

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Arbeitsgruppe Klinische Biochemie
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Selektive Zelloberflächenmodulation von Nierenzellkarzinomen mit
Glycosylphosphatidylinositol-verankertem TIMP-1 hemmt die
TGF- β 1-Aktivierung und senkt die Expression
regulatorischer ID-Gene**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Susan Notohamiprodjo

aus
Bad Oeynhausen

Jahr 2014

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter	Prof. Dr. Peter J. Nelson, PhD
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Antje Menssen
	Prof. Dr. Volker Spindler
	Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann
Mitbetreuung durch promovierte Mitarbeiterin:	Priv. Doz. Dr. rer. nat. Roghieh Djafarzadeh
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	02. Oktober 2014

Meiner Familie

Inhalt

1.	Zusammenfassung.....	9
2.	Einführung.....	10
2.1	Das Nierenzellkarzinom	10
2.2	Metastasierung von Nierenzellkarzinomen und Matrix Metalloproteinasen.....	11
2.3	Regulierung von Matrix Metalloproteinasen durch „Tissue Inhibitor of Metalloproteinases“	12
2.4	TIMP-1-GPI.....	13
2.4.1	Konstruktion und Herstellung des Fusionsproteins.....	13
2.4.2	Besondere Effekte im Vergleich zu rekombinanten TIMP-1	15
3.	Ziel dieser Arbeit	16
4.	Material	18
4.1	Affymetrix Microarraydaten.....	18
4.2	Zelllinien.....	18
4.3	Kulturmedien und –zusätze	19
4.4	Zellkulturchemikalien	19
4.5	FPLC Puffer	19
4.6	Antikörper.....	20
4.7	Enzyme	21
4.8	Western Blot	21
4.9	ELISA Puffer	23
4.10	Zymographie.....	23
4.11	Northern Blot	24
4.12	Reverse Transkription.....	24
4.13	Quantitative PCR Assays.....	24
4.14	Reagenzienpakete	25
4.15	Reagenzien	25
4.16	Platten	27

4.17	Geräte	27
4.18	Software	28
4.19	Freeware und Datenbanken	28
4.20	Verbrauchsmaterial.....	28
4.21	Sonstiges.....	29
5.	Methoden	30
5.1	Zellbiologische Methoden.....	30
5.1.1	Kultivierung von RCC53	30
5.1.2	Einfrieren von RCC53	30
5.1.3	Bestimmung der Zellzahl.....	31
5.2	Protein-biochemische Methoden	31
5.2.1	Produktion und Klonierung von TIMP-1-GPI.....	31
5.2.2	Western Blot	33
5.2.3	Konzentrationsbestimmung von TIMP-1-GPI mit ELISA.....	36
5.3	In vitro Versuche	37
5.3.1	Effizienzanalyse der TIMP-1-GPI Inkorporierung und MMP-Bindung an die Zelloberfläche.....	37
5.3.2	Annexin V FACS	38
5.3.3	Zymographie	39
5.3.4	Zellvitalitätstest.....	39
5.4	Molekular-biologische Methoden.....	40
5.4.1	RNA-Isolierung.....	40
5.4.2	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	41
5.4.3	Northern Blot.....	41
5.4.4	Reverse Transkription	42
5.4.5	Quantitative PCR Analyse.....	42
5.4.6	Microarray-Analyse	43
6.	Ergebnisse	48

6.1	Extraktion und Reinigung von TIMP-1-GPI mittels Säulenchromatographie.	48
6.2	Effektive Inkorporierung von TIMP-1-GPI auf der Zelloberfläche von RCC53.....	52
6.3	Bindung von MMP-1, -2, -7 und -9 durch TIMP-1-GPI an die Zelloberfläche.	53
6.4	Dosis abhängige Hemmung der Gelatinasefunktion von MMP-2 und -9 in der Zymographie.....	55
6.5	Proliferationshemmung durch TIMP-1-GPI Behandlung im Zellvitalitätstest	57
6.6	Zunahme der Apoptoserate von RCC53-Zellen bei TIMP-1-GPI Behandlung.....	58
6.7	Microarray-Analyse von mit „Inhibitor der DNA Bindung“ (ID) assoziierten Signaltransduktionswegen bei TIMP-1-GPI-Behandlung.....	60
6.8	Quantitative PCR Analyse der ID-Expression bei TIMP-1-GPI Behandlung.	65
6.9	Verringerung des Anteils an aktiven TGF- β bei TIMP-1-GPI Behandlung.....	67
7.	Diskussion.....	69
8.	Literatur.....	79
9.	Genliste.....	87
10.	Abkürzungsverzeichnis	93
11.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	96
11.1	Abbildungen.....	96
11.2	Tabellen.....	97
12.	Anhang.....	98
12.1	Originalartikel.....	98
12.2	Kongressbeiträge.....	99
13.	Danksagung	105

1. Zusammenfassung

Das zugunsten von Matrix Metalloproteinasen (MMP) verschobene Proteasen/Inhibitoren-Verhältnis begründet unter anderem die Malignität von Nierenzellkarzinomen. „Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1“ (TIMP-1), ein löslicher Gewebeinhibitor für Metalloproteinasen der extrazellulären Matrix, kontrolliert die Aktivität von MMP durch 1:1 stoichiometrische Bindung. Durch Fusion von humanen TIMP-1 mit einem Glycosylphosphatidylinositol- (GPI)-Anker wird die TIMP-1-Aktivität von der extrazellulären Matrix auf die Zelloberfläche verschoben und eine lokale Applikation von definierten TIMP-1-Konzentrationen ermöglicht. Mit TIMP-1-GPI behandelte Nierenkarzinomzellen zeigten im Vergleich zu Vehikel und nativen TIMP-1-Kontrollgruppen signifikant erhöhte Apoptose- und reduzierte Proliferationsraten. Ziel der Arbeit ist mithilfe von transkriptomischem Profiling und Signaltransduktionsweg-Mapping verantwortliche Genregulationsmechanismen für TIMP-1-GPI-spezifische Effekte zu identifizieren. Mithilfe dieser Techniken zeigten wir, dass eine TIMP-1-GPI-Behandlung zu einer signifikanten Änderung der Regulation von „Inhibitor der DNA Bindung“ (ID), TGF- β /SMAD und BMP Signaltransduktionswege führte. Die unterdrückte ID-Proteinexpression ist auf die durch TIMP-1-GPI gehemmte proteolytische Aktivierung von pro-TGF- β 1 und dadurch verursachte reduzierte TGF- β 1-Signalaktivität zurückzuführen. Eine mögliche Erklärung für die Überlegenheit von TIMP-1-GPI gegenüber nativem TIMP-1 ist die fokale Konzentration auf der Zelloberfläche, die eine effektivere Hemmung von autosezernierten TGF- β 1 ermöglicht. Diese besonderen Eigenschaften von TIMP-1-GPI könnten in der Therapie von Nierenzellkarzinomen als Adjuvanz bei der modernen chirurgischen Nierenteilresektion oder bei der Therapie mit Angiogenese-Hemmern zunutze gemacht werden, um mögliche Tumorrezidive zu verhindern.

2. Einführung

2.1 Das Nierenzellkarzinom

Nierenzellkarzinome sind die häufigsten, primären und malignen Nierentumoren und entspringen den proximalen Tubulus- oder Sammelrohrzellen. Die Inzidenz bei Malignomerkrankungen beträgt ungefähr 2% [1, 2]. Nierenzellkarzinome können histologisch in klarzellige, papilläre, chromophobe, Ductus-Bellini- oder onkozytäre Karzinome eingeteilt werden, die sich in ihrem klinischen Erscheinungsbild, jedoch auch in ihrer Prognose unterscheiden [3].

Die Schwere der Erkrankung kann in vier Stadien nach Fuhrmann bestimmt werden, die mit der Prognose korrelieren [4]. In frühen Stadien liegt die Mortalität etwa bei 2-9% [5]. Bei Fernmetastasierung im fortgeschrittenen Stadium IV liegt die Mortalität allerdings bei 54-79% [5]. Die Erkrankung am Nierenzellkarzinom ist aufgrund der Symptomarmut besonders tückisch. Wenn es zu Symptomen wie Schmerzen, Bauchumfangsvermehrung oder Blut im Urin kommt, befindet sich das Nierenzellkarzinom meist bereits im fortgeschrittenen Stadium [2, 6].

Aktuell wird das Nierenzellkarzinom vor allem durch chirurgische R0-Resektion (totale oder partielle Nephrektomie) therapiert [6, 7]. Das Nierenzellkarzinom ist meist resistent gegen Radiochemotherapie. Zur palliativen Therapie bei Inoperabilität oder bei eingetretener Fernmetastasierung wird eine Radiochemotherapie [6, 8] und seit einigen Jahren eine antiangiogenetische Therapie mit anti-VEGF und mTOR-Inhibitoren durchgeführt [9, 10]. Durch die adjuvante antiangiogenetische Therapie konnte das Überleben der Patienten signifikant verlängert werden, jedoch nicht die Häufigkeit von Remissionen [11]. Zudem können bei der Therapie mit anti-VEGF und mTOR-Inhibitoren schwere Nebenwirkungen auftreten, wie starker Gewichtsverlust, Neutropenie, Anämie, Nephrotoxizität, Müdigkeit und Diarrhoe [12, 13]. Die Suche

nach alternativen bzw. supportiven Therapeutika spielt somit weiterhin eine wichtige Rolle in der Erforschung des Nierenzellkarzinoms.

2.2 Metastasierung von Nierenzellkarzinomen und Matrix Metalloproteininasen

Charakteristisch für Nierenzellkarzinome ist das invasive Wachstum und die Metastasierung in Lunge, Gehirn und Knochen [14]. Bei der Bildung von Metastasen spielen unter anderem „Matrix Metalloproteininasen“ (MMP) eine bedeutende Rolle [15, 16]. Vierundzwanzig Mitglieder der MMP-Familie sind beim Menschen bekannt. MMP sind Zink-abhängige Proteasen der extrazellulären Matrix (EZM) und fähig dessen Komponente wie Kollagen, Proteoglykane und Fibronectin abzubauen [17]. Einige von ihnen, wie z.B. MMP-7 [18], werden von den Tumorzellen selbst sezerniert. Aber auch die umgebenden Stromazellen sezernieren MMP, wie z.B. MMP-2 und -9 [19]. MMP prozessieren die Mikroumgebung des Tumors und führen dadurch zum Gefäßeinbruch und somit zur lymphogenen und hämatogenen Streuung. MMP generieren so in Zielorganen eine Mikroumgebung mit guten Wachstumsbedingungen für den Tumor, sodass sich dort neue Tumorherde bilden können [15]. Um die Energie- und Nährstoffversorgung des Tumors zur weiteren Proliferation zu gewährleisten, induzieren MMP eine verstärkte Angiogenese. Beispielsweise spielt MMP-9 eine wichtige Rolle in der Freisetzung und Aktivierung von pro-angiogenetischen Faktoren wie „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) und „tumor growth factor beta“ (TGF- β), sowie in der Induktion der Migration von Endothelzellen [15, 20-22].

In Nierenzellkarzinomen wurden unter anderem erhöhte Spiegel von MMP-1, -2, -3, -9, -14, -15 und -16 gefunden und mit Tumorprogress assoziiert [23].

Aufgrund der wichtigen Rolle von MMP in der Tumorgenese, Proliferation und Metastasierung rückt die Regulierung der MMP-Expression in den Fokus der Erforschung und Therapie des Nierenzellkarzinoms.

2.3 Regulierung von Matrix Metalloproteinasen durch „Tissue Inhibitor of Metalloproteinases“

Matrix Metalloproteinasen können wie viele andere Proteine durch verschiedene Mechanismen reguliert werden, wie zum Beispiel über die Beeinflussung der Genexpression, Proteinbiosynthese oder Prozessierung von Proenzymen [24]. MMP werden als inaktive Pro-MMP, sogenannte Zymogene exprimiert und durch verschiedene Mechanismen aktiviert, die noch nicht vollends erforscht sind. Bekannte Aktivierungsmechanismen sind unter anderem der sogenannte „Cystein Switch“ [25] oder die Interaktion mit Glykosaminoglykanen [26].

MMP können auch lokal in der extrazellulären Matrix durch endogene Inhibitoren reguliert werden, sogenannte „Tissue Inhibitor of Metalloproteinases“ (TIMP). TIMP sind natürliche Hemmer von MMP mit vier Familienmitgliedern (TIMP-1, -2, -3 und 4) [17]. Auch sie sind Proteine der extrazellulären Matrix und wasserlöslich mit Ausnahme von TIMP-3, das über Glykosaminoglykane an die Zelloberfläche gebunden ist [27]. TIMP bestehen aus zwei Domänen, wobei die C-terminale Domäne für MMP unabhängige biologische Vorgänge verantwortlich gemacht wird und die N-terminale Domäne die MMP-Aktivität durch 1:1 stochiometrische Bindung hemmt [28, 29]. TIMP-1, ein 28 kDa großes Protein, das von nahezu allen mesenchymalen Zellen produziert wird, ist fähig alle MMP, insbesondere MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-9 zu inhibieren. Zudem bildet TIMP-1 einen spezifischen Komplex mit proMMP-9 und ist womöglich mit dessen Aktivierung assoziiert [30].

2.4 TIMP-1-GPI

2.4.1 Konstruktion und Herstellung des Fusionsproteins

Die MMP-abhängige biologische Funktion von TIMP spielt eine Rolle in der Tumormetastasierung. Um die Mikroumgebung von Nierenzellkarzinomen mit definierten Konzentrationen von humanen TIMP-1 (hTIMP-1) gezielt zu modulieren, entwickelte unsere Arbeitsgruppe im Vorfeld dieser Arbeit ein Fusionsprotein aus hTIMP-1 mit einem Glycosylphosphatidylinositol-(GPI-)Anker [31-33]. Der posttranslational angebrachte GPI-Anker an der C-terminalen Domäne des Proteins bindet hTIMP-1 aufgrund ihrer Dipolarität an die Zelloberfläche der Nierenkarzinomzelle. Der lipophile Anteil des GPI-Ankers befestigt das Molekül in der Zellmembran, während der hydrophile Anteil des GPI-Ankers mit dem Protein verbunden ist [34]. Die Abbildung 1 visualisiert den Aufbau des Fusionsproteins.

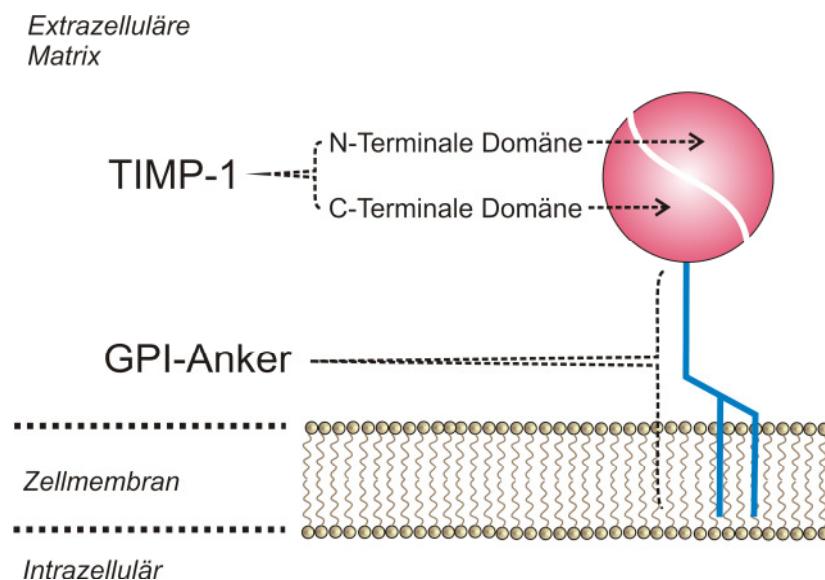


Abb. 1: Aufbau von TIMP-1-GPI. TIMP-1-GPI ist ein rekombinantes Fusionsprotein aus an der C-terminalen Domäne GPI-verankertem humanen TIMP-1. Durch den GPI-Anker wird TIMP-1 an die Zelloberfläche gebunden und so die Diffusion in die extrazelluläre Matrix unterbunden. Die Applikation konstanter, definierter Konzentrationen von TIMP-1 im Sinne eines „Cell Paintings“ wird auf diese Weise ermöglicht. Zur Herstellung von TIMP-1-GPI wurden die codierenden hTIMP-1 und GPI-Anker Sequenzen über einen pEF-DHRF-Vektor in dhrf-defiziente CHO-Zellen als Expressionsorganismus kloniert und selektiert.

Die Fusion von hTIMP-1 und einem GPI-Anker (TIMP-1-GPI) konzentriert die TIMP-1 Aktivität auf die Zelloberfläche unabhängig von Protein-Protein-Wechselwirkungen [31]. Diese Art der selektiven Oberflächenmodulation, auch „Protein engineering“ oder „Cell painting“ genannt, ist eine elegante Methode, die zum Beispiel eine Alternative zum Gentransfer darstellt [35-39].

Dazu wurde die GPI-Anker-codierende Sequenz von „Lymphocyte Function-associated Antigen 3“ (LFA-3) mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die hTIMP-1-codierende Sequenz ohne Stopp-Codon wurde mit hTIMP-1-spezifischen Primern ebenfalls mittels PCR von cDNA amplifiziert mit Einfügung einer EcoRI (Escherichia coli R Nuklease I) Schnittstelle über dem Vorwärtsprimer und einer XbaI (Xanthomonas badrii Nuklease I) Schnittstelle über dem Rückwärtsprimer. Nach erfolgter Ligatur der GPI-Anker-DNA-Sequenz mit der hTIMP-1-DNA-Sequenz, wurde das Produkt in einen pEF-DHFR (Elongationsfaktor Promotor – Dihydrofolat Reduktase) Vektor subkloniert. Dieser Vektor wurde anschließend durch Elektroporation in Dihydrofolatreduktase- defiziente (dhfr-) Chinesische Hamster Ovarzellen (CHO-Zellen) kloniert und selektiert. Bakterien wurden nicht als Expressionsorganismus gewählt, da sie keine GPI-verankerten Proteine exprimieren [34, 40].

Durchflusszytometrie-Analysen mit spezifischen hTIMP-1-Antikörpern zeigten eine stabile Expression von TIMP-1-GPI durch die CHO-Zellen. Die Inkubation mit gereinigtem TIMP-1-GPI in CHO-Zellen wies eine hohe Effizienz der Einführung vom Fusionsprotein in die Zellmembran von 40% bis 80% auf [31].

2.4.2 Besondere Effekte im Vergleich zu rekombinanten TIMP-1

In vorausgegangenen Arbeiten wurden Nierenkarzinomzellen vom RCC26, RCC53 und A498 Typ mit gereinigtem TIMP-1-GPI behandelt. Im Gegensatz zu mit rekombinanten hTIMP-1 (rhTIMP-1) behandelten Zellen zeigte sich im Proliferations-Assay mit MTT eine dosisabhängige Proliferationshemmung, eine erhöhte Apoptoserate im Annexin V FACS sowie eine erhöhte Sensitivität für FAS-induzierte Apoptose [32, 41, 42]. Außerdem zeigte sich in der Zymographie eine effektivere Hemmung von MMP-2 und -9 durch TIMP-1-GPI als durch rekombinantes hTIMP-1 (rhTIMP-1). TIMP-1-GPI wies also im Vergleich mit rhTIMP-1 eine höhere Effektivität und neue bei rhTIMP-1 bisher nicht beobachtete, biologische Effekte auf [31-33, 43, 44].

3. Ziel dieser Arbeit

Die besonderen Effekte von TIMP-1-GPI auf die Proliferation und Apoptoserate und –empfindlichkeit von Nierenkarzinomzellen können nicht durch ausschließliche Interaktion auf Proteinebene erklärt werden. Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung der verantwortlichen Signaltransduktionswege und der veränderten Genexpression mittels Microarray- und Pathwayanalyse. Die Alternativhypothese dieser Arbeit ist, dass durch TIMP-1-GPI-Behandlung beeinflusste Signaltransduktionswege zu einer veränderten Genexpression führen, die für diese Effekte verantwortlich sind.

Nach der Herstellung und dem Nachweis von TIMP-1-GPI im Proteinextrakt wird zunächst die Inkorporierung von TIMP-1-GPI auf die Zelloberfläche von Nierenkarzinomzellen mittels Durchflusszytometrie bestätigt. Schließlich werden die proliferationshemmenden und Apoptose-fördernden Effekte von TIMP-1-GPI auf Nierenkarzinomzellen entsprechend der im Vorfeld der Arbeit erprobten Methoden reproduziert [31-33]. Die RNA von mit 7 und 14 ng/ml TIMP-1-GPI behandelten Nierenkarzinomzellen werden zur Analyse mittels Microarrays extrahiert. Als Kontrollgruppen dienen mit Vehikel und rhTIMP-1 inkubierte Nierenkarzinomzellen. Die Ergebnisse der Microarray-Versuche werden mithilfe datenbankbasierter Analysesoftware „Genomatix Pathway Systems“ (GePS) (Genomatix, München, Deutschland) und „Gene Set Enrichment Analysis“ (GSEA) (Broad Institute of MIT and Harvard, USA) und ausführlicher Literaturrecherche ausgewertet und auf die am signifikantesten regulierten Signaltransduktionswege fokussiert. Um die veränderte Genexpression experimentell zu bestätigen, erfolgen Versuche mit quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR). Mithilfe der gewonnenen Erkenntnisse wird schließlich die Annahme der Alternativhypothese überprüft.

1. Arbeitshypothesen

H₀: TIMP-1-GPI-Behandlung hat keinen Effekt auf regulatorische Signaltransduktionswege, die die Proliferation und Apoptose von Nierenkarzinomzellen beeinflussen.

H₁: TIMP-1-GPI-Behandlung hat einen Effekt auf regulatorische Signaltransduktionswege, die die Proliferation und Apoptose von Nierenkarzinomzellen beeinflussen.

2. Produktion und Reinigung von TIMP-1-GPI

- Produktion von TIMP-1-GPI mittels Vektor-Klonierung und Zellkultur mit Chinesische Hamster Ovarzellen
- Extraktion und Reinigung von TIMP-1-GPI mit Säulenchromatographie (Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC))
- Nachweis von TIMP-1-GPI durch Immunoblot-Methode
- Überprüfung der Reinheit des gewonnenen Proteinextraktes mit Western Blot und in Silberfärbungsmethode
- Quantifizierung der TIMP-1-GPI-Konzentration mit ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

3. Validierung TIMP-1-GPI spezifischer Effekte auf Nierenkarzinomzellen

- Überprüfung der Inkorporierung von TIMP-1-GPI auf die Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie
- Nachweis der Bindung von Matrix Metalloproteinasen an die Zelloberfläche durch TIMP-1-GPI mittels Durchflusszytometrie
- Untersuchung der Gelatinase-Aktivität nach TIMP-1-GPI-Behandlung mit Zymographie
- Bestimmung der Proliferationsrate von Nierenkarzinomzellen nach TIMP-1-GPI-Behandlung mittels Zellvitalitätstest
- Untersuchung der Apoptoserate nach TIMP-1-GPI-Behandlung mittels Durchflusszytometrie mit „Annexin V“

4. Transkriptomisches Profiling und Signaltransduktionsweg-Mapping

- RNA-Extraktion nach TIMP-1-GPI-Behandlung
- Überprüfung der Intaktheit und Reinheit der gewonnenen RNA mit Northern Blot
- Identifizierung signifikant regulierter Transkripte mit Microarray Analyse
- Qualitätskontrolle der Microarrays mit „MADMAX“ Analysesoftware
- Identifizierung signifikant regulierter Signaltransduktionswege mit Datenbank-basierten Analysesoftwares „Genomatix Pathway System“ und „Gene Set Enrichment Analysis“

5. Validierung der Microarray-Versuchsergebnisse

- Bestimmung der Expression regulierter Zielgene mit quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR)

6. Identifizierung möglicherweise vorgelagerter Signaltransduktionswege in der von TIMP-1-GPI verursachten Genexpressionsregulierung

- Literaturrecherche und Diskussion
- Ermittlung des Konzentrationsverhältnisses zwischen Gesamt-TGF-β und aktiviertem TGF-β mit ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Tab. 1: Versuchsaufbau der Arbeit

4. Material

4.1 Affymetrix Microarraydaten

Arraytyp	Behandlung mit	RNA Isolierung am	Arrayname
HG U133 Plus2	Vehikel	05.05.2010	1+Vehicle
HG U133 Plus2	14 ng/ml rhTIMP-1	05.05.2010	2+rhT1
HG U133 Plus2	7 ng/ml TIMP-1-GPI	05.05.2010	3+7ng-T1Pi
HG U133 Plus2	14 ng/ml TIMP-1-GPI	05.05.2010	4+14ng-T1Pi
HG U133 Plus2	Vehikel	04.08.2010	1-Vehicle
HG U133 Plus2	Vehikel	04.08.2010	2-Vehicle
HG U133 Plus2	14 ng/ml rhTIMP-1	04.08.2010	3-rhTIMP-1
HG U133 Plus2	14 ng/ml rhTIMP-1	04.08.2010	4-rhTIMP-1
HG U133 Plus2	7 ng/ml TIMP-1-GPI	04.08.2010	7-TIMP-1-GPI-7
HG U133 Plus2	7 ng/ml TIMP-1-GPI	04.08.2010	8-TIMP-1-GPI-7
HG U133 Plus2	14 ng/ml TIMP-1-GPI	04.08.2010	5-TIMP-1-GPI-14
HG U133 Plus2	14 ng/ml TIMP-1-GPI	04.08.2010	6-TIMP-1-GPI-14

4.2 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Medium
(CHO/dhfr-); adhärent DHFR-defiziente Chinesischer Hamster Ovarzellen;	ATCC, Rockville, USA; no. CRL.9096	MEM α-Medium + 10% dFBS +1% P/S
(RCC53); adhärent Humane Nierenzellkarzinom Zelllinie, aggressiv wachsend von metastasiertem, klarzelligem Tumor	Isoliert von D. Schendel, München, Deutschland	RPMI 1604 + 15% FBS + 1% NEAA + 1% Natriumpyruvat +1 % P/S

4.3 Kulturmedien und –zusätze

RPMI 1604 Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
RPMI 1604 farbloses Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
MEM α-Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
Fötales Kälberserum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Dialysiertes fötales Kälberserum (dFBS)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Natriumpyruvat	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

4.4 Zellkulturchemikalien

PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung), 1x, 10x	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Trypsin/EDTA (T/E)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Biotase	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypanblau	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland

4.5 FPLC Puffer

DEAE Äquilibrierungspuffer (pH 7,4)		
100 mM	Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
50 mM	Tris/HCl	Roche, Basel, Schweiz
0,05%	Triton X-100H	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
DEAE Puffer B (pH 7,4)		
1 M	Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
50 mM	Tris/HCl	Roche, Basel, Schweiz
0,05%	Triton X-100H	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
DEAE Regenerationspuffer (pH 7,4)		
2 M	Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
50 mM	Tris/HCl	Roche, Basel, Schweiz
1%	Triton X-100	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz

Heparin Äquilibrierungspuffer (pH 7,4)		
168,8 mM	Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
10 mM	Natriumphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,05%	Triton X-100H	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Heparin Elutionspuffer (pH 7,4)		
450 mM	Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
10 mM	Natriumphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,05%	Triton X-100H	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Heparin Regenerationspuffer (pH 7,4)		
2 M	Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
10 mM	Natriumphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
1%	Triton X-100	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz

4.6 Antikörper

Antikörper	Verwendung	Hersteller
TIMP-1 coating Antikörper	ELISA	Bender Medsystem, Wien, Österreich
TIMP-1 primärer Ak	Western Blot	Labvision, Kalamazoo, USA
TIMP-1 primärer Ak IM32	FACS	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
MMP-1 primärer Ak IM35	FACS	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
MMP-2 primärer Ak, IM33	FACS	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
MMP-7 primärer Ak MS813	FACS	Labvision, Kalamazoo, USA
MMP-9 primärer Ak IM61	FACS	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Isotyp IgG1 isoAk M9269	FACS	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isotyp IgG2b isoAk M8894	FACS	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Anti-mIgG-FITC sekundärer Ak F313	FACS	Dako AS, Glostrup, Dänemark
Anti-m/HRP	Western Blot	Dako, Roskilde, Dänemark
Streptavidin HRP	ELISA	Bender Medsystem, Wien, Österreich
Annexin V FITC	FACS	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	FACS	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

4.7 Enzyme

DNAse I	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase A	Roche, Basel, Schweiz
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	NEB, Frankfurt a. M., Deutschland
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Biotase	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad, USA

4.8 Western Blot

12% Trengel		
6,6 ml	Aqua injectabilia	Braun, Melsungen, Deutschland
8 ml	Acrylamidmix	Roth, Karlsruhe, Deutschland
5 ml	Tris (1,5 M, pH 8,8)	Merck, Darmstadt, Deutschland
200 µl	SDS 10%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
200 µl	APS 10%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
20 µl	TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
5% Sammelgel		
3,4 ml	Aqua injectabilia	Braun, Melsungen, Deutschland
0,83 ml	Acrylamidmix	Roth, Karlsruhe, Deutschland
0,63 ml	Tris (1 M, pH 6,8)	Merck, Darmstadt, Deutschland
50 µl	SDS 10%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
50 µl	APS 10%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
5 µl	TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Elektrophoresepuffer		
1,9 M	Glyzin	Invitrogen, Carlsbad, USA
0,25 M	Tris	Merck, Darmstadt, Deutschland
1%	SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fixierbad Silberfärbung		
50%	Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
10%	Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
40%	Aqua injectabilia	Braun, Melsungen, Deutschland

Inkubationslösung Silberfärbung		
12,65 mM	Natriumthiosulfat	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
0,5 M	Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,5%	Glutaraldehyd	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Silberlösung Silberfärbung		
0,1%	Silbernitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,06%	Formaldehyd	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Entwicklerlösung Silberfärbung		
235,9 mM	Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,03%	Formaldehyd	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Stopplösung Silberfärbung		
800 mM	EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
TBS (10x)		
1,5 M	Natriumchlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
100 mM	Tris	Merck, Darmstadt, Deutschland
10 mM	Natriumazid	Merck, Darmstadt, Deutschland
TBST		
0,05%	Tween20 in TBS	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
Blockierlösung Immunoblot		
5%	Magermilchpulver in TBS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sonstiges		
Magic Mark XP Western Standard		Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE LDS Sample Puffer (4x)		Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE Transferpuffer (50x)		Invitrogen, Carlsbad, USA
Western Lightning Oxidizing Reagent		Perkin Elmer, Waltham, USA
Western Lightning Luminol Reagent Plus		Perkin Elmer, Waltham, USA

4.9 ELISA Puffer

Assaypuffer		
5 g	Bovines Serum Albumin	Roche, Basel, Schweiz
0,5 ml	Tween 20	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
auf 1 L	PBS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Waschpuffer		
0,05%	Tween 20 auf PBS	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz

4.10 Zymographie

Zymographie Gel 10% Gelatine	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tris-Glyzin-SDS-Laufpuffer	
240 mM	Tris
2 M	Glyzin
1%	SDS
Renaturierungslösung	
2,5%	Triton X-100
Fixierlösung	
50%	Methanol
10%	Eisessig
Färbelösung	
0,25%	Coomassie G 250
25%	Isopropanol
10%	Essigsäure
Entwicklungs puffer	
50 mM	Tris/HCl
2 mM	Natriumchlorid
5 mM	Calciumchlorid
0,5%	Brij

4.11 Northern Blot

MOPS-Puffer		
200 mM	MOPS (209,3 g/mol)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
50 mM	Natriumacetat (136 g/mol)	Merck, Darmstadt, Deutschland
10 mM	EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland

4.12 Reverse Transkription

First-strand buffer 5x	Invitrogen, Carlsbad, USA
dNTP	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DTT	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNAsin	Promega, Madison, USA
Acrylamid linear 15 µg/ml	Ambion Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Hexanukleotide	Roche, Basel, Schweiz
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNAse-freies Wasser	Invitrogen, Carlsbad, USA

4.13 Quantitative PCR Assays

Die Primer der Assay-on-Demand (AoD) sind am 5'-Ende mit dem Fluorenszenzfarbstoff 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM) und am 3'-Ende mit dem Quencherfarbstoff Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA) markiert. Primer des Referenzgens S18 rRNA sind am 5'-Ende mit dem Fluorenszenzfarbstoff VIC® und am 3'-Ende mit dem Quencherfarbstoff TAMRA markiert.

Gen	Assaytyp	Nummer	Spezifität	Hersteller
hID1	AoD	Hs03676575_s1	cDNA spezifisch	Applied Biosystems, Foster City, USA
hID2	AoD	Hs00747379_m1	cDNA spezifisch	Applied Biosystems, Foster City, USA
hID3	AoD	Hs00171409_m1	cDNA spezifisch	Applied Biosystems, Foster City, USA
hID4	AoD	Hs00155465_m1	cDNA spezifisch	Applied Biosystems, Foster City, USA
S18	AoD	4310893E	cDNA unspezifisch	Applied Biosystems, Foster City, USA

4.14 Reagenzienpakete

SimplyBlue Safestain	Invitrogen, Carlsbad, USA
PureLink RNA Mini Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
QuantiT RNA Assay Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNase free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
Taqman Universal PCR Master mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Annexin Binding Buffer	BD Pharmingen, San Diego, USA

4.15 Reagenzien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose ultrapure	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aqua injectabilia	Braun, Melsungen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Biotinkonjugate	Bender Medsystem, Wien, Österreich
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roche, Basel, Schweiz
Brij 35 Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl_2)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland

Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid 1%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formamid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Formaldehyd 37%	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glutaraldehyd 20%	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hexanukleotide	Roche, Basel, Schweiz
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol, absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
3-(N-morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) 5 M	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumphosphat (NaPi)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
dNTP Set	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Proteinase Inhibitor Tabletten Complete	Roche, Basel, Schweiz
RNAsin, Ribonuklease Inhibitor	Promega, Madison, USA
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Silbernitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sukrose	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
Triton X-100H	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz

4.16 Platten

Flachboden-Kulturplatte, 96-Loch	TPP, Trasadingen, Schweiz
Rundboden-Suspensionsplatte, 96-Loch	TPP, Trasadingen, Schweiz
ELISA Platte Maxisorb, 96-Loch	Nunc, Roskilde, Dänemark
Taqman Platte 96-Loch	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

4.17 Geräte

ABI Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, USA
ELISA Lesegerät GENiosPlus	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Fluorescence Activated Cell Scanner FACSCalibur	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Äkta FPLC System	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Gelelektrophoresekammer	Novex, San Diego, USA
Gelgießkammer	Hoefer Scientific, San Francisco, USA
Inkubator Modell 400	Brutmaschinen Janeschitz, Hammelburg, Deutschland
MinifugeT	Heraeus, Hanau, Deutschland
MegaFuge 1.0R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Braun, Melsungen, Deutschland
Qubit Fluorometer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Röntgenfilm Entwickler	Agfa, Mortsel, Belgien
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Wasserbad Haake SWB20	Thermo Haake, Karlsruhe, Deutschland

4.18 Software

ChipInspector	Genomatix, München, Deutschland
Genomatix Pathway System (GePS)	Genomatix, München, Deutschland
CellQuest	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
XFluor	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Unicorn 4.0	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems, Foster City, USA
Photoshop 7	Adobe, San Jose, USA
Illustrator CS5	Adobe, San Jose, USA
Office 2010	Microsoft, Redmont, USA
Corel Draw X4	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
Endnote X5	Thomson Reuters, NYC, USA

4.19 Freeware und Datenbanken

Management and Analysis Database for MicroArray eXperiments (MADMAX)	Bioinfomatics, Wageningen, Niederlande
Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)	Broad Institute of MIT and Harvard, USA
RMAExpress, V. 1.0.5.	Ben Bolstad, University of California, Berkeley, USA

4.20 Verbrauchsmaterial

Zellkulturplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturkratzer	TPP, Trasadingen, Schweiz
Konische Zentrifugenröhren 15 ml/ 50 ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

4.21 Sonstiges

Abstandshalter (Western Blot)	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Agarosegelkämme (Western Blot)	LMS GmbH, Dossenheim, Deutschland
Aluminiumoxid-Platten (Western Blot)	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Membranfilter 0,1 µm, 0,22 µm Porengröße	Millipore, Billerica, USA
Glasplatten (Western Blot)	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
FPLC Glassäule	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
PVDF Membran	Millipore, Billerica, USA
Röntgenfilme	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Schwämme (Western Blot)	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Wattman Papier 3 mm	Invitrogen, Carlsbad, USA

5. Methoden

5.1 Zellbiologische Methoden

Es wurde unter sterilen Bedingungen mit sterilen Medien und Geräten gearbeitet, um Kontamination durch Pilze und Bakterien zu vermeiden. Alle verwendeten Medien wurden im warmen Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt bevor sie den Zellen zugegeben werden. Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ aufbewahrt.

5.1.1 Kultivierung von RCC53

RCC53-Zellen vom metastasierten klarzelligen Nierenkarzinom wurden alle drei bis vier Tage im Verhältnis von 1 zu 4 auf Flaschen mit 150 cm² Wachstumsfläche geteilt. Unter dem Mikroskop wurden die Kulturflaschen überprüft, wie dicht die Zellen gewachsen waren und ob Kontamination mit Bakterien oder Pilzen bestand.

Unter einem sterilen Abzug wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Die adhärenten Zellen wurden dann mit 3 ml Trypsin/EDTA (T/E) für drei Minuten unter Klopfen abgelöst. Durch anschließende Gabe von 6 ml Vollmedium wird die Aktivität von Trypsin inhibiert.

In sterilen Röhrchen wurde die Zellsuspension bei etwa 150 G (1500 rpm) und 4 °C drei Minuten zentrifugiert bis sich ein Pellet bildet. Der Überstand wurde unter steriles Abzug verworfen und das Pellet mit 4 ml Vollmedium wieder zur Suspension vermischt. Je 1 ml wurde in neue, sterile Zellkulturflaschen mit 150 cm² Wachstumsfläche gegeben und im Brutschrank aufbewahrt.

5.1.2 Einfrieren von RCC53

Um die Zellen für einen kurzen Zeitraum aufzubewahren, wurden sie in Vollmedium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) in Isopropanol gefüllten Behältern bei -80 °C

eingefroren. Sollten die Zellen über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden, wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -160°C eingefroren.

5.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. 50 µl Trypanblau wurden 50 µl Zellsuspension hinzugegeben und in die Zählkammer pipettiert. Trypanblau ist ein Farbstoff, der tote Zellen markiert [45]. Diese wurden bei der Zählung ausgeschlossen. In vier Großquadranten wurden die lebenden, Trypanblau-negativen Zellen gezählt und die Zellzahl mit folgender Formel errechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl Felder}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

5.2 Protein-biochemische Methoden

5.2.1 Produktion und Klonierung von TIMP-1-GPI

Die Produktion von TIMP-1-GPI wurde bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe beschrieben [31].

Die Arbeit mit DHFR-defiziente CHO-Zellen als Expressionsorganismus fand unter sterilen Bedingungen statt. CHO-Zellen wurden in α-Medium mit 10% dFBS (dialysiertes fötales bovin Serum) kultiviert.

Ein DNA-Fragment mit den Sequenzen für den GPI-Anker von LFA-3 wurde mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) in den pEF-DHFR Vektor kloniert. Ein DNA Fragment mit der Sequenz für hTIMP-1 ohne Stopcodon wurde aus cDNA mittels PCR amplifiziert mit Einfügung einer EcoRI-Schnittstelle über dem Vorwärtsprimer und einer XbaI-Schnittstelle über dem Rückwärtsprimer. Die amplifizierten Gene

wurden in den pEF-DHFR Vektor subkloniert und mit Elektroporation in DHFR-defiziente CHO-Zellen eingeführt. Bakterien wurden nicht als Expressionsorganismus gewählt, da sie keine GPI-verankerten Proteine exprimieren [34, 40].

5.2.1.1 Extrahieren von TIMP-1-GPI

Unter sterilen Bedingungen wurde das Proteinextrakt aus den CHO-Zellen mit 5 ml Tris-Extraktionspuffer extrahiert, steril in Röhrchen filtriert und eine Stunde lang bei 4°C rotiert. Anschließend wurde das Extrakt zentrifugiert und der flüssige Überstand in eine Spritze aufgenommen.

5.2.1.2 Reinigung von TIMP-1-GPI

Die „Fast Protein Liquid Chromatographie“ (FPLC) ist ein etabliertes Verfahren, das sich die speziellen biochemischen Eigenschaften des zu reinigenden Proteins zunutze macht. Das aus den CHO-Zellen extrahierte Proteingemisch fließt durch Säulen verschiedener Eigenschaften und wird auf diese Weise nach seinen verschiedenen Eigenschaften filtriert. Zur Reinigung von TIMP-1-GPI wurden vier Säulen verwendet: Diethylaminoethyl- (DEAE), Desalting-, Heparin- und „Toyo Soda Kogiyu“- (TSK-) Säulen. Die Messung der durch die Sammelröhrchen der Fraktionssammler laufenden Proteine erfolgte durch eine UV-Absorptionsmessung bei 280 nm.

Die DEAE-Säule enthält einen Anionenaustauscher, der Proteine mit negativer Gesamtladung an sich bindet [46]. Der Durchlauf enthält TIMP-1-GPI, das eine positive Gesamtladung hat und deshalb nicht an die DEAE-Säule bindet. Die Elution mit den ausgewaschenen Proteinen, die an die DEAE-Säule gebunden waren, wurde

verworfen. Der TIMP-1-GPI-haltige Durchlauf aus der DEAE-Säule wurde auf die sogenannte Desalting-Säule übertragen, welche die Proteinlösung von Salzen befreit. Die Protein enthaltende Fraktion wurde auf die Heparin-Säule übertragen, an die TIMP-1-GPI hochaffin bindet und durch Puffer mit einer geeigneter Salzkonzentration eluiert werden kann [47]. Durchlauf- und Waschfraktion wurden verworfen. Der Elutionsdurchlauf enthält TIMP-1-GPI, welche auf die TSK-Säule geladen wurde, die Proteine zwischen 10 kDa und 500 kDa nach ihrer Größe auftrennt. Die TSK-Säule, eine Gelfiltration, enthält Partikel mit kleinen Poren, in die nur kleine Proteine eindringen können und so zurückgehalten werden. Kleine Proteine wandern somit langsamer durch die Säule als große Proteine, die nicht in die Poren eindringen können.

5.2.2 Western Blot

Western Blot ist eine Standardmethode zum Nachweis von Proteinen. Proteine werden auf ein Gel geladen und durch Elektrophorese nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Es wird eine Spannung angelegt, entlang dieser die Proteine durch das Gel wandern. Da die meisten Proteine Zwitterionen sind, ist der Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) erforderlich, das die Disulfidbrückenbildung und somit die Faltung der Proteine verhindert, sodass eine Auftrennung nach Molekülmasse erfolgen kann [48, 49]. Für diese Auftrennung ist ebenfalls die Filterfunktion durch die Porengröße im Gel verantwortlich. Kleine Proteine wandern somit schneller als große Proteine.

Mithilfe von Western Blot kann man die Zusammensetzung von Proteingemischen untersuchen. Die aus der FPLC gewonnenen Fraktionen wurden mit Western Blot auf

ihre Zusammensetzung und somit auf die Reinheit des gewonnenen TIMP-1-GPI geprüft.

5.2.2.1 Gießen von Gelen

Um TIMP-1-GPI optimal nachweisen zu können, wählten wir Gele mit 12% Acrylamid Anteil im Trenngel. Das Sammelgel in welches das Proteingemisch geladen wird, hat einen 5% Acrylamidanteil.

Für 7,5 ml Trenngel wurden 6,6 ml Wasser, 8 ml Acrylamidmix, 5 ml Tris (pH 8,8), 200 µl 10%iges SDS, 200 µl 10%iges Ammoniumpersulfat (APS) und 20 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) gemischt und ohne Bläschenbildung zur Gießkammer gegeben. Für 5 ml Sammelgel wurden 3,4 ml Wasser, 0,83 ml Acrylamidmix, 0,6 ml Tris (pH 6,8), 50 µl SDS (10%), 50 µl APS (10%) und 5 µl TEMED gemischt und über das Trenngel in die Gießkammer gegossen. Die Ladetaschen wurden mit Einlage von Kunststoffkämmen geformt.

Gele wurden mit feuchtem Umschlag in Plastik bei 4 °C aufbewahrt.

5.2.2.2 Färbemethoden

Die 30 µl Proteinproben wurden mit 10 µl Lithiumdodecylsulfat (LDS) Sample Puffer mit 2 µl Proteaseinhibitor pro Tasche aufgetragen und eine Stunde bei 120 V elektrophoretisch getrennt. Die dabei entstehenden Proteinbanden können mit verschiedenen Methoden sichtbar gemacht werden. In diesem Projekt wurden der Immunoblot und die Silberfärbung angewendet.

5.2.2.2.1 Immunoblot

Beim Immunoblot macht man sich spezifische Antikörper zunutze, um bestimmte Proteine im Gel nachzuweisen. Zum Nachweis von TIMP-1-GPI verwendeten wir einen primären Mausantikörper für TIMP-1. Aufgrund der hochspezifischen Antikörper ist die zweifelsfreie Identifizierung von TIMP-1(-GPI) ein Vorteil des Immunoblots gegenüber der Silberfärbung.

Zuvor wurde das Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF-)Membran eine Stunde lang bei 30 V in NuPAGE Transferpuffer transferiert. Die Membran wurde anschließend in 5% Magermilch in tert-Butyldimethylsilyl-Derivate (TBS) eine Stunde lang blockiert. Nach jeweils 5 Minuten Waschen mit TBST (tert-Butyldimethylsilyl-Derivate mit Tween 20) und TBS wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit primärem TIMP-1 Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal 10 Minuten mit TBST und einmal 10 Minuten in TBS gewaschen und daraufhin 1 Stunde lang mit sekundärem anti-m/HRP Antikörper inkubiert. Nach vier 10-minütigen TBST- und zwei 5-minütigen TBS-Waschschriften wurden im Dunkelraum 2 ml „Oxidizing“- und 2 ml „Luminol Reagenz“ hinzugegeben, die die gebundenen Antikörper fluoreszieren lassen. Nachdem die Membran auf Wattman-Papier angetrocknet wurde, wurde sie in Folie eingelegt und mit einem Röntgenfilm in eine Filmkassette gelegt, solange bis der Film ausreichend belichtet war. Der Film wurde mit der Röntgenfilm-Entwickler-Maschine entwickelt, sodass das Bild mit den für TIMP-1 spezifischen Banden bei 60 kDa für das Dimer und 30 kDa für das Monomer entstand.

5.2.2.2 Silberfärbung

Bei der Silberfärbung werden die Banden der gewanderten Proteine des Gels mit Silbernitrat gefärbt und so sichtbar gemacht. Vorteil der Silberfärbung gegenüber dem

Immunoblot ist, dass auch Nebenprodukte in den Proben und somit die Reinheit dargestellt werden können.

Das Gel wurde über Nacht in Inkubationslösung aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde nach drei 10-minütigen Waschschritten mit destilliertem Wasser das Gel in Silberlösung für 30 bis 45 Minuten gefärbt. Nach kurzem Waschen mit destilliertem Wasser wurde das Gel für maximal 4 Minuten in Entwicklerlösung inkubiert und schließlich für 15 Minuten in Stopplösung die Färbung abgeschlossen. Das Gel wurde anschließend in destilliertem Wasser aufbewahrt.

5.2.3 Konzentrationsbestimmung von TIMP-1-GPI mit ELISA

Die Konzentration von TIMP-1-GPI in den gesammelten Pools der Säulenchromatographie wurde mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) bestimmt. Mit spezifischen Antikörpern für TIMP-1 wurde eine für ELISA-Versuche speziell angefertigte Platte (96-Loch ELISA Platte Maxisorb von Firma Nunc, Dänemark) benetzt, an diese TIMP-1 bindet. Diese gebundenen Proteine werden mit einem Enzym verbundenen sekundären Antikörpern detektiert und durch eine Farbreaktion durch dieses gebundene Enzym sichtbar gemacht. Somit kann mit Extinktionsmessungen die genaue Konzentration bestimmt werden.

Dazu wurde am Tag zuvor die 96-Loch Platte mit dem Erstantikörper gegen TIMP-1 benetzt und über Nacht bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Eine Standardeichkurve wurde mit einer Verdünnungsreihe von Standardprotein erstellt sowie Verdünnungen der Proben aus den gesammelten Durchlaufsfraktionen der DEAE-, Desalting- und TSK-Säule sowie der Heparin-Säulen Elution. Nach mehrmaligem Waschen mit Waschpuffer wurden den Standards und Proben Biotinkonjugate in Assaypuffer hinzugegeben und die Platte zwei Stunden bei Raumtemperatur bei 100 rpm

geschüttelt. Anschließend wurde nach mehrmaligem Waschen mit Waschpuffer, Streptavidin „horseradish peroxidase“ (HRP) in Assaypuffer hinzugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur bei 100 rpm geschüttelt. Nach Zugabe von Substrat und nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln, wurde 1 M Phosphorsäure als Stopplösung hinzugegeben. Die Platte wurde am ELISA Auslesegerät GENionPlus bei 450 nm zu 0 nm gemessen.

5.3 In vitro Versuche

5.3.1 Effizienzanalyse der TIMP-1-GPI Inkorporierung und MMP-Bindung an die Zelloberfläche

Die Durchflusszytometrie oder „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS) Analyse ist ein Verfahren mit welchem man mit spezifischen Antikörpern markierte Zelloberflächenstrukturen nachweisen kann. Mit diesem Verfahren sollte die Inkorporierung von TIMP-1-GPI in die Zelloberfläche von RCC53 nachgewiesen werden und dessen Fähigkeit MMP zu binden.

Wir untersuchten vier Behandlungsreihen mit Medium, Vehikel, rhTIMP-1 und TIMP-1-GPI. Die Zellen (bis auf die unbehandelten Zellen) wurden in serumfreiem Medium zwei Stunden lang im Brutschrank mit Medium, Vehikel, 14 ng/ml rhTIMP-1 oder 14 ng/ml TIMP-1-GPI inkubiert und schließlich in serumfreiem Medium aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen mit Biotase abgelöst, mit PBS gewaschen und auf eine Rundboden-Suspensionsplatte ausplattiert. Die Platte wurde zwei Minuten bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellpellets mit primären Antikörpern für TIMP-1, MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 und IgG1 und IgG2b Isotyp-Antikörpern für 60 Minuten auf Eis

inkubiert. Nach einem Waschschnitt mit PBS wurden die Zellen 45 Minuten lang im Dunkeln mit sekundärem anti-mIgG-(Fluoreszein-Isothiozyanat-)FITC Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 10 µl PBS in spezielle FACS-Röhrchen suspendiert. Die Zellen wurden dann mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur und der CellQuest Software untersucht.

5.3.2 Annexin V FACS

Die Annexin V Durchflusszytometrie ist ein Verfahren mit dem man apoptotische Zellen nachweisen kann. Annexin V aus der Annexin-Familie ist ein Protein, das an Phosphatidylserine, welches auf der Zelloberfläche von apoptotischen Zellen zu finden ist, bindet [50, 51]. Mithilfe von Annexin V Antikörpern kann der Anteil an apoptotischen Zellen in einer Population bestimmt werden. Um besser unterscheiden zu können, in welchem Apoptosestadium sich die Zellen befinden und den Anteil an nekrotischen Zellen zu untersuchen, wurde das Peptid 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) benutzt, welches mit DNA von avitalen Zellen interkaliert [52, 53]. Lebendige Zellen sind in der Durchflusszytometrie sowohl Annexin V als auch 7-AAD negativ, frühapoptotische Zellen Annexin V positiv und 7-AAD negativ, spätapoptotische Zellen Annexin V und 7-AAD positiv und nekrotische Zellen Annexin V negativ und 7-AAD positiv.

Um die Wirkung von TIMP-1-GPI auf die Apoptoserate zu untersuchen, wurden RCC53-Zellen, wie bereits beim MMP-FACS beschrieben, mit Medium, Vehikel, 14 ng/ml rhTIMP-1 und 12 ng/ml TIMP-1-GPI behandelt und in serumfreiem Medium über Nacht aufbewahrt. Nach Ablösung mit Biotase, Waschen mit PBS und Ausplattierung auf einer Rundboden-Suspensionsplatte, wurden die Zellen in jeweils 300 µl „Annexin Binding Buffer“ in FACS-Röhrchen suspendiert und 10 Minuten lang

im Dunkeln mit Annexin-V-FITC und 7-AAD inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur und CellQuest Software untersucht.

5.3.3 Zymographie

Die Zymographie erlaubt die Visualisierung der MMP-2 und MMP-9 Gelatinase-Aktivität durch Gelatineabbau im Gel in Vehikel, 14 ng/ml rhTIMP-1 und 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 14 ng/ml TIMP-1-GPI behandelten und unbehandelten Zellen.

25 µl Probe, 25 µl Tris-Glyzin-SDS Puffer und 2 µl Proteininhibitor wurden vermischt und 8 µl je Tasche auf das Zymographiegel aufgetragen und 90 Minuten lang elektrophoretisch bei 125 V aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend 30 Minuten lang in Renaturierungspuffer und 48 Stunden bei 37°C in Entwicklungspuffer inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das Gel aus dem Entwicklungspuffer genommen und 30 Minuten lang in Fixierlösung fixiert. Anschließend wurde das Gel vier Stunden lang in Färbelösung gefärbt und die Färbung 10 bis 30 Minuten in Fixierlösung wieder fixiert. Das Gel wurde dann 30 Minuten lang in Entfärbelösung gegeben bis es die gewünschte Färbung erhalten hatte und wurde dann in steriles Injektionswasser aufbewahrt.

5.3.4 Zellvitalitätstest

Der MTT-Test ist ein Verfahren, das die Vitalität von Zellen mithilfe einer Farbstoffreduktion misst. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ist ein wasserlöslicher, gelber Farbstoff, der durch NADH und NADPH – Nebenprodukten der Glykolyse stoffwechselaktiver und somit vitaler Zellen – zum

wasserunlöslichen, violetten Formazan reduziert wird [54-56]. Je mehr vitale Zellen die Probe enthält, desto intensiver ist die violette Farbe, dessen Extinktion mittels Photometrie bestimmt werden kann.

Der Versuch wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Von ca. 5000 bis 6000 RCC53-Zellen wurden je 100 µl pro Loch auf die 96-Loch Platten ausplattiert und die Platten für mindestens 6 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert bis die Zellen adhären waren. Das überstehende Medium wurde abgesaugt und 100 µl farbloses Medium je Loch gegeben und wiederum über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und je 6 Löcher mit 100 µl jeweiligem Protein (2, 4, 6, 8, 10, 12 und 14 ng/ml TIMP-1-GPI, 14 ng/ml rhTIMP-1, 14 ng/ml dhTIMP-1, Vehikel) in farblosem Medium behandelt. Die Platten wurden eine Stunde lang bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Überstand wurde abpipettiert und 150 µl Proliferationsmedium zugegeben und die Platten im Brutschrank aufbewahrt.

Die erste Platte wurde nach 24 Stunden gemessen, die zweite nach 48 Stunden und die dritte nach 72 Stunden. Dazu wurden pro Loch 50 µl MTT-Lösung gegeben und drei Stunden lang im Brutschrank inkubiert. Die Platte wurde dann 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und der Abstand abpipettiert. Je Loch wurden 100 µl Isopropanol mit 0,04% NaOH gegeben. Die Platte wurde eine Minute lang bei 300 rpm geschüttelt und am ELISA-Auslesegerät bei 570 nm/690 nm vermessen.

5.4 Molekular-biologische Methoden

5.4.1 RNA-Isolierung

RNA von mit Vehikel, 14 ng/ml rhTIMP-1, 7 ng/ml TIMP-1-GPI oder 14 ng/ml TIMP-1-GPI behandelten RCC53-Zellen wurden zur cDNA Gewinnung isoliert, die für

nachfolgende Microarray-Analysen und quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR) benötigt wurde. Zur Reinigung wurde das „PureLink RNA Mini Kit“ nach Herstellerangaben verwendet. Der optionale DNase-Reinigungsschritt wurde angewendet. Die gewonnene RNA-Konzentration wurde mittels des „Quant-It RNA Assay Kit“ bestimmt und anschließend durch Reverse Transkription zu cDNA ungeschrieben oder bei -80 °C aufbewahrt.

5.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Für die Bestimmung der Konzentration wurde das „Quant-It RNA Assay Kit“ verwendet. Eine Pufferlösung wurde aus 10 µl Reagenz mit 1990 µl Pufferstammlösung gemischt, was für etwa 10 Proben mit jeweils 200 µl Pufferlösung pro Eppendorf-Röhrchen in 1,0 ml Größe ausreicht. Um dem Messgerät zwei Referenzgrößen zu bieten, wurden Standards (S0 und S10) angefertigt, die aus 190 µl Puffer mit 10 µl S0 bzw. S10 bestehen. Die RNA Proben wurden im Verhältnis 1:200 verdünnt und bei Bedarf erneut im Verhältnis 1:10 verdünnt.

5.4.3 Northern Blot

Northern Blot ist analog zum Western Blot für Proteine das Verfahren der Wahl um RNA mittels Gelelektrophorese darzustellen und ihre Qualität und Reinheit zu prüfen. Ähnlich wie beim Western Blot wird eine Substanz benötigt, welche die Komplexbildung von RNA verhindert und somit die Auf trennung nach Ladung und Größe ermöglicht. Beim Northern Blot handelt es sich dabei um Formamid und/oder Formaldehyd.

(3-(N-Morpholino-)Propansulfonsäure (MOPS)-Puffer ist Bestandteil des Gels und dient auch als Elektrodenpuffer. 3 µl RNA-Probe wurden mit 10 µl Formamid, 4 µl

37%iges Formaldehyd, 2 µl MOPS-Puffer und 1 µl Ethidiumbromid gemischt und diese 20 µl Ladevolumen 15 Sekunden bei 65°C gekocht, auf Eis abgekühlt und in die Geltaschen pipettiert. In eine Tasche wurde 5%iges Bromphenolblau als Laufkontrolle gegeben. Bromphenolblau wurde wegen möglicherweise enthaltenen RNasen, die die RNA zersetzen würden, nicht den Proben hinzugegeben. Die anschließende Gelelektrophorese dauerte bei 70 bis 100 V etwa eine Stunde. Die Banden konnten unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

5.4.4 Reverse Transkription

Um cDNA herzustellen, wurden 2 µg jeder RNA Probe in 26,4 µl RNase-freies Wasser zur Reversen Transkription entnommen und 13,59 µl folgender Mischung hinzugegeben: 8 µl Puffer (5x), 0,8 µl Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP) (25 mM), 2 µl Dithioreitol (DTT) (0,1 M), 1 µl „RNase Out“ (40 U/µl), 0,5 µl Acrylamid (linear, 15 µl/ml), 0,43 µl Hexanukleotide (2 µg/µl), und 0,86 µl „Superscript II“ (200 U/µl).

Für RT- Proben wurden 0,2 µg jeder RNA Probe in 26,4 µl RNase-freies Wasser entnommen und 13,59 µl von derselben Mischung, darin statt „Superscript II RNase“ RNase-freies Wasser, hinzugegeben. Alle Proben wurden 90 Minuten lang bei 42°C und 350 rpm im Schüttler inkubiert und bei -20°C aufbewahrt.

5.4.5 Quantitative PCR Analyse

Bei der qPCR Analyse können exprimierte Gene durch Markierung spezifischer cDNA-Abschnitte quantifiziert werden. Es wurde die Methode der sogenannten „taq-man“ Analyse gewählt.

Bei der taq-man Analyse werden spezifische Abschnitte der cDNA mit einer Sonde markiert, die bei stattfindender Bindung an cDNA fluoresziert. Spezifische Primer für das zu untersuchende Gen geben der taq-Polymerase einen Startpunkt zur PCR. Wird dabei die Sonde von der taq-Polymerase verarbeitet, löst sich der FAM- oder VIC®-markierte Fluoreszenzfarbstoff, der vom Messgerät detektiert werden kann.

Für die taq-man Analyse wurden 2 µl cDNA pro Loch einer 96 Loch Multiply PCR Platte (Sarstedt AG, Nümbrecht) pipettiert. RT+ Proben wurden doppelt und RT- Proben einfach angesetzt. RT- Proben wurden nur für nicht-cDNA-spezifische Primer angesetzt. Jeder Probe wurde 18 µl Gebrauchslösung aus 10 µl taq-man mastermix, 1 µl Primer Assay und 7 µl H₂O zugegeben. Primer Assays für hID-1 (Hs03676575_s1), hID-2 (Hs00747379_m1), hID-3 (Hs00171409_m1), hID-4 (Hs00155465_m1) wurden verwendet, sowie Primer Assays eines als „Housekeeper“ bezeichneten Referenzgens S18 (4310893E), die in allen Zellen eine Ribosomen-Untereinheit exprimiert [57].

5.4.6 Microarray-Analyse

Um molekularbiologische Vorgänge auf DNA-Ebene darzustellen, wurden die Nierenkarzinomzellen mit Microarrays untersucht. Microarray oder sogenannte Genchips sind mit künstlich hergestellten DNA-Abschnitten bedruckte Karten. Bei diesem Projekt verwendeten wir Affymetrix Human Genome Chips vom „HG U133 Plus 2“ Typ, die mit mehr als eine Millionen solcher Proben bedruckt sind. Die Microarray-Untersuchung ermöglicht die parallele Untersuchung mehrerer tausend DNA-Abschnitte des gesamten menschlichen Genoms bei Verwendung geringer Mengen an Probematerial.

Als Probematerial dient cDNA aus RNA der untersuchten Zellen. Jeweils drei Microarrays wurden mit cDNA von verschiedenen behandelten Zellen in Heidelberg entsprechend des Protokolls von Amen, N. [58] hybridisiert.

Die RCC53-Zellen wurden mit Vehikel, 14 ng/ml rhTIMP-1, 7 ng/ml TIMP-1-GPI oder 14 ng/ml TIMP-1-GPI behandelt. Bei der Hybridisierung legen sich die einzelsträngigen cDNA-Moleküle an ihren komplementären Strang, die auf definierten Positionen auf dem Array markiert sind. Nach dem Abwaschen verbleiben nur die gebundenen cDNA-Abschnitte auf dem Array und können mittels Laser ausgelesen werden.

5.4.6.1 .CEL-Daten

Die Daten der Microarray-Analyse werden mittels Affymetrix „GeneChip Operating Software“ (GCOS) zu sogenannten .CEL-Dateien verarbeitet. Dabei stellt GCOS zuerst eine Bilddatei im .DAT-Dateiformat her. Das Bild, das auch als .tiff-Datei exportiert werden kann, stellt die Intensitäten dar, die vom Scanner gemessen wurden. Aus .DAT-Dateien lassen sich .CEL-Dateien generieren, welche die Intensitäten pro Zelle der .DAT-Datei in Zahlenwerte ausdrücken.

Die Hybridisierung und Generierung der .CEL-Dateien der Microarray Daten wurden freundlicher Weise im Labor von Herrn Prof. Gröne vom Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg durchgeführt.

5.4.6.2 Qualitätskontrolle von Affymetrix Genchips

Um zu überprüfen, ob die Microarray-Daten verwertbar waren, war eine Qualitätskontrolle nötig, um Verfälschungen der Ergebnisse durch Artefakte zu vermeiden. „Management and Analysis Database for MicroArray eXperiments“

(MADMAX) ist eine Datenbank und ein Analysewerkzeug, welches auf Oracle 10g basiert und in Zusammenarbeit mit der „European NutritionGenomics Organisation“ (NuGO) durchgeführt wird. Die Microarray-Daten werden in verschiedenen Diagrammen dargestellt und statistisch ausgewertet. Sie erlauben den Vergleich zwischen mehreren Microarray-Datensätzen und Rückschlüsse auf die Qualität der Versuchsdurchführung. Die Ergebnisse wurden im pdf-Format ausgegeben.

Eine wichtige Rolle im Überprüfungsprozess spielt die Normalisierung, um Microarrays einer Versuchsreihe miteinander besser vergleichbar zu machen. Bei der sogenannten „MAS5 Normalisierung“ wird die Signalintensität einzelner Microarrays mittels eines Skalierungsfaktors auf die durchschnittliche Signalintensität aller Arrays der Versuchsreihe normalisiert. Das Verhältnis zwischen den einzelnen Skalierungsfaktoren sollte im idealen Fall unter 3 liegen. Ein höherer Wert weist auf einen fehlerhaften Array innerhalb der Versuchsreihe hin.

Die Bilddaten der .CEL-Daten wurden der Bewertung ebenfalls hinzugezogen. Es wurde darauf geachtet, ob sich in den Abbildungen Artefakte wie Schlieren, Flecken oder Streifen fanden. Homogen erscheinende Abbildungen sprechen für ein weitestgehend Artefakt freien Array (Abb. 2) [59].

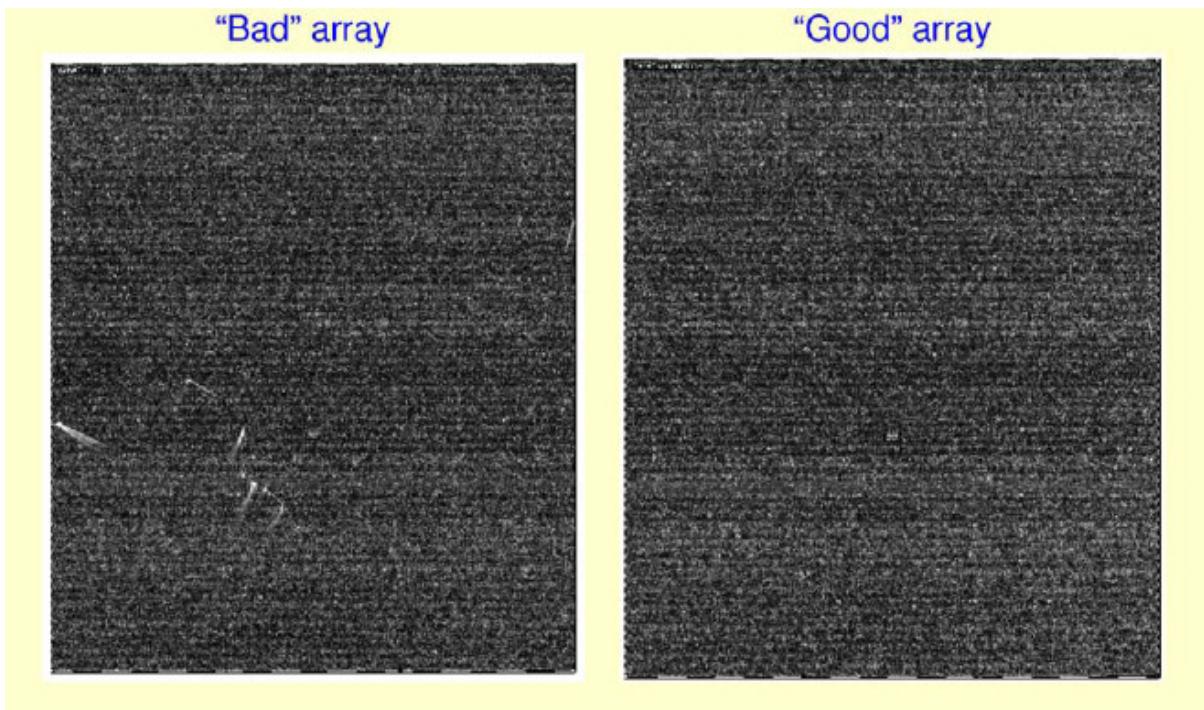


Abb. 2: Beispiele für Microarrays schlechter und guter Qualität. Der linke Microarray weist Artefakte wie Schlieren und Flecken in den Bilddaten auf, welche sich negativ auf die Qualität auswirken. Der rechte Microarray weist keine solcher Artefakte auf. Aus „Tutorial on the Madmax Affymetrix quality control pipeline“ von Philip de Groot, 11 – 13, 19 – 20 April 2006. [57]

„Relative Log Expressions- (RLE) Werte“ weisen ebenfalls auf die Qualität der Microarrays hin. Dabei wurde nach Normalisierung die Durchschnittsintensität von den Intensitäten einzelner Proben subtrahiert. Die RLE-Werte wurden als Box-Diagramm dargestellt. Bei einer Versuchsreihe guter Qualität würden sich die Boxen in einer Linie anordnen und gleich groß sein.

5.4.6.3 Analyse mit Genomatix ChipInspector und Pathway System (GePS)

„ChipInspector“ ist ein Programm, das Microarray-Daten in vier Schritten prozessiert: Zuordnung von Einzelsonden zu Transkripten, totale Intensitätsnormalisierung, Signifikanz-Analyse von Microarrays (SAM) und Transkript-Identifikation.

Es wurden Behandlungs-Kontroll-Analysen zwischen Vehikel und 14 ng/ml rhTIMP-1, 7 ng/ml TIMP-1-GPI oder 14 ng/ml TIMP-1-GPI, als auch zwischen 14 ng/ml rhTIMP-1 und 7 ng/ml oder 14 ng/ml TIMP-1-GPI durchgeführt. Die Anzahl an

signifikanten Sonden wurde auf 5000 eingestellt bei einer Fehlerrate (False Discovery Rate (FDR)) von 0%. Die Liste mit den Transkript-Ergebnissen wurde in „Genomatix Pathway System“ (GePS) exportiert. GePS enthält mehrere Datenbanken und nutzt Gen-ontologische Attribute um große Gensets zu charakterisieren. GePS erlaubt des Weiteren die Darstellung von Signalwegdiagrammen und Verknüpfung mit der Literatur.

5.4.6.4 Analyse mit Robust Multichip Average (RMA) und Gene Set Enrichement Analysis (GSEA)

„Robust Multichip Average“ (RMA) verarbeitet .CEL-Dateien über folgende Schritte: Hintergrund-Anpassung, Quantil-Normalisierung und Zusammenfassung. RMA-Ergebnisse wurden anschließend in „Gene Set Enrichment Analysis“ (GSEA) exportiert, welches Behandlung und Kontrolle miteinander vergleicht, ob definierte Gensets signifikant reguliert sind. Die Gensets entnimmt GSEA aus Gendatenbanken wie „KEGG“, „Reactome“ und „BioCarta“. Es können auch eigene Gensets definiert werden [60, 61].

6. Ergebnisse

6.1 Extraktion und Reinigung von TIMP-1-GPI mittels Säulenchromatographie.

CHO-Zellen wurden wie bereits beschrieben als Expressionsorganismus von TIMP-1-GPI kultiviert. Die enthaltenden Proteine wurden mit Tris extrahiert. Das Proteinextrakt wurde steril filtriert und eine Stunde bei 4°C rotiert. Kleine Proben des Proteinextrakts wurden mit Western Blot untersucht. Sowohl in der Silberfärbung als auch im Immunoblot für TIMP-1 konnten die Banden für das 33 kDa große TIMP-1-GPI identifiziert werden bzw. TIMP-1-GPI als Dimer bei etwa 60 kDa. Die Messung von TIMP-1-GPI mit ELISA ergab eine Konzentration von 1363,25 ng/ml.

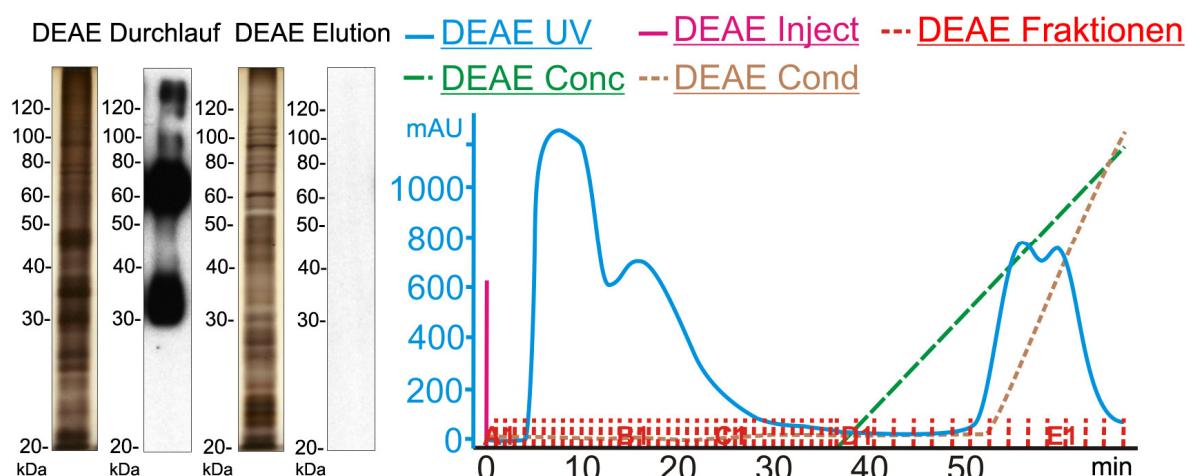


Abb. 3: Extraktion von TIMP-1-GPI mit DEAE-Säule. Die DEAE-Säule beinhaltet Anionenaustauscher, welche negativ geladene Proteine bindet. Positiv geladenes TIMP-1-GPI konnte deswegen in der Durchlaufsfraktion (Fraktionen A5 bis B11) im Western Blot gefunden werden. Es bestand jedoch eine starke Verunreinigung mit anderen Proteinen. Die Elutionsfraktion (Fraktionen D10 bis E4) enthielt negativ geladene Proteine und kein Nachweis von TIMP-1-GPI im Immunoblot. Die 138,5 ng/ml TIMP-1-GPI enthaltende Durchlaufsfraktion wurde anschließend auf die Desalting-Säule geladen.

Anschließend wurde die DEAE-Säule mit dem Proteinextrakt beladen. Die Durchlauffraktionen A5 bis B11 mit insgesamt 18,3 ml wurden aufgefangen und auf die Desalting-Säule geladen. Die Elutionsfraktionen D10 bis E4 mit insgesamt 14 ml wurden aufgefangen, gesammelt und bei 4°C aufbewahrt. Bei der Western Blot

Untersuchung wurde festgestellt, dass sich bei der Silberfärbung und Immunoblot für TIMP-1 in der DEAE-Durchlauffraktion die Banden für TIMP-1-GPI zeigten. In der DEAE-Elutionsfraktion jedoch fanden sich weder in der Silberfärbung noch im Immunoblot für TIMP-1-spezifische Banden für TIMP-1-GPI (Abb. 3). Die DEAE-Durchlauffraktion enthielt nach Messung mit ELISA eine TIMP-1-GPI-Konzentration von 138,5 ng/ml.

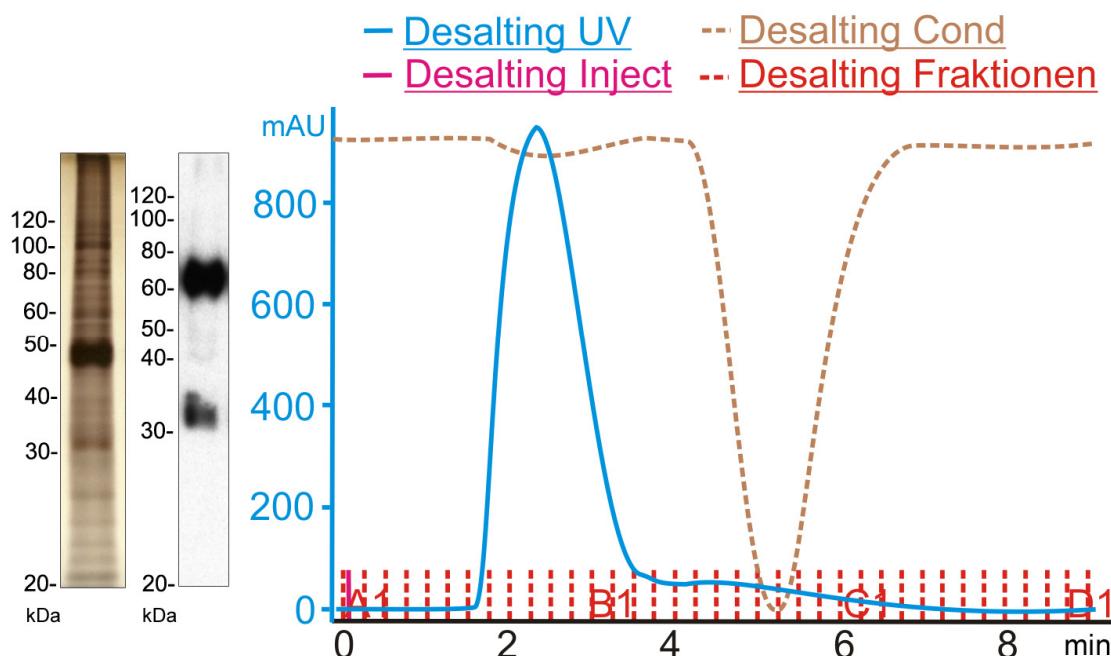


Abb. 4: Extraktion von TIMP-1-GPI mit Desalting-Säule. In der Desalting-Säule werden überschüssige Salze aus der DEAE-Durchlaufsfaktion entfernt. Die Protein enthaltende Fraktion (Fraktionen A8 bis B2) enthielt 110,61 ng/ml TIMP-1-GPI, das im Immunblot nachgewiesen werden konnte und weniger als die DEAE-Durchlaufsfaktion verunreinigt war. Die Protein enthaltende Fraktion wurde anschließend auf die Heparin-Säule geladen.

Die aus der Desalting-Säulenchromatographie gewonnenen, Protein enthaltenden Fraktionen A8 bis B2 (gesammelt insgesamt 31 ml) wurden auf die Heparin-Säule aufgetragen. Die Durchlauffraktionen A1 bis A6 mit insgesamt 24 ml wurden gesammelt und bei 4°C aufbewahrt. Die Fraktionen B7 und B8 mit insgesamt 3,9 ml wurden auf die TSK-Säule gegeben. In den gesammelten Fraktionen der Desalting-Säule und in der Heparin-Elutionsfraktion konnten in der Western Blot

Silberfärbung und im Immunoblot für TIMP-1-spezifische Banden für TIMP-1-GPI dargestellt werden (Abb. 4, Abb. 5). Die TIMP-1-GPI-Messung mit ELISA ergaben in den gesammelten Fraktionen der Desalting-Säule eine Konzentration von 110,61 ng/ml bzw. in der Heparin-Elutionsfraktion eine Konzentration von 334,5 ng/ml. Die Heparin-Durchlauffraktion enthielt hingegen nur eine TIMP-1-GPI-Konzentration von 6,27 ng/ml.

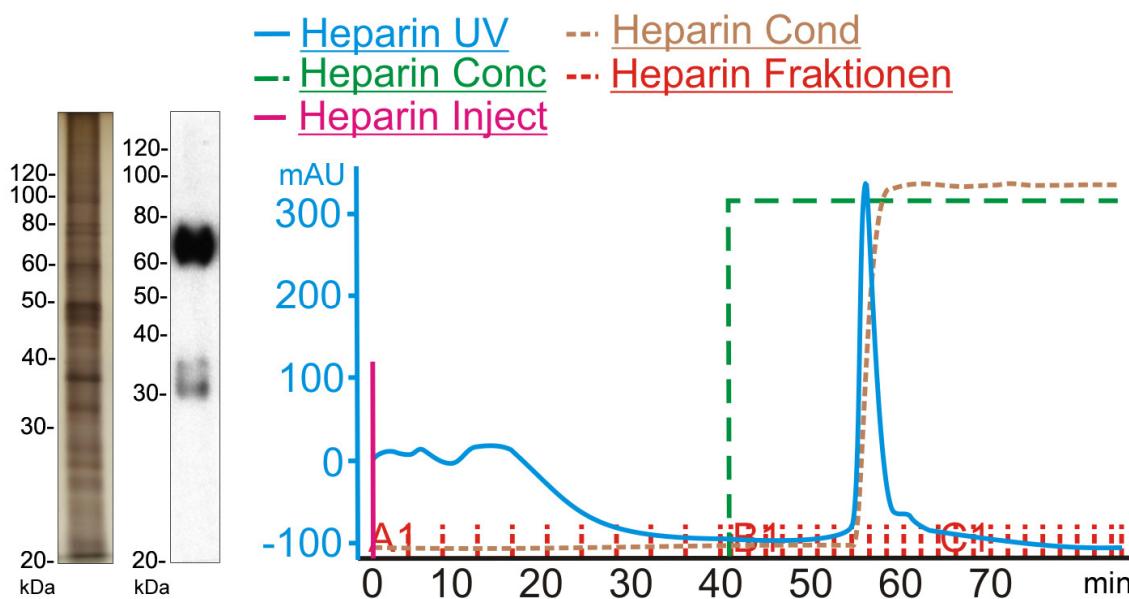


Abb. 5: Extraktion von TIMP-1-GPI mit Heparin-Säule. Heparin ist fähig TIMP-1-GPI zu binden. Andere Proteine durchlaufen früh die Heparin-Säule, während TIMP-1-GPI erst mit der Elutionsfraktion (Fraktionen B7 und B8) ausgeschieden wird. Die Elutionsfraktion enthielt 334,5 ng/ml TIMP-1-GPI und hatte einen geringen Verunreinigungsgrad. Die Heparin-Elutionsfraktion wurde auf die TSK-Säule geladen.

Die Fraktionen B4 bis C9 der TSK-Säule wurden einzeln aufbewahrt. Insgesamt wurde für diese Fraktionen ein Volumen von 11,4 ml bestimmt. Als Vehikelprobe wurden die Fraktionen E4 bis G3 gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Western Blot auf TIMP-1-GPI untersucht, um abzuwägen welche Fraktionen gesammelt werden können. Der Immunoblot zeigte spezifische Banden für TIMP-1-GPI in den Fraktionen B4 bis C9, wobei die Konzentration an TIMP-1-GPI in den Fraktionen B5 bis C1 am höchsten zu sein schien. In der Silberfärbung waren die

Banden für TIMP-1-GPI in den Fraktionen B5 bis C1 am besten sichtbar. Bei Fraktionen ab C3 wurden die Banden für TIMP-1-GPI blasser und andere Banden kräftiger, welches für einen höheren Grad der Verunreinigung sprach. Wir entschieden uns die Fraktionen B4 bis C3 zu sammeln und erhielten ein Gesamtvolumen von 11,4 ml. Die Fraktionen C4 bis C9 wurden ebenfalls gesammelt und hatten ein Gesamtvolumen von 5,6 ml. Die Fraktionen der TSK-Säule B4 bis C3 wurden nochmals mittels Western Blot untersucht. Dabei lag im Vergleich zu den gesammelten Fraktionen der DEAE-, Desalting- und Heparin-Säulen bei der Silberfärbung eine geringere Verunreinigung durch andere Proteine vor. Spezifische Banden für TIMP-1-GPI waren auch im Immunoblot abgrenzbar (Abb. 6). Die Analyse mit ELISA ergab für die gesammelten Fraktionen der TSK-Säule eine TIMP-1-GPI-Konzentration von 39,12 ng/ml.

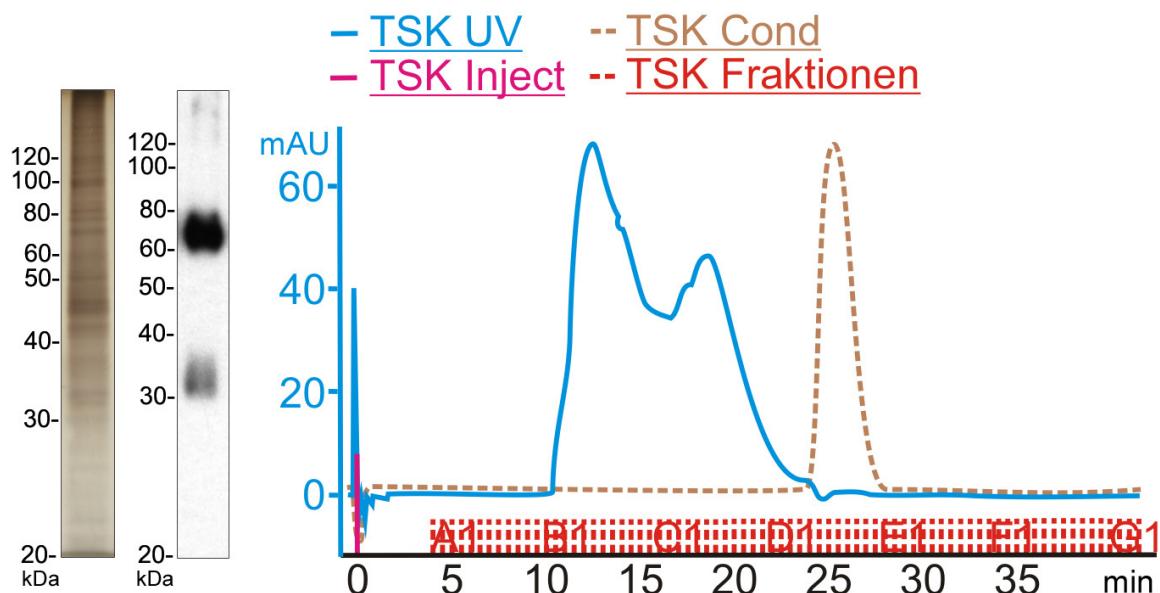


Abb. 6: Extraktion von TIMP-1-GPI mit TSK-Säule. In der TSK-Säule werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Die am wenigsten verunreinigten Fraktionen B4 bis C3 wurden gesammelt und enthielten 39,12 ng/ml TIMP-1-GPI bei einem Volumen von 11,4 ml.

6.2 Effektive Inkorporierung von TIMP-1-GPI auf der Zelloberfläche von RCC53.

TIMP-1-GPI ist im Gegensatz zu nativem hTIMP-1 durch den GPI-Anker an der Zelloberfläche gebunden. Die Inkorporierung von TIMP-1-GPI in die Zellmembran der RCC Zellen wurde mittels spezifischer Oberflächenantikörperfärbung und anschließender FACS-Analyse dargestellt.

RCC53-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen mit 12,5 ng/ml und 50 ng/ml TIMP-1-GPI und mit Vehikel als Negativkontrolle behandelt. Die zweite Präparation wurde mit 7 ng/ml und 14 ng/ml TIMP-1-GPI und Vehikel inkubiert. Das weitere Vorgehen war identisch.

Je Probe wurden 3×10^4 Zellen auf ihre Fluoreszenzintensität untersucht. Alle Proben wiesen eine niedrige Intensität der Isotyp-Antikörperkontrollen auf, was auf deren unspezifische Bindung an die Zelloberfläche hindeutete. Bei mit Vehikel behandelten Proben lag die Fluoreszenzintensität ebenfalls auf niedrigem Niveau wie bei der Isotyp-Antikörper-Kontrolle. Dies war am ehesten im Rahmen einer nicht signifikanten Inkorporierung aufgrund des Fehlens von TIMP-1-GPI im Vehikel zu werten.

Im Gegensatz zur Isotyp-Antikörper- und Vehikelkontrolle zeigte sich bei mit TIMP-1-GPI-behandelten Proben eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Bei der mit 12,5 ng/ml TIMP-1-GPI-behandelten Probe kam es zu einer Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität von 3,05 auf 6,67 und bei der mit 50 ng/ml TIMP-1-GPI behandelten Probe sogar zu einem Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität von 2,89 auf 14,07. Auch grafisch zeigte sich bei den Diagrammen dort eine deutliche Verschiebung der schwarzen Linie nach rechts (Abb. 7). Die signifikante Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität bei mit TIMP-1-GPI und spezifischen TIMP-1-Antikörpern behandelten Proben war als

Ergebnis einer effizienten Inkorporierung von TIMP-1-GPI in die Zellmembran der RCC53-Zellen zu deuten.

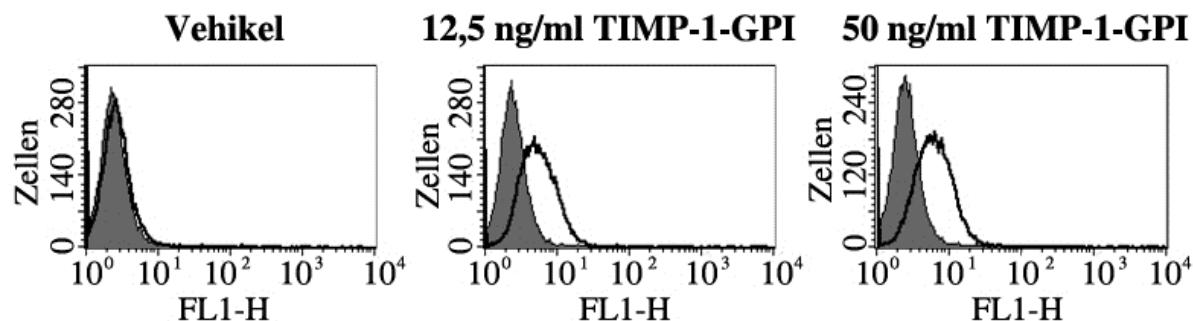


Abb. 7: Inkorporierung von TIMP-1-GPI in RCC53. RCC53-Zellen wurden mit Vehikel, 12,5 und 50 ng/ml TIMP-1-GPI behandelt. Es erfolgte eine Färbung mit spezifischen primären Antikörpern (IM32) bzw. mit Isotyp-Antikörpern und sekundären Antikörpern (F313 IgG1 und 7-AAD). Mithilfe dieser Technik kann TIMP-1-GPI auf der Zelloberfläche mittels FACS nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede in der Fluoreszenz bei TIMP-1-GPI behandelten Zellen, jedoch nicht bei mit Vehikel behandelten Zellen. Dies wies auf eine erfolgreiche Inkorporierung von TIMP-1-GPI in die Zellmembranen der RCC53-Zellen hin.

6.3 Bindung von MMP-1, -2, -7 und -9 durch TIMP-1-GPI an die Zelloberfläche.

RCC53-Zellen wurden mit 14 ng/ml TIMP-1-GPI und mit Vehikel und 14 ng/ml rhTIMP-1 als Negativkontrolle behandelt und mit spezifischen Antikörpern für TIMP-1, MMP-1, -2, -7 und -9, Isotyp-Antikörpern und anti-mIgG-FITC gefärbt. Die Messung mittels Durchflusszytometrie wurde wie beschrieben durchgeführt.

Je Probe wurden 3×10^4 Zellen auf ihre Fluoreszenzintensität untersucht. Dabei zeigte sich bei allen Proben eine niedrige mittlere Fluoreszenzintensität der Isotyp-Antikörperkontrollen um 3,0. Bei mit Vehikel behandelten Proben lag die mittlere Fluoreszenzintensität für TIMP-1, MMP-1, -2 und -7 ebenfalls auf niedrigem Niveau wie bei den Isotyp-Antikörperkontrollen um 3,0. Nur bei MMP-9 und rhTIMP-1 behandelten Zellen zeigten sich geringe mittlere Intensitätsverschiebungen von etwa 3,0 auf 4,0.

Bei TIMP-1-GPI-behandelten Zellen kam es bei auf TIMP-1 untersuchten Zellen zu einer Verschiebung der mittleren Fluoreszenzintensität von 3,35 auf 14,33, bei Untersuchung auf MMP-1 von 3,35 auf 11,72, bei Untersuchung auf MMP-2 von 3,35 auf 28,53, bei Untersuchung auf MMP-7 von 3,54 auf 22,52 und bei Untersuchung auf MMP-9 von 3,35 auf 34,19. In Abbildung 8 sind die Fluoreszenzintensitäten grafisch dargestellt.

TIMP-1-GPI ist im Gegensatz zu nativem hTIMP-1 durch den GPI-Anker an die Zelloberfläche gebunden und kann so mittels spezifischer Oberflächenantikörperfärbung und anschließender FACS-Analyse auf der Zellmembran von RCC53-Zellen dargestellt werden. An TIMP-1-GPI gebundene MMP lassen sich auf diese Weise ebenfalls an der Zelloberfläche weisen.

Die FACS-Analyse zeigte, dass Antikörper unspezifisch an die Zellmembran binden. Bei Behandlung mit Vehikel und rhTIMP-1 kam es zu keiner signifikanten Fluoreszenzintensitätsverschiebung im Vergleich zu den Isotyp-Antikörperkontrollen. Behandlung mit TIMP-1-GPI jedoch führte zu signifikanten Fluoreszenzintensitätsverschiebungen im Vergleich zu den Isotyp-Antikörperkontrollen. Dies deutete darauf hin, dass TIMP-1-GPI effektiv in die Zellmembran von RCC53 inkorporiert wurde und MMP an die Zelloberfläche binden kann.

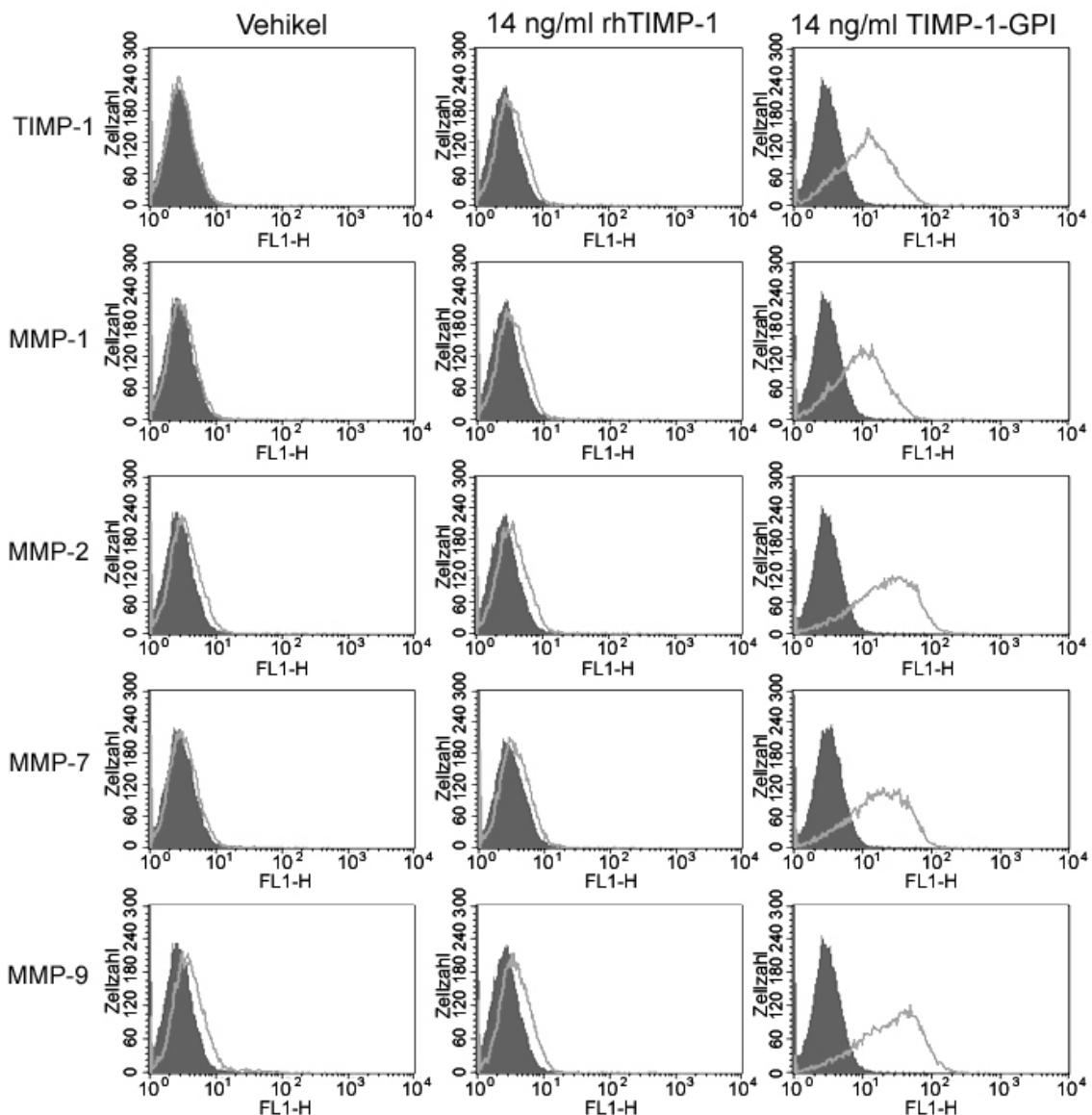


Abb. 8: MMP FACS. RCC53-Zellen wurden mit Vehikel, 14 ng/ml rhTIMP-1 und 14 ng/ml TIMP-1-GPI behandelt. Eine Färbung mit spezifischen Antikörpern für TIMP-1, MMP-1, -2, -7 und -9, entsprechenden Isotyp-Antikörpern und sekundäre Antikörper (F313 IgG1 und 7-AAD) wurde durchgeführt. Nach TIMP-1-GPI Behandlung kam es zu signifikanten Signalanhebungen für Oberflächen-gebundene TIMP-1, MMP-1, -2, -7 und -9 im Gegensatz zu Vehikel und rhTIMP-1 behandelten RCC53-Zellen. Dies deutete auf eine effektive Bindung von MMP an oberflächengebundenes TIMP-1-GPI hin. Nach Behandlung mit Vehikel und rhTIMP-1 zeigten sich keine Signalintensitätserhöhungen.

6.4 Dosis abhängige Hemmung der Gelatinasefunktion von MMP-2 und -9 in der Zymographie.

Die Zymographie macht sich die biologischen Eigenschaften von MMP-2 und -9 zunutze, um ihre Aktivität nachzuweisen. MMP-2 und -9 sind sogenannte

Gelatinasen, die Gelatine proteolytisch prozessieren. In der Zymographie werden Gelatine-haltige Gele so gefärbt, dass Areale die von MMP-2 und -9 verdaut wurden transparente Banden auf dem blauen Gel hinterlassen. MMP-2 und -9 sind unter anderem Substrate von TIMP-1 und somit wahrscheinlich auch von TIMP-1-GPI. Die Auswirkung von TIMP-1-GPI auf die MMP-2 und -9 Aktivität sollte mittels Zymographie näher untersucht werden.

RCC53-Zellen wurden mit Vehikel, 14 ng/ml rhTIMP-1 und 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 14 ng/ml TIMP-1-GPI wie beschrieben behandelt und auf Zymographie-Gele geladen. Als Negativ-Kontrolle diente Zellkulturmedium.

In der Zymographie (Abb. 9) erschienen bei der Negativ-Kontrolle keine Banden. Bei Vehikel sowie bei rhTIMP-1 zeigten sich Banden für MMP-9 und -2. Bei TIMP-1-GPI zeigte sich mit zunehmender Konzentration eine deutliche Abnahme der Bandenintensität von MMP-2 und -9. Bei 2 ng/ml nahm die Intensität der Banden im Vergleich zu Vehikel um ungefähr die Hälfte ab. Bereits bei 12 ng/ml waren die Banden kaum noch erkennbar.

Die Abnahme der Bandintensität mit zunehmender Konzentration von TIMP-1-GPI deutete auf eine Dosis-abhängige MMP-2 und -9 Hemmung von TIMP-1-GPI. rhTIMP-1 hingegen zeigte bei einer Konzentration von 14 ng/ml im Vergleich mit Vehikel keine signifikante MMP-2 und -9 Gelatine-Funktionshemmung.

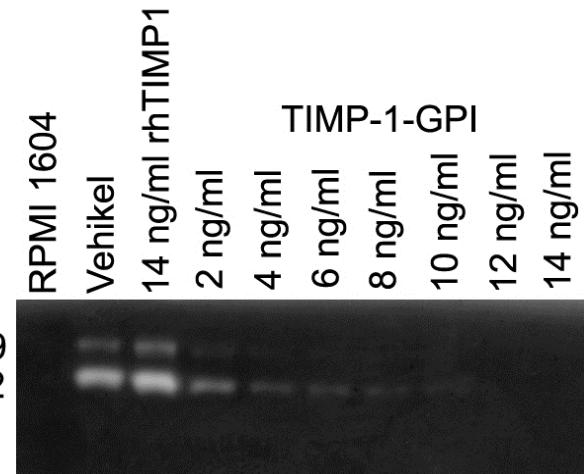


Abb.9: TIMP-1-GPI Zymographie. Die Zymographie erlaubt die Visualisierung der Gelatinase Funktion von MMP-2 und -9. Die proteolytische Aktivität von MMP-2 und -9 nahm mit steigender Konzentration von TIMP-1-GPI ab. Bei Vehikel und rhTIMP-1 behandelten RCC53-Zellen kam es nicht zu einer signifikanten Hemmung der MMP-2 und -9 Aktivität. Reines RPMI 1604 zeigte sich bei nicht enthaltenden MMP negativ.

6.5 Proliferationshemmung durch TIMP-1-GPI Behandlung im Zellvitalitätstest

RCC53-Zellen wurden auf drei 96-Loch Flachbodenplatten ausplattiert und je 6 Loch eine Stunde lang mit Protein (1% FCS RPMI 1604 Medium, Vehikel, 14 ng/ml rhTIMP-1, 2 ng/ml, 4 ng/ml, 6 ng/ml, 8 ng/ml, 10 ng/ml, 12 ng/ml und 14 ng/ml TIMP-1-GPI) behandelt. Anschließend wuchs die Zellpopulation je Platte für 24, 48 und 72 Stunden in 1% FCS-haltigem Proliferationsmedium.

Nach abgelaufener Wachstumszeit wurde jedem Loch MTT zugegeben, dessen farbige Kristalle sich auf lebendige Zellen ablagnern. Je intensiver die Farbe, desto mehr Zellen befinden sich im Loch. Diese Intensität wurde mithilfe des GENionPlus-Auslesegeräts bei 570 nm zu 690 nm Wellenlänge gemessen.

In allen Behandlungsreihen kam es zu einer Zunahme der Intensität mit zunehmender Dauer der Wachstumszeit, was auf eine Proliferation der RCC53-Zellen hindeutete (Abb. 10). Allerdings wurden insbesondere nach 48 und 72 Stunden bei TIMP-1-GPI Behandlung signifikant geringere Intensitäten gemessen als in anderen Behandlungsreihen. Beispielsweise wurde nach 48 Stunden im Vergleich zwischen

Medium und 2 ng/ml TIMP-1-GPI-Behandlung eine Abnahme der Intensität um 53,45% gemessen bzw. nach 72 Stunden um 55,9%. Nach 48 Stunden war die Intensität nach 14 ng/ml TIMP-1-GPI-Behandlung um 78,48% geringer als in Medium bzw. nach 72 Stunden um 81,33%. Je höher die TIMP-1-GPI-Konzentration war, desto stärker nahm die gemessene Intensität ab. Dies wies auf eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung von RCC53-Zellen durch TIMP-1-GPI hin. Bei Vehikel, rhTIMP-1 und dhTIMP-1 behandelten Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Intensität zu unbehandelten in Medium proliferierten Zellen. Der proliferationshemmende Effekt ließ sich also nur in TIMP-1-GPI-behandelten Zellen nachweisen. Ein Effekt durch die TIMP-1-Komponente alleine konnte aufgrund der fehlenden Proliferationshemmung bei rhTIMP-1 ausgeschlossen werden.

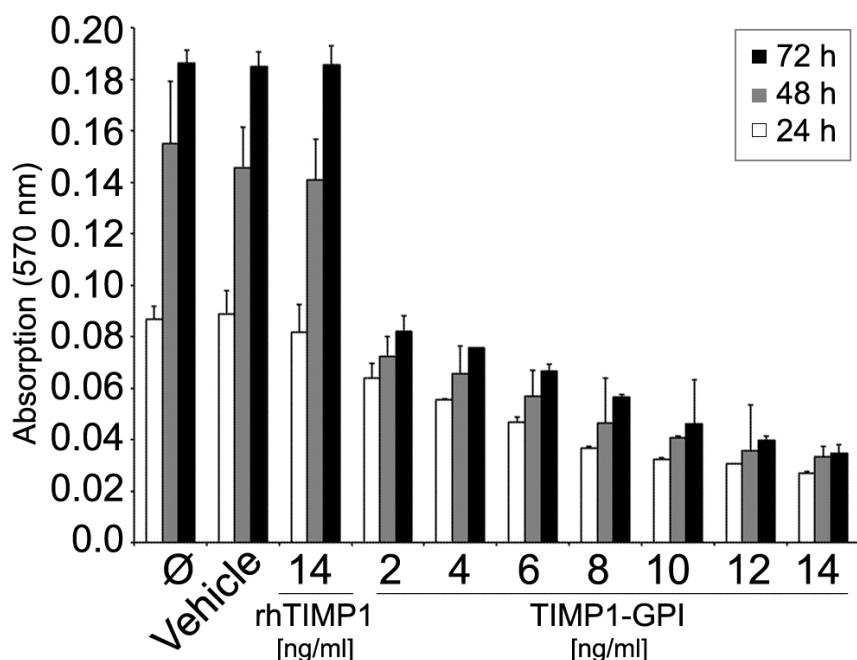


Abb. 10: MTT Assay nach 24, 48 und 72 h TIMP-1-GPI-Behandlung. Die Absorbtion von an vitalen RCC53-Zellen abgelagerten MTT-Kristallen lässt sich mittels ELISA messen und somit die Proliferationrate quantifizieren. Dabei zeigte sich mit steigender Dosis von TIMP-1-GPI insbesondere nach 48 und 72 Stunden eine signifikante Hemmung der Proliferation von RCC53. Nach rhTIMP-1 Behandlung kam es im Vergleich mit 1% FCS Medium und Vehikel behandelten RCC53 zu keiner signifikanten Hemmung der Proliferationsrate.

Um die Apoptoserate nach TIMP-1-GPI zu untersuchen, wurden RCC53-Zellen mittels Annexin V Durchflusszytometrie untersucht. Vier Behandlungsreihen mit Medium, Vehikel, 14 ng/ml rhTIMP-1 und 14 ng/ml TIMP-1-GPI wurden wie beschrieben mit Annexin V und 7-AAD gefärbt und je Probe 3×10^4 Zellen auf ihre Fluoreszenzintensität untersucht.

In mit Medium behandelten Zellen lag der Anteil apoptotischer Zellen bei 13,32%, nekrotischer bei 2,4% und vitaler bei 84,01%. Vehikel und 14 ng/ml rhTIMP-1 behandelte Zellen zeigten Apoptoseraten von etwa gleichem Ausmaß. In mit 14 ng/ml TIMP-1-GPI behandelten Zellen waren 38,43% apoptotisch, 4,92% nekrotisch und 56,6% vital. Das entsprach etwa einer Verdopplung der Apoptoserate. Der Anteil an nekrotischen Zellen stieg nicht signifikant an (Abb.11).

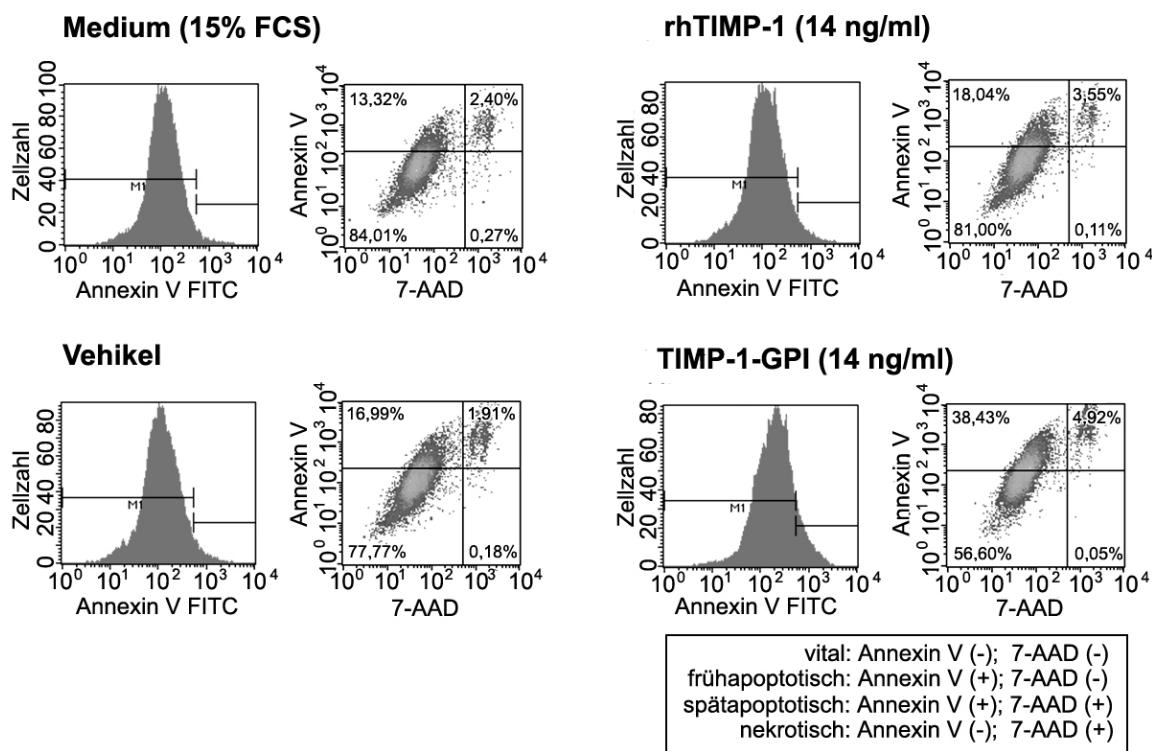


Abb. 11: Apoptose FACS mit Annexin V nach TIMP-1-GPI-Behandlung. Die Quote an apoptotischen und nekrotischen Zellen lässt sich mithilfe der Färbung mit Annexin V und 7-AAD bestimmen. RCC53-Zellen wurden mit Medium, Vehikel, 14 ng/ml rhTIMP-1 und 14 ng/ml TIMP-1-GPI behandelt. Nach TIMP-1-GPI-Behandlung kam es zu einer signifikanten Zunahme an apoptotischen Zellen im Vergleich mit anderen Behandlungsreihen. Auch der Anteil der nekrotischen Zellen stieg an, jedoch in einem insignifikanten Ausmaß.

6.7 Microarray-Analyse von mit „Inhibitor der DNA Bindung“ (ID) assoziierten Signaltransduktionswegen bei TIMP-1-GPI-Behandlung.

TIMP-1-GPI ist wie auch natives TIMP-1 ein extrazelluläres Protein [31]. Im Proliferationstest und in der Durchflusszytometrie führte die Behandlung von RCC53-Zellen mit TIMP-1-GPI im Vergleich zum nativen TIMP-1 zu einer effektiveren Hemmung der Proliferation und zu einer Steigerung der Apoptoserate. Da insbesondere intrazelluläre Prozesse für das Proliferations- und Apoptoseverhalten von Zellen verantwortlich sind [61] und um die molekularbiologischen Hintergründe bei TIMP-1-GPI-Behandlung besser zu verstehen, erfolgten Analysen mittels Transkriptomischem Profiling und Signaltransduktionsweg-Analyse.

Es wurden vier Behandlungsreihen mit Vehikel, 14 ng/ml rhTIMP-1, 7 ng/ml und 14 ng/ml TIMP-1-GPI, von denen 48 Stunden nach Behandlung folgende RNA-Konzentrationen gewonnen werden konnten (Tab. 2) untersucht:

Nr.	Behandlung mit:	Konzentration
I	Vehikel	1,72 µg/µl
II	rhTIMP-1 14 ng/ml	1,64 µg/µl
III	TIMP-1-GPI 7 ng/ml	1,82 µg/µl
IV	TIMP-1-GPI 14 ng/ml	2,24 µg/µl
1	Vehikel	0,872 µg/µl
2	rhTIMP-1 14 ng/ml	0,796 µg/µl
3	TIMP-1-GPI 14 ng/ml	0,708 µg/µl
4	TIMP-1-GPI 7 ng/ml	0,99 µg/µl
5	Vehikel	0,828 µg/µl
6	rhTIMP-1 14 ng/ml	0,968 µg/µl
7	TIMP-1-GPI 14 ng/ml	0,818 µg/µl
8	TIMP-1-GPI 7 ng/ml	0,67 µg/µl

Tab. 2: Gewonnene RNA-Konzentrationen der Behandlungsreihen

Die gewonnene RNA wurde schließlich mit Microarrays (Affymetrix Human Genome Chip HG U133 Plus2) hybridisiert. Die gewonnenen .CEL-Dateien wurden mit MADMAX auf ihre Qualität überprüft.

Alle .CEL-Daten-Abbildungen wiesen keine Artefakte wie Schlieren, Streifen oder Flecken auf (Abb. 13). Die Skalierungsfaktoren lagen alle etwa um 0,5. Das Verhältnis lag somit unter 3, was auf ein konstantes Signalverhalten der Arrays der Versuchsreihe hinwies. In RLE-Diagrammen verhielten sich alle Arrays ähnlich ohne signifikante Ausreißer (Abb. 12).

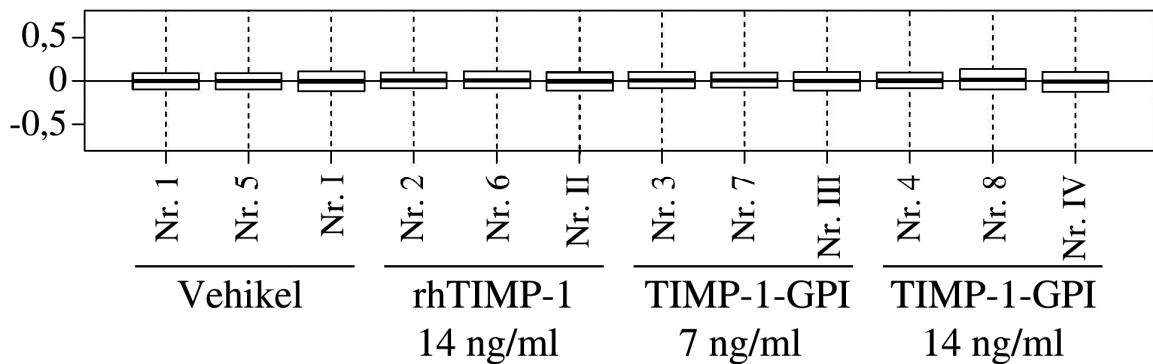


Abb. 12: Alle verwendeten Microarrays verhielten sich im RLE-Boxplot ähnlich. Für den RLE-Boxplot wurde nach Normalisierung die Durchschnittsintensität von den Intensitäten einzelner Proben subtrahiert. Die RLE-Werte der verwendeten Microarrays stellten sich hier als Box-Diagramm dar, ordneten sich in einer Linie an und waren alle in etwa gleich groß. Dies deutete auf eine ausreichend gute Qualität der Microarrays hin.

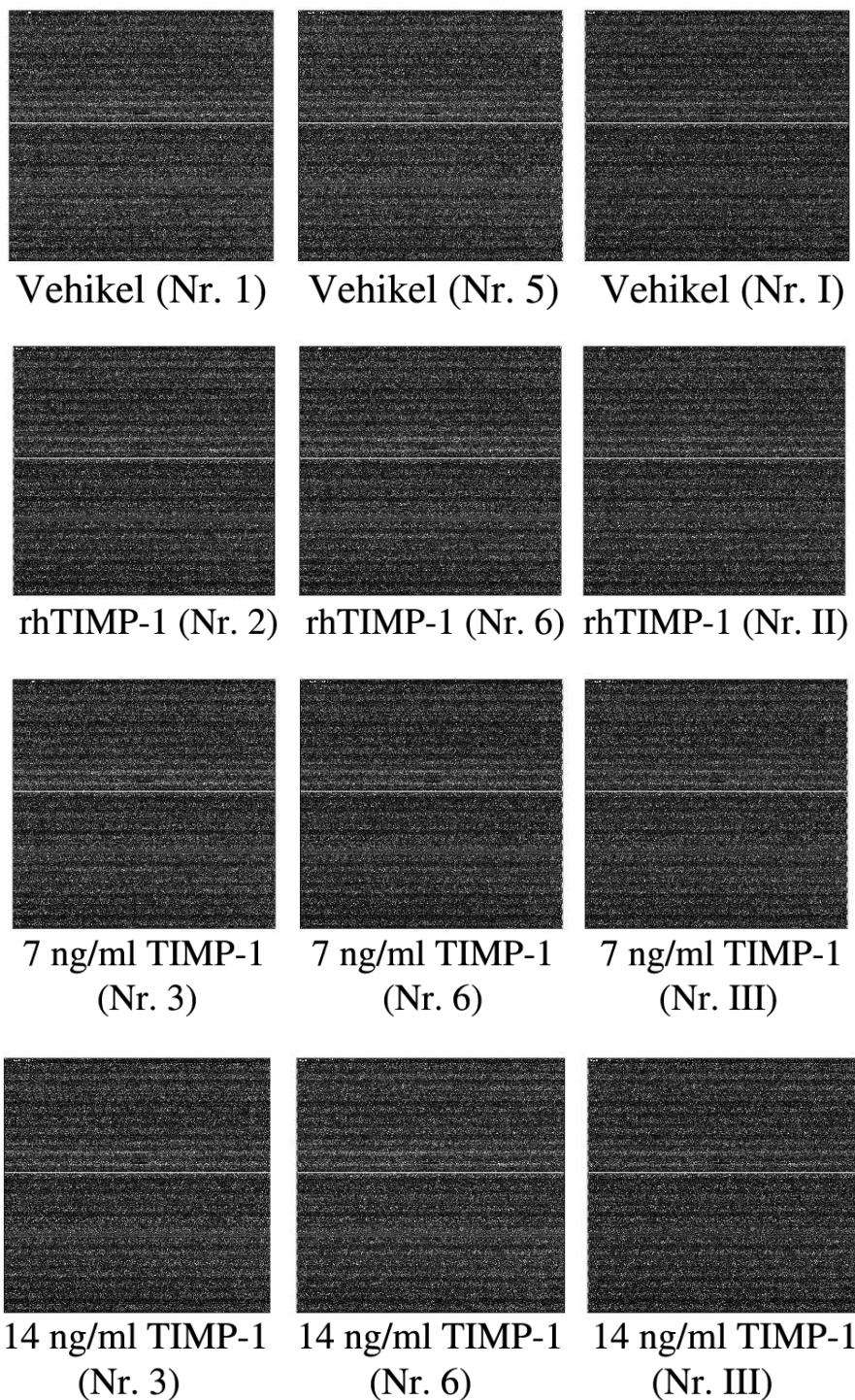


Abb. 13: Alle .CEL-Daten wiesen ein homogenes Bildmuster auf. Microarrays guter Qualität weisen keine Bildartefakte wie Schlieren und Flecken auf wie auch alle im Versuch verwendeten Microarrays. Sie konnten somit für weitere Analysen eingeschlossen werden.

Nachdem überprüft wurde, dass die Microarray-Rohdaten verwertbar waren, wurden diese mit zwei verschiedenen statistischen Methoden analysiert.

Mit ChipInspector wurden die Daten von Vehikel mit 14 ng/ml rhTIMP-1, 7 ng/ml und 14 ng/ml TIMP-1-GPI verglichen sowie 14 ng/ml rhTIMP-1 mit 7 ng/ml und 14 ng/ml TIMP-1-GPI. In der Standardeinstellung lag die positive und negative Fehlerrate bei 0%. Für alle Vergleichsgruppen wurde neben der Standardeinstellung auch die Zahl an signifikanten Proben auf 510, 1000, 2000 und 5000 eingestellt, bei welchen die positive und negative Fehlerrate bei Vergleichsgruppen mit Vehikel unter 1%, bei Vergleichsgruppen mit rhTIMP-1 unter 5% lag. Die Liste mit den signifikanten Transkripten wurde in GePS exportiert.

GePS stufte vor allem Signalwege für Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Entzündung als signifikant reguliert ein. In der Vergleichsgruppe Vehikel gegen 14 ng/ml rhTIMP-1 wurden unter anderem E-Cadherin (p-Wert $1,83E^{-03}$), IL-5 (p-Wert $4,43E^{-04}$) und JAK-STAT (p-Wert $9,27E^{-03}$) Signalwege als signifikant reguliert eingestuft. In allen Vergleichsgruppen mit TIMP-1-GPI wurden unter anderem ID (p-Wert $1,27E^{-05}$), TGF-β (p-Wert $6E^{-03}$), SMAD (p-Wert $1,66E^{-03}$) und Zellzyklus (p-Wert $9,37E^{-04}$) Signalwege als signifikant reguliert eingestuft (Tab. 3).

Die Liste von RMA als signifikant nachgewiesene Transkripte wurde mittels GSEA analysiert. GSEA stufte BMP (p-Wert 0,000), TGF-β (p-Wert 0,000) und ID (p-Wert 0,003), E2F (p-Wert 0,013) und Zellzyklus (p-Wert 0,010) Signalwege als signifikant herunterreguliert ein (Tab. 4).

GePS Analyse von Vehikel vs. 7 ng/ml TIMP-1-GPI		
Kanonischer Signalweg	p-Wert	Gene
ID	3,57E ⁻⁰⁴	ID4, ID2, ID3, RB1, ID1
BMP Rezeptor Signalweg	3,76E ⁻⁰³	SMAD5, PPM1A, SMAD9, SMAD7, BMPR2
Mothers against DPP homolog / SMAD family member 1	2,77E ⁻⁰³	SMAD5, HAS2, TGFBR3, PPM1A, SMAD9, THBS1, ID2, ID3, SMAD7, ID1, ERBB2IP, RXFP1, BMPR2, TWSG1
TGF beta	3,51E ⁻⁰³	ID4, SMAD5, HAS2, TGFBR3, PPM1A, SMAD9, THBS1, MYO10, VCAN, ARL13B, ID2, ID3, FSTL1, SMAD7, ID1, ERBB2IP, SYNJ2BP, BMPR2, GDF15, TWSG1
Zellzyklus	3,34E ⁻⁰⁵	NBN, MOBKL1B, CUX1, CAV2, SAT1, PRKAR1A, ID2, ID3, ATRX, KRT10, ZBTB7A, RB1, ATR, CCNE2, ID1, ZBTB2, MCM10, CDT1, OTX2, FBXO5
GePS Analyse von Vehikel vs. 14 ng/ml TIMP-1-GPI		
Kanonischer Signalweg	p-Wert	Gene
ID	1,27E ⁻⁰⁵	ID4, ID1, TCF3, ID2, ID3, PAX8
Mothers against DPP homolog / SMAD family member 1	1,66E ⁻⁰³	SMAD5, HAS2, SMAD9, THBS1, SFTPB, ID1, ERBB2IP, RXFP1, ID2, ID3, TRIB3, TWSG1
TGF beta	6,00E ⁻⁰³	ID1, ID2, ID4, HAS2, SFTPB, SMAD9, ID3, PAX8
Zellzyklus	9,37E ⁻⁰⁴	NBN, OGT, CCNE2, ID1, PRKAR1A, MCM10, CDT1, TCF3, ID2, FBXO5, SKP2, ID3, CASP7, IREB2
GePS Analyse von 14 ng/ml rhTIMP-1 vs. 14 ng/ml TIMP-1-GPI		
Kanonischer Signalweg	p-Wert	Gene
ID	2,24E ⁻⁰⁴	ID1, ID4, ID2, ID3
Mothers against DPP homolog / SMAD family member 1	5,07E ⁻⁰³	ID1, HAS2, ID2, TGFB2, SMAD6, TRIB3, ID3
TGF beta	2,50E ⁻⁰³	ID1, ID2, ID4, HAS2, SMAD6, ID3, TRIB3
Zellzyklus	4,33E ⁻⁰³	CCNE2, ID1, ID2, ID3
Proliferation	4,61E ⁻⁰³	ID1, ID2, FGFR3, ERBB3, RHOB, CD74
GePS Analyse von Vehikel vs. 14 ng rhTIMP-1		
Kanonischer Signalweg	p-Wert	Gene
Kanonischer NF-kappaB Signalweg	4,63E ⁻⁰³	CYLD, RIPK2, ATM
EGFR1	5,05E ⁻⁰³	MAP3K2, SH3BGRL, APPL1, STAT1, PRKAR1A, CREB1, MAP2K7
Mapkinase Signalweg	7,02E ⁻⁰³	MAP3K2, STAT1, CREB1, MAP2K7
IL-5 Signalweg	9,55E ⁻⁰³	IL5RA, STAT1

Tab. 3: Genomatix Pathway Systems Ergebnisse. Vermindert exprimierte Gene sind fett markiert, vermehrte exprimierte Gene unterstrichen. GePS stufte nach TIMP-1-GPI Behandlung ID-assoziierte Signaltransduktionswege wie ID-, BMP-, TGF-β-, Zellzyklus- und SMAD-Signalwege als signifikant reguliert ein. Nach rhTIMP-1 Behandlung stufte GePS NF-kappaB-, EGFR1-, MAPK- und IL-5-Signalwege als signifikant ein.

GSEA: Herunterreguliert (Vehikel vs. 14 ng/ml TIMP-1-GPI)		
Kanonischer Signalweg (Gen-Set)	Nominale r p-Wert	Gene
BMP Signalweg	0.000	BMPR1A, UBE2D1, SMAD9, NOG, SMAD7, ZFYVE16, SMAD6, SMAD4, ACVR2A, SKI, SMAD5, SMURF2, UBE2D3, SMAD1, ACVR2B, BMP2
TGF beta Signalweg	0.000	ID2, ID4, ID3, ID1, PITX2, BMPR1A, SMAD9, EP300, NOG, SMAD7, ZFYVE16, TGFB2, SMAD6, TGFBR1, ACVR1, ROCK1, IFNG, BMP8B, SMAD4
ID Signalweg	0.003	ID2, ID4, ID3, ID1, TCF12, RB1, MYOG, MYOD1, CCNA2, TCF3
E2F vermittelte Regulierung der DNA Replikation	0,013	FBXO5, CDC25A, MCM8, RB1, PCNA, CDK1, CDC45, CCNB1
G2-M-Checkpoints	0,010	MCM6, MCM10, CHEK1, CDC25A, ATR, MCM8, CDK1, WEE1, CDC45, RFC3, CDC7
GSEA: Hochreguliert (Vehikel vs. 14 ng/ml TIMP-1-GPI)		
Kanonischer Signalweg (Gen-Set)	Nominale r p-Wert	Gene
Cholesterin Biosynthese	0.000	IDI2, CYP51A1, GGPS1, LBR, SC4MOL, SC5DL, HMGCS1, NSDHL, HMGCR, EBP
Zytosolische tRNA Aminoacylation	0.000	AIMP, EEF1E1, LARS, RARS, DARS, KARS, AIMP2, IARS, NARS, TARS, FARSB, HARS
Aminoacyl tRNA Biosynthese	0.000	LARS2, MARS2, YARS2, AARS2, MTFMT, LARS, PSTK, RARS2, IARS2, TARSL2, RARS, DARS

Tab. 4: Gene Set Enrichement Analysis Ergebnisse. GSEA stufte ID-assoziierte Signaltransduktionswege wie BMP-, TGF- β -, ID-, E2F- und Zellzyklusignalwege als signifikant herunterreguliert und Aminoacylbiosynthese assoziierte Signalwege als hochreguliert ein.

6.8 Quantitative PCR Analyse der ID-Expression bei TIMP-1-GPI Behandlung.

Die quantitative PCR ist ein Verfahren, das indirekt die Regulierung von Genen mittels Konzentrationsbestimmung von mRNA misst. Je höher die mRNA-Konzentration, desto größer die Transkriptionsaktivität des entsprechenden Genabschnitts. Die aus mit Vehikel, 14 ng/ml rhTIMP-1 und 14 ng/ml TIMP-1-GPI behandelten RCC53 gewonnene mRNA wurde wie beschrieben in cDNA umgeschrieben und ihre Konzentration mittels qPCR bestimmt.

Bei der qPCR wird die Konzentration an spezifischen Primern bestimmter Gen-Transkripte mit CT-Werten angegeben. Um diese Werte grafisch darstellen zu

können, wurden die Werte auf der y-Achse in $2^{\Delta CT}$ logarithmisch aufgetragen (Abb. 14). Um die geringen Schwankungen zwischen mehreren Versuchsreihen einzubeziehen, wurde das Experiment dreifach durchgeführt und Mittelwerte gebildet, welche in folgender Tabelle (Tab.5) aufgelistet sind.

	Vehikel	rhTIMP-1	TIMP-1-GPI
hID-1	$9,91E^{-04}$	$2,92E^{-04}$	$8,92E^{-05}$
hID-2	$2,51E^{-03}$	$1,45E^{-03}$	$2,00E^{-04}$
hID-3	$8,64E^{-04}$	$3,77E^{-04}$	$4,20E^{-05}$
hID-4	$1,84E^{-03}$	$9,63E^{-03}$	$1,99E^{-04}$

Tab. 5: Ergebnisse der qPCR Analyse (in $2^{\Delta CT}$ Werten).

Wie auch grafisch dargestellt, war die gemessene cDNA-Konzentration für alle ID-Gene bei TIMP-1-GPI-behandelten Zellen signifikant geringer als bei Vehikel behandelten Zellen (Abb. 14). Die Werte für rhTIMP-1-behandelte Zellen lagen zwischen denen von TIMP-1-GPI und Vehikel.

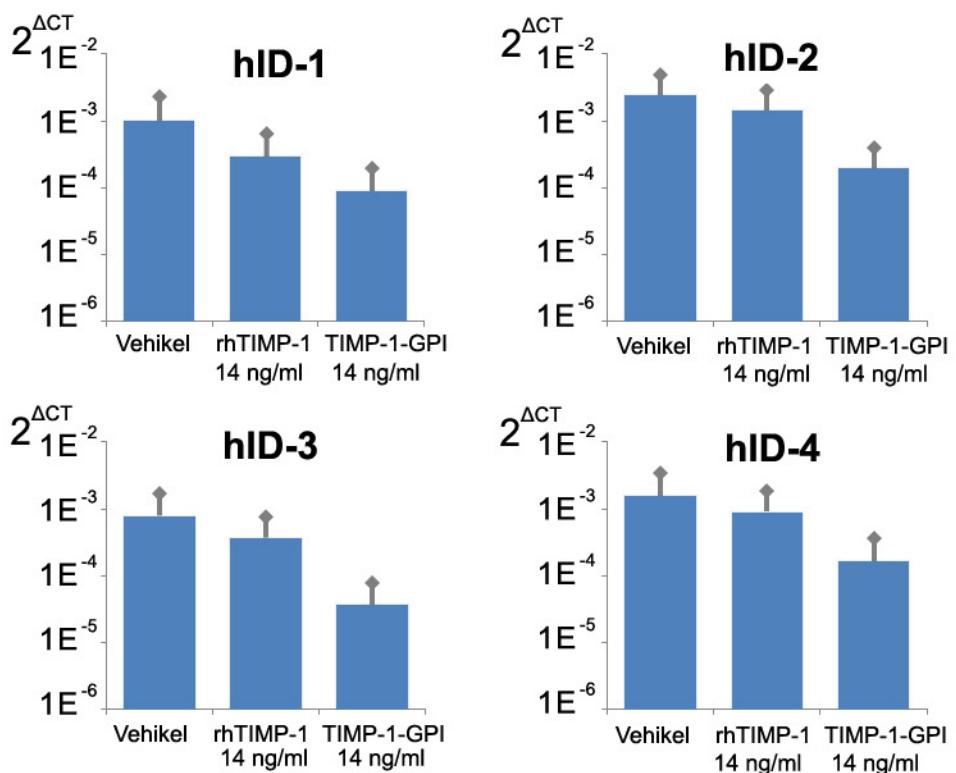


Abb. 14: Quantitative PCR der ID-Proteinfamilie. RCC53-Zellen wurden mit Vehikel, 14 ng/ml rhTIMP-1 und 14 ng/ml TIMP-1-GPI inkubiert und die RNA extrahiert und zu cDNA umgeschrieben. Die gewonnene cDNA wurde mittels qPCR und hID-1, -2, -3 und -4 spezifischen Primern auf die Menge an ID kodierende Sequenzen untersucht. qPCR zeigte hierbei eine signifikante Hemmung der Expression aller Mitglieder der ID Proteinfamilie nach TIMP-1-GPI Behandlung. Auch nach rhTIMP-1 Behandlung kam es zu einer Hemmung der ID Expression, jedoch geringer ausgeprägt als nach TIMP-1-GPI Behandlung.

6.9 Verringerung des Anteils an aktiven TGF-β bei TIMP-1-GPI Behandlung.

Um herauszufinden, ob TIMP-1-GPI Behandlung einen Einfluss auf die TGF-β Aktivierung hatten, wurden vier Behandlungsreihen von RCC53 (Kulturvollmedium, Vehikel, 14 ng/ml rhTIMP-1 und 14 ng/ml TIMP-1-GPI) mittels ELISA nach der Gesamt-TGF-β- und aktiven TGF-β-Konzentration untersucht.

Es zeigte sich, dass bei allen Behandlungsreihen die Gesamt-TGF-β-Konzentration bei etwa 6000 pg/ml lag. Das Verhältnis aktives TGF-β zu Gesamt-TGF-β lag bei unbehandelten, mit Vehikel- und rhTIMP-1-behandelten Zellen etwa um 0,4. Bei TIMP-1-GPI-behandelten Zellen lag dieses Verhältnis bei etwa 0,15. Der Anteil an aktiven TGF-β bei gleich bleibender Gesamt-TGF-β-Konzentration war bei

TIMP-1-GPI-behandelten Zellen also signifikant geringer als bei unbehandelten, mit Vehikel- oder rhTIMP-1-behandelten Zellen (Abb. 15).

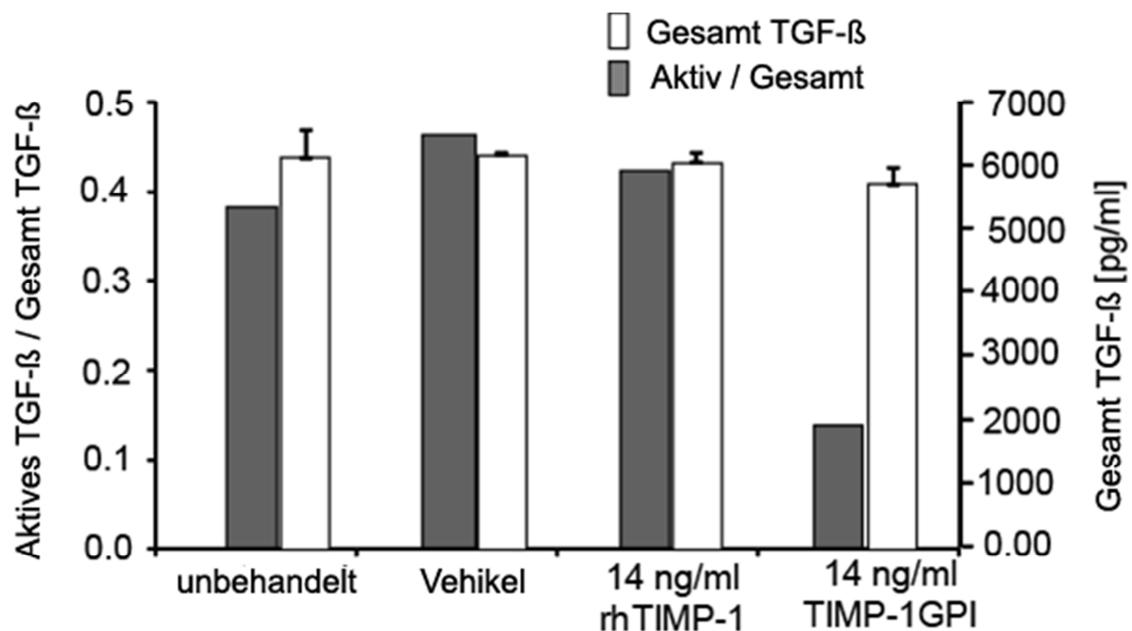


Abb. 15: TGF- β ELISA Ergebnisse. Mit Medium, Vehikel, 14 ng/ml rhTIMP-1 und 14 ng/ml TIMP-1-GPI behandelte RCC53-Zellen wurden mittels ELISA auf die Konzentration an aktivem TGF- β und TGF- β gesamt untersucht. In allen Behandlungsreihen blieb die Konzentration an Gesamt-TGF- β konstant. In unbehandelten, Vehikel und rhTIMP-1-behandelten RCC53-Zellen stellte aktivierte TGF- β den größten Anteil an Gesamt-TGF- β . Nach TIMP-1-GPI-Behandlung kam es zu einer signifikanten Abnahme des Anteils an aktivierte TGF- β [39].

7. Diskussion

Matrix Metalloproteininasen (MMP) spielen eine wichtige Rolle in der Tumorbiologie, nicht nur beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom [15, 16]. Eine erhöhte Expression und Bildung von MMP wurde in mehreren malignen Tumorerkrankungen nachgewiesen und mit schlechter Prognose assoziiert [22, 62-68]. Bestimmte Expressionsmuster von verschiedenen MMP konnten zudem mit dem bevorzugten Ort der Fernmetastasierung assoziiert werden, wie z.B. MMP-1 und Gehirn-Metastasen [69] und Knochenmetastasen [70] bei Brustkrebs oder MMP-13 und Knochenmetastasen beim Nierenzellkarzinom [71].

MMP sind an mehreren Schritten der Tumorprogression beteiligt. Sie prozessieren die Bestandteile der extrazellulären Matrix und ermöglichen so die Bildung eines Mikromilieus, die der Proliferation von Tumorzellen zugutekommt und zur Infiltration des Tumors in das Gewebe führt [15, 22, 72]. MMP werden ebenfalls für die Invasion von Tumorzellen in Blut- und Lymphgefäß verantwortlich gemacht, die zur hämatogenen und lymphogenen Streuung von malignen Zellen führt [15, 73]. MMP sollen auch dafür verantwortlich sein, dass Tumorzellen in bestimmten Organen aus dem Blut- oder Lymphstrom austreten können und so die Entstehung neuer Tumorherde ermöglichen [74, 75]. MMP spielen eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen [15, 26, 72] und in der Neovaskularisierung von Tumoren [15, 20-22].

Aufgrund der Beteiligung von MMP in der Tumorprogression suchte man nach Möglichkeiten MMP in ihrer Funktion zu beeinflussen. Es existieren verschiedene Substanzen, die MMP spezifisch in ihrer Transkription, Translation und Funktion hemmen. Mit Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK)- oder unspezifischen Tyrosin Kinase (TK) Inhibitoren lässt sich die Expression von MMP-Genen hemmen [76-78].

Ein weiterer Ansatz ist die Hemmung der Translation durch spezifische Antisense Oligonukleotide und RNA Ribozyme, sowie die Hemmung der MMP-Funktion durch Peptidomimetika, Nicht-Peptidomimetika, Tetrazyklin-Derivate und Bisphosphonate [76, 79-81]. In klinischen Studien konnten sich pharmakologische MMP-Inhibitoren jedoch nicht durchsetzen, unter anderem wegen nicht möglicher oraler oder intravenöser Applikation, Toxizität oder letztendlich aufgrund von Ineffektivität in Kombination oder im Vergleich zu bereits etablierten Therapieschemata [82].

Ein weiterer Ansatz der spezifischen MMP-Hemmung ist die Beeinflussung des Verhältnisses von MMP zu TIMP. Die physiologischen Inhibitoren von MMP stellen die „Tissue Inhibitor of Metalloproteinases“ (TIMP) dar [17, 24, 30]. Sie hemmen mithilfe der N-terminalen Domäne MMP in einer 1:1 stochiometrischen Bindung. In malignen Tumoren steht das Verhältnis MMP zu TIMP zugunsten von MMP [23, 28, 83].

Die vorsichtige Beeinflussung des MMP/TIMP-Verhältnisses stellt eine besondere Herausforderung dar. Da es sich bei TIMP-1 um ein lösliches Protein handelt, könnte sich eine einfache Zugabe von TIMP als nicht ausreichend kontrollierbar darstellen. TIMP haben mit ihrer C-terminalen Domäne zusätzlich MMP-unabhängige Funktionen, die unter anderem mit Tumorwachstum begünstigenden Effekten assoziiert werden [28, 29]. Es wurden auch erhöhte TIMP-Spiegel bei einigen Tumoren beobachtet [29, 84].

In dieser und in vorausgegangen Arbeiten konstruierte unsere Arbeitsgruppe mit TIMP-1-GPI ein Fusionsprotein, das die biologische Aktivität von TIMP-1 auf die Zelloberfläche konzentriert [31]. Durch die Verankerung mittels GPI-Anker in die Lipid

Rafts der Zelloberfläche ist zudem eine Applikation mit definierten Konzentrationen auf der Zelle möglich.

Mit CHO-Zellen als Expressionsorganismus und mittels FPLC (Fast Protein Liquid Chromatographie) konnten wir 39,12 ng/ml TIMP-1-GPI in hoher Reinheit gewinnen. Dies konnte mittels Western Blot und ELISA nachgewiesen werden. Das gewonnene TIMP-1-GPI ließ sich effektiv in RCC53-Zellen inkorporieren und zeigte im Gegensatz zu Vehikel und rhTIMP-1 behandelten Zellen eine signifikante Prozessierung von MMP an der Zelloberfläche. In Proliferations- und Apoptoseanalysen wie MTT- und Annexin V Assays zeigten sich eine signifikante Hemmung der Proliferationsrate und eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate TIMP-1-GPI-behandelter Zellen. Dies konnte bei Vehikel- und rhTIMP-1-behandelten Zellen nicht nachgewiesen werden. Vorausgegangene Arbeiten zeigten, dass die FAS-induzierte Apoptose in TIMP-1-GPI-behandelten Zellen im Gegensatz zu rhTIMP-1-behandelten Zellen effektiver war [32]. Da diese Effekte nicht mit Protein-Protein-Interaktion alleine begründet werden konnten, wurden in der vorgelegten Arbeit RCC53-Zellen mit Vehikel-, rhTIMP-1- und TIMP-1-GPI-Behandlung mit Microarrays molekularbiologisch untersucht. Tatsächlich fand sich sogar in zwei verschiedenen Analyseansätzen und in der qPCR die signifikante Herunterregulation von „Inhibitor of DNA binding“ (ID) Gene.

ID ist eine Familie von Helix-loop-Helix- (HLH) Transkriptionsfaktoren, welche aus vier Mitgliedern besteht: ID-1, -2, -3 und -4. ID sind inhibitorische Transkriptionsfaktoren und spielen eine wesentliche Rolle in der Regulation von Genen des Zellzyklus, Proliferations- und Apoptose-Signalwegen wie z.B. Retinoblastoma (RB) Gen und andere HLH-Gene [85]. Hochregulation von ID wurde mit gesteigerter

Tumorproliferation und Dedifferenzierung in Zusammenhang gestellt, während Herunterregulation von ID mit Apoptose und Proliferationshemmung von Tumoren verknüpft wurden [86-88].

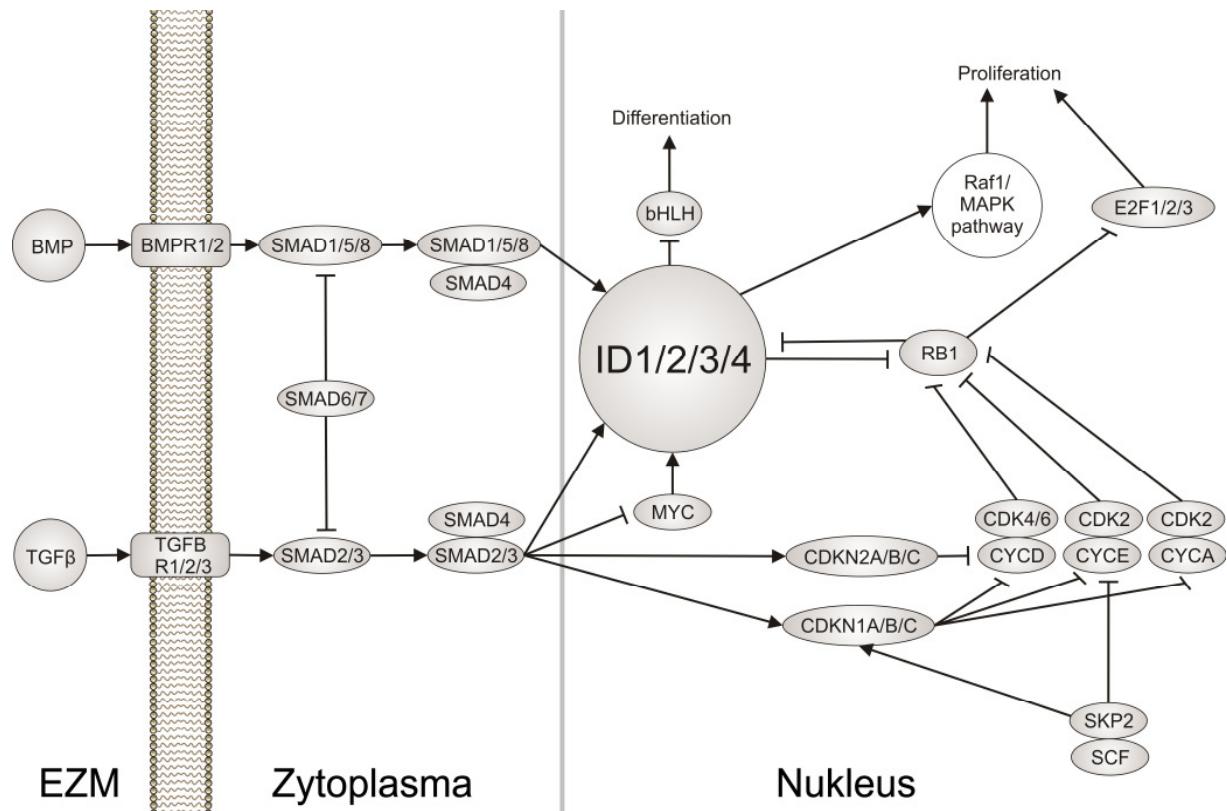


Abb. 16: Übersicht ID-assozierter Signaltransduktionswege. Die in den Microarray Versuchen als signifikant reguliert gewertete ID-, TGF- β -, BMP-, SMAD- und Zellzyklus-Signalwege sind eng miteinander verknüpft. Es kommt unter anderem über ID zu Regulation von Differenzierung und Proliferation. Die ID-Familie selbst wird unter anderem von TGF- β - und BMP-Signalwegen über SMAD reguliert.

Da eine Behandlung mit TIMP-1-GPI zu ähnlichen Effekten führte wie die Herunterregulation von ID, war auch hier ein Zusammenhang wahrscheinlich. TIMP-1-GPI ist ein Membran-gebundenes, extrazelluläres Protein, während ID intranuklear gelegen sind. Ein direkter Effekt von TIMP-1-GPI auf ID-Proteine konnte somit sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden und musste daher über Regulation von Signaltransduktionswegen erfolgen. Ein möglicher Mechanismus ist die Regulierung von ID durch TIMP-1-GPI über den TGF- β -SMAD-

Signaltransduktionsweg (Abb. 16). In Microarray-Versuchen konnten wir tatsächlich Gene, welche mit „Tumor Growth Factor Beta“ (TGF- β) Signaltransduktionswegen assoziiert sind, als signifikant reguliert identifizieren.

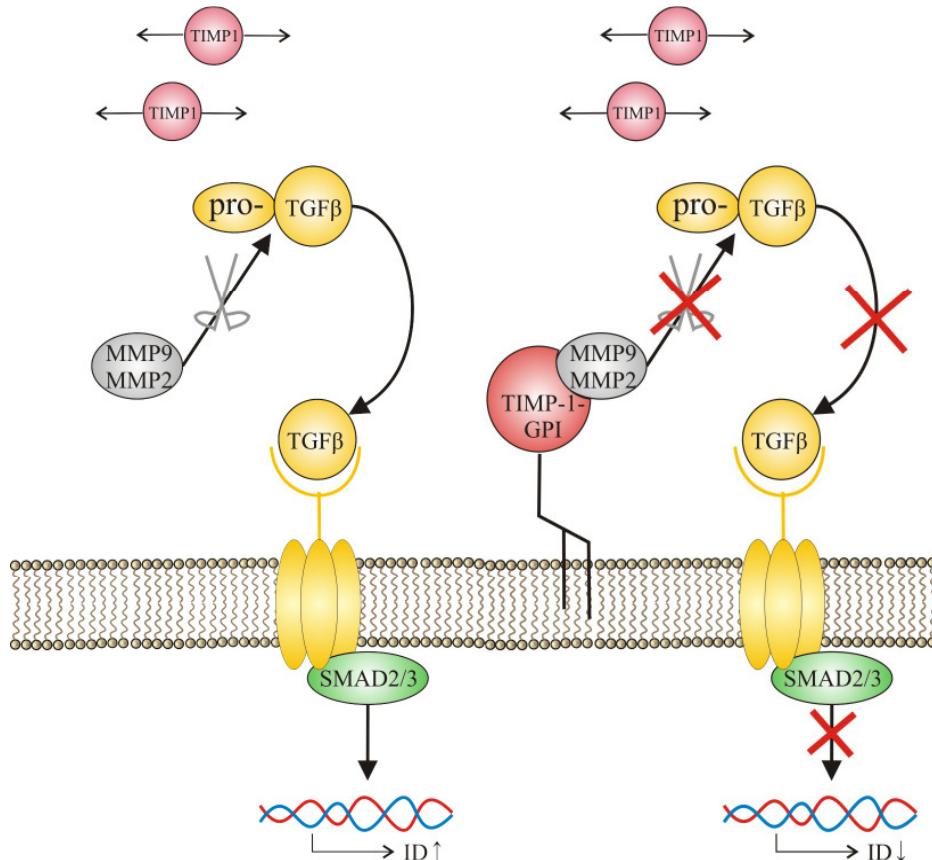


Abb. 17: Mechanismus der Hemmung der TGF- β -Aktivierung durch TIMP-1-GPI. Pro-TGF- β wird physiologisch durch MMP-2 und -9 proteolytisch aktiviert. Aktiviertes TGF- β stimuliert die ID-Expression über SMAD-3. Bei TIMP-1-GPI Behandlung werden MMP-2 und -9 und somit die TGF- β -Aktivierung inhibiert. Die Stimulation der ID-Expression durch SMAD-3 nimmt ab. TIMP-1-GPI steht im Gegensatz zu nativen TIMP-1 in definierten Konzentrationen auf der Zelloberfläche zur Verfügung und könnten vermutlich aufgrund dessen die MMP-2 und -9 Aktivität effektiver regulieren als freies TIMP-1.

Es ist bekannt, dass TGF- β 1 über „Mothers Against DPP Homolog 3“ (SMAD-3) die ID-1-Expression induziert [89]. TGF- β 1 ist ein Protein, welches als inaktive Pro-Form sezerniert wird und durch enzymatische Spaltung in ihre aktive Form gebracht wird. Diese enzymatische Spaltung geschieht durch MMP-2 und -9 [90]. TIMP-1 kann durch 1:1 stochiometrische Bindung die Funktion von MMP-2 und -9 und somit die

TGF- β 1 Aktivierung inhibieren. Bindet weniger TGF- β 1 an die TGF- β -Rezeptoren, wird weniger SMAD-3 freigesetzt und die ID-1-Expression durch diesen fehlenden Reiz gedrosselt [89] (Abb. 17).

Wir konnten beobachten, dass nach rhTIMP-1-Behandlung die ID-Expression in RCC53-Zellen nicht signifikant gehemmt wurde. Nach TIMP-1-GPI jedoch kam es zu einer signifikanten Hemmung der ID-Expression. Demnach hatte TIMP-1-GPI eine höhere Effektivität als rhTIMP-1 in der ID-Regulierung.

Im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. Nicole Rieth [91] wurde die Struktur und Funktionsweise von TIMP-1-GPI näher untersucht, um zu klären, ob die Unterschiede in ihrer biologischen Aktivität zwischen TIMP-1-GPI und rhTIMP-1 durch ihre molekularen Strukturen bedingt sind. Frau Dr. Nicole Rieth stellte TIMP-1-GPI Varianten her, um bestimmte Domänen der Proteinstruktur zu deaktivieren. Die Transfektion von zwei Valin-Resten am N-Terminus von TIMP-1-GPI (VV-TIMP-1-GPI) bewirkte eine Deaktivierung des N-Terminus, wodurch bei VV-TIMP-1-GPI vor allem C-terminale Funktionen im Vordergrund standen. Die Entfernung des C-Terminus von TIMP-1-GPI (N-TIMP-1-GPI) wiederum bewirkte dessen Deaktivierung, womit N-TIMP-1-GPI vor allem N-terminale Funktionen aufwies. Ebenfalls wurden Versuche mit TIMP-1-GPI durchgeführt die enzymatisch am GPI-Anker gespalten wurden und so TIMP-1 freigesetzt und GPI-Anker in der Membran verblieben. Bei 99°C denaturiertes TIMP-1-GPI wurde ebenfalls auf seine Effektivität untersucht. Es zeigte sich, dass VV-TIMP-1-GPI und denaturiertes TIMP-1-GPI die Fähigkeit verloren MMP zu binden und zu prozessieren. Enzymatisch gespaltenes TIMP-1-GPI zeigte in seiner Wirkung keinen signifikanten Unterschied zu rhTIMP-1. Lediglich N-TIMP-1-GPI wies Effekte auf, die TIMP-1-GPI ähnlich waren.

Die Ergebnisse von Dr. Rieth legten daher nahe, dass TIMP-1-GPI vor allem durch die N-terminale Domäne wirkt.

Ebenfalls von näherem Interesse ist die Beantwortung der Frage, wodurch genau die Vorteile von TIMP-1-GPI gegenüber rhTIMP-1 bedingt sind und ob sie womöglich nur durch die Verankerung an die Zelloberfläche verursacht werden. Neben TIMP-1-GPI existiert bereits ein physiologisch an die Zelloberfläche gebundenes Protein der TIMP-Familie: TIMP3. TIMP-3 ist als einziger der vier Familienmitglieder physiologisch über Bindung des N-Terminus an Heparansulfate und Chondroitinsulfate an die Zelloberfläche gebunden [27, 92]. Ein Vergleich mit TIMP-1-GPI könnte sich allerdings als schwierig erweisen, weil TIMP-3 auch sezerniert werden kann und dann fest in der extrazellulären Matrix bindet [92]. Ein Vergleich mit anderen GPI-verankerten TIMP, wie zum Beispiel TIMP-2, könnte hier sinnvoller sein, wobei bedacht werden muss, dass TIMP-2 zum Teil andere sich von TIMP-1 unterscheidende molekularbiologische Eigenschaften aufweist [17].

Da auch rhTIMP-1 über eine N-terminale Domäne verfügt, liegt der Unterschied zwischen TIMP-1-GPI und rhTIMP-1 scheinbar nicht allein in der N-terminalen Funktion. Während rhTIMP-1 sich im Extrazellularraum verteilt, konzentriert sich TIMP-1-GPI an der Zelloberfläche der behandelten Zelle. Im Fall der Hemmung der TGF- β 1-Aktivierung könnte der Vorteil von TIMP-1-GPI gegenüber rhTIMP-1 also auch in seiner räumlichen Verteilung liegen. Pro-TGF- β wird unter anderem von Nierenkarzinomzellen selbst sezerniert und so eine Autostimulation durch die Zelle hervorgerufen [93]. Die oberflächen- und rezeptornahe Spaltung von pro-TGF- β durch MMP-2 und -9 wurde möglicherweise durch das membranständige TIMP-1-GPI

so gehemmt, dass weniger aktives TGF- β 1 die Rezeptoren stimulierte, weniger SMAD-3 intrazellulär freigesetzt wurde und somit die Stimulation der ID-Expression abnahm. Die Abnahme der ID-Expression wiederum könnte zu den beobachteten Effekten wie gehemmte Proliferationsrate und erhöhte Apoptoseneigung führen [86, 87]. rhTIMP-1 das sich als wasserlösliches Protein in der extrazellulären Matrix befindet, konnte wegen der räumlichen Entfernung zur Zelloberfläche die frühe Pro-TGF- β -Aktivierung durch MMP-2 und -9 im Vergleich zu TIMP-1-GPI möglicherweise nicht schnell genug inhibieren, um die Autostimulation der Zelle zu durchbrechen.

Mittels TGF- β -ELISA konnten wir in dieser Arbeit demonstrieren, dass bei gleich bleibender Konzentration von Gesamt-TGF- β der Anteil an pro-TGF- β nach TIMP-1-GPI-Behandlung im Gegensatz zu Behandlung mit Vehikel oder rhTIMP-1 signifikant stieg. Dies wies auf eine effektivere Hemmung der MMP-2 und -9 vermittelten TGF- β 1-Aktivierung hin.

Ein Zusammenhang zwischen TIMP-1-GPI-Behandlung, Hemmung der MMP-2 und -9 vermittelten TGF- β 1-Aktivierung und Herunterregulierung von ID-Genen erschien wahrscheinlich. Um diesen Mechanismus näher zu untersuchen, sind weiterführende Experimente erforderlich, die vor allem auf die SMAD-3 und ID nachgeschaltete Signaltransduktionswege fokussiert sind.

In vorangegangenen Arbeiten wurde die Wirkung von TIMP-1-GPI auch auf andere Zelllinien untersucht, wie Keratinozyten [94], Fibroblasten [44, 94], Malignes Melanomzellen [33], Kolonkarzinomzellen [95] und Mesothelzellen [43]. Djafarzadeh et al. stellten fest, dass TIMP-1-GPI bei Fibroblasten und Mesothelzellen eher einen proliferationssteigernden und migrationsfördernden Effekt hat, welcher im

Gegensatz zu den Effekten auf verschiedene Karzinomzellen stünde [43]. Da TGF- β 1 außer SMAD-3 vermittelter Stimulierung von ID-1-Expression auch in anderen weitgefächerten, nachgeschalteten Signaltransduktionswege eine Rolle spielt [96], könnte der Wirkungsmechanismus von TIMP-1-GPI in Fibroblasten und Mesothelzellen auch in der Regulation von TGF- β 1-assoziierten Signaltransduktionswegen liegen. Eine Hochregulierung von ID-Genen durch TGF- β 1 kann auch nicht ausgeschlossen werden, zumal auch bekannt ist, dass TGF- β 1 über „Aktivierender Transkriptionsfaktor 3“ (ATF-3) die ID-Expression stimulieren kann [97, 98]. Die Wirkung von TIMP-1-GPI auf nicht-klarzellige Nierenzellkarzinome ist bisher nicht bekannt und muss in weiteren Studien untersucht werden.

Der Einsatz von TIMP-1-GPI in der Therapie des Nierenzellkarzinoms könnte beispielsweise bei modernen Nephron-schonenden, operativen Eingriffen eine nützliche Ergänzung darstellen. Eine der schwerwiegenden Komplikationen bei organerhaltenden Nierenteilresektionen stellt die R1-Resektion und verbliebendes Resttumorgewebe dar [99]. TIMP-1-GPI wurde konstruiert, um definierte Konzentrationen auf lokales Gewebe applizieren zu können. Die GPI-Verankerung verhindert die Diffusion von TIMP-1 aus dem zu behandelndem Gewebe. Intraoperative peritumorale Injektion von TIMP-1-GPI als Ergänzung zum operativen Eingriff könnte helfen mögliche mikroskopisches Tumorrestgewebe unter Kontrolle zu halten und möglicherweise aufgrund der erhöhten Apoptose-Empfindlichkeit und –Neigung sogar zu reduzieren, um ein Tumorrezidiv zu verhindern.

TIMP-1-GPI könnte aufgrund seines Wirkmechanismus über den TGF- β -SMAD-3-ID-Signalweg eine supplementäre Rolle in der adjuvanten Therapie mit VEGF-

und mTOR-Inhibitoren [9, 10] spielen. Neben der proliferationshemmenden und pro-apoptotischen Wirkung könnte die Erhöhung der Sensitivität auf FAS-induzierte Apoptose [32] unterstützend zur VEGF- und mTOR-Inhibitor Therapie das Ansprechen des Nierenzellkarzinoms auf Chemotherapie erhöhen.

Da TGF- β auch in der Angiogenese eine wichtige Rolle spielt [90], könnte TIMP-1-GPI einen synergistischen Effekt in der anti-angiogenetischen Therapie haben. Die TIMP-1-GPI-vermittelte Hemmung von MMP-9, das unter anderem in der Freisetzung und Aktivierung von VEGF beteiligt ist [20, 21], könnte dies ebenfalls verstärken. Die anti-angiogenetische Wirkung von TIMP-1-GPI muss allerdings in weiteren Studien noch belegt werden.

Sollte eine Kombination mit TIMP-1-GPI zu einem synergistischen Effekt in der Therapie mit VEGF- und mTOR-Inhibitoren führen, könnte dies in Form einer Dosisreduktion und somit Reduktion toxischer Nebenwirkungen genutzt werden. Therapie-limitierende Nebenwirkungen wie starke Müdigkeit, Leukopenie, Anämie und gastrointestinale Nebenwirkungen könnten reduziert werden [12, 13]. Um die klinische Anwendbarkeit von TIMP-1-GPI in der Therapie vom Nierenzellkarzinom zu prüfen, sind in-vivo Versuche im Tiermodell durchzuführen.

In dieser Arbeit konnte die besondere Biologie von TIMP-1-GPI im Vergleich mit äquivalenten Konzentrationen von rhTIMP-1 demonstriert werden. Die Wirkung von TIMP-1-GPI auf klarzellige Nierenkarzinome können auf die effektivere Blockade der proteolytischen Aktivierung des wichtigen Tumorwachstumsfaktor TGF- β 1 zurückgeführt werden. Aufgrund seiner spezifischen Wirkung zeigt TIMP-1-GPI ein hohes Potential in der Anwendung in der Therapie des Nierenzellkarzinoms.

8. Literatur

1. Lipworth, L., R.E. Tarone, and J.K. McLaughlin, The epidemiology of renal cell carcinoma. *J Urol*, 2006. **176**(6 Pt 1): p. 2353-8.
2. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2012. **62**(1): p. 10-29.
3. Deng, F.M. and J. Melamed, Histologic variants of renal cell carcinoma: does tumor type influence outcome? *Urol Clin North Am*, 2012. **39**(2): p. 119-32, v.
4. Fuhrman, S.A., L.C. Lasky, and C. Limas, Prognostic Significance Of Morphologic Parameters In Renal Cell Carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 1982. **6**(7): p. 655-663.
5. Bianchi, M., et al., A population-based competing-risks analysis of survival after nephrectomy for renal cell carcinoma. *Urol Oncol*, 2014. **32**(1): p. 46 e1-7.
6. Koul, H., et al., Molecular aspects of renal cell carcinoma: a review. *Am J Cancer Res*, 2011. **1**(2): p. 240-254.
7. Chiu, Y. and A.W. Chiu, Renal preservation therapy for renal cell carcinoma. *Int J Surg Oncol*, 2012. **2012**: p. 123596.
8. Escudier, B., et al., How to select amongst available options for the treatment of advanced RCC? *Ann Oncol*, 2012. **23 Suppl 10**: p. x309-x312.
9. Janowitz, T., et al., Adjuvant therapy in renal cell carcinoma-past, present, and future. *Semin Oncol*, 2013. **40**(4): p. 482-91.
10. Conti, A., et al., Progress of Molecular Targeted Therapies for Advanced Renal Cell Carcinoma. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 419176.
11. Iacovelli, R., et al., Targeted therapies and complete responses in first line treatment of metastatic renal cell carcinoma. A meta-analysis of published trials. *Cancer Treat Rev*, 2014. **40**(2): p. 271-5.
12. Alasker, A., et al., A contemporary update on rates and management of toxicities of targeted therapies for metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev*, 2013. **39**(4): p. 388-401.
13. Mulders, P., Vascular endothelial growth factor and mTOR pathways in renal cell carcinoma: differences and synergies of two targeted mechanisms. *BJU Int*, 2009. **104**(11): p. 1585-9.
14. Klatte, T., et al., Surveillance for renal cell carcinoma: why and how? When and how often? *Urol Oncol*, 2008. **26**(5): p. 550-4.

15. Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb, Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 2010. **141**(1): p. 52-67.
16. Roomi, M., et al., Modulation of Human Renal Cell Carcinoma 786-0 MMP-2 and MMP-9 Activity by Inhibitors and Inducers In Vitro. *Medical Oncology*, 2006. **23**(2): p. 245-250.
17. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, 2006. **69**(3): p. 562-73.
18. Sumi, T., et al., Expression of matrix metalloproteinases 7 and 2 in human renal cell carcinoma. *Oncol Rep*, 2003. **10**(3): p. 567-570.
19. Bhavarahamurthy, V., et al., In situ gene expression and localization of metalloproteinases MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, and their inhibitors TIMP1 and TIMP2 in human renal cell carcinoma. *Oncol Rep*, 2006. **15**(5): p. 1379-1384.
20. Zhang, X., et al., Angiogenesis in renal cell carcinoma: Evaluation of microvessel density, vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases. *International Journal of Urology*, 2002. **9**(9): p. 509-514.
21. Hadler-Olsen, E., J.O. Winberg, and L. Uhlin-Hansen, Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. *Tumour Biol*, 2013. **34**(4): p. 2041-51.
22. Roy, R., J. Yang, and M.A. Moses, Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(31): p. 5287-97.
23. Catania, J.M., G. Chen, and A.R. Parrish, Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. **292**(3): p. F905-11.
24. Nagase, H.W., JF;, Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem*, 1999. **274**(21): p. 21491-21494.
25. Van Wart, H.E. and H. Birkedal-Hansen, The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. . *PNAS*, 1990. **87**(14): p. 5578–5582.
26. Khokha, R., A. Murthy, and A. Weiss, Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(9): p. 649-65.

27. Pavloff, N., et al., A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family. *J Biol Chem*, 1992. **267**(24): p. 17321-6.
28. Moore, C.S. and S.J. Crocker, An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology. *Am J Pathol*, 2012. **180**(1): p. 12-6.
29. Stetler-Stevenson, W., Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Cell Signaling: Metalloproteinase-independent Biological Activities. *Sci Signal*, 2008. **1**(27): p. re6 (p1-19).
30. Brew, K., D. Dinakarpandian, and H. Nagase, Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1477**(1-2): p. 267-83.
31. Djafarzadeh, R., et al., Exogenously added GPI-anchored tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) displays enhanced and novel biological activities. *Biol Chem*, 2004. **385**(7): p. 655-63.
32. Djafarzadeh, R., et al., GPI-anchored TIMP-1 treatment renders renal cell carcinoma sensitive to FAS-mediated killing. *Oncogene*, 2006. **25**(10): p. 1496-508.
33. Djafarzadeh, R., et al., TIMP-1-GPI in combination with hyperthermic treatment of melanoma increases sensitivity to FAS-mediated apoptosis. *Cancer Immunol Immunother*, 2009. **58**(3): p. 361-71.
34. Tsai, Y.H., X. Liu, and P.H. Seeberger, Chemical biology of glycosylphosphatidylinositol anchors. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012. **51**(46): p. 11438-56.
35. Collet, G., et al., Trojan horse at cellular level for tumor gene therapies. *Gene*, 2013. **525**(2): p. 208-16.
36. Weidle, U.H., et al., Genetically Engineered Fusion Proteins for Treatment of Cancer. *Cancer Genomics & Proteomics*, 2012. **9**(6): p. 357-372.
37. Beckman, R.A., L.M. Weiner, and H.M. Davis, Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer*, 2007. **109**(2): p. 170-9.
38. Suerth, J.D., A. Schambach, and C. Baum, Genetic modification of lymphocytes by retrovirus-based vectors. *Current opinion in immunology*, 2012. **24**(5): p. 598-608.

39. Weyers, A. and R.J. Linhardt, Neoproteoglycans in tissue engineering. *The FEBS Journal*, 2013. **280**(10): p. 2511-2522.
40. Eisenhaber, B., P. Bork, and F. Eisenhaber, Post-translational GPI lipid anchor modification of proteins in kingdoms of life: analysis of protein sequence data from complete genomes. *Protein Engineering*, 2001. **14**(1): p. 17-25.
41. Notohamiprodjo, S., et al., Cell surface engeneering of renal cell carcinoma with GPI-anchored TIMP-1 blocks TGF- β 1 activation and reduces regulatory ID gene expression. *Biol Chem*, 2012.
42. Rieth, N., Modulation des proteolytischen Mikromilieus von Tumoren mittels GPI-verankerter TIMP-1-Varianten - vom Breitspektrum zum spezifischen Proteaseinhibitor, in Arbeitsgruppe Klinische Biochemie, Klinikum der Universität München2011, Ludwig-Maximilians-University Munich.
43. Djafarzadeh, R., et al., Recombinant GPI-Anchored TIMP-1 Stimulates Growth and Migration of Peritoneal Mesothelial Cells. *PLoS One*, 2012.
44. Djafarzadeh, R., et al., Treatment of Dermal Fibroblasts with GPI-Anchored Human TIMP-1 Protein Moderates Processes Linked to Scar Formation. *J Invest Dermatol*, 2012.
45. Auskaps, A.M. and J.H. Shaw, Vital Staining of Calcifying Bone and Dentin with Trypan Blue. *Journal of Dental Research*, 1955. **34**(3): p. 452-458.
46. Grodzki, A.C. and E. Berenstein, Antibody purification: ion-exchange chromatography. *Methods Mol Biol.*, 2010. **588**: p. 27-32.
47. Mercer, E., et al., Purification of a metalloproteinase inhibitor from human rheumatoid synovial fluid. *Biochem J*, 1985. **231**(3): p. 505-510.
48. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. **227**: p. 680-685.
49. Maizel, J.V., (edit. by Habel, K. and Salzmann, N.P.), Fundamental Techniques of Virology. *Academic Press*, 1969. **32**: p. 460-463.
50. Koopman, G., et al., Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 1994. **84**(5): p. 1415-1420.
51. Vermes, I., et al., A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 1995. **184**(1): p. 39-51.

52. Zembruski, N.C., et al., 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal Biochem*, 2012. **429**(1): p. 79-81.
53. Wadkins, R.M. and T.M. Jovin, Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA. *Biochemistry*, 1991. **30**(39): p. 9469-9478.
54. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
55. Berridge, M.V., P.M. Herst, and A.S. Tan, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*, 2005. **11**: p. 127-152.
56. Berridge, M.V. and A.S. Tan, Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, 1993. **303**(2): p. 474-482.
57. Rienzo, M., et al., Identification of valid reference housekeeping genes for gene expression analysis in tumor neovascularization studies. *Clinical & Translational Oncology*, 2013. **15**(3): p. 211-218.
58. Amen, N., et al., Differentiation of epidermal keratinocytes is dependent on glucosylceramide:ceramide processing. *Hum Mol Genet*, 2013.
59. de Groot, P., Tutorial on the Madmax Affymetrix quality control pipeline. 2006.
60. Subramanian, A., et al., Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(43): p. 15545-50.
61. Huang, H., et al., Key pathways and genes controlling the development and progression of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) based on gene set enrichment analysis. *Int Urol Nephrol*, 2013.
62. Gou, X., et al., Expressions of CD147, MMP-2 and MMP-9 in Laryngeal Carcinoma and its Correlation with Poor Prognosis. *Pathol Oncol Res*, 2013.
63. Fernandez-Garcia, B., et al., Expression and prognostic significance of Fibronectin and Matrix Metalloproteases in breast cancer metastasis. *Histopathology*, 2013.
64. Benson, C.S., et al., Expression of matrix metalloproteinases in human breast cancer tissues. *Dis Markers*, 2013. **34**(6): p. 395-405.

65. Wu, T., et al., Increased MMP-21 expression is associated with poor overall survival of patients with gastric cancer. *Med Oncol*, 2013. **30**(1): p. 323.
66. Ramankulov, A., et al., Plasma matrix metalloproteinase-7 as a metastatic marker and survival predictor in patients with renal cell carcinomas. *Cancer Sci*, 2008. **99**(5): p. 1188-1194.
67. Miyata, Y., et al., Expression of matrix metalloproteinase-7 on cancer cells and tissue endothelial cells in renal cell carcinoma: prognostic implications and clinical significance for invasion and metastasis. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(23): p. 6998-7003.
68. Cho, N.H., et al., Increased expression of matrix metalloproteinase 9 correlates with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Eur Urol*, 2003. **44**(5): p. 560-566.
69. Liu, H., et al., The role of MMP-1 in breast cancer growth and metastasis to the brain in a xenograft model. *BMC Cancer*, 2012. **12**.
70. Casimiro, S., et al., Analysis of a bone metastasis gene expression signature in patients with bone metastasis from solid tumors. *Clin Exp Metastasis*, 2012. **29**(2): p. 155-164.
71. Kominsky, S.L., et al., MMP-13 is over-expressed in renal cell carcinoma bone metastasis and is induced by TGF-beta1. *Clin Exp Metastasis*, 2008. **25**(8): p. 865-70.
72. Joyce, J.A. and J.W. Pollard, Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(4): p. 239-52.
73. Juncker-Jensen, A., et al., Tumor MMP-1 activates endothelial PAR1 to facilitate vascular intravasation and metastatic dissemination. *Cancer Res*, 2013. **73**(14): p. 4196-211.
74. Lee, K.Y., et al., Human brain endothelial cell-derived COX-2 facilitates extravasation of breast cancer cells across the blood-brain barrier. *Anticancer Res*, 2011. **31**(12): p. 4307-4313.
75. Deryugina, E.I. and J.P. Quigley, Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. **25**(1): p. 9-34.
76. Hidalgo, M. and S. Eckhardt, Development of Matrix Metalloproteine Inhibitors in Cancer Therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 2001. **93**(3): p. 178-193.

77. Lee, K.S., J.S. Shin, and K.S. Nam, Starfish polysaccharides downregulate metastatic activity through the MAPK signaling pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Biol Rep*, 2013. **40**(10): p. 5959-5966.
78. Simon, C., H. Goepfert, and D. Boyd, Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced Mr 92,000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion. *Cancer Res*, 1998. **58**: p. 1135-1139.
79. Gu, Y., et al., Inhibition of breast cancer cell extracellular matrix degradative activity by chemically modified tetracyclines. *Ann Med*, 2005. **37**(6): p. 450-60.
80. Parvathy, S.S. and W. Masocha, Matrix metalloproteinase inhibitor COL-3 prevents the development of paclitaxel-induced hyperalgesia in mice. *Med Princ Pract*, 2013. **22**(1): p. 35-41.
81. Li, L. and H. Li, Role of microRNA-mediated MMP regulation in the treatment and diagnosis of malignant tumors. *Cancer Biol Ther*, 2013. **14**(9).
82. Dufour, A. and C.M. Overall, Missing the target: matrix metalloproteinase antitargets in inflammation and cancer. *Trends Pharmacol Sci*, 2013. **34**(4): p. 233-42.
83. Hagemann, T., et al., mRNA expression of matrix metalloproteases and their inhibitors differs in subtypes of renal cell carcinomas. *Eur J Cancer*, 2001. **37**(15): p. 1839-46.
84. Lambert, E., et al., TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004. **49**(3): p. 187-98.
85. Benezra, R., et al., Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. Control of terminal myogenic differentiation. *Ann N Y Acad Sci*, 1990. **599**: p. 1-11.
86. Zebedee, Z. and E. Hara, Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene*, 2001. **20**(58): p. 8317-25.
87. Perk, J., A. Iavarone, and R. Benezra, Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(8): p. 603-14.
88. Kee, B.L., E and ID proteins branch out. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(3): p. 175-84.
89. Liang, Y.Y., F.C. Brunicardi, and X. Lin, Smad3 mediates immediate early induction of Id1 by TGF-beta. *Cell Res*, 2009. **19**(1): p. 140-8.

90. Yu, Q. and I. Stamenkovic, Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*, 2000. **14**(2): p. 163-76.
91. Rieth, N., Modulation des proteolytischen Mikromilieus von Tumoren mittels GPI-verankerter TIMP-1-Varianten: vom Breitspektrum zum spezifischen Proteaseinhibitor. *Dissertation, LMU München: Fakultät für Biologie* 2011.
92. Murphy, G., Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biology*, 2011. **12**(11): p. 233.
93. Junker, U., et al., Transforming Growth Factor Beta 1 is significantly elevated in Plasma of Patients suffering from Renal Cell Carcinoma. *Cytokine*, 1996. **8**(10): p. 794-798.
94. Djafarzadeh, R., et al., Cell surface engineering using glycosylphosphatidylinositol anchored tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 stimulates cutaneous wound healing. *Wound Rep Reg*, 2013.
95. Raggi, M.C., et al., Peritumoral administration of GPI-anchored TIMP-1 inhibits colon carcinoma growth in Rag-2 gamma chain-deficient mice. *Biol Chem*, 2009. **390**(9): p. 893-7.
96. Horbelt, D., A. Denkis, and P. Knaus, A portrait of Transforming Growth Factor beta superfamily signalling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012. **44**(3): p. 469-74.
97. Padua, D. and J. Massague, Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res*, 2009. **19**(1): p. 89-102.
98. Kang, Y., C. Chen, and J. Massague, A Self-Enabling TGF β Response Coupled to Stress Signaling: Smad Engages Stress Response Factor ATF3 for Id1 Repression in Epithelial Cells. *Molecular Cell*, 2003. **11**: p. 915-926.
99. Marszalek, M., et al., Positive surgical margins after nephron-sparing surgery. *Eur Urol*, 2012. **61**(4): p. 757-63.

9. Genliste

Abkürzung	Entrez Gene	Name
AARS	16	Alanyl-t-RNA Synthetase
ACVR2A	92	Activin A Receptor Type IIA
ACVR2B	93	Activin A Receptor Type IIB
AIMP	9255	Aminoacyl tRNA Synthase Complex-Interacting Multifunctional Protein 1
APPL1	26060	Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interaction, PH Domain And Leucine Zipper Containing 1
ARL13B	200894	ADP-Ribosylation Factor-like 13B
ATF3	467	Activating Transcription Factor 3
ATM	472	Ataxia Teleangiectasia Mutated
ATR	545	Ataxia Teleangiectasia And Rad3 Related
ATRX	546	Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked
ACVR1	90	Activin A Receptor Type I
BMP2	650	Bone Morphogenetic Protein 2
BMP8B	656	Bone Morphogenetic Protein 8B
BMPR1A	657	Bone Morphogenetic Protein Receptor Type IA
BMPR2	659	Bone Morphogenetic Protein Receptor Type II
CASP7	840	Caspase 7 Apoptosis-related Cysteine Peptidase
CAV2	858	Caveolin 2
CCNA2	890	Cyclin A2
CCNB1	891	Cyclin B1
CCNE2	9134	Cyclin E2
CD74	972	CD74 Molecule, Major Histocompatibility Complex, Class II Invariant Chain
CDC25A	993	Cell Division Cycle 25A
CDC45	8318	Cell Division Cycle 45
CDC7	8317	Cell Division Cycle 7
CDK1	983	Cyclin-dependent Kinase 1

Abkürzung	Entrez Gene	Name
CDT1	81620	Chromatin Licensing And DNA Replication Factor 1
CHEK1	1111	Checkpoint Kinase 1
CREB1	1285	cAMP Responsive Element Binding Protein 1
CUX1	1523	Cut-like Homeobox 1
CYLD	1540	Cylindromatosis (Turban Tumor Syndrome)
CYP51A1	1595	Cytochrome P450, Family 51, Subfamily A, Polypeptide 1
DARS	1615	Aspartyl-tRNA Synthetase
E2F	1869 - 1876, 144455, 79733	E2F Transcription Factor
EBP	10682	Emopamil Binding Protein (Sterol Isomerase)
EEF1E1	9521	Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Epsilon 1
EP300	2033	E1A Binding Protein p300
ERBB2IP	55914	ERBB2 Interacting Protein
FARSB	10056	Phenylalanyl-t-RNA Synthetase Beta Subunit
FBXO5	26271	F-Box Protein 5
FSTL1	11167	Follistatin-like 1
GDF15	9518	Growth Differentiation Factor 15
GGPS1	9453	Geranylgeranyl Diphosphat Synthase 1
HARS	3035	Histidyl-tRNA Synthetase
HAS2	3037	Hyaluronan Synthase 2
HMGCR	3156	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase
HMGCS1	29637	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase 1
IARS	3376	Isoleucyl-tRNA Synthetase
ID1	3397	Inhibitor Of DNA Binding 1, dominant negative Helix-Loop-Helix Protein
ID2	3398	Inhibitor Of DNA Binding 2, dominant negative Helix-Loop-Helix Protein

Abkürzung	Entrez Gene	Name
ID3	3399	Inhibitor Of DNA Binding 3, dominant negative Helix-Loop-Helix Protein
ID4	3400	Inhibitor Of DNA Binding 4, dominant negative Helix-Loop-Helix Protein
IDI2	91734	Isopentenyl-Diphosphate Delta Isomerase 2
IFNG	3458	Interferon Gamma
IL5RA	3568	Interleukin 5 Receptor Alpha
IREB2	3658	Iron-Responsive Element Binding Protein 2
JAK2	3717	Janus Kinase 2
KARS	3735	Lysyl-t-RNA Synthethase
KRT10	3858	Keratin 10
LARS	51520	Leucyl-t-RNA Synthetase
LBR	3930	Lamin B Receptor
LFA-3	965	CD58 Molecule, Lymphocyte Function-associated Antigen 3
MAP2K7	5609	Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 7
MAP3K2	10746	Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 2
MARS	4141	Methionyl-tRNA Synthetase
MCM6	4175	Minichromosome Maintenance Complex Component 6
MCM8	84515	Minichromosome Maintenance Complex Component 8
MCM10	55388	Minichromosome Maintenance Complex Component 10
MMP1	4312	Matrix Metallopeptidase 1 (Interstitial Collagenase)
MMP2	4313	Matrix Metallopeptidase 2 (Gelatinase A)
MMP7	4316	Matrix Metallopeptidase 7 (Matrilysin, Uterine)
MMP9	4318	Matrix Metallopeptidase 9 (Gelatinase B)
MOBKL1B	55233	MOB Kinase Activator 1A
MTFMT	123263	Mitochondrial Methionyl-tRNA Formyltransferase

Abkürzung	Entrez Gene	Name
MYO10	4651	Myosin X
MYOD1	4654	Myogenic Differentiation 1
NARS	4677	Asyparaginyl-t-RNA Synthetase
NBN	4683	Nibrin
NOG	9241	Noggin
NSDHL	50614	NAD(P) Dependent Steroid Dehydrogenase-like
OGT	8473	O-linked N-acetylglucosamine Transferase
OTX2	5015	Orthodenticle Homeobox 2
PAX8	7849	Paired Box 8
PCNA	5111	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PITX2	5308	Paired-like Homeodomain 2
PPM1A	5494	Protein Phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ Dependent, 1A
PRKAR1A	5573	Protein Kinase, cAMP-dependent, Regulatory, Type I, Alpha
PSTK	118672	Phosphoseryl-tRNA Kinase
RARS	5917	Arginyl-tRNA Synthetase
RB1	5925	Retinoblastoma 1
RFC3	5983	Replication Factor C (Activator 1) 3
RHOB	388	RAS Homolog Family Member B
RIPK2	8767	Receptor-Interacting Serine-Threonine Kinase 2
ROCK1	6093	Rho-Associated, Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1
RXFP1	59350	Relaxin/Insulin-like Family Peptide Receptor 1
SAT1	6303	Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase 1
SC4MOL	6307	Methylsterol Monooxygenase 1
SC5DL	6309	Sterol-C5-Desaturase
SFTPB	6439	Surfactant Protein B
SH3BGRL	6451	SH3 Domain Binding Glutamic Acid-Rich Protein Like
SKI	6497	V-SKI Sarcoma Viral Oncogene Homolog

Abkürzung	Entrez Gene	Name
SKP2	6502	S-Phase Kinase-associated Protein 2, E3 Ubiquitin Protein Ligase
SMAD-1	4086	SMAD Family Member 1
SMAD-2	4087	SMAD Family Member 2
SMAD-3	4088	SMAD Family Member 3
SMAD-4	4089	SMAD Family Member 4
SMAD-5	4090	SMAD Family Member 5
SMAD-6	4091	SMAD Family Member 6
SMAD-7	4092	SMAD Family Member 7
SMAD-8	4093	SMAD Family Member 8
SMAD-9	4094	SMAD Family Member 9
SMURF2	64750	SMAD Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 2
STAT1	6772	Signal Transducer And Activator Of Transcription 1
SYNJ2BP	55333	Synaptojanin 2 Binding Protein
TARS	6897	Threonyl-tRNA Synthetase
TARSL2	123283	Threonyl-tRNA Synthetase-like 2
TCF3	6929	Transcription Factor 3
TGFBR1	7046	Transforming Growth Factor, Beta Receptor 1
TGFBR3	7049	Transforming Growth Factor, Beta Receptor III
TGFB2	7042	Transforming Growth Factor Beta 2
THBS1	7057	Thrombospondin 1
TIMP1	7076	TIMP Metallopeptidase Inhibitor 1
TIMP2	7077	TIMP Metallopeptidase Inhibitor 2
TIMP3	7078	TIMP Metallopeptidase Inhibitor 3
TIMP4	7079	TIMP Metallopeptidase Inhibitor 4
TRIB3	57761	Tribbles Homolog 3
TWSG1	57045	Twisted Gastrulation Homolog 1
UBE2D1	7321	Ubiquitin-conjugating Enzyme E2D 1
UBE2D3	7323	Ubiquitin-conjugating Enzyme E2D 3
VCAN	1462	Versican

Abkürzung	Entrez Gene	Name
WEE1	7465	WEE1 Homolog
YARS	8565	Tyrosyl-tRNA Synthetase
ZBTB2	57621	Zinc Finger And BTB Domain Containing 2
ZBTB7A	51341	Zinc Finger And BTB Domain Containing 7A
ZFYVE16	9765	Zinc Finger, FYVE Domain Containing 16

10. Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Ak	Antikörper
AOD	Assay On Demand, fertig gemischte qPCR Sonden und Oligonukleotiden
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CHO Zellen	Chinesische Hamster Ovar Zellen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT Wert	Cycle threshold
DEAE	Diethylaminoethyl
dFBS	dialysiertes fötales bovines Serum
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithioreitol
EcoRI	Escherichia coli Stamm R Nuklease I
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FAM	6-Carboxy-Fluoreszein
FBS	Fötales bovines Serum
FDR	False Discovery Rate, Fehlerrate
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GCOS	Affymetrix GeneChip Operating Software

GePS	Genomatix Pathway System
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HRP	horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
LDS	Lithium dodecyl sulfate
MADMAX	Management and Analysis Database for MicroArray eXperiments
MAS5	Affymetrix Microarray Suite 5.0
MEM	Minimum Essential Medium
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaN3	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NaPi	Natriumphosphat
NEAA	Nicht essenzielle Aminosäuren
NTC	Non Template Control
NuGO	NutritionGenomics Organisation
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pEF	Elongationsfaktor Promotor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative PCR
RCC	Renal Cell Carcinoma (Nierenzellkarzinom)
RLE	Relative Log Expression

RMA	Robust Multichip Average
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
T/E	Trypsin/EDTA
TAMRA	Tetramethyl-Rhodamin
TBS	tert-Butyldimethylsilyl-Derivate
TBST	tert-Butyldimethylsilyl-Derivate mit Tween20
TEMED	Tetramethylethylenediamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSK	Toyo Soda Kogiyu (Produziert von Toyo Soda, der frühere Name des Mutterkonzerns Tosoh in Japan)
UV	Ultraviolett
Xbal	Xanthomonas badrii Nuklease I

11. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

11.1 Abbildungen

Abb. 1: Aufbau von TIMP-1-GPI.....	13
Abb. 2: Beispiele für Microarrays schlechter und guter Qualität.....	46
Abb. 3: Extraktion von TIMP-1-GPI mit DEAE-Säule.....	48
Abb. 4: Extraktion von TIMP-1-GPI mit Desalting-Säule.	49
Abb. 5: Extraktion von TIMP-1-GPI mit Heparin-Säule.....	50
Abb. 6: Extraktion von TIMP-1-GPI mit TSK-Säule.	51
Abb. 7: Inkorporierung von TIMP-1-GPI in RCC53.....	53
Abb. 8: MMP FACS.....	55
Abb. 9: TIMP-1-GPI Zymographie.	57
Abb. 10: MTT Assay nach 24, 48 und 72 h TIMP-1-GPI-Behandlung.	58
Abb. 11: Apoptose FACS mit Annexin V nach TIMP-1-GPI-Behandlung.	59
Abb. 12: Alle verwendeten Microarrays verhielten sich im RLE-Boxplot ähnlich.	61
Abb. 13: Alle .CEL-Daten wiesen ein homogenes Bildmuster auf.	62
Abb. 14: Quantitative PCR der ID-Proteinfamilie.....	67
Abb. 15: TGF- β ELISA Ergebnisse.....	68
Abb. 16: Übersicht ID-assozierter Signaltransduktionswege.	72
Abb. 17: Mechanismus der Hemmung der TGF- β -Aktivierung durch TIMP-1-GPI ...	73

11.2 Tabellen

Tab. 1: Versuchsaufbau der Arbeit	17
Tab. 2: Gewonnene RNA-Konzentrationen der Behandlungsreihen	60
Tab. 3: Genomatix Pathway Systems Ergebnisse.....	64
Tab. 4: Gene Set Enrichement Analysis Ergebnisse.....	65
Tab. 5: Ergebnisse der qPCR Analyse (in $2^{\Delta CT}$ Werten).....	66

12. Anhang

12.1 Originalartikel

Notohamiprodjo S, Djafarzadeh R, Rieth N, Hofstetter M, Jaeckel C, Nelson PJ

Cell surface engineering of renal cell carcinoma with glycosylphosphatidylinositol-anchored TIMP-1 blocks TGF- β 1 activation and reduces regulatory ID gene expression.

Biol Chem. 2012 Dec;393(12):1463-70.

Djafarzadeh R, Notohamiprodjo S, Rieth N, Hofstetter M, Noessner E, Nelson PJ

Treatment of dermal fibroblasts with GPI-anchored human TIMP-1 protein moderates processes linked to scar formation.

J Invest Dermatol. 2013 Mar;133(3):803-11.

doi: 10.1038/jid.2012.375. Epub 2012 Oct 25.

Djafarzadeh R, Sauter M, Notohamiprodjo S, Noessner E, Goyal P, Siess W, Wörnle M, Ribeiro A, Himmlein S, Sitter T, Nelson PJ

Recombinant GPI-anchored TIMP-1 stimulates growth and migration of peritoneal mesothelial cells.

PLoS One. 2012;7(4):e33963.

doi: 10.1371/journal.pone.0033963. Epub 2012 Apr 27.

Djafarzadeh R, Conrad C, Notohamiprodjo S, Hipp S, Niess H, Bruns CJ, Nelson PJ

Cell surface engineering using glycosylphosphatidylinositol anchored tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 stimulates cutaneous wound healing.

Wound Repair and Regeneration, 2014 Jan-Feb;22(1):70-6

doi: 10.1111/wrr.12132.

12.2 Kongressbeiträge

Vortrag

Notohamiprodjo S, Djafarzadeh R, Rieth N, Hofstetter M, Jaeckel C, Nelson PJ

GPI-anchored TIMP-1 leads to decreased expression of inhibitor of DNA binding

29th Winter School Proteinase And Their Inhibitors, Tiers, Italien

29. Februar – 4. März 2012

Short Communication

Susan Notohamiprodjo, Roghieh Djafarzadeh, Nicole Rieth, Monika Hofstetter,
Carsten Jaeckel and Peter J. Nelson^{a,*}

Cell surface engineering of renal cell carcinoma with glycosylphosphatidylinositol-anchored TIMP-1 blocks TGF- β 1 activation and reduces regulatory ID gene expression

Abstract: Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) controls matrix metalloproteinase activity through 1:1 stoichiometric binding. Human TIMP-1 fused to a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (TIMP-1-GPI) shifts the activity of TIMP-1 from the extracellular matrix to the cell surface. TIMP-1-GPI treated renal cell carcinoma cells show increased apoptosis and reduced proliferation. Transcriptomic profiling and regulatory pathway mapping were used to identify the potential mechanisms driving these effects. Significant changes in the DNA binding inhibitors, TGF- β 1/SMAD and BMP pathways resulted from TIMP-1-GPI treatment. These events were linked to reduced TGF- β 1 signaling mediated by inhibition of proteolytic processing of latent TGF- β 1 by TIMP-1-GPI.

Keywords: DNA array; matrix metalloproteinases; pathway mapping; renal cell carcinoma; TGF- β 1 proliferation; tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1).

^aDedicated to Prof. Marianne Jochum, a great mentor and colleague at the University of Munich.

*Corresponding author: Peter J. Nelson, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Campus Innenstadt, Universität München, Arbeitsgruppe Klinische Biochemie, Schillerstrasse 42, D-80336, München, Deutschland, e-mail: peter.nelson@med.uni-muenchen.de

Susan Notohamiprodjo: Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Campus Innenstadt, Universität München, Arbeitsgruppe Klinische Biochemie, Schillerstrasse 42, D-80336, München, Deutschland

Roghieh Djafarzadeh: Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Campus Innenstadt, Universität München, Arbeitsgruppe Klinische Biochemie, Schillerstrasse 42, D-80336, München, Deutschland

Nicole Rieth: Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Campus Innenstadt, Universität München, Arbeitsgruppe Klinische Biochemie, Schillerstrasse 42, D-80336, München, Deutschland

Monika Hofstetter: Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Campus Innenstadt, Universität München, Arbeitsgruppe Klinische Biochemie, Schillerstrasse 42, D-80336, München, Deutschland

Carsten Jaeckel: Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Campus Innenstadt, Universität München, Arbeitsgruppe Klinische Biochemie, Schillerstrasse 42, D-80336, München, Deutschland

Renal cell carcinoma (RCC) represents approximately 2% of all malignancies (Lipworth et al., 2006; Siegel et al., 2011). Prognosis is generally poor as the tumor is usually in late stage, with infiltration of surrounding tissue and dissemination of metastasis when symptoms occur (Koul et al., 2011; Siegel et al., 2011). Patients with RCC are generally treated with surgery, as these tumors are largely resistant to radiochemotherapy.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc-dependent endopeptidases that degrade the extracellular matrix (ECM) and play important roles in tumor progression and metastasis (Kessenbrock et al., 2010). Levels of MMP-1, -2, -3, -9, -14, -15 and -16 are elevated in RCC, which is thought to promote a more optimal microenvironment for tumor growth and the spread of metastasis (Catania et al., 2007).

Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) are soluble proteins of the ECM that act as endogenous inhibitors of MMPs. TIMPs suppress MMP proteinase function in a 1:1 stoichiometric binding. The TIMP-family contains four members: TIMP-1, -2, -3 and -4. In RCC, the ratio of MMPs to TIMPs is increased in favor of MMPs (Hagemann et al., 2001; Catania et al., 2007; Moore and Crocker, 2012). TIMP-1 can have diverse effects on tumor growth, including MMP-dependent growth-promoting and MMP independent effects. The MMP-dependent activities are mediated through the N-terminal protein domain, which directly blocks MMP activity; while the MMP-independent activities are thought to be mediated through the C-terminal hemopexin-binding domain (Stetler-Stevenson, 2008; Moore and Crocker, 2012). The net effects of TIMP-1 on

Recombinant GPI-Anchored TIMP-1 Stimulates Growth and Migration of Peritoneal Mesothelial Cells

Roghieh Djafarzadeh¹*, Matthias Sauter²*, Susan Notohamiprodjo¹, Elfriede Noessner³, Pankaj Goyal⁴, Wolfgang Siess⁴, Markus Wörnle², Andrea Ribeiro², Susanne Himmlein², Thomas Sitter^{2†}, Peter J. Nelson^{1*}

1 Arbeitsgruppe Klinische Biochemie, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Universität München, Munich, Germany, **2** Nephrologie, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Universität München, Munich, Germany, **3** Institute of Molecular Immunology, Helmholtz Zentrum München, Munich, Germany, **4** Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Klinikum der LMU, München, Germany

Abstract

Background: Mesothelial cells are critical in the pathogenesis of post-surgical intraabdominal adhesions as well as in the deterioration of the peritoneal membrane associated with long-term peritoneal dialysis. Mesothelial denudation is a pathophysiologically important finding in these processes. Matrix metalloproteinase (MMP) biology underlies aspects of mesothelial homeostasis as well as wound repair. The endogenous tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) moderate MMP activity.

Methods and Finding: By modifying human TIMP-1 through the addition of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor, a recombinant protein was generated that efficiently focuses TIMP-1 on the cell surface. Treatment of primary mesothelial cells with TIMP-1-GPI facilitates their mobilization and migration leading to a dramatic increase in the rate of wound experimental closure. Mesothelial cells treated with TIMP-1-GPI showed a dose dependent increase in cell proliferation, reduced secretion of MMP-2, MMP-9, TNF- α and urokinase-type plasminogen activator (uPA), but increased tissue plasminogen activator (t-PA). Treatment resulted in reduced expression and processing of latent TGF- β 1.

Conclusions: TIMP-1-GPI stimulated rapid and efficient *in vitro* wound closure. The agent enhanced mesothelial cell proliferation and migration and was bioactive in the nanogram range. The application of TIMP-1-GPI may represent a new approach for limiting or repairing damaged mesothelium.

Citation: Djafarzadeh R, Sauter M, Notohamiprodjo S, Noessner E, Goyal P, et al. (2012) Recombinant GPI-Anchored TIMP-1 Stimulates Growth and Migration of Peritoneal Mesothelial Cells. PLoS ONE 7(4): e33963. doi:10.1371/journal.pone.0033963

Editor: Michael Butterworth, University of Pittsburgh, United States of America

Received October 13, 2011; **Accepted** February 20, 2012; **Published** April 27, 2012

Copyright: © 2012 Djafarzadeh et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft NE 468/2-3 and SFB-TR36 B6 to Dr. Nelson and B1 to Dr. Noessner. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: peter.nelson@med.uni-muenchen.de

† These authors contributed equally to this work.

¶ These authors also contributed equally to this work.

Introduction

The peritoneum is a large serous membrane that covers intraabdominal organs (visceral peritoneum) and lines the peritoneal cavity (parietal peritoneum). The term peritoneal membrane is strongly associated with the application of peritoneal dialysis (PD). The peritoneal membrane consists of an innermost mesothelial cell monolayer, a basement membrane and the submesothelial stroma with extracellular matrix components, connective tissue cellular components and finally vascular and lymphatic structures. This membrane is used during PD as a semipermeable membrane that allows movement of urokinase substances and water in the abdominal cavity permitting the adjustment of electrolytes and acidbase homeostasis. Mesothelial injury by toxic, inflammatory (PD), mechanic or ischaemic (surgery) stimuli can lead to disturbance in the homeostasis of the membrane. The identification of agents that could prevent or

promote membrane repair is an important issue in mesothelial biology.

The MMPs are a large family of structurally related enzymes that collectively degrade extracellular matrix (ECM) [1]. The balance between MMPs and their endogenous inhibitors, the TIMPs, help to regulate ECM turnover during normal tissue homeostasis and pathogenesis. These proteins can also play key roles in moderating cell signaling through the cleavage of precursor proteins or proteolytic modification of cytokines or growth factors [2].

MMP/TIMP biology is important to peritoneal mesothelial cell homeostasis and repair [3]. Mesothelial cells can directly participate in the extracellular matrix turnover that follows serosal injury via elaboration of MMPs and TIMPs. The state of cellular differentiation appears to have an important influence on MMPs/TIMP expression such that epithelialoid cells often display a more

Treatment of Dermal Fibroblasts with GPI-Anchored Human TIMP-1 Protein Moderates Processes Linked to Scar Formation

Roghieh Djafarzadeh¹, Susan Notohamiprodjo¹, Nicole Rieth¹, Monika Hofstetter¹, Elfriede Noessner² and Peter J. Nelson¹

Tissue inhibitors of metalloproteinases exhibit diverse physiological/biological functions including moderation of the proteolytic processing of growth factors and turnover of extracellular matrix. These various biological activities are linked in part to the stoichiometry of tissue inhibitor of metalloprotein/matrix metalloprotein (TIMP/MMP)/surface protein interactions. TIMP-1, a secreted protein, can be detected on the cell surface only through its interaction with surface-bound proteins. Proteins anchored by glycosylphosphatidylinositol (GPI), when purified and added to cells or tissues, are efficiently incorporated into their surface membranes. A GPI anchor was fused to TIMP-1 to focus defined concentrations of the inhibitory protein independently on the surface of primary dermal fibroblast cells. Exogenously added recombinant TIMP-1-GPI effectively inserted into the cell membrane of fibroblasts blocked the secretion of MMPs and markedly altered the stoichiometry of MMP association with the cell surface. TIMP-1-GPI treatment resulted in inhibition of fibroblast-reduced proliferation, and transiently reduced expression of fibrosis-associated genes. These effects were dose dependent. Treated cells also showed a more proapoptotic phenotype based on apoptotic assays and western blot analysis for apoptosis-associated protein expression. GPI-anchored TIMP-1 may represent a more effective version of the protein for use in therapeutic approaches to help control fibrosis and scar formation.

Journal of Investigative Dermatology advance online publication, 25 October 2012; doi:10.1038/jid.2012.375

INTRODUCTION

During wound healing, fibroblasts regulate the formation and contraction of granulation tissue. They are recruited to the site of the wound where they proliferate and undergo activation to myofibroblasts. During normal wound healing, the myofibroblasts eventually undergo apoptosis. In pathological situations, sustained fibroblast activation and reduced apoptosis can lead to myofibroblast overproliferation, excessive extracellular matrix production (ECM), overcontraction, and eventually hypertrophic or keloid scar formation (Clark, 1993; Schaffer *et al.*, 1997; Fattman, 2008).

In tissue remodeling, the production of ECM is generally counterbalanced by its turnover. The catabolism is mediated by various enzyme families that include the matrix

metalloproteinases (MMPs) (Bonewald, 1999; Crosby and Waters, 2010; Mirastschijski *et al.*, 2010). In humans, there are 23 MMPs subgrouped by their substrate specificity and cellular localization. They include the collagenases, gelatinases, stromelysins, and membrane-type MMPs (Sternlicht and Werb, 2001; Morrison *et al.*, 2009; Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010). The catalytic activity of MMPs is generally low in normal tissue, but are increased during inflammation and wound repair (Overall and Lopez-Otin, 2002). Importantly, these enzymes do more than metabolize ECM. Many membrane-bound cytokines, receptors, and adhesion molecules are also processed, or released from the cell surface, by the action of MMPs. Thus, this enzyme family can be seen as controlling diverse aspects of tissue homeostasis and wound repair, and therefore represents a potential target for therapeutic intervention in some pathologic settings.

Although MMP expression can be controlled transcriptionally by cytokines and growth factors, their catalytic activity is also regulated by four endogenous inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 and TIMP-4) (Brew *et al.*, 2000; Overall and Lopez-Otin, 2002). The balance between MMP/TIMP expression is essential for the regulation of tissue homeostasis and is linked to various pathogenic processes (Brew *et al.*, 2000; Ra and Parks, 2007; Mirastschijski *et al.*, 2010).

¹Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Campus Innenstadt, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany and ²Institute of Molecular Immunology, Helmholtz Zentrum München, Munich, Germany

Correspondence: Peter J. Nelson, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Campus Innenstadt, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, Schillerstrasse 42, Munich 80336, Germany.
E-mail: peter.nelson@med.uni-muenchen.de.

Abbreviations: 7-AAD, 7-aminoactinomycin D; ECM, extracellular matrix production; GPI, glycosylphosphatidylinositol; MMPs, matrix metalloproteinases; PLC, phospholipase C; TIMP, tissue inhibitors of metalloproteinases; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

Received 25 January 2012; revised 26 July 2012; accepted 30 July 2012

Cell surface engineering using glycosylphosphatidylinositol anchored tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 stimulates cutaneous wound healing

 Roghieh Djafarzadeh, PhD¹; Claudio Conrad, MD, PhD²; Susan Notohamiprodjo, MD¹; Stephanie Hipp, ••¹; Hanno Niess, MD³; Christiane J. Bruns, MD, PhD³; Peter J. Nelson, PhD¹

1. Medizinische Klinik und Poliklinik IV,

3. Department of Surgery, University of Munich, Munich, Germany, and

2. Department of Surgery and Harvard Stem Cell Institute, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts

Reprint requests:

Prof. P. J. Nelson, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Campus Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München, Arbeitsgruppe Klinische Biochemie, Schillerstrasse 42, 80336, Munich, Germany.
Tel: +89 218075 845;
Fax: +89 218075 860;
Email:
peter.nelson@med.uni-muenchen.de

 Manuscript received: November 8, 2012
Accepted in final form: October 10, 2013

DOI:10.1111/wrr.12132

ABSTRACT

The balance between matrix metalloproteinases and their endogenous tissue inhibitors (TIMPs) is an important component in effective wound healing. The biologic action of these proteins is linked in part to the stoichiometry of TIMP/matrix metalloproteinases/surface protein interactions. We recently described the effect of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored version of TIMP-1 on dermal fibroblast biology. Here, cell proliferation assays, in vitro wound healing, electrical wound, and impedance measurements were used to characterize effects of TIMP-1-GPI treatment on primary human epidermal keratinocytes. TIMP-1-GPI stimulated keratinocyte proliferation, as well as mobilization and migration. In parallel, it suppressed the migration and matrix secretion of dermal myofibroblasts, and reduced their secretion of active TGF- β 1. Topical application of TIMP-1-GPI in an in vivo excisional wound model increased the rate of wound healing. The agent positively influenced different aspects of wound healing depending on the cell type studied. TIMP-1-GPI counters potential negative effects of over active myofibroblasts and enhances the mobilization and proliferation of keratinocytes essential for effective wound healing. The application of TIMP-1-GPI represents a novel and practical clinical solution for facilitating healing of difficult wounds.

Wound healing is a complex multistep process in which epidermal keratinocytes and fibroblasts play central roles. Reepithelialization of the wound relies on the mobilization and proliferation of keratinocytes. In parallel, fibroblast/myofibroblast activation and proliferation within the wound are required for efficient wound healing. Overactivation of fibroblasts can lead to hypertrophic scar formation especially when keratinocyte-driven wound closure is delayed, or when myofibroblasts do not undergo efficient apoptosis.¹

The matrix metalloproteinase (MMP) family is a large structurally related enzyme family. The actions of MMPs are linked to the processing of a wide range of extracellular proteins including extracellular matrix (ECM), cytokines, and growth factors. In this regard, these enzymes are thought to help control a diverse spectrum of biologic processes. The 24 MMPs found in humans include collagenases, gelatinases, stromelysins, and membrane-type MMPs.² MMP activities are regulated at diverse levels including by proteolytic activation of precursor zymogens, and the presence of four endogenous inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, and TIMP-4).^{3–5} The net balance between MMP/TIMP expression is strongly associated with the turnover of ECM and its remodeling during normal tissue homeostasis and pathogenesis. MMP/TIMP activity also underlies the migratory and remodeling events that drive wound repair. While MMP activity is often elevated in wounds with delayed

or aberrant healing, targeting wound healing with small molecular antagonists has proven problematic in part because of the pleiotropic biology of MMPs and their inhibitors.^{6–8}

We have previously shown that the bioactivity of TIMP-1 can be altered by changing its cellular distribution, specifically by focusing expression directly on to the cell surface.^{9–14} TIMP-1 is normally a secreted protein found within the ECM and only loosely associated with the cell surface through its interaction with other proteins. Modification of human TIMP-1 protein by the addition of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor gives rise to a recombinant reagent that can be transferred from one cell to another through a process called “cell painting” or “cell surface engineering.”¹⁵ Exogenously applied TIMP-1-GPI fusion protein is efficiently incorporated into virtually all cell surface membranes and effectively refocuses the actions of TIMP-1 directly onto the cell surface. This can give rise to enhanced as well as unique biologic effects.

We have recently shown that TIMP-1-GPI can have dramatic effects on the biology of primary human dermal fibroblasts.¹⁰ TIMP-1-GPI treatment was found to moderate processes linked to scar formation including reducing fibroblast/myofibroblast proliferation, ECM production, and enhancing their sensitivity to apoptosis.¹⁰ Here we have expanded on the characterization of effects of TIMP-1-GPI treatment on general aspects of wound healing and further report that treatment with the agent actively promotes the

13. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. Peter Nelson dafür, dass ich dieses Projekt in seinem Labor durchführen durfte und für seine kompetente fachliche wie auch moralische Unterstützung, die intensive Förderung und seine Geduld.

Frau Dr. Roghieh Djafarzadeh möchte ich sehr herzlich danken für die exzellente und liebevolle Betreuung und Unterstützung, nicht nur fachlich sondern auch menschlich, für die gute Organisation und dass ich so viel von ihr lernen durfte.

Vielen Dank an Herrn Prof. Gröne und seine Arbeitsgruppe für die vorbildhafte Zusammenarbeit bei den Microarray Experimenten.

Ein großes Dankeschön gilt auch Herrn Carsten Jäckel für die kompetente und freundliche Unterstützung in der Auswertung der Microarraydaten mit all den verschiedenen Analysetools. Ohne ihn hätte ich den Überblick über die schiere Menge an Ergebnissen verloren.

Mein lieber Dank geht auch an Frau Monika Hofstetter, meine persönliche Herrin der Proteine, für ihre sehr gute und fleißige Arbeit in der Produktion von TIMP-1-GPI und auch für das geniale Versteck für die Microarrays, das so gut war, dass wir es selbst fast nicht mehr wiedergefunden haben.

Ich bedanke mich auch sehr bei Frau Sylke Rohrer, Frau Alexandra Wechselberger und Frau Anke Fischer für die wertvolle und tatkräftige Unterstützung in der Laborarbeit. Danke auch an Frau Dr. Nicole Rieth und Frau Dr. Christine von Törne für die sehr gute fachliche Unterstützung und Beratung.

Ich möchte mich ebenfalls bei Herrn Dr. Bruno Luckow für die interessanten und lehrreichen Gespräche und sein wachsames Auge in der Organisation des Laborkomplexes bedanken.

Herzlichen Dank an meinen Bruder Mike für das Gegenlesen meiner Dissertation.

Meiner Familie gilt auch ein besonderer Dank vom ganzen Herzen für ihre Liebe, den stetigen Rückhalt, die große moralische Unterstützung und Förderung während meiner Arbeit.

Eidesstattliche Versicherung

Notohamiprodjo, Susan

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Selektive Zelloberflächenmodulation von Nierenzellkarzinomen mit
Glykosylinositolphosphatidylinositol-verankertem TIMP-1 hemmt die TGF- β 1 Aktivierung und senkt die
Expression regulatorischer ID Gene**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als
solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle
einzelnen nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

München, 24.02.2014

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand