

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher)

*Urokinase-type plasminogen activator (uPA) als Mediator der durch *tissue inhibitor of metalloproteinases-1* (TIMP-1) induzierten Lebermetastasierung*

Florian Albert Johann Schrözlmaier

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: 1. apl. Prof. Dr. A. Krüger

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

3. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel

Die Dissertation wurde am 12.10.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.04.2011 angenommen.

Meinem Großvater Dr. med. Albert Spaeth
in Würdigung seiner Lebensleistung gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Metastasierung

1.1.1 Metastatische Kaskade	7
1.1.2 Prometastatische Nische	9
1.1.3 Metastasierungsmodell	10

1.2 Proteolyse-Systeme

1.2.1 <i>Urokinase-type plasminogen activator</i> (uPA)	12
1.2.2 <i>Tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i> (TIMP-1)	16
1.2.3 Proteolytisches Netzwerk	19

1.3 *Hepatocyte growth factor* (HGF)-Signalweg

1.4 Tumor-assoziierte Immunzellen

1.5 Methoden zur Modulation der Genexpression

1.5.1 Adenoviraler Gentransfer	24
1.5.2 RNA-Interferenz (RNAi)	24

2 Zielsetzung

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien	28
3.1.2 Zellkulturreagenzien	30
3.1.3 Molekularbiologische Reagenzien	31
3.1.4 Gebrauchsgegenstände	31
3.1.5 Mikroskope und optische Dokumentationsgeräte	36
3.1.6 Software	36

3.2 Tierexperimentelle Methoden

3.2.1 Versuchstiere	37
3.2.2 Tierhaltung	37
3.2.3 Tierversuch mit Modulation des uPA-Status der Tumorzellen	38
3.2.4 Tierversuch mit Modulation des uPA-Status auf Wirtsseite	39
3.2.5 Tierversuch mit Depletion der Neutrophilen Granulozyten	40

3.3 Zellkultur

3.3.1 Lösungen und Medien	40
3.3.2 Zelllinien	41
3.3.3 Zellkultivierung	41

3.4 Adenoviren

3.5 Molekularbiologische Methoden	
3.5.1 Lösungen	42
3.5.2 Plasmide	43
3.5.3 Bestimmung der Zellzahl	44
3.5.4 Kotransfektion von Verpackungszellen	45
3.5.5 Transduktion und Selektion von Tumorzellen	45
3.5.6 RNA-Isolation aus Zellen	46
3.5.7 RNA-Konzentrationsbestimmung	47
3.5.8 Qualitative Agarose-Gel-Elektrophorese	48
3.5.9 Reverse Transkription	48
3.5.10 Quantitative <i>real time</i> -Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	49
3.5.11 DNA-Isolation aus Gewebe	50
3.5.12 Qualitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
3.6 Proteinbiochemische Methoden	
3.6.1 Lösungen	51
3.6.2 Proteinisolation aus Gewebe	52
3.6.3 Proteinkonzentrationsbestimmung	52
3.6.4 Western Blotting	53
3.7 Organ-X-Gal-Färbung	
3.7.1 Lösungen	56
3.7.2 Färbung	57
3.8 Histologische Methoden	
3.8.1 Lösungen	58
3.8.2 Probenfixation	58
3.8.3 Immunhistochemie auf Paraffinschnitten	59
3.8.4 Immunhistochemie auf Gefrierschnitten	61
3.8.5 Kopplung von Gewebe-X-Gal-Färbung und Immunhistochemie	62
3.8.6 Immunfluoreszenz	63
3.9 Statistik	63
4 Ergebnisse	
4.1 Beeinflussung der TIMP-1-induzierten Metastasierung durch uPA-<i>knock-out</i> im Wirt	
4.1.1 Abnahme der Gesamttumorzelllast	64
4.1.2 Unveränderte Makrometasierung	65
4.1.3 Leichte Zunahme der Makrometastasengröße	65
4.1.4 TIMP-1- und Wirts-uPA-unabhängige Proliferationsrate in Makrometastasen	66

4.1.5 Rückgang des Tumorzell- <i>scattering</i>	67
4.2 Kooperative Aktivierung des HGF-Signalwegs durch TIMP-1 und Wirts-uPA	
4.2.1 Erhöhung der c-Met-Aktivierung	68
4.2.2 Lokalisationsmuster der hepatischen c-Met-Aktivierung	69
4.2.3 Zunahme des c-Met-Protein-Gehalts	70
4.2.4 Lokalisationsmuster der hepatischen c-Met-Expression	70
4.2.5 Anstieg des HGF-Protein-Gehalts	71
4.2.6 Fehlende Korrelation mit der HGF-Aktivierung	72
4.3 Wirts-uPA-abhängige Infiltration myeloider Immunzellen als Mediatoren der TIMP-1-induzierten Metastasierung	
4.3.1 uPA-unabhängige Induktion der Makrophageneinwanderung durch TIMP-1	73
4.3.2 Massive TIMP-1-induzierte Infiltration von Neutrophilen Granulozyten in Abhängigkeit von uPA	74
4.3.3 Intrahepatisches Verteilungsmuster der Immunzellen	75
4.3.4 Abhängigkeit der c-Met-Aktivierung von der Neutrophileninfiltration	76
4.3.5 Korrelation des Tumorzell- <i>scattering</i> mit der Neutrophileninfiltration	77
4.4 Beeinflussung der TIMP-1-induzierten Metastasierung durch uPA-<i>knock-down</i> in Tumorzellen	
4.4.1 Verifizierung des shRNA-vermittelten <i>knock-down</i> von murinem uPA in L-CI.5s-Zellen	77
4.4.2 Reduzierte Gesamtmetastasierung	78
4.4.3 Abnahme der Makrometastasierung	79
4.4.4 Fehlender Rückgang der Sekundären Invasion	79
4.4.5 Weitgehende Unabhängigkeit der c-Met-Aktivierung vom uPA-Status der Tumorzellen	80
5 Diskussion	
5.1 Zusammenwirken von Aktivator und Inhibitor verschiedener Protease-Familien bei der Ausbildung einer Prometastatischen Nische	82
5.2 Interdependenz zwischen TIMP-1, uPA und dem HGF- Signalweg	84
5.3 Bedeutung von myeloiden Immunzellen für die TIMP-1-induzierte Aktivierung des HGF-Signalwegs	86
5.4 Differentielle Bedeutung von Tumorzell- und Wirts-uPA für die Metastasierung	88
5.5 Schlussfolgerungen für die Tumorthherapie	91
5.6 Ausblick	93
6 Zusammenfassung	95

7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	
7.1	Abbildungen	96
7.2	Tabellen	97
8	Abkürzungsverzeichnis	98
9	Literaturverzeichnis	100
10	Danksagung	113
11	Lebenslauf	115
12	Publikationen	
12.1	Zeitschriftenartikel	116
12.2	Vorträge	116

1 Einleitung

1.1 Metastasierung

1.1.1 Metastatische Kaskade

Malignome limitieren die Lebenserwartung eines Organismus in erster Linie durch ihre Fähigkeit zur systemischen Dissemination, der sog. Metastasierung (DeNardo *et al.*, 2008; Pantel *et al.*, 2004). Da gegenwärtig angenommen wird, dass nicht alle malignen Zellen eines Primärtumors gleichermaßen das Potential zur Metastasierung besitzen, gilt als Voraussetzung für diesen Prozess zunächst die Selektion eines metastatischen Klon aus der Gesamtheit der Zellen des Primärherds (Fearon *et al.*, 1990) (Abb. 1). Als Erklärungsgrundlagen hierfür dienen derzeit v. a. zwei Modelle. Das *linear progression model* postuliert die Akkumulation sukzessiv erfolgreicher genetischer und epigenetischer Alterationen als Grundlage des metastatischen Potentials von Tumorzellen (Gupta *et al.*, 2006; Nguyen, 2004). Das *early stage model* hingegen basiert darauf, dass Selektions- und nachgeschalteter Metastasierungsprozess früh und parallel zum Wachstum des Primärtumors erfolgen (Bernards *et al.*, 2002; Gray, 2003), und die Tumorprogression von sog. *cancer stem cells* (CSCs) ausgeht, welche sich zu infiltrativ und metastatisch veranlagten Klonen entwickeln können (Pardal *et al.*, 2003).

Diejenigen neoplastischen Zellen, die nicht nur unabhängig von systemischen Wachstums- und Apoptosemechanismen sind, sondern auch die Fähigkeit zur Invasion besitzen, lösen sich schließlich vom Primärtumorverband und beginnen, durch Proteolyse Basalmembranen zu zersetzen (Gupta *et al.*, 2006; Hanahan *et al.*, 2000; Nguyen, 2004). Nach erfolgter Penetration dieser Gewebearriere migrieren diese Zellen gerichtet durch die Extrazelluläre Matrix (*extracellular matrix*/ECM) (Abb. 1), was wiederum insbesondere durch Proteasen bewerkstelligt wird (Gupta *et al.*, 2006; Hanahan *et al.*, 2000; Nguyen, 2004). Darüber hinaus kommt es auch zur wechselnden Polarisation der Zellen und zu einer dynamischen Veränderung von interzellulären und Zell-Matrix-Kontakten (Zigrino *et al.*, 2005), die letztlich in der sog. *epithelial-mesenchymal transition* (EMT) (Christofori, 2006; Condeelis *et al.*, 2003) bzw. der *epithelial-amoeboid transition* (EAT) (Wolf *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2006) resultieren können. Die Migrationsrichtung wird dabei v. a. durch ein komplexes Chemokin-vermitteltes Netzwerk aus Tumorzellen und assoziierten Bindegewebs- und Immunzellen vermittelt (Condeelis *et al.*, 2006).

Am Ende einer erfolgreichen Invasionsphase steht die Penetration des Blut- bzw. Lymphgefäßsystems, die sog. Intravasation (Abb. 1). Dieser Vorgang ist von ähnlichen Faktoren abhängig wie die Invasion. Im Falle der lymphogenen Metastasierung kann es dabei durch zeitweisen Arrest in Lymphknoten zu einer zweiten Selektion hochmetastatischer Klone kommen (Gupta *et al.*, 2006).

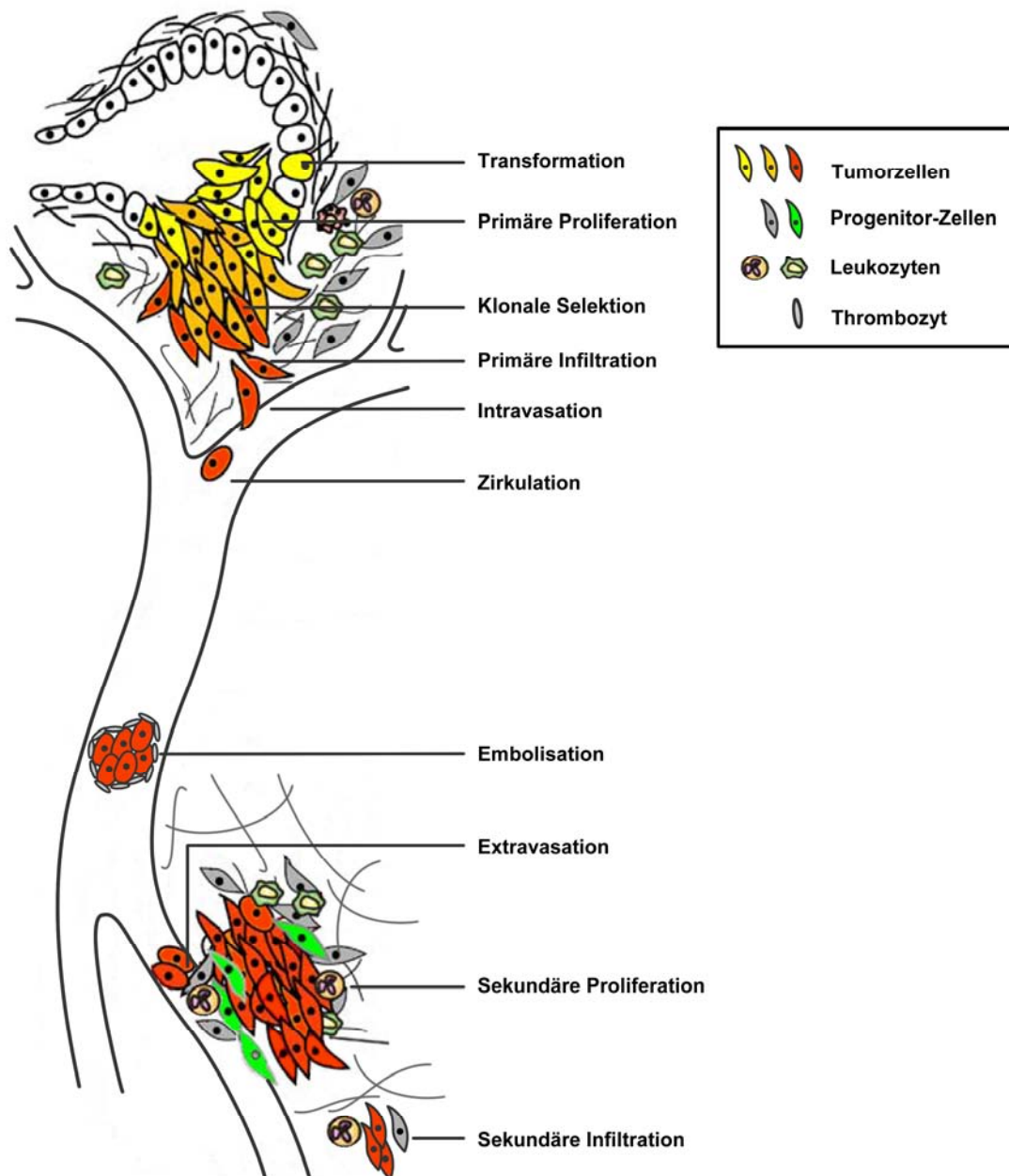


Abbildung 1: Metastatische Kaskade (modifiziert nach DeNardo *et al.*, 2008). Dargestellt ist der stufenweise Ablauf der Metastasierung, ausgehend von Transformation, Proliferation und klonaler Selektion im Primärherd. Nach erfolgreicher Infiltration des peritumorösen Gewebes und erfolgter Intravasation zirkulieren die Tumorzellen als Emboli im Blut- oder Lymphgefäßsystem, ehe sie an den Zielorganen der Metastasierung extravadieren, proliferieren und schließlich das Zielorgan infiltrieren. Nähere Erläuterung im Text.

Insbesondere zum Schutz vor Scherkräften und dem Immunsystem des Wirts (Mehlen *et al.*, 2006) rotten sich in das Gefäßsystem invadierte Tumorzellen zusammen (Liotta *et al.*, 1976) und umgeben sich mit einer Hülle an Fibrin, Thrombozyten (Jurasz *et al.*, 2004) oder gar Endothelien (Sugino *et al.*, 2004) (Abb. 1). Es konnte nachgewiesen werden, dass die in diesen Komplexen enthaltenen Tumorzellen proliferieren können (Al-Mehdi *et al.*, 2000) und sich deshalb allein auf Grund der Größenzunahme des Tumorembolus die Wahrscheinlichkeit eines Arrests in Kapillargefäßen erhöht (Chambers *et al.*, 2002).

Der sich nun anschließende Prozess, bei dem die arretierten Tumorzellen das Gefäßsystem wieder verlassen, die sog. Extravasation, und die darauf folgende Etablierung der Tumorzellen in einem Sekundärorgan stellen den letzten Teil der metastatischen Kaskade dar (Abb. 1). Die hierbei ablaufenden biologischen Mechanismen beginnen sich aktuell herauszukristallisieren, so dass sich zusammengenommen das Bild der sog. Prä- oder auch Prometastatischen Nische ergeben hat (Kaplan *et al.*, 2005).

1.1.2 Prometastatische Nische

Für die Ausbildung der Prometastatischen Nische zeichnet ein komplexes Zusammenspiel zwischen Tumorzellen, hämatopoetischen und endothelialen Vorläuferzellen (*hematopoietic progenitor cells/HPCs* und *endothelial progenitor cells/EPCs*), differenzierten Fibroblasten und infiltrierenden Immunzellen verantwortlich. Der Tropismus der Metastasierung, also die Wahl des Organs, in dem sich die Metastasen ausbilden, scheint dabei von den Tumorzellen selbst durch spezifische Gensignaturen determiniert und über gezielte Chemokin-Sekretion kommuniziert zu werden (Minn *et al.*, 2005). Nach bisherigem Kenntnisstand kommt es jedoch noch vor der Infiltration durch Tumorzellen zu einer Mobilisation von HPCs und EPCs aus dem Knochenmark in das Zielorgan (Kaplan *et al.*, 2005). Diese eingewanderten Knochenmarkszellen exprimieren etwa das *very late antigen-4* (VLA-4), auch CD49d/CD29 oder Integrin $\alpha_4\beta_1$ genannt, welches mit dem auf den zirkulierenden Tumorzellen vorhandenen Fibronectin interagiert, so dass sich schließlich ein heterogenes Zellcluster bildet. Durch die beschriebene Wechselwirkung kann die Expression der Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) induziert werden, was einerseits die Penetration der Gefäßwand und die folgende Infiltration in die ECM der Zielorgans fördert, andererseits aber auch zur Chemokin-Freisetzung führt (Hiratsuka *et al.*, 2002; Kaplan *et al.*, 2005). Hierdurch werden sowohl weitere HPCs, EPCs und Tumorzellen, als auch Immunzellen zur Prometastatischen Nische rekrutiert, so dass sich dort quasi die metastatische Aktivität potenziert (Kaplan *et al.*, 2005). Zudem exprimieren HPCs den *vascular endothelial growth factor receptor-1* (VEGFR-1), über den einerseits die Angiogenese stimuliert, andererseits wiederum die Expression einer Reihe von Chemokinen wie dem *chemokine ligand-12* (CXCL-12), auch *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1) genannt, induziert werden kann (Littlepage *et al.*, 2005). Über diesen Mechanismus werden *chemokine receptor-4* (CXCR-4)-positive Zellen, insbesondere entsprechende Tumor- und myeloide Zellen, zum Ort der Metastasierung gelockt (Chambers *et al.*, 2002; Kaplan *et al.*, 2006).

Diejenigen Tumorzellen, die in das Zielgewebe eingewandert sind, können entweder zunächst über unbestimmte Zeit als ruhende Tumorzellen in einem *dormancy* genannten Stadium vorharren oder unmittelbar zu einer Metastase auswachsen (Luzzi *et al.*, 1998).

Welche Mechanismen dafür verantwortlich sind, welchen Weg die Tumorzelle einschlägt, ist noch Gegenstand aktueller Forschung. Denkbare Auslöser sind neben einer unzureichenden Angiogenese, die zentrifugale Sauerstoff- und Nährstoffgradienten aus etablierten Makrometastasen heraus nach sich zieht (Pennacchietti *et al.*, 2003), auch ein erhöhtes Invasionspotential der Zellen durch weitere metastatische Transformation (Chambers *et al.*, 2002), eine Modulation der lokalen Immunantwort (Zou, 2005) sowie eine gesteigerte Empfänglichkeit des *microenvironment* für einwandernde Tumorzellen durch weitere Modulationen der Prometastatischen Nische (Gupta *et al.*, 2006).

1.1.3 Metastasierungsmodell

Um die bei der Metastasierung ablaufenden Prozesse experimentell nachstellen zu können, ist man nicht zuletzt deshalb auf Tiermodelle angewiesen, weil in *In-vitro*-Ansätzen das komplexe Wechselspiel zwischen Tumorzellen und dem *microenvironment* nur unzureichend reproduziert werden kann (Krüger, 2009). Tiermodelle lassen sich dabei in syngene und *xenograft*-Modellen unterteilen (Khanna *et al.*, 2005). Bei Ersteren können wegen der Speziesgleichheit von Versuchstier und inokulierten Zellen immunkompetente Tiere zum Einsatz kommen, so dass auch der Beitrag des Immunsystems zur Metastasierung untersucht werden kann. Außerdem zeigen etliche Proteasen wie auch das *urokinase-type plasminogen activator* (uPA)-System eine strikte Speziespezifität, so dass etwa die Untersuchung der bei der Ausprägung der Prometastatischen Nische ablaufenden proteolytischen Vorgänge keiner Spezieslimitation unterliegt (Frandsen *et al.*, 2001). Der Nachteil syngener Modelle liegt jedoch insbesondere darin, dass keine humanen Tumorzellen untersucht werden und so die gewonnenen Ergebnisse nur eingeschränkt auf die menschliche Tumorbilogie übertragen werden können, ein Problem, das durch Inokulation humaner Zellen in immundefiziente Tiere im Rahmen von *xenograft*-Modellen umgangen werden kann (Khanna *et al.*, 2005).

Tiermodelle können jedoch auch nach dem Modus der Tumorzelltransplantation unterschieden werden. Während bei spontanen Metastasierungsmodellen mit orthotoper oder heterotoper Inokulation die gesamte metastatische Kaskade inklusive aller limitierender und selektionierender Einflüsse schon bei der Ausbildung des Primärtumors durchlaufen werden muss, werden bei der sog. experimentellen Metastasierung die Tumorzellen direkt intravaskulär injiziert, so dass die Generierung von metastatischen Läsionen unabhängig von den im Primärherd ablaufenden Prozessen ist. Hierdurch wird der Metastasierungsverlauf erheblich beschleunigt sowie reproduzierbarer und kontrollierbarer (Khanna *et al.*, 2005).

Durch den Einsatz gentechnisch veränderter Versuchstiere und Tumorzellen im Rahmen der *functional genomics* kommt es noch zu einer weiteren Diversifizierung der

experimentellen Ansätze, die insbesondere den Einfluss spezifischer Genprodukte auf die Metastasierung nachvollziehen lässt (Khanna *et al.*, 2005; Krüger, 2009). Während dabei der *knock-down* oder *knock-out* einiger Gene zu letalen oder deutlich phänotypisch defizitären Varianten führt und das Verfahren hierdurch limitiert ist, sind etwa uPA-defiziente Mäuse während der üblichen Versuchsdauern kaum in ihrer Lebensfähigkeit eingeschränkt (Carmeliet *et al.*, 1994).

Um die Detektion applizierter Tumorzellen zu erleichtern, wurden zudem etliche Markierungsstrategien entwickelt. Eine dieser Möglichkeiten besteht in der Transfektion eines Gens in das Genom der Tumorzellen, dessen Genprodukt fluoresziert oder enzymatisch aktiv ist und deshalb zu einer nachweisbaren Farbstoffreaktion führt. So kodiert das bakterielle Gen *lacZ* für das Enzym β -D-Galaktosidase, welches die intrazelluläre Hydrolyse des chromogenen Substrats X-Gal zu einem hydrophoben Indigopräzipitat katalysiert (Krüger *et al.*, 1994) (Abb. 2). Somit können entsprechend gefärbte Tumorzellen *ex vivo* bis auf Einzelzellebene nachgewiesen und hieraus Schlüsse etwa auf den Ablauf der Kolonisation der Prometastatischen Nische gezogen werden (Gerg *et al.*, 2008) (Abb. 3).

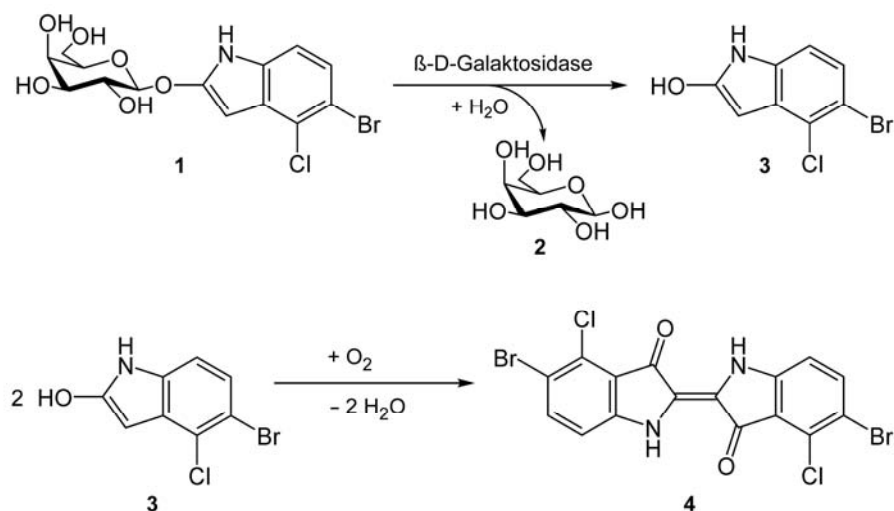


Abbildung 2: X-Gal-Reaktion (1 X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β -D-galaktopyranosid), 2 β -D-Galaktose, 3 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol, 4 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-1H,1'H-(2,2')-biindolyliden-3,3'-dion). Dargestellt sind Hydrolyse und Oxidation des chromogenen Substrats X-Gal (1) hin zu einem Gewebe präzipitierenden Indigofarbstoff (2).

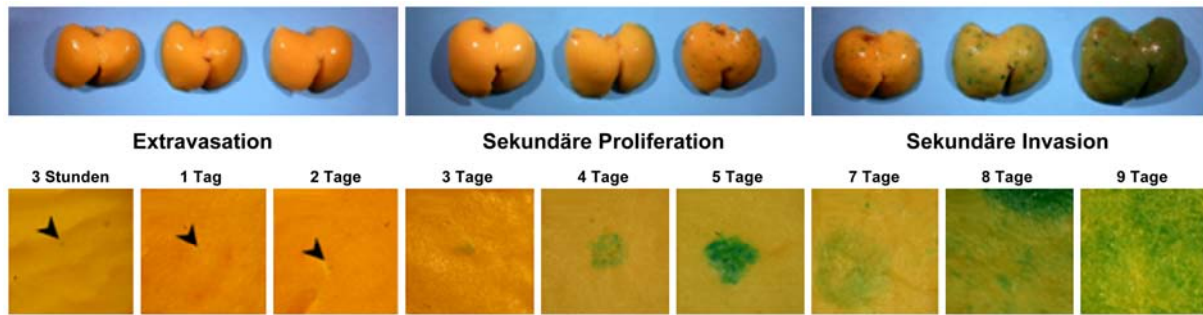


Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der Kolonisation der Prometastatischen Nische im L-CI.5s-Modell (modifiziert nach Gerg *et al.*, 2008). Dargestellt ist die sukzessive Besiedelung der Leber mit murinen Lymphomzellen (Einzelzellen durch Pfeile gekennzeichnet) über einen Zeitraum von 9 Tagen. Nach erfolgreicher Extravasation bilden sich zunächst größere Tumorzellherde, von welchen ausgehend es zu einer diffusen Infiltration des Leberparenchyms durch L-CI.5s-Zellen kommt.

1.2 Proteolyse-Systeme

1.2.1 Urokinase-type plasminogen activator (uPA)

Die perizelluläre Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin, einer hauptsächlich nicht-fibrilläre Anteile der ECM degradierende Serinprotease, wird v. a. über den *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) reguliert (Crippa, 2007). Dieser wird als Zymogen, *pro-* oder *single chain-uPA* (pro-uPA bzw. sc-uPA), synthetisiert und durch eine Reihe anderer Proteasen durch limitierte Proteolyse aktiviert. Der dabei generierte eigentliche uPA, auch als *high-molecular weight-uPA* (HMW-uPA) oder *two chain-uPA* (tc-uPA) bezeichnet, lässt sich in drei Domänen gliedern, nämlich die *growth factor-like domain* (GFD) als Bindungspartner des uPA-Rezeptors (uPAR), die *kringle domain* (KD) mit starker Affinität zu Strukturen der ECM und die Serinproteasedomäne *low-molecular weight uPA* (LMW-uPA). Alternativ kann der LMW-uPA auch als B-Kette bezeichnet und GFD und KD zum *amino-terminal fragment* (ATF) bzw. zur A-Kette zusammengefasst werden (Berger, 2002).

Obgleich einige Forschungsergebnisse auch auf alternative funktionelle Bindungspartner hinweisen (Carmeliet *et al.*, 1998; Longstaff *et al.*, 1999; Pluskota *et al.*, 2003), gilt nach wie vor der uPAR, gleichbedeutend mit CD87, als der höchstafine uPA-Rezeptor (Abb. 4). Seine drei homologen Domänen sind über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an die Zellmembran gebunden, können aber auch als *soluble uPAR* (suPAR) proteolytisch ins Interstitium freigesetzt werden, ohne die Fähigkeit zur uPA-Bindung zu verlieren (Krüger *et al.*, 2000). Die Ausbildung des uPA-uPAR-Komplexes, begünstigt durch die simultane Bindung von Plasminogen an eine heterogene Gruppe von Lipiden und Proteinen wie Annexin II und α -Enolase, dient dabei zu einem großen Teil der Beschleunigung und Fokussierung der extrazellulären Proteolyse (Berger, 2002; Rømer *et al.*, 2004). Die Besetzung des Rezeptors mit dem Liganden führt zudem über eine stärkere Interaktion beider Partner mit Integrinen (Chapman *et al.*, 2001; Tarui *et*

al., 2001), Vitronektin (Sidenius *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 1994) und Thrombospondinen (Higazi *et al.*, 1996) zur Ausbildung von Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakten (Abb. 4) sowie zu einem *clustering* an spezialisierten Membranbezirken wie den *focal adhesions* (Myöhänen *et al.*, 1993) oder dem *leading edge* (Kjøller, 2002). Insbesondere in diesen Zellregionen wird der uPA-uPAR-Komplex einer weiteren Funktion gerecht, nämlich der Initiation von Signalkaskaden, wozu er mangels einer eigenen intrazellulären Domäne zwangsläufig Kooperationspartner benötigt. Besonders die Transaktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren (*growth factor receptors*/GFRs) (Liu *et al.*, 2002) sowie die Interaktion mit Integrinen (Juliano, 1999; Kugler *et al.*, 2003) als effizienten *scaffolding structures* für Unmengen an v. a. Proliferation und zytoskelettales Rearrangement beeinflussenden intrazellulären Signaltransduktoren (Alfano *et al.*, 2005; Blasi *et al.*, 2002; Mazzieri *et al.*, 2005) sind hierbei von Bedeutung (Abb. 4). In diesem Kontext sind auch die perizelluläre Organisation sowie die auto- und parakrine Regulation des uPA-Systems zu berücksichtigen, erkennbar daran, dass etwa die Expression von uPAR durch uPA getriggert werden kann (Mahanivong *et al.*, 2007; Rømer *et al.*, 2004).

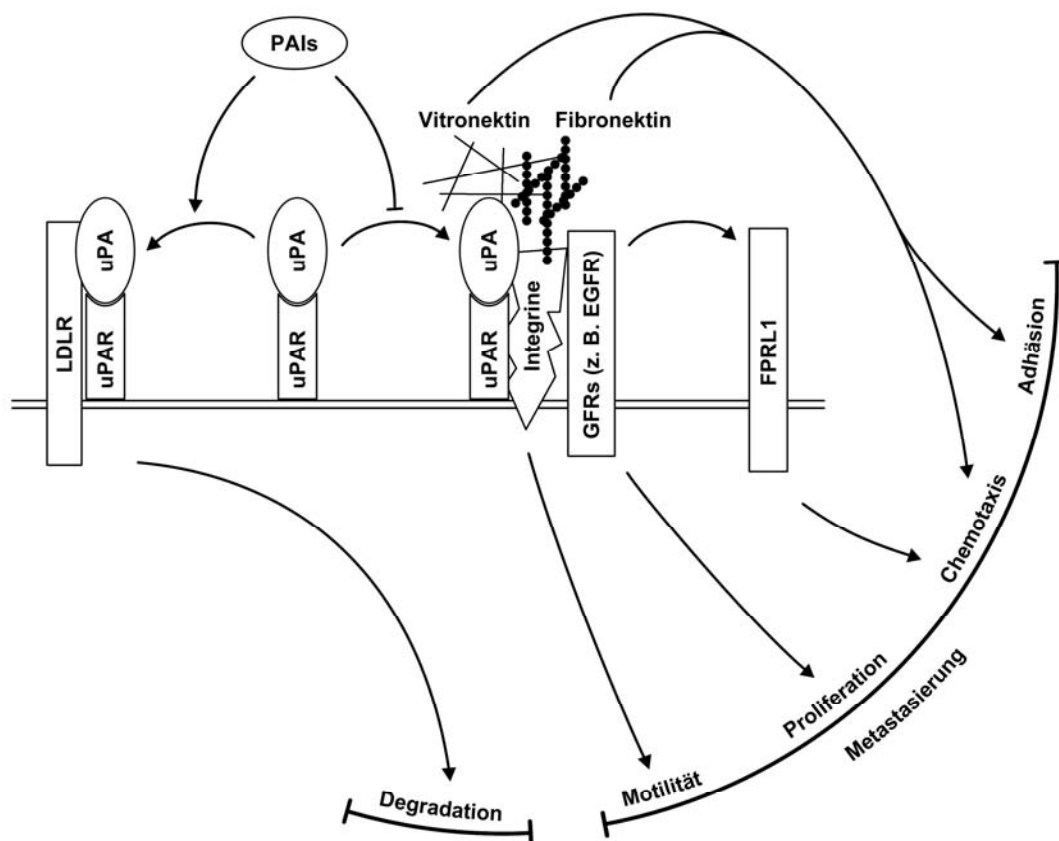


Abbildung 4: Proteolyse-unabhängige Wirkungen des uPA (EGFR: *epithelial growth factor receptor*, FPRL1: *formyl peptide receptor-like 1*, GFRs: *growth factor receptors*, LDLR: *low density lipoprotein receptor*, PAIs: *plasminogen activator inhibitors*, uPA: *urokinase-type plasminogen activator*, uPAR: *urokinase-type plasminogen activator receptor*). Dargestellt sind die Proteolyse-unabhängigen Wirkungen des uPA, welche insbesondere über die Wechselwirkung mit Strukturen der ECM (Fibronektin und Vitronektin) und transmembranalen Rezeptoren erfolgt. Der natürliche Inhibitor PAI-1 hemmt diese Interaktionen und fördert die Degradation des uPA-uPAR-Komplexes. Nähere Erläuterung im Text.

Neben diesen Proteolyse-unabhängigen Prozessen können Signaltransduktionen auch indirekt durch Freisetzung und Aktivierung von als Zymogene sezernierten oder Inhibitor-gebundenen Wachstumsfaktoren aus der ECM in Gang gebracht werden, wie dies etwa für den *hepatocyte growth factor/scatter factor* (HGF/SF) (Matsuoka *et al.*, 2006; Naldini *et al.*, 1992), den *transforming growth factor β* (TGF β) (Rifkin *et al.*, 1999) und spezielle Isoformen des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Plouët *et al.*, 1997) nachgewiesen werden konnte (Abb. 5). Auf diesem Hintergrund lässt sich auch verstehen, weswegen etwa allein die Blockade der proteolytischen Funktion des uPA eine Reduktion des tumorigenen Potentials einer Melanom-Zelllinie um rund ein Drittel mit sich bringt (Koopman *et al.*, 1998). Andererseits führt die Spaltung von ECM-Komponenten auch zur Freisetzung antiangiogenetischer Peptide wie der sog. Statine (van Hinsbergh *et al.*, 2006) (Abb. 5), worauf man zum Teil das auf den ersten Blick paradoxe Ergebnis zurückführt, dass der uPA unter gewissen Bedingungen die Metastasierung von Mamma-Karzinomzellen auch hemmen kann (Merchan *et al.*, 2006). Weitere Spaltprodukte der ECM (Degryse *et al.*, 1999) wirken ebenso chemotaktisch auf Leukozyten wie gewisse durch Proteolyse oder Ligandenbindung demaskierte Peptidsequenzen des uPAR selbst (Crippa, 2007). Diese Wirkung wird noch dadurch potenziert, dass der uPAR den ebenfalls chemotaktisch wirkenden Rezeptor *formyl peptide receptor-like 1* (FPRL1) transaktivieren kann (Resnati *et al.*, 2002) (Abb. 4).

Gehemmt wird die proteolytische Aktivität von uPA insbesondere durch seine endogenen Inhibitoren *plasminogen activator inhibitor-1* und *-2* (PAI-1 und -2) (Abb. 4 und 5), beide Vertreter der *serine proteinase inhibitor* (Serpine)-Familie kovalent bindender und durch das Substrat selbst durch Spaltung aktivierter Selbstmord-Proteasen (Magdolen *et al.*, 2002). Parallel zum eigentlichen Inhibitionsprozess kommt es zur Interaktion von uPA und PAI-1 mit Rezeptoren vornehmlich der *low density lipoprotein-related receptor/ α_2 -macroglobulin receptor* (LDLR/ α_2 -MR)-Familie (Abb. 4). Hierdurch wird die Internalisation des uPA-uPAR-PAI-1-Komplexes angebahnt, wobei Ligand und Inhibitor in der Regel lysosomal degradiert, der Rezeptor hingegen recycelt wird (Conese *et al.*, 1995; Durand *et al.*, 2004). Bedeutsam in diesem Kontext ist, dass auch an den uPA-uPAR-Komplex gebundene Integrine sowie weitere mit diesen interagierende ECM-Komponenten mit endocytiert werden können (Czakay *et al.*, 2003). Über diese antiadhäsive Wirkung hinaus besteht ein kompetitiver Antagonismus von PAI-1 mit uPA und uPAR am Vitronektin (Abb. 4), wobei der Inhibitor zum Einen die wesentlich höhere Affinität besitzt, zum Anderen dessen Bindung an Vitronektin eine sterische Inhibition der Wechselwirkungen mit Integrinen nach sich zieht, so dass das Vitronektin zweier wesentlicher Bindungspartner simultan beraubt wird (Czakay *et al.*, 2003).

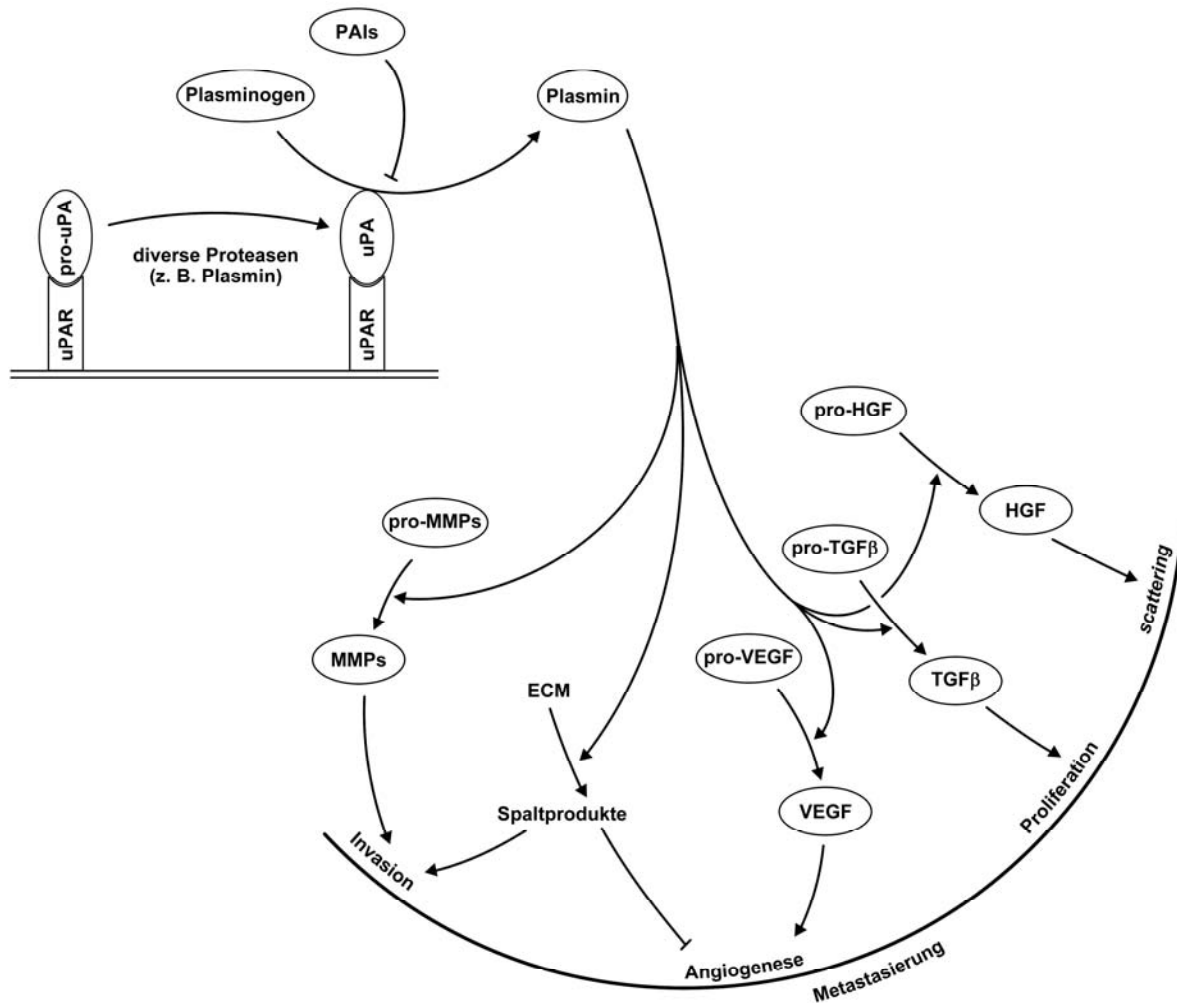


Abbildung 5: Proteolyse-abhängige Wirkungen des uPA (ECM: extracellular matrix, GFs: growth factors, HGF: hepatocyte growth factor, MMPs: matrix metalloproteinases, MSP: macrophage stimulating protein, PAIs: plasminogen activator inhibitors, TGF β : transforming growth factor β , uPA: urokinase-type plasminogen activator, uPAR: urokinase-type plasminogen activator receptor, VEGF: vascular endothelial growth factor). Dargestellt sind die von der Plasminogen-Aktivierung abhängigen Wirkungen des uPA, welche sich in der ECM-Proteolyse und der Aktivierung von MMP- und Wachstumsfaktor-Proformen manifestiert. Nähere Erläuterung im Text.

Zusammengefasst überwiegen die tumorigenen und prometastatischen Einflüsse durch den uPA. Im Hinblick auf die Prometastatische Nische scheint dabei insbesondere der im *microenvironment* bereitgehaltene Pool an uPA von Bedeutung zu sein. Zwar konnte bei gewissen Versuchsbedingungen auch bei einem uPA-*knock-down* auf Tumorzellseite eine Reduktion der Invasivität und ein Anstieg der Apoptoserate dokumentiert werden (Pulukuri *et al.*, 2005), jedoch steht dem eine weit größere Anzahl von Versuchsergebnissen gegenüber, die auf eine bedeutendere Rolle des stromalen uPA-Systems für Proliferation und Infiltration von Tumorzellen in Wirtsgeweben hinweisen (Frandsen *et al.*, 2001; Gutierrez *et al.*, 2000; Kindzelskii *et al.*, 2004; Okusa *et al.*, 1999). So konnte zum Einen eine für die Angiogenese bedeutsame uPA-Expression durch EPCs (Basire *et al.*, 2006), zum Anderen eine wichtige Rolle von uPA bei der Aufrechterhaltung der VEGF-induzierten Permeabilitätssteigerung an Gefäßen (Behzadian *et al.*, 2003; Weis *et al.*, 2005) im Rahmen der Metastasierung

nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass solitär infiltrierende Tumorzellen, sog. *budding cancer cells*, zwar uPAR, nicht jedoch uPA exprimieren (Pyke *et al.*, 1995), aber von einem Arsenal an uPA-positiven Stroma-Zellen umgeben werden (Nielsen *et al.*, 2007; Pyke *et al.*, 1991; Rømer *et al.*, 1994). Auch für die Chemotaxis von Makrophagen (Bryer *et al.*, 2008; DiPasquale *et al.*, 2007) und Neutrophilen Granulozyten (Gyetko *et al.*, 2004) und deren lokale Aktivierung (Abraham *et al.*, 2003), wie sie für die sukzessive Kolonisation der Prometastatischen Nische unerlässlich sind, spielt das stromale uPA-System eine bedeutende Rolle.

Die klinische Bedeutung des uPA-Systems liegt insbesondere in seiner Eigenschaft als Maß für die Aggressivität eines Tumors und somit auch als prognostischer Parameter bei einer ganzen Reihe von Malignomen (Dass *et al.*, 2008) und als Zielstruktur therapeutischer Interventionen (Duffy *et al.*, 2004; Rømer *et al.*, 2004) begründet. Bei der Karzinogenese im Colon etwa besteht eine eindruckliche Korrelation der Expression von uPA mit dem zunehmenden Dysplasiegrad von Adenomen und den *staging* manifester Karzinome (Papadopoulou *et al.*, 2002). Die prognostische Aussagekraft insbesondere mehrerer Komponenten des uPA-Systems zusammen ist auch beim Mamma-Karzinom sehr groß. Hinzu tritt dabei auch eine prädiktive Bedeutung im Hinblick auf eine bessere Wirksamkeit von Chemotherapien (Decock *et al.*, 2005; Harbeck *et al.*, 2002). So ist es auch nicht verwunderlich, dass den pharmazeutischen Eingriffen in das uPA-System große Beachtung geschenkt wird. Sie reichen derzeit von gentherapeutischen Verfahren wie der Transfektion uPA-tragender Plasmiden, Antisense-Oligonukleotide und Adenoviren (Pillay *et al.*, 2006) über die Applikation von suPAR als potenziellem uPA-scavenger (Krüger *et al.*, 2000; Lutz *et al.*, 2001), den Einsatz zyklischer GFD-Derivate (Sato *et al.*, 2002) oder linearer peptischer Antagonisten (Reuning *et al.*, 2003) zur kompetitiven oder allosterischen Hemmung der uPA-uPAR-Bindung bis hin zu nicht-peptischen Inhibitoren (Schweinitz *et al.*, 2004) und monoklonalen Antikörpern (Ertongur *et al.*, 2004). Die dabei gewonnenen Ergebnisse lassen durchaus klinisches Potential erkennen.

1.2.2 *Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1)*

Ein zweites System von eminenter Wichtigkeit für die extrazelluläre Proteolyse stellen die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) dar. Gegenwärtig sind in Vertebraten 24 als Zymogene sezernierte Vertreter beschrieben, welche neben dem Zink-Ion ihres aktiven Zentrums weitere strukturelle Zn^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen enthalten und sich nach Sequenzhomologien, Domänenorganisation und Substratspezifität gruppieren lassen (Visse *et al.*, 2003). Tumorbiologisch ist das MMP-System an allen Schritten der metastatischen Kaskade beteiligt (Ala-aho *et al.*, 2005; Deryugina *et al.*, 2006). Dabei ist nicht nur der Abbau der

ECM, sondern auch die Beeinflussung von Angiogenese, Apoptose und Proliferation von Belang. Ein besonderes Augenmerk gilt der Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9), die eine erhebliche Rolle bei der Ausbildung der Prometastatischen Nische und der Vermittlung des Invasionspotentials von Tumorzellen spielt (Gerg *et al.*, 2008; Hiratsuka *et al.*, 2002; Kaplan *et al.*, 2005). In der Zusammenschau ist es also nicht verwunderlich, dass die Expression von MMPs bei einer Vielzahl von Neoplasien mit einer schlechteren Prognose für den Patienten korreliert (Baker *et al.*, 2003; Turpeenniemi-Hujanen, 2005).

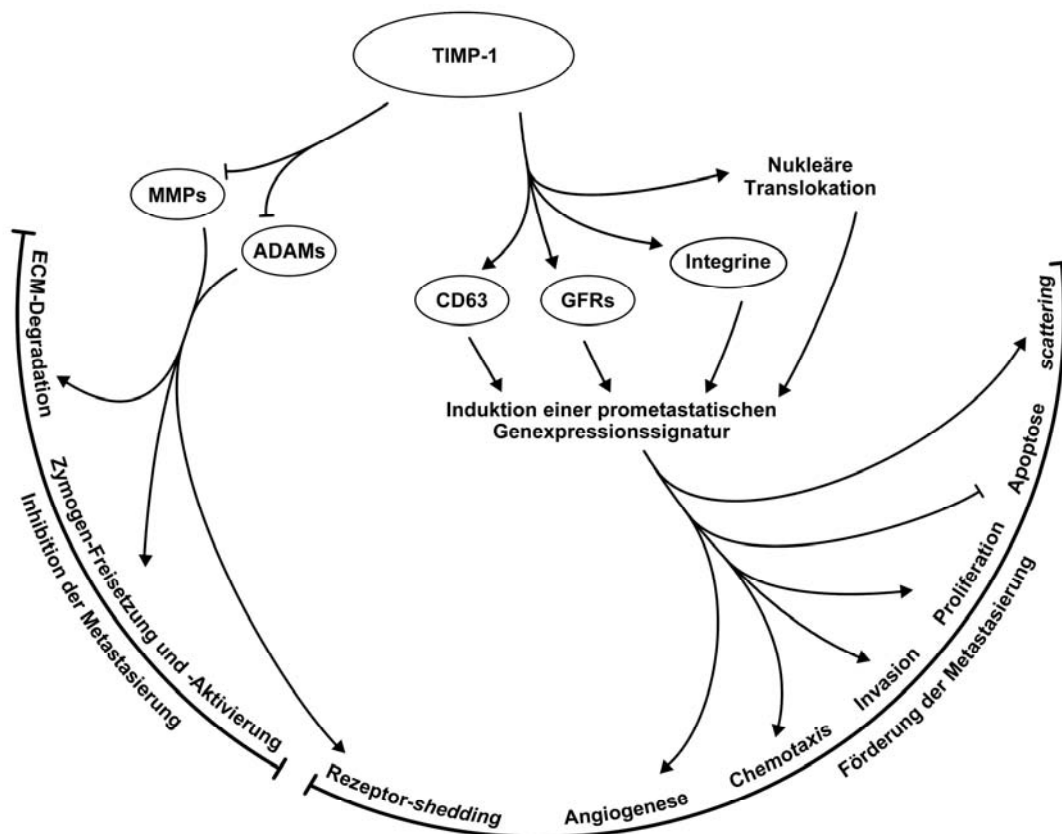


Abbildung 6: TIMP-1-Paradoxon (ADAMs: *a disintegrin and metalloproteinases*, ECM: *extracellular matrix*, GRFs: *growth factor receptors*, MMPs: *matrix metalloproteinases*, TIMP-1: *tissue inhibitor of metalloproteinases-1*). Erläutert sind die gegenläufigen Wirkungen des TIMP-1 im Hinblick auf die Metastasierung. Einerseits inhibiert TIMP-1 ADAMs und MMPs und hemmt dahingehend die Metastasierung, andererseits führt er über verschiedene Mechanismen zur Induktion einer distinkten Genexpressionssignatur, welche der Metastasierung Vorschub leistet. Nähere Erklärung im Text.

Unter physiologischen Bedingungen besteht eine austarierte Homöostase zwischen den MMPs und ihren natürlichen Breitband-Inhibitoren, den *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs), dem α_2 -Makroglobulin und dem Membran-gebundenen *reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal-motifs* (RECK) (Deryugina *et al.*, 2006; Visse *et al.*, 2003). So korreliert regelhaft die Expression von MMPs mit derjenigen von TIMPs und *vice versa* (Baker *et al.*, 2003; Roeb *et al.*, 1999). Ein besonderes Interesse der Metastasierungsforschung genießt dabei seit einiger Zeit der TIMP-1, ein stark glykosyliertes

Polypeptid mit 12 Cystein-reichen Motiven, die das Protein über insgesamt sechs Disulfidbrücken in drei Schleifenstrukturen einteilen (Hornebeck *et al.*, 2005). Die inhibitorische Aktivität des TIMP-1 erstreckt sich insbesondere auf die nicht Membran-gebundenen MMPs und die Sheddase der *A disintegrin and metalloproteinase* (ADAM)-Familie (Visse *et al.*, 2003; White, 2003) (Abb. 6). Die Inhibition der MMPs erfolgt dabei über einen 1 : 1-stöchiometrischen Komplex zwischen dem katalytischen Zentrum der jeweiligen MMP und der N-terminalen TIMP-1-Domäne, welcher durch Wechselwirkungen zwischen der MMP und den peripheren *loops* des Inhibitors stabilisiert wird (Magdolen *et al.*, 2002). Über diesen direkten Hemmmechanismus hinaus können über den C-Terminus von TIMP-1 Bindungen an MMPs und ihre Pro-Formen erfolgen, die etwa im Falle der MMP-9 dazu führen können, dass entweder die Aktivierung des MMP-Zymogens verlangsamt (Brand, 2002) oder der entstehende Komplex hochaffin an LDLR bindet und so ein Internalisationsprozess in Gang gesetzt wird (Hahn-Dantona *et al.*, 2001).

Eine weitere Eigenschaft des TIMP-1, synonym *erythroid-potentiating activity protein* (EPA) genannt, besteht in seiner proliferativen und antiapoptotischen Wirkung, die sich so unspezifisch auf verschiedene Zellarten erstreckt, dass er als auto- und parakriner Wachstums- und Überlebensfaktor angesehen werden kann (Chirco *et al.*, 2006; Visse *et al.*, 2003). Nach heutigem Kenntnisstand erfüllt TIMP-1 diese Funktion auf zweierlei Weise. Zum Einen kommt es indirekt über die Hemmung von MMPs und ADAMs zu einer reduzierten Freisetzung antiangiogener Peptide, einer verminderten Degradation von Wachstumsfaktoren und einer Abnahme des *shedding* ihrer Rezeptoren (Porter *et al.*, 2004; Porter *et al.*, 2005), zum Anderen ist TIMP-1 in der Lage, über Kooperationspartner (Lee *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003) intrazelluläre Signalkaskaden zu initiieren (Lambert *et al.*, 2003), die Expression von Wachstumsfaktoren zu induzieren (Yoshiji *et al.*, 1998) und tumorigene genetische Instabilitäten zu triggern (Rhee *et al.*, 2004) (Abb. 6). In diesem Kontext konnte neuerdings das Tetraspanin CD63, auch *lysosomal associated membrane protein 3* (LAMP-3) oder *platelet-activating glycoprotein of 40 kDa* (PHgp40) genannt, als erster membranaler signaltransduktiver Bindungspartner von TIMP-1 identifiziert werden (Chirco *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2006). Eine weiterer Eingriff des TIMP-1 in Signaltransduktionswege erfolgt über seine Zellzyklus-abhängige Translokation in den Zellkern (Abb. 6), ein Weg, über den TIMP-1 u. a. die Expression promitotischer Gene induzieren kann (Rho *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 1998).

In der Zusammenschau ist also der unerwartete Umstand, dass sowohl die intratumorale Expression (Yoshikawa *et al.*, 2006; Schrohl *et al.*, 2004) als auch die Blutspiegel (Lipton *et al.*, 2007) von TIMP-1 als Proteaseinhibitor bei einem Gros von Malignomen mit einer schlechteren Überlebensrate für den Patienten vergesellschaftet ist, auch mit TIMP-1-Paradoxon umschrieben, durchaus nachvollziehbar. Im selben Kontext ist

auch das klinische Scheitern der MMP-Breitspektrum-Inhibitoren zu sehen (Krüger *et al.*, 2001). So konnte nicht nur gezeigt werden, dass diese Proliferation und Metabolismus von Mamma-Karzinom-Zellen *in vitro* mit einer ähnlichen Kinetik stimulieren wie der natürliche Inhibitor TIMP-1 (Porter *et al.*, 2004; Porter *et al.*, 2005), sondern auch dass sie *in vivo* der Lebermetastasierung Vorschub leisten (Krüger *et al.*, 2001). Diese unerwünschte Wirkung nimmt im Übrigen bei zunehmender Substratspezifität des Inhibitors ab (Arlt *et al.*, 2002). Auch die gentechnische Überexpression von TIMP-1 in Tierversuchen erbrachte ähnliche Ergebnisse. So konnte in einer großen Anzahl von Studien gezeigt werden, dass eine derartige Modulation sowohl in Tumorzellen als auch systemisch im Wirt zwar Anzahl (Elezkurtaj *et al.*, 2004; Krüger *et al.*, 1998; Miyagi *et al.*, 2007) und Größe (Koop *et al.*, 1994) makrometastatischer Läsionen reduziert, dies jedoch nicht immer mit einer Abnahme der Gesamtmetastasierung einhergeht (Krüger *et al.*, 1997; Yamauchi *et al.*, 2001). Verantwortlich hierfür ist in erster Linie der Umstand, dass TIMP-1 die Mikrometastasierung, also das von Makrometastasen ausgehende *scattering* von Tumorzellen, fördert (Kopitz *et al.*, 2007) (Abb. 6). Dies dürfte auf der Modulation des *microenvironment* hin zu einer Prometastatischen Nische durch Induktion einer spezifischen Gensignatur und damit verbunden einer Verstärkung des HGF-*signalling* (Kopitz *et al.*, 2007) beruhen, die ihr histologisches Korrelat in einer Invasionsfront-spezifischen Überexpression von TIMP-1 findet (Kahlert *et al.*, 2008). Da dies in Situationen physiologischer HGF-Aktivierung nicht nachvollzogen werden kann, scheint es einen Malignom-spezifischen Mechanismus darzustellen (Mohammed *et al.*, 2005). Im Kontext der TIMP-1-vermittelten Induktion des HGF-Signalwegs mehrten sich zudem die Anzeichen für eine chemotaktische Wirkung von TIMP-1 zumindest auf Neutrophile Granulozyten, welche HGF in ihren Granula speichern (Halbgewachs *et al.*, noch unpublizierte Daten).

1.2.3 Proteolytisches Netzwerk

Da im Verlauf der Metastasierung strukturell unterschiedliche Bestandteile der ECM gespalten werden müssen, überrascht es nicht, dass starke Interaktionen zwischen den verschiedenen Protease-Familien bestehen. Die in der onkologischen Grundlagenforschung am Besten studierten Proteasen sind dabei die MMPs und das uPA-System, wobei auch auf die nicht unerhebliche Bedeutung anderer Proteasesysteme wie der Cathepsine (Gondi *et al.*, 2006; Mohamed *et al.*, 2006) und ihrer Inhibitoren, der Cystatine bzw. Stefine (Kopitz *et al.*, 2005), der *type II transmembrane serine proteases* (TTSP) wie der Matriptase (Riddick *et al.*, 2005) oder auch des Gerinnungsfaktors Xa (Banke *et al.*, 2005) hingewiesen sein soll. Die funktionelle Überlappung der Proteolysesysteme zeigt sich eindrucksvoll daran, dass

sowohl die Plasmin-Generierung als auch die Wirkung der MMPs inhibiert sein müssen, um eine effektive Wundheilung zu verhindern (Lund *et al.*, 1999).

Über diesen funktionellen Synergismus hinaus bestehen auch bei der Aktivierung der jeweiligen Zymogene deutliche Wechselwirkungen. So aktiviert etwa Plasmin als Effektorprotease des uPA-Systems direkt die pro-MMPs 1, 3, 7, 9, 10 und 13 sowie indirekt die pro-MMPs 2 und 14, die ihrerseits wieder andere pro-MMPs proteolysieren können (Abb. 4). Zudem können die MMPs 1, 3, 7, 9 und 12 Plasminogen zu Plasmin aktivieren (Lijnen, 2001; Mazziari *et al.*, 1997; Visse *et al.*, 2003). Auch uPA kann zur Aktivierung von pro-MMPs beitragen, wie dies kürzlich für das pro-MMP-9 nachgewiesen werden konnte (Zhao *et al.*, 2008), es kann jedoch auch wie Plasmin durch MMPs degradiert werden (D'Alessio *et al.*, 2004; Ugwu *et al.*, 1998).

Über diese posttranslationalen Prozesse hinaus bestehen auch Gemeinsamkeiten in der Transkription, gibt es doch eine ganze Reihe von Proteinen wie etwa HGF/SF, *epithelial growth factor receptor* (EGFR) oder den *extracellular MMP inducer* (EMMPRIN/CD147), die die Expression von Komponenten beider Protease-Systeme induzieren können. Hierauf mag es auch beruhen, dass in Malignomen häufig sowohl eine Überexpression von MMPs als auch von uPA besteht (Baker *et al.*, 2003; Kermorgant *et al.*, 2001; Quemener *et al.*, 2007). Eine Steigerung der Expression von MMPs oder HGF kann darüber hinaus auch durch uPA vermittelt werden (Bueno *et al.*, 2006, González-Cuevas *et al.*, 2006). Was die Beeinflussung der uPA-Expression durch TIMP-1 anbelangt, so konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der TIMP-1-induzierten Hochregulation prometastatischer Gene auch die Expression von uPA und einer Reihe seiner Aktivatoren ansteigt (Kopitz *et al.*, 2007). Dies korreliert mit dem Sachverhalt, dass in Tumoren häufig eine parallele Erhöhung der uPA- und der TIMP-1-mRNA-Transkription (Castelló *et al.*, 2002) sowie ihres Proteingehalts besteht (Baker *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2003). Ein weiteres Indiz für eine direkte Verbindung zwischen TIMP-1 und uPA liefert der Umstand, dass der synthetische Breitspektrum-MMP-Inhibitor Batimastat der Entstehung von Lebermetastasen teilweise durch Induktion der HGF- und uPA-Expression im Wirtsgewebe Vorschub leistet (Holst-Hansen *et al.*, 2001; Krüger *et al.*, 2001).

1.3 Hepatocyte growth factor (HGF)-Signalweg

Der *hepatocyte growth factor* (HGF), synonym *scatter factor* (SF) genannt, bildet gemeinsam mit dem *macrophage stimulating protein* (MSP) die Gruppe der proteolytisch inaktiven Plasminogen-Analoga. Der HGF besteht ähnlich dieser Protease aus einer N-terminalen Domäne (N), vier Kringle-Domänen (K1 bis K4) und einer *serine proteinase homology domain* (SPH), wobei die N- und die K1-Domäne gemeinsam der Rezeptorinteraktion dienen und deshalb zur NK1-Domäne zusammengefasst werden

(Bichmeier *et al.*, 2003). Wie Plasminogen wird der HGF als einkettiges Zymogen synthetisiert und durch limitierte Proteolyse zwischen der K4- und der SPH-Region in eine zweikettige aktive Form mit α - und β -Kette überführt. Dies bewerkstelligen verschiedenste Proteasen wie etwa der *HGF activator* (HGFA), die Matriptase, der uPA und die Gerinnungsfaktoren X bis XII (Jiang *et al.*, 2005).

Der einzige bisher bekannte Rezeptor des HGF ist der *mesenchymal-epithelial transition receptor* (c-Met) (Abb. 7). Dieser stellt ein strukturell der Immunglobulin-ähnlichen Superfamilie der Adhäsionsmoleküle zugehöriges Heterodimer aus einer extrazellulären α - und einer transmembranalen β -Kette dar (Abb. 7). Dieser Aufbau kommt durch Spaltung der N-terminalen Semaphorin-Domäne (Sema) zu Stande, deren einer Teil dann die α -Kette bildet. In der β -Kette schließen sich an die Sema-Region eine Cystein-reiche, vier atypische Immunglobulin-ähnliche, eine transmembranale, eine juxtamembranale, eine Kinase- und schließlich eine C-terminale Domäne an (Birchmeier *et al.*, 2003). Während an die juxtamembranale Region das *Casitas B-lineage lymphoma protein* (CBL) binden und hierdurch die Endozytose und anschließende Degradation des Rezeptors vermittelt kann (Taher *et al.*, 2002) (Abb. 7), interagieren die extrazellulären Domänen der β -Kette mit diversen anderen Membranproteinen. Als für die intrazelluläre Signalweitergabe bedeutsame Interaktionspartner haben sich dabei das Oberflächenprotein CD44, insbesondere seine Spleißvariante 6 (CD44v6), sowie das $\alpha_6\beta_4$ -Integrin herauskristallisiert (Orian-Rousseau *et al.*, 2002) (Abb. 7). Zur effektiven Signaltransduktion kommt es zudem zur Anlagerung des großen Multiadaptor-Proteins *endogenous growth factor receptor bound 2 protein-associated binder-1* (GAB-1) an die C-terminale Region, worüber im Prinzip nahezu alle denkbaren Signalkaskaden initiiert werden können (Abb. 7). Von besonderer Bedeutung sind hierbei die Signalwege zur Beeinflussung von zytoskelettalem Rearrangement, Apoptosehemmung, Proliferation und Angiogenese (Jiang *et al.*, 2005; Royal *et al.*, 2000) (Abb. 7). Zudem kann HGF über eine Hochregulation von Komponenten des uPA-Systems zur Verstärkung der extrazellulären Proteolyse führen und über die Induktion von CXCR-4 die Invasion von CXCL-12-positiven Tumorzellen fördern (Maroni *et al.*, 2007; Tacchini *et al.*, 2003).

Die Organisation des HGF-c-Met-Systems zeigt eine charakteristische Perizellularität. Während der Ligand hauptsächlich von Zellen mesenchymalen Ursprungs wie spezialisierten Fibroblasten, glatten Muskelzellen und infiltrierenden Leukozyten gebildet wird, exprimieren die den Rezeptor c-Met tragenden Epithelien häufig kein HGF (Schuppan *et al.*, 1998). Zwar sind auch autokrine Regulationsmechanismen beschrieben (Rahimi *et al.*, 1996), jedoch scheint der parakrinen Organisation über Zytokine größere Bedeutung zuzukommen (Rosen *et al.*, 1994). Synthetisierter pro-HGF kann dabei auch an Heparansulfat-Proteoglykane der ECM binden und dort bis zur Proteolyse-vermittelten Freisetzung gelagert werden

(Schuppan *et al.*, 1998). So lässt es sich auch erklären, dass uPA auch *up-stream* des HGF-signalling liegen kann (Shimizu *et al.*, 2001).

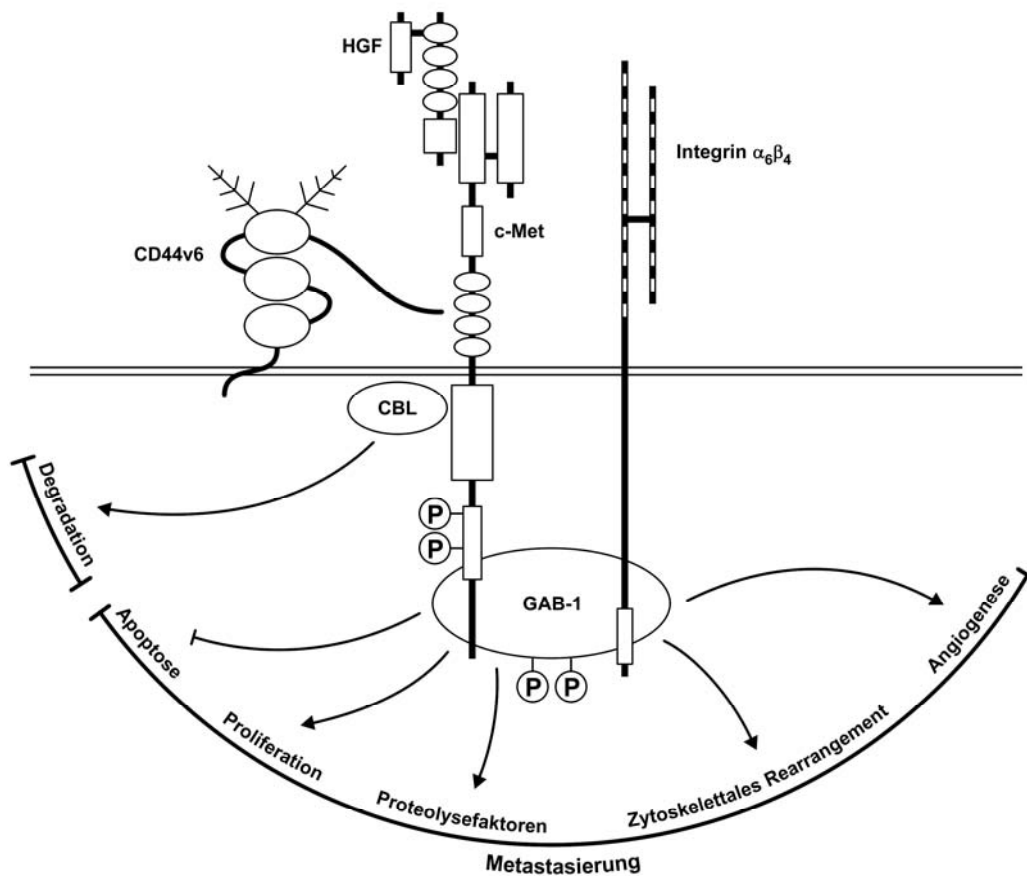


Abbildung 7: HGF-signalling (c-Met: mesenchymal-epithelial transition receptor, CBL: Casitas B-lineage lymphoma protein, GAB-1: endogenous growth factor receptor bound 2 protein-associated binder 1, HGF: hepatocyte growth factor). Dargestellt ist das durch Bindung von HGF an seinen Rezeptor c-Met ablaufende signalling, welches eine bedeutende Förderung der Metastasierung nach sich zieht. CD44v6 und Integrine leisten hierbei wichtige Beiträge zur Aktivierung dieses hauptsächlich über das Multiadaptor-Protein GAB-1 ablaufenden Signalwegs. Nähere Erläuterung im Text.

Physiologisch ist der HGF-Signalweg von eminenter Bedeutung für die Embryonalentwicklung sowie im adulten Organismus für Wundheilung und Regeneration, so dass sich c-Met etwa auf Progenitorzellen findet, die zu geschädigten Geweben migrieren (Birchmeier *et al.*, 2003; Boccaccio *et al.*, 2006). Es überrascht auch nicht, dass die HGF-Expression sowohl durch Hypoxie als typisches Phänomen bei einer Gewebeschädigung induziert werden kann (Pennacchietti *et al.*, 2003), als auch die Aktivierung des HGF-signalling zu einer Hochregulation anderer Faktoren führt, die für die Migration aus hypoxischen Arealen notwendig sind (Tacchini *et al.*, 2003). Eine Induktion des HGF-Signalwegs findet sich auch bei einer Vielzahl von Tumoren und korreliert dabei häufig mit Tumorstadium und Prognose (Birchmeier *et al.*, 2003). Bedeutsam ist in diesem Zusammenhang, dass das Invasionspotential von Tumorzellen auch von der HGF-

induzierten Hochregulation des uPA-Systems abhängt (Bauer *et al.*, 2005a; Bauer *et al.*, 2005b; Lee *et al.*, 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass metastasierende Tumorzellen mit *down*-reguliertem c-Met eine signifikant reduzierte Wachstumsrate im Lebergewebe zeigen, wobei bereits eine 30 %-ige Reduktion der Rezeptorexpression eine 80 %-ige Abnahme der Gesamt-Kinase-Aktivität nach sich zog (Herynk *et al.*, 2003). Allein deshalb ist es schon nicht verwunderlich, dass das HGF-System als vielversprechendes Ziel der *targeted therapy* in Erwägung gezogen wird. Zwar sind alle pharmazeutischen Ansätze noch in der präklinischen Erprobung, jedoch lässt das Spektrum möglicher Interventionsmöglichkeiten zuversichtlich stimmen. Diese reichen von c-Met-Ribozymen und *decoy receptors* über verschiedenste HGF-Antagonisten bis hin zu Hemmstoffen der intrazellulären Signaltransduktion (Christensen *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2005).

1.4 Tumor-assoziierte Immunzellen

Die ursprüngliche Ansicht, dass leukozytäre Infiltrate in sich entwickelnden Tumoren einen Versuch des Wirtsorganismus zur Elimination maligner Zellen darstellen, musste weitgehend revidiert werden. Lediglich dem erworbenen Abwehrsystem billigt man noch eine gewisse suppressive Wirkung auf die Tumorprogression zu (Zou, 2005), während insbesondere die Anzahl Tumor-assoziiierter Makrophagen und Neutrophiler Granulozyten mit einer schlechteren Prognose für maligne Erkrankungen vergesellschaftet ist (Condeelis *et al.*, 2006). Dies liegt zu einem großen Teil daran, dass diese Immunzellen beim Eintritt in ein neoplastisches *microenvironment* aktiviert werden und so über Hochregulation von Wachstums- und Angiogenesefaktoren, Chemokinen und Enzymen zum *ECM-remodelling* (Condeelis *et al.*, 2006; DeNardo *et al.*, 2008) die Empfänglichkeit der Gewebes für infiltrierende Tumorzellen erhöhen. Die ausgeschütteten Botenstoffe führen zudem zu einer weiteren Infiltration von Tumor- und myeloiden Zellen, so dass der Ausprägung einer Prometastatischen Nische Vorschub geleistet wird (Chambers *et al.*, 2002; Kaplan *et al.*, 2006).

Insbesondere was die Initiation des HGF-*signalling* anbelangt, sind Immunzellen und hier v. a. infiltrierende Neutrophile Granulozyten von erheblicher Bedeutung, stellen sie doch als Einträger des Liganden HGF Vermittler für die in c-Met-positiven Epithelzellen ablaufenden Signalkaskaden dar. Dies konnte sowohl in Fällen entzündlicher Krankheiten (Crestani *et al.*, 2002; Grenier *et al.*, 2002) als auch im Rahmen der Tumorprogression (Imai *et al.*, 2005; Wislez *et al.*, 2003) nachgewiesen werden. Auch Makrophagen exprimieren in bestimmten Situationen HGF und kommen somit insbesondere in der Leber als Kooperationspartner für c-Met-tragenden Epithelzellen in Frage (Armbrust *et al.*, 2002; Morimoto *et al.*, 2001). Bedeutsam in diesem Kontext ist, dass uPA sowohl direkt die

Degranulation von Immunzellen vermitteln (Gyetko *et al.*, 2004), als auch indirekt durch Initiation proinflammatorischer Signalkaskaden ihre Rekrutierung verstärken kann (Abraham *et al.*, 2003). Somit kann uPA auch über die Induktion der Infiltration von HGF-speichernden Zellen *up-stream* des HGF-Signalwegs liegen.

1.5 Methoden zur Modulation der Genexpression

1.5.1 Adenoviraler Gentransfer

Mitglieder der humanen Adenovirus-Familie *Mastadenoviridae* sind in der Lage, in Vertebraten ein weites Spektrum an Geweben inklusive ausdifferenzierter, sich nicht mehr teilender Zellen zu infizieren (Amalfitano, 2004). Die experimentell am Häufigsten verwendeten Adenoviren sind dabei Deletions- oder Substitutionsvarianten des humanen Adenovirus Serotyp 5 (Jones *et al.*, 1978). Dem Genom dieser Adenoviren fehlen das *early gene 1* (E1) und häufig auch das *early gene 3* (E3). Die von E1 kodierten Proteine kontrollieren die Transkription viraler DNA, den Eintritt der infizierten Zelle in die S-Phase der Mitose und die Hemmung von deren Apoptose, während E3-Proteine die Immunantwort des Wirtsorganismus und die Virusfreisetzung modulieren (Amalfitano, 2004). Somit sind derart konstruierte virale Vektoren replikationsdefizient und vergleichsweise wenig immunogen. Da die Expression der sog. *late genes*, welche insbesondere für die Bestandteile des Viruskapsids kodieren, erst dann möglich ist, wenn die DNA-Replikation des Virus abgeschlossen ist, bedarf es zur Generierung solcher Adenoviren in der Zellkultur der Anwendung von Ammenzelllinien, welche stabil die E1- und E3-Regionen des Virusgenoms exprimieren (Amalfitano, 2004).

Experimentell bedeutsam ist, dass bei intravaskulärer Applikation von weniger als 10^9 pfu/ml Virus die zirkulierenden Adenoviren insbesondere in der Leber sequestriert werden, so dass sich dort Transduktionsraten von bis zu 90 % der Leberzellen finden (Amalfitano *et al.*, 1998). Die entsprechend hohe Transgenexpression drei bis zehn Tage nach Inokulation des Virus kann auch für das in dieser Arbeit verwendete für TIMP-1 kodierende Adenovirus nachgewiesen werden (Elezkurtaj *et al.*, 2004). Somit eignet sich dieses Adenovirus für die hocheffiziente und über den Versuchszeitraum stabile Überexpression von TIMP-1 in der murinen Leber.

1.5.2 RNA-Interferenz (RNAi)

Der Begriff RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet die Stilllegung doppelsträngiger RNA-Moleküle, wie sie physiologisch als posttranskriptioneller Abwehrmechanismus eukaryontischer Zellen gegen fehlerhaft transkribierte oder auch von Pathogenen

synthetisierte doppelsträngige RNA (dsRNA) von Bedeutung ist. Diese dsRNA wird von dem RNaseIII-Enzym *dicer* erkannt und in 20 bis 25 Nukleotide lange doppelsträngige Fragmente, die *small inhibitory RNAs* (siRNAs), zerschnitten. Anschließend assembliert sich ein Ribonukleoproteinpartikel, der *RNA-induced silencing complex* (RISC), welcher die siRNAs entdrillt und den *sense*-Strang degradiert, während der *antisense*-Strang zur spezifischen Suche nach komplementären mRNA-Sequenzabschnitten verwendet wird. Findet der aktivierte Komplex homologe Sequenzen, so werden diese mittels einer Endonuklease gespalten. Da hierüber die Menge einer spezifischen mRNA verringert wird, kann auch das entsprechende Protein nur noch in geringen Mengen oder überhaupt nicht mehr translatiert werden (Takeshita *et al.*, 2006).

Gentechnisch kann der gezielte mRNA-Abbau auch transient durch Transfektion von Zellen mit vorgefertigten siRNAs oder stabil durch Vektor-vermittelte Einschleusung von *small hairpin RNAs* (shRNA) induziert werden (Takeshita *et al.*, 2006). Der für die shRNA kodierende Vektorabschnitt besitzt dabei einen charakteristischen Aufbau aus einer Zielgenspezifischen *sense*-Sequenz, gefolgt von einigen wenigen Basenpaaren zur Ausbildung einer Schleifenstruktur und schließlich einer *antisense*-Sequenz, auf die sich nach intrazellulärer Abspaltung des *hairpin* die *sense*-Sequenz zurückfalten kann. Die Anwendung der RNA-Interferenz kann dabei sowohl in kultivierten Zellen als auch *in vivo* erfolgen (Gao *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit diente die shRNA-Technologie zur Herstellung von uPA-*knock-out*-Lymphomzellen.

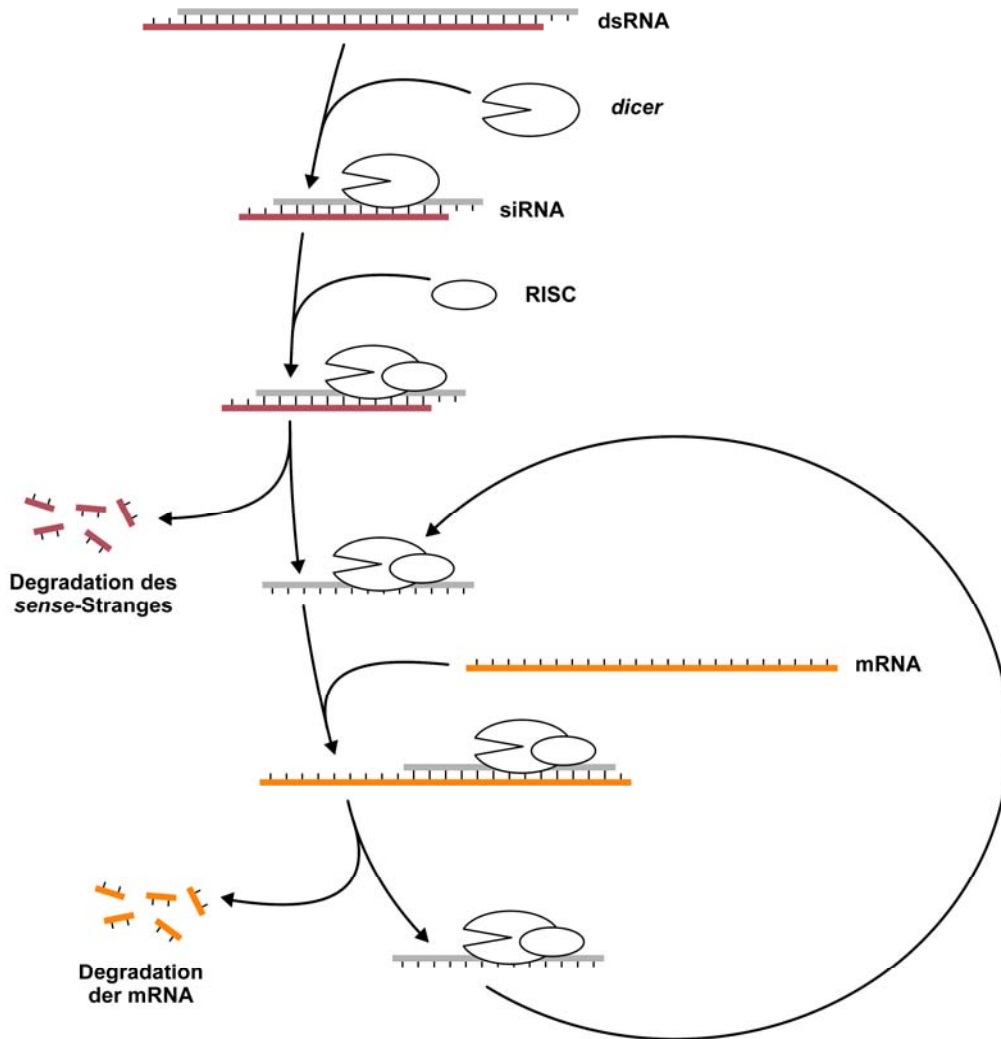


Abbildung 8: Prinzip der RNA-Interferenz (RISC: *RNA-induced silencing complex*). Dargestellt ist das Prinzip der Genstilllegung über RNA-Interferenz. Nähere Erläuterung im Text.

2 Zielsetzung

Aus den Ergebnissen früherer Arbeiten leitete sich das Modell ab, dass TIMP-1 zu einem verstärkten *scattering* von Tumorzellen aus etablierten Makrometastasen und hierüber zu einer Erhöhung der Gesamtmetastasierung führt. Da hierfür u. a. die Induktion einer prometastatischen Gensignatur verantwortlich zu sein scheint, in deren Rahmen auch die Expression von uPA hochreguliert wird, stellte sich die Frage nach der biologischen Funktion dieser TIMP-1-uPA-Korrelation.

Ziel der vorliegenden Arbeit war also zunächst die Überprüfung, ob sich die TIMP-1-induzierte Metastasierung sowie deren Phänotyp in Abhängigkeit von der uPA-Expression verändern. Sollte dies der Fall sein, sollte durch Einsatz gentechnisch modifizierter Nacktmäuse und durch stabile RNA-Interferenz generierter Tumorzellvarianten geklärt werden, ob hierfür v. a. der Wirts- oder der Tumorzell-Anteil an uPA verantwortlich ist.

Da gezeigt werden konnte, dass TIMP-1 zu einer Induktion des HGF-*signalling* führt, und uPA auch ein potenter Aktivator des pro-HGF ist, stellte sich die Frage, ob uPA ein Mediator der TIMP-1-bedingten Aktivierung dieses Signalwegs ist. Hierbei sollte ermittelt werden, ob eine mögliche Abhängigkeit dieser Induktion auf einer verstärkten Aktivierung der Pro-Form des Liganden, auf einer Hochregulation des Rezeptors c-Met oder auf einem vergrößerten Reservoir an HGF beruht.

Ferner sollte geklärt werden, ob Immunzellen wie Makrophagen oder Neutrophile Granulozyten in Abhängigkeit von TIMP-1 und/oder uPA zum Ort der Metastasierung rekrutiert werden und ob dies eine mögliche Erklärung für das HGF-vermittelte *scattering* von Tumorzellen liefert.

Letztlich sollten die gewonnenen Ergebnisse dazu dienen, die mögliche Beteiligung von uPA an der Ausbildung einer Prometastatischen Nische durch Gentransfer von TIMP-1 in die Wirtsumgebung des Zielorgans zu klären und daraus Schlüsse auf die prinzipielle Sinnhaftigkeit in das uPA- oder HGF-System eingreifender Therapieregime bei Patienten mit hohen tumorassoziierten TIMP-1-Spiegeln zu ziehen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Aceton	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Agarose	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Avidin-Blocklösung	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland
BCA-Lösung 1	Pierce Inc., Rockford, USA
BCA-Lösung 2	Pierce Inc., Rockford, USA
Biotin-Blocklösung	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland
BME (β -Mercaptoethanol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Bromphenolblau (3,3',5,5'-Tetrabromphenolsulfonphthalein)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
BSA (Bovines Serum-Albumin)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Calciumchloriddihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
DAB (3, 3'-Diaminobenzidin)-Plus-Substratlösung	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol)-Stocklösung	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
D-Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
DMF (Dimethylformamid)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DQ TM -Gelatine-Stocklösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol <i>pro analysi</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Flüssigstickstoff (N_2)	Linde AG, Pullach, Deutschland
Formalin (CH_2O), w = 37 % (w/w)	Karl Roth GmbH, Fürth, Deutschland
Gelbes Blutlaugensalz ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd, w = 50 % (w/w)	Karl Roth GmbH, Fürth, Deutschland
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Incidin Extra N	Ecolab GmbH, Wien, Österreich
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaisers Glyceringelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kresolrot (4-[3-(4-hydroxy-3-methylphenyl)-1,1-dioxo-benzo[c]oxathiol-3-yl]-2-methylphenol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Lumi-Light Kit	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchloridhexahydrat (MgCl ₂ · 6 H ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mayers Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Moviol-4-88-Stock	Karl Roth GmbH, Fürth, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdesoxycholat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphatdihydrat (Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NP40 ([Octylphenoxy]polyethoxyethanol)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
PAA (96,7 % (w/w) Acrylamid + 3,3 % (w/w) Bisacrylamid), w = 40 % (w/w)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Paraffin	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Plasminogen-Stocklösung	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
Ponceau-S-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Prestained molecular weight marker Nr. 161-0374	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Proteinase-K-Lösung (c = 1 mg/ml)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland

Puromycindihydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Rotes Blutlaugensalz ($K_3[Fe(CN)_6]$)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
StreptAB Complex/HRP Duett Mouse/Rabbit Kit	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
TissueTek [®] OCT compound	Sakura Finetek Germany GmbH, Heppenheim, Deutschland
Tris (Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
Triton X-100 (Polyethylenglycol-p- (1,1,3,3-tetramethylbutyl)- phenylether)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
Trypanblau (3,3'-Dimethyl-4,4'- bis(5-amino-4-hydroxy-2,7- disulfonaphtyl-3-azo)-[1,1'- biphenyl]), w = 0,4 % (w/v)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), w = 30 % (w/w)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β- D-galaktopyranosid)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Zellkultur-Agarose	Karl Roth GmbH, Fürth, Deutschland

3.1.2 Zellkulturreagenzien

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Argininhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
L-Asparaginsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Nordamerikanisches FCS (fetal calf serum)	CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen, Deutschland
Nordamerikanisches FCS GOLD (fetal calf serum)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin/EDTA (Lösung aus Ethylendiamintetraacetat-	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

[w = 0,02 % (w/v)] und
 Trypsin [w = 0,05 % (w/v)],
 pH = 7,4)

Zellkultur-PBS (phosphat buffered saline), pH = 7,4 Biochrom AG, Berlin, Deutschland

3.1.3 Molekularbiologische Reagenzien

Absolve	NEN Life Science Products, Zaventem, Belgien
Desoxyadenosintriphosphat (dATP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Desoxycytosintriphosphat (dCTP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Desoxyguanintriphosphat (dGTP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Desoxythymintriphosphat (dTTP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
10 · KCl-TAQ-Puffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
mPGK2m-Stocklösung	Apara Bioscience GmbH, Denzlingen, Deutschland
muPA7p-Stocklösung	Apara Bioscience GmbH, Denzlingen, Deutschland
muPA4m-Stocklösung	Apara Bioscience GmbH, Denzlingen, Deutschland
Nukleasefreies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
20 · Pre-Developed TaqMan™ Assay Reagent Human 18S rRNA (Hs99999901_s1)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Random-Hexamere (c = 200 ng/μl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Ribolock RNase Inhibitor	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
20 · TaqMan™ Assay for Murine uPA (Mm00447054_m1)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Taq-Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
5 · Transkriptionspuffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Trizol®-Reagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

3.1.4 Gebrauchsgegenstände

Alufolie	Mercateo AG, Köthen, Deutschland
Autoklaviertes Mäusefutter	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland

Blottinggerät	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Centrifuge 5415 R	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
CO ₂ -Eis-Behälter	KGW Isotherm Karlsruher Glastechnisches Werk – Schieder GmbH, Karlsruhe, Deutschland
CO ₂ -Eis-Maschine	KGW Isotherm Karlsruher Glastechnisches Werk – Schieder GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Crasheismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland
Cryoschraubdeckelgefäß mit Silikondichtung (V = 2,5 ml)	nerbe plus GmbH, Winsen an der Luhe, Deutschland
Cryotubes (V = 2,0 ml)	TPP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz
Deckgläser (O = 24 · 40 mm ²)	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Demaskierungsküvette	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, München, Deutschland
Entsorgungsbeutel (V = 10 l)	TPP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz
Erlenmeyerkolben (V ₁ = 10 ml, V ₂ = 50 ml und V ₃ = 500 ml)	DURAN Group GmbH, Wertheim, Deutschland
Feuchte Kammer	Tupperware Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Flüssigkeitstank (V = 2,5 l)	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden, Deutschland
Gelgießvorrichtung mit Zubehör	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gelmikrowelle	Siemens AG, München, Deutschland
Gestopfte Pipetten-Spitzen (V ₁ = 10 µl, V ₂ = 20 µl, V ₃ = 100 µl, V ₄ = 250 µl und V ₅ = 1000 µl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Glasflaschen (V ₁ = 100 ml, V ₂ = 250 ml, V ₃ = 500 ml und V ₄ = 2500 ml)	DURAN Group GmbH, Wertheim, Deutschland
Glaspipetten (V = 10 ml)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Große Histologiewaage SBA 51	Scaltech Inc., Houston, USA
Histologiegefrierschrank (θ = -20°C)	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, Deutschland
Histologiekühlschrank (θ = 4°C)	Robert Bosch GmbH, Gerlingen, Deutschland
Histologiemikrowelle	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland
Histologiepinsel 236	MCT Moderne Contact Technology GmbH, Reichenschwand, Deutschland
Holzgranulat	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg,

	Deutschland
Holzspatel	MedPlus Medizintechnik GmbH, Dresden, Deutschland
Hood Hera Safe	Heraeus Sepatech GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Horizontale Elektrophoresekammer Hofer HE 33 Mini Horizontal Submarine Unit	Hofer Inc., Holliston, USA
Horizontale Küvetten	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, München, Deutschland
Individual ventilized cages Hohenpeißenberg, Deutschland	Tecniplast Deutschland GmbH,
Injektionsspritzen (V = 10 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Inokulationsnadeln Sterican Gr. 20	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Klarsichtfolie Plastibrand®	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim, Deutschland
Kleenex Ultra 6760 Handtuch	Hakle-Kimberly Deutschland GmbH, Koblenz, Deutschland
Kleine Histologiewaage	Ohaus Europe, Middle East & Africa, Nänikon, Schweiz
Kryostat-Mikrotom HM500 OM	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Kühlschränke ($\theta_1 = -20^\circ\text{C}$ und $\theta_2 = 4^\circ\text{C}$)	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, Deutschland
Kühlschränke ($\theta = -80^\circ\text{C}$)	Heraeus Sepatech GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Maßstabsbalken	Leica AG, Solms, Deutschland
Megafuge 2.0R	Heraeus Sepatech GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Messzylinder ($V_1 = 50$ ml, $V_2 = 250$ ml, $V_3 = 500$ ml und $V_4 = 1000$ ml)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate	Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mikrotommesser S35	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Minibeadbeater™	Biospec Products Inc., Bartlesville, USA
Moucoirs Handtücher	Hakle-Kimberly Deutschland GmbH, Koblenz, Deutschland
Multipette plus	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling- Berzdorf, Deutschland
Multipettenaufsätze ($V_1 = 5$ µl, $V_2 = 10$ µl, $V_3 = 50$ µl, $V_4 = 100$ µl und $V_5 = 250$ µl)	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling- Berzdorf, Deutschland
N ₂ -Tank	Linde AG, Pullach, Deutschland
N ₂ -Tragebehälter	KGW Isotherm Karlsruher Glastechnisches Werk –

	Schieder GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
Nitrocellulose-Membran RPN2020D	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
Objektträgerbögen (Gr. 10)	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, München, Deutschland
Objektträgerboxen (Gr. 50)	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, München, Deutschland
Paraffinblockschachteln	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Paraffineinbettkassetten	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Paraffin Embedding System Dispenser Unit TBS88	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Paraffin-Mikrotom HM355	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Paraffin-Streckbad TFB35	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Parafilm M	Pechiney Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
PCR-Maschine PTC-200 Peltier Thermal	MJ Research Inc., Waltham, USA
PCR-Tube (V = 0,2 ml)	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling- Berzdorf, Deutschland
pH-Meter Metrohm 632	Deutsche Metrohm GmbH & Co. KG Elektronische Messgeräte, Filderstadt, Deutschland
Pinzette	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling- Berzdorf, Deutschland
Pipetboy	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling- Berzdorf, Deutschland
Pipetten ($V_1 = 10 \mu\text{l}$, $V_2 = 20 \mu\text{l}$, $V_3 = 100 \mu\text{l}$ und $V_4 = 1000 \mu\text{l}$)	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling- Berzdorf, Deutschland
Plastiksprühflaschen	Bürkle GmbH, Bad Bellingen, Deutschland
Plastiktöpfchen (V = 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Schwenktisch HS 260 basic	Ika [®] -Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
SemperCare [®] edition powder free Gr. M	Semperit Technische Produkte GmbH, Wien, Österreich
Skalpell	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Softaskin [®]	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Spectrophotometer DU [®] 640	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Stericups [™] ($D_{\text{Poren}} = 0,22 \mu\text{m}$)	Millipore GmbH, Eschweiler, Deutschland
Sterilium classic pure (V = 500 ml)	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
Stromwandler für Blotting Power	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Pac 1000	
Stromwandler für vertikale Gelelektrophorese Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Stromwandler für horizontale Gelelektrophorese Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
SuperFrost® Plus Objektträger	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
TaqMan™ ABI PRISM 7900 HT Detection System	Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Thermo / Forma Scientific CO ₂ Water Jacketed Incubator	CE – Instruments Thermo Quest Corp., Egelsbach, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Tischheizgerät RCT-basic	Ika®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Tränkeflaschen	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland
Trockenofen ($\theta = 80^{\circ}\text{C}$)	Heraeus Sepatech GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Tubes ($V_1 = 1,5 \text{ ml}$ und $V_2 = 2,0 \text{ ml}$)	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Tubeständer (verschiedene Gr.)	Karl Roth GmbH, Fürth, Deutschland
Ungestopfte Pipetten-Spitzen ($V_1 = 10 \mu\text{l}$, $V_2 = 20 \mu\text{l}$, $V_3 = 100 \mu\text{l}$, $V_4 = 250 \mu\text{l}$ und $V_5 = 1000 \mu\text{l}$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
UV-Lampe	Colenta Labortechnik GmbH & Co. KG, Waldkirchen, Deutschland
Varioclav® Dampfsterilisatoren	H+P Labortechnik GmbH, Hackermoos, Deutschland
Versiegelungsfolie für MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate	Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vertikale Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Vertikale Küvetten	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, München, Deutschland
Vortexer MS 2 Minishaker IKA®	Ika®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Waage Explorer	Ohaus Europe, Middle East & Africa, Nänikon, Schweiz
Wallac Victor ² 1420 Multilabel Counter	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
Wallac-Platte (96 wells)	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim, Deutschland

Wärmebad	Grant Instruments Ltd., Shepreth, UK
Wärmeschrank ($\theta = 37^{\circ}\text{C}$)	WTC Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Wärmeschrank ($\theta = 65^{\circ}\text{C}$)	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Well-Platten (6, 12, 24 und 96 U-wells)	TPP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz
Whatman Munktell Filter Paper 1F	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Zellkulturflaschen ($O_{\text{Boden}/1} = 25 \text{ cm}^2$, $O_{\text{Boden}/2} = 75 \text{ cm}^2$ und $O_{\text{Boden}/3} = 150 \text{ cm}^2$)	TPP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturkühlschrank ($\theta = 4^{\circ}\text{C}$)	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, Deutschland
Zellkulturmikroskop Zeiss Axiovert 25	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Zellkulturröhrchen ($V_1 = 15 \text{ ml}$ und $V_2 = 50 \text{ ml}$)	BD Biosciences AG, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturschalen ($D_1 = 6 \text{ cm}$, $D_2 = 10 \text{ cm}$ und $D_3 = 15 \text{ cm}$)	TPP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz
Zellstoff	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland
Zirconiumsilicatkügelchen ($D = 0,1 \text{ mM}$)	Biospec Products Inc., Bartlesville, USA

3.1.5 Mikroskope und optische Dokumentationsgeräte

Auflichtmikroskop SZX9	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Coolpix 4500 Digital Camera	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Durchlichtmikroskop DRMB	Leica AG, Solms, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 135	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Kodak Image Station 440 CF	Kodak GmbH, Stuttgart, Deutschland

3.1.6 Software

AxioVision 4.5	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Kodak 1D 3.5 Image Software	Kodak GmbH, Stuttgart, Deutschland
Microsoft Office 2003	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
SDS2.2	Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland

SigmaPlot	Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland
SigmaStat 3.0	Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland
SPOT	Diagnostic Instruments Inc., Burreoughs Street, USA

3.2 Tierexperimentelle Methoden

3.2.1 Versuchstiere

CD1^{nu/nu} Die Mäuse dieses Stammes wurden bei der Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland, käuflich erworben. Ihr Stamm wurde durch Transfer eines mutierten unfunktionellen *nude*-Gens aus dem Ursprungstamm *Caesarean Derived 1* (CD1) generiert. Da in Mäusen das Genprodukt des *nude*-Locus, *winged helix nude* (*whn*), für die Keratinisierung des Haarschaftes ebenso wie für Differenzierung der epithelialen Vorläuferzellen des Thymus benötigt wird, sind diese Mäuse sowohl nackt als auch athym und damit immundefizient.

uPA^{+/-}-META/Bom^{nu/nu} und uPA^{-/-}-META/Bom^{nu/nu} Die Zucht von Mäusen mit variablem uPA-Status erfolgte mit Muttertieren, welche freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Dr. Nils Brüner (Institut für Veterinärpathobiologie der Königlichen Veterinär- und Landbauhochschule Dänemarks, Fredriksberg, Dänemark) zur Verfügung gestellt wurden. Diese Muttertiere entstammten einer fünfmaligen Rückkreuzung von Mäusen eines gemischten C57BL6J-129-Hintergrunds in die META/Bom-Linie. Diese wiederum stellt einen Subtyp von teilweise immundefizienten BALB/c-Mäusen mit mutiertem *nude*-Allel dar. Als Ausgangspunkt für die Zucht diente ursprünglich die Verpaarung eines uPA^{+/-}-META/Bom^{nu/nu}-Männchens mit einem uPA^{+/-}-META/Bom^{nu/+}-Weibchen (Frandsen TL *et al.*, 2001). Von den Nachkommen wurden für die Versuche dieser Arbeit lediglich homozygote uPA-Wildtyp- oder *-knock-out*-Mäuse verwendet.

3.2.2 Tierhaltung

Die Haltung der Tiere erfolgte im *specified pathogen free* (SPF)-Tierstall des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, München, Deutschland, in

speziellen *individual ventilized cages* (IVCs) zur Haltung von Mäusen. Dabei wurden bis zu sechs Mäuse in einen Mäusekäfig (Höhe 143 mm, Breite 197 mm, Tiefe 308 mm) eingesetzt. Autoklaviertes Mäusefutter und autoklaviertes Trinkwasser bei 2-maligem Wechsel der Tränkeflaschen pro Woche erhielten die Tiere *ad libitum*. Spezielles Holzgranulat diente als Einstreu bei zweimaligem Wechsel pro Woche. Wenn Nacktmäuse eingesetzt wurden, wurde durch vermehrtes Einstreu und Zugabe von sterilisiertem Zellstoff als Nestbaumaterial dem vermehrten Wärmebedürfnis dieser Tiere Rechnung getragen. Die Räume waren speziell als Tierhaltungsräume konzipiert mit personenlimitierter Zutrittskontrolle, Pflege durch ausgebildete Versuchstierpfleger, Klimatisierung und *health monitoring* gemäß der Empfehlungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) durch die regelmäßige Untersuchung von *sentinel*-Tieren und einen Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 h mit Dämmerungsphase. Die Haltung der Tiere erfolgte in Umsetzung der in der EU-Richtlinie 86/609 und dem Tierschutzgesetz des Freistaates Bayern festgelegten Bestimmungen.

3.2.3 Tierversuch mit Modulation des uPA-Status der Tumorzellen

Zur Untersuchung des Einflusses von durch Tumorzellen synthetisiertem uPA auf das TIMP-1-induzierte Metastasierungsmuster bediente man sich in dieser Arbeit des etablierten L-CI.5s-Modells, bei dem die Lebermetastasierung dieses *lacZ*-markierten T-Zell-Lymphoms bis auf Einzelzellebene nachverfolgt werden kann (Abb. 3). Die zum Zeitpunkt des Tierversuchs etwa 8 bis 12 Wochen alten Mäuse wurden für den Versuch nach der Art des verwendeten Adenovirus und dem uPA-Genotyp der inokulierten Tumorzellen gruppiert (Tab. 1).

Adenovirus	L-CI.5sshscr	L-CI.5sshuPA
Addl70-3	6	5
AdTIMP-1	8	5

Tabelle 1: Anzahl der CD1^{nu/nu}-Mäuse pro Gruppe.

An Tag 1 eines Tierversuchs wurde den CD1^{nu/nu}-Mäusen eine Dosis von $2 \cdot 10^9$ pfu von für humanes TIMP-1-kodierendes Adenovirus (AdTIMP-1) bzw. Kontrollvirus (Addl70-3), gelöst in einem Volumen von 0,2 ml PBS²⁺, in die linke Schwanzvene injiziert. Hierzu wurden zunächst die in 1,5-ml-Tubes eingefrorenen Virusaliquots auf Crasheis langsam aufgetaut und, ausgehend von der Stockkonzentration des jeweiligen Aliquots ($c_{\text{AdTIMP-1}} = 7,5 \cdot 10^{10}$ pfu/ml, $c_{\text{Addl70-3}} = 3,0 \cdot 10^{11}$ pfu/ml), das benötigte Volumen entnommen, ehe die Tubes wieder bei -80°C eingefroren wurden. Die Aufrechterhaltung hoher TIMP-1-Konzentration im Lebergewebe über die gesamte Versuchsdauer auf der Grundlage dieses

Inokulationsregimes wurde bereits validiert (Kopitz *et al.*, 2007). Drei Tage nach der Virusinokulation wurden den Mäusen jeweils $5,0 \cdot 10^3$ Tumorzellen in die rechte Schwanzvene inokuliert. Weitere sechs Tage später wurden die Mäuse per Genickbruch geopfert und ihnen die Leber entnommen.

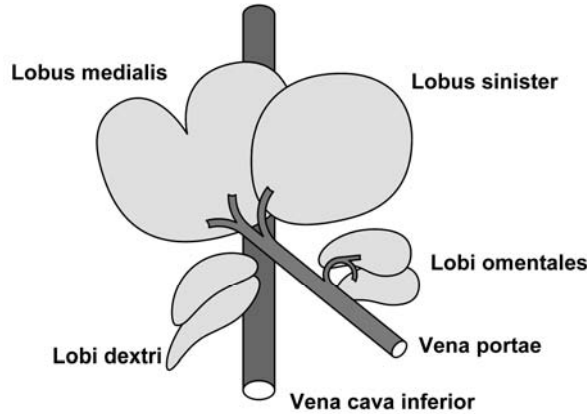


Abbildung 9: Schematische Darstellung der murinen Leberlappen.

Die *Lobi omentales* und *dextri* wurden jeweils in 2,0-ml-Cryotubes verbracht, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich im -80°C -Kühlschrank bis zur molekularbiologischen bzw. proteinbiochemischen Analyse gelagert. Der *Lobus sinister* wurde in etwa 3 mm dicke Scheiben geschnitten und für Immunhistochemie und -fluoreszenz aufbereitet. Der *Lobus medialis* wurde für die Organ-X-Gal-Färbung verwendet. Der restliche Mausekadaver wurde richtliniengemäß entsorgt.

3.2.4 Tierversuch mit Modulation des uPA-Status auf Wirtsseite

Um den Einfluss von Wirts-uPA auf die TIMP-1-induzierte Metastasierung zu prüfen, wurden die selbst gezüchteten $\text{uPA}^{+/+}\text{META/Bom}^{nu/nu}$ und $\text{uPA}^{-/-}\text{META/Bom}^{nu/nu}$ verwendet. Nach dem uPA-Genotyp und der Art des inokulierten Adenovirus ließen sich die Versuchstiere folgendermaßen gruppieren (Tab. 2):

Adenovirus	$\text{uPA}^{+/+}\text{META/Bom}^{nu/nu}$	$\text{uPA}^{-/-}\text{META/Bom}^{nu/nu}$
Add170-3	3	5
AdTIMP-1	4	4

Tabelle 2: Anzahl der $\text{META/Bom}^{nu/nu}$ -Mäuse pro Gruppe.

Die Versuchsdurchführung war analog zum Tierversuch mit modulierten Tumorzellen.

3.2.5 Tierversuch mit Depletion der Neutrophilen Granulozyten

Um den Stellenwert der Neutrophilen Granulozyten für die Ausprägung des TIMP-1-induzierten Metastasierungsphänotyps zu eruieren, wurde bei 7 selbst gezüchteten uPA^{+/+}META/Bom^{nu/nu}-Mäusen eine Neutrophilendepletion durchgeführt. Hierzu erhielten die Tiere nicht nur das bereits dargestellte Regime von AdTIMP-1- und L-CI.5s-Inokulationen, sondern zusätzlich je 250 µl Anti-Ly-6G-Antikörper-Serum (polyklonal, Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, USA) 24 h und 2 h vor sowie 5 Tage nach Inokulation des Adenovirus. Die Depletion vor Inokulation des für TIMP-1 kodierenden Adenovirus wurde dabei deshalb gewählt, um die TIMP-1-abhängige Infiltration der Neutrophilen effektiv zu unterbinden. Die dritte Depletion an Tag 6 erfolgte, um eine Depletion über die gesamte Versuchsdauer sicherzustellen. Die Effizienz dieses Depletionsprotokolls wurde bereits vielfach publiziert (Lawson *et al.*, 1997). Als Kontrollgruppen dienten 5 uPA^{-/-}META/Bom^{nu/nu}-Mäuse, die lediglich AdTIMP-1 und Tumorzellen erhielten, deren Neutrophile Granulozyten jedoch nicht depletiert wurden. Tötung und Gewebeverarbeitung erfolgten analog zum Tierversuch mit modulierten Tumorzellen.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Lösungen und Medien

Arginin-Asparaginsäure-Lösung ($c_{\text{Arg}} = 27 \text{ mM}$ bzw. $c_{\text{Asp}} = 55 \text{ mM}$) aus
2,9 g L-Argininhydrochlorid und 0,9 g L-Asparaginsäure *ad* 250 ml mit ddH₂O

BME-Lösung ($c = 50 \text{ mM}$) aus
1 g BME *ad* 250 ml mit ddH₂O

Calciumchloridlösung ($c = 0,68 \text{ mM}$) aus
5 g CaCl₂ · 2 H₂O *ad* 500 ml mit ddH₂O

Glutaminlösung ($c = 200 \text{ mM}$) aus
7,3 g L-Glutamin *ad* 250 ml mit ddH₂O

HEPES-Lösung ($c = 1 \text{ M}$) aus
59,6 g HEPES *ad* 250 ml mit ddH₂O

Magnesiumchloridlösung ($c = 0,49 \text{ mM}$) aus
5 g mgCl₂ · 6 H₂O *ad* 500 ml mit ddH₂O

Medium für HEK-293 während der normalen Kultivierung aus
500 ml DMEM mit 5 ml Glutamin-Lösung und 56 ml nordamerikanisches FCS

Medium für HEK-293 während der Transfektion aus
500 ml DMEM mit 5 ml Glutamin-Lösung und 11 ml nordamerikanisches FCS

Medium für L-CI.5s aus
500,0 ml RPMI 1640 mit 0,5 ml BME-, 5,0 ml Glutamin- und 5,0 ml HEPES-Lösung
sowie 11,0 ml nordamerikanisches FCS GOLD

PBS²⁺ aus
5 ml CaCl₂- und 5 ml MgCl₂-Lösung *ad* 500 ml mit Zellkultur-PBS und dann sterilfiltriert

3.3.2 Zelllinien

- HEK-293** Die HEK-293-Zelllinie ist das Transformationsprodukt einer humanen embryonalen Nierenzelle (*human embryonic kidney cell*) epithelialen Ursprungs mit Genomanteilen des menschlichen Adenovirus 5 (Ad5), so dass die adenovirale E1-Region stabil exprimiert wird. Somit können HEK-293-Zellen als Verpackungszelllinie für E1-deletierte Adenoviren verwendet werden (Amalfitano, 2004). Mikroskopisch erscheinen sie hypotriploid und mehrheitlich adhärent und zeichnen sich durch eine hohe Infizier- und Transduzierbarkeit aus. Ursprünglich wurden sie von BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland, als Bestandteil des Adeno-XTM-Systems erworben.
- L-CI.5s** Diese Zelllinie ist von Prof. Dr. Achim Krüger aus einer Lebermetastase der hochmalignen Variante ESb der murinen Methylcholanthren-induzierten T-Zell-Lymphomlinie L5178Y/E (Eb) generiert worden (Krüger *et al.*, 1994). L-CI.5s-Zellen tragen als Marker für ihre *Ex-vivo*-Detektion das bakterielle *lacZ*-Gen, kodierend für die zytoplasmatische Expression des Enzyms β -D-Galaktosidase. Mikroskopisch handelt es sich um annähernd kugelige Suspensionszellen.

3.3.3 Zellkultivierung

Alle Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37°C, 95 % (v/v) Luftfeuchtigkeit und 5 % (v/v) CO₂ auf Zellkulturschalen von 15 cm Durchmesser kultiviert und drei Mal wöchentlich passagiert. Hierbei wurde bei den HEK-293-Zellen zunächst das verbrauchte Medium abgenommen, einmal mit 10 ml Zellkultur-PBS gespült und die Zellen anschließend mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden abgelöst. Dann wurde die Suspension wieder auf in der Regel insgesamt 15 ml Medium aufgefüllt, im Verhältnis 1 : 3 gesplittet und dann auf 10 ml Volumen mit HEK-293-Kultiviermedium aufgefüllt.

L-CI.5s-Zellen wurden als Suspensionszellen in Schraubflaschen von 25 cm² Bodenfläche kultiviert und ebenfalls drei Mal pro Woche gesplittet. Hierzu wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren eine homogene Zellsuspension hergestellt, welche dann meist im Verhältnis 1 : 5 auf neue Schraubflaschen verteilt und in diesen auf insgesamt 10 ml Gesamtvolumen mit dem entsprechenden Medium aufgefüllt wurde.

3.4 Adenoviren

AdTIMP-1 Dieses Adenovirus wurde von Frau Dr. Charlotte Kopitz (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München, München, Deutschland) mit Hilfe des AdMaxTM-Systems (Micorbix Biosystems Inc., Toronto, Kanada) hergestellt (Kopitz *et al.*, 2007) und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Er besitzt eine Transgenkassette, kodierend für humanen TIMP-1 unter Kontrolle des humanen CMV-Promotors (P_{CMV}) (Abb. 10).

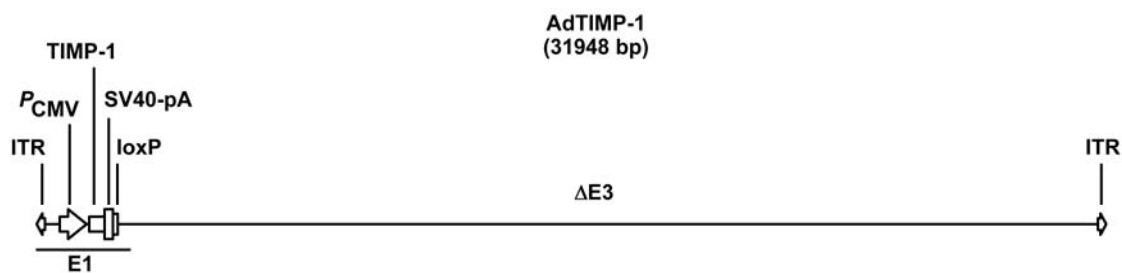


Abbildung 10: Schematische Darstellung von AdTIMP-1 (Ad: Adenovirus, bp: base pairs ITR: inverted terminal repeats, P: Promotor, CMV: Cytomegalie-Virus, P_{CMV} : CMV-Promotor, TIMP-1: für humanen TIMP-1 kodierende Sequenz, SV40: Simian-Virus 40, pA: Polyadenylierungssignal, loxP: loxP-Sequenz, Δ : deletierte Sequenz, E1 und E3: early genes 1 und 3).

Addl70-3 Addl70-3 ist ein nichtreplizierendes Adenovirus, welches Deletionen der E1- und E3- Sequenzen des Adenovirusgenoms aufweist. Lediglich die *inverted terminal repeats* (ITR) und die RNA-Verpackungssignale (ψ^+) sowie der Protein-IX-Promotor sind intakt (Bett *et al.*, 1994). Da dieses Adenovirus kein Transgen enthält, konnte es als Kontrollvirus verwendet werden.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Lösungen

Absolverlösung (w = 2 % (v/v)) aus
2 ml Absolve *ad* 1000 ml mit nukeasefreiem H₂O

Agarosesuspension (w = 1 % (w/v)) aus
5 g Agarose *ad* 500 ml mit TAE-Puffer

Calciumchloridlösung (c = 2 M) aus
147 g CaCl₂ · 2 H₂O *ad* 500 ml mit ddH₂O

DNA-Lysepuffer aus
0,15 g EDTA, 1,20 g NaCl, 0,20 g SDS und 1,20 g Tris *ad* 100 ml mit ddH₂O, eingestellt auf pH = 8,5 mit HCl und NaOH

dNTP-Lösung aus

je 1 µl dATP, dCTP, dGTP und dTTP (jeweils $c = 100 \text{ mM}$) *ad* 40 µl mit nukleasefreiem H_2O

Ethanol ($w = 80 \%$ (v/v)) aus

800 ml Ethanol *ad* 1000 ml mit nukleasefreiem H_2O

Ethidiumbromidlösung ($w = 0,05 \%$ (w/v)) aus

5 mg Ethidiumbromid *ad* 10 ml mit dd H_2O

forward primer-Lösung muPA7p aus

5 µl *forward primer*-Stock muPA7p *ad* 50 µl mit nukleasefreiem H_2O

2 · HEBS (HEPES buffered saline)-Lösung aus

0,5 g D-Glucose, 2,5 g HEPES, 0,185 g KCl, 4 g NaCl und 0,063 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ *ad* 500 ml mit dd H_2O , eingestellt auf $\text{pH} = 7,1$ mit HCl und NaOH

Incidin ($w = 5 \%$ (v/v)) aus

25 ml Incidin Extra N *ad* 500 ml mit dd H_2O

Kaliumchlorid-dNTP-Puffer aus

je 1 µl dNTP-Lösung, 6 µl Glycerin, 5 µl 10 · KCl-TAQ-Puffer, 3 µl Kresolrot, 3 µl MgCl_2 *ad* 38 µl nukleasefreiem H_2O

Polybren-Lösung ($c = 800 \text{ mg/l}$) aus

8 mg Polybren *ad* 10 ml mit dd H_2O

Polymerisationsprobenlösung mPGK2m aus

5 µl Stocklösung mPGK2m *ad* 50 µl mit nukleasefreiem H_2O

Puromycin-Lösung ($c = 1 \text{ mg/ml}$) aus

1,5 mg Puromycindihydrochlorid *ad* 1,5 ml mit dd H_2O

reverse primer-Lösung muPA4m aus

5 µl *reverse primer*-Stock muPA4m *ad* 50 µl mit nukleasefreiem H_2O

6 · RNA-Auftragepuffer aus

7,5 mg Bromphenolblau, 306,5 µl H_2O_2 und 30 ml Glycerin *ad* 50 ml mit nukleasefreiem H_2O

TAE-Puffer aus

1,46 g EDTA, 5,7 ml Essigsäure und 24,23 g Tris *ad* 5000 ml mit dd H_2O , eingestellt auf $\text{pH} = 8,0$ mit HCl und NaOH

TE-Puffer aus

0,30 g EDTA und 1,21 g Tris *ad* 1000 ml mit dd H_2O , eingestellt auf $\text{pH} = 8,5$ mit HCl und NaOH

3.5.2 Plasmide

Die retroviralen Plasmide für den *knock-down* von murinem uPA auf Tumorzellseite wurden freundlicherweise von Frau Lu Fei (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Sie stellen letztlich eine Modifikation des Plasmids RNAi-Ready pSiren-RetroQ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) dar, eines sich selbst inaktivierenden Vektors zur Expression doppelsträngiger shRNAs unter Kontrolle des humanen U6-Promoters (P_{U6}). Zur eukaryontischen Selektion dient eine Puromycin-Resistenz. Zwischen

den *Bam*HI- und *Eco*RI-Schnittstellen einkloniert wurden nach vorhergehendem *annealing* folgende shRNA-Sequenzen, interagierend mit der Sequenz 1153 der murinen uPA-RNA (*sense strand*: 5'-CUA-GCU-UCC-GGC-GGG-UUG-A-3') (Abb. 11). Der GC-Gehalt betrug dabei 63,2 %.

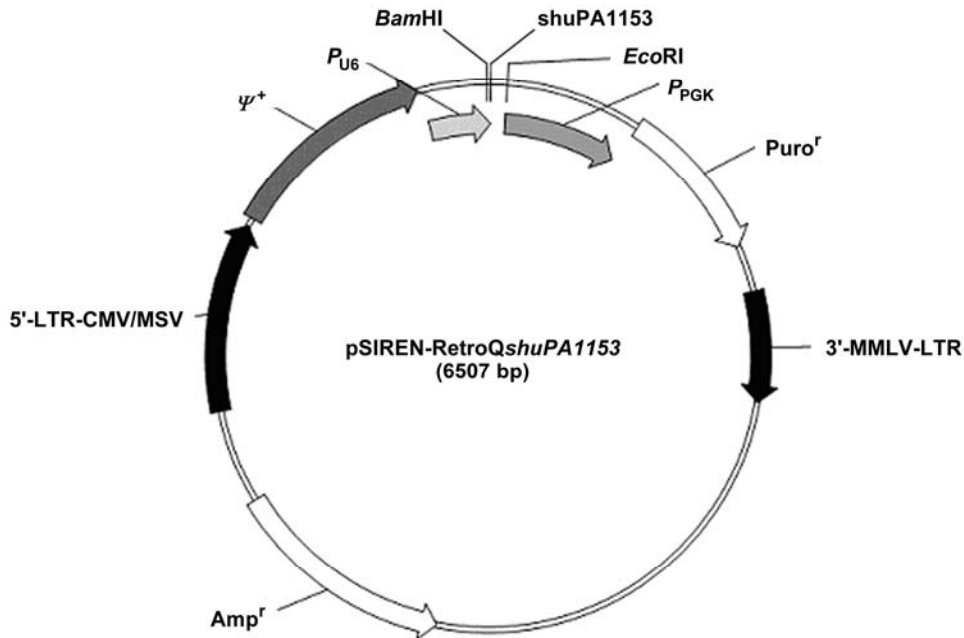


Abbildung 11: Schematische Darstellung von pSIREN-RetroQshuPA1153 (p: Plasmid, *shuPA1153*: für die *small hairpin RNA* gegen den Sequenzabschnitt 1153 der murinen *urokinase-type plasminogen activator*-RNA codierende Sequenz, *Eco*RI: Schnittstelle der Restriktionsendonuclease *Eco*RI, *P*: Promotor, *PGK*: Phosphoglyceratkinase, *Puro*^r: Puromycin-Resistenz, *MMLV*: Moloney Murine Leukemia Virus, *LTR*: *long terminal repeats*, *Amp*^r: Ampicillin-Resistenz, *MSV*: Murines Synzytialvirus, *CMV*: Cytomegalie-Virus, *P*_{U6}: *CMV-U6*-Promotor, ψ^+ : RNA-Verpackungssignal, *Bam*HI: Schnittstelle der Restriktionsendonuclease *Bam*HI).

Als Kontrolle diente ein analog hergestelltes Plasmid mit einer *scrambled*-Sequenz (*sense strand*: 5'-GAU-CCA-GCA-AUG-UCC-ACA-CUA-UAC-UUC-AAG-AGA-GUA-UAG-UGU-GGA-CAU-UGC-UUU-UUU-UGG-AAG-CUU-G-3'). Der GC-Gehalt betrug dabei 37,3 %.

Die Helferplasmide pHCMV-G und pHIT 60 dienen zur Expression der retroviralen Proteine *env* bzw. *gag* und *pol*. Sie stellen Murines Leukämie-Virus (MLV)-basierte retrovirale Vektoren unter Kontrolle des humanen *CMV-U6*-Promotors dar. Ihre Generierung wurde jeweils Mitte der 90er Jahre publiziert (Soneoka *et al.*, 1995; Yee *et al.*, 1994). Bezogen wurden sie von Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland.

3.5.3 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen zunächst wie zuvor beschrieben abgelöst und in Suspension gebracht. Hiervon wurden 100 μ l mit demselben Volumen 0,2 % (v/v)-iger Trypanblau-Lösung in einem 1,5-ml-Tube vermischt, um durch Blaufärbung

der toten Zellen vitale von avitalen Zellen unterscheiden zu können. Anschließend wurde hiermit eine Neubauer-Zählkammer von 0,1 mm Tiefe und mit vier Kästchen von je $2,5 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$ beschickt, wobei die lebenden und die toten Zellen unter dem Mikroskop in je zwei diagonal gegenüberliegenden Kästchen sowie auf zwei Kästchenrändern gezählt wurden. Diese Zellzahlen entsprechen der Anzahl Zellen in 0,1 μl Suspension, da sich auf zwei großen Quadraten ein Volumen von $2 \cdot 0,1 \mu\text{l}$ der 1 : 1-Farbstoffverdünnung befindet. Diese Zellzahlen wurden anschließend mit dem Faktor 10^4 multipliziert, um die Zellzahl in 1 ml Suspension zu erhalten. Bei einer Vitalitätsrate von mindestens 75 % wurden die Zellen dann einer weitergehenden Behandlung zugeführt.

3.5.4 Kotransfektion von Verpackungszellen

Zur Produktion von Retroviren, die das Gen für die gegen murines uPA gerichtete shRNA tragen, wurden zunächst $5 \cdot 10^6$ HEK-293-Zellen in drei 10-cm-Zellkulturschalen ausgesät. 24 h später wurde ein Mediumwechsel mit Transfektionsmedium durchgeführt und die Zellen weitere drei Stunden im Brutschrank inkubiert. 2 h nach dem Mediumwechsel wurde begonnen, in drei 1,5-ml-Tubes Plasmidlösungen aus den folgenden Volumina der Transfer- und Helferplasmide herzustellen (Tab. 3).

Substanz	Dichte	Verum	Negativkontrolle	Positivkontrolle
pHCMV-G	1,82 g/l	5,5 μl	5,5 μl	6,7 μl
pHIT 60	1,25 g/l	8,0 μl	8,0 μl	8,0 μl
pSirensHuPA	1,49 g/l	6,7 μl	---	---
pSirensHscr	1,49 g/l	---	---	6,7 μl
ddH ₂ O	1,00 g/l	418,8 μl	425,5 μl	418,8 μl
CaCl ₂ (c = 2 M)	1,00 g/l	61,0 μl	61,0 μl	61,0 μl

Tabelle 3: Volumina für die Herstellung der Plasmidlösungen in μl .

Anschließend wurden in drei 10-ml-Röhrchen je 500 μl 2 · HEBS-Lösung vorgelegt. Nun wurde mit einem Pipetboy und einer 1-ml-Pasteurpipette Luft in die HEBS-Lösung geblasen und zeitgleich die Plasmidlösung entlang der Pipette eingetropt. Daraufhin wurde der Ansatz 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, ehe er tropfenweise auf die am Vortag ausgesäten HEK-293-Zellen gegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von 8 h wurde unter S2-Bedingungen das Medium gewechselt, möglichst ohne Zellen vom Boden abzulösen.

3.5.5 Transduktion und Selektion von Tumorzellen

Am nächsten Morgen wurden unter S2-Bedingungen je $1,5 \cdot 10^6$ L-CI.5s-Zellen in 5 ml Medium mit je 20 μl Polybren-Lösung auf die kotransfizierten HEK-293-Zellen gegeben und

anschließend für 48 h inkubiert. Dann wurde der Überstand aus den Zellkulturschalen in je ein 50-ml-Röhrchen überführt, auf je 30 ml mit L-CI.5s-Medium aufgefüllt und bei Raumtemperatur 3 min bei 900 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Mediumüberstand abgenommen, die Pellets in je 20 ml Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach insgesamt dreimaliger Wiederholung dieser Schritte wurden die nun als S1-Material klassifizierbaren Zellen in je 4 ml Medium resuspendiert und anschließend je 100 µl zum Zählen entnommen. Daraufhin wurden soviel ml Zellsuspension in ein 50-ml-Röhrchen (Röhrchen 1) überführt, dass dort die Zellkonzentration genau $3 \cdot 10^5$ Zellen pro 1 ml betrug. Nun wurde im Rahmen einer *limiting dilution* in 50-ml-Röhrchen eine Verdünnungsreihe nach folgendem Schema durchgeführt, so dass die Endkonzentration 3 Zellen in 1 ml betrug (Tab. 4).

Röhrchen	Vorgelegte Zellsuspension	Zugabe	Konzentration
1	10,0 ml Ausgangsvolumen	0,0 ml Medium	$3 \cdot 10^5$ Zellen/ml
2	1,0 ml aus Röhrchen 1	9,0 ml Medium	$3 \cdot 10^4$ Zellen/ml
3	1,0 ml aus Röhrchen 2	9,0 ml Medium	$3 \cdot 10^3$ Zellen/ml
4	1,0 ml aus Röhrchen 3	9,0 ml Medium	$3 \cdot 10^2$ Zellen/ml
5	1,5 ml aus Röhrchen 4	12,5 ml Medium	$3 \cdot 10$ Zellen/ml
6a/b	3,5 ml aus Röhrchen 5	31,5 ml Medium	3 Zellen/ml
6c	2,5 ml aus Röhrchen 5	22,5 ml Medium	3 Zellen/ml

Tabelle 4: Volumina für die Herstellung der Verdünnungsreihe der *limiting dilution* in ml.

In die jeweiligen Röhrchen 6a und 6b wurden nun je 175 µl Puromycin gegeben, so dass sich eine Antibiotikum-Konzentration von 5 µg/ml ergab. Den jeweiligen Röhrchen 6c wurde kein Puromycin zugegeben. Nun wurden mit einer auf 100 µl Auswurf eingestellten Multipipette pro Verum- bzw. Kontrollansatz je 6 96-U-well-Platten aus den Röhrchen 6a bzw. 6b sowie 2 derartige Platten aus dem Röhrchen 6c mit Suspension beschickt. Alle Platten wurden nun solange im Brutschrank inkubiert, bis alle Zellen auf den Platten der Negativkontrolle abgetötet waren. Alle auf den Selektionsplatten heranwachsenden Zellkolonien, deren Größe mehr als die Hälfte der Bodenfläche eines Wells einnahm, wurden mit einer Pipette durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gepickt und in 1 ml Medium auf einer 24-well-Platte ausgesät. Die gepickten Klone wurden fortan über 12- auf 6-well-Platten hochgezogen und dann einer molekularbiologischen Analyse zugeführt, um letztlich Klone mit ähnlich starkem uPA-*knock-down* poolen zu können.

3.5.6 RNA-Isolation aus Zellen

Um das Ausmaß der uPA-Expression in den transduzierten L-CI.5s-Zellen im Vergleich zu nicht modifizierten T-Lymphomzellen zu untersuchen, wurde aus den im Rahmen der *limiting dilution* und der simultanen Puromycin-Selektion gewonnenen Klonen sowie aus

nicht transduzierten L-CI.5s-Zellen RNA isoliert. Hierzu wurden die Zellen bei 900 rpm 5 min abzentrifugiert, dann das Medium abgenommen und die Zellen mit kaltem Zellkultur-PBS gewaschen. Es folgten zwei weitere Zentrifugationsschritte, ehe dem resultierenden Pellet 0,5 ml kaltes Trizol[®]-Reagenz zugegeben und die gallertartige Suspension in ein 2-ml-Tube überführt wurde. Anschließend ließ man den Ansatz 5 min bei Raumtemperatur inkubieren, bevor unter dem Abzug 100 µl Chloroform zupipettiert und 15 s gevortext wurde. Nach weiteren 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Tubes 15 min bei 13000 rpm in einer auf 4°C gekühlten Tischzentrifuge zentrifugiert. Während dessen wurden in 1,5-ml-Tubes je 250 µl Isopropanol vorgelegt. Nach der Zentrifugation wurde die obere, farblose Phase abgenommen und in die 1,5-ml-Tubes überführt. Daraufhin wurde kurz gevortext und anschließend erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurde 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, dann der entstandene Überstand abgenommen und verworfen, ehe dem Pellet 1 ml nukleasefreies 80 % (v/v)-iges Ethanol zugegeben wurde. Nach 5-minütiger Fällung durch Zentrifugation bei 7600 rpm und 4°C wurde der resultierende Überstand abgenommen und verworfen, während man das Pellet 10 min bei Raumtemperatur trocknen ließ. Daraufhin wurde das Pellet in 30 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert und auf Crasheis gelagert.

3.5.7 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration in der erhaltenen Suspension wurde mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Hierbei muss die RNA durch 10-minütiges Erhitzen auf 65°C im Heatblock und anschließende Lagerung auf Crasheis durch Aufbrechen ihrer Sekundärstrukturen denaturiert werden. Anschließend wurden in 1,5-ml-Tubes 1 : 100-Verdünnungen der jeweiligen RNA mit nukleasefreiem Wasser hergestellt, kurz gevortext und dann in der 100-µl-Küvette des Photometers die Extinktionen bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge gemessen. Zuvor musste sichergestellt werden, dass dessen UV-Lampe mindestens 15 min eingegläht und dass es durch Bestimmung eines Wasserleerwerts normiert war. Aus der Extinktion bei 260 nm Wellenlänge lässt sich auf die Konzentration schließen, während der Quotient $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}}$ Aufschluss über die Reinheit der RNA gibt. Es wurden dabei Werte zwischen 1,6 und 2,0 für eine Weiterverarbeitung der RNA akzeptiert. Nach jeder Einzelmessung wurde die Probe verworfen, die Küvette zweimal mit ddH₂O gespült und auf Kleenex-Papier restliche Wassertropfen abgeklopft. Im Anschluss an die erste Messung aller RNAs wurde in analoger Weise eine zweite Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Hierzu wurden zunächst 1 : 50-Verdünnungen der Ursprungssuspension mit nukleasefreiem Wasser hergestellt und hieraus jeweils soviel Volumen entnommen, dass letztlich 7 µl RNA-Verdünnung auf eine errechnete Konzentration von 500 ng/µl eingestellt

wurden. Die Menge an einzusetzender 1:50-Verdünnung errechnete sich dabei folgendermaßen: $(E_{260 \text{ nm}/1. \text{ Messung}} \cdot 4)^{-1}$, aufzufassen als ng/µl. Nach der zweiten Messung wurden schließlich 30 µl RNA-Suspension mit einer Konzentration von 100 ng/µl hergestellt. Für die Berechnung der einzusetzenden Ursprungssuspension bediente man sich dabei folgender Formel: $3000/(E_{260 \text{ nm}/2. \text{ Messung}} \cdot 40 \cdot 50)$, ebenfalls zu interpretieren als ng/µl.

3.5.8 Qualitative Agarose-Gel-Elektrophorese

Vor der reversen Transkription musste sichergestellt werden, dass die RNA nicht degradiert war. Hierzu bediente man sich einer qualitativen Agarose-Gel-Elektrophorese, bei der die Elektrophoresetrays und -kämme zuvor 30 min in 2 % (v/v)-igem Absolute eingelegt wurden, um eine Kontamination des Agarosegels mit RNAsen zu vermeiden. Anschließend wurde durch Erhitzen bei 600 W in der Mikrowelle und intermittierendes Schütteln eine 1 % (w/v)-ige Suspension von Agarose in TAE-Puffer hergestellt, diese in die vorbereiteten Trays gefüllt, 2,5 µl Ethidiumbromidlösung untergemischt und schließlich die Kämmen eingesetzt. Nach Festwerden des Gels wurden dessen Taschen schließlich mit je 10 µl auf 100 mg/µl eingestellter RNA-Lösung, die zuvor in 1,5-ml-Tubes mit 2 µl 6 · RNA-Auftragspuffer versetzt worden war, beladen. Als Größenstandard diente eine kommerziell erhältliche 1-kb-DNA-Leiter. Die Elektrophoresendauer betrug etwa 60 min bei einer angelegten Spannung von 80 V. An einer Geldokumentationsstation konnten die RNA-Fragmente schließlich an Hand der Interkalation des Ethidiumbromids durch Bestrahlung mit UV-Licht von 312 nm Wellenlänge sichtbar gemacht werden. Falls die RNA nicht degradiert ist, sind deutlich mindestens zwei Banden zu erkennen, die den beiden quantitativ häufigsten RNA-Typen, nämlich der 18S- und der 28S-rRNA, entsprechen.

3.5.9 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wurde je 1 µg RNA, entsprechend 10 µl RNA-Suspension, umgeschrieben. Die restliche RNA-Lösung wurde bei -80°C weggefroren. Insgesamt konnten 12 Proben parallel transkribiert werden. Hierzu wurde zunächst die RNA in einem PCR-Tube mit 1 µl Random-Hexameren versetzt und 10 min bei 70°C in der PCR-Maschine inkubiert. Während dessen wurde eine Kühlmischung aus Kochsalz und Crasheis hergestellt, in die die Tubes unverzüglich nach der Inkubation überführt wurden. Daraufhin wurde ein *master mix* aus folgenden Komponenten hergestellt: 1 µl nukleasefreies H₂O, 4 µl 5 · Transkriptionspuffer, 1 µl dNTP-Lösung, 1 µl Reverse Transkriptase und schließlich 1 µl RNase-Inhibitor, jeweils pro zu transkribierender RNA-Probe. Aus dieser Mischung wurden den Proben je 8 µl zugesetzt, die Tubes rasch in die PCR-Maschine zurückgestellt und

schließlich bei 42°C für eineinhalb Stunden inkubiert. Die enthaltene cDNA konnte beliebig lange bei -20°C gelagert werden.

3.5.10 Quantitative *real time*-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die quantitative *real time*-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) wurde an dem TaqMan™-Gerät ABI PRISM 7900 HAT Sequence Detection System mit der zugehörigen Software durchgeführt. Beim TaqMan™- oder auch 5'-Nuclease-Assay wird die DNA außer mit zwei spezifischen Oligonucleotid-Primern noch mit einem fluoreszenzmarkierten Oligonucleotid, der sogenannten Probe, hybridisiert. Diese Sonde ist mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende, im vorliegenden Falle dem 6-Carboxyfluorescein (FAM) bzw. dem VIC, einem in seinem chemischen Aufbau nicht publizierten Fluorophor der Firma Applied Biosystems Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland, und einem am 3'-Ende liegenden *quencher* wie 6-Carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamin (TAMRA) markiert. Die Reporterfluoreszenzemission wird bei der intakten TaqMan™-Sonde durch die Nähe zum *quencher* unterdrückt. Bei der Neustrangsynthese schneidet die TAQ-Polymerase durch ihre 5'-3'-Exonucleaseaktivität die Probe in kleine Fragmente, wodurch es zu einer Loslösung des Reporters vom *quencher* kommt und die Reporterfluoreszenz freigesetzt werden kann. Die Zunahme der Reporterfluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen und ist proportional der Menge des DNA-Templates im Tube sowie dadurch auch der aus den Tumorzellen isolierten mRNA-Menge.

Neben murinem uPA, dem in seiner Expression zu untersuchenden Zielgen, wurde auch die Menge an cDNA eines *housekeeping*-Gens mit interindividuell konstanter Expression, nämlich der 18S-rRNA, bestimmt, um die verschiedenen uPA-Level miteinander vergleichen zu können. Hierbei kamen neben dem vorgefertigten 18S-rRNA-Assay für den Nachweis muriner uPA-RNA folgende Sequenzen zum Einsatz: *forward primer*: 5'-TGG-AAC-TCT-GCC-ACT-GTC-CTT-3', *reverse primer*: 5'-GGC-CCA-CCT-GCA-CAT-AGC-3' und *probe*: 5'-ATA-ATT-ACT-GCA-GGA-ACC-CAG-ACA-ACC-GGA-3'. Für die TaqMan™-Analyse wurden dabei zunächst in 2-ml-Tubes 200 µl 1 : 100-Verdünnungen der jeweiligen cDNA in nukleasefreiem H₂O hergestellt. Von den cDNAs, die für die Erstellung der Standardgeraden von Zielgen und 18S-rRNA verwendet wurden, wurden zusätzlich in 2-ml-Tubes 20 µl 1:10-, 60 µl 1 : 1000- und 60 µl 1 : 10000-Verdünnungen in nukleasefreiem H₂O angefertigt. Anschließend wurden zur Bestimmung der 18S-rRNA- und der uPA-Standardgeraden nach folgendem Schema in insgesamt 12 Kavitäten der TaqMan™-Platte die jeweils nötigen Volumina nukleasefreies H₂O vorgelegt und dann aus den cDNA-Verdünnungen die entsprechenden Volumina zupipettiert (Tab. 5).

Standard	Konzentration	Vorgelegte cDNA-Lösung	Zugabe
18S	1,0000 ng	2,00 µl 1 : 100-Verdünnung	8,00 µl nukleasefreies H ₂ O
18S	0,5000 ng	1,00 µl 1 : 100-Verdünnung	9,00 µl nukleasefreies H ₂ O
18S	0,2500 ng	5,00 µl 1 : 1000-Verdünnung	5,00 µl nukleasefreies H ₂ O
18S	0,1250 ng	2,50 µl 1 : 1000-Verdünnung	7,50 µl nukleasefreies H ₂ O
18S	0,0625 ng	1,25 µl 1 : 1000-Verdünnung	8,75 µl nukleasefreies H ₂ O
18S	0,0310 ng	6,25 µl 1 : 10000-Verdünnung	3,75 µl nukleasefreies H ₂ O
uPA	20,0000 ng	4,00 µl 1 : 10-Verdünnung	6,00 µl nukleasefreies H ₂ O
uPA	10,0000 ng	2,00 µl 1 : 10-Verdünnung	8,00 µl nukleasefreies H ₂ O
uPA	5,0000 ng	1,00 µl 1 : 10-Verdünnung	9,00 µl nukleasefreies H ₂ O
uPA	2,0000 ng	4,00 µl 1 : 100-Verdünnung	6,00 µl nukleasefreies H ₂ O
uPA	1,0000 ng	2,00 µl 1 : 100-Verdünnung	8,00 µl nukleasefreies H ₂ O
uPA	0,5000 ng	1,00 µl 1 : 100-Verdünnung	9,00 µl nukleasefreies H ₂ O

Tabelle 5: Volumina für die Herstellung der qRT-PCR-Standards in µl.

In weitere vier Kavitäten wurden lediglich 10 µl nukleasefreies H₂O als Negativkontrolle pipettiert, jeweils zwei Kavitäten für die Bestimmung von 18S-rRNA und uPA. In diesen Kavitäten sollte keine PCR stattfinden können. Wäre dies doch der Fall, so läge eine Kontamination des nukleasefreien H₂O oder einer der PCR-Reagenzien vor. Im Anschluss daran wurden pro zu vermessender cDNA-Probe drei Kavitäten mit je 10 µl 1 : 100-Verdünnung zur Bestimmung des uPA-Gehalts und drei Kavitäten mit je 2 µl 1 : 100-Verdünnung und je 8 µl nukleasefreiem H₂O zur Ermittlung des 18S-rRNA-Gehalts befüllt. Abschließend wurden die PCR-Lösungen für 18S-rRNA und uPA angesetzt und mit Hilfe einer Multipette zu den Proben-Verdünnungen pipettiert. Die PCR-Lösungen bestanden dabei aus jeweils 12,5 µl 2 · qPCRTM-Mastermix, je 1,25 µl Primer-Proben-Mix und je 12,5 µl nukleasefreiem H₂O. Nach Abschluss der Pipettierschritte wurde die TaqManTM-Platte mit einer Folie versiegelt und kurz bei 1000 rpm abzentrifugiert. Die Messung erfolgte schließlich am TaqManTM-Gerät nach Angaben des Herstellers. Die Auswertung wurde mit Hilfe des Programms SDS2.2 (Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) und der SigmaPlot-Software durchgeführt.

3.5.11 DNA-Isolation aus Gewebe

Zur Bestimmung des uPA-Genotyps der selbst gezüchteten Mäuse wurde aus je einem ca. 3 mm langen Schwanzspitzenresektat zunächst genomische DNA isoliert. Hierzu wurden die Biopsien in 2-ml-Tubes mit je 500 µl DNA-Lysepuffer und 5 µl Proteinase-K-Lösung vermischt und im Heizblock über Nacht bei 55°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Proben 5 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert, anschließend der Überstand in je ein neues 2-ml-Tube überführt, in das zuvor 500 µl Isopropanol vorgelegt worden waren. Daraufhin wurde nochmal für 10 min analog zentrifugiert, dann der Überstand abgenommen und das Pellet 10 min bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Schließlich

wurde die DNA in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und konnte bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert werden.

3.5.12 Qualitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Polymerisation der erhaltenen genomischen Maus-DNA wurden die Tubes mit der DNA-TE-Lösung 10 min im Heatblock bei 65°C inkubiert. Während dessen wurde ein PCR-*master mix* aus folgenden Bestandteilen hergestellt: pro cDNA-Probe je 38 µl KCl-dNTP-Puffer, 2 µl *forward primer*-Lösung muPA7p (5'-CTC-CCG-TGG-CTG-GGT-AGT-GG-3'), 2 µl *reverse primer*-Lösung muPA4m (5'-AGA-GGA-CGG-TCA-GCA-TGG-GAA-C-3'), 2 µl Polymerisationsprobenlösung mPGK2m (5'-GCC-TTG-GGA-AAA-GCG-CCT-C-3') und 0,2 µl TAQ-Polymerase. Nach der Inkubation wurden die cDNA-Tubes auf Crasheis gestellt, je 5 µl DNA-Lösung in ein PCR-Tube überführt und je 44,2 µl *master mix* zupipettiert. Anschließend wurden die Tubes in die PCR-Maschine gestellt und nach folgendem Schema inkubiert:

1. 95°C für 15 min
2. 94°C für 1 min
3. 60°C für 1 min
4. 72°C für 1 min
5. erneut 1. bis 4., insg. 32-mal
6. abschließend 72°C für 10 min

Nach Beendigung der PCR wurde eine qualitative Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt, wobei in jede Tasche des Gels nur 10 µl PCR-Produkt pipettiert wurden. Bei UV-Belichtung zeigten sich dann auf verschiedener Laufhöhe eine bzw. zwei Banden, wobei das PCR-Produkt des Wildtypallels wegen seiner größeren Masse weniger weit lief als das des *defunct allele*. Somit konnte den Mäusen eindeutig der Genotyp uPA^{+/+}, uPA^{+/-} und uPA^{-/-} zugeordnet werden.

3.6 Proteinbiochemische Methoden

3.6.1 Lösungen

Antikörperlösung aus

1,25 g BSA ad 50 ml mit TBS-T

APS-Lösung aus

1 g APS ad 10 ml mit ddH₂O

BCA-Mix aus

196 µl BCA-Lösung 1 und 4 µl BCA-Lösung 2 je Probe

Blocklösung aus

2,5 g Magermilchpulver ad 50 ml mit TBS-T

Blottingpuffer aus

1,13 g Glycin, 100 ml Methanol und 0,30 g Tris *ad* 1000 ml mit ddH₂O

BSA-Lösung aus

40 mg BSA *ad* 1 ml mit Extraktionspuffer

Elektrophoresepuffer aus

14,42 g Glycin, 1,00 g SDS und 3,03 g Tris *ad* 1000 ml mit ddH₂O

Extraktionspuffer aus

0,37 g CaCl₂ · 2 H₂O, 5,84 g NaCl, 3,03 g Tris und 5 ml Triton X-100 *ad* 1000 ml mit ddH₂O, eingestellt auf pH = 7,5 mit HCl und NaOH

5 · Lämmli-Puffer aus

2,5 ml BME, 0,10 g Bromphenolblau, 3,5 ml Glycerin, 1,50 g SDS und 0,42 g Tris

Sammelgelpuffer aus

10,00 g SDS und 6,06 g Tris *ad* 100 ml mit ddH₂O, eingestellt auf pH = 6,8 mit HCl und NaOH

TBS-T aus

8,77 g NaCl, 6,06 g Tris und 1 ml Tween-20 *ad* 1000 ml mit ddH₂O, eingestellt auf pH = 7,6 mit HCl und NaOH

Trenngelpuffer aus

0,40 g SDS und 18,17 g Tris *ad* 100 ml mit ddH₂O, eingestellt auf pH = 8,6 mit HCl und NaOH

3.6.2 Proteinisolation aus Gewebe

Für jedes für die Proteinbiochemie vorgesehene, bei -80°C gelagerte Leberstückchen wurde ein Kryoschraubdeckelgefäß mit Silikondichtung mit einigen wenigen Zirconiumsilicatkügelchen von 0,1 mm Durchmesser und 400 µl kaltem Extraktionspuffer befüllt. Dann wurde zügig das noch gefrorene Organstückchen zugefügt, das Gefäß verschlossen und im Minibeadbeater™ 20 s gemixt. Das daraus resultierende Homogenisat wurde 10 min auf Crasheis inkubiert, bevor die Zirconiumsilicatkügelchen und noch ungelöstes Protein in der Tischzentrifuge bei 4°C und 13000 rpm 10 min abzentrifugiert wurden. Daraufhin wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, auf drei 2-ml-Tubes verteilt und diese in Flüssigstickstoff schockgefroren, um dann bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert zu werden.

3.6.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration in den Leberhomogenisaten wurde mit Hilfe der BCA™-Strategie bestimmt. Bei diesem Verfahren kommt es zunächst zu einer Reduktion von Cu²⁺-Ionen durch die Peptidketten in den Proteinen. Anschließend werden die entstandenen Cu⁺-Ionen durch zwei Moleküle Bicinchoninsäure zu einem purpurnen Komplex chelatisiert, welcher Licht der Wellenlänge 562 nm absorbiert. Die Höhe der gemessenen Absorption ist

somit proportional der Proteinkonzentration. Zu Beginn der Messung wurde zunächst in einem 2-ml-Tube aus der BSA-Lösung eine 1 : 10-Verdünnung mit Extraktionspuffer hergestellt. Diese Verdünnung wurde in jeweils einem neuen 2-ml-Tube insgesamt sechsmal 1 : 2 weiterverdünnt, so dass sich letztlich Verdünnungen mit den Konzentrationen 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml und 0,0625 mg/ml ergaben. Diese wurden später zur Ermittlung der Standardgeraden verwendet, wobei von jeder BSA-Konzentration zweimal je 10 µl in je eine Kavität der Wallac-Platte pipettiert wurden. Zur Bestimmung des Proteingehalts der Proben wurden zunächst von jeder Probe 1 : 100-Verdünnungen in Extraktionspuffer hergestellt, von denen ebenfalls zweimal je 10 µl in je eine Kavität der Wallac-Platte überführt wurden. Zu diesen Volumina wurden dann mit einer Multipette je 200 µl BCA-Mix zupipettiert, ehe eine halbstündige Inkubation bei 37°C erfolgte. Schließlich wurde im Wallac-Photometer die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des SigmaPlot-Systems.

3.6.4 Western Blotting

Zur Bestimmung des Gehalts an β -D-Galaktosidase, c-Met, phospho-c-Met, pro-HGF und HGF α in den asservierten Lebergeweben wurden Western Blots durchgeführt. Hierbei wurden zunächst die für die vorgeschaltete SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) benötigten Gele gegossen. Begonnen wurde mit dem Trenngel, welches einen Gehalt von 8 % (v/v) Polyacrylamid aufweisen und 1,5 mm dick sein sollte. In einem 15-ml-Tube wurden hierzu folgende Komponenten zusammenpipettiert, ehe die entstehende Mischung zügig zwischen die beiden Glasplatten einer Gelgießstation eingelaufen gelassen wurde:

Pro Gel: 6,45 ml ddH₂O
2,25 ml PAA
2,82 ml Trenngelpuffer
0,11 ml APS-Lösung
0,5 µl TEMED

Das Trenngel wurde unmittelbar nach dem Gießen mit ca. 2 ml Isopropanol überschichtet und etwa 1 h polymerisieren gelassen. Dann wurde das Isopropanol abgegossen, der obere Gelrand gründlich mit ddH₂O gespült und das Gel mitsamt Glasplatten wieder in die Gelgießstation eingespannt. Schließlich wurde auf das Trenngel das Sammelgel gegossen, welches zuvor in einem 15-ml-Tube aus folgenden Bestandteilen hergestellt wurde:

Pro Gel: 1,53 ml ddH₂O
0,32 ml PAA
0,66 ml Sammelgelpuffer

0,25 ml APS-Lösung
2,5 µl TEMED

In das überschichtete Sammelgel wurde dann vorsichtig ein Gelkamm geschoben, ohne dass sich Luftpinschlüsse bildeten. Anschließend ließ man es ebenfalls ca. 1 h auspolymerisieren, ehe es dann entweder in eine vertikale Gelelektrophoresekammer eingespannt oder bei 4°C im Kühlschrank, eingewickelt in in Elektrophoresepuffer getränkte Handtücher, mehrere Tage gelagert werden konnte.

Während der Polymerisation des Sammelgels wurden die Proteinproben vorbereitet. Insgesamt wurden 75 µg Protein aufgetragen. Die hierfür einzusetzende Proteinmenge wurde nach zuvor erläuterten Protokoll bestimmt. Dieses Volumen wurde in einem 1,5-ml-Tube mit ddH₂O auf insgesamt 20 µl aufgefüllt und dann mit 5 µl 5 · Lämmli-Puffer versetzt. Daraufhin wurden die Proben in einem Heizblock 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend bis zum Auftragen auf das Gel auf Crasheis gelagert.

Zur eigentlichen Elektrophorese wurden mindestens zwei Gele in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt, nachdem zuvor die Sammelgelkämme entfernt worden waren. Der Raum zwischen den beiden Gelen wurde zur Gänze mit Elektrophoresepuffer gefüllt, die restliche Kammer etwa zu einem Drittel. Daraufhin wurden in die jeweils am Weitesten links liegende Tasche des Gels 7,5 µl Molekulargewichtsmarker und in die übrigen Taschen 25 µl Proteinlösung in der gewünschten Reihenfolge pipettiert. Die folgende Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 15 mA pro Gel bei konstanter Stromstärke über etwa 3 h, im Falle des HGF-Western-Blots solange, bis sich die Markerbanden für 75 und 50 kDa um mindestens 1 cm voneinander getrennt hatten.

Gegen Ende der Elektrophorese wurde die Western-Blot-Apparatur vorbereitet. Hierbei wurden zunächst pro Gel drei Blätter Whatman-Papier, zugeschnitten auf die Größe einer Nitrocellulose-Membran, in Blottingpuffer eingelegt. Während dessen wurden beide Elektrodenplatten der Apparatur gründlich mit Blottingpuffer befeuchtet und anschließend die Whatman-Papiere stapelweise auf die Graphitplatten verteilt. Die Nitrocellulose-Membran wurde dann am rechten oberen Rand mit Bleistift oder Kugelschreiber beschriftet und ein kleiner Teil ihrer linken oberen Ecke abgeschnitten, um nach dem Proteintransfer sowohl die Seite mit den transferierten Proteinen als auch die Position des Markers besser nachvollziehen zu können. Auch die Membran wurde in Blottingpuffer eingelegt und schließlich auf den Whatman-Papieren positioniert. Nach beendeter Elektrophorese wurden nun die Gele aus der Elektrophoresekammer entnommen und vorsichtig eine Glasplatte abgenommen. Der Sammelgelanteil wurde mit einem Skalpell entfernt und das restliche Gel genau ausgerichtet mit einer Spachtel auf die Nitrocellulose-Membran gelegt. Schließlich wurden noch weitere drei in Blottingpuffer getränkte Whatman-Papiere darübergestapelt und einmal mit einer 25-ml-Pipette über die Stapel gerollt, um eingeschlossene Luftblasen

herauszudrücken. Dann wurde die obere Elektrodenplatte auf die Anrichtung gesetzt und fest angedrückt. Der Elektrotransfer der Proteine aus den Gelen auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte für ca. 2 h bei einer konstanten Stromstärke von 250 mA.

Nach erfolgtem Blotting wurde die Deckplatte der Apparatur abgenommen, die Whatman-Papiere sowie die SDS-PAGE verworfen und die Membran mit Hilfe einer Pinzette in ein Plastischälchen gelegt. Ab diesem Schritt zeigte die Proteinseite der Membran, also die beim Blotting dem Gel benachbarte Seite, stets nach oben. Nachdem die Nitrocellulose-Membran einmal mit ca. 10 ml TBS-T gewaschen wurde, erfolgte über etwa 5 min eine unspezifische Proteinfärbung mit ca. 4 ml Ponceau S, um zum Einen den Erfolg des Elektrotransfers zu überprüfen und zum Anderen die Membran über ihre gesamte Breite mit einem Skalpell sicher knapp oberhalb der Molekulargewichtsbande für 50 kDa zerschneiden zu können. Hierdurch konnte die Ladungskontrolle durch α -Tubulin ($m \approx 55$ kDa) von den übrigen nachzuweisenden Proteinen, nämlich von β -D-Galaktosidase ($m \approx 115$ kDa), c-Met ($m \approx 145$ kDa), phospho-c-Met ($m \approx 145$ kDa), HGF α ($m \approx 65$ kDa) und pro-HGF ($m \approx 90$ kDa) getrennt werden, so dass eine parallele Detektion ermöglicht wurde. Alle Streifen zur Detektion gleicher Antigene wurden in ein Schälchen gegeben. Nach der Proteinfärbung wurde die Ponceau-S-Lösung wieder zurück in die Flasche gekippt und die Membran dreimal 5 min auf dem Schwenktisch mit TBS-T gewaschen. Während dessen wurden durch kräftiges Vortexen pro Schälchen etwa 15 ml einer 5 % (w/v)-igen Magermilchlösung in TBS-T hergestellt, mittels derer über Nacht bei 4°C im Kühlschrank unspezifische Proteinbindestellen auf den Membranen geblockt wurden.

Am nächsten Morgen wurde die Blocklösung verworfen und die Membranen dreimal 5 min auf dem Schwenktisch in TBS-T gewaschen. In dieser Zeit wurden pro Schälchen etwa 15 ml einer 2,5 % (w/v)-igen BSA-Lösung in TBS-T hergestellt und die jeweiligen Primärantikörper darin verdünnt (Tab. 6).

Antigen	Klon	Hersteller	Spezies	Stockkonz.	Verdünnung
α -Tubulin	DM1A	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Maus	100 μ g/ml	1 : 500
β -D-Galaktosidase	200-193	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Maus	100 μ g/ml	1 : 500
c-Met	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology GmbH, Heidelberg, Deutschland	Kaninchen	200 μ g/ml	1 : 500
HGF α und pro-HGF	polyklonal	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland	Ziege	100 μ g/ml	1 : 1000
phospho-c-Met	polyklonal	GenScript Inc., Piscataway, USA	Kaninchen	100 μ g/ml	1 : 1000

Tabelle 6: Für die Western-Blot-Analyse verwendete Primärantikörper.

Zunächst ließ man die Primärantikörper 2 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubieren. Danach wurde die Antikörperlösung wieder zurück in die 15-ml-Zellkulturröhrchen gegossen und konnte, gelagert bei 4°C, mehrmals verwendet werden. Im Anschluss daran wurden die Membranen dreimal 5 min auf dem Schwenktisch mit ca. 15 ml TBS-T gewaschen, ehe sie 1,5 h bei Raumtemperatur mit den korrespondierenden Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert wurden. Diese wurden folgendermaßen in Antikörperlösung verdünnt (Tab. 7):

Antigen	Klon	Hersteller	Spezies	Stockkonz.	Verdünnung
Kaninchen-IgG	polyklonal	Amersham Biosciences, Piscataway, USA	Esel	100 µg/ml	1 : 5000
Maus-IgG	polyklonal	Amersham Biosciences, Piscataway, USA	Esel	100 µg/ml	1 : 1000
Ziegen-IgG	polyklonal	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland	Huhn	100 µg/ml	1 : 1000

Tabelle 7: Für die Western-Blot-Analyse verwendete Sekundärantikörper.

Nach der Inkubation mit den Sekundärsystemen wurde mit den Lösungen und den Membranen analog zur Inkubation mit den Primärantikörpern verfahren. Bis zur Detektion konnten die Membranen dann in den mit ca. 15 ml TBST-T befüllten, durch Folie verschlossenen Schälchen im Kühlraum bei 4°C gelagert werden.

Die Detektion der Western Blots erfolgte schließlich an der Kodak Image Station mit Hilfe einer Kodak-Software. Hierzu wurden die Membranen mit einer Pinzette aus den Schälchen genommen und auf eine Klarsichtfolie gelegt. Dann wurden je 500 µl der beiden Entwicklungslösungen des Lumi-Light-Kits auf die Folie pipettiert, vermischt und dann auf die Blots getropft. Daraufhin wurde eine zweite Klarsichtfolie über die benetzten Membranen geschlagen, das Ganze mit der Proteinseite der Membranen nach unten auf die Glasscheibe der Image-Station gelegt und dort durch Leerbelichtung ausgerichtet. Die Dauer der nun folgenden fotografischen Belichtung richtete sich dann nach der Intensität der zu detektierenden Banden und konnte variabel am Computer justiert werden. Nach erfolgter Belichtung wurden die Intensitäten mittels Densitometrie quantifiziert und die Werte der zu detektierenden Proteine mit den zugehörigen α -Tubulin-Werten korreliert. Die hierdurch normierten Werte konnten mit Hilfe der SigmaPlot-Software weiter ausgewertet werden.

3.7 Organ-X-Gal-Färbung

3.7.1 Lösungen

Färbelösung aus

0,25 ml X-Gal-Stock-Lösung *ad* 10 ml mit Färbepuffer pro Organfärbung

Färbepuffer aus

1,64 g $K_3[Fe(CN)_6]$, 2,10 g $K_4[Fe(CN)_6]$, 2 ml $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$, 0,1 ml Natriumdesoxycholat und 0,2 ml NP40 ad 900 ml mit PBS, eingestellt auf pH = 7,1 mit HCl und NaOH

Fixierlösung 1 aus

27 ml Formalin und 2 ml 50 % (w/w)-ige Glutaraldehyd-Lösung ad 500 ml mit PBS

Fixierlösung 2 aus

27 ml Formalin ad 500 ml mit PBS

PBS aus

0,20 g KCl, 0,24 g KH_2PO_4 , 8,00 g NaCl und 1,44 g $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ ad 1000 ml mit ddH₂O

X-Gal-Stock-Lösung aus

1 g X-Gal ad 25 ml mit DMF

3.7.2 Färbung

Zur Bestimmung der Metastasenzahl sowie zur Detektion der Tumorzell dissemination innerhalb des murinen Leberparenchyms wurde jeweils der *Lobus medialis* der Versuchstiere einer sog. X-Gal-Färbung zugeführt. Hierzu wurden die Leberlappen nach kurzem Schwenken in PBS mit der kranialen Seite nach oben in ein Plastiktöpfchen gelegt und die Gefäße verschlossen. So wurden die Organe ein bis zwei Stunden in Fixierlösung 1 bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Lebern dreimal mit PBS gewaschen, ehe sie wieder mit der kranialen Seite nach oben in die Töpfchen gegeben und mit ca. 10 ml Färbelösung bei nur schräg aufgelegtem Deckel ca. 5 h im 37°C-Wärmeschrank gefärbt wurden. Dann wurden die Töpfchen verschlossen und über Nacht im Kühlraum weitergefärbt. Am nächsten Morgen wurde die Färbelösung abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und schließlich ca. 10 ml Fixierlösung 2 zugegeben. Die Töpfchen konnten mit geschlossenem Deckel nun beliebig lange gelagert werden. Die Auszählung der oberflächlich detektierbaren Makrometastasen auf der kranialen und der kaudalen Seite des Leberlappens erfolgte dann am Auflichtmikroskop. Dabei wurden alle detektierbaren X-Gal-Signale von mehr als 0,2 mm Durchmesser als Makrometastasen aufgefasst und ihr maximaler Durchmesser bestimmt. Hierzu wurde zunächst bei 6,4-facher Vergrößerung von allen Metastasen ein Blid am Auflichtmikroskop gemacht und anschließend bei derselben Vergrößerung ein Maßstabsbalken fotografiert. Am Lichtmikroskop konnte schließlich mit Hilfe des Spot-Programms bei 200-facher Vergrößerung nach Maßstabsabgleich die Größe der zuvor dokumentierten Makrometastasen ermittelt werden. Die Auswertung der Zählungen erfolgte mit Hilfe des SigmaPlot-Programms. Die Fotodokumentation wurde mit einer Digitalkamera durchgeführt.

3.8 Histologische Methoden

3.8.1 Lösungen

Agarose-Lösung (w = 0,5 % (w/v)) aus
30 µg Zellkultur-Agarose *ad* 1,5 ml ddH₂O

Citratpuffer (c = 10 mM) aus
29,41 g Natriumcitrat *ad* 1000 ml mit ddH₂O, eingestellt auf pH = 6,0 mit HCl und NaOH

DAPI-Lösung (c = 0,1 µg/ml) aus
100 µl DAPI-Stocklösung *ad* 1 ml mit ddH₂O

Detergenslösung aus
0,2 g MgCl₂ · 6 H₂O, 50 µl Natriumdesoxycholat und 100 µl NP40 *ad* 500 ml mit PBS, eingestellt auf pH = 7,1 mit HCl und NaOH

DQTM-Gelatine-Lösung (c = 100 µg/ml) aus
100 µl DQTM-Gelatine-Stocklösung *ad* 1 ml mit ddH₂O

EDTA-Lösung (c = 0,5 M) aus
73,06 g EDTA *ad* 500 ml mit ddH₂O, eingestellt auf pH = 8,0 mit HCl und NaOH

Ethanol (w = 90 % (v/v)) aus
450 ml Ethanol *ad* 50 ml mit ddH₂O

Moviol-Lösung aus
6,0 g Glycerin, 2,4 g Moviol 4-88 *ad* 20 ml mit TBS

Peroxidasen-Blockierungs-Lösung aus
100 µl H₂O₂ (w = 30 % (w/w)) *ad* 10 ml mit Methanol

Plasminogen-Lösung (c = 45,4 µg/ml) aus
100 µl Plasminogen-Stocklösung *ad* 1 ml mit ddH₂O

TBS aus
8,77 g NaCl und 6,06 g Tris *ad* 1000 ml mit ddH₂O, eingestellt auf pH = 7,6 mit HCl und NaOH

3.8.2 Probenfixation

Der für die histologische Aufarbeitung vorgesehene *Lobus sinister* der jeweiligen Mausleber wurde bei Beendigung des Tierversuchs zunächst in etwa 3 mm dicke Scheiben geschnitten. Da die Immunhistochemie auf Makrophagen und Neutrophile Granulozyten sowie die Immunfluoreszenz auf phospho-c-Met nur auf Gefrierschnitten möglich war, wurde etwa die Hälfte der Scheiben mit einer glatten Schnittfläche nach unten in ein Plastikschälchen gelegt und möglichst luftblasenfrei in TissueTek[®] eingebettet. Zur gleichmäßigen Abkühlung wurden die Schälchen dann auf ein auf CO₂-Eis gelagertes Kupferblech gelegt und anschließend bei -80°C weggefroren.

Die Immunhistochemie auf c-Met und PCNA wurde auf Paraffinschnitten durchgeführt. Hierzu wurden die Leberstückchen zunächst in zuklappbare Körbchen gelegt und in das Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München, München, Deutschland, gebracht, welches dankenswerterweise die routinemäßige

Dehydrierung mit Hilfe einer aufsteigender Alkoholreihe durchführte. Nach dieser über Nacht erfolgenden Prozedur wurden die Gewebe paraffiniert. Hierzu wurde zunächst der Deckel des Probenkörbchens entfernt und die gehärteten Scheibchen mit der Schnittfläche nach unten in metallene Ausgießrahmen gelegt. Nachdem aus der Paraffin-Ausgießstation ein wenig Paraffin in den Ansatz tropfen gelassen wurde, zog man den Ausgießrahmen unverzüglich vorsichtig auf die kleine Kühlplatte der Ausgießstation, um die Scheibchen in der gewollten Position zu fixieren. Anschließend wurde der Boden des Probekörbchens auf den Ausgießrahmen gesetzt und der Ansatz komplett mit flüssigem Paraffin befüllt. Unmittelbar darauf wurden die eingebetteten Proben auf die auf -5°C temperierte große Kühlplatte der Ausgießstation gelegt und aushärten gelassen. Nach etwa einer Stunde konnte der metallene Ausgießrahmen entfernt und die Blöcke bei Raumtemperatur in Schachteln gelagert werden.

3.8.3 Immunhistochemie auf Paraffinschnitten

Zur Durchführung der Immunhistochemie auf Paraffinschnitten wurden die paraffinierten Präparate in das Paraffinrotationsmikrotom eingespannt und Schnitte der Dicke $3\ \mu\text{m}$ angefertigt. Nach dem Strecken der Schnitte im 47°C warmen Wasserbad wurden sie durch vorsichtiges Eintauchen des Objektträgers auf diesen aufgezogen und anschließend bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Daraufhin wurden die Präparate durch sukzessive jeweils dreiminütige Inkubation in 100 % (v/v)-igem Xylol, 100 % (v/v)-igem und 90 % (v/v)-igem Ethanol entparaffiniert und rehydriert. Auf ein kurzes Spülen in ddH_2O folgte die Antigen-Demaskierung. Hierzu wurden die Objektträger in eine Plastikküvette mit Citratpuffer überführt und 5 min bei 680 W und daraufhin zweimal 5 min bei 530 W in der Mikrowelle erhitzt. Nach jedem Erhitzungsschritt wurde dabei der Puffer gewechselt. Anschließend ließ man die Objektträger 15 min in der Küvette abkühlen, ehe ein Spülgang mit ddH_2O erfolgte. Zur Blockierung endogener Peroxidasen erfolgte daraufhin in einer Feuchten Kammer eine 5-minütige Inkubation mit 0,3 % (v/v)-iger H_2O_2 -Lösung in Methanol. Nach 5 min Waschen in einer Glasküvette mit ddH_2O wurden die Objektträger dann etwa zwei Stunden in der Feuchten Kammer mit jeweils $150\ \mu\text{l}$ eines der beiden folgenden Primärantikörper inkubiert (Tab. 8), wobei als Negativkontrolle ein Schnitt mitgeführt wurde, der nicht mit dem Primärsystem in Berührung kam.

Antigen	Klon	Hersteller	Spezies	Stockkonz.	Verdünnung
c-Met	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology GmbH, Heidelberg, Deutschland	Kaninchen	200 µg/ml	1 : 200
PCNA	PC10	Novocastra Laboratories Inc., Newcastle-upon-Tyne, UK	Maus	100 µg/ml	1 : 2000

Tabelle 8: Für die Immunhistochemie auf Paraffinschnitten verwendete Primärantikörper.

Nach erfolgter Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper wurden die Objektträger zunächst dreimal 5 min in einer Glasküvette mit TBS gewaschen, ehe die Inkubation mit dem Sekundärsystem StreptAB Complex/HRP Duett Mouse/Rabbit Kit erfolgte. Hierbei musste zunächst in der mitgelieferten Tropfflasche 1 ein ausreichendes Volumen einer 1 : 10-Verdünnung der Lösung C in TBS hergestellt werden, welche den biotinylierten Sekundärantikörper enthält. Von dieser wurden 2 Tropfen auf jeden Schnitt gegeben wurden.

Nach 45-minütiger Inkubation in der Feuchten Kammer wurden die Objektträger dreimal 5 min in einer Glasküvette mit TBS gewaschen. Unmittelbar vor Beginn des Waschvorgangs wurde in der mitgelieferten Tropfflasche 2 pro Schnitt je 1,5 µl der Lösungen A und B mit 150 µl TBS verdünnt, so dass die enthaltenen Komponenten Meerrettichperoxidase und Streptavidin genug Zeit hatten miteinander zu komplexieren. Schließlich wurde die erhaltene Lösung tropfenweise auf die Schnitte aufgebracht und für 45 min in der Feuchten Kammer inkubieren gelassen.

Nachdem die Schnitte dann erneut dreimal 5 min in einer Glasküvette mit TBS gewaschen worden waren, erfolgte die Farbentwicklung mit der DAB Plus-Substratlösung in einer Konzentration von 1 Tropfen Stocklösung pro 1 ml TBS. Die Entwicklung wurde dabei nach ca. 20 s abrupt durch Überführen der Objektträger in eine Glasküvette mit TBS gestoppt, um eine zu starke Hintergrundfärbung zu vermeiden. Zur orientierenden Detektion der Histoarchitektur erfolgte anschließend noch eine etwa einminütige Färbung mit Mayers Hämalaun. Im Anschluss daran wurden die Objektträger zweimal in Leitungswasser gespült und dann 10 min in schwach fließendem Leitungswasser gebläut. Das Eindeckeln erfolgte mit ca. 20 µl Kaisers Glyceringelatine pro Objektträger und Deckgläsern der Oberfläche 24 · 40 mm², wobei die Glyceringelatine zuvor ca. 15 min bei 65°C im Wärmeofen langsam geschmolzen worden war. Die Objektträger wurden dann über Nacht trocknen gelassen, bevor sie mit Isopropanol gereinigt und bis zur Auswertung in Plastikboxen gelagert wurden.

Selbige erfolgte für die c-Met- und die PCNA-Färbungen unterschiedlich. Während Erstere einfach am Lichtmikroskop bei 200-facher Vergrößerung durch Fotodokumentation ausgewertet werden konnte, musste bei Letzterer zunächst eine Bestimmung der Schnittoberfläche erfolgen. Hierzu wurde zunächst analog zum Vorgehen bei der Organ-X-Gal-Färbung bei 6,4-facher Vergrößerung von allen Schnitten und vom Maßstabsbalken ein

Bild am Auflichtmikroskop gemacht. Am Lichtmikroskop konnte dann mit Hilfe des Spot-Programms bei 200-facher Vergrößerung nach Maßstabsabgleich und manueller Umfahrung des Metastasenrandes die Größe der zuvor dokumentierten Makrometastasen ermittelt, diese fotografiert und die Anzahl der proliferierenden Zellen innerhalb dieser Läsionen ausgezählt werden. Die weitere Auswertung erfolgte dann mittels der SigmaPlot-Software.

3.8.4 Immunhistochemie auf Gefrierschnitten

Die Immunhistochemie auf Makrophagen wurde auf Kryoschnitten der Dicke 5 µm durchgeführt. Diese wurden mit Hilfe eines Mikrotom-Kryostats bei einer Objektischtemperatur von -18°C und einer Boxentemperatur von -16°C angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und 30 min luftgetrocknet. Anschließend erfolgte in einer Glasküvette über 10 min die Fixierung in eiskaltem Aceton. Nach 10-minütigem Trocknen wurde die endogene Peroxidaseaktivität analog zum Vorgehen bei Paraffinschnitten blockiert. Daraufhin erfolgte die Blockade der endogenen Avidin- und Biotin-Aktivitäten geblockt, indem in einer Feuchten Kammer jeweils für 15 min mit den entsprechenden Block-Lösungen inkubiert und dazwischen und danach in Glasküvetten jeweils dreimal 5 min mit TBS gewaschen wurde. Anschließend wurden die Schnitte etwa 2 h mit pro Präparat 150 µl des gegen den *lymphocyte antigen 6-complex* (Ly-6G) gerichteten Primärantikörpers unter Mitführung einer Negativkontrolle analog zum Vorgehen bei Paraffinschnitten inkubiert (Tab. 9).

Antigen	Klon	Hersteller	Spezies	Stockkonz.	Verdünnung
Ly-6G	NIMP-R14	Abcam plc, Cambridge, UK	Ratte	100 µg/ml	1 : 50
Ratten-IgG	polyklonal (biotinyliert)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	Kaninchen	100 µg/ml	1 : 200

Tabelle 9: Für die Immunhistochemie auf Gefrierschnitten verwendete Antikörper.

Ly-6G ist ein myeloides Differenzierungsantigen, dessen Expression insbesondere bei der granulozytären Ausreifung ansteigt und die höchste Ausprägung auf reifen Neutrophilen Granulozyten zeigt, jedoch auch auf einigen Eosinophilen Granulozyten und Vorstufen von Dendritischen Zellen und Monozyten zu finden ist. Da die Anzahl der Neutrophilen Granulozyten in der Leber bei Weitem diejenige der Eosinophilen übersteigt, kann die Anzahl an für dieses Antigen positiven Zellen näherungsweise mit der Anzahl an Neutrophilen Granulozyten gleichgesetzt werden (Fleming *et al.*, 1993).

Nach der Inkubation mit dem jeweiligen Primärsystem wurden die Objektträger dreimal 5 min in einer Glasküvette mit TBS gewaschen. Daraufhin erfolgte in einer Feuchten

Kammer die etwa 45-minütige Inkubation mit pro Schnitt 150 µl des Sekundärantikörpers. Nach etwa 30 min Inkubationszeit wurde in der mitgelieferten Tropfflasche 2 des Dako-Kits, wie bereits beschrieben, ein ausreichendes Volumen des Streptavidin-Peroxidase-Komplexes angesetzt, welcher im Anschluss an die Inkubation mit dem Sekundärantikörper und dreimaligem fünfminütigem Waschen in TBS tropfenweise auf die Schnitte gegeben wurde. Nachdem die Schnitte dann erneut dreimal 5 min in einer Glasküvette mit TBS gewaschen worden waren, wurde die Farbentwicklung mit einer AEC-Lösung in einer Konzentration von 1 Tropfen Stocklösung pro 2 ml TBS gestartet. Zur Vermeidung einer zu starken Hintergrundfärbung wurde die Entwicklung nach etwa 10 min durch Überführen der Objektträger in eine Glasküvette mit TBS beendet. Abschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun, das Eindecken, Reinigen und Lagern der Schnitte sowie die Größenbestimmung über einen Maßstabsabgleich analog zum Vorgehen bei Paraffinschnitten. Im Rahmen der Auswertung wurde dann die Anzahl der Neutrophilen Granulozyten bei einer 200-fachen Vergrößerung ermittelt und die Ergebnisse mit Hilfe von SigmaPlot analysiert.

3.8.5 Kopplung von Gewebe-X-Gal-Färbung und Immunhistochemie

Der immunhistochemische Nachweis von infiltrierenden Makrophagen wurde mit einer Gewebe-X-Gal-Färbung kombiniert, um die erwartete Kolo-kalisation dieser Immunzellen mit den metastasierenden Tumorzellen nachzuweisen. Hierzu wurden zunächst Kryoschnitte nach dem bereits beschriebenen Protokoll hergestellt und trocknen gelassen. Daraufhin wurden die Objektträger jeweils in einer Glasküvette 10 min in der auch für die Organ-X-Gal-Färbung verwendeten Fixierlösung 1 fixiert, dann 10 min in TBS rehydriert und daraufhin 10 min in der Detergenslösung inkubiert. Schließlich wurden die Objektträger in eine in Alufolie eingewickelte Glasküvette mit der auch für die Organ-X-Gal-Färbung verwendeten Färbelösung überführt und über Nacht bei 37°C im Wä rmeschrank inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Schnitte in einer Glasküvette dreimal 5 min in TBS gespült, ehe die Immunhistochemie mit dem Peroxidase-Block begonnen wurde. Dieser wurde wie auch die gesamte übrige Immunhistochemie bis auf den eingesetzten Primärantikörper völlig analog zur Immunhistochemie auf Gefrierschnitten durchgeführt. Als Primärsystem wurde der in Ratten generierte Antikörper gegen den *F4/80-like receptor* (FIRE) (Klon 6F12, BD Biosciences AG, Heidelberg, Deutschland, Stockkonzentration 1000 µg/ml) in einer 1 : 50-Verdünnung in TBS eingesetzt. FIRE wird von einer Reihe von zirkulierenden Monozyten und residenten Makrophagen in Lymphknoten, Milz und Peritoneum sowie von myeloiden Vorläuferzellen mit einem Differenzierungspotential zu Dendritischen Zellen, nicht aber von aktivierten Dendritischen Zellen exprimiert (Caminschi

et al., 2001). Da die Von-Kupfferschen Sternzellen als hepatische Gewebemakrophagen FIRE-negativ sind, konnten diejenigen Zellen, die dieses Antigen exprimierten, näherungsweise als einwandernde monozytär-makrophagische Zellen aufgefasst werden. Die Auswertung der FIRE-Immunhistochemie erfolgte analog zur PCNA-Färbung.

3.8.6 Immunfluoreszenz

Die Detektion von phosphoryliertem c-Met in Gefrierschnitten von 5 µm Dicke, hergestellt wie zuvor beschrieben, erfolgte mit Hilfe einer Immunfluoreszenz. Nach Trocknung, Fixation und Rehydrierung wurden die Schnitte in einer Feuchten Kammer bei Raumtemperatur etwa 2 h mit pro Präparat 150 µl Primärantikörperlösung unter Mitführung einer Negativkontrolle analog zur Immunhistochemie auf Gefrierschnitten inkubiert (Tab. 10).

Antigen	Klon	Hersteller	Spezies	Stockkonz.	Verdünnung
phospho-c-Met	polyklonal	Assay Designs Inc., Ann Arbor, USA	Kaninchen	100 µg/ml	1 : 50
Kaninchen-IgG	polyklonal (biotinyliert)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland	Ziege	100 µg/ml	1 : 200

Tabelle 10: Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper.

Anschließend wurden die Objektträger dreimal 5 min in einer Glasküvette mit TBS gewaschen, ehe im Dunkeln in einer Feuchten Kammer ca. 45 min die Inkubation mit pro Schnitt 150 µl der Sekundärantikörperlösung, zur Kerngegenfärbung versetzt mit 1,5 µl DAPI-Lösung pro Schnitt, erfolgte. Nach 5-minütigem Waschen in TBS wurden die Schnitte mit 20 µl Moviol-Lösung überschichtet, eingedeckt und ohne größere Manipulation zügig ausgewertet. Zum Transport wurde der Objektträgerbogen in Alufolie eingewickelt. Die Dokumentation und Bildbearbeitung erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop mit Hilfe der AxioVison-4.5-Software. Die Belichtungszeit im DAPI-Filter lag dabei bei etwa 500 ms, die im Türkisfilter für das phospho-c-Met-Signal bei ca. 10 s. Für die anschließende graphische Auswertung wurde das SigmaPlot-Programm verwendet.

3.9 Statistik

Für die statische Auswertung mit Hilfe der SigmaStat 3.0-Software wurde der *Mann-Whitney-U-rank sum*-Test verwendet, da es sich hierbei um ein parameterfreies statisches Testverfahren für Daten ohne zwingende Normalverteilung handelt. Das Signifikanzniveau lag bei 5 % ($p = 0,05$).

4 Ergebnisse

4.1 Beeinflussung der TIMP-1-induzierten Metastasierung durch uPA-knock-out im Wirt

4.1.1 Abnahme der Gesamttumorzelllast

Um zu überprüfen, ob der in früheren Studien dokumentierte Effekt, dass es nach adenoviralem Gentransfer von TIMP-1 zur gesteigerten hepatischen Gesamtmetastasierung eines T-Zell-Lymphoms kommt (Kopitz *et al.*, 2007), auch im vorliegenden Modell mit META/Bom-Mäusen zutrifft, wurden diesen Mäusen drei Tage nach Virusinokulation L-C1.5s-Zellen intravaskulär injiziert und die Tiere nach weiteren sechs Tagen geopfert. Aus den entnommenen Lebern wurde anschließend Protein isoliert und eine Western-Blot-Analyse auf das von den *lacZ*-markierten Tumorzellen exprimierte Enzym β -D-Galaktosidase durchgeführt (Abb. 12).

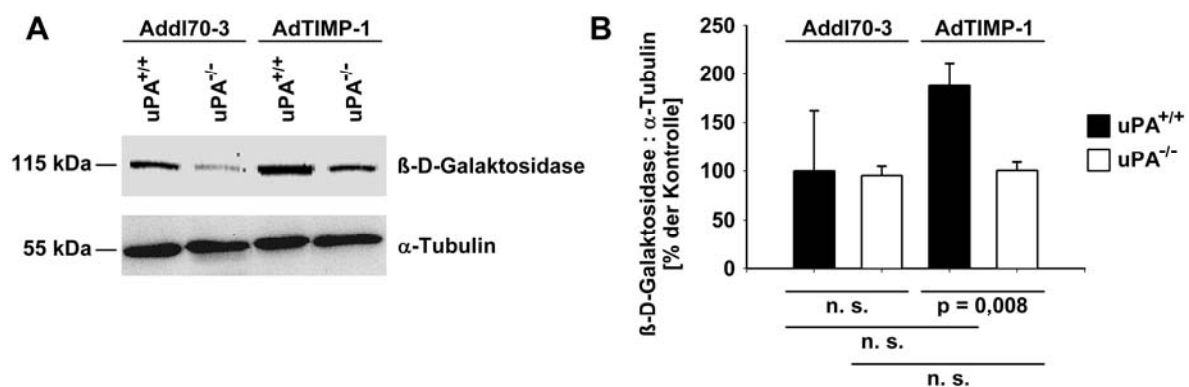


Abbildung 12: β -D-Galaktosidase-Western-Blot von Leberprotein der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse. A Repräsentativer Western Blot. **B** Densitometrie aller durchgeführten Western Blots (Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Dichte der β -D-Galaktosidase-Banden relativ zur Dichte der jeweiligen α -Tubulin-Banden; der Mittelwert der Referenzgruppe Addl70-3/uPA^{+/+} wurde 100 % gesetzt.). Addl70-3/uPA^{+/+} 100,000 ± 27,675, n = 5 Proben aus 3 Mäusen; Addl70-3/uPA^{-/-} 95,010 ± 4,253, n = 5 Proben aus 5 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{+/+} 188,073 ± 10,288, n = 5 Proben aus 4 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{-/-} 100,473 ± 3,683, n = 5 Proben aus 4 Mäusen.

Es zeigte sich nahezu eine Verdopplung der Gesamttumorzelllast in der AdTIMP-1-uPA^{+/+}-Gruppe im Vergleich zur Referenzgruppe. Diese Zunahme war in uPA^{-/-}-Mäusen, die AdTIMP-1 erhalten hatten, nicht mehr nachzuweisen. Da es in den Addl70-3-Gruppen keinen Unterschied in der Gesamtmetastasierung zwischen Mäusen, die uPA exprimieren konnten, und solchen mit uPA-knock-out gab, konnte geschlossen werden, dass der Einfluss von Wirts-uPA speziell für die Ausprägung der TIMP-1-induzierten Metastasierung von Bedeutung war.

4.1.2 Unveränderte Makrometastasierung

Es stellte sich daraufhin die Frage, ob die gesteigerte Gesamtmetastasierung in der AdTIMP-1-uPA^{+/+}-Gruppe auf einer größeren Anzahl an Makrometastasen beruhte. Aus diesem Grunde wurde eine Organ-X-Gal-Färbung durchgeführt und die Makrometastasen mit Hilfe der Auflichtmikroskopie quantifiziert (Abb. 13).

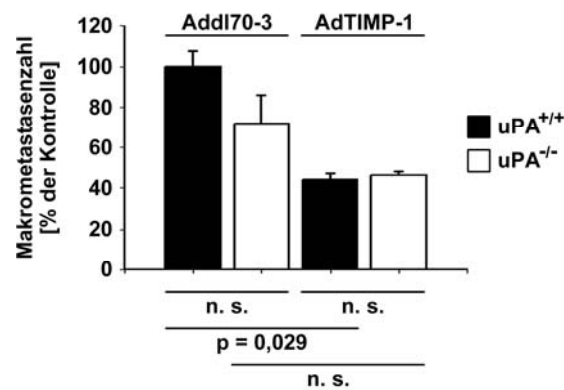


Abbildung 13: Makrometastasenzahl in den Lebern der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse (Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Makrometastasenzahl; der Mittelwert der Referenzgruppe Addl70-3/uPA^{+/+} wurde 100 % gesetzt.). Addl70-3/uPA^{+/+} 100,000 ± 7,535, n = 3 Mäuse; Addl70-3/uPA^{-/-} 71,926 ± 13,960, n = 5 Mäuse; AdTIMP-1/uPA^{+/+} 44,262 ± 2,656, n = 4 Mäuse; AdTIMP-1/uPA^{-/-} 46,107 ± 1,844, n = 4 Mäuse.

Die Anzahl der Makrometastasen in den mit AdTIMP-1-behandelten Mäusen war nur etwa halb so groß wie in den Mäusen, die Nullvirus erhalten hatten. Diese Korrelation erreichte statistische Signifikanz, während sich innerhalb der Addl70-3- und der AdTIMP-1-Gruppen keine statistisch signifikante Reduktion der Makrometastasenzahl durch Verlust von uPA im Wirt ergab. In Zusammenschau mit der verminderten Gesamtmetastasierung durch uPA-knock-out im Wirt bei den mit AdTIMP-1 transduzierten Mäusen (Abb. 12) konnte diese Abnahme der Gesamttumorzelllast bei unwesentlich veränderter Makrometastasenzahl nur entweder durch eine geringere Größe der Makrometastasen oder durch ein verstärktes *scattering* der Tumorzellen verursacht sein.

4.1.3 Leichte Zunahme der Makrometastasengröße

Um die Größe der Metastasen in den verschiedenen Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde jede über Organ-X-Gal-Färbung detektierbare Makrometastase vermessen. Hierbei zeigte sich eine geringfügige Zunahme der Makrometastasengröße in uPA^{-/-}-Mäusen von rund 10 % unabhängig vom applizierten Virus. Der Vergleich von mit AdTIMP-1 transduzierten Mäusen mit den Kontrolltieren dokumentierte eine auf 86 %

(uPA^{+/+}) bzw. 84 % (uPA^{-/-}) verminderte Metastasen­größe. Diese Korrelation erreichte im Falle der uPA-*knock-out*-Mäuse statistische Signifikanz (Abb. 14).

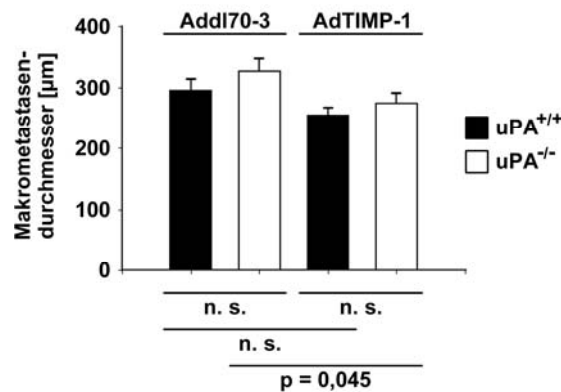


Abbildung 14: Mittlere Makrometastasen­größe in den Lebern der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse (Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Makrometastasen­größe in µm). Addl70-3/uPA^{+/+} 296,023 ± 18,374, n = 64 Metastasen; Addl70-3/uPA^{-/-} 327,545 ± 19,541, n = 40 Metastasen; AdTIMP-1/uPA^{+/+} 254,974 ± 12,004, n = 79 Metastasen; AdTIMP-1/uPA^{-/-} 274,406 ± 17,196, n = 52 Metastasen.

4.1.4 TIMP-1 und Wirts-uPA-unabhängige Proliferationsrate in Makrometastasen

Es stellte sich nun die Frage, ob die leichte Zunahme in der Makrometastasen­größe bei uPA-*knock-out* im Wirt auf einer veränderten Proliferationsrate innerhalb der Makrometastasen beruhte. Hierzu wurde eine immunhistochemische Färbung auf das *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) durchgeführt und im Anschluss die Anzahl der proliferierenden Zellen innerhalb einer Makrometastase ausgezählt. Diese konnten auf Grund des weitgehend unproliferativen Charakters infiltrierender Immunzellen näherungsweise als proliferierende Tumorzellen aufgefasst werden. Es konnte dabei keine statistisch signifikante TIMP-1- und/oder uPA-abhängige Veränderung der Proliferationsrate dokumentiert werden (Abb. 15).

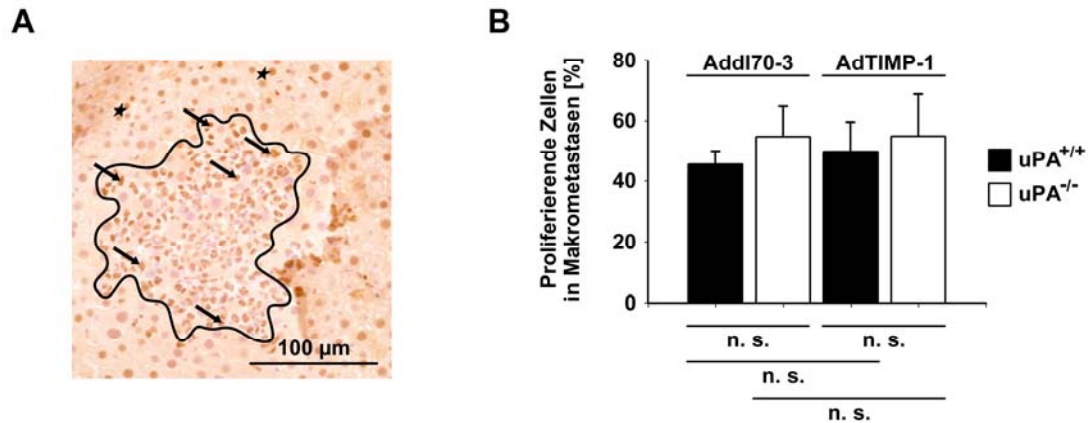


Abbildung 15: PCNA-Immunhistochemie auf Leberschnitten von META/Bom^{nu/nu}-Mäusen. A Repräsentative PCNA-Immunhistochemie (Pfeile kennzeichnen proliferierende Tumorzellen, Sternchen weisen auf proliferierende Hepatozyten hin. Kerngegenfärbung mit Hämalaun). **B** Quantifizierung der PCNA-positiven Zellen innerhalb von Makrometastasen (Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Anzahl proliferierender Zellen pro 1,0 cm² Metastasenfläche im Verhältnis zur Gesamtzahl der dort vorhandenen Zellen). Addl70-3/uPA^{+/+} 45,439 ± 6,333, n = 8 Makrometastasen von 3 Mäusen; Addl70-3/uPA^{-/-} 54,658 ± 11,118, n = 5 Makrometastasen von 5 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{+/+} 49,787 ± 6,920, n = 2 Makrometastasen von 2 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{-/-} 54,827 ± 13,883, n = 4 Makrometastasen von 4 Mäusen.

4.1.5 Rückgang des Tumorzell-scattering

Nachdem die TIMP-1-induzierte uPA-abhängige Zunahme der Metastasenlast (Abb. 12) offensichtlich weder auf einer vermehrten Ausprägung von Makrometastasen (Abb. 13) noch auf deren Vergrößerung (Abb. 14) beruhte, musste dieser Effekt auf einer gesteigerten diffusen Infiltration des Leberparenchyms durch Tumorzellen zurückzuführen sein. Die überschlagsweise Quantifizierung dieses Tumorzell-scattering erfolgte mittels vergleichender fotografischer Dokumentation von auflichtmikroskopischen Bildern. Die Sekundäre Invasion der Tumorzellen in das Leberparenchym zeigte dabei in der Tat eine starke Abhängigkeit vom TIMP-1- und uPA-Status des Wirts. So war in uPA^{-/-}-Tieren das TIMP-1-induzierte Tumorzell-scattering deutlich reduziert. In mit Kontrollvirus transduzierten Mäusen war praktisch keine intraparenchymatöse Dissemination nachweisbar (Abb. 16).

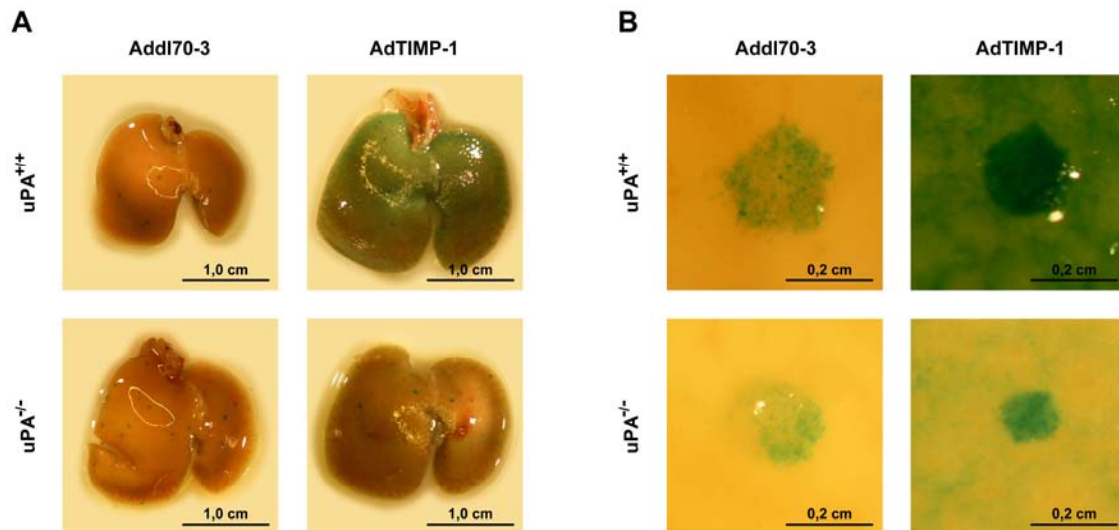


Abbildung 16: Auflichtmikroskopie von X-Gal-gefärbten Lebern der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse (Indigofarbenes Signal entspricht den Tumorzellen.). **A** 6,4-fache Vergrößerung. **B** 56-fache Vergrößerung. Es zeigte sich ein massives Tumorzell-scattering in der AdTIMP-1/uPA^{+/+}-Gruppe, welches bei uPA-knock-out nahezu komplett unterbunden war.

4.2 Kooperative Induktion des HGF-Signalwegs durch TIMP-1 und Wirts-uPA

4.2.1 Erhöhung der c-Met-Aktivierung

Es stellte sich dann die Frage, ob für das TIMP-1-induzierte *scattering* von Tumorzellen eine Aktivierung des HGF-Signalwegs von Bedeutung war. Hierzu wurde mit Leberprotein aus META/Bom^{nu/nu}-Mäusen zunächst eine Western-Blot-Analyse auf aktiviertes c-Met durchgeführt, bei der der eingesetzte Antikörper speziell an die zytoplasmatischen Phosphorylierungsareale des Rezeptors band. Es zeigte sich, dass die Menge an phospho-c-Met in mit AdTIMP-1 transduzierten Tieren im Vergleich mit Tieren, die Addl70-3 erhalten hatten, signifikant anstieg. Dieser Effekt war bei uPA-knock-out auf Wirtsseite signifikant reduziert. Beim Vergleich zwischen uPA-Wildtyp- und uPA-defizienten Tieren in den Kontrollgruppen war in uPA-knock-out-Mäusen ebenfalls eine geringere Menge an phospho-c-Met detektierbar (Abb. 17).

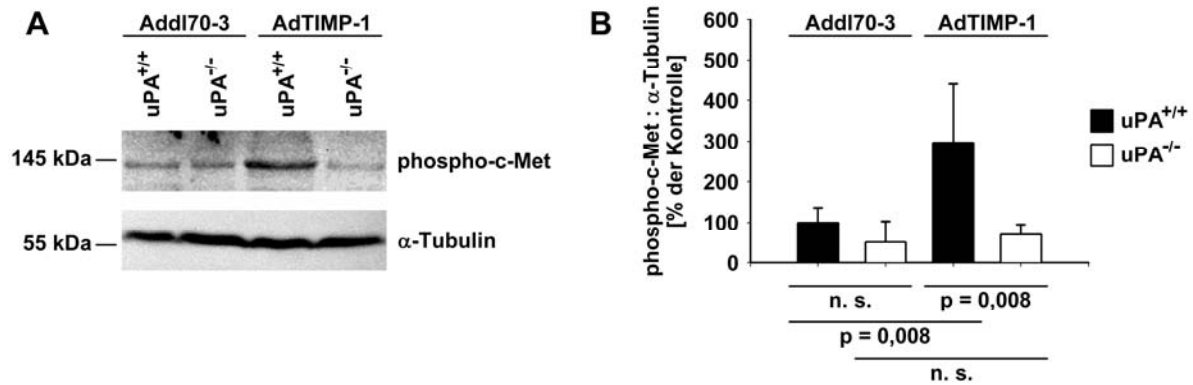


Abbildung 17: Phospho-c-Met-Western-Blot von Leberprotein der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse [1]. **A** Repräsentativer Western Blot. **B** Densitometrien zu allen durchgeführten Western Blots (Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Dichte der phospho-c-Met-Banden relativ zur Dichte der jeweiligen α -Tubulin-Banden; der Mittelwert der Referenzgruppe Addl70-3/uPA^{+/+} wurde 100 % gesetzt.). Addl70-3/uPA^{+/+} 100,000 ± 16,118, n = 5 Proben aus 3 Mäusen; Addl70-3/uPA^{-/-} 51,468 ± 22,850, n = 5 Proben aus 5 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{+/+} 296,697 ± 63,887, n = 5 Proben aus 4 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{-/-} 69,943 ± 11,160, n = 5 Proben aus 4 Mäusen.

4.2.2 Lokalisationsmuster der hepatischen c-Met-Aktivierung

Um zu überprüfen, in welchen Leberarealen die Aktivierung von c-Met stattfand, wurde eine phospho-c-Met-Immunfluoreszenz durchgeführt. Es zeigte sich dabei ein über alle Gruppen unverändertes, also uPA- und TIMP-1-unabhängiges Signal um große venöse Gefäße. Zusätzlich dazu konnte ausschließlich in mit AdTIMP-1 transduzierten uPA-Wildtyp-Mäusen aktivierter c-Met im Bereich von Makrometastasen sowie über weite Bereiche des Leberparenchyms nachgewiesen werden (Abb. 18).

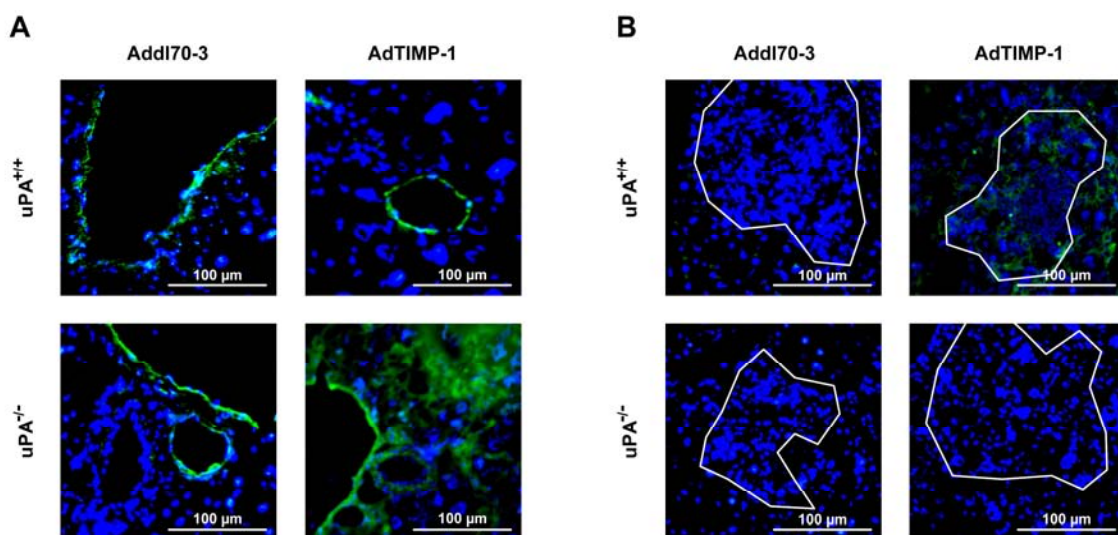


Abbildung 18: Phospho-c-Met-Immunfluoreszenz auf Leberschnitten von META/Bom^{nu/nu}-Mäusen (Grünes Signal entspricht dem Nachweis von phospho-c-Met, blaues Signal stellt die Kerngegenfärbung dar.). **A** perivaskuläres und parenchymatöses Signal. **B** perimetastatisches Signal (Die weiße Linie beschreibt die ungefähre Grenze der Makrometastasen.). Es zeigte sich keine Veränderung der perivaskulären c-Met-Aktivierung in Abhängigkeit von uPA und TIMP-1, jedoch konnte bei *knock-out* von Wirts-uPA kein Signal im Parenchym der mit AdTIMP-1 transduzierten Mäuse nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich ausschließlich in uPA-Wildtyp-Mäusen mit hoher TIMP-1-Konzentration eine c-Met-Aktivierung um Makrometastasen.

4.2.3 Zunahme des c-Met-Protein-Gehalts

Da das in Gegenwart hoher TIMP-1-Konzentrationen verstärkte HGF-*signalling* in uPA-Wildtyp-Mäusen (Abb. 17) sowohl auf einer erhöhten Expression des Rezeptors c-Met als auch alternativ oder additiv auf einer erhöhten Menge des Liganden HGF beruhen konnte, wurde zunächst eine Western-Blot-Analyse auf c-Met durchgeführt. Der Proteingehalt an c-Met zeigte dabei einen hochsignifikanten Anstieg in den mit AdTIMP-1 transduzierten Tieren verglichen mit Tieren, die Nullvirus erhalten hatten. Dieser Effekt war bei uPA-Verlust auf Wirtsseite signifikant geringer (Abb. 19).

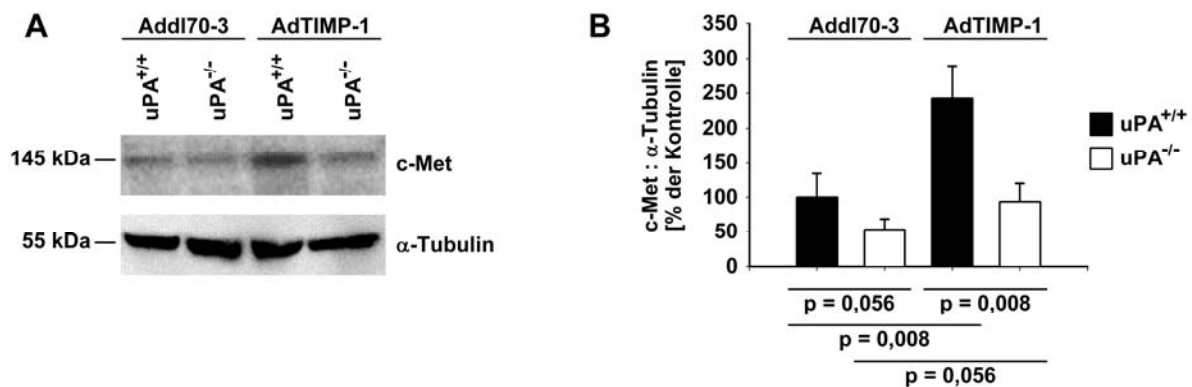


Abbildung 19: c-Met-Western-Blot von Leberprotein der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse. **A** Repräsentativer Western Blot. **B** Densitometrie aller durchgeführten Western Blots (Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Dichte der c-Met-Banden relativ zur Dichte der jeweiligen α -Tubulin-Banden; der Mittelwert der Referenzgruppe AddI70-3/uPA^{+/+} wurde 100 % gesetzt.). AddI70-3/uPA^{+/+} 100,000 \pm 15,552, n = 5 Proben aus 3 Mäusen; AddI70-3/uPA^{-/-} 53,822 \pm 6,704, n = 5 Proben aus 5 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{+/+} 242,549 \pm 20,845, n = 5 Proben aus 4 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{-/-} 93,429 \pm 11,876, n = 5 Proben aus 4 Mäusen.

4.2.4 Lokalisationsmuster der hepatischen c-Met-Expression

Zur Demonstration, in welchen Leberarealen die Expression von c-Met erfolgte, wurde eine c-Met-Immunhistochemie durchgeführt. Hierbei zeigte sich in den TIMP-1-Gruppen im Bereich von Makrometastasen eine verstärkte c-Met-Expression, wobei durch Verlust von Wirts-uPA keine deutliche Abnahme dieses c-Met-Signals zu beobachten war. c-Met-positiv waren dabei in erster Linie Hepatozyten, die den Makrometastasen unmittelbar benachbart waren. In den mit AdTIMP-1 transduzierten Mäusen konnte jedoch die Expression von c-Met auch in weiter von der Makrometastase entfernt liegenden Hepatozyten nachgewiesen werden, sofern der Wirt zur Expression von uPA in der Lage war. Ferner kam es in uPA-*knock-out*-Tieren, die keine hohen TIMP-1-Konzentrationen aufwiesen, zu keiner detektierbaren c-Met-Expression mehr (Abb. 20).

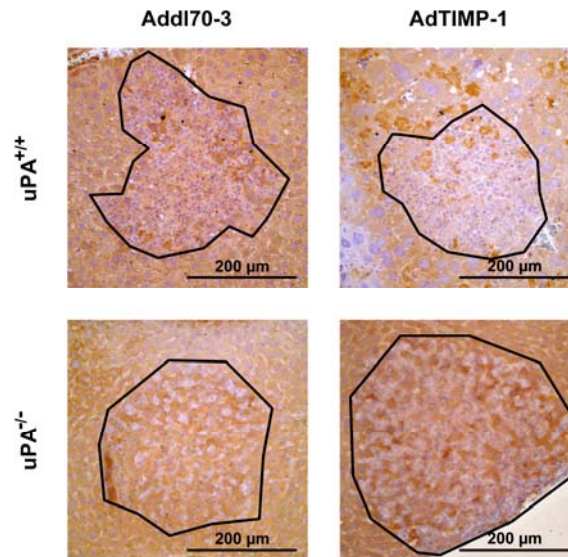


Abbildung 20: c-Met-Immunhistochemie auf Leberschnitten von META/Bom^{nu/nu}-Mäusen (Dunkelbraun gefärbte Zellen exprimieren c-Met. Kerngegenfärbung mit Hämalaun. Die schwarze Linie beschreibt die ungefähre Grenze der Makrometastasen.). Es zeigte sich eine perimetastatische Induktion der c-Met-Expression nach Transduktion mit AdTIMP-1, die bei Fehlen von Wirts-uPA kaum abnahm. Zudem exprimierten bei hoher TIMP-1-Konzentration auch weiter von der Makrometastase entfernt liegende Hepatozyten c-Met, sofern der Wirt uPA exprimieren konnte.

4.2.5 Anstieg des HGF-Protein-Gehalts

Um herauszufinden, ob die verstärkte Aktivierung des HGF-Signalwegs in mit AdTIMP-1 transduzierten Mäusen (Abb. 17) zusätzlich zum erhöhten Proteingehalt an c-Met (Abb. 19) auch auf einer erhöhten Menge des Liganden oder auf dessen verstärkter Aktivierung beruhte, wurde mit Leberprotein aus META/Bom^{nu/nu}-Mäusen eine Western-Blot-Analyse auf HGF durchgeführt. Da der verwendete Antikörper an die α -Kette dieses Wachstumsfaktors band, konnte zwischen aktiviertem HGF (HGF α) und seiner Pro-Form (pro-HGF) unterschieden werden. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg pro-HGF- und HGF α -Gehalts in den mit AdTIMP-1 transduzierten Tieren verglichen mit Tieren, die Add170-3 erhalten hatten. Dieser Effekt war in uPA-defizienten Mäusen weitaus schwächer ausgeprägt. In den Kontrollgruppen war in uPA-knock-out-Mäusen eine nicht-signifikant geringere Menge der aktivierten und latenten HGF-Form sowie des Gesamt-HGF nachzuweisen (Abb. 21).

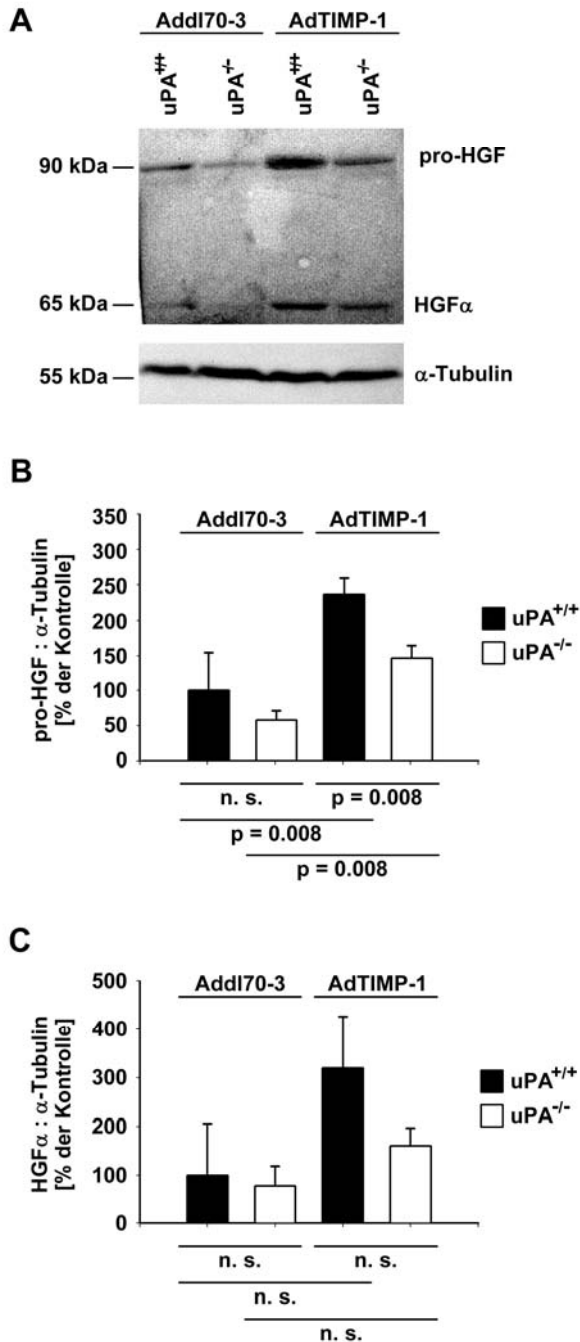


Abbildung 21: Pro-HGF- und HGF α -Western-Blot von Leberprotein der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse. A Repräsentativer Western Blot. **B und C** Densitometrien zu allen durchgeführten Western Blots (Der Mittelwert der Referenzgruppe Add170-3/uPA^{+/+} wurde jeweils 100 % gesetzt.). **B** Ermittlung des pro-HGF-Gehalts (Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Dichte der pro-HGF-Banden relativ zur Dichte der jeweiligen α -Tubulin-Banden.) Add170-3/uPA^{+/+} 100,000 \pm 24,515, n = 5 Proben aus 3 Mäusen; Add170-3/uPA^{-/-} 57,967 \pm 5,799, n = 5 Proben aus 5 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{+/+} 237,341 \pm 9,837, n = 5 Proben aus 4 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{-/-} 146,483 \pm 7,958, n = 5 Proben aus 4 Mäusen. **C** Ermittlung des HGF α -Gehalts (Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Dichte der HGF α -Banden relativ zur Dichte der jeweiligen α -Tubulin-Banden.) Add170-3/uPA^{+/+} 100,000 \pm 52,922, n = 4 Proben aus 3 Mäusen; Add170-3/uPA^{-/-} 78,607 \pm 20,115, n = 4 Proben aus 4 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{+/+} 319,215 \pm 53,179, n = 4 Proben aus 4 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{-/-} 159,760 \pm 18,094, n = 4 Proben aus 4 Mäusen.

4.2.6 Fehlende Korrelation mit der HGF-Aktivierung

Durch In-Bezug-Setzung der durchschnittlichen Menge der aktivierten HGF-Form zu derjenigen des Gesamt-HGF wurde nun ermittelt, ob in Abhängigkeit von TIMP-1 und/oder uPA eine verstärkte Aktivierung des pro-HGF erfolgte. Es zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Somit konnte geschlussfolgert werden, dass die TIMP-1-vermittelte Induktion des HGF-Signalwegs nicht auf einer verstärkten

Aktivierung des Liganden, sondern auf einem erhöhten Proteingehalt an pro-HGF und seines Rezeptors c-Met beruht (Abb. 22).

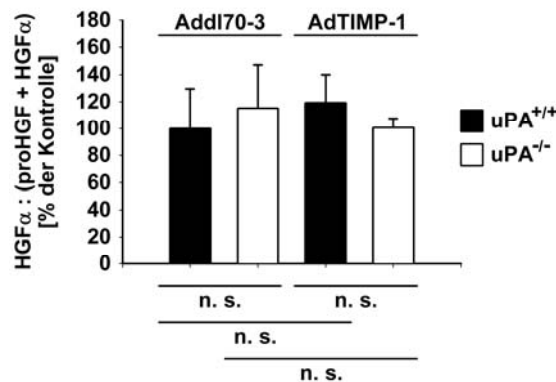


Abbildung 22: Ermittlung der relativen HGF-Aktivierung in Lebern der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse (Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler des Quotienten aus der Dichte der HGF α -Banden und der Summen aus den Dichten der pro-HGF- und HGF α -Banden; der Quotient aus den Mittelwerten der Referenzgruppe Add170-3/uPA^{+/+} wurde 100 % gesetzt.). Add170-3/uPA^{+/+} 100,000 ± 14,728, n = 4 Proben aus 3 Mäusen; Add170-3/uPA^{-/-} 115,358 ± 16,038, n = 4 Proben aus 4 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{+/+} 119,380 ± 10,316, n = 4 Proben aus 4 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{-/-} 100,828 ± 3,285, n = 4 Proben aus 4 Mäusen.

4.3 Wirts-uPA-abhängige Infiltration myeloider Immunzellen als Mediatoren der TIMP-1-induzierten Metastasierung

4.3.1 uPA-unabhängige Induktion der Makrophageninwanderung durch TIMP-1

Da bekannt ist, dass in Lebermetastasierungsmodellen hohe TIMP-1-Konzentrationen einen erhöhten HGF-Proteingehalt nach sich ziehen, ohne die Transkription von HGF in der Leber zu induzieren (Kopitz *et al.*, 2007), stellte sich nun die Frage, ob bekannte HGF-exprimierende und -speichernde Zellen wie Makrophagen und Neutrophile Granulozyten im vorliegenden Tumormodell als Einträger für HGF fungieren. Zur Beantwortung dieser Frage und etwaiger Abhängigkeiten der Infiltration der genannten Immunzellen von der TIMP-1- und uPA-Expression wurde zunächst eine Immunhistochemie auf den Makrophagenmarker FIRE durchgeführt, diese mit einer Gewebe-X-Gal-Färbung zur Detektion von Tumorzellen gekoppelt und anschließend separat die perimetastatisch und parenchymatös lokalisierten Makrophagen quantifiziert. Diese immunhistochemische Quantifizierung belegte, dass die Transduktion mit AdTIMP-1 eine signifikant erhöhte Infiltration von Makrophagen nach sich zog, dieser Effekt sich jedoch bei Modulation des uPA-Status nicht veränderte. In den Tieren, die Nullvirus erhalten hatten, kam es in der uPA^{-/-}-Gruppe sogar zu einem Anstieg der Makrophageninfiltration. Somit war die Einwanderung von Makrophagen ins Leberparenchym im vorliegenden Metastasierungsmodell lediglich von der TIMP-1-Konzentration, nicht jedoch von der uPA-Expression des Wirtstiers abhängig (Abb. 23).

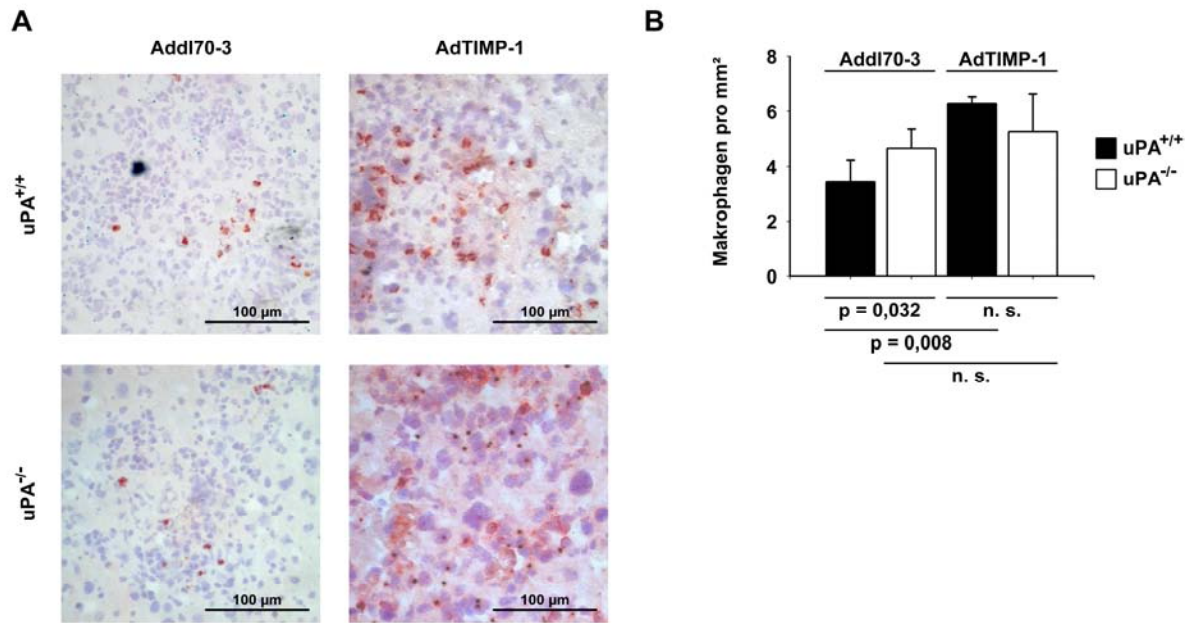


Abbildung 23: FIRE-Immunhistochemie auf Leberschnitten von META/Bom^{nu/nu}-Mäusen. **A** Repräsentative Immunhistochemie mit Gewebe-X-Gal-Färbung (Rotes Signal entspricht Makrophagen. Kerngegenfärbung mit Hämalaun, Tumorzellfärbung mit X-Gal). **B** Quantifizierung der Makrophagendichte (Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Makrophagenzahl pro 1,0 mm² Schnittfläche.). AddI70-3/uPA^{+/+} 3,437 ± 0,355, n = 5 Schnitte von 3 Mäusen; AddI70-3/uPA^{-/-} 4,665 ± 0,302, n = 5 Schnitte von 5 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{+/+} 6,290 ± 0,108, n = 5 Schnitte von 4 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{-/-} 5,256 ± 0,615, n = 5 Schnitte von 4 Mäusen.

4.3.2 Massive TIMP-1-induzierte Infiltration von Neutrophilen Granulozyten in Abhängigkeit von uPA

Nun wurde mit Hilfe der Immunhistochemie auf das Markerprotein Ly-6G auch die Infiltration Neutrophiler Granulozyten quantifiziert. Es zeigte sich dabei eine exorbitante Steigerung der Anzahl infiltrierender Neutrophiler Granulozyten in mit AdTIMP-1 transduzierten Mäusen, welche nahezu komplett wegfiel, wenn die Mäuse ihrer uPA-Expression beraubt waren. Da eine Veränderung des Wirts-uPA-Status in den Nullvirusgruppen keinerlei Änderung der Neutrophileninfiltration nach sich zog, konnte der Schluss gezogen werden, dass dieser Effekt TIMP-1-abhängig und Wirts-uPA ein wesentlicher Mediator dieses Effekts war (Abb. 24).

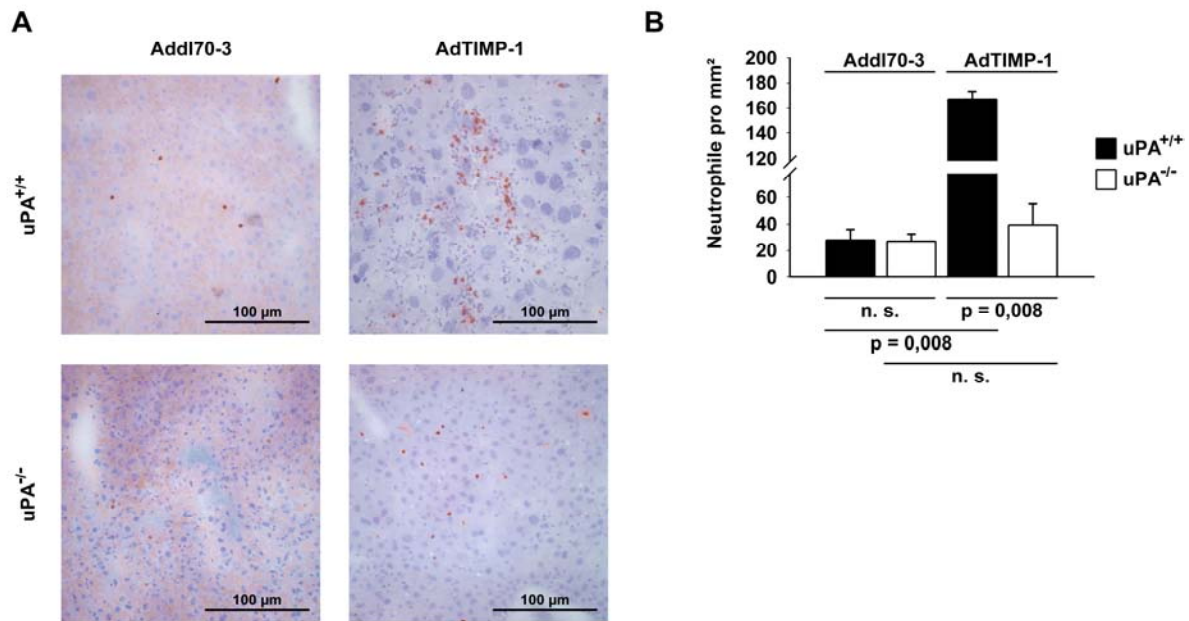


Abbildung 24: Ly-6G-Immunhistochemie auf Leberschnitten von META/Bom^{nu/nu}-Mäusen. **A** Repräsentative Immunhistochemie (Rotes Signal entspricht Neutrophilen Granulozyten. Kerngegenfärbung mit Hämalaun). **B** Quantifizierung der Neutrophilendichte (Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Neutrophilenzahl pro 1,0 mm² Schnittfläche.). AddI70-3/uPA^{+/+} 27,814 ± 3,549, n = 5 Schnitte von 3 Mäusen; AddI70-3/uPA^{-/-} 26,874 ± 2,497, n = 5 Schnitte von 5 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{+/+} 167,017 ± 2,699, n = 5 Schnitte von 4 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{-/-} 39,132 ± 6,980, n = 5 Schnitte von 4 Mäusen.

4.3.3 Intrahepatisches Verteilungsmuster der Immunzellen

Sollten Makrophagen und Neutrophile Granulozyten das *scattering* von Tumorzellen durch Bereitstellung von HGF begünstigen, so sollten sie auch selbst in der Lage sein, diffus in das Lebergewebe zu infiltrieren. Durch selektive Auszählung der Immunzellen nach ihrem Lokalisationsort in der Leber konnte dokumentiert werden, dass Makrophagen in Abhängigkeit von TIMP-1 effizient ins Leberparenchym einwandern, während bei Neutrophilen Granulozyten dieser Effekt weit weniger stark von TIMP-1 abhängig war. Bei Mangel an uPA im Wirt war die Disseminationsneigung der Immunzellen geringfügig um 8 % bei Makrophagen und um 13 % bei Neutrophilen Granulozyten reduziert (Abb. 25).

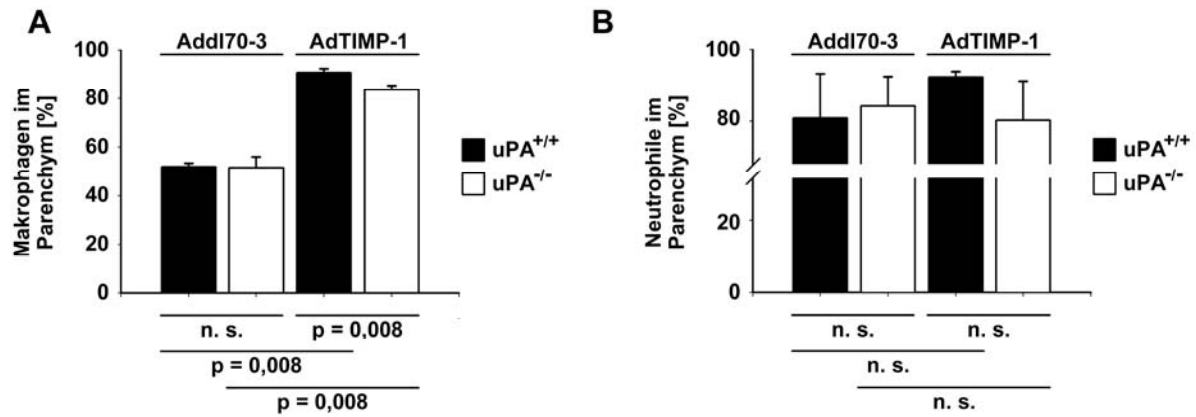


Abbildung 25: Verteilungsmuster der die Leber von META/Bom^{nu/nu}-Mäusen infiltrierenden Immunzellen (Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardfehler der Immunzellenzahl im Parenchym relativ zur Gesamtzahl der jeweiligen Immunzellentität). **A** Ermittlung des Makrophagenanteils im Parenchym. Addl70-3/uPA^{+/+} 51,908 ± 0,630, n = 5 Schnitte von 3 Mäusen; Addl70-3/uPA^{-/-} 51,666 ± 1,910, n = 5 Schnitte von 5 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{+/+} 90,677 ± 0,674, n = 5 Schnitte von 4 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{-/-} 83,503 ± 0,760, n = 5 Schnitte von 4 Mäusen. **B** Ermittlung des Neutrophilenanteils im Parenchym. Addl70-3/uPA^{+/+} 80,900 ± 5,520, n = 5 Schnitte von 3 Mäusen; Addl70-3/uPA^{-/-} 84,100 ± 3,750, n = 5 Schnitte von 5 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{+/+} 92,300 ± 0,687, n = 5 Schnitte von 4 Mäusen; AdTIMP-1/uPA^{-/-} 80,200 ± 4,890, n = 5 Schnitte von 4 Mäusen.

4.3.4 Abhängigkeit der c-Met-Aktivierung von der Neutrophileninfiltration

Um zu testen, ob die infiltrierenden Neutrophilen Granulozyten tatsächlich für die Vermittlung des TIMP-1-induzierten HGF-*signalling* verantwortlich waren, wurde uPA^{+/+}META/Bom^{nu/nu}-Mäuse zusätzlich zur Inokulation von AdTIMP-1 und L-CI.5s-Zellen ein gegen Neutrophile Granulozyten gerichteter Antikörper injiziert und diese Immunzellen hierüber depletiert. Als Kontrolle dienten uPA^{-/-}META/Bom^{nu/nu}-Mäuse ohne Neutrophilen-Depletion. Es zeigte sich, dass in beiden Veruchsgruppen, also sowohl bei uPA-*knock-out*, als auch bei Entfernung der Neutrophilen Granulozyten, keine nennenswerte c-Met-Phosphorylierung mehr stattfand (Abb. 26).

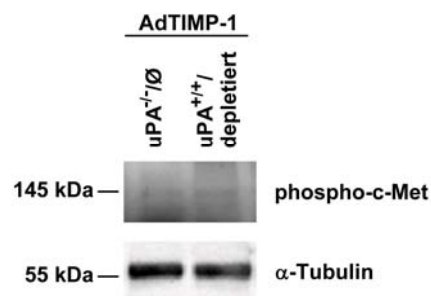


Abbildung 26: Phospho-c-Met-Western-Blot von Leberprotein der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse [II]. Es zeigte sich bei Neutrophilendepletion nur ein sehr geringes HGF-*signalling*, welches gleichwertig zur durch uPA-*knock-out* gehemmten c-Met-Phosphorylierung war.

4.3.5 Korrelation des Tumorzell-*scattering* mit der Neutrophileninfiltration

Es stellte sich nun die Frage, ob das durch Neutrophilendepletion reduzierte HGF-*signalling* (Abb. 26) mit einer Abnahme des Tumorzell-*scattering* ins Leberparenchym einherging. Die überschlagsweise Quantifizierung der Sekundären Invasion der Tumorzellen erfolgte mittels vergleichender fotografischer Dokumentation von auflichtmikroskopischen Bildern. Die *scattering* der Tumorzellen stellte sich dabei in der Tat als praktisch völlig inhibiert heraus, wenn durch Depletion keine Neutrophilen Granulozyten mehr in die Leber invadieren konnten. Auch in den uPA^{-/-}-Tieren ohne Neutrophilendepletion zeigte sich eine subtotale Hemmung der Sekundären Invasion (Abb. 27).

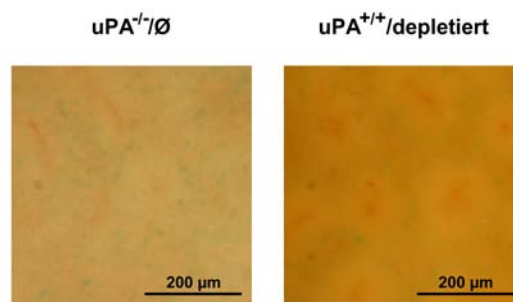


Abbildung 27: Auflichtmikroskopie von X-Gal-gefärbten Lebern der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse bei 56-facher Vergrößerung (Indigofarbenes Signal entspräche den Tumorzellen.). Es zeigte sich, dass das Tumorzell-*scattering* durch Neutrophilendepletion in einer analogen Weise gehemmt wurde wie durch uPA-*knock-out*.

4.4 Beeinflussung der TIMP-1-induzierten Metastasierung durch uPA-*knock-down* in Tumorzellen

4.4.1 Verifizierung des shRNA-vermittelten *knock-down* von murinem uPA in L-CI.5s-Zellen

Um zu überprüfen, ob sich die hepatische Gesamtmetastasierung von L-CI.5s-Zellen auch bei Modulation ihrer eigenen uPA-Expression ändert, wurde zunächst durch shRNAi-Technologie eine Variante der T-Zell-Lymphom-Linie L-CI.5s hergestellt, die einen *knock-down* von murinem uPA zeigte (L-CI.5sshuPA), der das Detektionslimit des qRT-PCR unterschritt. Als Kontrolle wurde eine Variante generiert, die eine *scrambled* shRNA (L-CI.5sshscr) exprimiert, ohne die Expression an murinem uPA nennenswert zu vermindern (Abb. 28).

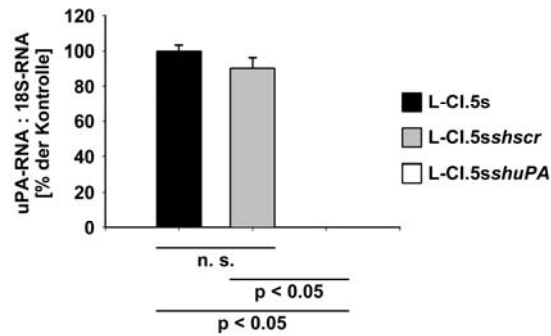


Abbildung 28: Verifizierung des *knock-down* von murinem uPA in L-CI.5s-Zellen über qRT-PCR (Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Menge an uPA-mRNA relativ zur Menge an jeweiliger 18S-RNA; der Mittelwert der Referenzgruppe L-CI.5s wurde 100 % gesetzt.). L-CI.5s 100,00 ± 1,529, n = 2 Zellpools; L-CI.5sshscr 90,267 ± 3,024, n = 2 Zellpools; L-CI.5sshuPA 0,000 ± 0,000, n = 2 Zellpools.

4.4.2 Reduzierte Gesamtmetastasierung

Die verschiedenen L-CI.5s-Varianten wurden drei Tage nach Inokulation von AdTIMP-1 bzw. Addl70-3 in eine Schwanzvene von CD1^{nu/nu}-Mäusen injiziert. Nach Opferung der Tiere am 9. Versuchstag wurde aus den Lebern Protein isoliert und daraufhin eine Western-Blot-Analyse auf das von den *lacZ*-markierten Tumorzellen exprimierte Enzym β -D-Galaktosidase durchgeführt (Abb. 29).

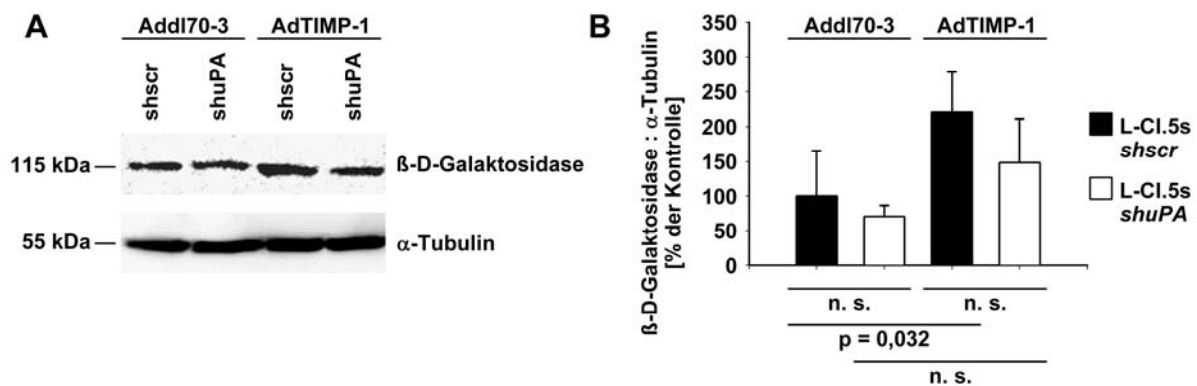


Abbildung 29: β -D-Galaktosidase-Western-Blot von Leberprotein der CD1^{nu/nu}-Mäuse. **A** Repräsentativer Western Blot. **B** Densitometrie zu den Western Blots (Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Dichte der β -D-Galaktosidase-Banden relativ zur Dichte der jeweiligen α -Tubulin-Banden; der Mittelwert der Referenzgruppe Addl70-3/L-CI.5sshscr wurde 100 % gesetzt.). Addl70-3/L-CI.5sshscr 100,000 ± 29,298, n = 5 Proben von 5 Mäusen; Addl70-3/L-CI.5sshuPA 70,610 ± 7,001, n = 5 Proben von 5 Mäusen; AdTIMP-1/L-CI.5sshscr 220,902 ± 25,484, n = 5 Proben von 5 Mäusen; AdTIMP-1/L-CI.5sshuPA 148,304 ± 28,112, n = 5 Proben von 5 Mäusen.

Es zeigte sich eine mehr als verdoppelte Gesamtmetazelllast in der AdTIMP-1-L-CI.5sshscr-Gruppe im Vergleich zur Referenzgruppe. Diese Zunahme war bei Inokulation von L-CI.5sshuPA-Zellen deutlich abgeschwächt. In den Addl70-3-Gruppen kam es bei uPA-*knock-down* auf Tumorzellseite ebenfalls zu einer Abnahme der Gesamtmetastasierung. Es stellte sich somit die Frage, ob die Reduktion der Gesamtmetastasierung bei uPA-*knock-*

down in den Tumorzellen auf einer Abnahme der Makrometastasenzahl, einer Verminderung des Tumorzell-scattering oder auf beidem beruhte.

4.4.3 Abnahme der Makrometastasierung

Zur Überprüfung, ob der durch uPA-knock-down in Tumorzellen verursachte Rückgang der Gesamtmetastasierung (Abb. 29) auf eine verringerte Ausbildung von Makrometastasen zurückzuführen war, wurde eine Organ-X-Gal-Färbung durchgeführt und die Makrometastasen im Anschluss daran mit Hilfe der Auflichtmikroskopie quantifiziert (Abb. 30).

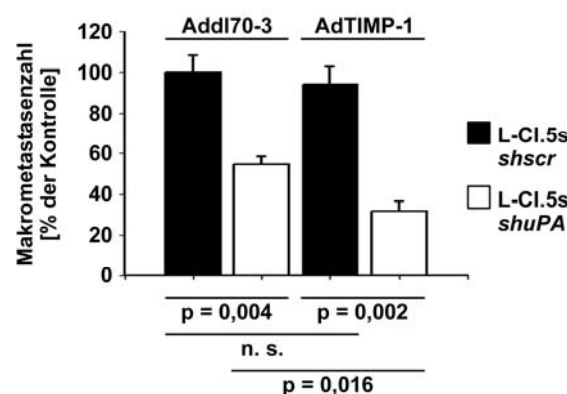


Abbildung 30: Makrometastasenzahl in den Lebern der CD1^{nu/nu}-Mäuse (Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Makrometastasenzahl; der Mittelwert der Referenzgruppe Add170-3/L-CI.5sshscr wurde 100 % gesetzt.). Add170-3/L-CI.5sshscr 100,000 ± 8,544, n = 6 Mäuse; Add170-3/L-CI.5sshuPA 54,545 ± 3,803, n = 5 Mäuse; AdTIMP-1/L-CI.5sshscr 94,318 ± 8,406, n = 8 Mäuse; AdTIMP-1/L-CI.5sshuPA 31,818 ± 4,767, n = 5 Mäuse.

Die Anzahl der Makrometastasen in den mit AdTIMP-1-behandelten Mäusen war nur geringfügig geringer als bei den Mäusen, die Nullvirus erhalten hatten und erreichte nur beim Vergleich der Tiere mit L-CI.5sshuPA-Inokulation statistische Signifikanz. Ein statistisch signifikanter Unterschied bestand jedoch zwischen der Makrometastasenzahl in den Mäusen, die L-CI.5sshscr-Zellen erhalten hatten, und denjenigen, in die die Zellen mit uPA-knock-down inokuliert worden waren. Die Verringerung der uPA-Expression auf Tumorzellseite zog dabei eine Reduktion der Makrometastasenzahl um 45 % (Add170-3) bzw. 67 % (AdTIMP-1) nach sich.

4.4.4 Fehlender Rückgang der Sekundären Invasion

Die näherungsweise Quantifizierung des Tumorzell-scattering wurde auch beim Tierversuch mit Modulation der uPA-Expression auf Tumorzellseite mittels einer vergleichenden Auflichtmikroskopie von X-Gal-gefärbten *Lobi mediales* durchgeführt. Die

durch TIMP-1 induzierte Sekundäre Invasion der Tumorzellen stellte sich als weitgehend unabhängig vom uPA-Status der L-CI.5s-Zellen heraus. Somit konnte der Schluss gezogen werden, dass der Rückgang der Gesamtmetastasierung bei uPA-*knock-down* in den Tumorzellen lediglich auf einer verminderten Anzahl an Makrometastasen (Abb. 30), nicht jedoch auf einem reduzierten *scattering* beruhte.

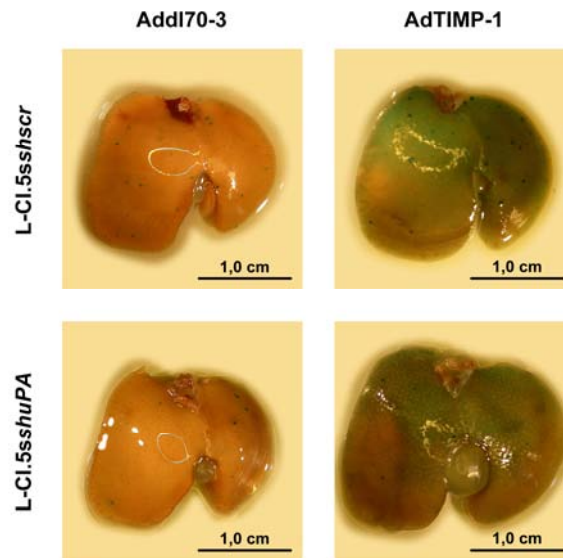


Abbildung 31: Auflichtmikroskopie von X-Gal-gefärbten Lebern der CD1^{nu/nu}-Mäuse bei 6,4-facher Vergrößerung (Indigoblaues Signal entspricht den Tumorzellen.). Es zeigte sich eine Induktion des Tumorzell-*scattering* nach Transduktion von AdTIMP-1, welche bei uPA-*knock-down* in den Tumorzellen keinen nennenswerten Änderung erfuhr.

4.4.5 Weitgehende Unabhängigkeit der c-Met-Aktivierung von Tumorzell-uPA

Um zu klären, ob von den Tumorzellen exprimierter uPA einen Beitrag zur perimetastatischen Aktivierung von c-Met leistete, wurde auf Leberschnitten derjenigen Mäuse eine phospho-c-Met-Immunfluoreszenz durchgeführt, die Tumorzellen mit moduliertem uPA-Status erhalten hatten. Durch Transduktion von AdTIMP-1 wurde auch in diesen Mäusen eine perimetastatische Aktivierung von c-Met induziert, jedoch führte ein Fehlen von uPA auf Tumorzellseite zu keinerlei Änderung des phospho-c-Met-Signals (Abb. 32).

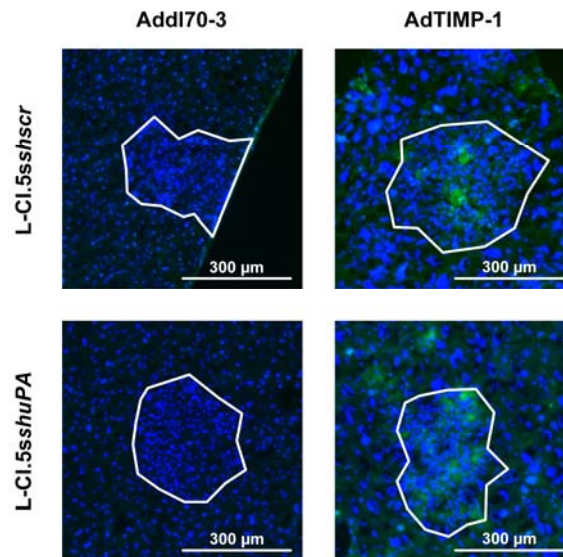


Abbildung 32: Phospho-c-Met-Immunfluoreszenz auf Leberschnitten von $CD1^{nu/nu}$ -Mäusen (Grünes Signal entspricht dem Nachweis von phospho-c-Met, blaues Signal stellt die Kerngegenfärbung dar. Die weiße Linie beschreibt die ungefähre Grenze der Makrometastasen.). Es zeigte sich eine verstärkte Aktivierung von c-Met nach Transduktion von AdTIMP-1, die jedoch nicht abhängig vom uPA-Status der Tumorzellen war.

5 Diskussion

5.1 Zusammenwirken von Aktivator und Inhibitor verschiedener Protease-Familien bei der Ausbildung einer Prometastatischen Nische

Eine zunehmende Zahl von Versuchsergebnissen führte in den letzten Jahren zur Erkenntnis, dass das ursprüngliche Axiom, dass Proteasen strikt prometastatisch wirkten, während ihre Inhibitoren antimetastatische Eigenschaften besäßen, nicht aufrecht zu erhalten ist (Duffy *et al.*, 2008). So ist etwa aus früheren Arbeiten bekannt, dass der natürliche MMP-Breitspektrum-Inhibitor TIMP-1 ein charakteristisches Metastasierungsmuster induziert, welches zwar durch eine Abnahme der Anzahl detektierbarer Makrometastasen, aber eben auch durch eine Induktion des *scattering* von Tumorzellen ausgehend von diesen makrometastatischen Läsionen und somit in der Summe durch eine gesteigerte Gesamtmetastasierung gekennzeichnet ist (Kopitz *et al.*, 2007). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass TIMP-1 in Lebern eine distinkte Genexpressionssignatur induziert, welche u. a. eine gesteigerte Expression der Serinprotease uPA beinhaltet (Kopitz *et al.*, 2007). Da der adenovirale Gentransfer des natürlichen uPA-Inhibitors PAI-2 zudem zu einer Abnahme des TIMP-1-induzierten Tumorzell-*scattering* in der Leber führte (Kopitz *et al.*, 2008), stellte sich die Frage, inwiefern uPA als Mediator der TIMP-1-induzierten Metastasierung in Betracht kommt. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal direkt demonstriert werden, dass TIMP-1 und uPA, also Inhibitor und Aktivator verschiedener Proteasefamilien, bei der Ausbildung einer Prometastatischen Nische zusammenwirken. Dies unterstreicht einmal mehr die enorme Komplexität des *protease web*.

Der Umstand, dass MMPs, nach heutigem Wissensstand insbesondere MMP-9, den Erfolg der Extravasation von Tumorzellen mitbestimmen (Gerg *et al.*, 2008; Hiratsuka *et al.*, 2002; Kaplan *et al.*, 2005), legte die Vermutung nahe, dass TIMP-1 als natürlicher Breitspektrum-inhibitor dieser Proteasefamilie die Metastasierung über eine verminderte Extravasationseffizienz von Tumorzellen hemmt. Extrapoliert man die Rate erfolgreicher Extravasationsereignisse aus der Anzahl von Makrometastasen, so konnte in der Tat in einer Vielzahl von Studien ein derartiger antimetastatischer Effekt von TIMP-1 nachgewiesen werden (Brand, 2002; Deryugina *et al.*, 2006). So führten sowohl die über Transfektion von Plasmiden, Adenoviren oder rekombinantem Protein erfolgten Modifikationen der TIMP-1-Expression auf Tumorzellseite als auch auf Wirtsseite zu einer Inhibition der Metastasierung im Sinne einer verminderten Makrometastasenzahl (Elezkurtaj *et al.*, 2004; Krüger *et al.*, 1998; Miyagi *et al.*, 2007; Yamauchi *et al.*, 2001). Dieser Effekt konnte auch im vorliegenden Versuchsmodell der hepatischen Metastasierung von L-CI.5s-T-Lymphomzellen bestätigt

werden, zog doch die Transduktion von META/Bom^{nu/nu}-Mäusen mit AdTIMP-1 eine 66 %-ige Reduktion der Makrometastasenzahl nach sich (Abb. 13).

Bedeutsamerweise konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch auch rekapituliert werden, dass die Abnahme in der Ausbildung makrometastatischer Läsionen nach adenoviralem Gentransfer von TIMP-1 (Abb. 13) nicht mit einer Abnahme der Gesamtmetastasierung einherging, sondern vielmehr von einem Anstieg der Gesamttumorzelllast in den Lebern um 88 % begleitet war (Abb. 12). In ähnlicher Weise konnte dieser Effekt bereits früher dokumentiert werden (Kopitz *et al.*, 2007; Krüger *et al.*, 1997). Wie die auflichtmikroskopische Dokumentation zeigte, beruhte die gesteigerte Metastasenlast in den mit AdTIMP-1 transduzierten Lebern vornehmlich auf einer Zunahme des Tumorzell-*scattering* (Abb. 16). Es konnte zudem belegt werden, dass diese intraparenchymatöse Dissemination von Tumorzellen stark von der uPA-Expression durch den Wirt, also von der uPA-Konzentration im *microenvironment* abhing (Abb. 16). Zudem war in uPA-defizienten Mäusen, die Nullvirus erhalten hatten, keinerlei Anstieg der Gesamtmetastasierung im Vergleich zu mit AdTIMP-1 transduzierten Versuchstieren nachzuweisen (Abb. 12).

Zusammengenommen ist das uPA-System also als Mediator der durch hohe TIMP-1-Konzentrationen induzierten Prometastatischen Nische anzusehen und bereitet somit quasi den Boden für die effiziente Kolonisation des Zielorgans Leber durch metastasierende Tumorzellen. Dieses Ergebnis korreliert mit dem Sachverhalt, dass in Tumoren häufig eine parallele Erhöhung der uPA- und TIMP-1-mRNA-Transkription zu verzeichnen ist, wie dies etwa bisher für das kolorektale Karzinom (Baker *et al.*, 2003), das Mamma-Karzinom (Castelló *et al.*, 2002) und gewisse myeloproliferative Erkrankungen gezeigt werden konnte (Jensen *et al.*, 2003). Zudem stellt die Erkenntnis, dass TIMP-1 und uPA in metastasierungsfördernder Weise zusammenwirken einen weiteren Erklärungsansatz für das klinische Scheitern synthetischer MMP-Breitspektruminhibitoren dar, konnten doch auch bei diesen eine Induktion der uPA-Expression im Wirtsgewebe und eine Förderung der Metastasierung nachgewiesen werden (Holst-Hansen *et al.*, 2001). Interessanterweise wurde zudem unlängst gezeigt, dass uPA entscheidend an der Vermittlung von Proliferation und Migration von EPCs und anderen mesenchymalen Stammzellen beteiligt ist (Basire *et al.*, 2006; Gutova *et al.*, 2008). Wegen der großen Bedeutung dieser Zellen für Ausbildung und Unterhalt der Prometastatischen Nische unterstreicht diese experimentelle Beobachtung den Stellenwert von uPA für die Ausprägung solcher metastasenempfindlicher Regionen in Sekundärorganen, deren Ausbildung ihrerseits auch von TIMP-1 induziert werden kann (Kopitz *et al.*, 2007).

5.2 Interdependenz zwischen TIMP-1, uPA und dem HGF-Signalweg

Bereits publizierte Forschungsergebnisse zeigten, dass hohe TIMP-1-Konzentrationen zu einer Induktion des HGF-Signalwegs und über das damit verbundene Tumorzell-*scattering* in das Leberparenchym zu einer gesteigerten Metastasenlast führen können (Kopitz *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass uPA ein maßgeblicher Mediator dieser durch TIMP-1 induzierten Aktivierung des HGF-*signalling* ist.

HGF, synonym auch *scatter factor* genannt, induziert über die Interaktion mit seinem Rezeptor c-Met, eine Vielzahl pro-metastatischer Gene (Abb. 7), die metastasierenden Tumorzellen letztlich die Möglichkeit eröffnen, effizient in das Gewebe ihres Zielorgans zu infiltrieren. Die Serinprotease uPA spielt eine bedeutende Rolle bei der Induktion dieses Signalwegs, ist sie doch in der Lage, HGF auf verschiedenen Ebenen zu regulieren. So kann uPA die Expression von HGF induzieren (Bueno *et al.*, 2006) sowie durch limitierte Proteolyse latente HGF-Reserven aus der ECM mobilisieren (Schuppan *et al.*, 1998) und pro-HGF aktivieren (Naldini *et al.*, 1992; Shimizu *et al.*, 2001). Eine weitere Verquickung zwischen uPA und dem HGF-*signalling* ergibt sich daraus, dass die Expression von uPA durch HGF gesteigert werden (Tacchini *et al.*, 2003), so dass uPA auch *down-stream* dieses Signalwegs liegen kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass uPA im Falle der TIMP-1-vermittelten Induktion des HGF-Signalwegs in der Tat eine bedeutsame *up-stream*-Funktion bezüglich des HGF-*signalling* erfüllt. Da der einzige bisher bekannte hochaffine Rezeptor des HGF das Transmembranprotein c-Met ist, wird diese durch uPA erfüllte Mediatorfunktion allein schon aus der Bestimmung der c-Met-Phosphorylierung deutlich. So kam es nach Transduktion von AdTIMP-1 zwar in uPA-Wildtyp-Mäusen zu einer Verdreifachung der c-Met-Aktivierung, jedoch verminderte sich in uPA-*knock-out*-Tieren dieser Anstieg um 77 % (Abb. 17). Parallel dazu kam es in dieser Gruppe auch zu einer dramatischen Abnahme des TIMP-1-induzierten *scattering* der Tumorzellen, welches ja ein histologisches *read-out* des HGF-*signalling* darstellt (Abb. 16). Diese Ergebnisse reihen sich in eine Kette von bereits publizierten Daten ein, die etwa eine reduzierte HGF-vermittelte Invasionskapazität von Zellen eines hepatozellulären Karzinoms nach Blockade von uPA (Lee *et al.*, 2008) oder eine verminderte Regenerationsfähigkeit von Lebergewebe in uPA^{-/-}-Versuchstieren (Roselli *et al.*, 1998) zeigen und so die Interdependenz von uPA und dem HGF-Signalweg untermauern.

Von großem Belang im Hinblick auf die Aktivierung des HGF-Signalwegs ist auch die Frage, wo die Phosphorylierung von c-Met erfolgt. In der vorliegenden Arbeit konnte in Ergänzung früherer Versuchsergebnisse (Kopitz *et al.*, 2007) gezeigt werden, dass es in Mauslebern nach Transduktion von AdTIMP-1 zu einer starken perimetastatischen, aber auch parenchymatösen Aktivierung von c-Met kommt, aber nur dann, wenn der von Metastasierung betroffene Organismus in der Lage ist, uPA zu produzieren (Abb. 18). Diese

TIMP-1- und uPA-abhängige Lokalisation passt gut zur Vorstellung, dass das *scattering* von Tumorzellen von präformierten makrometastatischen Läsionen ausgeht und dann einen sukzessiven Infiltrationsprozess ins Leberparenchym darstellt. Ergänzend sei darauf hingewiesen, dass in Analogie zu früheren Ergebnissen (Kopitz *et al.*, 2007) auch um venöse Gefäße eine Aktivierung von c-Met nachzuweisen war (Abb. 18). Diese stellte sich jedoch als unabhängig von TIMP-1 und uPA heraus, so dass alternative Aktivierungswege eine Rolle spielen müssen. Da es sich in der Leber bei den perivenösen und periportalen Regionen um Gewebebezirke mit niedrigem Sauerstoffgehalt handelt, könnte in diesem Zusammenhang eine transkriptionelle Induktion des met-Protoonkogens und diverser HGF-Aktivatoren durch den *hypoxia-inducible factor-1* (Hif-1) bedeutsam sein (Pennacchiotti *et al.*, 2003). Noch unpublizierte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe weisen ebenfalls in diese Richtung.

Da die effektive Induktion eines Signalwegs sowohl auf der Hochregulation des verantwortlichen Rezeptors, als auch der seines Liganden bzw. auf beider Hochregulation beruhen kann, lag die Vermutung nahe, dass es TIMP-1-abhängig in der Leber auch zu einem Anstieg an c-Met-Protein kommt. In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit dokumentiert werden, dass sich nach Transduktion mit AdTIMP-1 in Lebern der Gehalt an c-Met annähernd verdreifacht (Abb. 19) und dies, wie erwartbar, in denjenigen Regionen, in denen auch eine verstärkte Aktivierung dieses Rezeptors zu beobachten war (Abb. 20). Dieses Ergebnis korreliert mit früheren Erkenntnissen, welche ebenfalls einen TIMP-1-induzierten Anstieg von c-Met-Protein zeigten (Kopitz *et al.*, 2007). Ähnlich dem weitgehend uPA-abhängigen Anstieg der c-Met-Phosphorylierung war auch die Zunahme des c-Met-Proteingehalts erheblich von der uPA-Expression durch den Wirt abhängig, verminderte sich doch in uPA-*knock-out*-Mäusen der Anstieg an c-Met-Protein um 58 % (Abb. 19). Auch dieses Ergebnis fügt sich in eine Reihe bekannter Versuchsergebnisse ein (Bauer *et al.*, 2005b). Zudem legte es den Schluss nahe, dass das verstärkte HGF-*signalling* teilweise auf der verstärkten c-Met-Expression beruhte.

Über die verstärkte TIMP-1- und uPA-abhängige Expression des Rezeptors c-Met hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit auch eine Zunahme des Proteingehalts des c-Met-Liganden dokumentiert werden. So stieg der Gehalt an pro-HGF in den Lebern mit AdTIMP-1 transduzierter Mäuse um den Faktor 2,3 im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 21). In Tieren, die kein uPA exprimieren konnten, war dieser Anstieg um ca. 40 % reduziert (Abb. 21). Da in der Literatur mehrfach beschrieben ist, dass uPA ein potenter Aktivator des pro-HGF ist (Naldini *et al.*, 1992; Shimizu *et al.*, 2001), könnte das Mehr an pro-HGF auch mit einem Mehr an aktiviertem HGF einhergehen. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch über Ermittlung der relativen HGF-Aktivierung verifiziert werden, dass im Kontext der TIMP-1-vermittelten Induktion des HGF-Signalwegs die Aktivierung von pro-HGF nicht vom uPA-Status des Wirts abhängt (Abb. 22). Da das Ausmaß des HGF-*signalling* dennoch uPA-

abhängig war, konnte die Beeinflussung durch uPA nur über eine Erhöhung der in der Leber verfügbaren HGF-Konzentration erfolgen. Dies kann prinzipiell entweder dadurch erreicht werden, dass die Transkription von HGF-mRNA im Lebergewebe induziert wird, ein verstärktes *release* von in der ECM sequestriertem HGF erfolgt (Schuppan *et al.*, 1998) oder aber Zellen zur Leber rekrutiert werden, die in der Lage sind, HGF zu produzieren und freizusetzen. Da aus früheren Versuchsergebnissen bekannt ist, dass hohe TIMP-1-Konzentrationen in der Leber nicht zu einer Steigerung der HGF-Expression auf dem Transkriptionsniveau führen (Kopitz *et al.*, 2007) und TIMP-1 Proteasen inhibiert, die an der Freisetzung von pro-HGF beteiligt sind, lag eine Rolle für infiltrierende Immunzellen nahe.

5.3 Bedeutung myeloider Immunzellen für die TIMP-1-induzierte Aktivierung des HGF-Signalwegs

Die große Bedeutung von infiltrierenden Immunzellen für die Modulation des *microenvironment* gilt mittlerweile als gesichert. So korreliert die Anzahl Tumor-assoziiertes Makrophagen und Neutrophiler Granulozyten mit einer schlechteren Prognose für maligne Erkrankungen, was man v. a. auf die parallel verlaufende Hochregulation von Wachstums- und Angiogenesefaktoren, Chemokinen und Enzymen zum ECM-*remodelling* zurückführt (Condeelis *et al.*, 2006; DeNardo *et al.*, 2008). In die Gruppe der durch Immunzellen exprimierten Wachstumsfaktoren fällt auch der HGF. Seine Expression und seine effiziente Sekretion konnte sowohl für Makrophagen (Armbrust *et al.*, 2002; Morimoto *et al.*, 2001), als auch für Neutrophile Granulozyten (Crestani *et al.*, 2002; Grenier *et al.*, 2002; Imai *et al.*, 2005; Wislez *et al.*, 2003) nachgewiesen werden. Auch bei der Progression des Non-Hodgkin-Lymphoms schuldigt man Neutrophile Granulozyten an, den Anstieg des HGF-Spiegels im Blut zu vermitteln (Toyama *et al.*, 2005). Die Vorstellung, dass bei soliden Tumoren HGF von infiltrierenden myeloiden Immunzellen produziert wird, während Tumorzellen c-Met exprimieren, passt dabei gut zur bekannten perizellulären Organisation dieses Signaltransduktionssystems (Birchmeier *et al.*, 2003). Das uPA-System kann dabei dahingehend in diese Organisationsstruktur eingreifen, als es in der Lage ist, die Rekrutierung myeloider Immunzellen in sekundäre Gewebe (Abraham *et al.*, 2003) und anschließend deren Degranulation zu vermitteln (Gyetko *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Infiltration von Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten in die Leber durch TIMP-1 induziert werden kann. So kam es nach Transduktion mit AdTIMP-1 zu einem 83 %-igen Anstieg der Anzahl der in der Leber nachweisbaren Makrophagen und gar zu einer Versechsfachung der Neutrophilenzahl (Abb. 23 und 24). Diese quasi chemotaktische Funktion von TIMP-1 stellt

eine recht neue Erkenntnis dar, konnte sie doch bisher lediglich im Zusammenhang mit der Entstehung der Myokarditis nachgewiesen werden (Crocker *et al.*, 2007).

Die Untersuchung des Stellenwerts von Wirts-uPA für die TIMP-1-induzierte Infiltration der Leber durch Immunzellen zeigte interessanterweise, dass das Fehlen von uPA auf Wirtsseite lediglich die Infiltration Neutrophiler Granulozyten um annähernd 80 % reduzierte, während die Einwanderung von Makrophagen nur um 17 % zurückging (Abb. 23 und 24). Auf den ersten Blick steht dies scheinbar im Widerspruch zu bisherigen Forschungsergebnissen (Bryer *et al.*, 2008; DiPasquale *et al.*, 2007), jedoch fokussierten diese Versuche nicht auf die Metastasierungsforschung, sondern auf den Stellenwert von Makrophagen für regenerative Prozesse, so dass die Tumor-assoziierte Infiltration von Makrophagen anderen Regulationsmechanismen unterliegen dürfte. Der Umstand, dass die TIMP-1-induzierte Infiltration Neutrophiler Granulozyten von der uPA-Expression durch den Wirt abhängig war (Abb. 24), lässt mehrere Begründungen möglich erscheinen. So könnte die durch hohe TIMP-1-Konzentrationen verstärkte Expression einiger Proteine mit stimulierender Wirkung auf Immunzellen wie etwa des *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) uPA-abhängig erfolgen, worauf derzeit noch unpublizierte Daten hinweisen (Halbgewachs *et al.*, derzeit noch unpublizierte Daten). Zudem ist bekannt, dass TIMP-1 nicht nur die Expression von uPA, sondern auch die des uPAR induziert (Kopitz *et al.*, 2007), so dass es zu einer verstärkten Plasmin-Generierung kommen dürfte. Die durch die damit verbundene Proteolyse entstehenden Spaltprodukte der ECM wirken bekanntermaßen zum Teil ebenso chemotaktisch auf Immunzellen wie gewisse durch Proteolyse oder Ligandenbindung demaskierte Peptidsequenzen des uPAR selbst (Chapman *et al.*, 2001; Crippa, 2007; Degryse *et al.*, 1999). Diese Wirkung kann noch dadurch potenziert werden, dass uPAR den ebenfalls chemotaktisch wirkenden Rezeptor FPRL1 transaktivieren kann (Resnati *et al.*, 2002).

Da es im Rahmen des TIMP-1-induzierten *scattering* zu einer Infiltration des Leberparenchyms durch Tumorzellen kommt, lag die Vermutung nahe, dass sich TIMP-1-abhängig auch das Verteilungsmuster der infiltrierenden Immunzellen ändert. Während die vorliegenden Daten nur einen geringen Anstieg der im Leberparenchym lokalisierten Neutrophilen Granulozyten um etwa 14 % dokumentieren konnten (Abb. 25), zeigte die parenchymatöse Dissemination von Makrophagen eine deutliche TIMP-1-Abhängigkeit. So waren in mit AdTIMP-1 transduzierten Versuchstieren 75 % mehr Makrophagen außerhalb makrometastatischer Läsionen nachzuweisen als in der Kontrollgruppe (Abb. 25). Sowohl bei Makrophagen, als auch bei Neutrophilen war diese verstärkte Disseminationstendenz nur unwesentlich vom uPA-Status des Wirts abhängig (Abb. 25). Dabei ist jedoch zu bedenken, dass die um 12 % geringere Dissemination von Neutrophilen Granulozyten in uPA-*knock-out*-Mäusen von einer um 77 % reduzierten Gesamtzahl dieser Immunzellen begleitet war

(Abb. 24), was bedeutete, dass sich die Neutrophilenzahl im Parenchym im Vergleich zu uPA-exprimierenden Mäusen auf etwa ein Fünftel reduzierte.

Die vorliegende Arbeit konnte den hohen Stellenwert Neutrophiler Granulozyten für die Vermittlung des TIMP-1-induzierten Metastasierungsmusters auch durch selektive Depletion dieser myeloiden Immunzellen bestätigen. Dabei zeigte sich, dass es in Mäusen mit Neutrophilendepletion weder zu einem Tumorzell-*scattering* (Abb. 27), noch zu einer diesem zu Grunde liegenden Aktivierung des HGF-Signalwegs kommt (Abb. 26). Eine analoge Inhibition des TIMP-1-typischen Metastasierungsphänotyps und des HGF-*signalling* wird auch durch den uPA-*knock-out* im Wirt hervorgerufen (Abb. 16 und 17). Da dieser darüber hinaus auch die Infiltration Neutrophiler Granulozyten hochsignifikant hemmt (Abb. 24), ließ sich schlussfolgern, dass die Wirts-uPA notwendig für die TIMP-1-induzierte Infiltration dieser Immunzellen ist und hierüber die Induktion des HGF-Signalwegs vermittelt wird. Da hierauf wiederum das *scattering* der Tumorzellen in das Leberparenchym beruht, wird über diesen die Tumorummunologie berührenden Mechanismus ein entscheidender Beitrag zur größeren Empfänglichkeit des Zielorgans Leber für metastasierende Tumorzellen geleistet.

5.4 Differentielle Bedeutung von Tumorzell- und Wirts-uPA für die Metastasierung

Eine große Anzahl von Metastasierungsmodellen etwa des Mammakarzinoms (Pakneshan *et al.*, 2004), des Malignen Melanoms (Hearing *et al.*, 1994) und des Prostatakarzinoms (Pulukuri *et al.*, 2005) belegte eine prinzipielle Hemmung der Metastasierung durch Verminderung der uPA-Expression in Tumorzellen. Aus diesem Grunde konnte angenommen werden, dass Tumorzell-uPA auch für die Vermittlung des TIMP-1-induzierten Metastasierungsphänotyps von Bedeutung ist. Die vorliegende Arbeit widerlegt jedoch diese Hypothese insofern, als weder das Tumorzell-*scattering* in das Leberparenchym (Abb. 31), noch die c-Met-Phosphorylierung (Abb. 32) eine Abhängigkeit von der uPA-Expression durch die Tumorzellen zeigen.

In einer Reihe früherer Versuche konnte belegt werden, dass von Stromazellen synthetisiertes uPA einen bedeutenden Faktor für das Auswachsen von Primärtumoren und Metastasen darstellt (Frandsen *et al.*, 2001; Gutierrez *et al.*, 2000). Eine solche Korrelation zwischen der Expression von Tumorzell-uPA und der Fähigkeit zur Dissemination in metastatischen Sekundärorganen ist allein schon wegen der bekannten proliferativen Wirkungen von uPA denkbar (Alfano *et al.*, 2005; Blasi *et al.*, 2002), ist doch die Proliferation eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Metastasierung (Hanahan *et al.*, 2000). Dieser Sachverhalt konnte in der vorliegenden Arbeits insofern reproduziert werden, als in uPA^{-/-}-Mäusen, die nicht mit AdTIMP-1 transduziert wurden, eine Reduktion der Anzahl an

Makrometastasen um 28 % im Vergleich zu uPA-Wildtyp-Tieren nachzuweisen war (Abb. 13). In Mäusen mit dem für TIMP-1 typischen Metastasierungsmuster war diese Abnahme nicht nachweisbar (Abb. 13), was jedoch darauf zurückgeführt werden könnte, dass TIMP-1 durch Induktion alternativer proliferativer und proteolytischer Signalwege die durch den uPA-*knock-out* verursachte Reduktion dieser metastasierungsfördernden Eigenschaften konterkariert (Kopitz *et al.*, 2007). Sollte dies der Fall sein, so dürfte die Proliferation von Tumorzellen in makrometastatischen Läsionen von uPA^{-/-}-Tieren nicht reduziert sein. Dies konnte im vorliegenden Versuchsmodell bestätigt werden (Abb. 15). Da aber die Proliferation in hepatischen Makrometastasen mit Add170-3 transduzierter Tiere ebenso anstieg, wenn die Expression von uPA durch den Wirt verhindert war (Abb. 15), kann der Einfluss von TIMP-1 nicht allein für die proliferative Gegenregulation verantwortlich sein. Vielmehr muss der Schluss gezogen werden, dass zumindest in der beschriebenen Versuchskonstellation der von Tumorzellen selbst synthetisierte uPA für die Determination ihrer Proliferationsrate einen größeren Stellenwert besitzt als die uPA-Expression durch den Wirtsorganismus.

Über die fehlende Beeinflussung der Proliferationsrate durch Wirts-uPA hinaus zeigte sich eine leichte Vergrößerung der detektierbaren Makrometastasen in Mäusen ohne uPA-Expression durch den Wirt (Abb. 14). Dies mag zum Einen auf einer verminderten Degradation der ECM und damit einer erschwerten Infiltrierbarkeit des Leberparenchyms beruhen, zum Anderen sind die inokulierten Tumorzellen in diesem Versuchsansatz ja in der Lage, uPA zu exprimieren, was den Tumorzellen die Fähigkeit zu einer gewissen uPA-basierten Proteolyse der ECM verleiht. Da es jedoch in den Lebern der Tiere, denen Tumorzellen mit *down*-regulierter uPA-Expression injiziert worden waren, zu keiner nennenswerten Veränderung des *scattering* im Vergleich zur Inokulation von uPA-exprimierenden Tumorzellen kam (Abb. 31), während sich das Ausmaß der auflichtmikroskopisch detektierbaren Tumorzell-dissemination ins Leberparenchym drastisch verminderte, wenn der Wirtsorganismus keine uPA-Expression zeigte (Abb. 16), kann der Schluss gezogen werden, dass der Stellenwert dieser Tumorzell-uPA-abhängigen ECM-Proteolyse für das *scattering* der Tumorzellen von sehr untergeordneter Bedeutung ist. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der bereits bekannten Beobachtung, dass die uPA-Expression durch Bindegewebszellen mit dem Infiltrationsvermögen von Tumorzellen korreliert (Okusa *et al.*, 1999).

Da die intraparenchymatöse Tumorzell-dissemination nicht vom uPA-Status der Tumorzellen abhing (Abb. 31), dürfte sich unter der Annahme, dass für das *scattering* der Tumorzellen nicht zuletzt auch eine Aktivierung des HGF-*signalling* verantwortlich zeichnet, in Abhängigkeit von der uPA-Expression der Tumorzellen keine Veränderung in der Induktion dieses Signalwegs einstellen. In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass das Ausmaß der c-Met-Phosphorylierung unabhängig vom

uPA-Status der Tumorzellen war (Abb. 32). Gleichbedeutend damit ist die Feststellung, dass die uPA-Expression auf Wirtsseite ausreichend für die Aktivierung des HGF-Signalwegs und das damit verbundene *scattering* der Tumorzellen ist.

Der Umstand, dass es bei Reduktion der uPA-Expression in den Tumorzellen dennoch zu einem etwa 30 %-igen Rückgang der hepatischen Gesamtmetastasierung kam und zwar sowohl in Tieren, die AdTIMP-1 erhalten hatten, als auch in solchen, denen das Kontrollvirus injiziert worden war (Abb. 29), legte den Schluss nahe, dass der Erfolg der Tumorzell-Extravasation, gemessen an der Anzahl detektierbarer Makrometastasen, teilweise auf der uPA-Expression durch infiltrierende Tumorzellen beruhte. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten in der Tat, dass sich in den Lebern derjenigen Mäuse, die Tumorzellen mit uPA-*knock-down* erhalten hatten, weniger Makrometastasen ausbildeten als in den Kontrolltieren und zwar 45 % weniger bei vorausgehender Inokulation von Add170-3 und sogar 66 % weniger bei AdTIMP-1. Diese Reduktion der Makrometastasenzahl verhält sich komplementär zum in einer Vielzahl von Versuchen dokumentierten antimetastatischen Effekt einer uPA-down-regulation auf Tumorzellseite (Hearing *et al.*, 1994; Pakneshan *et al.*, 2004; Pulukuri *et al.*, 2005).

Zusammengefasst kann also postuliert werden, dass die uPA-Expression auf Wirtsseite eine größere Bedeutung für die TIMP-1-induzierte Ausbildung und den Unterhalt der Prometastatischen Nische in der Leber besitzt und damit die Voraussetzung für das effektive *scattering* der Tumorzellen ins Leberparenchym schafft. Dies wiederum wird vornehmlich über eine Vermittlung der Induktion des HGF-Signalwegs über die verstärkte Infiltration von HGF-exprimierenden myeloiden Immunzellen und eine Hoch-Regulation der c-Met-Expression ermöglicht. Gemessen an der Anzahl an Makrometastasen, welche näherungsweise als Maß für den Erfolg der Extravasation gelten können, scheint von den Tumorzellen synthetisierter uPA hingegen bis zu einem gewissen Grad das metastatische Potential dieser Zellen zu determinieren. Hieraus ergibt sich das in der folgenden Grafik dargestellte Interaktionsmodell zwischen TIMP-1, uPA und dem HGF-Signalweg (Abb. 33).

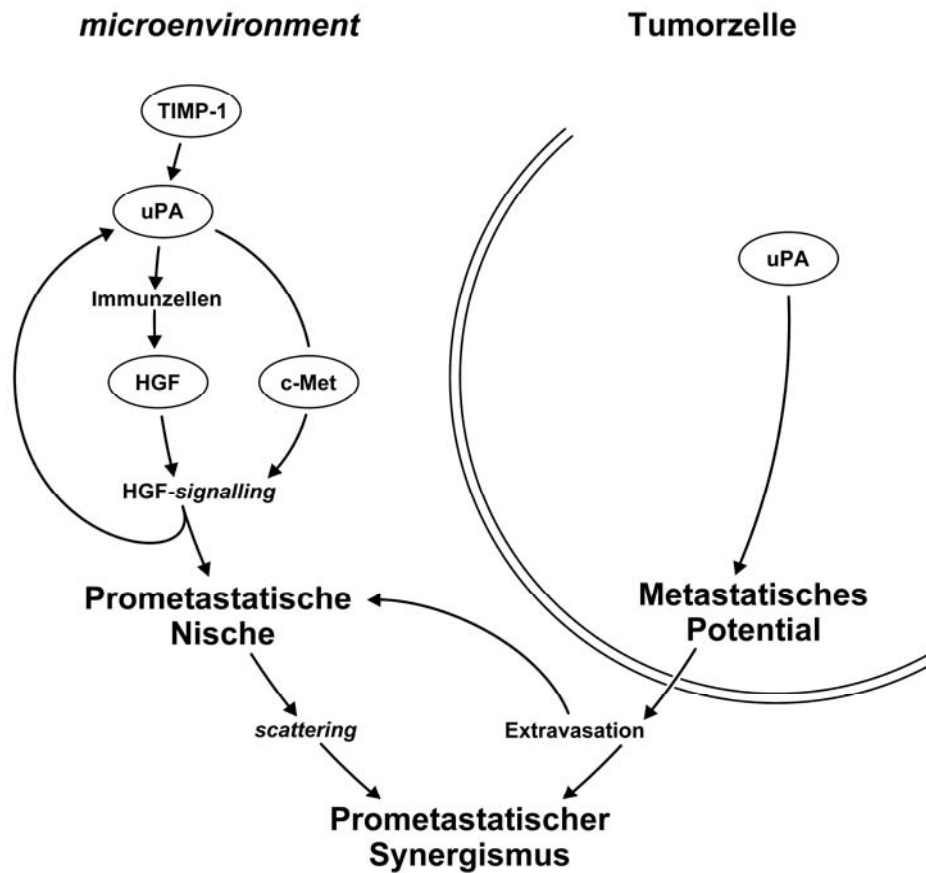


Abbildung 33: Interaktionsmodell zwischen TIMP-1, uPA und dem HGF-Signalweg bei der Lebermetastasierung. Dargestellt sind die differentiellen Beiträge der Wirts- und der Tumorzell-Seite bei der Metastasierung. Einerseits determiniert die uPA-Expression durch die infiltrierenden Tumorzellen zu einem gewissen Grad deren Metastatisches Potential, andererseits können hohe TIMP-1-Konzentrationen die Expression von uPA im Lebergewebe induzieren, was seinerseits über ein verstärktes HGF-signalling zur Ausprägung einer Prometastatischen Nische beiträgt. Diese wiederum kann von den extravadierten Tumorzellen zur effektiven Kolonisation des metastatischen Sekundärorgans genutzt werden. Nähere Erläuterung im Text.

5.5 Schlussfolgerungen für die Tumorthherapie

Lange Zeit herrschte in der tumorbiologischen Forschung die Meinung vor, dass MMPs der Tumorprogression Vorschub leisteten, während ihre Inhibition antimetastatische Effekte auslösen würde. Dieses Axiom führte zur Entwicklung synthetischer Breitspektrum-Inhibitoren, die jedoch allesamt spätestens in klinischen Phase-III-Studien scheiterten (Zucker *et al.*, 2000). In ähnlicher Weise zeigte die Einschleusung des natürlichen MMP-Breitspektrum-Inhibitors TIMP-1 mit Hilfe adenoviraler Vektoren in einigen Studien prometastatische Wirkungen (Brand, 2002), so dass die TIMP-1-basierte Gentherapie keinen Einstieg in die klinische Wirkstofftestung gefunden hat. Zudem konnte in einer großen Anzahl klinischer Studien ein prognostisch ungünstiger Effekt hoher lokaler oder systemischer TIMP-1-Spiegel bei Patienten mit Tumorerkrankungen belegt werden (Lipton *et al.*, 2007;

Schrohl *et al.*, 2004; Würtz *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2006). Da deshalb erhöhte TIMP-1-Konzentrationen gewissermaßen als negativer prognostischer Faktor angesehen werden können, ist es von großer Bedeutung, für die Risikogruppe von Tumorpatienten mit hoher TIMP-1-Expression maßgeschneiderte Therapiestrategien zu entwickeln. Hierbei spielen die sog. *targeted therapies* eine besondere Rolle, worunter man *sensu lato* den Einsatz von Medikamenten versteht, die auf eine exakt definierte Zielstruktur bzw. einen konkreten biologischen *pathway* fokussieren, deren Inaktivierung die Regression oder Destruktion eines Tumors bzw. die Remission einer anderweitigen Erkrankung nach sich zieht (Mocellin *et al.*, 2006). Hierunter fallen insbesondere die Verwendung blockierender monoklonaler Antikörper und niedermolekularer Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren, die Genterapie und die aktive und passive Immuntherapie im Sinne einer antineoplastischen Vakzinierung.

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass das uPA- und das HGF-System zu einem erheblichen Teil die prometastatische Wirkung von TIMP-1 vermitteln, und aus einer Reihe früherer Studien bekannt ist, dass in Tumoren häufig TIMP-1 und Komponenten des uPA- und HGF-Systems parallel in ihrer Expression gesteigert werden (Kopitz *et al.*, 2007), kommt den pharmazeutischen Eingriffen in diese biologischen Systeme eine besondere Bedeutung bei der Suche nach geeigneten Therapieoptionen für Tumorpatienten mit hoher TIMP-1-Expression zu. In einer ganzen Reihe von *In-vitro*-Experimenten und Tierversuchen konnte dabei bereits sowohl für die Blockade der uPA-vermittelten Plasmin-Generierung, als auch für die Inhibition des HGF-*signalling* ein metastasierungshemmender Effekt dokumentiert werden (Christensen *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2005; Reuning *et al.*, 2003; Rømer *et al.*, 2004). Die in den folgenden Tabellen aufgeführten Substanzen befinden sich dabei bereits in der klinischen Erprobung (Comoglio *et al.*, 2008; Hofmeister *et al.*, 2008).

Substanz	Wirkstoffklasse	Stadium	Tumorentitäten
Å6	Allosterischer uPA-Antagonist am uPAR	II	Ovarialkarzinom
WX-671/ Mesupron®	Niedermolekularer Serinproteaseinhibitor	I	Kopf-Hals-, Mamma- und Pancreaskarzinom
WX-UK1	Niedermolekularer Serinproteaseinhibitor	I	Kopf-Hals- und Mammakarzinom

Tabelle 11: In der klinischen Testung befindliche Substanzen, die mit dem uPA-System interagieren.

Substanz	Wirkstoffklasse	Stadium	Tumorentitäten
AMG102	Anti-HGF-Antikörper	II	Glioblastom, Nierenzellkarzinom
ARQ197	Niedermolekularer c-Met-spezifischer Tyrosinkinaseinhibitor	II	Pankreaskarzinom
MK2461	Niedermolekularer c-Met-spezifischer Tyrosinkinaseinhibitor	II	Diverse solide Tumore
MP470	Niedermolekularer Breitspektrum-Tyrosinkinaseinhibitor (u. a. c-Met-inhibierend)	I	Diverse solide Tumore
PF2341066	Niedermolekularer ALK (<i>anaplastic lymphoma kinase</i>)- und c-Met-spezifischer Tyrosinkinaseinhibitor	II	Diverse solide Tumore
SGX523	Niedermolekularer c-Met-spezifischer Tyrosinkinaseinhibitor	I	Diverse solide Tumore
XL880	Niedermolekularer Breitspektrum-Tyrosinkinaseinhibitor (u. a. c-Met-inhibierend)	II	Kopf-Hals-, Magen- und Nierenzellkarzinom

Tabelle 12: In der klinischen Testung befindliche Substanzen, die mit dem HGF-System interagieren.

Während die klassische Auffassung der *targeted therapy* bisher von pharmazeutischen Eingriffen an einer *target*-Struktur ausgeht (Mocellin *et al.*, 2006), werfen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Frage auf, ob diese dogmatische Definition nicht etwas aufgeweicht werden sollte. Denn wenn etwa die TIMP-1-induzierte Metastasierung sowohl vom uPA- als auch von HGF-System getragen ist (Abb. 33), dann liegt doch die Vermutung nahe, dass Tumorpatienten mit hoher TIMP-1-Expression durchaus von einer Therapie profitieren dürften, die eine unkanonische Kombination von sowohl gegen uPA bzw. uPAR als auch gegen HGF oder c-Met gerichteter Substanzen darstellt.

5.6 Ausblick

Da in der vorliegenden Arbeit in Ergänzung früherer Ergebnisse (Kopitz *et al.*, 2007) dargelegt werden konnte, dass die Ausprägung des TIMP-1-induzierten Metastasierungsphänotyps auf einer gesteigerten uPA-Expression und einer verstärkten Aktivierung des HGF-Signalwegs beruhte, liegt es quasi auf der Hand, die antimetastatische Effektivität einer simultanen Blockade des uPA- und des HGF-Systems in Tieren mit erhöhter TIMP-1-Konzentration zu evaluieren. Sollte sich bei diesen Tierversuchen ein metastasierungshemmender Synergismus bei Verwendung zweier der *targeted therapy* zuzuordnender Substanzen ergeben, so würde dies im Prinzip nahe legen, dass durch Hinzufügung weiterer Substanzen (z. B. Anti-c-Met- und Anti-uPAR-Antikörper) etwaige definierbare Nebenwirkungen anderer Substanzen (z. B. uPA-abhängige Induktion des HGF-*signalling* durch MMP-Breitspektrum-Inhibition) ausbalanciert werden könnten.

Die in dieser Arbeit dargelegte TIMP-1-vermittelte Induktion des HGF-Signalwegs und der hepatischen Infiltration von myeloiden Immunzellen in die Leber stellt eine schlüssige Erklärung für die metastasierungsfördernde Wirkung des Proteaseinhibitors TIMP-1 dar. Hierbei stellt sich jedoch die Frage, ob die Hochregulation der Wirts-uPA-Expression durch TIMP-1 und die hierauf zurückzuführende Chemotaxis auf Immunzellen lediglich im Rahmen tumoröser Prozesse abläuft oder ob es sich dabei um einen Tumorzell-unabhängigen Effekt handelt. Diese Fragestellung könnte durch Reproduktion des in dieser Arbeit dargestellten Nachweises von Immunzellen und dem HGF-*signalling* in Mäusen mit variablem uPA-Status nach Injektion von AdTIMP-1 bzw. Add170-3, aber ohne nachfolgende Inokulation von Tumorzellen geklärt werden.

Schließlich gibt die vorliegende Arbeit noch Anlass zu einigen weiteren Fragestellungen der tumorbiologischen Grundlagenforschung. So zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass von den Tumorzellen synthetisierter uPA bedeutsam für deren metastatisches Potential ist, während Wirts-uPA maßgeblich an der Modulation des hepatischen *microenvironment* hin zu einer prometastatischen Nische beteiligt ist. Hieraus ergibt sich die Frage, inwieweit sich ein additiver antimetastatischer Effekt einstellt, wenn in uPA^{-/-}-Mäuse nach vorangegangener Injektion von AdTIMP-1 bzw. Add170-3 Tumorzellen inokuliert werden, die selbst ein deutlich reduziertes Ausmaß an uPA-Expression zeigen.

Ein weiterer Forschungsansatz ergibt sich im Zusammenschau mit früheren Versuchsergebnissen, die belegten, dass TIMP-1 zur Induktion einer distinkten prometastatischen Genexpressionssignatur führt, welche u. a. durch eine Erhöhung der Expression von uPA und c-Met gekennzeichnet ist (Kopitz et al., 2007). Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass die TIMP-1-induzierte Expression von c-Met in Abhängigkeit von der uPA-Expression erfolgt. Dieser Umstand wirft die Frage auf, ob nicht auch die Expression anderer durch hohe TIMP-1-Konzentrationen induzierter Gene einer durch TIMP-1 gesteigerten uPA-Expression unterliegen. Dieser Erwägung könnte zunächst einmal durch eine Expressionsanalyse der TIMP-1-induzierten Gene mit Hilfe eines *low density array* (LDA) auf den Grund gegangen werden, wobei cDNA der uPA-*knock-out*-Mäuse und ihrer Wildtyp-Kontrollen verwendet würde. Ein Vergleich dieser beiden Gruppen ließe Rückschlüsse auf etwaige uPA-abhängige Expressionen zu.

6 Zusammenfassung

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Transduktion muriner Lebern mit einem für TIMP-1 kodierenden Adenovirus eine signifikante Erhöhung der Gesamtmetastasierung nach sich zieht (Kopitz *et al.*, 2007). In der vorliegenden Abhandlung konnte diese Beobachtung unter Verwendung von Versuchstieren und Tumorzellen mit unterschiedlicher uPA-Expression im Rahmen eines auf funktioneller Genomik beruhenden *In-vivo*-Modells nicht nur bestätigt, sondern zudem nachgewiesen werden, dass Wirts-uPA den wesentlichen Mediator dieses prometastatischen Effekts darstellt. Dieses Erkenntnis ist v. a. deshalb von großer Bedeutung, als damit das erste Mal überhaupt ein funktionell relevantes Zusammenwirken von Aktivator und Inhibitor verschiedener Proteasefamilien dokumentiert werden konnte. Zudem konnte ein weiterer Beleg für die differentielle Bedeutung der uPA-Expression auf Wirts- und Tumorzellseite bei der Ausbildung einer Prometastatischen Nische erbracht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass in Mäusen mit physiologischer uPA-Expression die Transduktion mit AdTIMP-1 zu einer Steigerung des HGF-*signalling* und, damit verbunden, zu einer Erhöhung der Gesamttumorzelllast in den Mauslebern führt. Die uPA-Defizienz des Wirts führte dabei zu einer Abnahme des HGF-Proteingehalts, welche jedoch nicht auf einer verminderten Aktivierung von pro-HGF beruhte. Vielmehr korrelierte der HGF-Gehalt in den Mauslebern mit der Invasion Neutrophiler Granulozyten, welche wiederum eine deutliche Abhängigkeit von der uPA-Expression durch den Wirt zeigte. Somit waren diese Immunzellen als Einträger von HGF und damit als Mediatoren des vom HGF-*signalling* abhängigen *scattering* der Tumorzellen ins Leberparenchym anzusehen. Des Weiteren konnte belegt werden, dass der Stellenwert des von den Tumorzellen selbst synthetisierten uPA für die Vermittlung des TIMP-1-induzierten Metastasierungsphänotyps gering war, Tumorzell-uPA hingegen einen großen Einfluss auf die Effizienz der Tumorzellextravasation, gemessen an der Anzahl makrometastatischer Läsionen, hatte.

Zusammengefasst konnten in der vorliegenden Arbeit Aspekte dafür gefunden werden, dass in das uPA- und HGF-System eingreifende *targeted therapies* einen geeigneten Therapieansatz für Tumorpatienten mit hohen systemischen und/oder lokalen TIMP-1-Konzentrationen darstellen.

7 **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

7.1 **Abbildungen**

Abbildung 1: Metastatische Kaskade (S. 8)

Abbildung 2: X-Gal-Reaktion (S. 11)

Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der Kolonisation der Prometastatischen Nische im L-C1.5s-Modell (S. 12)

Abbildung 4: Proteolyse-unabhängige Wirkungen des uPA (S. 13)

Abbildung 5: Proteolyse-abhängige Wirkungen des uPA (S. 15)

Abbildung 6: TIMP-1-Paradoxon (S. 17)

Abbildung 7: HGF-*signalling* (S. 22)

Abbildung 8: Prinzip der RNA-Interferenz (S. 26)

Abbildung 9: Schematische Darstellung der murinen Leberlappen (S. 39)

Abbildung 10: Schematische Darstellung von AdTIMP-1 (S. 42)

Abbildung 11: Schematische Darstellung von pSirenRetroQshuPA1153 (S. 44)

Abbildung 12: β -D-Galaktosidase-Western-Blot von Leberprotein der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse (S. 64)

Abbildung 13: Makrometastasenzahl in den Lebern der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse (S. 65)

Abbildung 14: Mittlere Makrometastasengröße in den Lebern der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse (S. 66)

Abbildung 15: PCNA-Immunhistochemie auf Leberschnitten von META/Bom^{nu/nu}-Mäusen (S. 67)

Abbildung 16: Auflichtmikroskopie von X-Gal-gefärbten Lebern der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse (S. 68)

Abbildung 17: Phospho-c-Met-Western-Blot von Leberprotein der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse [I] (S. 69)

Abbildung 18: Phospho-c-Met-Immunfluoreszenz auf Leberschnitten von META/Bom^{nu/nu}-Mäuse (S. 69)

Abbildung 19: c-Met-Western-Blot von Leberprotein der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse (S. 70)

Abbildung 20: c-Met-Immunhistochemie auf Leberschnitten von META/Bom^{nu/nu}-Mäusen (S. 71)

Abbildung 21: Pro-HGF- und HGF α -Western-Blot von Leberprotein der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse (S. 72)

Abbildung 22: Ermittlung der relativen HGF-Aktivierung in Lebern der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse (S. 73)

Abbildung 23: FIRE-Immunhistochemie auf Leberschnitten von META/Bom^{nu/nu}-Mäusen (S. 74)

Abbildung 24: Ly-6G-Immunhistochemie auf Leberschnitten von META/Bom^{nu/nu}-Mäusen (S. 75)

- Abbildung 25: Verteilungsmuster der die Leber von META/Bom^{nu/nu}-Mäusen infiltrierenden Leukozyten (S. 76)
- Abbildung 26: Phospho-c-Met-Western-Blot von Leberprotein der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse [II] (S. 76)
- Abbildung 27: Auflichtmikroskopie von X-Gal-gefärbten Lebern der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse bei 56-facher Vergrößerung (S. 77)
- Abbildung 28: Verifizierung des *knock-down* von murinem uPA in L-CI.5s-Zellen über qRT-PCR (S. 78)
- Abbildung 29: β -D-Galaktosidase-Western-Blot von Leberprotein der CD1^{nu/nu}-Mäuse (S. 78)
- Abbildung 30: Makrometastasenzahl in den Lebern der CD1^{nu/nu}-Mäuse (S. 79)
- Abbildung 31: Auflichtmikroskopie von X-Gal-gefärbten Lebern der CD1^{nu/nu}-Mäuse bei 6,4-facher Vergrößerung (S. 80)
- Abbildung 32: Phospho-c-Met-Immunfluoreszenz auf Leberschnitten von CD1^{nu/nu}- Mäusen (S. 81)
- Abbildung 33: Interaktionsmodell zwischen TIMP-1, uPA und dem HGF-Signalweg bei der Lebermetastasierung (S. 91)

7.2 Tabellen

- Tabelle 1: Anzahl der CD1^{nu/nu}-Mäuse pro Gruppe (S. 38)
- Tabelle 2: Anzahl der META/Bom^{nu/nu}-Mäuse pro Gruppe (S. 39)
- Tabelle 3: Volumina für die Herstellung der Plasmidlösungen in μ l (S. 45)
- Tabelle 4: Volumina für die Herstellung der Verdünnungsreihe der *limiting dilution* in μ l (S. 46)
- Tabelle 5: Volumina für die Herstellung der qRT-PCR-Standards in ml (S. 50)
- Tabelle 6: Für die Western-Blot-Analyse verwendete Primärantikörper (S. 55)
- Tabelle 7: Für die Western-Blot-Analyse verwendeten Sekundärantikörper (S. 56)
- Tabelle 8: Für die Immunhistochemie auf Paraffinschnitten verwendete Primärantikörper (S. 60)
- Tabelle 9: Für die Immunhistochemie auf Gefrierschnitten verwendete Antikörper (S. 61)
- Tabelle 10: Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper (S. 63)
- Tabelle 11: In der klinischen Testung befindliche Substanzen, die mit dem uPA-System interagieren (S. 92)
- Tabelle 12: In der klinischen Testung befindliche Substanzen, die mit dem HGF-System interagieren (S. 93)

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin	E	<i>early gene</i> (frühes Gen)
Abb.	Abbildung	ECM	<i>extracellular matrix</i> (Extrazelluläre Matrix)
Ad	Adenovirus	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>	EPC	<i>epithelial progenitor cell</i> (Epitheliale Progenitorzelle)
APS	Ammoniumpersulfat	f.	folgende
ATP	Adenosintriphosphat	FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
BCA	Bicinchoninacetat	FIRE	<i>F4/80-like receptor</i>
BME	β -Mercaptoethanol	FPRL-1	<i>formyl peptide receptor-like 1</i>
BSA	Bovines Serumalbumin	G	Guanin
c	Konzentration	GAB-1	<i>endogenous growth factor receptor bound 2 protein-associated binder 1</i>
C	Cytosin	GF	<i>growth factor</i> (Wachstumsfaktor)
CBL	<i>Casitas B-lineage lymphoma protein</i>	GFD	<i>growth factor-like domain</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>	GFR	<i>growth factor receptor</i> (Wachstumsfaktor-Rezeptor)
CD1	<i>Caesarean Derived-1</i>	GTP	Guanintriphosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i> (Komplementär-DNA)	HEBS	<i>HEPES buffered saline</i>
CMV	Cytomegalie-Virus	HEK	<i>human embryonic kidney cell</i> (humane embryonale Nierenzelle)
CTP	Cytosintriphosphat	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonat
CXCL	Chemokin-Ligand	HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
CXCR	Chemokin-Rezeptor	HGF α	α -Kette des HGF
c-Met	<i>mesenchymal-epithelial transition receptor</i>	HPC	<i>hematopoetic progenitor cell</i> (Hämatopoetische Progenitorzelle)
d	Desoxy-	i	Interferenz
D	Durchmesser	K	<i>kringle</i>
DAB	3, 3'-Diaminobenzidin	LDLR	<i>low-density lipoprotein receptor</i>
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol	Ly-6G	<i>lymphocyte antigen-6 complex</i>
dd	doppelt-destilliert	mRNA	<i>messenger RNA</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>		
DMF	Dimethylformamid		
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)		
ds	doppelsträngig		

MMP	Matrixmetalloproteinase	si	<i>small inhibitory</i>
O	Oberfläche	SPH	<i>serine proteinase homology</i>
p	<i>possibility</i>	T	Thymin
P	Phosphorylierungsstelle	TAE	Tris-Acetat-EDTA
PAA	Polyacrylamid	TBS	<i>Tris buffered saline</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	TBS-T	TBS mit Tween-20
PAI	<i>plasminogen activator inhibitor</i>	TE	Tris-EDTA
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
PCR	Polymerasekettenreaktion	TGF	<i>tumour growth factor</i>
qRT	<i>quantitative real-time</i>	TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>	TTP	Thymintriphosphat
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonucleinsäure)	U	Uracil
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>	uPA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i>
rpm	<i>runs per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)	uPAR	<i>uPA-receptor</i>
rRNA	ribosomale RNA	UV	ultraviolett
S.	Seite	v	Volumen
scr	<i>scrambled</i>	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat	vgl.	vergleiche
SF	<i>scatter factor</i>	w	<i>weight</i> (Gewicht)
sh	<i>small hairpin</i>	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β -D-galaktopyranosid

9 Literaturverzeichnis

- Abraham E, Gyetko MR, Kuhn K, Arcaroli J, Strassheim S, Park JS, Shetty S, Idell S: Urokinase-Type Plasminogen Activator Potentiates Lipopolysaccharide-Induced Neutrophil Activation. *J Immunol* 2003, 170 (11): 5644-5651
- Adams GP, Weiner LM: Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 2005, 23 (9): 1147-1157
- Ala-aho R, Kähäri VM: Collagenases in cancer. *Biochimie* 2005, 87 (3-4): 273-286
- Alfano D, Franco P, Vocca I, Gambi N, Pisa V, Mancini A, Caputi M, Carriero MV, Iaccarino I, Stoppelli MP: The urokinase plasminogen activator and its receptor. Role in cell growth and apoptosis. *Thromb Haemost* 2005, 93 (2): 205-211
- Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ: Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med* 2000, 6 (1): 100ff.
- Amalfitano A: Utilization of adenovirus vectors for multiple gene transfer applications. *Methods* 2004, 33 (2): 173-178
- Amalfitano A, Hauser MA, Hu H, Serra D, Begy CR, Chamberlain JS: Production and Characterization of Improved Adenovirus Vectors with the E1, E2b, and E3 Genes Deleted. *J Virol* 1998, 72 (2): 926-933
- Arlt M, Kopitz C, Pennington C, Watson KLM, Krell HW, Bode W, Gänsbacher B, Khokha R, Edwards DR, Krüger A: Increase in Gelatinase-specificity of Matrix Metalloproteinase Inhibitors Correlates with Antimetastatic Efficacy in a T-Cell Lymphoma Model. *Cancer Res* 2002, 62 (19): 5543-5550
- Armbrust T, Batusic D, Xia L, Ramadori G: Early gene expression of hepatocyte growth factor in mononuclear phagocytes of rat liver after administration of carbon tetrachloride. *Liver* 2002, 22 (6): 486-494
- Athauda G, Giubellino A, Coleman JA, Horak C, Steeg PS, Lee MJ, Trepel J, Wimberly J, Sun J, Coxon A, Burgess TL, Bottaro DP: c-Met Ectodomain Shedding Rate Correlates with Malignant Potential. *Clin Cancer Res* 2006, 12 (14): 4154-4162
- Baker EA, Leaper DJ: The plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in colorectal cancer: relationship to tumour pathology. *Eur J Cancer* 2003; 39 (7): 981-988
- Banke IJ, Arlt MJE, Mueller MM, Sperl S, Stemberger A, Stürzebecher J, Amirkhosravi A, Moroder L, Krüger A: Effective inhibition of experimental metastasis and prolongation of survival in mice by a potent factor Xa-specific synthetic serine protease inhibitor with weak anticoagulant activity. *Thromb Haemost* 2005, 94 (5): 1084-1093
- Basire A, Sabatier F, Ravet S, Lamy E, Mialhe A, Zabouo G, Paul P, Gurewich V, Sampol J, Dignat-George F: High urokinase expression contributes to the angiogenic properties of endothelial cells derived from circulating progenitors. *Thromb Haemost* 2006, 95 (4): 678-688
- Bauer TW, Fan F, Liu W, Johnson M, Parikh NU, Parry GC, Callahan J, Mazar AP, Gallick GE, Ellis LM: Insulinlike Growth Factor-I-Mediated Migration and Invasion of Human Colon Carcinoma Cells Requires Activation of c-Met and Urokinase Plasminogen Activator Receptor. *Ann Surg* 2005, 241 (5): 748-758
- Bauer TW, Liu W, Fan F, Camp ER, Yang A, Somcio RJ, Bucana CD, Callahan J, Parry GC, Evans DB, Boyd DD, Mazar AP, Ellis LM: Targeting of Urokinase Plasminogen Activator Receptor in Human Pancreatic Carcinoma Cells Inhibits c-Met- and Insulin-

- like Growth Factor-I Receptor-Mediated Migration and Invasion and Orthotopic Tumor Growth in Mice. *Cancer Res* 2005, 65 (17): 7775-7781
- Behzadian MA, Windsor LJ, Ghaly N, Liou G, Tsai NT, Caldwell RB: VEGF-induced paracellular permeability in cultured endothelial cells involves urokinase and its receptor. *Fed Am Soc Exp Biol* 2003, 17 (6): 752-774
- Berger DH: Plasmin/Plasminogen System in Colorectal Cancer. *World J Surg* 2002, 26 (7): 767-771
- Bernards R, Weinberg RA: A progression puzzle. *Nature* 2002, 418 (6900): 823
- Bett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL: An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91 (19): 8802-8806
- Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF: Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, 4 (12): 915-925
- Blasi F, Carmeliet P: uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3 (12): 932-943
- Boccaccio C, Comoglio PM: Invasive growth: a *MET*-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer* 2006, 6 (8): 637-645
- Brand K: Cancer Gene Therapy with Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs). *Curr Gene Ther* 2002, 2 (2): 255-271
- Bryer SC, Fantuzzi G, Van Rooijen N, Koh TJ: Urokinase-Type Plasminogen Activator Plays Essential Role in Macrophage Chemotaxis and Skeletal Muscle Regeneration. *J Immunol* 2008, 180 (2): 1179-1188
- Bueno M, Salgado S, Beas-Zárate C, Armendariz-Borunda J: Urokinase-type plasminogen activator gene therapy in liver cirrhosis is mediated by collagens gene expression down-regulation and up-regulation of MMPs, HGF und VEGF. *J Gene Med* 2006, 8 (11): 1291-1299
- Caminschi I, Lucas KM, O'Keeffe MA, Hochrein H, Laâbi Y, Köntgen F, Lew AM, Shortman K, Wright MD: Molecular Cloning of F4/80-Like-Receptor, a Sevan-Span Membrane Protein Expressed Differentially by Dendritic Cell and Monocyte-Macrophage Subpopulations. *J Immunol* 2001, 167 (7): 3570-3576
- Carmeliet P, Moons L, Dewerchin M, Rosenberg S, Herbert JM, Lupu F, Collen D: Receptor-independent Role of Urokinase-Type Plasminogen Activator in Pericellular Plasmin and Matrix Metalloproteinase Proteolysis during Vascular Wound Healing in Mice. *J Cell Biol* 1998, 140 (1): 233-245
- 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): 419-468
- Castelló R, Estellés A, Vázquez C, Falcó C, España F, Almenar SM, Fuster C, Aznar J: Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Urokinase Plasminogen Activator, Plasminogen Activator Inhibitor Type I, and Tissue Metalloproteinase Inhibitor Type I Gene Expressions in Primary Breast Cancer. *Clin Chem* 2002, 48 (8): 1288-1295
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002, 2 (8): 563-572

- Chapman HA, Wei Y: Protease Crosstalk with Integrins: the Urokinase Receptor Paradigm. *Thromb Haemost* 2001, 86 (1): 124-129
- Chirco R, Liu XW, Jung KK, Choi Kim HR: Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Met Rev* 2006, 25 (1): 99-113
- Christensen JG, Burrows J, Salgia R: c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Lett* 2005, 225 (1): 1-26
- Christofori G: New signals from the invasion front. *Nature* 2006, 441 (7092): 444-450
- Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L: Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat Rev Drug Disc* 2008, 7 (6): 504-516
- Condeelis J, Pollard JW: Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *Cell* 2006, 124 (2): 263-266
- Condeelis J, Segall JE: Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* 2003, 3 (12): 921-930
- Conese M, Blasi F: Urokinase/Urokinase Receptor System: Internalization/Degradation of Urokinase-Serpin Complexes: Mechanism and Regulation. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1995, 376 (3): 143-155
- Crestani B, Dehoux M, Hayem G, Leçon V, Hochedez F, Marchal J, Jaffré S, Stern JB, Durand G, Valeyre D, Fournier M, Aubier M: Differential Role of Neutrophils and Alveolar Macrophages in Hepatocyte Growth Factor Production in Pulmonary Fibrosis. *Lab Invest* 2002, 82 (8): 1015-1022
- Crippa MP: Urokinase-type plasminogen activator. *Int J Biochem Cell Biol* 2007, 39 (4): 690-694
- Crocker SJ, Frausto RF, Whitmire JK, Benning N, Milner R, Whitton JL: Amelioration of Coxsackievirus B3-Mediated Myocarditis by Inhibition of Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1. *Am J Pathol* 2007, 171 (6): 1762-1773
- Czekay RP, Aertgeerts K, Curriden SA, Loskutoff DJ: Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol* 2003, 160 (5): 781-791
- D'Alessio S, Fibbi G, Cinelli M, Guiducci S, Del Rosso A, Margheri F, Serrati S, Pucci M, Kahaleh B, Fan P, Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Matucci-Cerinic M, Del Rosso M: Matrix Metalloproteinase 12-Dependent Cleavage of Urokinase Receptor in Systemic Sclerosis Microvascular Endothelial Cells Results in Impaired Angiogenesis. *Arthritis Rheumatol* 2004, 50 (10): 3275-3285
- Dass K, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Sarkar FH: Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treatm Rev* 2008, 34 (1): 122-136
- Decock J, Paridaens R, Čufer T: Proteases and metastasis: clinical relevance nowadays? *Curr Opin Oncol* 2005, 17 (6): 545-550
- Degryse B, Resnati M, Rabbani SA, Villa A, Fazioli F, Blasi F: Src-Dependence and Pertussis-Toxin Sensitivity of Urokinase Receptor-Dependent Chemotaxis and Cytoskeleton Reorganization in Rat Smooth Muscle Cells. *Blood* 1999, 94 (2): 649-662
- DeNardo DG, Johansson M, Coussens LM: Immune cells as mediators of solid tumor metastasis. *Cancer Met Rev* 2008, 27 (1): 11-18

- Deryugina EI, Quigley JP: Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Met Rev* 2006, 25 (1): 9-34
- DiPasquale DM, Cheng M, Billich W, Huang SA, Van Rooijen N, Hornberger TA, Koh TJ: Urokinase-type plasminogen activator and macrophages are required for skeletal muscle hypertrophy in mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007, 293 (4): 1278-1285
- Duffy MJ, Duggan C: The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clin Biochem* 2004, 37 (7): 541-548
- Duffy MJ, McGowan PM, Gallagher WM: Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol* 2008, 214 (3): 283-293
- Durand MKV, Bødker JS, Christensen A, Dupont DM, Hansen M, Jensen JK, Kjølgaard S, Mathiasen L, Pedersen KE, Skeldal S, Wind T, Andreasen PA: Plasminogen activator inhibitor-1 and tumour growth, invasion, and metastasis. *Thromb Haemost* 2004, 91 (3): 438-449
- Elezkurtaj S, Kopitz C, Baker AH, Perez-Cantó A, Arlt MJE, Khokha R, Gänsbacher B, Anton M, Brand K, Krüger A: Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the liver: efficient protection against T-cell lymphoma and colon carcinoma metastasis. *J Gene Med* 2004, 6 (11): 1228-1237
- Ertongur S, Lang S, Mack B, Wosikowski K, Muehlenweg B, Gires O: Inhibition of the invasion capacity of carcinoma cells by WX-UK1, a novel synthetic inhibitor of the urokinase-type plasminogen activator system. *Int J Cancer* 2004, 110 (6): 815-824
- Fearon ER, Vogelstein B: A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 1990, 61 (5): 759-767
- Fleming TJ, Fleming ml, Malek TR: Selective Expression of Ly-6G on Myeloid Lineage Cells in Mouse Bone Marrow. RB6-8C5 mAb to Granulocyte-Differentiation Antigen (Gr-1) Detects Members of the Ly-6 Family. *J Immunol* 1993, 151 (5): 2399-2408
- Frandsen TL, Holst-Hansen C, Nielsen BS, Christensen IJ, Nyengaard JR, Carmeliet P, Brünner N: Direct Evidence of the Importance of Stromal Urokinase Plasminogen Activator (uPA) in the Growth of an Experimental Human Breast Cancer Using a Combined uPA Gene-Disrupted and Immunodeficient Xenograft Model. *Cancer Res* 2001, 61 (2): 532-537
- Gao X, Zhang P: Transgenic RNA Interference in Mice. *Physiology* 2007, 22 (3): 161-166
- Gerg M, Kopitz C, Schaten S, Tschukes A, Kahlert C, Stangl M, von Weyhern CW, Brücher BL, Edwards DR, Brand K, Krüger A: Distinct functionality of tumor cell-derived gelatinases during formation of liver metastases. *Mol Cancer Res* 2008, 6 (3): 341-351
- Gondi CS, Kandhukuri N, Kondraganti S, Gujrati M, Olivero WC, Dinh DH, Rao JS: RNA interference-mediated simultaneous down-regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor and cathepsin B induces caspase-8-mediated apoptosis in SNB19 human glioma cells. *Mol Cancer Ther* 2006, 5 (12): 3197-3208
- Gondi CS, Lakka SS, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS: Intraperitoneal Injection of a Hairpin RNA – Expressing Plasmid Targeting Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) Receptor and uPA Retards Angiogenesis and Inhibits Intracranial Tumor Growth in Nude Mice. *Clin Cancer Res* 2007, 13 (14): 4051-4060
- González-Cuevas J, Bueno-Topete M, Armendariz-Borunda J: Urokinase plasminogen activator stimulates function of active forms of stromelysin and gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in cirrhotic tissue. *J Gastroenterol Hepatol* 2006, 21 (10): 1544-1554

- Gray JW: Evidence emerges for early metastasis and parallel evolution of primary and metastatic tumors. *Cancer Cell* 2003, 4 (1): 4ff.
- Grenier A, Chollet-Martin S, Crestani B, Delarche C, El Benna J, Boutten A, Andrieu V, Durand G, Gougerot-Pocidallo MA, Aubier M, Dehoux M: Presence of a mobilizable intracellular pool of hepatocyte growth factor in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* 2002, 99 (8): 2997-3003
- Gupta GP, Massagué J: Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* 2006, 127 (4): 679-695
- Gutierrez LS, Schulman A, Brito-Robinson T, Noria F, Ploplis VA, Castellino FJ: Tumor Development Is Retarded in Mice Lacking the Gene for Urokinase-Type Plasminogen Activator or Its Inhibitor, Plasminogen Activator Inhibitor-1. *Cancer Res* 2000, 60 (20): 5839-5847
- Gutova M, Najbauer J, Frank RT, Kendall SE, Gevorgyan A, Metz MZ, Guevorkian M, Edmiston M, Zhao D, Glackin CA, Kim SU, Aboody KS: Urokinase Plasminogen Activator and Urokinase Plasminogen Activator Receptor Mediate Human Stem Cell Tropism to Malignant Solid Tumors. *Stem Cells* 2008, 26 (6): 1406-1413
- Gyetko MR, Aizenberg D, Mayo-Bond L: Urokinase-deficient and urokinase receptor-deficient mice have impaired neutrophil antimicrobial activation in vitro. *J Leuc Biol* 2004, 76 (3): 648-656
- Hahn-Dantona E, Ruiz JF, Bornstein P, Strickland DK: The Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Modulates Levels of Metalloproteinase 9 (MMP-9) by Mediating Its Cellular Catabolism. *J Biol Chem* 2001, 276 (18): 15498-15503
- Hanahan D, Weinberg RA: The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000, 100 (1): 57-70
- Harbeck N, Kates RE, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JGM, Krüger A, Kiechle M, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA: Enhanced Benefit from Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients Classified High-Risk according to Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 ($n = 3424$). *Cancer Res* 2002, 62 (16): 4617-4622
- Hearing VJ, Law LW, Corti A, Appella E, Blasi F: Modulation of Metastatic Potential by Cell Surface Urokinase of Murine Melanoma Cells. *Cancer Res* 1994, 48 (1): 1270-1278
- Herynk MH, Stoeltzing O, Reinmuth N, Parikh NU, Abounader R, Latterra J, Radinsky R, Ellis LM, Gallick GE: Down-Regulation of c-Met Inhibits Growth in the Liver of Human Colorectal Carcinoma Cells. *Cancer Res* 2003, 63 (11): 2990-2996
- Higazi AA, Upson RH, Cohen RL, Manuppello J, Bognacki J, Henkin J, McCrae KR, Kounnas MZ, Strickland DK, Preissner KT, Lawler J, Cines DB: Interaction of Single-Chain Urokinase With Its Receptor Induces the Appearance and Disappearance of Binding Epitopes Within the Resultant Complex for Other Cell Surface Proteins. *Blood* 1996, 88 (2): 542-551
- Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M: MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2002, 2 (4): 289-300
- Hofmeister V, Schrama D, Becker JC: Anti-cancer therapies targeting the tumor stroma. *Cancer Immunol Immunother* 2008, 57 (1): 1-17
- Holst-Hansen C, Low JA, Stephens RW, Johnson MD, Carmeliet P, Frandsen TL, Brünner N, Dickson RB: Increased stromal expression of murine urokinase plasminogen activator in a human breast cancer xenograft model following treatment with the matrix

- metalloprotease inhibitor, batimastat. *Breast Cancer Res Treatment* 2001, 68 (3): 225-237
- Hornebeck W, Lambert E, Petitfrère E, Bernard P: Beneficial and detrimental influences of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in tumor progression. *Biochimie* 2005, 87 (3-4): 377-383
- Imai Y, Kubota Y, Yamamoto S, Tsuji K, Shimatani M, Shibatani N, Takamido S, Matsushita M, Okazaki K: Neutrophils enhance invasion activity of human cholangiocellular carcinoma and hepatocellular carcinoma cells: An *in vitro* study. *J Gastroenterol Hepatol* 2005, 20 (2): 287-293
- Jensen MK, Holten-Andersen MN, Riisbro R, Brown PDN, Larsen MB, Kjeldsen L, Heickendorff L, Brünner N, Hasselbalch HC: Elevated plasma levels of TIMP-1 correlate with plasma suPAR/uPA in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Eur J Haematol* 2003, 71 (5): 377-384
- Jiang WG, Martin TA, Parr C, Davies G, Matsumoto K, Nakamura T: Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005, 53 (1): 35-69
- Jones N, Shenk T: Isolation of Deletion and Substitution Mutants of Adenovirus Type 5. *Cell* 1978, 13 (1): 181-188
- Juliano RL: Signal Transduction by Cell Adhesion Receptors and the Cytoskeleton: Functions of Integrins, Cadherins, Selectins, and Immunoglobulin Superfamily Members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002, 42: 283-323
- Jung KK, Liu XW, Chirco R, Fridman R, Choi Kim HR: Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *Eur Mol Biol Org J* 2006, 25 (17): 3934-3942
- Jurasz P, Alonso-Escolano D, Radomski MW: Platelet-cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 2004, 143 (7): 819-826
- Kahlert C, Bandapalli OR, Schirmacher P, Weitz J, Brand K: Invasion Front-specific Overexpression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in Liver Metastases from Colorectal Cancer. *Anticancer Res* 2008, 28 (3A): 1459-1466
- Kaplan RN, Rafii S, Lyden D: Preparing the "soil": The Premetastatic Niche. *Cancer Res* 2006, 66 (23): 11089-11093
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D: VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005, 438 (7069): 820-827
- Kermorgant S, Aparicio T, Dessirier V, Lewin MJ, Lehy T: Hepatocyte growth factor induces colonic cancer cell invasiveness via enhanced motility and protease overproduction. Evidence for PI3 kinase and PKC involvement. *Carcinogenesis* 2001, 22 (7): 1035-1042
- Khanna C, Hunter K: Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* 2005, 26 (3): 513-523
- Kindzelskii AL, Amhad I, Keller D, Zhou MJ, Haugland RP, Garni-Wagner BA, Gyetko MR, Todd RF, Petty HR: Pericellular proteolysis by leukocytes and tumor cells on substrates: focal activation and the role of urokinase-type plasminogen activator. *Histochem Cell Biol* 2004, 121 (4): 299-310

- Kjøller L: The Urokinase Plasminogen Activator Receptor in the Regulation of the Actin Cytoskeleton and Cell Motility. *Biol Chem* 2002, 383 (1): 5-19
- Koop S, Khokha R, Schmidt EE, MacDonald IC, Morris VL, Chambers AF, Groom AC: Overexpression of Metalloproteinase Inhibitor in B16F10 Cells Does Not Affect Extravasation but Reduces Tumor Growth. *Cancer Res* 1994, 54 (17): 4791-4797
- Koopman JL, Slomp J, de Bart ACW, Quax PHA, Verheijen JH: Mitogenic Effects of Urokinase on Melanoma Cells Are Independent of High Affinity Binding to the Urokinase Receptor. *J Biol Chem* 1998, 273 (50): 33267-33272
- Kopitz C, Anton M, Gänsbacher B, Krüger A: Reduction of experimental human fibrosarcoma lung metastasis in mice by adenovirus-mediated cystatin C overexpression in the host. *Cancer Res* 2005, 65 (19): 8608-8612
- Kopitz C, Gerg M, Bandapalli OR, Ister D, Pennington CJ, Hauser S, Flechsig C, Krell HW, Antolovic D, Brew K, Nagase H, Stangl M, Hann von Weyhern CW, Brücher BLDM, Brand K, Coussens LM, Edwards DR, Krüger A: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Promotes Liver Metastasis by Induction of Hepatocyte Growth Factor Signaling. *Cancer Res* 2007, 67 (18): 8615-8623
- Krüger A: Functional genetic mouse models: promising tools for investigation of the proteolytic internet. *Biol Chem* 2009, 390 (2): 91-97
- Krüger A, Fata JE, Khokha R: Altered Tumor Growth and Metastasis of a T-Cell Lymphoma in *TIMP-1* Transgenic Mice. *Blood* 1997, 90 (5): 1993-2000
- Krüger A, Sanchez-Sweatman OH, Martin DC, Fata JE, Ho AT, Orr FW, Rütther U, Khokha R: Host TIMP-1 overexpression confers resistance to experimental brain metastasis of a fibrosarcoma cell line. *Oncogene* 1998, 16 (18): 2419-2423
- Krüger A, Schirmacher V, von Hoegen P: Scattered micrometastases visualized at the single-cell level: detection and re-isolation of *lacZ*-labeled metastasized lymphoma cells. *Int J Cancer* 1994, 58 (2): 275-284
- Krüger A, Soeltl R, Lutz V, Wilhelm OG, Magdolen V, Rojo EE, Hantzopoulos PA, Graeff H, Gänsbacher B, Schmitt M: Reduction of breast carcinoma tumor growth and lung colonization by overexpression of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87). *Cancer Gene Ther* 2000, 7 (2): 292-299
- Krüger A, Soeltl R, Sopov I, Kopitz C, Arlt M, Magdolen V, Harbeck N, Gänsbacher B, Schmitt M: Hydroxamate-Type Matrix Metalloproteinase Inhibitor Batimastat Promotes Liver Metastasis. *Cancer Res* 2001, 61 (4): 1272-1275
- Kugler MC, Wei Y, Chapman HA: Urokinase Receptor and Integrin Interactions. *Curr Pharm Des* 2003, 9 (19): 1565-1574
- Lambert E, Boudot C, Kadri Z, Soula-Rothhut M, Sowa ml, Mayeux P, Hornebeck W, Haye B, Petitfrère E: Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signalling pathway leading to erythroid cell survival. *Biochem J* 2003, 372 (3): 767-774
- Lawson CA, Yan SD, Yan SF, Liao H, Zhou YS, Sobel J, Kisiel W, Stern DM: Monocytes and Tissue Factor Promote Thrombosis in a Murine Model of Oxygen Deprivation. *J Clin Invest* 1997, 99 (7): 1729-1738.
- Lee KH, Choi EY, Hyun MS, Jang BI, Kim TN, Lee HJ, Eun JY, Kim HG, Yoon SS, Lee DS, Kim JH, Kim JR: Role of hepatocyte growth factor/c-Met signaling in regulating urokinase plasminogen activator on invasiveness in human hepatocellular carcinoma: a potential therapeutic target. *Clin Exp Metastasis* 2008, 25 (1): 89-96

- Lee SJ, Jung Yoo H, Soo Bae Y, Kim HJ, Lee ST: TIMP-1 inhibits apoptosis in breast carcinoma cells via a pathway involving pertussis toxin-sensitive G protein and c-Src. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 312 (4): 1196-1201
- Lijnen HR: Plasmin and Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling. *Thromb Haemost* 2001, 86 (1): 324-333
- Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM: The Significance of Hematogenous Tumor Cell Clumps in the Metastatic Process. *Cancer Res* 1976, 36 (3): 889-894
- Lipton A, Ali SH, Leitzel K, Demers L, Evans DB, Hamer P, Brown-Shimer S, Pierce K, Carney W: Elevated Plasma Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Level Predicts Decreased Response and Survival in Metastatic Breast Cancer. *Cancer* 2007, 109 (10): 1933-1939
- Littlepage LE, Egeblad M, Werb Z: Coevolution of cancer and stromal cellular responses. *Cancer Cell* 2005, 7 (6): 499f.
- Liu D, Aguirre Ghiso JA, Estrada Y, Ossowski L: EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. *Cell* 2002, 1 (5): 445-457
- Liu XW, Bernardo MM, Fridman R, Choi Kim HR: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Protects Human Breast Epithelial Cells Against Intrinsic Apoptotic Cell Death via the Focal Adhesion Kinase/Phosphatidylinositol 3-Kinase and MAPK Signaling Pathway. *J Biol Chem* 2003, 278 (41): 40364-40372
- Longstaff C, Merton RE, Fabregas P, Felez J: Characterization of Cell-Associated Plasminogen Activation Catalyzed by Urokinase-Type Plasminogen Activator, but Independent of Urokinase Receptor (uPAR, CD87). *Blood* 1999, 93 (11): 3839-3846
- Lund LR, Rømer J, Bugge TH, Nielsen BS, Frandsen TL, Degen JL, Stephens RW, Danø K: Functional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing. *Eur Mol Biol Org J* 1999, 18 (17): 4645-4656
- Lutz V, Reuning U, Krüger A, Luther T, Pildner von Steinburg S, 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): 789-798
- Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC: Multistep Nature of Metastatic Inefficiency. Dormancy of Solitary Cells after Successful Extravasation and Limited Survival of Early Micrometastases. *Am J Pathol* 1998, 153 (3): 865-873
- Magdolen U, Krol J, Sato S, Mueller MM, Sperl S, Krüger A, Schmitt M, Magdolen V: Natural inhibitors of tumor-associated proteases. *Radiol Oncol* 2002, 36 (2): 131-143
- Mahanivong C, Yu J, Huang S: Elevated Urokinase-Specific Surface Receptor Expression is Maintained Through its Interaction With Urokinase Plasminogen Activator. *Mol Carcinogenesis* 2007, 46 (3): 165-175
- Maroni P, Bendinelli P, Matteucci E, Desiderio MA: HGF induces CXCR4 and CXCL12-mediated tumor invasion through Ets1 and NF- κ B. *Carcinogenesis* 2007, 28 (2): 267-279
- Matsuoka H, Sisson TH, Nishiura T, Simon RH: Plasminogen-Mediated Activation and Release of Hepatocyte Growth Factor from Extracellular Matrix. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006, 35 (6): 705-713

- Mazzei R, Blasi F: The urokinase receptor and the regulation of cell proliferation. *Thromb Haemost* 2005, 93 (4): 641-646
- Mazzei R, Masiero L, Zanetta L, Monea S, Onisto M, Garbisa S, Mignatti P: Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *Eur Mol Biol Org J* 1997, 16 (9): 2319-2332
- Mehlen P, Puisieux A: Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 2006, 6 (6): 449-458
- Merchan JR, Tang J, Hu G, Lin Y, Mutter W, Tong C, Karumanchi SA, Russell SJ, Sukhatme VP: Protease Activity of Urokinase and Tumor Progression in a Syngeneic Mammary Cancer Model. *J Natl Cancer Inst* 2006, 98 (11): 756-764
- Minn AJ, Kang Y, Serganova I, Gupta GP, Giri DD, Doubrovin M, Ponomarev V, Gerald WL, Blasberg R, Massagué J: Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest* 2005, 115 (1): 44-55
- Miyagi M, Aoyagi K, Kato S, Shirouzu K: The *TIMP-1* gene transferred through adenovirus mediation shows a suppressive effect on peritoneal metastases from gastric cancer. *Int J Clin Oncol* 2007, 12 (1): 17-24
- Mocellin S, Lise M, Nitti D: Targeted therapy for colorectal cancer: mapping the way. *Trends Mol Med* 2005; 11 (7): 327-335
- Mohamed MM, Sloane BF: Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006, 6 (3): 764-774
- Mohammed FF, Pennington CJ, Kassiri Z, Rubin JS, Soloway PD, Ruther U, Edwards DR, Khokha R: Metalloproteinase Inhibitor TIMP-1 Affects Hepatocyte Cell Cycle via HGF Activation in Murine Liver Regeneration. *Hepatology* 2005, 41 (4): 857-867
- Morimoto K, Amano H, Sonoda F, Baba M, Senba M, Yoshimine H, Yamamoto H, Ii T, Oishi K, Nagatake T: Alveolar Macrophages that Phagocytose Apoptotic Neutrophils Produce Hepatocyte Growth Factor during Bacterial Pneumonia in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001, 24 (5): 608-615
- Myöhänen HAT, Stephens RW, Hedman K, Tapiovaara H, Rønne E, Høyer-Hansen G, Danø K, Vaheri A: Distribution and Lateral Mobility of the Urokinase-Receptor Complex at the Cell Surface. *J Histochem Cytochem* 1993, 41 (9): 1291-1301
- Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, Daikuhara Y, Tsubouchi H, Blasi F, Comoglio PM: Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *Eur Mol Biol Org J* 1992, 11 (13): 4825-4833
- Nath D, Williamson NJ, Jarvis R, Murphy G: Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase. *J Cell Sci* 2001, 114 (6): 1213-1220
- Nguyen TH: Mechanisms of Metastasis. *Clin Dermatol* 2004, 22 (3): 209-216
- Nielsen BS, Rank F, Illemann M, Lund LR, Danø K: Stromal cells associated with early invasive foci in human mammary ductal carcinoma *in situ* coexpress urokinase and urokinase receptor. *Int J Cancer* 2007, 120 (10): 2086-2095
- Okusa Y, Ichikura T, Mochizuki H: Prognostic Impact of Stromal Cell-Derived Urokinase-Type Plasminogen Activator in Gastric Carcinoma. *Cancer* 1999, 85 (5): 1033-1038
- Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman JP, Herrlich P, Ponta H: CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev* 2002, 16 (23): 3074-3086

- Pakneshan P, Szyf M, Farias-Eisner R, Rabbani SA: Reversal of the Hypomethylation Status of Urokinase (uPA) Promoter Blocks Breast Cancer Growth and Metastasis. *J Biol Chem* 2004, 279 (30): 31735-31744
- Pantel K, Brakenhoff RH: Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004, 4 (6): 448-456
- Papadopoulou S, Scorilas A, Yotis J, Arnogianaki N, Plataniotis G, Agnanti N, Talieri M: Significance of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Expression in Human Colorectal Carcinomas. *Tumor Biol* 2002, 23 (3): 170-178
- Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ: Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003, 3 (12): 895-902
- Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM: Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the *met* protooncogene. *Cancer Cell* 2003, 3 (4): 347-361
- Pillay V, Dass CR, Choong PFM: The urokinase plasminogen activator receptor as a gene therapy target for cancer. *Trends Biotechnol* 2006, 25 (1): 33-39
- Plouët J, Moro F, Bartagnolli S, Coldebœuf N, Mazarguil H, Clamens S, Bayard F: Extracellular Cleavage of the Vascular Endothelial Growth Factor 189-Amino Acid Form by Urokinase Is Required for Its Mitogenic Effect. *J Biol Chem* 1997, 272 (20): 13390-13396
- Pluskota E, Soloviev DA, Plow EF: Convergence of the adhesive and fibrinolytic systems: recognition of urokinase by integrin $\alpha_M\beta_2$ as well as by the urokinase receptor regulates cell adhesion and migration. *Blood* 2003, 101 (4): 1582-1590
- Porter JF, Sharma S, Wilson DL, Kappil MA, Hart RP, Denhardt DT: Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 stimulates gene expression in MDA-MB-435 human breast cancer cells by means of its ability to inhibit metalloproteinases. *Breast Cancer Res Treat* 2005, 94 (2): 185-193
- Porter JF, Shen S, Denhardt DT: Tissue inhibitor of metalloproteinase-I stimulates proliferation of human cancer cells by inhibiting a metalloproteinase. *Br J Cancer* 2004, 90 (2): 463-470
- Pulukuri SMK, Gondi CS, Lakka SS, Jutla A, Estes N, Gujrati M, Rao JS: RNA Interference-directed Knockdown of Urokinase Plasminogen Activator and Urokinase Plasminogen Activator Receptor Inhibits Prostate Cancer Cell Invasion, Survival, and Tumorigenicity *in Vivo*. *J Biol Chem* 2005, 280 (43): 36529-36540
- Pyke C, Kristensen P, Ralfkiær E, Grøndahl-Hansen J, Eriksen J, Blasi F, Danø 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): 1059-1067
- Pyke C, Salo S, Ralfkiær E, Rømer J, Danø K, Tryggvason K: Laminin-5 Is a Marker of Invading Cancer Cells in Some Human Carcinomas and Is Coexpressed with the Receptor for Urokinase Plasminogen Activator in Budding Cancer Cells in Colon Adenocarcinoma. *Cancer Res* 1995, 55 (18): 4132-4139
- Quemener C, Gabison EE, Naimi B, Lescaille G, Bougatef F, Podgorniak MP, Labarchède G, Lebbé C, Calvo F, Menashi S, Mourah S: Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer Up-regulates the Urokinase-Type Plasminogen Activator System Promoting Tumor Cell Invasion. *Cancer Res* 2007, 67 (1): 9-15

- Rahimi N, Tremblay E, McAdam L, Park M, Schwall R, Elliott B: Identification of a Hepatocyte Growth Factor Autocrine Loop in a Murine Mammary Carcinoma. *Cell Growth Differ* 1996, 7 (2): 263-270
- Resnati M, Pallavicini I, Wang JM, Oppenheim J, Serhan CN, Romano M, Blasi F: The fibrinolytic receptor for urokinase activates the g protein-coupled chemotactic receptor FPRL1/LXA4R. *Proc Natl Acad Sci* 2002, 99 (3): 1359-1364
- 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 (19): 1529-1543
- Rhee JS, Diaz R, Korets L, Hodgson JG, Coussens LM: TIMP-1 Alters Susceptibility to Carcinogenesis. *Cancer Res* 2004, 64 (3): 952-961
- Rho BS, Chung BM, Lee JH: TIMP-1 Regulates Cell Proliferation by Interacting With the Ninth Zinc Finger Domain of PLZF. *J Cell Biochem* 2007, 101 (1): 57-67
- Riddick AC, Shukla CJ, Pennington CJ, Bass R, Nuttall RK, Hogan A, Sethia KK, Ellis V, Collins AT, Maitland NJ, Bell RY, Edwards DR: Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues. *Br J Cancer* 2005, 92 (12): 2171-2180
- Rifkin DB, Mazziari R, Munger JS, Noguera I, Sung J: Proteolytic control of growth factor availability. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1999, 107 (1): 80-85
- Roeb E, Winograd R, Breuer B, Nguyen H, Matern S: Increased TIMP-1 Activity Results in Increased Expression of Gelatinases and Altered Cell Motility. *J Cell Biochem* 1999, 75 (2): 346-355
- Rømer J, Nielsen BS, Ploug M: The Urokinase Receptor as a Potential Target in Cancer Therapy. *Curr Pharm Des* 2004, 10 (19): 2359-2376
- Rømer J, Pyke C, Lund LR, Eriksen J, Kristensen P, Rønne E, Høyer-Hansen G, Danø K, Brünner N: Expression of uPA and its receptor by both neoplastic and stromal cells during xenograft invasion. *Int J Cancer* 1994, 57 (4): 553-560
- Roselli HT, Su M, Washington K, Kerins DM, Vaughan DE, Russell WE: Liver regeneration is transiently impaired in urokinase-deficient mice. *Am J Physiol* 1998, 275 (6): G1472-G1479
- Rosen EM, Nigam SK, Goldberg ID: Scatter Factor and the *c-Met* Receptor: A Paradigm for Mesenchymal/Epithelial Interaction. *J Cell Biol* 1994, 127 (6): 1783-1787
- Royal I, Lamarche-Vane N, Lamorte L, Kaibuchi K, Park M: Activation of Cdc42, Rac, PAK, and Rho-Kinase in Response to Hepatocyte Growth Factor Differentially Regulates Epithelial Cell Colony Spreading and Dissociation. *Mol Biol Cell* 2000, 11 (5): 1709-1725
- Sato S, Kopitz C, Schmalix WA, Muehlenweg B, Kessler H, Schmitt M, Krüger A, Magdolen V: High-affinity urokinase-derived cyclic peptides inhibiting urokinase/urokinase receptor-interaction: effects on tumor growth and spread. *Fed Eur Biochem Soc Lett* 2002, 528 (1-3): 212-216
- Schrohl AS, Holten-Andersen MN, Peters HA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JGM, Brünner N, Foekens JA: Tumor Tissue Levels of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 as a Prognostic Marker in Primary Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10 (7): 2289-2298

- Schuppan D, Schmid M, Somasundaram R, Ackermann R, Ruehl M, Nakamura T, Riecken EO: Collagens in the Liver Extracellular Matrix Bind Hepatocyte Growth Factor. *Gastroenterology* 1998, 114 (1): 139-152
- Schweinitz A, Steinmetzer T, Banke IJ, Arlt MJE, Stürzebecher A, Schuster O, Geissler A, Giersiefen H, Zeslawska E, Jacob U, Krüger A, Stürzebecher J: Design of Novel and Selective Inhibitors of Urokinase-type Plasminogen Activator with Improved Pharmacokinetic Properties for Use as Antimetastatic Agents. *J Biol Chem* 2004, 279 (32): 33613-33622
- Shimizu M, Hara A, Okuno M, Matsuno H, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Niwa M, Akita K, Yamada Y, Yoshimi N, Uematsu T, Kojima S, Friedman SL, Moriwaki H, Mori H: Mechanism of Retarded Liver Regeneration in Plasminogen Activator-Deficient Mice: Impaired Activation of Hepatocyte Growth Factor After Fas-Mediated Massive Hepatic Apoptosis. *Hepatology* 2001, 33 (3): 569-576
- Sidenius N, Andolfo A, Fesce R, Blasi F: Urokinase Regulates Vitronectin Binding by Controlling Urokinase Receptor Oligomerization. *J Biol Chem* 2002, 277 (31): 27982-27990
- Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, Griffiths JC, Romano G, Kingsman SM, Kingsman AJ: A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucl Acids Res* 1995, 23 (4): 628-633
- Sugino T, Yamaguchi T, Ogura H, Saito A, Hashimoto T, Hoshi N, Yoshida S, Goodison S, Suzuki T: Morphological evidence for an invasion-independent metastasis pathway exists in multiple human cancers. *BioMed Central Med* 2004, 5 (9): 1-8
- Tacchini L, Matteucci E, De Ponti C, Desiderio MA: Hepatocyte growth factor signaling regulates transactivation of genes belonging to the plasminogen activation system via hypoxia inducible factor-1. *Exp Cell Res* 2003, 290 (2): 391-401
- Taher TEI, Tjin EPM, Beuling EA, Borst J, Spaargaren M, Pals ST: c-Cbl Is Involved in Met Signaling in B Cells and Mediates Hepatocyte Growth Factor-Induced Receptor Ubiquitination. *J Immunol* 2002, 169 (7): 3793-3800
- Takeshita F, Ochiya T: Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci* 2006, 97 (8): 689-696
- Tarui T, Mazar AP, Cines DB, Takada Y: Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor (CD87) Is a Ligand for Integrins and Mediates Cell-Cell Interaction. *J Biol Chem* 2001, 276 (6): 3983-3990
- Turpeenniemi-Hujanen T: Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie* 2005, 87 (3-4): 287-297
- Ugwu F, Van Hoef B, Bini A, Collen D, Lijnen HR: Proteolytic Cleavage of Urokinase-Type Plasminogen Activator by Stromelysin-1 (MMP-3). *Biochem* 1998, 37 (20): 7231-7236
- van Hinsbergh VWM, Engelse MA, Quax PHA: Pericellular Proteases in Angiogenesis and Vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, 26 (4): 716-728
- Visse R, Nagase H: Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res* 2003, 92 (8): 827-839
- 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): 32380-32388

- Weis SM, Cheresh DA: Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 2005, 437 (7058): 497-504
- White JM: ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol* 2003, 15 (5): 598-606
- Wislez M, Rabbe N, Marchal J, Milleron B, Crestani B, Mayaud C, Antoine M, Soler P, Cadranet J: Hepatocyte Growth Factor Production by Neutrophils Infiltrating Bronchioloalveolar Subtype Pulmonary Adenocarcinoma: Role in Tumor Progression and Death. *Cancer Res* 2003, 63 (6): 1405-1412
- Wolf K, Friedl P: Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity. *Br J Dermatol* 2006, 154 (Suppl. 1): 11-15
- Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Bröcker EB, Friedl P: Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 2003, 160 (2): 267-277
- Würtz SØ, Christensen IJ, Schrohl AS, Mouridsen H, Lademann U, Jensen V, Brünner N: Measurement of the Uncomplexed Fraction of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 in the Prognostic Evaluation of Primary Breast Cancer Patients. *Mol Cell Proteomics* 2005, 4 (4): 483-491
- Yamauchi K, Ogata Y, Nagase H, Shirouzu K: Inhibition of Liver Metastasis from Orthotopically Implanted Colon Cancer in Nude Mice by Transfection of the TIMP-1 Gene into KM12SM Cells. *Surg Today* 2001, 31 (9): 791-798
- Yee JK, Miyanojara A, La Porte P, Bouic K, Burns JC, Friedmann T: A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: Highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91 (20): 9564-9568
- Yoshiji H, Harris SR, Raso E, Gomez DE, Lindsay CK, Shibuya M, Sinha CC, Thorgeirsson UP: Mammary carcinoma cells over-expressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1 show enhanced vascular endothelial growth factor expression. *Int J Cancer* 1998, 75 (1): 81-87
- Yoshikawa T, Tsuburaya A, Kobayashi O, Sairenji M, Miyagi Y: Protein levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in tumor extracts as a marker for prognosis and recurrence in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 2006, 9 (2): 109-113
- Zhao WQ, Li H, Yamashita K, Guo XK, Hoshino T, Yoshida S, Shinya T, Hayakawa T: Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. *J Cell Sci* 1998, 111 (9): 1147-1153
- Zhao Y, Lyons CE, Xiao A, Templeton DJ, Sang QA, Brew K, Hussaini IM: Urokinase directly activates matrix metalloproteinases-9: A potential role in glioblastoma invasion. *Biochem Biophys Res Comm* 2008, 369 (4): 1215-1220
- Zigrino P, Löffek S, Mauch C: Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. *Biochimie* 2005, 87 (3-4): 321-328
- Zou W: Immunosuppressive networks in the tumor environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005, 5 (4): 263-274
- Zucker S, Cao J, Chen WT: Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* 2000, 19 (56): 6642-6650

10 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Bernd Gänsbacher für die freundliche Aufnahme am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München und die Möglichkeit, diese Dissertation dort zu erarbeiten.

Ein großer Dank gebührt außerdem meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Achim Krüger, für die Überlassung der höchst interessanten Fragestellung und seine interessierte Mitbetreuung. Insbesondere möchte ich mich aber für das in mich als „Fachfremden“ gesetzte Vertrauen bedanken, welches mir als Mediziner einen breiten Einblick in naturwissenschaftliche Arbeitstechniken ermöglichte. Freudig zurückdenken werde ich auch an die vielen produktiven Diskussionen während der Ausarbeitung meiner Publikation, bei der ich dankenswerter Weise als Erstautor firmieren durfte.

Ein weiterer besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Frau Dr. Charlotte Kopitz, für die engagierte Betreuung, die vielen fachlich ergiebigen, aber auch gar manches Mal sehr persönlichen Diskussionen und die damit verbundene Möglichkeit, von ihrer langjährigen praktischen und theoretischen Erfahrung im Forschungsalltag zu profitieren. Gleichermaßen möchte ich mich aber auch für den Freiraum bedanken, den sie mir bei der zeitlichen Einteilung und Durchführung der Versuche gelassen hat. Ganz konkret sei ihr zudem für die Zur-Verfügung-Stellung der Adenoviren, die Inokulation von Viren und Tumorzellen sowie für die Einführung in die Versuchstierzucht gedankt.

Herrn Prof. Dr. Dr. Nils Brüner vom Institut für Veterinärpathobiologie der Königlichen Veterinär- und Landbauhochschule Dänemarks, Fredriksberg, Dänemark, danke ich für die Überlassung von META/Bom^{nu/nu}-Mäusen zur Etablierung einer eignen Zucht.

Bei Frau Lu Fei möchte ich mich für die Überlassung der onkoviralen Plasmide bedanken.

Im Hinblick auf die Depletion der Neutrophilen Granulozyten sei Herrn Priv.-Doz. Dr. Hana Algül von der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München, Deutschland, für die Überlassung des Protokolls gedankt. Frau Birgit Halbgewachs fühle ich mich in diesem Zusammenhang zu ganz besonderem Dank verpflichtet für ihre über das normale Maß der Kollegialität hinausgehende Bereitschaft, in völlig uneigennütziger Weise den Tierversuch zur Neutrophilendepletion zu übernehmen und mir die Daten für diese Dissertation zur Verfügung zu stellen. Zudem sei ihr herzlich für die Einarbeitung in die Proteonbiochemie gedankt.

Den Technischen Assistentinnen möchte ich ganz herzlich für die vielfältige technische Unterstützung danken, Frau Katja Honert hierbei insbesondere für die Einarbeitung in die Zellkultur und Frau Mareike Lehnhoff für ihre Hilfe bei histologischen Verfahren.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei allen übrigen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die tatkräftige Unterstützung bei den Tierversuchen, die kritischen Anmerkungen und hilfreichen Diskussionen bedanken, insbesondere aber auch für die das ungezwungene Arbeitsklima. Exemplarisch hervorheben möchte ich Frau Stefanie Hauser für ihre Hilfe bei molekularbiologischen Verfahren und Frau Dr. Susanne Schaten für ihre Unterstützung bei Immunhistologie und -fluoreszenz.

Denjenigen Mitarbeitern, die durch ihre oftmals nicht ausreichend gewürdigten Serviceleistungen die Versuchsdurchführungen erheblich erleichtert haben, ist an dieser Stelle ebenfalls zu danken. Stellvertretend seien hier Herr Dr. Anton Steger, Herr Josef Straßmair und für alle Mitarbeiter des Tierstalls Frau Rosi Bergmeyer genannt. Auch bei den Damen des Sekretariats, allen voran bei Frau Brigitte Kätzel, möchte ich mich für die problemlose Organisation von Verwaltungsangelegenheiten bedanken.

Meinen Eltern gebührt an dieser Stelle ein ganz besonderer Dank für ihre uneingeschränkte vielgestaltige Unterstützung und ihr stetes Verständnis sowie insbesondere auch dafür, dass sie mir in großem Vertrauen alle meinen Lebensweg betreffenden Entscheidungen ohne erzieherischen Impetus selbst treffen ließen. Ein ganz liebevoller Dank gilt auch meiner besseren Hälfte für all die aufgebrachte Geduld, das einführende Verständnis und die liebevolle Unterstützung, aber auch die vielen computertechnischen Hilfen, ohne all das diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Florian Albert Johann S c h r ö t z l m a i r

Geburtsdatum: 19.02.1982

Geburtsort: Kösching

Ausbildung

09/1988 – 09/1992 Grundschule Eitensheim

09/1992 – 06/2001 Willibald-Gymnasium Eichstätt (Abitur am 29.06.2001)

10/2001 – 05/2009 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (Ärztliche Approbation am 28.05.2009)

Forschung

04/2007 – 05/2009 Doktorand in der AG Molekulare Onkologie (Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Achim Krüger), Institut für Experimentelle Onkologie und Therapiefor-
schung der Technischen Universität München (Direktor: Univ.-Prof.
Dr. med. univ. Bernd Gänsbacher)

Beruf

06/2009 – 04/2010 Wissenschaftlicher Angestellter in der AG Molekulare Onkologie (Leiter:
Prof. Dr. rer. nat. Achim Krüger), Institut für Experimentelle Onkologie
und Therapieforschung, Klinikum rechts der Isar der Technischen
Universität München (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. univ. Bernd
Gänsbacher)

05/2010 – Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohren-
heilkunde, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Alexander Berghaus)

12 Publikationen

12.1 Zeitschriftenartikel

Schelter F, Gerg M, Halbgewachs B, Schatten S, Görlach A, **Schrötzlmair F**, Krüger A. Identification of a survival-independent metastasis-enhancing role of hypoxia-inducible factor-1 α with a hypoxia-tolerant tumor cell line. *J Biol Chem*, 2010: 285 [34]: 26182-26189

Schrötzlmair F, Kopitz C, Halbgewachs B, Lu F, Algül H, Brünner N, Gänsbacher B, Krüger A. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1-induced scattered liver metastasis is mediated by host-derived urokinase-type plasminogen activator. *J Cell Mol Med*, 2010: 14 [12]: 2760-2770

Schelter F, Halbgewachs B, Bäumler P, Neu C, Görlach A, **Schrötzlmair F**, Krüger A. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1-induced scattered liver metastasis is mediated by hypoxia-inducible factor 1- α . *Clin Exp Metastasis*, 2011: 28 [2]: 91-99

Hauser S, Bickel L, Weinspach D, Gerg M, Schäfer MK, Pfeifer M, Hazin J, Schelter F, Weidle UH, Ramser J, Volkmann J, Meindl A, Schmitt M, **Schrötzlmair F**, Altevogt P, Krüger A. Full-Length L1CAM and Not Its $\Delta 2\Delta 27$ Splice Variant Promotes Metastasis through Induction of Gelatinase Expression. *PLoS One*, 2011: 6 [4]: e18989

12.2 Vorträge

Kopitz C, **Schrötzlmair F**, Brünner N, Krüger A: Cooperation of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 in the Creation of a Pro-Metastatic Niche Via Hepatocyte Growth Factor-Signaling in the Liver. *25th Winter School on Proteinases and Their Inhibitors*, Tiers, Italien, 27. Februar bis 02. März 2008

Kopitz C, **Schrötzlmair F**, Brünner N, Krüger A: Cooperation of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 in the Creation of a Pro-Metastatic Niche Via Hepatocyte Growth Factor-Signaling in the Liver. *5th Conference on Experimental and Translational Oncology*, Kranjska Gora, Slowenien, 26. bis 30. März 2008