

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1)
als prometastatischer Faktor:

**Identifizierung von *Hypoxia-inducible Factor-1 α* (HIF-1 α) und
Neutrophilen Granulozyten als wichtige Mediatoren**

Birgit Halbgewachs

aus

Karlsruhe

2010

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Achim Krüger betreut und von Frau Prof. Dr. Angelika Vollmar vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 08.02.2010

Birgit Halbgewachs

Dissertation eingereicht am: 22.04.2010

1. Gutachter: Herr apl. Prof. Dr. Achim Krüger

2. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. Angelika Vollmar

Mündliche Prüfung am: 01.07.2010

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	- 1 -
2 Einleitung	- 2 -
2.1 Grundlagen Metastasierung	- 2 -
2.2 Proteolytisches Netzwerk	- 6 -
2.2.1 Matrix Metalloproteinasen (MMPs)	- 7 -
2.2.2 <i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i> (TIMPs)	- 8 -
2.2.3 Effekte von TIMP-1 auf die Metastasierung	- 9 -
2.3 Rolle des <i>Hepatocyte Growth Factor</i> (HGF)-c-Met-Signalwegs bei der Metastasierung	- 12 -
2.4 Einfluss Tumor-assoziiierter Immunzellen	- 14 -
2.5 <i>Hypoxia-inducible factor-1</i> (HIF-1) als ein Regulator der zellulären Stressreaktion	- 15 -
2.6 Metastasierungsmodelle	- 19 -
2.6.1 Übersicht	- 19 -
2.6.2 L-CI.5s-Modell als mechanistisches Modell der Lebermetastasierung	- 20 -
2.6.3 TIMP-1-Überexpression im L-CI.5s-Modell zur Untersuchung prometastatischer Mechanismen von TIMP-1	- 22 -
3 Zielsetzung	- 23 -
4 Material und Methoden	- 24 -
4.1 Tierexperimentelle Methoden	- 24 -
4.1.1 Versuchstiere	- 24 -
4.1.2 Metastasierungsmodell	- 24 -
4.1.3 Depletion Neutrophiler Granulozyten	- 26 -
4.1.4 Histochemische Methoden	- 28 -
4.1.4.1 X-Gal-Färbung	- 28 -
4.1.4.1.1 X-Gal-Färbung von Organen	- 28 -
4.1.4.1.2 X-Gal-Färbung von Kryoschnitten	- 29 -
4.1.4.2 Immunhistochemie auf Paraffinschnitten	- 29 -
4.1.4.3 Immunhistochemie auf Kryoschnitten	- 30 -

4.1.4.4 Immunfluoreszenzfärbung auf Kryoschnitten	- 31 -
4.1.4.5 <i>In-situ</i> -Hybridisierung	- 31 -
4.2 Zellbiologische Methoden	- 33 -
4.2.1 Zelllinien und Medien	- 33 -
4.2.2 Lentivirale Transduktion von Zellen	- 34 -
4.2.3 Inkubation von Zellen mit rekombinantem TIMP-1	- 35 -
4.2.4 Invasionsversuche mit TIMP-1-behandelten Tumorzellen	- 36 -
4.2.5 Isolation Neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark	- 37 -
4.2.6 Migrationsversuche mit primären Neutrophilen Granulozyten	- 37 -
4.3 Adenovirale Methoden	- 38 -
4.3.1 Adenovirale Konstrukte	- 38 -
4.3.1.1 Addl70-3	- 38 -
4.3.1.2 AdTIMP-1	- 38 -
4.3.1.3 Adshc-Met	- 38 -
4.3.2 Amplifikation, Aufreinigung und Titration der Adenoviren	- 39 -
4.3.2.1 Amplifikation	- 39 -
4.3.2.2 Aufreinigung	- 39 -
4.3.2.3 Titration der Adenoviren	- 40 -
4.4 Molekularbiologische und biochemische Methoden	- 41 -
4.4.1 RNA-Isolation	- 41 -
4.4.1.1 RNA-Isolation aus Zellen	- 41 -
4.4.1.2 RNA-Isolation aus Gewebe	- 42 -
4.4.2 Reverse Transkription	- 42 -
4.4.3 Quantitative RT-PCR (TaqMan [®] -Analyse)	- 43 -
4.4.4 Proteinisolation aus Gewebe und Bestimmung des Proteingehalts	- 44 -
4.4.5 Westernblot-Analyse	- 44 -
4.4.6 HGF-ELISA	- 45 -
4.5 Statistik	- 45 -
5 Ergebnisse	- 46 -
5.1 Untersuchung molekularer Mechanismen der TIMP-1-induzierten Metastasierung	- 46 -
5.1.1 Tumorzell-HIF-1 α als Mediator der prometastatischen Wirkung von TIMP-1	- 46 -

5.1.1.1 Die TIMP-1-modulierte Mikroumgebung induziert HIF-1 α in Leber-infiltrierenden Zellen	- 46 -
5.1.1.2 TIMP-1 alleine induziert HIF-1 α in verschiedenen Tumorzelllinien <i>in vitro</i>	- 49 -
5.1.1.3 TIMP-1 erhöht die Invasivität von Tumorzellen <i>in vitro</i>	- 50 -
5.1.1.4 Bedeutung von Tumorzell-HIF-1 α bei der TIMP-1-induzierten Invasivität	- 51 -
5.1.1.5 Tumorzell-HIF-1 α vermittelt die TIMP-1-induzierte Tumorzellstreuung <i>in vivo</i>	- 53 -
5.1.1.6 Der <i>knock down</i> von Tumorzell-HIF-1 α reduziert die c-Met-Expression und Signaltransduktion in TIMP-1-überexprimierenden Tieren	- 56 -
5.1.1.7 Der HIF-1 α - <i>knock-down</i> in den Tumorzellen hat keinen Einfluss auf die Proliferation	- 58 -
5.1.2 Untersuchungen zum Einfluss von TIMP-1 auf Neutrophile Granulozyten und deren Rolle bei der TIMP-1-induzierten Metastasierung	- 59 -
5.1.2.1 Kein signifikanter Anstieg der HGF-mRNA-Expression in der Leber durch TIMP-1	- 59 -
5.1.2.2 TIMP-1 verstärkt die Infiltration Neutrophiler Granulozyten in die Leber und die Migration von Neutrophilen <i>in vitro</i>	- 60 -
5.1.2.3 Einfluss von TIMP-1 auf die Degranulierung Neutrophiler Granulozyten	- 61 -
5.1.2.4 Etablierung der Antikörper-vermittelten Depletion Neutrophiler Granulozyten in Mäusen	- 63 -
5.1.2.5 Untersuchung der Rolle Neutrophiler Granulozyten bei der TIMP-1-induzierten Metastasierung	- 64 -
5.1.3 Ausblick: Untersuchung der Rolle von Wirts-c-Met bei der TIMP-1-induzierten Metastasierung	- 65 -
5.1.3.1 shRNA-vermittelter <i>knock down</i> von c-Met <i>in vivo</i>	- 66 -
5.1.3.1.1 Dosisfindung	- 66 -
5.1.3.1.2 Zeitverlauf des c-Met-knock-down nach adenoviralem Gentransfer	- 67 -
5.1.3.2 Adenoviraler Gentransfer von humanem TIMP-1 in die Mausleber nach vorangehender Adenovirusinokulation	- 68 -

5.1.3.3 Erste Untersuchung des Beitrags von Wirts-c-Met zur TIMP-1-induzierten Metastasierung	- 69 -
5.2 Charakterisierung molekularer Veränderungen im zeitlichen Verlauf der Metastasierung im L-CI.5s-Modell – Vergleich mit der TIMP-1-induzierten Metastasierung	- 71 -
5.2.1 Die sekundäre Invasion von Tumorzellen geht einher mit einer gesteigerten Expression von TIMP-1 in Metastasen	- 71 -
5.2.2 Die sekundäre Invasion wird begleitet von einem HGF-Protein-Anstieg und einer Aktivierung der HGF-c-Met-Signaltransduktion	- 73 -
5.2.3 Infiltrierende Neutrophile Granulozyten akkumulieren in Metastasen	- 74 -
6 Diskussion	- 76 -
6.1 Aufklärung eines Zusammenhangs zwischen TIMP-1 und HIF-1 α	- 77 -
6.2 Identifizierung von HIF-1 als Tumorzell-intrinsischer Mediator der TIMP-1-induzierten Metastasierung	- 81 -
6.3 Rekrutierung Neutrophiler Granulozyten durch TIMP-1	- 84 -
6.4 Bedeutung Neutrophiler Granulozyten bei der TIMP-1-induzierten Metastasierung	- 87 -
6.5 Etablierung des <i>c-Met-knock-down</i> im Wirt	- 89 -
6.6 Molekulare Veränderungen im Verlauf der „normalen“ und der TIMP-1-induzierten Metastasierung	- 91 -
6.7 Ausblick	- 93 -
7 Verzeichnisse	- 95 -
7.1 Literaturverzeichnis	- 95 -
7.2 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	- 112 -
7.3 Abkürzungsverzeichnis	- 114 -
8 Danksagung	- 117 -
9 Lebenslauf	- 119 -

1 Zusammenfassung

Metastasen sind für 90% der Krebs-assoziierten Todesfälle verantwortlich. Mittlerweile weiß man, dass Störungen im Gleichgewicht zwischen Proteasen und deren Inhibitoren die Homöostase eines Gewebes verändern und dadurch dessen Empfänglichkeit für einwandernde Tumorzellen erhöhen können. Entsprechend korrelieren hohe Plasmaspiegel des endogenen Proteaseinhibitors *tissue inhibitor of metalloproteinases-1* (TIMP-1) oft mit einer schlechten Prognose von Krebspatienten. In Tiermodellen führt eine erhöhte TIMP-1-Expression zu einer verstärkten experimentellen Lebermetastasierung, charakterisiert durch eine aggressive Streuung der Tumorzellen im Leberparenchym. Erhöhte TIMP-1-Spiegel führen u.a. zu einem starken Anstieg von *hepatocyte growth factor* (HGF)-Protein in der Leber und zu einer Aktivierung des HGF-Signalwegs, welche eine Voraussetzung für die aggressive Tumorzellinfiltration ist. In der vorliegenden Arbeit sollten TIMP-1-induzierte Faktoren auf Tumorzellseite und auf Wirtsseite identifiziert werden, die über den HGF-Signalweg oder davon unabhängig die prometastatische Wirkung von TIMP-1 vermitteln. Auf Tumorzellseite konnte der Transkriptionsfaktor *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1), ein Mediator der zellulären Stressanpassung und zudem Regulator des HGF-Rezeptors c-Met, als wichtiger Mediator der TIMP-1-induzierten Metastasierung identifiziert werden. Die adenovirale TIMP-1-Überexpression *in vivo* induzierte die regulierte α -Untereinheit von HIF-1 (HIF-1 α) in Tumorzellen ebenso wie exogen zugesetztes TIMP-1 *in vitro*. Der shRNA-vermittelte HIF-1 α -*knock down* in L-CI.5s-T-Zell-Lymphomzellen verhinderte die TIMP-1-assoziierte Tumorzellinfiltration in der Leber, verbunden mit einer reduzierten Aktivierung des HGF-c-Met-Signalwegs. Auf Wirtsseite konnte gezeigt werden, dass der TIMP-1-induzierte Anstieg an HGF-Protein nur teilweise auf eine HGF-*de-novo*-Synthese in der Leber zurückzuführen war, dass jedoch TIMP-1 chemotaktisch auf HGF-speichernde Neutrophile Granulozyten wirkte. In der Folge verhinderte die Antikörper-vermittelte Depletion von Neutrophilen die TIMP-1-assoziierte Tumorzellstreuung *in vivo*. Um den Beitrag des c-Met-Signalwegs im Wirt zur TIMP-1-induzierten Metastasierung zu untersuchen, wurde ein Protokoll etabliert, das schon heute die spezifische Reduktion der c-Met-Expression im Wirtsgewebe mittels adenoviralen Gentransfers einer gegen c-Met gerichteten shRNA-Sequenz erlaubt. Mit der Identifizierung von Tumorzell-HIF-1 α und Neutrophilen Granulozyten im Wirt konnten in dieser Arbeit zwei wichtige Mediatoren der prometastatischen Wirkung von TIMP-1 identifiziert werden.

2 Einleitung

In den Industrieländern sind bösartige Tumorerkrankungen heute die zweithäufigste Todesursache (WHO, 2008). 90% der Krebspatienten versterben dabei nicht am diagnostizierten Primärtumor, der sich mit den konventionellen Behandlungsmethoden (Resektion, Chemotherapie und Bestrahlung) meist gut behandeln lässt (Perret und Crépin, 2008), sondern an peripheren Metastasen (Fidler, 2003; Mehlen und Puisieux, 2006), die zum Teil auch erst Jahre nach erfolgreicher Behandlung des Primärtumors klinisch manifest werden (Aguirre-Ghiso, 2007) und gegen die bis heute keine spezifisch wirksamen Pharmaka verfügbar sind (Perret und Crépin, 2008). Während die Mechanismen der Primärtumorentstehung in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht wurden, fand die Erforschung molekularer Mechanismen der Metastasierung bis vor einigen Jahren wenig Beachtung (Gupta und Massagué, 2006). Mittlerweile weiss man jedoch, dass nicht nur Veränderungen in den Tumorzellen selbst (Zell-autonome Veränderungen), sondern auch die Mikroumgebung der Tumorzellen einen entscheidenden Einfluss auf Tumorprogression und Metastasierung haben (Kulesa *et al.*, 2006; Gort *et al.*, 2008). Ein tiefes Verständnis der der Metastasierung zugrunde liegenden Mechanismen ist wichtig, um antimetastatische Therapien entwickeln zu können und so in Zukunft die Morbidität und Mortalität von Krebspatienten zu senken (Steege und Theodorescu, 2008).

2.1 Grundlagen Metastasierung

Metastasen entstehen, wenn sich einzelne Tumorzellen vom ursprünglichen Primärtumor ablösen und nach Verteilung im Organismus in anderen Organen ansiedeln. Hierzu müssen die Tumorzellen erfolgreich mehrere Schritte durchlaufen und verschiedenen Stressfaktoren widerstehen (Abbildung 2-1).

Schon innerhalb des Primärtumors sind Tumorzellen einer Reihe von Stressfaktoren ausgesetzt; so kommt es beispielsweise mit zunehmender Größe des Primärtumors häufig zu Sauerstoff- oder Nährstoffmangelsituationen (Pouyssegur *et al.*, 2006). Solchen Stressoren können Tumorzellen entweder durch Anpassung (z.B. durch Induktion der Angiogenese oder Umstellung des Metabolismus) oder durch Flucht bzw. Invasion und Metastasierung begegnen (Ruan *et al.*, 2009). Der heterodimere Transkriptionsfaktor *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) ist ein wichtiger Faktor der zellulären Stressant-

wort (Pouysségur *et al.*, 2006; Görlach, 2009) und spielt als solcher auch eine wichtige Rolle bei der Metastasierung (Gort *et al.*, 2008; Scheltemer *et al.*, 2010, Manuskript in Vorbereitung).

Die Metastasierung beginnt damit, dass sich einzelne Tumorzellen aus dem Zellverband des Primärtumors ablösen und die Fähigkeit zur Migration erlangen (Abbildung 2-1, 1.). Häufig scheint daran ein Übergang der Tumorzellen von einem epithelialen hin zu einem motilen, mesenchymalen Phänotyp (*epithelial-mesenchymal transition, EMT*) beteiligt zu sein (Geiger und Peeper, 2009). Für die nachfolgende Infiltration in das umliegende Gewebe (Abbildung 2-1, 2.) müssen migrierende Tumorzellen die Extrazelluläre Matrix (EZM) und die Basalmembran durchdringen. Die EZM ist ein komplex zusammengesetztes, dreidimensionales Netzwerk aus Makromolekülen, das einerseits den Zellen eines Gewebes Halt gibt, andererseits aber auch eine wichtige Speicherfunktion für verschiedenste (Wachstums-) Faktoren einnimmt (Bissell und Radisky, 2001). Die Basalmembran ist eine Spezialform der EZM, ein dichtes Geflecht verschiedener Glykoproteine und Proteoglykane (z.B. Kollagen IV, Laminin, Perlecan), das Epithelien vom darunter liegenden Stützgewebe trennt (Bissell und Radisky, 2001; Gupta und Massagué, 2006); der Durchbruch von Tumorzellen durch die Basalmembran ist ein sicherer Nachweis der Malignität eines Tumors (Hood und Cheresch, 2002). Verschiedene, teils von Tumorzellen, teils von den Zellen des umliegenden Stromas sezernierte Proteasen sind in der Lage, die Bestandteile der EZM und der Basalmembran abzubauen und so Tumorzellen den Weg in das umliegende Gewebe und schließlich in das Gefäßsystem zu ebnet (Joyce und Pollard, 2009).

Der Eintritt der Tumorzellen in Blut- oder Lymphgefäße, die Intravasation (Abbildung 2-1, 3.), erfolgt häufig über Gefäße, deren Neubildung (Angiogenese) vom Primärtumor selbst induziert wurde, um eine ausreichende Versorgung der wachsenden Tumormasse mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten. Diese Blutgefäße weisen meist ein irregulär aufgebautes Endothel auf und haben in der Regel keine durchgehende Basalmembran, wodurch invasiven Tumorzellen der Eintritt in das Gefäßsystem erleichtert wird (Baluk *et al.*, 2005; Desgrosellier und Cheresch, 2010).

Haben die intravasieren Tumorzellen die Zirkulation erreicht, werden sie über den Blut- bzw. Lymphstrom im Organismus verteilt (Abbildung 2-1, 4.). In der Blutzirkulation sind die Tumorzellen Angriffen durch das Immunsystem sowie hohen Scherkräften ausgesetzt, an denen viele Zellen zugrunde gehen (Gupta und Massagué, 2006; Joyce und

Pollard, 2009). Die meisten der überlebenden Zellen werden aufgrund ihrer Größe in kleinen Kapillaren zurückgehalten (Chambers *et al.*, 2002), teilweise erfolgt die Interaktion mit dem Gefäßendothel auch indirekt z.B. über die Bindung an Blutplättchen und Komponenten des Gerinnungssystems (Nguyen, 2004).

In den Gefäßen zurückgehaltene Tumorzellen können entweder noch im Gefäßsystem proliferieren und Kolonien ausbilden (Al-Mehdi *et al.*, 2000), oder sie verlassen in einem als Extravasation bezeichneten Vorgang das Gefäßsystem (Abbildung 2-1, 5.) und wandern in das Zielorgan der Metastasierung ein (Nguyen, 2004). Auch die Extravasation kann durch proteolytische Aktivität beeinflusst werden (Gerg *et al.*, 2008). Darüber hinaus wird diskutiert, dass Änderungen von Zell-Zell-Kontakten zwischen Endothelzellen bei der Tumorzellextravasation eine Rolle spielen (Gupta und Massagué, 2006). Verschiedene Faktoren beeinflussen den Ort der Tumorzellextravasation (Nguyen, 2004), beispielsweise die Verteilung des Blutflusses in der Umgebung des Primärtumors, aber auch die Expression für bestimmte Tumorzellen chemotaktischer Faktoren im Zielorgan der Metastasierung (Müller *et al.*, 2001; Joyce und Pollard, 2009).

Sind die Tumorzellen im Zielorgan der Metastasierung angelangt, müssen sie sich an die neue Mikroumgebung anpassen. Nur ein sehr kleiner Teil der extravasierten Tumorzellen ist in der Lage, zu proliferieren und zu Mikro- und Makrometastasen auszuwachsen (Abbildung 2-1, 6.); viele Zellen sterben entweder, oder sie verharren zunächst in einem ruhenden Zustand (sog. *dormancy*) (Gupta und Massagué, 2006). Gelingt es einer disseminierten Tumorzelle, trotz aller Hindernisse eine Metastase zu bilden, so unterliegt sie mit zunehmender Größe der Metastase einem ähnlichen Selektionsdruck wie im Primärtumor (z.B. durch Nährstoff- und Sauerstoffmangel). Dies kann dazu führen, dass sich wiederum einzelne Tumorzellen von einer etablierten Metastase lösen, erneut in das umliegende Gewebe infiltrieren („sekundäre Invasion“) (Abbildung 2-1, 7.) und sekundäre Metastasen ausbilden (Bross *et al.*, 1975; Weiss *et al.*, 1988).

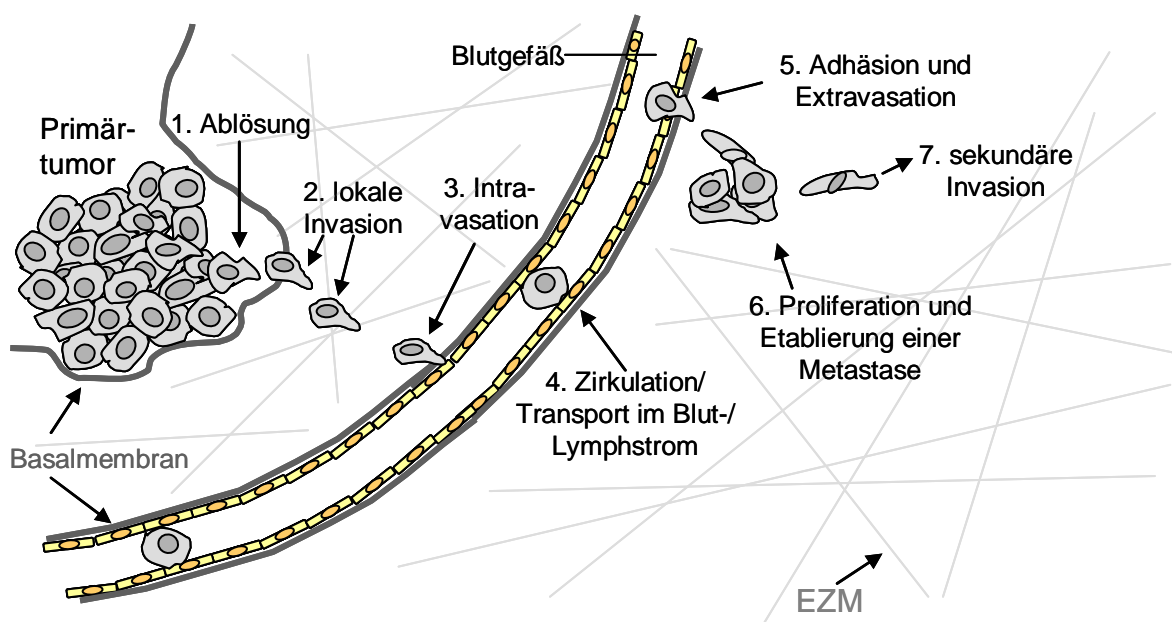


Abbildung 2-1: Wichtige Schritte bei der Entstehung von Metastasen. 1. Ablösung einzelner Tumorzellen vom Primärtumor. 2. Lokale Invasion einzelner Tumorzellen in das umliegende Gewebe. 3. Intravasation der Tumorzellen in Blut- und Lymphgefäße. 4. Zirkulation bzw. Transport der Tumorzellen im Blut-/ Lymphstrom und damit Verteilung der Tumorzellen im Organismus. 5. Adhäsion der Tumorzellen an das Endothel und Extravasation im Zielorgan der Metastasierung. 6. Etablierung einer Metastase in der neuen Mikroumgebung und davon ausgehend 7. sekundäre Invasion in das umliegende Gewebe. Weitere Erläuterungen s. Text.

Es wird diskutiert, dass die Etablierung extravasierter Tumorzellen in der neuen Mikroumgebung der limitierende Faktor bei der Metastasierung und Hauptgrund für das Auftreten Tumortyp-spezifischer Metastasierungsmuster (sog. „*homing*“ bestimmter Tumoren in bestimmte Organe) ist (Chambers *et al.*, 2002). Faktoren der Mikroumgebung und die Homöostase im Zielorgan der Metastasierung spielen dabei ebenso eine Rolle wie intrinsische Eigenschaften der Tumorzellen (Nguyen, 2004; DeNardo *et al.*, 2008). Dieser Gedanke ist nicht neu: Schon im 19. Jahrhundert erkannte der englische Chirurg Stephen Paget, dass bestimmte Tumorzellen (*seed*) bevorzugt in bestimmte Organe (*soil*) metastasieren, also nur in einer für sie passenden Umgebung zu Metastasen auswachsen können (sog. „*seed and soil*“-Hypothese) (Fidler, 2003). In der Tat bestimmt die lokale Mikroumgebung im Zielorgan der Metastasierung ganz wesentlich, ob extravasierte Tumorzellen absterben, ruhend vorliegen, oder in der Lage sind, zu proliferieren und (Makro-) Metastasen auszubilden (Joyce und Pollard, 2009). Unter physiologischen Bedingungen sorgen vielfache Interaktionen und Rückkopplungsmechanismen zwischen zellulären und nicht-zellulären Faktoren der Mikroumgebung für die Aufrechterhaltung der Homöostase eines Gewebes (Glick und Yuspa, 2005). Störgrößen von außen (z.B. Infektionen, infiltrierende Tumorzellen oder auch, wie später gezeigt

werden wird, eine erhöhte Expression von Proteasen oder deren Inhibitoren) können die Mikroumgebung und die Gewebekomöostase verändern und so die Besiedlung eines Organs mit Tumorzellen begünstigen (Aggarwal *et al.*, 2006; Kopitz *et al.*, 2007; Joyce und Pollard, 2009). Neuere Studien zeigen, dass auch Primärtumoren die Mikroumgebung in entfernten Organen verändern und dadurch zur Ausbildung einer sog. prämetastatischen Nische führen können (Kaplan *et al.*, 2005). Vom Primärtumor sezernierte Faktoren induzieren dabei im Zielorgan der Metastasierung Veränderungen in der EZM und dadurch noch vor der Ankunft von Tumorzellen die Einwanderung hämatopoetischer Zellen aus dem Knochenmark, welche Adhäsion, Überleben und Wachstum ankommender Tumorzellen begünstigen und so die Metastasierung in dieses Organ fördern (Kaplan *et al.*, 2005; Erler *et al.*, 2009). In unserer Arbeitsgruppe konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass auch Veränderungen im proteolytischen Netzwerk der Leber (s. Abschnitt 2.2) die Homöostase in diesem Organ stören und in der Folge die Besiedlung der Leber mit Tumorzellen begünstigen können (Kopitz *et al.*, 2007).

2.2 Proteolytisches Netzwerk

Proteasen, Peptidbindungen spaltende Enzyme, sind wichtige Regulatoren der Gewebekomöostase (Krüger, 2009). Neben ihrer Beteiligung an Ab- und Umbauprozessen der EZM und an der Freisetzung in der EZM gespeicherter oder kryptischer bioaktiver Moleküle sind Proteasen auch in der Lage, Signalmoleküle und die damit zusammenhängenden Signalwege durch limitierte Proteolyse zu modifizieren (auf dem Keller *et al.*, 2007). Basierend auf ihrem Katalysemechanismus lassen sich Proteasen in verschiedene Klassen einteilen: Metalloproteasen, Serin-, Cystein-, Threonin- und Aspartat-Proteasen (Turk, 2006; López-Otín und Matrisian, 2007). Die Aktivität von Proteasen wird u.a. durch endogene Inhibitoren reguliert (Overall und López-Otín, 2002).

Die Proteasen verschiedener Klassen agieren nicht isoliert, sondern sie interagieren auf mannigfache Weise miteinander, mit ihren Substraten und Inhibitoren (Overall und Kleifeld, 2006). Um die Komplexität dieser Interaktionen zu beschreiben, prägten Overall und Kleifeld den Begriff des „proteolytischen Netzwerks“ (*protease web*) (Overall und Kleifeld, 2006). Unter physiologischen Bedingungen befindet sich dieses Netzwerk in einem dynamischen Gleichgewicht, das zur Homöostase eines Gewebes beiträgt (Overall und Kleifeld, 2006). Änderungen in der Expression oder Aktivität einer Komponente, wie sie z.B. bei Krebserkrankungen häufig auftreten, beeinflussen zwangsläufig

auch andere Faktoren des Netzwerks und verändern dadurch die Mikroumgebung und Gewebekomöostase eines Organs. Mittlerweile gibt es Hinweise, dass mehrere solcher regionaler proteolytischer Netzwerke in bestimmten Organen auch untereinander im Sinne eines „proteolytischen Internets“ kommunizieren können (Krüger, 2009). Die Informationsübertragung zwischen den verschiedenen Organen und Netzwerken könnte dabei z.B. über Hormone oder Zytokine erfolgen (Krüger, 2009).

2.2.1 Matrix Metalloproteinasen (MMPs)

Bei fast allen Krebserkrankungen ist eine erhöhte Expression und Aktivität von MMPs zu beobachten (Egeblad und Werb, 2002), die häufig auch mit einer schlechten Prognose korreliert (Mook *et al.*, 2004; Zucker und Vacirca, 2004; Vaisanen *et al.*, 2008; Voland *et al.*, 2009). Die meisten der 24 in Säugetieren bekannten MMPs sind sezernierte Proteine, jedoch gibt es auch membrangebundene Vertreter (Egeblad und Werb, 2002; Visse und Nagase, 2003). Gemeinsames Strukturmerkmal aller MMPs ist der Aufbau aus einer Pro-Domäne, einer katalytischen Domäne, einer Ankerregion und einer Hämpoxin-Domäne; im katalytischen Zentrum befindet sich ein Zink-Ion (Visse und Nagase, 2003). MMPs werden als inaktive Vorstufen, sog. Zymogene, gebildet und müssen durch proteolytische Entfernung der Pro-Domäne aktiviert werden (Page-McCaw *et al.*, 2007). Darüber hinaus wird die Aktivität von MMPs auch durch die Interaktion mit endogenen MMP-Inhibitoren reguliert (Overall und López-Otín, 2002).

MMPs sind in der Lage, alle Komponenten der EZM abzubauen (Mott und Werb, 2004), und können dadurch migrierenden (Tumor-) Zellen den Weg durch ein Gewebe ebnen (Page-McCaw *et al.*, 2007). Daneben sind auch eine Reihe anderer Moleküle Substrate von MMPs und den mit den MMPs verwandten Proteinasen der ADAM-Familie (*a disintegrin and metalloproteinases*) (Egeblad und Werb, 2002; Page-McCaw *et al.*, 2007). Hierzu zählen beispielsweise Zelladhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren (Egeblad und Werb, 2002). Zudem können MMPs sich und andere Proteasen untereinander aktivieren, wie dies z.B. für die Aktivierung von pro-MMP-2 durch MT1-MMP gezeigt wurde (Strongin *et al.*, 1995).

Aufgrund der Matrix-degradierenden Eigenschaften von MMPs ging man lange Zeit von einer antimetastatischen Wirkung der MMP-Inhibition aus (Brown 1998). In Anbetracht der heute bekannten Vielzahl an Interaktionspartnern von MMPs im proteolytischen Netzwerk ist es retrospektiv jedoch nicht erstaunlich, dass alle Versuche, die metastati-

sche Ausbreitung von Tumorzellen durch die Behandlung von Krebspatienten mit synthetischen Breitspektrum-MMP-Inhibitoren zu verhindern, bislang scheiterten (Coussens *et al.*, 2002; Krüger, 2009). Untersuchungen in Tiermodellen zeigten, dass die Breitspektrum-Hemmung von MMPs zu Veränderungen in der Mikroumgebung der Leber und zu einer Zunahme der Lebermetastasierung führt (Krüger *et al.*, 2001; Arlt *et al.*, 2002). Um in Zukunft die Ausbreitung von Tumorzellen durch antiproteolytische Therapien eindämmen zu können, ist es erforderlich, die Mechanismen der prometastatischen Wirkung von Breitspektrum-MMP-Inhibitoren näher zu untersuchen und zwischen Proteasen, die als therapeutische Zielstrukturen für die Behandlung von Krebspatienten in Frage kommen, und solchen, die eine antimetastatische Funktion haben und deshalb nicht durch Pharmaka beeinflusst werden sollten (sog. Antitargets), zu unterscheiden (Overall und Kleifeld, 2006).

2.2.2 *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs)*

Unter physiologischen Bedingungen wird die proteolytische Aktivität in einem Gewebe streng reguliert, u.a. durch endogene Proteaseinhibitoren (Brew *et al.*, 2000). Die bedeutendsten endogenen Inhibitoren von MMPs sind die *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) (Baker *et al.*, 2002). Bis heute sind vier verschiedene TIMPs bekannt (TIMP-1 bis -4), die sich sowohl in ihrer Substratspezifität als auch in ihrem Expressionsmuster unterscheiden (Baker *et al.*, 2002). Die TIMPs besitzen ein Molekulargewicht von ca. 20-30 kDa und bestehen aus einer N- und einer C-terminalen Domäne, die jeweils durch drei Disulfidbrücken stabilisiert sind (Visse und Nagase, 2003). Der C-Terminus ist für Interaktionen mit anderen Proteinen erforderlich (Chirco *et al.*, 2006), während die Hemmung von MMPs über den N-Terminus des Inhibitors erfolgt, der einen nicht-kovalenten 1:1-Komplex mit der Protease bildet und dabei das Zink-Ion im aktiven Zentrum der Protease koordiniert (Baker *et al.*, 2002). Mit Ausnahme von TIMP-1, das kaum inhibitorische Aktivität gegenüber den membrangebundenen MMPs (MT-MMPs) und MMP-19 besitzt (zusammengefasst in Lambert *et al.*, 2004), sind alle TIMPs in der Lage, alle bisher bekannten MMPs zu inhibieren (Visse und Nagase, 2003; Stetler-Stevenson, 2008). TIMP-1 ist darüber hinaus auch ein Inhibitor von ADAM-10 aus der Familie der ADAMs (Baker *et al.*, 2002). Als wichtige Komponenten des proteolytischen Netzwerks sind TIMPs maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase beteiligt. Neben ihrer MMP-inhibitorischen Aktivität besitzen TIMPs aber auch MMP-unabhängige Funktionen (Baker *et al.*, 2002), die von einer pro- oder

antiapoptotischen Wirkung über eine Beeinflussung der Zellproliferation bis hin zu einer Rolle bei der Angiogenese reichen (Chirco *et al.*, 2006).

Vor allem TIMP-1 korreliert in Krebspatienten häufig mit einer schlechten Prognose (Kuvaja *et al.*, 2008; Sorensen *et al.*, 2008 u.a.). Die beschriebenen Wirkungen von TIMP-1 sind sehr vielfältig und stark von den verwendeten Zelllinien und Versuchsbedingungen abhängig (Stetler-Stevenson, 2008). Nicht immer gelingt es, die beobachteten Effekte in MMP-abhängige oder -unabhängige einzuteilen. Während beispielsweise in Kupffer-Sternzellen gezeigt werden konnte, dass TIMP-1 über einen MMP-abhängigen Mechanismus antiapoptotisch wirkt (Murphy *et al.*, 2002), wird in B-Zell-Lymphomzellen, Brustkrebszellen und auch verschiedenen nicht-malignen Zelllinien eine MMP-unabhängige antiapoptotische Wirkung von TIMP-1 postuliert, die vermutlich über eine Aktivierung des *focal adhesion kinase* (FAK)-Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalwegs vermittelt wird (Li *et al.*, 1999; Stetler-Stevenson, 2008). Auch auf Wachstum und Proliferation konnten abhängig vom Zelltyp unterschiedliche Wirkungen von TIMP-1 gezeigt werden (Chirco *et al.*, 2006). Erst vor Kurzem konnte CD63, ein Mitglied der Tetraspanin-Familie, als zellulärer Bindungspartner für TIMP-1 identifiziert werden (Jung *et al.*, 2006): Jung *et al.* konnten zeigen, dass TIMP-1, CD63 und Integrin β_1 einen ternären Komplex auf der Oberfläche von Brustepithelzellen ausbilden, in dem das Integrin unabhängig von der Zelladhäsion in der aktiven Konformation vorliegt (Jung *et al.*, 2006). Die Ausbildung dieses Komplexes war Voraussetzung für die anti-apoptotische Wirkung von TIMP-1 (Jung *et al.*, 2006).

2.2.3 Effekte von TIMP-1 auf die Metastasierung

Entsprechend der ursprünglichen Hypothese, dass MMPs durch ihre EZM-degradierenden Eigenschaften die Tumorprogression und Metastasierung fördern, ging man lange Zeit von einer antitumorigenen und antimetastatischen Wirkung von TIMP-1 aus. Tatsächlich konnte ein solcher Effekt in mehreren Tiermodellen gezeigt werden (zusammengefasst in Hornebeck *et al.*, 2005). So unterdrückte die Überexpression von TIMP-1 in der Leber die SV40T-Antigen-induzierte Entstehung hepatozellulärer Karzinome und eine reduzierte TIMP-1-Expression war mit einer schnelleren Tumorinitiation und -progression assoziiert (Martin *et al.*, 1996). In TIMP-1-transgenen Mäusen wurde die experimentelle Metastasierung von Fibrosarkomzellen in das Gehirn ebenso verhindert (Krüger *et al.*, 1998a) wie die spontane Metastasierung von ESbL-*lacZ*-

Lymphomzellen (Krüger *et al.*, 1997). In anderen Modellen reduzierte die Überexpression von TIMP-1 in der Leber das Wachstum transplantierte Ehrlich-Tumorzellen (Ikenaka *et al.*, 2003). Zudem führten durch adenoviralen Gentransfer erzielte hohe systemische TIMP-1-Spiegel zu einer reduzierten Lebermetastasierung von aggressiven T-Zell-Lymphomzellen und Kolorektalkarzinomzellen (Elezkurtaj *et al.*, 2004). An Melanomzelllinien konnte schließlich gezeigt werden, dass nicht nur eine erhöhte TIMP-1-Expression im Wirt, sondern auch die Überexpression von TIMP-1 in den Tumorzellen selbst das tumorigene und metastatische Potential der Tumorzellen reduziert (Khokha, 1994).

All diesen Studien, in denen TIMP-1 eine antitumorigene und antimetastatische Wirkung hatte, stehen jedoch zahlreiche klinische Untersuchungen gegenüber, in denen TIMP-1 als negativer prognostischer Marker bei verschiedenen Krebserkrankungen identifiziert wurde. Dies gilt beispielsweise für das Mammakarzinom (Kuvaja *et al.*, 2008; Würtz *et al.*, 2008), das Kolorektalkarzinom (Sorensen *et al.*, 2008), das Magenkarzinom (Mimori *et al.*, 1997), das Bronchialkarzinom (Fong *et al.*, 1996) und Non-Hodgkin-Lymphome (Kossakowska *et al.*, 2000). Auch wenn dies auf den ersten Blick paradox erscheinen mag, so ist es angesichts der heute bekannten Komplexität der Interaktionen im proteolytischen Netzwerk nicht erstaunlich, dass auch eine erhöhte Expression eines Proteaseinhibitors mit einer schlechten Prognose korrelieren kann.

Kürzlich gelang es, in einem Mausmodell die in Patienten beobachteten molekularen Veränderungen, die mit erhöhten TIMP-1-Spiegeln einhergehen, nachzustellen (Kopitz *et al.*, 2007). Die Überexpression von TIMP-1 führt in diesem Modell zu deutlichen Veränderungen des Genexpressionsprofils und damit der Gewebekomplexität: Neben einer Induktion der Expression verschiedener Metastasierungs-assoziiierter Gene in der Leber, wie sie in ähnlicher Form auch im (Tumorzell-freien) Lebergewebe von Patienten mit metastasierten Kolorektalkarzinomen gefunden werden, steigt auch die Menge an *hepatocyte growth factor* (HGF)-Protein an und der HGF-c-Met-Signalweg, ein wichtiger promigratorischer Signalweg (s. Abschnitt 2.3), wird aktiviert (Kopitz *et al.*, 2007). Insgesamt markieren all diese Veränderungen in der Leber die Ausbildung einer prämetastatischen Nische, die in experimentellen Metastasierungsmodellen von T-Zell-Lymphomzellen (L-CI.5) und Fibrosarkomzellen (HT1080) zu einer starken Zunahme der Lebermetastasierung führt (Kopitz *et al.*, 2007). Dabei führen erhöhte TIMP-1-Spiegel im Modell der experimentellen Lebermetastasierung von L-CI.5s-Zellen zwar zu

einer Reduktion der Anzahl vielzelliger Makrometastasen, jedoch kommt es gleichzeitig zu einer massiven Zunahme der Infiltration einzelner Tumorzellen in das Leberparenchym (Abbildung 2-2). Die Tumorzellen streuen dabei so stark und aggressiv, dass praktisch das gesamte Leberparenchym von Tumorzellen durchsetzt ist (Abbildung 2-2) (Kopitz *et al.*, 2007). Inhibitorstudien ergaben, dass die oben erwähnte Aktivierung des HGF-Signalwegs eine Voraussetzung für diese massive Tumorzellinfiltration ist (Kopitz *et al.*, 2007). Die Hemmung der *shedase* ADAM-10 durch TIMP-1 spielt hierbei eine Rolle (Kopitz *et al.*, 2007): Unter physiologischen Bedingungen ist ADAM-10 an der proteolytischen Spaltung des HGF-Rezeptors c-Met beteiligt (Kopitz *et al.*, 2007). In Gegenwart erhöhter TIMP-1-Spiegel wird ADAM-10 gehemmt und dadurch auch die Spaltung von c-Met verhindert, so dass es zu einer Akkumulation von c-Met auf der Zelloberfläche und in der Folge zur Aktivierung des HGF-c-Met-Signalwegs kommt (Kopitz *et al.*, 2007). Bislang ist allerdings unklar, ob die Aktivierung des HGF-c-Met-Signalwegs auf Seiten der *Wirtszellen* für die prometastatische Wirkung von TIMP-1 notwendig ist oder ob hierfür dieser Signalweg in den *Tumorzellen* aktiviert werden muss; darüber hinaus ist noch nicht bekannt, ob die Zunahme der HGF-Menge in der Leber zur Induktion der HGF-c-Met-Signaltransduktion beiträgt oder ob hierfür die basal in der Leber vorhandene HGF-Menge ausreicht.

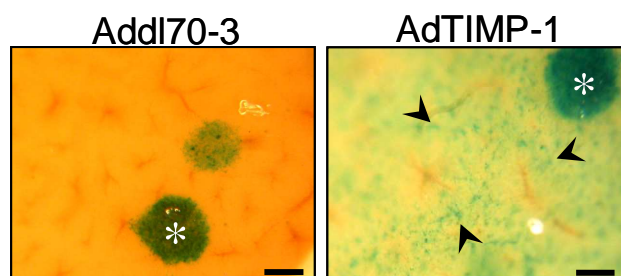


Abbildung 2-2: Erhöhte TIMP-1-Spiegel induzieren die Lebermetastasierung. Drei Tage nach adenoviralem Gentransfer von TIMP-1 wurden 5.000 L-CI.5s-T-Zell-Lymphomzellen i.v. in CD1-*nu/nu*-Mäuse inokuliert. Sechs Tage später wurden die Lebern entnommen und die Tumorzellen mit X-Gal angefärbt. Nahaufnahmen der Leberoberfläche. TIMP-1 reduziert die Makrometastasierung, induziert jedoch die aggressive Infiltration von Tumorzellen in das Leberparenchym und die Gesamttumorlast in der Leber. Sterne: Makrometastasen. Pfeile: gestreute Tumorzellen im Leberparenchym; jedes blau-grüne Signal geht auf eine Tumorzelle zurück; Balken: 0,2 mm; (modifiziert aus Kopitz *et al.*, 2007).

2.3 Rolle des *Hepatocyte Growth Factor* (HGF)-c-Met-Signalwegs bei der Metastasierung

Der *hepatocyte growth factor* (HGF), auch bekannt als *scatter factor* (SF), wurde unabhängig voneinander als Wachstumsfaktor für Hepatozyten (Nakamura *et al.*, 1986) und als Faktor, der die Motilität von Epithelzellen verstärkt (Stoker *et al.*, 1987), beschrieben. HGF/ SF wird hauptsächlich von Zellen mesenchymalen Ursprungs, u.a. einigen Immunzellpopulationen, gebildet und wirkt unter physiologischen Bedingungen parakrin über seinen Rezeptor c-Met (MET – *mesenchymal epithelial transition factor*) auf Epithelzellen (Gentile *et al.*, 2008; Corso *et al.*, 2005). Im Zusammenhang mit Krebserkrankungen kann es jedoch mitunter auch zur autokrinen Aktivierung des HGF-c-Met-Signalwegs kommen (Corso *et al.*, 2005). In der Regel wird HGF/ SF in seiner pro-Form sezerniert und kann in dieser Form auch an Proteoglykane der EZM gebunden und dadurch gespeichert werden (Kobayashi *et al.*, 1994; Lyon *et al.*, 1994). Erst nach proteolytischer Aktivierung durch verschiedene Serinproteasen, darunter beispielsweise *urokinase plasminogen activator* (uPA), *tissue-type plasminogen activator* (tPA) oder die Blutgerinnungsfaktoren X, XI und XII, kann HGF an den c-Met-Rezeptor binden (Birchmeier *et al.*, 2003). Allerdings können z.B. Neutrophile Granulozyten intrazellulär gespeichertes pro-HGF bei ihrer Aktivierung und Degranulierung aktivieren und so direkt aktives HGF freisetzen (Grenier *et al.*, 2002). In seiner aktiven Form ist HGF/ SF ein Heterodimer aus einer α - und einer β -Untereinheit, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, wobei die α -Untereinheit aus einer N-terminalen Domäne (N) und vier sog. *kringle*-Domänen (K1-K4) aufgebaut ist, während die β -Untereinheit eine *serin protease homology* (SPH)-Domäne ohne enzymatische Aktivität aufweist (Birchmeier *et al.*, 2003; Benvenuti und Comoglio, 2007). Die Bindung von HGF/ SF an den c-Met-Rezeptor erfolgt über die NK1-Domäne von HGF, vermutlich sind jedoch auch Bereiche der SPH-Domäne an der Interaktion mit dem Rezeptor beteiligt (Birchmeier *et al.*, 2003).

Auch der c-Met-Rezeptor ist ein α - β -Heterodimer, dessen beide Untereinheiten über eine Disulfidbrücke verknüpft sind (Birchmeier *et al.*, 2003; Benvenuti und Comoglio, 2007). Die α -Untereinheit befindet sich extrazellulär, während die β -Untereinheit einen extrazellulären, einen transmembranären und einen cytoplasmatischen Teil besitzt (Birchmeier *et al.*, 2003). Die Bindung des Liganden erfolgt über die α - und einen Teil der β -Untereinheit (Birchmeier *et al.*, 2003). Nach Bindung von HGF an c-Met kommt es

zu der für Rezeptortyrosinkinasen typischen Rezeptordimerisierung und zur Autophosphorylierung von c-Met (Stella und Comoglio, 1999), wodurch die Bindung verschiedener Adaptermoleküle initiiert und schließlich unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktionswege aktiviert werden, wie z.B. der Ras- oder der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg (zusammengefasst in Trusolino und Comoglio, 2002; Birchmeier *et al.*, 2003). In der Folge induziert die HGF-c-Met-Signaltransduktion ein als *invasive growth* bezeichnetes Programm (Benvenuti und Comoglio, 2007), das zu einer Zunahme von Zellwachstum, Migration, Invasion, Angiogenese und einer Hemmung der Apoptose führt (Birchmeier *et al.*, 2003; Benvenuti und Comoglio 2007).

Unter physiologischen Bedingungen ist der HGF-c-Met-Signalweg essentiell für die Entwicklung lebenswichtiger Organe wie der Leber und im adulten Organismus an der Regeneration geschädigter Gewebe beteiligt (Birchmeier *et al.*, 2003). Zahlreiche Krebserkrankungen gehen mit einer aktivierten HGF-c-Met-Signaltransduktion einher, die häufig mit einer schlechten Prognose korreliert (Birchmeier *et al.*, 2003; Gentile *et al.*, 2008). Als vor allem parakrin wirkender Faktor ist HGF/ SF dabei ein wichtiger Mediator zwischen Tumorzellen und ihrer Mikroumgebung (Matsumoto und Nakamura, 2006; Benvenuti und Comoglio, 2007) und kann über verschiedene Mechanismen die Tumorprogression fördern (Desiderio, 2007). So ist beispielsweise eine Beteiligung des HGF-c-Met-Signalwegs an der Reduktion der epithelialen E-Cadherin-Expression bekannt (Desiderio, 2007) sowie an der Induktion proinvasiver Proteasen wie MMPs (Ozaki *et al.*, 2003; Zhou und Wong, 2006) und uPA (Ried *et al.*, 1999; Tacchini *et al.*, 2003). Ebenso kann die Expression von Chemokinrezeptoren durch den HGF-Signalweg beeinflusst werden (Matteucci *et al.*, 2005).

Auch für die prometastatische Wirkung von TIMP-1 ist die Aktivierung des HGF-c-Met-Signalwegs eine Voraussetzung (Kopitz *et al.*, 2007) (s. Kapitel 2.2.3). TIMP-1 induziert auf bislang noch unbekannt Weise einen Anstieg an HGF-Protein in der Leber, fördert aber auch die Expression des c-Met-Rezeptors an der Zelloberfläche, indem dessen ADAM-10-abhängige proteolytische Spaltung und damit die Inaktivierung von c-Met inhibiert wird (Kopitz *et al.*, 2007). Die in der Folge gesteigerte Aktivierung des c-Met-Rezeptors ist für die massive Infiltration einzelner Tumorzellen in das Leberparenchym (sog. *scattering*) notwendig (Kopitz *et al.*, 2007).

2.4 Einfluss Tumor-assoziiierter Immunzellen

Infiltrierende Immunzellen spielen vor allem als Quelle zahlreicher Proteasen (van Kempen *et al.*, 2006), Wachstumsfaktoren oder Zytokine eine Rolle bei der Metastasierung (Wu und Zhou, 2009). Im Hinblick auf die prometastatische Wirkung von TIMP-1 ist hierbei insbesondere die Expression von HGF durch Neutrophile Granulozyten (Grenier *et al.*, 2002) und Makrophagen (Pollard, 2004) interessant, wodurch diese Immunzellpopulationen zum TIMP-1-assoziierten Anstieg an HGF in der Leber (s. Abschnitt 2.2.3) beitragen könnten.

Tatsächlich ist eine Korrelation zwischen erhöhter TIMP-1-Expression und einer erhöhten Expression zweier Markergene Neutrophiler Granulozyten, Neutrophiler Elastase und Cathepsin G, bekannt (Kopitz *et al.*, 2007). Nach ihrer Reifung im Knochenmark zirkulieren Neutrophile Granulozyten im Blutstrom, bis sie im Falle einer Immunantwort aus diesem zirkulierenden Pool in das Gewebe einwandern (Tazzyman *et al.*, 2009). PMNs (*polymorphonuclear neutrophil granulocytes*) stellen die größte Gruppe im Blut zirkulierender Leukozyten und sind bei Infektionen die ersten Abwehrzellen am Krankheitsherd (Coussens und Werb, 2001). Bei verschiedenen Krebserkrankungen konnte eine erhöhte Anzahl an Neutrophilen nachgewiesen werden, teilweise assoziiert mit einer schlechten Überlebensprognose (Murdoch *et al.*, 2008). Häufig kann eine Überexpression von Interleukin-8 (IL-8), einem bedeutenden Chemoattraktans für PMNs, durch Tumorzellen für die verstärkte Neutrophileninfiltration verantwortlich gemacht werden (Murdoch *et al.*, 2008). HGF wird von PMN-Vorstufen während ihrer Reifung im Knochenmark synthetisiert und von reifen Neutrophilen als pro-HGF in intrazellulären Granula (sekretorischen Vesikeln und spezifischen Granula) gespeichert (Grenier *et al.*, 2002). Bei der Degranulierung der PMNs wird pro-HGF durch zelleigene Serinproteasen aktiviert, so dass letztendlich aktives HGF an die Umgebung abgegeben wird (Grenier *et al.*, 2002). Neben HGF speichern einwandernde PMNs in ihren intrazellulären Granula eine Reihe weiterer Faktoren, die normalerweise der Pathogenabwehr, der Induktion einer Immunantwort oder der Geweberegeneration dienen, die jedoch auch die Tumorprogression fördern können (Coussens *et al.*, 2000; Grenier *et al.*, 2002; Murdoch *et al.*, 2008). So wurden tumorassoziierte PMNs gemeinsam mit Makrophagen und Mastzellen als die wichtigste Quelle von MMP-9 in einem murinen Hauttumor-Modell beschrieben (Coussens *et al.*, 2000; auf dem Kempen *et al.*, 2006). Neben einer Reihe weiterer Proteasen (z.B. Serinproteasen wie uPA, Cathepsin G und Proteinase 3

sowie MMPs wie MMP-1, -2 und -8) speichern Neutrophile Granulozyten auch angiogene Faktoren (z.B. VEGF) und verschiedene Zytokine, die in Art einer positiven Rückkopplung die Infiltration weiterer Immunzellen induzieren können (Murdoch *et al.*, 2008). Neben ihrer Tumor-fördernden Wirkung können Neutrophile Granulozyten auch hemmend auf Tumorzellen wirken (Tazzyman *et al.*, 2009): Für verschiedene Zytokine und Faktoren aus Neutrophilen Granulozyten ist ein zytotoxischer Effekt auf Tumorzellen beschrieben; so ist beispielsweise das in azurophilen Granula Neutrophiler Granulozyten gespeicherte Enzym Myeloperoxidase (Witko-Sarsat *et al.*, 2000), das die Umsetzung von Wasserstoffperoxid und Chloridionen zu reaktivem Hypochlorit und Wasser katalysiert (Harrison und Schultz, 1976), ebenso an der Tumorzell-zytotoxischen Wirkung Neutrophiler Granulozyten beteiligt (Clark und Klebanoff, 1975; Slivka *et al.*, 1980) wie verschiedene andere Faktoren wie reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* - ROS), Proteasen und Zytokine wie *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) oder Interleukin-1 β (IL-1 β) (Di Carlo *et al.*, 2001).

Auch Monozyten, die Vorläufer der Makrophagen, werden häufig durch Wachstumsfaktoren und Chemokine, welche von Tumorzellen freigesetzt werden, in Sekundärorgane rekrutiert (Pollard, 2004). Die Anzahl dieser sog. tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) korreliert oft mit einer schlechten Prognose von Krebspatienten (z.B. bei Brust-, Prostata-, Ovarial- und Zervixkrebs) (Pollard, 2004). Durch die Freisetzung angiogener Faktoren wie VEGF, aber auch indirekt z.B. durch die Sezernierung von MMP-9, können TAMs die Tumorangiogenese fördern (Pollard, 2004; Lewis und Pollard, 2006); die Freisetzung weiterer Proteasen wie MMP-7 und *urokinase plasminogen activator* (uPA) fördert die Invasion von Tumorzellen, und von TAMs sezernierte Wachstumsfaktoren (z.B. FGF, HGF und EGF) können Wachstum und Motilität von Tumorzellen verstärken (Pollard, 2004). Ähnlich wie Neutrophile können auch Makrophagen nicht nur fördernd, sondern auch hemmend auf die Tumorprogression wirken. Bislang sind die Faktoren, die diese gegensätzlichen Wirkungen kontrollieren, jedoch noch nicht bekannt (Joyce und Pollard, 2009).

2.5 Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) als ein Regulator der zellulären Stressreaktion

Wie in Kapitel 2.1 dargestellt, sind disseminierende Tumorzellen einer Reihe exogener Stressfaktoren ausgesetzt. Tumorzellen können darauf entweder durch Anpassung

(z.B. Induktion der Angiogenese oder Umstellung des Metabolismus) oder durch Flucht bzw. Invasion und Metastasierung (z.B. Induktion von Proteasen oder promigratorischer Signalwege wie des c-Met-Signalwegs) begegnen (Ruan *et al.*, 2009). In beiden Fällen erfolgt die Reaktion über Genexpressionsänderungen. Ein Transkriptionsfaktor, der die Expression zahlreicher Gene der zellulären Stressreaktion, u.a. auch die von c-Met (Pennacchietti *et al.*, 2003), reguliert, ist der *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1), ein Mitglied der sog. basischen *helix-loop-helix*-Proteine (bHLH) (Pouyssegur *et al.*, 2006). HIF-1 wurde ursprünglich als ein durch Sauerstoffmangel (Hypoxie) induzierbarer Faktor beschrieben, der die Expression von Erythropoietin (EPO) regulierte (Semenza und Wang, 1992). In seiner aktiven Form ist HIF-1 ein Heterodimer aus einer induzierbaren α - und einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit (Harris, 2002). Um als Transkriptionsfaktor aktiv zu sein, muss die cytoplasmatisch exprimierte α -Untereinheit in den Zellkern translozieren, wo die Ausbildung des Heterodimeres mit der β -Untereinheit erfolgt und HIF-1 schließlich an sog. *hypoxia response elements* (HREs) in der Promotorregion von HIF-1-regulierten Genen bindet (Pouyssegur *et al.*, 2006).

Die Regulation der Aktivität von HIF-1 erfolgt über die α -Untereinheit, deren Abbau sauerstoffabhängig reguliert wird und deren Neusynthese sauerstoffunabhängig durch verschiedene Faktoren induziert werden kann (Semenza, 2003).

Die sauerstoffabhängige Regulation von HIF-1 erfolgt auf zwei Wegen über die Hydroxylierung einzelner Aminosäuren von HIF-1 α (Abbildung 2-3). Durch Prolylhydroxylasen (PHDs – *prolylhydroxylase domain proteins*) wird HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen, also bei einem Sauerstoffpartialdruck über 40 mmHg (Thilo-Körner *et al.*, 1992; Bertout *et al.*, 2008), an den beiden Prolinresten 402 und 564 hydroxyliert, wodurch die Interaktion von HIF-1 α mit dem Von-Hippel-Lindau-Protein (VHL) ermöglicht wird. VHL ist die Erkennungsregion einer E3-Ubiquitin-Protein-Ligase, die HIF-1 α für den Abbau über das Proteasom markiert (Semenza, 2003; Pouyssegur *et al.*, 2006). Unter ausreichender Sauerstoffzufuhr ist HIF-1 α mit einer Halbwertszeit von unter fünf Minuten eines der kurzlebigsten zellulären Proteine (Berra *et al.*, 2001). Andererseits wird auch die Interaktion zwischen HIF-1 α und den Koaktivatoren p300 und CBP über einen sauerstoffabhängigen Mechanismus reguliert: Das Enzym *factor inhibiting HIF-1* (FIH-1) hydroxyliert sauerstoffabhängig Asparagin-803 und verhindert dadurch die Interaktion von HIF-1 α mit den beiden Koaktivatoren, wodurch die HIF-1-abhängige Transkription unterbunden wird (Semenza, 2003). PHDs und FIH unterscheiden sich in ihrer Affinität

zu Sauerstoff und dadurch in ihrer Aktivität unter hypoxischen Bedingungen. Durch diese Affinitätsunterschiede wird eine fein regulierte Aktivität von HIF-1 unter abnehmendem Sauerstoffpartialdruck ermöglicht (Pouysségur *et al.*, 2006).

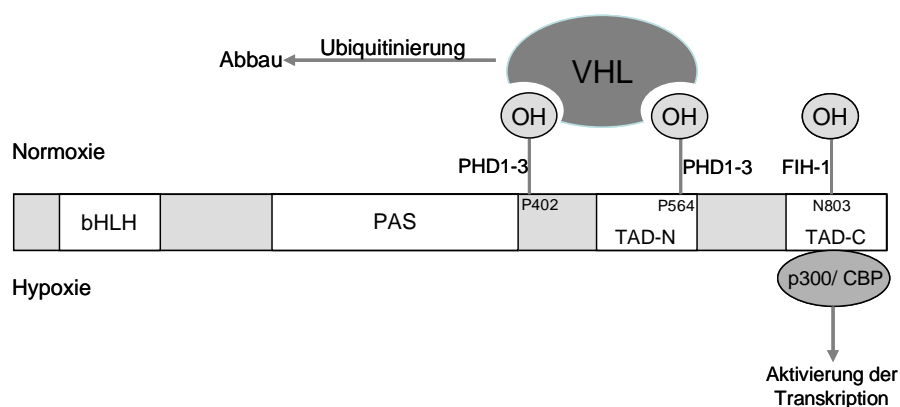


Abbildung 2-3: Sauerstoffabhängige Regulation der HIF-1-Aktivität. O₂ reguliert den Abbau von HIF-1α. Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1α an Prolin-402 und -564 durch Prolylhydroxylasen (PHDs 1-3) hydroxyliert, wodurch das von-Hippel-Lindau-Protein (VHL) binden kann und HIF-1α über das 26S-Proteasom abgebaut wird. Die sauerstoffabhängige Hydroxylierung von Asparagin-803 durch FIH-1 (*Factor inhibiting HIF-1*) verhindert die Bindung von p300 und CBP und verhindert dadurch die HIF-1-abhängige Transkription. Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF-1α weniger hydroxyliert. Die Bindung von VHL ist verringert, wodurch HIF-1α weniger abgebaut wird. Gleichzeitig können p300 und CBP and HIF-1α binden und HIF-1-regulierte Gene transkribiert werden. bHLH, basische Helix-Loop-Helix; PAS, Per-Arnt-Sim; TAD-C, Carboxy-terminale Transaktivierungsdomäne; TAD-N, Amino-terminale Transaktivierungsdomäne (modifiziert nach Semenza, 2003).

Die sauerstoffunabhängige Regulation von HIF-1α erfolgt als Antwort auf die Aktivierung bestimmter Signaltransduktionswege. Sie unterscheidet sich in zwei wesentlichen Merkmalen von der sauerstoffabhängigen Induktion (Semenza, 2003): Zum Einen erfolgt die Induktion Zelltyp-spezifisch, während Hypoxie zu einer HIF-1α-Induktion in allen Zellarten führt; zum Anderen beruht die Induktion auf einer gesteigerten Neusynthese, während Hypoxie über einen verringerten Abbau von HIF-1α wirkt. Im Wesentlichen konnten zwei Signalwege identifiziert werden, über die die Expression von HIF-1α induziert wird (Abbildung 2-4), nämlich der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)- und der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg (zusammengefasst in Semenza, 2003). Bekannte Faktoren, die HIF-1α sauerstoffunabhängig über diese Signalwege induzieren können, sind z.B. *insulin-like growth factor-1/ -2* (IGF-1/ -2) (Feldser *et al.*, 1999; Fukuda *et al.*, 2002), *epidermal growth factor* (EGF) (Zhong *et al.*, 2000; Laughner *et al.*, 2001), Insulin und Interleukin-1β (IL-1β) (Stiehl *et al.*, 2002).

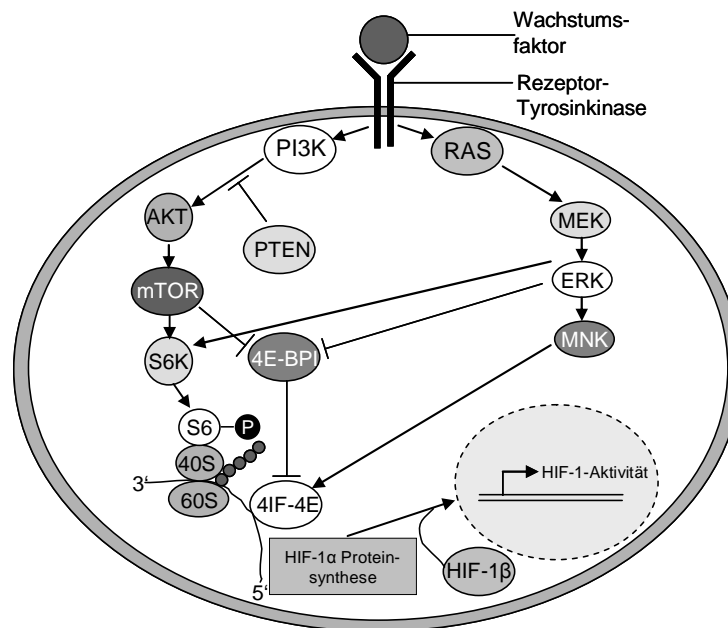


Abbildung 2-4: Sauerstoffunabhängige Regulation der HIF-1 α -Proteinsynthese. Die Bindung eines Wachstumsfaktors an dessen Rezeptor-Tyrosinkinase aktiviert den PI3K- und MAPK-Signalweg. PI3K aktiviert AKT und mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Im MAPK-Signalweg aktiviert MEK ERK. mTOR und ERK phosphorylieren die p70-S6-Kinase (S6K), die über die Phosphorylierung des ribosomalen S6-Proteins und Inhibierung von 4E-BP1 (eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor-4E-bindendes Protein) die Translation von HIF-1 α initiiert. MNK, welches durch ERK aktiviert wird, aktiviert direkt den eIF-4E (eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor-4E) und dadurch die Translation von HIF-1 α (modifiziert nach Semenza, 2003).

Kommt es sauerstoffabhängig oder -unabhängig zur Akkumulation von HIF-1 α im Zytoplasma, so kann HIF-1 nach Translokation der α -Untereinheit in den Zellkern und Heterodimerisierung mit der β -Untereinheit die Transkription regulieren. Bislang sind ca. 100 Gene bekannt, deren Expression durch HIF-1 beeinflusst werden kann (Pouyssegur *et al.*, 2006). Viele dieser Gene haben eine wichtige Funktion bei der Tumorphorprogression. So tragen sie beispielsweise zu 1. Invasion und Metastasierung (z.B. c-Met, MMP-2, uPAR), 2. Angiogenese (VEGF, VEGFR2), 3. Apoptoseresistenz (IGF-2, NOS-2) oder 4. zur metabolischen Anpassung (GLUT-1, GAPDH, CAIX) von Tumorzellen bei (Semenza, 2003). Auf diese Weise ermöglicht die HIF-1-Signaltransduktion Tumorzellen eine bessere Anpassung an Stressbedingungen in ihrer Mikroumgebung (2., 4.) oder die „Flucht“ in Gegenden mit besseren Wachstumsbedingungen (1., 2.). Es überrascht deshalb nicht, dass eine hohe Expression von HIF-1 α in vielen Tumoren mit einer schlechten Überlebensprognose assoziiert ist, so z.B. bei Brustkrebs, Kopf-Hals-Tumoren, Speiseröhren-, Magen- und Lungenkrebs (Vaupel und Mayer, 2007) und auch in Tiermodellen mit einer verstärkten Metastasierung einhergeht (Hiraga *et al.*, 2007). Untersuchungen an Patientenmaterial zeigten, dass hypoxische Regionen ver-

schiedener Tumoren eine erhöhte Expression von Carboanhydrase IX (CAIX) aufweisen (Wykoff *et al.*, 2000). CAIX ist an der Regulation des zellulären pH-Werts beteiligt, und ihre Expression wird fast ausschließlich über HIF-1 reguliert (Wykoff *et al.*, 2000), weswegen die CAIX-Expression häufig als Maß für die transaktivierende Aktivität von HIF-1 herangezogen wird (Airley *et al.*, 2003; Potter und Harris, 2004).

2.6 Metastasierungsmodelle

2.6.1 Übersicht

Um molekulare Mechanismen der Metastasierung besser zu verstehen und darauf basierend neue Therapiestrategien im Kampf gegen Krebs entwickeln zu können, sind reproduzierbare und einfache *In-vivo*-Modelle unerlässlich. Die gängigen Metastasierungsmodelle in Mäusen lassen sich in sog. *spontane* und *experimentelle* Metastasierungsmodelle einteilen (Eccles, 2001).

Bei den Spontanmodellen geht der Metastasierung immer die Ausbildung eines Primärtumors voraus. Dieser Tumor kann beispielsweise durch extravasale Inokulation von Tumorzellen am ursprünglichen Primärherd (orthotop) oder andernorts initiiert werden (Price, 2001). Auch durch genetische Manipulation des Wirts (z. B. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder Aktivierung/ Überexpression von Onkogenen) (Guy und Cardoso, 2001) oder durch Applikation kanzerogener Substanzen können spontan metastasierende Tumoren induziert werden (Krüger *et al.*, 2007). Die von diesen Primärtumoren ausgehende Metastasierung ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, die das Ausmaß der Metastasierung beeinflussen (z.B. Lage, Größe und Aggressivität des Tumors, Proliferationsrate und Angiogenese) (Günthert, 1997; Krüger *et al.*, 2007). Vorteilhaft an den spontanen Metastasierungsmodellen ist, dass sämtliche Schritte der metastatischen Kaskade ablaufen und untersucht werden können (Krüger *et al.*, 2007).

Die sog. experimentellen Metastasierungsmodelle eignen sich besonders zur Beobachtung der späten Phasen der Metastasierung (Zirkulation und Überleben der Tumorzellen im Blutkreislauf, Extravasation, Etablierung von (Makro-) Metastasen, sekundäre Invasion) (Krüger *et al.*, 2007). Bei der experimentellen Metastasierung werden Tumorzellen direkt in das Gefäßsystem der Versuchstiere inokuliert. Dies kann entweder intravenös z.B. in die Schwanzvene (Krüger *et al.*, 1998b) oder auch z.B. intrakardial erfolgen (Krüger *et al.*, 1998b; Krüger *et al.*, 2007). Vorteilhaft bei experimentellen Me-

tastasierungsmodellen sind die gegenüber Spontanmodellen größere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Inokulation einer definierten Anzahl an Tumorzellen zu einem definierten Zeitpunkt bei der experimentellen Metastasierung im Vergleich zur Intravasation einer unbestimmten Anzahl an Zellen zu einem unbestimmten Zeitpunkt bei der Spontanmetastasierung) und die meist kürzere Versuchsdauer.

Aktuelle Studien zeigen, dass die Ablösung einzelner Tumorzellen vom Primärtumor und deren Streuung im Organismus schon zu sehr frühen Zeitpunkten im Verlauf der Tumorprogression erfolgen kann (Husemann *et al.*, 2008), also wahrscheinlich noch vor Diagnosestellung des Primärtumors. Diese Erkenntnis macht deutlich, dass effektive antimetastatische Therapiestrategien nicht primär auf eine Hemmung der Ablösung von Tumorzellen und deren Ausbreitung im Organismus abzielen sollten, sondern vielmehr das Auswachsen extravasierter, evt. ruhend vorliegender Tumorzellen unterdrücken sollten. Diese späten Phasen der Metastasierung, die auch für die Überlebensprognose von Krebspatienten entscheidend sind, können mithilfe experimenteller Metastasierungsmodelle ideal untersucht werden.

Je nach Herkunft der verwendeten Tumorzellen unterscheidet man zwischen *syngen* Modellen, bei denen die Tumorzellen demselben Versuchstierstamm entstammen, wie die Tiere, in die sie inokuliert werden, und *Xenograft*-Modellen (Watson und Morris, 2001). Bei letzteren werden speziesfremde Tumorzellen verwendet (z.B. Inokulation humaner Tumorzellen in Mäuse). Syngene Modelle haben den großen Vorteil, dass keine immunologischen Inkompatibilitäten zwischen Tumorzellen und Wirt auftreten, so dass für die Untersuchungen immunkompetente Tiere verwendet werden können und der Beitrag von Zellen des Immunsystems zur Tumorprogression mit untersucht werden kann. Xenograft-Modelle hingegen ermöglichen die Verwendung humaner Zellen, allerdings in immunsupprimierten Mäusen, was vor allem dann hilfreich ist, wenn die Effizienz neuer Therapeutika, die beim Menschen zur Anwendung kommen sollen, untersucht wird.

2.6.2 L-CI.5s-Modell als mechanistisches Modell der Lebermetastasierung

Für die *In-vivo*-Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit das syngene Modell der experimentellen Lebermetastasierung *lacZ*-markierter L-CI.5s-T-Zell-Lymphomzellen verwendet (Krüger *et al.*, 1994a; Krüger *et al.*, 1994b). Vorteile dieses Modells sind die aufgrund der hohen Aggressivität der L-CI.5s-Zellen kurze Versuchsdauer (in-

nerhalb von sechs bis sieben Tagen bilden sich zahlreiche makrometastatische Foci in der Leber) und die hohe Reproduzierbarkeit (Arlt *et al.*, 2002; Gerg *et al.*, 2008).

Die Vorläuferzelllinien der L-CI.5s-T-Zell-Lymphomzellen sind durch spontane Methylcholanthren-induzierte Tumorigenese in DBA/2-Mäusen entstanden (Schirmmacher *et al.*, 1979). L-CI.5s-Zellen sind deshalb syngen zu diesem immunkompetenten Mausstamm. Die Tumorzellen wurden mittels retroviralen Gentransfers stabil mit dem bakteriellen *lacZ*-Markergen transduziert, das für das Enzym β -Galaktosidase kodiert (Krüger *et al.*, 1994a). Mittels X-Gal-Färbung (Umsetzung des β -Galaktosidase-Substrats 5-brom-4-chlor-3-indoyl- β -D-Galaktopyranosid zu einem Indigofarbstoff) lassen sich *lacZ*-markierte Zellen in Geweben sehr einfach und bis auf Einzelzellebene detektieren (Krüger *et al.*, 1994a; Krüger *et al.*, 1994b), so dass selbst kleinste Mikrometastasen und ruhend (*dormant*) in einem Organ vorliegende Tumorzellen hochspezifisch nachgewiesen werden können (Krüger *et al.*, 1998b). Mit Hilfe *lacZ*-markierter Tumorzellen lässt sich deshalb auch die Effizienz potentieller Krebstherapeutika oder der Einfluss genetischer Modifikationen der Tumorzellen auf das Metastasierungsverhalten untersuchen (Krüger *et al.*, 1998b).

Haupt-Zielorgan der Metastasierung im L-CI.5s-Modell ist die Leber (Krüger *et al.*, 1994a; Krüger *et al.*, 1994b). L-CI.5s-Zellen sind hochaggressiv: Nach intravenöser Inokulation von nur 5000 Tumorzellen bilden sich innerhalb von wenigen Tagen zahlreiche metastatische Foci in der Leber, nach ca. acht bis neun Tagen versterben die Tiere. An Hand des Metastasierungsmusters in der Leber in den ersten acht Tagen nach Tumorzellinokulation lassen sich grob drei Phasen unterscheiden (Abbildung 2-5) (Gerg *et al.*, 2008):

- 1) Eine initiale Phase der Extravasation: Einzelne extravasierte Tumorzellen können im L-CI.5s-Modell schon drei Stunden nach Inokulation der Tumorzellen im Leberparenchym detektiert werden.
- 2) Eine Phase des Auswachsens: Zwischen dem zweiten und fünften Tag nach Inokulation der Tumorzellen nimmt die Größe der metastatischen Foci in der Leber zu.
- 3) Ab Tag sieben nach Tumorzellinokulation sind neben Makrometastasen ($\geq 0,2$ mm) auch sekundär infiltrierte Tumorzellen im Leberparenchym nachweisbar.

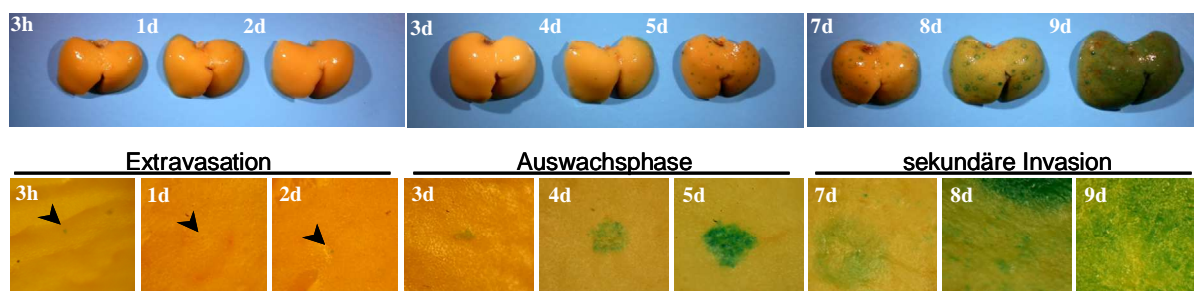


Abbildung 2-5: Unterscheidung verschiedener Phasen im Verlauf der Lebermetastasierung im L-CI.5s-Modell. Nach Inokulation von 5000 L-CI.5s-Zellen in DBA/2-Mäuse wurden zu den angegebenen Zeitpunkten die Lebern entnommen und die Tumorzellen mit X-Gal angefärbt. Oben: Aufsicht auf die medialen Leberlappen. Unten: Nahaufnahmen der Leberoberfläche. Anhand der Makro- (oben) und Mikrometastasierung (unten) können drei Phasen im Verlauf der Lebermetastasierung unterschieden werden (modifiziert aus Gerg *et al.*, 2008).

2.6.3 TIMP-1-Überexpression im L-CI.5s-Modell zur Untersuchung prometastatischer Mechanismen von TIMP-1

Die Verwendung *lacZ*-markierter Tumorzellen ermöglicht auch die Analyse, welche Auswirkungen eine Modulation der Wirtsumgebung auf die Metastasierung hat (Krüger *et al.*, 1998b). Nach moderater adenoviraler Überexpression von TIMP-1 im L-CI.5s-Modell steht ein Tiermodell zur Verfügung, das die bei Patienten mit erhöhten TIMP-1-Spiegeln beobachteten molekularen Veränderungen sehr gut abbildet (Kopitz *et al.*, 2007) und somit ideal geeignet ist, um die molekularen Mechanismen der prometastatischen Wirkung von TIMP-1 zu untersuchen. Ausreichend hohe TIMP-1-Spiegel werden dabei durch intravenöse Inokulation von 2×10^9 pfu eines für TIMP-1 kodierenden Adenovirus erreicht. Bereits drei Tage nach dem Gentransfer ist eine systemisch deutlich erhöhte TIMP-1-Expression in den Mäusen nachweisbar, die mit zahlreichen Veränderungen der Gewebekomöostase einhergeht (Kopitz *et al.*, 2007). Werden diesen Tieren 5000 L-CI.5s-T-Zell-Lymphomzellen intravenös inokuliert, führt die erhöhte TIMP-1-Expression wie in Kapitel 2.2.3 erwähnt zu einem dramatisch veränderten Metastasierungsphänotyp und einer starken Zunahme der Tumorzelllast in der Leber. Aufgrund der Immunogenität der Adenoviren wurden in diesem Modell ursprünglich immunsupprimierte CD1-*nu/nu*-Mäuse verwendet. Jedoch eignet sich das Versuchsprotokoll auch zur adenoviralen Überexpression von TIMP-1 in immunkompetenten DBA/2-Mäusen (AG Krüger unpublizierte Daten; s. auch Michou *et al.*, 1997). Dies ermöglicht die Untersuchung molekularer Mechanismen der TIMP-1-induzierten Metastasierung auch in Anwesenheit eines funktionalen Immunsystems.

3 Zielsetzung

Die Mechanismen der prometastatischen Wirkung des Proteaseinhibitors TIMP-1 sind erst ansatzweise verstanden. Bekannt war schon, dass hohe TIMP-1-Spiegel die Mikroumgebung in der Leber verändern und zur Ausbildung einer prämetastatischen Nische führen und dass die Aktivierung des HGF-c-Met-Signalwegs für die prometastatische Wirkung von TIMP-1 essentiell ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, auf Seiten der Tumorzellen und auf Seiten der Wirtsumgebung weitere Mediatoren der prometastatischen Wirkung von TIMP-1 zu identifizieren, die möglicherweise in den HGF-c-Met-Signalweg eingreifen. Auf Tumorzellseite interessierte v.a. der Transkriptionsfaktor HIF-1, der an der zellulären Anpassung an Stressbedingungen beteiligt und ein Regulator der c-Met-Expression ist. Durch Genexpressionsanalyse sollte untersucht werden, ob erhöhte TIMP-1-Spiegel mit einem Anstieg von HIF-1 α , der regulierten α -Untereinheit von HIF-1, einhergehen, ob es zur Aktivierung der HIF-1-Signaltransduktion kommt und, wenn ja, welchen Beitrag HIF-1 *in vivo* zur TIMP-1-induzierten Metastasierung leistet. Bislang war unklar, ob TIMP-1 einzig durch die Modulation der Mikroumgebung die Metastasierung fördert oder ob TIMP-1 auch einen direkten Einfluss auf das metastatische Potential (also z.B. die Invasivität) von Tumorzellen hat. Ein solcher *direkter* Einfluss von TIMP-1 sollte deshalb *in vitro* untersucht werden. Da bislang die Ursache für die in TIMP-1-transduzierten Tieren beobachtete Zunahme an HGF-Protein im Lebergewebe nicht bekannt war, sollte untersucht werden, ob es TIMP-1-abhängig zu einer gesteigerten HGF-*de-novo*-Synthese in der Leber kommt oder ob auch infiltrierende Immunzellen als Quelle von HGF-Protein in Frage kommen. Genexpressionsanalysen lieferten bereits erste Hinweise, dass erhöhte TIMP-1-Spiegel die Infiltration von Neutrophilen Granulozyten in die Leber möglicherweise verstärken. Es sollte daher untersucht werden, ob TIMP-1 die Migration und Infiltration Neutrophiler Granulozyten in die Leber tatsächlich induziert und hierüber die HGF-Protein-Spiegel in der Leber erhöhen kann. Nach Etablierung eines Protokolls zur Antikörper-vermittelten Depletion Neutrophiler Granulozyten in Mäusen sollte der Beitrag dieser Immunzellpopulation zur TIMP-1-induzierten Metastasierung *in vivo* untersucht werden. Schließlich sollte ein Protokoll zum adenoviral vermittelten *knock down* von c-Met im Wirtsgewebe, auch bei gleichzeitiger Überexpression von TIMP-1, etabliert werden, um gezielt den Beitrag der c-Met-Signaltransduktion im Wirtsgewebe zur Metastasierung untersuchen zu können.

4 Material und Methoden

4.1 Tierexperimentelle Methoden

4.1.1 Versuchstiere

Für die *In-vivo*-Metastasierungsversuche wurden weibliche, 8 - 10 Wochen alte Mäuse verwendet. Die Versuche zur Rolle von HIF-1 α bei der TIMP-1-induzierten Metastasierung wurden in immunkomprimierten CD1-*nu/nu*-Mäusen durchgeführt. Dieser Mausstamm, der durch das Fehlen des Thymus nicht in der Lage ist, T-Zellen zu bilden, wurde in den Charles-River-Laboratorien (Charles River Laboratories, Wilmington, USA) durch Transfer des *nude*-Gens in CD1-Mäuse mittels Kreuzungen und Rückkreuzungen generiert. Für alle anderen *In-vivo*-Experimente wurden immunkompetente DBA/2-Mäuse verwendet. Dieser älteste aller Inzucht-Mausstämme ist syngene zu den applizierten L-CI.5s-Zellen (Krüger *et al.*, 1994a). Alle Tiere wurden über die Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen und unter pathogenfreien Bedingungen gehalten. Zwischen Lieferung der Tiere und Versuchsbeginn verging mindestens eine Woche, um eine Gewöhnung der Tiere an die neue Umgebung sicherzustellen.

4.1.2 Metastasierungsmodell

Die Zuteilung der Versuchstiere zu den einzelnen Versuchsgruppen erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Um die intravenöse Inokulation von adenoviralen Vektoren bzw. Tumorzellen zu erleichtern, wurden die Versuchstiere zur Dilatation der Venen 20 Minuten mit Rotlicht erwärmt. Für die Inokulation in die Schwanzvene wurden 27GA_{7/8}-Kanülen (0,4 x 21 mm, Rose GmbH, Trier) und 1ml-Spritzen (B. Braun, Melsungen) verwendet.

Für alle Versuche mit TIMP-1-Überexpression wurden drei Tage vor Applikation der Tumorzellen je Maus 2×10^9 pfu AdTIMP-1- bzw. AdI70-3-Viren, suspendiert in 200 μ l PBS²⁺ (PBS mit 0,68 mM MgCl₂ und 0,56 mM CaCl₂), intravenös inokuliert.

Für die Versuche zur experimentellen Metastasierung *lacZ*-markierter L-CI.5s-T-Zell-Lymphomzellen bzw. der Subzelllinien L-CI.5s-shNT/ -shHIF wurden die Tumorzellen mit PBS (*phosphate buffered saline*, Biochrom AG, Berlin) gewaschen und auf eine Zellzahl von 250000 Zellen/ ml PBS eingestellt. Nach erneuter Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension auf eine Zellzahl von 25000 Zellen/ ml PBS eingestellt und

die Zellen bis zur Inokulation auf Eis gelagert. Pro Maus wurden 200 µl der Tumorzellsuspension (entspricht 5000 Tumorzellen) in eine der Schwanzvenen inokuliert. Zu den in Abbildung 4-1 angegebenen Zeitpunkten wurden die Versuchstiere entweder durch Genickbruch (für Untersuchungen zur Rolle von HIF-1α) oder durch Kohlendioxid (für alle anderen Versuche) getötet und die Lebern entnommen.

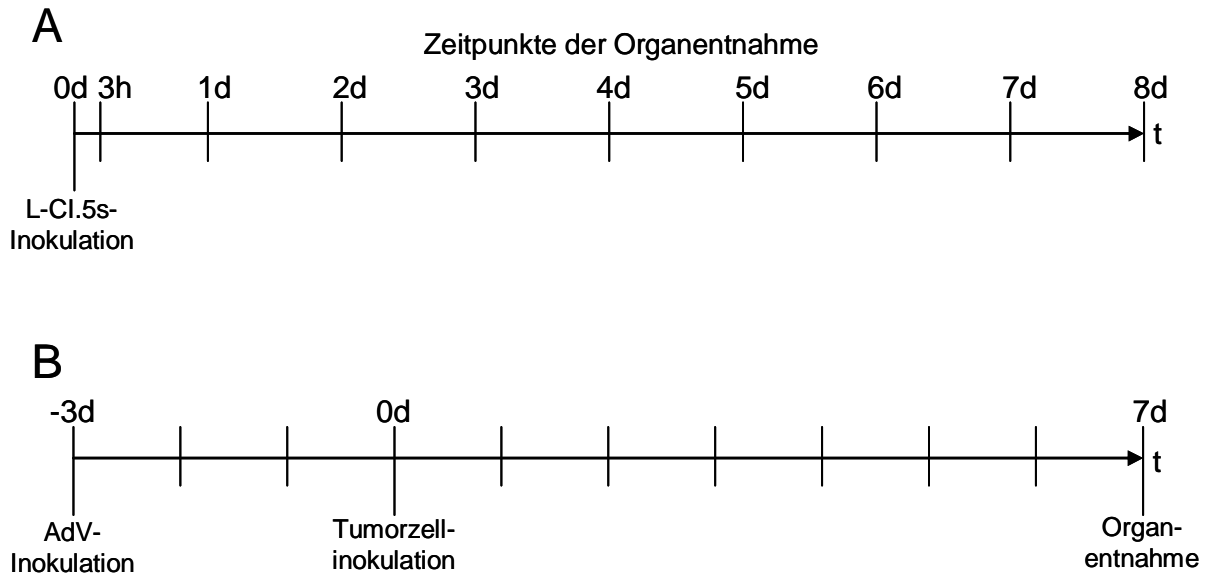


Abbildung 4-1: Inokulations- und Präparationsschemata der Tierversuche. Dargestellt sind die Zeitpunkte der Adenovirus- bzw. Tumorzellinokulation sowie die Zeitpunkte der Organentnahmen. **A**, Zeitverlauf der L-CI.5s-Metastasierung. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach initialer Inokulation von 5000 L-CI.5s-Zellen wurden die Tiere mit CO₂ getötet. **B**, TIMP-1-Modell der experimentellen Metastasierung von L-CI.5s-shNT bzw. L-CI.5s-shHIF-Zellen. Drei Tage nach Virusinokulation wurden die Tumorzellen appliziert, weitere sieben Tage später wurden die Versuchstiere durch Genickbruch getötet und die Lebern entnommen.

Ein Teil des Lebergewebes wurde für biochemische Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren bzw. für histologische Nachweise asserviert. Gewebe für Kryoschnitte wurde dabei direkt in Tissu-Tek[®] (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und bei -80°C gelagert, während Proben für Paraffinschnitte zunächst über Nacht bei 4°C in 2% (V/V) Formaldehyd (Applichem, Darmstadt) in PBS fixiert, nach Standardprotokoll dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet wurden. Die medialen Leberlappen wurden in 2% (V/V) Formaldehyd und 0,2% (V/V) Glutaraldehyd (beides Applichem, Darmstadt) fixiert und für das Anfärben der Metastasen mit X-Gal verwendet (s. 4.1.4.1.1) (Krüger *et al.*, 1994a). Die Quantifizierung der Makrometastasen erfolgte durch Auszählung aller metastatischen Foci ≥ 0,2 mm auf den medialen Leberlappen. Für die Quantifizierung einzelner gestreuter Tumorzellen wurden Kryoschnitte von Lebergewebe angefertigt und mit X-Gal angefärbt (s. 4.1.4.1.2). Gestreute Tumorzellen

außerhalb klar definierbarer metastatischer Foci wurden am Mikroskop ausgezählt und die Anzahl auf die Schnittfläche normalisiert. Zur Bestimmung der Gesamttumorlast in der Leber wurde die mRNA-Expression des *lacZ*-Markergens der Tumorzellen wie in Abschnitt 4.4.3 dargestellt durch quantitative RT-PCR gemessen und auf die Expression von 18S-rRNA normalisiert.

4.1.3 Depletion Neutrophiler Granulozyten

Die Depletion Neutrophiler Granulozyten erfolgte durch zweimalige intraperitoneale Injektion von 250 µl eines gegen murine Neutrophile Granulozyten gerichteten polyklonalen Antiserums aus Kaninchen („anti-PMN“, Accurate Chemical & Scientific Corporation, Westbury, USA) (Davis *et al.*, 1969) im Abstand von 24 Stunden. Das Antiserum, welches gegen das Ly-6G-Oberflächenantigen auf Neutrophilen Granulozyten gerichtet ist, wurde unverdünnt eingesetzt. Kontrolltiere erhielten 250 µl PBS. Ly6-Proteine, zu deren Familie auch *granulocyte receptor-1* (Gr-1) gehört (Daley *et al.*, 2008), werden von Leukozyten exprimiert und sind dort Differenzierungsmarker und vermutlich an der Aktivierung beteiligt (Gumley *et al.*, 1995). Das Ly-6G-Zelloberflächenantigen wird außerhalb des Knochenmarks fast ausschließlich von Neutrophilen Granulozyten exprimiert (Daley *et al.*, 2008) und deshalb auch häufig als Marker Neutrophiler Granulozyten herangezogen (Lieber *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 1998). Für den Fall, dass TIMP-1-überexprimiert wurde, erfolgte die zweite Applikation des Antiserums drei Stunden vor der Inokulation des Virus. L-C1.5s-Tumorzellen wurden wie üblich drei Tage nach der Virusinokulation appliziert (Abbildung 4-2).

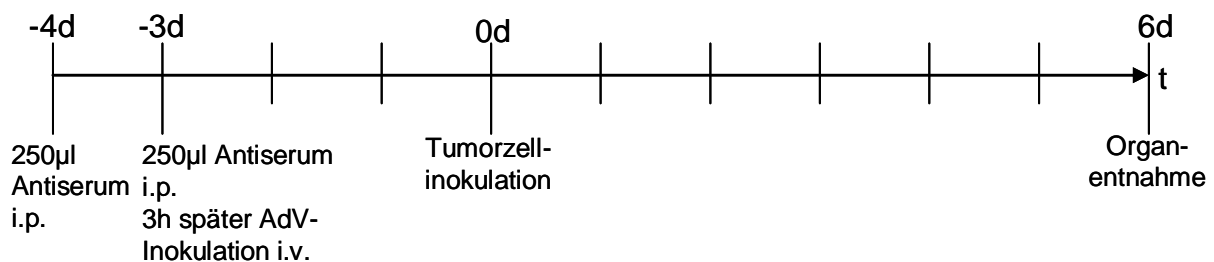


Abbildung 4-2: Inokulations- und Präparationsschema für die Untersuchung des Beitrags Neutrophiler Granulozyten zur TIMP-1-induzierten Metastasierung. 27 und drei Stunden vor dem adenoviralen Gentransfer von TIMP-1 wurden je Maus 250 µl des anti-PMN-Antiserums i.p. inokuliert. Drei Tage nach Adenovirusinokulation folgte die Applikation der Tumorzellen. Weitere sechs Tage später wurden die Versuchstiere getötet.

Die Kontrolle der Depletionseffizienz erfolgte immunzytochemisch im Blut. Hierzu wurde bei der Präparation der Tiere aus der Mesenterialvene Blut entnommen. Um die Blutgerinnung zu verhindern, wurde die verwendete Spritze zuvor mit Heparin (Heparin-Natrium 250000, Ratiopharm, Ulm) gespült und ein Tropfen Heparin in Spritze und Kanüle belassen. Das Blut wurde anschließend in der Tischzentrifuge 10 min bei 3500 U/ min und 4°C zentrifugiert und der (Plasma-) Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde zur Lyse der Erythrozyten in 2 ml Erythrozyten-Lyselösung (s. Tabelle 4-1) resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse wurde anschließend durch Zugabe des 5- bis 10-fachen Volumens an PBS abgestoppt, die Zellen erneut abzentrifugiert (5 min, 3500 U/ min, 4°C) und der Überstand verworfen. Falls das Pellet nach dem Zentrifugieren durch verbliebene Erythrozyten noch rot gefärbt war, wurde der gesamte Lyseschritt wie beschrieben wiederholt. Die Zellen wurden ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und im Anschluss gezählt. Für die Zytospins wurde die Zellzahl auf 300000 Zellen/ ml eingestellt und je 500 µl der Zellsuspension in einer Zytospin-Zentrifuge auf Objektträger übertragen (400 U/ min, 5 min, RT).

Tabelle 4-1: Zusammensetzung der Erythrozyten-Lyselösung

Lösung 1	Lösung 2	Lösung 3	Gebrauchslösung
35 g NH ₄ Cl	0,42 g MgCl ₂ ·6H ₂ O	2,25 g NaHCO ₃	7 Teile H ₂ O _{dest.}
1,85g KCl	0,14 g MgSO ₄ ·7H ₂ O	in 1000 ml H ₂ O _{dest.}	4 Teile Lösung 1
1,5 g Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	in 1000 ml H ₂ O _{dest.}		1 Teil Lösung 2
0,119 g KH ₂ PO ₄			1Teil Lösung 3
5 g Glukose			
in 1000 ml H ₂ O _{dest.}			

Für den immunzytochemischen Nachweis der Neutrophilen Granulozyten wurden die Zytospins zunächst 10 min in eiskaltem Aceton fixiert, anschließend 10 min an der Luft getrocknet und für 10 min in *TRIS-buffered saline* (TBS) rehydriert. Endogene Peroxidasen wurden für 5 min mit 0,3% H₂O₂ (Sigma-Aldrich, München) in Methanol (Applchem, Darmstadt) blockiert und anschließend die Zytospins zweimal in TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (anti-Maus Ly-6G NIMP-R14, 1:50 in TBS verdünnt; Hycult Biotechnology, Beutelsbach) erfolgte über Nacht bei 4°C. Vor der 45-minütigen Inkubation mit dem Zweitantikörper (biotinylierter anti-Ratten-Antikörper-

Antikörper 1:100 in TBS; Dako, Hamburg) wurden die Zytospins zweimal 5 min mit TBS gewaschen. Nach erneutem Waschen (2 x 5 min) wurde der *horseradish-peroxidase* (HRP)-Komplex (Dako, Hamburg) zugegeben und für 30 min auf den Zytospins belassen. Die Farbentwicklung erfolgte mit Aminoethylcarbazol (AEC, Dako, Hamburg) so lange, bis die Zytospins sich rötlich verfärbten (ca. 3 min). Im Anschluss daran wurde mit Aq. dest. gewaschen, 30 sek mit Hämalaun gegengefärbt, zehn Minuten gewässert und anschließend mit Glycerin-Gelatine (Kaiser's Glycerin-Gelatine, Merck, Darmstadt) eingedeckt. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop durch Auszählen Ly-6G-positiver und -negativer Zellen.

4.1.4 Histochemische Methoden

4.1.4.1 X-Gal-Färbung

Für die Anfärbung *lacZ*-markierten Tumorzellen in Organen bzw. auf Kryoschnitten mit X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid; Fermentas, St.Leon-Rot) wurde unmittelbar vor Verwendung eine Gebrauchslösung aus einem Teil X-Gal-Stammlösung und 39 Teilen Färbelösung hergestellt (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: Zusammensetzung der für die X-Gal-Färbung benötigten Lösungen

X-Gal-Stammlösung	Färbelösung	Gebrauchslösung
40 mg/ ml (M/V) X-Gal in Dimethylformamid (Sigma-Aldrich, München)	1,64 g $K_3Fe(CN)_6$ 2,10 g $K_4Fe(CN)_6$ 2 ml 1 M $MgCl_2$ 1 ml 10 % Natrium-Deoxycholat 2 ml 10 % NP40 in 1000 ml PBS, pH 7,1	1 T X-Gal-Stammlösung 39 T Färbelösung

4.1.4.1.1 X-Gal-Färbung von Organen

Die medialen Leberlappen wurden unmittelbar nach der Entnahme aus dem Versuchstier mit PBS gewaschen und für 1,5 Stunden in einer Fixierlösung aus 2% (V/V) Formaldehyd und 0,2% (V/V) Glutaraldehyd (beides Applichem, Darmstadt) in PBS fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die eigentliche Färbung erfolgte mit der in Tabelle 4-2 beschriebenen Gebrauchslösung in Anwesenheit von Luft-sauerstoff für vier bis sieben Stunden bei 37°C und anschließend über Nacht bei 4°C.

Am nächsten Morgen wurden die Organstücke mit PBS gewaschen und zur weiteren Fixierung und Lagerung mit Fixierlösung aus 2% (V/V) Formaldehyd (Applichem, Darmstadt) in PBS versetzt.

4.1.4.1.2 X-Gal-Färbung von Kryoschnitten

8 µm dicke Kryoschnitte von Lebergewebe wurden luftgetrocknet und anschließend für zehn Minuten mit 2% (V/V) Formaldehyd/ 0,2% (V/V) Glutaraldehyd (beides Applichem, Darmstadt) in PBS fixiert, mit PBS gewaschen, für 10 min mit einer Lösung aus 2 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich, München), 0,01% (V/V) Natriumdeoxycholat (Sigma-Aldrich, München) und 0,02% (V/V) Nonidet-P40 (Sigma-Aldrich, München) in PBS permeabilisiert und anschließend die Tumorzellen über Nacht bei 37°C mit der in Tabelle 4-2 beschriebenen Gebrauchslösung inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und mit Glycerin-Gelatine (Kaiser's Glycerin-Gelatine, Merck, Darmstadt) eingedeckt.

4.1.4.2 Immunhistochemie auf Paraffinschnitten

Für die immunhistochemische Anfärbung von HIF-1α oder PCNA wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte von Lebergewebe hergestellt, auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Die Entparaffinierung erfolgte durch eine absteigende Alkoholreihe in Roticlear[®] (3 x 3 min) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), 100% Ethanol (2 x 3 min) und 90% Ethanol (2 x 3 min); anschließend wurde in Aq. bidest. gespült. Die Antigenmaskierung erfolgte durch 10-minütiges Kochen der Schnitte in der Mikrowelle in 0,01 M Zitronensäurelösung (pH 6,0). Nach 15-minütigem Abkühlen wurden endogene Peroxidasen für 5 min mit 3% H₂O₂ in Aq. bidest. blockiert, danach kurz in Aq. bidest. gespült und 5 min in TBS inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer (Verdünnungen s. Tabelle 4-3, jeweils in TBS). Am nächsten Tag wurden die Schnitte 2 x 5 min in TBS-0,1%Tween-20 (TBS-T) gewaschen. Die Detektion des gebundenen Primärantikörpers erfolgte mit dem *Cell and Tissue Staining Kit* (R&D Systems, Wiesbaden). Die Inkubation mit dem vom Hersteller gebrauchsfertig mitgelieferten Sekundärantikörper erfolgte für 45 min bei RT in einer feuchten Kammer. Nach 3 x 5 min Waschen in TBS-T wurde 30 min mit der ebenfalls gebrauchsfertigen Lösung des *high sensitivity horseradish peroxidase-Komplexes* (HSS-HRP) inkubiert und anschließend 2 x 5 min in TBS-T gewaschen. Die Farbentwicklung erfolgte mit Diaminobenzidin (DAB, Dako, Hamburg) für ca.

30 Sekunden. Anschließend wurde für 30 Sekunden mit Hämalaun gegengefärbt und die Schnitte mit Glycerin-Gelatine (Kaiser's Glycerin-Gelatine, Merck, Darmstadt) eingedeckt.

Tabelle 4-3: Für die Immunhistochemie auf Paraffinschnitten verwendete Antikörper

Antigen	Antikörper und Verdünnung
mu-HIF-1 α	Kaninchen-anti-Maus-HIF-1 α NB100-449 (Novus Biologicals), 1: 100
mu-PCNA	Kaninchen-anti-Maus-PCNA (Abcam), 1:2000

4.1.4.3 Immunhistochemie auf Kryoschnitten

Für den Immunhistochemischen Nachweis Neutrophiler Granulozyten wurden 8 μ m dicke Kryoschnitte von Lebergewebe angefertigt, an der Luft getrocknet, 10 min in eiskaltem Aceton (Applichem, Darmstadt) fixiert und erneut an der Luft getrocknet, bevor die Schnitte 10 min in TBS rehydriert wurden. Es folgten ein 10-minütiger Avidin-Block und ein ebenso langer Biotin-Block (*Cell and Tissue Staining Kit*, R&D Systems, Wiesbaden), jeweils gefolgt von 10 min Waschen in TBS. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (s. Tabelle Tabelle 4-4, Verdünnung jeweils in TBS) erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Am folgenden Tag wurde 2 x 5 min in TBS gewaschen. Im Falle der Ly-6G-Färbung erfolgte anschließend die 45-minütige Inkubation mit dem Zweitantikörper (*Cell and Tissue Staining Kit*, R&D Systems, Wiesbaden) und nach zweimaligem Waschen in TBS à 5 min die 30-minütige Inkubation mit dem HSS-HRP-Komplex (*Cell and Tissue Staining Kit*, R&D Systems, Wiesbaden). Beide Schritte entfielen beim Nachweis von Myeloperoxidase (MPO) mit dem biotinylierten anti-MPO-Antikörper. Die Farbentwicklung erfolgte mit Diaminobenzidin (DAB, *Cell and Tissue Staining Kit*, R&D Systems, Wiesbaden) für ca. 3 bis 10 min. Im Anschluss wurde für 30 Sekunden mit Hämalaun gegengefärbt und die Schnitte mit Glycerin-Gelatine (Kaiser's Glyceringelatine, Merck, Darmstadt) eingedeckt.

Tabelle 4-4: Für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz auf Kryoschnitten verwendet Antikörper

Antigen	Antikörper und Verdünnung
mu-Ly-6G	Ratten-anti-Maus-Ly-6G Klon NIMP-R14 (Hycult Biotechnology), 1:50
mu-MPO	biotinylierter Maus-anti-Maus-MPO-Antikörper 8F4 (Abcam), unverdünnt
mu-phospho-c-Met	Kaninchen-anti-Maus-phospho-c-Met (StressGen), 1:50

4.1.4.4 Immunfluoreszenzfärbung auf Kryoschnitten

Der Nachweis von phospho-c-Met erfolgte über Immunfluoreszenzfärbung. Hierzu wurden 8 µm dicke Kryoschnitte von Lebergewebe angefertigt, an der Luft trocknen gelassen mit eiskaltem Aceton 10 min fixiert und anschließend 10 min in TBS rehydriert. Die Inkubation mit dem 1:50 in TBS verdünnten anti-phospho-c-Met-Antikörper (StressGen) erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Schnitte wurden anschließend 2 x 10 min in TBS-T gewaschen und mit einem Alexa-Fluor-488-markierten Zweitantikörper (gegen Kaninchenantikörper) (Molecular Probes) in einer 1:200-Verdünnung inkubiert. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2'-phenylindol (DAPI, Applichem, Darmstadt) (6,7 µg/ml) angefärbt und die Schnitte mit Mowiol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) eingedeckt. Die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop erfolgte direkt im Anschluss.

4.1.4.5 *In-situ*-Hybridisierung

Die mRNA-Expression von murinem TIMP-1 wurde mittels *In-situ*-Hybridisierung auf Paraffinschnitten nachgewiesen. Zur Zerstörung von RNasen wurden, soweit möglich, alle verwendeten Gerätschaften 4 h bei 280°C behandelt. Geräte, die nicht heißluftsterilisiert werden konnten, wurden mit 2% (V/V) AbSolve[®] (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) behandelt. Alle wässrigen Lösungen bis zur Posthybridisierung wurden unter Verwendung von RNase-freiem Aq. bidest. hergestellt. Die verwendeten Objektträger wurden vor der Verwendung 60 min mit 5 ml 3-Aminopropyltriethoxysilan (Sigma-Aldrich, München) in 250 ml Aceton (Applichem, Darmstadt) silanisiert, anschließend 10 min mit Wasser gewaschen und im Anschluss über Nacht bei 60°C getrocknet. 3,5 bis 7 µm dicke Paraffinschnitte wurden wie unter 4.1.4 beschrieben angefertigt und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert. Die Entparaffinierung erfolgte für 2 x 10 min in Roticlear[®] (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), die anschließende Rehydrierung 5 min in 100% Ethanol, 5 min in 95% Ethanol und 5 min in 70% Ethanol. Im Anschluss wurde zweimal in Wasser gewaschen. Für die sog. Prähybridisierung wurden die Schnitte 2 x 5 min in PBS und danach 2 x 5 min PBS/ 100 mM Glycin (Sigma-Aldrich, München) inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine 15-minütige Inkubation in PBS-0,3% (V/V) Triton X-100 (Applichem, Darmstadt), nach der 2 x 5 min mit PBS gewaschen wurde. Die Permeabilisierung wurde für 30 min bei 37°C in einer Lösung aus 20 µg/ml RNase-freier Proteinase K (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in Tris-EDTA (TE)-Puffer durchgeführt, danach wurde bei 4°C 5 min mit 4% (M/V) Paraformaldehyd in PBS nachfixiert und

2 x 5 min mit PBS gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte für 2 x 5 min die Acetylierung in 0,25% (V/V) Essigsäureanhydrid (Sigma-Aldrich, München) in 0,1 M Triethanolamin-Puffer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Vor der Hybridisierung wurde 10 min bei 37°C in Prähybridisierungspuffer (50% (V/V) deionisiertes Formamid (Applichem, Darmstadt) in 4x-SSC-Puffer) inkubiert. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte mit ca. 50 ng der Digoxin-markierten RNA-Sonde in Hybridisierungspuffer (40% (V/V) deionisiertes Formamid, 5% (M/V) Dextransulfat, 1x-Denhard's-Lösung, 4x-SSC-Puffer, 10 mM DTT, 1 mg/ml Hefe-t-RNA (Roche Applied Sciences), 1 mg/ml denaturierte und gescherte Lachssperma-DNA) über Nacht bei 42°C. Ab dem folgenden Schritt musste nicht mehr RNase-frei gearbeitet werden. Am nächsten Morgen wurde 2 x 15 min mit 2x-SSC-Puffer bei 37°C und anschließend 15 min mit 1x-SSC-Puffer gewaschen. Ungebundene Einzelstrang-RNA wurde während 30 min bei 37°C mit 20 µg/ml RNaseA in NTE-Puffer verdaut, danach nochmals 2 x 30 min bei 37°C mit 50% (V/V) Formamid in 1x-SSC-Puffer gewaschen. Der Nachweis der gebundenen, Digoxin-markierten Sonde erfolgte immunhistochemisch. Hierzu wurde zunächst 2 x 10 min in TBS gewaschen und danach während 30 min unspezifische Bindungen mit 5% (V/V) Ziegen Serum in TBS-T blockiert. Die Inkubation mit dem 1:5000 in TBS-T/ 1% (V/V) Ziegen Serum verdünnten Anti-Digoxin-Antikörper (Roche Applied Sciences) erfolgte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurde 2 x 30 min mit TBS gewaschen und anschließend 10 min mit Substratpuffer (100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) inkubiert. Die Farbsubstrat-Lösung, bestehend aus 10 ml Substratpuffer, 45 µl NBT-Lösung (75 mg/ml, Applichem, Darmstadt), 70 µl BCIP-Lösung (25 mg/ml, Roche Applied Sciences), 12 µl Levamisol-Lösung (0,8 M) wurde auf die Schnitte gegeben und für ca. 2 bis 4 Stunden im Dunkeln in einer feuchten Kammer auf den Schnitten belassen. Durch 5-minütige Inkubation in Wasser wurde die Farbreaktion abgestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte für ca. 1 min mit Kernechtrot. Nach erneutem zweimaligem Waschen in Wasser wurden die Schnitte mit Glycerin-Gelatine (Kaiser's Glycerin-Gelatine, Merck, Darmstadt) eingedeckt.

Sonde:

sense

```
5'GGATCCCCCTGGCCCCCTTTGCATCTCTGGCATCTGGCATCCGCTTGTTGCTATCACTGATAGCTT  
CCAGTAAGGCCTGTAGCTGTGCCCCACCCACCCACAGACAGCCTTCTGCAACTCGGACCTGGTCA  
TAAGGGCTAAATTCATGGGTTCCCCAGAAATCAACGAGACCACCTTATACCAGCGTTATAAGATCAA  
GATGACTAAGATGCTAAAAGGATTCAAGGCTGTGGGAAATGCCGAGATAGCTTAT3'
```

antisense

5'ATAAGCTATCTGCGGCATTTCCCACAGCCTTGAATCCTTTTAGCATCTTAGTCATCTTGATCTTATAA
CGCTGGTATAAGGTGGTCTCGTTGATTTCTGGGGAACCCATGAATTTAGCCCTTATGACCAGGTCCG
AGTTGCAGAAGGCTGTCTGTGGGTGGGTGGGGCACAGCTACAGGCCTTACTGGAAGCTATCAGTGA
TAGCAACAAGAGGATGCCAGATGCCAGAGATGCAAAGGGGCCAGGGGATCCA3'

Tabelle 4-5: Für die *In-situ*-Hybridisierung benötigte Reagenzien und Lösungen

Lösung/ Reagens	Zusammensetzung
BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolyphosphat) (Ap- plichem)	250 mg in 10 ml Dimethylformamid lösen
NBT (4-Nitro-blau-tetrazoliumchlorid) (Roche Ap- plied Sciences)	in 70% Dimethylformamid gelöst
NTE-Puffer (pH 8,0)	500 mM NaCl 10 mM Tris 1 mM EDTA
Substratpuffer:	100 mM Tris-HCl (pH 9.5) 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Zelllinien und Medien

Die Generierung der murinen L-Cl.5s-T-Zell-Lymphomzellen wurde in Kapitel 2.6.2 bereits beschrieben (Schirrmacher *et al.*, 1979; Krüger *et al.*, 1994a; Krüger *et al.*, 1994b). Bei CT26L-Zellen handelt es sich um adhären wachsende murine, durch Behandlung mit N-nitroso-N-methylurethan induzierte, undifferenzierte Kolorektalkarzinomzellen (ATCC, Manassas, USA). Die humane Fibrosarkomzelllinie HT1080 wurde von Rasheed *et al.* generiert (Rasheed *et al.*, 1974). HT1080-Zellen wachsen adhären und weisen ein aktiviertes N-*ras*-Onkogen auf (Geiser *et al.*, 1989). Auch die humane Magenkarzinomzelllinie GTL-16 wächst adhären. Es handelt sich hierbei um eine klonale Zelllinie, die von einer kaum differenzierten Magenkarzinomzelllinie abstammt (Giordano *et al.*, 1988a; Giordano *et al.*, 1988b). Für die Amplifikation und Titration der verwendeten Adenoviren wurden humane embryonale Nierenzellen, HEK (*human embryonic kidney*)-293-Zellen, verwendet (Hitt *et al.*, 1995). HEK-293-Zellen wurden von Graham *et al.*

durch Insertion gescherter Ad5-DNA in humane embryonale Nierenzellen generiert (Graham *et al.*, 1977). HEK-293-Zellen exprimieren stabil die E1-Region des Ad5-Virus und eignen sich deshalb als adenovirale Verpackungszelllinie für E1-deletierte Adenoviren (Amalfitano *et al.*, 1998; Schneider und French, 1993). Für die Herstellung lentiviraler Partikel wurden adhärent wachsende 293T-Zellen verwendet. Diese Zelllinie, die von HEK-293-Zellen abstammt, exprimiert stabil das *simian virus 40* (SV-40)-T-Antigen (Pear *et al.*, 1993; DuBridge *et al.*, 1987). Dies ermöglicht die effiziente episomale Replikation transfizierter Plasmide, die einen SV-40-*origin of replication* aufweisen (Pear *et al.*, 1993).

Alle Zelllinien wurden unter Standardbedingungen bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert und dreimal wöchentlich passagiert. Die Kultivierung der in Suspension wachsenden L-CI.5s-Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen, alle anderen Zellen wurden auf Zellkulturschalen gehalten (beides TPP, Trasadingen, Schweiz).

Tabelle 4-6: Zellkulturmedien für die verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Medium
L-CI.5s L-CI.5s-shNT/ shHIF	RPMI 1640 ¹ , 10% (v/v) FKS (PAA Gold ²), 50 µM β-Mercaptoethanol ³ , 10 mM Hepes ¹ , 2 mM L-Glutamin ¹ , 0,55 mM Asparagin ³ , 0,27 mM Arginin ³
CT26L	RPMI 1640 ⁴ , 10% (v/v) FKS (PAN)
HT1080	DMEM ¹ , 10% (v/v) FKS (PAN), 10 mM Hepes ¹ , 2 mM L-Glutamin ¹ , 0,55 mM Asparagin ³ , 0,27 mM Arginin ³
GTL-16	RPMI 1640 ¹ , 10% (v/v) FKS (PAN), 2 mM L-Glutamin ¹
HEK-293	DMEM ¹ , 10% (v/v) FKS (PAA Gold ²), 2 mM L-Glutamin ¹
293T	DMEM ¹ , 10% (v/v) FKS (PAN), 10 mM Hepes ¹ , 2 mM L-Glutamin ¹ , 0,55 mM Asparagin ³ , 0,27 mM Arginin ³

¹Biochrom AG, Berlin; ²PAA Gold, PAA Laboratories, Pasching; ³Sigma-Aldrich, München; ⁴Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe

4.2.2 Lentivirale Transduktion von Zellen

L-CI.5s-shNT-, -shHIF- und CT26L-shNT- und -shHIF-Zellen wurden durch lentiviralen Gentransfer von small-hairpin-RNA-Sequenzen, die gegen die mRNA von HIF-1α (-shHIF) gerichtet waren bzw. keine Zielsequenz im Maus-Transkriptom aufwiesen (-shNT, *non target*), generiert. Die die shRNA-Sequenzen enthaltenden pLKO.1-puro-

Transferplasmide wurden käuflich erworben (Sigma-Aldrich, München). Die lentiviralen Partikel wurden durch Kotransfektion des jeweiligen Transferplasmids mit lentiviralen Helferplasmiden des ViraPower™ lentiviralen Expressionssystems (Invitrogen, Karlsruhe) in 293T-Zellen generiert. Hierzu wurden am Vortag der Kotransfektion 5×10^6 293T-Zellen pro 10-cm-Schale ausgesät. 24 h später wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 3 h die Kotransfektion durchgeführt. Die Kotransfektion erfolgte mit Hilfe von Lipofectamine 2000™ (Invitrogen, Karlsruhe). 1,5 ml OptiMem-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) wurden mit 36 µl Lipofectamine versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden zu 1,5 ml OptiMem-Medium 10 µg des pLKO.1-puro-Transferplasmids, 6,6 µg pLP1, 5 µg pLP2 und 3 µg pLP-VSVG gegeben (alle Plasmide außer den Transferplasmiden aus dem ViraPower™ lentiviralen Expressionssystem von Invitrogen). Die OptiMem-Lipofectamine-Lösung wurde mit der OptiMem-DNA-Lösung gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 10 ml OptiMem mit 10% FKS (Pan) auf die 293T-Zellen gegeben. Nach der Inkubation wurde die OptiMem-Lipofectamine-DNA-Mischung tropfenweise zu den 293T-Zellen gegeben. Wurde der Virusüberstand für die Infektion adhärenter Zellen verwendet, erfolgte 6 h nach der Kotransfektion ein Mediumwechsel (Zugabe von 293T-Komplettmedium). Die Infektion der L-CI.5s-Zellen erfolgte über 48 h in Kokultur mit den Virus-produzierenden 293T-Zellen. CT26L-Zellen wurden für 2 h mit Virusüberstand infiziert, anschließend wurde frisches Kulturmedium zugegeben und für weitere 46 h inkubiert. Alle Infektionen erfolgten unter Zusatz von 8 µg/ml Polybrene® (Sigma-Aldrich, München). Erfolgreich transduzierte Zellen wurden durch die Behandlung mit Puromycin (Sigma-Aldrich, München) selektioniert.

4.2.3 Inkubation von Zellen mit rekombinantem TIMP-1

Für die *in-vitro*-Inkubationsversuche wurde rekombinantes humanes TIMP-1 (entweder R&D Systems, Wiesbaden oder Peprotech, Hamburg) verwendet. Adhärente Zellen wurden 24 h vor der Inkubation ausgesät (s. Tabelle 4-7), Suspensionszellen (L-CI.5s) wurden unmittelbar vor der Inkubation auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Vor der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS (Biochrom AG, Berlin) gewaschen. Die Inkubation selbst erfolgte für eine Stunde in Serum-freiem Zellkulturmedium (s. Tabelle 4-6) unter Standard-Kulturbedingungen. Die optimal wirksame Konzentration an TIMP-1 wurde individuell für jede Zelllinie ermittelt. Getestet wurden jeweils 350, 700 und 1400 ng/ml rekombinantes TIMP-1. Für die eigentlichen Versuche wurden folgende

Konzentrationen verwendet: für CT26L und GTL-16 350 ng/ ml; L-CI.5s 700 ng/ ml; HT1080 1400 ng/ ml. Nach der Inkubation wurden die Zellen vor der Verwendung für weitere Versuche oder Analysen wiederum zweimal mit PBS gewaschen.

Tabelle 4-7: Für die Inkubation mit rekombinantem TIMP-1 verwendete Zelldichten und eingesetzte TIMP-1-Konzentrationen

Zelllinie	Verwendete Zelldichte	Eingesetzte TIMP-1-Konzentration
L-CI.5s/ L-CI.5s-shNT/ -shHIF	2 x 10 ⁶ Zellen/ ml	700 ng/ ml
CT26L/ CT26L-shNT/ -shHIF	1 x 10 ⁶ Zellen/ 6-Well	350 ng/ ml
HT1080	4 x 10 ⁵ Zellen/ 6-Well	1400 ng/ ml
GTL-16	3 x 10 ⁵ Zellen/ 12-Well	350 ng/ ml

4.2.4 Invasionsversuche mit TIMP-1-behandelten Tumorzellen

Für die *in-vitro*-Invasionsversuche wurden die Zellen in Transwell®-Inserts (Corning, Kaiserslautern) ausgesät (Porenweite 3 µm für L-CI.5s- und CT26L-Zellen; 8 µm für HT1080- und GTL-16-Zellen), die zuvor mit 78 µg/ cm² einer künstlichen EZM (Matrigel™; BD Biosciences, Heidelberg) beschichtet worden waren. Adhärenz Zellen wurden zunächst in Serum-haltigem Medium auf das Matrigel ausgesät und bis zur ausreichenden Adhäsion 6 bis 8 Stunden gewartet. Anschließend wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS (Biochrom AG, Berlin) gewaschen und für eine Stunde mit rekombinantem TIMP-1 inkubiert (Konzentration s. Tabelle 4-7). Nach erneutem Waschen wurde die Invasion durch Aufbau eines Serum-Gradienten (Serum-freies Medium im oberen Kompartiment, Zellkulturmedium mit 10% FKS im unteren Kompartiment) gestartet. 48 Stunden (bzw. 24 h für CT26L-shNT/ -shHIF) später wurden Matrigel und Zellen auf der Oberseite der Membran entfernt und die an der Unterseite der Membran haftenden Zellen mit 4',6-Diamidin-2'-phenylindol (DAPI, 6,7 µg/ ml in PBS, Applichem, Darmstadt) angefärbt. Die Zellen in einem definierten Bereich der Membran wurden am Mikroskop ausgezählt. Suspensionszellen (L-CI.5s) wurden für eine Stunde mit TIMP-1 inkubiert, gewaschen und erst anschließend in die Inserts ausgesät. Nach 48 Stunden wurde die Gesamtzahl invadierter Zellen im Medium des unteren Kompartiments ermittelt.

4.2.5 Isolation Neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark

Neutrophile Granulozyten wurden aus dem Knochenmark von DBA/2-Mäusen isoliert. Hierzu wurden Femur und Tibia beider Hinterbeine entnommen, von Muskulatur und Sehnen befreit und in 70%-igem (V/V) Ethanol desinfiziert. Alle weiteren Schritte wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Die Epiphysen wurden mittels eines Skalpell abgetrennt und die Knochenmarkszellen mit PBS (Biochrom AG, Berlin) herausgespült. Nach gründlichem Resuspendieren wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min; 1200 U/min; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in einer hypotonen Lösung zur Lyse der Erythrozyten (Erythrozyten-Lyselösung s. Tabelle 4-1) aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden zehn bis 30 ml PBS zugegeben und erneut zentrifugiert. Es folgte ein zweiter Waschschrift mit PBS. Anschließend wurden die Zellen in PBS resuspendiert und auf eine Zellzahl von $3\text{-}5 \times 10^7$ Zellen/ ml eingestellt. Pro Milliliter der Zellsuspension wurden 9 ml Percoll-Gradientlösung (1 ml 20 x -PBS, 1 ml Wasser und 18 ml Percoll der Dichte 1,124 g/ ml; Biochrom AG, Berlin) zugegeben und gemischt. Im Anschluss folgte eine 20-minütige Zentrifugation in der Ultrazentrifuge (30.000 U/ min, 20°C, Festwinkelrotor; ohne Bremse), bei der sich die Neutrophilen Granulozyten als weiße Bande zwischen zwei Banden aus Leukozyten und Makrophagen sammelten. Die Neutrophilen wurden mit einer Pipette abgenommen, mit PBS gewaschen, gezählt und für den Migrationsversuch verwendet.

4.2.6 Migrationsversuche mit primären Neutrophilen Granulozyten

Frisch isolierte Neutrophile Granulozyten (s. Abschnitt 4.2.5) wurden nach dem Waschen mit PBS (Biochrom AG, Berlin) in Medium (RPMI, Biochrom AG, Berlin; 1% FKS (PAN); 1% Penicillin, Biochrom AG, Berlin; 1% Streptomycin, Biochrom AG, Berlin) aufgenommen und auf eine Zellzahl von $1,67 \times 10^6$ Zellen/ ml Medium eingestellt. Der Migrationsversuch erfolgte in einer *Boyden-Chamber* (Porenweite der Membran 0,3 µm) (Corning, Kaiserslautern). Pro Insert wurden 150 µl Zellsuspension ausgesät. In das untere Kompartiment wurde 1 ml Medium (Zusammensetzung s.o.) unter Zusatz von 1400 ng/ ml rek. TIMP-1 gegeben. In den Kontrollen wurde statt TIMP-1 PBS zugegeben. Die mikroskopische Auszählung der an der Unterseite der Membran haftenden Zellen in einem definierten Bereich erfolgte nach 48 h nach Anfärben der adhären Zellen mit DiffQuick® (Roche) gemäß Herstellerprotokoll.

4.3 Adenovirale Methoden

4.3.1 Adenovirale Konstrukte

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten adenoviralen Vektoren handelt es sich um replikationsdefiziente Adenoviren des Serotyps 5, deren E1- und E3-Region deletiert ist (Bett *et al.*, 1994). Diese Viren lassen sich deshalb nur in HEK-293-Zellen, welche die E1-Region in *trans* ersetzen, amplifizieren (Amalfitano *et al.*, 1998).

4.3.1.1 Addl70-3

Addl70-3-Viren enthalten kein Transgen und wurden als Kontrolle verwendet (Jones und Shenk, 1978; Bett *et al.*, 1994). Die Viren wurden ursprünglich von Martina Anton (IEOT, TU München) zur Verfügung gestellt.

4.3.1.2 AdTIMP-1

AdTIMP-1-Viren tragen die cDNA von humanem TIMP-1 unter der Kontrolle des humanen CMV (Cytomegalievirus)-Promotors. Das Transgen wurde an der Stelle der viralen E1-Region in das Virusgenom integriert. Die integrierte cDNA-Sequenz entspricht der *reviewed reference sequence* des NCBI (National Center for Biotechnical Information, Bethesda, USA) (NM_003245). Die AdTIMP-1-Viren wurden ursprünglich von Dr. Charlotte Kopitz generiert und charakterisiert (Kopitz *et al.*, 2007).

4.3.1.3 Adshc-Met

Adshc-Met-Viren tragen eine gegen die mRNA von murinem c-Met gerichtete shRNA-Sequenz unter der Kontrolle des humanen U6-Promotors. Sie wurden käuflich erworben (Sirion Biotech, Martinsried). Die Funktionalität der Viren wurde von der Firma Sirion *in vitro* nachgewiesen, wobei in MLP-29-Zellen auf RNA-Ebene ein *knock down* von 72% erreicht wurde (Sirion, Datenblatt).

4.3.2 Amplifikation, Aufreinigung und Titration der Adenoviren

Alle Adenoviren wurden wie mehrfach beschrieben amplifiziert, gereinigt und titriert (Hitt *et al.*, 1995; Kopitz *et al.*, 2005; Kopitz *et al.*, 2007).

4.3.2.1 Amplifikation

Subkonfluente HEK-293-Zellen wurden auf 15-cm-Zellkulturschalen ausgesät und 72 h später mit den entsprechenden Adenoviren mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 10 infiziert. Pro Schale wurden 2 ml des Adenovirus, suspendiert in PBS²⁺ (s. Kapitel 4.1.2) zugegeben, für 15 Minuten inkubiert, die Platte geschwenkt und nochmals 15 min inkubiert. Anschließend wurden pro Schale 15 ml HEK-293-Medium mit reduziertem Serumgehalt (2% FKS) zugegeben. Sobald alle Zellen einen zytopathischen Effekt (CPE) zeigten (üblicherweise nach ca. 48 h), wurden die Viren geerntet. Hierzu wurden Zellüberstand und Zellen abgenommen, 20 min bei 2700 U/ min und 20°C zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 0,1 M Tris pH 8,0 aufgenommen (pro 10 Schalen 5 ml) und dieser „Crude Stock“ bis zur Aufreinigung bei -80°C gelagert. In der Regel wurde ein Crude-Stock aus 100 infizierten Schalen hergestellt. Reichte der anfangs vorhandene Virusüberstand nicht für die Infektion einer so großen Anzahl Schalen (wie im Falle des käuflich erworbenen Adshc-Met), so wurde nach einem leicht modifizierten Protokoll vorgegangen: Eine subkonfluente Schale HEK-293-Zellen wurde mit einer MOI von 7 wie oben beschrieben infiziert. Sobald alle Zellen deutlichen CPE zeigten, wurde der Überstand abgenommen und im Verhältnis 1:2 bis 1:4 auf neue subkonfluente HEK-293-Zellen gegeben, nach 30 min wurde auch hier wieder mit Medium (mit nur 2% FKS) auf 15 ml aufgefüllt. Nach diesem Verfahren wurde vorgegangen, bis 12 bis 20 Schalen infiziert waren. Aus diesen wurde dann wie oben beschrieben ein Crude-Stock hergestellt. Sobald Crude-Stocks aus insgesamt ca. 40 Schalen vorhanden waren, wurde das Virus aufgereinigt.

4.3.2.2 Aufreinigung

Für die Aufreinigung der Adenoviren wurden die Crude-Stocks nach dem Auftauen mit 10% (V/V) einer 5%-igen Natriumdeoxycholatlösung (in H₂O) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden pro 4,5 ml Zellpellet 45 µl 2 M MgCl₂ und 22,5 µl DNaseI-Lösung zugegeben, geschwenkt und unter regelmäßigem Schwenken 60 min im Wasserbad (37°C) inkubiert, bis die Viskosität nur wenig über der von

Wasser lag. Anschließend wurde 15 Minuten bei 5°C, 4000 U/ min zentrifugiert. Aus Cäsiumchloridlösungen unterschiedlicher Dichte wurde in Ultrazentrifugen-Röhrchen vorsichtig ein Dichtegradient aufgebaut. Hierzu wurden 3 ml „Cs-1,5“-Lösung (s. Tabelle 4-8) mit 10 ml „Cs-1,35“- und 10 ml „Cs-1,25“-Lösung (s. Tabelle 4-8) überschichtet. Die Übergänge zwischen den einzelnen Phasen wurden mit Filzstift auf dem Röhrchen markiert. Zum Schluss wurde das Virus überschichtet (15 ml). Nach Austarieren wurde für 2 h bei 20.000 U/ min, 10°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (ohne Bremse und mit langsamer Beschleunigung). Die sich am Übergang zwischen der „Cs-1,35“- und der „Cs-1,25“-Lösung befindende Virusbande wurde mit einer Kanüle und Spritze vorsichtig abgenommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass ausreichend CsCl-Lösung mit aufgenommen wurde, um ein Ausfallen des Virus zu verhindern. Im Anschluss wurde das Virus erneut in ein Zentrifugenröhrchen gegeben, mit „Cs-1,35“-Lösung aufgefüllt und in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (24 h bei 20.000 U/ min, 10°C). Nach der Zentrifugation wurde die Virusbande wie beschrieben abgenommen, diesmal allerdings in einem möglichst kleinen Volumen, in Dialysekassetten überführt (Cutoff 10 kDa; Slide-A-Lyzer, Pierce) und 20 h bei 4°C gegen 10 mM Tris pH 8,0 dialysiert, wobei der Puffer mindestens fünfmal gewechselt wurde. Im Anschluss wurde das Virus abgenommen, mit 10% (V/V) Glycerin versetzt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Tabelle 4-8: Für die Aufreinigung von Adenoviren verwendete Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
DNaseI	100 mg bovine Pankreas-DNAse in 10 ml 20 mM Tris pH 7,4, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,1 mg/ ml BSA, 50% Glycerin
„Cs-1,5“	90,8 g CsCl, 109,2 g 10mM-Tris pH 8,0
„Cs-1,35“	70,4 g CsCl, 129,6 g 10mM-Tris pH 8,0
„Cs-1,25“	54,0 g CsCl, 146,0 g 10mM-Tris pH 8,0

4.3.2.3 Titration der Adenoviren

Für die Titration wurden HEK-293-Zellen mit verschiedenen Virusverdünnungen infiziert und die Zahl sich bildender Plaques, die durch die Virus-induzierte Lyse der Zellen im Zellrasen entstehen, ermittelt. Jeder Plaque geht auf ein Viruspartikel zurück, so dass sich aus der Zahl der Plaques und der eingesetzten Virusverdünnung der Virustiter als

plaque forming units (pfu) pro ml ermitteln lässt. Im Unterschied zu anderen Verfahren werden mit dieser Methode nur infektiöse Viruspartikel erfasst. Für die Titration wurden am Vortag HEK-293-Zellen auf 6-cm-Schalen so ausgesät, dass sie 24 h später ca. 70-80% konfluent waren. Von den zu analysierenden Viren wurden Verdünnungen zwischen 10^{-8} und 10^{-11} in PBS²⁺ (s. Kapitel 4.1.2) hergestellt. Es wurden zwei unabhängige Verdünnungsreihen erstellt. Die Infektion der HEK-293-Zellen erfolgte mit 200 µl des Virus für 30 min im Brutschrank. Mit jeder hergestellten Verdünnung wurden zwei Schalen infiziert. Im Anschluss an die Infektion wurde ein *Overlay* aus einer 1:2-Mischung aus einer 1%-igen Agaroselösung (nach Aufkochen auf 42°C abgekühlt) und 2x-F11-Medium vorsichtig auf den Zellrasen gegeben. Nach Erstarren des *Overlay* wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert. Sieben, zehn und 14 Tage nach der Infektion wurden die Plaques ausgezählt und daraus der Virustiter [pfu/ ml] berechnet.

2x F11 für 100 76 ml MEM-Earle (Biochrom AG, Berlin)
9 ml 10 x F11 (Biochrom AG, Berlin)
2,5 ml 7,5 % (M/V) NaHCO₃ (in H₂O)
300 µl Fungizone (Biochrom AG, Berlin)
1,5 ml Pen/Strep (Biochrom AG, Berlin)
1,5 ml Glutamin (Biochrom AG, Berlin)
1,5 ml 5 % (M/V) Hefeextrakt (in H₂O)
7,5 ml Pferde-Serum (PAA Laboratories, Pasching)

4.4 Molekularbiologische und biochemische Methoden

4.4.1 RNA-Isolation

4.4.1.1 RNA-Isolation aus Zellen

Die RNA-Isolation aus Zellen erfolgte mit TRI-Reagent[®] (Sigma-Aldrich, München). Suspensionszellen wurden zunächst abzentrifugiert (5 Minuten, 900 U/ min, RT), in kaltem (4°C) PBS (Biochrom AG, Berlin) resuspendiert und dieser Waschschrift ein weiteres Mal wiederholt, bevor das Zellpellet in 250 µl TRI-Reagent[®] aufgenommen wurde. Adhärente Zellen wurden ebenfalls zweimal mit kaltem (4°C) PBS gewaschen, mit 250 µl TRI-Reagent[®] versetzt und mittels eines Zellschabers (TPP, Trasadingen,

Schweiz) von der Zellkulturschale abgelöst und anschließend in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Ab diesem Schritt wurden adhärenente und Suspensions-Zellen gleich behandelt. Die Lysate wurden 5 min bei RT inkubiert und anschließend mit 50 µl Chloroform (Applichem, Darmstadt) versetzt, und durch *Vortexen* gemischt. Nach erneuter zwei- bis dreiminütiger Inkubation bei RT wurde in der Tischzentrifuge 15 Minuten bei 13000 U/ min und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige obere Phase abgenommen, zu 125 µl Isopropanol gegeben und durch *Vortexen* kurz gemischt. Nach zehnminütiger Inkubation bei RT wurde erneut 10 min bei 13000 U/ min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 200 µl 80%-igem Ethanol (Applichem, Darmstadt) versetzt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 7600 U/ min und 4°C wurde das Ethanol abgenommen, das RNA-Pellet ca. 10 min an der Luft getrocknet und anschließend in 15 µl RNase-freiem Wasser (Promega, Mannheim) gelöst. Die RNA wurde entweder direkt für die Reverse Transkription vorbereitet oder bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

4.4.1.2 RNA-Isolation aus Gewebe

Für die RNA-Isolation aus Lebergewebe wurde das PureYield RNA Midiprep System™ (Promega, Mannheim) verwendet. Alle notwendigen Reagenzien wurden vom Hersteller mitgeliefert. Bis zur Aufarbeitung wurden die Gewebeprobe bei -80°C gelagert. Die gefrorenen Leberstücke wurden mit Hilfe eines Ultra Turrax® in Lysepuffer zerkleinert und wie im Protokoll des Herstellers beschrieben weiter verarbeitet. Nach der Aufarbeitung wurden die RNA-Lösungen aliquotiert und entweder direkt für die Reverse Transkription vorbereitet oder bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

4.4.2 Reverse Transkription

Nach der Isolation wurde die RNA zunächst durch zehnminütiges Erhitzen auf 65°C denaturiert. Während der weiteren Schritte wurden die Proben auf Eis gekühlt. Die Konzentration der RNA-Proben wurde am Photometer bestimmt. Um zu gewährleisten, dass die Konzentrationen aller Proben für die Reverse Transkription exakt eingestellt sind, wurden alle Proben mit RNase-freiem Wasser zunächst auf eine Konzentration von 0,5 µg/ µl eingestellt, ein weiteres Mal am Photometer vermessen und erst anschließend auf eine einheitliche Konzentration von 0,1 µg/ µl eingestellt. Vor der Reversen Transkription wurden die RNA-Proben mittels Agarosegelelektrophorese in 1%-igen Gelen auf Degradierung überprüft. Erst danach wurde die Reverse Transkription durch-

geführt. Hierfür wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Darmstadt) gemäß Herstellerangaben verwendet. Pro Ansatz wurde 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben. Die Reaktionsmischung setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenz:	Bedarf pro Reaktion:
10x RT-Puffer	2,0 µl
25x dNTP-Mix (100mM)	0,8 µl
10x RT- <i>random primers</i>	2,0 µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1,0 µl
RNase Inhibitor	1,0 µl
nucleasefreies Wasser	3,2 µl

Die Reaktion wurde in 0,2-ml-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) nach folgendem Programm durchgeführt:

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25°C	37°C	85°C	4°C
Zeit	10 min	120 min	5 sek	dauerhaft

4.4.3 Quantitative RT-PCR (TaqMan®-Analyse)

Für die quantitative RT-PCR (TaqMan®-Analyse) wurden käuflich erworbene *primer-probe*-Mischungen (Applied Biosystems, Darmstadt) und ein Komplett-Mastermix (Sigma-Aldrich, München) verwendet. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte relativ zur Expression der 18S-rRNA als konstitutiv exprimiertes Gen. Rein rechnerisch wurde die in einer Probe enthaltene cDNA-Menge eines Gens mit Hilfe einer Standardgerade ermittelt. Für die Analyse der 18S-rRNA-Expression wurden hierzu 1 ng, 0,5 ng, 0,25 ng, 0,125 ng, 0,0625 ng und 0,031 ng cDNA jeweils in 10 µl Wasser vermessen. Für die Standardgerade anderer Gene wurden 20 ng, 10 ng, 5 ng, 2 ng, 1 ng und 0,5 ng cDNA in 10 µl Wasser analysiert. Von den eigentlichen Proben wurden jeweils Triplets gemessen. Für die Bestimmung der 18S-rRNA-Menge wurde hierzu 1 ng cDNA eingesetzt, für die Bestimmung anderer Gene 5 ng, jeweils in 10 µl Wasser. Zu den Proben wurden 15 µl der PCR-Reaktionsmischung gegeben, bestehend aus 12,5 µl Mastermix, 1,25 µl der genspezifischen *primer-probe*-Mischung (Applied Biosystems, Darmstadt) und 1,25 µl nucleasefreiem Wasser (Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe). Die im Mastermix

enthaltene DNA-Polymerase baut während der Elongationsphase der PCR-Reaktion die genspezifisch zwischen den beiden Primern bindende *probe* ab. Hierdurch werden Fluorophor und Quencher, beide ursprünglich an die *probe* gebunden, räumlich voneinander getrennt, so dass sich das nach Anregung durch einen Laser ausgesendete Fluoreszenzsignal des Fluorophors ändert. Die Signalintensität hängt dabei direkt von der Anzahl der Amplikons in der Probe ab und steigt exponentiell an.

4.4.4 Proteinisolation aus Gewebe und Bestimmung des Proteingehalts

Für die Proteinisolation aus Lebergewebe wurde das gefrorene Gewebestück im Mini-Beadbeater™ mit Hilfe von Zirkoniumkügelchen in 400 µl Lysepuffer homogenisiert. Der Lysepuffer setzte sich zusammen aus 10% (V/V) *Cell Lysis Buffer* (10x) (Cell Signaling, Danvers, USA) und 1 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid, Sigma-Aldrich, München) in Wasser. Die Homogenate wurden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min in der Tischzentrifuge bei 13.000 U/ min, 4°C zentrifugiert. Der Proteinüberstand wurde abgenommen, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Proteinkonzentration wurde nach der BCA-Methode mit dem *BCA Protein Assay Kit* (Pierce/ ThermoScientific, Schwerte) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Proben wurden in Verdünnungen zwischen 1:10 und 1:100 in Wasser eingesetzt. Für die Kalibriergerade wurde eine Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin (BSA, Appllichem, Darmstadt) in Wasser mit Konzentrationen zwischen 4 µg/ µl und 0,0625 µg/ µl erstellt. Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.4.5 Westernblot-Analyse

Je 75 µg Protein wurden in 1,5 mm dicken, 8%-igen Gelen durch Polyacrylamidgелеlektrophorese bei einer Stromstärke von 40 mA aufgetrennt und anschließend während 1,5 Stunden und bei 200 mA je Gel auf Nitrocellulosemembranen (GE Healthcare, Freiburg) geblottet. Gebundenes Protein wurde zur Überprüfung des Transfers mit PonceauS (Sigma-Aldrich, München) angefärbt und die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% (M/V) Milchpulver oder 5% BSA (M/V) (beides Amersham, Darmstadt) in TBS versetzt mit 0,1% Tween-20 (TBS-T) inkubiert. Die Inkubation mit den Primärantikörpern (s. Tabelle 4-9) erfolgte über Nacht bei 4°C in den genannten Pufferlösungen. Für die Ladungskontrolle wurde ein Antikörper gegen α-Tubulin verwendet. Nach Waschen in TBS-T folgte eine 1,5-stündige Inkubation bei Raumtempe-

ratur mit dem Zweit-Antikörper. Die Detektion der HRP-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte durch Chemolumineszenz mit Hilfe des ECL-Systems (Roche, Mannheim).

Tabelle 4-9: Für Westernblots verwendete Antikörper

Antigen	Erst-Antikörper	Zweit-Antikörper
c-Met	1:500 in 2,5% BSA/ TBS-T (SP260; Santa Cruz)	anti-rabbit IgG-HRP (GE Healthcare) 1:5000 in 2,5% BSA/TBS
phospho-c-Met	1:1000 in 5% BSA/ TBS-T (3121S; Cell Signaling)	anti-rabbit IgG-HRP (GE Healthcare) 1:5000 in 2,5% BSA/TBS
β-Galaktosidase	1:500 in 2,5% BSA/ TBS-T (Oncogene)	anti-mouse IgG-HRP (GE Healthcare) 1:2000 in 2,5% BSA/TBS
α-Tubulin	1:500 in 2,5% BSA/ TBS-T (Calbiochem)	anti-mouse IgG-HRP (Amersham) 1:2000 in 2,5% BSA/TBS-

4.4.6 HGF-ELISA

Die Bestimmung der HGF-Proteinmenge erfolgte mittels ELISA (Rat HGF-EIA, Institute of Immunology Co., Tokio, Japan; laut Herstellerangaben auch zur Detektion von murinem HGF geeignet). Die gewogenen Leberproben wurden mit der vierfachen Menge Tween-Extraktionspuffer (20 mM TRIS, 2 M NaCl, 0,1% (V/V) Tween-80, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, pH=7,5) versetzt und wie in Kap. 4.4.4 beschrieben homogenisiert. Anschließend wurden die Proben über Heparinsäulen aufgereinigt (HiTrap™, Amersham, Freiburg). Hierzu wurden die Leberhomogenate 1:4 mit Probenpuffer (20 mM TRIS, 0,1% (v/v) Tween-80, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, pH=7,5) verdünnt. Die Heparinsäulen wurden vor der Beladung mit den Proben mit 10 ml Adsorptionspuffer (20 mM TRIS, 0,5 M NaCl, 0,1% (V/V) Tween-80, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, pH=7,5) äquilibriert. Nach Bindung der Proben an die Säulen wurde mit 10 ml Adsorptionspuffer gewaschen und anschließend mit 5 ml Tween-Extraktionspuffer eluiert. Zwischen den einzelnen Proben wurden die Säulen jeweils mit 5 ml Tween-Extraktionspuffer, danach mit 10 ml Adsorptionspuffer gereinigt. Bis zur Durchführung des ELISAs wurden die Proben bei -20°C gelagert. Der ELISA wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

4.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte für normalverteilte Werte mit Hilfe des *Student's t*-Test. Folgten die Werte nicht einer Normalverteilung, wurde der Mann-Whitney-Rank-Sum-Test angewendet. Ein p-Wert von < 0,05 wurde als signifikant angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung molekularer Mechanismen der TIMP-1-induzierten Metastasierung

5.1.1 Tumorzell-HIF-1 α als Mediator der prometastatischen Wirkung von TIMP-1

Der Erfolg der Metastasierung disseminierender Tumorzellen hängt sowohl von Faktoren der Wirtsumgebung als auch von intrinsischen Faktoren der Tumorzellen ab. Es wurde deshalb untersucht, welche Tumorzell-eigenen Faktoren die verstärkte Metastasierung in der TIMP-1-modulierten Mikroumgebung vermitteln.

5.1.1.1 Die TIMP-1-modulierte Mikroumgebung induziert HIF-1 α in Leberinfiltrierenden Zellen

Ein wichtiger Faktor der zellulären Anpassung an Stressbedingungen ist der heterodimere Transkriptionsfaktor HIF-1. Um zu untersuchen, ob auch die durch erhöhte TIMP-1-Konzentrationen in der Leber hervorgerufenen Veränderungen der Mikroumgebung zu einer Aktivierung von HIF-1 führen, wurde TIMP-1 durch adenoviralen Gentransfer systemisch in Mäusen überexprimiert und die Expression von HIF-1 α , der regulierten Untereinheit von HIF-1 und Carboanhydrase IX (CAIX) im Lebergewebe der TIMP-1-transduzierten- oder mit Kontrollviren behandelten Mäuse durch quantitative RT-PCR ermittelt (Abbildung 5-1). Die Bestimmung der CAIX-Expression diente dabei als Marker für das Ausmaß der Aktivierung von HIF-1. In Abwesenheit von Tumorzellen führte eine systemisch erhöhte TIMP-1-Expression in der Leber zu einer schwachen Induktion der HIF-1 α -Expression um den Faktor 1,4, die CAIX-Expression wurde durch die TIMP-1-Überexpression 1,8-fach erhöht (Abbildung 5-1).

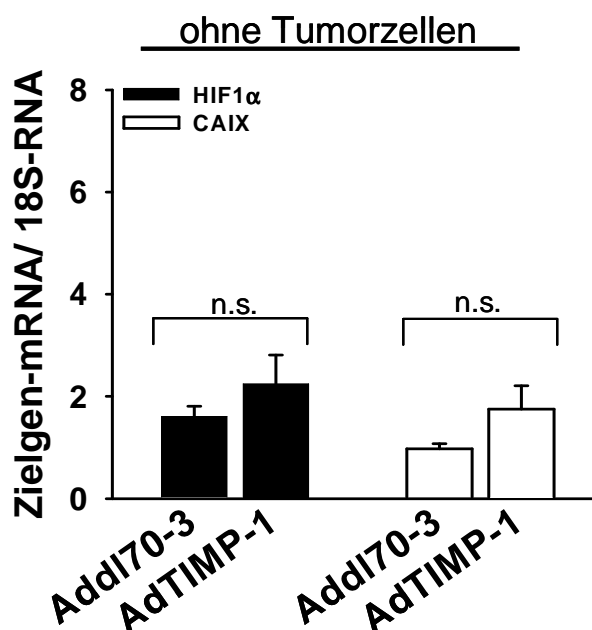


Abbildung 5-1: Einfluss der TIMP-1-modulierten Mikroumgebung in der Leber auf die Expression von HIF-1 α und CAIX. CD1-*nu/nu*-Mäuse wurden intravenös mit 2×10^9 pfu Add170-3 bzw. AdTIMP-1 behandelt. Neun Tage nach Gentransfer wurden die Mäuse getötet, die Lebern entnommen und die Expression von HIF-1 α bzw. CAIX mittels qRT-PCR ermittelt. Die TIMP-1-Überexpression führte zu einer leichten Zunahme der HIF-1 α - und CAIX-Expression in der Leber. Schwarze Balken: HIF-1 α -Expression normalisiert auf die Expression von 18S-rRNA, weiße Balken: CAIX-Expression normalisiert auf die Expression von 18S-rRNA. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (HIF-1 α : Add170-3: $1,61 \pm 0,20$, $n = 5$; AdTIMP-1: $2,25 \pm 0,56$; $p = 0,74$; $n = 5$. CAIX: Add170-3: $0,98 \pm 0,10$; $n = 5$; AdTIMP-1: $1,75 \pm 0,46$; $n = 5$; $p = 0,983$). n.s - nicht signifikant.

Um zu untersuchen, ob die durch TIMP-1 induzierten Veränderungen in der Leber zu einer Induktion von HIF-1 α in infiltrierenden Tumorzellen führen, wurden drei Tage nach adenoviralem Gentransfer *lacZ*-markierte L-Cl.5s-T-Zell-Lymphomzellen intravenös in Mäuse mit normaler (Add170-3-behandelt) bzw. erhöhter TIMP-1-Expression (AdTIMP-1-behandelt) inokuliert und sechs Tage später die Expression von HIF-1 α und CAIX im Lebergewebe ermittelt. In Gegenwart von L-Cl.5s-T-Zell-Lymphomzellen führte eine systemisch hohe TIMP-1-Expression zu einem signifikanten Anstieg der HIF-1 α -Expression in der Leber um das 2,6-Fache (Abbildung 5-2, A, schwarze Balken) und der CAIX-Expression um das 5,1-Fache (Abbildung 5-2, A, weiße Balken) verglichen mit Tieren, die basale TIMP-1-Expressionsspiegel aufwiesen. Die Überexpression von TIMP-1 bedingt eine deutliche Zunahme der Tumorzelllast in der Leber (Kopitz *et al.*, 2007). Um zu untersuchen, ob der beobachtete Anstieg von HIF-1 α und CAIX in Gegenwart von L-Cl.5s-Zellen allein darauf zurückzuführen ist, wurde die Expression von HIF-1 α bzw. CAIX auf die Expression des Tumorzell-Markergens *lacZ* normalisiert

(Abbildung 5-2, B). Auch nach Berücksichtigung der Tumorzelllast war die Expression von HIF-1 α und CAIX in TIMP-1-überexprimierenden Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren jeweils um mehr als den Faktor sieben erhöht (Abbildung 5-2, B), ein Hinweis darauf, dass der Anstieg an HIF-1 α eine Folge der erhöhten TIMP-1-Expression und nicht der erhöhten Tumorzelllast war.

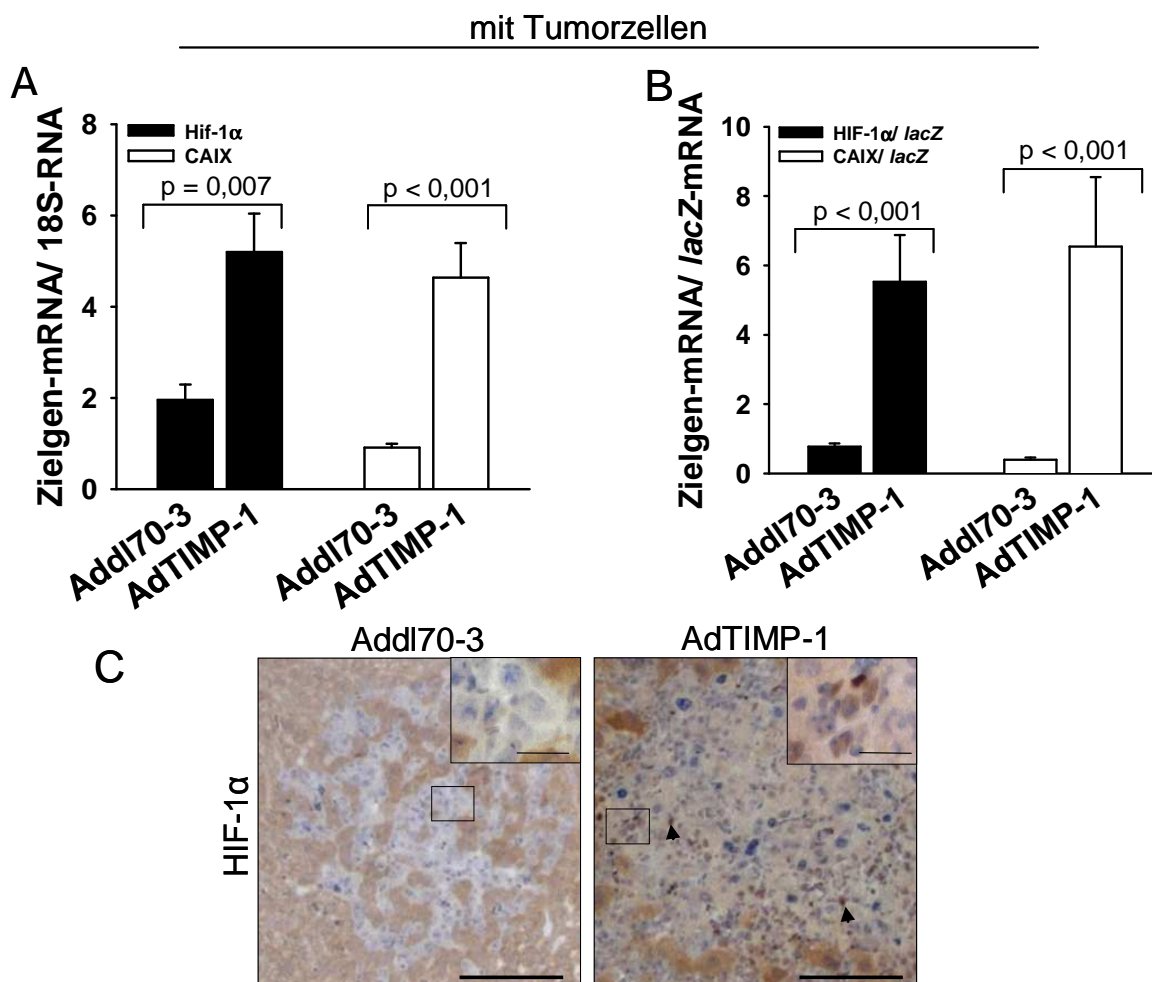


Abbildung 5-2: Einfluss der TIMP-1-modulierten Mikroumgebung in der Leber auf die Expression von HIF-1 α und CAIX in Gegenwart von Tumorzellen. CD1-*nu/nu*-Mäuse wurden intravenös mit 2×10^9 pfu Addl70-3 bzw. AdTIMP-1 behandelt. Drei Tage später wurden 5000 *lacZ*-markierte L-CI.5s-Zellen i.v. inokuliert. Neun Tage nach Gentransfer wurden die Mäuse getötet, die Lebern entnommen und analysiert. **A**, Die Expression von HIF-1 α bzw. CAIX wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Die TIMP-1-Überexpression führte zu einer signifikanten Zunahme der HIF-1 α - und CAIX-Expression in der Leber. Schwarze Balken: HIF-1 α -Expression normalisiert auf die Expression von 18S-rRNA, weiße Balken: CAIX-Expression normalisiert auf die Expression von 18S-rRNA. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (HIF-1 α : Addl70-3: $1,96 \pm 0,33$, $n = 4$; AdTIMP-1 $5,20 \pm 0,85$, $n = 4$; $p = 0,007$. CAIX: Addl70-3: $0,91 \pm 0,09$, $n = 4$; AdTIMP-1: $4,64 \pm 0,76$, $n = 4$; $p < 0,001$). **B**, Die Expression von HIF-1 α bzw. CAIX wurde auf die Tumorzelllast in der Leber normalisiert, welche mittels qRT-PCR des *lacZ*-Markergens der Tumorzellen bestimmt wurde. TIMP-1 erhöhte die Expression von HIF-1 α und CAIX auch nach Normalisierung auf die Tumorzelllast in der Leber signifikant. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (HIF-1 α : Addl70-3: $0,78 \pm 0,10$; $n = 3$; AdTIMP-1: $5,53 \pm 1,35$; $n = 3$, $p < 0,001$. CAIX: Addl70-3: $0,40 \pm 0,06$; $n = 3$; AdTIMP-1: $6,55 \pm 2,00$; $n = 3$; $p < 0,001$). **C**, Immunhistochemischer Nachweis von HIF-1 α auf Paraffinschnitten von Metastasen-tragendem Lebergewebe. Zellen mit kernlokalisiertem HIF-1 α (Pfeile) waren in Metastasen TIMP-1-überexprimierender Tiere, jedoch nicht in Kontrolltieren und nicht im Leberparenchym nachweisbar. Balken: 100 μ m, Balken Einschub: 20 μ m.

Ist HIF-1 als Transkriptionsfaktor aktiv, ist dessen α -Untereinheit im Zellkern lokalisiert. Während durch immunhistochemische Analyse sowohl in Add170-3-behandelten als auch in TIMP-1-transduzierten Tieren cytoplasmatisch lokalisiertes HIF-1 α im gesamten Lebergewebe nachweisbar war, konnten Zellen mit kernlokalisiertem HIF-1 α nur in Metastasen TIMP-1-überexprimierender Tiere, jedoch nicht in Metastasen von Kontrolltieren und auch nicht im Leberparenchym detektiert werden (Abbildung 5-2, C). Dieses Ergebnis bestätigte die Annahme, dass die durch TIMP-1 modulierte Mikroumgebung in der Leber zu einer Induktion und Aktivierung von HIF-1 α in Leber-infiltrierenden Zellen führte.

5.1.1.2 TIMP-1 alleine induziert HIF-1 α in verschiedenen Tumorzelllinien *in vitro*

Um zu prüfen, ob es sich bei den Leber-infiltrierenden, HIF-1 α -exprimierenden Zellen um Tumorzellen handeln konnte und um zu untersuchen, ob TIMP-1 selbst, auch ohne die TIMP-1-modulierte *In-vivo*-Umgebung, zu einer Induktion von HIF-1 α führt, wurde der Einfluss von TIMP-1 auf die HIF-1 α - und CAIX-Expression in verschiedenen Tumorzelllinien *in vitro* untersucht. Analysiert wurden L-CI.5s- (murine T-Zell-Lymphomzellen), CT26L- (murine Kolorektalkarzinomzellen), HT1080- (humane Fibrosarkomzellen) und GTL-16-Zellen (humane Magenkarzinomzellen). Die Inkubation mit rekombinantem TIMP-1 hatte in allen getesteten Zelllinien einen signifikanten Anstieg der HIF-1 α -Expression zur Folge (Abbildung 5-3 A). Die optimal wirksame Konzentration von TIMP-1 lag bei den einzelnen Zelllinien zwischen 350 und 1400 ng/ml und war in Vorversuchen ermittelt worden.

Trotz der in allen Zelllinien erhöhten HIF-1 α -Expression stieg die Expression des HIF-1-regulierten Gens CAIX nur in L-CI.5s- und CT26L-Zellen signifikant an (Abbildung 5-3 B). Somit war TIMP-1 alleine ausreichend, um HIF-1 α in verschiedenen Tumorzellen zu induzieren, was jedoch nicht notwendigerweise auch zu einer verstärkten Expression HIF-1-abhängiger Gene bzw. einer verstärkten Aktivität von HIF-1 führte.

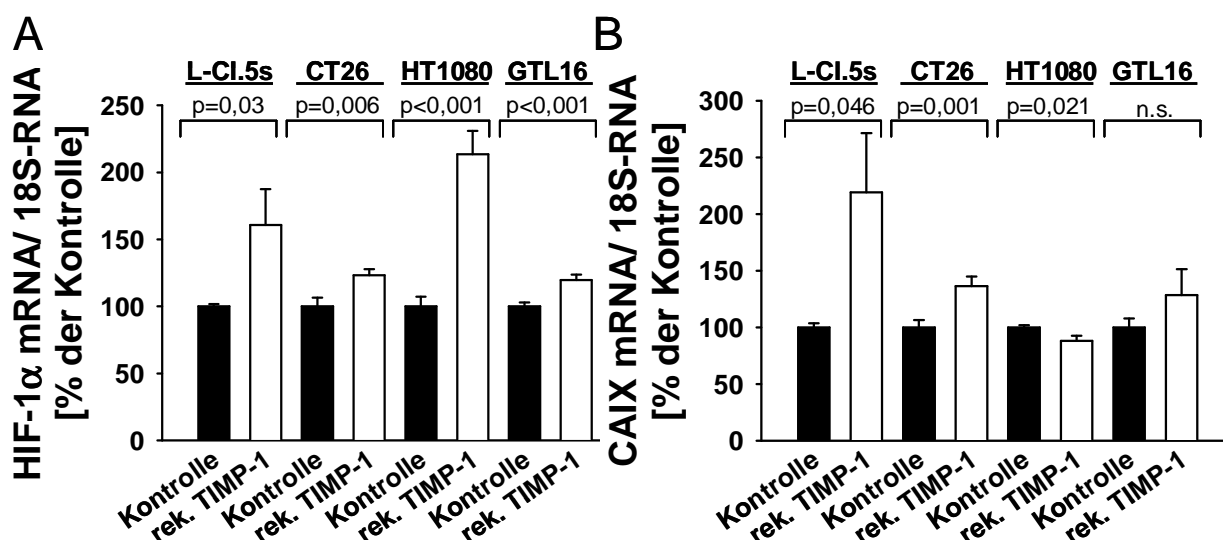


Abbildung 5-3: TIMP-1 induziert direkt die HIF-1 α -Expression und z.T. auch die HIF-1-Signaltransduktion in Tumorzellen. L-CI.5s-, CT26L-, HT1080- und GTL-16-Zellen wurden jeweils für eine Stunde in serumfreiem Medium mit rekombinantem TIMP-1 inkubiert. Die Inkubation von L-CI.5s-Zellen erfolgte mit 700 ng/ml rek. TIMP-1, von CT26L- und GTL16-Zellen mit 350 ng/ml und von HT1080-Zellen mit 1400 ng/ml rek. TIMP-1. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen, die Gesamt-RNA isoliert und die Expression von HIF-1 α (A) bzw. CAIX (B) mittels qRT-PCR bestimmt und auf die Expression von 18S-rRNA normalisiert. Dargestellt ist die prozentuale Expression von HIF-1 α bzw. CAIX der TIMP-1-inkubierten Zellen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ohne TIMP-1, deren Expression auf 100% gesetzt wurde. Die dargestellten Ergebnisse ergeben sich aus den Mittelwerten aus mind. drei unabhängigen Experimenten. A, Signifikante Erhöhung der HIF-1 α -Expression in allen getesteten Zelllinien. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (L-CI.5s: Kontrolle: 100 \pm 7,4; n = 6; rek. TIMP-1: 160,7 \pm 26,7; n = 6; p = 0,03. CT26L: Kontrolle: 100 \pm 6,5; n = 8; rek. TIMP-1: 123,2 \pm 4,6; n = 8; p = 0,006. HT1080: Kontrolle: 100 \pm 7,2; n = 7; rek. TIMP-1: 213,5 \pm 17,5; n = 7; p < 0,001. GTL-16: Kontrolle: 100 \pm 2,8, n = 9; rek. TIMP-1: 119,7 \pm 4,2; n = 9; p < 0,001). B, Messung der CAIX-Expression nach Inkubation mit rek. TIMP-1. Signifikanter Anstieg in L-CI.5s- und CT26L-Zellen. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (L-CI.5s: Kontrolle: 100 \pm 3,5, n = 6; rek. TIMP-1: 219,3 \pm 52,2; n = 6; p = 0,046. CT26L: Kontrolle: 100 \pm 6,5; n = 8; rek. TIMP-1: 136,4 \pm 8,4; n = 8; p = 0,001. HT1080: Kontrolle: 100 \pm 2,0; n = 6; rek. TIMP-1: 88,0 \pm 4,6; n = 6; p = 0,021. GTL-16: Kontrolle: 100 \pm 7,8; n = 3; rek. TIMP-1: 128,4 \pm 23,1; n = 3; p = 0,260). n.s. – nicht signifikant.

5.1.1.3 TIMP-1 erhöht die Invasivität von Tumorzellen *in vitro*

In vivo führen hohe systemische TIMP-1-Spiegel zu einer aggressiven Infiltration von Tumorzellen in das Leberparenchym (Kopitz *et al.*, 2007). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob TIMP-1 einen direkten Einfluss auf die Invasivität von Tumorzellen hat. Die beschriebenen Zellen wurden wie im vorangegangenen Abschnitt mit rekombinantem TIMP-1 behandelt. Um auszuschließen, dass Reste des Proteaseinhibitors TIMP-1 aufgrund seiner MMP-hemmenden Eigenschaften die Invasivität der Tumorzellen beeinflussen, wurden die Zellen nach der Inkubation zweimal gewaschen. Im Anschluss wurde das Invasionsverhalten dieser vorbehandelten Zellen durch MatrigelTM im *Boyden-Chamber*-Invasionsversuch untersucht (Abbildung 5-4).

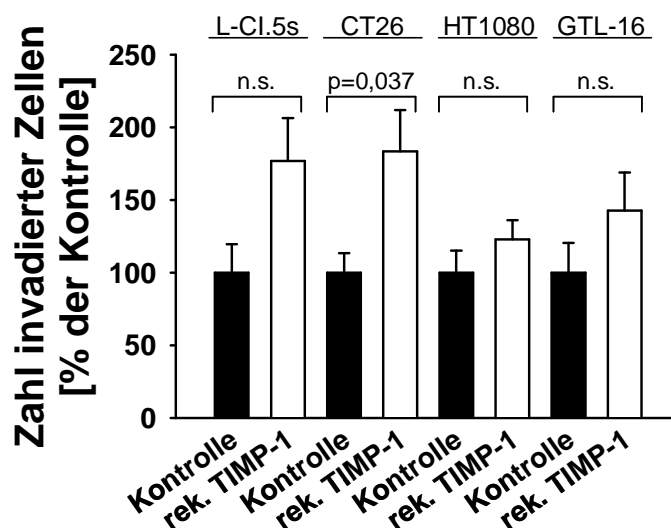


Abbildung 5-4: TIMP-1 steigert die Invasivität von Tumorzellen in vitro. A, L-CI.5s-, CT26L-, HT1080- und GTL-16-Zellen wurden für eine Stunde mit rekombinantem TIMP-1 inkubiert, zweimal gewaschen und anschließend die Invasivität durch Matrigel™ im *Boyden-Chamber*-Invasionsversuch ermittelt. Die Auswertung erfolgte nach 48 Stunden. TIMP-1-Vorbehandlung erhöhte die Invasivität aller getesteter Zelllinien. Der stärkste Effekt war bei L-CI.5s- und CT26L-Zellen zu beobachten (Invasionsversuch der L-CI.5s-Zellen von Dr. Charlotte Kopitz durchgeführt). Dargestellt ist die Zahl invadierter Zellen in Prozent der jeweiligen Kontrolle ohne TIMP-1-Vorbehandlung. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (L-CI.5s: Kontrolle: $100 \pm 19,51$, $n = 3$; rek. TIMP-1: $176,69 \pm 29,54$; $n = 3$; $p = 0,096$. CT26L: Kontrolle: $100 \pm 13,41$; $n = 4$; rek. TIMP-1: $183,49 \pm 28,26$; $n = 4$; $p = 0,037$. HT1080: Kontrolle: $100 \pm 15,24$; $n = 4$; rek. TIMP-1: $122,81 \pm 13,29$; $n = 4$; $p = 0,311$. GTL-16: Kontrolle: $100 \pm 20,45$; $n = 3$; rek. TIMP-1: $142,61 \pm 26,31$; $n = 3$; $p = 0,271$). n.s. – nicht signifikant.

Die Vorinkubation mit TIMP-1 erhöhte die Invasivität aller getesteter Zelllinien (Abbildung 5-4). Während die TIMP-1-Inkubation die Invasivität von L-CI.5s- und CT26L-Zellen deutlich erhöhte, reagierten HT1080- und GTL-16-Zellen mit einem schwachen, statistisch nicht signifikanten Anstieg der Invasivität (Abbildung 5-4). TIMP-1 verstärkte also genau in den Zelllinien die Invasion am meisten, in denen es auch zu einer Aktivierung der HIF-1-Signaltransduktion geführt hatte.

5.1.1.4 Bedeutung von Tumorzell-HIF-1 α bei der TIMP-1-induzierten Invasivität

TIMP-1 erhöhte in L-CI.5s- und CT26L-Zellen einerseits die Expression und Aktivität von HIF-1 α und andererseits deren Invasivität. Um zu klären, ob die Induktion von HIF-1 α in den Tumorzellen für die invasionsfördernde Wirkung von TIMP-1 verantwortlich ist, wurde das Invasionsverhalten von L-CI.5s- bzw. CT26L-Zelllinien mit einem stabilen *knock down* von HIF-1 α in Abhängigkeit von TIMP-1 untersucht. Als Kontrollen dienten Zelllinien, die mit einer shRNA-Sequenz ohne Ziel-mRNA im Transkriptom stabil transduziert worden waren (-shNT – *non target*). Die Effizienz des HIF-1 α -*knock-down* in

L-CI.5s-shHIF- und CT26L-shHIF-Zellen im Vergleich zu den jeweiligen -shNT-Kontrollzellen war durch quantitative RT-PCR überprüft worden und lag bei jeweils etwa 90% (Florian Schelter, AG Krüger). Die so generierten Zelllinien wurden wie beschrieben mit oder ohne TIMP-1-Vorinkubation auf ihre Invasivität durch Matrigel™ im *Boyden-Chamber*-Invasionsversuch analysiert. Während die Vorbehandlung mit TIMP-1 die Invasion der Kontrollzellen (L-CI.5s-shNT bzw. CT26L-shNT) erhöhte (Abbildung 5-5, A, B, schwarze Balken), hatte TIMP-1 keinen signifikanten Einfluss auf die Invasivität der HIF-1 α -*knock-down*-Zellen (L-CI.5s-shHIF bzw. CT26L-shHIF) (Abbildung 5-5, A, B, weiße Balken), ein Hinweis darauf, dass HIF-1 α in den Tumorzellen ein intrazellulärer Mediator der proinvasiven Wirkung von TIMP-1 sein könnte.

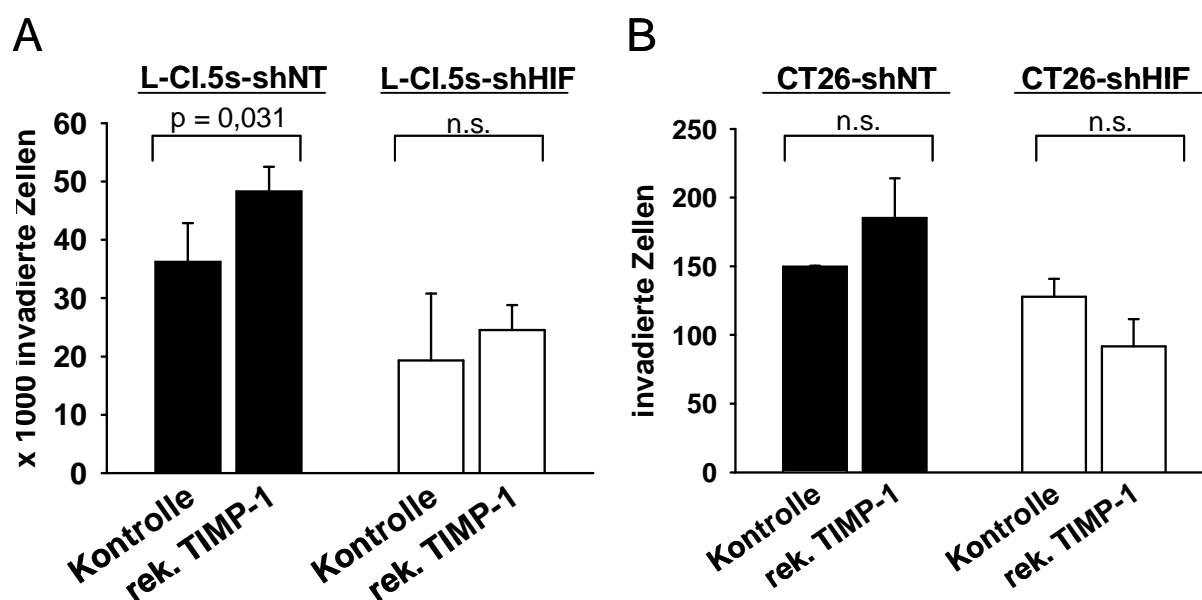


Abbildung 5-5: Der *knock down* von HIF-1 α verhindert die TIMP-1-induzierte Zunahme der Invasivität. L-CI.5s-shNT oder -shHIF-Zellen (A) bzw. CT26L-shNT oder -shHIF-Zellen (B) wurden für eine Stunde mit rekombinatem TIMP-1 behandelt, gewaschen und anschließend das invasive Potential durch Matrigel™ im *Boyden-Chamber*-Invasionsversuch untersucht. Die Auswertung erfolgte nach 24 (B) bzw. 48 Stunden (A). **A**, TIMP-1-Inkubation erhöhte die Invasivität von L-CI.5s-shNT-Zellen signifikant, hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Invasivität von L-CI.5s-shHIF-Zellen. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (L-CI.5s-shNT: Kontrolle: $36,20 \pm 3,85$; $n = 3$; rek. TIMP-1: $48,31 \pm 2,10$; $n = 4$; $p = 0,031$. L-CI.5s-shHIF: Kontrolle: $19,31 \pm 5,74$; $n = 4$; rek. TIMP-1: $24,51 \pm 2,16$; $n = 4$; $p = 0,428$). **B**, TIMP-1-Inkubation führte zu einem leichten Anstieg der Invasivität von CT26L-shNT-Zellen, jedoch nicht von CT26L-shHIF-Zellen. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (CT26L-shNT: Kontrolle: $149,67 \pm 0,88$; $n = 4$; rek. TIMP-1: $185,25 \pm 28,74$; $n = 4$; $p = 0,34$. CT26L-shHIF: Kontrolle: $127,75 \pm 13,09$; $n = 12$; rek. TIMP-1: $91,67 \pm 19,92$; $n = 4$; $p = 0,17$). n.s.- nicht signifikant.

5.1.1.5 Tumorzell-HIF-1 α vermittelt die TIMP-1-induzierte Tumorzellstreuung *in vivo*

Es konnte gezeigt werden, dass TIMP-1 zu einer Induktion von HIF-1 α in Tumorzellen führte, und im vorangegangenen Experiment wurde HIF-1 α als möglicher Mediator der TIMP-1-induzierten Invasivität von Tumorzellen *in vitro* identifiziert. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte untersucht werden, ob HIF-1 α auch *in vivo* einen Beitrag zur TIMP-1-assoziierten aggressiven Streuung von Tumorzellen leistet. Hierzu wurde die Lebermetastasierung von L-CI.5s-shNT- bzw. L-CI.5s-shHIF-Zellen in TIMP-1-überexprimierenden oder Kontrolltieren untersucht. Es zeigte sich, dass - unabhängig von der HIF-1 α -Expression der Tumorzellen - erhöhte TIMP-1-Spiegel die Anzahl an Makrometastasen in der Leber leicht reduzierten (Abbildung 5-6, A obere Reihe, B). Ebenso führte der *knock down* von HIF-1 α in den Tumorzellen unabhängig vom TIMP-1-Status der Tiere zu einer signifikant reduzierten Anzahl makrometastatischer Foci in der Leber (Abbildung 5-6, B, weiße Balken), ein Hinweis darauf, dass HIF-1 α eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Makrometastasen spielt. Darüber hinaus konnte ein leichter additiver Effekt von TIMP-1-Überexpression und *knock down* von HIF-1 α auf die Reduktion der Makrometastasierung beobachtet werden, der dazu führte, dass in Tieren mit hohem TIMP-1-Spiegel, denen L-CI.5s-shHIF-Zellen inokuliert worden waren, die geringste Anzahl an Makrometastasen detektiert wurde (Abbildung 5-6, B, ganz rechter Balken).

Um zu untersuchen, ob Tumorzell-HIF-1 α auch an der TIMP-1-assoziierten Induktion der diffusen und aggressiven Streuung einzelner Tumorzellen in das Leberparenchym beteiligt ist, wurde zunächst die Gesamtumorlast in der Leber durch quantitative RT-PCR des Tumorzell-Markergens *lacZ* ermittelt (Abbildung 5-6, C). Mit dieser Quantifizierung werden sowohl Tumorzellen innerhalb von Makrometastasen als auch gestreute Tumorzellen erfasst. In der Tat verursachte eine hohe TIMP-1-Expression in Tieren, denen die Kontrollzelllinie inokuliert worden war, eine deutliche Zunahme der Gesamtumorlast in der Leber (Abbildung 5-6, C, schwarze Balken), welche durch den *knock down* von HIF-1 α in den Tumorzellen verhindert wurde (Abbildung 5-6, C, weiße Balken). Die X-Gal-Färbung der Organe zeigte, dass sich diese Unterschiede in der Gesamtumorlast auch in einer entsprechenden Veränderung der Mikrometastasierung widerspiegeln (Abbildung 5-6, A, untere Reihe).

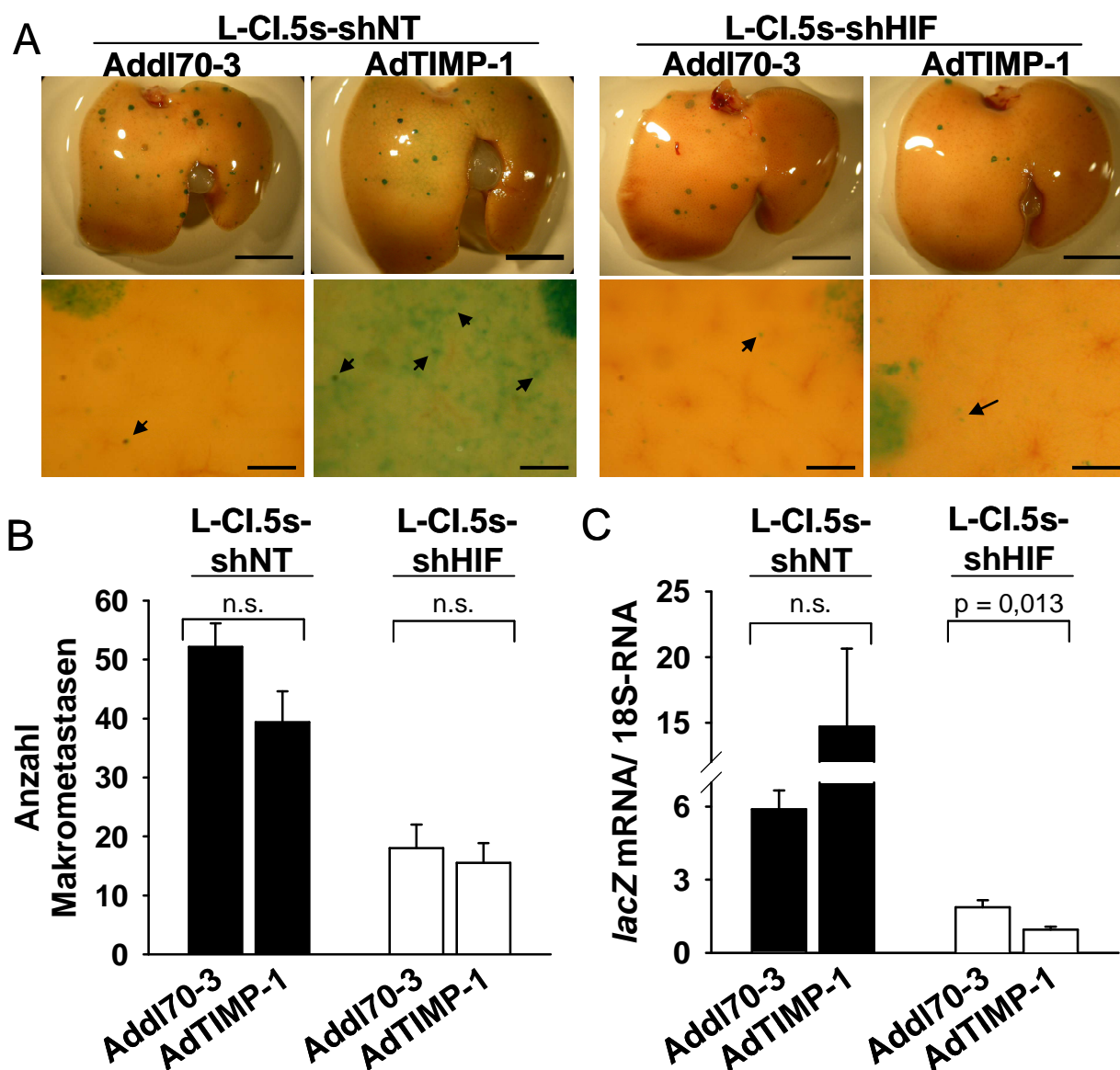


Abbildung 5-6: Tumorzell-HIF-1 α ist für die prometastatische Wirkung von TIMP-1 notwendig. Drei Tage nach adenoviralem Gentransfer von TIMP-1 bzw. Kontrollvektor wurden 5000 *lacZ*-markierte L-CI.5s-shNT bzw. L-CI.shHIF-Zellen in CD1-*nu/nu*-Mäuse inokuliert. Sieben Tage später wurden die Tiere getötet, die Tumorzellen in der Leber angefärbt und die Metastasierung untersucht. **A**, Makro- (oben, Balken: 5 mm) und Mikroaufnahmen (unten, Balken: 200 μ m) der X-Gal-gefärbten medialen Leberlappen. Die Mikroaufnahmen zeigen die Aufhebung des infiltrationsfördernden Effekts von TIMP-1 durch den HIF-1 α -*knock-down*. **B**, Anzahl der Makrometastasen ($\geq 0,2$ mm) auf den medialen Leberlappen. TIMP-1-Überexpression verringerte die Anzahl an Makrometastasen von L-CI.5s-shNT-Zellen (schwarze Balken). Der HIF-1 α -*knock-down* reduzierte TIMP-1-unabhängig die Anzahl an Makrometastasen signifikant (weiße Balken). Ein leicht additiver Effekt von TIMP-1-Überexpression und HIF-1 α -*knock-down* führte zur geringsten Anzahl makrometastatischer Foci in TIMP-1-überexprimierenden, L-CI.5s-shHIF-behandelten Tieren (B, rechts). Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (AddI70-3/ L-CI.5s-shNT: $52,17 \pm 3,96$; n = 6. AdTIMP-1/ L-CI.5s-shNT: $39,40 \pm 5,20$; n = 5; p = 0,078. AddI70-3/ L-CI.5s-shHIF: $18,00 \pm 4,00$; n = 6. AdTIMP-1/ L-CI.5s-shHIF: $15,50 \pm 3,33$; n = 6; p = 0,641). **C**, Bestimmung der Gesamtumorlast in der Leber mittels qRT-PCR des Tumorzellmarkers *lacZ* und Normalisierung auf die Expression von 18S-rRNA. Starke Zunahme der Gesamtumorlast durch TIMP-1 in L-CI.5s-shNT-, nicht jedoch in L-CI.5s-shHIF-behandelten Tieren. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (AddI70-3/ L-CI.5s-shNT: $5,891 \pm 0,774$; n = 3; AdTIMP-1/ L-CI.5s-shNT: $14,69 \pm 5,95$; n = 3; p = 0,659. AddI70-3/ L-CI.5s-shHIF: $1,87 \pm 0,29$; n = 5; AdTIMP-1/ L-CI.5s-shHIF: $0,98 \pm 0,12$; n = 6; p = 0,013). n.s. – nicht signifikant.

Um zu überprüfen, ob die Reduktion der Gesamttumorlast durch den HIF-1 α -*knock-down* tatsächlich auch auf eine verringerte Tumorzellstreuung zurückzuführen war, wurde die Zahl einzelner gestreuter Tumorzellen auf Gewebeschnitten genau quantifiziert. Es bestätigte sich, dass der *knock down* von HIF-1 α in L-CI.5s-Zellen die Zahl gestreuter Tumorzellen in Tieren mit TIMP-1-Überexpression signifikant um 46,3% reduzierte, während der HIF-1 α -*knock-down* in Kontrolltieren mit unveränderter TIMP-1-Expression die Anzahl gestreuter Tumorzellen nur um 20,2% verringerte (Abbildung 5-7, A). Absolut betrachtet, lag die Anzahl einzelner gestreuter L-CI.5s-shHIF-Zellen in TIMP-1-überexprimierenden Tieren sogar noch unter der in Kontrolltieren mit normaler TIMP-1-Expression (Abbildung 5-7, B). Hiermit wurde gezeigt, dass eine Inhibierung der HIF-1-Aktivität in den Tumorzellen die durch TIMP-1 normalerweise verstärkte Infiltration der Leber wirksam verhinderte und somit HIF-1 α in den Tumorzellen als Mediator der prometastatischen Aktivität von TIMP-1 identifiziert.

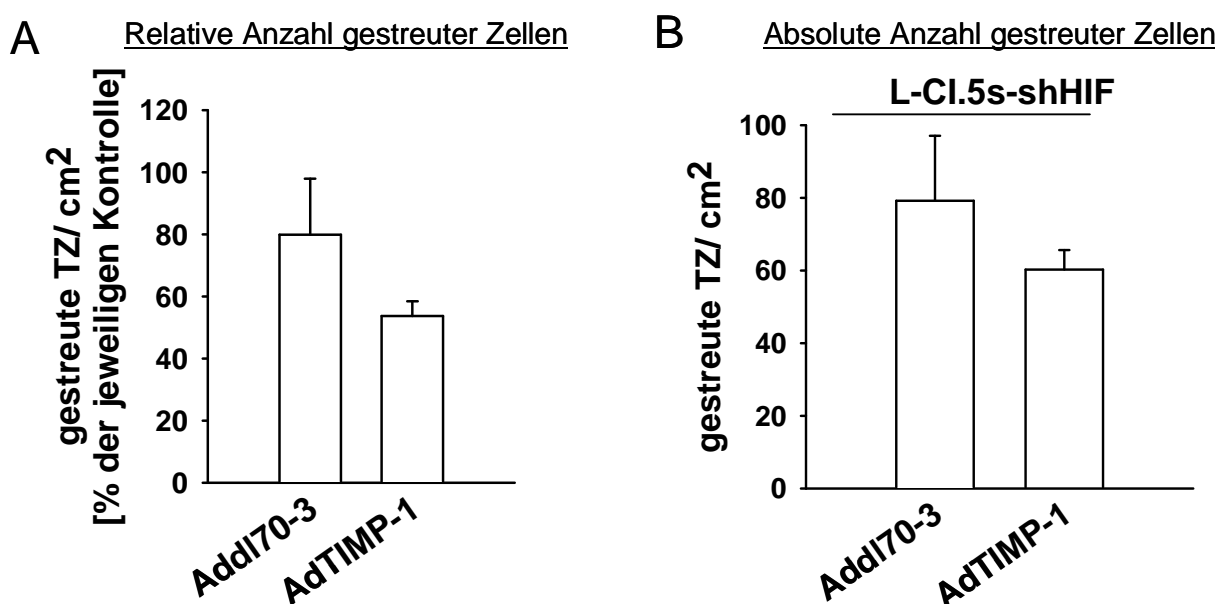


Abbildung 5-7: Der *knock down* von HIF-1 α in L-CI.5s-Zellen verringert deren diffuse Streuung im Leberparenchym TIMP-1-überexprimierender Tiere. Drei Tage nach adenoviralem Gentransfer wurden 5000 *lacZ*-markierte L-CI.5s-shNT bzw. L-CI.shHIF-Zellen in CD1-*nu/nu*-Mäuse inokuliert. Sieben Tage später wurden die Tiere getötet, die Lebern entnommen und die Tumorzellen auf Kryoschnitten mit X-Gal angefärbt. Die Anzahl gestreuter Tumorzellen abseits definierbarer metastatischer Foci wurde mikroskopisch ermittelt und auf die Schnittfläche normiert. Der *knock down* von HIF-1 α in den Tumorzellen verhinderte die Zunahme der Tumorzellstreuung durch TIMP-1. **A**, Dargestellt ist der prozentuale Anteil gestreuter L-CI.5s-shHIF-Zellen im Vergleich zur jeweiligen Anzahl gestreuter L-CI.5s-shNT-Zellen. Es wird deutlich, dass die Streuung der Tumorzellen in TIMP-1-überexprimierenden Tieren stärker reduziert wurde als in Tieren mit normaler TIMP-1-Expression. **B**, Absolute Anzahl gestreuter L-CI.5s-shHIF-Zellen in Add170-3-behandelten und AdTIMP-1-behandelten Tieren. Zu beachten ist die geringere Streuung der Tumorzellen in TIMP-1-überexprimierenden Tieren. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (Links: Add170-3: 79,84 \pm 18,07; n = 23; AdTIMP-1: 53,69 \pm 4,72; n = 87; p = 0,708. Rechts: Add170-3: 79,19 \pm 17,92; n = 23; AdTIMP-1: 60,25 \pm 5,37; n = 87; p = 0,918). n.s.-nicht signifikant. TZ-Tumorzellen.

5.1.1.6 Der *knock down* von Tumorzell-HIF-1 α reduziert die c-Met-Expression und Signaltransduktion in TIMP-1-überexprimierenden Tieren

Es ist bekannt, dass die Signaltransduktion über den c-Met-Rezeptor promigratorische und prometastatische Signalwege aktivieren kann (Birchmeier *et al.*, 2003) und dass deren Blockade die TIMP-1-assoziierte Streuung von Tumorzellen verhindert (Kopitz *et al.*, 2007). Zudem kann die Expression von c-Met durch Erhöhung der HIF-1 α -Level induziert werden (Pennacchiotti *et al.*, 2003). Um zu untersuchen, ob die HIF-1 α -abhängige Reduktion der Tumorzellstreuung in TIMP-1-überexprimierenden Tieren mit Veränderungen in der c-Met-Expression oder -Aktivität einhergeht, wurde die Expression von c-Met und dessen aktiver Form, phospho-c-Met, mittels Westernblotanalyse bzw. Immunfluoreszenzfärbung untersucht. In der Tat wurde durch den *knock down* von HIF-1 α in L-CI.5s-Zellen die c-Met-Expression im Metastasen-tragenden Lebergewebe TIMP-1-überexprimierender Tiere reduziert (Abbildung 5-8, A). Dieses Ergebnis konnte auch dann bestätigt werden, wenn die geringere Tumorlast in L-CI.5s-shHIF-behandelten Tieren berücksichtigt wurde, indem die Expression von c-Met bei der densitometrischen Auswertung der Westernblots gegen die Expression von β -Galaktosidase, dem Produkt des *lacZ*-Tumorzell-Markergens, normalisiert wurde (Abbildung 5-8, A, rechts). In Übereinstimmung mit der reduzierten c-Met-Expression war in Metastasen und Leberparenchym TIMP-1-überexprimierender Tiere, denen HIF-1 α -*knock-down*-Zellen inokuliert worden waren, weniger phosphorylierter c-Met-Rezeptor nachweisbar als in Tieren, die mit L-CI.5s-shNT-Zellen behandelt worden waren (Abbildung 5-8, B). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Fehlen von HIF-1 α in den Tumorzellen zu einer verringerten c-Met-Signaltransduktion führen kann, was die verringerte Streuung von L-CI.5s-shHIF-Zellen in Tieren mit erhöhter TIMP-1-Expression erklären kann.

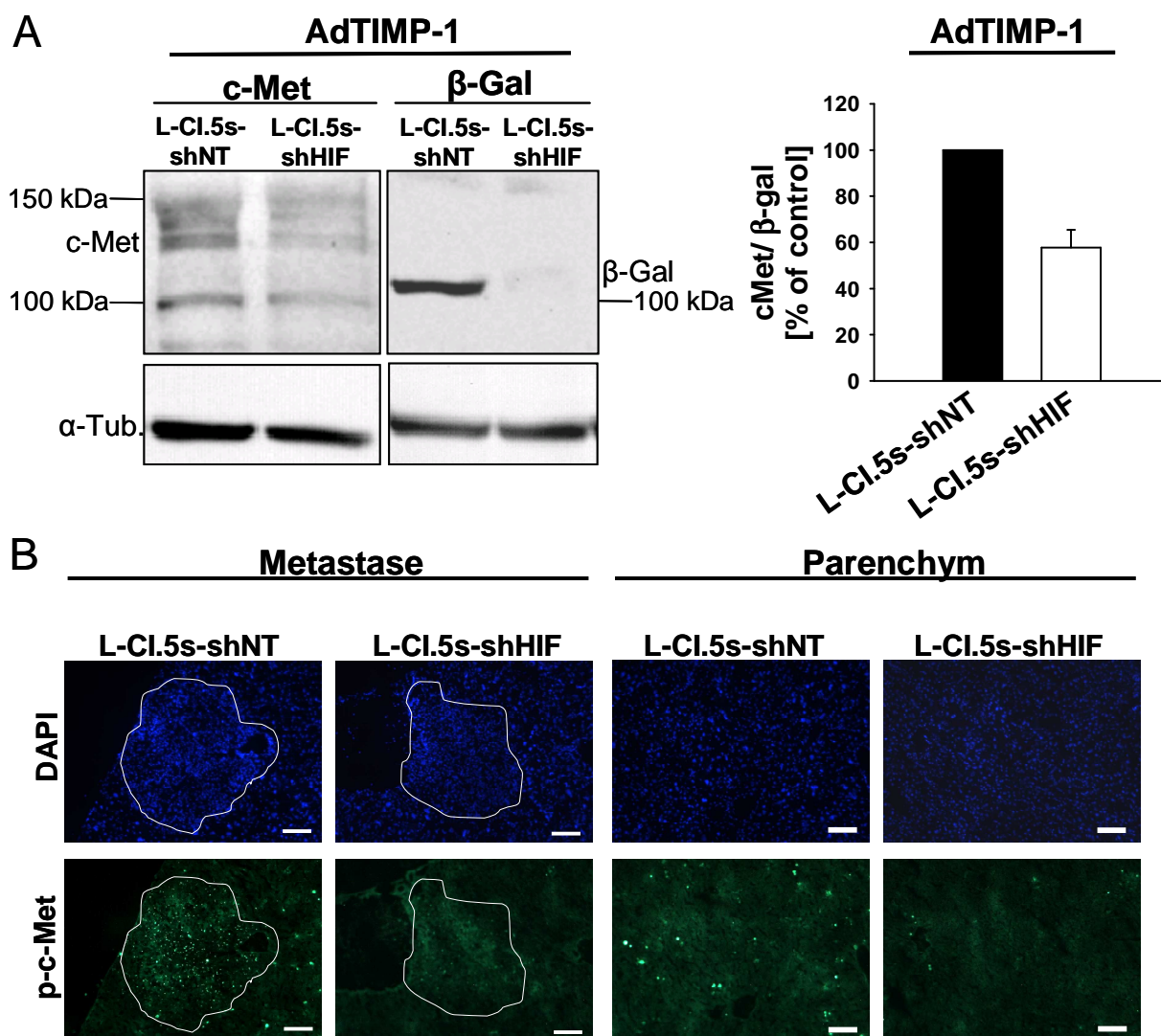


Abbildung 5-8: Reduzierte c-Met-Expression und -Aktivierung in Lebergewebe bzw. Metastasen TIMP-1-transduzierter Tiere durch den *knock down* von HIF-1 α in Tumorzellen. Drei Tage nach AdTIMP-1-Gentransfer wurden 5000 *lacZ*-markierte L-CI.5s-shNT- oder L-CI.5s-shHIF-Zellen in CD1-*nu/nu*-Mäuse inokuliert. Nach weiteren sieben Tagen wurden die Tiere getötet und die Lebern entnommen. **A**, Analyse der c-Met-Proteinexpression mittels Westernblot-Analyse. Der gezeigte Blot ist beispielhaft für eines aus drei analysierten Tieren pro Gruppe. Um die reduzierte Tumorzelllast in der HIF-1 α -*knock-down*-Gruppe zu berücksichtigen, wurde die Menge an c-Met-Protein nach densitometrischer Auswertung auf die Menge an β -Galaktosidase, dem Produkt des Tumorzell-Markergens *lacZ*, normalisiert (rechts). Dargestellt ist die prozentuale Signalintensität in L-CI.5s-shHIF-behandelten Tieren im Vergleich zur L-CI.5s-shNT-Gruppe, deren Signalintensität auf 100% gesetzt wurde. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (L-CI.5s-shNT: 100, n = 2; L-CI.5s-shHIF: 57,73 \pm 7,71; n = 2). **B**, phospho-c-Met-Immunfluoreszenzfärbung von Lebergewebe TIMP-1-transduzierter Mäuse zeigt eine reduzierte Menge an aktivem c-Met in Metastasen und Parenchym von Tieren, denen L-CI.5s-shHIF-Zellen inokuliert worden waren, im Vergleich zu Tieren, die mit L-CI.5s-shNT-Zellen behandelt worden waren. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI. Balken: 100 μ m.

5.1.1.7 Der HIF-1 α -*knock-down* in den Tumorzellen hat keinen Einfluss auf die Proliferation

Neben einer verringerten Invasivität der HIF-1 α -*knock-down*-Zellen könnte auch eine reduzierte Proliferationsrate für die verringerte Metastasierung von L-CI.5s-shHIF-Zellen in TIMP-1-transduzierten Tieren im Vergleich zu L-CI.5s-shNT-Zellen verantwortlich sein. Um dies zu überprüfen, wurde die Proliferation beider Zelllinien *in vitro* über 48 Stunden (Abbildung 5-9, A) und *in vivo* mittels immunhistochemischen Nachweises des Proliferationsmarkers *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) in Lebermetastasen TIMP-1-transduzierter Tiere (Abbildung 5-9, B) untersucht. In beiden Fällen unterschied sich die Proliferation der beiden Zelllinien nicht nennenswert voneinander. Ein unterschiedliches Proliferationsverhalten von L-CI.5s-shHIF- und L-CI.5s-shNT-Zellen war somit nicht für die deutlichen Unterschiede in der Metastasierung beider Zelllinien in Mäusen mit erhöhter TIMP-1-Expression verantwortlich.

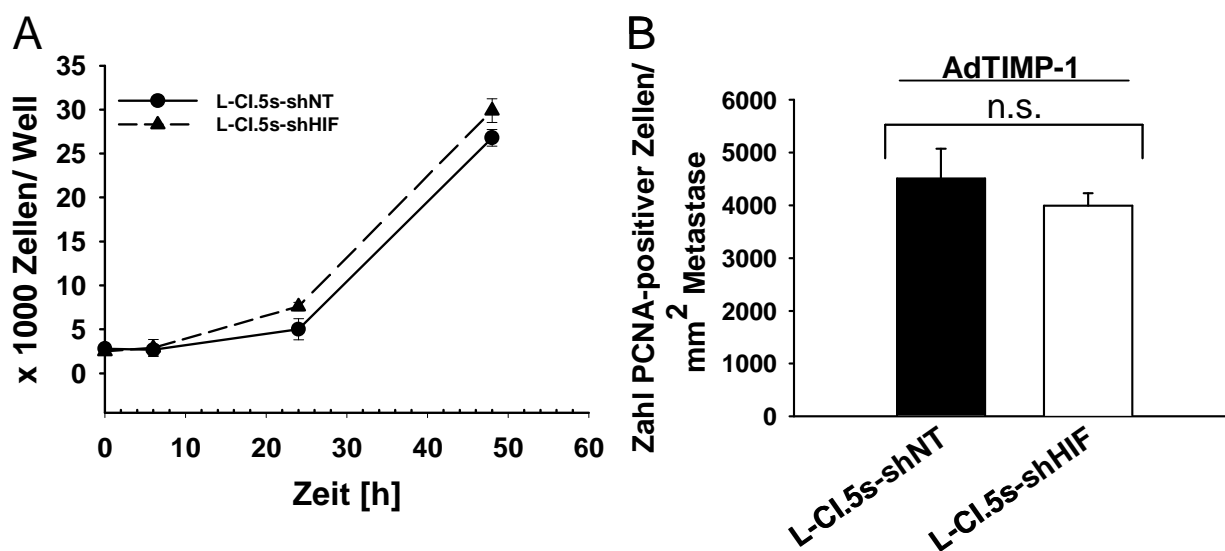


Abbildung 5-9: Nahezu unveränderte Proliferation nach *knock down* von HIF-1 α in L-CI.5s-Zellen. **A**, *in vitro*. 1000 Zellen pro Well wurden in 96-Well-Platten ausgesät und die Zahl lebender Zellen über 48 h beobachtet. n = 5 pro Zeitpunkt. **B**, *in vivo*. Drei Tage nach AdTIMP-1-Gentransfer wurden 5000 L-CI.5s-shNT- oder L-CI.5s-shHIF-Zellen in CD1-*nu/nu*-Mäuse inokuliert. Nach weiteren sieben Tagen wurden die Tiere getötet und die Lebern entnommen. PCNA-positive Zellen innerhalb makrometastatischer Foci in der Leber wurden immunhistochemisch auf Paraffinschnitten angefärbt, ausgezählt und die Anzahl auf die Fläche der Metastase normiert. Die PCNA-positiven Zellen in 12 (L-CI.5s-shNT) bzw. 16 (L-CI.5s-shHIF) Metastasen wurden ausgezählt. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (L-CI.5s-shNT: 40509,73 \pm 563,45; n = 12. L-CI.5s-shHIF: 3994,10 \pm 234,99; n = 16; p = 0,88). n.s. – nicht signifikant.

5.1.2 Untersuchungen zum Einfluss von TIMP-1 auf Neutrophile Granulozyten und deren Rolle bei der TIMP-1-induzierten Metastasierung

Die Aktivierung des HGF-c-Met-Signalwegs ist entscheidend für die prometastatische Wirkung von TIMP-1 (Kopitz *et al.*, 2007). Es ist bereits bekannt, dass die Überexpression von TIMP-1 sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Tumorzellen zu einem Anstieg der HGF-Proteinmenge in der Leber führt (Kopitz *et al.*, 2007). Bislang war allerdings weder bekannt, wie es zu dem beobachteten HGF-Anstieg kommt, noch, ob HGF ein limitierender Faktor der TIMP-1-induzierten Metastasierung ist.

5.1.2.1 Kein signifikanter Anstieg der HGF-mRNA-Expression in der Leber durch TIMP-1

Um zu untersuchen, ob TIMP-1 in der Leber die *De-novo*-Synthese von HGF induziert, wurde die Menge an HGF-mRNA nach adenoviralem Transfer von TIMP-1 bzw. Kontrollvektor in CD1-*nu/nu*-Mäusen mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Es zeigte sich, dass erhöhte TIMP-1-Spiegel nicht zu einem signifikanten Anstieg der HGF-mRNA-Expression in der Leber führten (Abbildung 5-10). In Anbetracht der von Kopitz *et al.* beobachteten, durch TIMP-1-Überexpression bedingten Steigerung der HGF-Proteinexpression um 68% (Kopitz *et al.*, 2007) wurde hypothesisiert, dass in TIMP-1-überexprimierenden Tieren extrahepatisch synthetisiertes HGF-Protein z.B. durch infiltrierende Neutrophile Granulozyten in die Leber transportiert wird. Einen ersten Hinweis darauf lieferte bereits die Beobachtung, dass eine erhöhte TIMP-1-Expression in Menschen wie in Mäusen mit einer erhöhten Expression zweier Markergene Neutrophiler Granulozyten, Neutrophiler Elastase und Cathepsin G, einhergeht (Kopitz *et al.*, 2007).

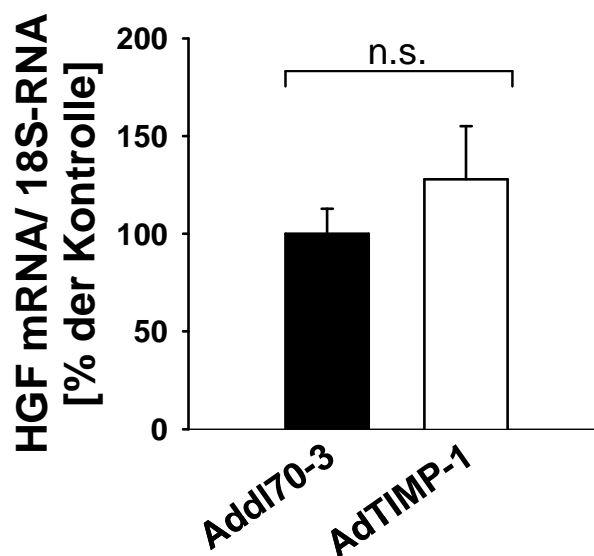


Abbildung 5-10: Kein signifikanter Anstieg der HGF-RNA-Expression in der Leber durch adenovirale Überexpression von TIMP-1. 2×10^9 pfu Addl70-3 oder AdTIMP-1 wurden i.v. in CD1-*nu/nu*-Mäuse inokuliert. Neun Tage nach Gentransfer wurden die Lebern entnommen und die HGF-mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert und auf die Expression von 18S-rRNA normalisiert. Dargestellt ist die prozentuale HGF-Expression in TIMP-1-transduzierten Mäusen im Vergleich zu Addl70-3-behandelten Kontrolltieren. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (Addl70-3: $100 \pm 12,79$; $n = 3$; AdTIMP-1: $127,82 \pm 27,23$; $n = 3$; $p = 0,369$). n.s. – nicht signifikant.

5.1.2.2 TIMP-1 verstärkt die Infiltration Neutrophiler Granulozyten in die Leber und die Migration von Neutrophilen *in vitro*

Um zu untersuchen, ob systemisch hohe TIMP-1-Spiegel tatsächlich einen Einfluss auf die Infiltration Neutrophiler Granulozyten in die Leber haben, wurde TIMP-1 mittels adenoviralen Gentransfers in Mäusen überexprimiert und die Neutrophilen in der Leber immunhistochemisch nachgewiesen. Der Nachweis erfolgte über die Detektion des Ly-6G-Zelloberflächenantigens, das außerhalb des Knochenmarks fast ausschließlich von Neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (Daley *et al.*, 2008) und deshalb häufig als Neutrophilenmarker herangezogen wird (Anderson *et al.*, 1998; Lieber *et al.*, 2004). Die Auszählung ergab, dass in TIMP-1-überexprimierenden Tieren mehr als doppelt so viele Neutrophile Granulozyten in die Leber eingewandert waren wie in Kontrolltieren mit unveränderter TIMP-1-Expression (Abbildung 5-11, A).

Für die Klärung der Frage, ob TIMP-1 direkt an diesem chemotaktischen Effekt beteiligt war, wurde das Migrationsverhalten von aus dem Knochenmark isolierten Neutrophilen Granulozyten *in vitro* im *Boyden-Chamber*-Migrationsversuch analysiert, wobei dem Medium im unteren Kompartiment rekombinantes TIMP-1 zugesetzt wurde. Tatsächlich

wanderten in Anwesenheit von TIMP-1 im unteren Kompartiment etwa viermal so viele Neutrophile durch die Membran wie in der Kontrolle (Abbildung 5-11, B). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass TIMP-1 direkt an der Rekrutierung Neutrophiler Granulozyten in die Leber beteiligt sein könnte.

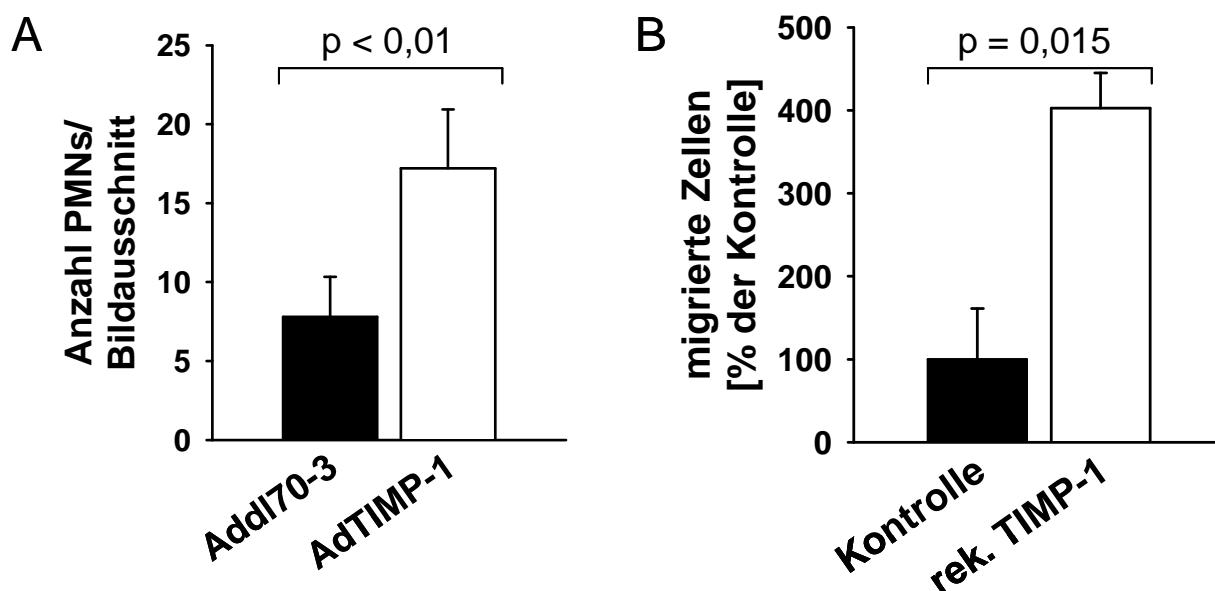


Abbildung 5-11: TIMP-1 beeinflusst die Migration Neutrophiler Granulozyten *in vivo* und *in vitro*. **A**, *in vivo*. 2×10^9 pfu Addl70-3 oder AdTimp-1 wurden i.v. in CD1-*nu/nu*-Mäuse inokuliert. Drei Tage nach Gentransfer wurden die Lebern entnommen und die Neutrophilen Granulozyten immunhistochemisch auf Kryoschnitten von Lebergewebe angefärbt. TIMP-1 führte zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl infiltrierter Neutrophiler Granulozyten in das Leberparenchym (Ulrike Brüning, AG Krüger; Masterarbeit). Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (Addl70-3: $7,80 \pm 0,38$; $n = 44$; AdTimp-1: $17,21 \pm 0,56$; $n = 44$; $p < 0,001$). **B**, *in vitro*. Neutrophile wurden aus dem Knochenmark von DBA/2-Mäusen isoliert und deren Migrationsverhalten in einem *Boyden-Chamber*-Migrationsversuch *in vitro* untersucht. Porenweite der Membran: 0,3 mm. 1400 ng/ml rekombinantes TIMP-1 wurde dem Medium im unteren Kompartiment zugesetzt. Nach 48 h wurden an der Unterseite der Membran haftende Zellen angefärbt und ausgezählt. TIMP-1 im unteren Kompartiment erhöhte die Migration der Neutrophilen Granulozyten durch die Membran. Dargestellt ist der prozentuale Anteil durch die Membran migrierter Neutrophiler in der TIMP-1-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle ohne TIMP-1 im Medium. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (Kontrolle: $100 \pm 61,21$; $n = 3$. rek. TIMP-1: $402,63 \pm 42,30$; $n = 3$; $p = 0,015$).

5.1.2.3 Einfluss von TIMP-1 auf die Degranulierung Neutrophiler Granulozyten

Infiltrierende Neutrophile Granulozyten könnten zum Anstieg an HGF-Protein und dadurch zur Aktivierung der HGF-c-Met-Signaltransduktion in der Leber TIMP-1-überexprimierender Tiere beitragen. Voraussetzung hierfür ist eine Freisetzung des intrazellulär gespeicherten HGF durch Degranulierung der Neutrophilen Granulozyten. Es wurde deshalb untersucht, ob TIMP-1 bzw. die TIMP-1-modulierte Mikroumgebung in der Leber die Degranulierung von PMNs induzieren können. Der direkte Effekt von

TIMP-1 wurde an isolierten Neutrophilen Granulozyten *in vitro* analysiert. Hierzu wurden aus dem Knochenmark isolierte Neutrophile Granulozyten entweder mit rekombinantem TIMP-1 oder mit PMA (Phorbol-Myristat-Acetat), einem starken Stimulus für die Degranulierung Neutrophiler Granulozyten (Richter, 1992; Grenier *et al.*, 2002), inkubiert und anschließend mittels HGF-Immuncytochemie untersucht, ob HGF intra- oder extrazellulär lokalisiert war. Im Unterschied zur Positivkontrolle PMA führte TIMP-1 nicht zu einer Freisetzung von HGF aus Neutrophilen (Ulrike Brüning, AG Krüger; Masterarbeit).

Auch wenn TIMP-1 *in vitro* offensichtlich nicht als Degranulationssignal für PMNs wirkte, so könnten andere Faktoren der TIMP-1-modulierten Mikroumgebung in der Leber dennoch zu einer Aktivierung/ Degranulierung von Neutrophilen führen. Um dies zu untersuchen, wurden Neutrophile Granulozyten im Metastasen-tragenden Lebergewebe TIMP-1-transduzierter oder mit Kontrollvirus behandelter Mäuse mittels Immunhistochemie auf Myeloperoxidase (MPO) angefärbt (Abbildung 5-12). Myeloperoxidase ist ein intrazelluläres, in azurophilen Granula von PMNs gespeichertes Enzym, das bei der Degranulierung Neutrophiler Granulozyten freigesetzt wird (Witko-Sarsat *et al.*, 2000).

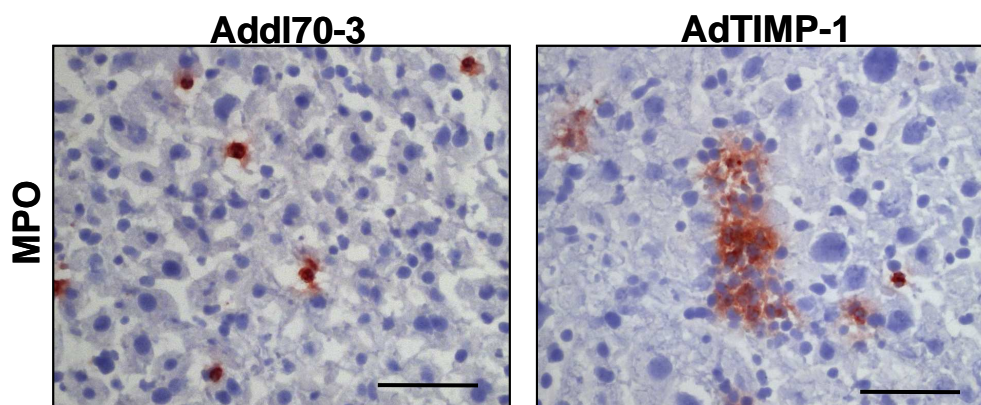


Abbildung 5-12: Einfluss der TIMP-1-Überexpression auf die Degranulierung Neutrophiler Granulozyten *in vivo*. 2×10^9 pfu Addl70-3 oder AdTIMP-1 wurden i.v. in CD1-*nu/nu*-Mäuse inokuliert. Drei Tage später wurden 5000 L-Cl.5s-T-Zell-Lymphomzellen i.v. inokuliert. Nach weiteren sechs Tagen wurden die Tiere getötet und die Neutrophilen Granulozyten in der Leber mittels Immunhistochemie auf Myeloperoxidase angefärbt. Das parazellulär lokalisierte Signal von MPO in AdTIMP-1-behandelten Mäusen lässt auf eine Degranulierung der Neutrophilen schließen. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für die jeweiligen Gruppen. Balken: 50 μ m.

In Kontrolltieren mit normaler TIMP-1-Expression führte der Nachweis der Myeloperoxidase zu einem punktuellen Signal, während Myeloperoxidase in TIMP-1-überexprimierenden Tieren parazellulär detektierbar war (Abbildung 5-12). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass in der TIMP-1-modulierten Umgebung Myeloperoxidase aus intrazellulären Speichern freigesetzt wurde, und ist somit ein indirekter Nachweis dafür, dass die

TIMP-1-modulierte Mikroumgebung die Degranulierung von Neutrophilen induzierte.

5.1.2.4 Etablierung der Antikörper-vermittelten Depletion Neutrophiler Granulozyten in Mäusen

Um den Beitrag der durch TIMP-1-Überexpression verstärkt in die Leber infiltrierenden Neutrophilen Granulozyten zur TIMP-1-induzierten Metastasierung zu untersuchen, sollten Neutrophile Granulozyten in DBA/2-Mäusen Antikörper-vermittelt depletiert werden. Für die Etablierung der Depletion wurden DBA/2-Mäuse an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit einem gegen Neutrophile Granulozyten gerichteten Antiserum (anti-PMN-Antiserum) behandelt (Lawson *et al.*, 1997). Drei und sieben Tage nach der ersten Inokulation wurde die Anzahl im Blut zirkulierender Neutrophiler Granulozyten immunocytochemisch durch Nachweis Ly-6G-positiver Zellen bestimmt (Abbildung 5-13).

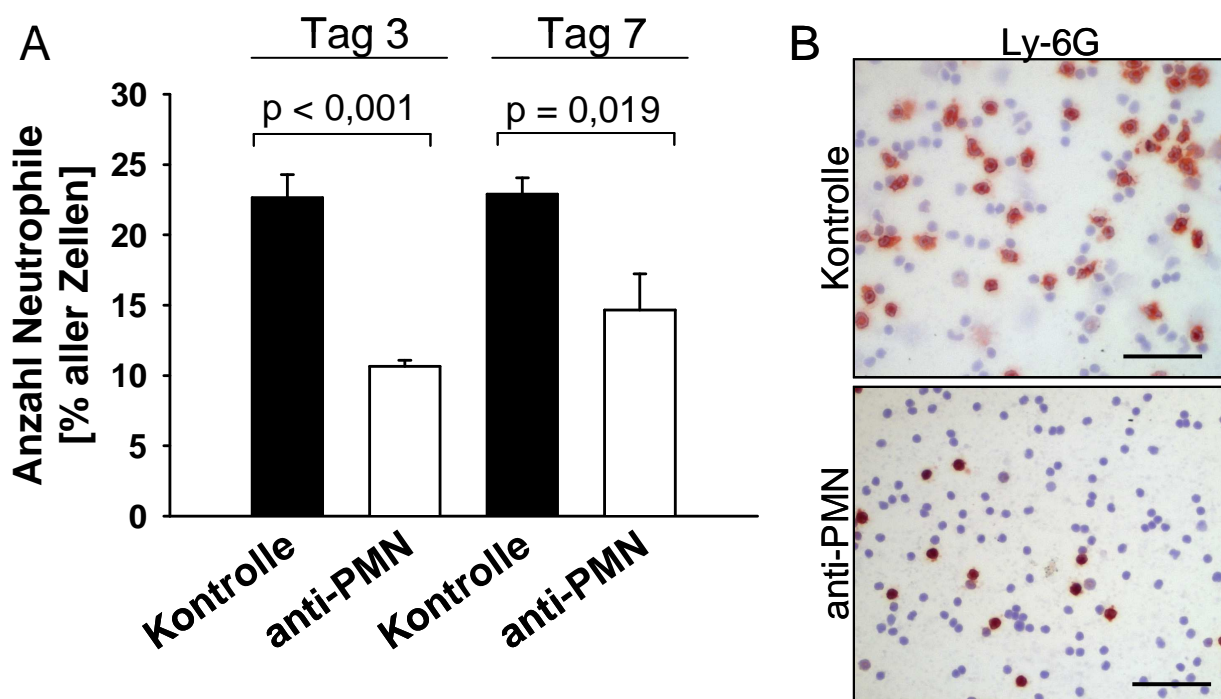


Abbildung 5-13: Etablierung der Antiserum-vermittelten Depletion Neutrophiler Granulozyten. 250 µl eines gegen Maus-Neutrophile Granulozyten gerichteten polyklonalen Antiserums (anti-PMN) wurden zweimal im Abstand von 24 Stunden i.p. in DBA/2-Mäuse inokuliert: Kontrolltiere erhielten PBS. Drei und sieben Tage später wurden die Tiere getötet, aus der Mesenterialvene Blut entnommen, nach Abtrennung der Erythrozyten Zytospins angefertigt und Neutrophile Granulozyten mittels Immunocytochemie auf den Neutrophilen-Marker Ly-6G angefärbt. **A**, Auszählung Ly-6G-positiver und -negativer Zellen ergab zu beiden Zeitpunkten eine signifikant reduzierte Anzahl im Blut zirkulierender PMNs nach Antiserum-Behandlung. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (Tag 3: Kontrolle: 22,66 ± 1,63; anti-PMN: 10,65 ± 0,44; $p < 0,001$. Tag 7: Kontrolle: 22,90 ± 1,16; anti-PMN: 14,65 ± 2,57; $p = 0,019$. $n = 5$ Bildauschnitte in allen Gruppen). **B**, Deutliche Veränderungen in der Morphologie Neutrophiler Granulozyten in Antiserum-behandelten Tieren lassen eine Schädigung der verbliebenen Neutrophilen vermuten; Tag drei nach Behandlung; Balken: 50 µm. anti-PMN: mit Antiserum behandelt.

An Tag drei nach initialer Behandlung konnte eine über 50%-ige Reduktion der Anzahl zirkulierender Neutrophiler nachgewiesen werden (Abbildung 5-13, A). Die Effizienz der Depletion nahm im Verlauf der folgenden Tage zwar ab, betrug aber auch an Tag sieben noch 36% (Abbildung 5-13, A). Auffällig war außerdem, dass die verbliebenen Ly-6G-positiven Zellen in der Antiserum-behandelten Gruppe im Vergleich zu Neutrophilen aus Kontrolltieren eine deutlich veränderte Morphologie aufwiesen, was eine Schädigung der verbliebenen PMNs vermuten lässt (Abbildung 5-13, B).

5.1.2.5 Untersuchung der Rolle Neutrophiler Granulozyten bei der TIMP-1-induzierten Metastasierung

Für die Klärung der Frage nach dem Beitrag Neutrophiler Granulozyten zur TIMP-1-induzierten Metastasierung wurde nach dem zuvor etablierten Protokoll nach zwei initialen Gaben des Antiserums TIMP-1 mittels adenoviralen Gentransfers in DBA/2-Mäusen überexprimiert. Kontrolltiere wurden mit Add170-3 behandelt. Drei Tage nach dem Gentransfer wurden L-C1.5s-Tumorzellen inokuliert und weitere sechs Tage später wurde die Lebermetastasierung untersucht.

Unabhängig von der Anwesenheit Neutrophiler Granulozyten führte die Überexpression von TIMP-1 zu einer Reduktion der Anzahl an Makrometastasen in der Leber (Abbildung 5-14, A). Dieser Effekt, der möglicherweise mit einem hemmenden Einfluss von TIMP-1 auf die Extravasation der Tumorzellen zusammenhängt, wurde bereits mehrfach beobachtet (Kopitz *et al.*, 2007; Abbildung 5-6). Die Behandlung mit dem anti-PMN-Antiserum führte zu einer zusätzlichen Reduktion der Anzahl metastatischer Foci in TIMP-1-überexprimierenden Tieren, um 37%, welche jedoch statistisch nicht signifikant war (Abbildung 5-14, A, weiße Balken). In den Kontrolltieren ohne TIMP-1-Überexpression wirkte sich die Behandlung mit dem anti-PMN-Antiserum nicht auf die Anzahl an Makrometastasen in der Leber aus (Abbildung 5-14, A, schwarze Balken).

Neben dem Einfluss, den Neutrophile auf die Ausbildung von Makrometastasen haben, ist v.a. auch deren Bedeutung bei der aggressiven TIMP-1-induzierten Streuung der Tumorzellen von Interesse. Die Behandlung der Tiere mit dem anti-PMN-Antiserum konnte diese Tumorzellinfiltration fast vollständig unterdrücken (Abbildung 5-14, B), was darauf hinweist, dass Neutrophile vermutlich in den frühen Phasen der TIMP-1-induzierten Metastasierung eine wichtige Rolle spielen und möglicherweise an der Ausbildung der TIMP-1-induzierten metastatischen Nische in der Leber beteiligt sind.

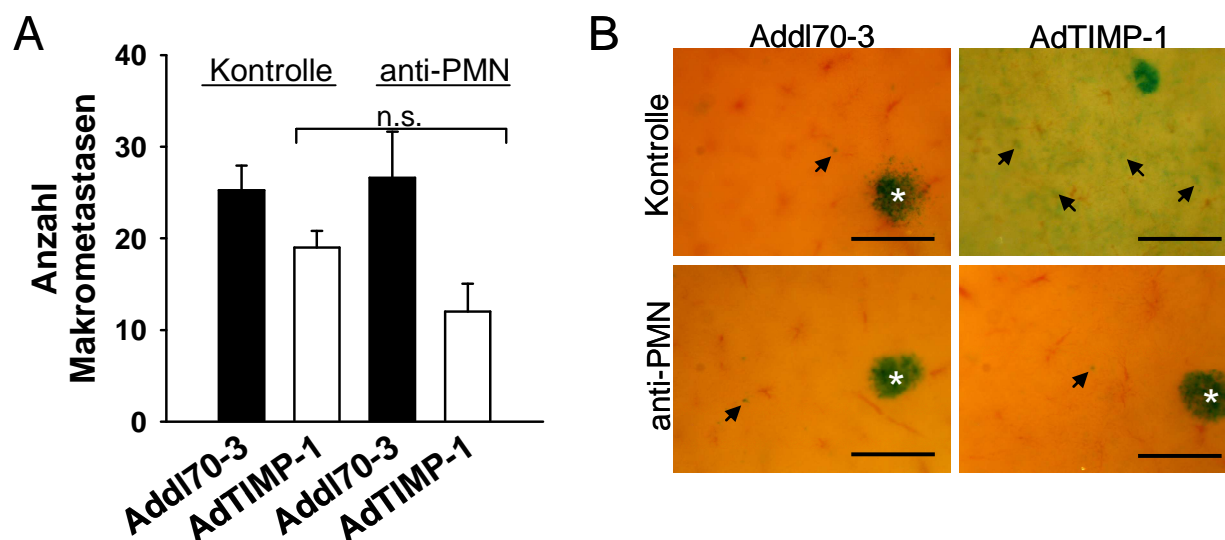


Abbildung 5-14: Auswirkung der anti-PMN-Behandlung auf die experimentelle Lebermetastasierung. 250 µl des gegen Neutrophile Granulozyten gerichteten Antiserums bzw. 250 µl PBS wurden zweimal im Abstand von 24 Stunden i.p. in DBA/2-Mäuse inokuliert. Drei Stunden nach der zweiten Applikation des Antiserums wurden 2×10^9 pfu AdTIMP-1 oder Addl70-3 i.v. inokuliert. Drei Tage später wurden 5000 *lacZ*-markierte L-Cl.5s-T-Zell-Lymphomzellen i.v. appliziert. Am sechsten Tag nach der Inokulation der Tumorzellen wurden die Tiere getötet und Makro- (A) und Mikrometastasierung (B) in der Leber nach X-Gal-Färbung untersucht. **A**, Anzahl der Makrometastasen (Metastasen $\geq 0,2$ mm) auf den medialen Leberlappen. Reduktion der Makrometastasierung in TIMP-1-überexprimierenden Tieren, jedoch nicht in Mäusen mit normaler TIMP-1-Expression. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (Addl70-3/ PBS: $25,25 \pm 2,69$; $n = 4$; AdTIMP-1/ PBS: $19,00 \pm 1,82$; $n = 5$; Addl70-3/ anti-PMN: $26,60 \pm 5,03$; $n = 5$; AdTIMP-1/ anti-PMN: $12,00 \pm 3,03$; $n = 4$). n.s. – nicht signifikant. **B**, Nahaufnahmen repräsentativer Lebern zeigen fehlende TIMP-1-assoziierte Infiltration einzelner Tumorzellen in das Leberparenchym in anti-PMN-behandelten, TIMP-1-überexprimierenden Tieren; Sterne: Makrometastasen; Pfeile: Mikrometastasen; jedes blau-grüne Signal stammt von einer *lacZ*-markierten Tumorzelle; Balken: 500 µm.

5.1.3 Ausblick: Untersuchung der Rolle von Wirts-c-Met bei der TIMP-1-induzierten Metastasierung

Systemisch hohe TIMP-1-Spiegel führen auch in Abwesenheit von Tumorzellen zu einer Aktivierung des c-Met-Signalwegs in der Leber, und die Aktivierung dieses Signalwegs ist Voraussetzung für die prometastatische Wirkung von TIMP-1 (Kopitz *et al.*, 2007). Während es zur Rolle von c-Met in Tumorzellen zahlreiche Untersuchungen gibt (Übersicht in Birchmeier *et al.*, 2003), ist bislang kaum etwas über die Bedeutung der c-Met-Signaltransduktion in Wirtszellen bei der Metastasierung bekannt. Insbesondere gibt es bislang keine Studien dazu, ob die c-Met-Signaltransduktion in der Leber zur Ausbildung einer prämetastatischen Nische in einer Mikroumgebung mit erhöhter TIMP-1-Expression beitragen kann. Durch adenoviralen Gentransfer einer gegen c-Met gerichteten shRNA-Sequenz lässt sich eine spezifische Inhibierung von c-Met in Wirtszellen

erreichen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde hierfür ein Protokoll etabliert, das es in weiteren Studien erlaubt, den Beitrag des c-Met-Signalwegs in Wirtszellen zur TIMP-1-induzierten Metastasierung zu untersuchen.

5.1.3.1 shRNA-vermittelter *knock down* von c-Met *in vivo*

5.1.3.1.1 Dosisfindung

Zunächst sollte ermittelt werden, welche Dosis des Adshc-Met-Virus erforderlich ist, um in immunkompetenten DBA/2-Mäusen einen effizienten *knock down* von c-Met in der Leber zu erzielen. Hierzu wurden 2×10^9 , $8,25 \times 10^9$ oder $1,45 \times 10^{10}$ pfu des Adshc-Met- bzw. $1,45 \times 10^{10}$ pfu des Kontroll-Virus (Addl70-3) in DBA/2-Mäuse inokuliert und fünf Tage später die RNA-Expression von c-Met in der Leber mittels quantitativer RT-PCR ermittelt. Die Analyse ergab, dass schon mit der niedrigsten eingesetzten Virusdosis von 2×10^9 pfu Adshc-Met pro Maus auf RNA-Ebene eine signifikante Reduktion der c-Met-Expression um 93% erreicht wurde (Abbildung 5-15).

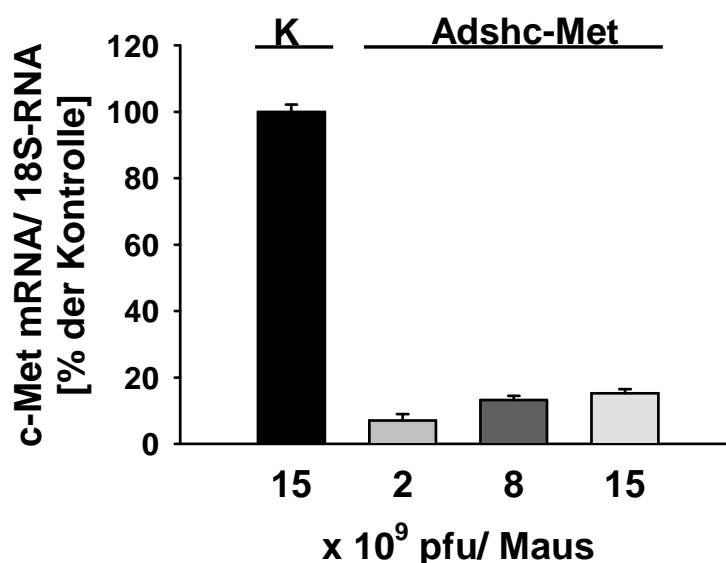


Abbildung 5-15: Etablierung des c-Met-*knock-down* in der Leber: Dosisfindung. $1,45 \times 10^{10}$ pfu Addl70-3 („K“) bzw. 2×10^9 , 8×10^9 oder $1,45 \times 10^{10}$ pfu Adshc-Met wurden i.v. in DBA/2-Mäuse inokuliert. Fünf Tage später wurden die Tiere getötet, die Lebern entnommen und die c-Met-Expression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR bestimmt. Die c-Met-Expression wurde auf die Expression von 18S-rRNA normalisiert. Dargestellt ist die prozentuale c-Met-Expression Adshc-Met-behandelter Tiere im Vergleich zur Addl-Kontrolle. Säulen: Mittelwerte. Balken: Standardfehler. (Addl70-3: $100 \pm 2,20$; n = 2; Adshc-Met 2×10^9 pfu: $7,10 \pm 1,85$; n = 2; p < 0,001. 8×10^9 pfu: $13,25 \pm 1,28$; n = 2; p < 0,001. $1,45 \times 10^{10}$ pfu: $15,28 \pm 1,27$; n = 2; p < 0,001).

5.1.3.1.2 Zeitverlauf des c-Met-knock-down nach adenoviralem Gentransfer

Um die Rolle von Wirts-c-Met bei der TIMP-1-induzierten Metastasierung, insbesondere auch bei der Ausbildung einer prämetastatischen Nische in der Leber, untersuchen zu können, muss die c-Met-Expression in der Leber bereits zu Beginn der TIMP-1-Überexpression auch auf Proteinebene reduziert sein und diese Reduktion während des gesamten Metastasierungsexperiments anhalten. Um deshalb den zeitlichen Verlauf der c-Met-Expression im Lebergewebe nach Inokulation des Adshc-Met-Virus bzw. des Kontrollvirus zu untersuchen, wurden je 2×10^9 pfu Add170-3 bzw. Adshc-Met i.v. in DBA/2-Mäuse inokuliert und die Expression von c-Met in der Leber zusätzlich zu Tag fünf auch zwei, neun und 17 Tage nach Virusinokulation auf RNA- und Proteinebene untersucht. Auf RNA-Ebene war die c-Met-Expression zu jedem der Zeitpunkte im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert (Abbildung 5-16).

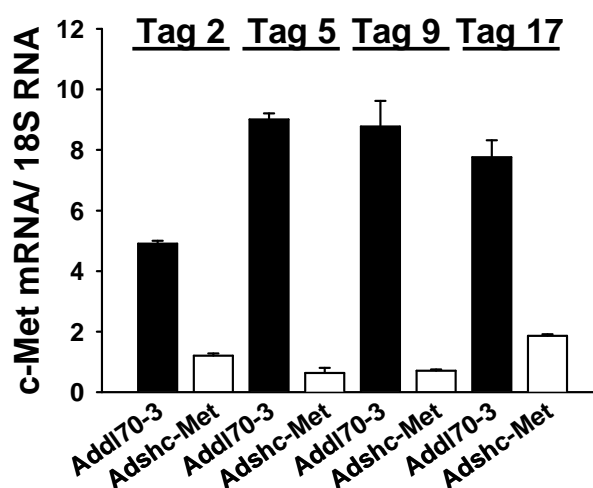


Abbildung 5-16: Signifikante Reduktion der c-Met-RNA-Expression bereits an Tag 2 nach Adshc-Met-Gentransfer. 2×10^9 pfu Add170-3 bzw. Adshc-Met wurden i.v. in DBA/2-Mäuse inokuliert. Zwei, fünf, neun und 17 Tage später wurde die RNA-Expression von c-Met im Lebergewebe mittels qRT-PCR untersucht und auf die Expression von 18S-rRNA normalisiert. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler. (Tag 2: Add170-3: $4,90 \pm 0,10$; $n = 2$; Adshc-Met: $1,21 \pm 0,07$; $n = 2$; $p = 0,002$. Tag 5: Add170-3: $9,01 \pm 0,20$; $n = 2$; Adshc-Met: $0,64 \pm 0,17$; $n = 2$; $p = 0,002$. Tag 9: Add170-3: $8,77 \pm 0,85$; $n = 2$; Adshc-Met: $0,71 \pm 0,04$; $n = 2$; $p = 0,002$. Tag 17: Add170-3: $7,76 \pm 0,57$; $n = 2$; Adshc-Met: $1,86 \pm 0,05$; $n = 2$; $p = 0,002$).

Im Unterschied dazu konnte auf Proteinebene erst ab Tag neun nach Virusinokulation eine deutliche Reduktion der c-Met-Expression nachgewiesen werden, die jedoch ebenfalls bis Tag 17 anhielt (Abbildung 5-17). Aufgrund dieser Ergebnisse sollte in zukünftigen Experimenten die Inokulation des TIMP-1-kodierenden Adenovirus idealerweise nicht vor Tag neun nach Transfer der c-Met-shRNA erfolgen.

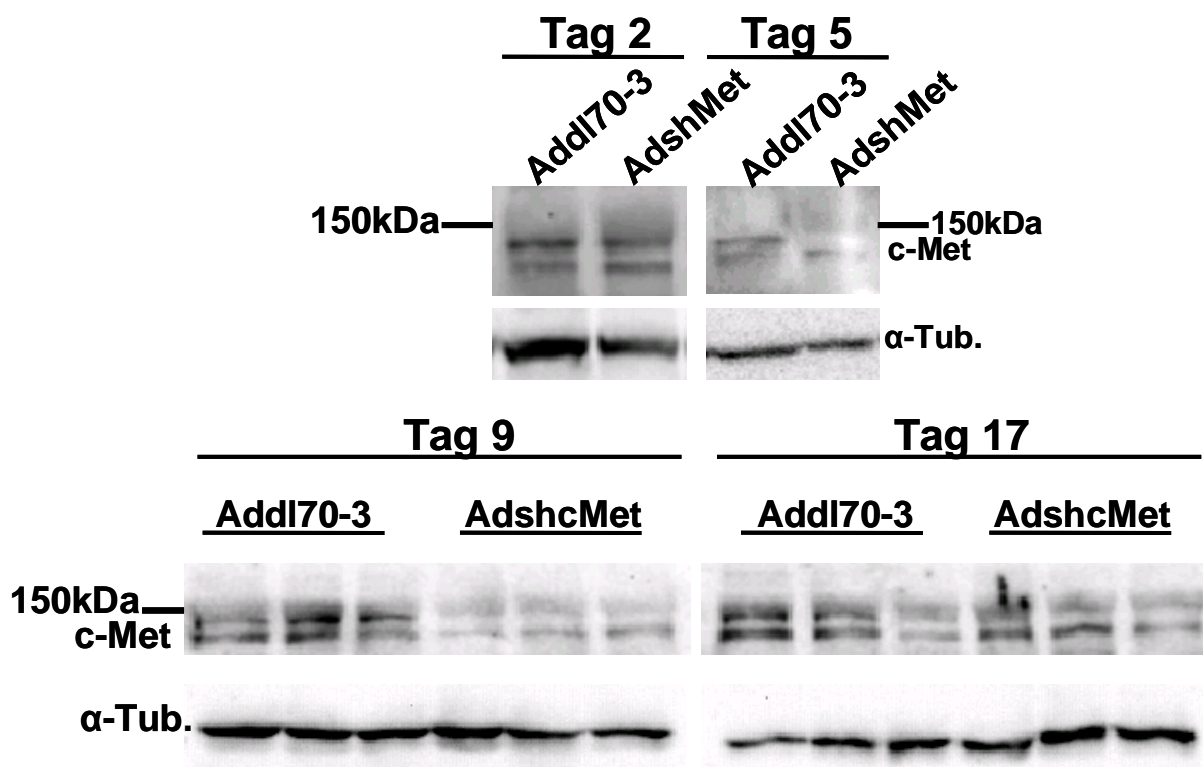


Abbildung 5-17: Deutliche Reduktion der c-Met-Proteinmenge in der Leber an Tag 9 nach Adshc-Met-Gentransfer. 2×10^9 pfu Addl70-3 bzw. Adshc-Met wurden i.v. in DBA/2-Mäuse inokuliert. Zwei, fünf, neun und 17 Tage später wurde die Proteinexpression von c-Met im Lebergewebe mittels Westernblot-Analyse untersucht. α -Tubulin diente als Ladungskontrolle. $n = 2$ für Tag 2 und Tag 5; $n = 3$ für Tag 7 und Tag 9.

5.1.3.2 Adenoviraler Gentransfer von humanem TIMP-1 in die Mausleber nach vorangehender Adenovirusinokulation

Die Untersuchung der Rolle von Wirts-c-Met im TIMP-1-Modell der experimentellen Metastasierung erfordert die aufeinanderfolgende zweimalige Inokulation von Adenoviren (erst Adshc-Met und danach AdTIMP-1). Adenoviren können eine Immunreaktion des Wirts auslösen, so dass bei wiederholter Applikation von Adenoviren die Viruselimination beschleunigt ist (Dong *et al.*, 1996; Benihoud *et al.*, 1998). Es musste deshalb sichergestellt werden, dass bei Durchführung des Versuchs nach dem geplanten Protokoll trotz vorangehender Inokulation von Adshc-Met-Viren noch eine TIMP-1-Überexpression durch Inokulation von AdTIMP-1-Viren erzielt wird. Um dies zu überprüfen, wurden DBA/2-Mäusen neun Tage nach Inokulation von Addl70-3 oder Adshc-Met TIMP-1-kodierende Adenoviren bzw. Kontrollviren inokuliert. Die RNA-Expression von humanem TIMP-1 in der Leber wurde an Tag drei nach TIMP-1-Gentransfer, dem geplanten Zeitpunkt der Tumorzellinokulation, untersucht. Es konnte eine schwache Expression des humanen Transgens nachgewiesen werden (Abbildung 5-18).

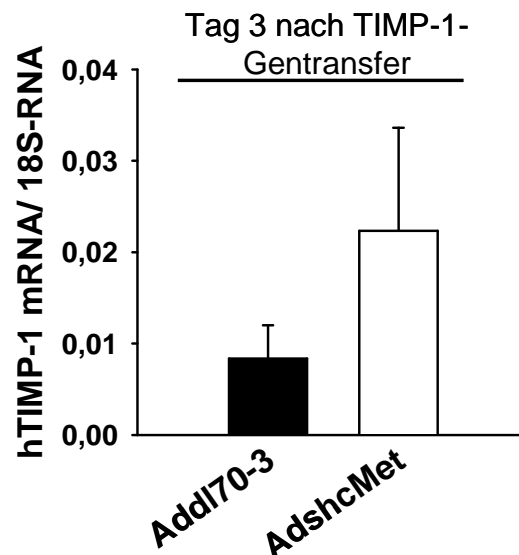


Abbildung 5-18: Untersuchung der adenoviral vermittelten Expression von humanem TIMP-1 nach vorangegangenem adenoviralem Gentransfer. 2×10^9 pfu AddI70-3 bzw. Adshc-Met wurden i.v. in DBA/2-Mäuse inokuliert. Neun Tage später wurden 2×10^9 pfu AdTIMP-1 ebenfalls i.v. appliziert. Weitere drei Tage später wurden die Tiere getötet, die Lebern entnommen und die Expression von humanem TIMP-1 in der Mausleber mittels qRT-PCR analysiert. Die TIMP-1-Expression wurde auf die Expression von 18S-rRNA normalisiert. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler (AddI70-3/ AdTIMP-1: $0,008 \pm 0,004$; $n = 3$; Adshc-Met/ AdTIMP-1: $0,022 \pm 0,011$; $n = 3$; $p = 0,235$).

5.1.3.3 Erste Untersuchung des Beitrags von Wirts-c-Met zur TIMP-1-induzierten Metastasierung

In einem ersten Versuch mit kleiner Gruppengröße sollte untersucht werden, ob die nach dem erarbeiteten Protokoll erreichbare TIMP-1-Überexpression (s. Abbildung 5-19) ausreicht, um den typischen TIMP-1-assoziierten Metastasierungsphänotyp zu induzieren und ob der *knock down* von c-Met im Wirt einen Einfluss auf den Metastasierungsphänotyp in TIMP-1-überexprimierenden Mäusen hat. Hierzu wurden 2×10^9 pfu Adshc-Met bzw. Kontrollvirus in DBA/2-Mäuse inokuliert. Neun Tage später wurden 2×10^9 pfu des TIMP-1-kodierenden Adenovirus (AdTIMP-1), bzw. des entsprechenden Kontrollvirus (AddI70-3) intravenös appliziert. Weitere drei Tage später folgte die Inokulation von 5000 *lacZ*-markierten L-CI.5s-T-Zell-Lymphomzellen. Die Untersuchung der Mikrometastasierung in der Leber sechs Tage nach der Inokulation der Tumorzellen ergab, dass das Ausmaß der TIMP-1-Überexpression ausreichte, um die Tumorzellstreuung in der für TIMP-1 typischen Weise zu induzieren (Abbildung 5-19, A, links). Die Transduktion mit Adshc-Met-Viren konnte diesen aggressiven Metastasierungsphänotyp allerdings nicht verhindern (Abbildung 5-19, A, rechts). Während die Vorbehandlung mit Adshc-Met-Viren in Kontrolltieren ohne TIMP-1-Überexpression die Anzahl an Mak-

rometastasen in der Leber leicht reduzierte (Abbildung 5-19, B, links), wirkte sie sich in Mäusen mit erhöhter TIMP-1-Expression nicht auf die Anzahl makrometastatischer Foci aus (Abbildung 5-19, B, rechts).

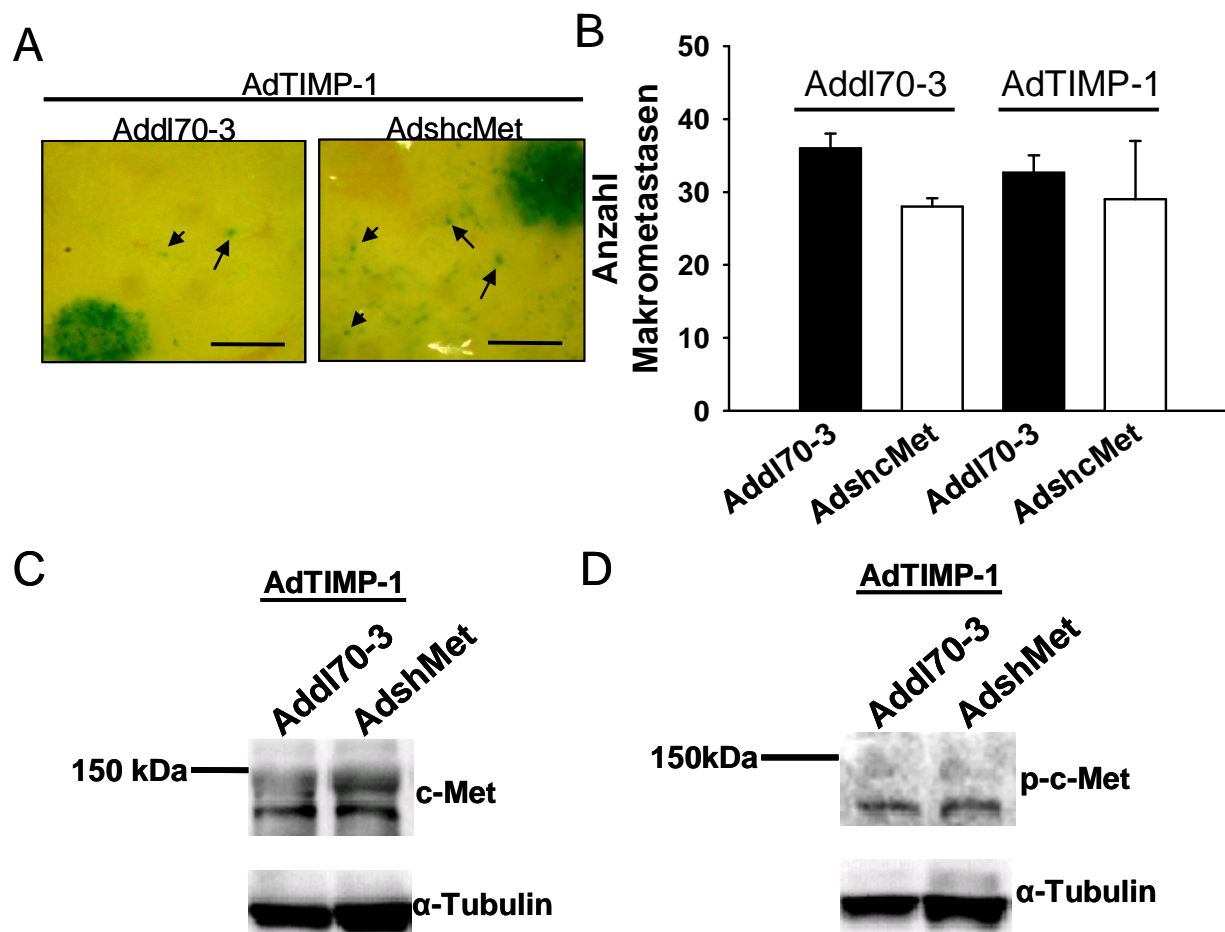


Abbildung 5-19: Untersuchung des Beitrags von Wirts-c-Met zur TIMP-1-induzierten Lebermetastasierung – erste Ergebnisse. 2×10^9 pfu Addl70-3 bzw. Adshc-Met wurden i.v. in DBA/2-Mäuse inokuliert. Neun Tage später wurden 2×10^9 pfu AdTIMP-1 und weitere drei Tage später 5000 *lacZ*-markierte L-Cl.5s-T-Zell-Lymphomzellen i.v. appliziert. Sechs Tage nach Inokulation der Tumorzellen wurden die Tiere getötet, die Lebern entnommen und die Tumorzellen mit X-Gal angefärbt. **A**, Nahaufnahmen der Leberoberfläche. Die erreichte TIMP-1-Überexpression reichte für die Induktion des für TIMP-1-transduzierte Tiere charakteristischen Metastasierungsphänotyps in der Leber aus (links). Adshc-Met-Gentransfer hatte keinen deutlichen Einfluss auf die Streuung der Tumorzellen in TIMP-1-überexprimierenden Tieren (rechts). Balken: 250 μ m. **B**, Leichte Reduktion der Makrometastasenzahl (Metastasen $\geq 0,2$ mm) durch Adshc-Met-Behandlung in Tieren mit normaler TIMP-1-Expression, nicht jedoch in TIMP-1-überexprimierenden Tieren. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler. (Addl70-3/ Addl70-3: $36 \pm 2,00$; $n = 3$; Adshc-Met/ Addl70-3: $28 \pm 1,16$; $n = 3$; $p = 0,026$. Addl70-3/ AdTIMP-1: $33 \pm 2,3$; $n = 3$; Adshc-Met/ AdTIMP-1: 29 ± 8 ; $n = 2$; $p = 0,621$). **C**, Westernblot-Analyse der c-Met-Expression in der Leber. Nahezu unveränderte c-Met-Proteinmenge in der Leber durch Behandlung mit Adshc-Met-Viren. Repräsentativ für $n = 2$. **D**, Westernblot-Analyse der phospho-c-Met-Proteinmenge in der Leber. Die Menge an phosphoryliertem c-Met nahm durch Behandlung mit dem Adshc-Met-Virus leicht ab. Repräsentativ für $n = 2$.

Um zu untersuchen, ob in Anwesenheit von Tumorzellen möglicherweise Kompensationsmechanismen in Kraft treten, welche eine durch die Transduktion mit Adshc-Met-Viren reduzierte c-Met-Expression im Lebergewebe ausgleichen, wurde die Expression von c-Met und von phosphoryliertem c-Met im Metastasen-tragenden Lebergewebe mittels Westernblot-Analyse untersucht. Tatsächlich konnte in Anwesenheit von Tumorzellen in Adshc-Met-behandelten Tieren keine Reduktion der c-Met-Expression im Vergleich zu Addl70-3-behandelten Tieren nachgewiesen werden (Abbildung 5-19, C). Die Menge an phosphoryliertem c-Met unterschied sich in den jeweiligen Versuchsgruppen ebenfalls kaum (Abbildung 5-19, D). Diese ersten Ergebnisse sind Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen zur Rolle von c-Met im Wirt bei der TIMP-1-induzierten Metastasierung und auch darüber, ob möglicherweise Kompensationsmechanismen der Tumorzellen eine reduzierte c-Met-Expression in der Leber ausgleichen können.

5.2 Charakterisierung molekularer Veränderungen im zeitlichen Verlauf der Metastasierung im L-CI.5s-Modell – Vergleich mit der TIMP-1-induzierten Metastasierung

Im L-CI.5s-Modell gehen die späten Stadien der Metastasierung (etwa ab Tag sieben nach Inokulation der Tumorzellen) mit einer Streuung einzelner Tumorzellen in das Leberparenchym einher (Gerg *et al.*, 2008), die in ihrem Phänotyp der TIMP-1-induzierten Metastasierung ähnelt. Es wurde deshalb untersucht, ob während der sekundären Invasion in den Spätstadien des L-CI.5s-Modells vergleichbare molekulare Veränderungen stattfinden, wie sie auch im Zusammenhang der TIMP-1-induzierten Metastasierung beschrieben worden waren.

5.2.1 Die sekundäre Invasion von Tumorzellen geht einher mit einer gesteigerten Expression von TIMP-1 in Metastasen

Zunächst sollte geklärt werden, ob die sekundäre Invasion von Tumorzellen während der späten Stadien der Lebermetastasierung von einer erhöhten Expression von TIMP-1 begleitet wird. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde die Expression von TIMP-1 während eines neuntägigen Beobachtungszeitraums im L-CI.5s-T-Zell-Lymphommodell untersucht. Die Analyse durch quantitativer RT-PCR zeigte, dass die Menge an TIMP-1 in der Leber im Verlauf des Fortschreitens der Metastasierung stark anstieg. Die stärkste Zunahme der TIMP-1-Expression war kurz vor Beginn der sekun-

dären Invasion der Tumorzellen zu verzeichnen (Abbildung 5-20, A).

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welche Zellen zum Anstieg der TIMP-1-Spiegel in der Leber im Verlauf der Metastasierung beitragen. Mittels Maus-TIMP-1-*in-situ*-Hybridisierung auf Leberschnitten konnte gezeigt werden, dass TIMP-1-mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tumorzellinokulation v.a. im Bereich der Metastasen exprimiert wurde (Abbildung 5-20, B). Es ist demnach anzunehmen, dass die Tumorzellen zum beobachteten Anstieg an TIMP-1 in der Leber beitragen.

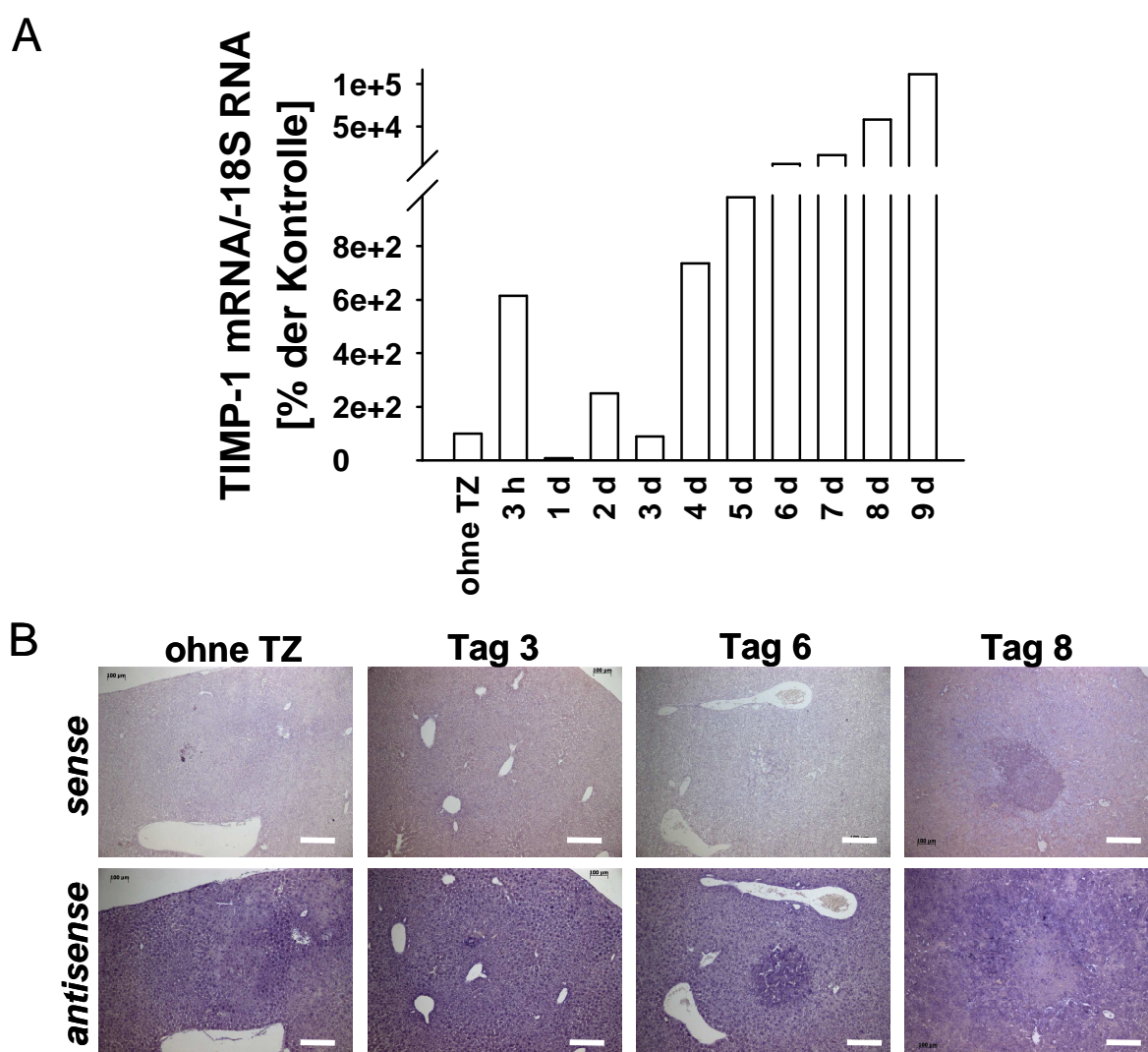


Abbildung 5-20: Anstieg der TIMP-1-Expression v.a. in Metastasen im Verlauf der Metastasierung. 5000 L-Cl.5s-T-Zell-Lymphomzellen wurden i.v. in DBA/2-Mäuse inokuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet und die Lebern entnommen. **A**, Zunahme der TIMP-1-Expression in der Leber im Verlauf der Metastasierung und Korrelation mit der sekundären Invasion. Analyse der TIMP-1-Expression mittels qRT-PCR. Normalisierung der TIMP-1-Expression zur Expression von 18S-rRNA. Dargestellt ist die prozentuale TIMP-1-Expression im Vergleich zu Tieren, die keine Tumorzellen erhalten hatten. Säulen: Mittelwerte; Pool aus drei Tieren pro Zeitpunkt. Versuch durchgeführt von Dr. M. Arlt und Dr. M. Gerg, AG Krüger; Auswertung durch B. Halbgewachs. **B**, TIMP-1-*in-situ*-Hybridisierung auf Parafinschnitten der Leber zeigt, dass TIMP-1 vor allem in Metastasen exprimiert wird; *sense*: Kontrolle, *antisense*: Nachweis von TIMP-1. Balken: 200 µm.

5.2.2 Die sekundäre Invasion wird begleitet von einem HGF-Protein-Anstieg und einer Aktivierung der HGF-c-Met-Signaltransduktion

Um zu überprüfen, ob es im Verlauf der Lebermetastasierung im L-CI.5s-Modell neben einer Induktion der TIMP-1-Expression auch zu einer Aktivierung des HGF-c-Met-Signalwegs kommt, wurde die HGF-Expression in der Mausleber zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation von L-CI.5s-Zellen sowohl auf Proteinebene mittels ELISA, als auch auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht (Abbildung 5-21, A, B).

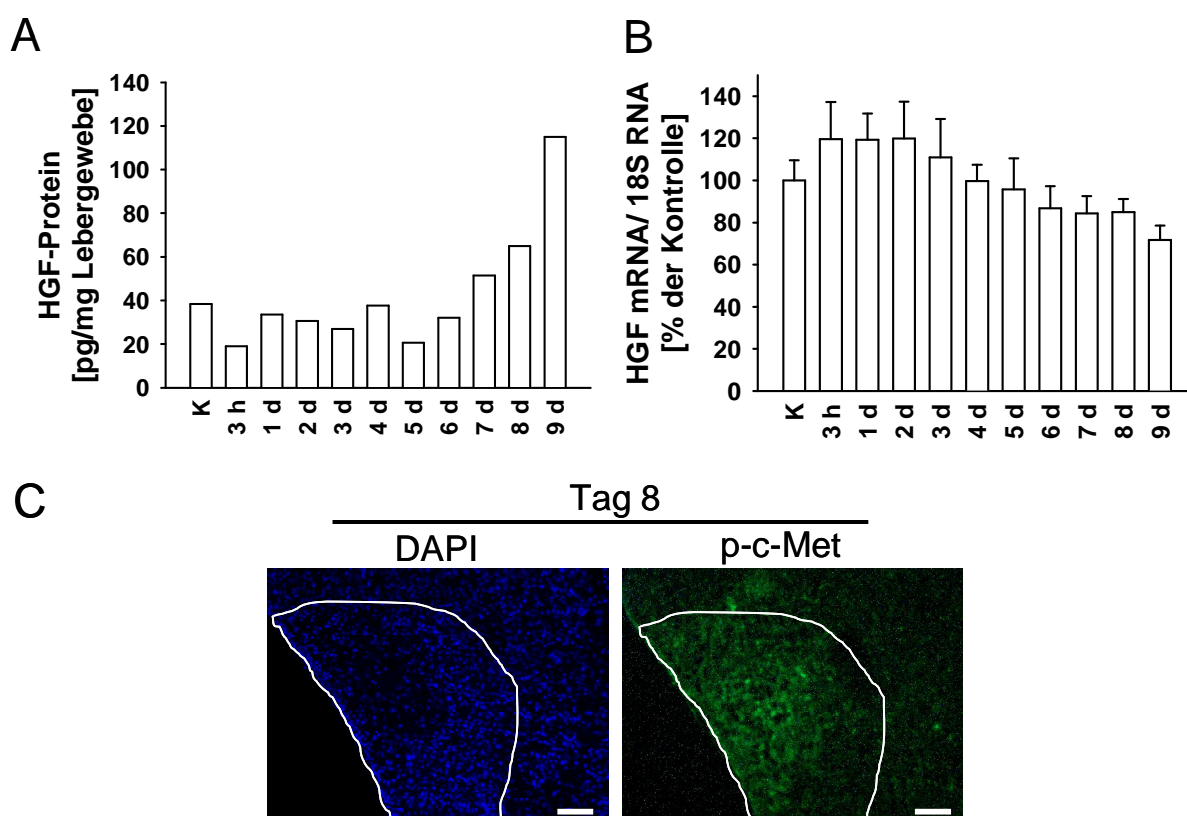


Abbildung 5-21: Zunahme der HGF-Proteinmenge, aber nicht der HGF-RNA im Verlauf der Metastasierung im L-CI.5s-Modell. 5000 L-CI.5s-T-Zell-Lymphomzellen wurden i.v. in DBA/2-Mäuse inokuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet und die Lebern entnommen. **A**, Bestimmung der HGF-Proteinmenge in der Leber mittels ELISA. Pool aus drei Tieren pro Zeitpunkt. Zunahme der HGF-Proteinmenge in den Spätstadien der Metastasierung. **B**, Bestimmung der RNA-Expression von HGF in der Leber mittels qRT-PCR und Normalisierung der HGF-Expression auf die Expression von 18S-rRNA. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler. $n = 3$ pro Zeitpunkt. Keine nennenswerte Änderung der HGF-RNA-Expression im Verlauf der Metastasierung. **C**, phospho-c-Met-Immunfluoreszenzfärbung auf Lebergewebe an Tag 8 nach Tumorzellinokulation zeigt Aktivierung von c-Met innerhalb von Metastasen. Repräsentatives Bild. Balken: 100 μm .

Während die Menge an HGF-Protein in der Leber in den späten Phasen der Metastasierung zunahm und somit mit dem Auftreten sekundär invadierter Tumorzellen korrelierte (Abbildung 5-21, A), konnte keine Zunahme der HGF-RNA-Expression beobachtet

werden (Abbildung 5-21, B). Dieses Ergebnis zeigt, dass HGF im Verlauf der Metastasierung, ähnlich wie bei der TIMP-1-induzierten Metastasierung bereits beobachtet, nicht *de novo* in der Leber gebildet wurde. Vielmehr scheint extrahepatisch synthetisierter HGF von außen, etwa durch infiltrierende Neutrophile Granulozyten, in die Leber zu gelangen. Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte in makrometastatischen Foci gegen Ende der Metastasierung eine aktivierte Signaltransduktion über den c-Met-Rezeptor, gemessen als phosphorylierter c-Met-Rezeptor, nachgewiesen werden, während im Parenchym kein phospho-c-Met-Signal detektierbar war (Abbildung 5-21, C).

5.2.3 Infiltrierende Neutrophile Granulozyten akkumulieren in Metastasen

Die TIMP-1-Überexpression verstärkte die Infiltration Neutrophiler Granulozyten in die Leber (s. Abschnitt 5.1.2.2). Es wurde deshalb untersucht, ob auch die im Verlauf der Lebermetastasierung ansteigende TIMP-1-Expression in der Leber von einer zunehmenden Infiltration Neutrophiler Granulozyten begleitet wurde (Abbildung 5-22).

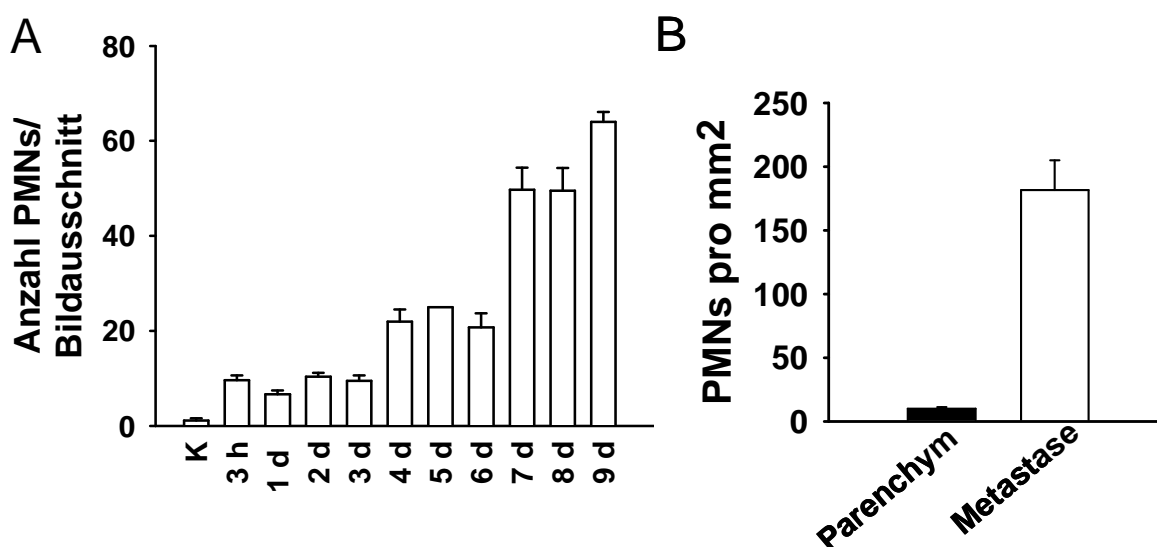


Abbildung 5-22: Im Verlauf der Metastasierung im L-C1.5s-Modell zunehmend in die Leber infiltrierende Neutrophile Granulozyten akkumulieren in Metastasen. 5000 L-C1.5s-T-Zell-Lymphomzellen wurden i.v. in DBA/2-Mäuse inokuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet und die Lebern entnommen. **A**, Nachweis Neutrophiler Granulozyten im Leberparenchym mittels Ly-6G-Immunhistochemie. Zunahme der Zahl infiltrierter Neutrophiler Granulozyten im Verlauf der Metastasierung, die mit dem Anstieg an TIMP-1 und HGF-Protein korrelierte (Ulrike Brüning, AG Krüger; Masterarbeit). **B**, Quantifizierung Neutrophiler Granulozyten in Metastasen und Leberparenchym an Tag sechs nach Tumorzellinokulation. Neutrophile Granulozyten wurden mittels Ly-6G-Immunhistochemie angefärbt und mikroskopisch ausgezählt. Normalisierung auf die Fläche. Säulen: Mittelwerte, Balken: Standardfehler. (Parenchym: $12,55 \pm 2,09$; $n = 5$; Metastase: $153,49 \pm 55,87$; $n = 5$; $p = 0,008$). Neutrophile Granulozyten akkumulierten innerhalb metastatischer Foci.

In der Tat konnte nach Inokulation von L-CI.5s-Zellen in DBA/2-Mäuse mittels Immunhistochemie gezeigt werden, dass es mit Fortschreiten der Lebermetastasierung zu einer Zunahme der Zahl Neutrophiler Granulozyten in der Leber kam (Abbildung 5-22, A). Um die Lokalisation der Neutrophilen im Metastasen-tragenden Lebergewebe genauer zu bestimmen, wurde die Anzahl an Neutrophilen Granulozyten pro Flächeneinheit im Leberparenchym sowie innerhalb von Metastasen ermittelt. Es zeigte sich, dass sich die Neutrophilen Granulozyten in den metastatischen Foci, den Orten mit der höchsten TIMP-1-Expression, anreicherten (Abbildung 5-22, B).

6 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten HIF-1 α auf Tumorzellseite bzw. Neutrophile Granulozyten auf Wirtsseite als Mediatoren der prometastatischen Wirkung von TIMP-1 identifiziert werden. Dabei wurde erstmals gezeigt, dass der Proteaseinhibitor TIMP-1 HIF-1 α in Tumorzellen induzieren kann. Ursprünglich war man davon ausgegangen, dass eine erhöhte TIMP-1-Expression über die Störung des proteolytischen Netzwerks die Gewebemöostase in der Leber verändert und dadurch die Metastasierung und Streuung von Tumorzellen verstärkt; jedoch führten hohe TIMP-1-Spiegel nicht nur *in vivo*, in der TIMP-1-modulierten Leber, zu einer Induktion von HIF-1 α , sondern auch TIMP-1 alleine induzierte *in vitro* in verschiedenen Tumorzellen die HIF-1 α -Expression. Dieser direkte Effekt von TIMP-1 bewirkte darüber hinaus auch eine Zunahme der Invasivität verschiedener Tumorzelllinien, die, wie weitere Untersuchungen mit HIF-1 α -*knock-down*-Zelllinien zeigten, wenigstens teilweise durch HIF-1 α vermittelt wurde. *In vivo* unterband der *knock down* von HIF-1 α die aggressive TIMP-1-assoziierte Infiltration des Leberparenchyms durch L-CI.5s-Zellen, wozu wahrscheinlich auch eine durch den HIF-1 α -*knock-down* reduzierte Induzierbarkeit des HGF-c-Met-Signalwegs beitrug. Auf Wirtsseite hatte TIMP-1 einen promigratorischen Einfluss auf Neutrophile Granulozyten und führte, wie in der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, zu einer verstärkten Infiltration dieser HGF-speichernden Immunzellpopulation in die Leber, die dort auch verstärkt degranulierten und dadurch zum beschriebenen starken Anstieg an HGF-Protein in der Leber TIMP-1-transduzierter Tiere beitragen können. Die Behandlung mit einem gegen Neutrophile Granulozyten gerichteten Antiserum zur Depletion dieser Immunzellpopulation führte im L-CI.5s-Modell in TIMP-1-transduzierten Mäusen zu einer reduzierten Anzahl makrometastatischer Foci und verhinderte die TIMP-1-assoziierte aggressive Tumorzellinfiltration in der Leber. Diese Beobachtung zeigt, dass Neutrophile Granulozyten wichtige Mediatoren der prometastatischen Wirkung von TIMP-1 auf Wirtsseite sind, möglicherweise durch ihren Beitrag zur Aktivierung des HGF-c-Met-Signalwegs.

6.1 Aufklärung eines Zusammenhangs zwischen TIMP-1 und HIF-1 α

Eine erhöhte Expression der α -Untereinheit des Transkriptionsfaktors HIF-1 ist ebenso wie erhöhte TIMP-1-Spiegel in vielen Krebserkrankungen mit einer schlechten Prognose assoziiert (Übersichten in Vaupel und Mayer, 2007 und Duffy *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun *in vitro* und *in vivo* ein Zusammenhang zwischen beiden Faktoren identifiziert werden. Es zeigte sich, dass TIMP-1 einerseits die Expression und Aktivität von HIF-1 α in verschiedenen Tumorzelllinien induzierte, dass andererseits aber auch HIF-1 α in den Tumorzellen ein wichtiger Mediator der prometastatischen Effekte von TIMP-1 war.

Erst vor Kurzem konnte gezeigt werden, dass hohe TIMP-1-Spiegel nicht nur ein schlechter prognostischer Marker sind, sondern selbst zur Tumorprogression beitragen können (Kopitz *et al.*, 2007). So führte die adenovirale Überexpression von TIMP-1 in verschiedenen experimentellen Metastasierungsmodellen zu einer verstärkten Lebermetastasierung (Kopitz *et al.*, 2007). Als Proteaseinhibitor ist TIMP-1 Teil des hochgradig regulierten proteolytischen Netzwerks, das unter physiologischen Bedingungen maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase beteiligt ist (Overall und Kleifeld, 2006; Krüger, 2009). Eine veränderte Aktivität einer Komponente dieses Systems beeinflusst auch andere Faktoren des Protease-Netzwerks und kann, aufgrund der Komplexität der Interaktionen im *protease web*, unvorhersehbare Auswirkungen auf die Gewebemöostase haben; in der Folge kann es so auch zur Induktion prometastatischer Gene, beispielsweise anderer Proteasen oder von Zytokinen, kommen (Krüger *et al.*, 2009). In der Tat ist bekannt, dass hohe TIMP-1-Spiegel sowohl in Krebspatienten als auch in Mäusen mit Veränderungen der Mikroumgebung in der Leber assoziiert sind und zu einer Induktion prometastatischer Gene führen (Kopitz *et al.*, 2007). Die Zellen eines Gewebes oder infiltrierende Immun- und Tumorzellen passen sich an solche Veränderungen in ihrer Mikroumgebung durch Änderungen der Genexpression an (Witz, 2008). Der Transkriptionsfaktor HIF-1 ist ein wichtiger Faktor der zellulären Stressadaptation (Pouysségur *et al.*, 2006; Görlach 2009). Eine Reihe von Stressfaktoren können HIF-1 induzieren, allen voran Sauerstoffmangel, aber auch z.B. ein Mangel an Glukose, ein niedriger pH-Wert im Extrazellularraum und reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* – ROS) (Feldser *et al.*, 1999; Pouysségur *et al.*, 2006; Pouysségur und Mechta-Grigoriou, 2006). In dieser Arbeit konnte erstmals *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass auch TIMP-1 bzw. Stressbedingungen im Zusammenhang mit

Störungen des proteolytischen Gleichgewichts zu einer Aktivierung von HIF-1 führen können. Die Induktion von HIF-1 α erfolgte dabei schon auf Transkriptionsebene, ähnlich, wie es auch für verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren bereits bekannt ist (Semenza, 2003; Zhou und Brüne, 2006).

Interessanterweise wurde durch die adenovirale Überexpression von TIMP-1 *in vivo* die Expression von HIF-1 α - und dessen *downstream*-Gen CAIX im Lebergewebe in Abwesenheit von Tumorzellen praktisch nicht induziert, während hohe TIMP-1-Spiegel in Metastasen-tragenden Lebern zu einem signifikanten Anstieg an HIF-1 α und CAIX führten. Daraus lässt sich schließen, dass sich Leberzellen über einen HIF-1-unabhängigen Mechanismus an die TIMP-1-induzierten Veränderungen in der Mikroumgebung anpassen. In der Literatur gibt es Hinweise, dass die Regulation von HIF-1 α in der Leber bzw. in Hepatozyten über andere Mechanismen verläuft als in anderen Zellen und Organen (Kietzmann *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2006). HIF-1 α wird in der Leber zwar sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene konstitutiv exprimiert (Kietzmann *et al.*, 2001), jedoch konnten beispielsweise Kietzmann *et al.* zeigen, dass sich die im Lebergewebe physiologischerweise beobachtbare Zonierung der Sauerstoffversorgung nicht in einer Zonierung der HIF-1 α -Proteinexpression widerspiegelt (Kietzmann *et al.*, 2001). In einer anderen Studie von Khan *et al.* war in Ratten-Hepatozyten auch unter hypoxischen Bedingungen kein nukleär exprimiertes HIF-1 α -Protein und auch keine DNA-Bindung von HIF-1 α nachweisbar, obwohl auch hier HIF-1 α mRNA exprimiert wurde; stattdessen führte Sauerstoffmangel in diesen Zellen zu einer Translokation von HIF-1 α in Peroxisomen (Khan *et al.*, 2006). In maligne transformierten Ratten-Hepatomazellen hatten identische Versuchsbedingungen hingegen sowohl eine Kernlokalisierung, als auch die Aktivierung von HIF-1 α zur Folge (Khan *et al.*, 2006). Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen von Khan *et al.* wurde auch in der vorliegenden Arbeit in TIMP-1-überexprimierenden Tieren nur in Anwesenheit von L-CI.5s-T-Zell-Lymphomzellen ein signifikanter Anstieg der HIF-1 α - und CAIX-mRNA-Expression in der Leber beobachtet. Während zytoplasmatisch lokalisiertes HIF-1 α -Protein in allen Zellen des Leberparenchyms in Kontrolltieren und TIMP-1-überexprimierenden Tieren detektierbar war, konnten Zellen mit kernlokalisiertem HIF-1 α -Protein ausschließlich in Metastasen TIMP-1-überexprimierender Tiere nachgewiesen werden. Die über HIF-1 vermittelte Anpassung an ungünstige Bedingungen für Zellwachstum und Überleben gehört zu den intrinsischen Eigenschaften vieler aggressiver Tumorzellen (Chan und Giaccia, 2007). Zahlreiche Studien zeigen, dass Tumorzellen innerhalb eines Primärtumors oder in etablierten

Metastasen häufig hypoxischen Bedingungen ausgesetzt sind (Bertout *et al.*, 2008) und mit einer Aktivierung von HIF-1 darauf reagieren (Kim *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2006; Arvidsson *et al.*, 2010). Die Abwesenheit HIF-1 α -positiver Zellen im L-CI.5s-Modell in Metastasen Add170-3-behandelter Tiere zeigt, dass die Aktivierung von HIF-1 α in Ad-TIMP-1-behandelten Mäusen auf TIMP-1 bzw. die durch TIMP-1 modulierte Mikroumgebung in der Leber zurückzuführen ist und offensichtlich nicht durch eine Mangelversorgung mit Sauerstoff oder Nährstoffen ausgelöst wurde. In der Tat sind die meisten Metastasen im L-CI.5s-Lebermetastasierungsmodell kleiner als das Diffusionslimit für Sauerstoff im Gewebe, das bei ca. 1-2 mm liegt (Folkman, 1986). Auch die im Rahmen dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass L-CI.5s-Zellen weder mit einer Induktion der Expression von HIF-1 α oder CAIX (unpublizierte Daten), noch mit einem deutlich unterschiedlichen Proliferationsverhalten auf hypoxische Bedingungen reagierten, bestätigt die Annahme, dass die Induktion von HIF-1 α in Metastasen TIMP-1-überexprimierender Tiere auf TIMP-1 und nicht auf Sauerstoffmangel zurückzuführen ist. Neben Tumorzellen könnten auch andere Zellarten, z.B. infiltrierende Immunzellen wie Neutrophile oder Monozyten, zu dem beobachteten Anstieg an HIF-1 α in TIMP-1-überexprimierenden Tieren beitragen (Burke *et al.*, 2002; Zarembek und Malech, 2005; Walmsley *et al.*, 2008). Jedoch zeigten die *In-vitro*-Experimente, dass verschiedene Tumorzelllinien auch mit einer Induktion von HIF-1 α auf hohe TIMP-1-Spiegel reagierten. Die Tatsache, dass unter diesen TIMP-1-sensitiven Zelllinien sowohl Zellen hämatopoetischen Ursprungs, als auch Zellen epithelialer und mesenchymaler Herkunft waren, lässt auf einen generelleren Mechanismus der Induktion von HIF-1 α durch TIMP-1 schließen. In einer Studie von Würtz *et al.* wurden im Serum von Brustkrebs-Patienten mit niedrigen TIMP-1-Spiegeln zwischen 1 und 127 ng TIMP-1/ ml gemessen, während bei Patienten mit erhöhter TIMP-1-Expression bis zu 600 ng TIMP-1/ ml Serum nachgewiesen werden konnten (Würtz *et al.*, 2008). Die in dieser Arbeit für die *In-vitro*-Versuche eingesetzten Konzentrationen an TIMP-1 bewegten sich zwischen 350 und 700 ng/ ml, einzig HT1080 benötigten 1400 ng/ ml TIMP-1, und lagen damit größtenteils in Bereichen, die auch im Serum von Patienten mit erhöhter TIMP-1-Expression gefunden wurden. Es ist demnach denkbar, dass es auch in Patienten mit erhöhten TIMP-1-Spiegeln über einen vergleichbaren Mechanismus zu einer Induktion von HIF-1 α kommen könnte.

Zwar gibt es bereits Hinweise, dass HIF-1 α die Expression von TIMP-1 beeinflusst (Yang *et al.*, 2006), doch wurde die umgekehrte Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 durch den Proteaseinhibitor TIMP-1 bislang in der Literatur noch nicht beschrie-

ben. Es wurde jedoch schon mehrfach eine Hypoxie-unabhängige Induktion von HIF-1 α auf Transkriptionsebene gezeigt (Semenza, 2003; Görlach, 2009). Verschiedene Signalwege können zu einer solchen Induktion führen (Zhong *et al.*, 2000; Stiehl *et al.*, 2002), so z.B. der PI3K-Signalweg (zusammengefasst in Semenza, 2003), der auch durch TIMP-1 aktiviert werden kann (Akahane *et al.*, 2004; Stetler-Stevenson, 2008). Die Aktivierung dieses Signalwegs durch TIMP-1 ist unabhängig von dessen MMP-inhibitorischer Aktivität (Liu *et al.*, 2003) und erst kürzlich wurde postuliert, dass die Ausbildung eines ternären Komplexes zwischen TIMP-1, CD63 und Integrin β_1 auf der Zelloberfläche an der Aktivierung des PI3K-Signalwegs beteiligt ist (Chirco *et al.*, 2006). Da alle in dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien CD63 exprimieren (HT1080: (Berditchevski *et al.*, 1997); CT26L (Cho *et al.*, 2005), L-CI.5s und GTL-16: AG Krüger unpublizierte Ergebnisse), lässt sich vermuten, dass die Induktion von HIF-1 α durch TIMP-1 über CD63 verlaufen könnte. Unterschiede in der CD63-Expression der verschiedenen Zelllinien könnten in der Folge auch dafür verantwortlich sein, dass verschiedene getestete Zelllinien unterschiedlich stark auf die Vorbehandlung mit TIMP-1 reagierten.

Obwohl die Vorinkubation verschiedener Tumorzelllinien mit rekombinantem TIMP-1 in allen getesteten Zelllinien zu einer Induktion von HIF-1 α führte, war dennoch lediglich in L-CI.5s- und CT26L-Zellen auch eine signifikant erhöhte Expression des HIF-1-abhängigen Gens CAIX nachweisbar. Die Expression von CAIX wird fast ausschließlich über HIF-1 reguliert und deshalb als Marker für die Aktivität von HIF-1 herangezogen (Potter und Harris, 2004). Weshalb es in HT1080- und GTL-16-Zellen nicht zu einem Anstieg an CAIX kam, ist bislang unbekannt; Zelllinien-spezifische Unterschiede in der Reaktion auf eine HIF-1 α -Induktion könnten eine Rolle spielen. Um abschließend zu klären, ob TIMP-1 die transaktivierende Aktivität von HIF-1 tatsächlich nur in L-CI.5s- und CT26L-Zellen induziert, werden derzeit in der AG Krüger Studien mit HRE-Luciferase-Konstrukten durchgeführt, die eine direkte Bestimmung der Aktivität von HIF-1 ermöglichen.

Im Vergleich zum Effekt der TIMP-1-Inkubation *in vitro* hatte die Überexpression von TIMP-1 *in vivo* einen wesentlich stärkeren Einfluss auf die HIF-1 α -Expression, was mehrere Ursachen haben kann. So könnten beispielsweise infiltrierende Immunzellen wie Monozyten oder Neutrophile Granulozyten (die ja in TIMP-1-überexprimierenden Tieren verstärkt in die Leber infiltrieren) zum beobachteten Anstieg an HIF-1 α und CAIX

im Metastasen-tragenden Lebergewebe TIMP-1-überexprimierender Tiere beitragen (Burke *et al.*, 2002; Zarembler und Malech, 2005; Walmsley *et al.*, 2008). Allerdings kam es in der Leber in Abwesenheit von Tumorzellen durch TIMP-1 nur zu einem sehr schwachen Anstieg der HIF-1 α - und CAIX-Expression, obwohl auch hier mehr als doppelt so viele Neutrophile Granulozyten nachweisbar waren wie in Kontrolltieren. Darüber hinaus könnte TIMP-1 *in vivo* zusätzlich zu seinem direkten Effekt auch indirekt über die Veränderungen in der Mikroumgebung in der Leber zu einem Anstieg an HIF-1 α in den Tumorzellen führen. Dieser Effekt könnte wiederum MMP-abhängig oder unabhängig sein. Eine MMP-abhängige Induktion von HIF-1 α wäre beispielsweise aufgrund einer veränderten Bioverfügbarkeit von Zytokinen wie Interleukin-1 β (IL-1 β) denkbar. IL-1 β ist ein bekannter Hypoxie-unabhängiger Induktor von HIF-1 α (Stiehl *et al.*, 2002), der durch MMP-1, -2, -3 und -9 in inaktive Fragmente gespaltet wird (Ito *et al.*, 1996). In TIMP-1-überexprimierenden Tieren ist die Aktivität von MMPs im Leberparenchym wirksam unterdrückt (Kopitz *et al.*, 2007), so dass es zu einer geringeren Inaktivierung von IL-1 β und in der Folge zu einer Induktion von HIF-1 α kommen könnte. Eine MMP-unabhängige Wirkung von TIMP-1 auf die Expression von HIF-1 α in Tumorzellen könnte über die Rekrutierung und Degranulierung Neutrophiler Granulozyten verlaufen, setzen doch Neutrophile Granulozyten bei ihrer Degranulierung eine Vielzahl bioaktiver Moleküle frei, von denen einige prinzipiell auch zu einer Induktion von HIF-1 α führen können, so z.B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder IL-1 β (Witko-Sarsat *et al.*, 2000; Galanis *et al.*, 2008).

6.2 Identifizierung von HIF-1 als Tumorzell-intrinsischer Mediator der TIMP-1-induzierten Metastasierung

Charakteristisches Merkmal der TIMP-1-assoziierten Lebermetastasierung ist eine aggressive Infiltration einzelner Tumorzellen in das Leberparenchym (Kopitz *et al.*, 2007). In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Vorinkubation mit TIMP-1 *in vitro* das invasive Potential verschiedener Tumorzellen erhöhte. Somit konnte neben der bereits beschriebenen Rolle von TIMP-1 bei der Ausbildung einer metastatischen Nische in der Leber (Kopitz *et al.*, 2007) und einem Einfluss auf Proliferation und Überleben von Tumorzellen (Stetler-Stevenson, 2008), nun auch ein *direkter* Einfluss von TIMP-1 auf die Invasivität von Tumorzellen nachgewiesen werden. Im Unterschied zum hier gezeigten proinvasiven Effekt von TIMP-1 gibt es zahlreiche Studien, in denen eine

invasionshemmende Wirkung des Proteaseinhibitors TIMP-1 gezeigt wurde (Khokha *et al.*, 1992; Baker *et al.*, 1998; Engers *et al.*, 2001). In all diesen Studien wurde TIMP-1 entweder in den Zellen überexprimiert, oder exogen zugefügtes TIMP-1 war während der gesamten Versuchsdauer anwesend. Der invasionshemmende Effekt von TIMP-1 in diesen Untersuchungen ist also höchstwahrscheinlich auf die Hemmung der für invasive Prozesse wichtigen MMPs zurückzuführen. Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit die Zellen für eine Stunde mit TIMP-1 inkubiert und anschließend TIMP-1 durch Waschen entfernt. Da also während der Tumorzellinvasion kein exogenes TIMP-1 mehr vorhanden war, wurde sichergestellt, dass nicht der proteasehemmende Effekt von TIMP-1, sondern nur der direkte Einfluss von TIMP-1 auf das Genexpressionsprofil und das metastatische Potential der Tumorzellen zum Tragen kam. Im vorangegangenen Abschnitt (Kapitel 6.1) wurde bereits diskutiert, dass die durch TIMP-1 ausgelöste Induktion von HIF-1 α in den Tumorzellen über eine Interaktion zwischen TIMP-1 und CD63/ β_1 -Integrin verlaufen könnte. Auch für den proinvasiven Effekt von TIMP-1 wäre eine Beteiligung von CD63 denkbar. So konnten Sugiura *et al.* zeigen, dass durch die Behandlung mit einem gegen CD63 gerichteten Antikörper die Expression von MMP-2 in und die Invasivität von MDA-MB-231-Zellen erhöht wurde (Sugiura und Berditchevski, 1999). Die Autoren postulieren, dass die Behandlung mit dem Antikörper zu einer Zusammenlagerung (*clustering*) von CD63/ $\alpha_3\beta_1$ -Integrin-Komplexen und dadurch, vermittelt über den PI3K-Signalweg, zu einer Induktion der MMP-2-Expression und der Invasivität führt (Sugiura und Berditchevski, 1999). Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für die hier beschriebene proinvasive Wirkung von TIMP-1 denkbar.

Interessanterweise wirkte die Vorinkubation der Tumorzellen mit TIMP-1 v.a. in den Zelllinien proinvasiv, in denen TIMP-1 auch die Signaltransduktion über HIF-1 (gemessen als CAIX-Expression) am stärksten induzierte (L-CI.5s- und CT26L-Zellen). Mit Hilfe von HIF-1 α -*knock-down*-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass Tumorzell-HIF-1 α in der Tat für die proinvasive Wirkung von TIMP-1 erforderlich war. Der HIF-1 α -*knock-down* verhinderte allerdings nicht nur die Induktion der Tumorzellinvasion durch TIMP-1, sondern er führte generell zu einer deutlich verringerten Invasivität der shHIF-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzelllinien. Eine solche Beteiligung von HIF-1 α an der Invasivität von Tumorzellen ist bekannt (Krishnamachary *et al.*, 2003; Victor *et al.*, 2006), könnte jedoch dazu führen, dass ein schwacher proinvasiver Effekt von TIMP-1 auf die shHIF-Zelllinien möglicherweise verdeckt wurde. Um dies zu umgehen, wäre ein Zell-

system geeignet, das basal eine niedrige HIF-1 α -Expression aufweist und in dem der *knock down* von HIF-1 α nur einen schwachen Effekt auf die Invasivität hat.

Dass HIF-1 auch *in vivo* bei der Invasion und Metastasierung eine wichtige Rolle spielt, ist aus der Literatur bereits bekannt (Bertout *et al.*, 2008; Gort *et al.*, 2008). Liao *et al.* beobachteten beispielsweise ein reduziertes metastatisches Potential von Brustkrebszellen, wenn diesen HIF-1 α fehlte (Liao *et al.*, 2007). Auch im L-CI.5s-Modell führte der *knock down* von HIF-1 α in den Tumorzellen unabhängig vom TIMP-1-Status der Tiere zu einer deutlichen Abnahme der Anzahl an Makrometastasen und der Gesamttumorlast in der Leber. Die Anzahl an Makrometastasen hängt von mehreren Faktoren ab, u.a. von der Anzahl initial extravasierter Zellen (Kopitz *et al.*, 2007; Gerg *et al.*, 2008). Proteasen können die Extravasation von Tumorzellen beeinflussen (Gerg *et al.*, 2008; Joyce und Pollard, 2009), und mehrfach wurde eine Beteiligung von HIF-1 an der Regulation der Expression einer Reihe Matrix-degradierender Proteasen wie MMP-2 und MMP-9, uPAR und Cathepsin D beschrieben (Krishnamachary *et al.*, 2003; Semenza *et al.*, 2003; Fujiwara *et al.*, 2007), wodurch sich die Reduktion der Makrometastasierung von HIF-1 α -*knock-down*-Zellen erklären ließe. Auch Änderungen im Proliferationsverhalten oder im Überleben von HIF-1 α -*knock-down*-Zellen könnten für die Abnahme der Makrometastasierung verantwortlich sein (Ruan *et al.*, 2009), doch unterschieden sich die L-CI.5s-Zellen mit HIF-1 α -*knock-down* weder *in vitro* noch *in vivo* in ihrem Proliferationsverhalten von den shNT-Kontrollzellen; auch im Überleben der L-CI.5s-Zellen war *in vivo* kein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien feststellbar (Schelter *et al.*, 2010, Manuskript in Vorbereitung). Ähnlich wie durch den HIF-1 α -*knock-down* reduziert auch die Überexpression von TIMP-1 wird die Anzahl makrometastatischer Foci in der Leber, vermutlich durch eine Hemmung proteolytischer Vorgänge während der Extravasation (Kopitz *et al.*, 2007). Beide Effekte, die Reduktion der Makrometastasierung durch den HIF-1 α -*knock-down* und durch TIMP-1-Überexpression, verhielten sich additiv, so dass in TIMP-1-überexprimierenden Tieren, die mit L-CI.5s-shHIF-Zellen behandelt worden waren, die geringste Anzahl an Makrometastasen auftrat.

Viel bemerkenswerter als die Auswirkung auf die Makrometastasierung war der Einfluss des HIF-1 α -*knock-down* auf die durch TIMP-1 induzierte aggressive Streuung der Tumorzellen. Diese wurde durch den *knock down* von HIF-1 α in den L-CI.5s-Zellen nahezu vollständig unterdrückt. Es ist bekannt, dass die Aktivierung des HGF-c-Met-Signalwegs die Tumorzell dissemination fördern bzw. induzieren kann (zusammenge-

fasst in Benvenuti und Comoglio, 2007), und auch für die starke und aggressive Tumorzellstreuung in TIMP-1-überexprimierenden Tieren ist die Aktivierung dieses Signalwegs eine Voraussetzung (Kopitz *et al.*, 2007). Darüber hinaus ist beschrieben, dass die c-Met-Expression über HIF-1 erhöht werden kann (Pennacchietti *et al.*, 2003). Entsprechend führte der *knock down* von HIF-1 α in den Tumorzellen in TIMP-1-transduzierten Tieren zu einer Reduktion sowohl der Expression des c-Met-Rezeptors im Metastasen-tragenden Lebergewebe, als auch zu einer verminderten Menge an phosphoryliertem c-Met innerhalb von Metastasen. Somit erscheint ein Szenario wahrscheinlich, in dem TIMP-1 und Faktoren der TIMP-1-modulierten Mikroumgebung über eine Aktivierung von HIF-1 in den Tumorzellen zu einer Induktion von c-Met führen und dadurch eine verstärkte Invasivität/ Streuung der Tumorzellen auslösen. Fehlt den Tumorzellen HIF-1 α , so sind sie nicht in der Lage, auf den TIMP-1-induzierten Stress mit einer gesteigerten Invasivität (im Sinne einer Fluchtreaktion) zu reagieren, so dass die Tumorzellstreuung im Leberparenchym abnimmt. Auch hier könnte ein unterschiedliches Proliferationsverhalten zwischen HIF-1 α -*knock-down*-Zellen und Kontrollzellen eine Rolle spielen, jedoch unterschied sich die Proliferation der beiden Zelllinien auch in TIMP-1-überexprimierenden Tieren nicht voneinander.

Interessanterweise streuten L-CI.5s-shHIF-Zellen in TIMP-1-überexprimierenden Tieren signifikant weniger als in Addl70-3-behandelten Tieren. Ursache hierfür könnten Unterschiede in der proteolytischen Aktivität sein: Vor allem MMP-9 ist im L-CI.5s-Modell für die sekundäre Invasion und Streuung der Tumorzellen wichtig (Gerg *et al.*, 2008). Der HIF-1 α -*knock-down* führt in L-CI.5s-Zellen zu einer deutlichen Reduktion der MMP-9-Expression (Schelter *et al.*, 2010, Manuskript in Vorbereitung), doch ist sicherlich noch eine geringe Restaktivität von MMP-9 vorhanden. Diese könnte für die sekundäre Invasion einzelner Tumorzellen in Addl70-3-behandelten Tieren verantwortlich sein. In Ad-TIMP-1-behandelten Mäusen hingegen ist MMP-9 durch die Überexpression des Breit-spektrum-MMP-Inhibitors TIMP-1 vollständig inhibiert (Kopitz *et al.*, 2007), so dass MMP-9 hier nicht mehr zur sekundären Invasion der Tumorzellen beitragen kann.

6.3 Rekrutierung Neutrophiler Granulozyten durch TIMP-1

Eine erhöhte TIMP-1-Expression führt zu einem Anstieg der HGF- und c-Met-Proteinmenge in der Leber (Kopitz *et al.*, 2007). Während die Ursache für die Akkumulation von c-Met bereits näher untersucht worden war (Kopitz *et al.*, 2007), war über den

HGF-Anstieg bislang wenig bekannt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass die Zunahme der HGF-Menge nur zum Teil auf eine durch TIMP-1 induzierte *De-novo*-Synthese von HGF in der Leber zurückzuführen war. Diese Beobachtung lässt sich z.B. über eine durch TIMP-1 induzierte vermehrte Infiltration HGF-speichernder Immunzellen in die Leber erklären. So ist in der Literatur beispielsweise die Expression von HGF für Neutrophile Granulozyten (McCourt *et al.*, 2001; Grenier *et al.*, 2002) und Makrophagen (Armbrust *et al.*, 2002; Pollard 2004) beschrieben, und erst kürzlich wurde in Non-Hodgkin-Lymphomen eine Korrelation zwischen der Anzahl Neutrophiler Granulozyten und der Menge an HGF-Protein gezeigt (Toyama *et al.*, 2005). Bei der Degranulierung von Neutrophilen kommt es nicht nur zur Freisetzung, sondern auch zur Aktivierung von pro-HGF durch zelleigene Serinproteasen (Grenier *et al.*, 2002). Eine Beteiligung von HGF aus Neutrophilen Granulozyten bei der Tumorprogression wird in der Literatur bereits diskutiert (Wislez *et al.*, 2003). So konnte in Patienten mit Bronchioalveolarkarzinom eine Korrelation zwischen verstärkter Infiltration Neutrophiler Granulozyten und einer schlechten Prognose gezeigt werden (Bellocq *et al.*, 1998) und in einer Folgepublikation wurde die Freisetzung von HGF aus den Neutrophilen als Ursache dafür diskutiert (Wislez *et al.*, 2003).

Vor Kurzem wurde erstmals beobachtet, dass es auch bei der Ausbildung der TIMP-1-assoziierten prämetastatischen Nische in der Leber zu einer verstärkten Infiltration Neutrophiler Granulozyten kommt (Ulrike Brüning, AG Krüger; Masterarbeit), und im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TIMP-1 selbst die Migration Neutrophiler Granulozyten beeinflusste. *In vitro* migrierten isolierte Maus-Neutrophile in Richtung hoher TIMP-1-Konzentrationen, und *in vivo* reichert sich Neutrophile Granulozyten in den Gebieten hoher TIMP-1-Expression an. Über den zugrunde liegenden Mechanismus kann bislang nur spekuliert werden. So könnte auch hier eine Bindung von TIMP-1 an Zellmembran-ständiges CD63 auf Neutrophilen Granulozyten beteiligt sein. CD63 wird in Neutrophilen vor allem auf der Membran intrazellulärer Granula exprimiert und spielt hier eine Rolle bei der Kompartimentierung zellulärer Proteine (Kallquist *et al.*, 2008). Zudem gibt es Untersuchungen, die auf eine Beteiligung von Zellmembran-ständigem CD63 bei der Aktivierung und Adhäsion von Neutrophilen Granulozyten hinweisen (Skubitz *et al.*, 1996). So wurde eine Assoziation zwischen CD63 und CD11/CD18-Integrinen, welche essentiell für die Adhäsion aktivierter Neutrophiler Granulozyten an Endothelzellen und damit auch für deren Rekrutierung an den Ort einer Entzündung sind (Witko-Sarsat *et al.*, 2000), beschrieben (Skubitz *et al.*, 1996). Die

Behandlung mit einem gegen CD63 gerichteten Antikörper erhöhte in dieser Studie von Skubitz *et al.* CD18-abhängig die Adhäsion Neutrophiler Granulozyten an Endothelzellen *in vitro* (Skubitz *et al.*, 1996). Aus diesem Grund ist es denkbar, dass TIMP-1 durch Bindung an CD63 auf Neutrophilen deren Adhäsion an das Gefäßendothel und letztendlich deren Infiltration in die Leber erhöht. Untersuchungen mit gegen CD63 gerichteten oder gegen CD11/CD18 gerichteten blockierenden Antikörpern (Skubitz *et al.*, 1996) könnten über eine Beteiligung von CD63 bei der TIMP-1-modulierten Migration Neutrophiler Granulozyten Aufschluss geben.

Im Zusammenhang mit der TIMP-1-induzierten Metastasierung konnte darüber hinaus kürzlich gezeigt werden, dass die Serinprotease *urokinase plasminogen activator* (uPA) für die TIMP-1-induzierte Infiltration Neutrophiler Granulozyten in die Leber notwendig ist, wohingegen uPA für die basale Infiltration von Neutrophilen in Tieren mit normaler TIMP-1-Expression entbehrlich war (Schrötzlmair *et al.*, 2009). Es ist demnach anzunehmen, dass TIMP-1 chemotaktisch auf Neutrophile Granulozyten wirkt und dass für die folgende Diapedese, den Übertritt der Neutrophilen aus dem Gefäßsystem in das Gewebe, die proteolytische Aktivität von uPA erforderlich ist.

Eine Beteiligung Neutrophiler Granulozyten bei der TIMP-1-induzierten Metastasierung wurde vor allem wegen ihrer Fähigkeit, intrazellulär (pro-)HGF zu speichern, postuliert. HGF ist hauptsächlich in den sog. spezifischen Granula nachweisbar und wird bei der Degranulierung der Neutrophilen freigesetzt und aktiviert (Grenier *et al.*, 2002). Aus vorangegangenen Experimenten war bekannt, dass TIMP-1 *in vitro* kein Stimulus für die Degranulierung von Neutrophilen ist (Ulrike Brüning, AG Krüger; Masterarbeit). In dieser Arbeit konnte jedoch histologisch eine Freisetzung des intrazellulären Proteins Myeloperoxidase im Lebergewebe TIMP-1-überexprimierender Tiere gezeigt werden. Die Überexpression von TIMP-1 führt in der Leber zu einer Reihe molekularer Veränderungen, unter anderem z.B. auch zu einer Induktion der Expression von *insulin like growth factor-II* (IGF-II) (AG Krüger, unpublizierte Daten), welches seinerseits die Expression von Interleukin-8 (IL-8), einem bekannten Stimulus für die Degranulierung Neutrophiler Granulozyten (Taub *et al.*, 1996), erhöhen kann (Kim *et al.*, 2004). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Überexpression von TIMP-1 nicht nur zu einer verstärkten Infiltration, sondern indirekt auch zu einer Degranulierung Neutrophiler Granulozyten und damit zur Freisetzung von HGF in der Leber führt.

6.4 Bedeutung Neutrophiler Granulozyten bei der TIMP-1-induzierten Metastasierung

Zahlreiche klinische Untersuchungen weisen auf eine Korrelation zwischen einer Akkumulation Neutrophiler Granulozyten im Tumorgewebe und einer schlechten Prognose für die Patienten hin (Wislez *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2009; Kishi *et al.*, 2009), und in verschiedenen Untersuchungen konnte ein Beitrag von Neutrophilen zur Tumorprogression gezeigt werden (Murdoch *et al.*, 2008). So ist beispielsweise aus Tierstudien, in denen Neutrophile Granulozyten Antikörper-vermittelt depletiert wurden, bekannt, dass PMNs an der Tumor-Angiogenese beteiligt sind (Benelli *et al.*, 2002). Auch durch die Freisetzung von Proteasen wie MMP-9 können Neutrophile die Metastasierung verstärken (Acuff *et al.*, 2006).

Um den Beitrag Neutrophiler Granulozyten zur TIMP-1-induzierten Metastasierung zu untersuchen, wurde diese Immunzellpopulation in Rahmen der vorliegenden Arbeit in Mäusen Antikörper-vermittelt depletiert. Die Depletion erfolgte durch wiederholte intra-peritoneale Injektion eines gegen Ly-6G gerichteten polyklonalen Antiserums (Lawson *et al.*, 1997). Ly-6G ist ein Zellmembran-ständiges Protein, das hauptsächlich von Neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (Daley *et al.*, 2008). Mit Hilfe der Depletion sollte vor allem die Rolle Neutrophiler Granulozyten bei der Ausbildung der TIMP-1-induzierten metastatischen Nische und der TIMP-1-assoziierten Tumorzell-Streuung untersucht werden. Beides sind sehr frühe Ereignisse. So ist in TIMP-1-überexprimierenden Tieren bereits drei Tage nach Inokulation der Tumorzellen eine deutliche Tumorzell-Infiltration im Leberparenchym nachweisbar (Kopitz *et al.*, 2007). Es war deshalb wichtig, vor allem zu den frühen Zeitpunkten eine effiziente Depletion zu gewährleisten. Mit der zweimaligen Inokulation des Antiserums konnte über sieben Tage eine zufriedenstellende Neutrophilendepletion erreicht werden, zumal die in den Antiserum-behandelten Tieren noch verbliebenen Ly-6G-positiven Zellen eine deutlich veränderte Morphologie aufwiesen, was auf eine Schädigung schließen lässt.

Wurden Mäuse vor dem adenoviralen Gentransfer von TIMP-1 zweimal mit dem depletierenden Antiserum behandelt, verringerte sich die Anzahl makrometastatischer Foci in der Leber um fast 50%, während diese Behandlung in Mäusen mit normaler TIMP-1-Expression keine Auswirkungen auf die Anzahl an Makrometastasen in der Leber hatte. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass Neutrophile Granulozyten in TIMP-1-überexprimierenden Tieren bei der Extravasation oder beim Auswachsen extravasierter

Tumorzellen zu Makrometastasen von Bedeutung sind. Hämatopoetische Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung einer prämetastatischen Nische und können so die organspezifische Metastasierung beeinflussen (Kaplan *et al.*, 2005; Hiratsuka *et al.*, 2006; Erler *et al.*, 2009). In einer Studie von Martin *et al.* trugen Neutrophile Granulozyten wesentlich zur MMP-9-Expression in Tumorgewebe bei (Martin *et al.*, 2008) und in einem experimentellen Metastasierungsversuch konnte MMP-9 aus Neutrophilen als entscheidender Faktor für die initiale Kolonisierung der Lunge durch Tumorzellen identifiziert werden, auch wenn MMP-9 nicht für das Auswachsen der Tumorzellen zu Makrometastasen notwendig war (Acuff *et al.*, 2006). Ob das Fehlen von MMP-9 aus Neutrophilen Granulozyten in Antiserum-behandelten, TIMP-1-überexprimierenden Tieren für die Reduktion der Makrometastasierung verantwortlich sein kann, mag angesichts der hohen TIMP-1-Konzentrationen fraglich erscheinen. Es gibt jedoch Hinweise, dass Neutrophile in ihrer unmittelbaren Umgebung auch in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren EZM-Moleküle abbauen können (Owen und Campbell, 1999). Darüber hinaus sezernieren Neutrophile neben MMPs auch eine Reihe anderer Proteasen, die nicht durch TIMP-1 inhibiert werden, wie z.B. die Serinproteasen Cathepsin G, Neutrophile Elastase, Proteinase-3 und uPA (Owen und Campbell, 1999; Witko-Sarsat *et al.*, 2000), so dass ein Beitrag von Neutrophilen zur Tumorzell-Extravasation in TIMP-1-überexprimierenden Tieren durchaus möglich scheint. In Mäusen mit normaler TIMP-1-Expression hatte die Behandlung mit dem gegen Neutrophile gerichteten Antiserum keine Auswirkungen auf die Anzahl metastatischer Foci in der Leber. Berücksichtigt man, dass in Tieren mit normaler TIMP-1-Expression auch basal nur sehr wenige PMNs in der Leber nachweisbar sind, so ist dieses Ergebnis nicht überraschend.

Die Behandlung mit dem Neutrophile-depletierenden Antiserum wirkte sich jedoch nicht nur auf die Anzahl makrometastatischer Foci in der Leber TIMP-1-transduzierter Tiere aus, sie führte auch zu einer deutlichen Reduktion der TIMP-1-assoziierten Tumorzellinfiltration in das Leberparenchym und offenbarte so einen möglichen Beitrag Neutrophiler Granulozyten zur Ausbildung der TIMP-1-assoziierten prämetastatischen Nische. Die bisherigen Ergebnisse sind ein interessanter Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen zum zugrunde liegenden Mechanismus. Wie eingangs bereits diskutiert, könnten Neutrophile Granulozyten durch ihre Rolle als HGF-Lieferanten zur TIMP-1-induzierten Metastasierung beitragen, kommt es doch in der TIMP-1-modulierten Mikroumgebung in der Leber zur Degranulierung der Neutrophilen und damit zur Freisetzung von HGF, welches zur Aktivierung des HGF-c-Met-Signalwegs in Tieren mit erhöhter

TIMP-1-Expression beitragen kann. Auch eine Beteiligung Neutrophiler Granulozyten bei der Aktivierung von HIF-1 in Tumorzellen, wie sie in Abschnitt 6.1 bereits angesprochen wurde, ist denkbar. So setzen Neutrophile beispielsweise IL-1 β frei (Di Carlo, 2001), für das eine Induktion von HIF-1 α beschrieben ist (Stiehl *et al.*, 2002); aber auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS – *reactive oxygen species*), wie sie beim *oxidative burst* Neutrophiler Granulozyten zur Pathogenabwehr gebildet werden (Witko-Sarsat *et al.*, 2000), können zur einer Aktivierung des HIF-1-Signalwegs beitragen (Galanis *et al.*, 2008). Darüber hinaus könnte die Streuung von Tumorzellen durch die erwähnte Freisetzung einer Reihe von Proteasen durch Neutrophile begünstigt werden. Neutrophile können jedoch auch die Infiltration weiterer Immunzellen, z. B. von Makrophagen verstärken (Di Carlo *et al.*, 2001; Kaplanski *et al.*, 2003), welche ihrerseits ebenfalls die Tumorprogression fördern können (Joyce und Pollard, 2009). Eine verstärkte Leberinfiltration von Makrophagen in TIMP-1-überexprimierenden Tieren konnte in einer kürzlich in der Arbeitsgruppe durchgeführten Studie gezeigt werden (Elisabeth Nüske, AG Krüger; Bachelorarbeit).

6.5 Etablierung des c-Met-*knock-down* im Wirt

In verschiedenen Tumoren wurde eine verstärkte Expression von c-Met beobachtet, die immer mit einer schlechten Prognose korreliert (zusammengefasst in Gentile *et al.*, 2008). Eine deregulierte, bisweilen auch autokrine Aktivierung des HGF-c-Met-Signalwegs in Tumorzellen kann wichtige Schritte der Metastasierung begünstigen wie beispielsweise Invasion oder Überleben der Tumorzellen (Benvenuti und Comoglio, 2007; Comoglio *et al.*, 2008). Während der Beitrag von Tumorzell-c-Met zur Tumorprogression und Metastasierung bereits in verschiedenen Modellen intensiv untersucht wurde (z.B. Shinomyia *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Benvenuti und Comoglio, 2007), ist noch nicht bekannt, ob auch die Aktivierung des HGF-c-Met-Signalwegs in der Leber die Metastasierung begünstigen kann und die Empfänglichkeit dieses Organs für einwandernde Tumorzellen erhöht. Die Beantwortung dieser Frage ist gerade im Hinblick auf die prometastatische Wirkung von TIMP-1 von Bedeutung, da die Aktivierung des HGF-c-Met-Signalwegs einerseits eine Voraussetzung für die prometastatische Wirkung von TIMP-1 ist (Kopitz *et al.*, 2007), und zum anderen eine erhöhte TIMP-1-Expression auch in Abwesenheit von Tumorzellen zu einer Aktivierung dieses Signalwegs in der Leber führt (Kopitz *et al.*, 2007). Um den Beitrag der Wirts-c-Met-Expression zur Ausbil-

derung der TIMP-1-induzierten prämetastatischen Nische und zur TIMP-1-induzierten Metastasierung untersuchen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Protokoll zur spezifischen Reduktion der c-Met-Expression im Wirtsgewebe mittels adenoviralen Gentransfers einer gegen c-Met gerichteten shRNA-Sequenz etabliert. Auch wenn der Gentransfer mit Hilfe adenoviraler Vektoren einige Nachteile mit sich bringt wie beispielsweise die nur transiente Expression des Transgens oder eine vergleichsweise hohe Immunogenität der adenoviralen Vektoren (Douglas, 2007), so ist diese Methode dennoch vor allem für die Transduktion von Leberzellen gut geeignet (Wilson, 2001). So konnte im Lebergewebe fünf Tage nach Inokulation der niedrigsten getesteten Virusdosis bereits ein hocheffizienter *knock down* von c-Met auf RNA-Ebene nachgewiesen werden und neun Tage nach dem Gentransfer war auch eine Reduktion der c-Met-Proteinexpression in der Leber nachweisbar. Die Untersuchung der Rolle von c-Met im Wirt im Modell der TIMP-1-induzierten Metastasierung erfordert die zweimalige aufeinanderfolgende Inokulation von Adenoviren (erst Adshc-Met und im Anschluss AdTIMP-1). Es ist bekannt, dass bei wiederholter Applikation adenoviraler Vektoren die Viruseliminierung beschleunigt ist (Dong *et al.*, 1996; Benihoud *et al.*, 1998). Tatsächlich konnte nach vorangegangener Applikation von Adl70-3- bzw. Adshc-Met-Viren nur eine vergleichsweise schwache Expression von TIMP-1 nach adenoviraler Transduktion der Leber mit AdTIMP-1-Viren nachgewiesen werden, allerdings reichte diese schwache Expression des Transgens dennoch aus, um *in vivo* den charakteristischen TIMP-1-assoziierten Metastasierungsphänotyp zu induzieren.

In einem ersten Experiment mit kleiner Gruppengröße hatte der adenoviral vermittelte *knock down* von c-Met im Wirtsgewebe keinen Einfluss auf die aggressive TIMP-1-induzierte Tumorzellstreuung im Leberparenchym. Die Ursache für diese Beobachtung ist noch unklar. Erste Untersuchungen deuten darauf hin, dass möglicherweise Kompensationsmechanismen der Tumorzellen eine reduzierte c-Met-Expression in der Leber ausgleichen. Darüber hinaus könnten auch unspezifische Nebeneffekte der shRNA, wie sie erst vor Kurzem von Beer *et al.* beschrieben worden waren (Beer *et al.*, 2010), über eine Veränderung der Mikroumgebung die Metastasierung beeinflussen. Bevor eine endgültige Aussage über die Rolle von Wirts-c-Met bei der TIMP-1-induzierten Metastasierung möglich ist, müssen weitere Experimente abgewartet werden.

6.6 Molekulare Veränderungen im Verlauf der „normalen“ und der TIMP-1-induzierten Metastasierung

Ähnlich der TIMP-1-assoziierten Metastasierung sind auch die Spätstadien der „normalen“ Metastasierung im L-CI.5s-Modell durch die sekundäre Infiltration einzelner Tumorzellen in das Leberparenchym gekennzeichnet (Gerg *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch hier der Tumorzellstreuung eine drastische Zunahme der TIMP-1-Expression vorangeht. Prozentual stieg dabei die TIMP-1-Expression weit mehr an als die Gesamttumorlast in der Leber (AG Krüger, unpublizierte Daten), so dass von einer echten Induktion der TIMP-1-Expression gesprochen werden kann und der Effekt nicht allein auf die im Verlauf der Metastasierung zunehmende Tumorzellzahl in der Leber zurückzuführen war. In der Literatur wird teilweise postuliert, dass die in Krebspatienten häufig beobachtete hohe TIMP-1-Expression im Wesentlichen ein Gegenregulationsmechanismus des Wirtsgewebes ist, um eine durch die Tumorzellen bedingte erhöhte Proteaseaktivität auszugleichen (Hong *et al.*, 1996; Brown 1998). Im L-CI.5s-Modell nahm im Zeitverlauf der Metastasierung die Expression von TIMP-1 jedoch weit mehr zu als beispielsweise die Expression von MMP-9, die MMP-2-Expression blieb sogar nahezu unverändert (Gerg *et al.*, 2008). Eine Induktion von TIMP-1 allein als Gegenregulationsmechanismus ist deshalb eher unwahrscheinlich.

Die Expression von TIMP-1 beschränkte sich überwiegend auf die Bereiche metastatischer Foci, was darauf schließen lässt, dass die Tumorzellen wenigstens teilweise zur Zunahme der TIMP-1-Expression im Verlauf der Metastasierung beitragen. Auch in Patientenmaterial konnte eine Expression von TIMP-1 durch Tumorzellen nachgewiesen werden, die sich in Lebermetastasen von Kolorektalkarzinomen zudem bevorzugt auf Zellen im Bereich der invasiven Front des Tumors erstreckte (Kahlert *et al.*, 2008). Eine erhöhte Expression von TIMP-1 ist dort mit einer rascheren Tumorprogression assoziiert (Kahlert *et al.*, 2008). Interessanterweise folgte dem TIMP-1-Anstieg im L-CI.5s-Modell kurze Zeit später auch eine deutliche Zunahme der HIF-1 α -Expression in der Leber (Halbgewachs *et al.*; Manuskript in Vorbereitung), was nahelegt, dass es, ähnlich wie bei der TIMP-1-induzierten Metastasierung, einen Zusammenhang zwischen TIMP-1 und HIF-1 α geben könnte. Für die TIMP-1-induzierte aggressive Tumorzellstreuung ist die Signaltransduktion über den HGF-c-Met-Signalweg von zentraler Bedeutung (Kopitz *et al.*, 2007). Auch im Verlauf der „normalen“ Metastasierung stieg die HGF-Expression im L-CI.5s-Modell auf Proteinebene an, während auf mRNA-Ebene

keine Zunahme der Expression zu verzeichnen war. Ähnlich wie im Modell der TIMP-1-induzierten Metastasierung dürfte HGF-Protein deshalb „von außen“ in die Leber gelangen. Tatsächlich nahm die Zahl infiltrierter Neutrophiler im Zeitverlauf der Metastasierung zu (Ulrike Brüning, AG Krüger, Masterarbeit). Interessanterweise akkumulierten diese infiltrierten PMNs in den Makrometastasen, also den Orten mit der höchsten TIMP-1-Expression, was wiederum auf eine chemotaktische Wirkung von TIMP-1 auf Neutrophile Granulozyten hinweist. In Übereinstimmung mit dem beobachteten HGF-Anstieg konnte in den späten Phasen der Metastasierung auch eine Aktivierung des c-Met-Rezeptors innerhalb metastatischer Foci nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass über den c-Met-Rezeptor promigratorische Signalwege induziert werden (Birchmeier *et al.*, 2003; Benvenuti und Comoglio, 2008). Möglicherweise führen ungünstige Wachstumsbedingungen in den größer werdenden Metastasen, wie beispielsweise Nährstoff- oder Sauerstoffmangel, oder aber die Zunahme der TIMP-1-Expression, auch hier evt. über HIF-1, zur Aktivierung eines c-Met-abhängigen „Fluchtmechanismus“ in den Tumorzellen, was dann zur sekundären Invasion der Tumorzellen in das umliegende Leberparenchym führt. Die Bedeutung von c-Met für die sekundäre Invasion von L-CI.5s-Zellen konnte mit Hilfe einer L-CI.5s-c-Met-*knock-down*-Zelllinie in unserer Arbeitsgruppe bereits belegt werden: Durch den *knock down* von c-Met in L-CI.5s-Zellen wurde die sekundäre Invasion wirksam unterdrückt (AG Krüger, unpublizierte Daten).

Die Untersuchungen zu den Veränderungen im Zeitverlauf des L-CI.5s-Modells lassen im Wesentlichen zwei Rückschlüsse zu: Zum einen lassen sich die Beobachtungen aus dem TIMP-1-Modell der L-CI.5s-Metastasierung auch auf den „normalen“ Metastasierungsverlauf übertragen. Das Überexpressionsmodell ist somit gut geeignet, Vorgänge in der Endphase der Metastasierung zu untersuchen. Daneben spricht einiges für die Hypothese, dass ein Anstieg an TIMP-1 nicht nur eine Folge der Tumorprogression ist, sondern möglicherweise sogar eine Voraussetzung für die Streuung von Tumorzellen sein könnte. Untermuert wird diese Hypothese auch durch die erwähnte Studie von Kahlert *et al.*, in der eine Expression von TIMP-1 vor allem in Zellen im Bereich der invasiven Front von Metastasen nachgewiesen werden konnte (Kahlert *et al.*, 2008). Untersuchungen mit L-CI.5s-Zellen mit einem *knock down* von TIMP-1, bzw. TIMP-1-überexprimierenden Zellen, die aktuell in der Arbeitsgruppe durchgeführt werden bzw. in Vorbereitung sind, könnten zur Beantwortung der Frage nach der Notwendigkeit von TIMP-1 bei der Induktion der sekundären Invasion beitragen.

6.7 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TIMP-1 zu einer Aktivierung von HIF-1 α in Tumorzellen führt und dass HIF-1 α ein wichtiger Tumorzell-intrinsischer Mediator der prometastatischen Wirkung von TIMP-1 ist. In weiteren Untersuchungen sollte nun der zugrunde liegende Mechanismus weiter aufgeklärt werden. Zur Beantwortung der Frage, ob die Induktion von HIF-1 α mit den Protease-hemmenden Eigenschaften von TIMP-1 zusammenhängt, könnten Untersuchungen mit TIMP-1-Derivaten, die nicht mehr zur Hemmung von MMPs in der Lage sind, beispielsweise alkyliertes TIMP-1 (Chirco *et al.*, 2006) oder die TIMP-1-Mutante TIMP-1-T2G (Murphy *et al.*, 2002), beitragen. Die diskutierte Abhängigkeit des Effekts von der Bindung von TIMP-1 an CD63 könnte mit Hilfe von CD63-*knock-down*-Zellen untersucht werden. Biochemische Untersuchungen an TIMP-1-inkubierten Tumorzellen könnten Aufschluss darüber geben, ob es durch TIMP-1 zu einer Aktivierung des PI3K-Signalwegs, der zur Induktion von HIF-1 α führen kann, oder anderer intrazellulärer Signalwege kommt. Durch Verwendung spezifischer Inhibitoren gegen PI3K könnte darüber hinaus ggf. untersucht werden, ob dieser Signalweg an der TIMP-1-induzierten Aktivierung von HIF-1 α beteiligt ist.

In vivo hatte die TIMP-1-Überexpression einen wesentlich stärkeren Effekt auf die HIF-1 α -Expression als *in vitro*. Es ist deshalb anzunehmen, dass nicht nur TIMP-1 selbst, sondern auch andere Faktoren der TIMP-1-modulierten Mikroumgebung zur Induktion von HIF-1 α beitragen. Wie bereits erwähnt, könnten Neutrophile z.B. über die Freisetzung von IL-1 β zu einer HIF-1-Induktion in TIMP-1-transduzierten Tieren führen. Es wäre deshalb interessant zu untersuchen, ob die Depletion Neutrophiler Granulozyten eine Auswirkung auf die HIF-1 α -Expression hat.

Die Behandlung mit einem Neutrophile-depletierendem Antiserum verhinderte wirksam die durch TIMP-1 induzierte aggressive Streuung der Tumorzellen. Auch hier wäre es interessant, in weiteren Untersuchungen den zugrunde liegenden Mechanismus zu erforschen. Bislang wird davon ausgegangen, dass Neutrophile Granulozyten durch ihre Funktion als Lieferanten von HGF zur TIMP-1-assoziierten Metastasierung beitragen, doch könnten sie auch auf andere Weise die Streuung von Tumorzellen fördern. Einige der in Frage kommenden Faktoren wurden in den vorangegangenen Abschnitten bereits erwähnt. So könnten Neutrophile durch Freisetzung von Proteasen, durch die Rekrutierung anderer Immunzellen oder durch Induktion von Wachstumsfaktoren TIMP-1-abhängig die Metastasierung fördern. Hier wäre es interessant, Unterschiede in der

HGF-Menge, in der Proteaseexpression und -aktivität oder im Expressionsprofil prometastatischer Zytokine in PMN-depletierten und nicht-depletierten Tieren zu untersuchen.

Erst vor Kurzem konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass neben Neutrophilen Granulozyten auch vermehrt Makrophagen in die Leber TIMP-1-überexprimierender Tiere einwandern (Elisabeth Nüske, AG Krüger, Bachelorarbeit). Auch für Makrophagen ist eine prometastatische Wirkung in der Literatur belegt (Pollard, 2004; Joyce und Pollard, 2009). Um den Beitrag dieser Immunzellpopulation zur TIMP-1-induzierten Metastasierung genauer untersuchen zu können, könnten Makrophagen durch Behandlung von Mäusen mit Clodronat depletiert werden (Van Rooijen, 1989).

Vieles deutet schon jetzt darauf hin, dass der HGF-c-Met-Signalweg Dreh- und Angelpunkt der prometastatischen Wirkung von TIMP-1 ist. So lässt sich die TIMP-1-assoziierte Streuung der Tumorzellen durch die Behandlung mit einem c-Met-Inhibitor ebenso wie durch die Behandlung von Mäusen mit einem gegen HGF-speichernde Neutrophile Granulozyten gerichteten Antiserum unterdrücken und auch die Hemmung der Tumorzellstreuung durch den *knock down* von HIF-1 α geht mit einer reduzierten c-Met-Aktivierung in Metastasen einher. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits ein Protokoll etabliert, das es erlaubt, durch adenoviralen Gentransfer einer gegen c-Met gerichteten shRNA-Sequenz c-Met spezifisch im Wirtsgewebe zu inhibieren. Somit kann in zukünftigen Experimenten erstmals der interessanten Frage nachgegangen werden, welchen Beitrag die c-Met-Signaltransduktion im Wirtsgewebe zur Ausbildung der TIMP-1-induzierten metastatischen Nische leistet und welche Rolle sie damit letztendlich bei der prometastatischen Wirkung von TIMP-1 spielt.

Während der Spätstadien der „normalen“ Metastasierung im L-CI.5-Modell liefen ähnliche molekulare Vorgänge ab, wie sie auch für die TIMP-1-induzierte Metastasierung beschrieben worden waren (starker Anstieg der TIMP-1-Expression in der Leber, der mit dem Auftreten sekundär invadierter Tumorzellen korrelierte, Anstieg von HIF-1 α und HGF-Protein, Akkumulation Neutrophiler Granulozyten). Weitere Untersuchungen unter Verwendung von Tumorzellen mit einem *knock down* von TIMP-1, oder auch eine Reduktion der TIMP-1-Expression im Wirt, könnten Aufschluss darüber geben, ob TIMP-1 nicht nur ausreichend, sondern möglicherweise sogar dafür notwendig ist, die aggressive Streuung von Tumorzellen zu induzieren. Erste in der Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchungen mit L-CI.5s-shTIMP-1-Zellen bestätigten diese Hypothese.

7 Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

- Acuff HB, Carter KJ, Fingleton B, Gorden DL, Matrisian LM** (2006). Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Res* **66**: 259-66.
- Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G** (2006). Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* **72**: 1605-21.
- Aguirre-Ghiso JA** (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* **7**: 834-46.
- Airley RE, Loncaster J, Raleigh JA, Harris AL, Davidson SE, Hunter RD, West CM, Stratford IJ** (2003). GLUT-1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of the cervix: relationship to pimonidazole binding. *Int J Cancer* **104**: 85-91
- Akahane T, Akahane M, Shah A, Thorgeirsson UP** (2004). TIMP-1 stimulates proliferation of human aortic smooth muscle cells and Ras effector pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **324**: 440-5.
- Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ** (2000). Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med* **6**: 100-2.
- Amalfitano A, Hauser MA, Hu H, Serra D, Begy CR, Chamberlain JS** (1998). Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *J Virol* **72**: 926-33.
- Anderson KL, Smith KA, Pio F, Torbett BE, Maki RA** (1998). Neutrophils deficient in PU.1 do not terminally differentiate or become functionally competent. *Blood* **92**: 1576-85.
- Arlt M, Kopitz C, Pennington C, Watson KL, Krell HW, Bode W, Gänzbacher B, Khokha R, Edwards DR, Krüger A** (2002). Increase in Gelatinase-specificity of Matrix Metalloproteinase Inhibitors Correlates with Antimetastatic Efficacy in a T-Cell Lymphoma Model. *Cancer Res* **62**: 5543-50.
- Armbrust T, Batusic D, Xia L, Ramadori G** (2002). Early gene expression of hepatocyte growth factor in mononuclear phagocytes of rat liver after administration of carbon tetrachloride. *Liver* **22**: 486-94.

- Arvidsson Y, Bergström A, Arvidsson L, Kristiansson E, Ahlman H, Nilsson O** (2010). Hypoxia stimulates CXCR4 signalling in ileal carcinoids. *Endocr Relat Cancer*.
- auf dem Keller U, Doucet A, Overall CM** (2007). Protease research in the era of systems biology. *Biol Chem* **388**: 1159-62.
- Baker AH, Edwards DR, Murphy G** (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* **115**: 3719-27.
- Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC** (1998). Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest* **101**: 1478-87.
- Baluk, P, Hashizume H, McDonald DM** (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* **15**: 102-111.
- Beer S, Bellovin, DI, Lee JS, Komatsubara K, Wang LS, Koh H, Börner K, Storm TA, Davis CR, Kay MA, Felsher DW, Grimm D** (2010). Low-level shRNA cytotoxicity can contribute to MYC-induced hepatocellular carcinoma in adult mice. *Mol Ther* **18**: 161-170.
- Bellocq A, Antoine M, Flahault A, Philippe C, Crestani B, Bernaudin JF, Mayaud C, Milleron B, Baud L, Cadranel J** (1998). Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. *Am J Pathol* **152**: 83-92.
- Benelli R, Morini M, Carrozzino F, Ferrari N, Minghelli S, Santi L, Cassatella M, Noonan DM, Albini A** (2002). Neutrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation. *Faseb J* **16**: 267-9.
- Benihoud K, Saggio I, Opolon P, Salone B, Amiot F, Connault E, Chianale C, Dautry F, Yeh P, Perricaudet M** (1998). Efficient, Repeated Adenovirus-Mediated Gene Transfer in Mice Lacking both Tumor Necrosis Factor Alpha and Lymphotoxin a. *J Virol* **72**: 9514-9525.
- Benvenuti S, Comoglio PM** (2007). The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis. *J Cell Physiol* **213**: 316-325.
- Berditchevski F, Toliaf KF, Wong K, Carpenter CL, Hemler ME** (1997). A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase. *J Biol Chem* **272**: 2595-8.
- Berra E, Richard DE, Gothie E, Pouyssegur J** (2001). HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1alpha degradation. *FEBS Lett* **491**: 85-90.

- Bertout JA, Patel SA, Simon MC** (2008). The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* **8**: 967-975.
- Bett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL** (1994). An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8802-6.
- Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF** (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 915-25.
- Bissell MJ, Radisky D** (2001). Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* **1**: 46-54.
- Brew K, Dinakarandian D, Nagase H** (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* **1477**: 267-83.
- Bross ID, Viadana E, Pickren J** (1975). Do generalized metastases occur directly from the primary? *J Chronic Dis* **28**: 149-59.
- Brown PD** (1997). Matrix metalloproteinase inhibitors. *Breast Cancer Res Treat* **52**: 125-136.
- Burke B, Tang N, Corke KP, Tazzyman D, Ameri K, Wells M, Lewis CE** (2002). Expression of HIF-1alpha by human macrophages: implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy. *J Pathol* **196**: 204-12.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC** (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2**: 563-72.
- Chan DA, Giaccia AJ** (2007). Hypoxia, gene expression, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **26**: 333-9.
- Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HR** (2006). Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev* **25**: 99-113.
- Cho JA, Yeo DJ, Son HY, Kim HW, Jung DS, Ko JK, Koh JS, Kim YN, Kim CW** (2005). Exosomes: a new delivery system for tumor antigens in cancer immunotherapy. *Int J Cancer* **114**: 613-22.
- Clark RA, Klebanoff SJ** (1975). Neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity: role of the peroxidase system. *J Exp Med* **141**: 1442-7.
- Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L** (2008). Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat Rev Drug Discov* **7**: 504-516.
- Corso S, Comoglio PM, Giordano S** (2005). Cancer therapy: can the challenge be MET? *Trends Mol Med* **11**: 284-92.

- Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM** (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* **295**: 2387-92.
- Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z** (2000). MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* **103**: 481-490.
- Coussens LM, Werb Z** (2001). Inflammatory cells and cancer: think different! *J Exp Med* **193**: F23-6.
- Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE** (2008). Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* **83**: 64-70.
- Davis RC, Cooperband SR, Mannick JA** (1969). Preparation and in vitro assay of effective and ineffective antilymphocyte sera. *Surgery* **66**: 58-64.
- DeNardo DG, Johansson M, Coussens LM** (2008). Immune cells as mediators of solid tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **27**: 11-8.
- Desgrosseillier JS, Ceresch DA** (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* **10**: 9-22.
- Desiderio MA** (2007). Hepatocyte growth factor in invasive growth of carcinomas. *Cell Mol Life Sci* **64**: 1341-1354.
- Di Carlo E, Forni G, Lollini P, Colombo MP, Modesti A, Musiani P** (2001). The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood* **97**: 339-45.
- Dong J-Y, Wang D, Van Ginke FW, Pascual DW, Frizzell RA** (1996). Systemic Analysis of Repeated Gene Delivery into Animal Lungs with a Recombinant Adenovirus Vector. *Hum Gene Ther* **7**: 319-331.
- Douglas JT** (2007). Adenoviral vectors for gene therapy. *Mol Biotechnol* **36**: 71-80.
- DuBridghe RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP** (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* **7**: 379-87.
- Duffy MJ, McGowan PM, Gallagher WM** (2008). Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol* **214**: 283-93.
- Eccles NA** (2001). Basic principles for the study of metastasis using animal models. In: Brooks SA and Schumacher U (eds). *Metastasis Research Protocols*. Humana Press: Totowa, New Jersey. pp 161-172.

- Egeblad M, Werb Z** (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2**: 161-74.
- Elezkurtaj S, Kopitz C, Baker AH, Perez-Canto A, Arlt MJ, Khokha R, Gänsbacher B, Anton M, Brand K, Krüger A** (2004). Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the liver: efficient protection against T-cell lymphoma and colon carcinoma metastasis. *J Gene Med* **6**: 1228-37.
- Engers R, Springer E, Michiels F, Collard JG, Gabbert HE** (2001). Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up-regulating tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 expression. *J Biol Chem* **276**: 41889-97.
- Erler JT, Bennewith KL, Cox TR, Lang G, Bird D, Koong A, Le QT, Giaccia AJ** (2009). Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell* **15**: 35-44.
- Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL** (1999). Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* **16**: 3915-3918.
- Fidler IJ** (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3**: 453-8.
- Folkman J** (1986). How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res* **46**: 467-73.
- Fong KM, Kida Y, Zimmerman PV, Smith PJ** (1996). TIMP1 and adverse prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **2**: 1369-72.
- Fujiwara S, Nakagawa K, Harada H, Nagato S, Furukawa K, Teraoka M, Seno T, Oka K, Iwata S, Ohnishi T** (2007). Silencing hypoxia-inducible factor-1alpha inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas. *Int J Oncol* **30**: 793-802.
- Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL** (2002). Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* **41**: 38205-38211.
- Galanis A, Pappa A, Giannakakis A, Lanitis E, Dangaj D, Sandaltzopoulos R** (2008). Reactive oxygen species and HIF-1 signalling in cancer. *Cancer Lett* **266**: 12-20.
- Geiger TR, Peeper DS** (2009). Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1796**: 293-308.

- Geiser AG, Anderson MJ, Stanbridge EJ** (1989). Suppression of tumorigenicity in human cell hybrids derived from cell lines expressing different activated ras oncogenes. *Cancer Res* **49**: 1572-7.
- Gentile A, Trusolino L, Comoglio PM** (2008). The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev* **27**: 85-94.
- Gerg M, Kopitz C, Schaten S, Tschukes A, Kahlert C, Stangl M, Hann von Weyhern CW, Brücher BL, Edwards DR, Brand K, Krüger A** (2008). Distinct Functionality of Tumor Cell-Derived Gelatinases during Formation of Liver Metastases. *Mol Cancer Res* **6**: 341-51.
- Giordano S, Di Renzo MF, Ferracini R, Chiado-Piat L, Comoglio PM** (1988a). p145, a protein with associated tyrosine kinase activity in a human gastric carcinoma cell line. *Mol Cell Biol* **8**: 3510-7.
- Giordano S, Di Renzo MF, Narsimhan RP, Tamagnone L, Gerbaudo EV, Chiado-Piat L, Comoglio PM** (1988b). Evidence for autocrine activation of a tyrosine kinase in a human gastric carcinoma cell line. *J Cell Biochem* **38**: 229-36.
- Glick AB, Yuspa SH** (2005). Tissue homeostasis and the control of the neoplastic phenotype in epithelial cancers. *Semin Cancer Biol* **15**: 75-83.
- Görlach A** (2009). Regulation of HIF-1alpha at the transcriptional level. *Curr Pharm Des* **15**: 3844-3852.
- Gort EH, Groot AJ, van der Wall E, van Diest PJ, Vooijs MA** (2008). Hypoxic regulation of metastasis via hypoxia-inducible factors. *Curr Mol Med* **8**: 60-7.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R** (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**: 59-74.
- 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** (2002). Presence of a mobilizable intracellular pool of hepatocyte growth factor in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* **99**: 2997-3004.
- Gumley TP, McKenzie IF, Sandrin MS** (1995). Tissue expression, structure and function of the murine Ly-6 family of molecules. *Immunol Cell Biol* **73**: 277-96.
- Günthert U** (1997). Biologie der Metastasierung und Tumorangio-genese. In: Ostendorf PC and Seeber S (eds). *Hämatologie und Onkologie*. Urban und Schwarzenberg: München. pp 160-167.
- Gupta GP, Massagué J** (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* **127**: 679-95.

- Guy CT, Cardoso G** (2001). Transgenic animal models. In: Brooks SA and Schumacher U (eds). *Metastasis Research Protocols*. Humana Press: Totowa. pp 231-205.
- Halbgewachs B, Schelter F, Schrötzlmair F, Krüger A** (2010). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 evokes tumor cell scattering in the liver via Hypoxia-inducible factor-1 α . *Manuskript in Vorbereitung*.
- Harris AL** (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* **2**: 38-47.
- Harrison JE, Schultz J** (1976). Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* **251**: 1371-1374.
- Hiraga T, Kizaka-Kondoh S, Hirota K, Hiraoka M, Yoneda T** (2007). Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 expression enhance osteolytic bone metastases of breast cancer. *Cancer Res* **67**: 4157-63.
- Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y** (2006). Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol* **8**: 1369-75.
- Hitt M, A.J. B, Addison CL, Prevec L, Graham FL** (1995). Techniques for human adenovirus vector construction and characterization. In: Adolph KW (ed). *Viral Gene Techniques*. Academic Press: San Diego. pp 13-30.
- Hong SI, Park IC, Hong WS, Son YS, Lee SH, Lee JI, Choi DW, Moon NM, Choe TB, Jang JJ** (1996). Overexpression of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 in the stroma of gastric cancer. *J Korean Med Sci* **11**: 474-9.
- Hood JD, Cheresch DA** (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* **2**: 91-100.
- Hornebeck W, Lambert E, Petitfrere E, Bernard P** (2005). Beneficial and detrimental influences of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in tumor progression. *Biochimie* **87**: 377-83.
- Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, Forni G, Eils R, Fehm T, RiethMüller G, Klein CA** (2008). Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* **13**: 58-68.
- Ikenaka Y, Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Noguchi R, Tsujinoue H, Yanase K, Namisaki T, Imazu H, Masaki T, Fukui H** (2003). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) inhibits tumor growth and angiogenesis in the TIMP-1 transgenic mouse model. *Int J Cancer* **105**: 340-6.

- Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ, Sasaguri Y, Mori Y** (1996). Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **271**: 14657-60.
- Jensen HK, Donskov F, Marcussen N, Nordmark M, Lundbeck F, von der Maase H** (2009). Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* **27**: 4709-17.
- Jones N, Shenk T** (1978). Isolation of deletion and substitution mutants of adenovirus type 5. *Cell* **13**: 181-188.
- Joyce JA, Pollard JW** (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* **9**: 239-52.
- Jung KK, Liu XW, Chirco R, Fridman R, Kim HR** (2006). Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *Embo J* **25**: 3934-42.
- Kahlert C, Bandapalli OR, Schirmacher P, Weitz J, Brand K** (2008). Invasion front-specific overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in liver metastases from colorectal cancer. *Anticancer Res* **28**: 1459-65.
- Kallquist L, Hansson M, Persson AM, Janssen H, Calafat J, Tapper H, Olsson I** (2008). The tetraspanin CD63 is involved in granule targeting of neutrophil elastase. *Blood* **112**: 3444-54.
- 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, Ruggiero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D** (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438**: 820-7.
- Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C** (2003). IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* **24**: 25-9.
- Khan Z, Michalopoulos GK, Stolz DB** (2006). Peroxisomal localization of hypoxia-inducible factors and hypoxia-inducible factor regulatory hydroxylases in primary rat hepatocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. *Am J Pathol* **169**: 1251-69.
- Khokha R** (1994). Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of murine B16- F10 melanoma cells in vivo by the overexpression of the tissue inhibitor of the metalloproteinases-1. *J Natl Cancer Inst* **86**: 299-304.
- Khokha R, Zimmer MJ, Graham CH, Lala PK, Waterhouse P** (1992). Suppression of invasion by inducible expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in B16-F10 melanoma cells. *J Natl Cancer Inst* **84**: 1017-22.

- Kietzmann T, Cornesse Y, Brechtel K, Modaresi S, Jungermann K** (2001). Perivenous expression of the mRNA of the three hypoxia-inducible factor α -subunits, HIF1 α , HIF2 α and HIF3 α , in rat liver. *Biochem J* **354**: 531-537.
- Kim HJ, Byun SJ, Kim TY** (2004). Differential regulation of IGF-II-induced IL-8 by extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **317**: 276-84.
- Kishi Y, Kopetz S, Chun YS, Palavecino M, Abdalla EK, Vauthey JN** (2009). Blood neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts survival in patients with colorectal liver metastases treated with systemic chemotherapy. *Ann Surg Oncol* **16**: 614-22.
- Kobayashi T, Honke K, Miyazaki T, Matsumoto K, Nakamura T, Ishizuka I, Makita A** (1994). Hepatocyte growth factor specifically binds to sulfoglycolipids. *J Biol Chem* **13**: 9817-9821
- Kopitz C, Anton M, Gänsbacher B, Krüger A** (2005). Reduction of experimental human fibrosarcoma lung metastasis in mice by adenovirus-mediated cystatin C overexpression in the host. *Cancer Res* **65**: 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, von Weyhern CW, Brücher BL, Brand K, Coussens LM, Edwards DR, Krüger A** (2007). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. *Cancer Res* **67**: 8615-23.
- Kossakowska AE, Urbanski SJ, Janowska-Wieczorek A** (2000). Matrix Metalloproteinases and their Tissue Inhibitors - Expression, Role and Regulation in Human Malignant Non-Hodgkin's Lymphomas. *Leuk Lymphoma* **39**: 485-93.
- Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P, Semenza GL** (2003). Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* **63**: 1138-43.
- Krüger A** (2009). Functional genetic mouse models: promising tools for investigation of the proteolytic internet. *Biol Chem* **390**: 91-7.
- Krüger A, Fata JE, Khokha R** (1997). Altered tumor growth and metastasis of a T-cell lymphoma in Timp-1 transgenic mice. *Blood* **90**: 1993-2000.
- Krüger A, Kates RE, Edwards DR** (2009). Avoiding spam in the proteolytic internet: Future strategies for anti-metastatic MMP inhibition. *Biochim Biophys Acta*.
- Krüger A, Krebs T, Banke IJ** (2007). [Anti-metastatic effects of serine protease inhibitors: animal models for analysis]. *Hamostaseologie* **27**: 64-70.

- Krüger A, Sanchez-Sweatman OH, Martin DC, Fata JE, Ho AT, Orr FW, Ruther U, Khokha R** (1998a). Host TIMP-1 overexpression confers resistance to experimental brain metastasis of a fibrosarcoma cell line. *Oncogene* **16**: 2419-23.
- Krüger A, Schirmacher V, Khokha R** (1998b). The bacterial lacZ gene: an important tool for metastasis research and evaluation of new cancer therapies. *Cancer Metastasis Rev* **17**: 285-94.
- Krüger A, Schirmacher V, von Hoegen P** (1994a). Scattered micrometastases visualized at the single-cell level: detection and re-isolation of lacZ-labeled metastasized lymphoma cells. *Int J Cancer* **58**: 275-84.
- Krüger A, Soeltl R, Sopov I, Kopitz C, Arlt M, Magdolen V, Harbeck N, Gänsbacher B, Schmitt M** (2001). Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor batimastat promotes liver metastasis. *Cancer Res* **61**: 1272-5.
- Krüger A, Umansky V, Rocha M, Hacker HJ, Schirmacher V, von Hoegen P** (1994b). Pattern and load of spontaneous liver metastasis dependent on host immune status studied with a lacZ transduced lymphoma. *Blood* **84**: 3166-74.
- Kulesa PM, Kasemeier-Kulesa JC, Teddy JM, Margaryan NV, Seftor EA, Seftor RE, Hendrix MJ** (2006). Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3752-7.
- Kuvaja P, Talvensaaari-Mattila A, Turpeenniemi-Hujanen T** (2008). High preoperative plasma TIMP-1 is prognostic for early relapse in primary breast carcinoma. *Int J Cancer* **123**: 846-51.
- Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E** (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**: 187-98.
- Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL** (2001). HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* **12**: 3995-4004.
- Lawson CA, Yan SD, Yan SF, Liao H, Zhou YS, Sobel J, Kisiel W, Stern DM, Pinsky DJ** (1997). Monocytes and tissue factor promote thrombosis in a murine model of oxygen deprivation. *J Clin Invest* **99**: 1729-38.
- Lewis CE, Pollard JW** (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* **66**: 605-12.
- Li G, Fridman R, Kim HR** (1999). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Res* **59**: 6267-75.

- Liao D, Corle C, Seagroves TN, Johnson RS** (2007). Hypoxia-inducible factor-1alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res* **67**: 563-572.
- Lieber JG, Webb S, Suratt BT, Young SK, Johnson GL, Keller GM, Worthen GS** (2004). The in vitro production and characterization of neutrophils from embryonic stem cells. *Blood* **103**: 852-9.
- Liu XW, Bernardo MM, Fridman R, Kim HR** (2003). 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* **278**: 40364-72.
- López-Otín C, Matrisian LM** (2007). Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* **7**: 800-8.
- Lyon M, Deakin JA, Mizuno K, Nakamura T, Gallagher JT** (1994). Interaction of hepatocyte growth factor with heparan sulphate. Elucidation of the major heparan sulphate structural determinants. *J Biol Chem* **15**: 11216-11223.
- Martin DC, Ruther U, Sanchez-Sweatman OH, Orr FW, Khokha R** (1996). Inhibition of SV40 T antigen-induced hepatocellular carcinoma in TIMP-1 transgenic mice. *Oncogene* **13**: 569-76.
- Martin MD, Carter KJ, Jean-Philippe SR, Chang M, Mobashery S, Thiolloy S, Lynch CC, Matrisian LM, Fingleton B** (2008). Effect of ablation or inhibition of stromal matrix metalloproteinase-9 on lung metastasis in a breast cancer model is dependent on genetic background. *Cancer Res* **68**: 6251-9.
- Matsumoto K, Nakamura T** (2006). Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interactions. *Int J Cancer* **119**: 477-83.
- Matteucci E, Locati M, Desiderio MA** (2005). Hepatocyte growth factor enhances CXCR4 expression favoring breast cancer cell invasiveness. *Exp Cell Res* **310**: 176-85.
- McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP** (2001). Activated human neutrophils release hepatocyte growth factor/scatter factor. *Eur J Surg Oncol* **27**: 396-403.
- Mehlen P, Puisieux A** (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* **6**: 449-58.
- Michou AI, Santoro L, Christ M, Julliard V, Pavirani A, Mehtali M** (1997): Adenovirus-mediated gene transfer: influence of transgene, mouse strain and type of immune response on persistence of transgene expression. *Gene Ther* **4**: 473-482.

- Mimori K, Mori M, Shiraishi T, Fujie T, Baba K, Haraguchi M, Abe R, Ueo H, Akiyoshi T** (1997). Clinical significance of tissue inhibitor of metalloproteinase expression in gastric carcinoma. *Br J Cancer* **76**: 531-6.
- Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ** (2004). The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* **1705**: 69-89.
- Mott JD, Werb Z** (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 558-64.
- Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A** (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**: 50-6.
- Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE** (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **8**: 618-31.
- Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP** (2002). Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* **277**: 11069-76.
- Nakamura T, Teramoto H, Ichihara A** (1986). Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 6489-93.
- Nguyen TH** (2004). Mechanisms of metastasis. *Clin Dermatol* **22**: 209-16.
- Overall CM, Kleinfeld O** (2006). Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **6**: 227-39.
- Overall CM, López-Otín C** (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* **2**: 657-72.
- Owen CA, Campbell EJ** (1999). The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol* **65**: 137-50.
- Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, Zhang H, Yoshimura T, Kawazoe S, Eguchi Y, Yasutake T, Hisatomi A, Sakai T, Yamamoto K** (2003). Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1. *Hepatol Res* **27**: 289-301.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z** (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 221-33.

- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D** (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8392-6.
- Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM** (2003). Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* **3**: 347-61.
- Perret GY, Crépin M** (2008). New pharmacological strategies against metastatic spread. *Fundam Clin Pharmacol* **22**: 465-92.
- Pollard JW** (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* **4**: 71-8.
- Potter C, Harris AL** (2004). Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target. *Cell Cycle* **3**: 164-7.
- Pouysségur J, Dayan F, Mazure NM** (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* **441**: 437-43.
- Pouysségur J, Mechta-Grigoriou F** (2006). Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol Chem* **387**: 1337-1346.
- Price JE** (2001). Xenograft models in immunodeficient animals, I. Nude mice: spontaneous and experimental metastasis models. In: Brooks SA and Schumacher U (eds). *Metastasis Research Protocols*. Humana Press: Totowa. pp 205-214.
- Rasheed S, Nelson-Rees WA, Toth EM, Arnstein P, Gardner MB** (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* **33**: 1027-33.
- Richter J** (1992). Effect of adenosine analogues and cAMP-raising agents on TNF-, GM-CSF-, and chemotactic peptide-induced degranulation in single adherent neutrophils. *J Leukoc Biol* **51**: 270-5.
- Ried S, Jager C, Jeffers M, Vande Woude GF, Graeff H, Schmitt M, Lengyel E** (1999). Activation mechanisms of the urokinase-type plasminogen activator promoter by hepatocyte growth factor/scatter factor. *J Biol Chem* **274**: 16377-86.
- Ruan K, Song G, Ouyang G** (2009). Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem* **107**: 1053-62.
- Schelter F, Gerg M, Halbgewachs B, Schatten S, Görlach A, Schrötlmair F, Krüger A** (2010). Identification of Hypoxia-inducible factor-1 α as a regulator of invasive steps of metastasis with a hypoxia-tolerant tumor model. *Manuskript in Vorbereitung*.

- Schirmacher V, Shantz G, Clauer K, Komitowski D, Zimmermann HP, Lohmann-Matthes ML** (1979). Tumor metastases and cell-mediated immunity in a model system in DBA/2 mice. I. Tumor invasiveness in vitro and metastasis formation in vivo. *Int J Cancer* **23**: 233-44.
- Schneider MD, French BA** (1993). The advent of adenovirus. Gene therapy for cardiovascular disease. *Circulation* **88**: 1937-42.
- Schrötzlmair F, Kopitz C, Halbgewachs B, Lu F, Algul H, Brünner N, Gänsbacher B, Krüger A** (2009). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1-induced scattered liver metastasis is mediated by host-derived urokinase-type plasminogen activator. *J Cell Mol Med*.
- Semenza GL** (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**: 721-32.
- Semenza GL, Wang GL** (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**: 5447-54.
- Shinomiya N, Gao CF, Xie Q, Gustafson M, Waters DJ, Zhang YW, Vande Woude GF** (2004). RNA interference reveals that ligand-independent met activity is required for tumor cell signaling and survival. *Cancer Res* **64**: 7962-7970.
- Skubitz KM, Campbell KD, Iida J, Skubitz AP** (1996). CD63 associates with tyrosine kinase activity and CD11/CD18, and transmits an activation signal in neutrophils. *J Immunol* **157**: 3617-26.
- Slivka A, LoBuglio AF, Weiss SJ** (1980). A potential role for hypochlorous acid in granulocyte-mediated tumor cell cytotoxicity. *Blood* **55**: 347-50.
- Sorensen NM, Schrohl AS, Jensen V, Christensen IJ, Nielsen HJ, Brünner N** (2008). Comparative studies of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in plasma, serum and tumour tissue extracts from patients with primary colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* **43**: 186-91.
- Steeg PS, Theodore D** (2008). Metastasis: a therapeutic target for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* **5**: 206-19.
- Stella MC, Comoglio PM** (1999). HGF: a multifunctional growth factor controlling cell scattering. *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 1357-62.
- Stetler-Stevenson WG** (2008). Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* **1**: re6.
- Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH, Hellwig-Burgel T** (2002). Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett* **512**: 157-62.

- Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J** (1987). Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* **327**: 239-42.
- Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI** (1995). Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* **270**: 5331-8.
- Sugiura T, Berditchevski F** (1999). Function of alpha3beta1-tetraspanin protein complexes in tumor cell invasion. Evidence for the role of the complexes in production of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). *J Cell Biol* **146**: 1375-89.
- Tacchini L, Matteucci E, De Ponti C, Desiderio MA** (2003). Hepatocyte growth factor signaling regulates transactivation of genes belonging to the plasminogen activation system via hypoxia inducible factor-1. *Exp Cell Res* **290**: 391-401.
- Taub DD, Anver M, Oppenheim JJ, Longo DL, Murphy WJ** (1996). T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8). IL-8-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo. *J Clin Invest* **97**: 1931-41.
- Tazzyman S, Lewis CE, Murdoch C** (2009). Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis. *Int J Exp Pathol* **90**: 222-31.
- Thilo-Körner DG, Marre U, Savion N, Hehrlein FW, Bodeker RH** (1992). Hyperoxia (145 mmHg pO₂) and tissue normoxia (20-40 mmHg pO₂) modulate human vascular cell functions. *EXS* **61**: 400-4.
- Toyama T, Ido A, Sasak H, Maeda K, Yamashita K, Kubuki Y, Suzuki M, Matsuoka H, Tsubouchi H** (2005). Possible involvement of neutrophils in a serum level increase of hepatocyte growth factor in non-Hodgkin's lymphoma. *Oncol Rep* **13**: 439-44.
- Trusolino L, Comoglio PM** (2002). Scatter-factor and semaphoring receptors: cell signaling for invasive growth. *Nat Rev Cancer* **4**: 289-300.
- Turk B** (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 785-99.
- Vaisanen AH, Kallioinen M, Turpeenniemi-Hujanen T** (2008). Comparison of the prognostic value of matrix metalloproteinases 2 and 9 in cutaneous melanoma. *Hum Pathol* **39**: 377-85.
- Van Kempen LC, de Visser KE, Coussens LM** (2006). Inflammation, proteases and cancer. *Eur J Cancer* **42**: 728-734.
- Van Rooijen N** (1989). The liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *J Immunol Methods* **124**: 1-6.

- Vaupel P, Mayer A** (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* **26**: 225-39.
- Victor N, Ivy A, Jiang BH, Agani FH** (2006). Involvement of HIF-1 in invasion of Mum2B uveal melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* **23**: 87-96.
- Visse R, Nagase H** (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* **92**: 827-39.
- Voland P, Besig S, Rad R, Braun T, Baur DM, Perren A, Langer R, Hofler H, Prinz C** (2009). Correlation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase expression in ileal carcinoids, lymph nodes and liver metastasis with prognosis and survival. *Neuroendocrinology* **89**: 66-78.
- Walmsley SR, McGovern NN, Whyte MK, Chilvers ER** (2008). The HIF/VHL pathway: from oxygen sensing to innate immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol* **38**: 251-5.
- Watson SA, Morris TM** (2001). Theoretical considerations in using animal models of metastasis and brief methodology for in vivo colorectal cancer models in SCID and nude mice. In: Brooks SA and Schumacher U (eds). *Metastasis Research Protocols*. Humana Press: Totowa. pp 195-204.
- Weiss L, Harlos JP, Torhorst J, Gunthard B, Hartveit F, Svendsen E, Huang WL, Grundmann E, Eder M, Zwicknagl M, et al.** (1988). Metastatic patterns of renal carcinoma: an analysis of 687 necropsies. *J Cancer Res Clin Oncol* **114**: 605-12.
- WHO** (2008). The Top Ten Causes of Death. *WHO Fact Sheet* **310**
- Wilson JM** (2001). Adenovirus-mediated gene transfer to liver. *Adv Drug Deliv Rev* **46**: 205-209.
- Wislez M, Rabbe N, Marchal J, Milleron B, Crestani B, Mayaud C, Antoine M, Soler P, Cadranet J** (2003). Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death. *Cancer Res* **63**: 1405-12.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L** (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* **80**: 617-53.
- Witz IP** (2008). Tumor-microenvironment interactions: dangerous liaisons. *Adv Cancer Res* **100**: 203-29.
- Wu Y, Zhou BP** (2009). Inflammation: a driving force speeds cancer metastasis. *Cell Cycle* **8**: 3267-73.

- Würtz SO, Moller S, Mouridsen H, Hertel PB, Friis E, Brünner N** (2008). Plasma and serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 are associated with prognosis in node-negative breast cancer: a prospective study. *Mol Cell Proteomics* **7**: 424-30.
- Wykoff CC, Beasley NJP, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL** (2000). Hypoxia-inducible Expression of Tumor-associated Carbonic Anhydrases. *Cancer Res* **60**: 7075-7083.
- Yang C, Zeng S, Lv M** (2006). Effect of shRNA inhibiting HIF1alpha gene on TIMP1 expression in RPE cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **26**: 133-6.
- Zarembek KA, Malech HL** (2005). HIF-1alpha: a master regulator of innate host defenses? *J Clin Invest* **115**: 1702-4.
- Zhang SZ, Pan FY, Xu JF, Yuan J, Guo SY, Dai G, Xue B, Shen WG, Wen CJ, Zhao DH, Li CJ** (2005). Knockdown of c-Met by adenovirus-delivered small interfering RNA inhibits hepatocellular carcinoma growth in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* **4**: 1577-1584.
- Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL** (2000). Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* **60**: 1541-5.
- Zhou HY, Wong AS** (2006). Activation of p70S6K induces expression of matrix metalloproteinase 9 associated with hepatocyte growth factor-mediated invasion in human ovarian cancer cells. *Endocrinology* **147**: 2557-66.
- Zucker S, Vacirca J** (2004). Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* **23**: 101-117.

7.2 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

- Abbildung 2-1: Wichtige Schritte bei der Entstehung von Metastasen.
- Abbildung 2-2: Erhöhte TIMP-1-Spiegel induzieren die Lebermetastasierung.
- Abbildung 2-3: Sauerstoffabhängige Regulation der HIF-1-Aktivität.
- Abbildung 2-4: Sauerstoffunabhängige Regulation der HIF-1 α -Proteinsynthese.
- Abbildung 2-5: Unterscheidung verschiedener Phasen im Verlauf der Lebermetastasierung im L-CI.5s-Modell.
- Abbildung 4-1: Inokulations- und Präparationsschemata der Tierversuche.
- Abbildung 4-2: Inokulations- und Präparationsschema für die Untersuchung des Beitrags Neutrophiler Granulozyten zur TIMP-1-induzierten Metastasierung.
- Abbildung 5-1: Einfluss der TIMP-1-modulierten Mikroumgebung in der Leber auf die Expression von HIF-1 α und CAIX.
- Abbildung 5-2: Einfluss der TIMP-1-modulierten Mikroumgebung in der Leber auf die Expression von HIF-1 α und CAIX in Gegenwart von Tumorzellen.
- Abbildung 5-3: TIMP-1 induziert direkt die HIF-1 α -Expression und z.T. auch die HIF-1-Signaltransduktion in Tumorzellen.
- Abbildung 5-4: TIMP-1 steigert die Invasivität von Tumorzellen in vitro.
- Abbildung 5-5: Der *knock down* von HIF-1 α verhindert die TIMP-1-induzierte Zunahme der Invasivität.
- Abbildung 5-6: Tumorzell-HIF-1 α ist für die prometastatische Wirkung von TIMP-1 notwendig.
- Abbildung 5-7: Der *knock down* von HIF-1 α in L-CI.5s-Zellen verringert deren diffuse Streuung im Leberparenchym TIMP-1-überexprimierender Tiere.
- Abbildung 5-8: Reduzierte c-Met-Expression und -Aktivierung in Lebergewebe bzw. Metastasen TIMP-1-transduzierter Tiere durch den *knock down* von HIF-1 α in Tumorzellen.
- Abbildung 5-9: Nahezu unveränderte Proliferation nach *knock down* von HIF-1 α in L-CI.5s-Zellen.
- Abbildung 5-10: Kein signifikanter Anstieg der HGF-RNA-Expression in der Leber durch adenovirale Überexpression von TIMP-1.

- Abbildung 5-11: TIMP-1 beeinflusst die Migration Neutrophiler Granulozyten *in vivo* und *in vitro*.
- Abbildung 5-13: Etablierung der Antiserum-vermittelten Depletion Neutrophiler Granulozyten.
- Abbildung 5-14: Auswirkung der anti-PMN-Behandlung auf die experimentelle Lebermetastasierung.
- Abbildung 5-15: Etablierung des c-Met-*knock-down* in der Leber: Dosisfindung.
- Abbildung 5-16: Signifikante Reduktion der c-Met-RNA-Expression bereits an Tag 2 nach Adshc-Met-Gentransfer.
- Abbildung 5-17: Deutliche Reduktion der c-Met-Proteinmenge in der Leber an Tag 9 nach Adshc-Met-Gentransfer.
- Abbildung 5-18: Untersuchung der adenoviral vermittelten Expression von humanem TIMP-1 nach vorangegangenem adenoviralem Gentransfer.
- Abbildung 5-19: Untersuchung des Beitrags von Wirts-c-Met zur TIMP-1-induzierten Lebermetastasierung – erste Ergebnisse.
- Abbildung 5-20: Anstieg der TIMP-1-Expression v.a. in Metastasen im Verlauf der Metastasierung.
- Abbildung 5-21: Zunahme der HGF-Proteinmenge, aber nicht der HGF-RNA im Verlauf der Metastasierung im L-CI.5s-Modell.
- Abbildung 5-22: Im Verlauf der Metastasierung im L-CI.5s-Modell zunehmend in die Leber infiltrierende Neutrophile Granulozyten akkumulieren in Metastasen.
-
- Tabelle 4-1: Zusammensetzung der Erythrozyten-Lyselösung
- Tabelle 4-2: Zusammensetzung der für die X-Gal-Färbung benötigten Lösungen
- Tabelle 4-3: Für die Immunhistochemie auf Paraffinschnitten verwendete Antikörper
- Tabelle 4-4: Für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz auf Kryoschnitten verwendet Antikörper
- Tabelle 4-5: für die *In-situ*-Hybridisierung benötigte Reagenzien und Lösungen
- Tabelle 4-6: Zellkulturmedien für die verwendeten Zelllinien
- Tabelle 4-7: Für die Inkubation mit rekombinantem TIMP-1 verwendete Zelldichten und eingesetzte TIMP-1-Konzentrationen
- Tabelle 4-8: Für die Aufreinigung von Adenoviren verwendete Lösungen
- Tabelle 4-9: Für Westernblots verwendete Antikörper

7.3 Abkürzungsverzeichnis

AEC	Aminoethylcarbazol
Ad	Adenovirus
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
anti-PMN	gegen PMNs gerichtetes Antiserum
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BSA	bovines Serum-Albumin
CAIX	Carboanhydrase-IX
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy-DNA</i>
CPE	<i>cytopathic effect</i> , zytopathischer Effekt
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4'-6-Diamidin-2'-phenylindol
DMEM	<i>Dulbeccos modified Eagles Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
EDTA	Ethandiamintetraacetat
4E-BP	eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor-4E-bindendes Protein
E-cadherin	<i>epithelial cadherin</i>
eIF-4E	eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor-4E
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i>
EPA	<i>erythroid-potentiating activity</i>
EPO	Erythropoietin
EZM	extrazelluläre Matrix
EGF	<i>epidermal growth factor</i> ; epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FIH	<i>factor inhibiting HIF</i>
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glukosetransporter
HEK	<i>human embryonic kidney cell</i> ; humane embryonale Nierenzellen
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> , Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HIF	hypoxia-inducible factor
HRE	<i>hypoxia response element</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
hu	human

IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenous
LOX	<i>lysyl oxidase</i>
M	molar
MAP-Kinase	mitogen-activated protein kinase; Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDSC	<i>myeloid cell-derived suppressor cells</i>
MEM	<i>modified Eagles medium</i>
MET	<i>mesenchymal-epithelial transition factor</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPO	Myeloperoxidase
MSC	<i>mesenchymal stem cell</i>
MT-MMP	Membran-Typ-Matrix-Metalloproteinase
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mu	murin
NOS	NO-Synthase
n.s.	nicht signifikant
NT	<i>non target</i>
PAS	Per-Arnt-Sim
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
pfu	<i>plaque forming units</i>
PHD	<i>prolylhydroxylase domain protein</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMN	<i>polymorphonuclear neutrophil granulocyte</i> ; polymorphkerniger Neutrophiler Granulozyt
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor-1</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SF	<i>scatter factor</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small inhibitory RNA</i>
S6K	S6-Kinase
SPH	<i>serin protease homology</i>
SV	<i>simian virus</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer

TAM	<i>tumor-associated macrophage</i> ; Tumor-assoziiierter Makrophage
TBS	<i>Tris[®]-buffered saline</i>
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF-α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
tPA	<i>tissue-type plasminogen activator</i>
TZ	Tumorzellen
U	Umdrehungen
uPA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i> , Urokinase
uPAR	<i>urokinase-type plasminogen activator receptor</i> , Urokinase-Rezeptor
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGF-R	VEGF-Rezeptor
VHL	Von-Hippel-Lindau
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Achim Krüger** für die Bereitstellung des äußerst interessanten Themas, für die Möglichkeit, die Untersuchungen in seinem Labor durchführen zu können und die stets intensive Betreuung. Herr Prof. Dr. Krüger stand jederzeit als kritischer Gesprächspartner zur Verfügung und trug nicht zuletzt dadurch dazu bei, dass ich mich während meiner Zeit in seiner Gruppe nicht nur fachlich weiterentwickeln konnte. Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Krüger für seine praktische Unterstützung bei den Tierversuchen bedanken, z.B. für zahlreiche Tumorzell- und Virusinokulationen, die häufig auch am Wochenende stattfanden.

Bei Frau **Prof. Dr. Angelika Vollmar** (LMU München, Department Pharmazie, Zentrum für Pharmaforschung) bedanke ich mich ganz herzlich für die Übernahme der Fachvertretung und ihre stets große Hilfsbereitschaft. Darüber hinaus danke ich Frau Prof. Dr. Vollmar auch dafür, dass sie mich als Gast so freundlich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen hat, was ich in zahlreichen Gruppenseminaren erfahren konnte. Dieser Dank gilt auch allen ihren Mitarbeitern.

Herrn **Prof. Dr. Franz Bracher**, Herrn **PD Dr. Manfred Ogris**, Herrn **Prof. Dr. Ernst Wagner** und Herrn **PD Dr. Stefan Zahler** (alle LMU München, Department Pharmazie) danke ich ganz herzlich für ihre spontane Bereitschaft, sich als Mitglieder der Promotionskommission zur Verfügung zu stellen.

Herrn **Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher** gilt mein Dank für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München durchzuführen.

Herrn **PD Dr. med. Hana Algül** (TU München, II. Medizinische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar) danke ich für das Protokoll und viele wertvolle Informationen zur Antikörper-vermittelten Depletion Neutrophiler Granulozyten und seiner Mitarbeiterin **Karen Dlubatz** für zahlreiche praktische Tipps zur Durchführung.

Frau **Prof. Dr. med. Agnes Görlach** (TU München, Klinik für Kinderkardiologie, Deutsches Herzzentrum München) danke ich für die Möglichkeit, Versuche in ihrem Labor durchzuführen, und Frau **Kerstin Diemer** für die Einführung in die Benutzung der Hypoxiewerkbank und für viele praktische Tipps bei der Durchführung von Hypoxieexperimenten.

Frau **Dr. Charlotte Kopitz** möchte ich für die Einführung in die Methoden der Adenovirologie sowie der *In-vitro*-Inkubationen mit rekombinantem TIMP-1 danken, für zahlreiche fruchtbare Diskussionen und Anregungen, ihre große Unterstützung bei der Durchführung diverser Tierversuche und nicht zuletzt für ihre Untersuchungen zum Einfluss von TIMP-1 auf die Invasion von L-CI.5s-Zellen sowie zur prometastatischen Wirkung von TIMP-1, auf denen diese Arbeit aufbaut.

Frau **Dr. Susanne Schaten** danke ich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit und die Einarbeitung in alle Methoden der Immunhistochemie sowie für ihre Unterstützung bei zahlreichen Färbungen, insbesondere der TIMP-1-*in-situ*-Hybridisierung.

Herrn **Florian Schelter** möchte ich für die vielfache Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche, die Etablierung der HIF-1 α -*knock-down*-Zelllinien, welche ich für meine Untersuchungen verwenden konnte, und zahlreiche hilfreiche Diskussionen danken.

Herrn **Dr. Michael Gerg** danke für die Einarbeitung in die TaqManTM-Analyse und zahlreiche Anregungen.

Bei Herrn **Florian Schrözlmaier** bedanke ich mich besonders für die kritische Überarbeitung des Manuskriptes der Erstautorenpublikation, in der Teile dieser Arbeit zusammengefasst sind. Auch die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen und die stets gute Zusammenarbeit werden mir angenehm in Erinnerung bleiben. Darüber hinaus danke ich Herrn Schrözlmaier auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit und viele nützliche Hinweise.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau **Stephanie Hauser** für die freundschaftliche Zusammenarbeit, ihre unerschöpfliche Hilfsbereitschaft, unzählige konstruktive Diskussionen, ihre stete Unterstützung und nicht zuletzt für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei **Frau Katja Honert** bedanke ich mich für die Einarbeitung in die Methoden der Zellkultur und viele weitere Techniken. Frau Katja Honert und **Frau Mareike Lehnhoff** danke ich für ihre wertvolle Unterstützung bei vielen Versuchen.

Frau **Ulrike Brüning-Rossow** danke ich für die gute Zusammenarbeit und wichtige Experimente im Rahmen der Untersuchung des Beitrags Neutrophiler Granulozyten zur TIMP-1-induzierten Metastasierung, insbesondere die Analyse des Einflusses von TIMP-1 auf die Infiltration von Neutrophilen in die Leber.

Frau **Dr. Martina Anton** danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft und zahlreiche nützliche Tipps und Informationen v.a. zu adenoviralen und molekularbiologischen Methoden.

Allen anderen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung sowie den Mitarbeitern des Zentrums für Präklinische Forschung am Klinikum rechts der Isar der TU München danke ich für ihre kollegiale Unterstützung, die stets gute Zusammenarbeit und das sehr angenehme Arbeitsklima. Für die angenehme Arbeitsatmosphäre in der Trogerstraße 4a danke ich stellvertretend für alle Mitarbeiter der dort ansässigen Arbeitsgruppen Frau **Ann Reckhenrich** und Frau **Ursula Hopfner**.

All meinen **Freunden**, insbesondere Stephanie, Hendrik, Andreas, Christian, Anne, Miriam und Matthias sowie meinen **Geschwistern** Clemens und Barbara danke ich für ihr Verständnis und ihre Ermunterungen.

Besonders möchte ich auch **Martin** danken, der mir vor allem in der Endphase der Doktorarbeit liebevollen Rückhalt gab und durch dessen Verständnis mir vieles erleichtert wurde. Auch für das Korrekturlesen gilt ihm mein herzlicher Dank.

Meinen lieben **Eltern** danke ich für ihre unschätzbare, jederzeit und in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung, durch die mir Studium und auch Doktorarbeit erst möglich wurden.

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Halbgewachs
 Vorname: Birgit
 Geburtsdatum und -ort: 09.02.1979, Karlsruhe
 Familienstand: ledig
 Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1985 – 1989 Grundschole in Karlsruhe
 1989 – 1998 Bismarckgymnasium Karlsruhe
 06/ 1998 Allgemeine Hochschulreife

Studium:

02/ 1999 – 09/ 1999 Studium der Biochemie an der Universität Tübingen
 10/ 1999 – 04/ 2004 Studium der Pharmazie an der Universität Heidelberg
 04/ 2002 1. Staatsexamen
 04/ 2004 2. Staatsexamen
 06/ 2005 3. Staatsexamen
 06/ 2005 Approbation als Apothekerin

Famulatur und Praktika:

03/ 2000 Rosen-Apotheke Karlsruhe
 03/ 2001 Apotheke des Städtischen Klinikums Karlsruhe
 03/ 2002 – 04/ 2002 Universität Heidelberg, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Arbeitsgruppe PD Dr. Ralf Kinscherf
 05/ 2004 – 10/ 2004 Aventis Pharma Deutschland GmbH, Abteilung DI&A Cardiovascular, Therapeutisches Department Herzkreislauf, Sektion Molekularbiologie, Arbeitsgruppe Dr. Jochen Huber
 11/ 2004 – 04/ 2005 Europa-Apotheke Mannheim

Berufserfahrung:

08/ 2005 – 02/ 2006 Max-Planck-Institut für Biochemie Martinsried, Abteilung Molekulare Medizin, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Reinhard Fässler
 03/ 2006 - 05/ 2006 Jagdfeld-Apotheke, Haar bei München
 06/ 2006 – 08/ 2009 Institut für experimentelle Onkologie und Therapiefor- schung, Klinikum rechts der Isar der Technischen Uni- versität München, Arbeitsgruppe Prof. Dr. rer. nat. Achim Krüger