 2004, Jänicke et al. 2001). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass ein hohes Level von uPA/PAI-1 prognostisch ungünstig ist, während ein niedriges Level für einen weniger aggressiven Tumor spricht (Foekens et al. 2000). Diese Faktoren sind mittlerweile auf dem höchsten *Oxford Level of Evidence* validiert worden (Quelle: Oxford Centre for Evidence based Medicine Levels of Evidence, Mai 2001). Anhand einer Studie der EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) konnten diese Daten an über 8000 Patientinnen bestätigt werden (Harbeck et al. 2004). Somit besteht erstmals die Möglichkeit, anhand tumorbiologischer Faktoren eine individuelle Therapieentscheidung für Patientinnen mit tumorfreien Lymphknoten treffen zu können.

1.2. Proteasen und ihre Bedeutung bei malignen Erkrankungen

Bei malignen Tumorerkrankungen allgemein und ganz besonders beim Mammakarzinom ist die Ursache für den Tod der Patienten meist eine Metastasierung des Primärtumors in andere Organe. Das Mammakarzinom streut in der Regel zuerst in die Lunge, die Leber, sowie in das Knochenskelett. Für diese Aussaat der Tumorzellen müssen sich die Tumorzellen aus ihrem Verband lösen und die extrazelluläre Matrix (ECM) abbauen. Erst dann können sie über Lymph- oder Blutbahnen an andere Orte des Körpers gelangen und sich dort absiedeln. So entstehen Metastasen, die zu Komplikationen führen und die Überlebenschancen der

Patientin verringern. Ermöglicht wird dies durch das Zusammenspiel verschiedener proteolytischer Faktoren, zu denen Serinproteasen (uPA System), Cysteinproteasen (Cathepsine) und die Matrix Metalloproteinasen (MMPs), bzw. deren Inhibitoren (TIMPs) gehören (Andreasen et al. 2000, Turk et al. 2004, Magdolen et al. 2002).

Die ECM wurde traditionell hauptsächlich als physische Barriere verstanden, mittlerweile allerdings weiß man, dass sie darüber hinaus ein wichtiger Speicherort für verschiedene Wachstumsfaktoren ist (Aumailley et al. 1998). Diese Funktionen werden unter anderem durch die Bindung von uPA (Urokinasetyp Plasminogen Aktivator) an seinen Rezeptor uPAR gefördert. Dies bedeutet wiederum, dass während des Abbaus der ECM, wie er beim der Tumordinvasion beobachtet wird, nicht nur eine Barriere beseitigt wird. Vielmehr werden vielfältige Signalwege aktiviert, mit denen wiederum Proliferation, Überleben und Untergang der Zellen bestimmt werden (Vu et al. 2000).

Während das uPA System in beinahe allen Formen maligner Tumoren exprimiert wird, scheinen MMPs spezifisch für bestimmte Tumorentitäten zu sein (Egeblad et al. 2002). Allen Proteasen ist gemein, dass sie an physiologischen Prozessen beteiligt sind, bei denen Gewebe erneuert oder umgebaut wird. Dazu zählen beispielsweise die Wundheilung und die Entwicklung der Plazenta (Johnsen et al. 1998). In Mäusen, die kein Plasminogen produzieren, ist die Wundheilung stark beeinträchtigt. Offensichtlich fehlt den Keratinozyten die Fähigkeit, sich ihren Weg durch die ECM zu bahnen (Romer et al. 1996). In der Brustdrüse finden sich ähnliche Expressionsmuster von uPA, MMP-2, MMP-3 und MMP-11, wenn sie tumorartig verändert ist, bzw. nach dem Abstillen umgebaut wird (Dano et al. 2005).

Aus diesem Grund stehen proteolytische Faktoren einerseits wegen ihrer möglichen prognostischen, bzw. prädiktiven Bedeutung im Mittelpunkt der onkologischen Forschung. Sie stellen andererseits einen potentiellen Angriffspunkt für die Behandlung von Tumoren dar, da sie die Metastasierung des Primärtumors ermöglichen. Man versucht daher, durch die Interaktion mit proteolytischen Faktoren die Ausbreitung von Tumorzellen spezifisch zu verhindern. Dies wäre gegenüber einer konventionellen Chemotherapie von Vorteil, die gegen alle proliferierenden Zellen wirkt und somit weit reichende Nebenwirkungen, wie Leukopenie oder Anämie, hat. Bei einer individuellen, tumorbiologisch orientierten antiproliferativen Therapie hofft man dies umgehen zu können.

Der Vorteil ist einer spezifisch gegen Proteasen gerichteten Therapie ist, dass die inhibierten Komponenten extrazellulär liegen und daher gut zugänglich sind. Da sich die Proteasen z.T. in ihrer Funktion überschneiden, müsste man für eine effektive antiproliferative Therapie mit mehreren dieser Komponenten interagieren (Dano et al. 2005). Hier ist aber aufgrund der physiologischen Funktion der Proteasen auch mit negativen Wirkungen zu rechnen.

1.2.1. uPA/PAI-System

Zentrale proteolytische Faktoren, die den Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) fördern, sind der Urokinasetyp Plasminogen Aktivator (uPA), dessen Inhibitoren PAI-1 und PAI-2, und sein Rezeptor uPAR. Ihre Lage in der Zellmembran und ihre wichtigsten Funktionen sind schematisch in Abb. 1 dargestellt.

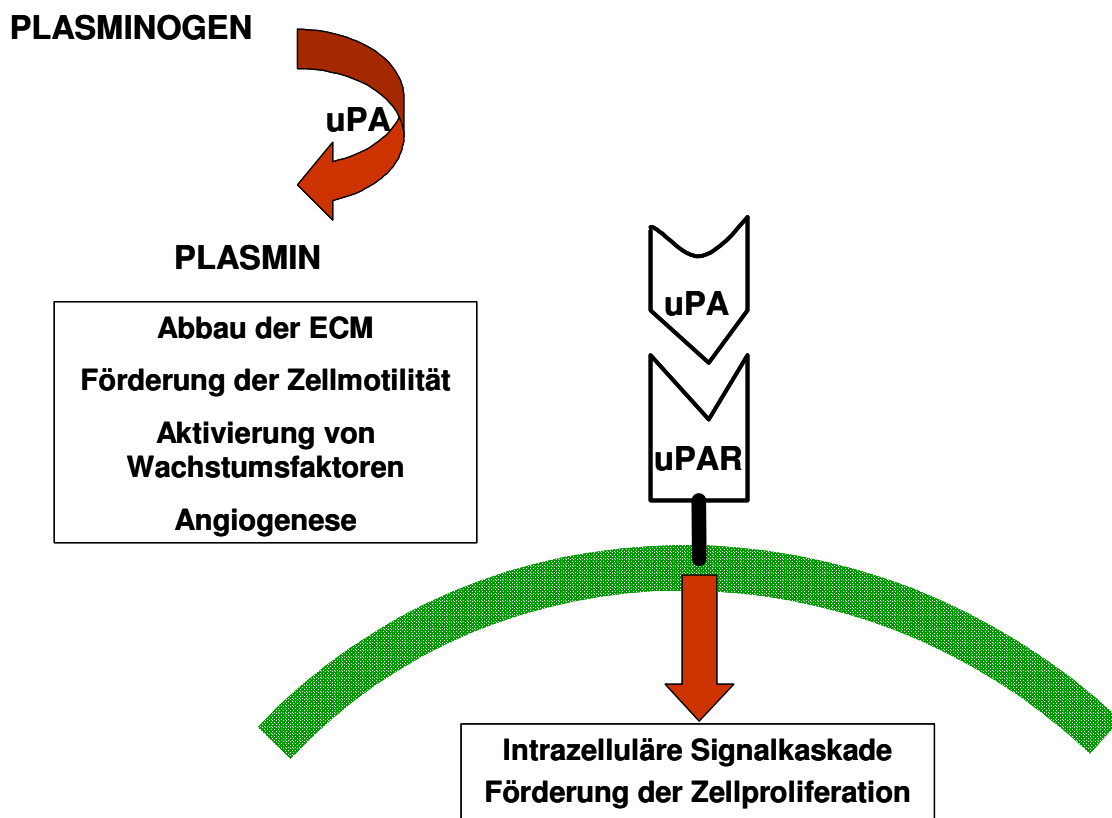


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Urokinase Systems und seiner Funktion.

Durch die Bindung an seinen extrazellulären Rezeptor uPAR (CD87) kann Urokinase Plasminogen zu Plasmin umwandeln. Dies aktiviert intrazelluläre Signalwege mit verschiedenen physiologischen, aber auch pathologischen Auswirkungen.

Die proteolytische Kaskade kann an verschiedenen Stellen gestoppt oder zumindest verlangsamt werden. uPA wird vor allem durch PAI-1, Plasmin vor allem durch α_2 -Antiplasmin inhibiert (Wang et al. 2003, Loskutoff et al. 1999). uPA und tPA (tissue plasminogen activator) werden durch Fibrin und Plasmin aktiviert und überführen ihrerseits

durch limitierte Proteolyse Plasminogen in Plasmin. Während uPA hauptsächlich am Abbau von Gewebe beteiligt ist, spielt tPA eine tragende Rolle bei der Fibrinolyse. Die entstehenden Fibrinogenspaltprodukte hemmen die Thrombinbildung und die Fibrinpolymerisation, sodass einer überschießenden Gerinnung vorgebeugt wird (Löffler et al. 1997).

Diese Trennung zwischen uPA und tPA ist jedoch nicht als strikt anzusehen (Dano et al. 1985). Dass sich die beiden zum Teil ergänzen, konnte an Mausmodellen gezeigt werden, denen diese Gene fehlten (Carmeliet et al. 1994, Bugge et al. 1996).

Urokinase konnte zuerst im Urin von Menschen nachgewiesen werden (Sobel et al. 1952), und man fand anschließend heraus, dass die aktive Form aus zwei Polypeptidketten besteht, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind: eine A- und eine B-Kette (Gunzler et al. 1982). Es werden verschiedene Varianten unterschieden: neben dem zweikettigen *high molecular weight* uPA (HMW-uPA) mit einem Molekulargewicht von 55 kD gibt es auch *low molecular weight* uPA (LMW-uPA), mit einem Molekulargewicht von 33 kD, der aber nicht an uPAR bindet. Die Vorform von uPA ist die enzymatisch inaktive, einkettige pro-uPA. Dieses Zymogen wird durch limitierte Proteolyse zu uPA umgebaut, wozu verschiedene Faktoren in der Lage sind: einerseits Plasmin, aber auch Serinproteasen wie Plasmakallikrein (Ichinose et al. 1986), Gewebekallikreine wie hK4 (Takayama et al. 2001) oder Cysteinproteasen, wie Cathepsin B oder L (Kobayashi et al. 1991, Goretzki et al. 1992). Plasmakallikrein kann als ein weiterer Plasminogenaktivator fungieren, wie bei der Differenzierung von Adipozyten gezeigt wurde (Selvarajan et al. 2001).

uPA wird durch den Urokinase Rezeptor uPAR (CD87) an die Oberfläche von Tumorzellen gebunden. Die Existenz eines zellulären Rezeptors für uPA wurde zuerst von Vassalli et al. (1985) beschrieben. Sie konnten die Bindung von uPA an Monozyten zeigen, die schnell, sättigbar und spezifisch war. Bisher sind nur wenige Zellen bekannt, auf denen uPAR nicht nachgewiesen werden konnte: nichtaktivierte T-Lymphozyten, CD34+ hämatopoetische Stammzellen, und eine embryonale Nierenzelllinie (Montuori et al. 2005).

HMW-uPA und pro-uPA binden an uPAR mit einer hohen Affinität von 0,1-1,0 nM, die Rezeptorbindungsstelle liegt im sogenannten *aminoterminalen Fragment* ATF (Aminosäuren 1-135) (Blasi 1987). Die lineare Bindungsstelle wurde auf die Aminosäuren 19-31 kartiert und umfangreich charakterisiert (Reuning et al. 2003). LMW-uPA besitzt dieses aminoterminal

Fragment nicht und kann daher nicht von uPAR gebunden werden. Das ATF ist katalytisch inaktiv, und an ihm wurden zuerst die Proteolyse-unabhängigen Wirkungen der Komplexbildung von uPA und uPAR untersucht. 1990 wurde aus dem Medium einer Prostatakarzinomzelllinie ein Faktor mit Wachstumsfaktor-ähnlicher Aktivität isoliert und als das ATF identifiziert (Rabbani et al. 1990). Es ist aufgebaut aus einer *kringle domain* und der *growth factor domain* GFD (Appella et al. 1987).

Die Interaktion von uPA und seinem Rezeptor uPAR wird durch die Serpine PAI-1 und PAI-2 (**Ser**inprotease **In**hibitoren) kontrolliert. PAI-1 bindet an den uPA/uPAR-Komplex, und dieser dreiteilige Komplex wird daraufhin über transmembranäre Rezeptoren aus der LDL-Familie (low density lipoprotein) internalisiert. In der Zelle dissoziiert er, und uPA und PAI-1 werden abgebaut. uPAR hingegen wird recycelt und erneut an die Zelloberfläche gebracht (Nykjaer et al. 1997). PAI-2 andererseits bildet auch einen Komplex mit uPA und uPAR, wird dann aber direkt abgebaut.

Viele Funktionen des uPA/uPAR-Systems benötigen transmembranäre Signalwege, da sie nicht direkt über uPAR vermittelt werden können. Der Rezeptor ist über einen GPI-Anker an der Zelloberfläche befestigt und besitzt keinen eigenen transmembranären und cytoplasmatischen Anteil (Blasi et al. 2002). Daher muss er mit extrazellulären Anteilen transmembranärer Proteine agieren, zu denen unter anderem Integrine, der *epithelial growth factor receptor*, Caveolin, fMLP (N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin) Rezeptoren und MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein*) gehören (Ossowski et al. 2000, Degryse et al. 2001). Dieser Vorgang wiederum aktiviert verschiedene Signalkaskaden, wie den *Jak/Stat* (Janus kinase, signal transducer and transcriptional activator) Signalweg, die *focal adhesion kinase* (FAK), die *extracellular signaling regulated kinase* (ERK). Eine Übersicht hierzu findet sich bei Kjoller (2002).

Während früher die Plasminogenaktivierung als Hauptfunktion von uPAR gesehen wurde, ist immer deutlicher geworden, dass er auch ein wichtiger Signal- und Adhäsionsrezeptor ist (Degryse et al. 2005). Dies zeigt sich anhand seiner verschiedenen Liganden: einerseits Vitronektin (VN) (Carriero et al. 1999), andererseits verschiedene Integrine, wie beispielsweise das $\alpha_M\text{-}\beta_2$ Integrin (Pluskota et al. 2003). Durch den Kontakt mit Vitronektin oder durch die laterale Interaktion mit Integrinen fördert uPAR direkt die Zelladhäsion (Wei et al. 1994,

Ossowski et al. 2000) und ist eine wichtige, wenn auch nicht unabdingbare Voraussetzung für die Vitronektin-vermittelte Zellmigration.

Degryse et al. (2005) konnten eine Sequenz in DII von uPAR identifizieren, die an Integrine bindet und so gemeinsam mit Vitronektin chemotaktische Signale auslöst. Eine Variante von uPAR, der diese Sequenz fehlt, zeigt eine verminderte Aktivierung von Vitronektin und Integrinen. Wird diese Sequenz aus DII synthetisch hergestellt und hinzugegeben, kann diese Blockade wieder überwunden werden. Auch Montuori et al. (2002) zeigten, dass Integrine nur am intakten Wildtyp des Rezeptors binden.

Die Bindung von Vitronektin an uPAR findet zwar auch in Abwesenheit von uPA statt, die Affinität von uPAR zu VN wird aber durch gleichzeitige Bindung von uPA an uPAR verstärkt (Wei et al. 1994). Inhibiert wird die Bindung durch PAI-1, da PAI-1 und uPAR an sich überschneidenden Stellen von Vitronektin binden (Deng et al. 1996). Bohuslav et al. (1995) konnten auf menschlichen Monozyten einen Rezeptorkomplex identifizieren, an dem uPAR als einziges GPI-verankertes Protein neben Integrinen und Tyrosinkinasen beteiligt war.

Die chemotaktischen Eigenschaften von uPAR werden durch eine spezifische Sequenz innerhalb des Rezeptors ermöglicht: SRSRY, eine Sequenz zwischen DI und DII, die durch die Bindung von uPA an seinen Rezeptor demaskiert wird. Sie macht aus uPAR einen Liganden für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (FPRL1/LXA4R) mit chemotaktischer Funktion (Fazioli et al. 1997). Dies legt die Vermutung nahe, dass durch den (teilweisen) Abbau von uPAR Fragmente freigelegt werden, die den Austausch zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Integrinen ermöglicht (Gargiulo et al. 2005).

Darüber hinaus bindet uPAR das Kininogen HKa, das durch seine Bindung an Plasmakallikrein wiederum *in vitro* die proteolytische Aktivität von uPA freisetzt (Lin et al. 1997). HKa und Vitronektin konkurrieren um die Bindung an uPAR an den Domänen II und III (Chavakis et al. 2000). Auch das sogenannte "uPAR assoziierte Protein", uPARAP, bildet einen Komplex mit uPAR. Es ist wichtig für die Internalisierung von Kollagen, damit dieses intrazellulär abgebaut werden kann (Behrendt 2004).

Durch die Bindung der oben aufgeführten unterschiedlichen Liganden werden Proliferation, Adhäsion, Migration, Invasion und Angiogenese der Zellen gefördert (Blasi 2002, Harbeck et

al. 2004, Mazziere et al. 2005). Somit ist uPAR nicht nur für die Ausbreitung von Tumorzellen im Körper verantwortlich, sondern stellt über Angiogenese eine ausreichende Gefäßversorgung der Tumorzellen sicher (Mazar et al. 1999). Erstaunlicherweise fördert auch PAI-1 die Angiogenese, wahrscheinlich durch Hemmung der Proteolyse. Das lässt vermuten, dass eine starke Proteolyse den Zusammenschluss von Gefäßzellen verhindert (Bajou et al. 1998).

Die Rolle des uPA-Systems an physiologischen, aber auch pathologischen Prozessen ist in einer großen Anzahl von Untersuchungen gezeigt worden: beispielsweise wird die Expression von uPAR mRNA durch Zerstörung des Zytoskeletts gefördert (Bayraktutan et al. 1995). Beim Herzinfarkt, wobei es zuerst zu einer Ischämie und dann zu einer Entzündung kommt, reguliert uPAR die Monozytenadhäsion (May et al. 2002). Während des Menstruationszyklus ändert sich die Lokalisierung und die Expression des uPA/PAI-Systems in endometrialem Gewebe (Nordengren et al. 2004). Und auch bei der akuten Abstoßung von Transplantatnieren wurden erhöhte uPAR Antigenwerte im Vergleich zu gesunden Probanden gemessen (Roelofs et al. 2003).

Auch in einer Reihe von Tierexperimenten wurde das uPA-System untersucht. Mäuse, die sowohl uPA als auch uPAR überexprimierten, zeigten eine starke Verdickung ihrer Epidermis, und die Differenzierung der Epidermis war gestört. Wurde diesen Mäusen aber das Plasminogen entzogen, zeigte sich ein normaler Phänotyp der Haut (Zhou et al. 2000, Bolon et al. 2004). Allerdings ist es bei uPAR^{-/-} Mäusen nicht vermehrt zu thrombembolischen Ereignissen gekommen (Dewerchin et al. 1996). Auf der Gegenseite ist an diesen Mäusen, denen das uPAR-Gen fehlt, erst relativ wenig zum Wachstum und der Ausbreitung von Tumoren gearbeitet worden (Mazziere et al. 2005).

Tumorzellen, die uPA sezernieren und somit über dessen proteolytische Funktion verfügen, können natürliche Grenzen, wie Basalmembranen und Gefäßwände, überwinden und die ECM abbauen (Sidenius et al. 2003). Die Aktivierung von uPA führt zu einer Reihe von Mechanismen, die die Aggressivität von Tumorzellen erhöhen. Es konnte in vielen Arbeiten gezeigt werden, dass ein hoher Gehalt an Faktoren des uPA Systems eine schlechte Prognose für Patienten mit Tumoren unterschiedlichen Ursprungs bedeutet. Dazu zählen Tumoren aus verschiedenen Organen: Brust, Ovar, Endometrium, Harnblase, Pankreas, Leber, Magen und weitere (Harbeck et al. 2004, Borgfeldt et al. 2003, Tecimer et al. 2001, Casella et al. 2002, Harvey et al. 2003, De Petro et al. 1998, Lee et al. 2004). Für uPAR speziell konnte gezeigt

werden, dass nur das Vorhandensein und die Anzahl uPAR-positiver Mikrometastasen im Knochenmark der Patienten eine prognostischen Aussagen lieferten. Patienten, bei denen zwar Mikrometastasen nachweisbar waren, dieser aber uPAR-negativ waren, hatten eine längere rezidivfreie Zeit (Allgayer et al. 1997).

Interessant ist allerdings, in welchen Zellen des Tumorgewebes die jeweiligen proteolytischen Faktoren nachweisbar sind. Hierzu wurden zahlreiche Untersuchungen an unterschiedlichen Tumorentitäten durchgeführt. Während uPA bei Brustkrebs, wie auch beim Kolonkarzinom, hauptsächlich von Fibroblasten exprimiert wird (Nielsen et al. 2001), findet man es bei Plattenepithelkarzinomen der Haut in den Krebszellen selbst (Sappino et al. 1991). uPAR hingegen lässt sich beim Kolonkarzinom in benignen und malignen Zellen nachweisen (Pyke et al. 1991), bei invasiv-duktalem Brustkrebs in Makrophagen, aber auch in den Tumorzellen selbst (Pyke et al. 1993, Costantini et al. 1996). Die genaue Lokalisation und vor allem deren biologische Bedeutung wird weiterhin diskutiert. Dies legt die Vermutung nahe, dass Tumorzellen die sie umgebenden Stromazellen benutzen, indem sie von deren uPA oder uPAR-Produktion profitieren. Die Rolle der Stromazellen lässt sich mit den gängigen Methoden *in vitro* nur schwierig untersuchen. In einem Mausmodell konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Abwesenheit von uPA in Stromazellen die Metastasierung stark hemmt (Almholt et al. 2005). Dano formuliert es so, dass Krebszellen die Organisatoren und Initiatoren des invasiven Wachstums sind; sie sind aber, um erfolgreich sein zu können, auf Stromazellen angewiesen. Es reicht offensichtlich nicht aus, dass Zellen mutieren und zu Krebszellen werden (Dano et al. 2005). Zusammenfassend sollte man invasives Tumorstadium als ein Umbauprozess ansehen, der außer Kontrolle geraten ist. Dies eröffnet neue Ansatzpunkte, was die Entwicklung einer antiproliferativen Therapie angeht (Johnsen et al. 1998).

Mit dem Hintergrund dieses Wissens werden laufend verschiedene therapeutische Ansätze entwickelt und geprüft, um die Interaktion des uPA/uPAR Systems zu verhindern und dadurch die Ausbreitung der Tumorzellen einzuschränken (D'Alessio et al. 2004, Guo et al. 2002, Guthaus et al. 2002, Romer et al. 2004). Es gibt eine Reihe von methodischen Ansätzen: Crowley et al. (1993) konnten zeigen, dass die Inhibierung von uPAR das metastatische Potential humaner PC3 Prostatakarzinomzellen senkt. Liu et al. (2003) haben ein modifiziertes Anthraxtoxin entwickelt, das spezifisch Tumorzellen schädigt, die uPAR exprimieren. Reuning et al. (2003) beschreiben die Hemmung der uPA/uPAR Interaktion über Peptid-Antagonisten,

und bei Mühlenweg et al. (2001) und Sperl et al. (2001) finden sich Übersichtsarbeiten zur Entwicklung synthetischer Inhibitoren der *active site* von uPA.

1.2.2. Urokinasetyp Plasminogen Aktivator Rezeptor uPAR (CD87)

Der Urokinase Rezeptor uPAR (CD87) ist ein stark glykosyliertes Protein, das über einen Glykolipidanker in der Zelloberfläche verankert ist. Sein Molekulargewicht beträgt zwischen 50 kD und 60 kD, und er wird als Polypeptidkette aus 313 Aminosäuren synthetisiert, die 28 Cysteinreste trägt und sich in drei Domänen unterteilt: DI, DII und DIII. Die Domänen zeichnen sich durch eine homologe Struktur aus, denn durch die identischen Cysteinmuster kommt es zu einer ähnlichen Faltung der Domänen (Roldan et al. 1990, Ploug et al. 1993).

Am sensibelsten für Proteasen, und auch für uPA, ist die Verbindungsstelle zwischen DI und DII. Wird DI enzymatisch abgespalten, kann sie noch immer uPA binden, allerdings mit einer ca. 1000fach niedrigeren Affinität für uPA als der intakte Rezeptor. Die Bindung von uPA wird demnach durch das Vorhandensein von DII und vor allem DIII noch verstärkt (Behrendt et al. 1996, Ploug 2003).

uPAR wird zunächst als eine Polypeptidkette aus 313 Aminosäureresten synthetisiert, an deren aminoterminalen Ende ein Signalpeptid aus 21 Aminosäureresten steht. Posttranslational werden die letzten 30 carboxyterminalen Aminosäurereste abgespalten und der Glykolipidanker an Gly283 angeheftet (Montuori et al. 2005). Es finden sich in den drei Domänen insgesamt 28 Cysteinreste, zwischen denen jeweils Disulfidbrücken entstehen und die den drei Domänen einen ähnlichen Aufbau geben. Dieses Muster von Cysteinresten findet sich häufig bei Proteinen, die einer Superfamilie zugeordnet werden, in der unter anderem Schlangengifte zusammengefasst sind (Ploug 2003). Proteine aus dieser Familie nehmen häufig eine dreifingrige Faltung ein (Llinas et al. 2005), und bei Säugetieren konnten bisher nur uPAR und das Metastasen-assoziierte Protein C4.4 aus dieser Gruppe nachgewiesen werden (Hansen et al. 2004).

Llinas et al. (2005) konnten die Kristallstruktur des Urokinaserezeptors lösen und somit weitere Aufschlüsse darüber erlangen, wo und wie er uPA und seine anderen Liganden bindet und wie er die proteolytische Aktivität von uPA ermöglicht. Die drei Domänen von uPAR stehen so zueinander, dass sich ein Hohlraum zwischen DI und DIII bildet, der nach oben hin weit offen ist. Diese Struktur ist stabil und bewirkt, dass der Rezeptor eine große äußere Oberfläche hat,

an der er weitere Liganden binden kann. Die Wände dieses Hohlraums werden von den β -Faltblättern gebildet und sorgen für viele mögliche Bindungsstellen. Somit könnte dieser Hohlraum auch interessant für die Entwicklung eines uPAR-Antagonisten sein. Die Autoren diskutieren, dass sich die Struktur von uPAR kaum ändert, wenn die *growth factor domain* von uPA an ihn bindet, sodass auch dann noch auf der Außenseite weitere Liganden (wie beispielsweise Vitronektin) binden können.

Die nicht glykosylierte Form von uPAR hat ein Molekulargewicht von 35 kD. Es gibt vier Stellen, an denen uPAR glykosyliert werden kann, und das Ausmaß der Glykosylierung von Domäne I hat starken Einfluss auf die Affinität des Rezeptors zu seinem Liganden uPA (Moller et al. 1993). Es wurden eine Reihe von Glykosylierungsvarianten und verschiedene molekulare Formen des Rezeptorantigens beschrieben und ihre Funktion analysiert (Übersicht bei Luther et al. 2003). In Abb. 2 sind schematisch die Varianten aufgezeigt.

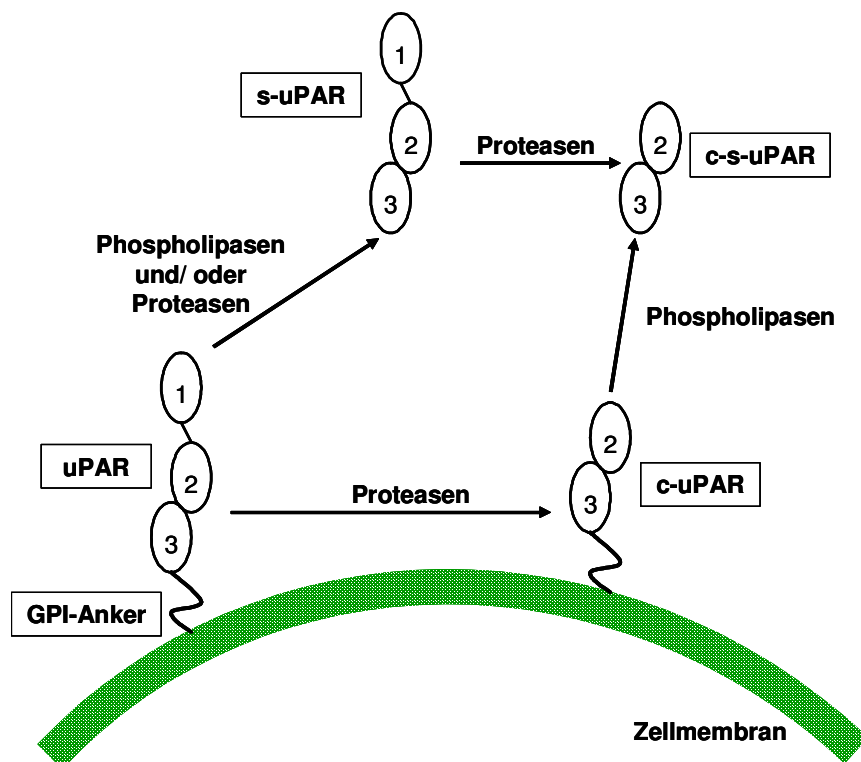


Abbildung 2: Varianten des Urokinase Rezeptors uPAR (CD87).

Durch unterschiedliche Proteasen und Phospholipasen kann uPAR gespalten werden. So entstehen Varianten ohne GPI-Anker, die löslich sind (s-uPAR) oder denen Domäne DI fehlt (c-uPAR). Darüber hinaus existiert ein löslicher Rezeptor ohne DI (c-s-uPAR).

(Abb. modifiziert nach Montuori et al. 2005).

Durch die Abspaltung von DI entsteht die Variante **c-uPAR** (uPAR-DII+III), die weder uPA noch Vitronektin bindet (Mazzieri et al. 2005). Diese Spaltung kann beispielsweise durch Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Cathepsin G, Metalloproteasen, Plasmin und uPA stattfinden (Montuori et al. 2005). Abhängig von der Protease, die die Spaltung durchführt, unterscheiden sich die verbliebenen uPAR-Reste an ihren aminoterminalen Enden. DII+III bleiben über den

GPI-Anker in der Zelloberfläche befestigt. Eventuell ist diese Spaltung von uPAR als ein negativer Rückkopplungsmechanismus zu sehen, der vor allem in normalen Zellen zu beobachten ist und c-uPAR ist somit eine Art Abfallprodukt. Tatsächlich kann c-uPAR häufiger in benignem als in malignem Schilddrüsengewebe nachgewiesen werden (Ragno et al. 1998). Er spielt eine wichtige Rolle in der immunologischen Antwort auf einen Tumor, indem er Entzündungszellen, wie Monozyten und Granulozyten anlockt (Montuori et al. 2002).

Wird der intakte Urokinase Rezeptor durch Phospholipasen, die den GPI-Anker spezifisch erkennen, oder durch proteolytische Spaltung nahe des C-Terminus, von der Zelloberfläche gelöst, entsteht die lösliche Form **s-uPAR** (Wilhelm et al. 1999). Sie existiert als Mono-, Di- oder als Oligomer, jeweils mit unterschiedlicher Bindungsaffinität zu uPA (Shliom et al. 2000). Fehlt auch DI, spricht man von c-s-uPAR. Eventuell wird eine besondere s-uPAR-Form auch durch alternatives Spleissen gebildet (Pyke et al. 1993). s-uPAR wird bei Patienten mit malignen Erkrankungen vermehrt im Plasma oder Aszites nachgewiesen und korreliert mit einer schlechteren Prognose (Andreasen et al. 1997, Pedersen et al. 1993). In einem Mausmodell hingegen reduzierte s-uPAR das Wachstum und das Metastasierungspotential der Brustkrebszelllinie MDA-MB 231 und der Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6#8 (Krüger et al. 2000, Lutz et al. 2001). Als mögliche Erklärung für diesen Widerspruch postulierten Jo et al. (2003), dass der antiproliferative Effekt von s-uPAR davon abhängt, ob das uPA/uPAR-System im Gewebe aktiv ist oder nicht. Davon abhängig kann der ERK Signalweg inhibiert oder aktiviert werden. Eventuell kann der Nachweis von s-uPAR im Aszites oder Plasma auch als relatives Maß dafür verstanden werden, wie hoch die uPAR-Expression insgesamt ist und damit auch die von GPI-uPAR.

Roldan et al. (1990) isolierten und analysierten das uPAR Gen. Es liegt auf Chromosom 19 und besteht aus sieben Exons und sechs Introns unterschiedlicher Länge, die sich auf einer genomischen DNA von über 23 kb Länge verteilen. Exon 1 wird zum großen Teil nicht translatiert, während sein Rest für ein Signalpeptid kodiert. Die Exons 2/3, 4/5 und 6/7 kodieren jeweils für eine Domäne des uPAR Antigens (s. Abb. 3). Posttranslational werden die 30 carboxyterminalen Aminosäurereste abgespalten und der GPI-Anker an der Position Gly283 angefügt (Ploug et al. 1991).

Neben den oben genannten verschiedenen Formen des Rezeptorantigens sind auch Varianten in der mRNA Struktur von uPAR beschrieben worden. Pyke et al. haben bereits 1993 eine uPAR2

mRNA mit einem alternativen Exon 7 beschrieben, welches s-uPAR entspricht. Casey et al. (1994) haben daraufhin eine uPAR Spleissvariante identifiziert, in der das 135 bp lange Exon 5 (uPAR-del5) fehlt, sodass ein Teil von DII verloren geht. Erst kürzlich wurde von Luther et al. (2003) eine weitere Variante ohne die Exons 4 und 5 beschrieben: uPAR-del4/5. Diesem Protein fehlt DII, ohne dass derzeit bekannt ist, welche biologische Funktion es im Vergleich zum Wildtyp hat.

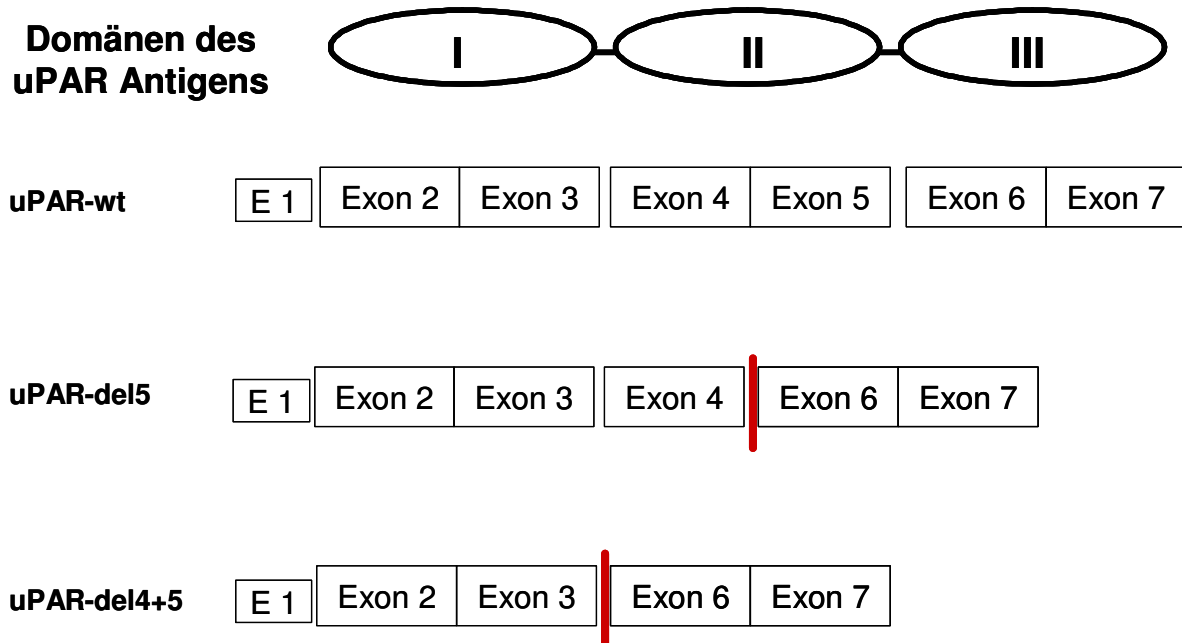


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des uPAR Antigens und der uPAR mRNA Spleissvarianten.

Das uPAR-wt Antigen ist aus drei homologen Domänen (DI-III) aufgebaut. Jeweils zwei Exons kodieren für eine Domäne. Auf mRNA Ebene sind Spleissvarianten bekannt, bei denen entweder Exon 5 (uPAR-del5) oder die Exons 4+5 fehlen (uPAR-del4+5).

Die mRNA Varianten entstehen durch *alternatives Spleissen*, einen häufig vorkommenden Mechanismus zur Transkriptionsregulierung von Genen. Dabei werden einzelne oder mehrere Exons entfernt oder hinzugefügt, sodass neue Exon-/Introngrenzen entstehen, und die ursprüngliche Aminosäuresequenz des Proteins ändert sich. Die Exon-/Introngrenzen in der prä-mRNA werden von Spleissosomen erkannt, Komplexen aus Ribonukleoproteinen. Sie bewirken, dass Exons herausgeschnitten und die neuen Grenzen zusammengefügt werden. Beim Erkennen dieser Grenzen können Fehler entstehen, da es innerhalb der Introns häufig ähnliche Sequenzen gibt. Dies kommt aber nur selten vor, da spezifische Dinukleotide an den Exon-/Introngrenzen und weiter entfernt gelegene Sequenzen identifiziert werden. Es sind auch Proteine bekannt, die das Spleissen inhibieren (ESEs/ISEs) oder verstärken (ESS/ISS). Zu den Inhibitoren gehören hauptsächlich Proteine aus der SR (Serin/Arginin) Familie, während die Verstärker aus der hnRNP-Familie (heterogene nukleäre Ribonukleoproteine) kommen.

Die Gründe für das alternative Spleissen sind kaum bekannt. Es erklärt aber, wie aus dem relativ kleinen Genom des Menschen eine so große Vielfalt an Genen entsteht. Von 60% aller menschlichen Gene ist mindestens eine Spleissvariante beschrieben worden (Black 2003). Durch das Spleissen werden, wie im Fall von uPAR, ganze Domänen hinzugefügt oder entfernt, was weit reichende Auswirkungen auf die biologische Funktion des Proteins haben kann. Die Spleissvarianten eines Gens können als Inhibitoren ihres eigenen Wildtyps agieren, wie es für das Apoptosegen Caspase-9 beschrieben wurde (Wu et al. 2003). Ebenso können aus membranständigen Proteinen lösliche Proteine werden, wie es bei den *fibroblast growth factor* Rezeptoren der Fall ist (Jang 2002). Auch bei den Tumorsuppressorgenen BRCA1 und BRCA2, die für einen Großteil der familiären Brustkrebserkrankungen verantwortlich sind, wurden Spleissvarianten beschrieben. Diese waren z.T. in Tumorgewebe höher exprimiert als in Normalgewebe, und ihre Überexpression war assoziiert mit Hormonrezeptor-negativen Tumoren (Bieche et al. 1999).

Das Ausmaß der Spleissvarianten kann für ein bestimmtes Gewebe, eine Erkrankung oder einen Auslöser spezifisch sein. Es gibt zahlreiche Möglichkeiten des alternativen Spleissens für ein Gen, und vor allem in malignen Tumoren sind sie sehr häufig nachweisbar. Regelmäßig zeigen diese Spleissvarianten ein anderes Expressionsmuster verglichen mit den Wildtypgenen. Dies legt die Vermutung nahe, dass sie als Biomarker für Tumoren eingesetzt werden können (Brinkman 2004, Dong et al. 2003, Magklara et al. 2001).

In einem früheren Projekt unserer Arbeitsgruppe wurde die Expression der uPAR mRNA Variante uPAR-del4/5 in einem repräsentativen Kollektiv von Brustkrebspatientinnen mittels eines quantitativen *real-time* RT-PCR Assays untersucht. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass uPAR-del4/5 sehr häufig in Brustkrebsgewebe exprimiert wird. Des Weiteren war interessanterweise eine höhere uPAR-del4/5 mRNA Expression signifikant mit kürzerem krankheitsfreien Überleben der Patientinnen assoziiert. Dies wurde als Hinweis dafür gewertet, dass die uPAR mRNA Variante uPAR-del4/5 als prognostischer Marker bei Brustkrebs verwendet werden könnte (Luther et al. 2003).

1.3. Zielsetzung des Projektes

Die prognostische Relevanz des uPA-Systems in Bezug auf die Prognose von malignen Erkrankungen generell und Brustkrebs im Besonderen ist immer wieder gezeigt worden. Dieses System ermöglicht es den Tumorzellen durch seine proteolytische Aktivität, sich in andere

Organe abzusiedeln und Metastasen zu bilden. uPA kann erst durch die Bindung an seinen zellulären Rezeptor uPAR seine proteolytische Wirkung entfalten. Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Rolle von uPAR näher zu untersuchen.

Da in der Arbeit von Luther et al. (2003) eine prognostische Relevanz der uPAR mRNA Spleissvariante uPAR-del4/5 bei Brustkrebs beschrieben worden war, sollten diese Untersuchungen fortgeführt werden. Dabei standen die folgenden drei Varianten der uPAR mRNA im Mittelpunkt:

- uPAR-wt
- uPAR-del5
- uPAR-del4/5

Häufig stehen nur geringe Gewebemengen für tumorbiologische Untersuchungen zur Verfügung, da die Erkrankungen dank besserer Vorsorgeuntersuchungen in früheren Stadien erkannt und operiert werden. Aus diesem Grund sollte die uPAR Expression auf mRNA Ebene mittels quantitativer *real-time* RT-PCR untersucht werden. Bei dieser Technik sind nur geringe Mengen an Tumorgewebe erforderlich, man erhält rasch Ergebnisse und die Methode wäre in der Routinearbeit gut anwendbar. Hierzu sollten RT-PCR Assays für den Nachweis von uPAR-wt und uPAR-del5 mRNA etabliert werden, basierend auf LightCycler Technologie. Der Assay zum Nachweis von uPAR-del4/5 mRNA konnte freundlicherweise von Luther et al. übernommen werden.

Die Fragen, bzw. die Aufgaben, die sich für diese Arbeit stellten, waren folgende:

1. Etablierung quantitativer *real-time* RT-PCR Assays für die uPAR mRNA Spleissvarianten uPAR-wt und uPAR-del5;
2. Messung der proteolytischen Parameter in Zelllinien von unterschiedlicher Herkunft und Dignität;
3. Messung der proteolytischen Parameter an Patientenproben und dabei:
 - a. Charakterisierung der Expression, vor allem auch der uPAR Varianten zueinander;
 - b. Korrelation der Expression zu demographischen und klinischen Daten der Patientinnen der Kollektive mit der Frage, ob die Expression der uPAR mRNA eine prognostische Relevanz hat.

2. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

2.1. Patientenkollektive

2.1.1. Proben aus der Tumorbank der Frauenklinik Rechts der Isar, München

Es wurden Proben von 19 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom und 9 Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom aufgearbeitet, die in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde des Klinikums Rechts der Isar (Direktorin: Prof. Dr. M. Kiechle) operiert worden waren. Für diese Tumorbank wird nach der Schnellschnittdiagnostik durch den Pathologen ein Teil des Gewebes in flüssigem Stickstoff asserviert. Die Kühlkette wird bis zu diesem Zeitpunkt eingehalten, um einen Abbau der RNA zu vermeiden. Anhand dieser Proben wurden die RT-PCR Test für uPAR-del5 und uPAR-wt etabliert.

2.1.2. Proben aus der Universitätsklinik Dresden

Durch die Kooperation mit der Klinik für Urologie (Direktor: Prof. Dr. M. Wirth) und dem Institut für Pathologie (Direktor: Prof. Dr. G. Baretton) der Universitätsklinik Dresden stand eine Reihe von Gewebeproben von Mammakarzinomen zur Verfügung. Für die vorliegende Arbeit wurden uns cDNAs zur Verfügung gestellt (Herstellung s. Luther et al. 2003).

2.1.3. Proben aus dem Erasmus Medical Center, Rotterdam, Niederlande

Aus dem Erasmus Medical Center in Rotterdam, Niederlande (Prof. Dr. John Foekens), standen 18 cDNAs von Patientinnen mit primärem Brustkrebs zur Verfügung. Mit diesen Proben sollte die Übereinstimmung von uPAR Antigen (gemessen in Rotterdam) und uPAR mRNA (gemessen in München) überprüft werden.

2.1.4. Proben aus dem Universitätsklinikum Nijmegen, Niederlande

Durch eine Kooperation mit der Abteilung für Chemische Endokrinologie des Universitätsklinikums Nijmegen, Niederlande (Dr. P. Span, Prof. Dr. F. Sweep) standen Proben von zuerst 50 und später noch einmal 280 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom zur Verfügung. Die Operationen fanden zwischen November 1987 und Dezember 1997 in den teilnehmenden Krankenhäusern des *Comprehensive Cancer Center East* in den Niederlanden statt. Die Studie entsprach den nationalen Vorschriften der Niederlande für ethische Angelegenheiten und wurde von dem zuständigen lokalen Ausschuss gebilligt. Das Tumorgewebe stammt von Patientinnen mit unilateralem Mammakarzinom nach erfolgter chirurgischer Resektion des Primärtumors. Patientinnen nach einer neoadjuvanten Behandlung, oder die bereits früher an einem Karzinom oder einem *Carcinoma in situ* erkrankt waren,

wurden von der Studie ausgeschlossen. Weiterhin wurden Patientinnen ausgeschlossen, bei denen innerhalb eines Monats nach der Operation ein Rezidiv auftrat, oder die Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung hatten.

2.2. Zelllinien

2.2.1. Zelllinien aus dem Klinikum Rechts der Isar

Die in den vorliegenden Versuchen verwendeten Zelllinien stammen zum Teil aus der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik, wo sie ständig in Kultur gehalten werden, und zum Teil von Kooperationspartnern am Klinikum Rechts der Isar, München:

PD Dr. Achim Krüger am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung

- MDA-MB 231 BAG (Ursprung: Brustkrebs)

Prof. Dr. Jürgen Schlegel am Institut für Neuropathologie

- G139 (Ursprung: Gehirn) und
- LN 18 (Ursprung: Gehirn)

Aus allen Zelllinien wurde, wie unten beschrieben, die Gesamt-RNA isoliert. Aus den meisten Zelllinien wurde mehrmals RNA isoliert und mehrere cDNAs hergestellt, sodass verschiedene Präparationen verglichen werden konnten.

2.2.2. Zelllinien aus der Klinik für Dermatologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Von der Klinik für Dermatologie Thalkirchner Straße, München (Direktor Prof. Dr. Dr. h.c. G. Plewig) standen uns cDNAs aus drei verschiedenen Zelllinien zur Verfügung. Sie waren alle melanozytären Ursprungs, aber von unterschiedlicher Aggressivität und mit einem anderen Wachstumsmuster. Die Zelllinien wurden in ihrer ursprünglichen Form oder nach Behandlung mit verschiedenen *small interference* RNAs (siRNAs) untersucht.

Die spezifische Inhibierung der Genexpression durch siRNAs findet in der letzten Zeit weitreichende Anwendung in der experimentellen Biologie und bietet eine attraktive Möglichkeit zur Entwicklung von Therapien. Bei Cheng et al. (2003) findet sich eine Übersicht über diese viel versprechende Methode und ihre potentiellen Anwendungsmöglichkeiten.

Im vorliegenden Projekt war die siRNA gegen Exon 4 des uPAR Gens gerichtet und sollte somit alle Varianten herunterregulieren, in denen Exon 4 erhalten ist. Ziel war es zu prüfen, ob

die Expression von uPAR mRNA gehemmt wird, und wenn ja, welche Variante des Gens in welchem Maße. Als Negativkontrolle standen Zelllinien zur Verfügung, die mit ICAM-siRNA behandelt worden waren, und in denen keine Regulation der uPAR mRNA Expression stattfinden sollte (Besch et al. 2002). Folgende Zelllinien wurden verwendet:

- WM 35 (unbehandelt)
- sBcl-2 (unbehandelt)
- 1205 LU
 - unbehandelt
 - Behandlung mit uPAR siRNA
 - Behandlung mit ICAM siRNA (Kontrolle)
 - Behandlung mit PMA
 - Behandlung mit PMA + uPAR siRNA
 - Behandlung mit PMA + ICAM siRNA (Kontrolle)

Die cDNAs wurden mit RT-PCR in einer 1:3 Verdünnung gemessen, jeweils zweimal für die uPAR Varianten und das Housekeeping Gen h-G6PDH.

2.2.3. Zelllinien aus dem Universitätsklinikum Nijmegen, Niederlande

Die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB 231 (abstammend aus Brustkrebs) wurden von der Abteilung für Chemische Endokrinologie des Universitätsklinikums Nijmegen, Niederlande (Dr. F. Sweep und Dr. P. Span) zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinien wurden mit Kobalt behandelt, um eine Hypoxie zu induzieren und die Zellen somit einem Stress auszusetzen:

- MDA-MB 231 Zellen nach Behandlung mit 100 oder 1000 μM Kobalt über 0-24 h
- MCF-4 Zellen nach Behandlung mit 10 oder 100 μM Kobalt über 0-24 h

In den Versuchen des Labors in Nijmegen wurde nach der Behandlung mit Kobalt eine Induktion der Expression des Enzyms Carboanhydrase 9 (CA9), das die Hydratisierung von CO_2 zu Hydrogencarbonat katalysiert, beobachtet. Die Fragestellung war, ob die Hypoxie die Expression der uPAR mRNA verändert.

2.3. Material und Methoden

2.3.1. Tumorgewebe aus der Frauenklinik Rechts der Isar, München

2.3.1.1. Asservierung

In der Frauenklinik Rechts der Isar werden Operationspräparate routinemäßig nach der Schnellschnittdiagnostik in der Pathologie für die Tumorbank des Hauses in flüssigem Stickstoff asserviert, insofern genug Gewebe vorhanden ist. Hierbei wird darauf geachtet, dass das Tumorgewebe von möglichst wenig gesundem Gewebe umgeben ist. Somit kann auf einen sehr großen Pool von gynäkologischen Tumoren verschiedenen Ursprungs zurückgegriffen werden. Das Gewebe wird entweder *en bloc* oder nach mechanischem Aufschluss, also pulverisiert, bei -160°C eingefroren. Durch die Einhaltung der Kühlkette vom Operationssaal bis zum Einfrieren wird ein Abbau der RNA verhindert oder zumindest eingeschränkt. Für die vorliegenden Experimente wurde, wenn nicht anders erwähnt, nicht pulverisiertes Tumorgewebe verwendet.

2.3.1.2. Schneiden der Gewebeproben und Extraktion von RNA

Aus dem Bestand der Tumorbank der Frauenklinik Rechts der Isar wurde aus 20 Mammakarzinomproben und 9 Ovarialkarzinomproben die Gesamt-RNA isoliert. Dazu wurden von dem in flüssigem Stickstoff gelagerten Gewebe unter Einhaltung der Kühlkette (-20°C) jeweils ca. 7 Schnitte angefertigt, mit einer Dicke von 6-8 μm . Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schnitte möglichst einen vergleichbar großen Durchmesser hatten. Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNA High Pure Paraffin Kit (Fa. Roche, Penzberg) isoliert. Wie in diesem Kit empfohlen, wurde das Gewebe über Nacht mit einem "Tissue Lysis Buffer" und Proteinase inkubiert, um es zu zerkleinern und zu homogenisieren. Die Nukleinsäuren binden direkt an die Oberfläche von Glasfasern in den Reaktionsgefäßen. Aufgrund der Interaktion mit Nukleinsäuren, und da die Struktur der Wasserstoffmoleküle zerstört wird, kann diese Reaktion innerhalb von Sekunden stattfinden. Die Bindung funktioniert zwar mit Nukleinsäuren im Allgemeinen, die Bedingungen sind aber für RNA optimiert. Die gebundene RNA wird dann im Laufe mehrerer sehr schneller *wash-and-spin* Schritte gereinigt, um zelluläre Bestandteile aus den Proben zu entfernen. Nach der Elution von der Säule wird eventuell noch vorhandene DNA mit DNase verdaut. Eine weitere Inkubation mit Proteinase verbessert die Qualität der RNA weiter. Am Ende der RNA-Extraktion wird die Gesamt-RNA durch eine schwache Salzelution von den Glasfasern entfernt, wobei eine RNA Präzipitation oder der Einsatz organischer Lösungsmittel nicht nötig ist.

Um den Erfolg der RNA-Isolierung zu testen, wurde die Konzentration der mRNA photometrisch bestimmt. Sie wurde in einer 1:100 Verdünnung im Photometer gemessen, wozu jeweils 1 µl RNA in 99 µl H₂O verdünnt wurde. Das Photometer misst die Lichtabsorption von Molekülen im sichtbaren ultravioletten Spektralbereich. Als Erfolgskontrolle wurde die Konzentration der RNA in µg/ml und der Quotient der Extinktion bei 260 und 280 nm gemessen. Diese Messungen sind nicht absolut zu sehen, da sie sehr nahe an der Nachweisgrenze des Photometers liegen. Dennoch liefern sie einen Anhalt über die Menge der RNA, und die Qualität wurde später durch die Messung des Housekeeping Gens h-G6PDH in der RT-PCR beurteilt. Zu geringe Werte führten zu einem Ausschluss der Probe von weiteren Analysen. Um die RNA zu erhalten und einen Abbau zu vermeiden, wurden die Proben aliquotiert und bei -80°C gelagert.

In einem Teilprojekt wurde RNA von einigen Tumoren sowohl aus Pulver, als auch aus einem Gewebstück isoliert. Ziel war herauszufinden, ob Gewebe nach dem mechanischen Aufschluss für ELISA noch für eine RNA-Präparation benutzt werden kann, oder ob sie zu sehr in Mitleidenschaft gezogen wurde. Der mechanische Aufschluss des Gewebes erfolgte mittels des Dismembrators im Rahmen der routinemäßigen Bestimmung von uPA und PAI-1 Antigen in unserem Labor. Die Gewebstücke wurden wie oben beschrieben aufgearbeitet, von dem Pulver schätzungsweise 20-40 µg mit dem oben beschriebenen Kit.

2.3.1.3. Reverse Transkription der RNA

Das zentrale Dogma der Molekularbiologie fasst die Beziehung zwischen DNA, RNA und Protein zusammen und schildert den Lauf des Informationsflusses, der normalerweise nur in einer Richtung funktioniert, von der DNA zu RNA und von dort zum Protein:

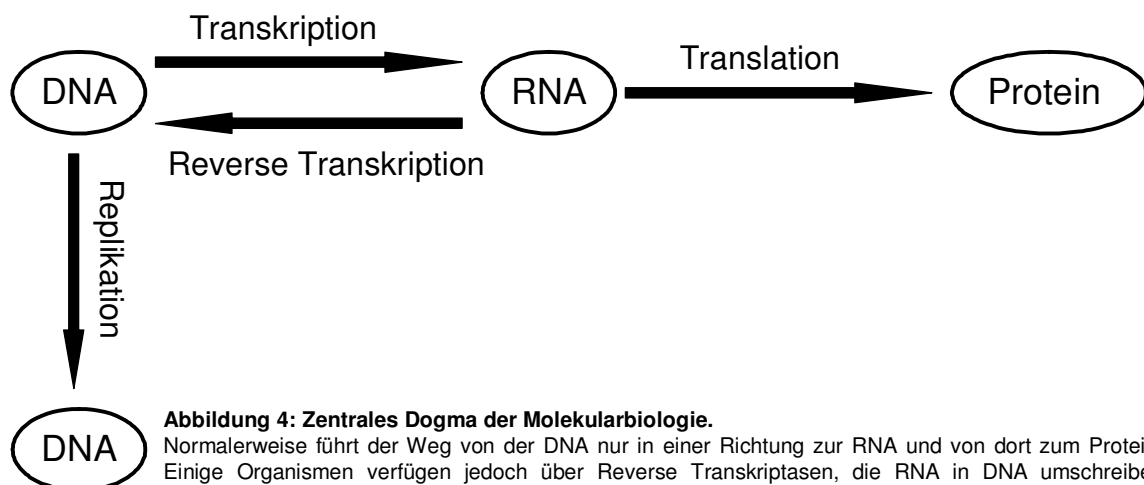


Abbildung 4: Zentrales Dogma der Molekularbiologie.
Normalerweise führt der Weg von der DNA nur in einer Richtung zur RNA und von dort zum Protein. Einige Organismen verfügen jedoch über Reverse Transkriptasen, die RNA in DNA umschreiben können.

Die *Replikation* bezeichnet den Vorgang, der eine Kopie der DNA herstellt. Dies findet während der Zellteilung statt, da hierbei immer der komplette genetische Code an die neue Zelle weitergegeben wird. In der *Transkription* hingegen wird die DNA in RNA umgeschrieben, indem aus der doppelsträngigen DNA eine einzelsträngige RNA entsteht. RNA und DNA unterscheiden sich in drei wesentlichen Punkten voneinander:

1. RNA enthält die Pentose D-Ribose anstelle der für DNA typischen Desoxyribose
2. RNA enthält die Pyrimidinbase Uracil anstelle der für DNA typischen Pyrimidinbase Thymin
3. RNA-Moleküle sind im Vergleich zu DNA wesentlich kürzer

Die für die Transkription notwendigen Enzyme sind DNA-abhängige RNA-Polymerasen, die für die RNA-Herstellung DNA als Matrize benutzen. Anhand dieser neu synthetisierten mRNA werden während der *Translation* die Proteine hergestellt. Die Abfolge von drei Basen (Nukleotiden) kodiert spezifisch für eine Aminosäure. Der Austausch einer oder mehrerer Basen führt somit zur Synthese einer anderen Aminosäure. Dies kann im Protein folgenlos bleiben oder zu einer veränderten Funktion führen.

Es gibt posttranskriptionelle Modifikationen der RNA, wozu unter anderem das sogenannte *Spleissen* gehört, das erst die vollständigen mRNA Moleküle herstellt. In diesem Vorgang werden die nicht kodierenden Sequenzen (= Introns), die häufig sehr groß sind, aus der RNA entfernt, und es bleiben nur die kodierenden Sequenzen (= Exons) übrig. Spleissen beschreibt eine zweifache Umesterung an der Exon-Introngrenze, wodurch die Introns herausfallen und die Enden der Exons neu miteinander verknüpft werden. Die mRNA Moleküle können aber auch durch *alternatives Spleissen* verändert werden. Dies ist die Grundlage der in dieser Arbeit untersuchten Spleissvarianten von uPAR. Durch alternatives Spleissen entstehen neue Varianten eines Gens, wobei der Auslöser für diesen Vorgang meistens nicht auszumachen ist. Es entsteht eine alternative mRNA, deren Translation dann häufig in anderen Proteinen mit einer teilweise stark veränderten Funktion resultiert. So bedeutet beim uPAR Gen die Entfernung der Exons 4 und 5, wie in der mRNA Variante uPAR-del4+5, dass ein Rezeptor entsteht, dem Domäne II komplett fehlt. Bei der Spleissvariante uPAR-del5 fehlt nur Exon 5 und damit nur ein Teil von Domäne II.

Einige Organismen, z.B. Viren, verfügen über eine *reverse Transkriptase*, die in der Lage ist, RNA in DNA umzuschreiben und den Informationsfluss zumindest auf diesem Teilstück umzukehren: es entsteht eine einzelsträngige (*complementary*) cDNA. Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase kann als Matrize RNA- oder DNA-Einzelstränge verwenden. An welcher Stelle die reverse Transkriptase mit der cDNA Synthese beginnt, wird durch die verwendeten Primer festgelegt. In dieser Arbeit wurde ein sogenannter *Random Primer* verwendet. Darunter wird ein Gemisch aus verschiedenen Hexameren verstanden, die „degeneriert“ sind, sodass eine zufällige Transkription erfolgt und nicht nur die von spezifischen Sequenzen.

2.3.1.3.1. Versuchsaufbau der cDNA Synthese

Die cDNA Synthese wurde mit dem AMV First Strand cDNA Synthesis Kit (Fa. Roche, Penzberg) nach untenstehendem Pipettierschema hergestellt, die Reaktionsbedingungen erfolgten nach Anweisung der Hersteller.

Tabelle 1: Pipettierschema der cDNA-Synthese. Die Herstellung der cDNA erfolgte mit dem AMV cDNA Synthesis Kit (Fa. Roche).

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
10fach Puffer**	2 µl	1 fach
dNTP	2 µl	1 µM
MgCl ₂	4 µl	5 µM
Random Primer	2 µl	3,2 µg
RNAse Inhibitor	1 µl	50 Einheiten
AMV Enzym	0,8 µl	> 20 Einheiten
H ₂ O*	von 0 µl bis 3,2 µl	
RNA*	von 5 µl bis 8,2 µl	ca. 1 µg
Gesamtvolumen	20 µl	

* Das Volumen von RNA wurde je nach Konzentration der RNA variiert, sodass immer ca. 1 µg RNA eingesetzt wurde.

** Puffer aus 100 mM Tris; 500 mM KCl; pH 8,32

Nach der photometrischen Messung des RNA-Gehalts in der Probe, wurde je nach Ergebnis mehr oder weniger RNA in die cDNA Synthese eingesetzt. Zur Kontrolle wurde von jeder Tumorprobe ein Reaktionsansatz ohne Primer oder ohne die reverse Transkriptase hergestellt, um eine eventuelle Kontamination durch genomische DNA nachweisen zu können. Dennoch musste bei diesem Versuch immer peinlich genau darauf geachtet werden, dass die Proben sehr sauber, aber auch sehr schnell verarbeitet werden und ständig auf Eis stehen, um einen Abbau oder eine Kontamination mit RNAsen oder genomischer DNA zu vermeiden. Da dieser Schritt in der RT-PCR so empfindlich ist, ist es ratsam, ihn unter den immer gleichen Bedingungen zu machen und auch nicht zu einer anderen reversen Transkriptase zu wechseln.

2.3.2. Tumorgewebe aus anderen Laboren

2.3.2.1. Proben aus dem Universitätsklinikum Dresden

Im Rahmen dieser Kooperation standen cDNAs zur Verfügung. Die RNA Extraktion erfolgte wie bei Luther et al. 2003 beschrieben. Mit diesem Kollektiv wurden die Vorarbeiten von Luther et al. fortgesetzt. Es handelte sich um Gewebe aus Mammakarzinomen, die am Institut für Pathologie an der Universität Dresden untersucht worden waren. An diesem Kollektiv wurde eine Reihe von Kreuztestungen vorgenommen, anhand derer die Stabilität der verwendeten uPAR RT-PCR Assays verglichen werden konnte. Hierzu wurden an 55 cDNAs aus dem Dresdner Kollektiv in München die verschiedenen Parameter gemessen.

2.3.2.2. Proben aus dem Erasmus Medical Center Rotterdam, Niederlande

Von den 18 Proben (2 davon Negativproben) wurden jeweils 5 µg RNA in 40 µl cDNA revers transkribiert und anschließend 20fach verdünnt. In Rotterdam wurde uPAR Antigen aus dem Zytosol mittels ELISA gemessen.

2.3.2.3. Proben aus dem Universitätsklinikum Nijmegen, Niederlande

Ein repräsentativer Teil des Tumors wurde vom Pathologen ausgewählt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und zur Abteilung für Chemische Endokrinologie des Universitätsklinikums Nijmegen zur routinemäßigen Bestimmung der Hormonrezeptoren (Östrogenrezeptor ER, Progesteronrezeptor PgR) gesandt. Der Rezeptorstatus wurde mit einem Ligandenbindungsassay bestimmt (Sweep et al. 2000, Span et al. 2003). Tumorgewebe oder -pulver, das nach dem mechanischen Aufschluss übrig war, wurde in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die vorliegende Arbeit wurde Gewebe je nach Verfügbarkeit aus dieser Tumorbank ausgewählt.

Die gesamte RNA wurde aus ungefähr 20 mg Gewebepulver mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) isoliert und mit DNase-I behandelt, wie beschrieben von Span et al. 2003. Die reverse Transkription wurde mit dem Reverse Transcription System (Promega Benelux BV, Leiden, Niederlande), dem Protokoll entsprechend, hergestellt. Nach der Annealingphase mit Random Primern für 10 min bei 20 °C wurde die cDNA Synthese bei 42°C für 60 min durchgeführt, gefolgt von einer Enzyminaktivierung für 5 min bei 95 °C. Die cDNAs wurden in einer 1:3 Verdünnung aliquotiert.

2.3.3. Zelleexperimente

2.3.3.1. Zellkultur

Folgende Zelllinien wurden in den Experimenten verwendet:

- **OV-MZ-6** Ovarialkarzinom
- **OV-MZ-10** Ovarialkarzinom
- **MDA-MB 231** Brustkrebs
- **MDA-MB 231 BAG** Brustkrebs
- **MDA-MB 435** Brustkrebs
- **MCF-7** Brustkrebs
- **aMCF-7** Brustkrebs
- **LN 18** Hirntumor
- **G139** Hirntumor
- **HaCaT** Keratinozyten

In eigener Kultur wurden OV-MZ-6 #8 Zellen gehalten, die anderen Zelllinien wurden von Kollegen kultiviert und daraus die RNA isoliert. Die Zelllinien wurden bei 37°C in einer mit 5% CO₂ angereicherten und angefeuchteten Atmosphäre kultiviert, in DMEM Medium (Gibco, Karlsruhe), zu dem 10% fetales Kälberserum (Gibco), 1% Penicillin-Streptomycin (Biochrom, Berlin), 1% Arginin-Asparagin (Fa. Sigma, Deisenhofen) und 1% HEPES Puffer, zur pH-Wert Stabilisierung (Gibco), gegeben wurde. In einer T75-Falcon-Flasche (Fa. BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) wurden die Zellen mit 12 ml Medium suspendiert, in einer T25 Flasche in 5 ml Medium. Die Flaschen wurden alle 8-10 Tage gewechselt.

Um die Zellen von den Wänden der Zellkulturflasche zu lösen (*Splitting*), wurde eine entsprechende Lösung hergestellt aus 1 M EDTA (zum Ablösen der Zellen) und PBS (zur Zellkultur, Fa. Dulbecco), im Verhältnis 1:20. Zum Splitten wurden zu einer T25-Flasche 1 ml der Lösung gegeben und zu einer T75-Flasche 2-4 ml, nachdem das Flüssigmedium abgesaugt worden war. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C mit leicht geöffnetem Deckel für 10 min mit der Splittinglösung inkubiert und anschließend durch kräftiges Beklopfen der Flasche von der Oberfläche abgelöst. Die suspendierten Zellen wurden im 15 ml Falcon-Röhrchen für 3-4 min bei 1500 U/min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde mit 3-4 ml Medium gewaschen und durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Von dieser Suspension wurden wiederum 3-4 ml jeweils in frische Flaschen umgefüllt.

Um sie zu zählen, wurden die Zellen erst mit 5 ml PBS gewaschen, was darauf wieder abgesaugt wurde. Sie wurden mit 4 ml Splittinglösung für 10 min inkubiert und die abgelösten Zellen zentrifugiert. Die Splittinglösung wurde abgesaugt und die Zellen in 4 ml Medium resuspendiert und gevortext. 20 ml davon wurden mit 180 ml Medium in ein neues Röhrchen gegeben (Verdünnung 1:10). Von der Suspension wurden jeweils 10 µl in die vier Kammern einer Neubauer-Kammer pipettiert und unter dem Mikroskop ausgezählt. Aus jeweils zwei Werten wurde der Mittelwert gebildet und danach berechnet, welches Volumen auf die Petrischale aufgetragen werden muss, um 1,5 Mio Zellen auszusäen. Bei einer Zell-Verdopplungszeit von etwa 24 h kann man somit nach 48 h von einer Besiedelung mit 6 Mio Zellen ausgehen. Zum Aussäen wurden auf Petrischalen von 10 cm Durchmesser jeweils 5 ml Nährmedium gegeben und dazu die errechnete Menge Zellsuspension zugefügt, gut gemischt und, wie sonst in der Zellkultur auch, im Brutschrank für 48 h inkubiert. Von jeder Zelllinie wurden immer zwei Petrischalen beimpft.

2.3.3.2. Extraktion von RNA

Die Gesamt-RNA wurde mittels Trizol Reagens (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) aus den Zellen extrahiert. Das Prinzip dieses Reagens basiert auf der Methode zur RNA-Isolierung, die von Chomczynski und Sacchi entwickelt worden ist (Chomczynski et al. 1987). Es handelt sich um eine monophasische Lösung, die aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat besteht. Sie kann die Integrität der RNA erhalten, während sie die Zellen zerstört und zelluläre Bestandteile entfernt. Durch die Zugabe von Chloroform wird die Probe während der Zentrifugation in eine wässrige und eine organische Phase aufgetrennt, wobei die RNA ausschließlich in der wässrigen Phase verbleibt. Die Präzipitation der RNA erfolgt durch Isopropanol, die Proteine werden durch nochmaliges Waschen mit Isopropanol aus der organischen Phase entfernt. Dadurch wird RNA gewonnen, die keine Reste von Proteinen oder DNA enthält, welche in der späteren RT-PCR stören würden. Die Methode nimmt nicht viel mehr als eine Stunde in Anspruch, und es können gut mehrere Proben gleichzeitig bearbeitet werden. Die empfohlene Menge an Zellen pro Probe beträgt 10^6 Zellen, sodass die Aussaat der Zellen darauf ausgerichtet sein sollte. Vor der RNA-Extraktion wurden die Petrischalen nach 48 h (jeweils zwei pro Zelllinie) zweimal mit PBS gewaschen, um Rückstände, z.B. des Nährmediums, zu entfernen, und dann die RNA gemäß dem Protokoll isoliert. Das Medium aus den aufgearbeiteten Zellen wurde bei -20°C für spätere ELISA-Messungen eingefroren, um einen Vergleich zwischen uPAR mRNA und Antigengehalt zu ermöglichen.

Die Menge an extrahierter RNA wurde im Photometer gemessen, um die Menge an RNA festzustellen. Bestimmt wurde die Ratio der Absorption bei 280nm und bei 260 nm. Diese Ratio sollte nicht weniger als 1,65 betragen, da ansonsten von einer schlechten Qualität der RNA auszugehen ist. Aus dieser Messung wurde das Volumen RNA errechnet, welches 3 µg RNA entspricht, und auf ein TAE-Agarosegel aufgetragen. Es sollten sich bei intakter RNA verschieden große Banden zeigen, die die unterschiedlichen Anteile der RNA repräsentieren: mRNA, die beiden ribosomalen RNAs bei ca. 5 kb (28S) und ca. 2 kb (18S), und die kleineren RNAs zwischen 0,1 und 0,3 kb (tRNA, 5S). Die RNA wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren oder direkt in cDNA revers transkribiert.

2.3.3.3. Reverse Transkription der RNA

Die cDNA Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Von jeder Probe wurde eine Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase oder ohne Primer hergestellt, um eine mögliche Kontamination durch DNA nachweisen zu können. Die cDNAs wurden bei -20°C gelagert oder direkt in der RT-PCR gemessen.

2.3.3.4. ELISA für uPAR Antigen

In den verschiedenen Zelllinien wurde neben uPAR mRNA auch uPAR Antigen gemessen. Die dazu verwendete Methode ist der "Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay" (= ELISA). Dieser Test beruht auf einer Art Kettenreaktion, bei der die gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten spezifischen Antikörper an eine Trägersubstanz (z.B. Zellulose oder Polysterol) gebunden vorliegen. An die Immunkomplexe, die sich während der Inkubation mit der Probe bilden, lagern sich im nächsten Schritt Antikörper an, die mit einem Enzym markiert sind (sogenannte Sandwichmethode). Durch Zugabe eines chromogenen Substrats zum Reaktionsansatz können die Immunkomplex-gebundenen Enzym-Substrat-Komplexe sichtbar gemacht, bzw. die Antigenkonzentration in der Probe über eine photometrische Bestimmung der Immunkomplex-gebundenen Markerenzyme durch Vergleich mit Standards ermittelt werden.

Es wurden in dieser Arbeit verschiedene ELISA Assays verwendet. Einerseits wurde uPAR beim Kooperationspartner an der Universität Dresden mit dem uPAR IIF10 ELISA nachgewiesen, wie bei Kotzsch et al. (2000) beschrieben. Dort wurde der Proteingehalt mittels des Micro BCA Protein Assay Kit (Fa. Pierce, Rockford, IL) gemessen. Andererseits wurde in München der Imubind Total uPAR ELISA Kit verwendet (Fa. American Diagnostica,

Greenwich, CT). Dieser Assay erkennt sowohl löslichen, nativen und rekombinanten uPAR, als auch uPAR/uPA und uPAR/uPA/PAI-1 Komplexe.

Zur Vorbereitung wurden, wie oben beschrieben, jeweils 2×10^6 Zellen für zwei Tage auf Petrischalen kultiviert und dann geerntet. Sie wurden in Phosphat-gepufferter Salzlösung resuspendiert und durch Zentrifugation ($200 \times g$, 10 min bei Raumtemperatur) sedimentiert. Mittels zwei Einfrier- und Auftauzyklen wurden die Zellen aufgeschlossen, anschließend folgte ein Auflösungsschritt (10 min, pro 10^6 Zellen 100 μ l Puffer mit 0,2% Triton X-100), und die Proben wurden bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die uPAR Antigenlevel wurden, unabhängig vom verwendeten Assay, als ng/mg des Gesamtproteins angegeben. Im American Diagnostica Assay ist der Fängerantikörper ein monoklonaler Mausantikörper, der gegen humanen uPAR gerichtet ist. Nach der Inkubation wird uPAR anschließend durch einen zweiten, biotinierten Antikörper erkannt und gebunden. Durch die Zugabe von Streptavidin-konjugierter „horseradish“ Peroxidase (HRP) wird die Entstehung des Antikörper-Enzym-Erkennungskomplexes vervollständigt. Zu diesem Komplex wird ein Perborat/3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat gegeben, dessen Reaktion mit der HRP die Blaufärbung der Lösung bewirkt. Die Sensitivität des Assays wird durch Zugabe einer Schwefelsäurelösung erhöht, wodurch eine Gelbfärbung der Probe entsteht. Die Gesamt uPAR Antigenlevel werden durch Messung der Extinktion bei 450 nm Wellenlänge bestimmt und mit den Werten einer mitgeführten Standardkurve verglichen.

2.3.4. Reinigung und Fragmentierung der uPAR Plasmide

Folgende uPAR Plasmide wurden für die Etablierung der uPAR RT-PCR Assays verwendet:

- pRcRSV-suPAR delta5 (Länge 5936 bp)
- pRcRSV-suPAR-D1+2+3 (Länge 6070 bp)
- pRcRSV-suPAR-delta4+5 (Länge 5773 bp)

Die Gewinnung der Plasmide pRcRSV-GPI-uPAR-wt (kodierend für uPAR-wt) und pRcRSV-GPI-uPAR del5 sind bereits von Luther et al. (2003) beschrieben worden. Sie wurden in einer „Midi-Prep“ hergestellt und anschließend ihre Konzentration photometrisch bestimmt. Da es sich bei Plasmiden um ringförmige, doppelsträngige DNA handelt, muss dieser Ring gespalten werden, um ein DNA-Fragment integrieren zu können. Dies geschieht mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, die sich durch ihre hohe Spezifität auszeichnen, da sie

doppelsträngige DNA an spezifischen Sequenzen spalten. Diese Sequenzen bestehen aus mindestens vier Basen und zeichnen sich durch eine palindromische Struktur aus: die Basensequenz muss in den beiden Einzelsträngen, jeweils vom 5'-Ende her gelesen, identisch sein. Somit kann das Plasmid an genau vorgegebenen Stellen geöffnet werden und der nicht benötigte Teil des Ringes entfernt werden. Stellvertretend zeigt Abb. 5 die Struktur des Plasmides, das für uPAR-del5 kodiert. Gekennzeichnet sind die Bindungsstellen der Restriktionsenzyme *Hind* III und *Xba* I, die zur Fragmentierung des Plasmides verwendet wurden.

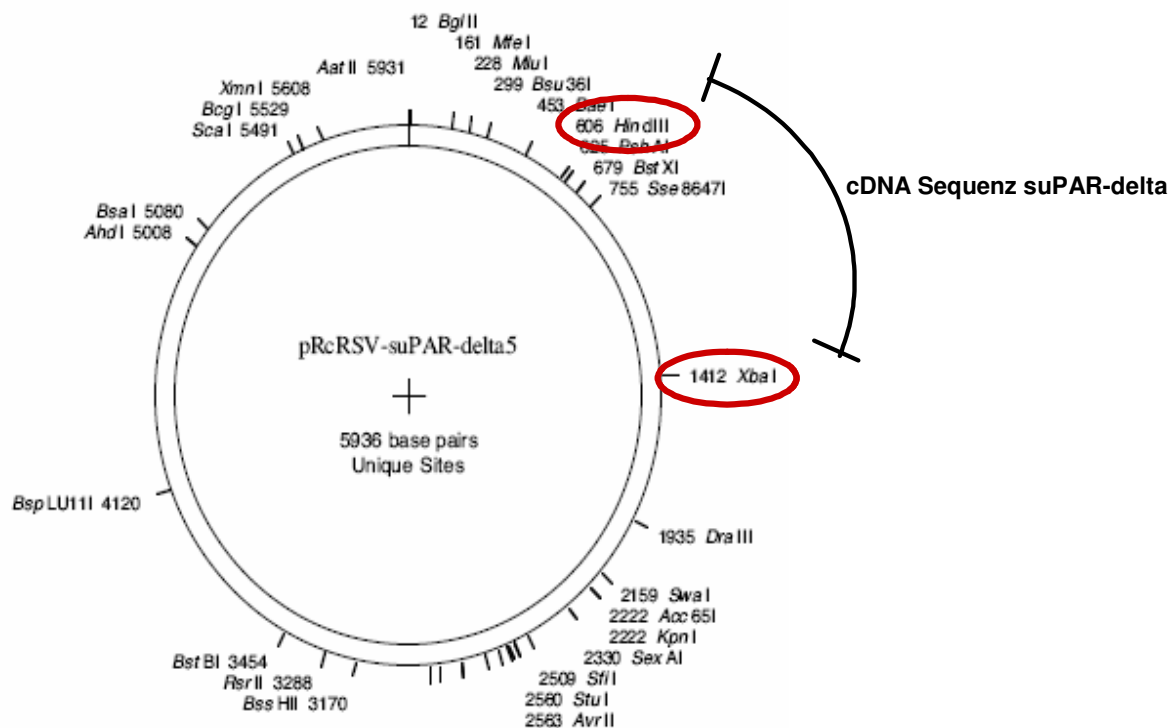


Abbildung 5: Struktur des Plasmides pRcRSV-suPAR-del5.

Mit den Restriktionsenzymen *Hind* III (Pos. 606) und *Xba* I (Pos. 1412) wurde die suPAR-del5 cDNA Sequenz aus dem pRcRSV-suPAR-del5 Plasmid herausgeschnitten. Die Sequenz hat eine Länge von 806 bp.

I. Schritt: Restriktionsverdau

Die Länge des Plasmides pRcRSV-GPI-uPAR-del5 beträgt 5936 bp. Die hier verwendete Konzentration betrug 140 ng/μl. Es wurden 7 μg DNA eingesetzt und mit den Restriktionsenzymen *Hind* III (Spaltungsstelle AAGCTT Position 606, aus *Haemophilus influenzae*) und *Xba* I (Spaltungsstelle TCTAGA Position 1412, aus *Xanthomonas badrii*) (Fa. New England Biolabs, Frankfurt) fragmentiert. Als Puffer wurde Nr. 2 (Fa. NEB) benutzt. Wegen der Empfindlichkeit der Enzyme wurden die Proben auf Eis pipettiert und nach dem Vortexen für 2,5 h bei 37°C inkubiert. Das Pipettierschema ist in Tab. 2 dargestellt:

Tabelle 2: Pipettierschema des Restriktionsverdau. Das suPAR-del5 Plasmid wurde fragmentiert und damit die Standardkapillaren für die RT-PCR beschichtet.

Reagenz	Volumen
DNA	50 µl
H ₂ O	22 µl
Puffer (10fach)	20 µl
Hind III	4 µl
Xba I	4 µl
Gesamtvolumen	200 µl

* Puffer aus 50mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM Dithiothreitol; pH 7,9

II. Schritt: Fällung der DNA mit Ethanol

Zur DNA wurden 1/10 Vol 4M Lithiumchlorid und 2 Vol. Ethanol pA (Fa. Merck, Darmstadt) gegeben und 5 min auf Eis gefällt. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C wurde der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen, für 10 min zentrifugiert und wiederum der Überstand entfernt.

III. Schritt: Gelelektrophorese und Ausschneiden der Banden

Nach dem Trocknen wurde die DNA in 50 µl H₂O gelöst, 40 µl davon mit 10 µl 5fach DNA Beladungspuffer gemischt und auf ein 1% TBE Gel aufgetragen. Die erwartete Fragmentgröße von 806 bp konnte anhand der 100 bp DNA-Leiter ausgemacht werden. Diese Bande wurde mit möglichst knappen Rändern ausgeschnitten und für 20 min in 700 µl 0,3 M Natriumacetat (NaAc) in zwei Plastikgefäßen inkubiert, herausgenommen und bei -20°C eingefroren.

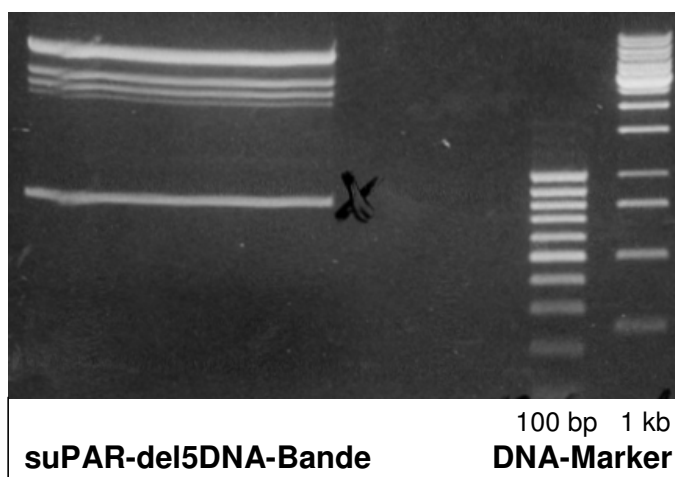


Abbildung 6: DNA-Banden des suPAR-del5 Plasmids nach Restriktionsverdau und Fällung mit Ethanol.

Nach dem Restriktionsverdau wurde das Plasmid mit Ethanol gefällt und anschließend auf ein 1% TBE Gel aufgetragen. Anhand der 100 bp und 1 kb DNA-Leiter wurde die 806 bp lange suPAR-del5 cDNA Sequenz identifiziert und aus dem Gel herausgeschnitten.

IV. Schritt: Freeze Squeeze

Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden jeweils dreimal für 15 min bei 37°C im Wasserbad erwärmt und bei -80°C eingefroren, im Anschluss bei Raumtemperatur aufgetaut und dann für 10 min bei 4°C und 13000 U/min zentrifugiert.

V. Schritt: Phenolchloroformfällung

Durch diesen Schritt wurden die Restriktionsenzyme von ihren Bindungsstellen an den Primern entfernt. Dazu wurde zu dem Eluat das gleiche Volumen Phenolchloroform gegeben (250 µl/Gefäß), gevortext und für 3 min bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur zentrifugiert. Unter dem Abzug wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß umpipettiert und mit 1/50 Vol. 1M MgCl₂ in 10% HAc (4,6 µl) und 3 Vol. Ethanol pA (690 µl) vermischt. Die Proben wurden 15 min bei -20°C gelagert und dann 15 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, 100 µl 70% Ethanol zum Waschen zugegeben und die Gefäße 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert. Der Ethanol wurde entfernt, die Proben über Nacht offen bei Raumtemperatur getrocknet und am folgenden Tag in 10 µl H₂O aufgelöst.

Die gereinigten DNA-Fragmente wurden anschließend zur Firma Roboscreen (Leipzig) geschickt, um damit Glaskapillaren beschichten zu lassen, mit denen die Standardkurven der RT-PCR generiert wurden.

2.3.5. Gelelektrophorese

Das Prinzip der Elektrophorese, mit der Nukleinsäurefragmente aufgeteilt werden, beruht darauf, dass Agarose, ein pflanzliches Polysaccharid, im Gel netzähnliche Strukturen bildet. DNA-Fragmente wandern entlang dieser Strukturen ihrer Größe entsprechend, wenn man sie einem elektrischen Feld aussetzt. Je kleiner sie sind, desto schneller und weiter wandern sie im Gel vom Pluspol zum Minuspol. Die DNA wird durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe wie Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Aufgrund ihrer Eigenschaft, sich an DNA anzulagern, sind diese Farbstoffe kanzerogen und der Kontakt mit ihnen ist zu vermeiden. Durch diese Färbung kann man die Banden unter UV-Licht erkennen und mithilfe von DNA-Markern, die neben den Proben auf das Gel aufgetragen werden, die Größe der Fragmente abschätzen. Diese Marker bestehen aus einem Gemisch von Nukleinsäurefragmenten verschiedener Größe, z.B. von 100 bp bis 1 kb.

Für 40 ml Gel wurden 0,4 g Agarose (Fa. Peqlab, Erlangen) in 32 ml H₂O bidest und 8 ml 5fach TBE (Tris-Borat-EDTA) aufgelöst und unter ständigem Rühren 10 min bei 50°C erhitzt, bis keine festen Bestandteile mehr sichtbar waren. Es wurden 1/1000 Vol. Ethidiumbromid zugegeben und je 40 ml des Gels in die Elektrophoreseplatte gegossen. Nach Erkalten des Gels wurden die Proben mit 5fach Beladungspuffer vermischt und anschließend in die Kammern des Gels pipettiert (jeweils 20 µl). Das Gel wurde in der Elektrophoresekammer mit 5fach TBE (hergestellt aus 109 g Tris, 55,6 g Borsäure und 9,3 g EDTA ad 2 l Endvolumen) bedeckt und konnte bei 100 Volt laufen, so lange es sich nicht zu stark erhitzte oder schmolz. Nach 40 – 45 min war die Auftrennung fertig.

2.3.6. Etablierung von quantitativen *real-time* RT-PCR Assays für uPAR-del5 und uPAR-wt mRNA

Zum spezifischen und sensitiven Nachweis der Urokinase Rezeptor (uPAR) mRNA wurden zwei verschiedene quantitative RT-PCR Assays entwickelt, basierend auf LightCycler Technologie.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR), die in dieser Arbeit vornehmlich angewandte Methode, war eine der großen Entwicklungen in der Molekularbiologie im 20. Jahrhundert, die zuerst von Kary Mullis beschrieben wurde, der dafür 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt (Saiki et al. 1985). Es ist eine Methode zur *in vitro* Amplifizierung von Nukleinsäurefragmenten, die ungewöhnlich einfach durchzuführen ist und ohne die Verwendung von Zellen zur Amplifizierung von DNA auskommt. Mithilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase, z.B. der Taq-Polymerase, die aus dem Organismus *Thermus aquaticus* stammt, und Primern, also Nukleinsäuren von ca. 20 bp Länge, können Fragmente spezifisch amplifiziert werden. Eine PCR besteht immer aus den folgenden drei Schritten:

- a. *Denaturierung* des DNA-Stranges
- b. Anheften der Oligonukleotide an die Einzelstränge (= *Annealing*)
- c. *Extension* zu neuen Doppelsträngen

In der RT-PCR (Reverse Transkription) wird in einem, der eigentlichen PCR vorangestellten Schritt, RNA in komplementäre DNA (complementary, = cDNA) umgeschrieben. Dies bedeutet, dass nicht primär DNA aus Gewebe isoliert und in der PCR amplifiziert wird, sondern RNA isoliert wird und somit die Expression eines Genes nachgewiesen wird. Das

bedeutet allerdings, dass man mit der sehr viel empfindlicheren (gegenüber RNAsen) und instabileren RNA arbeitet und während aller Schritte eine Kontamination durch genomische DNA vermeiden muss, um nicht falsch positive oder zu hohe Ergebnisse zu erhalten.

Man unterscheidet eine qualitative und eine quantitative PCR. Bei der qualitativen PCR geht es darum, die Existenz eines Gens in einer Probe nachzuweisen, z.B. gentechnologisch veränderte Organismen (GVOs) in Lebensmitteln oder Viren in Patientenproben. Bei der quantitativen PCR liegt der Schwerpunkt hingegen darin, die Menge an dem zu untersuchenden Gen festzustellen. Dies kann auch beim Nachweis von Virus-DNA wichtig sein, um die Viruslast eines Patienten zu bestimmen. Des Weiteren ist die Methode aber auch dazu geeignet, wie in der vorliegenden Untersuchung, die Stärke der Expression eines Genes zu untersuchen. Im Idealfall kann man durch den Vergleich von mRNA Werten und Antigengehalt eines Genes Rückschlüsse auf die posttranskriptionelle Regulierung ziehen. Vor der Entwicklung der quantitativen PCR war dies nur möglich, indem die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen wurden und die sichtbare Bande mit der eines Housekeeping Gens verglichen wurde. Dies führt aber zu ungenauen, bzw. subjektiven Ergebnissen.

In den vergangenen Jahren wurden in der PCR viele neue Erkenntnisse gewonnen und die Methode weiter verfeinert, als sogenannte *real-time* RT-PCR. Diese Variante stellt eine quantitative RT-PCR dar, in der außer den Primern zusätzlich fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide (= *Hybridization Probes* oder Sonden) verwendet werden, die zwischen den Primern auf dem zu untersuchenden Gen liegen. Es gibt hier verschiedene methodische Möglichkeiten, aber im LightCycler werden zwei dieser Sonden eingesetzt. Eine der Sonden ist am 5'Ende mit dem LightCycler Farbstoff LC-Red 640 markiert und am 3'Ende phosphoryliert, um eine Verlängerung zu vermeiden. Die zweite Sonde ist am 3'Ende mit Fluoreszin markiert. Sie werden so gewählt, dass sie mit einer Distanz von 2-5 bp auf dem DNA-Strang des Zielgens binden. Kommt es während der Amplifikation zu dieser räumlichen Nähe, entsteht ein Energietransfer (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET) zwischen den beiden Farbstoffen. Während des FRET wird Fluoreszin, der Geberfarbstoff, von der Lichtquelle des LightCyclers angeregt, und ein Teil dieser Anregung wird zum Empfängerfarbstoff transferiert. Das Maß an Fluoreszenz, das vom zweiten Farbstoff wiederum abgegeben wird, kann vom Gerät detektiert werden und bestimmt die Stärke des Signals. Das Signal ist somit proportional zur Ausgangsmenge des untersuchten Genes. Es handelt sich hier

demnach nicht um eine Endpunktanalyse wie bei der herkömmlichen PCR, sondern vielmehr wird der dynamische Prozess der RT-PCR bereits während des Versuches ausgewertet.

Der Zyklus, in dem zum ersten Mal ein Signal detektiert wird, das sich deutlich von dem Hintergrundrauschen abhebt, ist der *Crossing Point* und wird als Zykluszahl angegeben. Dieser ist wichtig für die computergestützte Auswertung der PCR und die Berechnung der Ausgangsmenge des gesuchten Gens. Zu diesem Zweck muss eine Standardkurve für jeden Lauf generiert werden. Hierzu werden häufig Verdünnungen der zu untersuchenden DNA benutzt, die aber den Nachteil haben, dass sie nicht lange stabil sind, und die Verdünnung von Hand nur begrenzt genau ist. Bei einem Nachweis sehr hoch exprimierter Gene ist dies nicht so relevant wie bei sehr geringen Molekülmengen, wie es auch bei uPAR und seinen Varianten der Fall ist.

Aus diesem Grund wurden als Standards LightCycler Glaskapillaren benutzt, die von der Firma Roboscreen mit genau definierten Mengen an uPAR-Fragment beschichtet wurden. Die Konzentration des Plasmids wurde dort mittels DHPLC (*denaturing high-performance liquid chromatography*) genau bestimmt und die Kapillaren mit den Konzentrationen 10 (jeweils 2fach), 50 (jeweils 2fach), 100, 1000, 10000 und 100000 Kopien mittels eines Pipettierroboters beschichtet. Diese 8 Kapillaren waren in jedem RT-PCR Lauf enthalten und ermöglichten es, verlässliche Standardkurven zu generieren. Des Weiteren konnten die beschichteten Kapillaren problemlos bei -20°C gelagert werden.

Nach der Etablierung konnten mit dieser Methode sehr schnell (pro Lauf 45-60 Minuten), spezifisch (durch Verwendung der Primer und Sonden) und sensitiv (theoretisch ein einziges Ausgangsmolekül messbar) die mRNA von uPAR und ihre Spleissvarianten nachgewiesen werden.

2.3.6.1. Design der Primer und Sonden

Als Vorlage zur Auswahl der Primer und Sonden dienten RT-PCR Assays für die uPAR Varianten uPAR-del4+5 und uPAR-FL, wie von Luther et al. 2003 beschrieben.

Die Primer und Sonden wurden von der Firma TibMolBiol (Berlin) bezogen und hatten die in Tab. 3 wiedergegebenen Sequenzen:

Tabelle 3: Bezeichnungen und Sequenzen der benutzten RT-PCR Primer und Hybridization Probes im uPAR Gen. Die Primer wurden so ausgesucht, dass für alle Versuche derselbe Vorwärtsprimer verwendet werden konnte. Die Rückwärtsprimer haben sichergestellt, dass nur die jeweils gesuchte uPAR mRNA Variante spezifisch nachgewiesen wurde.

	RT-PCR Assay		
	uPAR-wt	uPAR-del5	uPAR-del4+5*
Amplikonlänge	376 bp	372 bp	195 bp
Vorwärtsprimer	ex2 F	ex2 F GACCTCTGCAGGACCACGAT	ex2 F
Rückwärtsprimer	ex5 A GGTGGCGGTCATCCTTTG	x6,4 R CAGATTTTCAAGCTCCAGGACTT	x6,3 R TTTCAAGCTCCAGGACAGAGTT
Sonde I	FL	FL GGTACAGCTTTTCTCCACCAGCTCCA	FL
Sonde II	LC	LC CTCTTCTCCTTCTTCCCACAAGCG	LC

Es konnten die von Luther et al. beschriebenen Sonden benutzt werden, da sie mit ihrer Lage in Exon 2-3 (uPAR LC) und Exon 3 (uPAR FL) auch für den Nachweis von uPAR-del5 und uPAR-wt mRNA geeignet waren. Als Vorwärts-Primer wurde in beiden Assays der bereits beschriebene uPAR Ex 2F in Exon 2 verwendet, der ebenso für alle Varianten brauchbar war. Für die Amplifikation von uPAR-del5 wurde ein Primer gewählt, der auf Grenze zwischen den Exons 4 und 6 liegt (uPAR Ex 6,4R), die durch das alternative Spleissen neu entsteht. Das Amplifikationsprodukt hat eine Länge von 372 bp. Auf dieselbe Weise wurde auch der Primer für uPAR-del4+5 (Ex 6,3R) ausgesucht. Um alleinig die uPAR-wt mRNA nachzuweisen, nicht aber die Spleissvarianten, wurde ein Primer in Exon 5 gewählt, das sowohl in der uPAR-del5, als auch -del4+5 Variante fehlt. Somit sollte eine Amplifikation dieser Varianten ausgeschlossen werden und es entsteht ein Produkt von 376 bp Länge.

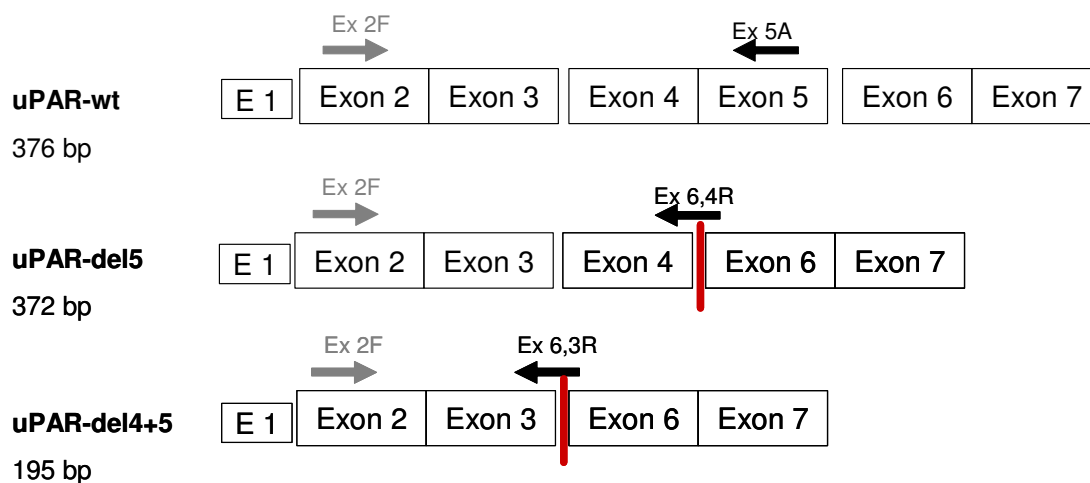


Abbildung 7: Lage der RT-PCR Primer im uPAR Gen.

Für alle uPAR mRNA Varianten wurde derselbe Vorwärtsprimer Ex 2F benutzt. Zur Amplifikation von uPAR-wt wurde ein Rückwärtsprimer in Exon 5 gewählt, das in den Spleissvarianten fehlt. Für die Spleissvarianten wurden Primer auf den neu entstandenen Grenzen zwischen Exons 4+6 (uPAR-del5) und 3+6 (uPAR-del4+5) gewählt um eine optimale Spezifität zu erreichen.

Die ausgewählten RT-PCR Primer wurden zuerst in einer konventionellen PCR an uPAR Plasmiden getestet. Die Frage war, ob ein auf dem Agarosegel sichtbares Produkt entsteht und ob es die erwartete Größe hat. Dazu wurde das pRcRSV-GPI-uPAR-del5 Plasmid mit einer Konzentration von initial 0,14 ng/µl 1:500 verdünnt, sodass es in einer Konzentration von 1,4 pg/5µl vorlag, und das pRcRSV-suPAR-D1+2+3 Plasmid in einer Konzentration von 1,3 pg/5µl (Konzentration pRcRSV-suPAR-delta4+5: 1,6 pg/5µl). Die verschiedenen Primerpaare wurden an Plasmiden und cDNAs aus Varianten der Zelllinie OV-MZ-6 #8, bzw. aus Mammatumoren der Frauenklinik getestet.

Tabelle 4: Pipettierschema der konventionellen PCR im Thermocycler. Mit diesen PCRs wurden die neuen Primer getestet und die sichtbaren Banden isoliert und sequenziert.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
10fach Puffer	2,5 µl	1 fach
dNTP	1,25 µl	1 µM
MgCl ₂	2 µl	2 µM
Polymerase	0,15 µl	
H ₂ O	12,1 µl	
Primer I: ex2F	1 µl	2 µM
Primer II*	1 µl	2 µM
Template	5 µl	
Gesamtvolumen	25 µl	

*Primer II: ex5A oder ex6,3R

Die PCR (Pipettierschema s. Tab. 4) erfolgte mit der folgenden Temperatureinstellung: initial 5 min bei 94°C, gefolgt von 32 Zyklen à 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 57°C und 1 min bei 72°C, gefolgt von 8 min bei 72°C und einer Abkühlung auf 4°C. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1% TAE-Agarosegel aufgetragen, zusammen mit einem 100 bp-Marker. Anschließend wurden die Reaktionsbedingungen optimiert, wobei hierbei auch wieder auf die von Luther et al. beschriebenen Assays zurückgegriffen wurde. Sowohl die MgCl₂-Konzentration als auch die Annealingtemperatur wurden angepasst.

2.3.6.2. Versuchsaufbau der quantitativen *real-time* RT-PCR

Es besteht die Möglichkeit, die RT-PCR in zwei Schritten (*two-step*) oder in einem Schritt (*one-step*) durchzuführen. Hier wurde die *two-step* RT-PCR gewählt, d.h. die reverse Transkription fand getrennt von der eigentlichen PCR statt. Der Vorteil der *one-step* RT-PCR, ihre Schnelligkeit, wird durch den Nachteil, dass die verschiedenen Gene in unterschiedlichen Probenansätzen gemessen werden müssen, aufgehoben. Die erhöhte Gefahr einer

Kontamination der Proben muss durch sehr sauberes Arbeiten während der reversen Transkription und der RT-PCR vermieden werden.

Das Pipettieren des Master Mixes wurde im Cooling Block des LightCyclers durchgeführt, sodass die Reagenzien immer bei 4°C gelagert wurden. Für alle RT-PCRs wurde der FastStart DNA Master Hybridization Kit (Fa. Roche) verwendet. Aufgrund der Verwendung einer Taq-Polymerase, die erst durch den Prä-Denaturierungsschritt vor der eigentlichen PCR aktiviert wird, wurde vermieden, dass die Amplifizierung bereits während der Vorbereitungsphase beginnt und unspezifische Produkte die Proben verunreinigen. Diese Taq-Polymerase ist bei Raumtemperatur inaktiv, da sie an einigen Aminosäureresten hitzelabile Hemmgruppen besitzt, die durch die initiale Inkubation bei 95°C abgespalten werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung dieser speziellen Polymerase die Sensitivität und Spezifität der PCR signifikant erhöht (Chou et al. 1992, Kellogg et al. 1994).

Der Master Mix wurde nach untenstehendem Schema hergestellt und als erstes, vor den Proben, in die Reaktionsgefäße pipettiert, um eine Verschleppung von DNA zu vermeiden. Anschließend wurden die Proben, bzw. H₂O als Negativkontrolle, zum Master Mix pipettiert und die Kapillaren mit den Plastikdeckeln luftdicht verschlossen. Nach 1 min Zentrifugation bei 800 U/min wurden die Reaktionsgefäße in das LightCycler Gerät gestellt und der Lauf gestartet. Die Protokolle der einzelnen RT-PCRs sind in Tab. 5 dargestellt.

An jedem Arbeitstag wurde mindestens einmal der Selbsttest des Gerätes durchgeführt, um eine reibungslose Funktion zu gewährleisten. Die Proben wurden nach Beendigung der PCR bei 4°C gelagert und Stichproben auf ein Agarosegel aufgetragen. Für jeden Lauf mit 32 Plätzen wurde eine Standardkurve mit acht Standardkapillaren von 10 bis 100000 Kopien (Fa. Roboscreen, Leipzig) generiert. Ebenso wurde in jedem Lauf als Negativkontrolle eine Probe mit Wasser als Template eingeschlossen. In der Regel wurden die Proben mindestens zweimal in zwei voneinander unabhängigen PCR-Läufen gemessen, bei einer zu großen Abweichung dieser Werte aber auch noch ein drittes oder viertes Mal.

Tabelle 5: Protokolle der verschiedenen uPAR RT-PCR Assays mit LightCycler Technologie. Die Annealingzeiten und -temperaturen wurden den Primern angepasst.

	RT-PCR Assay		
	uPAR-wt	uPAR-del5	h-G6PDH*
Gesamtvolumen (µl)	20	20	20
Master Mix (µl)	18	18	15
Primer I 10 mM	1,2	1,2	
Primer II 10 mM	1,2	1,2	2,
Sonde I 5mM	0,8	0,8	Detection Mix
Sonde II 5mM	0,8	0,8	
MgCl ₂ 25mM (µl)	1,6	1,6	2,4
H ₂ O	10,4	10,4	8,6
Reagenzienmix	2	2	2
Template (µl)	2	2	5
Anzahl PCR-Zyklen	45	45	45
Temperaturen (°C)/ Zeit (s)			
Prä-Denaturierung	jeweils 10 min bei 95°C		
Denaturierung	95/10	95/ 10	95/ 10
Annealing	15/ 66	15/ 66	55/ 15
Extension	72/ 15	72/ 15	72/15

* wie beschrieben von Luther et al. 2003

2.3.6.3. Auswertung im LightCycler

Bei der Software des LightCyclers stehen zwei verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, die Rohdaten auszuwerten. Entweder legt der Computer im „Second Derivative Maximum“ Modus die Standardkurve fest, oder sie wird vom Anwender bestimmt („Fit Points“ Modus). Beide Methoden haben Vor- und Nachteile, aber in dieser Arbeit wurde vorwiegend der „Fit Points“ Modus angewendet. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Punkte der Standardkurven ähnliche *Crossing Points* haben, um die Werte verschiedener Läufe miteinander vergleichen zu können. Des Weiteren wurden Standards nur dann aus der Auswertung genommen, wenn die Werte extrem von der Standardkurve abwichen.

2.3.6.4. Kontrolle im Agarosegel

Als Qualitätskontrolle wurden die Produkte aus der RT-PCR in regelmäßigen Abständen auf ein Agarosegel aufgetragen. So konnte überprüft werden, ob wirklich nur eine Bande in der erwarteten Größe zu sehen war. Dies war nicht durchgehend bei allen Proben nötig, weil durch die Verwendung spezifischer Primer und vor allem der *Hybridization Probes* ein falsch positives Signal in der RT-PCR annähernd ausgeschlossen werden kann. Die Sonden senden nur ein Signal aus, wenn sie an die gesuchte Sequenz binden. Dies wäre anders bei der Verwendung von SYBR Green, einem Farbstoff, der sich ähnlich wie Ethidiumbromid an jegliche Art von doppelsträngiger DNA anlagert.

2.3.6.5. Sequenzierung von PCR-Produkten

Durch die Verwendung spezifischer Primer und Sonden, die gegen verschiedenen Exons gerichtet sind, wird das Risiko, in einer RT-PCR genomische DNA zu vervielfältigen und dadurch falsch positive Ergebnisse zu erhalten, sehr eingeschränkt. Dennoch ist es nötig, die Produkte einer neu entwickelten PCR zu isolieren und sequenzieren zu lassen.

Dazu wurden die Glaskapillaren aus jeweils einem PCR-Lauf für uPAR-del5 und uPAR-wt zentrifugiert und somit die PCR-Produkte in Eppendorfröhrchen überführt. 40 µl wurden mit 10 µl H₂O vermischt und auf ein 2% Agarosegel aufgetragen. Die Banden in der entsprechenden Größe (uPAR-del5 372 bp und uPAR-wt 376 bp) wurden knapp aus dem Gel herausgeschnitten und abgewogen, wie beschrieben im Protokoll des Nucleo Spin Extract Kits (Fa. Macherey-Nagel, Düren).

uPAR-del5	300 µg Gel, d.h. 900 µl NT1 Puffer
uPAR-wt	270 µg Gel, d.h. 810 µl NT1 Puffer

Die Proben wurden für 10 min bei 50°C inkubiert und 2-3 min gevortext. Eine Trennsäule wurde in ein Eppendorfröhrchen getan und mit den Proben beladen. Danach wurden sie bei 8 x g für 1min zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Es wurden 600 µl NT3 Puffer zugegeben und die Proben 1 min bei 11 x g zentrifugiert, der Durchlauf wiederum verworfen. Der letzte Schritt wurde mit 200 µl NT3 Puffer wiederholt und dann die Proben bei 70°C für 3 min getrocknet. Die Trennsäule wurde ein neues Röhrchen gestellt und die Proben mit 50 µl Elution Buffer 3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 1 min bei 11 x g wurden jeweils 10 µl der gereinigten DNA zur Kontrolle auf ein 2% Agarosegel aufgetragen. Die restlichen 40 µl wurden zur Sequenzierung geschickt (Fa. Medigenomix, Martinsried).

2.3.7. Normalisierung der Daten gegen ein Housekeeping Gen

Die absoluten Molekülzahlen, die man mit der quantitativen RT-PCR erhält, müssen gegen ein sogenanntes Housekeeping Gen normalisiert werden. Dies ist nötig, da unmöglich ist, immer dieselbe Menge an Gesamt-RNA aus einer Probe zu isolieren, auch nicht unter standardisierten Bedingungen. Somit kann man nur mit den absoluten Werten für das Zielgen noch keine Aussage über die Expression treffen, sondern erst, wenn die Daten normalisiert wurden, indem die Ratio von Zielgen und Housekeeping Gen gebildet wurde. Housekeeping Gene kodieren für

Proteine, die für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion nötig sind und sollen nur einer begrenzten Regulation unterliegen. Die Diskussion, ob dies prinzipiell bei irgendeiner Art von Genen der Fall sein kann, wird weiterhin geführt (Tricarico et al. 2002). Für die Arbeit mit Mammakarzinomen werden unterschiedliche Housekeeping Gene empfohlen (Thellin et al. 1999, Revillion et al. 2000). Ohne eine Normalisierung der Daten gegen ein Housekeeping Gen könnte man aber keine Aussage über die Intaktheit der RNA, bzw. cDNA treffen, und die Molekülzahlen wären ohne Relevanz. Bei einer ineffektiven cDNA Synthese ist mit niedrigeren Werten für Ziel- und Housekeeping Gen zu rechnen, die sich in der errechneten Ratio aus beiden aber nicht mehr darstellen sollte.

2.3.7.1. Housekeeping Gen h-G6PDH

In dieser Arbeit wurde das h-G6PDH (humane Glucose-6-phosphat-dehydrogenase) verwendet, ein Enzym aus dem Pentosephosphatzyklus. Es katalysiert die Oxidation von Glucose-6-phosphat am C-Atom 1 zu 6-Phosphogluconolacton. Bei diesem Prozess entsteht $\text{NADPH} + \text{H}^+$.

Zur Quantifizierung von h-G6PDH wurde das h-G6PDH Housekeeping Gene Set (Fa. Roche) benutzt, entsprechend dem Protokoll der Hersteller. Die Primer und Sonden sind in einem Detection Mix enthalten, der zum Master Mix gegeben wird. Das resultierende Amplifikationsprodukt hat eine Größe von 123 bp. Zur Generierung der Standardkurve sind in diesem Set fünf Proben mit einer genau festgelegten Menge an h-G6PDH mRNA enthalten, die mit Random Primer revers transkribiert werden. So kann eine Standardkurve generiert werden, die Messpunkte bei 500, 5000, 50000, 500000 und 5 Mio Molekülen hat. Die relativen Expressionslevel der uPAR mRNA wurden errechnet, indem die absoluten uPAR Werte durch die absoluten h-G6PDH Werte geteilt wurden. Um nicht mit sehr kleinen Zahlen und vielen Dezimalen rechnen zu müssen, wurden diese Rationes mit dem Faktor 1000 multipliziert.

2.3.8. Statistische Auswertung

Die Berechnung der uPAR mRNA Expression wurde, wenn nicht anders beschrieben, gegen das Housekeeping Gen h-G6PDH normalisiert. Sowohl die uPAR, als auch die h-G6PDH Daten wurden mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor der Proben multipliziert, um eine bessere Vergleichbarkeit der Werte von unterschiedlichen Kollektiven zu erreichen.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem SPSS Programm, Version 12.0.

3. ERGEBNISSE

3.1. Entwicklung von RT-PCR Assays für uPAR-del5 und uPAR-wt

Zur Quantifizierung der Urokinase Rezeptor Wildtyp mRNA (uPAR-wt) und ihrer Spleissvariante uPAR-del5 wurden sensitive und spezifische *real-time* RT-PCR Assays entwickelt, die auf der LightCycler Technologie basieren. Zusammen mit dem von Luther et al. (2003) beschriebenen Assay für den Nachweis von uPAR-del4+5 mRNA war es somit möglich, drei Varianten des uPAR Genes zu untersuchen. Nicht nur die Höhe der Expression der einzelnen Varianten wurde so bestimmt, sondern auch, in welchem Verhältnis sie zueinander stehen und ob hier eine Regulierung, z.B. im Tumorgewebe, stattfindet.

Um die neuen Assays zu etablieren, wurden zuerst PCRs mit verschiedenen uPAR-Plasmiden und cDNAs aus Tumorproben und Zelllinien in einem herkömmlichen Thermocycler durchgeführt. Bei der OV-MZ-6#8 del5-Zelllinie handelt es sich um stabil transfizierte Zellen, die demzufolge uPAR-del5 in hohem Maße exprimieren. Die PCR-Produkte wurden auf Agarosegel aufgetragen. Die MgCl₂- und Primerkonzentrationen wurden titriert, und die Reaktionstemperaturen und -zeiten den verwendeten Primern und Sonden angepasst.

3.2. Sensitivität der Assays

In der quantitativen *real-time* PCR wird die Ausgangsmenge durch die Stärke des Signals, das von den fluoreszenzmarkierten Sonden durch den Energietransfer (FRET) ausgesandt wird, berechnet. Um daraus die absoluten Molekülmengen ableiten zu können, müssen die Signale gegen eine Standardkurve verglichen werden. Zur Generierung der Kurven haben wir Glaskapillaren verwendet, die mit genau definierten Mengen an uPAR-del5 oder uPAR-wt (bzw. uPAR-del4+5) Fragment beschichtet waren. Abb. 8 zeigt eine der Standardkurven, wie sie für jeden einzelnen Lauf berechnet wurde. Der höchste Standard mit 100000 Molekülen erreicht bereits nach ungefähr 25 Zyklen den Schwellenwert, während der kleinste Standard mit 10 Molekülen nach dem 38. Zyklus messbar wird. Die Abstände der Standards, die sich jeweils um eine Zehnerpotenz unterscheiden, sind regelmäßig.

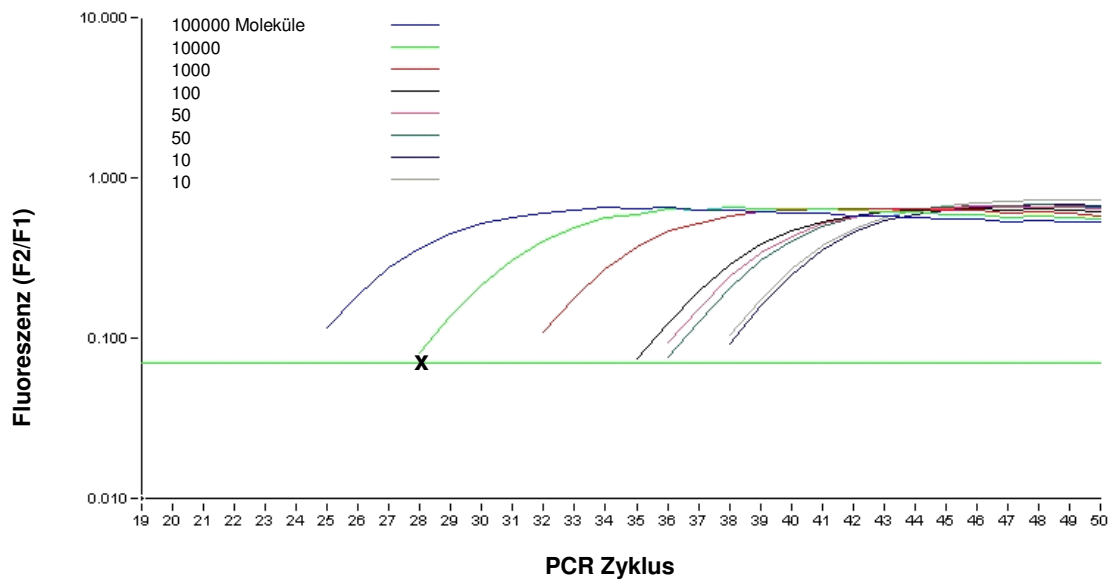


Abbildung 8: Standardkurve einer quantitativen RT-PCR im LightCycler.

Die Abbildung zeigt die Standards einer LightCycler RT-PCR. Dazu wurden Glaskapillaren verwendet, die mit genau definierten Mengen an uPAR Plasmid beschichtet waren. Der höchste Standard (100.000 Moleküle) erreicht seinen *Crossing Point*, bei dem er über die Standardabweichung herauskommt, bei ca. Zyklus 25, während die beiden niedrigsten Standards (jeweils 10 Moleküle) bei Zyklus 38 erscheinen. Es ist exemplarisch der Crossing Point des 10000 Molekül-Standards mit "x" gekennzeichnet.

Die Standardkurven waren sehr gut reproduzierbar. Es mussten nur sehr selten Standards aus der Auswertung herausgenommen werden, sodass die Kurve bis auf wenige Ausnahmen aus mindestens sechs Punkten bestand. Die folgenden Abbildungen 9a bis 9c zeigen die von der LightCycler Software berechneten Molekülmengen in den Standards, in Relation zu den theoretischen Molekülmengen (Standards von 10 bis 100000 Kopien).

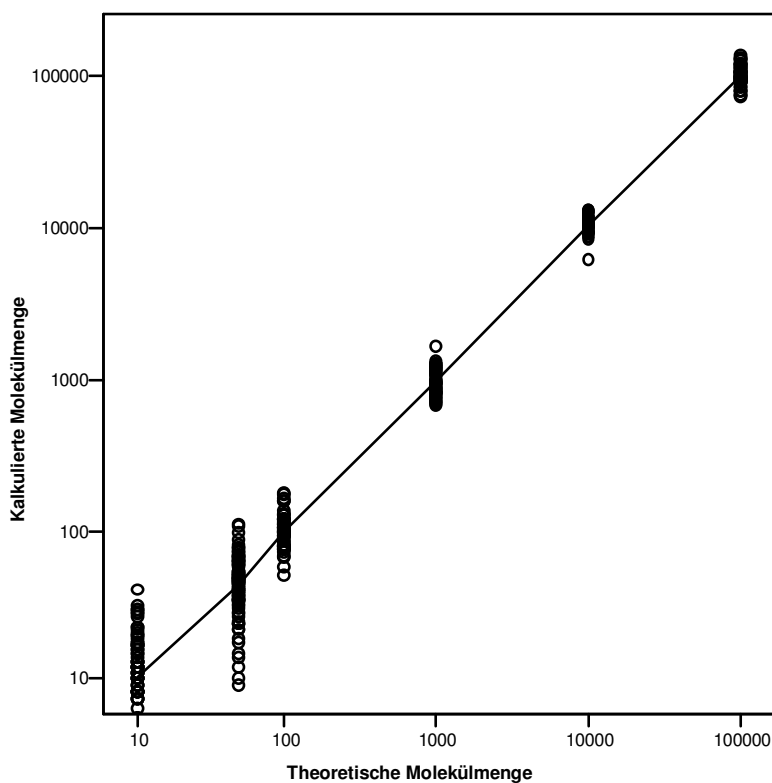


Abbildung 9a: Sensitivität und Interassay-Schwankungen der Standardkurven für die uPAR-wt Messungen.

Als Standards wurden Glaskapillaren verwendet, die mittels Robotertechnik mit uPAR-wt Plasmid beschichtet waren (Standards von 10 bis 100000 Moleküle). Die theoretischen Molekülmengen wurden gegen die vom LightCycler nach jeder PCR berechneten Mengen aufgetragen (n=55, logarhythmische Skalierung).

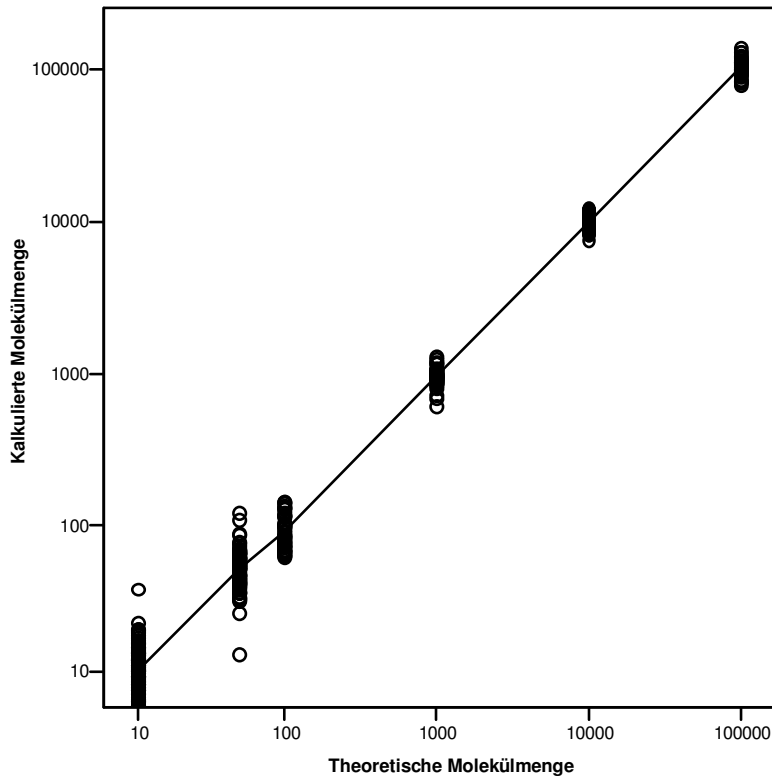


Abbildung 9b: Sensitivität und Interassay-Schwankungen der Standardkurven für die uPAR-del5 Messungen.

Als Standards wurden Glaskapillaren verwendet, die mittels Robotertechnik mit uPAR-del5 Plasmid beschichtet waren (Standards von 10 bis 100000 Moleküle). Die theoretischen Molekülmengen wurden gegen die vom LightCycler nach jeder PCR berechneten Mengen aufgetragen (n=49, logarhythmische Skalierung).

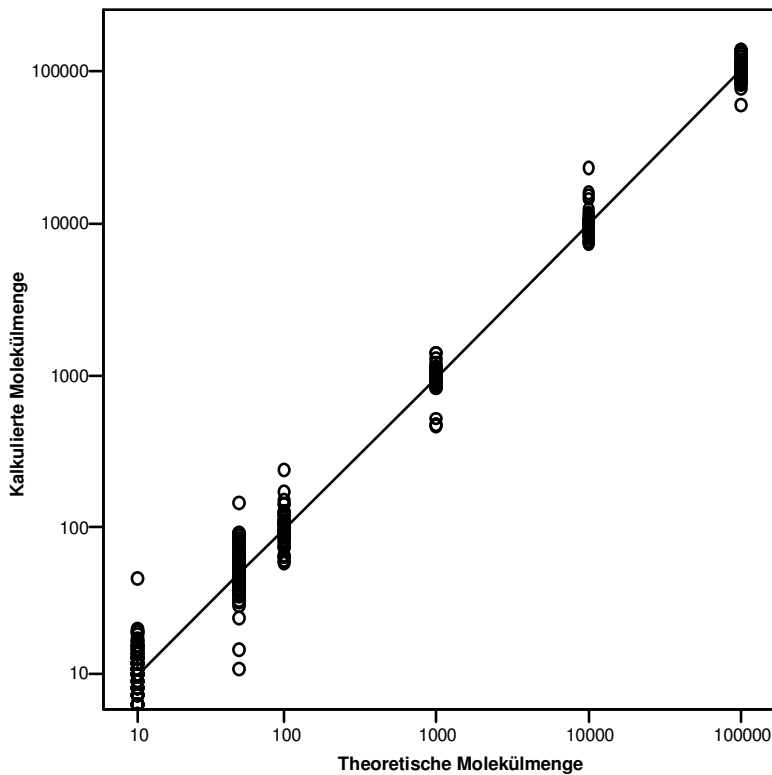


Abbildung 9c: Sensitivität und Interassay-Schwankungen der Standardkurven für die uPAR-del4+5 Messungen.

Als Standards wurden Glaskapillaren verwendet, die mittels Robotertechnik mit uPAR-del4+5 Plasmid beschichtet waren (Standards von 10 bis 100000 Moleküle). Die theoretischen Molekülmengen wurden gegen die vom LightCycler nach jeder PCR berechneten Mengen aufgetragen (n=56, logarhythmische Skalierung).

Das Detektionslimit lag für alle RT-PCR Assays bei 10 Kopien der cDNA, was dem niedrigsten Standard der Glaskapillaren entsprach. Regelmäßig konnten, wie oben gezeigt, auch diese Standards mit akzeptabler Schwankung amplifiziert werden. In jedem einzelnen PCR Lauf wurde eine Negativkontrolle in Form von Wasser mitgeführt, sodass auch Ergebnisse <10 Molekülen eine, wenn auch geringe, Expression des Gens vermuten lassen.

3.3. Spezifität der Assays

Durch die Verwendung von *Hybridization Probes* wird in der RT-PCR eine hohe Spezifität der Reaktion gewährleistet. Zur Etablierung wurde als Vorlage der Assay der Arbeitsgruppe A. Meye (Klinik für Urologie der Universitätsklinik Dresden) zum Nachweis von uPAR-FL (Exons 2, 3 und 4) verwendet. Wir haben die von Luther et al. (2003) beschriebenen Sonden übernommen, da sie in den Exons 2-3 (uPAR-LC) und 3 (uPAR-FL) liegen. Diese Exons sind in allen in dieser Arbeit untersuchten Varianten des Gens vorhanden. Da uPAR-LC nur an der Grenze zwischen Exon 2 und Exon 3 bindet und so ein Signal hervorrufen kann, wird auch dadurch die Amplifikation von eventuell vorhandener genomischer DNA verhindert.

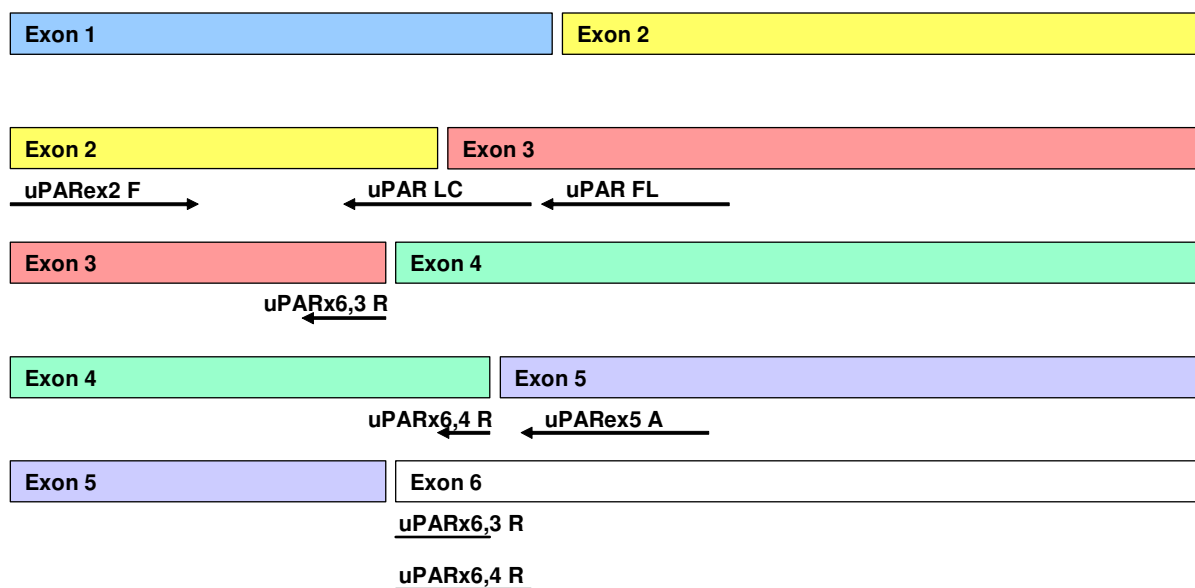


Abbildung 10: Lage der RT-PCR Primer im uPAR Gen.

Für alle uPAR mRNA Varianten wurde derselbe Vorwärtsprimer Ex2 F benutzt. Zur Amplifikation von uPAR-wt wurde ein Rückwärtsprimer in Exon 5 gewählt, das in den Spleissvarianten fehlt. Für die Spleissvarianten wurden die Primer auf die neu entstandenen Grenzen zwischen Exons 4+6 (uPAR-del5) und 3+6 (uPAR-del4+5) gelegt, um eine optimale Spezifität zu erreichen. Die Sonden uPAR LC und FL waren für alle uPAR Varianten anwendbar.

Wie in Abb. 10 dargestellt, wurden die PCR-Primer so ausgesucht, dass sie jeweils nur eine Variante des uPAR Gens abbilden. Als 5' Primer wurde in allen Assays Ex 2F verwendet, der durch seine Lage in Exon 2 universell einsetzbar ist. Der 3' Primer für uPAR-del5 liegt auf der

Grenze zwischen Exon 4 und Exon 6, die nur vorhanden ist, wenn Exon 5 herausgeschnitten wird und die beiden Enden neu zusammengefügt werden. Der Primer für uPAR-wt liegt in Exon 5, sodass er die Spleissvariante uPAR-del4+5 nicht amplifiziert. Diese theoretischen Erwartungen konnten durch Sequenzierung der PCR-Produkte gezeigt werden. Dazu wurden die Produkte aus einem LightCycler-Lauf für uPAR-del5, bzw. uPAR-wt und auf ein 2% Agarosegel aufgetragen. Die Banden in der erwarteten Größe wurden ausgeschnitten und nach Aufbereitung zur Sequenzierung geschickt.

Des Weiteren haben wir die Spezifität der beiden neu etablierten Assays anhand der drei verschiedenen uPAR-Fragmente überprüft. Sie wurden entweder in hoher Kopienzahl gemessen (etwa 1,5 pg DNA entsprechend), oder es wurden Standardkapillaren mit 100000 Kopien als Proben verwendet. Alle Negativkontrollen zeigten auch in hoher Kopienzahl kein Signal. Somit wird die Zielsequenz uPAR-del5, bzw. uPAR-wt, spezifisch mit den beiden neu etablierten RT-PCR Assays amplifiziert.

Tabelle 6: Spezifität der RT-PCR Assays. Die verschiedenen Plasmide wurden in Standardkapillaren oder als Verdünnungen mit den jeweils anderen Primern gemessen, um eine Kreuzamplifikation auszuschließen.

uPAR Plasmid	RT-PCR Assay		
	uPAR-wt	uPAR-del5	uPAR-del4+5
Full Length	pos.	neg.	neg.
delta 5	neg.	pos.	neg.
delta 4+5	neg.	neg.*	pos.

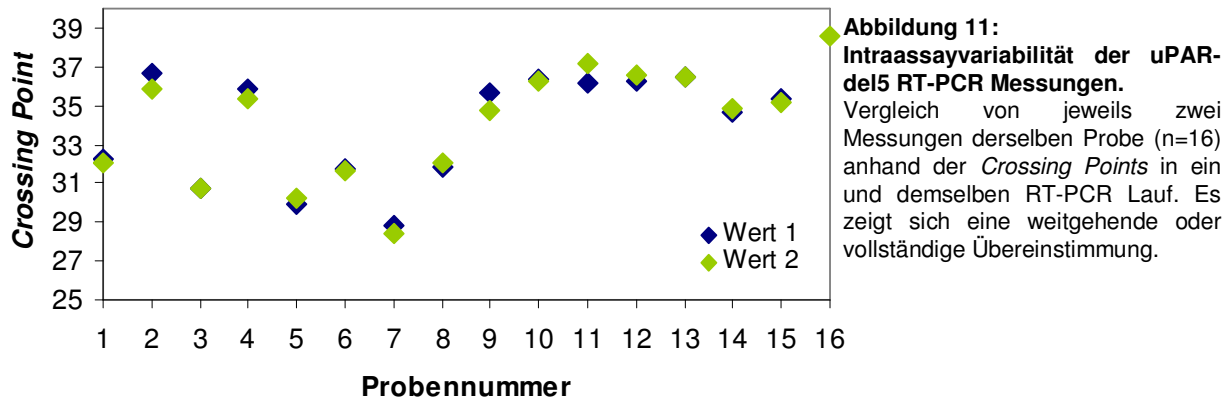
*: < 1% des Wertes im uPAR-del4+5 Assay

3.4. Reproduzierbarkeit der Assays

Die Reproduzierbarkeit und somit die Verlässlichkeit der RT-PCR Assays wurde in mehreren Ansätzen überprüft. Wenn Proben in einem Lauf zweimal gemessen wurden, wurde die *Intraassay*-Variabilität getestet. Andererseits wurden die Proben bis auf wenige Ausnahmen mindestens zweimal in voneinander unabhängigen RT-PCR Läufen gemessen, um die *Interassay*-Variabilität zu untersuchen.

3.4.1. Intraassay-Variabilität

In der folgenden Abbildung sind beispielhaft die Crossing Points von 16 Proben (aus unterschiedlichen PCR-Läufen) gezeigt, die während eines PCR-Laufs zweifach gemessen wurden. Es gab dabei nur geringe oder keine Schwankungen zwischen den beiden Messwerten. Dennoch wurde versucht, die Doppelbestimmung von Proben in zwei voneinander unabhängigen Läufen durchzuführen.



3.4.2. Interassay-Variabilität

Da der größere Fehler erwartet wird, wenn dieselbe Probe in zwei getrennten PCR-Läufen gemessen wird, ist die *Interassay-Variabilität* der wichtigere Parameter zur Überprüfung der Stabilität der Methode. Sie sagt etwas darüber aus, ob eine Methode zu einem beliebigen Zeitpunkt dieselben Ergebnisse liefert, oder ob es große Schwankungen gibt. Besonders beim Nachweis von uPAR-del5 und uPAR-del4+5 mRNA erschien dies wichtig, da sie häufig nur in gerade detektierbaren Mengen vorhanden waren. Abb. 12a und b zeigen die Werte von 278 Tumorproben, die mindestens zweimal in unabhängigen PCR-Läufen gemessen wurden. Bei einer inakzeptablen Differenz dieser beiden Werte wurde eine weitere Messung durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Wie in der Abbildung sichtbar, ist die Korrelation der Werte bei uPAR-del5 schlechter als bei uPAR-wt, weswegen in diesem Fall die Messungen häufiger noch ein weiteres Mal wiederholt wurden. Der Grund hierfür könnte die wesentlich geringere Expression von uPAR-del5 im Vergleich zu uPAR-wt sein.

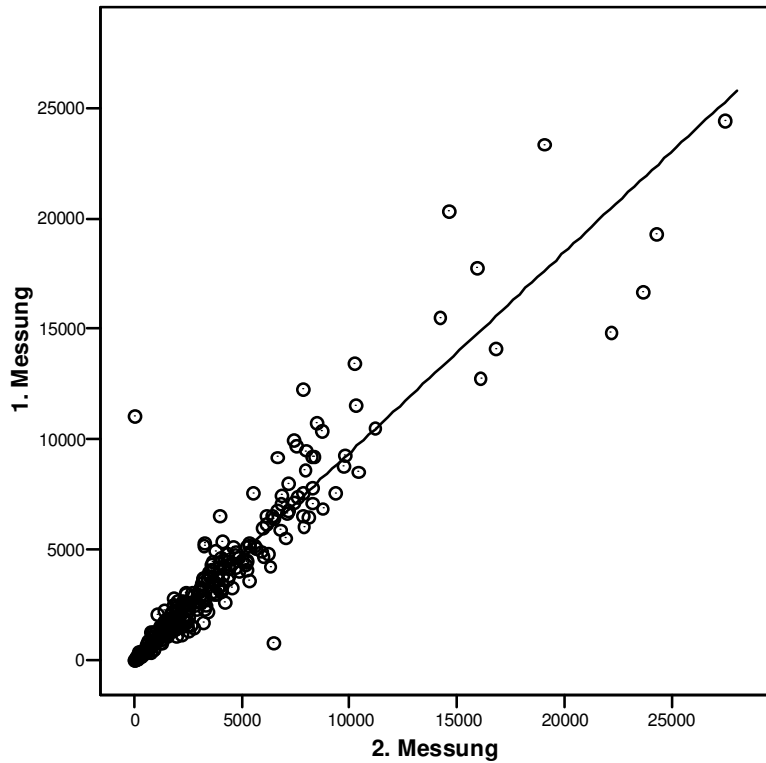


Abbildung 12a:
Interassayvariabilität für die uPAR-wt RT-PCRs (n=278).
 Alle cDNAs aus Gewebe oder Zelllinien wurden mindestens zweimal in voneinander unabhängigen RT-PCR Läufen gemessen. Bei einer zu hohen Abweichung fand eine dritte Messung statt. Die Abbildung zeigt die Korrelation (nach Spearman) der Messungen für uPAR-wt an 278 Proben: $R = 0,942$ bei $p < 0,01$

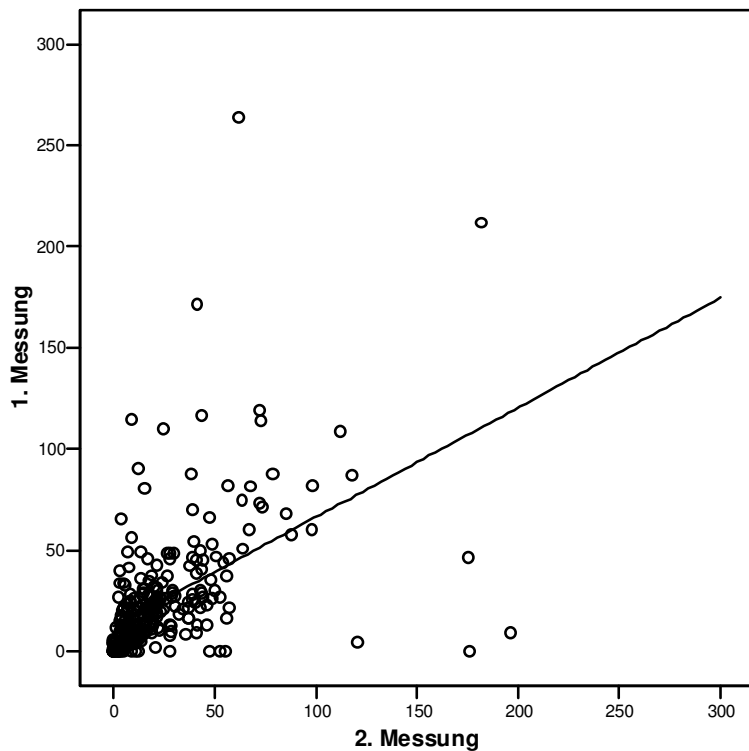


Abbildung 12b:
Interassayvariabilität für die uPAR-del5 RT-PCRs (n=278).
 Alle cDNAs aus Gewebe oder Zelllinien wurden mindestens zweimal in voneinander unabhängigen RT-PCR Läufen gemessen. Bei einer zu hohen Abweichung fand eine dritte Messung statt. Die Abbildung zeigt die Korrelation (nach Spearman) der Messungen für uPAR-del5 an 278 Proben: $R = 0,629$ bei $p < 0,01$

Aber auch anhand der in dieser Arbeit verwendeten Methode, die Standardkurven herzustellen, ließ sich die Reproduzierbarkeit überprüfen. Die *Crossing Points* der Kapillaren, die mit Molekülmengen von 10 bis 100000 beschichtet waren, wurden miteinander verglichen (s. Abb. 15). Anhand der Standardkurven konnte gezeigt werden, dass hier sehr stabile Assays

vorliegen. Die verwendeten Standardkapillaren stammten aus verschiedenen Chargen, aber durch die genaue Konzentrationsbestimmung der Fragmente mit DHPLC und die Beschichtung der Kapillaren mit einem Pipettierroboter konnte eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht werden.

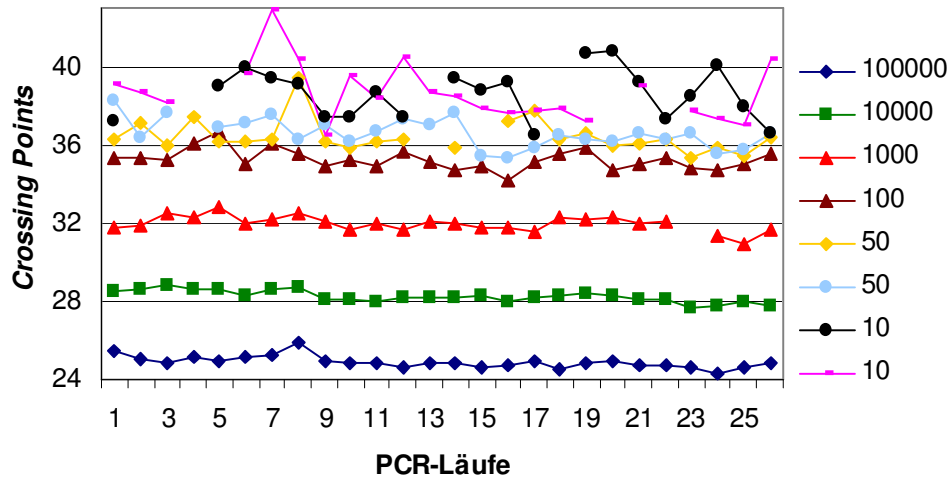


Abbildung 13: Vergleich der Standards für uPAR-wt Messungen anhand der Crossing Points.

Die Crossing Points der Standardkapillaren für alle durchgeführten uPAR-wt Messungen (n=26) zeigen, dass die Standards sehr konstant messbar waren.

An 100 Proben wurden in unserem Labor und bei unseren Kooperationspartnern in Dresden die Werte für uPAR-del4+5 gemessen. Die Korrelation betrug $R = 0,851$ bei $p < 0,01$. Offensichtlich sind die Werte also auch zuverlässig, wenn sie sich an der Nachweisbarkeitsgrenze bewegen. Die graphische Korrelation ist in Abb. 14. dargestellt.

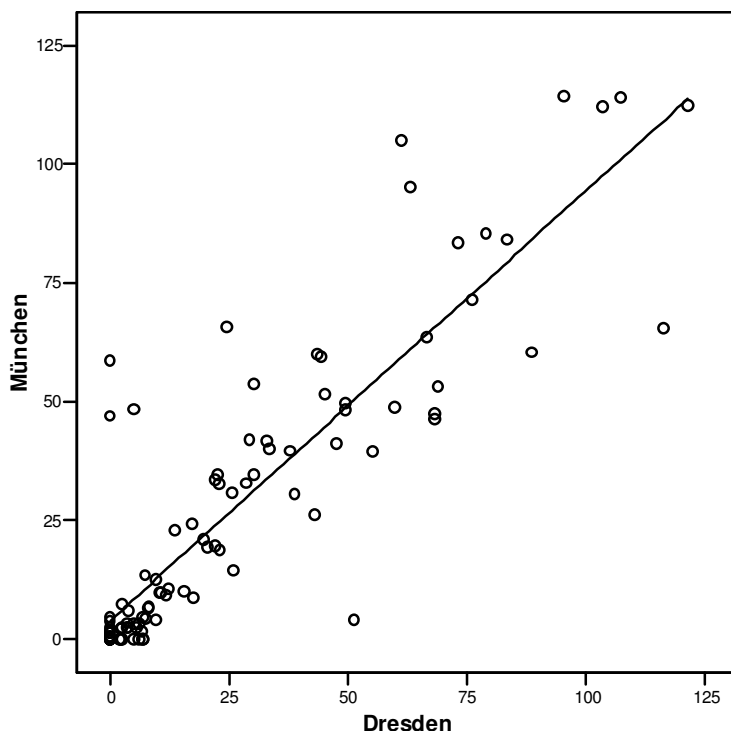


Abbildung 14: Vergleich von uPAR-del4+5 Messungen in Dresden und München (n=100).

100 cDNAs aus Tumorgewebe wurden sowohl in unserem Labor als auch in Dresden bei unseren Kooperationspartnern für uPAR-del4+5 mRNA gemessen. Die Abbildung zeigt die Korrelation (nach Spearman) für die nicht gegen ein Housekeeping Gen normalisierten Daten. $R = 0,851$ bei $p < 0,01$.

3.5. Zelleexperimente

3.5.1. Messungen von uPAR mRNA und Antigen in Zelllinien verschiedener Herkunft

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit 13 verschiedenen Zelllinien gearbeitet. Zum Teil wurden sie selbst in Kultur genommen und daraus die Gesamt-RNA extrahiert. Von einigen anderen Zelllinien stand bereits fertige RNA oder cDNA zur Verfügung. Somit konnten wir über Zellen sehr unterschiedlicher Herkunft und Dignität ein Expressionsmuster von uPAR mRNA und Antigen erstellen. Die uPAR Varianten wurden mit den neu etablierten Assays gemessen und gegen das Housekeeping Gen h-G6PDH normalisiert. Zum anderen wurde uPAR Antigen mit zwei verschiedenen ELISA Assays bestimmt: HUIIF10 und American Diagnostica Imubind.

Hierbei zeigte sich, dass uPAR mRNA in den meisten Zelllinien nachweisbar war, allerdings mit einer großen Spannbreite. Diese reichte von gerade nachweisbar im Fall der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 (uPAR-wt 3,81) bis zu 1000fach höheren Werten im Fall der Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-10 (uPAR-wt 3588). Der uPAR Antigengehalt reichte von nicht nachweisbar in der Brustkrebszelllinie MDA-MB 435 ($< 0,05$ ng/mg) bis zu ca. 7 ng/mg Gesamtprotein im Fall der Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-10.

Die uPAR-wt mRNA Konzentration wurde mit den uPAR Antigen Werten verglichen: die höchsten Antigenwerte (OV-MZ-10 und MDA-MB 231-BAG) korrespondieren zu den höchsten mRNA Werten. Die Zelllinie MDA-MB 435 mit nicht nachweisbarem uPAR Proteingehalt zeigte ebenso eine extrem niedrige uPAR-wt mRNA Expression. Die übrigen Zelllinien zeigten eine mittlere Expression sowohl auf Protein-, wie auch auf mRNA Level. Eine Expression von uPAR-del5 konnte in allen Zelllinien nachgewiesen werden, wenn auch nur in 0,23 bis 1,56 % der uPAR-wt Expression.

Die Zelllinien WM-35, 1205LU und sBcl-2 sind melanozytären Ursprungs, zeigen aber ein unterschiedliches Wachstumsmuster. Im Gegensatz zu den anderen beiden Zelllinien metastasieren die 1205LU Zellen, und bei ihnen lassen sich auch die höchsten uPAR mRNA Werte der drei Zelllinien messen. Für eine weitergehende Interpretation reichen diese Daten allerdings nicht aus.

aMCF-7 ist die Adriamycin-resistente Variante der Brustkrebszelllinie MCF-7. Sie unterscheiden sich auch darin, dass aMCF-7 Zellen Östrogenrezeptor-negativ und Tamoxifenresistent sind und außerdem ein invasives Wachstum *in vivo* und *in vitro* zeigen.

MCF-7 Zellen hingegen wachsen nicht invasiv (Schiemann et al. 1997). aMCF-7 Zellen weisen sowohl auf RNA-Ebene sehr viel höhere Werte für uPAR auf als ihre Mutterzelllinie. Auf Antigenebene lässt sich dazu keine Aussage treffen, da die Werte des HU/IIIIF10 und des ADI Elisa diskrepant sind.

Tabelle 7: Messung von uPAR Antigen und uPAR mRNA (uPAR-wt, uPAR-del5 und uPAR-del4+5) in 13 verschiedenen Zelllinien. Der zelluläre uPAR Antigengehalt (angegeben als ng/mg Protein) wurde mit zwei verschiedenen ELISAs gemessen. Der Gehalt an uPAR mRNA wurde mittels LightCycler RT-PCR gemessen und gegen das Housekeeping Gen h-G6PDH normalisiert. Die Verhältnisse wurden mit dem Faktor 1000 multipliziert.

Zelllinien		uPAR Antigen [ng/mg]		uPAR mRNA [relativ zu G6PDH]*			
Name	Herkunft	HU/IIIIF10 ²	ADI ¹	uPAR-wt	uPAR-del5	uPAR-del4+5	uPAR-del5/-wt [%]
MDA-MB 435	Mammakarzinom	<	<	21,15	0,24	0,07	1,14
MDA-MB 231	Mammakarzinom	1,99	1,43	747	2,00	1,34	0,27
MDA-MB 231 BAG	Mammakarzinom	5,28	7,28	1204	2,81	1,96	0,23
MCF-7	Mammakarzinom	4,25	<	3,81	0,03	0,01	0,85
aMCF-7	Mammakarzinom	3,19	3,00	671	3,85	1,10	0,57
OVMZ-10	Ovarialkarzinom	6,86	5,85	3588	28	5,62	0,78
OVMZ-6	Ovarialkarzinom	2,18	1,04	648	5,50	0,69	0,85
HaCaT	Keratinocyten	nicht gemessen		889	7,98	0,85	0,90
LN 18	Gehirn	2,07	1,06	137	2,14	0,20	1,56
G 139	Gehirn	nicht gemessen		748	4,18	0,89	0,56
WM 35	Melanom	nicht gemessen		39	0,57	0,16	1,46
sBcl-2	Melanom	nicht gemessen		316	4,14	1,05	1,31
1205 LU	Melanom	nicht gemessen		871	12	1,60	1,42

< nicht nachweisbar
* multipliziert mit Faktor 1000
¹ gemessen in Dresden
² gemessen in München

höchster Wert
zweithöchster Wert
geringster Wert

3.5.2. Melanomzellen nach Behandlung mit siRNA

In diesem Projekt konnte die praktische Anwendbarkeit der neu etablierten Methode gezeigt werden. Es sollte überprüft werden, ob die Behandlung melanozytärer Zellen mit einer siRNA, die gegen Exon 4 des uPAR Genes gerichtet war, eine Veränderung der Expression der uPAR mRNA Varianten bewirkt. Die Expression aller uPAR mRNA Varianten war mit Abstand am höchsten in der Zelllinie 1205LU, die sowohl durch ihr invasives, wie auch metastasierendes Wachstum gekennzeichnet ist. sBcl-2 Zellen zeichnen sich durch vertikales Wachstum aus, also in das sie umgebende Gewebe hinein, während WM 35 Zellen horizontal, also flächig wachsen. Beide haben eine niedrigere Expression als 1205LU Zellen (s. Abb. 15a exemplarisch für uPAR-wt).

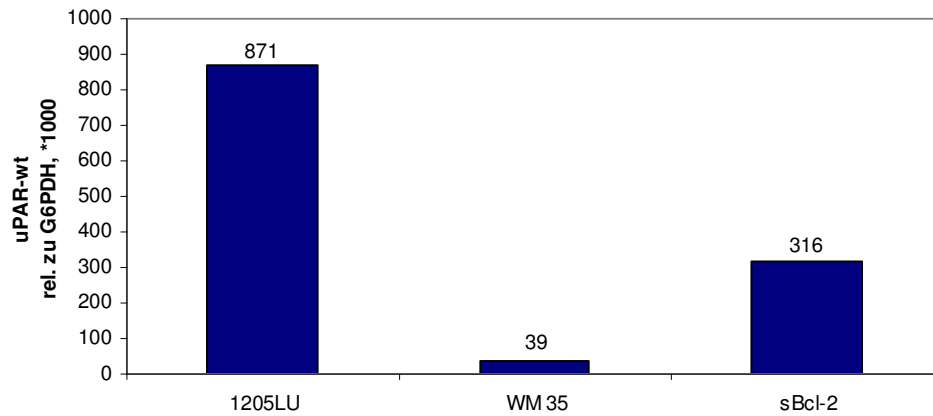


Abbildung 15a: Vergleich der uPAR-wt mRNA Werte drei verschiedener melanozytärer Zelllinien.

cDNAs der Zelllinien 1205LU, WM 35 und sBcl-2 wurden uns von der Klinik für Dermatologie, Thalkirchner Strasse zur Verfügung gestellt. Die höchsten uPAR-wt mRNA Werte zeigten die 1205LU Zellen, die als einzige der drei metastasieren. WM 35 Zellen wachsen horizontal und sBcl-2 Zellen vertikal, beide aber nicht invasiv.

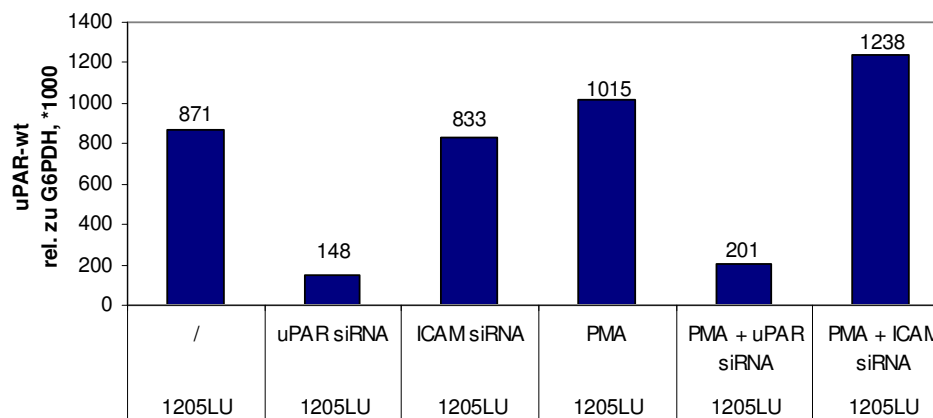


Abbildung 15b: Vergleich der uPAR-wt mRNA Werte für unbehandelte und behandelte 1205LU Zellen.

Die Zelllinie 1205LU wurde mit einer gegen Exon 4 der uPAR mRNA gerichteten siRNA behandelt, was zu einer Reduktion des uPAR-wt um ca. 84% führte. Mit siRNA gegen ICAM konnte keine Reduktion beobachtet werden. Bei Behandlung mit PMA (Phorbolmyristylacetat) kam es zu einer geringen Steigerung der uPAR-wt Werte. Zellen, die uPAR siRNA und PMA ausgesetzt waren, zeigten ebenso einen starken Abfall der uPAR-wt mRNA. Auch unter Behandlung mit PMA und ICAM siRNA kam es zu einem leichten Anstieg.

Abb. 15b zeigt, dass es unter PMA Behandlung zu einer leichten Induktion von uPAR-wt und uPAR-del4+5 kam. Durch uPAR siRNA Behandlung (mit und ohne PMA) wurde ein Rückgang der Expression aller uPAR mRNA Varianten beobachtet, vor allem des Wildtyps, wie auch der Variante uPAR-del5. Da die siRNA gegen Exon 4 des uPAR Gens gerichtet ist, sollte die uPAR-del4+5 mRNA nicht inhibiert werden. Im Vergleich mit den anderen Formen fällt zwar eine Inhibierung auf, die aber sehr viel geringer ist und die Werte nur um gut die Hälfte des Ausgangswertes reduziert:

Tabelle 8: Effekt der Behandlung mit uPAR siRNA auf die Expression der uPAR mRNA Varianten in der metastasierenden Melanomzelllinie 1205LU. Die verwendete siRNA war gegen Exon 4 des uPAR Genes gerichtet. Die stärkste Reduktion zeigte sich bei uPAR-wt und -del5, während del4+5 geringer inhibiert wurde.

Zellart	uPAR mRNA Variante		
	uPAR-wt	uPAR-del5	uPAR-del4+5
ohne uPAR siRNA	100%	100%	100%
plus uPAR siRNA	17%	17%	44%
plus uPAR siRNA und PMA	23%	33%	58%

3.5.3. Mammakarzinomzelllinien nach Behandlung mit Kobalt

Von den Brustkrebszelllinien MDA-MB 231 und MCF-7 standen jeweils 20 Proben zur Verfügung, die mit unterschiedlichen Mengen und Konzentrationen an Kobalt behandelt worden waren. Durch diese Behandlung sollten die Zellen hypoxischem Stress ausgesetzt werden, und Ziel war es, einen möglichen Einfluss dieser Behandlung auf die uPAR mRNA Expression zu untersuchen. Von jeder Probe waren zwei Ansätze vorhanden. Bei unseren Messungen konnte keine signifikante Inhibierung oder Verstärkung der uPAR mRNA Expression beobachtet werden. uPAR-wt mRNA wurde in allen Proben nachgewiesen, wobei die Werte in den MBA-MB 231 Zellen ca. 100fach höher waren als in den MCF-7 Zellen (s. Abb. 16). Die Spleissvarianten konnten hingegen nicht oder unterhalb der Nachweisgrenze (MCF-7 Zellen), bzw. in geringem Maße (MDA-MB 231 Zellen) nachgewiesen werden.

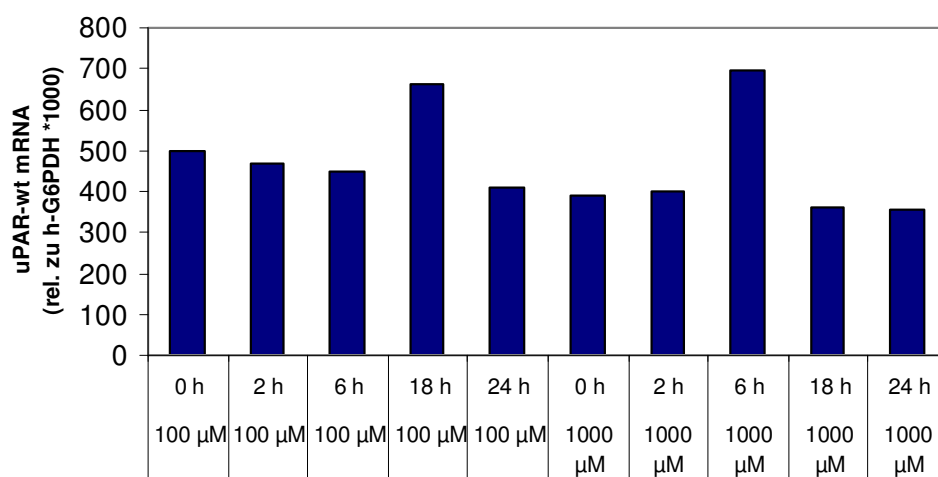


Abbildung 16: Einfluss einer Behandlung mit Kobalt auf die uPAR mRNA Expression in MCF-7 Zellen.

MCF7 Zellen standen uns von der Arbeitsgruppe Dr. P.Span aus Nijmegen, NL, zur Verfügung, die vorher mit unterschiedlichen Mengen (100 oder 1000 µM) und für verschiedene Dauer (0-24h) mit Kobalt behandelt worden waren. Dadurch sollten die Zellen hypoxischem Stress unterzogen werden. Es konnte lediglich ein geringer Anstieg in den uPAR-wt mRNA Werten beobachtet werden.

3.6. Experimente an Patientengewebe

Durch Kooperationen mit den Arbeitsgruppen von A. Meye an der Universitätsklinik Dresden und P. Span am Universitätsklinikum in Nijmegen, Niederlande, konnte in dieser Arbeit eine Vielzahl klinisch sehr gut charakterisierter Tumorproben untersucht werden. Die klinischen und epidemiologischen Daten der Patientinnen konnten mit der Expression der verschiedenen uPAR mRNA Varianten verglichen werden.

3.6.1. Patientengewebe aus München

Es wurden Proben von 19 Mammakarzinomen und 9 Ovarialkarzinomen eigenständig aufgearbeitet. Dazu gehörte die Auswahl geeigneter Fälle, das Schneiden der Proben, Isolieren der RNA, die cDNA Synthese und RT-PCR. Aus den Kryoschnitten wurde die Gesamt-RNA isoliert und revers transkribiert. Mit diesen cDNAs wurden die uPAR Varianten mittels RT-PCR gemessen und die Daten gegen das Housekeeping Gen h-G6PDH normalisiert. Von jeder RNA wurde bei der cDNA Synthese eine Negativkontrolle angefertigt, die entweder ohne Random Primer oder ohne reverse Transkriptase hergestellt wurde. Wenn in dieser Negativkontrolle ein Signal für uPAR oder h-G6PDH gemessen wurde, wurde die Probe von weiteren Messungen ausgeschlossen, da dann von einer Kontamination ausgegangen werden musste. Dies war bei 5 der Ovarialkarzinomproben der Fall, die gemeinsam bearbeitet worden waren. Dies lässt vermuten, dass hier einer der Teilschritte nicht ausreichend funktioniert hat. uPAR und die Spleissvarianten ließen sich in den Proben mit großer Regelmäßigkeit nachweisen, auch in einer geringen Zahl von Ovarialkarzinomen (n=4).

Tabelle 9: Spannbreite der uPAR mRNA Expression in Proben (Mamma- u. Ovarialkarzinom) aus der Frauenklinik Rechts der Isar.

	uPAR-del5	uPAR-wt	uPAR-del4+5	h-G6PDH
absolut	0-783	12-35570	0-277	922- 42150
relativ	0-220	61-9214	0-31	/

Die Spannbreite der uPAR mRNA reicht von kaum nachweisbar bis zu sehr hohen Werten. Da die h-G6PDH Werte innerhalb der Standardkurve (500 bis 5 Mio Moleküle) liegen, hat die RNA Extraktion offensichtlich gut funktioniert. Bei der geringen Probenanzahl wurde keine Auswertung der klinischen Daten gemacht, da hierfür größere und besser charakterisierte Kollektive zur Verfügung standen.

3.6.1.1. Vergleich Kryoschnitte und pulverisiertes Gewebe

Es war möglich, aus bereits mechanisch aufgeschlossenem Gewebe Gesamt-RNA zu isolieren und mit der daraus hergestellten cDNA RT-PCR Messungen zu machen. Für diese Art von Experiment ist es wichtig, die Primer und Sonden so zu wählen, dass ein möglichst kurzes Amplifikationsprodukt entsteht. Durch den physikalischen Stress, dem die RNA ausgesetzt wird, kann sie zum Teil zerstört sein, sodass nur noch wenige und vor allem kurze Fragmente für die cDNA Synthese und die anschließende RT-PCR zur Verfügung stehen. Mit einer Länge von 376 bp (uPAR-wt) bzw. 372 bp (uPAR-del5), war der Nachweis der uPAR Varianten noch möglich.

Es gab große Unterschiede bei den h-G6PDH Werten zwischen den verschiedenen Tumoren, aber weniger zwischen Pulver und Kryoschnitten. Hierbei muss in Betracht gezogen werden, dass die verwendete Menge an pulverisiertem Gewebe schwierig zu standardisieren ist. Die verschiedenen proteolytischen Faktoren ließen sich, zum Teil in geringer Menge, nachweisen. Besonders im Fall von uPAR ist der Nachweis zwar möglich, aber die Amplikongröße ist eigentlich nicht geeignet für pulverisiertes Gewebe. In welcher Bandbreite sich die isolierten RNA-Mengen und die proteolytischen Faktoren (exemplarisch für uPAR-wt) bewegten, zeigen Abb. 17a und 17b.

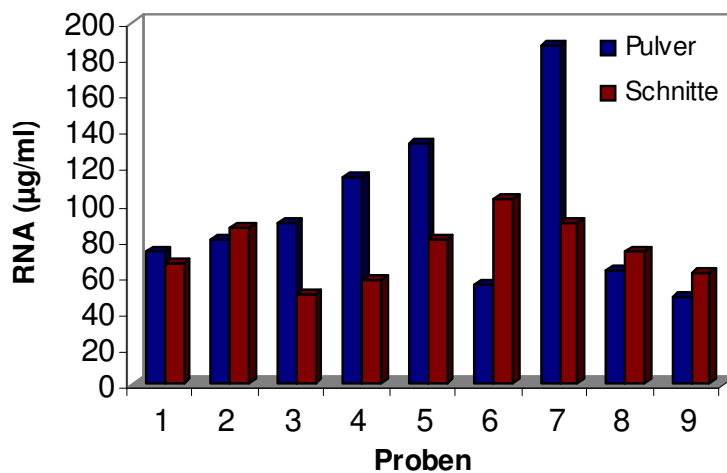


Abbildung 17a: Vergleich der RNA-Isolierung aus pulverisiertem Gewebe und aus Kryoschnitten (n=9).

Aus 9 Tumoren wurde die Gesamt-RNA einmal aus pulverisiertem Gewebe und einmal herkömmlich aus Kryoschnitten isoliert. Der RNA Gehalt der Proben wurde photometrisch bestimmt, wobei sich große Schwankungen zeigten. Offensichtlich ist aber auch aus pulverisiertem Gewebe, das mechanischem Stress ausgesetzt war, noch RNA zu isolieren.

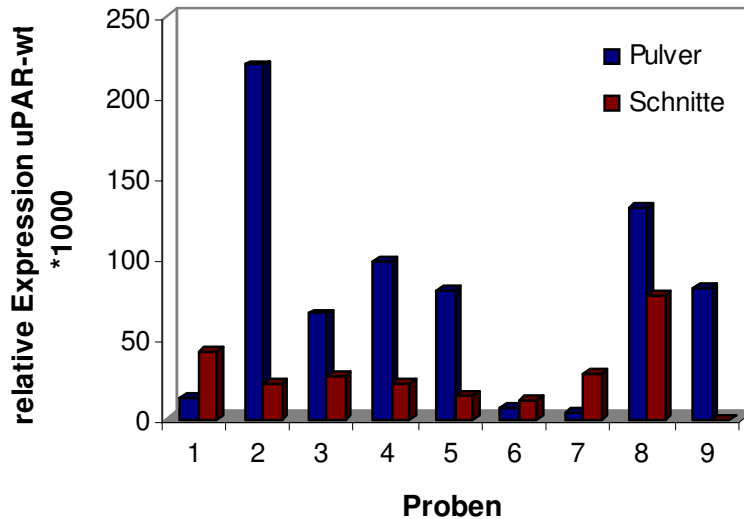


Abbildung 17b: Vergleich der relativen uPAR-wt Werte (normalisiert gegen h-G6PDH und mit Faktor 1000 multipliziert) aus pulverisiertem Gewebe und aus Kryoschnitten (n=9).

Die Abbildung zeigt exemplarisch die z.T. stark differierenden Werte für uPAR-wt aus 9 Tumoren, jeweils aus pulverisiertem Gewebe, bzw. aus Kryoschnitten isoliert.

3.6.2. Patientengewebe aus Dresden

Dieses Projekt stellte eine Fortsetzung der Kooperation mit dem Institut für Pathologie und der Klinik für Urologie am Universitätsklinikum Dresden dar. Auch an diesem Patientenkollektiv konnten die uPAR Varianten mit großer Regelmäßigkeit nachgewiesen werden. Während in Dresden mit dem Assays uPAR-FL (Rückwärtsprimer in Exon 4) die beiden uPAR Varianten delta 5 und Wildtyp nachgewiesen wurden, amplifizierte der neu etablierte Assay uPAR-wt nur den Wildtyp. An 55 Proben korrelierten die Werte von uPAR-FL und uPAR-wt statistisch signifikant mit $r = 0,982$ ($P < 0,01$).

Des Weiteren war es möglich, Werte für vier verschiedene Housekeeping Gene h-G6PDH (gemessen in München), GAPDH, HPRT und PBGD (alle gemessen in Dresden) anhand von 55 Proben zu vergleichen. Zu den Korrelationen der absoluten Werte für die Housekeeping Gene s. Tab. 10.

Tabelle 10: Korrelation der absoluten Werte der Housekeeping Gene h-G6PDH, GAPDH, HPRT und PBGD. In Proben aus Dresden (n=55) wurden diese Housekeeping Gene miteinander verglichen und die Korrelation nach Spearman-Rho bestimmt.

			G6PDH	GAPDH	HPRT	PBGD
Spearman-Rho	G6PDH	Korrelationskoeffizient	1,000	,908**	,749**	,884**
		Sig. (2-seitig)	.	,000	,000	,000
		N	55	55	55	55
	GAPDH	Korrelationskoeffizient	,908**	1,000	,822**	,882**
		Sig. (2-seitig)	,000	.	,000	,000
		N	55	55	55	55
	HPRT	Korrelationskoeffizient	,749**	,822**	1,000	,802**
		Sig. (2-seitig)	,000	,000	.	,000
		N	55	55	55	55
	PBGD	Korrelationskoeffizient	,884**	,882**	,802**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	,000	,000	.
		N	55	55	55	55

** · Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

3.6.3. Patientengewebe aus Rotterdam

Hier handelte es sich zwar nur um ein kleineres Patientenkollektiv, zu dem aber einige Daten, wie vor allem uPAR Antigen, vorhanden waren. uPAR-wt war in allen Proben nachweisbar, uPAR-del4+5 in beinahe allen. Die Negativkontrollen waren für alle Assays negativ. Zwischen uPAR-wt ($R = ,582$ bei $p \leq 0,05$), bzw. uPAR-del4+5 ($R = ,719$ bei $p \leq 0,01$) mRNA zu uPAR Protein wurde eine statistisch signifikante Korrelation beobachtet (bei allerdings sehr niedriger Probenanzahl von 16 Proben).

3.6.4. Patientengewebe aus Nijmegen

In diesem Projekt wurden die Varianten der uPAR mRNA an cDNAs von 192 Patientinnen gemessen. Dieses Kollektiv war ausführlich charakterisiert, sodass die Möglichkeit bestand, die proteolytischen Parameter zu einer großen Menge an klinischen Informationen in Beziehung zu setzen. Proben mit einem h-G6PDH Gehalt unter 10000 Molekülen wurden als qualitativ nicht ausreichend angesehen und demnach von der weiteren Analyse ausgenommen (18 von 192 cDNA Proben = 9,4 %).

Wir haben Expressionslevel von uPAR-del5, uPAR-wt und uPAR-del4+5 mRNA, normalisiert gegen h-G6PDH mRNA, in diesen 174 Fällen von Brustkrebspatientinnen in Bezug auf die klinischen Parameter der Patienten untersucht. uPAR-wt Expression konnte in allen Fällen nachgewiesen werden (medianes relatives Expressionslevel: 263). uPAR-del5 wurde in den Geweben häufig entdeckt, wenn auch mit auf einem signifikant niedrigeren Expressionslevel (Median: 1,57). In einem Fall gab es überhaupt kein uPAR-del5-Signal, in weiteren 40 der 174

Fälle (23,6%) war die gemessene Kopienzahl unterhalb des niedrigsten Standards. Die relative Expression von uPAR-del5 zu uPAR-wt war zwischen 0 und 3,1% (Median uPARdel5_{rel}/uPAR-wt_{rel}: 0,53%). Die mRNA Konzentrationen von uPAR-wt und uPAR-del5 korrelierten signifikant miteinander (R = 0,779; p < 0,001). Wir konnten keine statistisch signifikante Assoziation von uPAR-wt oder uPAR-del5 Expression mit klinischen Parametern wie Nodalstatus, Tumorgröße oder dem Grading entdecken. Eine signifikant höhere uPAR-del5 Expression wurde in Östrogenrezeptor-negativen Tumoren beobachtet (p = 0,023). Zur genaueren Charakterisierung dieses Kollektives s. Tabelle 11.

Tabelle 11: Kollektiv von 280 Brustkrebspatientinnen aus Nijmegen, Holland. Vergleich der klinischen Parameter zu den Werten der uPAR mRNA Varianten. Alle absoluten Werte relativ zu h-G6PDH, multipliziert mit Faktor 1000. Nur Proben mit h-G6PDH-Werten > 10000.

Variable	gesamt	Anzahl Patienten (%)	uPAR mRNA Variante		
			uPAR-wt	uPAR-del5	uPAR-del4+5
			p-Wert	p-Wert	p-Wert
Menopausen-Status^a	174				
pre/peri		39 (22,4)	0,397 (ns)	0,785 (ns)	0,794 (ns)
post		135 (77,6)			
x		-			
Nodalstatus^a	149				
negativ		79 (53,0)	0,058 (ns)	0,070 (ns)	0,451 (ns)
positiv		70 (47,0)			
x		25			
Tumorgröße (pT)^b	171				
1		55 (32,2)	0,101 (ns)	0,240 (ns)	0,072 (ns)
2		97 (56,7)			
3		15 (8,8)			
4		4 (2,3)			
x		3			
Tumorgrading^a	123				
I/II		65 (52,8)	0,116 (ns)	0,112 (ns)	0,484 (ns)
III		58 (47,2)			
x		51			
ER Status^a	174				
negativ		56 (32,2)	0,066 (ns)	0,023	0,118 (ns)
positiv		118 (67,8)			
x		-			
PR Status^a	174				
negativ		67 (38,5)	0,274 (ns)	0,153 (ns)	0,480 (ns)
positiv		107 (61,5)			
x		-			

A Mann-Whitney-Test
b Kruskal-Wallis-Test
x keine Angabe

3.6.5. Übersicht der uPAR mRNA Varianten in den verschiedenen untersuchten Kollektiven

Nachfolgende Abbildungen zeigen die Expression der verschiedenen uPAR mRNA Varianten, dargestellt als absolute und als relative Werte, und jeweils als Mediane und Mittelwerte. Die uPAR Varianten waren in einem Großteil der Fälle nachweisbar, und häufig in ähnlicher Höhe. Das Verhältnis der Varianten zueinander war bei allen Kollektiven $uPAR\text{-wt} > uPAR\text{-del5} > uPAR\text{-del4+5}$.

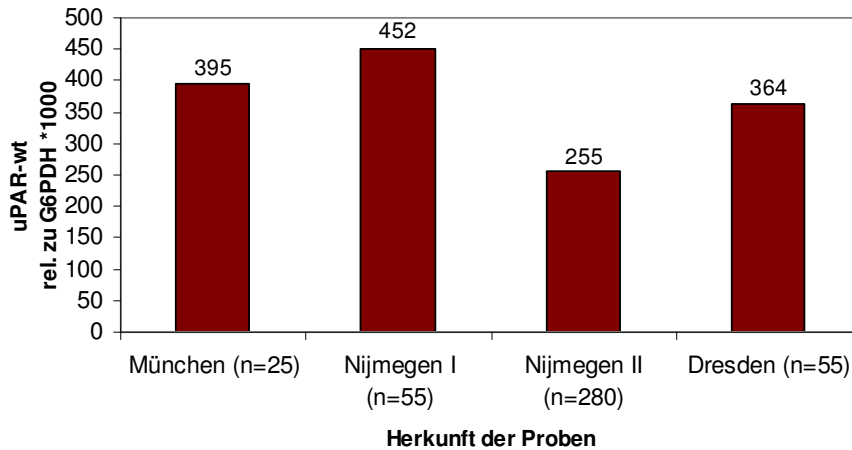


Abbildung 18a: Vergleich der uPAR-wt mRNA Werte in verschiedenen Mammakarzinomkollektiven.

Es standen mehrere Kollektive von Tumorgewebe aus Mammakarzinomen zur uPAR mRNA Messung zur Verfügung. Die Abbildung zeigt die Mediane der uPAR-wt mRNA-Werte (normalisiert gegen h-G6PDH und multipliziert mit dem Faktor 1000) im Vergleich zueinander. Es zeigt sich eine ähnliche Höhe der Expressionslevel in den unterschiedlichen Kollektiven.

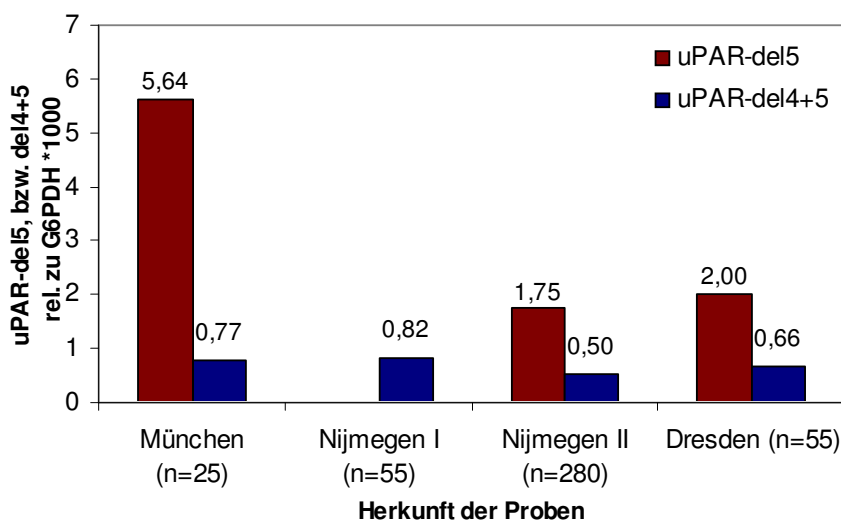


Abbildung 18b: Vergleich der uPAR-del5 und uPAR-del4+5 mRNA Werte in verschiedenen Mammakarzinomkollektiven.

Es standen mehrere Kollektive von Tumorgewebe aus Mammakarzinomen zur uPAR mRNA Messung zur Verfügung. Die Abbildung zeigt die Mediane der uPAR-del5 und uPAR-del4+5 mRNA-Werte (normalisiert gegen h-G6PDH und multipliziert mit dem Faktor 1000) im Vergleich zueinander.

4. DISKUSSION

Die Bedeutung des *uPA/PAI-Systems* allgemein und speziell des Urokinase Rezeptors hinsichtlich der Prognose von Patienten mit soliden Tumoren ist bereits vielfach gezeigt worden (Harbeck et al. 2004, Duffy et al. 2004, de Bock 2004, Rabbani et al. 2001). Durch die Bindung von uPA and uPAR wird aus Plasminogen die aktive Protease Plasmin, die es Tumorzellen ermöglicht, sich über Gefäße und Basalmembranen hinwegzusetzen. Erst dadurch erhalten diese das Potential, sich im Körper auszubreiten. Während die lokale Erkrankung beim Mammakarzinom selten zum Tod führt, kommt es durch die Metastasen zu lebensbedrohlichen Komplikationen.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, *real-time* RT-PCR Assays auf LightCycler Basis zu etablieren, um damit folgende Formen der Urokinase Rezeptor mRNA nachzuweisen:

- uPAR-del5 und
- uPAR-wt

Diese beiden proteolytischen Faktoren sollten gemeinsam mit einer weiteren Variante, uPAR-del4+5, für die schon ein Assay zur Verfügung stand, in Zelllinien und vor allem auch an Gewebeproben aus Mammakarzinomen gemessen werden.

Die cDNA Sequenz der *uPAR-del5 Variante*, für die hier ein RT-PCR Assay entwickelt wurde, ist ursprünglich von Casey et al. (1994) publiziert worden. In einer vorausgegangenen Arbeit unseres Labors konnte die Expression dieser Variante durch Primer, die gegen die Exons 1 und 6 des uPAR Gens gerichtet waren, in Tumorzellen gezeigt werden (Luther et al. 2003). In den Nukleotiddatenbanken findet man zudem eine Reihe voneinander unabhängiger Eintragungen der cDNA Sequenzen, die für uPAR-del5 kodieren, beispielsweise die Nummern AX281707, AA481366, BM543893 oder BM767461. Somit scheint die uPAR-del5 Spleissvariante häufig in menschlichen Zellen vorzukommen. Da die Struktur des uPAR-del5 Proteins nur zum Teil untersucht ist, kann man wenig darüber sagen, inwiefern sich seine Funktion von dem des Wildtyp-Rezeptors unterscheidet und ob überhaupt ein funktionierendes Protein gebildet wird. Durch das Herausschneiden von Exon 5 fehlt im Protein nicht, wie in der delta4+5 Variante eine ganze Domäne, sondern nur ein Teil von Domäne II. Es besteht weiterhin die Vermutung, dass sowohl uPAR-del5 als auch uPAR-del4+5 eine gewisse Rolle in der Ausbreitung und Invasion von Tumorzellen spielen, was dann letzten Endes zur Metastasierung einer Tumorerkrankung führt.

Der *Aufbau der Assays* war so gewählt, dass mit ihnen nur die jeweils zu untersuchende Variante des uPAR Gens amplifiziert wurde. Während bei allen Assays derselbe Vorwärtsprimer verwendet wurde, haben wir für die Spleissvariante einen gewählt, der auf der Grenze zwischen den Exons 4 und 6 liegt, die es nur in dieser Variante gibt. Für den Wildtyp wurde ein Primer in Exon 5 ausgesucht, sodass auch dieser Assay sehr spezifisch war, da keine mRNA von upar-del4+5 und uPAR-del5 amplifiziert wurde. Durch exemplarische Sequenzierung der Amplifikationsprodukte wurde diese theoretische Spezifität bestätigt. Die Sequenzen zeigten Übereinstimmung mit denen der zugänglichen Datenbanken. Des Weiteren wurden die Assays an anderen uPAR Plasmiden getestet, und auch hier wurde keine unspezifische Amplifikation beobachtet.

Die *Sensitivität* der Assays war sehr gut; es konnten regelmäßig auch die niedrigsten Werte der Standardkurven von 10 und 50 Molekülen nachgewiesen werden. Zur Generierung der Standardkurven wurden nicht, wie häufig der Fall, von Hand Verdünnungen der Plasmide angefertigt, denn dann könnte sehr schnell eine hohe Ungenauigkeit entstehen. Stattdessen wurden Plasmide mit der kodierenden Sequenz der jeweiligen Zielstruktur linearisiert, ihre Konzentration mittels DHPLC bestimmt, und daraufhin LightCycler Kapillaren mit exakt definierten Molekülmengen beschichtet (Köhler et al. 1999). Die Korrelation der theoretischen und der kalkulierten Molekülmengen der Standards zeigte, dass diese Methode sehr stabil war.

Der große Vorteil der RT-PCR ist, dass sie mit einem Minimum an Gewebe auskommt, eine große Spannbreite hat, robust ist und schnelle Ergebnisse liefert. Sie kann theoretisch ein einziges Molekül nachweisen, da während der Reaktion eine exponentielle Vermehrung stattfindet. Für die RNA-Extraktion aus den Proben der Frauenklinik Rechts der Isar haben wir nur einige wenige, dünne Kryoschnitte von jedem Tumor angefertigt und konnten damit unsere Messungen erfolgreich durchführen. Daher eignet sich die Methode hervorragend für Studien, für die lediglich eine begrenzte Menge an Gewebe zur Verfügung steht. Dies ist nicht selten der Fall, da die Tumoren immer häufiger frühzeitig entdeckt werden, wenn sie noch nicht sehr groß sind. Des Weiteren werden an den Proben noch weitere tumorbiologische Untersuchungen (z.B. uPA und PAI Antigenbestimmung) durchgeführt, für die auch noch Gewebe zur Verfügung stehen muss.

Wir haben bei unseren eigenen Proben, ob aus Zelllinien oder aus Patientengewebe, grundsätzlich *Negativkontrollen* mitgeführt, die entweder ohne Primer oder ohne Enzym für die cDNA-Synthese hergestellt worden waren. Nur so konnte sichergestellt werden, dass in der PCR kein Signal von genomischer DNA stammt, die in der Probe enthalten sein könnte. Wenn dies doch der Fall war, wurde die Probe nicht weiter verwendet, bzw. daraus erneut RNA präpariert. Besonders die Messungen für die Spleissvarianten von uPAR waren häufig am Rande der Nachweisbarkeit, sodass diese Negativkontrollen besonders wichtig waren, um auch diese geringen Werte interpretieren zu können.

Die absoluten Molekülzahlen, die in der quantitativen RT-PCR gemessen werden, müssen gegen ein sogenanntes *Housekeeping Gen* normalisiert werden. Wir haben uns in dieser Arbeit entschieden, das Gen h-G6PDH aus dem Pentosephosphatweg zu verwenden. Die Normalisierung ist nötig, da es unmöglich ist, immer dieselbe Menge an Gesamt-RNA aus einer Probe zu isolieren, auch nicht unter standardisierten Bedingungen. Sowohl die RNA-Präparation als auch die cDNA-Synthese sind sehr empfindliche Methoden, die von Versuch zu Versuch sehr unterschiedliche Ergebnisse erbringen können. Somit kann man mit den absoluten Werten für das Zielgen noch keine Aussage über seine Expression treffen, sondern erst nach Normalisierung der Daten. Dazu wird die Ratio von Zielgen und Housekeeping Gen gebildet. Bei einer ineffektiven cDNA Synthese ist mit niedrigeren Werten für Ziel- und Housekeeping Gen zu rechnen, die sich in der errechneten Ratio aus beiden aber nicht mehr darstellen sollte.

Unter dem Begriff der Housekeeping Gene fasst man eine heterogene Gruppe zusammen, die für Proteine kodieren, die für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion nötig sind. Hierzu zählen beispielsweise

- β -Actin
- Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)
- Phosphoglycerokinase 1
- β -2-Mikroglobin
- β -Glukuronidase
- Hypoxanthinphosphoribosyltransferase (HPRT)
- TATA-Box Bindingprotein
- Porphobilinogendeaminase (PBGD)
- 18S ribosomale RNA.

Man geht davon aus, dass diese Gene nur einer begrenzten Regulation durch Hypoxie oder andere Stimuli unterliegen. Allerdings ist es fraglich, ob dies überhaupt bei einem Gen der Fall sein kann. Daher empfehlen einige Autoren die Messung mehrerer Gene, um verlässliche Werte zu erhalten (Tricarico et al. 2002, Rubie et al. 2005). Dies würde allerdings einen enormen zusätzlichen finanziellen und auch personellen Aufwand bedeuten, gerade bei der Messung von großen Patientenkollektiven. In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurden 13 verschiedene Gene, die häufig als interne Standards verwendet werden, an malignen und benignen Geweben unterschiedlicher Herkunft untersucht. Die Autoren konnten und wollten keinen Goldstandard festlegen, aber sie empfehlen HPRT als Housekeeping Gen. Nur in Proben mit sehr wenig RNA, z.B. nach Mikrodissektion, könnte seine Expression zu gering sein, um nachweisbar zu sein (De Kok et al. 2005). Auch bei Vandesompele et al. (2002), die die Kombination verschiedener Housekeeping Gene empfehlen, ist HPRT meist bei diesen Genen enthalten.

Für die Arbeit mit Mammakarzinomen werden in der Literatur unterschiedliche Housekeeping Gene empfohlen. Thellin et al. (1999) beispielsweise empfehlen die Messung von rRNA. Andere Autoren verwenden h-G6PDH für Studien an Mammakarzinomen (Ikeda et al. 2000). Es wurde aber auch gezeigt, dass h-GAPDH in Mammakarzinomen überexprimiert ist und dass ein erhöhtes Level mit der Aggressivität von Brustkrebs korreliert (Revillion et al. 2000, Goidin et al. 2001, Desprez et al. 1992, Kletzien et al. 1994).

Uns erscheint es zudem als wichtig, dass die Höhe der Expression des Zielgens und des Housekeeping Gens ungefähr vergleichbar sind. Die h-G6PDH Werte in allen von uns untersuchten Proben lagen innerhalb der Standardkurven von 500 bis 5 Mio Molekülen, wofür nur geringe Verdünnungen der Proben nötig waren. Dadurch konnten Ungenauigkeiten eingeschränkt werden. Bei höheren Verdünnungen wären außerdem die uPAR Spleissvarianten sicherlich in vielen Proben nicht mehr messbar gewesen. Wie wir durch die gemeinsame Arbeit mit unseren Kooperationspartnern in Dresden zeigen konnten, korrelierten die Housekeeping Gene h-G6PDH, GAPDH, HPRT und PBGD statistisch signifikant miteinander. Dieses Kollektiv umfasste zwar nur 55 Proben, aber diese vier Gene scheinen sich für unsere Untersuchungen zu eignen.

Nach der Etablierung der neuen Assays wurde die uPAR mRNA Expression zuerst an *Zelllinien* unterschiedlicher Herkunft und Aggressivität analysiert. Dazu wurden die Zellen

selbst in Kultur genommen oder mit fertiger RNA, bzw. cDNA gearbeitet. In diesen Zelllinien gab es eine große Spannbreite der uPAR Expression, was die unterschiedlichen Eigenschaften der Zelllinien und ihr Wachstumsverhalten widerspiegeln könnte.

Zwischen den uPAR mRNA Werten und den ELISA-Werten für uPAR Antigen konnten wir eine gute Übereinstimmung zeigen. Die Zelllinien mit den höchsten Antigen Werten hatten auch die höchsten mRNA Werte, und umgekehrt.

Des Weiteren konnte in den Zelllinien 1205LU, sBcl-2 und WM 35, die melanozytären Ursprungs sind, aber ein sehr unterschiedlichen Wachstumsmuster haben, eine große Spannbreite der uPAR mRNA Expression gezeigt werden: die metastasierende Zelllinie (1205LU) hat den höchsten uPAR mRNA Gehalt. Wurden die Zellen mit einer siRNA behandelt, die gegen Exon 4 des uPAR Gens gerichtet war, konnte eine starke Inhibierung besonders der uPAR-wt mRNA gezeigt werden. Unerwartet wurde auch die Expression von uPAR-del4+5 herunterreguliert, denn sie sollte eigentlich in dieser Variante keinen Angriffspunkt haben. Allerdings ist die Expressionsrate im Gegensatz zu uPAR-wt sehr gering, und die beobachtete Reduktion betrug nur 56% (bzw. 42% bei gleichzeitiger Behandlung mit PMA).

Durch die Behandlung der Mammakarzinomzelllinien MDA MB 231 und MCF-7 mit Kobalt sollte in ihnen eine Hypoxie induziert werden. Diese Proben standen uns fertig von unseren Kooperationspartnern in Nijmegen zur Verfügung. Dort war eine Induktion der Expression von Carboanhydrase 9 (CA9) beobachtet worden. Von CA9 ist bekannt, dass sie einer starken Regulierung durch Hypoxie unterliegt (Robertson et al. 2004). Wir konnten keine wesentliche Regulierung der mRNA-Expression der proteolytischen Faktoren feststellen. Dies ist insofern überraschend, weil bekannt ist, dass Hypoxie die Aggressivität eines Tumors fördert und dass andererseits durch Hypoxie eine Induktion der proteolytischen Faktoren entsteht, vor allem auch von uPAR (Maity et al. 2000). Lee et al. (2004) konnten dies erst kürzlich an Prostatakarzinomzellen zeigen. Somit stellt sich die Frage, ob die Behandlung mit Kobalt nicht ausgereicht hat, um eine Hypoxie zu induzieren, oder ob man eventuell eine Veränderung der uPAR Expression auf Antigenebene, d.h. eine Regulation auf posttranskriptioneller Ebene hätte nachweisen können.

Nach der Etablierung der Assays und den Messungen an Zelllinien wurde die uPAR mRNA Expression *in vivo* an mehreren *Patientenkollektiven* untersucht. Sie stammten von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom, die in München, Dresden und in Holland operiert worden waren. Da die Proben aus unterschiedlichen Kliniken in verschiedenen Städten kamen, war dies ein sehr heterogenes Kollektiv.

Die Proben aus der Frauenklinik Rechts der Isar in München wurden vor allem zu Beginn der Arbeit verwendet, um die neuen Assays zu testen und zu etablieren. Dafür wurden die Proben eigenständig aufgearbeitet, die RNA extrahiert und in cDNA transkribiert, und im Anschluss die PCRs durchgeführt.

Die *RNA-Extraktion* erfolgte aus Kryoschnitten von Tumorblöcken, die in der Tumorbank der Frauenklinik aufbewahrt werden. Bei diesen Proben wurde vom Operationssaal bis zur cDNA Synthese auf die Einhaltung der Kühlkette geachtet. Nur so konnte sichergestellt werden, dass kein oder zumindest nur ein sehr geringer Abbau von RNA stattgefunden hat. Dies ist insofern wichtig, da die uPAR Varianten häufig an der Nachweisbarkeitsgrenze waren, und bei einer geringeren Menge an RNA wären sie eventuell gar nicht mehr zu messen gewesen. Es wurde immer darauf geachtet, dass die Schnitte von ungefähr gleich großen Gewebestücken angefertigt wurden, um die Menge der extrahierten RNA anzugleichen, aber dennoch war der wichtigste Parameter zur Überprüfung die Messung des Housekeeping Gens h-G6PDH. Tab. 9 zeigt die große Spannbreite der h-G6PDH Werte in den Proben und damit die unterschiedliche Effizienz der RNA-Isolierung und der cDNA-Synthese. Daher ist die Normalisierung gegen ein stabiles Housekeeping Gen so wichtig ist, um verwertbare Ergebnisse zu erhalten. Erst dann können Rückschlüsse über die Expression eines Gens gezogen werden.

Für die *cDNA Synthese* wurde ein *Random Primer* verwendet, der aus einem Gemisch von Hexameren besteht, sodass eine Synthese von zufälligen RNA Sequenzen stattfindet. Die Benutzung eines spezifischen Primers für uPAR, beispielsweise in Exon 1 oder Exon 6, wurde diskutiert, aber wieder verworfen. Dies hätte sicherlich eine größere Menge uPAR cDNA erbracht, da in derselben Zeit nur diese spezifische Reaktion ablaufen würde. Dann allerdings wäre es nötig gewesen, von jeder Tumorprobe mindestens zwei cDNAs herzustellen: für die Messung der uPAR Varianten und des Housekeeping Gens. Für

Messungen an anderen Genen, die man eventuell anschließen möchte, hätte man wiederum eine erneute cDNA herstellen müssen.

Die cDNA Synthese ist jedoch einer der absolut entscheidenden und sensibelsten Schritte in der quantitativen RT-PCR, weil man mit der sehr empfindlichen RNA arbeitet und jede Kontamination vermieden werden muss. Darüber hinaus ist die cDNA Synthese mit jedem Primer unterschiedlich effizient, sodass keine stabilen und vergleichbaren Werte zu erwarten wären. Daher wurde von dieser Idee Abstand genommen. Wir sehen es vielmehr als ideal an, von jeder Probe möglichst nur eine einzige cDNA herzustellen und diese nur ein einziges Mal zu verdünnen, um mit dieser Verdünnung sämtliche Parameter zu messen. Um wirklich sicherzugehen, sollte man von einer Probe mehrere cDNAs herstellen, diese nach der Synthese mischen, eventuell verdünnen und dann direkt aliquotieren und einfrieren. Somit hat man die Möglichkeit, für eine große Menge an Messungen immer auf dieselbe Probe zurückgreifen zu können. Sonst muss man, wenn man beispielsweise von demselben Tumorblock ein weiteres Mal RNA isoliert, in der neuen cDNA wiederum das Housekeeping Gen bestimmen.

Bei den *RT-PCRs* für die uPAR mRNA Varianten mussten nur wenige Proben aus München ausgeschlossen werden, weil in ihrer Negativkontrolle ein Signal gemessen wurde. Dies zeigt aber, wie wichtig es ist, von wirklich jeder neu isolierten RNA eine Negativkontrolle herzustellen. Die uPAR Varianten ließen sich an den Proben aus München nicht nur in Mamma-, sondern auch in Ovarialkarzinomen mit einer relativ großen Spannbreite nachweisen, wobei die Expression der Varianten folgende war: uPAR-wt > uPAR-del5 > uPAR-del4+5.

Immer wieder wird diskutiert, wie sichergestellt werden kann, dass man RNA möglichst nur aus Tumorgewebe und nicht aus dem umgebenden Bindegewebe extrahiert. Die sicherste Alternative wäre, das Gewebe mit Mikrodissektion aufzuarbeiten, also mit einem Laser genau an der Grenze zwischen Tumor- und Bindegewebe zuzuschneiden (Specht et al. 2000). Dies bedeutet allerdings einen sehr viel größeren personellen und apparativen Aufwand und kann nicht überall durchgeführt werden. Für die Tumorbank der Frauenklinik wird beim Schnellschnitt im Institut für Pathologie nur makroskopisch sichtbares Tumorgewebe asserviert. Und wenn man nur direkt aus dem makroskopisch sichtbaren Tumor RNA isoliert und aufarbeitet, sollte die Gefahr relativ gering sein, dass zu viele umgebende gutartige Zellen

enthalten sind. Dennoch kann man kritisieren, dass Schnitte, die nur von einem Teil des Tumorblockes stammen, eventuell nicht repräsentativ für den Tumor sind. Vielmehr könnte man dies erreichen, wenn man den Tumorblock mechanisch aufschließt und dieses Pulver weiterverarbeitet.

Zu diesem Zweck haben wir an einigen wenigen Proben zum Vergleich die Gesamt RNA aus pulverisiertem Gewebe und aus Kryoschnitten isoliert. Trotz der mechanischen Beanspruchung, der das Gewebe beim Aufschluss ausgesetzt ist, konnten wir auch in diesen Proben in der RT-PCR uPAR und h-G6PDH mRNA nachweisen. Offensichtlich ist die RNA noch in ausreichendem Zustand, um damit diese Messungen durchzuführen. Dennoch muss man bei dem mechanischen Aufschluss sicherlich ganz besonders auf die Einhaltung der Kühlkette und der Sauberkeit achten, da die Proben durch ihre vergrößerte Oberfläche sehr empfindlich sind. Durch Messung von Negativproben konnte die Amplifikation von genomischer DNA ausgeschlossen werden. Es kann aber bei dieser geringen Fallzahl keine Aussage getroffen werden, welche Art Gewebe bessere Ergebnisse liefert. Es lässt sich auch schlecht beurteilen, wie die Qualität der RNA ist und ob die Ergebnisse reproduzierbar sind. Hierzu wären weitere Experimente notwendig.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Extraktion von RNA aus mechanisch aufgeschlossenem Gewebe möglich ist, die RT-PCR Assays für diesen Zweck aber sicher noch weiter optimiert sein sollten. Die Assays sollten so kurz wie möglich sein, am besten nur geringfügig über 100 bp. Wir hatten in unseren Assays mit Amplikongrößen von > 300 bp daher nicht die optimalen Bedingungen, um mit dieser Art von Proben zu arbeiten. Man muss davon ausgehen, dass ein Teil der RNA sicherlich nur noch in Fragmenten vorhanden ist, und wenn die Primer nahe beieinander liegen, wäre die Wahrscheinlichkeit höher, dass sie binden.

In dem relativ großen Patientenkollektiv, das uns aus dem Universitätsklinikum in *Nijmegen* zur Verfügung stand, haben wir die Korrelation der proteolytischen Faktoren mit klinischen Parametern verglichen. Ein Teil der Proben wurden von der Analyse ausgeschlossen, da die h-G6PDH Werte sehr niedrig waren. Wir konnten keine statistisch signifikante Korrelation der uPAR-del5 oder uPAR-wt mRNA zum Nodalstatus, der Tumorgröße oder dem Grading der Patientinnen feststellen. Es fiel aber auf, dass höhere uPAR-del5 Werte signifikant mit einem negativen Östrogenrezeptorstatus assoziiert waren. Pierga et al. (2005) haben disseminierte

Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen untersucht. Dort war ein höherer uPAR mRNA Wert mit aggressiveren, Östrogenrezeptor-negativen Tumoren assoziiert.

In weiterführenden Untersuchungen, die auf dieser Arbeit basieren, konnte zwar eine klinische Relevanz von uPAR-del45 mRNA, besonders in Kombination mit TIMP-3 mRNA, gezeigt werden, allerdings nicht von uPAR-del5 oder uPAR-wt (Kotzsch et al. 2005). In einem ähnlichen methodischen Ansatz wurde die Expression der *full length* Kallikrein 7 (KLK 7) mRNA bei Brustkrebs untersucht, und hierbei zeigte sich, dass Patientinnen mit einer hohen Expression eine bessere Prognose als solche mit niedriger Expression hatten (Holzscheiter et al. 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in der Fragestellung gestellten Aufgaben folgendermaßen beantwortet werden können:

1. Es wurden erfolgreich quantitative *real-time* RT-PCR Assays für die uPAR mRNA Spleissvarianten uPAR-wt und uPAR-del5 etabliert.
2. Die uPAR mRNA Varianten uPAR-wt, uPAR-del5 und uPAR-del4+5 wurden in verschiedenen Zelllinien gemessen. Es zeigte sich eine große Spannbreite zwischen den Zellen unterschiedlicher Herkunft und Dignität.
3. Die proteolytischen Parameter wurden an verschiedenen Kollektiven von Patientenproben gemessen. Das Verhältnis, wie auch bei den Zelllinien, war immer uPAR-wt > uPAR-del5 > uPAR-del4+5. Der Vergleich mit den klinischen Daten der Patientinnen zeigte keine prognostische Relevanz der uPAR mRNA, gleich welcher Variante. Allerdings war in den Östrogenrezeptornegativen (und damit aggressiveren) Tumoren die uPAR-del5 Expression signifikant höher als in hormonsensitiven Proben.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Bedeutung von proteolytischen Faktoren allgemein und des uPA/PAI Systems im Besonderen in Hinblick auf Tumorerkrankungen ist vielfach gezeigt worden. Durch ihr Zusammenspiel ermöglichen sie es Tumorzellen, sich über Basalmembranen hinwegzusetzen und sich im Körper auszubreiten. Besonders auch beim Mammakarzinom konnte dieser Zusammenhang gezeigt werden. Da der Urokinase Rezeptor uPAR (CD87) die proteolytische Aktivität der Urokinase auf die Oberfläche von Tumorzellen bindet, spielt er eine zentrale Rolle in diesem Prozess.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, quantitative *real-time* RT-PCR Assays zum Nachweis der uPAR mRNA Formen uPAR-del5 und uPAR-wt zu entwickeln. Der Vorteil der mRNA Analyse ist einerseits, dass sie sehr rasche Ergebnisse liefert und andererseits nur sehr wenig Gewebe benötigt wird. Es wurden stabile Assays entwickelt, die auf der LightCycler Technologie basieren. Bei beiden Assays konnte eine hohe Spezifität und Sensitivität bestätigt werden. Durch die Verwendung von Standards mit 10^1 bis 10^5 Molekülen konnten auch sehr geringe Mengen der uPAR mRNA Spleissvarianten nachgewiesen werden.

Nach Etablierung der Assays wurde eine Reihe von Zelllinien sehr unterschiedlicher Herkunft untersucht. Es zeigte sich, dass die uPAR mRNA Werte je nach Herkunft und Aggressivität der Zellen stark variierten und sehr gut mit den uPAR Antigenwerten korreliert werden konnten. Die Abstufung der Expression der uPAR mRNA Formen war uPAR-wt > uPAR-del5 > uPAR-del4+5.

In mehreren Kollektiven von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom aus verschiedenen Kliniken wurde das Verhältnis der uPAR mRNA Expression zu klinischen Parametern untersucht. Auch hier gab es eine große Bandbreite der uPAR mRNA Expression, wobei die verschiedenen Varianten des Gens sehr stark miteinander korrelierten. Im Hinblick auf den Nodalstatus, das Grading des Tumors und beispielsweise auch des Menopausenstatus gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede. Allerdings zeigte sich, dass in Östrogenrezeptornegativen (und damit aggressiveren) Tumoren die uPAR-del5 Expression signifikant höher war als in hormonsensitiven Proben.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Allgayer H, Heiss MM, Riesenberger R, Grutzner KU, Tarabichi A, Babic R, Schildberg FW. Urokinase plasminogen activator receptor (uPA-R): one potential characteristic of metastatic phenotypes in minimal residual tumor disease. *Cancer Res* 1997; 57(7): 1394-9.

Almholt K, Lund LR, Rygaard J, Nielsen BS, Dano K, Romer J, Johnsen M. Reduced metastasis of transgenic mammary cancer in urokinase-deficient mice. *Int J Cancer* 2005; 113(4): 525-32.

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

Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57(1): 25-40.

Appella E, Robinson EA, Ullrich SJ, Stoppelli MP, Corti A, Cassani G, Blasi F. The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases. *J Biol Chem* 1987; 262(10): 4437-40.

Armstrong K, Eisen A, Weber B. Assessing the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 564-71.

Aumailley M, Gayraud B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med* 1998; 76(3-4): 253-65. Review.

Backe J. Brustkrebs beim Mann. *Dtsch Arztebl* 2002; 99: A 1168–72.

Bässler R. Mamma. In: Remmele W (ed) *Pathologie Band 4*. Springer, Berlin, Heidelberg.

Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, Skobe M, Fusenig NE, Carmeliet P, Collen D, Foidart JM. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med* 1998; 4(8): 923-8.

Bayraktutan U, Jones P. Expression of the human gene encoding urokinase plasminogen activator receptor is activated by disruption of the cytoskeleton. *Exp Cell Res* 1995; 221(2): 486-95.

Behrendt N, Ronne E, Dano K. Domain interplay in the urokinase receptor. Requirement for the third domain in high affinity ligand binding and demonstration of ligand contact sites in distinct receptor domains. *J Biol Chem* 1996; 271: 22885-94.

Behrendt N. The urokinase receptor (uPAR) and the uPAR-associated protein (uPARAP/Endo180): membrane proteins engaged in matrix turnover during tissue remodeling. *Biol Chem* 2004; 385(2): 103-36. Review.

Besch R, Giovannangeli C, Kammerbauer C, Degitz K. Specific inhibition of ICAM-1 expression mediated by gene targeting with triplex-forming oligonucleotides. *J Biol Chem* 2002; 277(36): 32473-9.

Bieche I, Lidereau R. Increased level of exon 12 alternatively spliced BRCA2 transcripts in tumor breast tissue compared with normal tissue. *Cancer Res* 1999; 59(11): 2546-50.

Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 2003; 72: 291-336. Epub 2003 Feb 27.

Blasi F, Vassalli JD, Dano K. Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *J Cell Biol* 1987; 104(4): 801-4. Review.

Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signaling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 932-43.

Bohuslav J, Horejsi V, Hansmann C, Stockl J, Weidle UH, Majdic O, Bartke I, Knapp W, Stockinger H. Urokinase plasminogen activator receptor, beta 2-integrins, and Src-kinases within a single receptor complex of human monocytes. *J Exp Med* 1995; 181(4): 1381-90.

Bolon I, Zhou HM, Charron Y, Wohlwend A, Vassalli JD. Plasminogen mediates the pathological effects of urokinase-type plasminogen activator overexpression. *Am J Pathol* 2004; 164(6): 2299-304.

Borgfeldt C, Bendahl PO, Gustavsson B, Langstrom E, Ferno M, Willen R, Grenman S, Casslen B. High tumor tissue concentration of urokinase plasminogen activator receptor is associated with good prognosis in patients with ovarian cancer. *Int J Cancer* 2003; 107(4): 658-65.

Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(8): 793-802.

Brinkman BM. Splice variants as cancer biomarkers. *Clin Biochem* 2004 Jul; 37(7): 584-94. Review.

Bugge TH, Flick MJ, Danton MJ, Daugherty CC, Romer J, Dano K, Carmeliet P, Collen D, Degen JL. Urokinase-type plasminogen activator is effective in fibrin clearance in the absence of its receptor or tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(12): 5899-904.

Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord JJ, Collen D, Mulligan RC. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 1994; 368(6470): 419-24.

Carriero MV, Del Vecchio S, Capozzoli M, Franco P, Fontana L, Zannetti A, Botti G, D'Aiuto G, Salvatore M, Stoppelli MP. Urokinase receptor interacts with alpha(v)beta5 vitronectin receptor, promoting urokinase-dependent cell migration in breast cancer. *Cancer Res* 1999; 59(20): 5307-14.

Casella R, Shariat SF, Monoski MA, Lerner SP. Urinary levels of urokinase-type plasminogen activator and its receptor in the detection of bladder carcinoma. *Cancer* 2002; 95(12): 2494-9.

Casey JR, Petranka JG, Kottra J, Fleenor DE, Rosse WF. The structure of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene. *Blood* 1994; 84: 1151-6.

Chavakis T, Kanse SM, Lupu F, Hammes HP, Muller-Esterl W, Pixley RA, Colman RW, Preissner KT. Different mechanisms define the antiadhesive function of high molecular weight kininogen in integrin- and urokinase receptor-dependent interactions. *Blood* 2000; 96(2): 514-22.

Cheng JC, Moore TB, Sakamoto KM. RNA interference and human disease. *Mol Genet Metab* 2003; 80(1-2): 121-8.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.

Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res* 1992; 20(7): 1717-23.

Claus EB, Risch N, Thompson WD. Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. *Cancer*. 1994; 73(3): 643-51.

Costantini V, Sidoni A, Devegilia R, Cazzato OA, Bellezza G, Ferri I, Bucciarelli E, Nenci GG. Combined overexpression of urokinase, urokinase receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 is associated with breast cancer progression: an immunohistochemical comparison of normal, benign, and malignant breast tissues. *Cancer* 1996; 77(6): 1079-88.

Crowley CW, Cohen RL, Lucas BK, Liu G, Shuman MA, Levinson AD. Prevention of metastasis by inhibition of the urokinase receptor. *PNAS* 1993; 90: 5021-5.

D'Alessio S, Margheri F, Pucci M, Del Rosso A, Monia BP, Bologna M, Leonetti C, Scarsella M, Zupi G, Fibbi G, Del Rosso M. Antisense oligodeoxynucleotides for urokinase-plasminogen activator receptor have anti-invasive and anti-proliferative effects in vitro and inhibit spontaneous metastases of human melanoma in mice. *Int J Cancer* 2004; 110(1): 125-33.

Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 1985; 44: 139-266.

Dano K, Behrendt N, Hoyer-Hansen G, Johnsen M, Lund LR, Ploug M, Romer J. Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost* 2005; 93(4): 676-81.

Degryse B, Orlando S, Resnati M, Rabbani SA, Blasi F. Urokinase/urokinase receptor and vitronectin/alpha(v)beta(3) integrin induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization through different signaling pathways. *Oncogene* 2001; 20: 2032-43.

Degryse B, Resnati M, Czekay RP, Loskutoff DJ, Blasi F. Domain 2 of the urokinase receptor contains an integrin-interacting epitope with intrinsic signaling activity: generation of a new integrin inhibitor. *J Biol Chem*. 2005 Apr 29.

Deng G, Curriden SA, Wang S, Rosenberg S, Loskutoff DJ. Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? *J Cell Biol* 1996; 134(6): 1563-71.

de Bock CE, Wang Y. Clinical significance of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression in cancer. *Med Res Rev* 2004; 24(1): 13-39. Review.

de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 2005; 85(1): 154-9.

De Petro G, Taviani D, Copeta A, Portolani N, Giulini SM, Barlati S. Expression of urokinase-type plasminogen activator (u-PA), u-PA receptor, and tissue-type PA messenger RNAs in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58(10): 2234-9.

Desprez PY, Poujol D, Saez S. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, E.C. 1.2.1.12.) gene expression in two malignant human mammary epithelial cell lines: BT-20 and MCF-7. Regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25-(OH)₂D₃). *Cancer Lett* 1992; 64(3): 219-24.

Dewerchin M, van Nuffelen AV, Wallays G, Bouché A, Moons L, Carmeliet P, Mulligan RC, Collen D. Generation and characterization of urokinase receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 1996; 97: 870-8.

Dong Y, Kaushal A, Brattsand M, Nicklin J, Clements J. Differential splicing of KLK5 and KLK7 in epithelial ovarian cancer produces novel variants with potential as cancer biomarkers. *Clin Cancer Res* 2003; 9(5): 1710-20.

Duffy MJ. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des* 2004; 10(1): 39-49.

Duffy MJ. Predictive Markers in Breast and Other Cancers: A Review. *Clin Chem* 2005; 51(3): 494-503. Epub 2005 Jan 6. Review.

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(3): 161-74. Review.

Fazioli F, Resnati M, Sidenius N, Higashimoto Y, Appella E, Blasi F. A urokinase-sensitive region of the human urokinase receptor is responsible for its chemotactic activity. *EMBO J* 1997; 16: 7279-86.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D. GLOBOCAN 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, Version 1.0. IARC Cancer Base No. 5. IARC Press. <http://www.dep.iarc.fr/globocan/globocan.html>

Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, Jeong JH, Wolmark N. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347(16): 1233-41.

Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Kramer MD, Brunner N, Janicke F, Meijer-van Gelder ME, Henzen-Logmans SC, van Putten WL, Klijn JG. The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res* 2000; 60(3): 636-43.

Funke I, Schraut W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *JCO* 1998; 16(2): 557-66.

Gargiulo L, Longanesi-Cattani I, Bifulco K, Franco P, Raiola R, Campiglia P, Grieco P, Peluso G, Stoppelli MP, Carriero MV. Cross-talk between fMLP and vitronectin receptors triggered by urokinase receptor-derived *SRSRY* peptide. *J Biol Chem* 2005; 280(26): 25225-32.

Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem* 2001; 295(1): 17-21.

Goretzki L, Schmitt M, Mann K, Calvete J, Chucholowski N, Kramer M, Gunzler WA, Janicke F, Graeff H. Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. *FEBS Lett* 1992; 297(1-2): 112-8.

Goss PE. Preventing Relapse Beyond 5 Years: The MA.17 Extended Adjuvant Trial. *Semin Oncol.* 2006; 33(2 Suppl 7): 8-12.

Gunzler WA, Steffens GJ, Otting F, Buse G, Flohe L. Structural relationship between human high and low molecular mass urokinase. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1982; 363(2): 133-41.

Guo Y, Mazar AP, Lebrun JJ, Rabbani SA. An antiangiogenic urokinase-derived peptide combined with tamoxifen decreases tumor growth and metastasis in a syngeneic model of breast cancer. *Cancer Res.* 2002; 62(16): 4678-84.

Guthaus E, Burgle M, Schmiedeberg N, Hocke S, Eickler A, Kramer MD, Sweep CG, Magdolen V, Kessler H, Schmitt M. uPA-silica-Particles (SP-uPA): a novel analytical system to investigate uPA-uPAR interaction and to test synthetic uPAR antagonists as potential cancer therapeutics. *Biol Chem* 2002; 383(1): 207-16.

Hansen LV, Gardsvoll H, Nielsen BS, Lund LR, Dano K, Jensen ON, Ploug M. Structural analysis and tissue localization of human C4.4A: a protein homologue of the urokinase receptor. *Biochem J* 2004; 380: 845-57.

Harbeck N, Kates R, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb Haemost* 2004; 91: 450-6.

Harbeck N, Kates RE, Schmitt M, Gauger K, Kiechle M, Janicke F, Thomassen C, Look MP, Foekens JA. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 predict disease outcome and therapy response in primary breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2004; 5(5): 348-52. Review.

Harvey SR, Hurd TC, Markus G, Martinick MI, Penetrante RM, Tan D, Venkataraman P, DeSouza N, Sait SN, Driscoll DL, Gibbs JF. Evaluation of urinary plasminogen activator, its receptor, matrix metalloproteinase-9, and von Willebrand factor in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9(13): 4935-43.

Holzschleiter L, Biermann JC, Kotsch M, Prezas P, Farthmann J, Baretton G, Luther T, Tjan-Heijnen VC, Talieri M, Schmitt M, Sweep FC, Span PN, Magdolen V. Quantitative Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of mRNA Encoding Full-Length Human Tissue Kallikrein 7: Prognostic Relevance of KLK7 mRNA Expression in Breast Cancer. *Clin Chem* 2006; 52(6): 1070-9.

Honig A, Rieger L, Sutterlin M, Dietl J, Solomayer EF. Preoperative chemotherapy and endocrine therapy in patients with breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2004; 5(3): 198-207. Review.

Ichinose A, Fujikawa K, Suyama T. The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. *J Biol Chem* 1986; 261(8): 3486-9.

Ikeda N, Miyoshi Y, Motomura K, Inaji H, Koyama H, Noguchi S. Prognostic significance of occult bone marrow micrometastases of breast cancer detected by quantitative polymerase chain reaction for cytokeratin 19 mRNA. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91(9): 918-24.

Jang JH. Identification and characterization of soluble isoform of fibroblast growth factor receptor 3 in human SaOS-2 osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292(2): 378-82.

Janicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M; German N0 Study Group. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(12): 913-20.

Jo M, Thomas KS, Wu L, Gonias SL. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits cancer cell growth and invasion by direct urokinase-independent effects on cell signaling. *J Biol Chem* 2003; 278(47): 46692-8.

Johnsen M, Lund LR, Romer J, Almholt K, Dano K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10(5): 667-71.

Kaufmann M, Graf E, Jonat W, Eiermann W, Geberth M, Albert US, Gademann G, Conrad B, Stahl K, von Minckwitz G, Schumacher M; German Adjuvant Breast Cancer Group. Tamoxifen versus control after adjuvant, risk-adapted chemotherapy in postmenopausal, receptor-negative patients with breast cancer: a randomized trial (GABG-IV D-93)--the German Adjuvant Breast Cancer Group. *J Clin Oncol* 2005; 23(31): 7842-8.

Kellogg DE, Rybalkin I, Chen S, Mukhamedova N, Vlasik T, Siebert PD, Chenchik A. TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques* 1994; 16(6):1134-7.

Kenemans P, Verstraeten RA, Verheijen RH. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas*. 2004; 49(1): 34-43.

Kjoller L. The urokinase plasminogen activator receptor in the regulation of the actin cytoskeleton and cell motility. *Biol Chem* 2002; 383(1): 5-19. Review.

Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J* 1994; 8(2):174-81. Review.

Kobayashi H, Schmitt M, Goretzki L, Chucholowski N, Calvete J, Kramer M, Gunzler WA, Janicke F, Graeff H. Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (Pro-uPA). *J Biol Chem* 1991; 266(8): 5147-52.

Köhler T, Lerche D, Meye A, Weisbrich C, Wagner O. Automated analysis of nucleic acids by quantitative PCR using coated ready-to-use reaction tubes. *J Lab Med* 1999; 23: 408-14.

Kotzsch M, Luther T, Harbeck N, Ockert D, Lutz V, Noack F, Grossmann D, Albrecht S, Kramer MD, Lossnitzer A, Grosser M, Schmitt M, Magdolen V. New ELISA for quantitation of human urokinase receptor (CD87) in cancer. *Int J Oncol* 2000; 17: 827-34.

Kotzsch M, Farthmann J, Meye A, Fuessel S, Baretton G, Tjan-Heijnen VC, Schmitt M, Luther T, Sweep FC, Magdolen V, Span PN. Prognostic relevance of uPAR-del4/5 and TIMP-3 mRNA expression levels in breast cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41(17): 2760-8.

Kreienberg R, Kopp I, Lorenz W, Budach W, Dunst J, Lebeau A, Lück H-J, v. Minckwitz G, Possinger K, Sauerbrei W, Sauerland S, Souchon R, Thomssen C, Untch M, Volm T, Weis J, Schmitt-Reißer B, Koller M, Heilmann V. Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Frau. Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (Hrsg.). Eine nationale S3-Leitlinie. Juni 2004.

Krüger A, Soeltl R, Lutz V, Wilhelm OG, Magdolen V, Rojo EE, Hantzopoulos PA, Graeff H, Gansbacher B, Schmitt M. Reduction of breast carcinoma tumor growth and lung colonization by overexpression of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87). *Cancer Gene Ther* 2000; 7(2): 292-9.

Kute TE, Russell GB, Zbieranski N, Long R, Johnston S, Williams H, Stackhouse C, Wilkins L, Evans I, Berry P, Rimmer K, Tucker E. Prognostic markers in node-negative breast cancer: a prospective study. *Cytometry B Clin Cytom* 2004; 59B(1): 24-31.

Lee KH, Bae SH, Lee JL, Hyun MS, Kim SH, Song SK, Kim HS. Relationship between urokinase-type plasminogen receptor, interleukin-8 gene expression and clinicopathological features in gastric cancer. *Oncology* 2004; 66(3): 210-7.

Lee KH, Choi EY, Hyun MS, Kim JR. Involvement of MAPK pathway in hypoxia-induced up-regulation of urokinase plasminogen activator receptor in a human prostatic cancer cell line, PC3MLN4. *Exp Mol Med* 2004; 36(1): 57-64.

Lin Y, Harris RB, Yan W, McCrae KR, Zhang H, Colman RW. High molecular weight kininogen peptides inhibit the formation of kallikrein on endothelial cell surfaces and subsequent urokinase-dependent plasmin formation. *Blood* 1997; 90(2): 690-7.

Liu S, Aaronson H, Mitola DJ, Leppla SH, Bugge TH. Potent antitumor activity of a urokinase-activated engineered anthrax toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 657-62.

Llinas P, Le Du MH, Gardsvoll H, Dano K, Ploug M, Gilquin B, Stura E, Menez A. Crystal structure of the human Urokinase plasminogen activator receptor bound to an antagonist peptide. *EMBO J* 2005; 24(9): 1655-63.

Löffler G, Petrides P (Hrsg.). *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 4. Auflage 1997.

Loskutoff DJ, Curriden SA, Hu G, Deng G. Regulation of cell adhesion by PAI-1. *APMIS* 1999; 107(1): 54-61.

Luther T, Kotsch M, Meye A, Langerholc T, Füssel S, Olbricht N, Albrecht S, Ockert D, Muehlenweg B, Friedrich K, Grosser M, Schmitt M, Baretton G, Magdolen V. Identification of a novel urokinase receptor splice variant and its prognostic relevance in breast cancer. *Thromb Haemost* 2003; 89: 705-17.

Lutz V, Reuning U, Kruger A, Luther T, von Steinburg SP, Graeff H, Schmitt M, Wilhelm OG, Magdolen V. High level synthesis of recombinant soluble urokinase receptor (CD87) by ovarian cancer cells reduces intraperitoneal tumor growth and spread in nude mice. *Biol Chem* 2001; 382(5): 789-98.

Magdolen U, Krol J, Sato S, Mueller MM, Krüger A, Sperl S, Schmitt M, Magdolen V. Natural inhibitors of tumor-associated proteases. *Radiol Oncol* 2002; 36: 131-43.

Magklara A, Scorilas A, Katsaros D, Massobrio M, Yousef GM, Fracchioli S, Danese S, Diamandis EP. The human KLK8 (neuropsin/ovasin) gene: identification of two novel splice variants and its prognostic value in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 806-11.

Maity A, Solomon D. Both increased stability and transcription contribute to the induction of the urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) message by hypoxia. *Exp Cell Res* 2000; 255(2): 250-7.

May AE, Schmidt R, Kanse SM, Chavakis T, Stephens RW, Schomig A, Preissner KT, Neumann FJ. Urokinase receptor surface expression regulates monocyte adhesion in acute myocardial infarction. *Blood* 2002; 100(10): 3611-7.

Mazar AP, Henkin J, Goldfarb RH. The urokinase plasminogen activator system in cancer: implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Angiogenesis* 1999; 3(1): 15-32.

Mazzieri R, Blasi F. The urokinase receptor and the regulation of cell proliferation. *Thromb Haemost* 2005; 93(4): 641-6.

Moller LB, Pollanen J, Rønne E, Pedersen N, Blasi F. N-linked glycosylation of the ligand-binding domain of the human urokinase receptor contributes to the affinity for its ligand. *J Biol Chem* 1993; 268: 11152-9.

Montuori N, Carriero M, Salzano S, Rossi G, Ragno P. The cleavage of the urokinase receptor regulates its multiple functions. *J Biol Chem* 2002; 277: 46932-9.

Montuori N, Visconte V, Rossi G, Ragno P. Soluble and cleaved forms of the urokinase-receptor: degradation products or active molecules? *Thromb Haemost* 2005; 93(2): 192-8.

Muehlenweg B, Sperl S, Magdolen V, Schmitt M, Harbeck N. Interference with the urokinase plasminogen activator system: a promising therapy concept for solid tumours. *Expert Opin Biol Ther* 2001; 1(4): 683-91. Review.

Nielsen BS, Sehested M, Duun S, Rank F, Timshel S, Rygaard J, Johnsen M, Dano K. Urokinase plasminogen activator is localized in stromal cells in ductal breast cancer. *Lab Invest.* 2001; 81(11): 1485-501.

Nordengren J, Pilka R, Noskova V, Ehinger A, Domanski H, Andersson C, Hoyer-Hansen G, Hansson SR, Casslen B. Differential localization and expression of urokinase plasminogen activator (uPA), its receptor (uPAR), and its inhibitor (PAI-1) mRNA and protein in endometrial tissue during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 2004; 10(9): 655-63.

Nykjaer A, Conese M, Christensen EI, Olson D, Cremona O, Gliemann J, Blasi F. Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *EMBO J.* 1997; 16(10): 2610-20.

Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA. Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12(5): 613-20. Review.

Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2004 Dec; 351(27): 2817-26. Epub 2004 Dec 10.

Pedersen N, Schmitt M, Ronne E, Nicoletti MI, Hoyer-Hansen G, Conese M, Giavazzi R, Dano K, Kuhn W, Janicke F. A ligand-free, soluble urokinase receptor is present in the ascitic fluid from patients with ovarian cancer. *J Clin Invest* 1993; 92(5): 2160-7.

Pierga JY, Bonneton C, Magdelenat H, Vincent-Salomon A, Nos C, Boudou E, Pouillart P, Thiery JP, de Cremoux P. Real-time quantitative PCR determination of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression of isolated micrometastatic cells from bone marrow of breast cancer patients. *Int J Cancer* 2005; 114(2): 291-8.

Ploug M, Ronne E, Behrendt N, Jensen AL, Blasi F, Dano K. Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *J Biol Chem* 1991; 266(3): 1926-33.

Ploug M, Kjalke M, Ronne E, Weidle U, Hoyer-Hansen G, Dano K. Localization of the disulfide bonds in the NH₂-terminal domain of the cellular receptor for human urokinase-type plasminogen activator. A domain structure belonging to a novel superfamily of glycolipid-anchored membrane proteins. *J Biol Chem* 1993; 268(23): 17539-46.

Ploug M. Structure-function relationships in the interaction between the urokinase-type plasminogen activator and its receptor. *Curr Pharm Des* 2003; 9(19): 1499-528. Review.

Pluskota E, Soloviev DA, Plow EF. Convergence of the adhesive and fibrinolytic systems: recognition of urokinase by integrin alpha Mbeta 2 as well as by the urokinase receptor regulates cell adhesion and migration. *Blood* 2003; 101(4): 1582-90.

Pyke C, Kristensen P, Ralfkiaer E, Grondahl-Hansen J, Eriksen J, Blasi F, Dano K. Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas. *Am J Pathol* 1991; 138(5): 1059-67.

Pyke C, Eriksen J, Solberg H, Nielsen BS, Kristensen P, Lund LR, Dano K. An alternatively spliced variant of mRNA for the human receptor for urokinase plasminogen activator. *FEBS Lett* 1993; 326(1-3): 69-74.

Pyke C, Graem N, Ralfkiaer E, Ronne E, Hoyer-Hansen G, Brunner N, Dano K. Receptor for urokinase is present in tumor-associated macrophages in ductal breast carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53(8): 1911-5.

Rabbani SA, Desjardins J, Bell AW, Banville D, Mazar A, Henkin J, Goltzman D. An amino-terminal fragment of urokinase isolated from a prostate cancer cell line (PC-3) is mitogenic for osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173(3): 1058-64.

Rabbani SA, Mazar AP. The role of the plasminogen activation system in angiogenesis and metastasis. *Surg Oncol Clin N Am* 2001; 10(2): 393-415. Review.

Ragno P, Montuori N, Covelli B, Hoyer-Hansen G, Rossi G. Differential expression of a truncated form of the urokinase-type plasminogen-activator receptor in normal and tumor thyroid cells. *Cancer Res* 1998; 58(6): 1315-9.

Reuning U, Sperl S, Kopitz C, Kessler H, Krüger A, Schmitt M, Magdolen V. 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* 2003; 9: 1529-43.

Revillion, Pawlowski V, Hornez L, Peyrat JP. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36(8): 1038-42.

Robertson N, Potter C, Harris AL. Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion. *Cancer Res* 2004; 64(17): 6160-5.

Roelofs JJ, Rowshani AT, van den Berg JG, Claessen N, Aten J, ten Berge IJ, Weening JJ, Florquin S. Expression of urokinase plasminogen activator and its receptor during acute renal allograft rejection. *Kidney Int* 2003; 64(5): 1845-53.

Roldan AL, Cubellis MV, Masucci MT, Behrendt N, Lund LR, Danø K, Appella E, Blasi F. Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J* 1990; 9: 467-74.

Romer J, Bugge TH, Pyke C, Lund LR, Flick MJ, Degen JL, Dano K. Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. *Nat Med* 1996; 2(3): 287-92.

Romer J, Nielsen BS, Ploug M. The urokinase receptor as a potential target in cancer therapy. *Curr Pharm Des* 2004; 10(19): 2359-76.

Rubie C, Kempf K, Hans J, Su T, Tilton B, Georg T, Brittner B, Ludwig B, Schilling M. Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Mol Cell Probes* 2005; 19(2): 101-9. Epub 2004 Dec 15.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732): 1350-4.

Sappino AP, Belin D, Huarte J, Hirschel-Scholz S, Saurat JH, Vassalli JD. Differential protease expression by cutaneous squamous and basal cell carcinomas. *J Clin Invest.* 1991; 88(4): 1073-9.

Selvarajan S, Lund LR, Takeuchi T, Craik CS, Werb Z. A plasma kallikrein-dependent plasminogen cascade required for adipocyte differentiation. *Nat Cell Biol* 2001; 3(3): 267-75.

Schiemann S, Ruckels M, Engelholm LH, Schwirzke M, Brunner N, Weidle UH. Differential gene expression in human mammary carcinoma cells: identification of a new member of a receptor family. *Anticancer Res* 1997; 17: 13-20.

Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Muller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmuller G, Eils R, Klein CA. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(13): 7737-42.

Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reuning U, Ulm K, Hofler H, Janicke F, Graeff H. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost.* 1997; 78(1): 285-96. Review.

Shliom O, Huang M, Sachais B, Kuo A, Weisel JW, Nagaswami C, Nassar T, Bdeir K, Hiss E, Gawlak S, Harris S, Mazar A, Higazi AA. Novel interactions between urokinase and its receptor. *J Biol Chem* 2000; 275(32): 24304-12.

Sidenius N, Blasi F. The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advantages and implication for prognosis and therapy. *Cancer Metast Rev* 2003; 22: 205-22.

Sobel, G, Mohler S, Jones N, Dowdy A, Guest M. Urokinase: an activator of plasma profibrinolysin extracted from urine. *Am J Physiol* 1952; 171: 768-9.

Span PN, Tjan-Heijnen VC, Manders P, Beex LV, Sweep CG. Cyclin-E is a strong predictor of endocrine therapy failure in human breast cancer. *Oncogene* 2003; 22: 4898-904.

Specht K, Richter T, Muller U, Walch A, Hofler MW. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival tissue by real-time RT-PCR. *J Mol Med* 2000; 78(7): B27.

Sperl S, Mueller MM, Wilhelm OG, Schmitt M, Magdolen V, Moroder L. The uPA/uPA receptor system as a target for tumor therapy. *Drug News Perspect* 2001; 14 (7): 401-11.

Statistisches Bundesamt: <http://www.destatis.de>

Sweep CG, Geurts-Moespot J. EORTC external quality assurance program for ER and PgR measurements: trial 1998/1999. European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *Int J Biol Markers* 2000; 15: 62-9.

Takayama TK, McMullen BA, Nelson PS, Matsumura M, Fujikawa K. Characterization of hK4 (prostase), a prostate-specific serine protease: activation of the precursor of prostate specific antigen (pro-PSA) and single-chain urokinase-type plasminogen activator and degradation of prostatic acid phosphatase. *Biochemistry* 2001; 40 (50): 15341-8.

Tecimer C, Doering DL, Goldsmith LJ, Meyer JS, Abdulhay G, Wittliff JL. Clinical relevance of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and its inhibitor type 1 in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2001; 80(1): 48-55.

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 1999; 75(2-3): 291-5.

Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* 2002; 309(2): 293-300.

Turk V, Kos J, Turk B. Cysteine cathepsins (proteases)--on the main stage of cancer? *Cancer Cell* 2004; 5(5): 409-10.

UICC (2002) TNM classification of malignant tumours, 6th ed. Wiley-Liss, Inc, New York

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3(7): RESEARCH0034. Epub 2002 Jun 18.

Vassalli JD, Baccino D, Belin D. A cellular binding site for the Mr 55,000 form of human urokinase plasminogen activator. *J Cell Biol* 1985; 100: 86-92.

Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, Aguilar M, Marubini E. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347(16): 1227-32.

Vu Th, Werb Z. Matrix metalloproteinases effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000; 14: 2123-33.

Wang H, Yu A, Wiman B, Pap S. Identification of amino acids in antiplasmin involved in its noncovalent 'lysine-binding-site'-dependent interaction with plasmin. *Eur J Biochem* 2003; 270(9): 2023-9.

Wei Y, Waltz DA, Rao N, Drummond RJ, Rosenberg S, Chapman HA. Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin. *J Biol Chem* 1994; 269(51): 32380-8.

Whelan TJ, Julian J, Wright J, Jadad AR, Levine ML. Does locoregional radiation therapy improve survival in breast cancer? A meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2000; 18(6): 1220-9.

Wilhelm OG, Wilhelm S, Escott GM, Lutz V, Magdolen V, Schmitt M, Rifkin DB, Wilson EL, Graeff H, Brunner G. Cellular glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D regulates urokinase receptor shedding and cell surface expression. *J Cell Physiol* 1999; 180(2): 225-35.

Wu JY, Tang H, Havlioglu N. Alternative pre-mRNA splicing and regulation of programmed cell death. *Prog Mol Subcell Biol* 2003; 31: 153-85.

Zhou BP, Li Y, Hung MC. HER-2/Neu signaling and therapeutic approaches in breast cancer. *Breast Dis* 2002; 15: 13-24.

Zhou HM, Nichols A, Meda P, Vassalli JD. Urokinase-type plasminogen activator and its receptor synergize to promote pathogenic proteolysis. *EMBO J* 2000; 19(17): 4817-26.

7. ANHANG

7.1. Abkürzungen

A	Adenosin
B2M	Beta-2-Mikroglobulin
Bp	<i>Base pairs</i> , Basenpaare
C	Cytosin
CA-9	Carboanhydrase 9
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CP	<i>Crossing Point</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i> , enzymgekoppelter Immunabsorptionstest
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> , Fibroblastenwachstumsfaktor
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h-G6PDH	Humane Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl- Transferase
kD	Kilodalton
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
nM	Nanomol

NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1
PBGD	Porphobilinogendeaminase
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription, Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions- Polymerasekettenreaktion
siRNA	Small Interfering RNA
T	Thymin
TAE	Puffer aus Tris, XXX und EDTA
TBE	Puffer aus Tris, Borsäure und EDTA
Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
U	<i>Unit</i> , Einheit
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
uPA	Urokinasetyp Plasminogen Aktivator
uPAR	Urokinasetyp Plasminogen Aktivator Rezeptor
UV	Ultraviolett

8. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name Anna Juliane Farthmann
Geburtstag 17.04.1976
Geburtsort Hamburg
Eltern Prof. Dr. Dr. h.c. Eduard Farthmann
Antje Farthmann

Schulische und berufliche Bildung

1982- 1986 Loretto-Grundschule Freiburg
1986- 1995 Friedrich-Gymnasium Freiburg (Abiturnote 1,2)
1995- 1998 Ausbildung im Colombi Hotel Freiburg zur Hotelfachfrau
1998- 1999 Anstellung im Kempinski Hotel Atlantic Hamburg

Studium

04/1999- 04/2001 Studium der Medizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen
04/2001 Physikum (Note 2,66)
04/2001 bis 04/2004 Studium der Medizin an der Technischen Universität München
03/2002 Erstes Medizinisches Staatsexamen (Note 2,0)
04/2004 Zweites Medizinisches Staatsexamen (Note 2,33)
04/2004 bis 03/2005 Praktisches Jahr an der Ludwig-Maximilians-Universität München
04/2005 Drittes Medizinisches Staatsexamen (Note 1)
04/2005 Abschluss des Medizinstudiums (Gesamtnote 1,83)
04/2005 Erteilung der Approbation

Famulaturen

08/2002 II. Medizinische Klinik der Universitätsklinik Freiburg
03/2003 Gynäkologische Abteilung des Krankenhauses München Schwabing
07-08/2003 Anästhesiologische Gemeinschaftspraxis im Nordsternhaus, München
08-09/2003 Head & Neck Surgery, Mount Sinai Hospital, New York City, USA

Praktisches Jahr

1. Tertial Frauenklinik Großhadern, München
2. Tertial Chirurgie: Krankenhaus München Schwabing
2. Tertial Chirurgie: University of Louisville Medical School, USA
3. Tertial Medizinische Klinik Ziemssenstraße, München

Berufliche Weiterbildung

Seit 07/2005 Beschäftigung als Assistenzärztin am Department Universitäts-Frauenklinik Freiburg

Sonstiges

1999- 2001 Mitarbeit in der Studentischen Selbstverwaltung der Universität Giessen (Mitglied der Liberalen Hochschulgruppe)
10/2000 bis 04/2005 Stipendiatin der Friedrich-Naumann-Stiftung
Seit 06/2002 Promotionsvorhaben in der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der TU München: „Quantifizierung der Urokinaserezeptor mRNA Spleissvarianten beim Mammakarzinom“
06/2002 bis 2/2002 Mitglied des Graduiertenkolleges 333 „Biologie Menschlicher Erkrankungen“ (seit 03/ 2003 assoziiertes Mitglied)
Fremdsprachen Englisch, Italienisch, Spanisch, Französisch
Hobbys Segeln, Wandern, Theater, Literatur

9. DANKSAGUNG

Zunächst danke ich Herrn PD Dr. V. Magdolen für die freundliche Überlassung des Themas und für die Betreuung. Er stand jederzeit für Fragen zur Verfügung und hat bis zuletzt viel Geduld mit mir gezeigt. Auch Herrn Prof. M. Schmitt als Leiter der Klinischen Forschergruppe an der Frauenklinik gilt mein Dank.

Im Labor der Klinischen Forschergruppe wurde ich von vielen MTAs fachlich und menschlich unterstützt, darunter Sabine Creutzburg, Daniela Hellmann, Christel Schnelldorfer und vielen weiteren. Mit meinen Mitdoktoranden Julia Biermann, Leon Holzscheiter und Panos Prezas habe ich viel Zeit am LightCycler verbracht und immer gerne zusammengearbeitet.

Durch Kooperationen mit Kollegen von der Universität Dresden und Nijmegen konnten wir auf eine große Anzahl weiterer Patientenproben zurückgreifen. Hier möchte ich mich bei Herrn Dr. Axel Meye, Herrn Dr. Matthias Kotzsch und Herrn Dr. Thomas Luther, Frau Romy Kranz und PD Dr. Paul Span bedanken.

Durch die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 333 “Biologie Menschlicher Erkrankungen”, das von Herrn Prof. M. Gratzl geleitet wurde, konnte ich nicht nur Doktoranden der Medizin, sondern auch verschiedener naturwissenschaftlicher Fächer kennenlernen und mich mit ihnen austauschen. Zunächst wurden wir durch Frau Dr. Martina Haasemann und später durch Frau Dr. Karen Schmidt-Baese betreut, die dem Graduiertenkolleg beide eine sehr persönliche Note gegeben haben.

Seit dem 3. Semester war ich Stipendiatin in der Grundförderung der Friedrich-Naumann-Stiftung. In dieser Zeit habe ich nicht nur viele Menschen verschiedenster Nationalitäten und Fachrichtungen getroffen, sondern auch echte Freundschaften geschlossen.

Mit meinen “Mädels” Elke Knollmann (damals noch Guthaus), Angela Kirschenhofer und Stefanie Neubauer habe ich natürlich viel Fachliches, vor allem aber auch viel (Zwischen-) Menschliches besprochen können und zum Glück immer noch Kontakt gehalten.

Jan Kühle danke ich für fast vier Jahre Park-WG, die ganz wesentlich dazu beigetragen haben war, dass ich mich in München so wohl gefühlt habe.

Meine Eltern haben mir nicht nur die Möglichkeit gegeben haben, mein Leben umzukrempeln und einen ganz neuen Weg einzuschlagen, sondern waren und sind vor allem immer für mich da.