

Untersuchung von Kandidatengenenen als mögliche Angriffspunkte einer gezielten Krebstherapie

Dissertation

der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität in München
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

Vorgelegt von

Ute Krebs
aus München

Martinsried 2008

1. Gutachter: PD Dr. Angelika Böttger
2. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Eick
Sondergutachter: Prof. Dr. Axel Ullrich

Tag der mündlichen Prüfung: 28. August 2008

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Der Mechanismus der Apoptose	1
1.2	Die Rolle der Apoptose in Krebszellen	6
1.3	Gezielte Krebstherapie im Vergleich zu konventioneller Chemotherapie	9
1.4	Selektion von Apoptose-insensitiven Krebszellen als Modellsystem zur Suche nach Kandidatengenenen	14
1.5	Matrix-Metalloproteinasen	19
1.6	Zielsetzung der Arbeit	25
2	MATERIAL UND METHODEN	26
2.1	Bezugsquellennachweis	26
2.1.1	Chemikalien	26
2.1.2	Enzyme	27
2.1.3	„Kits“ und sonstige Materialien	28
2.1.4	Wachstumsfaktoren und Liganden	29
2.1.5	Zelllinien	29
2.1.6	Zellkulturmedien	31
2.1.7	Bakterienstämme	32
2.1.8	Medien für <i>E. coli</i> -Bakterien	32
2.1.9	Puffer und Stammlösungen	33
2.1.10	Antikörper	37
2.1.11	Plasmide und Oligonukleotide	39
2.1.12	Computerprogramme	41
2.2	Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen	41
2.2.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	41
2.2.2	Mykoplasmen-Test	41
2.2.3	Kalziumphosphat-Transfektion	42
2.2.4	Transfektion mit anderen Methoden	43
2.2.5	Retroviraler Gentransfer in Säugerzellen (Infektion)	43

2.2.6	Generierung monoklonaler Zelllinien.....	43
2.3	Molekularbiologische Methoden	44
2.3.1	Plasmidpräparation für analytische Zwecke	44
2.3.2	Plasmidpräparation für präparative Zwecke	44
2.3.3	Enzymatische Behandlung von DNA	44
2.3.3.1	Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen	44
2.3.3.2	Dephosphorylierung von 5´-Enden	44
2.3.3.3	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	45
2.3.4	Herstellung von Expressionskonstrukten.....	45
2.3.5	Mutagenese.....	47
2.3.6	Gelelektrophorese	48
2.3.7	Isolierung von DNA-Fragmenten	48
2.3.8	DNA-Transfer in <i>E. coli</i> -Bakterien	49
2.3.8.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....	49
2.3.8.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....	49
2.3.9	Sequenzierung von DNA.....	49
2.3.10	Isolierung von RNA.....	50
2.3.11	Konzentrationsbestimmung von RNA	50
2.3.12	cDNA-Synthese	50
2.3.13	Makroarray-Analyse	51
2.3.13.1	Konstruktion der cDNA-Arrays	51
2.3.13.2	Prähybridisierung der cDNA-Arrays	52
2.3.13.3	Radioaktive Markierung der cDNA.....	52
2.3.13.4	Hybridisation	53
2.3.13.5	Waschen der cDNA-Arrays	54
2.3.13.6	Auswertung der cDNA-Arrays	54
2.3.14	Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	56
2.4	Zellbiochemische und zellbiologische Methoden	59
2.4.1	Bestimmung der Wachstumsrate	59
2.4.2	Nachweis der Caspase-Aktivität	60
2.4.3	Durchflusszytometrie	61

2.4.3.1	Bestimmung der Apoptose-Rate	62
2.4.3.2	Zelloberflächenfärbung	64
2.4.4	Focus Formation Assay	65
2.5	Proteinanalytische Methoden	65
2.5.1	Triton X-100 Lyse von Zellen	65
2.5.2	Proteinbestimmung	66
2.5.3	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	67
2.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	67
2.5.5	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran	69
2.5.6	Ponceau S-Färbung der Nitrozellulosemembran	70
2.5.7	Immundetektion von Proteinen (Immunoblotanalyse, Western Blot).....	70
2.5.8	Coomassie-Färbung	72
2.6	Antikörperherstellung	72
3	ERGEBNISSE.....	73
3.1	Validierung der Kandidatengene in BT-20	74
3.1.1	Untersuchungen zur Heterogenität der Zelllinie BT-20.....	74
3.1.2	Validierung der differentiellen Expression mit sqRT-PCR	76
3.1.3	Funktionelle Validierung durch Knock-down Experimente.....	80
3.2	Charakterisierung eines validierten Kandidatengens: MMP-15	84
3.2.1	Untersuchung des Effektes von monoklonalen MMP-15-Antikörpern auf die Apoptose in CH-11-insensitiven HeLaS3-Klonen	84
3.2.1.1	Herstellung des Antigens für die Generierung monoklonaler MMP- 15 Antikörper	85
3.2.1.2	Test der Hybridoma-Überstände.....	89
3.2.1.3	Effekt kommerzieller Antikörper auf HeLaS3-Klone	91
3.2.2	Funktionelle Untersuchung von MMP-15 in verschiedenen Zellsystemen nach Überexpression	92
3.2.2.1	Verwendete MMP-15 Konstrukte.....	92
3.2.2.2	MMP-15 in Rat-1	93
3.2.2.3	MMP-15 in Brustkrebszellen	101
3.2.2.4	MMP-15 in HEK293.....	105

3.2.2.5	MMP-15 in HeLaS3	110
4	DISKUSSION	113
4.1	Chemoresistenzmechanismen	113
4.2	MMPs als Angriffspunkte einer gezielten Krebstherapie.....	125
5	ZUSAMMENFASSUNG	135
6	LITERATUR.....	137
7	ABKÜRZUNGEN.....	150
8	DANKSAGUNG.....	153

1 EINLEITUNG

1.1 Der Mechanismus der Apoptose

Im Jahre 1972 beschrieben Kerr et al. eine Reihe genau definierter morphologischer Veränderungen in absterbenden Zellen und nannten diesen Prozess Apoptose. Dieser Ausdruck begründet sich in der Ähnlichkeit zwischen der Freisetzung apoptotischer Körperchen von sterbenden Zellen mit herabfallenden Blättern eines Laubbaumes, was im griechischen „apoptosis“ genannt wird (Kerr et al., 1972). Diese Form des „programmierten Zelltods“ wurde während der Evolution bei der Entwicklung der Metazoa nötig, um überflüssige, beschädigte oder infizierte Zellen in einem mehrzelligen Organismus gezielt entfernen zu können. Dadurch wird der Organismus als Ganzes geschützt und die Verschwendung von Ressourcen vermieden.

Die Schlüsselemente der Apoptose sind die nukleosomale Fragmentierung durch Endonukleasen, die umfassende Proteolyse durch Caspasen (Cystein-abhängige *Aspartyl-spezifische Proteasen*) und die Markierung der Zelloberfläche für die Phagozytose. Dadurch wird eine für die Apoptose bestimmte Zelle innerhalb kürzester Zeit in einen metabolisch inaktiven Zellkörper verwandelt, der seine DNA nicht mehr vervielfältigen kann. Außerdem werden die Zellüberreste durch Phagozytose aufgenommen, um potentiell schädliche Substanzen aus dem Zellinneren nicht dem Immunsystem auszusetzen (Letai, 2008).

Apoptose ist essentiell für Prozesse wie die Embryogenese, die Homöostase in Gewebeverbänden und die Abwehr von Krankheitserregern. Daher haben Störungen oder Fehlfunktionen des Apoptose-Mechanismus schwerwiegende Folgen für den Organismus und können im Menschen verschiedene Krankheiten auslösen (Cory & Adams, 2002). Dazu zählen unter anderem die Entstehung von Krebs oder Autoimmunkrankheiten. In diesen Fällen haben die Zellen die Fähigkeit, die Apoptose auszulösen, verloren. Es gibt aber auch Zellen, die fälschlicherweise durch Apoptose sterben. Dies wird als Ursache für

einige Symptome des Herzinfarktes, sowie bei der Alzheimer- und Parkinsonkrankheit, der Osteoporose und bei speziellen Netzhautdegenerationen vermutet (Höffeler, 2004).

Initiierung der Apoptose

Es gibt zwei gut charakterisierte Apoptose-Signalwege, die durch unterschiedliche Faktoren ausgelöst werden, aber in einen gemeinsamen Teil der Signalkaskade zusammenlaufen: sowohl über den extrinsischen als auch den intrinsischen Weg werden die Effektor-Caspasen aktiviert (siehe Abbildung 1).

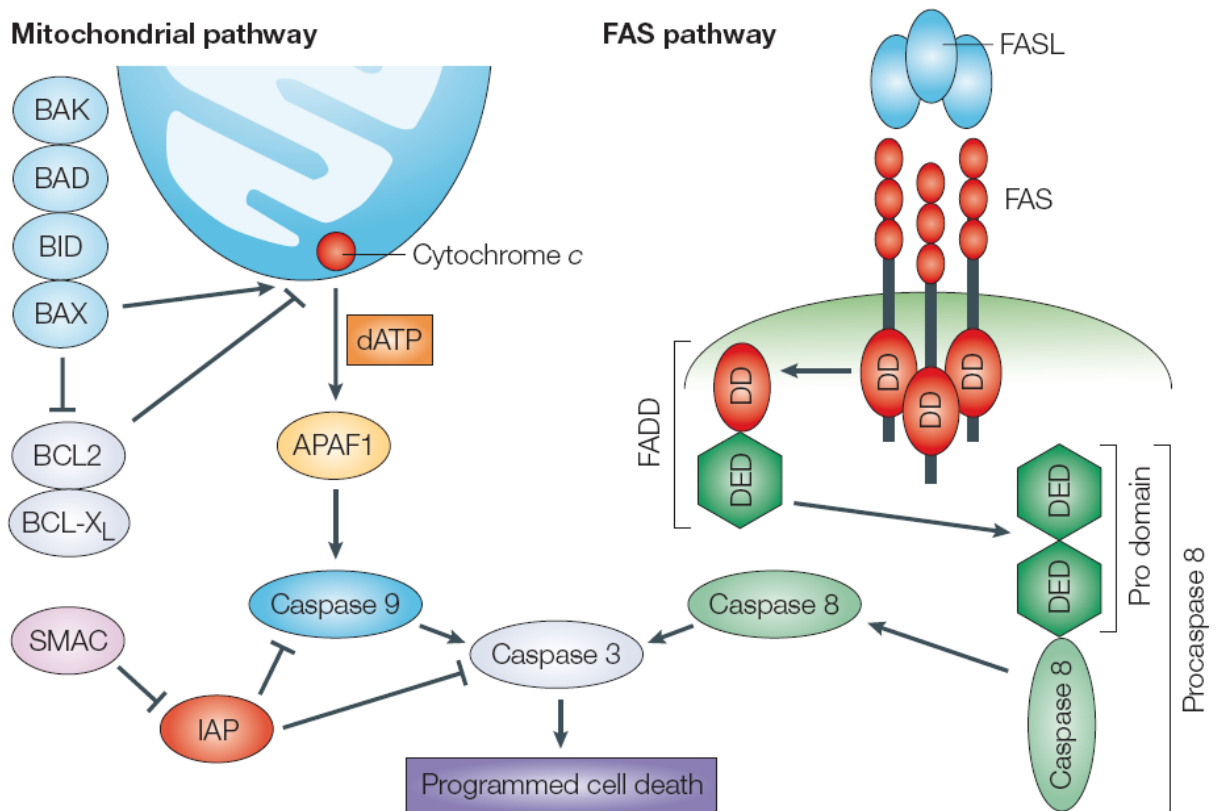


ABBILDUNG 1: VEREINFACHTE DARSTELLUNG DER BEIDEN HAUPT-SIGNALWEGE DER APOPTOSE (ABB. AUS (FESIK, 2005))

DER INTRINSISCHE SIGNALWEG (ÜBER DIE MITOCHONDRIEN, LINKE SEITE) FÜHRT NACH SIGNALLEN AUS DEM INNEREN DER ZELLE ZUR AKTIVIERUNG DER EFFEKTORCASPASEN (CASPASE 3), DER EXTRINSISCHE SIGNALWEG (ÜBER TODESREZEPTOREN WIE DEN FAS-REZEPTOR, RECHTE SEITE) WIRD DURCH EXTRAZELLULÄRE LIGANDEN AUSGELÖST.

APAF-1: APOPTOTIC PROTEASE-ACTIVATING FACTOR 1, dATP: 2'-DESOXYADENOSIN- 5'-TRIPHOSPHAT, BAK, BAD, BID, BAX: PRO-APOPTOTISCHE MITGLIEDER DER BCL2-FAMILIE, BCL2, BCL-X_L: ANTI-APOPTISCHE FAMILIENMITGLIEDER. DED: DEATH EFFECTOR DOMAIN, DD: DEATH DOMAIN, FADD: FAS-ASSOCIATED DEATH DOMAIN, FASL: FAS LIGAND, IAP: INHIBITOR OF APOPTOSIS, SMAC: SECOND MITOCHONDRIA-DERIVED ACTIVATOR OF CASPASE.

Die **extrinsische** Auslösung der Apoptose erfolgt über die Aktivierung der sogenannten Todesrezeptoren (TNFR1 (Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1), TRAILR1 (*TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1*) oder Fas) durch deren Liganden (TNF, TRAIL, FasL) (Nagata, 1999). Die Rezeptoren sind permanent in der Plasmamembran vorhanden und trimerisieren nach Bindung ihrer konstitutiv trimeren Liganden. Der trimere Rezeptorkomplex rekrutiert aus dem Zytosol weitere Faktoren wie FADD (*Fas-associating protein with death domain*) und Caspase-8 und es bildet sich der oligomere Komplex DISC (*death-inducing signalling complex*) (Peter & Kramer, 2003). Die Bildung des DISC-Komplexes führt zur Aktivierung der Initiatorcaspase (Caspase-8), die dann wiederum eine Effektorcaspase (Caspase-3) spaltet und aktiviert.

Der **intrinsische** Weg wird durch Signale aus dem Inneren der Zelle und über die Mitochondrien vermittelt (Riedl & Shi, 2004; Wang, 2001). Zu diesen Signalen gehören Schäden in der DNA, das Fehlen von Wachstumsfaktoren, die Aktivierung von Onkogenen, Störungen in Signaltransduktionswegen oder dem Netzwerk der Mikrotubuli. Als Reaktion auf derartige Ereignisse wird eine Untergruppe der BCL2-Proteinfamilie (*BH3-only activators*) aktiviert, zu denen BID (*BH3-interacting domain death agonist*) gehört und die als „zelluläre Wächter“ über die Apoptose gelten. Diese wiederum können die Aktivierung einer weiteren Untergruppe von BCL2-Proteinen induzieren: BAX (*BCL2-associated X protein*) und BAK (*BCL2-antagonist/killer*), deren Aktivierung essentiell für die Apoptose über den intrinsischen Weg ist. In der aktivierten Konformation kann BAX in die Mitochondrien-Membran integrieren und BAK sowie BAX bilden dort Homo-Oligomere. Diese Oligomere tragen zur Bildung von Poren in der äußeren Mitochondrien-Membran bei, was zur Freisetzung verschiedener Moleküle aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Zytoplasma führt. Dazu zählen Cytochrom c, SMAC/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low isoelectric point*), Endonuklease G und andere proapoptotische Proteine. (Letai, 2008). Durch diese Permeabilisierung der Mitochondrien-Membran wird die Aktivierung der Procaspase-9 durch das Apoptosom möglich. Das Apoptosom ist ein Komplex, der Apaf-1 (*apoptotic peptidase/protease activating factor-1*) und Cytochrom c enthält (Adams & Cory, 2002; Shi, 2002). Die im Apoptosom enthaltenen Apaf-1-Moleküle (insgesamt 7) liegen als inaktive Vorstufen im Zytoplasma vor und werden für die Apoptose durch das aus den

Mitochondrien freigesetzte Cytochrom c gebunden und aktiviert (Li et al., 1997). Aktivierte Caspase-9, die vergleichbar der Caspase-8 des extrinsischen Weges eine Initiatorcaspase ist, kann ebenfalls die Effektorcaspase, Caspase-3, aktivieren.

Regulation der Apoptose

Ob es wirklich zur Permeabilisierung der Mitochondrien-Membran kommt, die als Punkt gilt, ab dem die Zelle endgültig für die Apoptose bestimmt ist, wird allerdings von weiteren Proteinen der **BCL2-Familie** beeinflusst. Neben den bisher genannten Mitgliedern gibt es noch eine Untergruppe von antiapoptotischen Proteinen, unter anderem BCL2 (*B-cell CLL/Lymphoma 2*) und BCL-X_L. Sie können vor der Oligomerisierung von BAX und BAK eingreifen und die Einleitung der Apoptose verhindern. Obwohl sie auch direkt die aktivierte Form von BAX und BAK binden können, scheint der wichtigere Mechanismus ihrer antiapoptotischen Funktion in der Bindung und damit Blockierung der *BH3-only activators* (BID und BIM (*BCL2 interacting mediator of death*)) zu liegen, bevor diese BAX und BAK aktivieren können. Der Gegenpol dazu sind weitere proapoptotische BCL2-Proteine, die *BH3-only sensitizer* wie BAD (*BCL2 antagonist of cell death*). Sie können zwar BAX und BAK nicht direkt aktivieren, aber deren Aktivierung unterstützen, indem sie an antiapoptotische BCL2-Proteine binden und sie damit „wegfangen“. Letztendlich entscheidet das Gleichgewicht von pro- und antiapoptotischen BCL2-Proteinen über die Ausführung der Apoptose auf dem intrinsischen Weg ((Letai, 2008), siehe auch Abbildung 2).

Neben der Regulation über die Proteine der BCL2-Familie gibt es zwei weitere Mechanismen, die die Auslösung der Apoptose kontrollieren. Analog der BCL2-Proteine für den intrinsischen Weg können **FLIPs** (*FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme-like protease (FLICE/caspase-8)-inhibitory proteins*) in die Aktivierung über den extrinsischen Weg eingreifen. Da sie strukturell homolog zur Procaspase-8 sind, aber nicht über deren katalytische Aktivität verfügen, können sie an den DISC-Komplex binden, diesen damit blockieren und die Aktivierung der Caspase-8 verhindern.

Die dritte Klasse der regulatorischen Proteine wirkt in beiden Apoptose-Wegen: **IAPs** (*inhibitor of apoptosis proteins*) binden und inhibieren Caspasen. In humanen Zellen wurden folgende Familienmitglieder identifiziert: XIAP (*X-chromosome-linked IAP*, auch

beschrieben als hIAP, MIHA, und BIRC4), c-IAP1 (*cellular IAP 1*, auch beschrieben als HIAP2, MIHB, und BIRC2), c-IAP2 (auch beschrieben als HIAP1, MIHC, und BIRC3), NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*, auch beschrieben als BIRC1), Survivin (auch beschrieben als TIAP und BIRC5), Apollon (auch beschrieben als Bruce und BIRC6), ML-IAP (*melanoma IAP*, auch beschrieben als KIAP, livin und BIRC7), und ILP2 (*IAP-like protein 2*, auch beschrieben als BIRC8). Die IAPs können wiederum durch das proapoptotische SMAC inhibiert werden, wenn es aus den Mitochondrien freigesetzt wurde (Igney & Krammer, 2002).

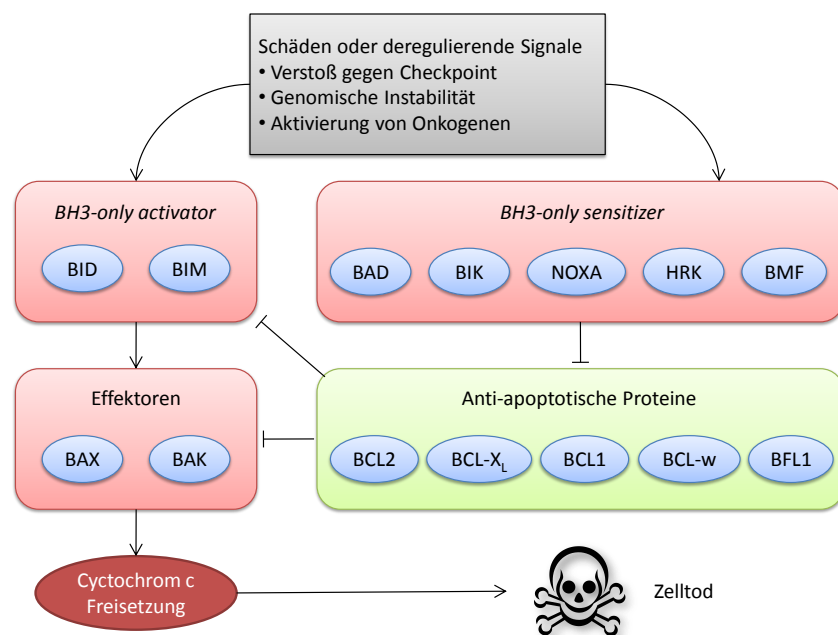


ABBILDUNG 2: MODELL DER REGULATION INTRINSISCHER APOPTOSE-INDUKTION DURCH PROTEINE DER BCL2-FAMILIE (ABB. VERÄNDERT NACH (LETAI, 2008))

BH3-ONLY ACTIVATOR: BID (*BH3-INTERACTING DOMAIN DEATH AGONIST*), BIM (*BCL2 INTERACTING MEDIATOR OF DEATH*),
BH3-ONLY SENSITIZER: BAD (*BCL2 ANTAGONIST OF CELL DEATH*), BIK (*BCL2-INTERACTING KILLER*), NOXA (LAT.: SCHÄDIGUNG), HRK (JAPAN.: *HARAKIRI*, FORM DER RITUELLEN SELBSTTÖTUNG), BMF (*BCL2-MODIFYING FACTOR*),
EFFEKTOREN: BAX (*BCL2-ASSOCIATED X PROTEIN*), BAK (*BCL2-ANTAGONIST/KILLER*),
ANTI-APOPTOTISCHE PROTEINE: BCL2 (*B-CELL CLL/LYMPHOMA 2*), BCL-X_L (*BCL2-RELATED PROTEIN X, ISOFORM L*), BCL1 (*B-CELL CLL/LYMPHOMA 1*), BCL-W (*B-CELL CLL/LYMPHOMA-W*), BFL-1 (*BCL2 HOMOLOG, ISOLIERT AUS FETALER LEBER*).

1.2 Die Rolle der Apoptose in Krebszellen

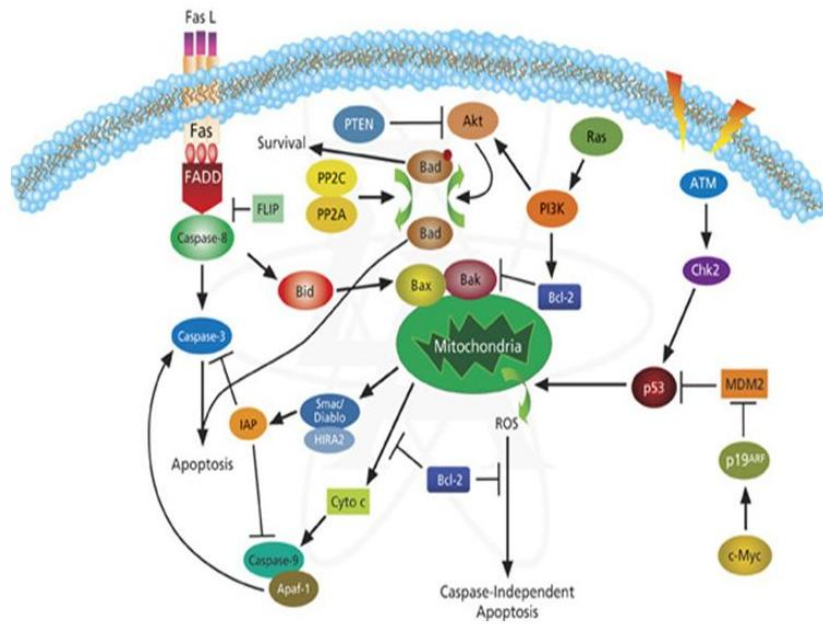
Der erste Hinweis auf die Bedeutung der Apoptose in Krebserkrankungen ergab sich durch die Entdeckung, dass BCL2, das durch eine Chromosomentranslokation im folliculären Lymphom konstitutiv exprimiert wird, der Zelle Überlebenssignale vermittelt und damit die Tumorentwicklung unterstützt (Vaux et al., 1988). Inzwischen ist allgemein anerkannt, dass die Verhinderung von Apoptose ein kritischer Schritt in der Krebsentstehung ist. Vermutlich werden normalerweise die meisten Zellen, deren Kontrolle des Zellzyklus durch onkogene Mutationen gestört ist, durch Apoptose entfernt. Der Verlust der Apoptose kann nicht nur diese präneoplastischen Zellen erhalten, sondern auch solche mit Mutationen, die die Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren aufheben, das Ausbrechen aus normalen Gewebeverbänden ermöglichen und die Metastasierung an andere Orte fördern (Adams & Cory, 2007). Außerdem können beschädigte oder deregulierte Zellen, die sonst durch das Immunsystem erkannt und entfernt werden würden, auf diese Weise der körpereigenen Tumorabwehr entgehen (Igney & Krammer, 2002; Owen-Schaub, 2002).

Wie essentiell die Verhinderung von Apoptose für Krebszellen ist, zeigt sich in der Vielfalt der Mechanismen, die in verschiedenen Krebsarten gefunden wurden (siehe Abbildung 3). Nahezu jede bislang bekannte Komponente in Apoptose-induzierenden oder -regulierenden Signalwegen wird durch unterschiedliche Störungen beeinflusst. Dazu gehören die Aktivierung von antiapoptotischen Signalen durch Überexpression oder aktivierende Mutationen sowie die Inhibition proapoptotischer Signale durch Verlust der Expression bzw. inaktivierende Mutationen.

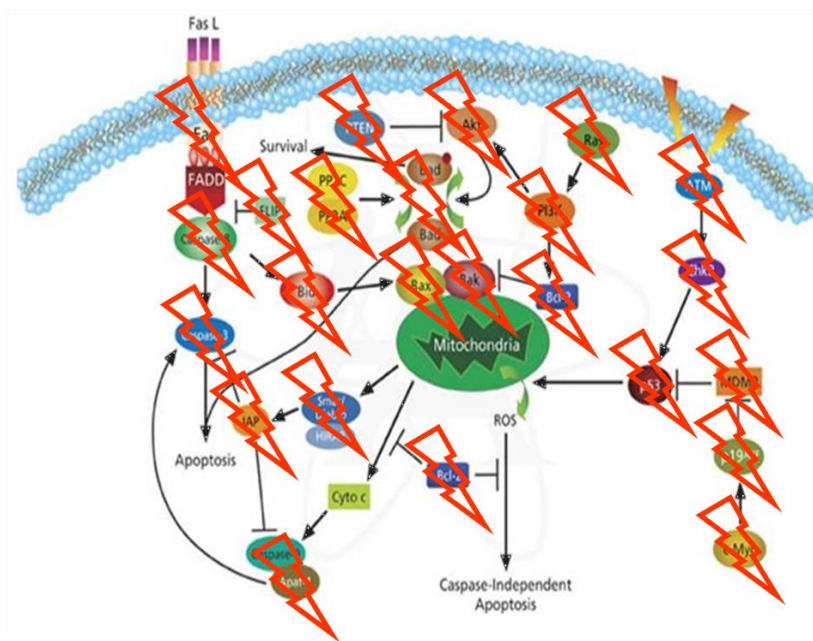
Neben der bereits genannten Überexpression von BCL2 gibt es auch Hinweise, dass die Tumor-assoziierten Viren Epstein-Barr-Virus und der humane Herpesvirus 8 durch die antiapoptotische Funktion ihrer BCL2-Homologe zur Tumorbildung beitragen. Andere Beispiele für die Überexpression antiapoptotischer Proteine sind MCL1 (*myeloid cell leukaemia sequence 1*) in Leukämien oder FLIP in Melanomen. Ebenfalls zu dieser Art der Apoptose-Inhibition ist die Expression löslicher Todesrezeptoren zu zählen. Sie dienen

als „Köder“ für die Liganden und können damit die Auslösung der Apoptose über den extrinsischen Signalweg verhindern.

Als Strategien zur Stilllegung proapoptotischer Signale wurde unter anderem die Inaktivierung des proapoptotischen Proteins BAX durch Mutationen beschrieben (Frameshift, der zum Verlust der Expression führt bzw. Punktmutationen, die zum Verlust der Funktion führen). Einige Studien in Mäusen zur Rolle von BAX haben sogar dessen Funktion als Tumorsuppressor bestätigt. Im metastatischen Melanom wurde dagegen der Verlust der Apaf1-Expression, in Neuroblastomen der von Caspase-8, gefunden. In allen drei Fällen führen diese Störungen im Apoptose-Mechanismus auch zu einer Desensibilisierung gegenüber Chemotherapie (Igney & Krammer, 2002).



Signalwege der Apoptose in normalen Zellen



beschrieben als Tumorsuppressor oder Onkogen bzw. dereguliert in verschiedenen Krebsarten

ABBILDUNG 3: APOPTOSE IN KREBSZELLEN. ABBILDUNG (VERÄNDERT) VON SIGMA ALDRICH ([HTTP://WWW.SIGMAALDRICH.COM](http://www.sigmaaldrich.com))

LITERATURSTELLEN ZUR ROLLE DER EINZELNEN GENE IN KREBS: **AKT** (NICHOLSON & ANDERSON, 2002), **APAF-1** (HAJRA & LIU, 2004), **ATM** (BOULTWOOD, 2001; PROKOPKOVA ET AL., 2007), **BAD** (JEONG ET AL., 2007; LEE ET AL., 2004), **BAK + BAX + BCL2** (CHAN & YU, 2004), **BID** (YIN, 2006; ZINKEL ET AL., 2003), **CASPASE-3** (DEVARAJAN ET AL., 2002), **CASPASE-8** (SOUNG ET AL., 2005; ZHANG & FANG, 2005), **c-MYC** (BISHOP, 1982; DANG ET AL., 1999; ROBSON ET AL., 2006), **CHK2** (ANTONI ET AL., 2007), **FAS** (OWEN-SCHAUB, 2002), **FLIP** (ZHANG & FANG, 2005), **IAP** (DEVERAUX & REED, 1999; MIZUTANI ET AL., 2007; PENNATI ET AL., 2007), **MDMD2 + p53** (FESIK, 2005), **p19^{ARF}**(POMERANTZ ET AL., 1998), **PI3K** (OSAKI ET AL., 2004), **PP2A/C** (WESTERMARCK & HAHN, 2008), **PTEN** (GERICKE ET AL., 2006), **RAS** (MALUMBRES & BARBACID, 2003), **SMAC** (MIZUTANI ET AL., 2005; YOO ET AL., 2003).

1.3 Gezielte Krebstherapie im Vergleich zu konventioneller Chemotherapie

Die oben beschriebenen Mechanismen der Entwicklung von Resistenz gegen die chemotherapeutische Behandlung von Tumoren sind nur einige wenige Beispiele für einen Nachteil dieser konventionellen Art der Krebstherapie. Es ist eine Vielzahl von Resistenzmechanismen bekannt, die den Therapieerfolg verhindern oder die Therapie von Rezidiven erschweren.

Die Entwicklung der Chemotherapie war dennoch eine Erfolgsgeschichte. Vor 1960 war die 2-Jahres-Überlebensrate für die meisten malignen Erkrankungen bei Kindern unter 30 %, heute ist sie über 70 %, da fast alle malignen Tumoren und hämatologischen Systemerkrankungen im Kindesalter auf eine Behandlung mit Zytostatika ansprechen (siehe Abbildung 4, (Creutzig et al., 2003)).

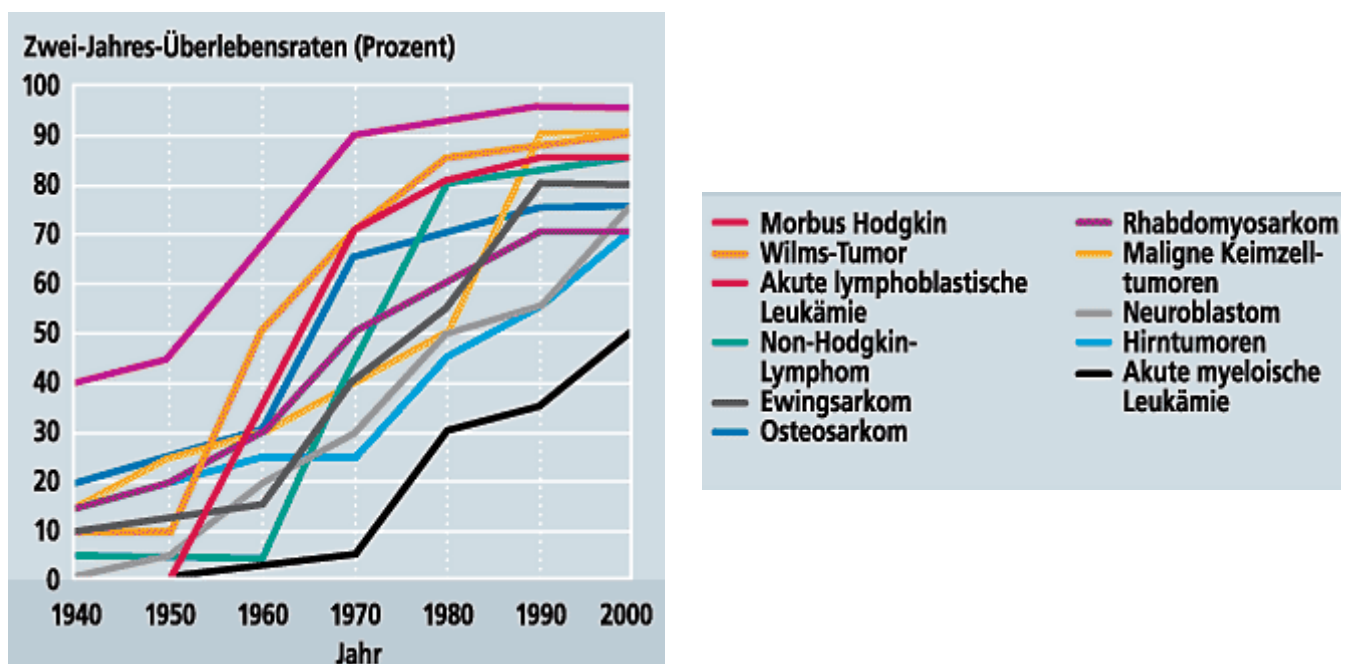


ABBILDUNG 4: ANSTIEG DER ÜBERLEBENS RATEN VON KINDERN UND JUGENDLICHEN MIT MALIGNEN ERKRANKUNGEN (ABB. AUS (CREUTZIG ET AL., 2003))

Als einer der Grundsteine der Chemotherapie gilt die Entdeckung von Salvarsan durch Paul Ehrlich (Ehrlich & Bertheim, 1912). Diese Substanz wurde auf der systematischen Suche nach einem Wirkstoff für die Behandlung von Syphilis gefunden, ausgehend von der Struktur des Atoxyls. Sie löste eine richtiggehende Euphorie aus, da Syphilis vor 100 Jahren neben der Tuberkulose und dem Alkohol als die „dritte Geißel der Menschheit“ galt. Außerdem war dies unter anderem ein Beispiel eines frühen Ansatzes des „rationalen Drug-Designs“. Ehrlich hat allerdings schon damals das Problem der Resistenzentwicklung gegen Chemotherapie beschrieben (Sörgel et al., 2004).

Die Geschichte der chemotherapeutischen Behandlung von Krebserkrankungen beginnt mit dem Einsatz von Schwefelost als Kampfstoff im Ersten Weltkrieg. Autopsie-Befunde von Soldaten, die diesem Stoff ausgesetzt waren, wiesen schwere lymphoide Hypoplasien und Knochenmarksdepressionen nach. Aufgrund von positiven Ergebnissen in Mäusen führte das zur ersten Anwendung von Stickstofflost bei einem Patienten mit fortgeschrittenem Non-Hodgkin-Lymphom, was eine vorübergehende Regression seiner Erkrankung bewirkte. Damit war das Prinzip etabliert, dass systemisch verabreichte Wirkstoffe zur Tumorregression führen können. Als in darauffolgenden Studien der Wirkmechanismus der Alkylierung von DNA aufgeklärt wurde und dass Tumorzellen sensitiver auf derartige Stoffe reagieren, wurde gezielt nach weiteren derartigen Wirkstoffen geforscht. Die später entwickelten Alkylantien wie Cyclophosphamid wurden Teil der Standardtherapie verschiedener Krebserkrankungen. Doch auch bei dieser Wirkstoffklasse zeichneten sich schon früh Komplikationen durch Resistenzentwicklung ab.

Nach der Entdeckung weiterer Wirkstoffklassen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen erwiesen sich Therapien mit einer Kombination verschiedener Substanzen als am wirkungsvollsten zur Vermeidung von chemoresistenten Tumorzellen. So begann in den 60er Jahren die Anwendung der Kombinations-Chemotherapie für verschiedene Leukämien und kurz darauf der Einsatz als adjuvante Therapie nach operativer Entfernung von Brustkrebs.

Doch nicht nur die Resistenzentwicklung kann den Erfolg einer Chemotherapie mindern. Während der klinischen Weiterentwicklung stießen die Forscher auch immer wieder auf Probleme der akuten und langfristigen Toxizität, die nahezu jedes Organ des Körpers angreift. Als zu Beginn der 80er Jahre die Fortschritte bei der Suche nach neuen Wirkstoffen nachließen, wurden Stimmen laut, die neue Strategien für die Wirkstoffsuche verlangten. Durch molekulare und genetische Ansätze zur Aufklärung zellbiologischer Vorgänge wurden in dieser Zeit viele neue Signaltransduktionsnetzwerke entdeckt, die Prozesse wie Proliferation und Überlebenssignale der Zellen regulieren. Nachdem gezeigt werden konnte, dass viele dieser Netzwerke in Krebszellen grundlegend verändert sind, begannen die Forscher Mechanismen und Methoden zu entwickeln, diese molekularen Defekte in Krebszellen zu beheben. Damit wurde die Ära der „gezielten Therapie“ eingeläutet, zu dieser Zeit hauptsächlich durch kleine Biotechnologiefirmen begründet. Zu den neuen Angriffspunkten zählten Wachstumsfaktoren, Signalmoleküle, Zellzyklus-Proteine, Apoptose-regulierende Proteine und Moleküle, die die Angiogenese fördern (Chabner & Roberts, 2005).

Da es in den meisten Fällen methodisch um einiges einfacher ist, die deregulierte Aktivität eines Kandidatenproteins zu inhibieren, als eine verminderte Aktivität wieder herzustellen, beruhen viele Strategien der gezielten Therapie auf chemischer oder genetischer Inhibition von Molekülen. Die Art der chemischen Inhibition hängt unter anderem von der Lokalisation des Zielproteins ab. Proteine, die im extrazellulären Raum erreichbar sind d.h. sezerniert werden oder auf der Zelloberfläche exprimiert werden, können durch inhibitorische Antikörper blockiert werden. Zu den bekanntesten Beispielen zählen hier Trastuzumab (Herceptin®), ein monoklonaler Her2-Antikörper, der zur Therapie von Her2-überexprimierendem Brustkrebs eingesetzt wird (Slamon et al., 2001) und Rituximab (Mabthera®), ein gegen CD20 gerichteter Antikörper für die Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen (Davis et al., 2000).

Eine andere Strategie, die sich Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) bedient, benutzt diese, um Wirkstoffe zielgerichtet nur zu Tumorzellen zu transportieren. Neben Toxin-gekoppelten Antikörpern sind chimäre Proteine ein weiteres Beispiel. Sie bestehen aus einer Gen-Fusion zwischen dem GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*) und verschiedenen Wirkstoffen wie bakteriellen und proapoptischen Proteinen. Damit

konnten Adenokarzinomzellen, die Bindestellen dieses Hormons an ihrer Zelloberfläche überexprimieren, gezielt abgetötet werden (Eaveri et al., 2004).

Unabhängig von der Lokalisation des Zielproteins können *small molecule inhibitors* deren Funktion inhibieren, zu denen die Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) zählen. Zu den ersten entwickelten TKIs gehört Imatinib (Glivec®), das die Bcr-Abl Kinase inhibieren kann. Dieses Fusionsprotein, dass durch eine Chromosomen-Translokation entsteht, kommt bei 95 % der Patienten vor, die an Chronisch Myeloischer Leukämie (CML) leiden (Moen et al., 2007). Zwei der neueren TKIs sind Sutent® und Nexavar®. Bei diesen Wirkstoffen wird eine neue Strategie verfolgt: die gleichzeitige Inhibition verschiedener Zielmoleküle. Da Tyrosinkinasen in komplexen, verzweigten Netzwerken aus Signalwegen agieren, kann die Inhibition einzelner Kinasen zu einer erworbenen Resistenz führen, indem die Tumorzellen diese Blockade durch verschiedene Mechanismen umgehen. Durch die antiangiogene und antitumorogene Wirkung dieser beiden Substanzen, vermittelt über die Inhibition von u.a. VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*), PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*), KIT, RET (*rearranged during transfection*) sowie FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase-3 receptor*) konnten gute Effekte in verschiedenen Krebsarten wie GIST (Gastrointestinale Stromatumoren) und dem Nierenzellkarzinom erreicht werden. Für weitere Indikationen laufen bereits klinische Studien (Le Tourneau et al., 2008).

Neben diesen Wegen, die Zielproteine direkt zu inhibieren, gibt es auch Strategien, bereits auf der Ebene der Transkription einzugreifen. Bei der Antisense-Technologie werden *antisense oligonucleotides* (ASOs) in die Zellen eingeschleust, die komplementäre Sequenzen zur mRNA des Zielproteins enthalten. Durch die Bildung von RNA-Doppelsträngen wird die Spaltung und der Abbau dieser mRNA induziert und die Expression so verhindert. Zu den Zielgenen, für die Studien mit ASOs durchgeführt wurden und werden, gehören BCL2 und PKC α (Wacheck & Zangemeister-Wittke, 2006).

Eine Übersicht einiger Wirkstoffe bzw. Substanzen, die direkt den Mechanismus der Apoptose manipulieren, ist in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführt. Dennoch geht die Suche nach neuen Kandidatengen unvermindert, wenn nicht durch erste Erfolge beflügelt sogar noch verstärkt weiter, um die Therapie ständig zu verbessern.

TABELLE 1: KLINISCHE ENTWICKLUNG VON WIRKSTOFFEN, DIE AUF ANTI-APOPTOTISCHE PROTEINE WIRKEN (TAB. AUS (LETAI, 2008))

Drug	Company	Clinical phase	Function	Additional comments
ABT-263	Abbott Laboratories	Phase I and I/II a clinical trials in NHL, CLL and SCLC	BH3 mimetic, targets BCL2, BCL-X _L , BCL-w	ABT-263 is an orally available compound closely related to ABT-737
Obatoclax (GX15-070)	Gemin X	Multiple phase I and phase II clinical trials in haematological malignancies and non-small cell lung cancer	BH3 mimetic	Might be a pan-inhibitor of anti-apoptotic proteins
Oblimersen (G3139)	Genta	Many clinical trials including phase III in melanoma and CLL	Antisense DNA targeting <i>BCL2</i>	None
AT-101	Ascenta Therapeutics	Phase II clinical trials in a variety of cancers	BH3 mimetic	AT-101 is the (-) enantiomer of gossypol

BH, BCL2 homology; CLL, chronic lymphocytic leukaemia; NHL, non-Hodgkin lymphoma; SCLC, small-cell lung cancer.

TABELLE 2: STATUS VON APOPTOSE-INDUZIERENDEN SUBSTANZEN (TAB. AUS (FESIK, 2005))

Compound	Company	Status
Anti-TRAILR1 agonistic antibody	Human Genome Sciences/ Cambridge Antibody Technology/ Takeda	Phase I and II trials initiated for solid tumours
Anti-TRAILR2 agonistic antibody	Human Genome Sciences/ Cambridge Antibody Technology	Phase I studies initiated in the United Kingdom and the United States
TRAIL	Genentech/Amgen	Phase I studies initiated in solid tumours
Oblimersen/Genasense (antisense oligonucleotide targeting <i>BCL2</i>)	Genta Inc.	Failed to meet primary end-point in phase III trial in malignant melanoma and multiple myeloma, phase III clinical trial and pre-registration in CLL
SPC-2096 (antisense oligonucleotide targeting <i>BCL2</i>)	Santaris Pharma	Phase I/II in CLL in Europe
AT 101((-)-Gossypol)	Ascenta Therapeutics Inc.	Phase I in CLL
Small-molecule BCL2-family inhibitor	Gemin X Biotech	Phase I in CLL
ABT-737 (small-molecule BCL2-family inhibitor)	Abbott Laboratories/Fizer (Idun)	Preclinical
IPI-983L/IPI-194 (small-molecule BCL2-family inhibitors)	Infinity Pharmaceuticals	Preclinical
XIAP-BIR2 inhibitor	Burnham Institute	Preclinical
XIAP-BIR3 inhibitor	UT Southwestern	Preclinical
XIAP-BIR3 inhibitor	Abbott Laboratories	Preclinical
Nutlins (MDM2 inhibitors)	Wyeth	Preclinical

BIR, baculovirus IAP repeat; CLL, chronic lymphocytic leukaemia; TNF, tumour-necrosis factor; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand; XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis protein.

1.4 Selektion von Apoptose-insensitiven Krebszellen als Modellsystem zur Suche nach Kandidatengen

Auf der Suche nach geeigneten Kandidatengen, die als Angriffspunkte einer gezielten Krebstherapie in Frage kommen, haben sich verschiedene Strategien entwickelt. Die Aufklärung der Mechanismen von Krebsentstehung, Tumorprogression, Wirkung bisheriger Substanzen und der Entwicklung von Resistenzen liefert die Grundlage und Voraussetzung für die Identifizierung von Kandidatengen. In Kombination mit Studien zur Deregulation dieser Mechanismen in verschiedenen Krebsarten kann man Hinweise darauf erlangen, an welcher Stelle ein Tumor am ehesten „verwundbar“ ist.

Die technologische Weiterentwicklung der letzten Jahre brachte Hochdurchsatz-Analysen hervor, mit denen in Studien versucht wird, Änderungen der Expression auf der Ebene von Genen (*Genomics*) und Proteinen (*Proteomics*) oder genetische Variationen (*genetic association*) mit der Erkrankung Krebs zu korrelieren (siehe Abbildung 5, (Lindsay, 2003)). Klinische Studien zur Erstellung von krebspezifischen Expressionsprofilen mittels DNA-Mikroarrays sind zum Beispiel in der online-Datenbank *Oncomine* zusammengefasst und die Daten können für die Studien-übergreifende Suche nach Biomarkern und Kandidatengen herangezogen werden (<http://www.oncomine.org>). Beispiele für die Suche nach tumorspezifischen Mutationen sind unter anderem Studien in Brustkrebs und kolorektalen Tumoren (Sjoblom et al., 2006b) oder in verschiedenen Krebszelllinien (Ruhe et al., 2007). Durch die Aufklärung des RNA-Interferenz-Mechanismus und der erfolgreichen Umsetzung in eine Methode zur selektiven Reduktion der Expression einzelner Gene (Elbashir et al., 2002) wurden außerdem RNAi-Screens ermöglicht, die direkt den funktionellen Einfluss der untersuchten Gene auf zelluläre Prozesse wie Proliferation und Apoptose nach Knock-down untersuchen (Berns et al., 2004; MacKeigan et al., 2005; Ngo et al., 2006).

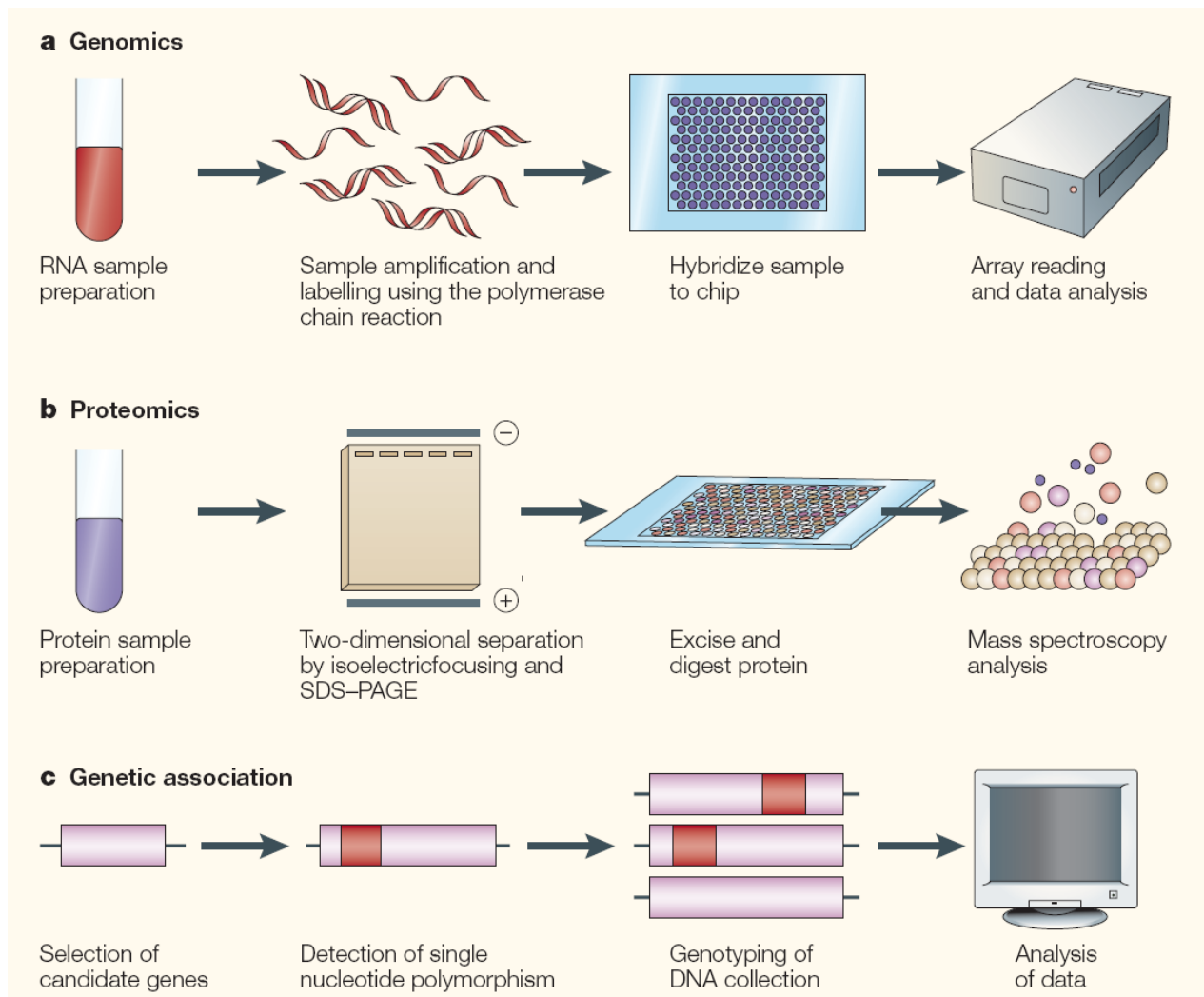


ABBILDUNG 5: METHODEN ZUR IDENTIFIZIERUNG NEUER KANDIDATENGENE (ABB. AUS (LINDSAY, 2003)

TECHNOLOGIEN WIE DIE DER GENOMIK (A), PROTEOMIK (B) UND DER GENETISCHEN ASSOZIATION (C) VERSUCHEN NEUE KANDIDATENGENE ZU FINDEN, INDEM SIE DIE DIFFERENTIELLE EXPRESSION VON mRNA, PROTEINEN ODER GENETISCHER POYLMORPHISMEN BESTIMMEN UND GESUNDE MIT ERKRANKTEN PROBEN VERGLEICHEN. SDS-PAGE: *SODIUM DODECYL SULPHATE-POLYACRYLAMID GEL ELEKTROPHORESE*.

Viele Studien, die Expressionsprofile von Krebszellen mit gesunden Zellen bzw. resistenten Krebszellen vergleichen, werden mit Patientenproben durchgeführt. Dies hat auf der einen Seite den Vorteil, dass es die tatsächliche Situation des Tumors im Organismus wiedergibt. Der Nachteil bei der Untersuchung von Gewebe mit DNA-Mikroarrays ist allerdings, dass die Unterschiede der Expressionsprofile innerhalb des Tumorgewebes, die durch die Heterogenität eines Tumors aus vielen individuell unterschiedlichen Krebszellen und Zelltypen bedingt ist, nicht ausreichend berücksichtigt

werden kann. Zur Aufklärung des komplexen Vorgangs der Resistenzbildung wäre es aber interessant, die individuellen Strategien der einzelnen Krebszellen, ausgehend von einem gleichen Genotyp, zu untersuchen. Dies kann durch eine Simulation der Resistenzbildung im Zellkulturmodell erreicht werden, da etablierte Krebszelllinien durch einen gewissen Genotyp charakterisiert sind (Dirks et al., 2005). Dennoch gibt es Hinweise darauf, dass in kultivierten Zelllinien verschiedene Subklone vorhanden sind, die sich durch die genetische Instabilität der Tumorzellen über die Zeit der Kultivierung ausbilden können. In einer Untersuchung von Leukämie-Zelllinien konnte das anhand der DNA-Fingerprint-Methode nachgewiesen werden (Parson et al., 2005). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Erstellung von Genexpressionsprofilen monoklonaler Subzelllinien der Ausgangszelllinie BT-20 (siehe Ergebnisse, Seite 74). Durch Anwendung eines Selektionsdrucks können diejenigen Subklone isoliert werden, die diesen Bedingungen am besten angepasst sind und dem Selektionsdruck „entkommen“ können. Diese Strategie konnte bereits 1990 von Hudziak et al. bestätigt werden, indem sie NIH3T3 Fibroblasten mit Apoptose-induzierendem TNF α (Tumornekrosefaktor α) selektioniert haben. In den selektionierten Klonen konnte eine Amplifikation des met-Onkogens als möglicher Mechanismus der Apoptose-Resistenz gefunden werden (Hudziak et al., 1990).

Zur Aufklärung weiterer antiapoptotischer Mechanismen und Mechanismen der Chemoresistenz wurden in dieser Arbeitsgruppe Studien mit verschiedenen Zelllinien und unterschiedlichen Substanzen zur Apoptose-Induktion und Selektion durchgeführt. Sie folgten der Strategie, die in Abbildung 6 dargestellt ist: durch Selektion in einer Krebszelllinie wurden resistente Klone isoliert, die durch Genexpressionsprofil-Analyse untersucht wurden. Die durch Vergleich mit der Ausgangszelllinie identifizierten differentiell exprimierten Gene stellen Kandidaten für die weitere Analyse Apoptose-relevanter Mechanismen dar. Zwei dieser Projekte sollen näher dargestellt werden, da sie die Grundlage dieser Arbeit bilden.

Selektion mit verschiedenen Chemotherapeutika in der Brustkrebszelllinie BT-20

Im Rahmen der dieser Arbeit vorausgegangenen Diplomarbeit (Richter, 2005) wurde die Brustkrebszelllinie BT-20 untersucht. Zur Analyse von Chemoresistenzmechanismen wurde diese Zelllinie mit drei verschiedenen Chemotherapeutika behandelt, die in der Behandlung von Brustkrebs eingesetzt werden: Doxorubicin, Taxotere® und Cyclophosphamid (Mano & Awada, 2004). Mit jeder Substanz wurden Klone selektioniert und solche mit verminderter Apoptose-Sensitivität mittels cDNA-Makroarray Analyse untersucht. Unter den Genen, die eine in den insensitiven Klonen erhöhte Expression zeigten, waren 6 Gene, die nach Selektion mit jedem der drei Chemotherapeutika stärker exprimiert wurden (siehe Ergebnisse, Abbildung 14, Seite 76). Da die drei Substanzen durch unterschiedliche Wirkmechanismen Apoptose auslösen (Doxorubicin ist ein Anthrazyklin und wirkt auf die DNA und Topoisomerase II, Taxotere® ist ein Mitosehemmer und stabilisiert Mikrotubuli, Cyclophosphamid wirkt alkylierend auf DNA und Proteine, (Holland, 2003)), sollten diese Gene weiter untersucht werden, um generellere Aspekte der Apoptose-Resistenz aufzuklären.

Selektion mit α -Fas-Antikörper in der Zervix-Karzinomzelllinie HeLaS3

In der Doktorarbeit von Reimar Abraham (Abraham, 2002) wurden Apoptose-Resistenzmechanismen in der Zelllinie HeLaS3 untersucht. Dafür wurden die Zellen mit einem agonistischen Fas-Antikörper (CH-11) selektioniert, der Apoptose über die Aktivierung des Todesrezeptors Fas auslösen kann. Unter den Genen, die eine erhöhte Expression in den insensitiven Klonen zeigten, war die Matrix-Metalloproteinase MMP-15. Weiterführende Analysen konnten MMP-15 als antiapoptotischen Faktor identifizieren (Abraham et al., 2005). Dazu gehörten unter anderem die funktionelle Validierung durch Knock-down Experimente in den resistenten Klonen, was einen Anstieg der Apoptose-Rate nach Inkubation mit dem Antikörper CH-11 zur Folge hatte. Dies war der erste Hinweis für eine Rolle von MMP-15 in der Apoptose und bietet die Grundlage für weitere Untersuchungen zu MMP-15 als möglichem Angriffspunkt einer gezielten, Apoptose-induzierenden Krebstherapie. Zu der bisher beschriebenen Funktion der Familie der Matrix-Metalloproteinasen im Allgemeinen und MMP-15 im Speziellen im folgenden Kapitel.

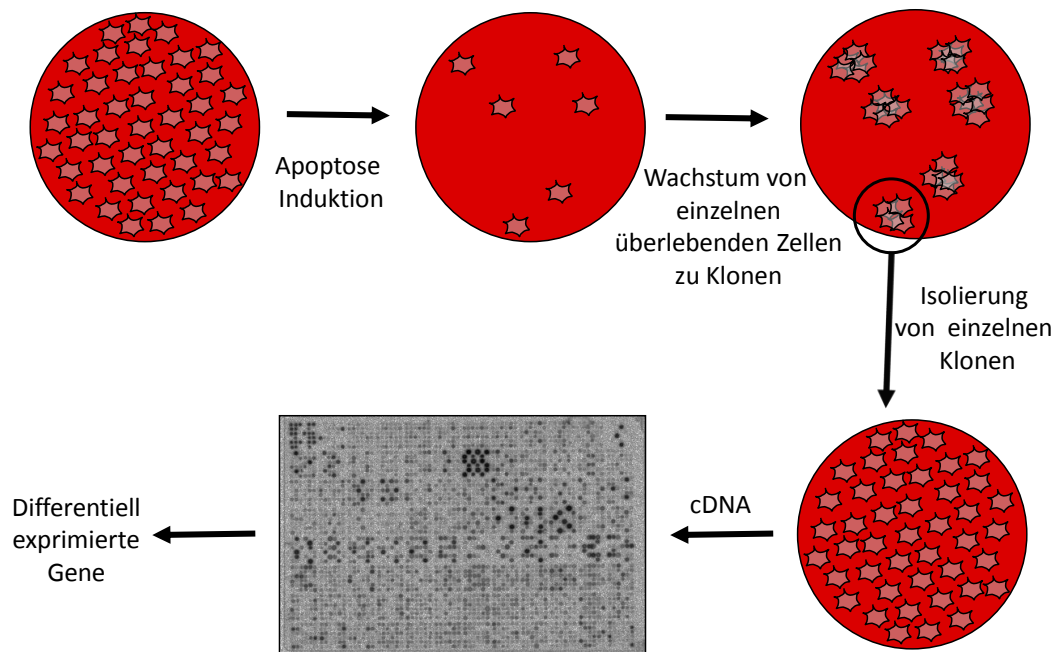


ABBILDUNG 6: STRATEGIE ZUR SUCHE NACH APOPTOSE-RELEVANTEN KANDIDATENGENEN

EINE KREBSZELLINIE WIRD MIT EINER APOPTOSE-INDUZIERENDEN SUBSTANZ IN EINER DOSIS BEHANDELT, SO DASS NUR EINZELNE ZELLEN ÜBERLEBEN. DIE SO ISOLIERTEN INSENSITIVEN KLONE KÖNNEN MITTELS cDNA-MAKROARRAYS UNTERSUCHT WERDEN, UM IM VERGLEICH ZUR SENSITIVEREN AUSGANGSZELLINIE DIFFERENTIELL EXPRIMIERTE GENE ZU IDENTIFIZIEREN.

1.5 Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) wurden bereits vor über 25 Jahren als Kandidaten einer gezielten Therapie entdeckt. Diese Entwicklung beruhte auf der Erkenntnis, dass die drei damals bekannten MMPs, MMP-1, Stromelysin-1 (MMP-3) und Gelatinase A (MMP-2) für die Degradation der Basalmembran und Proteinen der Extrazellulären Matrix (EZM), die bei Krebszellen während der Metastasierung und Angiogenese beobachtet wurde, verantwortlich gemacht wurden (Overall & Kleinfeld, 2006).

Inzwischen sind über 20 MMPs in Säugern bekannt (siehe Abbildung 7). Sie bilden eine Familie von Zink-abhängigen Metalloendopeptidasen, die teilweise sezerniert werden und zu deren Substraten neben den Proteinen der EZM auch Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle, andere Proteinasen und Proteinase-Inhibitoren gehören (Fingleton, 2007). Dank dieses umfangreichen Substrat-Spektrums sind MMPs in zahlreichen proteolytischen Vorgängen unter normalen und pathologischen Umständen beteiligt. Zu den physiologischen Prozessen, bei denen MMPs eine Rolle spielen, gehören das Wachstum von Neuriten, Zellmigration, Knochenverlängerung, Wundheilung, Angiogenese, Ovulation, Spermienreifung, Antigen-Prozessierung und -Präsentation, die Entwicklung der Brustdrüse und die Einnistung des Embryos.

Als *drug target* wurden MMPs anfänglich wegen ihrer Beteiligung an den Vorgängen in Arthritis interessant (zusammengefasst in (Murphy & Nagase, 2008). Ebenso ist seit längerer Zeit ihre Aktivität bei Tumorinvasion und der Migration bekannt, später wurde auch eine Rolle in anderen Prozessen der Tumorprogression beschrieben (zusammengefasst in (Egeblad & Werb, 2002). Außerdem sind Zusammenhänge mit vielen weiteren Erkrankungen wie Fibrose, Glaukom, Sklerodermie, Zirrhose, Multiple Sklerose, Aorten-Aneurysma oder Infertilität gezeigt worden (Brinckerhoff & Matrisian, 2002).

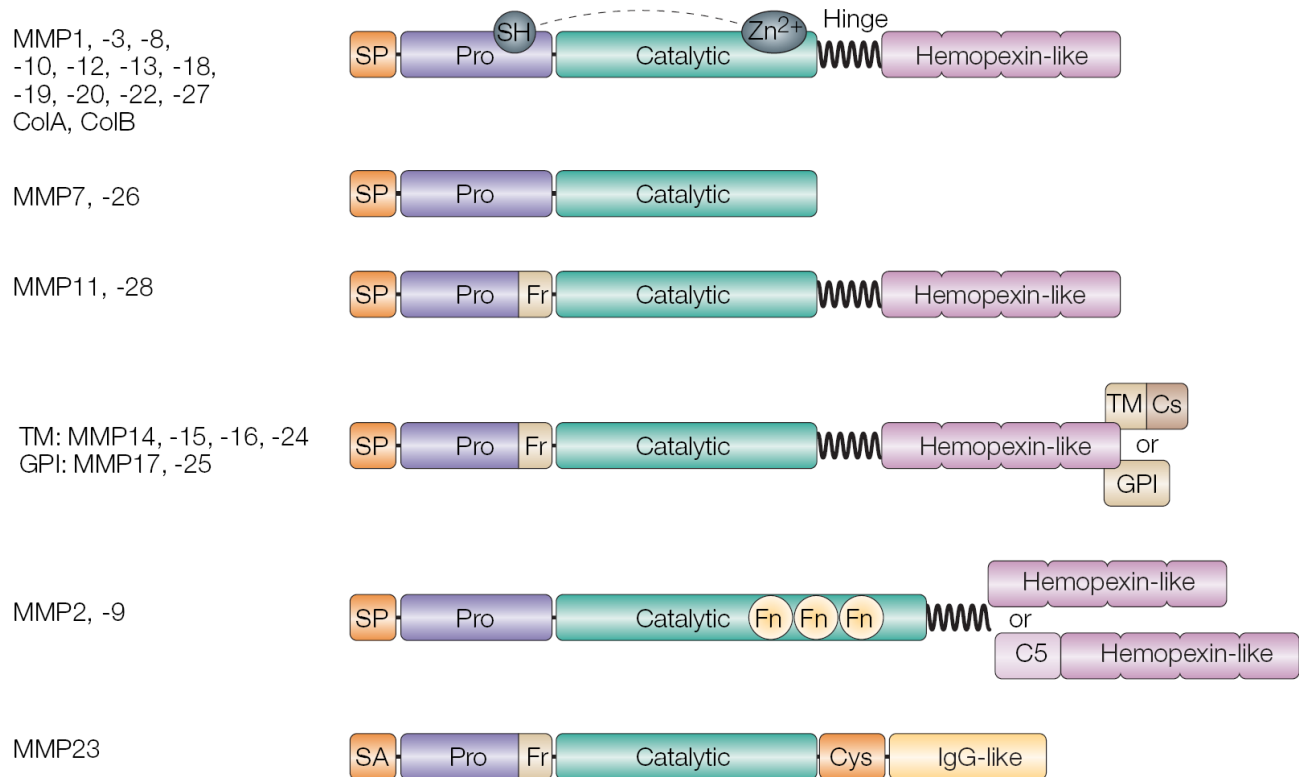


ABBILDUNG 7: ÜBERSICHT ÜBER DIE FAMILIE DER MATRIX-METALLOPROTEINASEN (ABB. AUS (PARKS ET AL., 2004))

EINTEILUNG DER MMPS NACH IHRER DOMÄNEN-STRUKTUR. C5: TYP-V-KOLLAGEN-ÄHNLICHE DOMÄNE, CATALYTIC: KATALYTISCHE DOMÄNE, COL: KOLLAGENASE-ÄHNLICHES PROTEIN, CS: ZYTOLOSISCHE DOMÄNE, CYS: CYSTEIN-REICHE REGION, FN: FIBRONECTIN-WIEDERHOLUNG, FR: FURIN-SPALTUNGSSEQUENZ, HINGE (ENGL.)= GELENK, PRO: PRODOMÄNE, SH: THIOLGRUPPE, SP: SIGNALPEPTID, ZN: ZINK.

MMPs werden als inaktive Zymogene gebildet, die proteolytisch prozessiert werden müssen, um aktiviert zu werden. Dabei wird das Propeptid abgespalten, dessen konservierter Cystein-Rest mit dem katalytischen Zink interagiert und damit das katalytische Zentrum blockiert (*cystein switch mechanism*). Diese Aktivierung kann durch Proteasen und andere MMPs oder durch verschiedene chemische Substanzen erfolgen. Einige MMPs, darunter auch die membrangebundenen MT-MMPs (*membrane-type MMP*), werden intrazellulär durch Furin aktiviert (Visse & Nagase, 2003). Neben dieser Art der Regulation können aktivierte MMPs in Gewebsflüssigkeiten durch das Plasmaprotein $\alpha 2$ -Microglobulin gebunden werden. Dieser Komplex wird von *scavenger receptors* erkannt und nach Endozytose abgebaut (Baker et al., 2002). Außerdem gibt es eine Familie endogener MMP-Inhibitoren, die Timps (*tissue inhibitor of metalloproteinase*).

Diese 4 Timps (Timp1–4) können einen 1:1-Komplex mit dem Zink der aktivierten katalytischen MMPs bilden und sie somit reversibel inhibieren. Allerdings wurden in der Zwischenzeit neben dieser inhibitorischen Aktivität zusätzliche Funktionen der Timps beschrieben. Beispielsweise ist Timp2 essentiell für die Aktivierung der proteolytischen Aktivität von MMP–2 über die Bildung eines trimolekularen Komplexes aus Timp2, MMP–2 und MT1–MMP (Brinckerhoff & Matrisian, 2002; Egeblad & Werb, 2002).

MMP–15 (oder MT2–MMP) wurde im Jahr 1995 identifiziert, als Will und Hinzmann eine Sequenz aus einer humanen Lungen–cDNA–Bibliothek isolierten, die große Übereinstimmungen mit der erst kurz zuvor identifizierten MMP–14–Sequenz aufwies (Sato et al., 1994; Will & Hinzmann, 1995). Sie fanden eine Expression von MMP–15 hauptsächlich in Geweben der Leber, Testis, Kolon und Darm. Außerdem konnten sie erhebliche mRNA–Mengen im Pankreas, der Niere und Lunge, dem Herz und Skelettmuskel nachweisen. Zwei Jahre später wurde das MMP–15–Gen auf Chromosom 16 lokalisiert (Mattei et al., 1997; Sato et al., 1997).

Bereits im gleichen Jahr wurde ein erster Hinweis auf eine Rolle von MMP–15 in Krebs gefunden. Ueno et al. konnten eine Expression von MMP–15 in Gewebeproben von Brustkrebspatientinnen nachweisen und beschrieben, dass drei der MT–MMPs (MT1–, MT2– und MT3–MMP) die Proform der MMP–2 aktivieren können. Für MMP–2 war bereits eine wichtige Rolle in Tumorzellen bekannt (Butler et al., 1997; Ueno et al., 1997). Obwohl es erst Zweifel gab, dass humanes MMP–15 MMP–2 aktivieren kann (Miyamori et al., 2000), wurde später gezeigt, dass MMP–15, im Gegensatz zu MMP–14/MT1–MMP, unabhängig von Timp2 MMP–2 aktivieren kann (Morrison et al., 2001; Morrison & Overall, 2006). Eine Übersicht über weitere inzwischen beschriebene Substrate von MMP–15 ist in Tabelle 3 gezeigt.

TABELLE 3: ÜBERSICHT ÜBER DAS SUBSTRAT-SPEKTRUM VON MMP-15

Substrat-Familie	Substrat	Referenz
Proteine der Extrazellulären Matrix	Aggrecan, Entaktin/Nidogen, Fibronectin, Laminin, Perlecan und Tenascin	(d'Ortho et al., 1997)
	Kollagen I	(Hotary et al., 2000)
	Fibrin	(Hotary et al., 2002)
Proteasen	ADAMTS-1 → Prozessierung	(Rodriguez-Manzaneque et al., 2000)
	proMMP-2 → Aktivierung	(Butler et al., 1997)
Adhäsionsmoleküle	CD44 → Abspaltung	(Suenaga et al., 2005)
	tTG (<i>tissue transglutaminase</i>)	(Belkin et al., 2001)
Rezeptoren	EMMPRIN (<i>extrazellulär matrix metalloproteinase inducer</i>) → Abspaltung	(Egawa et al., 2006)
	LRP (<i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>)	(Rozanov et al., 2004)
Zytokine	RANKL (<i>receptor activator of NF-kappaB ligand</i>) → Abspaltung	(Hikita et al., 2006)
	pro-TNF- α → Abspaltung	(d'Ortho et al., 1997)

Da schon früh die Beteiligung der verschiedenen MMPs in Krebs bekannt war, wurden immer wieder Expressionsstudien zu MMPs in unterschiedlichen Krebsarten durchgeführt. Tabelle 4 (Seite 24) zeigt, dass in vielen Tumoren eine erhöhte Expression von MMP-15 gefunden wurde. Dabei waren die Studien im Adenokarzinom der Lunge (Beer et al., 2002; Bhattacharjee et al., 2001; Garber et al., 2001), die mit DNA-Mikroarrays durchgeführt wurden, die mit der höchsten Probenanzahl.

Neben diesen Expressionsstudien, die oft unter dem Gesichtspunkt der Aktivierung von MMP-2 durchgeführt wurden, gibt es auch Belege für eine direkte Beteiligung von MMP-15 in tumorrelevanten Prozessen. Hotary et al. konnten in verschiedenen Studien zeigen, dass MMP-15 es Invasions-inkompetenten Zellen ermöglichen kann, Kollagen-I-Matrizes

(Hotary et al., 2000) und Fibrin-Matrizes (Hotary et al., 2002) zu penetrieren und, neben MMP-14 und -16, Krebszellen unabhängig mit der Eigenschaft versehen kann, das Gerüst der Basalmembran (BM) proteolytisch anzugreifen, die Bildung invasiver Pseudopodien auszulösen und die Transmigration zu propagieren. Dies war der erste Nachweis, dass eine Gruppe von Genprodukten den gesamten Prozess der BM-Umbildung manipulieren kann, der den karzinomatösen Phänotyp auszeichnet (Hotary et al., 2000; Hotary et al., 2006).

Eine Rolle von MMP-15 in Glioblastoma beschrieben Zhang et al. (Zhang et al., 2005). Sie konnten zeigen, dass das Chemokin SDF-1alpha (*stromal cell derived factor-1alpha*, CXCL12), dessen Rezeptor CXCR4 in verschiedenen Glioma-Zelllinien und Glioblastoma-Proben überexprimiert ist, die Expression von MMP-15 in Glioblastom-Zelllinien induzieren kann. Außerdem wurde mit SDF-1alpha die Invasion in Matrigel-beschichteten Kammern induziert, was durch einen Knock-down von MMP-15 inhibiert werden konnte. Bei in vivo Versuchen mit Mäusen, denen Glioma-Zelllinien injiziert wurden, führten Klone mit MMP-15 Knock-down zu kleineren und weniger invasiven Tumoren als Klone mit unspezifischer siRNA. Außerdem überlebten diese Mäuse länger als die, die Kontrollzellen bekommen hatten.

Die erste Untersuchung, die eine Rolle von MMP-15 in Apoptose beschrieb, war die oben beschriebene von Abraham et al. (Abraham et al., 2005). Damals konnte in den mit CH-11 selektionierten Klonen von HeLaS3, die eine verminderte Apoptose-Sensitivität zeigten, eine erhöhte Expression von MMP-15 nachgewiesen werden. Da neben dieser Überexpression auch in mehreren anderen Genen eine differentielle Expression gezeigt werden konnte, wurden zur funktionellen Validierung der Rolle von MMP-15 bei der Apoptose-Sensitivität Knock-down- und Überexpressionsexperimente durchgeführt. Der Knock-down in HeLaS3 und den insensitiven Klonen 14, 36 und 58 sowie der Brustkrebszelllinie MCF-7, der Prostatakrebszelllinie PC-3, der Lungenkrebszelllinie Calu-6 und der Melanomzelllinie Mel Juso führte nach Apoptose-Induktion mit CH-11 bzw. TRAIL zu einer erhöhten Apoptose-Rate. Nach Überexpression von MMP-15 in HeLaS3 konnte eine Abnahme der Apoptose-Rate beobachtet werden.

TABELLE 4: ÜBERSICHT ÜBER EXPRESSIONSSTUDIEN ZU MMP-15 IN VERSCHIEDENEN KREBSARTEN
 AUFGEListET SIND UNTERSUCHUNGEN, DIE EINE ERHÖHTE EXPRESSION VON MMP-15 IN KREBSZELLEN ZEIGEN

Krebsart	Referenz
Brustkrebs	Klin. Proben (Nacht et al., 1999; Ueno et al., 1997) Zelllinien (Kousidou et al., 2004; Nacht et al., 1999)
Gallengang-Karzinom	(Chiba et al., 2004)
Gehirntumoren	Glioblastom, Medulloblastom (Lampert et al., 1998), Glioblastom (Nakada et al., 1999), (Nuttall et al., 2003), Medulloblastom (Ozen et al., 2004)
Leberzellkarzinom, primäres	Zelllinien (Kim et al., 2001) Klin. Proben (Ishii et al., 2003)
Lungenkrebs	Adenokarzinom (Beer et al., 2002; Bhattacharjee et al., 2001; Garber et al., 2001; Kobayashi et al., 2004; Ohira et al., 2002) NSCLC>Adenokarzinom>normales Lungengewebe (Atkinson et al., 2007)
Melanom	(Ohnishi et al., 2001)
Nieren-Karzinom	(Kitagawa et al., 1999)
Ovarial-Karzinom	Zelllinien (Nishikawa et al., 2000) klin. Proben (Davidson et al., 2001)
Pankreas-Tumoren	(Ellenrieder et al., 2000)
Prostata-Krebs	(Riddick et al., 2005) Korrelation der MMP-15 Expression mit dem Gleason Score
Schilddrüsen-Papillom	(Nakamura et al., 1999)
Urothel-Karzinom	(Kitagawa et al., 1998)
Zervix-Karzinom	(Sheu et al., 2003)
verschiedene Krebszelllinien	(Giambernardi et al., 1998), (Nuttall et al., 2003), (Atkinson et al., 2007) MMP-15 in allen untersuchten Zelllinien

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Behandlung von Krebserkrankungen entwickelt sich stetig weiter. Nach anfänglichen Erfolgen der klassischen Chemotherapie führten die starken Nebenwirkungen und das Auftreten von Resistenzmechanismen zur Etablierung neuer Therapie-Strategien: die gezielte Manipulation von in Krebszellen relevanten Proteinen. Der Ausgangspunkt für die Entwicklung derartiger Wirkstoffe ist die Aufklärung der Mechanismen, die der Tumorentstehung und -progression sowie der Chemoresistenz zu Grunde liegen.

Die Krebsforschung der letzten Jahrzehnte verdeutlichte die entscheidende Rolle der Apoptose bei diesen Prozessen und viele der Signalwege, der beteiligten Proteine und deren Deregulation in Krebszellen wurden bereits beschrieben. Zur Identifizierung und Validierung weiterer Apoptose-relevanter Kandidatengene wurden in dieser Arbeit zwei Projekte durchgeführt, die beide auf der gleichen Strategie beruhen: die Genexpressionsanalyse von Krebszellen, welche unterschiedliche Apoptose-Sensitivität zeigen.

In der dieser Arbeit vorausgegangenen Diplomarbeit wurde die Brustkrebszelllinie BT-20 mit Chemotherapeutika behandelt, um Klone mit verringerter Apoptose-Sensitivität zu erhalten. Ziel dieser Arbeit war es, einige der in diesen Klonen stärker exprimierten Gene weiter zu validieren: die Expressionsdaten der Makroarrayanalyse durch semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion und die funktionelle Rolle dieser Gene in der Apoptose durch Knock-down Experimente.

Das zweite Projekt baut auf der Arbeit von Reimar Abraham, ehemals in dieser Arbeitsgruppe, auf. Er konnte in Klonen der Zervix-Karzinomzelllinie HeLaS3, die mit Fas-Antikörper selektiert wurden, die Matrix-Metalloproteinase MMP-15 als antiapoptotischen Faktor identifizieren. Es sollte ein inhibitorischer MMP-15-Antikörper entwickelt werden, der dessen antiapoptotische Wirkung aufheben kann. Außerdem sollte die Rolle von MMP-15 in der Apoptose näher aufgeklärt werden, um es als Kandidatengen für die gezielte Therapie weiter zu validieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) in p.a.-Qualität bezogen.

[alpha- ³³ P] Desoxyadenosintriphosphat (dATP)	Amersham (Freiburg)
Acrylamid/Bisacrylamid	National Diagnostics (USA) (30 % (w/v) / 0,8 % (w/v) ProtoGel®), Gibco-BRL (Eggenstein)
Agarose	Bio-Rad (München)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma (Taufkirchen)
Ampicillin	Sigma (Taufkirchen)
Aprotinin	Sigma (Taufkirchen)
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)	Sigma (Taufkirchen)
Chloramphenicol	Sigma (Taufkirchen)
Cholera Enterotoxin	Sigma (Taufkirchen)
Coomassie Brilliantblau G250	Merck (Darmstadt)
Cyclophosphamidmonohydrat	Sigma (Taufkirchen)
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma (Taufkirchen)
Desoxynukleotide (dNTPs)	Pharmacia (Freiburg)
Doxorubicin	Sigma (Taufkirchen)
Ethidiumbromid	Sigma (Taufkirchen)
FACS Flow	Becton Dickinson (Heidelberg)
Ficoll 400	Sigma (Taufkirchen)
G418	PAA (Cölbe)
Glutathion, reduziert	Sigma (Taufkirchen)

Hepes (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure)	Serva (Heidelberg)
Hydrokortison	Sigma (Taufkirchen)
Kanamycin	Gibco (Eggenstein)
Kristallviolett	Sigma (Taufkirchen)
L-Glutamin	Boehringer (Mannheim)
MTT	Sigma (Taufkirchen)
Natriumazid	Serva (Heidelberg)
Natriumfluorid	Sigma (Taufkirchen)
Natriumorthovanadat	Sigma (Taufkirchen)
Paclitaxel (Taxol®)	Sigma (Taufkirchen)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma (Taufkirchen)
Polyvinylpyrrolidon	Sigma (Taufkirchen)
Ponceau S	Sigma (Taufkirchen)
Propidiumiodid	Sigma (Taufkirchen)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth (Karlsruhe)
Staurosporin	Sigma (Taufkirchen)
Taxotere® (Docetaxel)	Sigma (Taufkirchen)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva (Heidelberg)
Triton X-100	Serva (Heidelberg)
Wasserstoffperoxid	Aldrich (Steinheim)

2.1.2 Enzyme

AMV Reverse Transkriptase	Roche (Penzberg)
Pfu Ultra DNA Polymerase	Stratagene (USA)
Taq DNA Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Trypsin, TPCK behandelt	Sigma (Taufkirchen)
Restriktionsenzyme	Fermentas (St. Leon-Rot)

2.1.3 „Kits“ und sonstige Materialien

AMV RT incubation buffer	Roche (Penzberg)
Cellophan-Folie	Pütz Folien (Taunusstein Wehen)
Cryo-Röhrchen	Nunclon (Dänemark)
ECL-Kit	PerkinElmer (Boston)
FastPlasmid™ Mini Kit	Eppendorf (Hamburg)
Filterpapier 3 MM	Whatman (USA)
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham (Braunschweig)
Human Cot-1 DNA	Invitrogen (Karlsruhe)
Hybridisierungsröhrchen	Hybond (USA)
Hyperfilm™ MP	Amersham (Braunschweig)
K1 und K2 Primer (CapFinder PCR synthesis Kit)	Clontech (USA)
Lipofectamin 2000™	Invitrogen (Karlsruhe)
Megaprime DNA Labelling Kit	Amersham (Freiburg)
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce (USA)
Mikroliter® Spritze	Hamilton (Bonaduz)
Mini Quick Spin DNA Columns	Roche (Mannheim)
Oligofectamine™	Invitrogen (Karlsruhe)
Parafilm	Dynatech (Denkendorf)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (USA)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Smart Ladder	Eurogentec (Seraing)
Sterilfilter 0,22 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company(USA)
Sterilfilter 0,45 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company(USA)
tRNA from baker's yeast	Roche (Mannheim)
vertikale Gelapparaturen	Atto Corporation (Japan)
Zellkulturgefäße, Plastik	Corning (New York)
	Greiner (Sulingen)
	Nunclon (Dänemark)
	Sarstedt (Nümbrecht)

2.1.4 Wachstumsfaktoren und Liganden

EGF (<i>epidermal growth factor</i>)	Sigma (Taufkirchen)
Insulin	Sigma (Taufkirchen)
TRAIL (<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>)	Prepro-Tech (London, UK)

2.1.5 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz
BT-20	<i>Homo sapiens</i> (Mensch), Mammakarzinom-Zelllinie	ATCC HTB-19
M1, M4, M7, M9	Monoklonale Subzelllinien von BT-20	neu etabliert
CXX	Mit Cyclophosphamid selektionierter Klon von BT-20	Diplomarbeit Ute Richter (Richter, 2005)
DXX	Mit Doxorubicin selektionierter Klon von BT-20	Diplomarbeit Ute Richter
TXX	Mit Taxotere® selektionierter Klon von BT-20	Diplomarbeit Ute Richter
BT-474	<i>Homo sapiens</i> (Mensch), Brustkrebszelllinie	ATCC HTB-20
Caki-1	<i>Homo sapiens</i> (Mensch), Nierenkarzinom-Zelllinie	ATCC HTB-46
HEK293	<i>Homo sapiens</i> (Mensch), embryonale Nierenzelllinie	ATCC CRL-1573

HeLaS3	<i>Homo sapiens</i> (Mensch), Zervix-Karzinomzelllinie	ATCC CCL-2.2 (Ham's F12) bzw. Abt. Molekulare Zellbiologie, MPI für Biochemie (DMEM)
--------	---	--

Klon 14, 36, 58	Mit CH-11 selektionierte Klone von HeLaS3 (Ham's F12)	Doktorarbeit Reimar Abraham (Abraham, 2002) und (Abraham et al., 2005)
-----------------	--	---

MCF10A	<i>Homo sapiens</i> (Mensch), immortalisierte Brustepithelzelllinie	ATCC CRL-10317
--------	--	----------------

NIH3T3	<i>Mus musculus</i> (Maus) Fibroblasten	ATCC CRL-1658
--------	--	---------------

Rat-1	<i>Rattus norvegicus</i> (Ratte) Fibroblasten	Roland Friedrich
-------	--	------------------

SCC-9	<i>Homo sapiens</i> (Mensch), Plattenepithelkarzinom-Zelllinie	ATCC CRL-1629
-------	---	---------------

SK-BR-3	<i>Homo sapiens</i> (Mensch), Brustkrebszelllinie	ATCC HTB-30
---------	--	-------------

Phoenix A	Amphotrophe Retrovirus produzierende Zelllinie (w/c 293T Zellen), stabil transfiziert mit einem Moloney GagPol- IRES-Lyt2 Konstrukt mit RSV Promoter, pPGK Hygromycin selektierbarem Marker und amphotrophen env Gen	Nolan Lab, Stanford
-----------	---	---------------------

Phoenix E	Ecotrophe Retrovirus produzierende Zelllinie (w/c 293T Zellen), analog Phoenix A	Nolan Lab, Stanford
-----------	--	---------------------

2.1.6 Zellkulturmedien

Fötale Kälberserum (FCS), alle Zellkultur-Medien und die dazu nötigen Zusätze wurden von der Firma Gibco (Eggenstein) bezogen.

Zelllinie	Medium	Zusätze
BT-20 und deren Klone	MEM	2 mM Glutamin 1x MEM non essential amino acids (nach Herstellerangaben) 10 % FCS
BT-474	RPMI 1640	2 mM Glutamin 10 µg/ml Insulin
Caki-1	McCoy's 5A	10 % FCS
HEK293	DMEM (4,5 mg/ml Glukose)	1 mM Natrium-Pyruvat 10 % FCS
HeLaS3 und Klon 14, 36, 58	Ham's F12	10 % FCS
HeLaS3, infiziert mit MMP-15	DMEM (4,5 mg/ml Glukose)	1 mM Natrium-Pyruvat 10 % FCS
MCF10A	DMEM (4,5 mg/ml Glukose)/Ham's F12 (1:1)	2 mM Glutamin 1 mM Natrium-Pyruvat 0,5 µg/ml Hydrokortison 15 µg/ml Insulin 20 ng/ml EGF 100 ng/ml Cholera Enterotoxin 5 % fötales Pferdeserum
NIH3T3	DMEM (4,5 mg/ml Glukose)	1 mM Natrium-Pyruvat 10 % FCS

Phoenix A/E	DMEM (4,5 mg/ml Glukose)	1 mM Natrium-Pyruvat 10 % FCS
Rat-1	DMEM (4,5 mg/ml Glukose)	1 mM Natrium-Pyruvat 5 % FCS
SCC-9	DMEM (4,5 mg/ml Glukose)/Ham's F12 (1:1)	1 mM Natrium-Pyruvat 0,4 µg/ml Hydrocortison 10 % FCS
SK-BR-3	McCoy's 5A	15 % FCS

Einfriermedium:

90 % FCS, 10 % DMSO

2.1.7 Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
DH5αF'	F' endA1 hsd17 (r _k -m _k ⁺) supE44 recA1 gyrA (Nal) thi-1 α(lacZYA-argF196)	Genentech, USA
DH10bpir116	chemically competent cells, express the π protein (pir gene product, essential for pir-dependent R6K replication origin of shRNA constructs (pSMc vector))	Openbiosystems, USA

2.1.8 Medien für *E. coli*-Bakterien

DH5αF' :	LB-Medium	1,0 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1,0 % NaCl pH 7,2
----------	-----------	--

Bei Bedarf wurden dem Medium nach dem Autoklavieren Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt.

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium 1,5 % Agar zugesetzt.

DH10bpir116:	2X-LB broth (low-salt) media	20 g/l	Pepton
		10 g/l	Hefeextrakt
		5 g/l	NaCl
		50 µg/ml	Chloramphenicol
		50 µg/ml	Kanamycin

2.1.9 Puffer und Stammlösungen

Alle anschließend aufgeführten Puffer und Lösungen wurden, falls nicht anderweitig angegeben, mit H₂O_{bidest.} angesetzt.

Aprotinin	20 µg/ml	Lagerung bei 4 °C
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	10 %	Lagerung bei 4 °C
Coomassie G250	2,5 g/l	Coomassie G250
	45 %	Methanol
	10 %	Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	40 %	Methanol
	10 %	Essigsäure
Cyclophosphamid	100 mM	frisch angesetzt in PBS
Denhardt (100x)	2,0 %	Polyvinylpyrrolidon
	2,0 %	Ficoll 400
	2,0 %	BSA

Doxorubicin	1 mM	In H ₂ O, Lagerung bei 4 °C
DNA-Auftragspuffer (6x)	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol
	30,0 %	Glycerin
	100,0 mM	EDTA pH 8,0
EDTA	0,5 M	Lagerung bei RT
FACS-Puffer	3 %	FCS in PBS
2x HEPES	140 mM	NaCl
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄
	50 mM	HEPES pH 7,05
Hybridisierungspuffer	5x	SSC
	0,1 %	SDS
Glutathion-Puffer	10 mM	Glutathion
		in 50 mM Tris-HCl pH 8,0
Kristallviolett-Färbelösung	20 %	Methanol
	5,0 g/l	Kristallviolett
Laemmli-Puffer (2x)	65,0 mM	Tris/HCL pH 6,8
	3,0 %	SDS
	30,0 %	Glycerin
	0,01 %	Bromphenolblau
	5,0 %	β-Mercaptoethanol

Lysepuffer	50,0 mM	HEPES pH 7,5
	150,0 mM	NaCl
	1,0 mM	EDTA
	10,0 %	Glycerin
	10,0 mM	Tetra-Natrium-Pyrophosphat
	1 %	Triton X-100
	100 mM	NaF
MTT-Lösung	5mg/ml	MTT-Pulver
MTT-Stop-Lösung	10 %	SDS
	5 %	Isobutanol
	0,01 M	HCl
Natriumcitrat	1 %	In H ₂ O, Lagerung bei 4 °C
Natriumorthovanadat	100 mM	Lagerung bei -20 °C
NET (10x)	500,0 mM	Tris/HCl pH 8,0
	50,0 mM	EDTA pH 8,0
	1,5 mM	NaCl
	0,5 %	Triton X-100
PBS	13,7 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PMSF	100 mM	in EtOH, Lagerung bei 4 °C
Ponceau S	2 g/l	in 2 % (w/v) Trichloressigsäure

Prä-Hybridisierungspuffer (2x)	10x	Denhardt
	10x	SSC
	100 mM	NaPO ₄ , pH 6.8
	2 mM	Na ₄ P ₂ O ₇
Propidiumiodid	2 mM	in H ₂ O, Lagerung bei 4 °C
Propidiumiodidpuffer	0,1 %	Natriumcitrat
	0,1 %	Triton X-100
	50 µg/ml	Propidiumiodid
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M	Tris/HCl pH 6,8
	0,4 %	SDS
SD-Transblot	50,0 mM	Tris/HCl pH 7,5
	40,0 mM	Glycin
	20,0 %	Methanol
	0,004 %	SDS
Strip-Lösung	62,5 mM	Tris/HCl pH 6,8
	100 mM	β-Mercaptoethanol
	2 %	SDS
TAE (10x)	400 mM	Tris
	10 mM	EDTA
	50 mM	Natriumacetat
		pH 8,0
Taxotere®	1 mM	in Ethanol, Lagerung bei 4 °C
	10 mM	verdünnt in PBS, Lagerung bei 4 °C

TE	1 mM 0,1 mM	Tris/HCl pH 7,6 EDTA pH 7,6
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M 0,4 %	Tris/HCl pH 8,8 SDS
Tris-Glycin-SDS (10x)	248,0 mM 1918,0 mM 1,0 %	Tris/HCl pH 7,5 Glycin SDS
Triton X-100	10 %	Lagerung bei RT
W1	2x 0,1 %	SSC SDS
W2	0,2x 0,1 %	SSC SDS

2.1.10 Antikörper

Antikörper	Eigenschaften	Referenz
α -Caspase-3	Polyklonal aus dem Kaninchen, anti-human/-maus/-ratte Caspase-3 full length (35 kDa) und großes Fragment nach Spaltung (17 kDa).	Cell Signaling Technologies (USA)
α -Fas (CH-11)	Monoklonal aus der Maus IgM, anti-humanes Fas, induziert Apoptose über die Aktivierung von Fas	Upstate/Millipore (USA)

Isotyp-Kontrolle-FITC (IC002F)	Maus IgG ₁ Isotyp-Kontrolle für Zelloberflächenfärbung (FACS), gekoppelt an Fluorescein	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
α -Erk1/2 (K-23)	Polyklonal aus dem Kaninchen IgG, anti-Erk2 div. Spezies, schwach auch Erk1	Santa Cruz (USA)
α -MMP-15 (MAB9161)	Monoklonal aus der Maus IgG ₁ , anti-humane MMP-15 Ectodomäne	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
α -MMP-15-FITC (IC9161F)	Wie MAB9161, aber gekoppelt an Fluorescein für Zelloberflächenfärbung (FACS)	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
α -Pink1 (ab23707)	Polyklonal aus dem Kaninchen, anti-human/-maus/-ratte Pink1, Peptid-Immunogen: AS 484-504 des hum. Pink1	Abcam plc (Cambridge, UK)
α -Tubulin (T9026)	Monoklonal aus der Maus IgG ₁ , anti- α -Tubulin div. Spezies	Sigma (Taufkirchen)

Alle bei der Immundetektion von Proteinen verwendeten sekundären Antikörper waren mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert.

Antikörper	Firma	Verdünnung
Ziege gegen Maus	Amersham (Braunschweig)	1 : 20 000
Schaf gegen Maus F(ab') ₂	Amersham (Braunschweig)	1 : 20 000
Ziege gegen Kaninchen	Bio-Rad (München)	1 : 25 000
Kaninchen gegen Schaf	Bio-Rad (München)	1 : 20 000

Für die Zelloberflächenfärbung am FACS (2.4.3.2):

Gans gegen Ratte, gekoppelt an Phycoerythrin	Jackson Immuno Research (USA)	1:100
--	-------------------------------	-------

2.1.11 Plasmide und Oligonukleotide

Ausgangsvektoren:

Vektor	Beschreibung	Referenz
pcDNA3	Eukaryotischer Expressionsvektor, Amp ^r , Neo ^r , CMV Promoter, BGH poly A, f1(+) ori	Invitrogen, (USA)
pBlueScript KS+	ColE1 ori, Amp ^r , LacZ, f1 (+) IG, SK (MKS)	Stratagene, (USA)
pLXSN	Retroviraler Expressionsvektor, Amp ^r , Neo ^r , ori from pBR322, 5'-LTR and 3'-LTR from MoMuLV, SV40 Promoter	Clontech, (USA)
pSj26(mod)	Modifizierter pcDNA3 zur Protein-expression, c-terminales GST-Epitop (aus pGEX2TK, Pharmacia) zwischen XhoI- und ApaI-Schnittstelle der <i>multiple cloning site</i>	Charles Cant, diese Arbeitsgruppe

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide:

Vektor	Beschreibung	Referenz
pSM2c- shRNA	shRNA Pink1-Konstrukte aus "Expression Arrest™ Human retroviral shRNA ^{mir} collection"	Openbiosystems, USA (Paddison et al., 2004)
pcDNA3-MMP-15	pcDNA3 mit der gesamten kodierende Region des humanen MMP-15-Gens (NM_002428, NCBI, Nt 929 bis 2980, inkl. Teil des 5'UTR) und einem c-terminalen myc/6xHis-Tag	U3 Pharma AG, (Martinsried)

Im Rahmen dieser Arbeit erstellte Plasmide (siehe 2.3.4 und 2.3.5):

Vektor	Beschreibung
pLXSN-MMP-15	pLXSN mit der gesamten kodierende Region des humanen MMP-15-Gens (NM_002428, NCBI, Nt 974 bis 2980) und einem c-terminalen myc/6xHis-Tag
pLXSN-MMP-15 E260A, pLXSN-MMP-15 D596G, pLXSN-MMP-15 G609R	pLXSN-MMP-15 mit den entsprechenden Mutationen
pcDNA3-MMP-15 E260A, pcDNA3-MMP-15 D596G, pcDNA3-MMP-15 G609R	pcDNA3-MMP-15 mit den entsprechenden Mutationen
pcDNA3-MMP-15excE260A-GST	pSj26(mod) mit dem extrazellulären Teil von MMP-15 (AS 1-625) und der angegebenen Mutation

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete siRNA Oligonukleotide:

siRNA	Beschreibung
Clusterin siRNA 1-3	Silencer® Pre-designed siRNA von Ambion, siRNA ID: 146049, 146050 und 146051
Timp2 siRNA 1-3	Silencer® Pre-designed siRNA von Ambion, siRNA ID: 118689, 118688 und 12940
Pink1 siRNA	Silencer® Validated siRNA von Ambion, siRNA ID: 1199
GL2 siRNA	Luziferase-siRNA (Negativ-Kontrolle) von Dharmacon

Alle übrigen Oligonukleotide (Primer für PCR, Mutagenese und Sequenzierung) sind in den jeweiligen Abschnitten der Methode beschrieben (2.3.4, 2.3.5, 2.3.9 und 2.3.14) und wurden von der MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

2.1.12 Computerprogramme

AIDA	Raytest (Kanada)
ArrayVision	Imaging Research (USA)
BASreader	Raytest (Kanada)
BD CellQuest™ Pro Version 4.0.2	Beckton Dickinson (USA)
DNASTar Paket (u.a. EditSeq, PrimerSelect, SeqMan)	DNASTAR, Inc. (USA)
WorklistManager Version 3.3	Beckton Dickinson (USA)

2.2 Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen

2.2.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten humanen Zellen wurden in Brutschränken (Heraeus, B5060 Ek/CO₂) bei 5–7 % CO₂, 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken (Heraeus, Laminair) ausgeführt. Alle 2–3 Tage wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt und stets vor Erreichen der Konfluenz passagiert. Das Einfrieren der Zellen erfolgte in Einfriermedium aus 90 % FCS und 10 % DMSO in Cryo-Röhrchen (Nunc). Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen schnell im Wasserbad (37 °C) aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen. Nach dem Abzentrifugieren zum Entfernen des DMSO wurde das Zellpellet in etwas Medium aufgenommen und in einer 15 cm-Kulturschale mit 15 ml Medium ausgesät.

Die Bestimmung der Zellanzahl zum Aussäen der Zellen in einer gewünschten Dichte erfolgte mit einem Coulter-Counter ZM der Firma Coulter.

2.2.2 Mykoplasmen-Test

Eine Kontamination von Zellkulturen mit Mykoplasmen, den kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryonten, beeinflusst die Expression von Zelloberflächenproteinen, die Vermittlung extrazellulärer Signale, den Stoffwechsel der Zellen sowie weitere Vorgänge und kann dadurch Versuchsergebnisse verfälschen. Zum Nachweis von Mykoplasmen

wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt. Dafür wurden die Zellen in einer 6 cm-Schale dünn ausgesät und nach 24 h mit 20 % Methanol fixiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 20 min. mit DAPI-Reagenz (2 µl auf 2 ml PBS) im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Mykoplasmen sind unter dem Fluoreszenzmikroskop als DAPI-Färbung an der Plasmamembran-Außenseite zu erkennen.

2.2.3 Kalziumphosphat-Transfektion

Zur Transfektion von HEK293-Zellen mit Plasmid-DNA hat sich eine modifizierte Kalziumphosphat-Methode bewährt, die durch eine hohe Transfektionseffizienz gekennzeichnet ist (Jordan et al., 1996). Dazu wird die DNA mit CaCl₂ und einer HEPES gepufferten Phosphatlösung präzipitiert und nach einem noch unbekanntem Mechanismus von der Zelle aufgenommen (Graham, 1973). Die DNA liegt als Trans-Genom in den Zellen vor und geht ohne Anwendung eines Selektionsverfahrens bei Zellteilung verloren (Scangos, 1981). Daraus resultiert in der sogenannten transienten Expression ein Expressionsmaximum bei 48–72 h nach der Transfektion.

Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Die Präzipitation der DNA erfolgte in folgendem Ansatz (pro 6 cm-Platte):

CaCl ₂ (2,5 M)	20 µl
DNA (1 µg/µl)	10 µl
TE	170 µl
Mischen und anschließend tropfenweise zu HEPES Lösung geben, während diese langsam auf einem Vortex geschüttelt wird	
HEPES	200 µl

Die DNA-Lösung wurde unmittelbar auf die Zellen gegeben und die Platten für 3 h bei 3 % CO₂ inkubiert. Danach erfolgte ein Medienwechsel und die weitere Inkubation bei 5–7 % CO₂.

2.2.4 Transfektion mit anderen Methoden

Zellen, bei denen eine Kalziumphosphat-Transfektion ineffizient war, wurden mit kommerziellen Transfektionsreagenzien behandelt. Die Transfektion mittels Lipofectamin 2000™ (Invitrogen) für Transfektionen mit Plasmid-DNA bzw. Oligofectamine™ (Invitrogen) für Transfektionen mit siRNA Oligonukleotiden erfolgte gemäß Herstellerangaben. Als Kontrolle wurden jeweils der leere Vektor bei Überexpression (pcDNA3) bzw. Luziferase-siRNA (GL2, Dharmacon) bei Knock-down-Experimenten transfiziert.

2.2.5 Retroviraler Gentransfer in Säugerzellen (Infektion)

Zur Infektion mit pLXSN Konstrukten wurde die Verpackungszelllinie Phoenix A für humane Zielzellen bzw. Phoenix E für Nagerzellen (NIH3T3 und Rat-1) mittels Kalziumphosphatmethode (siehe 2.2.3) mit pLXSN Konstrukten transfiziert. Nach 24 h wurde die Transfektionseffizienz der Kontroll-Transfektion mit GFP am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Der virale Überstand der übrigen Transfektionen wurde gesammelt und durch einen 45 µm Filter sterilfiltriert. Der Überstand wurde dann mit 8 µg/µl Polybren versetzt und auf die zu infizierenden Zellen gebracht. Dieser Vorgang wurde nach 4 h sowie weiteren 3 h und nochmals 3 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wiederholt. Nach erfolgter 4. Infektion wurde der letzte Überstand über Nacht auf den Zellen belassen. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen wenn erforderlich gesplittet. Die Selektion positiv infizierter Zellen erfolgte mit 2 µg/ml Puromycin, bis die nicht infizierte Kontrolle vollständig abgetötet wurde. Nach erfolgreicher Selektion standen stabil exprimierende Zellen für die entsprechenden Experimente zur Verfügung.

2.2.6 Generierung monoklonaler Zelllinien

Um aus der Zelllinie BT-20 bzw. nach Infektion einer Zelllinie monoklonale Subzelllinien herzustellen, wurden serielle Verdünnungen (z.B. 1/10, 1/100, 1/1000, je nach Zellzahl und Zelllinie) auf 15 cm Platten ausgesät, um die Zellen zu vereinzeln. Nachdem die einzelnen Zellen zu Klonen von etwa einem halben Zentimeter Durchmesser herangewachsen waren, wurden die Klone einzeln in 12-Loch-Platten überführt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Plasmidpräparation für analytische Zwecke

Kleinere Mengen an Plasmid-DNA wurden aus 2 ml *E. coli*-Kultur mit Hilfe des FastPlasmid™ Mini Kit (Eppendorf) laut Herstellerangaben präpariert.

2.3.2 Plasmidpräparation für präparative Zwecke

Für die Transfektion verschiedener Zelllinien wurden größere DNA-Mengen benötigt, deren Aufreinigung mit Hilfe des Qiagen Maxi-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

2.3.3 Enzymatische Behandlung von DNA

2.3.3.1 VERDAU VON DNA-FRAGMENTEN MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Restriktionen erfolgten in den vom Hersteller angegebenen Inkubationspuffern für 1–2 Stunden bei Temperaturoptimum des Enzyms.

2.3.3.2 DEPHOSPHORYLIERUNG VON 5´-ENDEN

Die Religation von Vektoren mit kompatiblen Enden wurde durch Dephosphorylierung ihrer 5´-Enden verhindert. 1–4 µg verdaute Vektor-DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 10–20 µl in 1x Phosphatasepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,5) nach Zugabe von 5 Units alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (1 E) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die dephosphorylierte DNA über ein Agarosegel (0,6–1 % Agarose) aufgereinigt und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit eluiert.

2.3.3.3 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN MIT T4-DNA-LIGASE

Bei der Ligation katalysiert T4-DNA-Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5´-Phosphat und einem 3´-Hydroxylende von Polynukleotiden. 20 bis 100 ng geschnittene Vektor-DNA wurden mit 2-5fachen Überschuss des zu klonierenden DNA-Fragments sowie 1 µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer (0,66 M Tris/HCl pH 7,5; 50 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 10 mM ATP) und 1 Unit T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 µl versetzt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von Bakterien verwendet.

2.3.4 Herstellung von Expressionskonstrukten

Für die Expression des MMP-15 Proteins wurde das Konstrukt pcDNA3-MMP-15, zur Verfügung gestellt von der Firma U3 Pharma AG, als Ausgangskonstrukt verwendet. Es enthält die gesamte kodierende Region des humanen MMP-15-Gens (inklusive eines Bereichs des 5'UTR) sowie einen c-terminalen myc/6xHis-Tag. Dieses Konstrukt wurde nach vollständiger Sequenzierung für die transiente Expression nach Transfektion eingesetzt.

Für die stabile Expression nach Infektion wurde das MMP-15 Insert aus diesem Konstrukt mittels **PCR (Polymerase-Kettenreaktion)** vervielfältigt. Mit dieser Methode kann ein DNA-Bereich zwischen zwei bekannten Regionen der Ausgangssequenz mithilfe einer DNA-Polymerase *in vitro* amplifiziert werden. Dies wird durch einen sich wiederholenden Zyklus aus verschiedenen Temperaturen für die Phasen Denaturierung der DNA, Hybridisierung spezifischer Oligonukleotide (Primer) an den Matrizenstrang und Synthese des komplementären Stranges durch die Verlängerung der Primer erreicht und führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung des zwischen den Primern liegenden Sequenzbereiches (Mullis, 1986).

Dabei wurden folgende Primer verwendet:

MMP-15Fwd gacgaattcgccaccatgggcagcgacccgag

MMP-15Rev tagctcgagtcaatggtgatggtgatgatgacc

Der Fwd-Primer enthält eine EcoRI-Schnittstelle (gaattc, grün), gefolgt von der Kozak-Sequenz zur Verstärkung der Initiation der Translation (Kozak, 1991) und direkt im Anschluss das Startkodon atg (rot). Der Rev-Primer enthält die 6 Kodons des His-Tag, gefolgt von dem Stop-Kodon (tca, rot) und einer XhoI-Schnittstelle (ctcgag, grün).

Die PCR wurde mit der Pfu Ultra DNA Polymerase (Stratagene) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde folgender PCR-Ansatz hergestellt:

H ₂ O	37,0 µl
10x Pfu-Puffer	5,0 µl
Primer (je Fwd + Rev, 10 pMol/µl)	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	1,0 µl
Pfu Ultra DNA Polymerase	1,0 µl
DNA (5 ng)	1,0 µl

Das verwendete PCR-Programm war:

Erste Denaturierung	2 min	95 °C
Amplifikation (30 Zyklen)	30 sek	95 °C
	30 sek	T _A (55 °C)
	2 min 10 sek	72 °C
Abschließende Synthese	10 min	72 °C
Kühlung der PCR- Produkte bis zur Entnahme	∞	4 °C

Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI verdaut (2.3.3.1) und mit dem QIAquick PCR Purification Kit laut Herstellerangaben aufgereinigt. Der Zielvektor pLXSN wurde mit denselben Enzymen verdaut, mit Gelelektrophorese (2.3.6) aufgetrennt, das Fragment aus dem Agarosegel mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt und mit alkalischer Phosphatase (2.3.3.2) behandelt. Nach Ligation des PCR-Produkts mit dem linearisierten Vektor (2.3.3.1) wurde das Produkt in *E.coli* vervielfältigt (0), das Insert vollständig sequenziert (2.3.9) und für die Transfektion der Verpackungszelllinie (2.2.5) präpariert.

Für die Expression des extrazellulären Teils des MMP-15 Proteins wurde das entsprechende Fragment (AS 1–625) mit folgenden Primern aus dem Konstrukt pLXSN-MMP-15 vervielfältigt:

MMP-15Fwd gacgaattcgccaccatgggcagcgacccgag

MMP-15excRev gtgctcgaggttcaccgtccgtgccacc

Der weitere Prozess war analog zur Herstellung des Konstrukts pLXSN-MMP-15 (siehe oben), allerdings war der Zielvektor diesmal pSj26(mod), so dass das Protein mit einem c-terminalen GST-Tag (Glutathion-S-transferase) zur Aufreinigung exprimiert wird.

2.3.5 Mutagenese

Für die Herstellung der verschiedenen Mutanten von MMP-15 (E260A, D596G, G609R) wurde der QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet. Dieser Kit für die gezielte Mutagenese beruht auf einer Verlängerung von Oligonukleotiden, die die gewünschte Mutation tragen und an die beiden komplementären Stränge des Ausgangsplasmids binden, durch die DNA-Polymerase *PfuTurbo*. Anschließend wird der Ausgangsstrang des Plasmids mit der ursprünglichen Sequenz durch das Restriktionsenzym DpnI verdaut.

Für die drei Mutationen wurden jeweils folgende Primer verwendet:

MMP-15 E260A Fwd GTGGCAGTGCATGCGCTGGGCCACGC

MMP-15 E260A Rev CCGTGGCCCAGCCCATGCACTGCCAC

MMP-15 D596G Fwd	GGGCGACGTGGGGG <u>G</u> TGGGGATGGGGAC
MMP-15 D596G Rev	CCAAAGTCCCCATCCCCA <u>C</u> CCCCCACGTCGCCCTCTG
MMP-15 G609R Fwd	CCCGGGGTCAACAAGGAC <u>A</u> GGGGCAGCCGCGTGGTG
MMP-15 G609R Rev	CACCACGCGGCTGCCCC <u>T</u> GTCCTTGTTGACCCCGGCCCAAAGTC

Die Reaktionen wurden laut den Herstellerangaben durchgeführt. Als Ausgangsplasmid diente pLXSN-MMP-15. Die korrekte Sequenz nach der Mutagenese wurde durch Sequenzierung des neuen Plasmids überprüft. Um diese Mutanten transient exprimieren zu können, wurden die Inserts wie in 2.3.4 beschrieben in den Vektor pcDNA3 umklontiert.

2.3.6 Gelelektrophorese

Doppelsträngige DNA-Moleküle im Größenbereich von 200 bp–1 kbp wurden in 1,5%igen, einzelsträngigen RNA-Moleküle im Größenbereich von 200 bp – 7 kbp in 1,0%igen horizontalen Agarosegelen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die entsprechende Agarosemenge wurde in 1xTAE aufgenommen, in der Mikrowelle aufgeköcht und zum Gießen des Gels verwendet. Der Agarose wurde nach dem Aufkochen Ethidiumbromid (3 µl/40 ml) zugesetzt. Als Laufpuffer diente 1xTAE. Die aufzutrennende DNA oder RNA wurde mit 1/5 des Volumens 6xDNA-Auftragspuffers versetzt. Als Längenmarker wurden 5 µl der Smart Ladder (Eurogentec, Seraing) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 80 Volt innerhalb von 0,5–1 Stunde.

2.3.7 Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch die Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

2.3.8 DNA-Transfer in *E. coli*-Bakterien

2.3.8.1 HERSTELLUNG KOMPETENTER *E. COLI*-BAKTERIEN

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien wurde die Methode von Chung und Miller (Chung & Miller, 1993) verwendet. Die Transformationseffizienz war größer als 5×10^6 Klone/ μg DNA.

2.3.8.2 TRANSFORMATION KOMPETENTER *E. COLI*-BAKTERIEN

Zur Transformation von *E. coli*-Bakterien wurden 10 μl des entsprechenden Ligationsansatzes verwendet. Dazu wurden 20 μl 5x KCM (500 mM KCl, 150 mM CaCl_2 , 250 mM MgCl_2), 70 μl H_2O und 100 μl kompetente, auf Eis aufgetaute Bakterien pipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert, dann mit 1000 μl LB-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Reaktionsansätze wurden kurz bei 5000 rpm abzentrifugiert, das Bakterienpellet in 200 μl LB-Medium resuspendiert und anschließend auf LB/Ampicillin-Agarplatten ausplattiert.

2.3.9 Sequenzierung von DNA

Zur Überprüfung der Sequenzen von Expressionsplasmiden wurden deren Inserts mithilfe des BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) an einem ABI 3730 Sequencer in der Core Facility des Max-Planck-Instituts für Biochemie sequenziert. Dafür wurden folgende Primer verwendet:

Für pcDNA3-Konstrukte:

pcDNA3 Fwd	cactgcttactggcttatcg
pcDNA3 Rev	tggcaactagaaggcacag

sowie für das MMP-15-Insert:

MMP-15-S1	ccgggaggaagtggaacaacc
MMP-15-S1b	cactgacctgcatggaaacaacctc
MMP-15-S2	cttcaagctgccccgaggacg
MMP-15-S2b	gccacagcctaccagcctctc

MMP-15-S3	aggtgaccgctactggctctttc
MMP-15-S3b	gcttcgcggggagatgttcg
MMP-15-S4	ggctacccaagtccatcctg
MMP-15-S4b	ctttcgagaagcgaacctggagc
MMP-15-S5b	ggtacccaagcccatcagtgtc

Für pLXSN-Konstrukte:

pLXSN Fwd	ctctcccccttgaacctc
pLXSN Rev	gactttccacaccctaactg

und oben genannte MMP-15 spezifischen Primer.

Für die shRNA-Konstrukte:

pSM2 Fwd	ctcgactagggataacagg
----------	---------------------

2.3.10 Isolierung von RNA

Für die Isolierung von RNA für die Makroarray-Analyse (2.3.13) oder sqRT-PCR (2.3.14) wurde der Kit „RNeasy“ von Qiagen laut Herstellerangaben verwendet. Die RNA wurde mit H₂O_{bidest.} eluiert.

2.3.11 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren wurde in einem Spektralphotometer (Thermo Scientific Nanodrop) bei der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm durchgeführt. Zum notwendigen Nullausgleich wurde H₂O_{bidest.} als Referenz verwendet, da die RNA in H₂O_{bidest.} resuspendiert wurde (siehe 2.3.10).

2.3.12 cDNA-Synthese

Zur Synthese der cDNA wurden ein Oligo-dT-Primer, der an das 3'-Ende von mRNA bindet (K1, Clontech Inc., USA) und ein „SMART“-Primer (Clontech Inc., USA), der an die 5'-terminale CAP-Struktur von mRNA bindet (K2), verwendet. Es erfolgte nur die Synthese

des zu der RNA komplementären DNA–Stranges. Es wurden jeweils 5 µg der totalRNA eingesetzt, nachdem die Integrität im Agarosegel überprüft wurde (siehe 2.3.6). Die RT–PCR wurde wie folgt angesetzt:

5 µg	totalRNA
Up to 10 µl	H ₂ O
1,0 µl	Primer K1
0,5 µl	Primer K2

Inkubation bei 68 °C für 2 min
abkühlen auf Eis für 10 sek

Zugabe von

4,0 µl	5x RT Puffer
2,0 µl	10 mM dNTPs
2,0 µl	AMV–RT

Inkubation bei 25 °C für 10 min, dann bei 42 °C für 60 min.

Anschließend wurde die cDNA mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt, mit 30 µl H₂O_{bidest.} eluiert und 5 µl auf einem 1 %–Agarosegel überprüft. Die cDNA wurde bei –20 °C aufbewahrt.

2.3.13 Makroarray–Analyse

2.3.13.1 KONSTRUKTION DER cDNA–ARRAYS

Die Makroarrays bestehen aus Nylonmembranen, auf die Sonden von etwa 1200 Genen aufgebracht sind. Die Sonden bestehen aus pBluescript Plasmiden, die Sequenzen der entsprechenden Gene mit einer Länge von 200 bp bis 4000 bp enthalten. Das leere Plasmid wird als Negativkontrolle auch auf die Arrays aufgebracht. Jede Gensonde ist dreimal aufgetragen und für viele Gene befinden sich zwei oder mehr Sonden mit

unterschiedlichen Sequenzen desselben Gens auf der Membran. Durch diese Mehrfachbestimmung der Expression jedes einzelnen Gens kann die Zuverlässigkeit der Daten gesteigert und der technische Fehler vermindert werden.

Das Aufbringen der Sonden auf die Nylonmembranen erfolgte mit einem GeneTAC™G3-Roboter (Genomic Solutions, USA). Durch Erhitzen der Membranen im Vakuum (80 °C für 2 h) wurden die Sonden fixiert.

Bei der Auswahl der Gene, die mit der Makroarray-Analyse untersucht werden sollten, wurde der Schwerpunkt auf Signalmoleküle gelegt, besonders Proteinkinasen und -phosphatasen. So kann, im Vergleich zu anderen Array-Systemen, die oft weit mehr Gene enthalten, die Analyse spezifisch auf die Gene des größten Interesses beschränkt werden. Ausgehend von den Daten des "Human Genome Project" wird die Anzahl der Proteinkinasen im menschlichen Genom auf ungefähr 550, die der Proteinphosphatasen, die die Aktivität der Proteinkinasen regulieren, auf 130 geschätzt (Lander et al., 2001). Auf den Arrays sind Sonden von 98 Tyrosinkinase, 429 Serin/Threoninkinase und 157 Proteinphosphatasen, so dass alle bisher identifizierten Kinasen und Phosphatasen untersucht werden.

2.3.13.2 PRÄHYBRIDISIERUNG DER cDNA-ARRAYS

Jede Membran wurde zuerst in Puffer W1 inkubiert, so dass die gesamte Membranfläche feucht war. Die Membran wurde mit 15 ml Prähybridisierungspuffer und 100 µg/ml tRNA in einer Hybridisierungsröhre verschlossen. Die Prähybridisierung erfolgte unter Rotation in einem Hybridisierungssofen (MWG-Biotech, Ebersbach) bei 68 °C ÜN.

2.3.13.3 RADIOAKTIVE MARKIERUNG DER cDNA

Die cDNA's wurden mit ³³P markiert. Dieses Radioisotop hat den Vorteil, dass es mit einer geringeren Energie strahlt und so die Hybridisierungssignale auf den Filtern deutlicher werden. Zur Markierung wurde der „Megaprime DNA Labelling Kit“ von Amersham verwendet und leicht modifiziert.

Folgender Ansatz wurde 5–10 min bei 95 °C inkubiert:

cDNA	5,0 µl
Primer (aus dem Kit, Hexanukleotide, „random primer“)	2,5 µl
H ₂ O	2,5 µl

Der Ansatz wurde für 5 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Zu diesem Mix wurden folgende Reagenzien gegeben:

dGTP	2,0 µl
dCTP	2,0 µl
dTTP	2,0 µl
Reaktionspuffer	2,5 µl
Klenow-Enzym	1,5 µl
α- ³³ P-ATP	5,0 µl (50 µCi)

Dieser Ansatz wurde für 3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit Hilfe der „mini Quick Spin DNA Columns“ von Roche aufgereinigt.

2.3.13.4 HYBRIDISATION

Die gereinigte ³³P-markierte cDNA wurde vor der Hybridisierung mit Cot-DNA (Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert. Diese DNA bindet besonders stark an repetitive Sequenzen und blockiert somit diese Sequenzen der cDNA, die sonst bei der Hybridisation mit den Arrays unspezifische Signale verursachen könnten.

Dafür wurde die aufgereinigte cDNA mit folgenden Reagenzien versetzt:

20x SSC	40 µl
10 % SDS	4 µl
Cot-DNA (1 mg/ml)	5 µl

und für 10 min bei 95 °C und anschließend für 30 min bei 68 °C inkubiert. Danach wurde der Mix ohne Temperaturverlust zu 10 ml Hybridisierungspuffer gegeben, der zuvor auf 70 °C vorgewärmt und mit 100 µg/ml tRNA (Roche) versetzt wurde. Für den Beginn der Hybridisierung wurde der Prähybridisierungspuffer auf den cDNA-Arrays ohne Temperaturverlust gegen den Hybridisierungspuffer ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte bei 68 °C und Rotation der Hybridisierungsröhren für mindestens 16 h.

2.3.13.5 WASCHEN DER cDNA-ARRAYS

Nach Entfernen des Hybridisierungspuffers wurden die Arrays in folgenden Schritten gewaschen:

Schritt	Puffer	Zeit	Temperatur
1	W1	20 min	42 °C
2	W1	20 min	42 °C
3	W2	20 min	42 °C
4	W2	60 min	65 °C

Danach wurden die Arrays mit H₂O_{bidest.} abgespült, getrocknet und auf Phosphoimagerplatten (Fuji, Japan) zwischen 48 h und 72 h exponiert.

2.3.13.6 AUSWERTUNG DER cDNA-ARRAYS

Die exponierten Phosphoimagerplatten wurden mittels eines Phosphoimagers (Fuji BAS 2500, Fuji, Japan) und der zugehörigen Software „BASreader“ (Raytest, Kanada) eingelesen. Mit dem Programm „AIDA“ (Raytest, Kanada) wurden die Bilddateien für die weitere Verarbeitung vorbereitet. Die Umsetzung der Bilddateien in verrechenbare Werte erfolgte mit dem Programm „ArrayVision“ (Imaging Research, USA). Das Programm errechnet für jeden Punkt des Arrays einen Wert, der die Stärke der Schwärzung ausdrückt. Dabei wurde von jedem Wert der unspezifische Hintergrund in der Umgebung der Punkte abgezogen. Außerdem wird jeder Punkt dem entsprechenden Gen zugeordnet. Die Daten wurden anschließend in Microsoft Excel exportiert und durch ein in der

Abteilung entwickeltes Programm ausgewertet. Abbildung 8 zeigt schematisch die schrittweise Analyse der Daten durch dieses Excel-Makro.

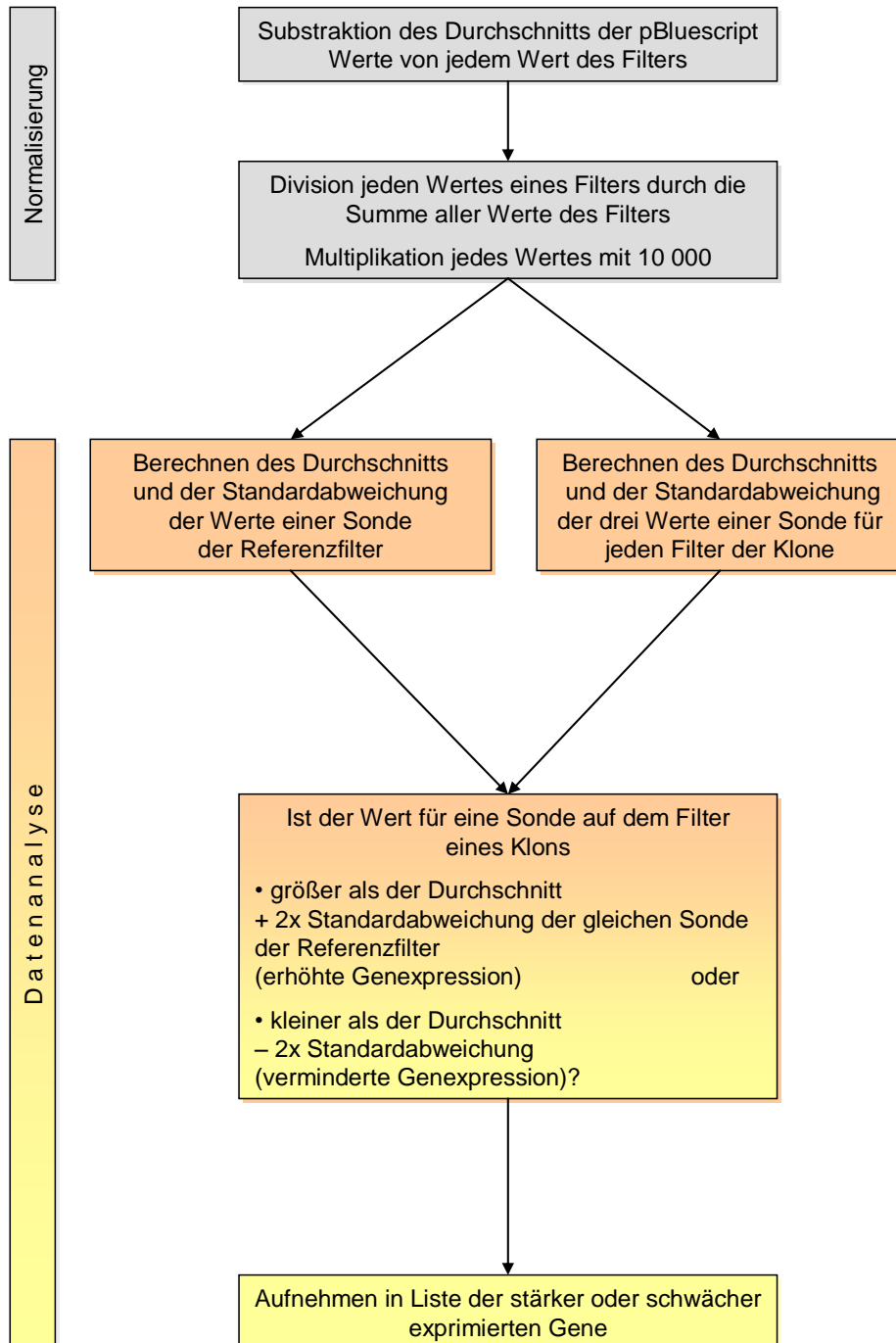


ABBILDUNG 8: SCHEMA DES AUSWERTUNGSPROGRAMMS

Dieses Makro wurde entwickelt, um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren. Für den Vergleich der monoklonalen BT-20 Zelllinien zur Ermittlung der Heterogenität wurden Werte verwendet, die an einem Zwischenschritt ausgegeben werden. In einem ersten Schritt wurde von allen Werten der Durchschnitt der Hybridisierungssignale von pBluescript auf dem jeweiligen Filter abgezogen. Dieses Plasmid ist der Leervektor, in den alle Konstrukte kloniert wurden. Auf diese Art wurde der Hintergrund, den jeder Punkt wegen unspezifischer Bindungen an den Plasmidvektor enthielt, in den weiteren Berechnungen nicht mehr berücksichtigt. Ergaben sich dabei Werte kleiner Null, so wurde der Wert Null gesetzt. Der nächste Schritt war die Normalisierung, in dem jeder Wert eines Punktes auf dem Filter durch die Summe der Werte aller Punkte desselben Filters geteilt wurde. Damit wurden die Gesamtsignalstärken der einzelnen Filter abgeglichen. Zur besseren Handhabung der Werte wurden alle Werte anschließend mit 10000 multipliziert. Diese Multiplikation veränderte das Verhältnis der Expressionsdaten nicht.

Von diesen normalisierten Werten wurde der Mittelwert der Triplikate je Sonde gebildet. Diese bilden den Ausgangspunkt für den Vergleich Referenzfilter-Klon im Fall der Identifizierung differentiell exprimierter Gene (z.B. BT-20 und insensitive Klone) und wurden auch für die Erstellung der Scatterplots zum Vergleich der monoklonalen BT-20 Zelllinien verwendet. Dafür wurden die Werte von je zwei Filtern in einem XY-Excel-Diagramm gegeneinander aufgetragen, so dass jeder Punkt einer Gensonde entspricht. Bei gleicher Expression einer Sonde auf den beiden Filtern liegt dieser Punkt auf der Winkelhalbierenden.

2.3.14 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Quantifizierung des Expressionslevels einzelner Gene können Fragmente eines Gens aus der cDNA mittels PCR vervielfältigt (siehe auch 2.3.4) und das Produkt quantifiziert werden. Diese Methode wurde zur Validierung von Makroarray-Ergebnissen mit derselben cDNA durchgeführt bzw. zur Bestimmung der Effizienz von Knock-down-Experimenten mit cDNA, die aus mit siRNA transfizierten Zellen gewonnen wurde.

Bei semiquantitativer PCR zur Bestimmung von relativen Expressionslevels muss berücksichtigt werden, dass sich die Amplifizierungsreaktion zum Zeitpunkt der Messung

in einer linearen Phase befindet. Dies wurde durch Parallelansätze erreicht, deren Reaktion nach unterschiedlicher Zyklusanzahl abgestoppt wurde.

Für die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte nach Auftrennung im Agarosegel (1,5 %) die Aufnahme mittels einer CCD-Kamera (LAS-1000, Fujifilm) und Auswertung der Banden mit der Software AIDA. Alle Reaktionen wurden dabei in Triplikaten durchgeführt und gemittelt.

Zur Normalisierung der zu vergleichenden cDNA-Proben wurde ein Fragment des *housekeeping*-Gens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) vervielfältigt und die cDNAs derartig verdünnt, dass bei gleicher Zyklusanzahl die gleiche Menge an PCR-Produkt entstand.

Die Quantifizierung des zu untersuchenden Gens wurde mit den normalisierten cDNAs durchgeführt. Dabei wurde erneut für diese PCR-Reaktion die lineare Phase der Amplifikation durch Parallelansätze mit verschiedener Zyklusanzahl bestimmt.

Es wurden folgende Primer, erstellt mit Hilfe der Software *PrimerSelect* aus dem Software-Paket DNASTar, verwendet, die jeweils ein Produkt von ca. 300bp vervielfältigen:

Gen	<i>Foward (5'→3')</i>	<i>Reverse (5'→3')</i>
Clusterin	ggccgccagcttgaggagttc	gcgtggaagttcaggggctcg
EphA2	ctatctcgagtagccaccatggagctccaggcagcccgc	cagttgtcctggctgccagacatcacg
GAPDH	accacagtccatgccatcac	tccaccaccctgttgctgta
Pim1	agaattctgccaccatgctctgtccaaaatcaactcgcttg	aggagcctaatagacgccggagaaacc
Pim2	cagcgccacctccatggtgacca	gcccaccacctgcaccactttc
Pim3	ctatctcgagttgccaccatgctgctctccaagttcggctc	gtcgctgggctgcttctctac
Plk1	agaattcagccaccatgagtgctgcagtgactgcaggaag	gggcgaggctgcggtgaatgg
Plk2	gttactcgagttgccaccatggagcttttgcggactatcac	agccaccctttcccagcacttg
Plk3	gcaccagcgcgcatcttg	tggcaggcagcgtgtagtgaacc

Gen	<i>Foward (5'→3')</i>	<i>Reverse (5'→3')</i>
Plk4	aaggatccgccaccatggcgacctgcatcggggagaag	gtgatgatctggtgcatgaagtgtcgagc
Pink1	tgaattcagccaccatggcggtgacagc	ccccaggccccgaccacgaact
Timp1	agaattccgccaccatggccccctttgagc	aactcctcgctgcggttggtggg
Timp2	gatcagggccaaagcggtcagtg	cactcgtccggggaggagatgtagc
Timp3	aaggatccgccaccatgacccttggtcgggctcatc	cagccccgtgtacatcttgccatcatag
Timp4	agaattctgccaccatgcttgggagccctcggccc	gcttctggctggttgcttctagtttcacaccacagag

Der Reaktionsansatz (je 10 µl) für die PCR war folgender:

H ₂ O	5,6 µl
10x Taq-Puffer (mit NH ₄ SO ₄)	1,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,0 µl
Primer (je Fwd + Rev, 10 pMol/µl)	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,2 µl
Taq DNA Polymerase	0,2 µl
cDNA	1,0 µl

Es wurde jeweils ein entsprechender MasterMix ohne cDNA hergestellt.

Die Reaktionen wurden mit folgendem Programm in einem Thermocycler „Mastercycler EP gradient S“ von Eppendorf durchgeführt:

Erste Denaturierung	3 min	94 °C
Amplifikation (30–40 Zyklen)	45 sek	94 °C
	45 sek	T _A
	45 sek	72 °C
Kühlung der PCR- Produkte bis zur Entnahme	∞	4 °C

Es wurden je nach amplifiziertem Gen unterschiedlich viele Zyklen der Amplifikation gefahren und die Parallelproben im Abstand von 2 Zyklen abgestoppt (z.B. nach 35, 37 und 39 Zyklen). Für die Quantifizierung von GAPDH wurden 17, 19 und 21 Zyklen gefahren.

2.4 Zellbiochemische und zellbiologische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Wachstumsrate

Zur Bestimmung der Wachstumsrate der Zelllinien wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet: Bestimmung der Zellzahl mit dem Coulter Counter (für Rat-1 Klone) oder ein MTT-Assay.

Für die Zellzahlbestimmung wurden die zu untersuchenden Zelllinien in 6-Loch-Platten ausgesät (je 30.000 Zellen in Triplikaten), zum zählen mit Trypsin vollständig abgelöst und in Wachstums-Medium aufgenommen. Die Zellzahl der drei Zellsuspensionen pro Zelllinie wurde im Coulter Counter je dreimal bestimmt, so dass für jeden Zeitpunkt 9 Messwerte pro Zelllinie ermittelt wurden.

Für die MCF10A Zellen wurde der MTT-Assay verwendet. Dieser Assay beruht auf der Umsetzung von Tetrazoliumsalzen (MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) durch mitochondriale Enzyme in lebenden Zellen (Mosmann, 1983). Aus MTT werden dabei stark blaue Formazan-Kristalle, die sich aufgrund der Impermeabilität der Zellmembran in lebenden Zellen anreichern. Durch Zugabe eines Detergens werden diese Kristalle freigesetzt und gelöst. Die Zunahme an Farbstoff korreliert dabei mit der Anzahl an stoffwechselaktiven Zellen und kann mit einem Spektrometer (ELISA Reader) quantifiziert werden.

Für die Durchführung der Messungen wurden MCF10A Zellen in einer 48-Loch-Platte in einer Dichte von 400 Zellen/Loch ausgesät. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde pro Loch 60 µl MTT-Lösung (5 mg/ml) zugegeben und für 2 h inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden jeweils 100 µl MTT-Stop-Lösung zugegeben und die Platten ÜN im Dunkeln inkubiert, um die Kristalle zu lösen. Am nächsten Tag wurde die Extinktion in einem Elisa-Reader (Dynatech MR5000) gemessen ($\lambda=570$ nm), jeweils nach konstanter Inkubationszeit. Der Versuch wurde in Triplikaten (pro Zelllinie und Zeitpunkt) durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt, als blank (Hintergrund) wurde Medium ohne Zellen gemessen.

2.4.2 Nachweis der Caspase-Aktivität

Als qualitativer Apoptose-Nachweis kann die Aktivierung der Effektorcaspase Caspase-3 im Westernblot (siehe 2.5.7) nachgewiesen werden. Caspase-3 wird bei der Aktivierung proteolytisch gespalten und es kann eine zusätzliche Bande (aktive Caspase-3) sichtbar gemacht werden. Dafür wurden HeLaS3 Zellen und die Klone 14, 36 und 58 in 12-Loch-Platten in einer Dichte von 150.000 Zellen/Loch ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Zugabe von Doxorubicin (1 µM) für eine Inkubationszeit von weiteren 24 h. Für die Lyse und den Westernblot siehe 2.5.

2.4.3 Durchflusszytometrie

Die einfachste Definition von Durchflusszytometrie (auch als FACS bezeichnet für *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) ist die Detektion, Messung und Analyse von Signalen, die von einzelnen Zellen (oder anderen Partikeln) erhalten werden, wenn sie in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Lichtstrahl treten. Diese Technologie erlaubt es, gleichzeitig mehrere physikalische und Fluoreszenz-Parameter einer einzelnen Zelle in einer größeren Zellpopulation quantitativ zu bestimmen. Der Durchflusszytometer misst, wie Zellen das Licht absorbieren und reflektieren, und welche Fluoreszenz sie emittieren. Diese Daten werden dann für jede einzelne Zelle gespeichert und können später wieder zur Berechnung abgerufen werden. Damit kann die relative Größe und optische Dichte berechnet werden. Der Gebrauch von spezifischen Antikörpern, die mit unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind, erlaubt es zudem, die Expression von bestimmten Molekülen auf und in der Zelle nachzuweisen. Ebenso können Nukleinsäure-bindende fluoreszierende Farbstoffe gebraucht werden, um den DNA-Gehalt in einer Zelle festzustellen.

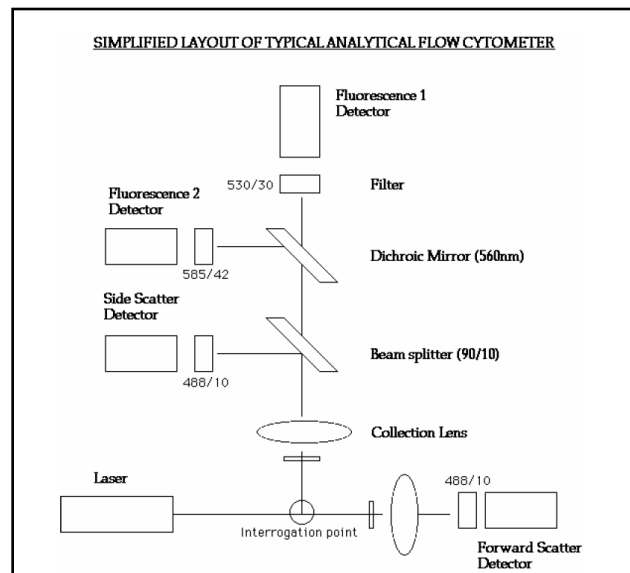


ABBILDUNG 9: PRINZIP DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE

EIN PARTIKEL ODER ZELLE WANDERT IN EINEM FLÜSSIGKEITSSTROM DURCH EINEN LASERSTRAHL. DABEI WIRD FÜR JEDE ZELLE/PARTIKEL GEMESSEN, WIE VIEL LICHT ABSORBIERT WIRD (FORWARD SCATTER, ERGIBT DIE RELATIVE GRÖSSE), WIE VIEL LICHT REFLEKTIERT WIRD (SIDE SCATTER, ERGIBT DIE RELATIVE OPTISCHE DICHT), SOWIE WELCHE FLUORESCENZEN EMITTIERT WERDEN (DETEKTION ABHÄNGIG VON DEN DETEKTOREN UND DER WELLENLÄNGE DES ANREGUNGSLICHTES). FILTER UND SPIEGEL REGULIEREN DAS LICHT SO, DASS ES AUF DIE RICHTIGEN DETEKTOREN TRIFFT. ABBILDUNG VON FACS FACILITY, DKF UNIVERSITÄT BERN, WWW.CX.UNIBE.CH/DKF7/.

2.4.3.1 BESTIMMUNG DER APOPTOSE-RATE

In einer normalen Zelle ist der Gehalt an chromosomaler DNA definiert durch die Anzahl der Chromosomen. Eine menschliche Zelle besitzt 44 Autosomen und 2 Geschlechtschromosomen (total 46). In proliferierenden Zellen verdoppeln sich die chromosomale DNA und die Anzahl der Chromosomen in der so genannten S-Phase des Zellzyklus. Aus diesem Grunde ist der DNA Gehalt zwischen der G2-Phase und der Mitose doppelt so groß wie in einer ruhenden oder postmitotischen Zelle. Die nukleäre DNA kann mittels spezieller Farbstoffe, wie zum Beispiel der DNA-interkalierenden Stoffe Ethidiumbromid und Propidiumiodid, angefärbt werden. Diese Farbstoffe sind fluoreszierend und können mit einem geeigneten Laser angeregt werden. Da die Fluoreszenz einer Zelle proportional ist zu ihrem DNA Gehalt, kann diese Färbung ausgenutzt werden um den DNA Gehalt und den Zellzyklusstatus einer einzelnen Zelle oder Zellpopulation im Durchflusszytometer zu analysieren (siehe Abbildung 10). Diese Methode kann auch verwendet werden um eine Aneuploidie (Veränderung des Chromosomensatzes) festzustellen, z.B. in Tumorzellen oder normalen Leberzellen.

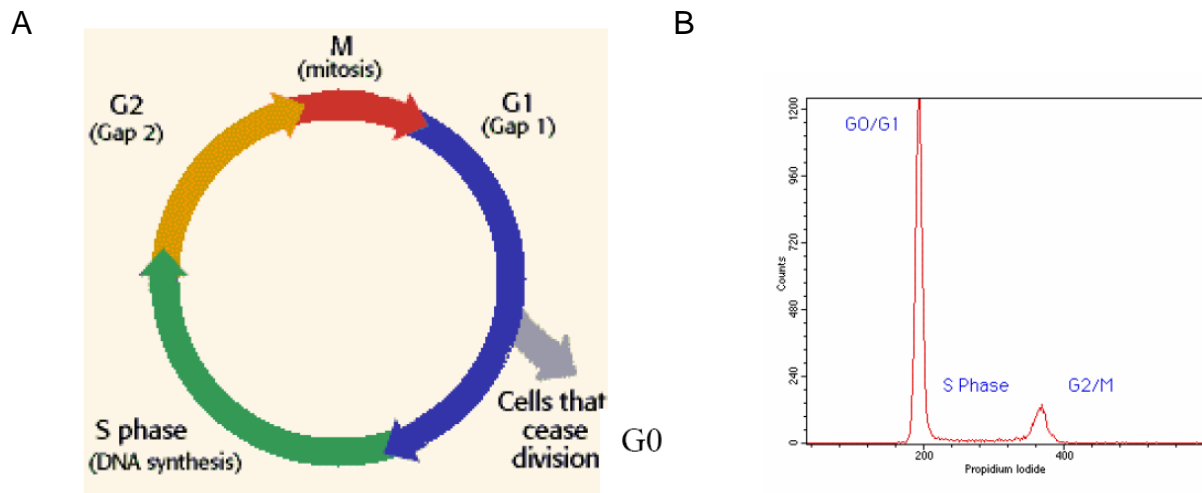


ABBILDUNG 10: A: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ZELLYKYLUS. B: DNA FÄRBUNG MITTELS PROPIDIUMIODID

Eines der typischen Merkmale von apoptotischem Zelltod ist die Fragmentierung von chromosomaler DNA in kleine Bruchstücke von 180 Basenpaaren oder ein mehrfaches davon. Diese entstehen durch enzymatische Verdauung der DNA zwischen den Histonproteinen. Zudem wird während der Apoptose oft auch der Zellkern fragmentiert. Die kleineren und größeren Stücke werden oft von der Zelle freigesetzt, sodass bei einer

DNA Färbung von apoptotischen Zellen ein DNA Gehalt beobachtet wird, der geringer ist als bei einer normalen Zelle in der G1-Phase. Man spricht von sub-G1 Zellen. Die DNA Färbung kann somit auch dazu benutzt werden, um Apoptose in einer Zellpopulation zu quantifizieren (Vermes et al., 2000).

Herkömmliche DNA Färbungen setzen eine Zellfixation und Zellpermeabilisierung voraus. Da die immer noch enthaltene RNA auch von Propidiumiodid und Ethidiumbromid angefärbt wird und so mit der DNA Färbung interferiert, muss die RNA zusätzlich verdaut werden. Die von Ildo Nicoletti entwickelte Methode (Nicoletti et al., 1991) umgeht diese Problematik, indem sie nur den DNA Gehalt von einzelnen Zellkernen analysiert. Die Methode nutzt aus, dass das Detergens Triton X-100 nur die zytoplasmatische Membran von Zellen lysiert, nicht aber die Kernmembran. Im geeigneten Lysepuffer wird somit direkt die Zelle lysiert, die Zellkerne freigesetzt und die nukleäre DNA mit Propidiumiodid gefärbt.

Diese Methode wurde für die quantitative Bestimmung der Apoptosesensitivität aller in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien angewendet. Die Apoptose-Induktion erfolgte jeweils 24 h nach dem Aussäen in 6-Loch- oder 12-Loch-Platten bzw. Transfektion mit siRNA mit der angegebenen Dosis. Für die Induktion mit CH-11 wurden die Zellen vor der Zugabe für 9 h gehungert (0 % FCS) und teilweise mit α -MMP-15 Antikörper versetzt (siehe 3.2.1.3, Seite 91). Nach der jeweils angegebenen Inkubationszeit wurde der Medienüberstand abgenommen und in ein 2 ml-Eppendorfgefäß auf Eis überführt. Die Zellen wurden mit Trypsin vollständig abgelöst und mit dem abgenommenen Medium abgespült. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen (5 Minuten, 1600 rpm, 4 °C) wurden die Zellen mit eiskaltem 70 % EtOH für min. 1 Stunde auf Eis fixiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden zum Zellpellet 500 μ l hypotonischer Propidiumiodidpuffer gegeben und für 3 Stunden bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden in Messröhrchen überführt und die Messung an einem FacsCalibur (BD Biosciences) Durchflusszytometer in einem Probenkarussell mit Hilfe des Computerprogramms zur Steuerung des Zytometers (WorklistManager, Beckton Dickinson) durchgeführt. Mit Hilfe des Programms CellQuest Pro (BD Biosciences) wurden die Daten ausgewertet und der prozentuale Anteil der apoptotischen Kerne (sub-G1-Peak mit geringem DNA-Gehalt) bestimmt (Abbildung 11).

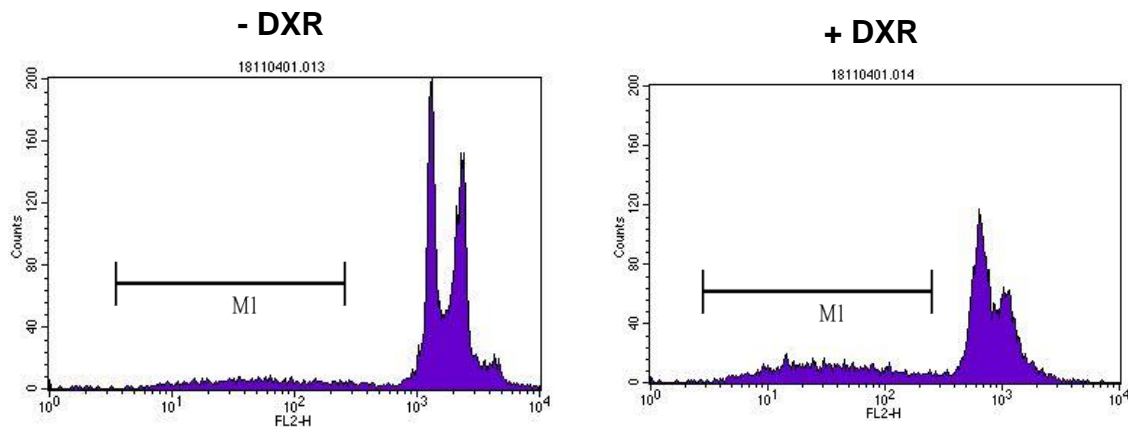


ABBILDUNG 11: BESTIMMUNG DES ANTEILS AN APOPTOTISCHEN ZELLEN MIT DEM DURCHFLUSSZYTOMETER NACH PROPIDIUMIODID-FÄRBUNG. DER ANTEIL DER ZELLEN IM BEREICH M1 ENTSpricht DEN APOPTOTISCHEN ZELLEN.

2.4.3.2 ZELLOBERFLÄCHENFÄRBUNG

Zur Quantifizierung der Zelloberflächenexpression von MMP-15 wurden die Zellen mit FITC-gekoppelten α -MMP-15-Antikörpern angefärbt und mit Durchflusszytometrie untersucht. Dafür wurden die Zellen mit EDTA abgelöst, mit FACS-Puffer gewaschen und die Zellzahl mit dem Coulter Counter bestimmt. Je $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden mit $5 \mu\text{l}$ Antikörper (IC9161F, $25 \text{ ng}/\mu\text{l}$) versetzt und in $50 \mu\text{l}$ FACS-Puffer resuspendiert. Nach 1 Stunde Inkubation auf Eis im Dunkeln wurden die Zellen 3x mit je 1 ml FACS-Puffer gewaschen und anschließend das FITC-Signal im FL1-Kanal am Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software CellquestPro. Zur Quantifizierung wurden mithilfe der Statistikfunktion die Werte „X Geo Mean“ für die Probe mit MMP-15 Antikörper und die Isotyp-Kontrolle bestimmt und der Quotient daraus gebildet.

Zum Test der Hybridoma-Überstände (MMP-15 Antikörper) wurden je $2,0 \times 10^5$ Zellen mit $100 \mu\text{l}$ Überstand (pur bzw. 1:5 in FACS-Puffer) resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach 2x waschen mit je 1 ml FACS-Puffer wurden die Zellen in $50 \mu\text{l}$ FACS-Puffer resuspendiert und mit sekundärem Antikörper versetzt (α -Ratte, gekoppelt an Phycoerythrin, 1:100). Nach 1 Stunde Inkubation auf Eis im Dunkeln wurden die Zellen 3x mit je 1 ml FACS-Puffer gewaschen und anschließend das PE-Signal im FL2-Kanal am Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung erfolgte wie oben beschrieben.

2.4.4 Focus Formation Assay

Als Methode zur Analyse der Transformation von Zellen *in vitro* wurde der Focus-Formation-Assay verwendet (Cox et al., 1994; Jeffers et al., 1997; Riedel et al., 1988; Shutes et al., 2007). Dafür wurden NIH3T3-Zellen retroviral infiziert (siehe 2.2.5) und die infizierten Zellen am Tag nach der letzten Infektion bzw. nach der angegebenen Anzahl von Passagen in Selektionsmedium (G418) auf 6 cm-Platten ausgesät (2×10^5 Zellen). Nach 24 h wurde das Medium gewechselt auf 4 % FCS (statt 10 %) und ab da jeden 2. Tag bis zum angegebenen Zeitpunkt der Färbung (15, 29 bzw. 40 Tage). Für die Färbung wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann für 5 min mit Kristallviolett-Lösung inkubiert. Nach dem Abwaschen überflüssiger Färbelösung wurden die Platten getrocknet und anschließend eingescannt.

Für die Untersuchung der stabil MMP-15 exprimierenden Rat-1 Zellen wurden diese nach der Selektion konfluent ausgesät, mit 4 % FCS wie oben angegeben kultiviert und die Platten nach 35 bis 38 Tagen Wachstum mit Kristallviolett angefärbt.

2.5 Proteinanalytische Methoden

2.5.1 Triton X-100 Lyse von Zellen

Zur spezifischen Aufreinigung von Proteinen wurden die Zellen mit Hilfe des Detergens Triton X-100 lysiert. Dabei werden die Zellmembranen aufgelöst, während der Zellkern und die übrigen Zellkompartimente intakt bleiben und durch Zentrifugation abgetrennt werden können.

Die Zellen wurden vor der Lyse mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit einem der Größe des Zellkulturgefäßes entsprechenden Volumen Lysepuffer lysiert. Dem Lysepuffer wurden vor der Verwendung folgende Phosphatase- und Proteaseinhibitoren frisch zugegeben:

- 10,0 µg/ml Aprotinin
- 1,0 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, in EtOH gelöst)
- 2,0 mM Natriumorthovanadat (pH 10.0)

Dabei inhibiert Na_3VO_4 die zellulären Phosphatasen und erhält damit den Phosphorylierungsstatus von Signalproteinen, PMSF und Aprotinin dagegen sind Proteaseinhibitoren, die einer möglichen Proteindegradation entgegen wirken.

Nach 15minütiger Lyse auf Eis wurde das Zelllysate durch abkratzen mit einem Schaber gesammelt, in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lysate wurden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Vor der Analyse der Lysate erfolgte die Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile wie Zellkerne und Zytoskelett mittels Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, $4\text{ }^\circ\text{C}$). Der Überstand, der die zytosolischen und einige membranständige Proteine enthielt, wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

2.5.2 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der "Micro BCA Protein Assay Kit" (Pierce) nach Angaben des Herstellers verwendet. Diese Methode beruht auf der Reduktion von Kupfer-Ionen ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$) durch verschiedene Seitengruppen von Aminosäuren (hauptsächlich Cystin, Cystein, Tryptophan und Tyrosin), die als Reduktionsmittel fungieren. Die Proteinbestimmung wird nicht durch Detergentien, wie sie bei der Lyse von Zellen eingesetzt werden, gestört. Die Kupfer-Ionen werden durch BCA (Bicinchonische Säure) komplexiert und bilden eine charakteristische violette Färbung, deren Extinktion in einem Elisa-Reader (Dynatech MR5000) gemessen wurde ($\lambda=570-490\text{ nm}$). Als Vergleichsstandard (Kalibrierungskurve) wurde eine Rinder-Serumalbumin-Konzentrationsreihe (100–2000 μg Protein/ml) eingesetzt. Es wurde darauf geachtet, dass die erhaltenen Proteinkonzentrationen innerhalb des Messbereiches von 100–2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ liegen, da oberhalb des Messbereiches keine lineare Korrelation zwischen Extinktion und Proteinkonzentration vorhanden ist.

2.5.3 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur Aufreinigung von MMP-15 Protein für die Immunisierung wurde das MMP-15-GST-Fusionsprotein aus dem Medienüberstand transient transfizierter HEK293 Zellen mit Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Dafür wurde der gesammelte Medienüberstand, der mit Protease-Inhibitoren versetzt und bis zur Aufreinigung bei -20 °C aufbewahrt wurde, mit 250 µl Sepharose (50 % Suspension)/50 ml Überstand ÜN bzw. für 3 h bei 4 °C inkubiert und dabei auf einem Drehrad invertiert. Nach der Inkubation wurde die Sepharose abzentrifugiert und dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Zur Elution für die analytischen Experimente wurde die Sepharose mit Lämmli-Puffer für 5 min gekocht. Für die präparative Elution wurden verschiedene Bedingungen mit Glutathionpuffer getestet. Die Eluate wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein entweder mit Coomassie-Färbung oder Westernblot nachgewiesen.

2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Polyacrylamidgele ermöglichen die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Durch das anionische Detergens SDS (Sodiumdodecylsulfat) werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d.h. Konformationseffekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Die Proteine erhalten zugleich eine negative Ladung, die nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung sondern vielmehr von der Zahl der in der Primärstruktur vorhandenen Aminosäuren abhängt. Alle Proteine erhalten somit ein relativ konstantes Ladung/Masse-Verhältnis und werden elektrophoretisch der Masse nach aufgetrennt.

Weiterhin ist das im Laemmli-Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol dafür verantwortlich, dass intra- und intermolekulare Disulfidbrücken der Proteine reduziert werden. So kommt eine Denaturierung der Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur zustande.

Es wurden stets vertikale Gelapparaturen (Atto Corporation, Japan) verwendet. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7.5-12.5%ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen. Über die Trenngele wurde im Anschluss ein 4%iges Sammelgel gegossen.

Nach Zugabe des Radikalstarters Ammoniumpersulfat (10%ige Lösung) zur vorgelegten Trenngellösung wurde diese sofort zwischen die Glasplatten gegossen und mit 500 µl Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Propanol entfernt, das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet und der Kamm eingesteckt. Nach ca. 15 min konnten die Silikondichtungen entfernt werden und die Gele in die Laufkammern (Atto Corporation, Japan) gebracht werden. Die Kammern wurden mit Laufpuffer (Tris-Glycin-SDS) gefüllt, die Kämmen gezogen und die Geltaschen mit Laufpuffer gespült, um Acrylamidverunreinigungen zu entfernen. Nach 5minütigem Aufkochen der Proben wurden diese abzentrifugiert und mit einer Mikroliter® Spritze (Hamilton, Bonaduz) auf das Gel aufgetragen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde wie von Sambrook et al. beschrieben durchgeführt (Sambrook et al., 1990). Sie erfolgte über Nacht bei auf 6 mA begrenzter Stromstärke pro Gel. Anschließend wurden die Gele auf Nitrozellulose transferiert (siehe 2.5.5) oder mit Coomassie gefärbt (siehe 2.5.8).

Als Molekulargewichtsstandard (Bio-Rad) bei der Gelelektrophorese wurde folgendes Proteingemisch verwendet:

<i>Protein</i>	<i>MG [kDa]</i>	<i>Protein</i>	<i>MG [kDa]</i>
Myosin	205.0	Ovalbumin	42.7
β-Galaktosidase	116.25	Carboanhydrase	29.0
Phosphorylase b	97.4	Trypsin-Inhibitor	21.5
BSA	66.2	Lysozym	14.4

Verwendete Pufferzusammensetzungen :

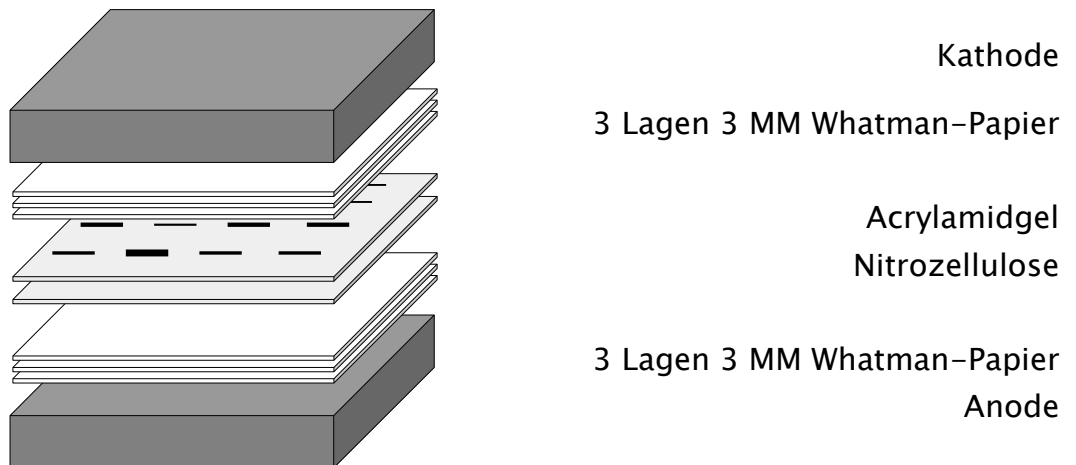
<i>Trenngel</i>	<i>7.5 %</i>	<i>10.0 %</i>	<i>12.5 %</i>
4x Trenngelpuffer	5 ml	5 ml	5 ml
H ₂ O	9.8 ml	8.1 ml	6.4 ml
Acrylamid (30 %/0.8 %)	5 ml	6.65 ml	8.35 ml
100 % TEMED	15 µl	15 µl	15 µl
10 % APS	150 µl	150 µl	150 µl

<i>Sammelgel</i>	4.0 %
4x Sammelgelpuffer	1.62 ml
H ₂ O	4.7 ml
Acrylamid (30 %/0.8 %)	900 µl
100 % TEMED	6.5 µl
10 % APS	65 µl

2.5.5 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Nach der Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE wurden sie durch Transfer auf Nitrozellulose (Gershoni & Palade, 1983) und anschließendem Immunoblot sichtbar gemacht. Proteine können auf diese Art mit sensitiven Antikörpern spezifisch nachgewiesen werden. Der Transfer erfolgte im sogenannten "semi-dry"-Verfahren bei 0.8 mA/cm² Gelfläche für 2–3 Stunden (je nach Größe der Proteine). Das in Transblot SD äquilibrierte Gel wurde auf eine den Gel-Ausmaßen zurechtgeschnittene Nitrozellulosemembran (Amersham) gelegt, die zu beiden Seiten von verschiedenen Lagen Filterpapier umgeben war. Um Luftblasen zu vermeiden, die die Bloteffizienz beträchtlich vermindern, wurden die zuvor in Transblot SD eingelegten Lagen an Filterpapier nach Auflegen stets mit einer 25 ml Kunststoffpipette geglättet und exakt übereinander geschichtet.

Blot-Aufbau:



2.5.6 Ponceau S-Färbung der Nitrozellulosemembran

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde diese für 1 min mit einer Lösung des Farbstoffs Ponceau S (2 g/l in 2 % (w/v) Trichloressigsäure) angefärbt. Unspezifisch angefärbte Bereiche der Nitrozellulose wurden mit destilliertem Wasser entfärbt, damit Banden des Proteinmarkers oder der Proteine des Zelllysats sichtbar wurden. Dies diente zum einen dazu die Markerbanden mit wasserfestem Kugelschreiber einzuzeichnen, zum anderen dazu abzuschätzen, ob gleiche Mengen an Protein aufgetragen worden waren. Ferner ist dieser Schritt wichtig, da die in der Färbelösung enthaltene Trichloressigsäure die geblotteten Proteine auf die Nitrozellulosemembran fixiert. Die Nitrozellulose wurde dann durch mehrmaliges Waschen in NET-Gelatine (0.25 % Gelatine in 1xNET) entfärbt und unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulose abgesättigt.

2.5.7 Immundetektion von Proteinen (Immunoblotanalyse, Western Blot)

Bei der Immundetektion wurden die auf der Nitrozellulosemembran fixierten Proteine mit einem Antikörper-gekoppelten Detektionsverfahren nachgewiesen. Diese Methode basiert darauf, dass in einem ersten Schritt spezifische sog. primäre Antikörper die immobilisierten Antigene auf der Nitrozellulose erkennen, während im zweiten Schritt diese ihrerseits durch sog. sekundäre Antikörper erkannt werden, die an Meerrettichperoxidase gekoppelt sind. Durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase wurden schließlich die Antigenbanden sichtbar gemacht. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System (*enhanced chemiluminescence*) der Firma PerkinElmer.

Zur Detektion der Proteine in der Western Blot Analyse wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper verwendet. Soweit die Konzentration bekannt war, wurden die Antikörperlösungen auf 1 µg/ml in NET, 0.25 % Gelatine eingestellt, ansonsten wurden die Antikörper 1:500 bzw. 1:1000 in NET, 0.25 % Gelatine verdünnt. Um die Haltbarkeit der Blotantikörperlösungen zu erhöhen, wurde Natriumazid (Endkonzentration 0.04 %) hinzu gegeben. So wird eine Kontamination der Lösung durch Mikroben vermieden, da das Azid einen hemmenden Einfluss auf deren Atmungskette hat.

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde diese für mindestens eine Stunde mit NET-Gelatine inkubiert. Der Filter wurde über Nacht bei 4 °C mit der Primärantikörperlösung inkubiert, danach dreimal 20 min mit NET-Gelatine gewaschen. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper in NET-Gelatine inkubiert. Vor der Detektion mit dem ECL-Reagenz wurde der Blot erneut dreimal für 15 min mit NET-Gelatine gewaschen.

ECL ist ein nicht-radioaktives System zur Detektion von spezifischen Antigenen auf einer stationären Phase. Dazu wurde der Filter für 1 min in einer 1:1-Mischung von ECL Reagenz 1 und 2 inkubiert. Die wesentlichen Komponenten des Systems sind Luminol und Wasserstoffperoxid, die in Anwesenheit von speziellen „*Enhancern*“ (z.B. Phenol) eine Lumineszenz-Reaktion eingehen (siehe Abbildung 12). Durch die an den sekundären Antikörper gebundene Meerrettichperoxidase werden zyklische Diacylhydrazide wie Luminol im Alkalischen oxidiert. Das durch die Chemilumineszenz ausgesendete Licht (Maximum bei $\lambda=428$ nm) kann anschließend durch Exposition des mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckten Blots auf einem Röntgenfilm detektiert werden. Die Lichtemission klingt – bedingt durch den Substratverbrauch – nach ca. 20–30 min ab.

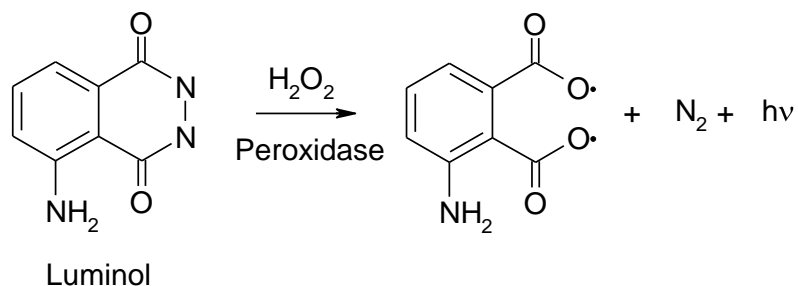


ABBILDUNG 12: CHEMOLUMINESZENZ-REAKTION DES ECL-SYSTEMS

Sollte dieselbe Membran ein weiteres Mal benutzt werden, ist eine Nachbehandlung der Nitrozellulose notwendig. Die auf der Membran gebundenen Antikörper des ersten Immunoblots können durch Inkubation in einer „Strip“-Lösung (62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 100 mM β -Mercaptoethanol und 2 % SDS) bei 50 °C für 1 Stunde in einem Warmwasserschüttlerbad entfernt werden. Danach muss das β -Mercaptoethanol durch

intensives Waschen mit NET-Gelatine über mindestens 4 Stunden vollständig entfernt werden, bevor ein weiterer primärer Antikörper mit der Membran inkubiert werden kann.

2.5.8 Coomassie-Färbung

Für die direkte Färbung von Proteinbanden im SDS-Gel wurden die Gele nach der Elektrophorese zuerst kurz in 2,5 % Glycerol eingeweicht und anschließend für 20 min in Coomassie G250 angefärbt. Nach ca. 3 h waschen in Entfärbelösung wurden die Gele zwischen Cellophan-Folie im Vakuum bei 60 – 80 °C getrocknet.

2.6 Antikörperherstellung

Die Immunisierung von Ratten mit Rat-1 MMP-15 Zellen (Klon 3) bzw. mit MMP-15excE260A-GST sowie die Fusion der Hybridoma und anschließende Klonierung erfolgte am Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz Zentrum München, Service-Einheit Monoklonale Antikörper, in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. med. Elisabeth Kremmer.

3 ERGEBNISSE

Die klassischen Therapieformen bei Krebserkrankungen, die chirurgische Entfernung von Tumoren, Strahlentherapie oder zytotoxische Chemotherapie, haben sich als wirksam aber relativ unspezifisch erwiesen. Da die letzten Jahrzehnte der Krebsforschung nach und nach die Mechanismen der Krebsentwicklung und die molekularen Vorgänge in Krebszellen aufgeklärt haben, hat sich eine neue Therapie-Strategie durchgesetzt: die gezielte Therapie, die an molekularen Angriffspunkten ansetzt.

Auf der Suche nach möglichen Kandidatengen, deren Genprodukte die Krebsentstehung begünstigen, die Tumorprogression vorantreiben oder zur Therapieresistenz beitragen, fiel der Fokus auf den Mechanismus der Apoptose. Diese Form des programmierten Zelltods ist essentiell für die Organisation und Regulation der vielen Zellen eines Organismus und Störungen können neben anderen Erkrankungen auch zu Krebs führen.

Wie bedeutend die Rolle von Apoptose in Krebszellen ist, wird dadurch verdeutlicht, dass nahezu alle Komponenten der bekannten apoptotischen Signalwege bereits in einer der verschiedenen Krebsarten als Tumorsuppressor oder als Onkogen charakterisiert bzw. Mutationen oder Deregulationen beschrieben wurden (siehe Einleitung, Abbildung 3 und Kapitel 1.2, Seite 6). Daher ist es naheliegend, die verminderte Apoptose in Krebszellen durch geeignete Substanzen im Rahmen einer Krebs-Therapie dadurch zu erhöhen, dass antiapoptotische Signale inhibiert oder apoptotische Signalwege aktiviert werden.

Eine mögliche Strategie zur Suche nach derartigen Apoptose-relevanten Kandidatengen beruht auf einem Modellsystem, dass die Selektion von Apoptose-resistenten Krebszellen im Körper nachstellt (siehe Abbildung 6 und Kapitel 1.4, Seite 14). Durch Analyse der Genexpressionsmuster können Veränderungen der Expression einzelner Gene in den resistenten Klonen identifiziert werden. Diese Gene sind potentielle Kandidaten, die nach funktioneller Validierung als mögliche Angriffspunkte einer gezielten Krebstherapie in Frage kommen könnten.

Zwei derartige Projekte werden in dieser Arbeit beschrieben.

3.1 Validierung der Kandidatengene in BT-20

3.1.1 Untersuchungen zur Heterogenität der Zelllinie BT-20

Wie in der Einleitung, Kapitel 1.4 beschrieben, basiert die Strategie der Selektion resistenter Klone einer Zelllinie auf der genomischen Instabilität von Tumorzellen und der damit verbundenen Entwicklung von Subklonen während der Kultivierung. Zur Bestimmung der Heterogenität der untersuchten Zelllinie BT-20 wurden durch serielle Verdünnung monoklonale Zelllinien etabliert und deren Genexpressionsprofile mittels cDNA-Makroarrays bestimmt. Diese Arrays enthielten, wie auch bei der Untersuchung der mit Chemotherapeutika selektierten Klone in der vorausgegangenen Diplomarbeit, die Gensonden für die Klassen der Kinasen, Phosphatasen sowie für weitere Signalmoleküle und Apoptose-relevante Proteine. Zum Vergleich der Expressionsprofile der Subklone von BT-20 wurden Scatterplots herangezogen, die die Werte von zwei Arrays gegeneinander auftragen. Jeder Punkt im Diagramm stellt eine Hybridisierungsprobe auf dem Array dar, wobei der X-Wert dem Expressionslevel des einen Klons, der Y-Wert dem des anderen entspricht. Mithilfe der Regressionsgeraden und R^2 , dem Koeffizienten der Korrelation, lässt sich das Ausmaß der Unterschiede zwischen den beiden Expressionsprofilen quantifizieren. Wie in Abbildung 13 gezeigt, wurden 4 monoklonale Zelllinien (M1, M4, M7 und M9), die aus BT-20 generiert wurden, analysiert und deren Genexpressionsprofile miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die drei Klone M4, M7 und M9 untereinander relativ ähnlich waren ($R^2 > 0,9$, siehe Abbildung 13 B), aber M1 größere Unterschiede aufwies (R^2 zwischen 0,5 und 0,7, siehe Abbildung 13 A). Beim Vergleich von zwei unabhängigen cDNA-Präparationen der Ausgangszelllinie BT-20 (Daten aus der Diplomarbeit (Richter, 2005)) ergab sich ein mittlerer Korrelationskoeffizient ($R^2 = 0,8078$, Abbildung 13 C). Damit lässt sich zeigen, dass wahrscheinlich ein Großteil der Subklone innerhalb der Zelllinie BT-20 große Ähnlichkeiten aufweisen, allerdings einzelne Klone ein unterschiedliches Genexpressionsprofil zeigen. Mit der kurzfristigen Selektion durch Apoptose-Induktion (Inkubation für 48 h) sollten solche einzelnen Klone isoliert werden, deren Genexpressionsprofil eine geringere Apoptose-Sensitivität vermittelt.

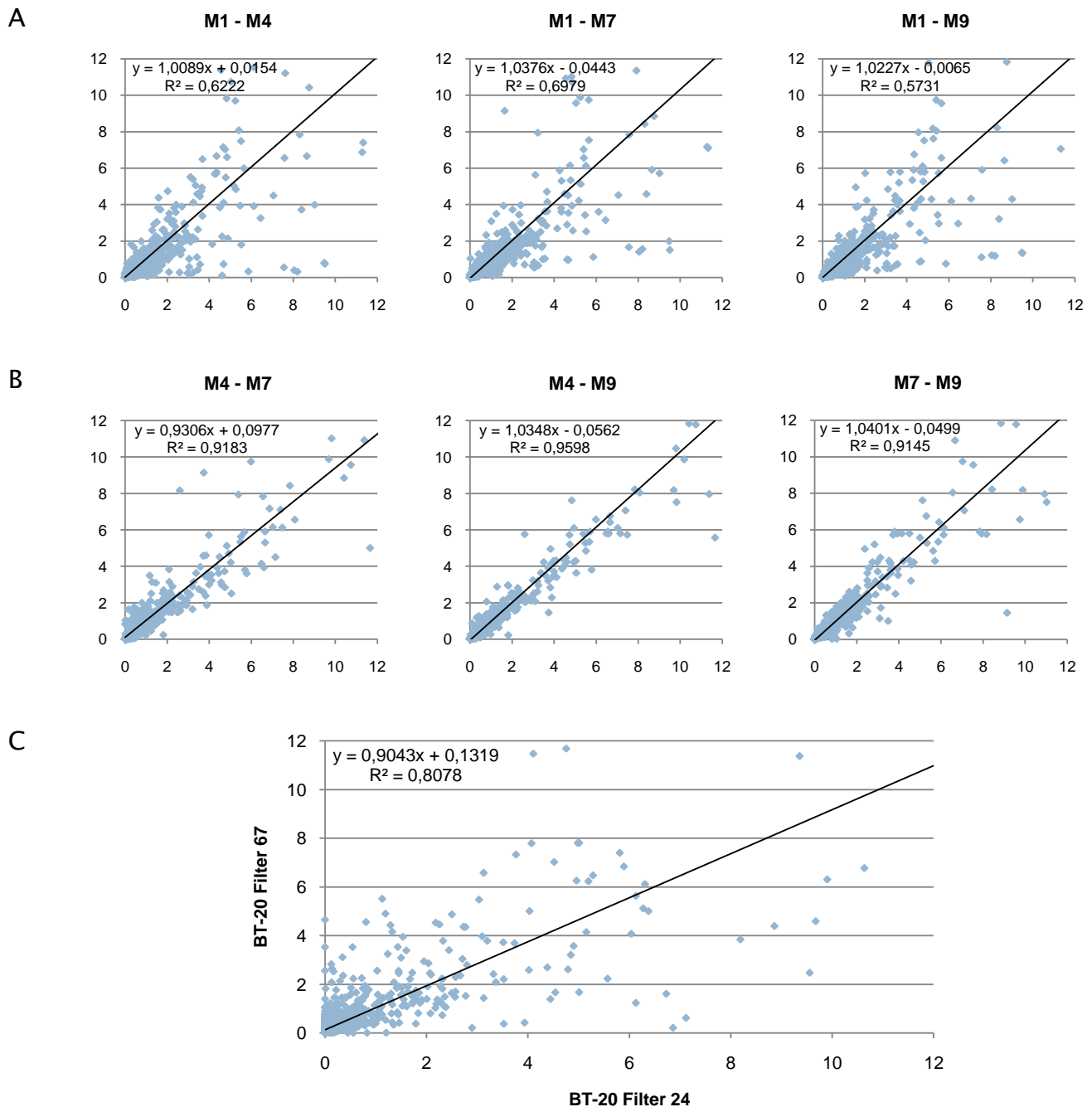


ABBILDUNG 13: BESTIMMUNG DER HETEROGENITÄT DER ZELLINIE BT-20 MITTELS GENEXPRESSIONSPROFILIEN VON SUBKLONEN

GEZEIGT SIND SCATTERPLOTS, BEI DENEN DIE WERTE DER HYBRIDIERUNGSSIGNALE VON JE ZWEI ARRAYS GEGENEINANDER AUFGETRAGEN SIND. DABEI ENTSPRICHT EIN PUNKT EINER HYBRIDISIERUNGSSONDE AUF DEM ARRAY. DIE GLEICHUNG DER REGRESSIONSGERADEN UND R^2 , DER KORRELATIONSKOEFFIZIENT, SIND JEWEILS LINKS OBEN ANGEZEIGT. **A:** VERGLEICH DER MONOKLONALEN ZELLINIE M1 (JEWEILS AUF DER X-ACHSE) MIT DEN DREI MONOKLONALEN ZELLINIEN M4, M7 UND M9 (AUF DER Y-ACHSE), **B:** VERGLEICH DER DREI MONOKLONALEN ZELLINIEN M4, M7 UND M9 UNTEREINANDER, ERSTGENANNT ZELLINIE AUF DER X-ACHSE, **C:** VERGLEICH VON ZWEI UNABHÄNGIGEN cDNA-PRÄPARATIONEN DER ZELLINIE BT-20.

3.1.2 Validierung der differentiellen Expression mit sqRT-PCR

In der dieser Doktorarbeit vorausgegangenen Diplomarbeit wurden die Brustkrebszelllinie BT-20 und mit Chemotherapeutika selektionierte Klone dieser Zelllinie, die eine verringerte Apoptose-Sensitivität zeigten, auf Unterschiede in der Genexpression untersucht (siehe 1.4, Seite 14 und Diplomarbeit (Richter, 2005).

Zur Validierung der Ergebnisse, die mit DNA-Makroarrays gewonnen wurden, wurde für die 6 Gene, die in allen drei Gruppen von Klonen eine höhere Expression zeigten (siehe Abbildung 14), das Expressionslevel mit Hilfe von semiquantitativer PCR bestimmt (siehe Material und Methoden, 2.3.14, Seite 56). Dabei wurde dieselbe cDNA verwendet, die mit den Makroarrays analysiert wurde.

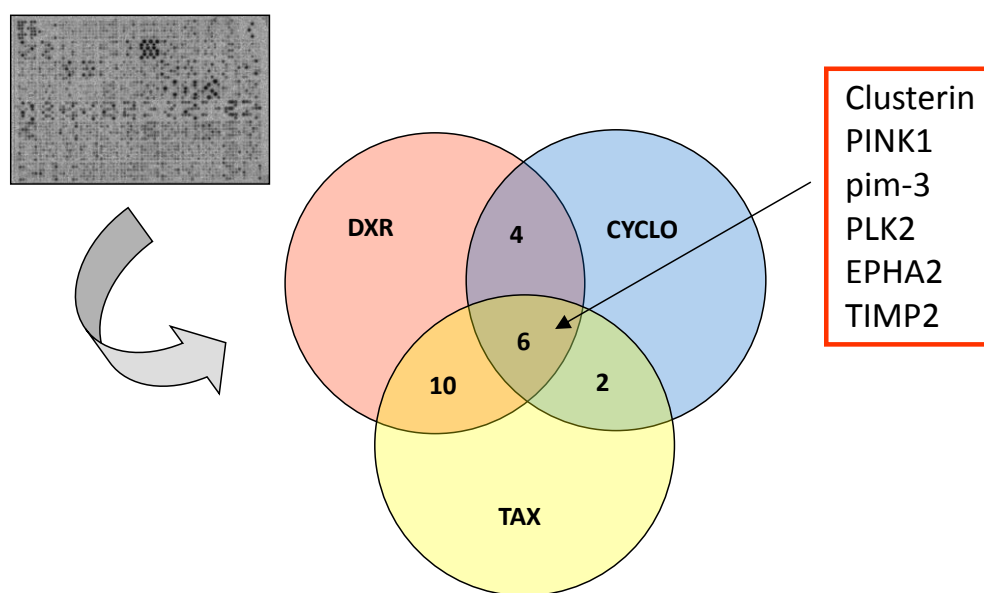


ABBILDUNG 14: GENE MIT ERHÖHTER EXPRESSION IN CHEMOTHERAPEUTIKA-SELEKTIONIERTE INSENSITIVEN KLONEN DER BRUSTKREBSZELLINIE BT-20

MITTELS MAKROARRAYS (EINGESCANNTE MEMBRAN LINKS OBEN) WURDE DIE EXPRESSION VON CA. 1300 GENEN IN BT-20 UND DEN DREI KLON-GRUPPEN (DXR: SELEKTIONIERT MIT DOXORUBICIN, CYCLO: MIT CYCLOPHOSPHAMID, TAX: MIT TAXOTERE®) QUANTIFIZIERT. IN DEN KREISSEGMENTEN IST DIE ANZAHL DER GENE ANGEZEIGT, DIE IN DEN JEWEILIGEN KLON-GRUPPEN EINE ERHÖHTE EXPRESSION IM VERGLEICH ZU BT-20 ZEIGTEN. DABEI WURDEN 6 GENE GEFUNDEN (SIEHE ROTER KASTEN), DIE IN ALLEN DREI GRUPPEN ERHÖHT WAREN.

Abbildung 15 zeigt beispielhaft die Ergebnisse der sq-PCR im Vergleich mit den Array-Daten für das Gen Plk2 (*polo-like kinase 2*), das in den Klonen T27 (selektioniert mit Taxotere®), C13 (selektioniert mit Cyclophosphamid) und D23 (selektioniert mit Doxorubicin) eine gegenüber BT-20 erhöhte Expression zeigte. Mit der PCR wurde ebenfalls eine erhöhte Expression in den drei Klonen gefunden, wobei der Unterschied der beiden cDNA-Präparationen größer war (daher höhere Standardabweichung).

Eine Übersicht der Ergebnisse aller 6 Gene sowie teilweise für verwandte Gene der gleichen Familie ist in Tabelle 5 gezeigt. Die Untersuchung der anderen Familienmitglieder sollte Hinweise darauf geben, ob die Expressionsänderung ganze Proteinfamilien betrifft oder spezifisch für die einzelnen Proteine ist. Außerdem ist dies für die eventuell redundante Funktionalität der Familienmitglieder interessant. Bis auf wenige Fälle konnten mit der PCR die Array-Daten validiert bzw. die relativen Unterschiede im Expressionslevel bestätigt werden. Die Diagramme für alle Gene befinden sich in Tabelle 6.

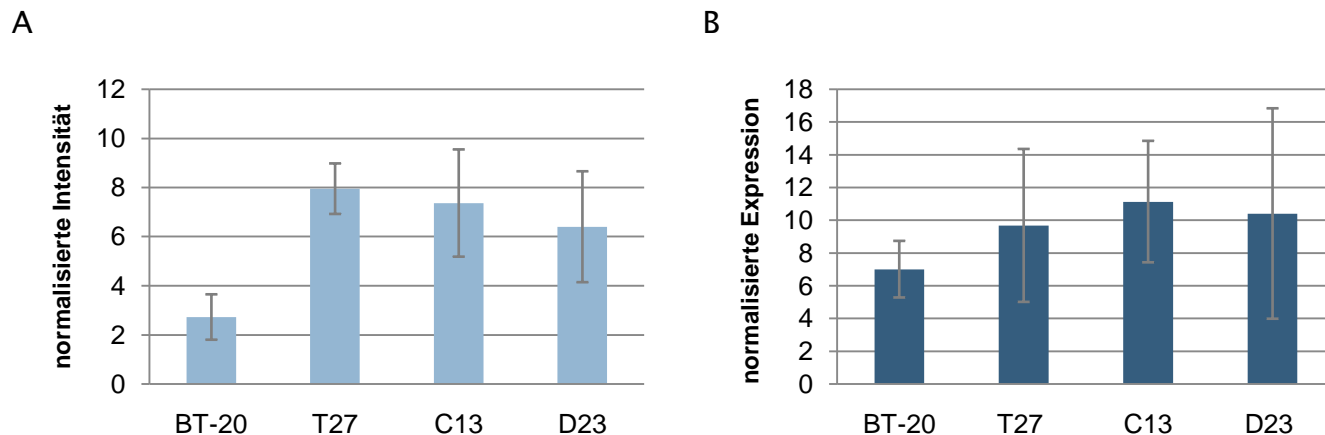


ABBILDUNG 15: VERGLEICH DER EXPRESSIONS-DATEN DER MAKROARRAY-ANALYSE MIT sqPCR FÜR DAS GEN PLK2

DIE GRAPHEN ZEIGEN JEWEILS DEN MITTELWERT MIT StAW FÜR 2 cDNA-PRÄPARATIONEN DER KLONE T27 (SELEKTIONIERT MIT TAXOTERE®), C13 (SELEKTIONIERT MIT CYCLOPHOSPHAMID) , D23 (SELEKTIONIERT MIT DOXORUBICIN) BZW. 3 FÜR BT-20. DIE WERTE DER ARRAY-ANALYSE (A) WURDEN AUF DIE TOTALINTENSITÄT DES ARRAYS NORMALISIERT, DIE DER PCR (B) AUF DIE GAPDH-EXPRESSION.

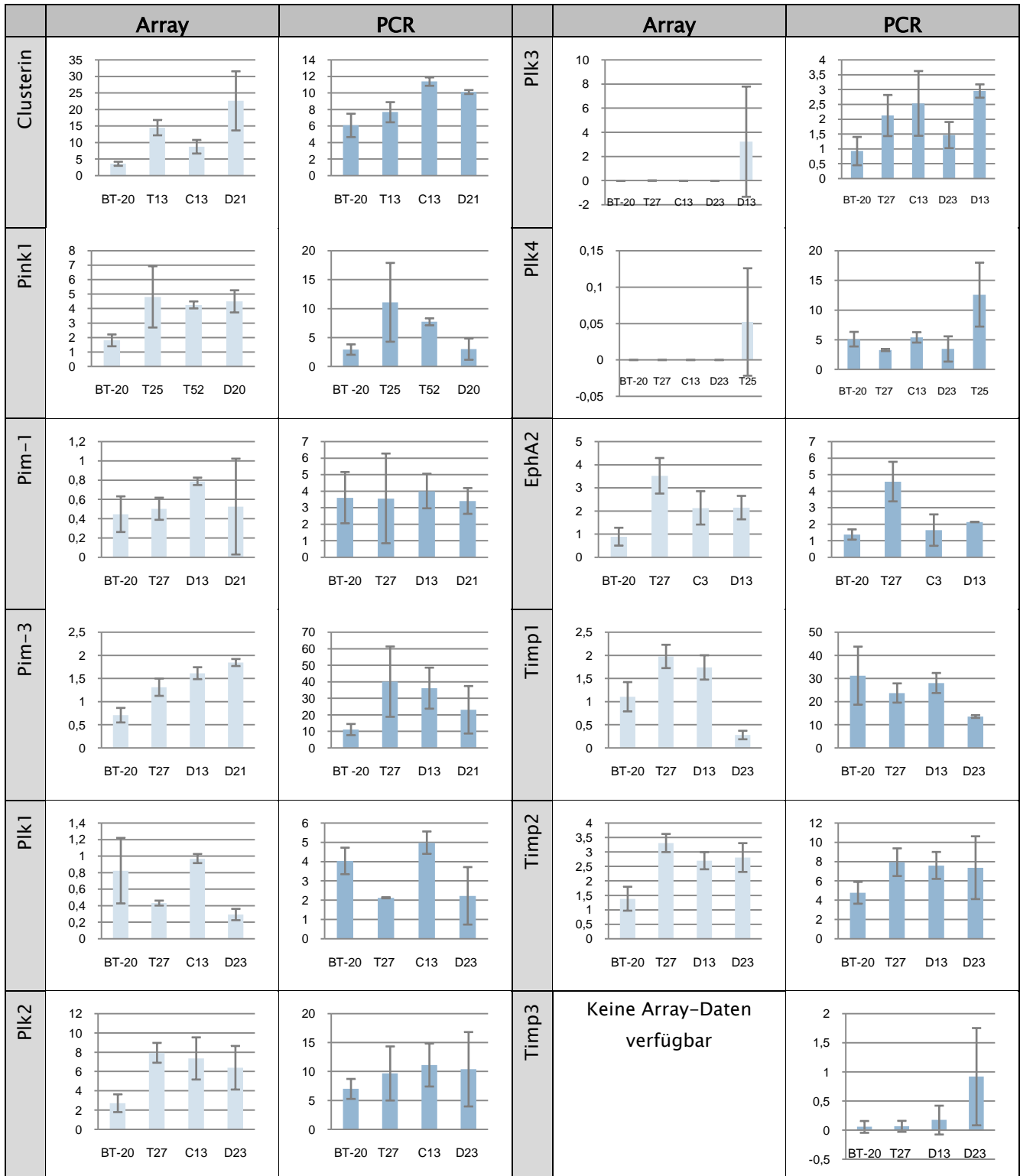
TABELLE 5: ÜBERSICHT DER sqPCR-ERGEBNISSE FÜR DIE IN DEN KLONEN HOCHREGULIERTEN GENE (GRÜN) UND ZUGEHÖRIGE GENFAMILIEN

	Klon	Array validiert	Klon	Array validiert	Klon	Array validiert	Klon	Array validiert
Clusterin	T13	+	C13	++	D21	+		
PINK1	T25	+	T52	++	D20	-		
pim-1	T27	++	D13	+	D21	++		
pim-3	T27	+	D13	++	D21	+		
PLK1	T27	++	C13	++	D23	+		
PLK2	T27	+	C13	+	D23	+		
PLK3	T27	?	C13	?	D23	?	D13	++
PLK4	T27	?	C13	?	D23	?	T25	++
EPHA2	T27	++	C3	-	D13	+		
TIMP1	T27	-	D13	-	D23	++		
TIMP2	T27	++	D13	++	D23	++		
TIMP3	T27	?	D13	?	D23	?		
TIMP4	T27	?	D13	?	D23	?		

++	+	-	?
Array-Daten validiert	Gleiche Tendenz wie in Array-Daten	andere Tendenz als in Array-Daten	Keine Array-Daten vorhanden

TABELLE 6: VALIDIERUNG DER MAKROARRAY-DATEN IN BT-20 UND KLONEN MIT sqPCR

DIE GRAPHEN ZEIGEN JEWEILS DEN MITTELWERT MIT StAW FÜR 2 cDNA-PRÄPARATIONEN DER KLONE BZW. 3 PRÄPARATIONEN FÜR BT-20. DIE WERTE DER ARRAY-ANALYSE (HELLBLAU, NORMALISIERTE INTENSITÄT AUF DER X-ACHSE) WURDEN NORMALISIERT AUF DIE TOTALINTENSITÄT DES ARRAYS, DIE DER PCR (DUNKELBLAU, NORMALSIERTE EXPRESSION AUF DER X-ACHSE) AUF DIE GAPDH-EXPRESSION. FÜR TIMP3 UND TIMP4 WAREN KEINE ARRAY-DATEN VERFÜGBAR, TIMP4 WURDE IN DEN KLONEN NICHT EXPRIMIERT (DATEN NICHT GEZEIGT).



3.1.3 Funktionelle Validierung durch Knock-down Experimente

Da die selektionierten Klone eine verminderte Sensitivität gegenüber den jeweiligen Chemotherapeutika zeigten, sollte im folgenden untersucht werden, ob und wie die überexprimierten Gene zu diesem Phänotyp beitragen. Dafür wurde als Methode der Knock-down dieser Gene mittels siRNA eingesetzt, gefolgt von der Apoptose-Induktion mit dem Chemotherapeutikum und Quantifizierung der Apoptose-Rate.

In Abbildung 16 ist die Effizienz des Knock-downs von Clusterin, das in den meisten der Klone eine erhöhte Expression zeigte, in den Klonen T13 und D21 gezeigt. Die beiden siRNAs 1 und 2 reduzierten die Clusterin mRNA auf weniger als die Hälfte der ursprünglichen Menge, siRNA 3 hingegen zeigte nahezu keinen Effekt.

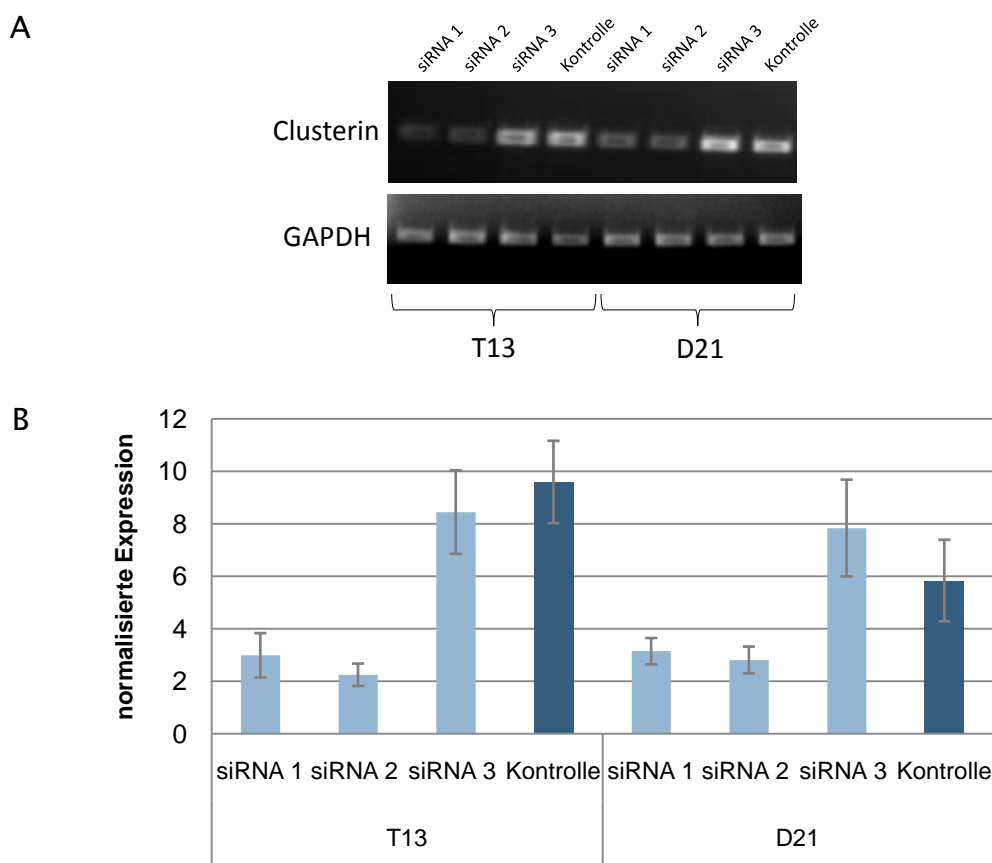


ABBILDUNG 16: KNOCK-DOWN VON CLUSTERIN MIT siRNA IN DEN KLONEN T13 UND D21

A: AGAROSE-GEL DER PCR-PRODUKTE VON CLUSTERIN UND GAPDH UND DESSEN QUANTIFIZIERUNG (**B**) MIT AIDA, NORMALISIERT AUF GAPDH. TRANSIENTE TRANSFEKTION MIT DREI VERSCHIEDENEN siRNA-SEQUENZEN FÜR CLUSTERIN.

In den mit siRNAs transfizierten Zellen wurde mit Taxotere® (für Klon T13) bzw. Doxorubicin (Klon D21) Apoptose induziert und diese nach 48 h quantifiziert. Wie in Abbildung 17 zu sehen, konnte der erwartete Anstieg der Apoptose-Rate bei verringerter Clusterin-Expression weder in Klon T13 noch in Klon D21 beobachtet werden.

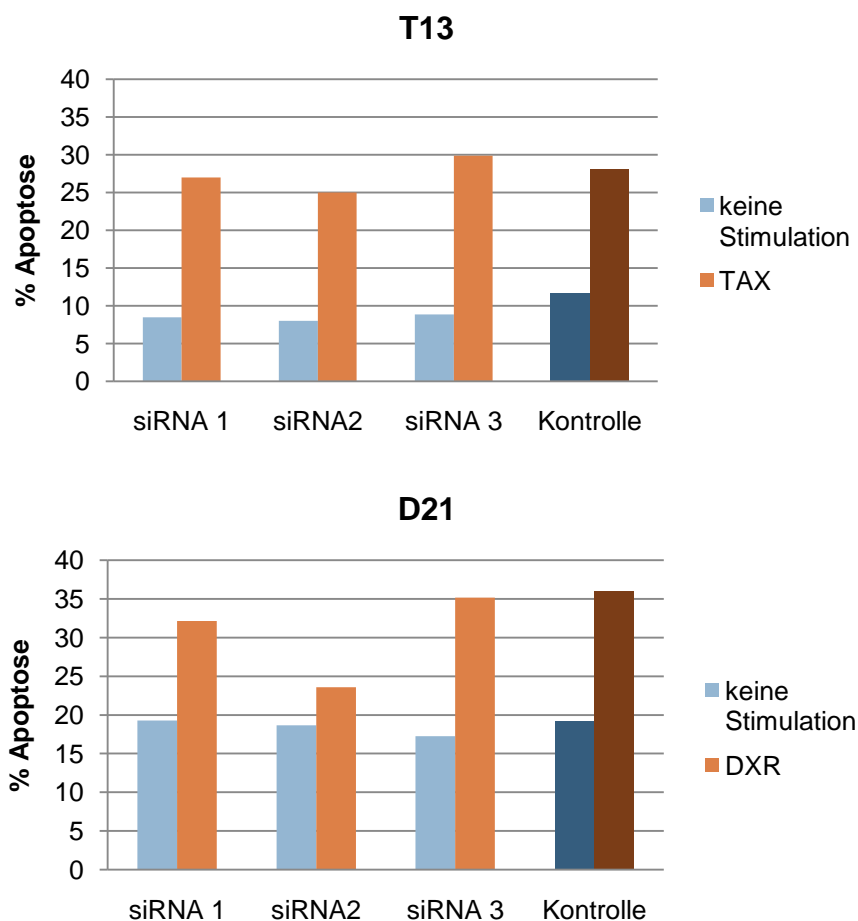


ABBILDUNG 17: BESTIMMUNG DER APOPTOSE-RATE NACH CLUSTERIN-KNOCK-DOWN

DIE ZELLEN WURDEN NACH TRANSFEKTION MIT DEN siRNAs (3 VERSCHIEDENE SEQUENZEN FÜR CLUSTERIN) MIT DEM ANGEgebenEN CHEMOTHERAPEUTIKUM BEHANDELT (TAXOTERE® (TAX) 10 nM, DOXORUBICIN (DXR) 1 µM) UND DIE APOPTOSE-RATE NACH 48 h MIT PI-FÄRBUNG UND DURCHFLUSSZYTOMETRIE QUANTIFIZIERT. % APOPTOSE ENTSPRICHT DEN ZELLEN IM SUB-G1-PEAK, QUANTIFIZIERT MIT CELLQUEST-SOFTWARE. ERGEBNISSE EINES VON ZWEI VERGLEICHBAREN EXPERIMENTEN.

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich beim Knock-down von Timp2, einem der natürlichen Inhibitoren von Matrix-Metalloproteinasen, in den Klonen D13 und T27. Trotz Reduktion des mRNA-Levels von Timp2 konnte kein Einfluss auf die Apoptose-Rate nach Induktion

mit dem jeweiligen Chemotherapeutikum gezeigt werden (Daten für D13 in Abbildung 18 und Abbildung 19).

Zusätzlich wurde für Timp2 auch der Einfluss der Apoptose-Induktion mit Doxorubicin auf dessen Expressionslevel untersucht, um zu sehen, ob die verminderte Expression in den Klonen nach Knock-down durch die Doxorubicin-Behandlung wieder ansteigt. Dies war allerdings nicht der Fall und bestätigt die Theorie der bereits vorhandenen Genexpressionsmuster in den Subklonen im Gegensatz zu kurzfristiger Induktion.

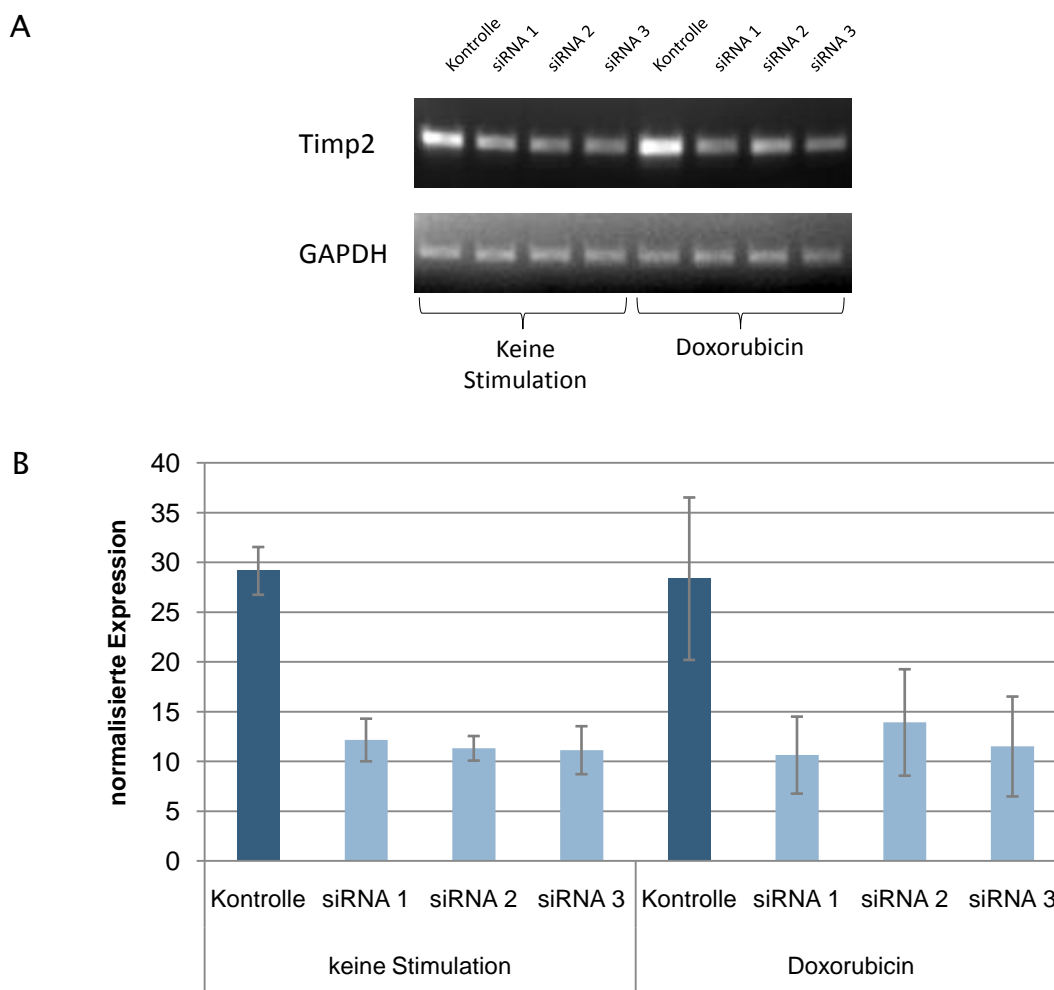


ABBILDUNG 18: KNOCK-DOWN VON TIMP2 MIT siRNA IM KLON D13

A: AGAROSE-GEL DER PCR-PRODUKTE VON TIMP2 UND GAPDH UND DESSEN QUANTIFIZIERUNG **(B)** MIT AIDA, NORMALISIERT AUF GAPDH. TRANSIENTE TRANSFEKTION MIT DREI VERSCHIEDENEN siRNA-SEQUENZEN FÜR TIMP2, RNA-EXTRAKTION MIT UND OHNE DOXORUBICIN-STIMULATION (1 μ M, 48 h)

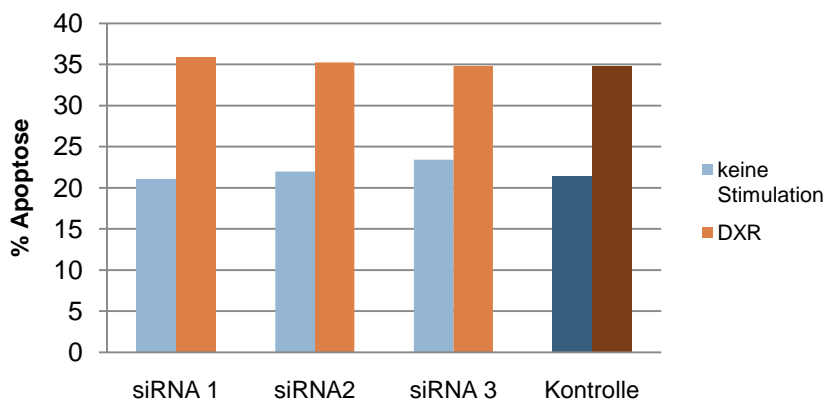


ABBILDUNG 19: BESTIMMUNG DER APOPTOSE-RATE NACH TIMP2-KNOCK-DOWN IM KLON D13

DIE ZELLEN WURDEN NACH TRANSFEKTION MIT DEN siRNAs (3 VERSCHIEDENE SEQUENZEN FÜR TIMP2) MIT DOXORUBICIN (DXR) 1 μ M BEHANDELT UND DIE APOPTOSE-RATE NACH 48 h MIT PI-FÄRBUNG UND DURCHFLUSSZYTOMETRIE QUANTIFIZIERT. % APOPTOSE ENTSpricht DEN ZELLEN IM SUB-G1-PEAK, QUANTIFIZIERT MIT CELLQUEST-SOFTWARE. ERGEBNISSE EINES VON ZWEI VERGLEICHBAREN EXPERIMENTEN.

Als drittes Gen wurde Pink1 untersucht, eine im Zusammenhang mit Parkinson beschriebene mitochondrielle Kinase. Für den Knock-down von Pink1 wurden die Klone D20, T13 und T25 sowie die Zelllinie BT-20 stabil mit shRNA-Vektoren infiziert. Nach Selektion konnte in den polyklonalen Zelllinien allerdings keine signifikante Reduktion des Pink1-Proteins nachgewiesen werden. Dementsprechend war keine signifikante Änderung der Apoptose-Rate nach Induktion mit Chemotherapeutika zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Für die Klone T13 und T25 wurden neben den infizierten polyklonalen Zellen auch monoklonale Zelllinien etabliert und auf Pink1-Expression getestet. Allerdings zeigte keiner der Klone eine signifikante Reduktion von Pink1.

Bei transienter Transfektion von Klon C10 mit Pink1 siRNA konnte ebenfalls kein Knock-down erreicht werden, da trotz Optimierung der Transfektionsbedingungen nur geringe Transfektionseffizienz erzielt wurde. Daher wurde die Expression von Pink1 in verschiedenen Zelllinien untersucht, um eine Zelllinie mit hoher endogener Pink1-Expression zu finden, für die etablierte Transfektionsbedingungen veröffentlicht sind. Die Zelllinie SCC-9 wurde transient mit Pink1 siRNA, Caki-1 transient mit Pink1 shRNA-Konstrukten transfiziert, aber es konnte kein Knock-down auf mRNA- oder Protein-Ebene erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

3.2 Charakterisierung eines validierten Kandidatengens: MMP-15

Die Suche nach neuen Angriffspunkten für molekulare, gezielte Therapien beginnt mit der Aufklärung der molekularen Mechanismen und Signalwege in Krebszellen. Wenn Kandidaten durch ihre Deregulation oder Mutation in Tumorzellen identifiziert wurden, muss ihre Signifikanz für die Entstehung oder Progression einer Krebsart validiert werden, indem die Rolle des zu untersuchenden Genprodukts in den relevanten Signalwegen genau charakterisiert wird. Dies kann durch positive oder negative Regulation des jeweiligen Gens geschehen, um die Wirksamkeit einer derartigen Therapie zu überprüfen und mögliche Nebenwirkungen abzuschätzen.

MMP-15 wurde aufgrund seiner Überexpression in verschiedenen Krebsarten und durch einige funktionelle Studien als Kandidatengens identifiziert (siehe Einleitung, 1.4 und 1.5). Insbesondere die Arbeiten zur Rolle von MMP-15 in der Apoptose (Abraham et al., 2005), die zum Teil in dieser Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, waren der Ausgangspunkt für die weiterführende Charakterisierung dieser Matrix-Metalloproteinase.

3.2.1 Untersuchung des Effektes von monoklonalen MMP-15-Antikörpern auf die Apoptose in CH-11-insensitiven HeLaS3-Klonen

Wie in der Einleitung, Kapitel 1.4 (Seite 14) beschrieben, wurde von Reimar Abraham in Klonen der Zelllinie HeLaS3, die mit dem agonistischen α -Fas-Antikörper CH-11 selektiert wurden, die Matrix-Metalloproteinase MMP-15 als antiapoptotischer Faktor identifiziert (Abraham, 2002; Abraham et al., 2005). Um MMP-15 als möglichen Angriffspunkt einer gezielten Krebstherapie weiter zu validieren, sollte der Effekt inhibitorischer monoklonaler MMP-15-Antikörper auf das Apoptose-Verhalten von MMP-15 exprimierenden Zellen untersucht werden.

3.2.1.1 HERSTELLUNG DES ANTIGENS FÜR DIE GENERIERUNG MONOKLONALER MMP-15 ANTIKÖRPER

Der Großteil des MMP-15-Proteins, unter anderem auch die katalytische Domäne, liegt außerhalb der Zelle und ragt in den extrazellulären Raum. MMP-15 bindende Antikörper könnten daher dessen Funktion inhibieren, indem sie beispielsweise sterisch die Bindung von Substraten behindern. Da für MMP-15 gezeigt wurde, dass es eine antiapoptotische Rolle in Krebszellen spielen kann, sollte untersucht werden, ob MMP-15 bindende Antikörper diese Funktion inhibieren können und damit die Apoptose in den Zellen erhöht wird.

Für die Generierung von monoklonalen Antikörpern, die MMP-15 binden können, sollten Ratten mit MMP-15 überexprimierenden Zellen und aufgereinigtem MMP-15-Protein immunisiert werden.

3.2.1.1.1 Überexpression von MMP-15 in Rat-1

Für die Immunisierung mit ganzen Zellen wurden Ratten-Fibroblasten (Rat-1) stabil mit MMP-15 infiziert und monoklonale Zelllinien etabliert. Unter den Klonen konnten Klon 3 und Klon 27 als Klone mit der höchsten Expression im Westernblot identifiziert werden (siehe Abbildung 20).

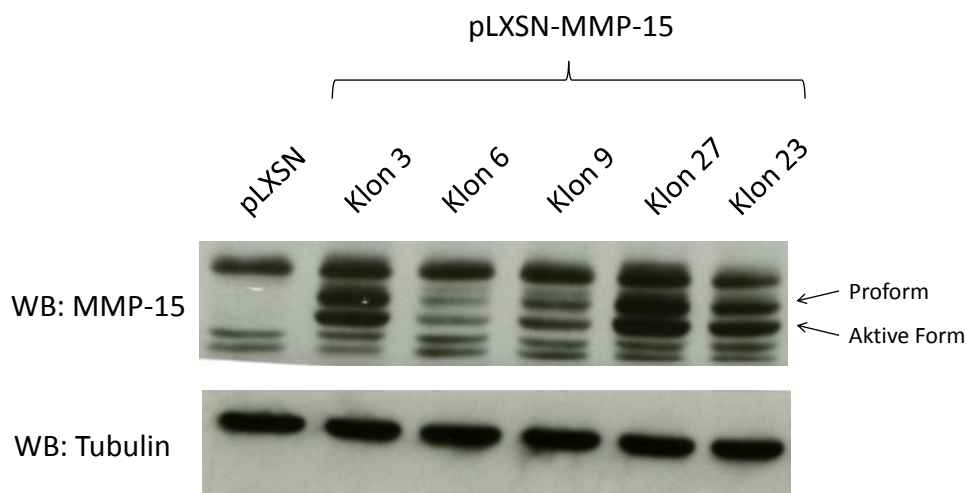


ABBILDUNG 20: STABILE MMP-15 EXPRESSION IM WESTERNBLOT NACH INFEKTION VON RAT-1-ZELLEN

Da für die Immunisierung im Besonderen die Menge an MMP-15-Protein an der Zelloberfläche relevant ist, wurde für die Rat-1 Klone eine Quantifizierung der Oberflächen-Expression mit Hilfe eines FITC-gekoppelten Antikörpers durchgeführt. Dabei korrelierten diese Daten größtenteils mit den Expressionslevels im Westernblot (siehe Abbildung 21).

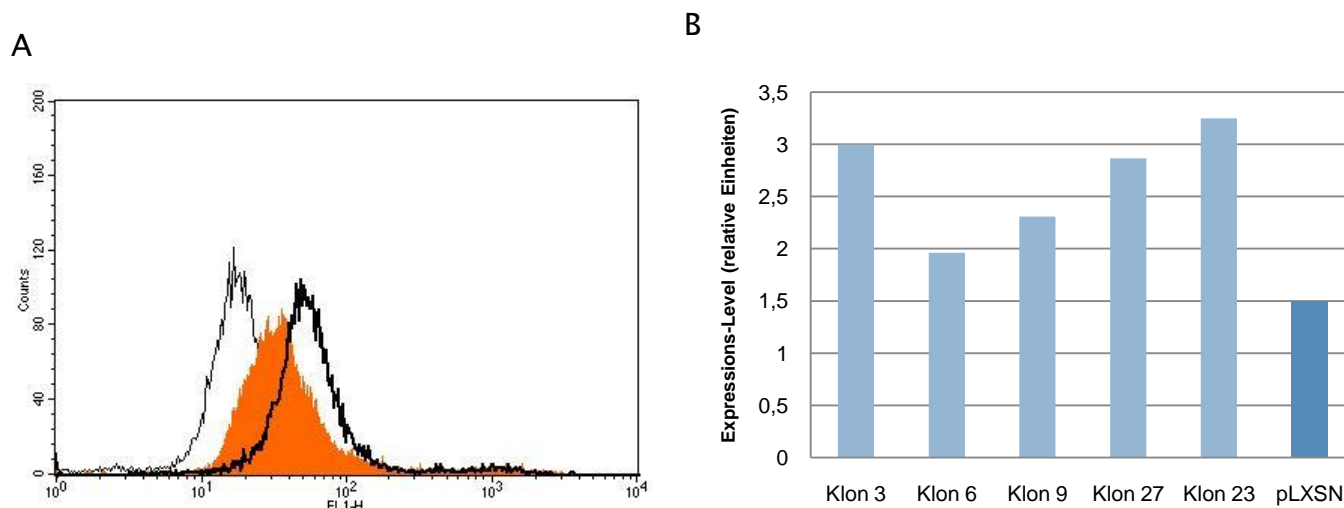


ABBILDUNG 21: QUANTIFIZIERUNG DER ZELLOBERFLÄCHENEXPRESSION VON MMP-15 IN RAT-1-KLONEN

DIE ZELLEN WURDEN NACH INKUBATION MIT FITC-GEKOPPELTEM MMP-15-ANTIKÖRPER MIT DURCHFLUSSZYTOMETRIE ANALYSIERT. EINE VERSCHIEBUNG DES PEAKS NACH RECHTS STEHT FÜR EINE ERHÖHTE EXPRESSION.

A: FACS-DIAGRAMM FÜR DEN KLON 3, FL-1: KANAL FÜR FITC, REPRÄSENTIERT DIE INTENSITÄT DER FÄRBUNG PRO ANALYSIRTER ZELLE, SCHWARZE KURVEN: KLON 3, DÜNN: ISOTYP-KONTROLLE, FETT: MMP-15-ANTIKÖRPER, ORANGE: POLYKLONALE ZELLEN MIT LEERVEKTOR INFIZIERT. **B:** QUANTIFIZIERUNG DER PEAKS MIT CELLQUEST-SOFTWARE (SIEHE 2.4.3.2).

Um die Expression weiter zu erhöhen, wurden die Klone 3 und 27 ein zweites Mal mit MMP-15-Konstrukten infiziert. Dies führte jedoch nicht zu einer Zunahme der Expression im Westernblot oder Oberflächen-Färbung (Daten nicht gezeigt).

Für die Immunisierung wurden 9×10^6 Zellen des Klons 3 eingesetzt (Helmholtz-Zentrum München).

3.2.1.1.2 Aufreinigung von MMP-15 Protein

Parallel zu der Immunisierungsstrategie mit ganzen Zellen sollte MMP-15-Protein für eine weitere Immunisierung aufgereinigt werden. Dafür wurde ein Expressionskonstrukt im pcDNA3-Vektor kloniert, das nur den extrazellulären Teil von MMP-15 (AS 1-625) enthält und somit das Produkt in den Medienüberstand abgegeben wird. Außerdem enthält es eine Mutation im aktiven Zentrum der katalytischen Domäne (E260A) und trägt C-terminal einen GST-Tag (Glutathion-S-Transferase) für die Aufreinigung (pcDNA3-MMP-15excE260A-GST, siehe Abbildung 22).

HEK293 Zellen wurden transient mit MMP-15excE260A-GST transfiziert und der Medienüberstand gesammelt. Dieser wurde mit Glutathion-Sepharose inkubiert, die das sezernierte GST-Fusionsprotein binden kann. Wie im Westernblot und Coomassie-Gel zu sehen (Abbildung 23), konnte das MMP-15 Protein sauber aufgereinigt werden. Allerdings konnte nicht die gesamte Menge an die Sepharose binden, was an MMP-15 im Durchfluss sichtbar war.

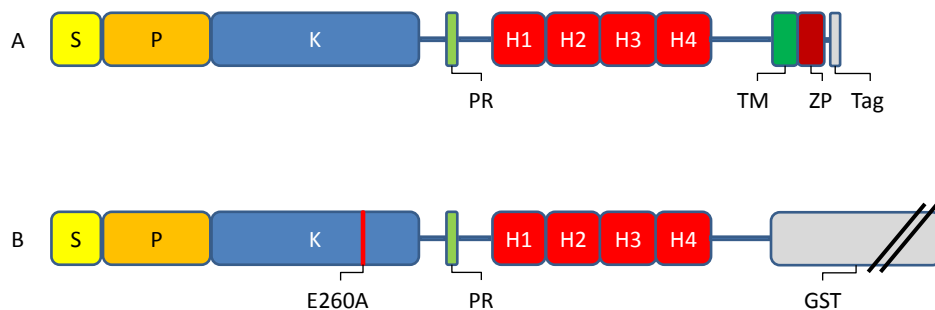


ABBILDUNG 22: MMP-15 KONSTRUKT FÜR DIE AUFREINIGUNG DES MMP-15 PROTEINS

A: AUSGANGSKONSTRUKT WILDTYP MIT MYC/HIS-TAG (TAG), **B:** INSERT MMP-15excE260A-GST OHNE TRANSMEMBRAN (TM) UND ZYTOPLASMATISCHE DOMÄNE (ZP) UND MIT GST-TAG (NICHT MASSSTABSGETREU). S: SIGNALPEPTID, P: PRODOMÄNE, K: KATALYTISCHE DOMÄNE, PR: PROLIN-REICHE REGION, H1-H4: HEMOPEXIN-ÄHNLICHE DOMÄNEN.

Zur Elution des nativen Proteins von der Glutathion-Sepharose wurde Glutathion-Puffer laut Herstellerangaben verwendet. Da das Protein trotz Optimierung der Bedingungen nicht vollständig eluiert werden konnte, wurde zur Immunisierung das Protein, gekoppelt an die Sepharose, eingesetzt.

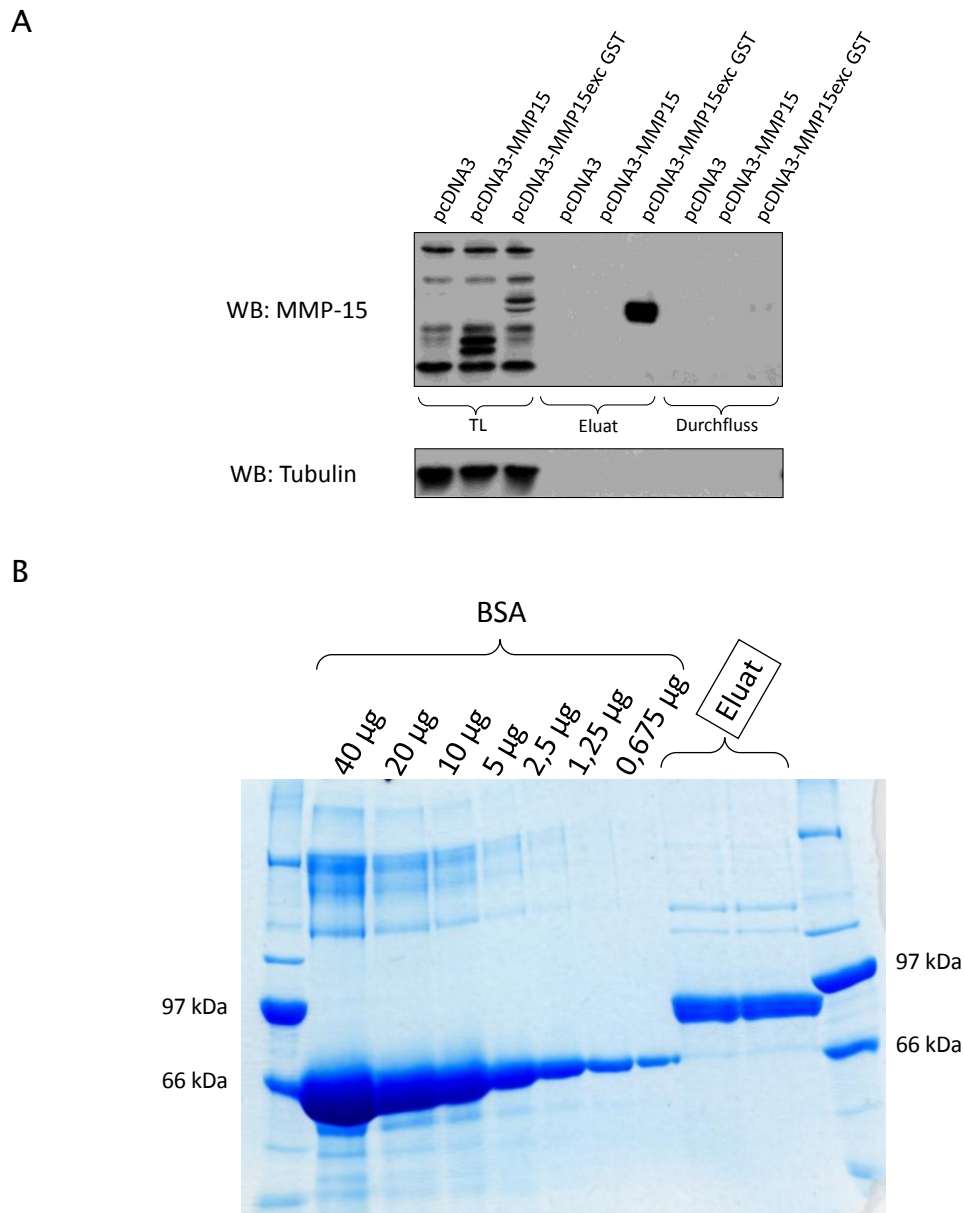
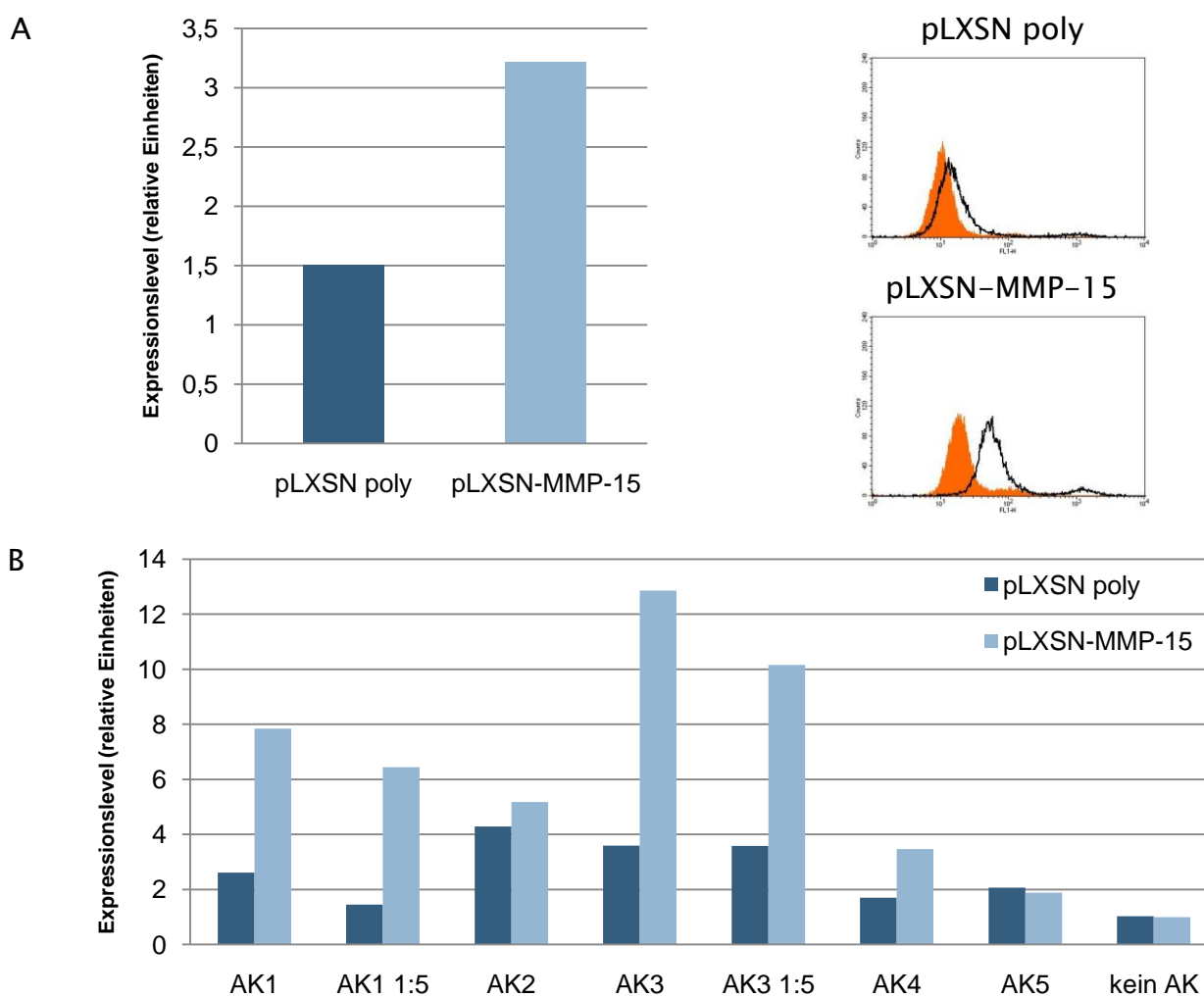


ABBILDUNG 23: AUFREINIGUNG VON MMP-15excE260A-GST NACH EXPRESSION IN HEK293

A: WESTERNBLOT NACH TRANSIENTER TRANSFEKTION VON HEK293 UND BINDUNG AN GLUTATHION-SEPHAROSE, pcDNA3: LEER-VEKTOR, TL: TOTALLYSAT, ELUAT: ELUIERT DURCH KOCHEN MIT LÄMMLI-PUFFER, DURCHFLOSS: ÜBERSTAND NACH INKUBATION MIT DER SEPHAROSE, **B:** COOMASSIE-GEL MIT BSA-MENGEN-STANDARD UND ELUAT VON 1/50 DER SEPHAORSE FÜR DIE IMMUNSIERUNG ZUR MENGENABSCHÄTZUNG.

3.2.1.2 TEST DER HYBRIDOMA-ÜBERSTÄNDE

Erst nach mehreren Fusionen konnten kurz vor Ende dieser Arbeit noch 5 Hybridoma-Klone isoliert werden, deren Überstände mittels ELISA positiv auf MMP-15-Bindung getestet wurden (durchgeführt von AG Kremmer, Helmholtz-Zentrum München). Um die Bindung dieser Antikörper an natives Protein zu testen, wurde eine Zelloberflächenfärbung mit Rat-1 pLXSN (Leervektor) Zellen und pLXSN-MMP-15 Klon 3 mit den Überständen durchgeführt. Wie in Abbildung 24 gezeigt, konnte für Antikörper 1 und 3 eine Zunahme des Signales bei den MMP-15 überexprimierenden Zellen, auch bei einer 1:5-Verdünnung, nachgewiesen werden.



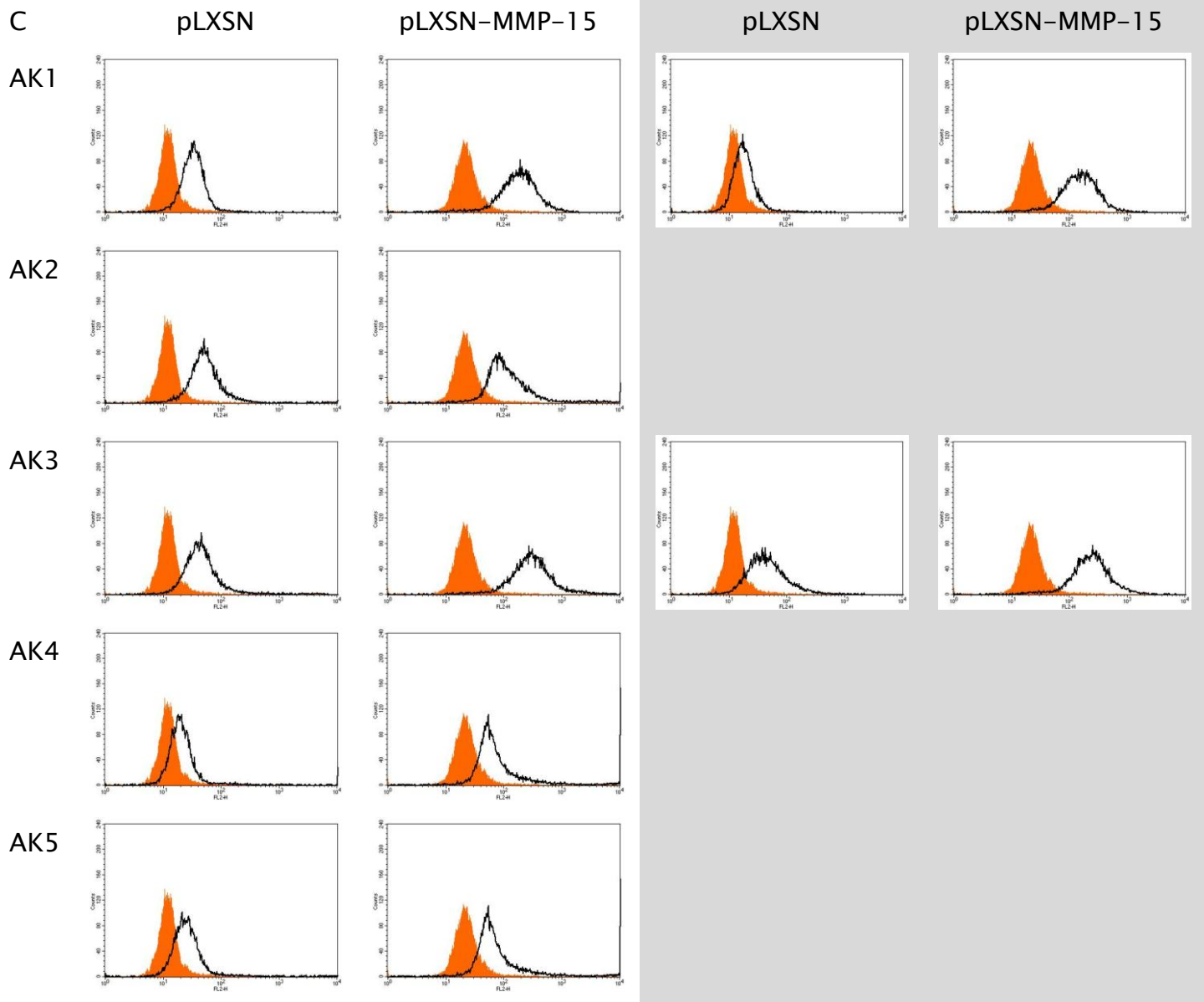


ABBILDUNG 24: ZELLOBERFLÄCHENFÄRBUNG VON RAT-1 ZELLEN ZUM TEST DER HYBRIDOMA-ÜBERSTÄNDE

A: POSITIV-KONTROLLE MIT KOMMERZIELLEM MMP-15-ANTIKÖRPER (IC9161F), **B:** TEST DER ÜBERSTÄNDE DER 5 HYBRIDOMA-KLONE (AK1-5) PUR BZW. IN 1:5-VERDÜNNUNG, QUANTIFIZIERUNG MIT CELLQUEST-SOFTWARE, **C:** FACS-DIAGRAMME FÜR AK1-5 PUR BZW. IN 1:5-VERDÜNNUNG (GRAU HINTERLEGT).

Die weitere Charakterisierung bzw. die Aufreinigung des Antikörpers konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden und sind Teil eines Folge-Projektes. Daher

wurde vorab stellvertretend das geplante Experiment zur Wirkung von MMP-15-Antikörpern auf die Apoptose in den HeLaS3-Klonen mit einem kommerziellen Antikörper durchgeführt.

3.2.1.3 EFFEKT KOMMERZIELLER ANTIKÖRPER AUF HELAS3-KLONE

Dafür wurden HeLaS3 Zellen sowie der selektionierte Klon 58, der MMP-15 überexprimiert, mit einem kommerziellen MMP-15-Antikörper inkubiert, bevor und während Apoptose mit CH-11 induziert wurde. Wie in Abbildung 25 gezeigt, konnte mit diesem Antikörper allerdings kein signifikanter Unterschied in der Apoptose-Rate nachgewiesen werden.

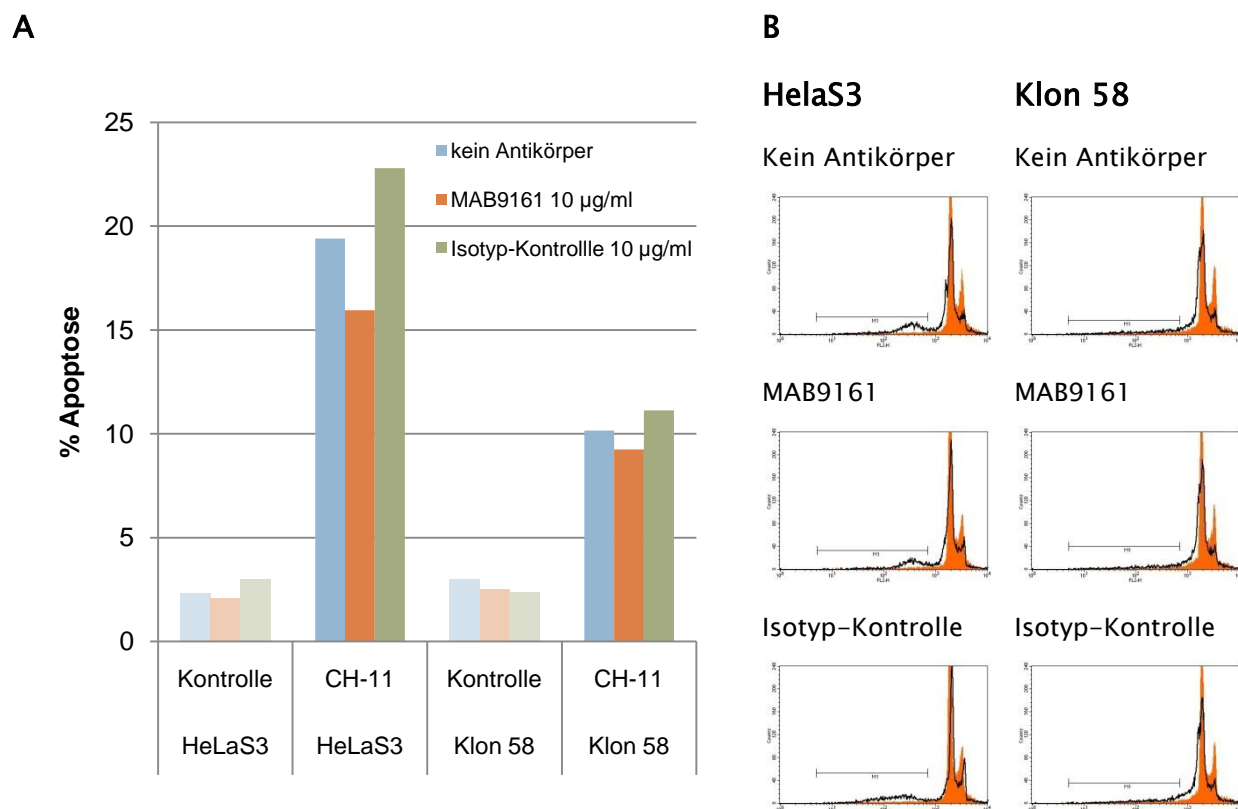


ABBILDUNG 25: APOPTOSE IN HELAS3 UND KLON 58 MIT MMP-15 ANTIKÖRPER

BESTIMMUNG DER APOPTOSE-RATE MIT PI-FÄRBUNG UND DURCHFLUSSZYTOMETRIE, GEZEIGT SIND DIE DATEN EINES VON DREI VERGLEICHBAREN EXPERIMENTEN. **A:** % APOPTOSE ENTSPRICHT DEN ZELLEN IM SUB-G1-PEAK, QUANTIFIZIERT MIT CELLQUEST-SOFTWARE, CH-11: AGONIST. ANTI-FAS-ANTI-KÖRPER, MAB9161: ANTI-MMP-15-ANTI-KÖRPER (R&D-SYSTEMS), 10 µg/ml, **B:** FACS-DIAGRAMME, FL-2: KANAL FÜR PROPIDIUM-IODID, REPRÄSENTIERT DEN DNA-GEHALT PRO ANALYSIRTER ZELLE, M1: SUB-G1-PEAK, ORANGE: UNINDUZIERTE KONTROLLE, SCHWARZ: INDUZIERT MIT 100 ng/ml CH-11 FÜR 40 h.

3.2.2 Funktionelle Untersuchung von MMP-15 in verschiedenen Zellsystemen nach Überexpression

Um die Rolle von MMP-15 genauer zu charakterisieren wurden Zellsysteme mit MMP-15 Überexpression etabliert. Neben den für die Antikörper-Generierung hergestellten Rat-1 und HEK293 Zellen wurden die Brustkrebszelllinien SK-BR-3 und BT-474 sowie MCF10A als normale Brustepithelzelllinie mit MMP-15 infiziert. Als Kontrolle wurde MMP-15 außerdem erneut in der Zelllinie HeLaS3 überexprimiert.

3.2.2.1 VERWENDETE MMP-15 KONSTRUKTE

Zusätzlich zu den für die Antigen-Herstellung verwendeten MMP-15 Konstrukten (siehe Abbildung 22) wurden weitere Konstrukte für die Überexpression in den verschiedenen Zelllinien erstellt. Die Wildtyp-Sequenz wurde durch gezielte Punktmutagenese an folgenden Stellen verändert:

- E260A: katalytisch inaktive Mutante
- D596G: natürlich vorkommender Polymorphismus (Morrison et al., 2001; Sjoblom et al., 2006a)
- G609R: natürlich vorkommender Polymorphismus (refSNP ID: rs3743563 in der NCBI Datenbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> und (Abraham et al., 2005)

Diese drei Mutanten sowie der Wildtyp (siehe Abbildung 26) wurden sowohl im pLXSN- als auch im pcDNA3-Vektor kloniert. Die pLXSN-Konstrukte wurden für die stabilen Infektionen (HeLaS3, Rat-1, MCF10A, SK-BR-3, BT-474), die pcDNA3-Konstrukte für transiente Überexpression (BT-474, HEK293) eingesetzt.

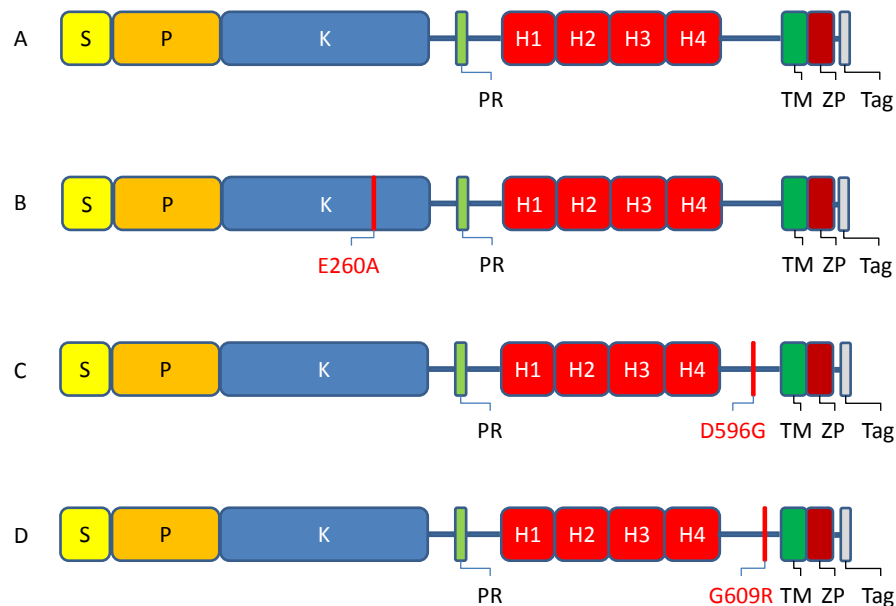


ABBILDUNG 26: MMP-15 KONSTRUKTE FÜR DIE ÜBEREXPRESSION IN VERSCHIEDENEN ZELLINIEN (INSERT IN pcDNA3 BZW. pLXSN)
 ÜBERSICHT DER DOMÄNENSTRUKTUR VON MMP-15 WT (A) UND LOKALISATION DER MUTATIONEN E260A (B), D596G (C) UND G609R (D). S: SIGNALPEPTID, P: PRODOMÄNE, K: KATALYTISCHE DOMÄNE, PR: PROLIN-REICHE REGION, H1-H4: HEMOPEXIN-ÄHNLICHE DOMÄNEN, TM: TRANSMEMBRAN-DOMÄNE, ZP: ZYTOPLASMATISCHE DOMÄNE, TAG: MYC/HIS-TAG.

3.2.2.2 MMP-15 IN RAT-1

Die für die Immunisierung generierten Rat-1 Klone mit MMP-15 Überexpression wurden auch für funktionelle Experimente zur Charakterisierung der Rolle von MMP-15 verwendet.

Um den Einfluss von MMP-15 auf die Apoptose in diesem Zellsystem zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin behandelt und die Apoptose-Rate quantifiziert. Die Induktion mit einem agonistischen Fas-Antikörper (wie in (Abraham et al., 2005) für HeLaS3) war in diesem Fall nicht möglich, da Rat-1 Zellen insensitiv gegenüber Fas-vermittelter Apoptose sind (Hueber et al., 1997). Doxorubicin dagegen kann Apoptose in Rat-1 Zellen auslösen (Han et al., 1997; Schäfer et al., 2004; Soucie et al., 2001).

Um den Effekt von MMP-15 bei Doxorubicin-induzierter Apoptose zu überprüfen, wurden auch HeLaS3 Zellen und die mit CH-11 selektionierten Klone mit Doxorubicin behandelt. Als qualitativer Apoptose-Nachweis gilt die Aktivierung der Effektor-Caspase-3 durch Spaltung des inaktiven Zymogens. Dies kann im Westernblot sichtbar gemacht werden. Wie in Abbildung 27 zu sehen, kann in HeLaS3 und den selektionierten Klonen 14, 36 und 58 Apoptose durch Doxorubicin ausgelöst werden. Dabei ist die Menge an aktiver Caspase-3 in den Klonen leicht erhöht, da die geladene Proteinmenge aufgrund größerer Zellzahl bei der Lyse der Klone höher war (siehe Tubulin-Reblot).

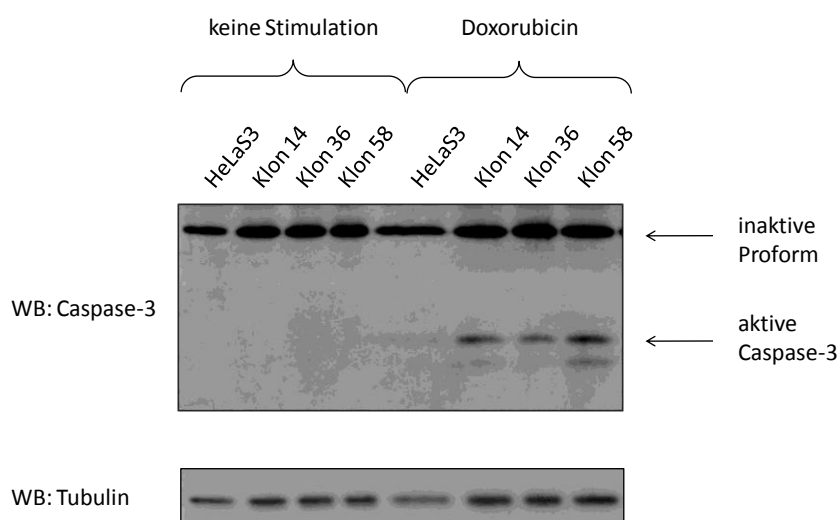


ABBILDUNG 27: CASPASE-3 AKTIVITÄT NACH INDUKTION MIT DOXORUBICIN IN HELAS3 UND SELEKTIONIERTE KOLONEN

DIE ZELLEN WURDEN 24 h NACH DEM AUSSÄEN MIT 1 μ M DOXORUBICIN BEHANDELT UND NACH 24 h LYSIERT. TUBULIN ALS LADEKONTROLLE.

Für die quantitative Bestimmung der Apoptose wurde außerdem eine PI-Färbung mit anschließender Durchflusszytometrie durchgeführt. Es konnten dabei geringe Unterschiede in der Apoptose-Rate gefunden werden (siehe Abbildung 28), die allerdings nicht so signifikant waren wie nach Apoptose-Induktion mit CH-11.

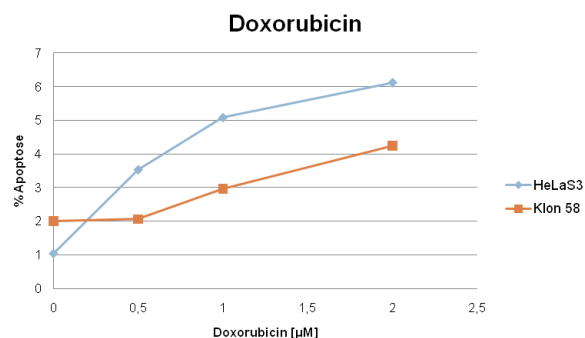
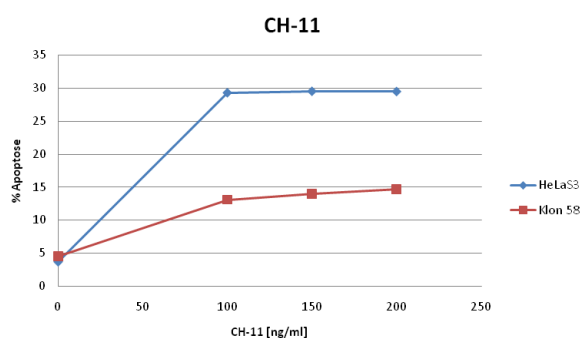
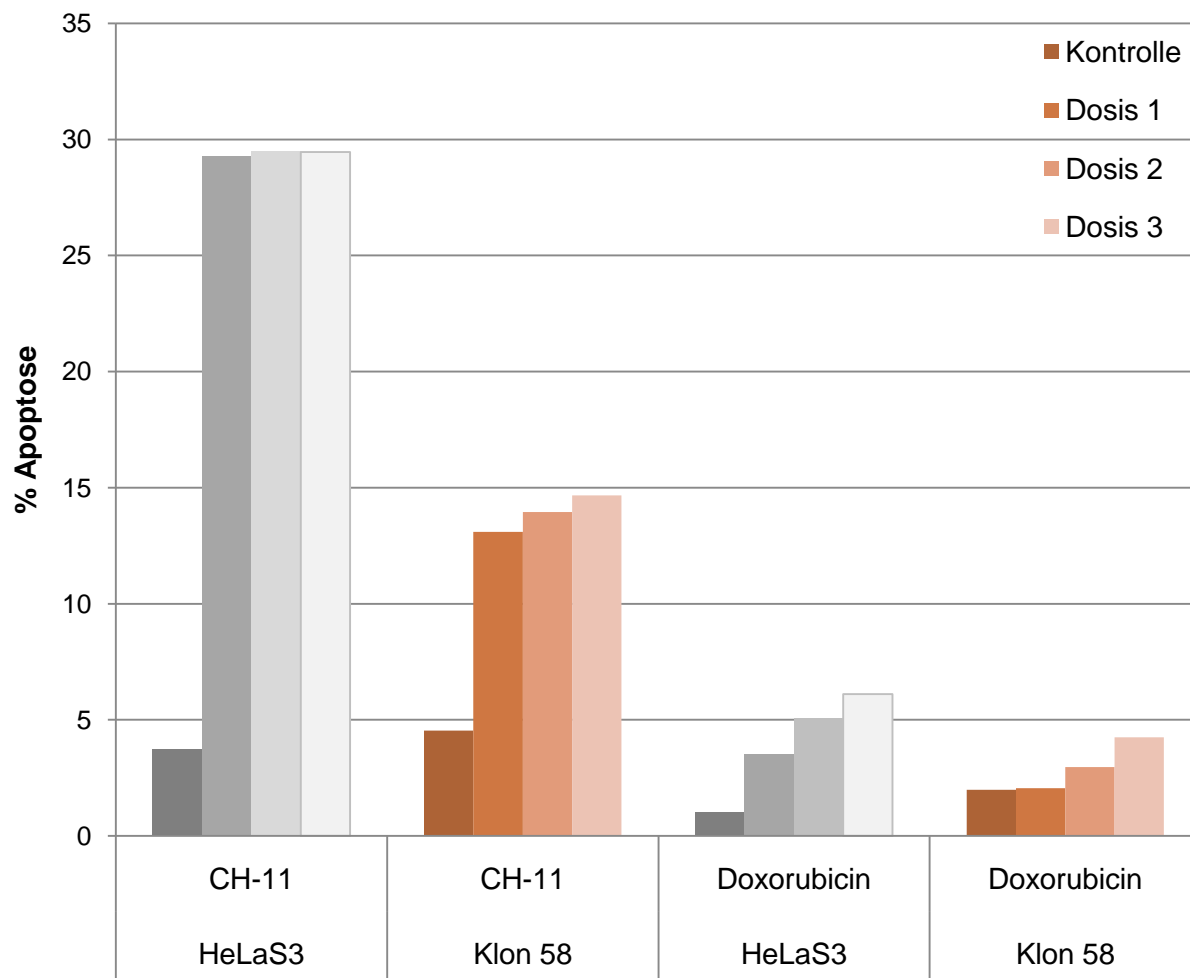


ABBILDUNG 28: APOPTOSE IN HELAS3 UND DEM SELEKTIONIERTEM KLON 58 NACH INDUKTION MIT CH-11 UND DOXORUBICIN

DIE ZELLEN WURDEN 24 h NACH DEM AUSSÄEN MIT DER ANGEGEBENEN DOSIS BEHANDELT (FÜR CH-11: 100 ng/ml, 150 ng/ml UND 200 ng/ml NACH 9 h HUNGERN, FÜR DOXORUBICIN 0,5 µM, 1,0 µM UND 2,0 µM) UND DIE APOPTOSE-RATE NACH 48 h MIT PI-FÄRBUNG UND DURCHFLUSSZYTOMETRIE QUANTIFIZIERT. % APOPTOSE ENTSPRICHT DEN ZELLEN IM SUB-G1-PEAK, QUANTIFIZIERT MIT CELLQUEST-SOFTWARE.

Für das analoge Experiment in der Zelllinie Rat-1 wurden polyklonale Zellen mit Leervektor (pLXSN) sowie zwei Klone mit Leervektor (pLXSN 15 und 16) und die beiden Klone mit der höchsten MMP-15-Expression (pLXSN-MMP-15 3 und 27) untersucht. In zwei von drei unabhängigen Experimenten zeigten die beiden MMP-15 Klone eine geringere Apoptose-Rate als pLXSN und pLXSN 15. Die absoluten Werte, bedingt durch die relativ hohe Variabilität dieses Assays, schwanken allerdings so stark, dass der Mittelwert über alle drei Experimente eine zu hohe Standardabweichung aufweist, um eine signifikante Verringerung der Apoptose-Rate zu belegen. Stellvertretend ist eines der drei Experimente in Abbildung 29 gezeigt.

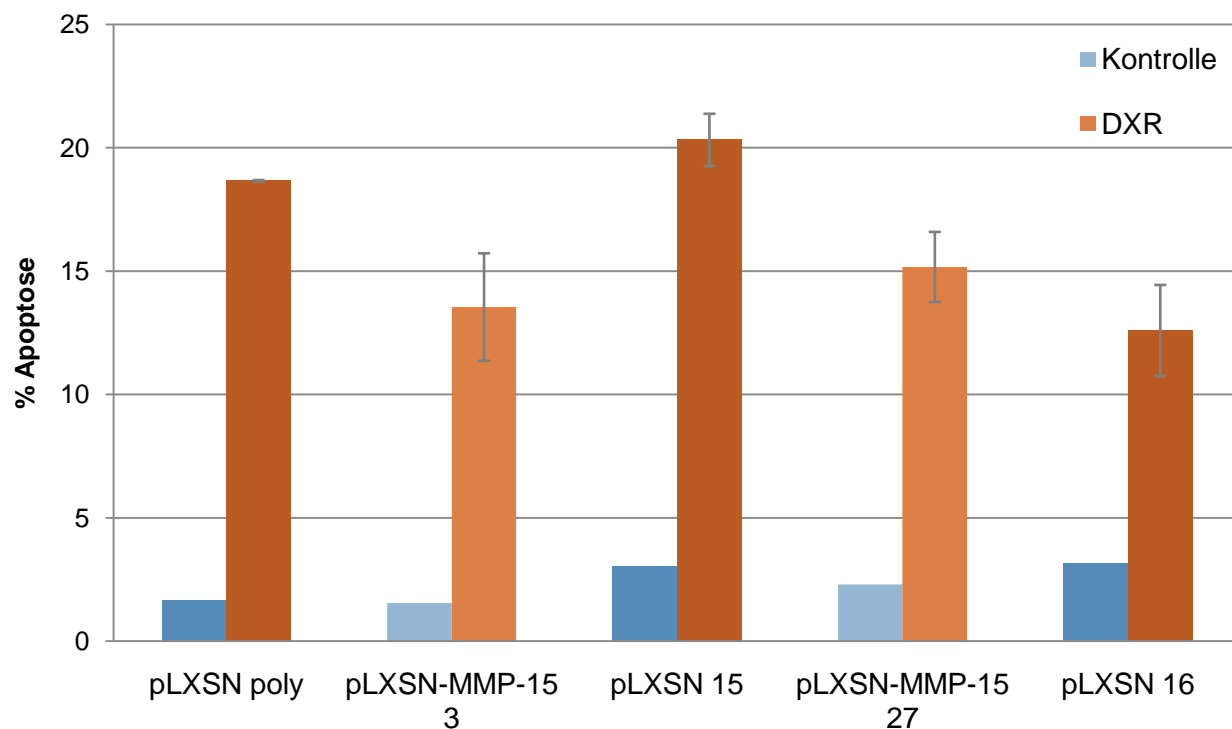


ABBILDUNG 29: APOPTOSE IN RAT-1 MMP-15 KLONEN NACH INDUKTION MIT DOXORUBICIN

DIE ZELLEN WURDEN 24 h NACH DEM AUSSÄEN (1×10^5 ZELLEN PRO 6-LOCH-PLATTE) MIT $0,5 \mu\text{M}$ DOXORUBICIN (DXR) BEHANDELT (DUPLIKAT) UND DIE APOPTOSE-RATE NACH 48 h MIT PI-FÄRBUNG UND DURCHFLUSSZYTOMETRIE QUANTIFIZIERT. % APOPTOSE ENTSPRICHT DEN ZELLEN IM SUB-G1-PEAK, QUANTIFIZIERT MIT CELLQUEST-SOFTWARE. DATEN EINES VON DREI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN.

Neben dem Einfluss auf die induzierte Apoptose, die der Hauptfokus dieser Arbeit war, sollte auch die Rolle von MMP-15 in anderen zellulären Prozessen untersucht werden, um dieses Protein genauer zu charakterisieren. Im Hinblick auf die Beteiligung von MMP-15 in Krebserkrankungen sind das im Speziellen das Zellwachstum und die Möglichkeit, Zellen *in vitro* zu transformieren.

Als Methode, um ein Gen auf transformierende Aktivität zu untersuchen, gilt der sogenannte Focus Formation Assay (siehe Material und Methoden, 2.4.4). Dabei wird untersucht, ob die Zellen nach Überexpression des entsprechenden Gens während des Wachstums in der Zellkulturschale ihre Kontaktinhibition verlieren und in mehreren Schichten übereinander wachsen. Diese Foci können durch Anfärbung mit Kristallviolett sichtbar gemacht werden.

Für den Focus Formation Assay wurde MMP-15 in NIH3T3 Zellen (Maus-Fibroblasten) durch Infektion überexprimiert (siehe Abbildung 30 A). Als Positivkontrolle für die Bildung von Foci wurden zusätzlich Zellen mit den Onkogenen src und Her2 infiziert. Nach 29 Tagen Wachstum zeigte die Färbung mehrschichtiges Zellwachstum auf der gesamten Platte in den src-Zellen und einige einzelne Foci in der Her2-Kontrolle. MMP-15 führte auch nach 40 Tagen nicht zur Bildung von Foci (siehe Abbildung 30 B).

Um die Anzahl der positiv infizierten Zellen in der Population zu erhöhen, wurden die Zellen außerdem vor dem Assay über 8 Passagen mit dem Antibiotikum G418 selektioniert. Im Falle von Her2 führte das zu einer signifikanten Zunahme der Foci-Anzahl (Färbung bereits nach 15 Tagen) trotz ähnlichem Her2-Level im Westernblot. Die MMP-15 Expression dagegen nahm leicht ab und induzierte wiederum keine Foci Bildung (Färbung nach 40 Tagen).

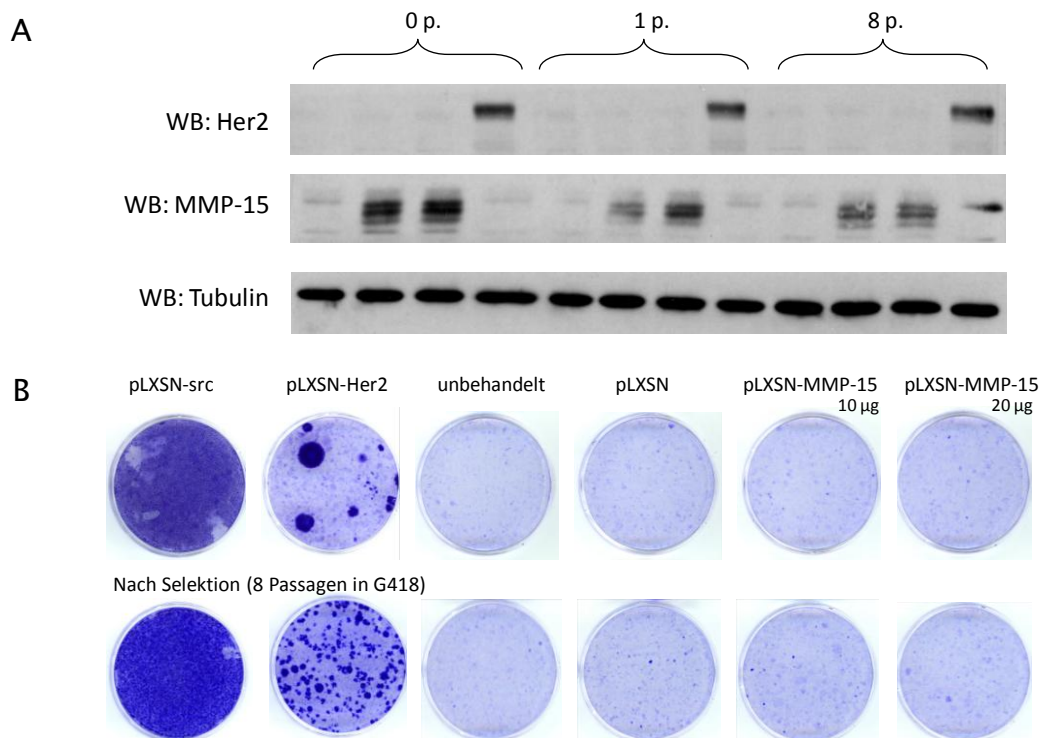


ABBILDUNG 30: FOCUS FORMATION ASSAY IN NIH3T3 NACH INFEKTION MIT MMP-15

A: EXPRESSION NACH RETROVIRALER INFEKTION MIT HER2 UND MMP-15 IM WESTERNBLOT. UNTERSUCHT WURDEN ZELLEN DIREKT NACH DER INFEKTION (0 P.) SOWIE NACH EINER PASSAGE (1 P.) UND 8 PASSAGEN (8 P.) IN SELEKTIONSMEDIUM (G418). TUBULIN ALS LADEKONTROLLE.

B: FOCI NACH FÄRBUNG MIT KRISTALLVIOLETT, SRC UND HER2 ALS POSITIV-KONTROLLEN, UNBEHANDELT UND LEER-VEKTOR (pLXSN) ALS NEGATIVKONTROLLEN. AUSGESÄT DIREKT NACH DER INFEKTION (OBERE REIHE) BZW. NACH SELEKTION IN G418 (UNTERE REIHE).

Rat-1 Zellen wurden wegen ihrer geringen Neigung zur Bildung von Foci ebenfalls bereits in vielen Experimenten zur *in vitro* Transformation nach Überexpression von potentiellen Onkogenen eingesetzt (Reynolds et al., 1987). Daher wurde dieser Versuch auch mit den selektierten Rat-1 Klonen durchgeführt. Dafür wurden polyklonal infizierte Zellen mit MMP-15 wt, die MMP-15 Klone 3, 6, 9 sowie 27 und polyklonal infizierte Zellen mit der inaktiven MMP-15 Mutante E260A sowie die drei Klone 23, 33 und 34 konfluent ausgesät und nach 35 bis 38 Tagen Wachstum mit Kristallviolett angefärbt. Wie in Abbildung 31 gezeigt, scheint die Bildung von Foci nicht vom Expressionslevel an MMP-15 oder der katalytischen Aktivität abzuhängen, sondern ist in diesem Fall wahrscheinlich durch klonale Effekte bedingt.

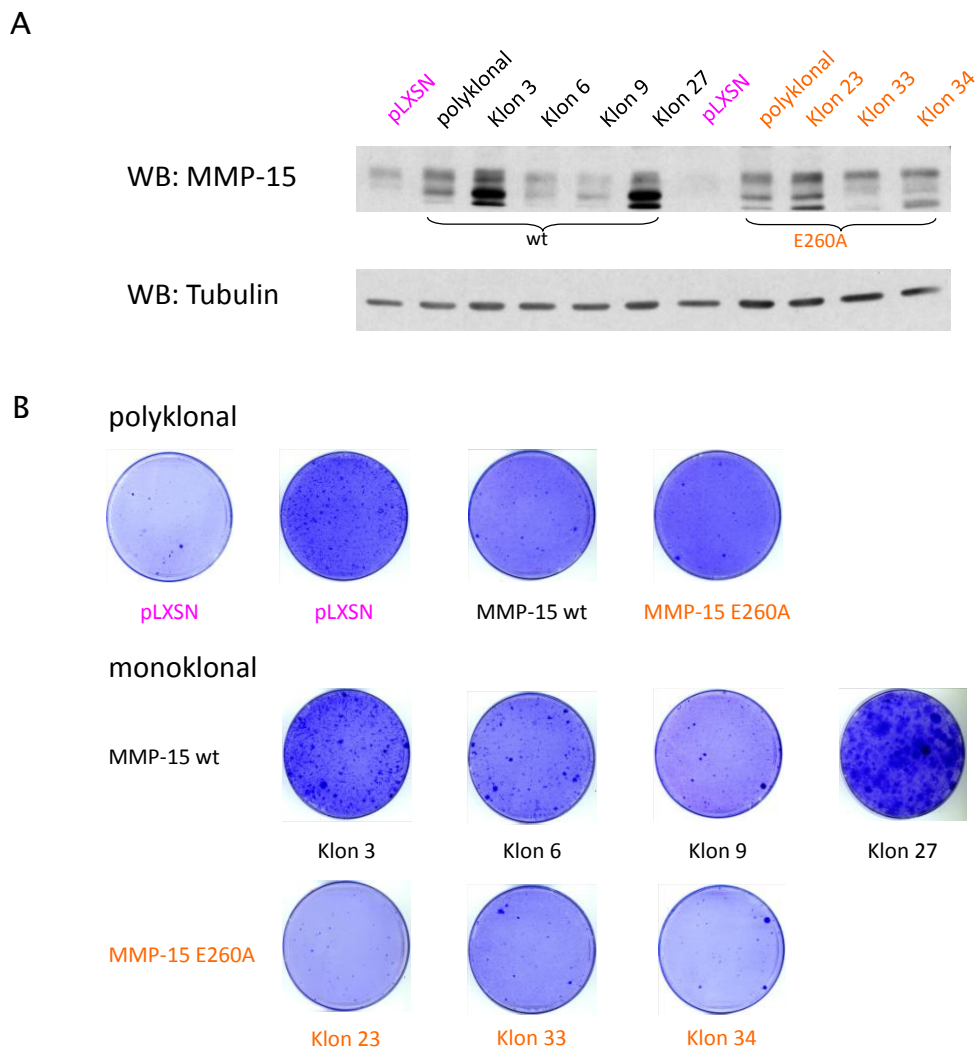


ABBILDUNG 31: FOCUS FORMATION ASSAY IN RAT-1 MMP-15 KLONEN

A: EXPRESSION VON MMP-15 DER KLONE IM WESTERNBLOT, WT: MMP-15 WILDTYPE, E260A: INAKTIVE MUTANTE VON MMP-15.

B: FÄRBUNG MIT KRISTALLVIOLETT NACH 35-38 TAGEN WACHSTUM.

Für die Charakterisierung des Einflusses von MMP-15 auf das Zellwachstum wurden Wachstumskurven für mehrere Klone mit Leervektor, MMP-15-wt und der Mutante E260A sowie polyklonale Zelllinien erstellt. In den beiden unabhängigen Experimenten zeigte sich keine signifikante Abhängigkeit der Wachstumsrate von der MMP-15 Expression (Abbildung 32). Die Unterschiede der Klone sind wiederum vermutlich auf klonale Effekte zurückzuführen.

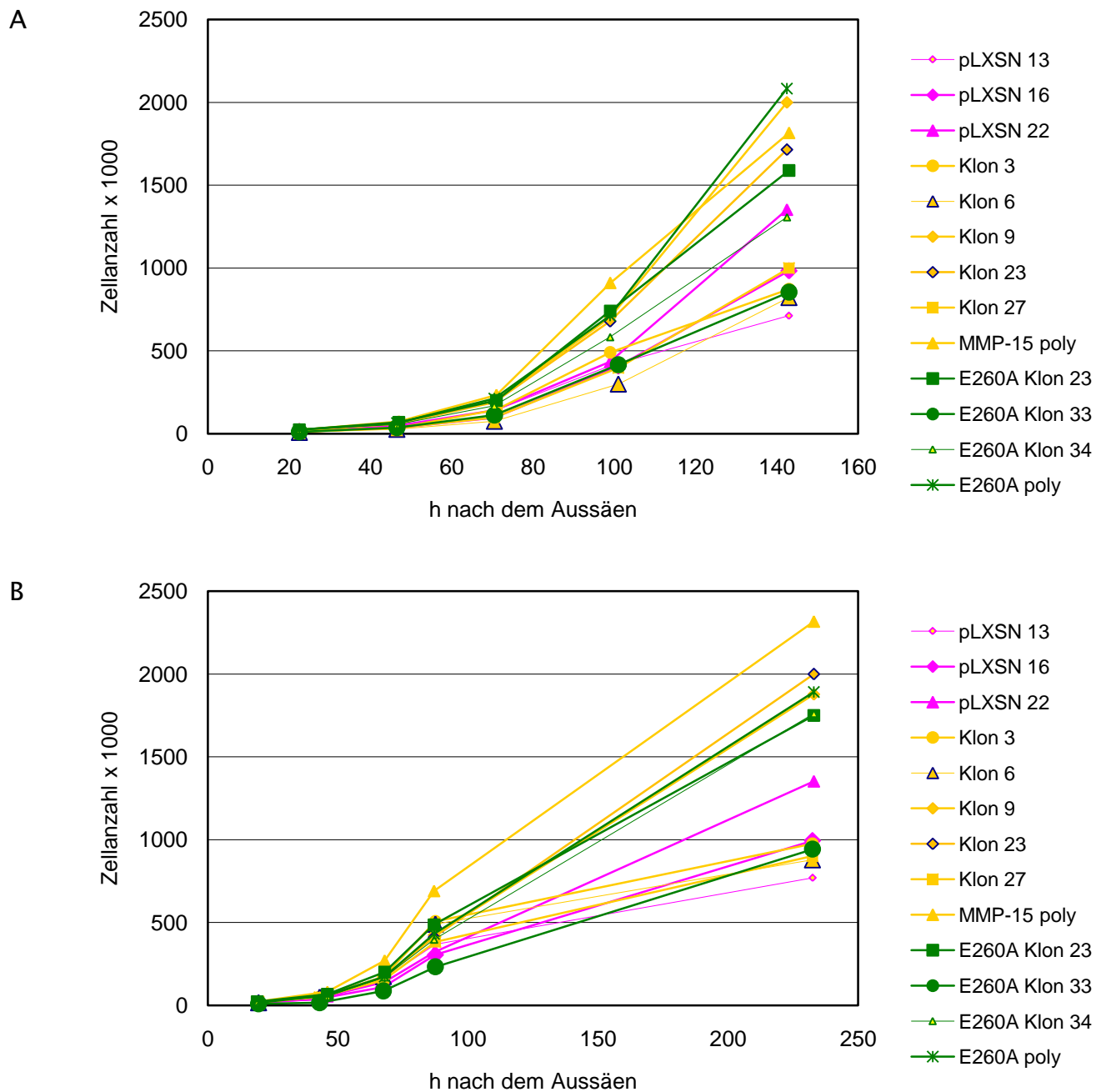


ABBILDUNG 32: WACHSTUMSKURVEN VON RAT-1 MMP-15 KLONEN

FÜR DIE BESTIMMUNG DES ZELLWACHSTUMS WURDEN DIE ZELLEN IN 6-LOCH-PLATTEN AUSGESÄT UND DIE ZELLZAHL ZU DEN ANGEGBENEN ZEITPUNKTEN MIT EINEM COULTER COUNTER BESTIMMT. ANGEGBEN IST JE ZEITPUNKT DER MITTELWERT AUS TRIPLIKATEN. **A+B:** ZWEI UNABHÄNGIGE EXPERIMENTE. KLONE MIT LEEERVEKTOR (pLXSN, PINK), MMP-15 WT (KLON 3, 6, ...GELB), INAKTIVER MMP-15 MUTANTE (E260A KLON 23, ...GRÜN) UND POLYKLONALE ZELLEN MIT MMP-15 WT (MMP-15 poly) UND INAKTIVER MMP-15 MUTANTE (E260A poly).

3.2.2.3 MMP-15 IN BRUSTKREBSZELLEN

Einer der ersten Hinweise für eine Beteiligung von MMP-15 in Krebserkrankungen stammt aus dem Jahr 1997. Ueno et al. untersuchten Gewebe von Patientinnen mit primärem invasivem Brustkrebs und verglichen die Expression der drei MT-MMPs 1, 2 und 3 mit dem entsprechenden Normalgewebe. MMP-15 (MT2-MMP) wurde nur in Tumorgewebe gefunden (Ueno et al., 1997). Des Weiteren fanden Kousidou et al. eine hohe, konstitutive Expression von MMP-15 in Brustkrebszelllinien im Vergleich zu normalen Zellen (Kousidou et al., 2004). Daher sollte der Einfluss einer MMP-15 Überexpression in Brustkrebszelllinien, im Vergleich mit normalen Brustepithelzellen (MCF10A) genauer untersucht werden.

Die Zelllinien SK-BR-3, BT-474 und MCF10A wurden mit retroviralen Konstrukten, die das Gen für MMP-15 wt (SK-BR-3, BT-474) sowie mit den Mutationen D596G (SNP) und E260A (katalytisch inaktiv) tragen, infiziert und selektioniert. In Abbildung 33 ist das Expressionslevel von MMP-15 in den polyklonalen Zelllinien und 4 Klonen für MCF10A mit MMP-15 E260A im Westernblot gezeigt.

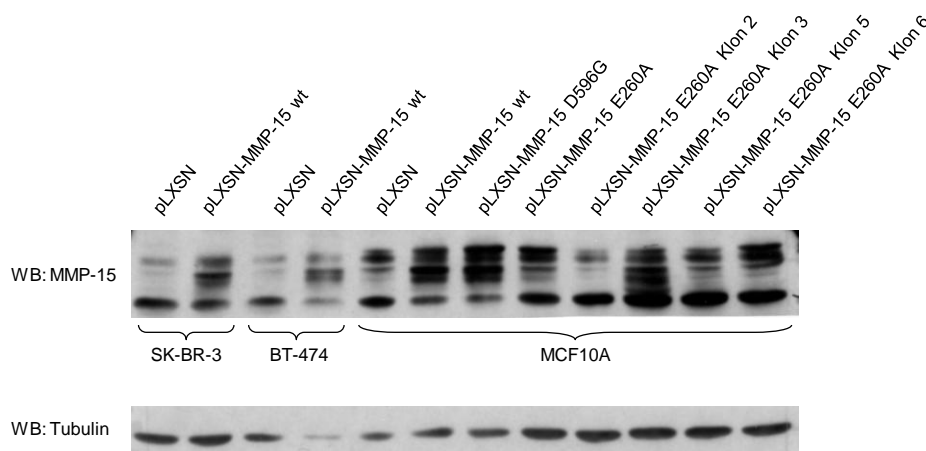


ABBILDUNG 33: MMP-15 EXPRESSION IM WESTERNBLOT NACH INFEKTION VON SK-BR-3, BT-474 UND MCF10A pLXSN: LEERVEKTOR.

Das Level von MMP-15 Protein an der Zelloberfläche in den infizierten MCF10A Zelllinien wurde zusätzlich mit Oberflächenfärbung und Durchflusszytometrie quantifiziert. Diese Werte korrelierten mit der Intensität der Banden im Westernblot und die Expression war über mehrere Passagen stabil (siehe Abbildung 34).

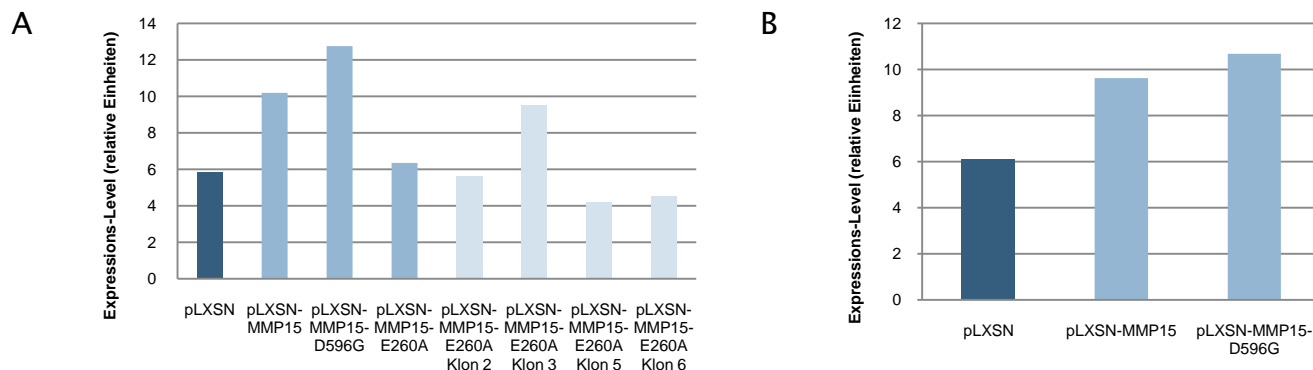


ABBILDUNG 34: MMP-15 OBERFLÄCHEN-EXPRESSION IN MCF10A NACH INFEKTION

DIE ZELLEN WURDEN NACH INKUBATION MIT FITC-GEKOPPELTEM MMP-15-ANTIKÖRPER MIT DURCHFLUSSZYTOMETRIE ANALYSIERT. QUANTIFIZIERUNG DER PEAKS MIT CELLQUEST-SOFTWARE

A+B: ZWEI UNABHÄNGIGE EXPERIMENTE MIT VERSCHIEDENEN PASSAGEN, VOR UND NACH DEM EINFRIEREN.

Bei der Behandlung von Brustkrebs wird oft das Chemotherapeutikum Doxorubicin eingesetzt (Mano & Awada, 2004) und es wurde bereits gezeigt, dass es Apoptose in MCF10A-Zellen auslösen kann (Kim et al., 2005; O'Callaghan-Sunol et al., 2007). Daher wurde für die Induktion von Apoptose in MCF10A-Zellen Doxorubicin gewählt.

Für die Analyse der Apoptose-Rate wurden lediglich die polyklonalen Zelllinien mit hoher Expression (MMP-15 wt und D596G) verwendet, um klonale Effekte wie im Fall der Rat-1 Zellen (siehe 3.2.2.2, Seite 93) auszuschließen. Es wurden 4 unabhängige Experimente durchgeführt (Abbildung 35). Dabei konnte beobachtet werden, dass die Zellen sehr unterschiedlich auf die Behandlung mit Doxorubicin reagierten (Apoptose-Raten zwischen 4 und 90 %) und dabei keine direkte Abhängigkeit von der MMP-15 Expression nachweisbar war.

Neben der Apoptose-Sensitivität wurde außerdem die Wachstumsrate der drei polyklonalen MCF10A-Zelllinien untersucht (siehe Abbildung 36). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollzellen und denen mit MMP-15 wt bzw. der Mutante D596G festgestellt werden.

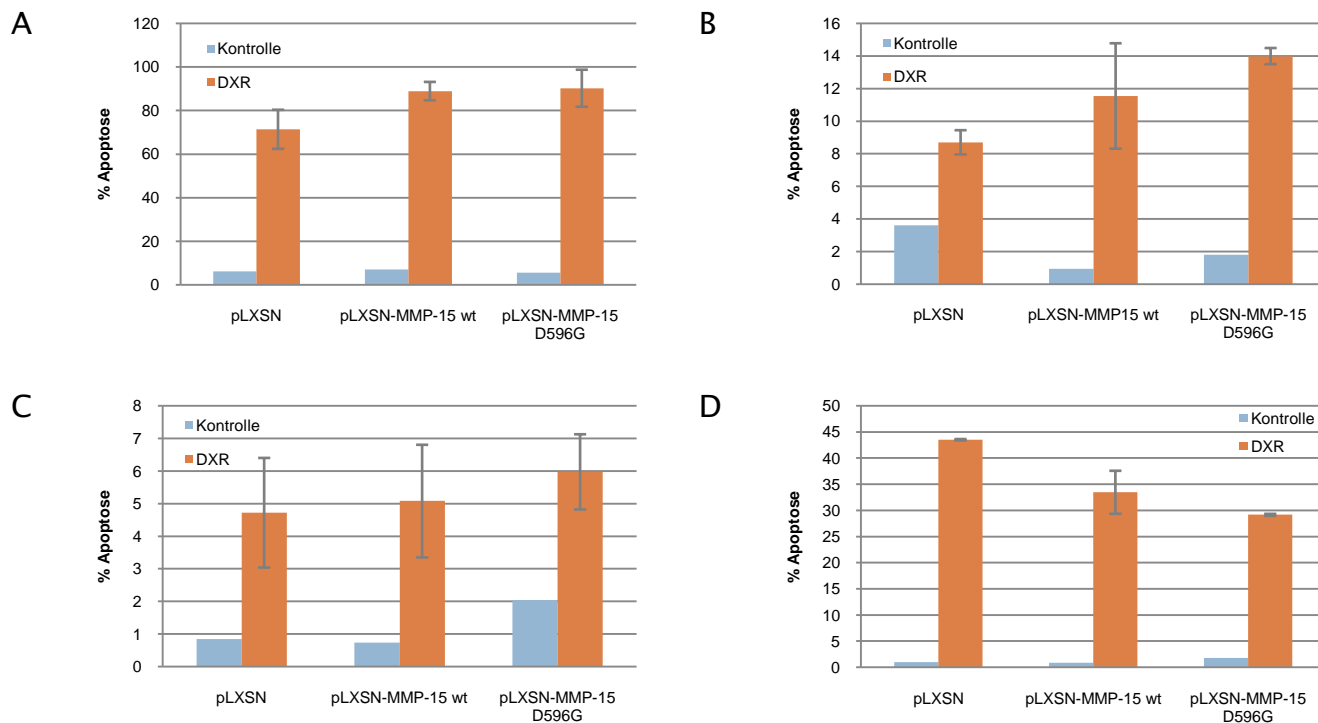


ABBILDUNG 35: APOPTOSE IN MCF10A NACH MMP-15-INFEKTION UND INDUKTION MIT DOXORUBICIN

DIE ZELLEN WURDEN 24 h NACH DEM AUSSÄEN MIT 1 μ M (A, D), 0,5 μ M (B), UND 0,75 μ M (C) DOXORUBICIN BEHANDELT UND DIE APOPTOSE-RATE NACH 48 h MIT PI-FÄRBUNG UND DURCHFLUSSZYTOMETRIE QUANTIFIZIERT. % APOPTOSE ENTSPRICHT DEN ZELLEN IM SUB-G1-PEAK, QUANTIFIZIERT MIT CELLQUEST-SOFTWARE.

A-D: 4 UNABHÄNGIGE EXPERIMENTE MIT ZELLEN DER PASSAGE 8 (A), 12 (B), 15 (C) BZW. 17 (D) NACH BEGINN DER SELEKTION.

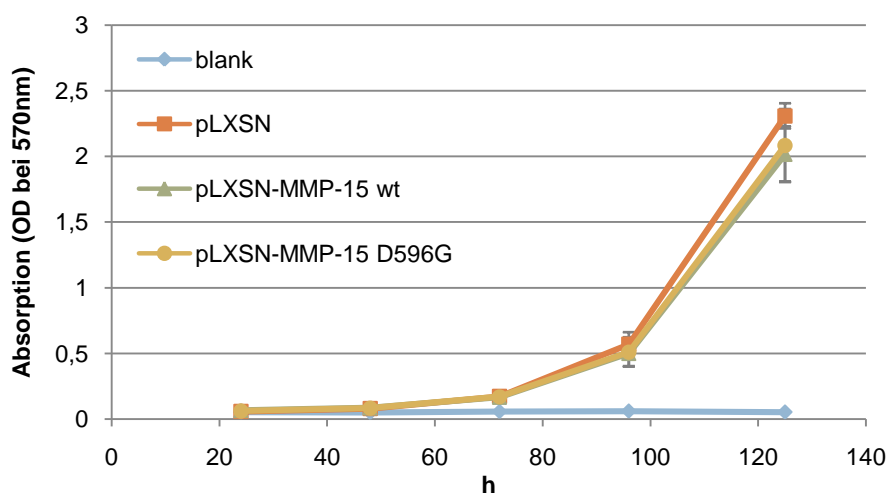


ABBILDUNG 36: WACHSTUMSRATE IN MCF10A NACH INFEKTION MIT MMP-15

DIE WACHSTUMSRATE WURDE MITTELS EINES MTT-ASSAYS (SIEHE MATERIAL UND METHODEN) BESTIMMT. GEZEIGT IST DER MITTELWERT MIT STANDARDABWEICHUNG VON ZWEI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN.

In der Zelllinie SK-BR-3 war die MMP-15 Expression in polyklonalen Zellen relativ niedrig und es konnte kein Unterschied in der Apoptose-Sensitivität gegenüber Doxorubicin festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Es konnte zwar in monoklonalen Zelllinien dieser Population ein erhöhtes Expressionslevel gefunden werden, aber aufgrund möglicher klonaler Effekte wurden keine funktionellen Experimente durchgeführt.

Für die Zelllinie BT-474 wurden Transfektionsbedingungen optimiert, um MMP-15 transient zu exprimieren. Dabei wurde ein deutlich höheres Expressionslevel erreicht als nach der Infektion (siehe Abbildung 37). Experimente zur Apoptose-Sensitivität gegenüber Staurosporin zeigten allerdings keine Abhängigkeit vom MMP-15 Expressionslevel (Daten nicht gezeigt).

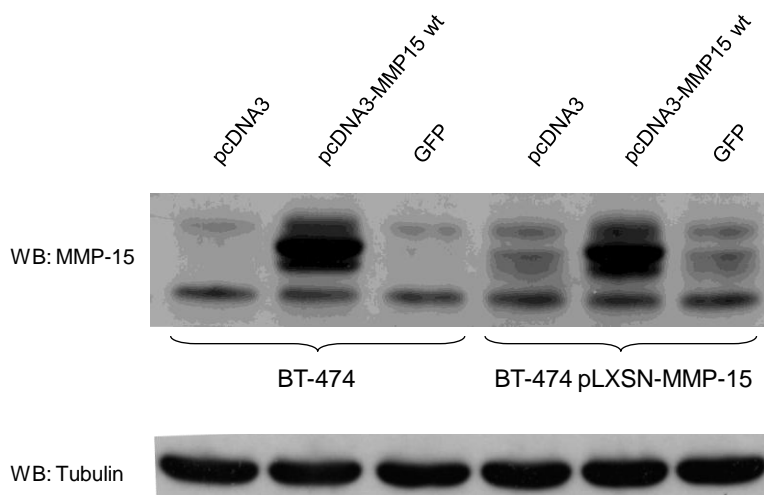


ABBILDUNG 37: MMP-15 IM WESTERNBLOT NACH TRANSIENTER TRANSFEKTION VON BT-474 UND BT-474 pLXSN-MMP-15

DIE URSPRUNGSZELLINIE BT-474 UND DIE POLYKLONAL INFIZIERTE ZELLINIE BT-474 pLXSN-MMP-15 WURDEN TRANSIENT MIT MMP-15 TRANSFIZIERT UND NACH 48 H LYSIERT. pcDNA3: LEERVEKTOR DER TRANSIENTEN TRANSFEKTION, GFP: TRANSFEKTIONSKONTROLLE.

3.2.2.4 MMP-15 IN HEK293

Die Zelllinie HEK293 (*human embryonic kidney*) stammt ursprünglich von der humanen embryonalen Niere. Die kultivierten Nierenzellen wurden mit Adenovirus 5 transformiert (Graham et al., 1977) und stellen damit ein artifizielles Zellkulturmodell dar. Da sie leicht zu kultivieren sind und bei transienter Transfektion mit der Kalzium-Phosphat-Methode hohe Effizienz erreicht werden kann, werden sie in vielen Studien zur Charakterisierung von Genprodukten nach Überexpression eingesetzt.

Da das Expressionslevel nach transienter Expression auch in polyklonalen HEK293 Zellen relativ hoch ist, sollte mit diesem Zellsystem das Apoptose-Verhalten nach transienter Expression untersucht werden. Das bietet unter anderem den Vorteil, dass sich die Zellen nicht während des Selektionsprozesses, der zur Generierung stabiler Zelllinien nötig ist, an die möglichen Eingriffe in apoptotische Signalwege anpassen können.

Für die Analyse der Rolle von MMP-15 in induzierter Apoptose wurden HEK293 Zellen mit MMP-15 wt und den Mutanten E260A, D596G und G609R transfiziert. Zunächst wurden der zeitliche Verlauf der MMP-15 Expression und das Verhalten von HEK293 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen zur Apoptose-Induktion untersucht.

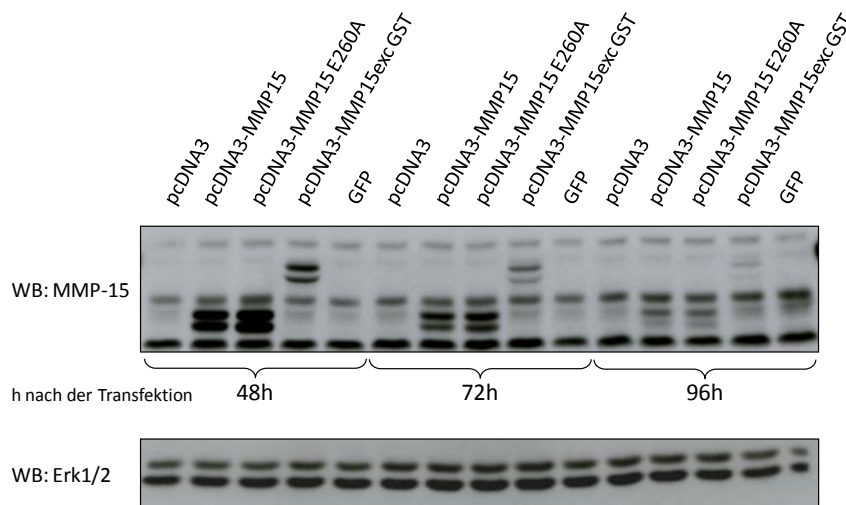


ABBILDUNG 38: MMP-15 EXPRESSION IM WESTERNBLOT NACH TRANSIENTER TRANSFEKTION VON HEK293

HEK293 ZELLEN WURDEN TRANSIENT MIT DER KALZIUM-PHOSPHAT-METHODE TRANSFIZIERT, NACH 24 h FÜR DIE EXPERIMENTE AUSGESÄT UND ZU DEN ANGEZEIGTEN ZEITPUNKTEN LYSIERT. GFP DIENTE DER EFFIZIENZ-KONTROLLE, pcDNA3: LEERVEKTOR, ERK1/2: LADEKONTROLLE.

Der Ablauf der Apoptose-Induktion ist ab einem gewissen Zeitpunkt der Apoptose-Kaskade nicht mehr aufzuhalten, da einmal aktivierte Effektor-Caspasen zwar noch durch endogene Inhibitoren reguliert werden, aber die Spaltung deren Substrate irgendwann irreparable Schäden in der Zelle hinterlässt (Huppertz et al., 1999). Mit PI-Färbung und Durchflusszytometrie wird Apoptose in einem relativ späten Stadium bestimmt (Collins et al., 1997), daher ist das Expressionslevel von MMP-15 zum Zeitpunkt der Induktion der Apoptose mehr relevant als zum Zeitpunkt der Messung der Apoptose-Rate. Der zeitliche Verlauf der Apoptose-Experimente in HEK293 Zellen war folgender:

Tag 1: aussäen der Zellen für die Transfektion

Tag 2: transiente Transfektion mit der Kalzium-Phosphat-Methode

Tag 3: aussäen der transfizierten Zellen für die Apoptose-Induktion

Tag 4: Induktion der Apoptose durch Zugabe Apoptose-induzierender Substanzen

Tag 5/6: Bestimmung der Apoptose-Rate

Wie in Abbildung 38 zu sehen, war das Expressionslevel von MMP-15 daher ausreichend lange nachweisbar.

Zur Induktion von Apoptose können viele verschiedene Substanzen eingesetzt werden. Um die für diese Bedingungen (Zellsystem, Inkubationsdauer, Quantifizierungs-Methode) geeignetste zu finden, wurden HEK293 Zellen mit verschiedenen Substanzen behandelt und die Apoptose-Rate mit PI-Färbung und Durchflusszytometrie bestimmt. Anhand der dabei ermittelten FACS-Diagramme (Abbildung 39) wurde Staurosporin ausgewählt, da hier ein gut abgegrenzter Sub-G1-Peak auftritt, der sich mit der CellQuest Software zuverlässig quantifizieren lässt. Staurosporin ist ein ursprünglich aus *Streptomyces* sp. AM-2282 (später *Streptomyces staurosporeus*) isoliertes Alkaloid, das antimikrobielle Aktivität gegen Pilze und Hefe zeigte (Omura et al., 1977). Später wurde nachgewiesen, dass es viele weitere biologische Effekte induziert und verschiedene Proteinkinasen inhibieren kann (Omura et al., 1995; Tamaoki, 1991), insbesondere *phospholipid/Ca⁺⁺dependent protein kinase* (Protein kinase C, (Tamaoki et al., 1986)) und Apoptose induziert (Kabir et al., 2002). Chemische Analoge von Staurosporin wurden außerdem als Wirkstoffe für die Krebsbehandlung in klinischen Versuchen getestet (Gescher, 2000).

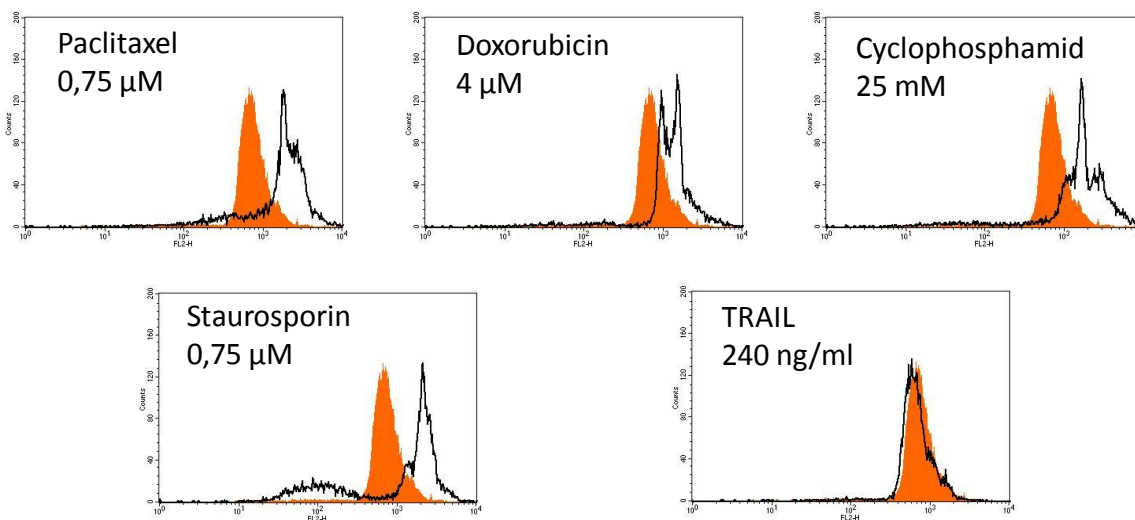


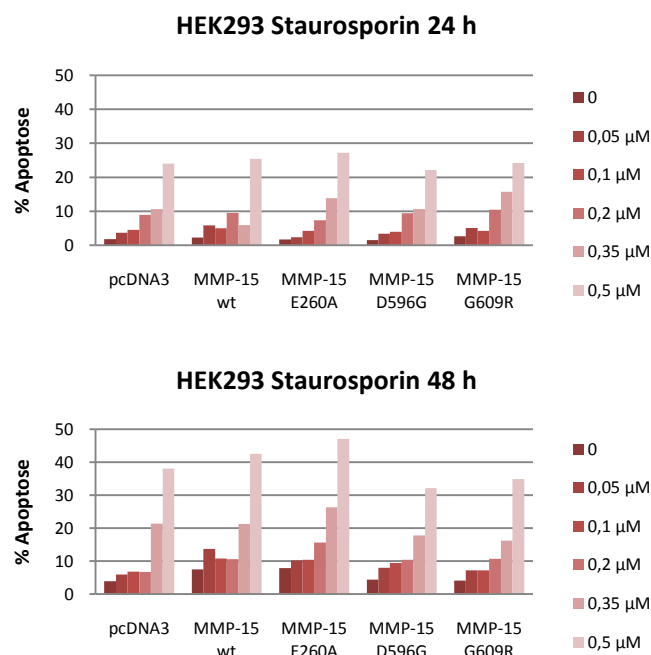
ABBILDUNG 39: APOPTOSE-INDUKTION IN HEK293 MIT VERSCHIEDENEN SUBSTANZEN

FACS-DIAGRAMME NACH BEHANDLUNG MIT DEN ANGEgebenEN SUBSTANZEN UND DER ANGEgebenEN DOSIS FÜR 48 h. FL-2: KANAL FÜR PROPIDIUM-IODID, REPRÄSENTIERT DEN DNA-GEHALT PRO ANALYSIRTER ZELLE, ORANGE KURVE: UNBEHANDELTE KONTROLLE, SCHWARZE KURVE: NACH APOPTOSE-INDUKTION.

Die Quantifizierung der Apoptose-Rate nach Induktion mit verschiedenen Konzentrationen von Staurosporin wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt (24 h und 48 h). Dabei konnte an beiden Zeitpunkten keine signifikante Abhängigkeit der Apoptose-Rate von der MMP-15 Expression bzw. Unterschiede zwischen den Mutanten festgestellt werden (Abbildung 40 A). Bei der Wiederholung des Experiments für den Zeitpunkt 48 h wurde dieses Ergebnis bestätigt (Abbildung 40 B).

Als Positiv-Kontrolle für die Rolle von MMP-15 bei der Staurosporin-vermittelten Apoptose wurden auch die mit CH-11 selektierten Klone von HeLaS3 (siehe Einleitung, 1.4 und (Abraham et al., 2005)), die eine erhöhte Expression von MMP-15 zeigen, mit Staurosporin behandelt und die Apoptose-Rate quantifiziert. Es wurden 2 Dosen (0,5 µM und 1,0 µM) und drei Inkubationszeiten (24 h, 48 h und 72 h) untersucht. In Abbildung 41 sind stellvertretend die Daten für ein Experiment nach 72 h Inkubationsdauer mit Staurosporin gezeigt. Dabei war die Apoptose-Rate in den HeLaS3-Ausgangszellen signifikant höher als in den drei untersuchten Klonen. In den übrigen Experimenten wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt (Daten nicht gezeigt).

A



B

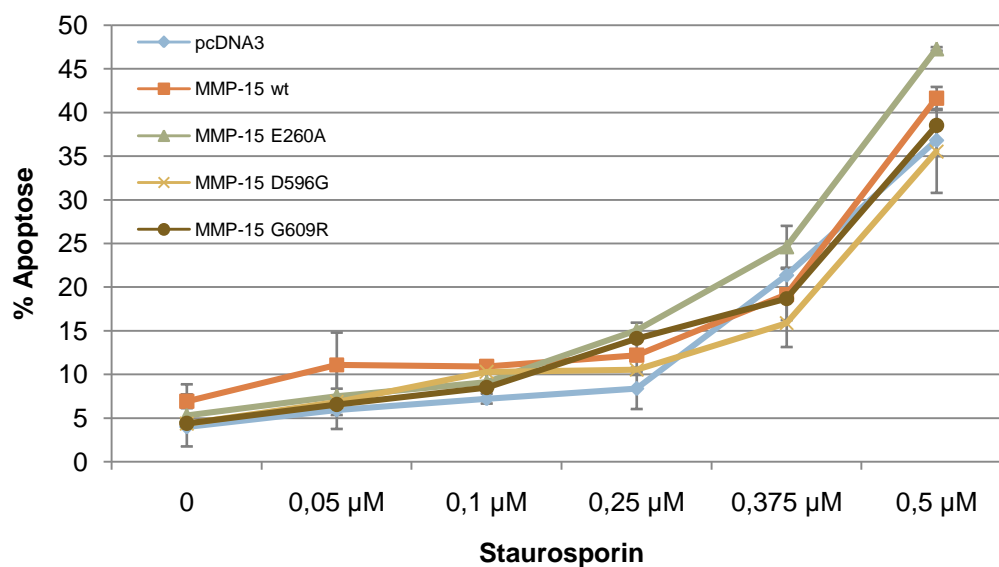


ABBILDUNG 40: APOPTOSE-RATE IN HEK293 NACH TRANSFEKTION UND INDUKTION MIT STAUROSPORIN

DIE ZELLEN WURDEN 24 h NACH DEM AUSSÄEN DER TRANSFIZIERTEN ZELLEN MIT DER ANGEGEBENEN DOSIS STAUROSPORIN BEHANDELT UND DIE APOPTOSE-RATE NACH ANGEGEBENER INKUBATIONSDAUER MIT PI-FÄRBUNG UND DURCHFLUSSZYTOMETRIE QUANTIFIZIERT. % APOPTOSE ENTSPRICHT DEN ZELLEN IM SUB-G1-PEAK, QUANTIFIZIERT MIT CELLQUEST-SOFTWARE. **A:** APOPTOSE-RATE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER INKUBATIONSDAUER, **B:** APOPTOSE-RATE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER DOSIS, MITTELWERT MIT StAW AUS ZWEI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN.

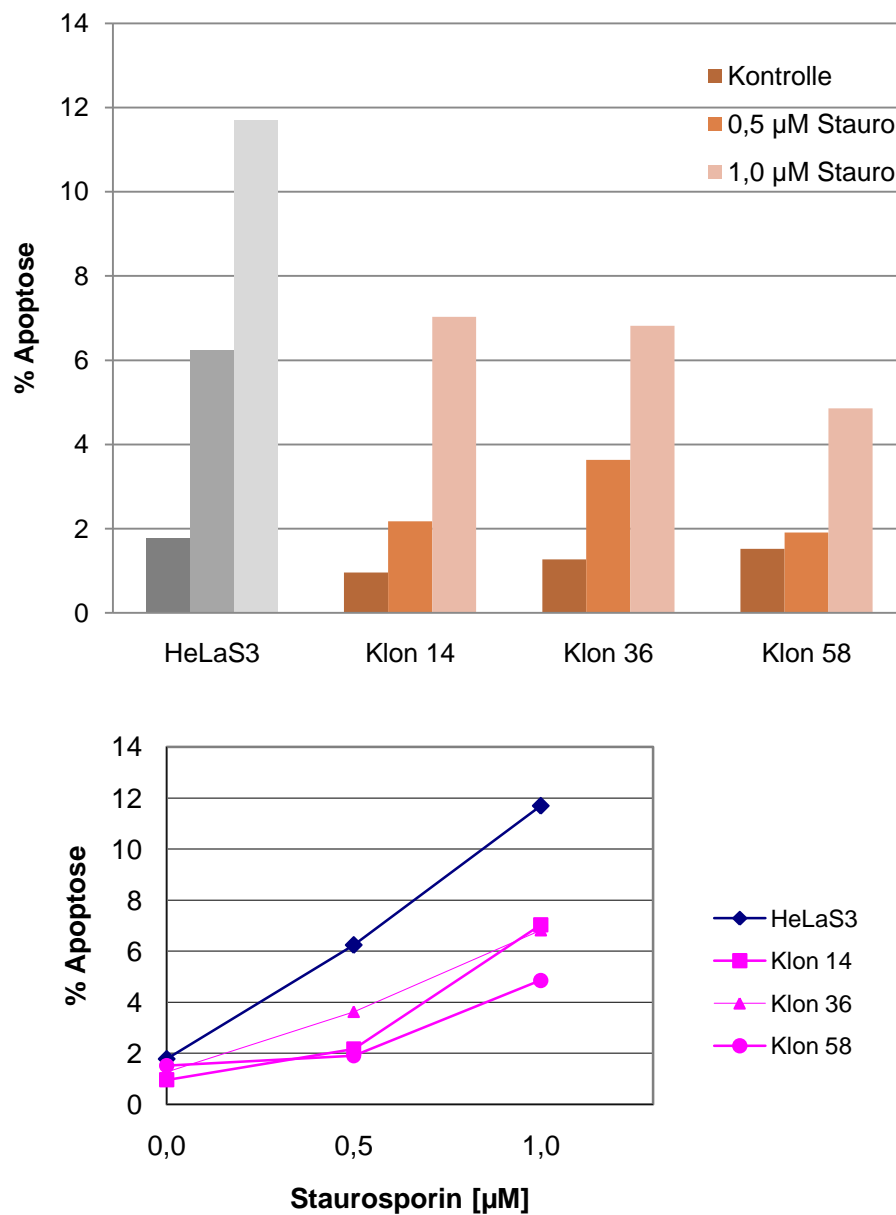


ABBILDUNG 41: APOPTOSE IN HELAS3 UND MIT CH-11 SELEKTIONIERTE KOLONEN NACH INDUKTION MIT STAUROSPORIN

DIE ZELLEN WURDEN 24 h NACH DEM AUSSÄEN MIT DER ANGEGBENEN DOSIS STAUROSPORIN BEHANDELT UND DIE APOPTOSE-RATE NACH 72 h MIT PI-FÄRBUNG UND DURCHFLUSSZYTOMETRIE QUANTIFIZIERT.

% APOPTOSE ENTSpricht DEN ZELLEN IM SUB-G1-PEAK, QUANTIFIZIERT MIT CELLQUEST-SOFTWARE.

3.2.2.5 MMP-15 IN HELAS3

Da in den untersuchten Zelllinien der erwartete Effekt von MMP-15 auf die Apoptose-Sensitivität nicht nachgewiesen werden konnte, wurde zur Kontrolle der Versuchsbedingungen das Apoptose-Experiment mit den Zelllinien HeLaS3 und Klon 58 aus Abraham et al. wiederholt. Dabei konnte sowohl die erhöhte MMP-15 Expression im Klon 58 als auch die verminderte Apoptose-Sensitivität gegenüber CH-11 reproduziert werden (siehe Abbildung 42).

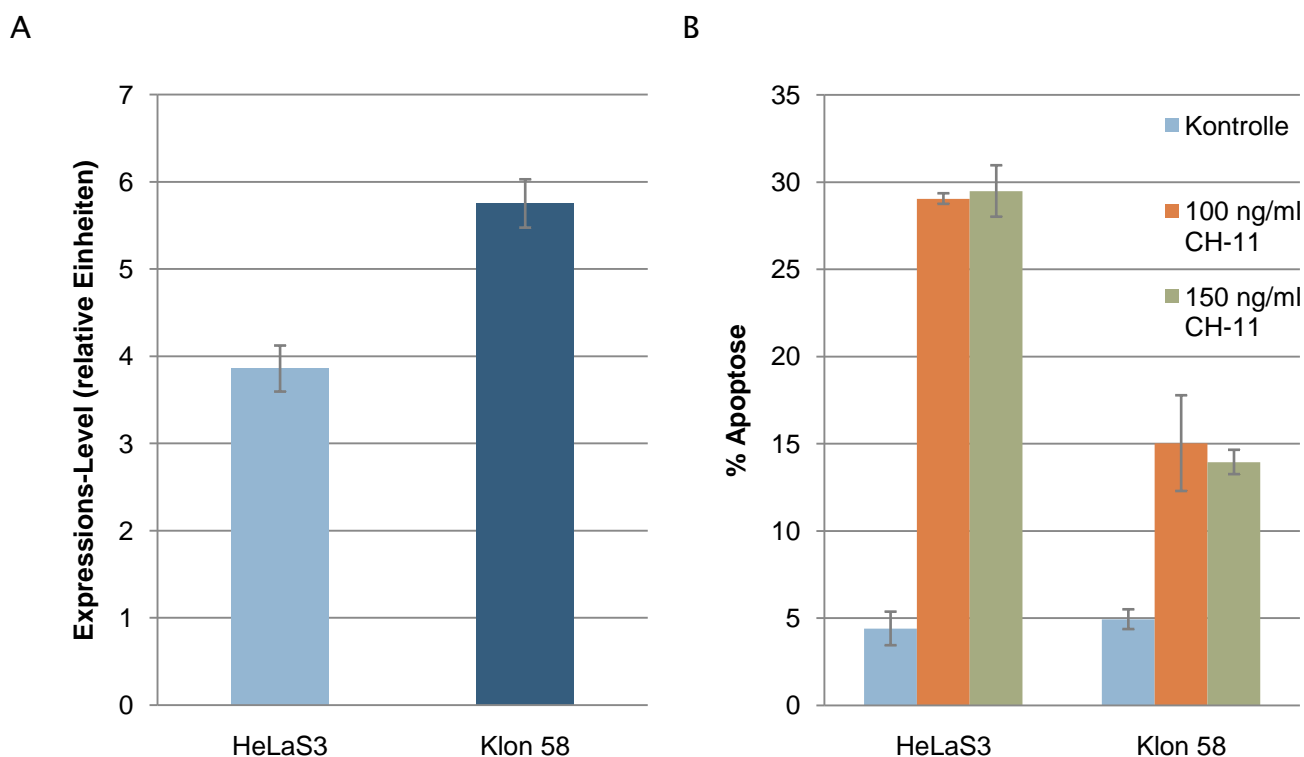


ABBILDUNG 42: MMP-15 OBERFLÄCHEN-EXPRESSION UND APOPTOSE NACH CH-11 INDUKTION IN HELAS3 UND KLON 58

A: DIE ZELLEN WURDEN NACH INKUBATION MIT FITC-GEKOPPELTEM MMP-15-ANTIKÖRPER MIT DURCHFLUSSZYTOMETRIE ANALYSIERT. QUANTIFIZIERUNG DER PEAKS MIT CELLQUEST-SOFTWARE. MITTELWERT AUS ZWEI UNABHÄNGIGEN MESSUNGEN.

B: DIE ZELLEN WURDEN NACH 9 h HUNGERN MIT DER ANGEGBENEN DOSIS CH-11 BEHANDELT. DIE APOPTOSE-RATE WURDE NACH 40 h MIT PI-FÄRBUNG UND DURCHFLUSSZYTOMETRIE BESTIMMT.

% APOPTOSE ENTSPRICHT DEN ZELLEN IM SUB-G1-PEAK, QUANTIFIZIERT MIT CELLQUEST-SOFTWARE. ANGEGBENEN IST DER MITTELWERT VON ZWEI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN MIT STANDARDABWEICHUNG.

Ebenso wurden HeLaS3-Zellen erneut mit MMP-15 infiziert. Da viele Studien mit HeLaS3 Zellen in DMEM-Medium statt Ham's F12-Medium durchgeführt werden (Fischer et al., 2006; Hawryluk-Gara et al., 2005; Kitazoe et al., 2005; Santamaria et al., 2007; Tang et al., 2008; Tian et al., 2005), wurde zum Vergleich diese Zelllinie ausgewählt. Die Infektion erfolgte über viralen Überstand der Verpackungszelllinie Phoenix A nach deren Transfektion mit pLXSN (Leervektor), pLXSN-MMP-15 wt und der Mutante MMP-15 E260A. Vor Beginn der Selektion wurden die infizierten Zellen in verschiedenen Zelldichten ausgesät (1/5, 1/50, 1/500), um drei Populationen an polyklonalen Zellen zu erhalten. Wie in Abbildung 43 zu sehen, führte dies jedoch bis auf pLXSN-MMP-15 E260A 500 zu vergleichbaren Mengen an MMP-15 an der Zelloberfläche.

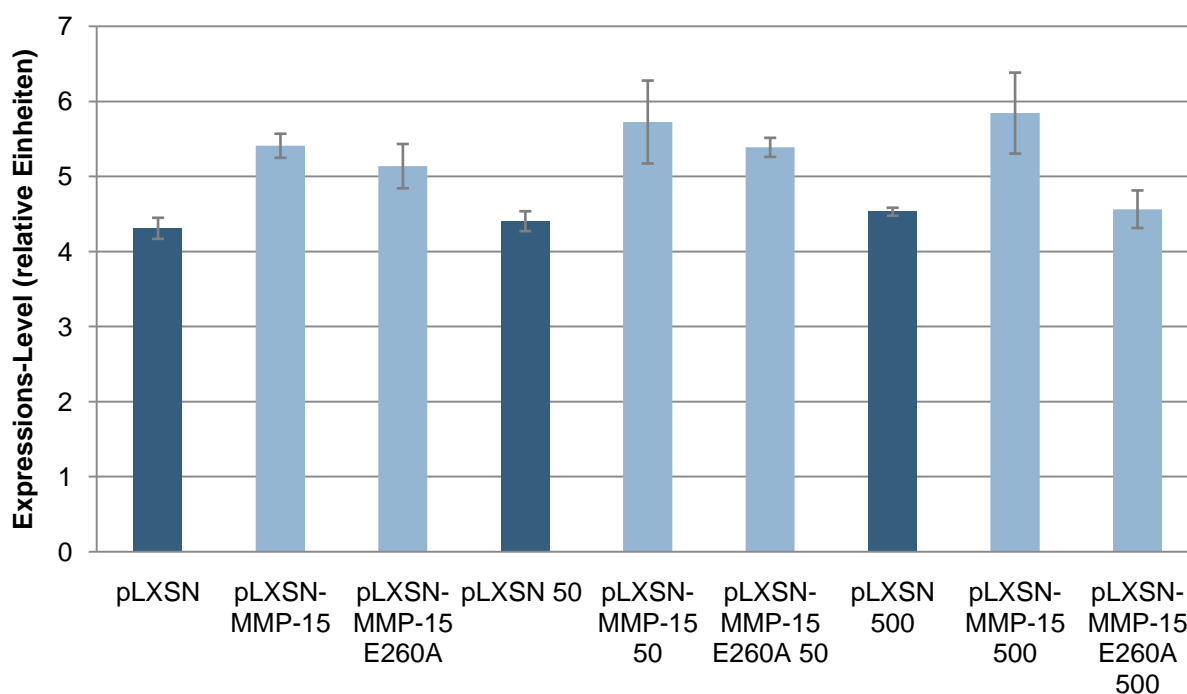


ABBILDUNG 43: MMP-15 OBERFLÄCHEN-EXPRESSION IN HELAS3 NACH INFEKTION UND SELEKTION

DIE ZELLEN WURDEN NACH INKUBATION MIT FITC-GEKOPPELTEM MMP-15-ANTIKÖRPER MIT DURCHFLUSSZYTOMETRIE ANALYSIERT. QUANTIFIZIERUNG DER PEAKS MIT CELLQUEST-SOFTWARE.

MITTELWERT MIT StAW AUS DREI UNABHÄNGIGEN MESSUNGEN, JE 6, 8 UND 11 PASSAGEN NACH BEGINN DER SELEKTION. NACH DER INFEKTION WURDEN DREI POLYKLONALE POPULATIONEN SELEKTIONIERT (-, 50, 500), pLXSN: LEERVEKTOR.

Diese insgesamt 9 Zelllinien wurden im Anschluss an die Selektion auf ihre Apoptose-Rate nach Induktion mit CH-11 untersucht. Wie in Abbildung 44 gezeigt, war die Apoptose-Rate in allen infizierten Zelllinien in DMEM-Medium vergleichbar und es konnte keine Abhängigkeit der Apoptose-Sensitivität vom Expressionslevel oder der katalytischen Aktivität von MMP-15 nachgewiesen werden. Auch eine erhöhte Dosis von 200 ng/ml bzw. 500 ng/ml führte zu keiner Zunahme der Apoptose-Rate. Im Vergleich mit der Zelllinie aus Abraham et al. (Abraham et al., 2005) war das Level der Apoptose nach Induktion mit CH-11 allerdings bereits ohne MMP-15 Überexpression viel geringer.

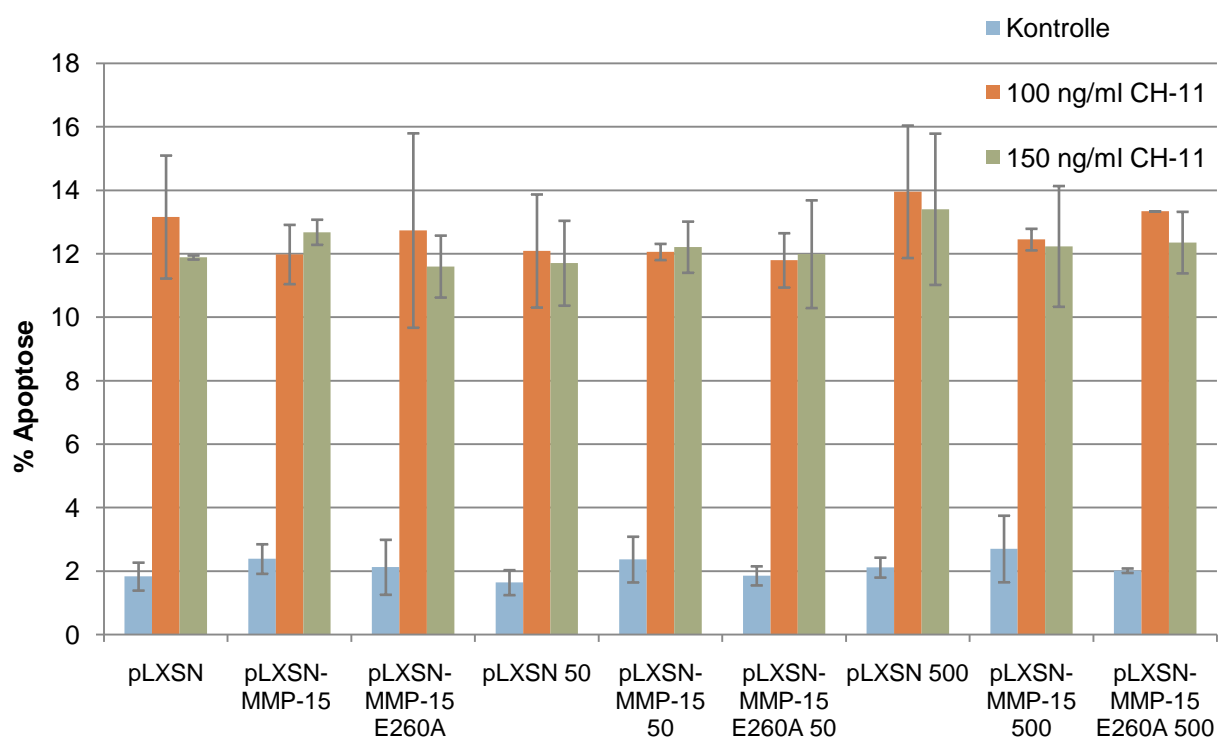


ABBILDUNG 44: APOPTOSE IN HELAS3 NACH INFEKTION MIT MMP-15 UND INDUKTION MIT CH-11

DIE SELEKTIONIERTEN POLYKLONALEN ZELLEN (IN DMEM-MEDIUM) WURDEN NACH 9 h HUNGERN MIT DER ANGEGEBENEN DOSIS CH-11 BEHANDELT. DIE APOPTOSE-RATE WURDE NACH 40 h MIT PI-FÄRBUNG UND DURCHFLUSSZYTOMETRIE BESTIMMT. % APOPTOSE ENTSPRICHT DEN ZELLEN IM SUB-G1-PEAK, QUANTIFIZIERT MIT CELLQUEST-SOFTWARE. ANGEBENEN IST DER MITTELWERT VON ZWEI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN MIT STANDARDABWEICHUNG. pLXSN: LEERVEKTOR.

4 DISKUSSION

Die Diagnose Krebs ist für den Patienten eine Schreckensmeldung, da Krebserkrankungen noch weitverbreitet als unheilbare Krankheiten gelten. Doch die Behandlungsmethoden entwickeln sich stetig weiter und für einige Krebsarten gibt es inzwischen gute Heilungschancen. Einen großen Beitrag zu diesem Fortschritt konnten nicht zuletzt die moderne Molekularbiologie und Grundlagenforschung leisten, indem sie die zu Grunde liegenden Mechanismen der Krebsentstehung und die zellulären Prozesse in Krebszellen aufklären. Um die Therapie weiter zu verbessern, müssen neue molekulare Angriffspunkte identifiziert werden, durch deren Manipulation man Krebszellen gezielt und spezifisch treffen kann. Als Ansatzpunkt dafür kann die Untersuchung von Resistenzmechanismen, die während einer Chemotherapie auftreten können, bzw. die Untersuchung der Apoptose-Blockade, die in den meisten Krebszellen auftritt, dienen. Zwei derartige Projekte wurden in dieser Arbeit durchgeführt.

4.1 Chemoresistenzmechanismen

Die Behandlung mit Chemotherapie führt durch den hohen Selektionsdruck auf die Tumorzellen in vielen Fällen zur Ausbildung von Resistenzmechanismen und damit zu Rezidiven oder Insensitivität gegenüber der Therapie. Zur Aufklärung derartiger Resistenzmechanismen ist es eine naheliegende Strategie, resistente mit sensitiven Zellen zu vergleichen, um die für diesen Phänotyp verantwortlichen Unterschiede zu identifizieren. Diese können als Ansatzpunkte für eine gezielte Therapie dienen, um in Kombination mit der bisherigen Therapie eine Verbesserung der Heilungschancen zu erzielen. Chemoresistenzmechanismen in Krebserkrankungen können, wie in der Einleitung (1.4) näher erläutert, im Zellkulturmodell simuliert und untersucht werden. Neben dem Vorteil, dass Veränderungen der Genexpression ausgehend von einem weitgehend gut charakterisierten Genotyp untersucht werden können, sind noch weitere Pluspunkte zu nennen. Im Vergleich mit Studien zur Chemoresistenz, in welchen

Patientenproben untersucht worden sind (Jazaeri et al., 2005; Oshita et al., 2004), steht von sensitiven und resistenten Zelllinien beliebig viel Probenmaterial zur Verfügung, im Gegensatz zu der begrenzten Zellmenge z.B. einer Biopsie. Dadurch erhöht sich die statistische Signifikanz, indem die Experimente wiederholt werden können. Außerdem sind weiterführende Untersuchungen zur funktionellen Validierung im gleichen Zellsystem möglich, wie zum Beispiel Protein-Funktionsanalysen durch Knock-down-Experimente. Neben mehreren in dieser Arbeitsgruppe durchgeführten Projekten führte eine ähnliche Strategie auch in anderen Studien zur Identifizierung von Resistenz-relevanten Genen (Kang et al., 2004; Lamendola et al., 2003; Zhao et al., 2007).

In der dieser Arbeit vorausgegangenen Diplomarbeit wurden Gene identifiziert, die in Klonen der Brustkrebszelllinie BT-20 mit verminderter Apoptose-Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika ein verändertes Expressionslevel zeigten. Unter den Genen mit erhöhter Expression in den insensitiven Klonen waren einige, für die bereits eine antiapoptotische Rolle beschrieben wurde (siehe unten). Dies bestätigt die Theorie, dass durch die Selektion im Zellkulturmodell durch Apoptose-Induktion Klone isoliert werden können, die durch antiapoptotische Mechanismen dem Selektionsdruck entkommen. Die mittels DNA-Makroarray gewonnenen Daten konnten weitestgehend durch semiquantitative PCR validiert werden. Die Gründe für Diskrepanzen zwischen den Array- und PCR-Daten können zum einen im semiquantitativen Charakter der PCR-Methode – im Vergleich zur quantitativen Realtime-PCR – begründet liegen (Bustin, 2002). Darum wurden Änderungen des Expressionslevels, die zwar im Vergleich BT-20 zu insensitivem Klon die gleiche Tendenz in Array und PCR zeigten, z.B. Überexpression, aber nicht die gleichen prozentualen Werte aufwiesen (z.B. zweifache Expression), dennoch für weitere Analysen in Betracht gezogen. Zum anderen ist eine bekannte Limitierung der Makroarray-Analyse, dass bei der Array-Hybridisierung nicht für alle der teilweise mehreren tausend Gensonden ein spezifisches, lineares Signal erwartet werden kann. Bei der Hybridisierung eines Arrays wird eine bestimmte Hybridisierungsbedingung für viele verschiedene Nukleinsäurehybridisierungen angewandt, was zwangsläufig in ungünstigen Bedingungen für einzelne dieser Reaktionen resultiert. Ein gewisser Anteil von unspezifischer Hybridisierung kann also nicht vermieden werden. Im allgemeinen gilt,

dass die Ergebnisse für einzelne Gene mit einer Rate von 70 % mittels RT-PCR validiert werden können (Pusztai & Hess, 2004).

Für die 6 identifizierten Gene, die eine Überexpression in gegenüber Doxorubicin, Taxotere® und Cyclophosphamid insensitiven Klonen zeigten, sollten nach der Bestätigung des Expressionslevels weitere Analysen zur funktionellen Validierung durchgeführt werden.

Eine Überexpression in Apoptose-insensitiven Zellen legt eine antiapoptotische Funktion dieser Gene nahe. Daher sollte der Einfluss einer Reduktion der Expression, vergleichbar zum Zustand in der Ausgangszelllinie, auf die Sensitivität gegenüber dem Apoptose-induzierenden Chemotherapeutikum der Selektion untersucht werden. Als Methode wurde dafür der Knock-down mittels siRNA in den insensitiven Klonen gewählt.

Clusterin wurde in den meisten Klonen mit einer erhöhten Expression gefunden und es ist bereits einige Literatur zu dessen antiapoptotischer Funktion vorhanden. Daher wurde der Knock-down von Clusterin in den beiden Klonen T13 (selektioniert mit Taxotere®) und D21 (selektioniert mit Doxorubicin), die eine erhöhte Expression von Clusterin zeigten, zur Etablierung des Versuchsansatzes durchgeführt. Im Folgenden zuerst zur bisher beschriebenen Funktion von Clusterin.

Clusterin wird aufgrund seiner vielfältigen Funktionen auch unter weiteren Namen beschrieben: Apolipoprotein J, TRPM-2 (*testosterone-repressed prostate message-2*) oder *sulphated glycoprotein-2*. Es werden zwei Isoformen durch alternatives Splicing exprimiert. Das eine Genprodukt (sCLU) ist ein sezerniertes heterodimeres Glykoprotein, bestehend aus 449 Aminosäuren, dessen während der Prozessierung im Golgi-Apparat durch Spaltung entstandene Monomere (α - und β -Peptid) durch Disulfidbrücken verbunden sind. Dieser Isoform wird eine zytoprotektive, antiapoptotische Funktion zugeschrieben. Das alternative Genprodukt, nCLU, wird nicht in zwei Peptide gespalten, sondern verbleibt in seiner Proform im Zytoplasma. Als Reaktion auf zelluläre Schäden kann es prozessiert werden und in den Zellkern wandern, wo es proapoptotisch wirkt. Clusterin wird in nahezu allen Geweben exprimiert und kann in allen Körperflüssigkeiten des Menschen nachgewiesen werden. Zu den zellulären Prozessen, in denen Clusterin beteiligt ist, gehören der Transport von Lipiden, der Umbau von Membranen und

Gewebe, die Regulation des Immunsystems, die Reparatur von DNA, Zelladhäsion, Zellzykluskontrolle und Apoptose. Expressionsstudien fanden eine erhöhte Clusterin-Expression in verschiedenen Krebserkrankungen des Menschen, darunter in Tumoren der Blase, Niere, Prostata, Kolon, Brust und Lunge (Shannan et al., 2006). Dies führte zusammen mit dem Nachweis der antiapoptotischen Funktion zur Entwicklung von Therapiestrategien, die Clusterin als molekularen Angriffspunkt nutzen. Nach Erfolgen in den ersten klinischen Studien zur Antisense-Therapie mit Clusterin-spezifischen Oligonukleotiden (OGX-011) befinden sich diese momentan in Phase II (Chi et al., 2008).

Auf Grundlage dieser Daten könnte man in den insensitiven Klonen von BT-20 bei reduzierter Expression von Clusterin einen Einfluss auf die Apoptose-Sensitivität erwarten. Um dies zu untersuchen, wurden die Klone T13 und D21 transient mit Clusterin siRNA mittels kommerzieller Transfektionsreagenzien (Lipofectamine 2000™, Oligofectamine™ von Invitrogen) transfiziert. Dabei konnten trotz Optimierung der Bedingungen laut Herstellerangaben keine hohen Transfektionseffizienzen erreicht werden, so dass nur eine Reduktion um höchstens 75 % des Expressionslevels erzielt wurde (siehe Abbildung 16). Außerdem zeigte eine der drei siRNA-Sequenzen keinerlei Effekt auf die Expression von Clusterin. Da die Funktionalität einer siRNA von mehreren Kriterien abhängt, die unter anderem die Sequenz betreffen (Birmingham et al., 2007), wird allerdings von der Herstellerfirma trotz des getesteten Design-Algorithmus auch nur die Funktionalität bei zwei von drei Sequenzen garantiert.

Bei der im Anschluss an die transiente Transfektion der siRNAs durchgeführten Analyse der Apoptose-Sensitivität konnte in keinem der beiden untersuchten Klone nach Inkubation mit Taxotere® (für T13) bzw. Doxorubicin (D21) ein Effekt auf die Apoptose-Rate festgestellt werden (siehe Abbildung 17). Allerdings wurde die Reduktion der Clusterin-Expression nur auf dem mRNA-Level nachgewiesen. Da die antiapoptotische Isoform von Clusterin sezerniert wird (Shannan et al., 2006), kann das Protein im Medienüberstand noch vorhanden gewesen sein und weiterhin seine Funktion ausgeübt haben. Des Weiteren kann die Menge an Clusterin, die von den nicht transfizierten Zellen weiterhin sezerniert wurde, für die übrigen Zellen ausgereicht haben, um einen protektiven Effekt auszuüben. Das erklärt auch die abweichenden Ergebnisse anderer

Studien, die eine Zunahme der spontanen Apoptose-Rate nach Reduktion der sezernierten Clusterin-Expression auf Protein-Level zeigen (Trougakos et al., 2004).

Als zweites Kandidatengen mit erhöhter Expression in den insensitiven Klonen wurde **Timp2** für eine Knock-down Analyse ausgewählt, da Timp2 in Hinblick auf die bisher beschriebenen sowohl pro- als auch antiapoptotischen Funktionen interessant ist. Timp2 gehört zur Familie der endogenen Metalloproteinase-Inhibitoren (*tissue inhibitors of metalloproteinases*). Diese sezernierten Proteine können in den meisten Geweben und Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Durch die Bildung nonkovalenter Komplexe mit MMPs (Matrix-Metalloproteinasen) können sie deren Funktion inhibieren und damit zahlreiche Prozesse wie Wundheilung, Neuordnung von Geweben, Angiogenese sowie Invasion, Tumorigenese und Metastasierung beeinflussen (Lambert et al., 2004).

Timp2 wird konstitutiv exprimiert und kann verschiedenste MMPs inhibieren. Daneben spielt es aber auch eine Rolle bei der Aktivierung von Pro-MMP-2 durch MT1-MMP, wie bereits in der Einleitung erwähnt. Für Timp2 wurden inzwischen zusätzlich einige Mechanismen gezeigt, wie es unabhängig von MMPs Einfluss auf verschiedene zelluläre Prozesse nimmt, z.B. Proliferation (Seo et al., 2003) oder Motilität von Endothelzellen über die Induzierung von Rap1-Signalen, einem negativen Regulator der Migration (Oh et al., 2006). Des Weiteren ergaben Studien zur Timp2 Expression, dass diese in Ovarialkarzinomen erhöht ist (Kim et al., 2006; Okamoto et al., 2003) und mit einer schlechten Prognose bei Blasenkarzinom korreliert (Gakiopoulou et al., 2003). Bezüglich des Einflusses auf die Apoptose gab es bereits Hinweise auf eine antiapoptotische Rolle in Zellen der Hypophyse (Matsumoto et al., 1993), in Melanom-Zellen (Valente et al., 1998), in Makrophagen (Johnson et al., 2006) und in Muskelzellen (Menon et al., 2006; Menon et al., 2005). Diese Ergebnisse unterstützen den erwarteten Effekt auf die Apoptose nach Verringerung der Expression von Timp2 in den insensitiven BT-20 Klonen.

Es wurde, analog zu Clusterin, ein insensitiver Klon mit erhöhter Timp2-Expression, D13 (selektioniert mit Doxorubicin), transient mit siRNAs transfiziert und im Anschluss die Apoptose-Sensitivität gegenüber Doxorubicin untersucht. Wiederum konnte wegen niedriger Transfektionseffizienz kein kompletter Knock-down erreicht werden, in diesem Fall nur eine Reduktion um etwa 60 % (siehe Abbildung 18). Dabei hatte die Inkubation mit Doxorubicin keinen unmittelbaren Einfluss auf das Expressionslevel. Diese

Beobachtung unterstützt die Theorie, dass während der Selektion der insensitive Klone bereits vorhandene Subklone in der heterogenen Zelllinie selektioniert wurden und die Änderungen in der Genexpression nicht kurzfristig durch die zweitägige (48 h) Inkubation mit dem Chemotherapeutikum induziert wurden. Diese kurze Inkubation zur Selektion ist eine der Stärken dieser Strategie, da sie die Intervallbehandlung während einer Chemotherapie simuliert.

Bei der Analyse der Apoptose-Sensitivität nach Timp2-Knock-down konnte kein Unterschied in der Apoptose-Rate festgestellt werden (siehe Abbildung 19). Allerdings verhält es sich hier wiederum ähnlich wie bei Clusterin: Timp2 ist ein sezerniertes Protein und die Reduktion der Expression nach siRNA-Transfektion wurde nur auf mRNA-Ebene gezeigt. Die Transfektionseffizienz war ebenso zu niedrig, so dass noch einige Zellen Timp2 sezernieren konnten. Daher kann keine klare Aussage zur Rolle von Timp2 in der Apoptose-Sensitivität der BT-20 Klone getroffen werden. Neben den oben beschriebenen Hinweisen zur antiapoptotischen Funktion von Timp2 wurden, wie schon erwähnt, auch gegenteilige Resultate erzielt. Es wurde unter anderem gezeigt, dass die Überexpression von Timp2 mittels adenoviralem Transfer zwar Einfluss auf die Invasion von Pankreas-Krebszellen hat, aber nicht auf die Apoptose (Rigg & Lemoine, 2001). Ähnliche Ergebnisse wurden in kardialen Fibroblasten gefunden, die nach Timp2 Expression nur eine Zunahme bei der BrdU-Inkorporation zeigten, nicht aber eine Änderung bei der Apoptose-Rate (Lovelock et al., 2005). Außerdem gibt es Studien zur Rolle von Timps bei der Stabilisierung von Todesrezeptoren. Dabei wurde gezeigt, dass Timp3 diese stabilisieren kann und damit die Zellen sensitiver für die Auslösung der Apoptose über den extrinsischen Weg macht, Timp2 dagegen kann dies nicht (Ahonen et al., 2003). Neben den beschriebenen antiapoptotischen und die Apoptose nicht beeinflussenden Ergebnissen zu Timp2 gibt es auch Berichte über eine proapoptotische Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass Timp2 in T Lymphozyten Apoptose auslöst (Lim et al., 1999), in Maus-Tumormodellen nach Timp2-Überexpression mittels Adenoviren die Apoptose im Tumorgewebe erhöht ist (Brand et al., 2000) und dass in Osteozyten die Überlebensrate zu 50 % durch Timp2 reduziert wurde (Karsdal et al., 2004). Die proapoptotische Rolle von Timp2 scheint allerdings Zelltyp-abhängig zu sein, wie von Kim et. al gezeigt, die eine Induktion von Apoptose nach Überexpression von Timp2 nur in HeLa-Zellen fanden,

nicht aber in den Ovarialkarzinom-Zelllinien SKOV-3 und 2774. In SKOV-3 hingegen wurde sogar eine antiapoptotische Wirkung nach Cisplatin-Inkubation gefunden (Kim et al., 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Funktionen von Timp2 sehr vielfältig und teilweise gegensätzlich zu sein scheinen, je nach Zellsystem und untersuchter Fragestellung. Auch im Bezug auf die Rolle in der Apoptose lässt sich aus der Literatur keine generelle Aussage ermitteln. Daher müssen weitere Experimente die Rolle von Timp2 in der Apoptose von verschiedenen Zellsystemen aufklären, um die mögliche Eignung als therapeutisches Zielmolekül zu ermitteln.

Als drittes Kandidatengen wurde **Pink1** näher untersucht. Pink1 (*PTEN-induced putative kinase-1*) wurde in einer Studie identifiziert, die Änderungen im Genexpressionsprofil nach exogener Expression des Tumorsuppressors PTEN untersuchte (Unoki & Nakamura, 2001). Bereits kurz nach dieser Entdeckung wurde ein Zusammenhang mit der Parkinson-Krankheit nachgewiesen: Valente et al. fanden Mutationen in Pink1, die mit der erblichen Form dieser Krankheit in drei Familien segregierten und nicht in Kontrollchromosomen gefunden wurden. Nach Transfektion von Pink1 wt und Mutanten wurde die Lokalisation des Genprodukts in den Mitochondrien und eine neuroprotektive Wirkung des wt im Vergleich zu den Mutanten gezeigt (Valente et al., 2004). Die Frequenz von Pink1 Mutationen liegt zwischen 1 und 9 %, je nach ethnischer Bevölkerungsgruppe. Das Genprodukt von Pink1 enthält eine mitochondriale Zielsequenz und eine konservierte Proteinkinase-Domäne (Thomas & Beal, 2007). Obwohl lange Zeit keine potentiellen Substrate bekannt waren, gibt es Hinweise für eine protektive Rolle in den Mitochondrien, gezeigt durch *loss-of-function* Versuche *in vivo* mit mitochondrialer Dysfunktion (Clark et al., 2006; Park et al., 2006; Yang et al., 2006). Erste Hinweise auf Substrate wurden kürzlich gefunden, als Pridgeon et al. zeigen konnten, dass Pink1 das mitochondriale Chaperon-Protein TRAP1 (*TNF receptor-associated protein 1*), auch bekannt als Hsp75 (*heat shock protein 75*), phosphorylieren kann. Diese Phosphorylierung war essentiell für die Vermittlung des protektiven Effekts von Pink1 gegen durch oxidativen Stress verursachten Zelltod (Pridgeon et al., 2007). Eine andere kürzlich erschienene Arbeit zeigt Ergebnisse, die auf eine proapoptotische Serin-Protease, HtrA2 (*high temperature requirement protein A2*) oder Omi, als Substrat hindeuten. Mutationen in dieser Protease

sind ebenfalls mit Parkinson assoziiert und eine gezielte Deletion in Mäusen führt zu mitochondrialer Dysfunktion. Plun-Favreau et al. konnten zeigen, dass HtrA2 und Pink1 interagieren und im gleichen Stress-Signalweg agieren. HtrA2 wird Pink1-abhängig phosphoryliert und diese Phosphorylierung ist in Patienten vermindert, die eine mutierte Form von Pink1 tragen (Plun-Favreau et al., 2007).

Die beschriebenen Resultate lassen wiederum, ähnlich zu Clusterin, eine Reduktion der Apoptose-Sensitivität nach Knock-down von Pink1 in den insensitiven BT-20 Klonen erwarten. Dieser Knock-down konnte allerdings trotz verschiedener Versuchsansätze (stabiler Knock-down mit shRNA-Vektoren polyklonal und monoklonal, transienter Knock-down mit siRNA, auch in anderen Zelllinien) nicht erreicht werden. Daher konnte der Effekt, der von Deng et al. gezeigt wurde, die in einer neuronalen Zelllinie durch Knock-down von Pink1 Apoptose induzierten (Deng et al., 2005), nicht in den Klonen der Brustkrebszelllinie BT-20 wiederholt werden. Eine mögliche Erklärung für die Probleme bei der Reduktion der Pink1-Expression könnte sein, dass der Selektionsdruck durch das Antibiotikum G418, der während der Selektion auf mit shRNA-Vektoren positiv infizierte Zellklone herrscht, diejenigen mit einer reduzierten Pink1-Expression benachteiligt, da sie empfindlicher gegenüber proapoptotischen Signalen sind. Dies könnte durch induzierbare Expression von stabil integrierten shRNA-Konstrukten umgangen werden. Allerdings waren die Sequenzen der shRNA-Konstrukte nicht validiert, d.h. es kann auch sein, dass sie nicht funktional in der Verringerung der mRNA-Menge waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Rolle von Pink1 als protektivem Faktor im Hinblick auf die mitochondrielle Apoptose in Neuronen bestätigt scheint (Mills et al., 2008). Bis auf eine Publikation, die sich mit der Häufigkeit von Krebs in Parkinson-Patienten beschäftigt und Pink1 als potentiellen Tumorsuppressor bezeichnet (Inzelberg & Jankovic, 2007), wurde aber bislang nicht auf die Beteiligung von Pink1 in Krebserkrankungen eingegangen. Als antiapoptotisches Protein scheint es allerdings ein guter Kandidat für die weitere Analyse in Tumorzellen.

Abgesehen von den oben beschriebenen Punkten, die als Erklärung für das Ausbleiben eines Effektes auf die Apoptose-Sensitivität in den BT-20 Klonen nach Knock-down aufgeführt wurden, gibt es noch weitere denkbare Szenarien. Da die Änderungen der Genexpression für die einzelnen Gene relativ gering waren, ist es möglich, dass der

Apoptose-Phänotyp nicht von einem einzelnen Genprodukt bzw. Signalweg abhängt, sondern durch ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren vermittelt wird. Durch die Komplexität des Signalnetzwerkes in der Zelle kann oft durch alternative Signalwege auf die Blockade eines Weges reagiert werden, besonders in einem genetisch so instabilen Systems wie dem einer Krebszelle. Da sich bei der Genexpressionsanalyse der BT-20 Klone abzeichnete, dass nicht eine generelle Strategie bei allen Klonen, sondern viel mehr viele, individuelle Muster der Expressionsänderung vorliegen, kann es sein, dass die untersuchten Gene, Clusterin und Timp2, in den jeweiligen Klonen nicht die „Schlüsselkomponenten“ waren.

Für die übrigen Gene (EphA2, Pim-3 und Plk2) gibt es auch bereits Hinweise zu einer Rolle in der Apoptose. Aufgrund der wenig vielversprechenden Ergebnisse der ersten drei Gene wurde keine weitere Analyse durch Knock-down durchgeführt. Daher nur kurz zu der bisher in der Literatur beschriebene Rolle dieser Gene in verschiedenen zellulären Prozessen, besonders im Zusammenhang mit Krebs.

Pim-3 bildet zusammen mit Pim-1 und Pim-2 eine Familie von protoonkogenen Serin/Threonin-Kinasen hoher Homologie. Der Zusammenhang mit Krebs zeigte sich 2003, als eine erhöhte Transkription von Pim-3 nach EWS/ETS-induzierter maligner Transformation in NIH3T3-Zellen gefunden wurde (Deneen et al., 2003), später auch in verschiedenen Krebsarten. Hinweise zum funktionellen Mechanismus von überexprimiertem Pim-3 in Krebszellen zeigten sich nach Knock-down in Zelllinien des Leberzell-, Pankreas- und Kolonkarzinoms, der Apoptose induzierte (Fujii et al., 2005; Li et al., 2006; Popivanova et al., 2007). In den beiden letzteren Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass Pim-3 seine antiapoptotische Funktion über die Phosphorylierung und damit Inaktivierung des proapoptotischen Bad-Proteins ausübt. Kürzlich wurde zusätzlich zu der Beteiligung in den genannten Krebsarten auch die Überexpression und Funktion in Magenkarzinomen untersucht (Zheng et al., 2008). Seine antiapoptotische Funktion und die weitestgehend auf maligne Gewebe beschränkte Expression qualifizieren Pim-3 als Kandidatengen für eine gezielte Therapie. Allerdings müssen weitere Analysen, auch im Bezug auf Redundanz der stark homologen Pim-1 und -2, diesen Angriffspunkt zusätzlich validieren. Für Pim-1, das bislang am besten

charakterisierte Mitglied dieser Proteinfamilie, zeigen erste Studien zur Entwicklung von *small molecule inhibitors* bereits ermutigende Ergebnisse (Pogacic et al., 2007).

Plk2 gehört ebenfalls zu einer Familie von Serin/Threonin-Kinasen: den *polo-like kinases* (Plk1–4). Diese Proteinfamilie ist in verschiedenen Organismen stark konserviert und spielt eine entscheidende Rolle während unterschiedlicher Stadien des Zellzyklus. Dabei ist Plk1 bis jetzt am besten untersucht und wird, da es den höchsten Homologie-Grad mit dem einzelnen Plk-Gen niederer Organismen zeigt, für die meisten konservierten Funktionen während der Mitose und Zytokinese verantwortlich gemacht. Es gibt inzwischen mehrere Analysen, die Plk1 als Kandidatengen für die gezielte Krebstherapie validieren und einige *small molecule inhibitors*, die Plk1 inhibieren können, werden bereits in klinischen Studien getestet (Strebhardt & Ullrich, 2006; Warner et al., 2008). Plk2 wurde entdeckt als „*early-growth-response gene*“, dessen Expression durch mitogene Signale induziert wird – daher auch der Name Snk (*serum-inducible kinase*) (Simmons et al., 1992). Später wurde gezeigt, dass die Plk2-Expression auch als Stress-Antwort nach Bestrahlung induziert wird und zwar über die transkriptionelle Aktivierung durch p53. Der Knock-down von Plk2 mittels siRNA in Anwesenheit von mitotischen Giften wie Paclitaxel oder Nocodazol führte zu einer erhöhten Apoptose-Rate (Burns et al., 2003). Zusammen mit den Ergebnissen aus der Studie zur Plk2-Knockout-Maus, in der ein verspäteter Eintritt der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus beobachtet wurde (Ma et al., 2003), der Rolle von Plk2 in der Duplikation von Zentriolen (Warnke et al., 2004) und der kürzlich veröffentlichten Untersuchung eines Plk2-Knockouts in Krebszellen, bei der gefunden wurde, dass die Zellen ein erhöhtes Ausmaß an DNA-Schäden und eine damit verbundene höhere Apoptose-Rate aufwiesen und Plk2 mit Chk1 und Chk2 sowie p53 interagieren kann (Matthew et al., 2007), lässt sich eine Rolle von Plk2 in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden und mitotischen Kontrollpunkten vermuten. Daher wäre es in Kombination mit DNA-schädigenden Krebsmedikamenten vielleicht möglich, durch Inhibition von Plk2 deren Effizienz zu erhöhen.

EphA2 gehört zur größten Familie der Rezeptortyrosinkinasen: den Eph-Rezeptoren. Diese 16 Rezeptoren, die alle membrangebunden sind und sowohl extrazelluläre als auch zyttoplasmatische Domänen enthalten, interagieren mit membrangebundenen Liganden auf der Zelloberfläche, den Ephrinen. Die Familie der Ephrine wird in zwei Klassen

unterteilt: Ephrine der Klasse A (Ephrin A1–A6) sind über einen GPI-Anker (*glycosyl phosphatidyl inositol*) an der Plasmamembran befestigt, während Ephrine der Klasse B (B1–B3) über eine Transmembrandomäne und einen kurzen zytoplasmatischen Rest verfügen. Die Ephrin-Rezeptoren werden dementsprechend auch in die Klassen A und B unterteilt, da sie, bis auf wenige Ausnahmen, jeweils nur Liganden einer Untergruppe binden können. Eine der Besonderheiten der Eph/Ephrin-Familie ist, dass sowohl Rezeptoren als auch Liganden nach der Interaktion Signale ins Zellinnere weiterleiten können. Dieses System gewinnt zusätzliche Komplexität, indem die Interaktion nicht nur zwischen zwei benachbarten Zellen (*trans*) stattfinden kann, sondern auch, wenn Rezeptor und Ligand auf der Oberfläche der gleichen Zelle exprimiert sind (*cis*). Dabei wird allgemein angenommen, dass *trans* Interaktionen aktivierende Signale vermitteln, während *cis* Interaktionen inhibierend wirken.

Eph-Rezeptoren und Ephrine werden in nahezu allen Geweben eines sich entwickelnden Embryos exprimiert und sie sind in einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen beteiligt. Dabei wirken sie meistens über die Regulation der Zelladhäsion. Ihre Rolle im adulten Organismus begann sich erst später abzuzeichnen. Inzwischen wurden Funktionen beim Lernprozess und dem Gedächtnis, der Homöostase von Knochen und der Insulin-Sekretion beschrieben. Wenn die Signale des Eph/Ephrin-Systems gestört sind, kann es zu schwerwiegenden Erbkrankheiten und der Entwicklung von Krebs kommen (Arvanitis & Davy, 2008).

Unter den Eph-Rezeptoren gilt besonders EphA2 als besonders relevant im Bezug auf Krebserkrankungen. Es gibt zahlreiche Studien zur Überexpression von EphA2 in verschiedenen Krebsarten, wohingegen in normalen Zellen die Expression auf wenige epitheliale Gewebe beschränkt ist. Oft ist das Expressionslevel im Tumor mit schlechter Prognose, fortgeschrittenem Stadium oder erhöhtem metastatischem Potential assoziiert. Da einige Ergebnisse der EphA2-Expression eine aktive Rolle bei der Tumorprogression zusprechen, u.a. durch vermehrte Invasion und Antiapoptose der Krebszellen sowie verminderte Sensitivität gegenüber therapeutischen Wirkstoffen, gilt EphA2 als vielversprechendes Kandidatengenen für die gezielte Krebstherapie (Landen et al., 2005). Verschiedene präklinische Studien zu löslichen EphA2-Fc-Rezeptoren, EphA2-siRNA, monoklonalen EphA2-Antikörpern und EphA2-mimetischen und antigenen Peptiden

(Übersicht in (Ireton & Chen, 2005)) zeigten bereits ermutigende Ergebnisse und bestätigten die Strategie, EphA2 als Angriffspunkt in der Krebstherapie zu nutzen.

Als Schlussfolgerung aus diesem Projekt lässt sich ziehen, dass das Zellkulturmodell prinzipiell zur Identifizierung neuer Angriffspunkte beitragen kann. Die meisten in der Literatur beschriebenen Ergebnisse anderer Studien über alle sechs oben beschriebenen Gene, die in den Apoptose-insensitiven Klonen der Brustkrebszelllinie BT-20 mit erhöhter Expression gefunden wurden, unterstützen deren potentielle bzw. bereits bestätigte Rolle als Kandidatengen für die gezielte Krebstherapie. Leider konnte die Funktionalität in der Antiapoptose in dem hier untersuchten Zellsystem nicht bestätigt werden. Dennoch sind einige dieser Gene vielversprechende Kandidaten, für die eine antiapoptotische Rolle in Krebserkrankungen noch nicht umfassend aufgeklärt ist. Nach Validierung durch andere Methoden, wie beispielsweise Überexpression oder aber Knock-down mit induzierbaren, stabil integrierten shRNA-Konstrukten, können sie durchaus als Angriffspunkte in Frage kommen. Es hat sich gezeigt, dass mit der Strategie der Selektion im Zellkulturmodell – durch die kurze Inkubationszeit mit dem Chemotherapeutikum ähnlich der Situation im Patienten während einer Chemotherapie – aus einer heterogenen Zellpopulation einzelne Klone isoliert werden können, die eine erhöhte Expression antiapoptotischer Gene aufweisen. Diese können als Ausgangspunkt für die weitere Validierung als Kandidatengen der gezielten Krebstherapie und die Aufklärung von antiapoptotischen Mechanismen in Krebszellen dienen.

4.2 MMPs als Angriffspunkte einer gezielten Krebstherapie

Matrix-Metalloproteinasen werden, wie in der Einleitung bereits erläutert, schon seit geraumer Zeit für ihren Einsatz als Angriffspunkte einer gezielten Therapie getestet. Dabei lag der Hauptfokus in den meisten Fällen auf ihrer, dem Namen nach naheliegenden, Funktionalität bei der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix. Doch die Selektion, die zur Identifizierung von MMP-15 als potentiellm Kandidatengen führte (Abraham et al., 2005), zielte nicht auf die Fähigkeit der Zellen, eine Matrix proteolytisch anzugreifen, sondern einem proapoptotischen Signal zu entkommen. Diese Funktionalität von MMPs kristallisiert sich erst seit kurzem heraus (Mannello et al., 2005) und für MMP-15 im speziellen war dies der erste Hinweis.

Die Blockade von Apoptose in Krebszellen ist, wie in Kapitel 1.2 der Einleitung ausführlich beschrieben, ein essentielles Merkmal von Tumorzellen – und ein gut geeignetes Ziel für das Eingreifen mit Krebsmedikamenten. Daher sollte in dieser Arbeit MMP-15 als Zielgen näher charakterisiert und ein inhibitorischer Antikörper entwickelt werden, mit dessen Hilfe in Krebszellen die Apoptose induziert werden kann.

Dazu wurde zuerst Antigen für die Immunisierung hergestellt, wobei zwei parallele Strategien verfolgt wurden: die Immunisierung mit ganzen Zellen, die MMP-15 überexprimieren und die Immunisierung mit aufgereinigtem MMP-15 Protein. Für funktionell wirksame Antikörper, die z.B. die Aktivität ihres Zielproteins inhibieren sollen, ist es essentiell, dass sie die native Form ihres Antigens erkennen. Die Generierung derartiger Antikörper gegen Membranproteine ist allerdings oftmals aufgrund der Aufreinigung von Membranproteinen in ihrer nativen Form schwierig. Außerdem können rekombinante Proteine leicht ihre native Konformation verlieren (Nagata et al., 2003). Daher wurde neben der klassischen Strategie mit Protein-Antigen die Immunisierung mit ganzen Zellen gewählt, da das MMP-15 Protein so in seiner nativen Form auf der Zelloberfläche präsentiert wird.

Bei der Infektion von Rat-1 Fibroblasten mit retroviralen MMP-15-Konstrukten konnte beobachtet werden, dass die polyklonalen Zellen nur geringe Mengen an MMP-15 exprimierten, sodass nur in monoklonalen Zellen eine deutliche Proteinmenge

nachgewiesen werden konnte. Bei der analogen Infektion von NIH3T3 Fibroblasten war die Expression ebenfalls nur zu Beginn deutlich (siehe Abb. 27 Focus Formation Assay) und nahm nach einigen Passagen der Zellen ab. Nach der Selektion für stabil exprimierende Zelllinien war die Expression kaum noch nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Dieser bzw. ein ähnlicher Effekt – nur geringe Überexpression von MMP-15 über längere Zeit – trat bei allen Zelllinien auf, die in dieser Arbeit untersucht wurden und wurde auch von Reimar Abraham in HeLaS3 beobachtet (persönliche Kommunikation). Auch die wiederholte Infektion der bereits mit MMP-15 infizierten Rat-1 Klone 3 und 27 zur Steigerung des Expressionslevels zeigte keinen Erfolg. Daher kann es nicht ausgeschlossen werden, dass die Probleme bei der Überexpression von MMP-15 darauf zurückzuführen sind, dass die Zellen ohne einen Selektionsdruck durch Apoptose-Induktion einen gewissen Nachteil durch die MMP-15-Expression haben und die Expression daher wieder verlieren. Die Expression über ein induzierbares System, beispielsweise mit einem Tet-Repressor (Gossen et al., 1994), wäre eine Möglichkeit, diesen Faktor zu umgehen.

Bei der transienten Expression von MMP-15 in HEK293 Zellen konnten dagegen höhere Expressionslevel erreicht werden. Für die Aufreinigung des MMP-15 Proteins wurde ein Konstrukt verwendet, welches nur den extrazellulären Teil von MMP-15 kodiert, sodass dieses in den Medienüberstand abgegeben wird. Dadurch konnte über mehrere Tage der Überstand geerntet werden. Außerdem wurde die E260A Mutante verwendet, da nicht klar ist, ob sich MMP-15 bei hohen Konzentrationen, wie sie während der Aufreinigung auftreten, selbst spalten kann. Die Aufreinigung über Glutathion-Sepharose führte zu sauberem MMP-15 Protein, wie in Abbildung 23 gezeigt. Allerdings traten bei der Aufreinigung folgende Probleme auf: trotz der Inkubation mit der Glutathion-Sepharose für einen gegenüber den Herstellerangaben mehrfach längeren Zeitraum konnte nicht alles MMP-15 Protein an die Sepharose binden, obwohl die Kapazität der Sepharose noch nicht erreicht war. Dies wurde durch erneute Inkubation des Durchflusses mit frischer Sepharose deutlich (Daten nicht gezeigt). Außerdem konnte das an die Sepharose gekoppelte MMP-15 Protein nicht, wie im Protokoll des Herstellers beschrieben, mit Glutathion-Puffer eluiert werden, sondern war nur durch Kochen mit Lämmli-Puffer von der Sepharose zu lösen. Da diese Elution für die Immunisierung aufgrund der

Denaturierung des Proteins nicht in Frage kam, wurde zur Immunisierung die MMP-15-Sepharose eingesetzt. Das beschränkte allerdings die Proteinmenge, da der Ratte nicht mehr als 500 µl Sepharose-Suspension gespritzt werden konnte. Diese Menge entspricht ungefähr 200 µg MMP-15 Protein.

Die Menge an MMP-15 Protein auf der Oberfläche der Rat-1 Klone bzw. an der Glutathion-Sepharose könnte die geringe Ausbeute an MMP-15-Antikörperproduzierenden Hybridoma-Klonen erklären. Allerdings gibt es für den Erfolg einer Immunisierung auch vielfältige andere Kriterien außer der Antigenmenge, sodass die Gründe nicht eindeutig festgestellt werden konnten.

Für die Etablierung des Test-Experiments und stellvertretend für die zu generierenden MMP-15 Antikörper wurde der Einfluss eines kommerziellen MMP-15 Antikörpers auf die CH-11 induzierte Apoptose in den Zelllinien HeLaS3 und Klon 58 (Abraham et al., 2005) untersucht. Dabei konnte der Unterschied der Apoptose-Sensitivität zwischen Ausgangszelllinie und selektioniertem Klon 58 reproduziert werden, allerdings hatte der MMP-15 Antikörper keinen Effekt auf die Apoptose-Rate nach Induktion mit dem α -Fas-Antikörper CH-11 (siehe Abb. 19). Da durch Knock-down Experimente von MMP-15 im Klon 58 eine gewisse MMP-15-Abhängigkeit der Apoptose-Sensitivität gezeigt wurde (Abraham et al., 2005), ist anzunehmen, dass der verwendete MMP-15 Antikörper das Protein an einem Epitop bindet, das für die Apoptose-Funktion irrelevant ist.

Um die Rolle von MMP-15 in der Apoptose näher zu charakterisieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit Zellsysteme mit MMP-15 Überexpression generiert, während Reimar Abraham als Kooperationspartner weitere Knock-down Experimente durchführte. Dafür wurden neben der katalytisch inaktiven Mutante E260A noch die beiden Mutanten D596G und G609R konstruiert, um ihre mögliche Funktion zu untersuchen. D596G ist ein natürlich vorkommender Polymorphismus, der auch bei einer Sequenzierungsstudie in Proben von Brusttumoren gefunden wurde (Sjoblom et al., 2006a). Die betroffene Aminosäure liegt carboxyterminal von den Hemopexin-ähnlichen Domänen innerhalb der Glyzin-reichen Sequenz, die diese mit der Transmembran-Domäne verbindet (Morrison et al., 2001). G609R kommt mit einer Allelfrequenz von 35 % ebenfalls als natürlicher Polymorphismus vor (refSNP ID: rs3743563, MMP-15 Genecard auf <http://www.dkfz-heidelberg.de/GeneCards/index.shtml>).

Zusätzlich zu den Zelllinien, die für die Antigenherstellung verwendet wurden (Rat-1 und HEK293), wurden die Brustkrebszelllinien SK-BR-3 und BT-474 sowie MCF10A als normale Brustepithelzelllinien mit MMP-15 infiziert. Die MMP-15 exprimierenden Rat-1 Fibroblasten wurden hinsichtlich verschiedener zellulärer Prozesse untersucht: Apoptose-Sensitivität gegenüber Doxorubicin, Kontakt-Inhibition des Wachstums (Focus Formation Assay) und Wachstumsrate. Diese Prozesse sind alle relevant für die Krebsentstehung und -progression und sollten daher bei der Validierung eines Kandidatengens berücksichtigt werden. Leider konnte in keinem der untersuchten Prozesse ein signifikanter, Krebs-unterstützender Einfluss von MMP-15 festgestellt werden.

Bezüglich der Apoptose-Sensitivität können folgende Punkte aufgeführt werden: es wurde zwar eine tendenziell niedrigere Apoptose-Rate in den beiden untersuchten MMP-15-Klonen beobachtet (Abbildung 29), allerdings auch in einem der Kontrollklone ohne MMP-15. Da nur die monoklonalen Zellen eine signifikante Menge an MMP-15 exprimierten und daher dieses Experiment nicht mit polyklonalen Zellen durchgeführt werden konnte, können klonale Effekte also nicht ausgeschlossen werden. Außerdem zeigten die Werte zwischen den drei Wiederholungen dieses Experiments relativ hohe Variabilität, so dass die hohe Standardabweichung keine eindeutige Aussage zulässt. Weiterhin zu beachten ist allerdings, dass der Effekt bei Apoptose-Induktion mit Doxorubicin auch beim HeLaS3 Klon 58 nicht so deutlich war wie bei Apoptose-Induktion mit CH-11 (Abbildung 28). Daher müssten für eine fundierte Aussage entweder zusätzliche Apoptose-Stimuli untersucht werden, die auch im Klon 58 einen deutlichen Effekt zeigen – CH-11 konnte wegen zellphysiologischer Gründe bei Rat-1 Zellen nicht eingesetzt werden (Hueber et al., 1997) – oder die Anzahl der Wiederholungen des Apoptose-Experiments müsste erhöht werden, um eine geringere Standard-Abweichung zu erreichen. Allerdings könnten klonale Effekte nur ausgeschlossen werden, wenn die Zahl der untersuchten Klone erhöht oder eine polyklonale Population mit höherer MMP-15 Expression eingesetzt werden würde. Da keine weiteren Klone mit einer ausreichend hohen MMP-15-Expression isoliert werden konnten, wurden diese Experimente nicht weiter optimiert.

Das Argument der klonalen Effekte kann auch bezüglich des Einflusses von MMP-15 auf die Wachstumsrate angebracht werden. Obwohl in diesem Experiment mehrere Klone

untersucht wurden, ließ sich kein vom MMP-15 Expressionslevel abhängiger Effekt nachweisen. Bei diesem Experiment kam erschwerend hinzu, dass die Klone teilweise unterschiedliche Zellgrößen zeigten und daher bei gleicher Zellzahl eine abweichende Konfluenz zu beobachten war.

Neben ihrer Rolle in der Tumorprogression wurden inzwischen auch Hinweise einer aktiven Rolle von MMPs in der frühen Phase der Transformation und Tumorentstehung gefunden, insbesondere von MMP-3 und MMP-14 im Zusammenhang mit genomischer Instabilität (Golubkov & Strongin, 2007; Radisky & Bissell, 2006; Stallings-Mann & Radisky, 2007). Daher sollte auch die Rolle von MMP-15 in diesem Zusammenhang untersucht werden. Der Focus Formation Assay zur Untersuchung der *in vitro* Transformation wurde in den beiden klassisch verwendeten Fibroblasten-Zelllinien NIH3T3 und Rat-1 durchgeführt, da beide Zelllinien eine geringe Neigung zur spontanen Bildung von Foci aufweisen. Weder in den frisch infizierten NIH3T3 Zellen noch in den selektionierten, stabil exprimierenden Rat-1 Zellen konnte die MMP-15 abhängige Bildung von Foci beobachtet werden. Die Ergebnisse der Rat-1 MMP-15 Klone 3 und 27, die die höchste Menge an MMP-15 exprimierten, lassen zwar einen Einfluss von MMP-15 vermuten, aber es muss wiederum das Argument der klonalen Effekte angebracht werden.

Das Phänomen der Kontaktinhibition beim Wachstum von Zellen wurde schon früh entdeckt (Eagle & Levine, 1967) und der Verlust der Kontaktinhibition bald mit der zellulären Transformation und Tumorigenese in Zusammenhang gebracht (Abercrombie, 1979). Aufgrund der Beteiligung von Zelladhäsionsmolekülen und der Tatsache, dass Matrix-Metalloproteinasen diese spalten können, wurden bereits einige Untersuchungen zur Rolle der MMPs in diesem Prozess durchgeführt.

In einer Studie, die den Einfluss von MMPs auf die Kontaktinhibition in Fibroblasten untersuchte, wurden in Zellen mit verminderter Timp1-Expression Hinweise für einen Verlust der Kontaktinhibition gefunden (Ho et al., 2001). Da Timp1 kaum eine inhibitorische Wirkung auf MT-MMPs, also auch MMP-15, zeigt (Lambert et al., 2004), scheint der Einfluss der perizellulären Proteolyse auf das Zelladhäsions-System und die normale Kontaktinhibition und somit Zelltransformation und Tumorigenese in diesem Zellsystem durch ein anderes Mitglied der MMP-Familie vermittelt zu werden. Dafür

spricht auch, dass dieser Effekt durch einen Kollagenase-Inhibitor (GM6001, inhibiert MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8 und MMP-9) aufgehoben wurde (Ho et al., 2001). Des Weiteren wurde in einer früheren Arbeit zur chemisch induzierten Transformation ebenfalls ein Einfluss von Timp1 und dem synthetischen MMP-Inhibitor KB8301 (inhibiert MMP-1, MMP-3 und MMP-9) auf die Bildung von Foci und eine Induktion von MMP-3 und MMP-9 während der Transformation gefunden (Shoji et al., 1997). Daher ist das Ergebnis der Focus Formation Assays mit MMP-15 mit den bisher veröffentlichten Daten vereinbar.

Um die Rolle von MMP-15 auch in einem Krebs-spezifischen Zellsystem zu untersuchen und mit der Funktion in normalen Zellen eines entsprechenden Zelltyps zu vergleichen, wurden außerdem zwei Brustkrebszelllinien, SK-BR-3 und BT-474, sowie MCF10A als normale Brustepithelzelllinie mit MMP-15 infiziert. Das führte in MCF10A-Zellen zur im Vergleich höchsten MMP-15 Expression in polyklonalen Zellen, die auch über längere Zeit stabil war. Bei der Analyse der Apoptose-Sensitivität gegenüber Doxorubicin, das bei der Behandlung von Brustkrebs routinemäßig eingesetzt und in vielen Studien zur Apoptose-Induktion in verschiedenen Zellsystemen angewandt wird, zeigte sich wiederum kein MMP-15 abhängiger Effekt auf die Apoptose-Rate. Vielmehr konnte beobachtet werden, dass die Zellen sehr unterschiedlich auf die Inkubation mit Doxorubicin reagierten und die Apoptose-Rate nicht in direkter Abhängigkeit zur Dosis war. Daher kann aus diesen Experimenten keine klare Aussage gezogen werden. Die Untersuchung der Wachstumsrate in Abhängigkeit von MMP-15 konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellen mit pLXSN (Leervektor), MMP-15 wt oder MMP-15 D596G-Expression nachweisen.

In den beiden Krebszelllinien SK-BR-3 und BT-474 war die Expression in polyklonal infizierten Zellen relativ schwach und es konnte in SK-BR-3 kein Unterschied in der Apoptose-Sensitivität gegenüber Doxorubicin festgestellt werden. Für die Zelllinie BT-474 wurde außerdem die transiente Transfektion optimiert und einige Experimente zur Apoptose-Sensitivität gegenüber Staurosporin, einem unspezifischen Kinase-Inhibitor, der oft zur Induktion von Apoptose eingesetzt wird, durchgeführt. Doch auch hier wurde kein Effekt der MMP-15 Expression auf die Apoptose-Rate gefunden.

Um eine stärkere Überexpression zu erreichen, wurde außerdem die leicht zu transfizierende Zelllinie HEK293 auf MMP-15 abhängige Effekte der Apoptose-Sensitivität

untersucht. Dabei wurden zuerst verschiedene Apoptose-Stimuli getestet, um eine für diese Bedingungen geeignete Substanz zu finden. Mit dem hier verwendeten Assay konnte die Staurosporin-induzierte Apoptose am besten quantifiziert werden und die selektionierten Klone der Zelllinie HeLaS3 (Klon 14, 36 und 58) mit erhöhter MMP-15 Expression zeigten auch gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose eine verminderte Sensitivität. In den transient transfizierten HEK293 Zellen allerdings konnte dieser Effekt bei keiner der untersuchten Inkubationszeiten und Staurosporin-Dosen beobachtet werden. Auch war kein Unterschied zwischen den verschiedenen MMP-15 Mutanten festzustellen.

Nachdem der Effekt von MMP-15 auf die Apoptose in den untersuchten Zelllinien nicht reproduzierbar schien, wurden erneut HeLaS3-Zellen mit MMP-15 infiziert, da die Zelllinie aus Reimar Abrahams Publikation nicht mehr zur Verfügung stand. Durch die Infektion und Selektion von drei polyklonalen Populationen konnte eine Zunahme der MMP-15 Expression erreicht werden (Abbildung 43), die allerdings relativ gering war. Auch als Reimar Abraham diese Infektion wiederholt hatte, konnte er kaum Expression in polyklonalen Zellen nachweisen (persönliche Kommunikation). Da der Unterschied aber vergleichbar mit dem zwischen Klon 58 und der Ausgangszelllinie war, wurden die Zellen dennoch auf ihre Apoptose-Sensitivität gegenüber CH-11 untersucht. Dabei konnte, ebenso wie in den bisher untersuchten Zelllinien, kein signifikanter Unterschied in der Apoptose-Rate festgestellt werden (Abbildung 44). Ähnliche Ergebnisse erhielt auch Reimar Abraham bei neu infizierten polyklonalen HeLaS3-Zellen, die nur geringe Mengen an MMP-15 überexprimierten (persönliche Kommunikation). HeLaS3 Zellen können in zwei verschiedenen Kulturmedien kultiviert werden (Ham's F12 und DMEM). Die Zelllinie für die Überexpression in dieser Arbeit wurde in DMEM-Medium kultiviert, die Ausgangszelllinie für die Selektion von Klon 58 und die Überexpression in Abraham et al. war in Ham's F12-Medium. Da diese Zelllinie bereits seit geraumer Zeit in den verschiedensten Laboren weltweit verwendet wird, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Zellpopulationen in den verschiedenen Medien unterschiedlich entwickelt haben. Daher können auch Unterschiede der Zellpopulationen von HeLaS3 in DMEM- bzw. Ham's-F12-Medium für die abweichenden Ergebnisse zu der ersten Zelllinie in Abraham et al. verantwortlich sein, da sie auch sichtbare Unterschiede in Zellmorphologie und

Wachstum zeigen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Effekt einer Überexpression von MMP-15 auf die Apoptose-Sensitivität in HeLaS3 scheinbar nicht so stabil reproduzierbar ist wie der Knock-down (Reimar Abraham).

Die Substrate von MMP-15, die für den antiapoptotischen Effekt verantwortlich sind, sind noch nicht bekannt, deshalb besteht die Möglichkeit, dass diese in den untersuchten Zelllinien (Rat-1, MCF10A, SK-BR-3, BT-474, HEK293) nicht exprimiert bzw. mutiert oder deren Signalwege durch andere genetische Veränderungen dereguliert sind. Das würde auch den Effekt des Knock-downs auf die Apoptose-Rate in Zellen mit endogener MMP-15 Expression erklären (Daten von Reimar Abraham), da MMP-15 dort in die entsprechenden Signalwege integriert ist. Daneben besteht außerdem die Möglichkeit, dass MMP-15 trotz Nachweis im Westernblot und durch Oberflächenfärbung zwar in der richtigen Lokalisation exprimiert wurde, aber nicht oder nicht vollständig aktiv war. Ein für MMP-15 spezifischer Aktivitätsassay ist momentan auf dem Markt nicht verfügbar und es ist auch kein für MMP-15 spezifisches Substrat bekannt.

Daher wäre als ein nächster möglicher Schritt bei der Validierung von MMP-15 als *drug target* die Aufklärung des Substrat-Spektrums sinnvoll. Dies wäre zum Beispiel mit Hilfe der Massenspektrometrie denkbar, analog zu der kürzlich veröffentlichten Methode für MMP-2 (Dean & Overall, 2007).

MMP-Inhibitoren (MMPIs) als Therapeutika

Obwohl der Einsatz von MMP-Inhibitoren als therapeutische Wirkstoffe zur Behandlung verschiedener Krankheiten bereits seit mehr als 20 Jahren getestet wird, hat es bis jetzt erst eine Substanz in die klinische Anwendung geschafft: Periostat™ für die Behandlung von Zahnfleisch-Erkrankungen. Eigentlich waren Krebs und Arthritis die beiden Indikationen, für die die größten Hoffnungen auf einen erfolgreichen Einsatz von MMP-Inhibitoren bestanden, aber die zahlreichen gescheiterten klinischen Studien in diesen beiden Krankheiten haben das Interesse an der Entwicklung neuer Substanzen erheblich reduziert. Als Gründe für die Misserfolge der bisherigen Studien gelten auf der einen Seite Fehler beim Design der klinischen Studien und auf der anderen Seite die Komplexität dieser Protein-Familie, die trotz intensiver Forschung noch vielfach nicht aufgeklärt ist (Fingleton, 2007). Dazu gehört unter anderem die Entdeckung, dass manche MMPs unter gewissen Bedingungen einen protektiven, antitumorigenen Effekt ausüben. Als Beispiele für Effekte in Mausmodellen sind hier zu nennen: die inhibitorische Wirkung von MMP-8 auf das Tumorstadium, pro- und antitumorigene Wirkungen von MMP-9 in verschiedenen Tumormodellen in Hinblick auf Invasion und Metastasierung oder die Generierung von Angiostatin durch MMP-12, exprimiert in Tumor-assoziierten Makrophagen (Martin & Matrisian, 2007). Eine Korrelation der MMP-12 Expression mit besserer Prognose wurde auch in Leberzellkarzinom und kolorektalen Karzinom des Menschen gefunden. Neben dieser Art der unerwünschten Wirkungen – die Hemmung von protektiven MMPs – traten in vielen Studien als Nebenwirkung auch Symptome des Muskuloskeletalen Syndroms (MSS) auf. Die Auslöser sind noch nicht bekannt und MSS wurde im Mausmodell nicht beobachtet. Aufgrund dieser Nebenwirkungen musste in vielen Fällen die Behandlung unterbrochen bzw. abgebrochen oder die Dosis unter die effektive Dosis aus dem Tiermodell gesenkt werden. Damit waren Aussagen über die Wirksamkeit oft nicht möglich (Fingleton, 2008). Diese Effekte und die Tatsache, dass die erfolgreichen Studien in Tiermodellen oft in frühen Stadien der Krankheit durchgeführt wurden und die klinischen Studien am Menschen erst im Endstadium ansetzten, könnten zum Scheitern des Einsatzes von Breitspektrum-MMP-Inhibitoren beigetragen haben (Martin & Matrisian, 2007). Eine mögliche Strategie, die immer noch vielversprechenden Angriffspunkte MMPs zu nutzen, ist die spezifische Hemmung von einzelnen MMPs im

Gegensatz zu den bisherigen Breispektrum MMPis. Da das Design von spezifischen *small molecule inhibitors* durch die hohe strukturelle Ähnlichkeit der katalytischen Domäne sehr schwierig ist, scheint die Entwicklung inhibitorischer Antikörper eine gute Alternative. Ein erstes positives Beispiel ist ein spezifischer MMP-14 Antikörper der Firma Dyax, der die Aktivität von MMP-14 und die Aktivierung von MMP-2 hemmen kann sowie die Tumorprogression und Metastasierung in Tumormausmodellen signifikant reduziert (Devy et al., 2007).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Mit der Aufklärung der molekularen Vorgänge in Krebszellen durch die Krebsforschung der letzten Jahrzehnte wurde eine neue Strategie der Krebstherapie ermöglicht: die gezielte Manipulation von Krebs-relevanten Molekülen. Diese Art der Therapie birgt unter anderem den Vorteil der verringerten Nebenwirkungen, wenn Moleküle getroffen werden, die in Krebszellen durch veränderte Expressionslevel oder Mutationen dereguliert sind und normale Zellen daher nicht oder kaum beeinträchtigt werden. Des Weiteren kann in Kombination mit herkömmlicher Chemotherapie einer Resistenzentwicklung entgegengewirkt werden, wenn die Proteine der verantwortlichen Mechanismen durch die gezielte Therapie beeinflusst werden.

Ein Mechanismus, der in vielen Fällen für die Chemoresistenz verantwortlich ist, aber auch einen entscheidenden Schritt im Prozess der Tumorigenese darstellt, ist der Verlust der Apoptose-Sensitivität von Krebszellen. Apoptose als natürlicher Prozess des Zelltods schützt den Organismus vor infizierten oder entarteten Zellen und liegt auch der Wirkungsweise von Chemotherapeutika zu Grunde. Durch die Veränderung der molekularen Mechanismen und Signalwege der Apoptose können Krebszellen dem Selektionsdruck der körpereigenen Tumorabwehr bzw. der Wirkung der Chemotherapeutika entkommen. Daher ist die Aufklärung derartiger antiapoptotischer Mechanismen ein guter Ansatzpunkt für die Weiterentwicklung der Krebstherapie.

In dieser Arbeit wurden zwei Projekte bearbeitet, die antiapoptotische Mechanismen in Krebszellen untersuchen. Im ersten Projekt sollten neue Kandidatengene identifiziert werden, die zum antiapoptotischen Phänotyp von Krebszellen beitragen können. Dafür dienten als Grundlage die Daten der dieser Arbeit vorausgegangenen Diplomarbeit. Durch Genexpressionsanalyse wurden Gene identifiziert, die in mit Chemotherapeutika selektionierten Klonen der Brustkrebszelllinie BT-20, die eine verringerte Sensitivität gegenüber diesen Chemotherapeutika zeigten, eine erhöhte Expression aufwiesen. Diese Expressionsdaten konnten durch semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion validiert werden. Für die funktionelle Validierung der Rolle dieser Gene im Prozess der Apoptose wurden Knock-down Experimente mit siRNAs für einige der Gene durchgeführt. Leider

konnte dadurch kein Einfluss auf die Apoptose-Rate erreicht werden. Dennoch sprechen Daten aus der Literatur für eine antiapoptotische Funktion mancher dieser Gene. Daher ist anzunehmen, dass das Ausmaß des Knock-down aufgrund von Restaktivität der Gene bzw. noch vorhandenem Protein nicht ausreichend war oder der Phänotyp in den insensitiven Klonen durch das Wirken mehrerer Genprodukte vermittelt wird und der Knock-down eines einzelnen Gens in diesem Zellsystem darum keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptose-Sensitivität ausübt. Weiterführende Experimente könnten einige der identifizierten vielversprechenden Kandidaten validieren.

Im zweiten Projekt sollte ein Kandidatengen weiter charakterisiert werden, dass in einer früheren Arbeit von Reimar Abraham aus dieser Arbeitsgruppe identifiziert wurde. In mit α -Fas-Antikörper selektionierten Klonen der Zelllinie HeLaS3, die eine verringerte Apoptose-Sensitivität aufweisen, konnte die verstärkte Expression der Matrix-Metalloproteinase MMP-15 nachgewiesen werden. In Kooperation mit Reimar Abraham, der die Effekte eines Knock-down von MMP-15 weiter untersuchte, wurde die Rolle von MMP-15 nach Überexpression analysiert. Außerdem wurden Experimente für die Entwicklung eines inhibitorischer Antikörpers gegen MMP-15 durchgeführt, der in Zellen mit MMP-15 abhängiger Antiapoptose die Induktion von Apoptose wieder herstellen soll. MMP-15 wurde in verschiedenen Zellsystemen stabil und transient als Wildtyp und mit verschiedenen Mutationen überexprimiert. Stabil exprimierende Rat-1 Fibroblasten und in HEK293 Zellen exprimiertes und aufgereinigtes MMP-15 Protein dienten zur Immunisierung von Ratten für die Herstellung des Antikörpers. Erst kurz vor Ende dieser Arbeit konnten zwei monoklonale Antikörper identifiziert werden, die MMP-15 auf der Zelloberfläche der Rat-1 Zellen binden können. Daher konnten keine funktionellen Studien mit diesen Antikörpern mehr durchgeführt werden.

Die Analysen zur Funktion von MMP-15 nach Überexpression in den verschiedenen Zellsystemen konnten keinen signifikanten Einfluss von MMP-15 auf die untersuchten Prozesse der Apoptose, des Zellwachstums oder der zellulären Transformation nachweisen. Da die Substrate, die für die antiapoptotische Rolle von MMP-15 verantwortlich sind, noch nicht bekannt sind, könnte eine Untersuchung des Substratspektrums und dessen Expression weitere Hinweise über die Beteiligung im Prozess der Apoptose und deren Relevanz in verschiedenen Krebserkrankungen liefern.

6 LITERATUR

- Abercrombie, M. (1979). Contact inhibition and malignancy. *Nature*, **281**, 259.
- Abraham, R. (2002). Untersuchungen zur Apoptoseresistenz in Krebszellen. In *Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Molekularbiologie*. Technische Universität: München.
- Abraham, R., Schafer, J., Rothe, M., Bange, J., Knyazev, P. & Ullrich, A. (2005). Identification of MMP-15 as an anti-apoptotic factor in cancer cells. *J Biol Chem*, **280**, 34123–32.
- Adams, J.M. & Cory, S. (2002). Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 715–20.
- Adams, J.M. & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, **26**, 1324–37.
- Ahonen, M., Poukkula, M., Baker, A.H., Kashiwagi, M., Nagase, H., Eriksson, J.E. & Kahari, V.-M. (2003). Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces apoptosis in melanoma cells by stabilization of death receptors. *Oncogene*, **22**, 2121–2134.
- Antoni, L., Sodha, N., Collins, I. & Garrett, M.D. (2007). CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy – two sides of the same coin? *Nat Rev Cancer*, **7**, 925–36.
- Arvanitis, D. & Davy, A. (2008). Eph/ephrin signaling: networks. *Genes & Dev*, **22**, 416–429.
- Atkinson, J.M., Pennington, C.J., Martin, S.W., Anikin, V.A., Mearns, A.J., Loadman, P.M., Edwards, D.R. & Gill, J.H. (2007). Membrane type matrix metalloproteinases (MMPs) show differential expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) compared to normal lung: correlation of MMP-14 mRNA expression and proteolytic activity. *Eur J Cancer*, **43**, 1764–71.
- Baker, A.H., Edwards, D.R. & Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*, **115**, 3719–27.
- Beer, D.G., Kardia, S.L., Huang, C.C., Giordano, T.J., Levin, A.M., Misek, D.E., Lin, L., Chen, G., Gharib, T.G., Thomas, D.G., Lizyness, M.L., Kuick, R., Hayasaka, S., Taylor, J.M., Iannettoni, M.D., Orringer, M.B. & Hanash, S. (2002). Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med*, **8**, 816–24.
- Belkin, A.M., Akimov, S.S., Zaritskaya, L.S., Ratnikov, B.I., Deryugina, E.I. & Strongin, A.Y. (2001). Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J Biol Chem*, **276**, 18415–22.
- Berns, K., Hijmans, E.M., Mullenders, J., Brummelkamp, T.R., Velds, A., Heimerikx, M., Kerkhoven, R.M., Madiredjo, M., Nijkamp, W., Weigelt, B., Agami, R., Ge, W., Cavet, G., Linsley, P.S., Beijersbergen, R.L. & Bernards, R. (2004). A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature*, **428**, 431.
- Bhattacharjee, A., Richards, W.G., Staunton, J., Li, C., Monti, S., Vasa, P., Ladd, C., Beheshti, J., Bueno, R., Gillette, M., Loda, M., Weber, G., Mark, E.J., Lander, E.S., Wong, W., Johnson, B.E., Golub, T.R., Sugarbaker, D.J. & Meyerson, M. (2001). Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13790–5.
- Birmingham, A., Anderson, E., Sullivan, K., Reynolds, A., Boese, Q., Leake, D., Karpilow, J. & Khvorova, A. (2007). A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity. *Nat Protoc*, **2**, 2068–78.
- Bishop, J.M. (1982). Retroviruses and cancer genes. *Adv Cancer Res*, **37**, 1–32.
- Boulwood, J. (2001). Ataxia telangiectasia gene mutations in leukaemia and lymphoma. *J Clin Pathol*, **54**, 512–6.

- Brand, K., Baker, A.H., Perez-Canto, A., Possling, A., Sacharjat, M., Geheeb, M. & Arnold, W. (2000). Treatment of Colorectal Liver Metastases by Adenoviral Transfer of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 into the Liver Tissue. *Cancer Res.*, **60**, 5723–5730.
- Brinckerhoff, C.E. & Matrisian, L.M. (2002). Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 207–14.
- Burns, T.F., Fei, P., Scata, K.A., Dicker, D.T. & El-Deiry, W.S. (2003). Silencing of the novel p53 target gene Snk/Plk2 leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells. *Mol Cell Biol*, **23**, 5556–71.
- Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*, **29**, 23–39.
- Butler, G.S., Will, H., Atkinson, S.J. & Murphy, G. (1997). Membrane-type-2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase A and is regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Eur J Biochem*, **244**, 653–7.
- Chabner, B.A. & Roberts, T.G., Jr. (2005). Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*, **5**, 65–72.
- Chan, S.L. & Yu, V.C. (2004). Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **31**, 119–28.
- Chi, K.N., Siu, L.L., Hirte, H., Hotte, S.J., Knox, J., Kollmansberger, C., Gleave, M., Guns, E., Powers, J., Walsh, W., Tu, D. & Eisenhauer, E. (2008). A Phase I Study of OGX-011, a 2'-Methoxyethyl Phosphorothioate Antisense to Clusterin, in Combination with Docetaxel in Patients with Advanced Cancer. *Clin Cancer Res*, **14**, 833–839.
- Chiba, H., Nagai, H., Ohdaira, T., Yasuda, Y. & Saito, K. (2004). Immunohistochemical study of characteristics of bile duct dysplasia evaluated on the basis of expression of metastasis/invasion-related factors and p53. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, **11**, 409–16.
- Chung, C.T. & Miller, R.H. (1993). Preparation and storage of competent Escherichia coli cells. *Methods Enzymol*, **218**, 621–7.
- Clark, I.E., Dodson, M.W., Jiang, C., Cao, J.H., Huh, J.R., Seol, J.H., Yoo, S.J., Hay, B.A. & Guo, M. (2006). Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature*, **441**, 1162.
- Collins, J.A., Schandi, C.A., Young, K.K., Vesely, J. & Willingham, M.C. (1997). Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem*, **45**, 923–34.
- Cory, S. & Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, **2**, 647–56.
- Cox, A.D., Der, C.J. & Ravi, I. (1994). [24] Biological assays for cellular transformation. In *Methods in Enzymology*, Vol. Volume 238. pp. 277. Academic Press.
- Creutzig, U., Henze, G., Bielack, S., Herold, R., Kaatsch, P., Klussmann, J.-H., Graf, N., Reinhardt, D., Schrappe, M., Zimmermann, M. & Jürgens, H. (2003). Krebserkrankungen bei Kindern: Erfolg durch einheitliche Therapiekonzepte seit 25 Jahren. *Dtsch Arztebl*, **100**, 842–852.
- d'Ortho, M.P., Will, H., Atkinson, S., Butler, G., Messent, A., Gavrilovic, J., Smith, B., Timpl, R., Zardi, L. & Murphy, G. (1997). Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem*, **250**, 751–7.
- Dang, C.V., Resar, L.M., Emison, E., Kim, S., Li, Q., Prescott, J.E., Wonsey, D. & Zeller, K. (1999). Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp Cell Res*, **253**, 63–77.
- Davidson, B., Goldberg, I., Berner, A., Nesland, J.M., Givant-Horwitz, V., Bryne, M., Risberg, B., Kristensen, G.B., Trope, C.G., Kopolovic, J. & Reich, R. (2001). Expression of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases messenger RNA in ovarian carcinoma cells in serous effusions. *Am J Clin Pathol*, **115**, 517–24.

- Davis, T.A., Grillo-Lopez, A.J., White, C.A., McLaughlin, P., Czuczman, M.S., Link, B.K., Maloney, D.G., Weaver, R.L., Rosenberg, J. & Levy, R. (2000). Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment. *J Clin Oncol*, **18**, 3135-43.
- Dean, R.A. & Overall, C.M. (2007). Proteomics Discovery of Metalloproteinase Substrates in the Cellular Context by iTRAQ™ Labeling Reveals a Diverse MMP-2 Substrate Degradome. *Mol Cell Proteomics*, **6**, 611-623.
- Deneen, B., Welford, S.M., Ho, T., Hernandez, F., Kurland, I. & Denny, C.T. (2003). PIM3 Proto-Oncogene Kinase Is a Common Transcriptional Target of Divergent EWS/ETS Oncoproteins. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 3897-3908.
- Deng, H., Jankovic, J., Guo, Y., Xie, W. & Le, W. (2005). Small interfering RNA targeting the PINK1 induces apoptosis in dopaminergic cells SH-SY5Y. *Biochem Biophys Res Commun*, **337**, 1133-8.
- Devarajan, E., Sahin, A.A., Chen, J.S., Krishnamurthy, R.R., Aggarwal, N., Brun, A.M., Sapino, A., Zhang, F., Sharma, D., Yang, X.H., Tora, A.D. & Mehta, K. (2002). Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene*, **21**, 8843-51.
- Deveraux, Q.L. & Reed, J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 239-52.
- Devy, L., Rabbani, S., Dransfield, D. & Henderikx, P. (2007). Antitumor efficacy of DX-2400, a potent and selective human antibody MMP-14 inhibitor discovered using phage display technology. *AACR Meeting Abstracts*, **2007**, 5618-.
- Dirks, W.G., Faehnrich, S., Estella, I.A. & Drexler, H.G. (2005). Short tandem repeat DNA typing provides an international reference standard for authentication of human cell lines. *ALTEX*, **22**, 103-9.
- Eagle, H. & Levine, E.M. (1967). Growth Regulatory Effects of Cellular Interaction. *Nature*, **213**, 1102.
- Eaveri, R., Ben-Yehudah, A. & Lorberboum-Galski, H. (2004). Surface antigens/receptors for targeted cancer treatment: the GnRH receptor/binding site for targeted adenocarcinoma therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, **4**, 673-87.
- Egawa, N., Koshikawa, N., Tomari, T., Nabeshima, K., Isobe, T. & Seiki, M. (2006). Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP/MMP-14) cleaves and releases a 22-kDa extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) fragment from tumor cells. *J Biol Chem*, **281**, 37576-85.
- Egeblad, M. & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, **2**, 161-74.
- Ehrlich, P. & Berthelm, A. (1912). On the salty acid 3.3 diamino-4.4 dioxy-arsenobenzoil and its next relatives. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **45**, 756-766.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Weber, K. & Tuschl, T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, **26**, 199-213.
- Ellenrieder, V., Alber, B., Lacher, U., Hendler, S.F., Menke, A., Boeck, W., Wagner, M., Wilda, M., Friess, H., Buchler, M., Adler, G. & Gress, T.M. (2000). Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. *Int J Cancer*, **85**, 14-20.
- Fesik, S.W. (2005). Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer*, **5**, 876-85.
- Fingleton, B. (2007). Matrix metalloproteinases as valid clinical targets. *Curr Pharm Des*, **13**, 333-46.
- Fingleton, B. (2008). MMPs as therapeutic targets--still a viable option? *Semin Cell Dev Biol*, **19**, 61-8.
- Fischer, J.A., Muller-Weeks, S. & Caradonna, S.J. (2006). Fluorodeoxyuridine modulates cellular expression of the DNA base excision repair enzyme uracil-DNA glycosylase. *Cancer Res*, **66**, 8829-37.
- Fujii, C., Nakamoto, Y., Lu, P., Tsuneyama, K., Popivanova, B.K., Kaneko, S. & Mukaida, N. (2005). Aberrant expression of serine/threonine kinase Pim-3 in hepatocellular carcinoma development and its role in the proliferation of human hepatoma cell lines. *Int J Cancer*, **114**, 209-18.
- Gakiopoulou, H., Nakopoulou, L., Siatelis, A., Mavrommatis, I., Panayotopoulou, E.G., Tsimpa, I., Stravodimos, C. & Giannopoulos, A. (2003). Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 as a multifunctional molecule of which

- the expression is associated with adverse prognosis of patients with urothelial bladder carcinomas. *Clin Cancer Res*, **9**, 5573–81.
- Garber, M.E., Troyanskaya, O.G., Schluens, K., Petersen, S., Thaesler, Z., Pacyna–Gengelbach, M., van de Rijn, M., Rosen, G.D., Perou, C.M., Whyte, R.I., Altman, R.B., Brown, P.O., Botstein, D. & Petersen, I. (2001). Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13784–9.
- Gericke, A., Munson, M. & Ross, A.H. (2006). Regulation of the PTEN phosphatase. *Gene*, **374**, 1–9.
- Gershoni, J.M. & Palade, G.E. (1983). Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem*, **131**, 1–15.
- Gescher, A. (2000). Staurosporine analogues – pharmacological toys or useful antitumour agents? *Crit Rev Oncol Hematol*, **34**, 127–35.
- Giambernardi, T.A., Grant, G.M., Taylor, G.P., Hay, R.J., Maher, V.M., McCormick, J.J. & Klebe, R.J. (1998). Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. *Matrix Biol*, **16**, 483–96.
- Golubkov, V.S. & Strongin, A.Y. (2007). Proteolysis–driven oncogenesis. *Cell Cycle*, **6**, 147–50.
- Gossen, M., Bonin, A.L., Freundlieb, S. & Bujard, H. (1994). Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells. *Curr Opin Biotechnol*, **5**, 516–20.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**, 59–74.
- Graham, F.L.a.v.d.E., A. J. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, **54**, 536–9.
- Hajra, K.M. & Liu, J.R. (2004). Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis*, **9**, 691–704.
- Han, J.W., Dionne, C.A., Kedersha, N.L. & Goldmacher, V.S. (1997). p53 status affects the rate of the onset but not the overall extent of doxorubicin–induced cell death in rat–1 fibroblasts constitutively expressing c–Myc. *Cancer Res*, **57**, 176–82.
- Hawryluk–Gara, L.A., Shibuya, E.K. & Wozniak, R.W. (2005). Vertebrate Nup53 interacts with the nuclear lamina and is required for the assembly of a Nup93–containing complex. *Mol Biol Cell*, **16**, 2382–94.
- Hikita, A., Yana, I., Wakeyama, H., Nakamura, M., Kadono, Y., Oshima, Y., Nakamura, K., Seiki, M. & Tanaka, S. (2006). Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF–kappaB ligand. *J Biol Chem*, **281**, 36846–55.
- Ho, A.T., Voura, E.B., Soloway, P.D., Watson, K.L.M. & Khokha, R. (2001). MMP Inhibitors Augment Fibroblast Adhesion through Stabilization of Focal Adhesion Contacts and Up–regulation of Cadherin Function. *J. Biol. Chem.*, **276**, 40215–40224.
- Höffeler, F. (2004). Die Maschinerie der Apoptose: Chronik eines angekündigten Todes. *Biologie in unserer Zeit*, **34**, 16–23.
- Holland, F.J., Frei, E. (2003). *Cancer Medicine 6*. Vol. 6. Cancer Medicine. BC Decker Inc.: London.
- Hotary, K., Allen, E., Punturieri, A., Yana, I. & Weiss, S.J. (2000). Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three–dimensional type I collagen matrix by membrane–type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J Cell Biol*, **149**, 1309–23.
- Hotary, K., Li, X.Y., Allen, E., Stevens, S.L. & Weiss, S.J. (2006). A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes Dev*, **20**, 2673–86.
- Hotary, K.B., Yana, I., Sabeh, F., Li, X.Y., Holmbeck, K., Birkedal–Hansen, H., Allen, E.D., Hiraoka, N. & Weiss, S.J. (2002). Matrix metalloproteinases (MMPs) regulate fibrin–invasive activity via MT1–MMP–dependent and –independent processes. *J Exp Med*, **195**, 295–308.
- Hudziak, R.M., Lewis, G.D., Holmes, W.E., Ullrich, A. & Shepard, H.M. (1990). Selection for transformation and met protooncogene amplification in NIH 3T3 fibroblasts using tumor necrosis factor alpha. *Cell Growth Differ*, **1**, 129–34.
- Hueber, A.O., Zornig, M., Lyon, D., Suda, T., Nagata, S. & Evan, G.I. (1997). Requirement for the CD95 receptor–ligand pathway in c–Myc–induced apoptosis. *Science*, **278**, 1305–9.

- Huppertz, B., Frank, H.-G. & Kaufmann, P. (1999). The apoptosis cascade — morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anatomy and Embryology*, **200**, 1.
- Igney, F.H. & Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, **2**, 277–88.
- Inzelberg, R. & Jankovic, J. (2007). Are Parkinson disease patients protected from some but not all cancers? *Neurology*, **69**, 1542–1550.
- Ireton, R.C. & Chen, J. (2005). EphA2 receptor tyrosine kinase as a promising target for cancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets*, **5**, 149–57.
- Ishii, Y., Nakasato, Y., Kobayashi, S., Yamazaki, Y. & Aoki, T. (2003). A study on angiogenesis-related matrix metalloproteinase networks in primary hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, **22**, 461–70.
- Jazaeri, A.A., Awtrey, C.S., Chandramouli, G.V., Chuang, Y.E., Khan, J., Sotiriou, C., Aprelikova, O., Yee, C.J., Zorn, K.K., Birrer, M.J., Barrett, J.C. & Boyd, J. (2005). Gene expression profiles associated with response to chemotherapy in epithelial ovarian cancers. *Clin Cancer Res*, **11**, 6300–10.
- Jeffers, M., Schmidt, L., Nakaigawa, N., Webb, C.P., Weirich, G., Kishida, T., Zbar, B. & Vande Woude, G.F. (1997). Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11445–50.
- Jeong, E.G., Lee, S.H., Kim, S.S., Ahn, C.H., Yoo, N.J. & Lee, S.H. (2007). Immunohistochemical analysis of phospho-BAD protein and mutational analysis of BAD gene in gastric carcinomas. *Apmis*, **115**, 976–81.
- Johnson, J.L., Baker, A.H., Oka, K., Chan, L., Newby, A.C., Jackson, C.L. & George, S.J. (2006). Suppression of atherosclerotic plaque progression and instability by tissue inhibitor of metalloproteinase-2: involvement of macrophage migration and apoptosis. *Circulation*, **113**, 2435–44.
- Jordan, M., Schallhorn, A. & Wurm, F.M. (1996). Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res*, **24**, 596–601.
- Kabir, J., Lobo, M. & Zachary, I. (2002). Staurosporine induces endothelial cell apoptosis via focal adhesion kinase dephosphorylation and focal adhesion disassembly independent of focal adhesion kinase proteolysis. *Biochem J*, **367**, 145–55.
- Kang, H.C., Kim, I.J., Park, J.H., Shin, Y., Ku, J.L., Jung, M.S., Yoo, B.C., Kim, H.K. & Park, J.G. (2004). Identification of genes with differential expression in acquired drug-resistant gastric cancer cells using high-density oligonucleotide microarrays. *Clin Cancer Res*, **10**, 272–84.
- Karsdal, M.A., Andersen, T.A., Bonewald, L. & Christiansen, C. (2004). Matrix metalloproteinases (MMPs) safeguard osteoblasts from apoptosis during transdifferentiation into osteocytes: MT1-MMP maintains osteocyte viability. *DNA Cell Biol*, **23**, 155–65.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239–57.
- Kim, H.-J., Cui, X. & Lee, A.V. (2005). Glucocorticoids sensitize MCF-10A human mammary epithelial cells to IGF-I in part via upregulation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). *AACR Meeting Abstracts*, **2005**, 866–.
- Kim, J.H., Kim, T.H., Jang, J.W., Jang, Y.J., Lee, K.H. & Lee, S.T. (2001). Analysis of matrix metalloproteinase mRNAs expressed in hepatocellular carcinoma cell lines. *Mol Cells*, **12**, 32–40.
- Kim, T.J., Rho, S.B., Choi, Y.L., Choi, C.H., Lee, J.W., Bae, D.S., Ahn, G., Lee, J.H. & Kim, B.G. (2006). High expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in serous ovarian carcinomas and the role of this expression in ovarian tumorigenesis. *Hum Pathol*, **37**, 906–13.
- Kitagawa, Y., Kunimi, K., Ito, H., Sato, H., Uchibayashi, T., Okada, Y., Seiki, M. & Namiki, M. (1998). Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human urothelial carcinomas. *J Urol*, **160**, 1540–5.

- Kitagawa, Y., Kunimi, K., Uchibayashi, T., Sato, H. & Namiki, M. (1999). Expression of messenger RNAs for membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human renal cell carcinomas. *J Urol*, **162**, 905–9.
- Kitazoe, M., Murata, H., Futami, J., Maeda, T., Sakaguchi, M., Miyazaki, M., Kosaka, M., Tada, H., Seno, M., Huh, N.H., Namba, M., Nishikawa, M., Maeda, Y. & Yamada, H. (2005). Protein transduction assisted by polyethylenimine-cationized carrier proteins. *J Biochem*, **137**, 693–701.
- Kobayashi, K., Nishioka, M., Kohno, T., Nakamoto, M., Maeshima, A., Aoyagi, K., Sasaki, H., Takenoshita, S., Sugimura, H. & Yokota, J. (2004). Identification of genes whose expression is upregulated in lung adenocarcinoma cells in comparison with type II alveolar cells and bronchiolar epithelial cells in vivo. *Oncogene*, **23**, 3089–96.
- Kousidou, O.C., Roussidis, A.E., Theocharis, A.D. & Karamanos, N.K. (2004). Expression of MMPs and TIMPs genes in human breast cancer epithelial cells depends on cell culture conditions and is associated with their invasive potential. *Anticancer Res*, **24**, 4025–30.
- Kozak, M. (1991). Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem*, **266**, 19867–70.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–5.
- Lambert, E., Dasse, E., Haye, B. & Petitfrere, E. (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*, **49**, 187–98.
- Lamendola, D.E., Duan, Z., Yusuf, R.Z. & Seiden, M.V. (2003). Molecular Description of Evolving Paclitaxel Resistance in the SKOV-3 Human Ovarian Carcinoma Cell Line. *Cancer Res*, **63**, 2200–2205.
- Lampert, K., Machein, U., Machein, M.R., Conca, W., Peter, H.H. & Volk, B. (1998). Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors. *Am J Pathol*, **153**, 429–37.
- Landen, C.N., Kinch, M.S. & Sood, A.K. (2005). EphA2 as a target for ovarian cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, **9**, 1179–87.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczký, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860–921.
- Le Tourneau, C., Faivre, S. & Raymond, E. (2008). New developments in multitargeted therapy for patients with solid tumours. *Cancer Treat Rev*, **34**, 37–48.
- Lee, J.W., Soung, Y.H., Kim, S.Y., Nam, S.W., Kim, C.J., Cho, Y.G., Lee, J.H., Kim, H.S., Park, W.S., Kim, S.H., Lee, J.Y., Yoo, N.J. & Lee, S.H. (2004). Inactivating mutations of proapoptotic Bad gene in human colon cancers. *Carcinogenesis*, **25**, 1371–6.
- Letai, A.G. (2008). Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat Rev Cancer*, **8**, 121–32.

- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479–89.
- Li, Y.-Y., Popivanova, B.K., Nagai, Y., Ishikura, H., Fujii, C. & Mukaida, N. (2006). Pim-3, a Proto-Oncogene with Serine/Threonine Kinase Activity, Is Aberrantly Expressed in Human Pancreatic Cancer and Phosphorylates Bad to Block Bad-Mediated Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cell Lines. *Cancer Res*, **66**, 6741–6747.
- Lim, M.S., Guedez, L., Stetler-Stevenson, W.G. & Stetler-Stevenson, M. (1999). Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 Induces Apoptosis in Human T Lymphocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **878**, 522–523.
- Lindsay, M.A. (2003). Target discovery. *Nat Rev Drug Discov*, **2**, 831.
- Lovelock, J.D., Baker, A.H., Gao, F., Dong, J.-F., Bergeron, A.L., McPheat, W., Sivasubramanian, N. & Mann, D.L. (2005). Heterogeneous effects of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases on cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **288**, H461–468.
- Ma, S., Charron, J. & Erikson, R.L. (2003). Role of Plk2 (Snk) in mouse development and cell proliferation. *Mol Cell Biol*, **23**, 6936–43.
- MacKeigan, J.P., Murphy, L.O. & Blenis, J. (2005). Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol*, **7**, 591–600.
- Malumbres, M. & Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*, **3**, 459–65.
- Mannello, F., Luchetti, F., Falcieri, E. & Papa, S. (2005). Multiple roles of matrix metalloproteinases during apoptosis. *Apoptosis*, **10**, 19–24.
- Mano, M.S. & Awada, A. (2004). Primary chemotherapy for breast cancer: the evidence and the future. *Ann Oncol*, **15**, 1161–71.
- Martin, M.D. & Matrisian, L.M. (2007). The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*, **26**, 717–24.
- Matsumoto, H., Ishibashi, Y., Ohtaki, T., Hasegawa, Y., Koyama, C. & Inoue, K. (1993). Newly established murine pituitary folliculo-stellate-like cell line (TtT/GF) secretes potent pituitary glandular cell survival factors, one of which corresponds to metalloproteinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, **194**, 909–15.
- Mattei, M.G., Roedel, N., Olsen, B.R. & Apte, S.S. (1997). Genes of the membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene family, MMP14, MMP15, and MMP16, localize to human chromosomes 14, 16, and 8, respectively. *Genomics*, **40**, 168–9.
- Matthew, E.M., Yen, T.J., Dicker, D.T., Dorsey, J.F., Yang, W., Navaraj, A. & El-Deiry, W.S. (2007). Replication stress, defective S-phase checkpoint and increased death in Plk2-deficient human cancer cells. *Cell Cycle*, **6**, 2571–8.
- Menon, B., Singh, M., Ross, R.S., Johnson, J.N. & Singh, K. (2006). beta-Adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult cardiac myocytes involves MMP-2-mediated disruption of beta1 integrin signaling and mitochondrial pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*, **290**, C254–61.
- Menon, B., Singh, M. & Singh, K. (2005). Matrix metalloproteinases mediate beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, **289**, C168–76.
- Mills, R.D., Sim, C.H., Mok, S.S., Mulhern, T.D., Culvenor, J.G. & Cheng, H.C. (2008). Biochemical aspects of the neuroprotective mechanism of PTEN-induced kinase-1 (PINK1). *J Neurochem*, **105**, 18–33.
- Miyamori, H., Takino, T., Seiki, M. & Sato, H. (2000). Human membrane type-2 matrix metalloproteinase is defective in cell-associated activation of progelatinase A. *Biochem Biophys Res Commun*, **267**, 796–800.
- Mizutani, Y., Nakanishi, H., Li, Y.N., Matsubara, H., Yamamoto, K., Sato, N., Shiraishi, T., Nakamura, T., Mikami, K., Okihara, K., Takaha, N., Ukimura, O., Kawachi, A., Nonomura, N., Bonavida, B. & Miki, T. (2007). Overexpression of XIAP expression in renal cell carcinoma predicts a worse prognosis. *Int J Oncol*, **30**, 919–25.

- Mizutani, Y., Nakanishi, H., Yamamoto, K., Li, Y.N., Matsubara, H., Mikami, K., Okihara, K., Kawauchi, A., Bonavida, B. & Miki, T. (2005). Downregulation of Smac/DIABLO expression in renal cell carcinoma and its prognostic significance. *J Clin Oncol*, **23**, 448–54.
- Moen, M.D., McKeage, K., Plosker, G.L. & Siddiqui, M.A. (2007). Imatinib: a review of its use in chronic myeloid leukaemia. *Drugs*, **67**, 299–320.
- Morrison, C.J., Butler, G.S., Bigg, H.F., Roberts, C.R., Soloway, P.D. & Overall, C.M. (2001). Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway. *J Biol Chem*, **276**, 47402–10.
- Morrison, C.J. & Overall, C.M. (2006). TIMP independence of matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation by membrane type 2 (MT2)-MMP is determined by contributions of both the MT2-MMP catalytic and hemopexin C domains. *J Biol Chem*, **281**, 26528–39.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**, 55.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant*, **51**, 263–73.
- Murphy, G. & Nagase, H. (2008). Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? *Nat Clin Pract Rheumatol*, **4**, 128–35.
- Nacht, M., Ferguson, A.T., Zhang, W., Petroziello, J.M., Cook, B.P., Gao, Y.H., Maguire, S., Riley, D., Coppola, G., Landes, G.M., Madden, S.L. & Sukumar, S. (1999). Combining serial analysis of gene expression and array technologies to identify genes differentially expressed in breast cancer. *Cancer Res*, **59**, 5464–70.
- Nagata, S. (1999). Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet*, **33**, 29–55.
- Nagata, S., Salvatore, G. & Pastan, I. (2003). DNA immunization followed by a single boost with cells: a protein-free immunization protocol for production of monoclonal antibodies against the native form of membrane proteins. *Journal of Immunological Methods*, **280**, 59.
- Nakada, M., Nakamura, H., Ikeda, E., Fujimoto, N., Yamashita, J., Sato, H., Seiki, M. & Okada, Y. (1999). Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors. *Am J Pathol*, **154**, 417–28.
- Nakamura, H., Ueno, H., Yamashita, K., Shimada, T., Yamamoto, E., Noguchi, M., Fujimoto, N., Sato, H., Seiki, M. & Okada, Y. (1999). Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res*, **59**, 467–73.
- Ngo, V.N., Davis, R.E., Lamy, L., Yu, X., Zhao, H., Lenz, G., Lam, L.T., Dave, S., Yang, L., Powell, J. & Staudt, L.M. (2006). A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature*, **441**, 106.
- Nicholson, K.M. & Anderson, N.G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*, **14**, 381–95.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. & Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, **139**, 271–9.
- Nishikawa, A., Iwasaki, M., Akutagawa, N., Manase, K., Yamashita, S., Endo, T. & Kudo, R. (2000). Expression of various matrix proteases and Ets family transcriptional factors in ovarian cancer cell lines: correlation to invasive potential. *Gynecol Oncol*, **79**, 256–63.
- Nuttall, R.K., Pennington, C.J., Taplin, J., Wheal, A., Yong, V.W., Forsyth, P.A. & Edwards, D.R. (2003). Elevated membrane-type matrix metalloproteinases in gliomas revealed by profiling proteases and inhibitors in human cancer cells. *Mol Cancer Res*, **1**, 333–45.
- O'Callaghan-Sunol, C., Gabai, V.L. & Sherman, M.Y. (2007). Hsp27 modulates p53 signaling and suppresses cellular senescence. *Cancer Res*, **67**, 11779–88.

- Oh, J., Diaz, T., Wei, B., Chang, H., Noda, M. & Stetler-Stevenson, W.G. (2006). TIMP-2 upregulates RECK expression via dephosphorylation of paxillin tyrosine residues 31 and 118. *Oncogene*, **25**, 4230–4.
- Ohira, T., Akutagawa, S., Usuda, J., Nakamura, T., Hirano, T., Tsuboi, M., Nishio, K., Taguchi, F., Ikeda, N., Nakamura, H., Konaka, C., Saijo, N. & Kato, H. (2002). Up-regulated gene expression of angiogenesis factors in post-chemotherapeutic lung cancer tissues determined by cDNA macroarray. *Oncol Rep*, **9**, 723–8.
- Ohnishi, Y., Tajima, S. & Ishibashi, A. (2001). Coordinate expression of membrane type-matrix metalloproteinases-2 and 3 (MT2-MMP and MT3-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in primary and metastatic melanoma cells. *Eur J Dermatol*, **11**, 420–3.
- Okamoto, T., Niu, R. & Yamada, S. (2003). Increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in clear cell carcinoma of the ovary. *Mol Hum Reprod*, **9**, 569–75.
- Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchya, H., Takahashi, Y. & Masuma, R. (1977). A new alkaloid AM-2282 OF Streptomyces origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)*, **30**, 275–82.
- Omura, S., Sasaki, Y., Iwai, Y. & Takeshima, H. (1995). Staurosporine, a potentially important gift from a microorganism. *J Antibiot (Tokyo)*, **48**, 535–48.
- Osaki, M., Oshimura, M. & Ito, H. (2004). PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, **9**, 667–76.
- Oshita, F., Ikehara, M., Sekiyama, A., Hamanaka, N., Saito, H., Yamada, K., Noda, K., Kameda, Y. & Miyagi, Y. (2004). Genomic-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profile with chemoresistance in patients with advanced lung cancer. *J Exp Ther Oncol*, **4**, 155–60.
- Overall, C.M. & Kleinfeld, O. (2006). Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy. *Br J Cancer*, **94**, 941–6.
- Owen-Schaub, L.B. (2002). Fas function and tumor progression: use it and lose it. *Cancer Cell*, **2**, 95–6.
- Ozen, O., Krebs, B., Hemmerlein, B., Pekrun, A., Kretzschmar, H. & Herms, J. (2004). Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in medulloblastomas and their prognostic relevance. *Clin Cancer Res*, **10**, 4746–53.
- Paddison, P.J., Silva, J.M., Conklin, D.S., Schlabach, M., Li, M., Aruleba, S., Balija, V., O'Shaughnessy, A., Gnoj, L., Scobie, K., Chang, K., Westbrook, T., Cleary, M., Sachidanandam, R., McCombie, W.R., Elledge, S.J. & Hannon, G.J. (2004). A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature*, **428**, 427–31.
- Park, J., Lee, S.B., Lee, S., Kim, Y., Song, S., Kim, S., Bae, E., Kim, J., Shong, M., Kim, J.-M. & Chung, J. (2006). Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature*, **441**, 1157.
- Parson, W., Kirchebner, R., Muhlmann, R., Renner, K., Kofler, A., Schmidt, S. & Kofler, R. (2005). Cancer cell line identification by short tandem repeat profiling: power and limitations. *FASEB J.*, **19**, 434–436.
- Pennati, M., Folini, M. & Zaffaroni, N. (2007). Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions. *Carcinogenesis*, **28**, 1133–9.
- Peter, M.E. & Krammer, P.H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*, **10**, 26–35.
- Plun-Favreau, H., Klupsch, K., Moiso, N., Gandhi, S., Kjaer, S., Frith, D., Harvey, K., Deas, E., Harvey, R.J., McDonald, N., Wood, N.W., Martins, L.M. & Downward, J. (2007). The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat Cell Biol*, **9**, 1243–52.
- Pogacic, V., Bullock, A.N., Fedorov, O., Filippakopoulos, P., Gasser, C., Biondi, A., Meyer-Monard, S., Knapp, S. & Schwaller, J. (2007). Structural Analysis Identifies Imidazo[1,2-b]Pyridazines as PIM Kinase Inhibitors with In vitro Antileukemic Activity. *Cancer Res*, **67**, 6916–6924.

- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C. & DePinho, R.A. (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*, **92**, 713–23.
- Popivanova, B.K., Li, Y.-Y., Zheng, H., Omura, K., Fujii, C., Tsuneyama, K. & Mukaida, N. (2007). Proto-oncogene, Pim-3 with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human colon cancer cells and can prevent Bad-mediated apoptosis. *Cancer Science*, **98**, 321–328.
- Pridgeon, J.W., Olzmann, J.A., Chin, L.-S. & Li, L. (2007). PINK1 Protects against Oxidative Stress by Phosphorylating Mitochondrial Chaperone TRAP1. *PLoS Biology*, **5**, e172.
- Prokopcova, J., Kleibl, Z., Banwell, C.M. & Pohlreich, P. (2007). The role of ATM in breast cancer development. *Breast Cancer Res Treat*, **104**, 121–8.
- Pusztai, L. & Hess, K.R. (2004). Clinical trial design for microarray predictive marker discovery and assessment. *Ann Oncol*, **15**, 1731–1737.
- Radisky, D.C. & Bissell, M.J. (2006). Matrix metalloproteinase-induced genomic instability. *Curr Opin Genet Dev*, **16**, 45–50.
- Reynolds, V.L., DiPietro, M., Lebovitz, R.M. & Lieberman, M.W. (1987). Inherent tumorigenic and metastatic properties of rat-1 and rat-2 cells. *Cancer Res*, **47**, 6384–7.
- Richter, U. (2005). Analyse von Chemoresistenzmechanismen in Krebszellen. In *Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Molekularbiologie*. Ludwig-Maximilian-Universität: München.
- Riddick, A.C., Shukla, C.J., Pennington, C.J., Bass, R., Nuttall, R.K., Hogan, A., Sethia, K.K., Ellis, V., Collins, A.T., Maitland, N.J., Ball, R.Y. & Edwards, D.R. (2005). Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues. *Br J Cancer*, **92**, 2171–80.
- Riedel, H., Massaglia, S., Schlessinger, J. & Ullrich, A. (1988). Ligand activation of overexpressed epidermal growth factor receptors transforms NIH 3T3 mouse fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 1477–81.
- Riedl, S.J. & Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 897–907.
- Rigg, A.S. & Lemoine, N.R. (2001). Adenoviral delivery of TIMP1 or TIMP2 can modify the invasive behavior of pancreatic cancer and can have a significant antitumor effect in vivo. *Cancer Gene Ther*, **8**, 869–78.
- Robson, S., Pelengaris, S. & Khan, M. (2006). c-Myc and downstream targets in the pathogenesis and treatment of cancer. *Recent Patents Anticancer Drug Discov*, **1**, 305–26.
- Rodriguez-Manzanique, J.C., Milchanowski, A.B., Dufour, E.K., Leduc, R. & Iruela-Arispe, M.L. (2000). Characterization of METH-1/ADAMTS1 processing reveals two distinct active forms. *J Biol Chem*, **275**, 33471–9.
- Rozanov, D.V., Hahn-Dantona, E., Strickland, D.K. & Strongin, A.Y. (2004). The low density lipoprotein receptor-related protein LRP is regulated by membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) proteolysis in malignant cells. *J Biol Chem*, **279**, 4260–8.
- Ruhe, J.E., Streit, S., Hart, S., Wong, C.-H., Specht, K., Knyazev, P., Knyazeva, T., Tay, L.S., Loo, H.L., Foo, P., Wong, W., Pok, S., Lim, S.J., Ong, H., Luo, M., Ho, H.K., Peng, K., Lee, T.C., Bezler, M., Mann, C., Gaertner, S., Hoefler, H., Iacobelli, S., Peter, S., Tay, A., Brenner, S., Venkatesh, B. & Ullrich, A. (2007). Genetic Alterations in the Tyrosine Kinase Transcriptome of Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res*, **67**, 11368–11376.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1990). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- Santamaria, A., Neef, R., Eberspacher, U., Eis, K., Husemann, M., Mumberg, D., Prechtel, S., Schulze, V., Siemeister, G., Wortmann, L., Barr, F.A. & Nigg, E.A. (2007). Use of the novel Plk1 inhibitor ZK-thiazolidinone to elucidate functions of Plk1 in early and late stages of mitosis. *Mol Biol Cell*, **18**, 4024–36.

- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. & Seiki, M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*, **370**, 61–5.
- Sato, H., Tanaka, M., Takino, T., Inoue, M. & Seiki, M. (1997). Assignment of the human genes for membrane-type-1, -2, and -3 matrix metalloproteinases (MMP14, MMP15, and MMP16) to 14q12.2, 16q12.2–q21, and 8q21, respectively, by in situ hybridization. *Genomics*, **39**, 412–3.
- Scangos, G.a.R., F. H. (1981). Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells – a review. *Genes Dev*, **14**, 1–10.
- Schäfer, B., Marg, B., Gschwind, A. & Ullrich, A. (2004). Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival. *J Biol Chem*, **279**, 47929–38.
- Seo, D.-W., Li, H., Guedez, L., Wingfield, P.T., Diaz, T., Salloum, R., Wei, B.-y. & Stetler-Stevenson, W.G. (2003). TIMP-2 Mediated Inhibition of Angiogenesis: An MMP-Independent Mechanism. *Cell*, **114**, 171.
- Shannan, B., Seifert, M., Leskov, K., Willis, J., Boothman, D., Tilgen, W. & Reichrath, J. (2006). Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ*, **13**, 12–9.
- Sheu, B.C., Lien, H.C., Ho, H.N., Lin, H.H., Chow, S.N., Huang, S.C. & Hsu, S.M. (2003). Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. *Cancer Res*, **63**, 6537–42.
- Shi, Y. (2002). Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure*, **10**, 285–8.
- Shoji, A., Sakamoto, Y., Tsuchiya, T., Moriyama, K., Kaneko, T., Okubo, T., Umeda, M. & Miyazaki, K. (1997). Inhibition of tumor promoter activity toward mouse fibroblasts and their in vitro transformation by tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1). *Carcinogenesis*, **18**, 2093–100.
- Shutes, A., Onesto, C., Picard, V., Leblond, B., Schweighoffer, F. & Der, C.J. (2007). Specificity and mechanism of action of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases. *J Biol Chem*, **282**, 35666–78.
- Simmons, D.L., Neel, B.G., Stevens, R., Evett, G. & Erikson, R.L. (1992). Identification of an early-growth-response gene encoding a novel putative protein kinase. *Mol Cell Biol*, **12**, 4164–9.
- Sjoblom, T., Jones, S., Wood, L.D., Parsons, D.W., Lin, J., Barber, T.D., Mandelker, D., Leary, R.J., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Buckhaults, P., Farrell, C., Meeh, P., Markowitz, S.D., Willis, J., Dawson, D., Willson, J.K., Gazdar, A.F., Hartigan, J., Wu, L., Liu, C., Parmigiani, G., Park, B.H., Bachman, K.E., Papadopoulos, N., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. & Velculescu, V.E. (2006a). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*, **314**, 268–74.
- Sjoblom, T., Jones, S., Wood, L.D., Parsons, D.W., Lin, J., Barber, T.D., Mandelker, D., Leary, R.J., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Buckhaults, P., Farrell, C., Meeh, P., Markowitz, S.D., Willis, J., Dawson, D., Willson, J.K.V., Gazdar, A.F., Hartigan, J., Wu, L., Liu, C., Parmigiani, G., Park, B.H., Bachman, K.E., Papadopoulos, N., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. & Velculescu, V.E. (2006b). The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science*, **314**, 268–274.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J. & Norton, L. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, **344**, 783–92.
- Sörgel, F., Landersdorfer, C. & Holzgrabe, U. (2004). Welche Berufsbezeichnung wird Ehrlichs Wirken gerecht? *Chemotherapie Journal*, **13**, 157–65.
- Soucie, E.L., Annis, M.G., Sedivy, J., Filmus, J., Leber, B., Andrews, D.W. & Penn, L.Z. (2001). Myc potentiates apoptosis by stimulating Bax activity at the mitochondria. *Mol Cell Biol*, **21**, 4725–36.

- Soung, Y.H., Lee, J.W., Kim, S.Y., Sung, Y.J., Park, W.S., Nam, S.W., Kim, S.H., Lee, J.Y., Yoo, N.J. & Lee, S.H. (2005). Caspase-8 gene is frequently inactivated by the frameshift somatic mutation 1225_1226delTG in hepatocellular carcinomas. *Oncogene*, **24**, 141-7.
- Stallings-Mann, M. & Radisky, D. (2007). Matrix metalloproteinase-induced malignancy in mammary epithelial cells. *Cells Tissues Organs*, **185**, 104-10.
- Strebhardt, K. & Ullrich, A. (2006). Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **6**, 321.
- Suenaga, N., Mori, H., Itoh, Y. & Seiki, M. (2005). CD44 binding through the hemopexin-like domain is critical for its shedding by membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Oncogene*, **24**, 859-68.
- Tamaoki, T. (1991). Use and specificity of staurosporine, UCN-01, and calphostin C as protein kinase inhibitors. *Methods Enzymol*, **201**, 340-7.
- Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M. & Tomita, F. (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **135**, 397-402.
- Tang, C.W., Maya-Mendoza, A., Martin, C., Zeng, K., Chen, S., Feret, D., Wilson, S.A. & Jackson, D.A. (2008). The integrity of a lamin-B1-dependent nucleoskeleton is a fundamental determinant of RNA synthesis in human cells. *J Cell Sci*, **121**, 1014-24.
- Thomas, B. & Beal, M.F. (2007). Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, R183-194.
- Tian, B., Nowak, D.E., Jamaluddin, M., Wang, S. & Brasier, A.R. (2005). Identification of direct genomic targets downstream of the nuclear factor-kappaB transcription factor mediating tumor necrosis factor signaling. *J Biol Chem*, **280**, 17435-48.
- Trougakos, I.P., So, A., Jansen, B., Gleave, M.E. & Gonos, E.S. (2004). Silencing Expression of the Clusterin/Apolipoprotein J Gene in Human Cancer Cells Using Small Interfering RNA Induces Spontaneous Apoptosis, Reduced Growth Ability, and Cell Sensitization to Genotoxic and Oxidative Stress. *Cancer Res*, **64**, 1834-1842.
- Ueno, H., Nakamura, H., Inoue, M., Imai, K., Noguchi, M., Sato, H., Seiki, M. & Okada, Y. (1997). Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas. *Cancer Res*, **57**, 2055-60.
- Unoki, M. & Nakamura, Y. (2001). Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene*, **20**, 4457-65.
- Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., Albanese, A., Nussbaum, R., Gonzalez-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W.P., Latchman, D.S., Harvey, R.J., Dallapiccola, B., Auburger, G. & Wood, N.W. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, **304**, 1158-60.
- Valente, P., Fassina, G., Melchiori, A., Masiello, L., Cilli, M., Vacca, A., Onisto, M., Santi, L., Stetler-Stevenson, W.G. & Albini, A. (1998). TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer*, **75**, 246-53.
- Vaux, D.L., Cory, S. & Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, **335**, 440-2.
- Vermes, I., Haanen, C. & Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods*, **243**, 167-90.
- Visse, R. & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, **92**, 827-39.
- Wacheck, V. & Zangemeister-Wittke, U. (2006). Antisense molecules for targeted cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, **59**, 65-73.
- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, **15**, 2922-33.

- Warner, S.L., Stephens, B.J. & Von Hoff, D.D. (2008). Tubulin-associated proteins: Aurora and Polo-like kinases as therapeutic targets in cancer. *Curr Oncol Rep*, **10**, 122–9.
- Warnke, S., Kemmler, S., Hames, R.S., Tsai, H.L., Hoffmann-Rohrer, U., Fry, A.M. & Hoffmann, I. (2004). Polo-like kinase-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr Biol*, **14**, 1200–7.
- Westermarck, J. & Hahn, W.C. (2008). Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med*.
- Will, H. & Hinemann, B. (1995). cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. *Eur J Biochem*, **231**, 602–8.
- Yang, Y., Gehrke, S., Imai, Y., Huang, Z., Ouyang, Y., Wang, J.-W., Yang, L., Beal, M.F., Vogel, H. & Lu, B. (2006). Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of Drosophila Pink1 is rescued by Parkin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 10793–10798.
- Yin, X.M. (2006). Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene*, **369**, 7–19.
- Yoo, N.J., Kim, H.S., Kim, S.Y., Park, W.S., Park, C.H., Jeon, H.M., Jung, E.S., Lee, J.Y. & Lee, S.H. (2003). Immunohistochemical analysis of Smac/DIABLO expression in human carcinomas and sarcomas. *Apmis*, **111**, 382–8.
- Zhang, J., Sarkar, S. & Yong, V.W. (2005). The chemokine stromal cell derived factor-1 (CXCL12) promotes glioma invasiveness through MT2-matrix metalloproteinase. *Carcinogenesis*, **26**, 2069–77.
- Zhang, L. & Fang, B. (2005). Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther*, **12**, 228–37.
- Zhao, Y.P., Chen, G., Feng, B., Zhang, T.P., Ma, E.L. & Wu, Y.D. (2007). Microarray analysis of gene expression profile of multidrug resistance in pancreatic cancer. *Chin Med J (Engl)*, **120**, 1743–52.
- Zheng, H.C., Tsuneyama, K., Takahashi, H., Miwa, S., Sugiyama, T., Popivanova, B.K., Fujii, C., Nomoto, K., Mukaida, N. & Takano, Y. (2008). Aberrant Pim-3 expression is involved in gastric adenoma-adenocarcinoma sequence and cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol*, **134**, 481–8.
- Zinkel, S.S., Ong, C.C., Ferguson, D.O., Iwasaki, H., Akashi, K., Bronson, R.T., Kutok, J.L., Alt, F.W. & Korsmeyer, S.J. (2003). Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression. *Genes Dev*, **17**, 229–39.

7 ABKÜRZUNGEN

Einheiten wurden nach dem internationalen SI-System abgekürzt. Für Aminosäuren wurde der Einbuchstabencode verwendet. Englische Ausdrücke sind *kursiv* gedruckt. Für Gennamen wurden die Symbole nach dem HUGO Gene Nomenclature Committee verwendet.

α -	anti- (Antigen von Antikörpern)
AK	Antikörper
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
AS	Aminosäure
ASO	<i>antisense oligonucleotide</i>
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BH3	<i>BCL2-homology domain 3</i>
BM	Basalmembran
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	Komplementäre DNA
CML	Chronisch-myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalo-Virus
Cyclo	Cyclophosphamid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
DXR	Doxorubicin
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fwd	Primer in 5'→3' (<i>forward</i>)
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GIST	Gastrointestinale Stromatumoren
GST	Glutathion-S-Transferase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
Neor	Neomycin-Resistenz
Nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
Rev	Primer in 3'→5' (<i>reverse</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sqPCR	Semiquantitative PCR
StAW	Standardabweichung
T _A	Anlagerungstemperatur (<i>annealing temperature</i>)
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
Tax	Taxotere®
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor

TL	Totallysat
ÜN	Über Nacht
UTR	untranslatierte Region
WB	Westernblot
wt	Wildtyp

8 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesen interessanten Projekten zu arbeiten und die guten Arbeitsbedingungen zur Verfügung gestellt hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Angelika Böttger für die Übernahme des Erstgutachtens und die nette Betreuung an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Für die Kooperation innerhalb des Projektes MMP-15 möchte ich mich bei Reimar Abraham bedanken, der mit Diskussion und Anregungen dazu beigetragen hat.

U3 Pharma AG möchte ich für die zur Verfügung-Stellung des MMP-15 Konstrukts danken.

Für die Herstellung der MMP-15 Antikörper möchte ich mich bei Frau Dr. Kremmer bedanken, die viel Mühe in dieses Projekt investiert hat.

An dieser Stelle geht auch ein großes Dankeschön an alle Mitarbeiter dieser Abteilung für die tägliche Unterstützung in vielen praktischen und theoretischen Fragen, interessante Diskussionen und wertvolle Anregungen sowie die besonders gute Arbeitsatmosphäre. Eine große Hilfe waren Michaela Bairlein und Philipp Mertins, die mich auch durch Korrekturlesen unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt schließlich meinem Mann und meiner Familie, die mir während der gesamten Zeit durch ihre Geduld, Hilfe und Unterstützung zur Seite standen und mir diese Arbeit erst ermöglicht haben.

CURRICULUM VITAE – DIPL. BIOL. UTE KREBS

Persönliche Daten

Geboren	18.05.1980 in Gräfelfing, Geburtsname Richter
Familienstand	verheiratet mit Dipl.-Ing. Benjamin Krebs, keine Kinder
Staatsangehörigkeit	deutsch
Anschrift	Liesl-Karlstadt-Str. 19 81476 München

Ausbildung

seit 1. März 2005	Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Molekularbiologie, unter der Betreuung von Prof. Dr. Axel Ullrich mit dem Thema „Untersuchung von Kandidatengenen als mögliche Angriffspunkte einer gezielten Krebstherapie“
1. März 2005	Abschluss: Dipl. Biol.
Mai 2004 – Februar 2005	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Molekularbiologie mit dem Thema „Analyse von Chemoresistenzmechanismen in Krebszellen“
ab Oktober 2001	Hauptstudium mit Hauptfach Anthropologie und Humangenetik
13. Oktober 2001	Vordiplom
Oktober 1999	Studium der Biologie (Diplom) an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Juni 1999	Schulabschluss: Abitur
1986 – 1999	Allgemeinbildende Schulen: Grundschule Gilching, Christoph Probst Gymnasium Gilching