

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

**Untersuchungen zur Regulation des
Invasionsgens Urokinase-Rezeptor (CD87)
durch den Tumorsuppressor Pdc4
unter gleichzeitiger methodischer
Neuetablierung eines quantitativen CAM-
Assays**

vorgelegt von

Jörg Leupold
aus
Mainz

München, 2004

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Frau PD Dr. Heike Allgayer betreut und von Herrn Prof. Dr. Horst Domdey vertreten.

Ehrenwörtliche Erklärung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet. Die benutzte Literatur sowie sonstige Hilfsmittel sind vollständig angegeben.

München, den 2. Mai 2005

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Regel', is written on a light-colored background.

Promotionsgesuch eingereicht am 10. September 2004

Mitglieder der Prüfungskommission:

1. Gutachter: PD Dr. Heike Allgayer
2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Domdey

Tag der mündlichen Prüfung: 29. April 2005

Mein besonderer Dank gilt...

...meiner Betreuerin **Frau PD Dr. Heike Allgayer**, die mir diese sehr interessante Aufgabe gestellt hat. Sie hatte immer ein offenes Ohr für alle auftretenden Fragen und Probleme und ließ mir gleichzeitig den nötigen Freiraum zur Ausgestaltung des Themas und zur Umsetzung eigener Ideen. Darüber hinaus möchte ich mich bei Ihr auch für die übertragene Verantwortung innerhalb der Arbeitsgruppe und das mir damit erwiesene Vertrauen bedanken.

...**Herrn Prof. Dr. Horst Domdey** für die Bereitschaft, diese Arbeit an der LMU München als Doktorvater zu betreuen.

...**meinen Eltern**, für Ihre Geduld und unermüdliche Unterstützung, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Mein weiterer Dank gilt...

...**Frau Prof. Dr. Nancy H. Colburn** für die Bereitstellung der Pcd4-Antikörper und verschiedener Expressionsplasmide.

...**Frau Prof. Dr. Gunilla Hoyer-Hansen, Herrn PD Dr. Viktor Magdolen** und **Herrn Dr. Andrew Mazar** für die Bereitstellung verschiedener uPAR-Antikörper.

...**Herrn PD Dr. Ernst Lengyel** und **Herrn Prof Dr. Douglas Boyd** für die Überlassung wichtiger uPAR-Promotorkonstrukte und Zelllinien.

...**Herrn Dr. Mike Rothe, Herrn Dr. Rainer Schubbert** und **Frau Prof. Dr. Liliana Ossowski**, deren große Unterstützung maßgeblich zu der Etablierung und Durchführung des CAM-Assays beigetragen hat.

...**Herrn Prof. Dr. Friedrich Schildberg** und **Herrn Prof. Dr. Markus Maria Heiss** für ihre Unterstützung innerhalb und außerhalb der Abteilung.

1	Einleitung	1
1.1	Molekulare Grundlagen des Kolonkarzinoms	1
1.2	Invasion und Metastasierung	3
1.3	Proteasen	5
1.4	Das Plasminogenaktivatorsystem	6
1.5	Der Urokinasetyp-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (uPAR, CD87)	9
1.5.1	Strukturelle und biochemische Eigenschaften des uPAR	9
1.5.2	Interaktion des uPAR mit anderen Proteinen	11
1.5.3	Transkriptionelle Regulation des uPAR-Promoters	14
1.5.4	Biologische und klinische Relevanz des Plasminogenaktivator-Systems	16
1.6	Das Hühnerei-Choreonallantoismembranmodell als <i>in vivo</i> Modell zur Untersuchung der Invasions- und Metastasierungskaskade	18
1.7	Das „programmed cell death 4“ Protein (Pcd4)	20
1.7.1	Strukturelle und biochemische Eigenschaften von Pcd4	20
1.7.2	Expression von Pcd4	21
1.7.3	Pcd4 als möglicher Tumorsuppressor und Regulator der Transkription	22
2	Zielsetzung	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Bezugsquellen	24
3.1.1	Chemikalien	24
3.1.2	Radiochemikalien	25
3.1.3	Plastikwaren und Papier	26
3.1.4	Geräte	26
3.1.5	„Kits“ und Untersuchungssysteme	27
3.1.6	Enzyme	28
3.1.7	Liganden	28
3.2	Medien und Puffer	28
3.2.1	Medien für E.coli Bakterien	28
3.2.2	Zellkulturmedien und Reagenzien	30

3.2.3	Antibiotika	31
3.2.4	Stammlösungen und häufig verwendete Puffer	31
3.3	Bakterienstämme und Zelllinien	35
3.3.1	Bakterienstämme	35
3.3.2	Zelllinien	35
3.3.3	Eier	36
3.4	Antikörper	36
3.5	Plasmide und Oligonukleotide	38
3.5.1	Expressionsplasmide	38
3.5.2	Reporterplasmide	39
3.5.3	Oligonukleotide	41
3.6	Molekularbiologische Methoden	44
3.6.1	Gelelektrophorese von DNA	44
3.6.2	Plasmidpräparation	44
3.6.3	Enzymatische Behandlung von DNA	45
3.6.4	DNA-Transfer in <i>E.coli</i> -Bakterien	46
3.6.5	Präparation von Total-RNA	47
3.6.6	Präparation von mRNA	48
3.6.7	Gelelektrophorese von RNA	48
3.6.8	Transfer von Ribonukleinsäuren auf Nylonmembran (Northern-Blot)	49
3.6.9	Hybridisierung radioaktiv markierter Proben mit RNA	49
3.6.10	Synthese von komplementärer DNA (cDNA)	49
3.6.11	Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR	50
3.7	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	50
3.7.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	50
3.7.2	Transfektion eukaryotischer Zellen	51
3.8	Reportergen-Untersuchungen	52
3.8.1	CAT Assay	52
3.8.2	Luciferase Assay	53
3.9	Proteinanalytische Methoden	53
3.9.1	Triton X-100 Lyse von Zellen	53
3.9.2	Proteinbestimmung	54
3.9.3	Immunpräzipitation von Proteinen	54
3.9.4	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran (Western-Blot)	54

3.9.5	Immunoblot-Analyse	55
3.9.6	Analyse von Oberflächenproteinen mittels Durchflusszyometrie (FACS)	55
3.9.7	Analyse von Oberflächenproteinen mittels Immunzytochemie	56
3.9.8	Elektromobility Shift Assay (EMSA)	57
3.10	Zellbiochemische und biologische Untersuchungen	58
3.10.1	Luminometrische Bestimmung von lebenden Zellen	58
3.10.2	Expression von Proteinen unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-regulierten Promotors	58
3.10.3	Invasions-Assays	58
3.11	Quantifizierung und statistische Auswertung	62
4	<u>Ergebnisse</u>	64
4.1	Regulation des Invasionsgens uPAR durch den Tumorsuppressor Pcdcd4	64
4.1.1	Reziproke Expression von Pcdcd4 und uPAR in gastrointestinalen Zelllinien	64
4.1.2	Pcdcd4 vermindert die mRNA- und Proteinmenge von uPAR auf der Zelloberfläche der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116	66
4.1.3	Pcdcd4 inhibiert den Promotor des <i>uPAR</i> -Gens in der Kolonkarzinomzelllinie RKO	70
4.1.4	Einfluss von Pcdcd4 auf verschiedene <i>cis</i> -Elemente des uPAR-Promotors	75
4.1.5	Beteiligung von Transkriptionsfaktoren der Sp- und GATA-Familien an der Pcdcd4 vermittelten uPAR-Promotor Suppression	79
4.1.6	Pcdcd4 hemmt die Invasivität der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 im Intravasationsassay (CAM-Assay)	82
4.2	Methodische Etablierung eines quantitativen CAM-Assay mittels Real-Time-PCR	85
4.2.1	Methodische Etablierung des CAM-Assay und Auswertung mit Endpunkt-PCR	85
4.2.2	Etablierung der quantitativen Auswertung des CAM-Assay mittels Real-Time-PCR unter Verwendung von TaqMan®-Proben	90
5	<u>Diskussion</u>	99
5.1	Regulation des Invasionsgens uPAR durch den Tumorsuppressor Pcdcd4	99

Inhaltsverzeichnis	IV
5.1.1 Reziproke Regulation von uPAR und Pdcd4	100
5.1.2 Die Suppression der uPAR-Expression auf transkriptioneller Ebene durch Pdcd4	101
5.1.3 Hemmung der Invasivität durch Pdcd4	109
5.2 Neuetablierung eines quantitativen Choreonallantoismembran (CAM)-Assay	110
5.2.1 Nachweis humaner genomischer DNA im CAM-Assay mittels Alu-Sequenz-PCR und radioaktiver Markierung der Fragmente	111
5.2.2 Etablierung des quantitativen Nachweises humaner Zellen im CAM-Assay	112
6 Zusammenfassung	115
7 Abkürzungen	117
8 Literaturverzeichnis	121

1 Einleitung

1.1 Molekulare Grundlagen des Kolonkarzinoms

Das kolorektale Karzinom ist nach dem Bronchialkarzinom die zweithäufigste durch Krebs bedingte Todesursache in Deutschland. Jährlich erkranken ca. 35 von 100 000 Personen daran. Diese Form des Krebses entsteht im Dickdarm, genauer im Kolon, dem Hauptteil des Dickdarms, oder im Rektum, dem Mast- bzw Enddarm. Mit wachsendem Verständnis über die genetischen Grundlagen hat man verschiedene Gene ausfindig gemacht, die in ihrer veränderten Form für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen verantwortlich sein können (Fearon und Vogelstein 1990). In 50% aller sporadisch auftretenden Fälle der Kolonkarzinome liegt eine Mutation des Protoonkogens *ras* vor. Wildtyp-Ras-Proteine kontrollieren als kleine GTPasen Signaltransduktionswege, die nach Bindung von Liganden an Tyrosinkinaserzeptoren und G-Protein gekoppelten Rezeptoren aktiviert werden (Margolis und Skolnik 1994; Kranenburg und Moolenaar 2001). Sie sind verantwortlich für Vorgänge des Zellwachstums, der Proliferation und Differenzierung. Von den verschiedenen Isoformen, H-Ras, N-Ras und K-Ras ist vor allem K-Ras assoziiert mit der Ausbildung des kolorektalen Karzinoms. Mutationen des *ras*-Gens, die in Tumoren gefunden werden (typischerweise Kodon 12, 13 und 61) vermindern stark die intrinsische Fähigkeit des Proteins, gebundenes GTP zu hydrolysieren und führen zu einer konstitutiv aktiven Signaltransduktion in den entsprechenden Effektorsignalwegen (Forrester, Almoguera et al. 1987; Bos 1988). Daneben konnte für eine weitere Reihe von Protoonkogenen, wie *c-myc* oder *c-erbB2* eine Beteiligung in der Entstehung des kolorektalen Karzinoms nachgewiesen werden (Hamilton 1993; Kapitanovic, Radosevic et al. 1997).

Der Tumorsuppressor APC (Adenomatöse Polyposis Coli) wurde zuerst bei der genetischen Analyse von Patienten mit einer erblichen Form des Kolonkarzinoms, der familiären adenomatöse Polyposis (FAP), identifiziert (Grodin, Thliveris et al. 1991). Es zeigte sich, dass nicht nur Tumore von Patienten mit dem FAP Syndrom, sondern auch bei sporadisch auftretenden Karzinomen beide *APC* Allele inaktiviert sind (Nagase und Nakamura 1993). APC bildet nach Bindung an β -Catenin und Axin

einen Komplex. Es kommt zur Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase 3) und die protosomale Degradierung von β -Catenin wird eingeleitet. Mutiertes APC kann noch an β -Catenin, nicht aber an Axin binden, und ist nicht mehr in der Lage, die Degradierung von β -Catenin zu stimulieren. β -Catenin wird dadurch stabilisiert und bildet im Nukleus der Zelle Komplexe mit den Transkriptionsfaktoren der TCF-Familie (T-Zellen spezifischer Faktor Familie), die eine Rolle bei der Transformation von Zellen spielen (Clements, Lowy et al. 2003).

1990 konnte ein weiteres Tumorsuppressorgen identifiziert werden. Es wurde als *DCC* (Deletiert in Kolorektalem Karzinom) bezeichnet und zeichnet sich durch eine Deletion beider Allele auf dem langen Arm des Chromosoms 18 aus. Diese Deletion konnte in 70% aller kolorektalen Karzinome nachgewiesen werden (Fearon, Cho et al. 1990). Das *DCC* Gen kodiert für ein Protein, das zu der Immunglobulin-Superfamilie zählt und Ähnlichkeit mit N-CAM (Neurales Zelladhäsionsmolekül) besitzt, welches für die Vermittlung von Zell-Zell Kontakten zuständig ist (Hedrick, Cho et al. 1994).

Mutationen des *p53* Gens finden sich bei 75% aller sporadisch auftretenden Kolonkarzinome. Dieser bekannteste Tumorsuppressor wurde 1979 erstmals beschrieben und ist eine der am häufigsten beschriebenen genetischen Abweichungen im Zusammenhang mit Tumorgenese (DeLeo, Jay et al. 1979; Fromentel und Soussi 1992). Er gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, zu denen neben *p53* noch die Proteine *p63* und *p73* gehören. Die endogene Proteinmenge von *p53* in den Zellen wird durch Ubiquitinierung und protosomale Degradierung genau kontrolliert (Scheffner, Huibregtse et al. 1993). Als Reaktion auf zellulären Stress, wie einer Beschädigung der DNA durch UV-Licht oder einer abnormalen Proliferation der Zelle, wird dieser Abbau unterbunden und es kommt zu einer Akkumulation und Aktivierung von *p53*. Durch die damit verbundene Transaktivierung verschiedener Zielgene nimmt *p53* Einfluss auf verschiedene zelluläre Prozesse. Eine Erhöhung der *p53* Proteinmengen kann unter anderem die Expression verschiedener proapoptotischer Proteine verändern und hat Einfluss auf die Expression von Genen, die als negative Regulatoren der Apoptose eine Rolle spielen (Hoffman, Biade et al. 2002; Sax und El-Deiry 2003; Tanikawa, Matsuda et al. 2003). Durch den Einfluss auf Cdk (Zyclin-abhängige Kinase) nimmt *p53* auch Einfluss auf den Zellzyklus nach einer Beschädigung der DNA. Die Aktivierung von

p53 arretiert die betroffene Zelle in der G1 Phase des Zyklus und unterstützt so die notwendige DNA- Reparatur (Kastan, Onyekwere et al. 1991).

Eine weitere erbliche Form des Kolonkarzinoms ist das sogenannte hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC). Etwa 5-10% aller kolorektalen Karzinome basieren auf dieser autosomal-dominant vererbten Tumordisposition. Die Ursache für die in diesen Tumoren gefundene genomische Instabilität liegt in einer Keimbahnmutation von mindestens einem der bekannten DNA-Reparatur MMR-Gene (*mismatch repair*), die für Proteine des DNA-Mismatch-Reparatursystems kodieren. Dieses System identifiziert und beseitigt Basenfehlpaarungen im DNA-Doppelstrang. Als Folge dieses Syndroms werden abweichende Sequenzen in den sogenannten Mikrosatelliten erzeugt (Mikrosatelliten-Instabilität, MSI). Diese kurzen hochrepetitiven DNA Sequenzen sind in vielen Kopien über das Genom verteilt. Bisher sind fünf verschiedene solche Gene beim Menschen bekannt, die bei HNPCC mutiert sein können (hMLH1, hMSH2, hMSH3, hPMS1, hPMS2 und hMSH6) (Peltomaki 2003).

1.2 Invasion und Metastasierung

Pathologisch existiert eine genaue Vorstellung, wie sich die einzelnen Schritte von der Entwicklung einer gesunden Zelle über verschiedene noch nicht maligne Stadien bis hin zu einer invasiven Tumorzelle morphologisch darstellen (Foulds 1954). Unter einem Tumor versteht man die gutartige oder bösartige Neubildung von Körpergewebe. Der Unterschied eines benignen Tumors zu einer malignen Neoplasie ist die Fähigkeit der Tumorzellen, die sie umgebende Basalmembran zu durchbrechen und in das umgebende Gewebe einzuwandern (Invasion). Gelangen solche invasiven Tumorzellen in Lymph- und/oder Blutgefäße, können sie auch an eine entfernte Stelle des Körpers gelangen, aus dem Gefäß wieder austreten und im dortigen Gewebe Metastasen ausbilden. Invasion und Metastasierung sind somit die entscheidenden Kriterien, in denen sich ein maligner von einem benignen Tumor unterscheidet. Gleichzeitig sind diese beiden Merkmale maligner Tumore die Hauptgründe für den Misserfolg einer Therapie nach der Diagnose und Resektion des primären Tumors. Metastasierte Tumorzellen können selbst nach der Entfernung

des primären Tumors in einem Ruhestadium im Körper persistieren („dormancy“), nach Jahren wieder aktiviert werden und zu neuen Metastasen heranwachsen (Zajicek 1987; Meltzer 1990). Genetische und biochemische Arbeiten belegen, dass es sich bei der Entwicklung eines Tumors um einen mehrstufigen Prozess handelt. Die zugrunde liegenden Ursachen umfassen eine Vielzahl von angeborenen oder im Laufe des Lebens erworbenen endogen oder exogen verursachten Veränderungen einer Zelle, die neben- oder nacheinander auftreten können (Fearon und Vogelstein 1990; Renan 1993). Maligne Tumore zeichnen sich durch folgende Eigenschaften aus: Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegen Wachstumsinhibitoren, das Umgehen von Apoptose, unbegrenzte Fähigkeit zur Replikation, Induktion von Angiogenese und die Fähigkeit zur Invasion/Metastasierung (Hanahan und Weinberg 2000).

Die eigentliche Metastasierung stellt komplexe Anforderungen an maligne Zellen. Das Wachstum von Metastasen ist das Resultat einer zeitlich und räumlich genau koordinierten Metastasierungskaskade. Nur ein geringer Anteil der vom Tumor gestreuten Zellen ist jedoch in der Lage, erfolgreich Metastasen etablieren zu können (Blood und Zetter 1990; Liotta, Steeg et al. 1991). Metastasierung beginnt immer mit einer Veränderung der Zell-Zell-Adhäsion, welche die Voraussetzung für eine Dissoziation der Tumorzellen aus dem primären Tumor ist. Danach erfolgt die lokale Invasion und Migration unter proteolytischer Degradation der Extrazellulären Matrix des umgebenden Gewebes. Nach der Intravasation in die periphere Blutzirkulation müssen die Zellen zunächst der Immunabwehr entkommen, um schließlich an der Gefäßwand anzuhaften, wieder zu invadieren und einen Sekundärtumor zu etablieren. Um letztlich das Wachstum über eine bestimmte Grösse hinaus und eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen zu gewährleisten, kommt es zur Induktion der Neoangiogenese (Jiang, Puntis et al. 1994; Ahmad und Hart 1997). Invasion und Metastasierung werden dabei vor allem durch das Zusammenspiel von verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen und der Aktivität von verschiedenen Proteasesystemen koordiniert. Für die Invasionskapazität der Tumorzellen sind tumorzellspezifisch verstärkte proteolytische Prozesse zur lokalen Auflösung der Basalmembran und der extrazellulären Matrix von entscheidender Bedeutung (Jones und Clerck 1982; Dvorak 1986; Liotta 1986; Duffy 1987).

1.3 Proteasen

Zelladhäsion, Migration und Invasion werden in normalen Körperzellen wie in neoplastisch veränderten Tumorzellen durch ein Zusammenspiel von verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen und der Aktivität von Proteasesystemen koordiniert (Schmitt et al., 1992). Den Zellen steht ein breites Spektrum von intrazellulär, extrazellulär und perizellulär wirksamen Proteasen mit verschiedenen Aktivitäten und Substratspezifitäten zur Verfügung. Die Aktivität dieser Proteasen wird durch ihre Interaktion mit Komponenten der extrazellulären Matrix, verschiedenen spezifischen Inhibitoren und Zelloberflächenrezeptoren lokalisiert und reguliert. Degradierung und Remodulierung der extrazellulären Matrix einschließlich der Basalmembran durch proteolytisch wirksame Enzyme sind Vorgänge, die während den Prozessen der Invasion, Intra- und Extravasation und Metastasierung von Tumorzellen ablaufen (Dvorak 1986). Die Identität der notwendigen proteolytischen Enzyme unterscheidet sich hierbei nicht von der solcher Enzyme, die physiologische Vorgänge wie Wundheilung, Entzündung, Embryogenese oder Angiogenese steuern (Blasi, 1988 und 1993, Dano et al., 1985, Liotta, 1986, Liotta et al., 1992, Markus, 1988). In den letzten Jahren konnte ein enormer Wissenszuwachs bezüglich dieser Enzyme erzielt werden. Vor allem die für die perizellulär ablaufenden Vorgänge verantwortlichen Proteasen wurden dabei zu Objekten intensiver Untersuchungen.

Neben den cytoplasmatischen Proteasen besitzt die Zelle eine Vielzahl auf der Zelloberfläche lokalisierter proteolytisch wirksamer Proteine. Diese Gruppe von Proteasen ist in der Lage, ihre Funktion entweder intrinsisch als membranverankerte Oberflächenmoleküle oder nach Bindung an membranständige Rezeptoren zu vermitteln. Die verschiedenen Familien der Membranproteasen werden anhand ihrer proteolytischen Aktivität, biologischen Funktion und strukturellen Organisation unterschieden. Vertreter der transmembranen Proteasen mit intrinsischer Aktivität sind z. Bsp. Membran Typ-Matrixmetalloproteasen (MT-MMP), membranverankerte Metalloprotease-Disintegrin Proteine (ADAMs), Typ II Transmembrane Serinproteasen wie Corin, Matripase, Enteropeptidase, Hepsin und integrale Serinmembranpeptidasen (SIMP) und Sekretasen (Misumi, Hayashi et al. 1992; Goldstein, Gherzi et al. 1997; Hooper, Karran et al. 1997; Schlöndorff und Blobel

1999; Hooper, Clements et al. 2001; Bode und Maskos 2003). Eine andere Gruppe bilden die proteaseaktivierten Rezeptoren (PARs). Diese werden erst durch Bindung einer Protease als Ligand proteolytisch aktiviert. Sie gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und besitzen vier Mitglieder. Der zuerst identifizierte Thrombinrezeptor PAR-1 wird nach Bindung von Thrombin, PAR-2 durch Trypsin, Trypsinase und Faktor Xa oder VIIa proteolytisch aktiviert. PAR-3 und 4 sind ebenfalls Rezeptoren für Thrombin (Macfarlane, Seatter et al. 2001). Daneben besitzt die Zelle verschiedene Oberflächenproteine, die als Rezeptoren für verschiedene sezernierte Proteasen, wie bestimmte Matrixmetalloproteasen (MMP), Cathepsine oder Serinproteasen dienen.

1.4 Das Plasminogenaktivatorsystem

Eines der wichtigsten Proteasesysteme, das verantwortlich ist für die Degradierung der extrazellulären Matrix, ist das Plasminogenaktivierungssystem. Es besteht aus drei Serinproteasen, die alle als inaktive Vorstufe oder Zymogene von der Zelle gebildet werden. Hierzu gehören die beiden Plasminaktivatoren Urokinase Plasminaktivator (uPA) und Gewebe Plasminaktivator (tPA), die durch spezifische Proteolyse Plasminogen zu Plasmin verdauen und aktivieren. (Wun, Ossowski et al. 1982; Castellino 1984; Vassalli, Dayer et al. 1984). Die drei Proteasekomponenten uPA, tPA und Plasminogen des Systems bestehen aus verschiedenen Domänen und besitzen neben ihrer C-terminalen Proteasedomäne weitere Proteinmodule am N-Terminus (Abb.1).

Der Hauptaktivator von Plasminogen *in vivo* ist tPA, der ungebunden Plasminogen schwach aktiviert und erst nach seiner Bindung an Fibrin seine maximale proteolytische Aktivität entfaltet. Über tPA aktiviertes Plasmin spielt eine entscheidende Rolle in der Fibrinolyse. Es ist verantwortlich für den Abbau von Fibringerinnseln, die entstehen, wenn nach einer Verletzung des Endotheliums die Blutgerinnungskaskade aktiviert wird und schließlich Thrombin das lösliche Fibrinogen zu unlöslichem Fibrin umwandelt. Pro-tPA wird als 70kDa großes Protein von den Zellen sezerniert und durch Plasmin von seiner sogenannten „*single-chain*“ Form (sctPA) durch Verdau an Arg²⁷⁵-Ile zu seiner aktiven „*two-chain*“ Form

umgewandelt. Diese beiden Polypeptidketten bleiben über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Zudem besitzt pro-tPA intrinsische katalytische Aktivität und kann schon als Zymogen in Anwesenheit von Fibrin im gleichen Maße aktiviert werden (Rijken, Hoylaerts et al. 1982; Tate, Higgins et al. 1987). Neben seiner katalytischen Domäne besitzt tPA zwei Kringel-Domänen, eine dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ähnliche Domäne und eine Fibronectin Typ-1 Domäne (Ny, Elgh et al. 1984).

uPA, der ebenfalls Plasminogen effizient in Plasmin umwandelt, ist das zentrale Molekül bei Vorgängen der perizellulären Proteolyse und Geweberemodellierung. Bindung von „*single chain*“ pro-uPA (scuPA) an seinen Rezeptor auf der Zelloberfläche führt zu einer Aktivierung der Protease und zu einer stark gesteigerten Produktion von Plasmin, welches seinerseits an den Rezeptor gebundenes pro-uPA in seine aktive „*two-chain*“ Form (tcuPA) umwandelt (Kasai, Arimura et al. 1985; Kasai, Arimura et al. 1985; Vassalli, Baccino et al. 1985; Ellis, Behrendt et al. 1991). Über uPA/uPAR gebildetes Plasmin kann nun proteolytisch aktiv werden und pro-MMPs aktivieren (Murphy, Stanton et al. 1999). Die beiden Systeme (uPA/uPAR/Plasmin und MMPs) führen zu einer Degradierung von Molekülen der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin, Laminin oder Collagen. Aktives uPA besteht aus zwei über Disulfidbrücken verbundene Polypeptidketten von 18 und 33kDa. Die inaktive Form pro-uPA (*single chain*- uPA, suPA oder *high molekular weight*, HMW-uPA) ist ein 56kDa großes Protein. Es besitzt im Gegensatz zu pro-tPA fast keine intrinsische Aktivität und besteht aus drei Domänen. Neben der Serinproteasedomäne (*low molekular weight*, LMW-uPA, AS 136-411) sind dies eine Kringel-Domäne (AS 47-135) und eine EGF ähnliche Domäne (AS 1-43). Die Kringel- und EGF-Domäne bilden zusammen das sogenannte aminoternale Fragment (ATF) (Appella, Robinson et al. 1987; Blasi, Vassalli et al. 1987).

Die physiologischen Inhibitoren der Proteasen des Plasminogenaktivierungssystems sind alle Mitglieder einer Gruppe von Proteinen, die als Serpine (Serinprotease Inhibitor Superfamilie) bezeichnet werden. Die bekanntesten Vertreter sind die Serpine Plasminogen Aktivator Inhibitoren-1 und -2 (PAI-1 und 2). Serpine inhibieren ihre Substrate mittels eines irreversiblen Suizid-Substratmechanismus. Beide Proteine sind physiologische Inhibitoren von uPA aber auch von tPA und bilden mit ihren Zielproteasen äquimolare Komplexe, wobei PAI-1 alle aktiven Formen (Zweikettenform des uPA sowie Ein- und Zweikettenform des tPA), PAI-2 lediglich

die Zweikettenformen von uPA und t-PA erkennt und inhibiert (Thorsen, Philips et al. 1988). Nach Interaktion der aktiven Protease mit dem reaktiven Zentrum des Serpins wird dessen reaktives Zentrum gespalten. Es entsteht eine kovalente Bindung zwischen der OH-Gruppe des katalytischen Serinrestes der Protease und einer Carboxylgruppe des reaktiven Zentrums des Serpins. Durch ein Umklappen der Molekülstruktur des Serpins kommt es zu einer Verschiebung des gespaltenen reaktiven Zentrums mit der gebundenen Protease. In der Protease selber kommt es dadurch zu massiven Konformationsänderungen, was zu einer Zerstörung ihres katalytischen Zentrums führt und die Freisetzung des Proteins von dem Serpin/Protease-Komplex verhindert (Huntington, Read et al. 2000).

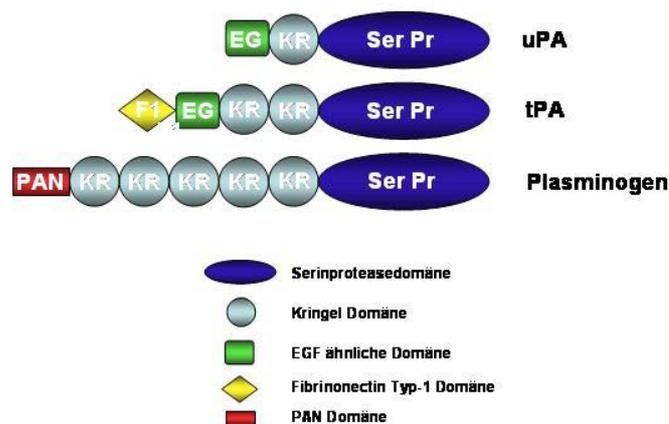


Abb.1: Schematische Darstellung der Domänen der Proteasekomponenten des Plasminogenaktivatorsystems.

1.5 Der Urokinasetyp-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (uPAR, CD87)

1.5.1 Strukturelle und biochemische Eigenschaften des uPAR

uPAR ist ein cysteinreicher, stark glykosylierter Zelloberflächenrezeptor und besteht aus drei strukturell homologen Domänen. Der Rezeptor besitzt keine transmembrane Domäne und wird durch eine Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Einheit in der Zellmembran verankert, die sich am C-terminalen Ende des Moleküls an Domäne III befindet (Ploug, Behrendt et al. 1991; Ploug, Ronne et al. 1991). In Abhängigkeit des Glykosylierungsgrades besitzt der Rezeptor ein heterogenes Molekulargewicht von 45-60 kDa (Behrendt, Ronne et al. 1990; Roldan, Cubellis et al. 1990). Innerhalb des Moleküls befinden sich fünf potentielle N-Glykosylierungsstellen, von denen aber nur vier mit Oligosachariden verknüpft werden. Wird der Rezeptor vollständig deglykosyliert, besitzt er ein Molekulargewicht von 35kDa und verliert die Fähigkeit, uPA zu binden (Estreicher, Wohlwend et al. 1989; Moller, Pollanen et al. 1993; Moller LB 1993; Ploug, Rahbek-Nielsen et al. 1998). uPAR bindet sowohl das enzymatisch inaktive einzelsträngige pro-uPA, als auch das enzymatisch aktive zweikettige HMW-uPA mit großer Affinität (K_d 0,1-1,0nM). uPA bindet dabei an uPAR in Lösung oder auf Zellen über eine genau definierte Aminosäuresequenz (AS 13-31) innerhalb des N-Terminus des Proteins (amino-terminales Fragment, ATF).(Stoppelli, Corti et al. 1985; Blasi 1988). Innerhalb des Rezeptors bindet uPA hauptsächlich an einer Region in Domäne I (AS 50 und 66). Daneben konnte nachgewiesen werden, dass auch die Domänen II und III beteiligt sind. Eine Deletion dieser Domänen senkt die Bindungsaffinität des Rezeptors für uPA um das 100-1000fache (Behrendt, Ploug et al. 1991; Pollanen 1993; Behrendt, Ronne et al. 1996; Riittinen, Limongi et al. 1996; Ploug 1998). Bei der Aktivierung der über uPA gesteuerten Kaskaden spielt die Plasmamembran der Zellen eine entscheidende Rolle.

Dies wurde belegt durch den Nachweis der spezifischen Bindung von uPA an die Zelloberfläche, die Entdeckung des Urokinaserezeptors (uPAR) und der Fähigkeit von Plasminogen, an der Membran zu binden und hier aktiviert zu werden (Vassalli, Baccino et al. 1985; Roldan, Cubellis et al. 1990). In seiner Aktivität wird uPA durch die Bindung an uPAR um ein Vielfaches potenziert (Ellis, Behrendt et al. 1991). Dies bewirkt eine Fokussierung proteolytischer Enzymaktivität und eine Amplifikation der Plasminogenaktivierung im direkten Umfeld der Tumorzelle.

Durch Bindung des spezifischen Inhibitors PAI-1 an den uPA/uPAR Komplex und durch Interaktion des Komplexes mit dem α -2-Makroglobulin-Rezeptor oder *low-density* Lipoproteinrezeptor (LRP,CD91), wird dieser in die Zelle internalisiert, die Liganden lysosomal degradiert und der freie uPAR an die Zelloberfläche rezirkuliert, so dass er für die Bindung eines weiteren uPA Moleküls zur Verfügung steht (Cubellis, Wun et al. 1990; Andreasen, Sottrup-Jensen et al. 1994; Conese, Nykjaer et al. 1995; Nykjaer, Conese et al. 1997). Dies resultiert in einem flexiblen, dynamischen und sehr effizienten proteolytischen System. PAI-2 bindet ebenfalls an rezeptorgebundenen uPA, führt aber nicht zu einer Internalisierung des Komplexes (Ragno, Montuori et al. 1995). Nach Bindung von uPA an seinen Rezeptor ist auch eine von uPA vermittelte proteolytische Abspaltung der Ligandendomäne des Rezeptors nachgewiesen worden. Dies führt zu einer Form des Rezeptors, die nicht mehr in der Lage ist, uPA zu binden (Hoyer-Hansen, Ronne et al. 1992).

Neben der membrangebundenen Form des Rezeptors findet man *in vivo* und *in vitro* auch eine lösliche Form ohne den GPI-Anker (suPAR). (Pedersen, Schmitt et al. 1993; Pyke, Eriksen et al. 1993; Lau und Kim 1994; Mizukami, Faulkner et al. 1995). Es wird vermutet, dass es sich hierbei um durch alternatives Spleißen entstandene Varianten des Rezeptors handelt (Pyke, Eriksen et al. 1993). suPAR kann aber auch durch den Verdau von intaktem membrangebundenen uPAR mit Phospholipase D von der Membran freigesetzt werden (Wilhelm, Wilhelm et al. 1999). Es wird vermutet, dass suPAR mit dem membranverankerten uPA/uPAR Komplex um Rezeptorspezifische Adaptermoleküle kompetitiert (Jo, Thomas et al. 2003). Weitere Daten belegen eine chemokine Funktion von suPAR Fragmenten (Domänen I und II) und deuten auf einen Einfluss auf die Migration von Tumorzellen hin (Resnati, Guttinger et al. 1996; Nguyen, Webb et al. 2000).

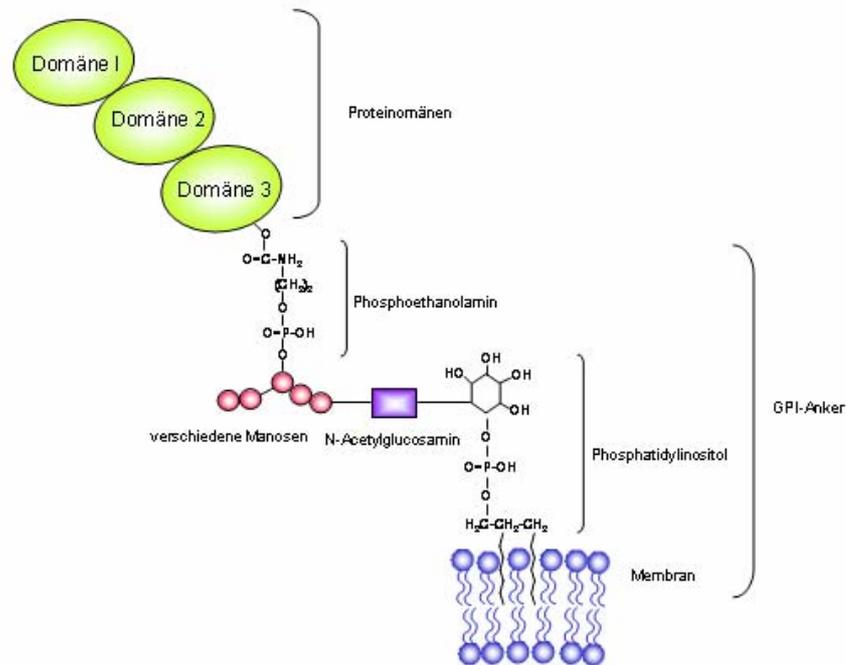


Abb.2: Schematischer Aufbau des uPAR. Dargestellt sind die drei Proteindomänen und der Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anker des Rezeptors.

1.5.2 Interaktion des uPAR mit anderen Proteinen

Der Urokinastyp-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor stellt eine wichtige Verbindung zwischen Adhäsion und Migration von Zellen und der dafür notwendigen perizellulären Proteolyse dar. Neben seinen klassischen Liganden und Inhibitoren wurden verschiedene weitere uPAR-assoziierte Proteine und die dadurch gesteuerten Signalwege beschrieben (Abb.3). In mehreren Studien konnte ein Zusammenhang von uPAR mit verschiedenen Adhäsionsmolekülen nachgewiesen werden.

Es wurde gezeigt, dass uPAR direkt mit Integrinen der β 1-Subfamilie interagiert und die β 1-Integrin vermittelte Zelladhäsion an Fibronectin verhindert (Wei, Lukashev et al. 1996). Daneben ist auch die Assoziation des uPAR mit Mitgliedern der β 2- und 3 Familie belegt worden (Xue, Mizukami et al. 1997). Integrine sind heterodimere Adhäsionsrezeptoren, die sich aus jeweils einer α - und β -Untereinheit zusammensetzen. Sie spielen in einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie Zellmotilität, Inflammation, Geweberemodullierung und Tumorgenese eine Rolle. Andere Studien sprechen zudem eine Beteiligung von Caveolin und uPAR in der durch Integrine vermittelten Adhäsion und beteiligten Signalwegen zu. Sie belegen, dass uPAR mit den von β 1Integrinen und Caveolin gebildeten Komplexen assoziiert und diese zusätzlich stabilisiert (Wei, Yang et al. 1999). Calveoline sind kleine integrale Membranproteine und sind typische Bestandteile der Caveolen der Plasmamembran. Sie sind in der Lage, Cholesterol zu binden und assoziieren mit einer Reihe von Signalmolekülen, wie Kinasen der Src-Familie, heterotrimeren G-Proteinen und H-Ras (Li, Okamoto et al. 1995; Li, Couet et al. 1996).

Neben seinem Liganden uPA bindet uPAR auch Vitronektin, eine Komponente der extrazellulären Matrix (Waltz und Chapman 1994; Wei, Waltz et al. 1994; Kanse, Kost et al. 1996). Die Affinität wird durch Bindung von pro-uPA, uPA, ATF und den uPA/PAI-I Komplex gesteigert. Umgekehrt konkurriert der Inhibitor PAI-1 alleine mit uPAR um die Bindung an Vitronektin. Dies führt dazu, dass im Falle eines Überschusses von uPA im Vergleich zu PAI-1 die Bindung des uPA/uPAR-Komplexes an Vitronektin stark erhöht wird. Gleichzeitig führt aber die durch uPA erhöhte proteolytische Plasminaktivität wieder zu einer verstärkten Ablösung des uPA-Rezeptors von Vitronektin. Liegt dagegen PAI-1 im Überschuss vor, so kommt es aufgrund der Konkurrenz von uPAR und PAI-1 um Vitronektin zu einer Ablösung des uPA-Rezeptors von Vitronektin und damit zu einer stark eingeschränkten uPAR/Vitronectin-vermittelten Adhäsion. Vitronectin bildet zusammen mit Fibronectin den Hauptanteil an Adhäsionsmolekülen in Plasma und Serum. Wie viele andere Adhäsionsmoleküle besitzt Vitronektin eine sogenannte RGB (Arg-Gly-Asp)-Sequenz, über die es mit Integrinen assoziieren kann. Interaktionen mit Komponenten der EZM werden über die Kollagenbindungsdomäne von Vitronektin vermittelt. Über die Bindung von PAI-1 kann matrixgebundenes Vitronektin auch die perizelluläre Proteolyse beeinflussen (Seiffert, Ciambone et al. 1994; Deng, Curriden et al. 1996).

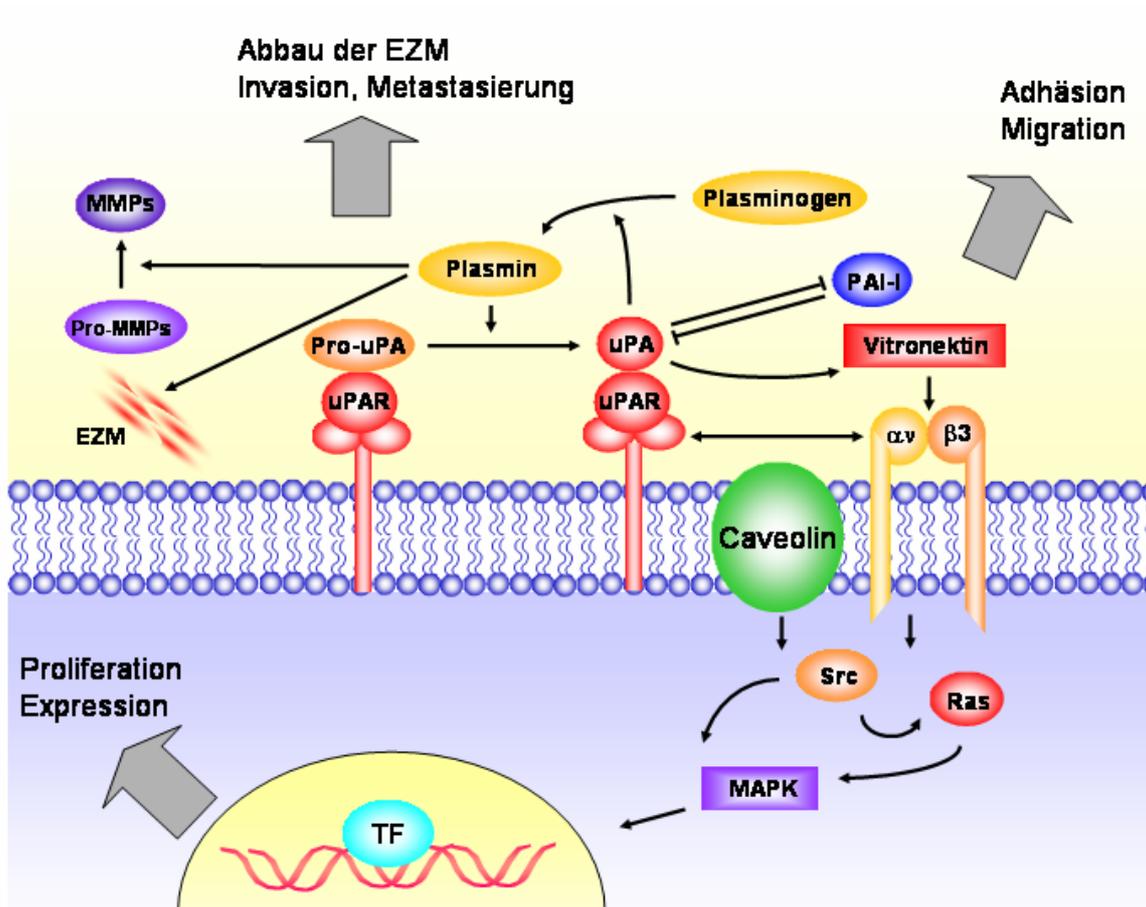


Abb. 3: Interaktion des uPAR mit anderen Proteinen. Dargestellt sind neben seinen klassischen Liganden und Inhibitoren verschiedene weitere uPAR assoziierte Proteine der Zelloberfläche. Die Bindung von pro-uPA an seinen Rezeptor uPAR fokussiert die proteolytische Aktivität der Zelle die Oberberfläche. Durch die Interaktion des Rezeptors mit Integrinen und Caveolin können verschiedene cytoplasmatische Signalwege aktiviert werden. EZM, Extrazelluläre Matrix; MAPK, Mitogen-Aktivierte-Kinasen; MMP, Matrix-Metallo-Proteasen; TF, Transkriptionsfaktoren; ↑, Aktivierung; ⊥, Inhibition.

1.5.3 Transkriptionelle Regulation des uPAR-Promoters

uPAR wird in einer Vielzahl von verschiedenen Geweben und Zelltypen, wie peripheren Monozyten, Granulozyten, Endothelzellen, B-Lymphozyten, aktivierten T-Zellen, Neutrophilen, Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert (Miles und Plow 1987; Nykjaer, Petersen et al. 1990; Pepper, Sappino et al. 1993; Anichini, Fibbi et al. 1994; Nykjaer, Moller et al. 1994; Plesner, Ploug et al. 1994; Gyetko, Sitrin et al. 1995; Limongi, Resnati et al. 1995; Plesner, Behrendt et al. 1997). Zudem lässt sich eine vermehrte Expression des Rezeptors in vielen Tumorgeweben und Tumorzelllinien nachweisen (Stoppelli, Corti et al. 1985; Boyd, Florent et al. 1988; Hollas, Hoosein et al. 1992; Mohanam, Sawaya et al. 1993; Buo, Bjornland et al. 1994; Kramer, Spring et al. 1994; Reinartz, Link et al. 1994; Stahl und Mueller 1994; Liu, Shuman et al. 1995).

In Zelllinien kann die Expression des Rezeptors durch verschiedene Stimuli (PMA, Zytokine, Wachstumsfaktoren) induziert werden. So kann in Zellen die Menge an uPAR mRNA und Expression des Proteins direkt durch die Zugabe von Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) hochreguliert, nach Zugabe von Natriumbutyrat und Amilorid, supprimiert werden (Felez, Miles et al. 1990; Lund, Ronne et al. 1991; Nusrat und Jr. 1991; Langer, Kuo et al. 1993; Plesner, Ploug et al. 1994; Wang, Jones et al. 1994; Dang, Wang et al. 1995). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Regulation der uPAR-Genexpression in der malignen Zelle maßgeblich auf der transkriptionellen Ebene stattfindet (Lund, Ellis et al. 1995; Wagner, Atkinson et al. 1995; Shetty, Kumar et al. 1997).

Die Promotorregion des humanen uPAR Gens besitzt keine TATA-Box und CAAT-Motive, wobei sich die basale Promotorregion in einem 188bp langen Abschnitt (-141 bis +47) vor der Transkriptionsstartseite des uPAR Gens befindet. Hier liegen Sp-1-Consensus-Elemente proximal zum Hauptinitiationspunkt der Transkription, welche für die basale Promoteraktivität verantwortlich sind (Soravia, Grebe et al. 1995). Weitere Untersuchungen konnten in dieser Region Konsensussequenzen für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B an Position -70bp und -49bp identifizieren (Dang, Boyd et al. 1999; Wang, Dang et al. 2000).

Eine weitere Region (-190 bis -171bp) mit einem AP-1 Consensus Motiv an -184bp spielt in der konstitutiven, der PMA-induzierbaren sowie der K-Ras-induzierbaren uPAR Promoterfunktion eine Rolle (Lengyel, Wang et al. 1996). Versuche zur Aufklärung der durch uPAR vermittelten Proteolyse, nach konstitutiver oder durch PMA und Src vermittelter Stimulation, enthüllten eine weitere entscheidende Sequenz des Promoters. Diese befindet sich an Position -152 bis -135bp und bindet die Transkriptionsfaktoren AP-2 (-142/-134bp), Sp-1(-147/-138bp) und Sp-3 (-133/-127). Lediglich die Identität des Proteins, welches mit der AP-2 Bindungsstelle in dieser Region assoziiert, konnte nicht restlos geklärt werden. Man geht jedoch davon aus, dass es sich um ein AP-2 α -ähnliches Protein handelt (Allgayer, Wang et al. 1999). Schließlich zeigten Deletionsstudien des Promoters, dass über ein PEA3/ets Motiv an Position -248bp direkt die Expression des Rezeptors supprimieren kann (Hapke, Gawaz et al. 2001). Integrine der β 3-Familie interagieren somit nicht nur physisch durch direkte Bindung an uPAR, sondern sind auch in der Lage die transkriptionelle Aktivität des uPAR-Promoters zu steuern.

```

-270 GATTGCCCGG GGTCCCACGT T AGGAAGAGA GAGAACTGGG
                                PEA3/ets
-230 ATTTGCACCC AGGCAATCTG GGGACAGAGC TGTGATCACA

-190 ACTCCA GAG TCAGGGCCGA GCCAGCCCCT TCACCACCAG
                                AP-1
-150 CCG GCCGC GC CCGGGAAGG GAAGTTTGTG GCGGAGGAGG
                                Sp-1 SP-3 AP-2 ähnlich
-110 TTCGTAC GGG AGGAG GGGA GGCGCCACG CATCTGGGGC
                                Sp-1 Sp-1
-70 TGACTCGCTC TTTCGCAAAA CGTCT GGGAG GAGTCCCCTGG
                                AP-1 NF $\kappa$ B
-30 GGCCACAAAA CTGCCTCCTT CCTGAGGCCA GAAGGAGAGA
                                L → +1
+11 AGACGTGCAG GGACCCCGCG CACAGGAGCT GCCCTCGCGA

+51 CTGGGTCAC C
                                Startcodon

```

Abb.4: Wichtige Transkriptionsfaktor Bindungsstellen des uPAR Promoters. Dargestellt sind die Konsensussequenzen der wichtigsten Transkriptionsfaktoren unterhalb des Transkriptionsstarts (+1) des uPAR Promoters.

1.5.4 Biologische und klinische Relevanz des Plasminogenaktivator-Systems

Zahlreiche klinische und experimentelle Studien haben gezeigt, dass die Komponenten des Plasminogenaktivator-Systems eine wesentliche Rolle in der Tumorinvasion und Metastasierung spielen. Neben dem Liganden uPA und den physiologischen Inhibitoren PAI-I und II ist vor allem der Rezeptor involviert in der Progression verschiedenener Tumore. Erste Hinweise auf eine solche Beteiligung erbrachten verschiedene Arbeiten, die belegten, dass uPAR in diversen Tumoren epithelialen Ursprungs im Gegensatz zu entsprechenden normalen Zellen überexprimiert wird. Hierzu zählen neben Tumoren des Gastrointestinaltrakts (Magen- und Colonkarzinom) unter anderen Mammakarzinome, Prostata-, Bronchial- und Ovarialkarzinome (Pyke, Kristensen et al. 1991; Jankun, Merrick et al. 1993; Sier, Verspaget et al. 1993; Romer, Pyke et al. 1994; Heiss, Babic et al. 1995; Cantero, Friess et al. 1997; Morita, Sato et al. 1998). Der Nachweis, dass eine erhöhte Expression des Rezeptors direkt mit einem hohen Invasionspotential der untersuchten Zellen korreliert, führte zu der Annahme, dass uPAR auch ein Kriterium für den invasiven oder malignen Phänotyp ist (Hollas, Blasi et al. 1991; Bianchi, Cohen et al. 1994; Wang, Skibber et al. 1994; Sliutz, Eder et al. 1996).

Eine solche Rolle für uPAR wird auch durch verschiedene experimentelle Arbeiten belegt. Die Transfektion von Tumorzelllinien mit uPAR-Expressionskonstrukten führt zu einer erhöhten Invasionsfähigkeit in Matrigel-Invasionsassays oder Hühnerei-Chorionallantois-Invasionsassays. Umgekehrt kann durch gezielte Hemmung der uPAR- Genexpression die Invasion in diesen Ansätzen vermindert werden (Ossowski 1988; Kariko, Kuo et al. 1993; Kook, Adamski et al. 1994; Quattrone, Fibbi et al. 1995). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von uPAR, neben MMP-9 und uPA, ein notwendiges Kriterium zur Intravasation von Gefässen ist (Kim, Yu et al. 1998). Schliesslich zeigte eine Arbeit die Inhibition von Angiogenese und Metastasenwachstum im Tiermodell durch einen spezifischen uPAR-Antagonisten, was eine Bedeutung von uPAR in der Etablierung von Metastasen weiter unterstützt (Min, Doyle et al. 1996).

Speziell beim Kolonkarzinom korreliert die Menge an endogenem uPAR mit der Invasionsfähigkeit von Tumorzelllinien (Schlechte, Murano et al. 1989; Hollas, Blasi et al. 1991). Antikörper gegen uPAR konnten die Zerstörung extrazellulärer Matrix in HT29 Zellen um 80% vermindern (Reiter, Kruithof et al. 1993). Schliesslich wurde eine parakrine Interaktion des Tumors mit den umgebenden Stromazellen beim Kolonkarzinom postuliert, nachdem die Expression von uPAR ausschliesslich in Tumorzellen, die Sekretion von uPA und PAI-1 hingegen in den umliegenden Stromazellen beobachtet wurde (Pyke, Kristensen et al. 1991; Pyke, Kristensen et al. 1991)

Die klinische Relevanz von uPAR und des uPA-Systems wird vor allem durch Arbeiten unterlegt, die eine höhere Expression einzelner Komponenten dieses Systems in Metastasen, im Vergleich zu den korrespondierenden Primärtumoren nachweisen konnten (Janicke, Schmitt et al. 1993; Schmalfeldt, Kuhn et al. 1995). Zusätzlich wurde belegt, dass der Nachweis von Komponenten des Plasminogenaktivatorsystems signifikant mit einem ungünstigen klinischen Verlauf korreliert. Dies bestätigen Studien mit Mammakarzinomen (Duffy, Reilly et al. 1990; Janicke, Schmitt et al. 1993), Bronchialkarzinomen (Pedersen, Grondahl-Hansen et al. 1994), Colonkarzinomen (Ganesh, Sier et al. 1994; Mulcahy, Duffy et al. 1994) Ösophagus- und Magenkarzinomen (Nekarda, Schmitt et al. 1994; Heiss, Babic et al. 1995; Heiss, Babic et al. 1996; Allgayer, Heiss et al. 1997; Allgayer, Babic et al. 1998; Nekarda, Schlegel et al. 1998). Eigene Arbeiten aus unserer Gruppe deuten auf uPAR als Charakteristikum des metastatisch relevanten Phänotyps in der minimal residualen Tumorkomponente des Magenkarzinoms hin (Heiss, Allgayer et al. 1995; Allgayer, Heiss et al. 1997; Heiss, Simon et al. 2002). Die enge Korrelation zwischen einem erhöhten uPA-, PAI-I- und uPAR-Gehalt im Tumorgewebe und der Tumoraggressivität macht das Plasminogenaktivator-System zu einem potentiellen Ziel für therapeutische Maßnahmen. Verschiedene Ansätze mit Antisense-Oligonukleotiden oder spezifischen Antikörpern, welche die Interaktion zwischen uPAR und seinem Liganden unterbinden, konnten gezielt die Invasion in verschiedenen Zelllinien reduzieren und waren erste Schritte in Richtung einer anti-invasiven Therapie (Ossowski und Reich 1983; Cavallaro, Vecchio et al. 1993; Quattrone, Fibbi et al. 1995). Aber erst neue Generationen von biochemischen Inhibitoren, die beispielsweise die Interaktion zwischen uPAR und seinem Liganden hemmen, erwiesen sich *in vivo* als vielversprechende Metastasierungshemmer, und

ein erster uPA-System-Inhibitor WX-UK1 konnte im Matrigel-Invasionsassay und Sphäroidassay die Invasivität von Fibroblasten signifikant reduzieren (Muehlenweg, Sperl et al. 2001; Ertongur, Lang et al. 2004).

1.6 Das Hühnerei-Choreonallantoismembranmodell als *in vivo* Modell zur Untersuchung der Invasions- und Metastasierungskaskade

Um ein vollständiges Bild über die Abläufe während der Tumormetastasierung zu bekommen, ist es notwendig, die zugrunde liegenden komplexen zellulären, biochemischen und molekularbiologischen Vorgänge besser verstehen zu können. Gängige *in vitro* Zellkulturmodelle, wie der Boyden Chamber/ Matrigel-Invasionsassay oder der Zellaggregationsassay können immer nur einzelne Schritte der Metastasierungskaskade nachahmen (Albini, Iwamoto et al. 1987). Um diesen Umstand zu verbessern, wurde eine Reihe von *in vivo* Modellen entwickelt. Die Entdeckung, dass körperfremde Tumorzellen in immundefiziente Mäuse transplantiert werden können, führte u.a. zu der Etablierung verschiedener heterotoper und orthotoper Mausmodelle (Rygaard und Povlsen 1969; Giovanella, Yim et al. 1972; Bosma, Custer et al. 1983). Je nach zu beantwortender Fragestellung, stellt das Hühner-Embryo-Metastasierungsmodell (CEM) oder Hühnerei-Choreonallantoismembran-Modell (CAM) eine Alternative zu diesen heterotropen oder orthotopen Karzinommodellen der Nacktmaus dar. Im Vergleich zum Mausmodell ermöglicht es eine relativ unproblematische Analyse der einzelnen Teilschritte komplexer physiologischer Vorgänge der Angiogenese, Intravasation und Metastasierung (Ossowski und Reich 1980; Nguyen, Shing et al. 1994). Die Verwendung von befruchteten Eiern ist wesentlich weniger kostenintensiv, da weder durch die Anschaffung noch durch die notwendige Unterbringung in Brutschränken hohe Kosten entstehen. Dauert ein Versuchsansatz zur spontanen oder experimentellen Metastasierung im murinen Modell in der Regel 4-10 Wochen, so kann man gleiche Fragestellungen im Hühnerembryo nach 7-9 Tagen beantworten.

Die zu untersuchenden Zellen werden direkt auf die Choroallantoismembran aufgebracht und zusammen mit dem Ei inkubiert. Der Nachweis der Invasion humaner Tumorzellen erfolgt mittels einer PCR für humane Alu-Sequenzen. Durch Isolierung genomischer DNA der Blutgefäße der Membran und anschließendem Nachweis der eingewanderten Zellen der kontralateralen CAM können Teilschritte der Intravasation beurteilt werden. Bei längerer Bebrütung können auch einzelne Gewebe aus dem Embryo entnommen und aufgearbeitet werden, wodurch eine Aussage über die Metastasierungsfähigkeit in Organstrukturen erfolgen kann (Kim, Yu et al. 1998). Ein weiterer Vorteil ist, dass es sich um ein geschlossenes Modell handelt. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die Testung neuer antimetastatischer Komponenten wichtig, die oft nur in limitierter Menge zur Verfügung stehen.

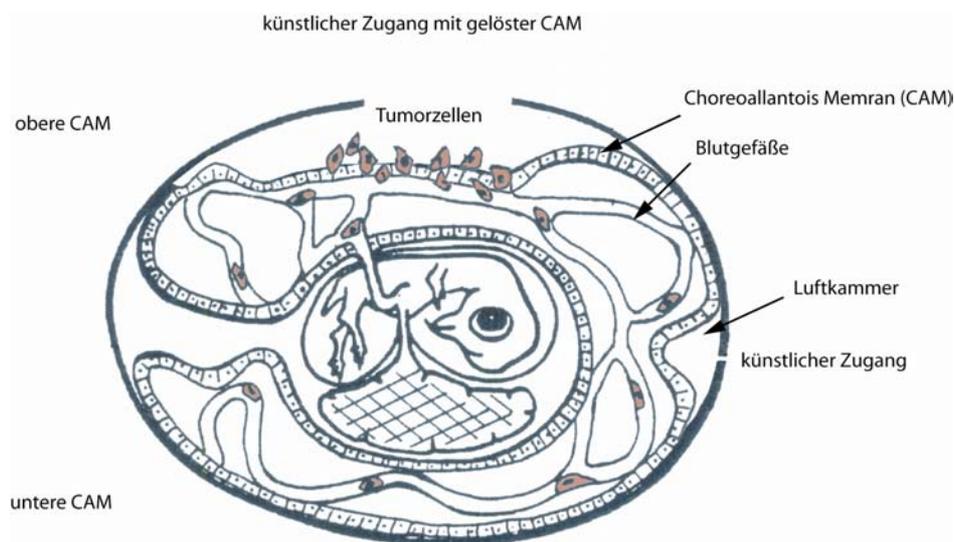


Abb.5: Schema des Invasionsassays. In die Schale eines 9 Tage bebrüteten Eies wird nach dem künstlichen partiellen Ablösen der Choroallantoismembran (CAM) ein Fenster geschnitten. Die Tumorzellen werden anschließend direkt auf die CAM aufgebracht und zusammen mit dem Ei inkubiert. Für den Nachweis der Intravasation erfolgt die Entnahme der unteren CAM und die Isolation der genomischen DNA (Kim, Yu et al. 1998).

1.7 Das „programmed cell death 4“ Protein (Pdc4)

1.7.1 Strukturelle und biochemische Eigenschaften von Pdc4

Pdc4 wurde zuerst als ein Maus Gen (MA-3) mittels Differential Display identifiziert, das in verschiedenen lymphoiden murinen Zelllinien nach Induktion von Apoptose mit verschiedenen Stimuli hochreguliert wird (Shibahara, Asano et al. 1995). Kurz darauf wurde eine homologe Sequenz für ein Topoisomerase-Inhibitor Suppressorgen (TIS) publiziert (Onishi und Kizaki 1996). In den darauf folgenden Jahren konnten die entsprechenden cDNAs der Homologe für Mensch (H731, 197/15a), Huhn (*programmed cell death 4*, Pdc4) und Ratte (*death upregulated gene*, DUG) nachgewiesen werden (Azzoni, Zatschina et al. 1998; Yoshinaga, Matsushita et al. 1999; Schlichter, Kattmann et al. 2001; Goke, Goke et al. 2002). Untersuchungen der Aminosäuresequenz des 64kDa großen Proteins konnten neben zwei MA-3 Domänen zwei leucinreiche Aminosäuresequenzen identifizieren, die homolog sind zu Zellkernexportsequenzen (*nuclear export signals*; NES) anderer Proteine (Goke, Goke et al. 2002; Bohm, Sawicka et al. 2003). Neben diesen Sequenzen besitzt Pdc4 mehrere putative Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen, wie Proteinkinase C und Casein Kinase II.

NESs wurden zuerst in der Sequenz des Rev- (*regulator of virion protein expression*) Protein, des humanen Immundefizienzvirus-1 (HIV-1) und des zellulären Proteinkinase A Inhibitors (PKI) beschrieben (Fischer, Huber et al. 1995; Wen, Meinkoth et al. 1995). In der Zelle wird diese Sequenz von CRM1 (*chromosome region maintenance 1*) gebunden und die entsprechenden Proteine aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert (Fornerod, Ohno et al. 1997). Eine solche Funktion der NES Sequenzen konnte auch für Pdc4 durch den Nachweis belegt werden, dass der Export des Proteins durch Leptomycin B, einem spezifischen CRM1-Inhibitor, blockiert wurde (Nishi, Yoshida et al. 1994; Bohm, Sawicka et al. 2003). MA-3 Domänen finden sich als konservierte Sequenzen neben Pdc4 vor allem in eukaryotischen Translationsfaktoren (Aravind und Koonin 2000).

Die Aktivierung der Proteinsynthese in eukaryotischen Zellen ist ein mehrstufiger Prozess, an dem unter anderem verschiedene eukaryotische Translationsinitiationsfaktoren (eIFs) wie eIF4F eine Rolle spielen. eIF4F ist ein Proteinkomplex aus den Faktoren eIF4E, eIF4A und eIF4G. eIF4G interagiert direkt mit eIF4A und eIF4E und führt so den funktionellen Komplex zusammen. Yeast two hybrid Studien konnten Pdc4 als einen neuen Bindungspartner des Translationsinitiationsfaktors eIF4E charakterisieren, wodurch es zu einer Inhibition der Translation durch Inaktivierung von eIF4A kommt (Yang, Jansen et al. 2003). Eine weitere Studie belegt den direkten Einfluss von Pdc4 auf die Translation eines Proteins. Es wurde gezeigt, dass Pdc4 in der Lage ist, das Wachstum von Tumorzellen über eine translationelle Suppression der Karboanhydrase-II zu inhibieren (Lankat-Buttgereit, Gregel et al. 2004).

1.7.2 Expression von Pdc4

Northern-Blot Analysen in normalem, adultem Mausgewebe zeigten eine ubiquitäre Expression von Pdc4 mit der höchsten nachgewiesenen Menge in Thymusgewebe und Leber (Shibahara, Asano et al. 1995). Nachfolgende Studien mit cDNA aus adultem Mausgewebe bestätigten diese Daten, konnten aber auch erhöhte Mengen in Hoden, Lunge, Gehirn und Milz zeigen. Andere Gruppen belegten auch eine Expression von Pdc4 in der Skelett- und Herzmuskulatur (Onishi, Hashimoto et al. 1998). Erste Daten zeigten, dass die Expression von Pdc4 durch verschiedene Zytokine beeinflusst werden kann. Versuche mit Interleukin-2 und -15 führten zu einer Erniedrigung, eine Stimulation mit Interleukin-12 zu einer Erhöhung des mRNA-Levels in NK- und T-Zellen (Azzoni, Zatssepina et al. 1998). Zusätzlich konnte eine Regulation der Expression über das virale Onkogen *v-myb* (Avian Myoblastosis Virus) und sein zelluläres Analogon *c-myb* nachgewiesen werden (Schlichter, Burk et al. 2001; Schlichter, Kattmann et al. 2001; Appl und Klempnauer 2002). Myb ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von Proteinen reguliert, die eine Schlüsselrolle in der Reifung hämatopoetischer Zellen spielen, aber auch in der Tumorenstehung und Metastasierung involviert sind.

Hierzu gehören Proteine wie Cyclooxygenase-2 (COX-2), Bcl-2 (*B-cell leukemia/lymphoma*) oder c-Myc (*Myelocytomatosis*), die im Zusammenhang von Angiogenese, Proliferation und Apoptose eine wichtige Rolle spielen (Oh und Reddy 1999).

1.7.3 Pcd4 als möglicher Tumorsuppressor und Regulator der Transkription

Versuche mit dem gut etablierten JB6 Mausmodell (Colburn, Koehler et al. 1980) erbrachten die ersten Hinweise auf eine Rolle von Pcd4 in der Suppression induzierter neoplastischer Transformation. In diesen murinen epidermalen Zellen ist Pcd4 in der Lage, die durch Trans-2-Phenylzyklopropylamin (TPA) verursachte neoplastische Transformation zu inhibieren (Cmarik, Min et al. 1999). Es ist bekannt, dass die durch TPA induzierten Signalwege in diesen Zellen in der Transaktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 enden (Dong, Birrer et al. 1994). Durch Überexpressionsstudien konnte gezeigt werden, dass die über den Transkriptionsfaktor AP-1 gesteuerte Transkription konzentrationsabhängig von Pcd4 inhibiert wird. Dieser Transkriptionsfaktor liegt in den Zellen nach Aktivierung als Homo- oder Heterodimer aus den Proteinen der Jun und Fos Familie vor, wobei Pcd4 spezifisch die Aktivierung der Komponenten c-Jun und c-Fos unterdrückt. Ein möglicher Einfluss auf die von NFκB oder Ornithindecaboxylase (ODC) vermittelte Transformation konnte nicht belegt werden (Yang, Jansen et al. 2001; Yang, Knies et al. 2003). Neuere Studien zeigten auch einen unmittelbaren Einfluss auf die Proliferation von Krebszellen (Goke, Gregel et al. 2004). Die Funktion als möglicher Tumorsuppressor wird durch eine Untersuchung unterlegt, in der verschiedene Lungenkarzinomzelllinien sowie primäres Lungentumorgewebe auf die Expression von Pcd4 auf RNA Ebene untersucht wurden. Hierbei zeigte sich eine deutliche Reduktion der mRNA Expression von Pcd4 in den Tumorproben und Krebszellen im Vergleich zu Normalgewebe und Kontrollzelllinien (Chen, Knosel et al. 2003). Auch eine Studie mit 60 verschiedenen humanen Krebszelllinien zeigte auf Proteinebene eine deutliche Reduktion von Pcd4 in renalen, Lungen- und Gliatumoren (Jansen, Camalier et al. 2004).

2 Zielsetzung

Protoonkogene und Tumorsuppressorgene spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Tumoren. Die von ihnen gebildeten Proteine sind in der Regel Bestandteile wichtiger zellulärer Signalwege, deren Fehlregulation die Grundlagen für die Initiierung einer neoplastischen Zelltransformation bis hin zu der Entstehung eines malignen Tumors legt. Noch unzureichend bekannt ist die Rolle von Tumorsuppressorgenen in der Regulation von uPAR. Tumorsuppressoren sind Moleküle, deren Fehlen oder zu geringe Aktivität die Entartung der betroffenen Zelle zur malignen Zelle begünstigt. Der Charakterisierung von Tumorsuppressoren und die Identifizierung ihrer Wirkmechanismen kommt daher im Hinblick auf ihre Nutzung in der Tumorthherapie eine essentielle Bedeutung zu. Gerade auch die Untersuchung, welche malignen Teileigenschaften von einem einzelnen Tumorsuppressor inhibiert werden (z. B. Transformation, Invasion, Metastasierungsfähigkeit) und die beteiligten Zielmoleküle sind in diesem Zusammenhang von Interesse. Die molekulare Funktion von Pdc4 ist noch weitgehend ungeklärt. Erste Arbeiten konnten eine Rolle in der malignen Transformation beschreiben, die durch Untersuchungen an humanen Tumoren und Tumorzellen belegt werden konnten (Cmarik, Min et al. 1999; Chen, Knosel et al. 2003; Goke, Gregel et al. 2004; Jansen, Camalier et al. 2004). Ob Pdc4 darüberhinaus in der Regulation von invasionsassoziierten Molekülen und damit in der für den Tumorpatienten prognostisch limitierenden Entwicklung von Metastasen eine Rolle spielt, ist bisher nicht untersucht worden. Ein solches Wissen könnte aber für eine zukünftige Nutzung dieses neuen Tumorsuppressors in der Tumorthherapie essentiell werden. Das Hühnerei-Choreonallantoismembran-Modell ist eine elegante *in vivo* Methode, um verschiedene Schritte der Metastasierungskaskade unter Laborbedingungen testen zu können. Im Vergleich zu murinen Modellen ermöglicht es, in kurzer Zeit relevante Daten über das Intravasations und Metastasierungsverhalten von Zellen zu erhalten. Ziele dieser Arbeit waren es aufzuklären, ob und welche Rolle Pdc4 in der Suppression von uPAR zukommt und wie dieser Einfluss vermittelt wird. Zusätzlich sollte das Hühnerei-Choreonallantoismembranmodell oder CAM Assay methodisch etabliert und eine verbesserte Methode der quantitativen Auswertung dieses Assays gefunden werden.

3 Material und Methoden

3.1 Bezugsquellen

3.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn in der folgenden Tabelle nicht anders aufgeführt, von den Firmen Sigma, ICN Biomedicals oder Merck in molekularbiologischer oder analysereiner Qualität (p.a.) bezogen.

ExpressHyb™ Hybridization Solution	BD Biosciences/ Clontech, USA
Acrylamid/Bis-Acrylamid Lösung	Bio-Rad, USA
Acetyl Coenzym A	Amersham Biosciences, Freiburg
DNAzol® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
TRizol® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Polyacryl Carrier	Molecular Research Center, USA
Leupeptin	Roche, Mannheim
Trasylo® 200000 KIE	Bayer, Leverkusen
Matrigel™ Basement Membrane Mix	BD Biosciences/Clontech, USA
Poly(dI-dC)•Poly(dI-dC)	Amersham Biosciences, Freiburg
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Reporter Lysis 5X Puffer	Promega, Mannheim
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Biosciences, Freiburg
Protein A Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Biosciences, Freiburg
Gelatine	Calbiochem, Schwalbach

GeneRuler™ 1kb, 100bp und 50bp DNA Ladder (Plus)	MBI Fermentas, Leon-Rot
Prestained Protein Ladder (~10-160kDa)	MBI Fermentas, Leon-Rot
AB-Serum, Reagenz für serologische Tests	Biotest, Dreieich
Gel/Mount™	Biomeda, USA
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Marimastat	Genentech, USA

3.1.2 Radiochemikalien

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma PerkinElmer Life Science bezogen und vor dem Ablauf der ersten Halbwertszeit eingesetzt.

Bezeichnung	Spezifische Aktivität
EasyTides® [γ - ³² P]-Adenosine 5'-triphosphat	3000Ci (111TBq)/mM
EasyTides® [γ - ³³ P]-Adenosine 5'-triphosphat	
EasyTides® [α - ³² P]-Deoxycytidine 5'-triphosphat	3000Ci (111TBq)/mM
EasyTides® [α - ³³ P]-Deoxycytidine 5'-triphosphat	
D-Threo [Dichloracetyl 1,2- ¹⁴ C] Chloramphenicol	50-60mCi (1.85-2.22GBq)/mM

3.1.3 Plastikwaren und Papier

Alle Plastikwaren wurden, wenn in der folgenden Tabelle nicht anders aufgeführt, von den Firmen Nunc (Zellkulturplastik), Beckman Coulter, Nalgene® (Zentrifugenplastik), Ratiolab (Pipettenspitzen), Millipore (Sterilfilter), BD Biosciences und Eppendorf bezogen.

MicroSpin™ G-25 Columns	Amersham Biosciences, Freiburg
Transwell, Polycarbonat Membranen	Costar, USA
OmniTip Hartkunststoff-Dispergierwerkzeug	Süd Labobedarf, Gauting
Hybond-N und P	Amersham Biosciences, Freiburg
Protran® Nitrocellulose Membran	Schleicher&Schuell, Dassel
Kodak Biomax MR und MS Filme	Amersham Biosciences, Freiburg
DC-Fertigplatten SIL G-25 UV ₂₅₄	Machery-Nagel, Düren
Röhrchen PP, runder Boden,	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubverschluss PP mit O-Ring, 13ml	
Chromatographiepapier 3MM	Whatman, UK

3.1.4 Geräte

Dispergierstab (Omni PCR Tissue Homogenizing Kit)	Süd Labobedarf, Gauting
Roll-Inkubator RX2 mit automatischem Drehmechanismus (eine Drehung/Stunde)	Lyon Electric Company, USA

3.1.5 „Kits“ und Untersuchungssysteme

Dual-Glo™ Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Mannheim
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
<i>Renilla</i> Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Mannheim
Cells-to-cDNA™ II	Ambion, UK
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Micro-FastTrack™ 2.0 Kit	Invitrogen, Karlsruhe
BCA Protein Assay Kit	Pierce, USA
ECL Western blotting detection	Amersham Biosciences, Freiburg
puReTaq Ready-To-Go PCR Beads	Amersham Biosciences, Freiburg
TaqMan® PCR Core Reagent Kit	Applied Biosystem, USA
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystem, USA
SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystem, USA
SYBR® Green PCR Core Reagent Kit	Applied Biosystem, USA
SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® <i>Taq</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Quick Ligation™ Kit	New England BioLabs, USA
Tet-Off™ Gene Expression System	BD Biosciences/Clontech, USA
Conventional PCR VenorGeM®	Minerva Biolabs, Berlin
Purgene™ DNA Purification System	Gentra, USA
Megaprime™ DNA labelling system	Amersham Biosciences, Freiburg

3.1.6 Enzyme

humane Urokinase	American Diagnostica, Pfungstadt
<i>Pwo</i> -Polymerase	Peqlab, Erlangen
KOD Hot Start DNA Polymerase	Novagen, UK
KOD XL DNA Polymerase	Novagen, UK
Polynukleotid Kinase T4	ICN Biomedicals, USA
T4 DNA Ligase	New England BioLabs, USA
T4 DNA Polymerase	New England BioLabs, USA
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs, USA
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England BioLabs, USA

3.1.7 Liganden

Humanes Lys-Plasminogen	American Diagnostica, Pfungstadt
Spectrozyme®UK	American Diagnostica, Pfungstadt

3.2 Medien und Puffer

3.2.1 Medien für E.coli Bakterien

Die verwendeten Medien und Bestandteile wurden im Autoklaven sterilisiert (30min, 121°C, 1,3bar). Lösungen und Medienzusätze, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden durch einen Filter mit 0,2µm Porengröße steriltfiltriert. Bei Bedarf wurden nach dem Autoklavieren Ampicillin 100 µg/ml oder Kanamycin 100 µg/ml zugesetzt. Zur Herstellung fester Nährböden wurden dem jeweiligen Medium 1,5% Agar zugegeben.

LB- Medium	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl pH 7,2
SOB- Medium	2% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 0,05% (w/v) NaCl
	nach dem Autoklavieren Zugabe von
	100mM MgCl ₂ 100mM MgSo ₄
SOC- Medium	SOB Medium 20% (w/v) Glucose
Super Broth- Medium	3,2% (w/v) Trypton 2% (w/v) Hefeextrakt 0,5% (w/v) NaCl pH 7,5
Terrific Broth- Medium	1,2% (w/v) Trypton 2,4% (w/v) Hefeextrakt 0,4% (v/v) Glycerol 54mM K ₂ HPO ₄ 15mM KH ₂ PO ₄ pH 7,2
5x KCM	500mM KCl 150mM CaCl ₂ 250mM MgCl ₂

TYM	10mM MgSO ₄ 100mM NaCl 2% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt
TfBI	30mM Kaliumacetat 50mM MnCl ₂ 100mM KCl 10mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glycerol
TfBII	10mM Na MOPS, pH7 75mM CaCl ₂ 10mM KCl 3% (v/v) Glycerol

3.2.2 Zellkulturmedien und Reagenzien

Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) mit Glutamax-I, 4,5 mg/ml Glukose, Natriumpyruvat	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640-Medium mit Glutamax-I	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Leibowitz`s L15-Medium	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Modified Eagle Medium (MEM) mit Glutamax-I	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
McCoy´s 5A Medium mit Glutamax-I	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Opti-MEM® 1 mit Glutamax-I	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
MEM Vitaminlösung (100x)	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (10x)	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Tryphanblau-Lösung, 0,4%	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Fetales Kälberserum "Not of USA origin"	Sigma, Taufkirchen
Fetales Kälberserum "Tet System Approved"	BD Biosciences/Clontech, USA
Einfriermedium	90% FCS, 10% DMSO

3.2.3 Antibiotika

Partricin	Biochrom, Berlin
Amphotericin B	Biochrom, Berlin
G418	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Zeocin	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe,
Blasticidin	Sigma, Taufkirchen
Hygromycin B	BD Biosciences/Clontech, USA
Ampicilin	MP (ICN) Biomedicals, USA
Kanamycin	MP (ICN) Biomedicals, USA
Penicillin-Streptomycin-Neomycin (PSN)	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Antibiotische Mischung (100x)	
Doxycyclin	BD Biosciences/Clontech, USA

3.2.4 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer

Die hier aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

BBS (2x)	50mM BES 280mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 6,96
DNA-Auftragspuffer (6x)	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 30% (v/v) Glycerin 100mM EDTA

Lämmli-Puffer (2x)	187,5mM H ₂ NC(CH ₂ OH) 6% (w/v) SDS 30% (v/v) Glycerin 0,01% (w/v) Bromphenolblau 5% (v/v) β-Mercaptoethanol
Lower-Tris	1,5M H ₂ NC(CH ₂ OH)/HCl, pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
MOPS (10x)	200mM Morpholinopropansulfonsäure 80mM Natriumacetat 10mM EDTA pH 7,0 (NaOH)
NET (10x)	1,5M NaCl 50mM EDTA 50mM H ₂ NC(CH ₂ OH) 0,5% (v/v) Triton X-100 pH 7,4 (HCl)
NET Gelatine (10x)	10x NET 2,5% (w/v) Gelatine
PBS	137mM NaCl 2,7mM KCl 8,1mM Na ₂ HPO ₄ •2 H ₂ O 1,5mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 (HCl)
RNA-Auftragspuffer (2x)	48% (v/v) Formamid 17% (v/v) Formaldehyd 11% (v/v) Glycerin 0,1% (w/v) Bromphenolblau
SD-Transblot	35mM H ₂ NC(CH ₂ OH) 40mM Glycin 20% (v/v) Methanol 0,004% (w/v) SDS
SSC (20x)	3M NaCl 300mM Natriumcitrat, pH 7,0

Western Blot Strip-Lösung	62,5mM H ₂ NC(CH ₂ OH)/HCl, pH 6,8 2% (w/v) SDS 100mM β-Mercaptoethanol
TAE (10x)	400mM H ₂ NC(CH ₂ OH) 10mM EDTA 50mM Na-Acetat pH 8,0 (Eisessig)
TBE (10x)	1,12M H ₂ NC(CH ₂ OH) 25mM EDTA 889mM Borat
TE10/0,1	1mM H ₂ NC(CH ₂ OH)/HCl, pH 8,0 0,1mM EDTA
Tris-Glycin-SDS (10x)	278,0mM H ₂ NC(CH ₂ OH)/HCl, pH 7,5 1,92M Glycin 1% (w/v) SDS
Upper-Tris (4x)	0,5M H ₂ NC(CH ₂ OH)/HCl, pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
Ponceau S- Lösung	0,2% (w/v) Ponceau S 1,6% (v/v) TCA
Kristallviolett- Lösung	20% Methanol 0,5% Kristalviolett
Triton X- 100 Lysepuffer	50mM HEPES, pH 7,2 150mM NaCl 1mM EGTA 20mM NaF 1% (v/v) TritonX- 100 10% (v/v) Glycerin pH 7,2
HNTG (4x)	200mM HEPES, pH 7,2 600mM NaCl 40% (v/v) Glycerin 0,4% (v/v)TritonX- 100

EMSA PufferA	10mM HEPES pH 7,8 10mM KCl 0,1mM EDTA 0,1mM EGTA 1mM DTT 0,5% (v/v) TritonX-100
EMSA PufferB	10mM HEPES pH 7,8 400mM NaCl 1mM EDTA 1mM EGTA 1mM DTT 20% (v/v) Glycerin
EMSA Bindungspuffer (5X)	25mM HEPES pH 7,8 25mM MgCl ₂ 500mM KCl 2,5mM DTT 50% (v/v) Glycerin 50µM ZnCl ₂
Neufuchsin-Färbelösung	Lösung 1: 15mM Levamisol 250mM Tris/HCl pH8,7 Lösung 2: 414mM NaNO ₂ 1,4% Neufuchsin in 2M HCl Lösung 3: 12% Naphtol ASBI Phosphat in Dimethylformamid
	Für die Gebrauchslösung werden die Lösungen in einem Verhältnis von 88:6,2:5,3 gemischt

3.3 Bakterienstämme und Zelllinien

3.3.1 Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (<i>lac</i> ZYA- <i>argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe

3.3.2 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Referenz
RKO	humane Kolonkarzinom-Zelllinie	ATCC CRL-2577
RKO Pdc4 Tet-off	modifizierte RKO Zelllinie stabil transfiziert mit Tetrazyklin inhibierbarer Überexpression des Proteins Pdc4	diese Arbeit
RKO Pdc4 Tet-on	modifizierte RKO Zelllinie stabil transfiziert mit Tetrazyklin induzierbarer Überexpression des Proteins Pdc4	diese Arbeit
HCT-GEO	humane Kolonkarzinom-Zelllinie	(Chantret, Barbat et al. 1988)
HCT-116	humane Kolorektalkarzinom-Zelllinie	ATCC CCL-247
SW480	humane kolorektale Adenokarzinom- Zelllinie	ATCC CCL-228
HT-29	humane kolorektale Adenokarzinom- Zelllinie	ATCC HTB-38

Mel-JuSo	humane Melanom-Zelllinie	DSMZ ACC 74
MDA-MB-435S	humane Mammaduktalkarzinom-Zelllinie	ATCC HTB-129
NIH/3T3	immortalisierte Mausfibroblasten	ATCC CRL-1658
HEK 293	humane embryonale Nierenfibroblasten, Transformiert mit Adenovirus Typ V DNA	ATCC CRL-1573

3.3.3 Eier

SPF (spezial pathogen free) Eier Charles River, USA

3.4 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden zur Immunpräzipitation oder als primäre Antikörper zur Detektion in der Immunoblot- bzw FACS- Analyse eingesetzt.

Antikörper	Eigenschaften	Referenz
β-Actin AC-15	Maus, monoklonal, IgG ₁ , gegen N-Terminus von β-Actin	Sigma, Taufkirchen
3937	Maus, monoklonal, IgG ₁ , gegen humanen Urokinase Rezeptor (CD87)	American Diagnostica, Pfungstadt
399R	Kaninchen, polyklonal, gegen humanen Urokinase Rezeptor (CD87)	American Diagnostica, Pfungstadt
R2	Maus, monoklonal, IgG ₁ , gegen humanen UrokinaseRezeptor (CD87)	(Ronne, Behrendt et al. 1991)
R3	Maus, monoklonal, IgG ₁ , gegen humanen UrokinaseRezeptor (CD87), inhibiert Bindung von uPA an uPAR	(Ronne, Behrendt et al. 1991)
Mazar anti-uPAR	Kaninchen, polyklonal, gegen humanen Urokinase Rezeptor (CD87)	(Gum, Juarez et al. 1998)
anti-Pdcd4	Kaninchen, polyklonal, gegen murines und humanes Pdcd4	(Yang, Jansen et al. 2001)

Folgende Antikörper wurden für immunzytochemische Analysen verwendet.

Antikörper	Eigenschaften	Referenz
Kaninchen gegen Maus	Kaninchen, polyklonal, gegen Maus IgGs	Dako, Dänemark
APAAP Maus	APAAP, löslicher Komplex aus Intestinaler <u>A</u> lkalischer Kälber <u>P</u> hosphatase und monoklonalem <u>A</u> nti- <u>A</u> lkalischer <u>P</u> hosphatase Mausantikörper	Dako, Dänemark

Die bei der Immundetektion von Proteinen verwendeten sekundären Antikörper waren mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Die für die FACS-Analysen verwendeten sekundären Antikörper waren mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC) konjugiert.

Antikörper	Eigenschaften	Referenz
Ziege gegen Maus	Ziege, polyklonal, gegen Maus IgG (H+L), HRP konjugiert, Verdünnung 1:50000	Dianova, Hamburg
Ziege gegen Kaninchen	Ziege, polyklonal, gegen Kaninchen IgG (H+L), HRP konjugiert, Verdünnung 1:50000	Dianova, Hamburg
Ratte gegen Maus	Ratte, polyklonal, gegen Maus IgG (H+L), FITC konjugiert, Verdünnung 1:200	Dianova, Hamburg

3.5 Plasmide und Oligonukleotide

3.5.1 Expressionsplasmide

Vektor	Beschreibung	Referenz
pcDNA3.1 (-)/(+)	Humaner Cytomegalovirus (CMV) Promotor, Neo _r , Amp _r	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA6/His TM A	Humaner Cytomegalovirus (CMV) Promotor, Histidin-Markierung Amp _r , Blastocidin _r	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1 (+) Pdc4	pcDNA3.1 (+) mit <i>pdc4</i> cDNA, kloniert <i>EcoRI/XbaI</i>	(Yang, Jansen et al. 2001)
pcDNA6/His TM AuPAR	pcDNA6/His TM A mit humaner <i>uPAR</i> cDNA kloniert <i>EcoRI/NotI</i>	diese Arbeit
pEGFP-C1	Humaner Cytomegalovirus (CMV) Promotor, Enhanced green fluorescent protein (EGFP) Gen, Amp _r , Kan _r /Neo _r	BD Biosciences/ Clontech, USA
pEGFP-C2	Humaner Cytomegalovirus (CMV) Promotor, Enhanced green fluorescent protein (EGFP) Gen, Amp _r , Kan _r /Neo _r	BD Biosciences/ Clontech, USA

3.5.2 Reporterplasmide

Vektor	Beschreibung	Referenz
pCAT®-Basic	Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) Gen, Amp _r	Promega, Mannheim
uPARCAT	pCAT®-Basic Vektor mit einem Teil der uPAR-Promotor Sequenz (-398 bis +51; 449bp), kloniert <i>Xba</i> I	(Allgayer, Wang et al. 1999)
uPARCATAP-1mut	uPARCAT mit mutiertem AP-1 Motiv an Position -184bp; Motiv wurde mutiert zu Tatc TCA	(Lengyel, Wang et al. 1996)
uPARCATSp-1/Sp-3mut	uPARCAT mit mutiertem Sp-1/Sp-3 Motiv an Position -147/-138bp; Motiv wurde mutiert zu ttCCtCtCCCC	(Allgayer, Wang et al. 1999)
uPARCATAP-2/Sp-1/SP-3mut	uPARCATSp-1/Sp-3mut mit zusätzlich mutiertem AP-2 Motiv an Position -144/-135bp; Motiv wurde mutiert zu aaGaGaCCCGG	(Allgayer, Wang et al. 1999)
SV ₀ CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) Gen, Amp _r	(Gorman, Moffat et al. 1982)
RSVLuci	Rous sarcoma virus (RSV) Promotor, <i>Firefly</i> Luciferase Gen, Amp _r	(Wet, Wood et al. 1987)
pGL3-Basic	<i>Firefly</i> Luciferase Gen, Amp _r	Promega, Mannheim
pGL3-Control	SV40 Promotor, <i>Firefly</i> Luciferase Gen, Amp _r	Promega, Mannheim
pGL3 -1469	pGL3-Basic Vektor mit der uPAR-Promotor Sequenz (-1469 bis +0; 1469bp), kloniert <i>Sma</i> I	(Hapke, Gawaz et al. 2001)

pGL3 Del1	pGL3-Basic Vektor mit der uPAR-Promotor Sequenz (-1469 bis +0; 1469bp), kloniert <i>Sma</i> I, Deletion zwischen -402/-350bp	(Hapke, Gawaz et al. 2001)
pGL3 Del2	pGL3-Basic Vektor mit der uPAR-Promotor Sequenz (-1469 bis +0; 1469bp), kloniert <i>Sma</i> I, Deletion zwischen -349/-300bp	(Hapke, Gawaz et al. 2001)
pGL3 Del3	pGL3-Basic Vektor mit der uPAR-Promotor Sequenz (-1469 bis +0; 1469bp), kloniert <i>Sma</i> I, Deletion zwischen -299/-260bp	(Hapke, Gawaz et al. 2001)
pGL3 Del4	pGL3-Basic Vektor mit der uPAR-Promotor Sequenz (-1469 bis +0; 1469bp), kloniert <i>Sma</i> I, Deletion zwischen -237/-203bp	(Hapke, Gawaz et al. 2001)
pGL3 AP-1mut	pGL3-Basic Vektor mit der uPAR-Promotor Sequenz (-1469 bis +0; 1469bp), kloniert <i>Sma</i> I, Mutation an Position -184bp (AP-1)	(Hapke, Gawaz et al. 2001)
pGL3 PEA3mut	pGL3-Basic Vektor mit der uPAR-Promotor Sequenz (-1469 bis +0; 1469bp), kloniert <i>Sma</i> I, Mutation an Position -248bp (PEA3/ets)	(Hapke, Gawaz et al. 2001)
phRG-TK	Herpes simplex Virus Thymidinkinase (HSV-TK) Promotor, <i>Renilla</i> Luciferase Gen, Amp _r	Promega, Mannheim

3.5.3 Oligonukleotide

Nachfolgende Sequenzen sind in 5' > 3' Richtung angegeben. Oligonukleotide für den Elektromobility Shift Assay (EMSA) wurden vor der Verwendung mit dem entsprechenden reversen Oligonukleotid hybridisiert.

Bezeichnung	Sequenz/Beschreibung	Referenz
-152/-135	CCA GCC GGC CGC GCC CCG GGA AGG GA 5'- EMSA Oligonukleotid gegen Region -152 bis -135 (relativ zum Transkriptionsstart) des uPAR Promotors mit Konsensussequenzen für Sp-1, Sp-3 und AP-2.	(Allgayer, Wang et al. 1999)
Sp-1	ATA CCA GTA TCC CTC CTG ACA AAA CTA ACA 5'- EMSA Oligonukleotid aus Region -402 bis -350 (relativ zum Transkriptionsstart) des uPAR Promotors mit putativer Konsensussequenz für Sp-1.	diese Arbeit
GATA-2	ATG CAT CTC TAG ATA AGG ATT TTC CAA 5'- EMSA Oligonukleotid aus Region -402 bis -350 (relativ zum Transkriptionsstart) des uPAR Promotors mit putativer Konsensussequenz für GATA-2.	diese Arbeit
NF-1	AAA ATC CTG TTA GCC AAA TAA TCA GCC ACA 5'- EMSA Oligonukleotid aus Region -402 bis -350 (relativ zum Transkriptionsstart) des uPAR Promotors mit putativer Konsensussequenz für NF-1.	diese Arbeit
cDNA FWD	GGA ATT CAT GGG TCA CCC GCC GCT GCT G 5'-Oligonukleotid zur Amplifikation der kompletten cDNA Sequenzen des humanen Urokinase Rezeptor, <i>EcoRI</i> Schnittstelle.	diese Arbeit

cDNA REV	AAG GAA AAA AGC GGC CGC GGT CCA GAG GAG AG 3'-Oligonukleotid zur Amplifikation der kompletten cDNA Sequenzen des humanen Urokinase Rezeptor, <i>Not1</i> Schnittstelle.	diese Arbeit
uPARFWD	CAT GGA TGC TCC TCT GAA G 5'-Oligonukleotid zur Amplifikation eines 227bp großen Fragments der cDNA Sequenzen des humanen uPAR.	diese Arbeit
uPARREV	GTG ATG GTG AGG CTG AGA TG 3'-Oligonukleotid zur Amplifikation eines 227bp großen Fragments der cDNA Sequenzen des humanen uPAR.	diese Arbeit
Pdcd4FWD	GAG CAT GGA GAT ACT AAT GAA G 5'-Oligonukleotid zur Amplifikation eines 286bp großen Fragments der cDNA Sequenzen des humanen Pdcd4.	diese Arbeit
Pdcd4REV	CAT CAC CAA CAG CTC TAG C 3'-Oligonukleotid zur Amplifikation eines 286bp großen Fragments der cDNA Sequenzen des humanen Pdcd4.	diese Arbeit
β-ActinFWD	CTT CAA CAC CCC AGC CAT 5'-Oligonukleotid zur Amplifikation eines 300bp großen Fragments der cDNA Sequenzen des humanen β-Actin.	diese Arbeit
β-ActinREV	TAA TGT CAC GCA CGA TTT CC 3'-Oligonukleotid zur Amplifikation eines 300bp großen Fragments der cDNA Sequenzen des humanen β-Actin.	diese Arbeit
ALU-Sense/ ZijlstraALUFWD	ACG CCT GTA ATC CCA GCA CTT 5'-Oligonukleotid für humane Alu-Sequenzen in der semiquantitativen und Real-Time-PCR.	(Kim, Yu et al. 1998; Zijlstra, Mellor et al. 2002)

ALU-Antisense/ ZijlstraALUREV	TCG CCC AGG CTG GAG TGC A 3'-Oligonukleotid für humane Alu-Sequenzen in der semiquantitativen und Real-Time-PCR.	(Kim, Yu et al. 1998; Zijlstra, Mellor et al. 2002)
YB8FWD	CGA GGC GGG TGG ATC ATG AGG T 5'-Oligonukleotid für humane Alu-Sequenzen in der Real-Time-PCR.	(Walker, Kilroy et al. 2003)
YB8REV	TCT GTC GCC CAG GCC GGA CT 3'-Oligonukleotid für humane Alu-Sequenzen in der Real-Time-PCR.	(Walker, Kilroy et al. 2003)
YB8 FWD68	GTC AGG AGA TCG AGA CCA TCC T 5'-Oligonukleotid für humane Alu-Sequenzen in der Real-Time-PCR.	diese Arbeit
YB8 REV182	TGA GGC AGG AGA ATG GCG 3'-Oligonukleotid für humane Alu-Sequenzen in der Real-Time-PCR.	diese Arbeit
YB8 REV 244	AGT GGC GCA ATC TCG GC 3'-Oligonukleotid für humane Alu-Sequenzen in der Real-Time-PCR.	diese Arbeit
YD8Probe167	^{6-FAM} AGC TAC TCG GGA GGC TGA GGC AGG ^{TAMRA} TaqMan®-Probe für die Oligonukleotid- kombination YB8 FWD68/ YB8 REV182.	diese Arbeit
YD8Probe202	^{6-FAM} ACC CCG GGA AGC GGA GCT TGC ^{TAMRA} TaqMan®-Probe für die Oligonukleotid- kombination YB8 FWD68/ YB8 REV244.	diese Arbeit

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 Gelelektrophorese von DNA

In Abhängigkeit der Größe der DNA wurden 0,8-2%ige horizontale Agarosegele verwendet. Als Laufpuffer diente 1xTAE. Sowohl dem Agarosegel als auch dem Laufpuffer wurde Ethidiumbromid (0,02% w/v) zugegeben. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Volumen 6x DNA-Auftragspuffer versetzt. Falls notwendig wurde die DNA mittels dem QIAEX II Gel Extraction Kit gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben isoliert. Alternativ wurden bei DNA-Fragmenten von ~30- 200bp auch nicht reduzierende und nicht denaturierende 5%ige Polyacrylamidgele verwendet. Als Laufpuffer diente in diesem Fall 1xTBE. Danach erfolgte ein Anfärben des Gels in einer 0,02%igen Etidiumbromidlösung in bidestiliertem Wasser für 20min. Anschließend wurden die Gele für 20min in bidestiliertem Wasser gewaschen und ausgewertet. Die Visualisierung der aufgetrennten DNA erfolgte mittels UV-Licht (302nm) unter Einsatz eines Orangefilters.

3.6.2 Plasmidpräparation

Für analytische Präparationen (~10µg) wurde der QIAamp DNA Mini Kit gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben verwendet. Für präparative Plasmid-aufarbeitungen (~400µg) wurde der QIAfilter Plasmid Maxi Kit gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben eingesetzt. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch photometrische Messung der Absorption bei 260nm (OD₂₆₀-Wert). Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Absorption bei 280nm (OD₂₈₀-Wert). Es wurden nur Plasmidpräparationen verwendet, die eine Ratio OD₂₆₀/OD₂₈₀ von ~1,8 erreichten. Die Qualität der DNA wurde routinemäßig durch Auftrennung in einem TAE-Agarosegel überprüft.

3.6.3 Enzymatische Behandlung von DNA

3.6.3.1 Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Sämtliche Restriktionsverdauungen wurden gemäß den von den Herstellern empfohlenen Angaben (Puffer, Temperaturoptimum) für 1-2 Stunden durchgeführt und anschließend mittels TAE-Agarosegelelektrophorese überprüft. Bei Doppelverdauen erfolgte, wenn notwendig, vor dem zweiten Verdau eine zusätzliche Aufreinigung der Ansätze mit dem QIAquick PCR Purification Kit gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben.

3.6.3.2 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen

Die Entfernung von Phosphatgruppen am 5'-Ende der DNA erfolgte mittels Alkalischer Phosphatase gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben. Um eine vollständige Entfernung der Phosphatase nach Abschluss der Reaktion zu gewährleisten, wurden die Ansätze entweder mit dem QIAquick PCR Purification Kit oder einer TAE-Gelelektrophorese mittels dem QIAEX II Gel Extraction Kit gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben isoliert.

3.6.3.3 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten mit T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) erfolgte bei radioaktiver Markierung gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben unter Verwendung von 30 μ Ci des entsprechenden Radioisotops. Zur nichtradioaktiven Phosphorylierung wurden die benötigten Mengen DNA mit 10U T4-PNK und 1xLigasepuffer für 30min bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung der phosphorylierten DNA erfolgte über MicroSpin™ G-25 Säulen gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben.

3.6.3.4 Einbau von Radionukleotiden in DNA-Fragmente

Die radioaktive Markierung der DNA erfolgte durch Klenow DNA Polymerase und [α - ^{32}P] oder [α - ^{33}P]-Deoxycytidine 5'-triphosphat mittels dem Megaprime™ DNA Labelling System. Die Aufreinigung der DNA-Sonden von nicht eingebauten Desoxyribonukleotiden wurde durch Verwendung des QIAquick Nucleotide Removal Kit gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben erreicht.

3.6.3.5 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase oder der Quick Ligation™ Kit verwendet. 20ng geschnittene und dephosphorylierte Plasmid-DNA wurden zu diesem Zweck mit einem 5-10fachen Überschuß des zu klonierenden DNA-Fragmentes gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben inkubiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend bei -20°C gelagert oder direkt zur Transformation von kompetenten Bakterien eingesetzt.

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

3.6.4.1 Herstellung und Vermehrung kompetenter *E.coli*-Bakterien

Die Bakterien wurden auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine Kolonie gepickt und in 20ml TYM-Medium erneut über Nacht bei 37°C geschüttelt bis eine OD_{600} von 0,2-0,8 erreicht wurde. Am nächsten Tag wurde diese Übernachtskultur in 100ml TYM-Medium gegeben. Nach dem Erreichen einer OD_{600} von 0,5-0,9 wurde dieser Ansatz wiederum in 500ml TYM-Medium überführt und solange bei 37°C geschüttelt bis eine OD_{600} von 0,6 erreicht wurde. Danach wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und bei 4200rpm (JA-Rotor, Beckmann, USA) für 20min abzentrifugiert.

Das Pellet wurde in 100ml eiskaltem TfBI resuspendiert und die Zellen erneut für 8min bei 4200rpm abzentrifugiert. Die Zellen wurde anschließend mit 20ml TfBII resuspendiert und in Portionen von 100µl aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

3.6.4.2 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden 10µl des entsprechenden Ligationsansatzes verwendet und mit 10µl 5xKCM, 30µl bidestiliertem Wasser und 50µl kompetenter Bakterien auf Eis vermischt und für 20min inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 1min bei 37°C. Nach der Zugabe von 900µl LB-Medium wurde der Ansatz für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt, abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgeschüttet und das Pellet im Resttropfen resuspendiert. Dieser Ansatz wurde auf mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde jeweils eine Kolonie in 3ml LB-Medium mit Antibiotikum gegeben und einer analytischen Plasmidaufarbeitung zugeführt. Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden jeweils 0,5 ml einer stationären Bakterienkultur (LB-Medium mit Antibiotikazusatz) mit 0,5 ml einer 50%igen Glycerinlösung versetzt, kurz gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.6.5 Präparation von Total-RNA

Für die Isolierung von Total-RNA aus Zellkulturen wurde TRIzol® Reagenz gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben verwendet. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch photometrische Messung der Absorption bei 260nm (OD₂₆₀-Wert). Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Absorption bei 280nm (OD₂₈₀-Wert). Es wurden nur RNA-Präparationen verwendet, die eine Ratio OD₂₆₀/OD₂₈₀ von ~1,6 erreichten.

3.6.6 Präparation von mRNA

Für die Isolierung von polyA⁺-mRNA aus Zellkulturen wurde der Micro-FastTrack™2.0 Kit (Version E) gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben verwendet. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch photometrische Messung der Absorption bei 260nm (OD₂₆₀-Wert). Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Absorption bei 280nm (OD₂₈₀-Wert). Es wurden nur RNA-Präparationen verwendet, die eine Ratio OD₂₆₀/OD₂₈₀ von ~1,6 erreichten.

3.6.7 Gelelektrophorese von RNA

Die Auftrennung von RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in horizontalen Agarosegelkammern. Die Auftrennung erfolgte in einem 1,2% RNA-Agarosegel. 1,2g Agarose wurden in 77ml bidestilliertem Wasser in der Mikrowelle aufgekocht und 10min bei Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurde der Ansatz mit 10ml 10x MOPS und 13ml Formaldehyd (37%v/v) aufgefüllt und das Gel gegossen. Die RNA wurde für die Gelelektrophorese folgendermaßen vorbereitet: 15µg Total-RNA oder 3µg polyA⁺-m-RNA wurde mit 2,5µl 10x MOPS, 4,4µl Formaldehyd (37% v/v) und 12,5µl Formamid versetzt, und das Gesamtvolumen mit bidestilliertem Wasser auf 25µl gebracht. Die Proben wurden 15min bei 55°C erhitzt, anschließend mit 5µl RNA-Auftragspuffer versetzt, auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x MOPS. Es wurde eine Spannung von 6V/cm² angelegt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 30min in 100ml Laufpuffer mit 5µl Ethidiumbromid gefärbt (10mg/ml) und im gleichen Volumen Laufpuffer ohne Ethidiumbromid 60min entfärbt. Die Visualisierung der aufgetrennten RNA erfolgte mittels UV-Licht (302nm) unter Einsatz eines Orangefilters.

3.6.8 Transfer von Ribonukleinsäuren auf Nylonmembran (Northern-Blot)

Der Transfer von RNA auf Nylonmembranen erfolgte mittels Kapillarkräften. Auf eine Glasplatte, die sich über einer mit 20x SSC gefüllten Glaswanne befand, wurden 3 Lagen in 20x SSC getränktes Chromatographiepapier luftblasenfrei aufgelegt und darauf geachtet, dass sich die Ränder des Papiers in dem darunter befindlichen Puffer befanden. Danach wurde das RNA-Agarosegel aufgelegt und mit einer in 2x SSC angefeuchteten Nylonmembran gleicher Größe luftblasenfrei bedeckt. Abschließend wurden drei weitere mit 2x SSC getränkte und auf die entsprechende Größe zurechtgeschnittene Chromatographiepapiere aufgelegt und mit mehreren Lagen trockenem, saugfähigem Papier bedeckt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte mittels UV-Licht mit einer Intensität von $0,120\text{J}/\text{cm}^2$.

3.6.9 Hybridisierung radioaktiv markierter Proben mit RNA

Für den Nachweis von fixierter RNA auf Nylonfiltern wurde die ExpressHyb™ Lösung gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben verwendet. Der Nachweis der hybridisierten Proben erfolgte auf Kodak Biomax MR-oder MS-Filmen mit entsprechenden Verstärkerfolien oder mit einem Fujifilm BAS-1800 II Phosphorimager.

3.6.10 Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

Für die direkte Synthese von cDNA aus geringen Zellmengen, ohne gesonderte RNA Isolierung, wurde der Cells-to-cDNA™II Kit den Angaben des Herstellers entsprechend verwendet. Für den Nachweis bestimmter RNAs aus isolierter gesamt RNA oder mRNA wurde das SuperScript™One-Step RT-PCR with Platinum®Taq System gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben verwendet.

3.6.11 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR

Für die Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten aus Plasmiden oder cDNA wurden für Fragmentgrößen $\leq 3\text{kb}$ die KOD Hot Start DNA Polymerase, für Fragmentgrößen $\geq 3\text{kb}$ die KOD XL DNA Polymerase gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben verwendet.

3.7 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

3.7.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten eukaryontischen Zellen wurden in Brutschränken (NuAire, USA) bei 5-7% CO_2 , 37°C und Wasserdampf gesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilwerkbänken ausgeführt. Alle benutzten Zelllinien wurden, wenn nicht anders aufgeführt, gemäß den von der *American Type Culture Collection* (ATCC) und Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) empfohlenen Haltungsbedingungen und Medien kultiviert, regelmäßig mit frischem Medium versorgt und passagiert. Die Zellkulturen wurden routinemäßig mit VenorGeM® gemäß den Herstellerangaben auf Infektionen mit Mykoplasmen untersucht. Das Einfrieren der Zellen erfolgte in sogenanntem Einfriermedium. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte entweder mit einer Zählkammer nach Neubauer (Brand, Wertheim) oder mit einem Coulter Counter® (Beckman Coulter, USA).

3.7.2 Transfektion eukaryotischer Zellen

Für die Transfektion der Zellen mit der sogenannten Kalziumphosphat-Methode (Chen und Okayama 1987) wurden die zu transfizierenden Zellen dergestalt ausgesäht, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine 50%ige Konfluenz erreichten. Für eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte wurde zu diesem Zweck 12-24 Stunden vor dem Versuch die entsprechende Menge an Zellen in 2ml Vollmedium ausgesäht. Dabei wurde darauf geachtet möglichst eine Einzelzellsuspension zu verteilen. Nach dem vollständigen Anheften der Zellen am Kulturgefäß wurden in einem Transfektionsröhrchen 4µg DNA, 10µl 2,5M CaCl₂ mit doppelt destiliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100µl aufgefüllt. Anschließend wurden unter vortexen, tropfenweise 100µl 2x BBS zu der Lösung gegeben. Nach einer Inkubation von 20min bei Raumtemperatur wurde die Lösung tropfenweise über den Zellen verteilt und kurz geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung im Medium zu erreichen. Die Platte wurde danach 15-24 Stunden im Inkubator bei 3% CO₂ inkubiert. Nach dieser Zeit wurden das Medium abgenommen, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und anschließend für mind. 24 Stunden in Vollmedium weiterkultiviert.

Kulturgefäß	Zellenzahl	Volumen Medium	DNA und Verdünnungsvolumen
6-Loch-Platte	3x10 ⁵	2ml	4µg in 200µl
6cm Schale	8x10 ⁵	4ml	8µg in 400µl
10cm Schale	1x10 ⁶	8ml	16µg in 800µl
15cm Schale	1,5x10 ⁶	16ml	32µg in 1600µl

Für Zelllinien, bei welchen eine Kalziumphosphat-Transfektion zu einer ungenügenden Anzahl transfizierter Zellen führte, wurde Lipofectamine™2000 gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben verwendet. Die Zellen wurden entweder 48-72 Stunden nach der Transfektion verwendet (transient) oder zur Herstellung stabil transfizierter Zelllinien gemäß dem auf dem Plasmid vorhandenen Selektionsgen unter Antibiotikabehandlung gestellt.

Der Nachweis der Transfektionseffizienz erfolgte durch Transfektion paralleler Ansätze mit einem Expressionsplasmid für das Grün-Fluoreszierende-Protein (GFP). Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion unter einem Fluoreszenzmikroskop (Anregung_{max} = 488nm; Emmission_{max} = 507nm) begutachtet und der prozentuale Anteil der GFP-exprimierenden Zellen bestimmt.

3.8 Reporter-Untersuchungen

3.8.1 CAT Assay

Die Zellen wurden mit den entsprechenden CAT-Reporterkonstrukten transfiziert und nach einer Inkubationszeit von 48-72 Stunden mit 1xReporter Lysis Puffer lysiert. Als Positiv- und Negativkontrollen dienten mit den Plasmiden uPARCAT und SV₀CAT transfizierte Zellen. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden die Ansätze immer mit den Plasmiden RSVLuci oder pHRG-TK mittransfiziert. Die Zellen wurden vor der Lyse mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis in einem entsprechenden Volumen Puffer inkubiert. Nach 10-15min auf Eis wurde das Zelllysate gesammelt und bei 12500g für 20min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde als Gesamtzelllysate weiterverwendet. Für den CAT-Assay wurden 5-10µg Protein mit 30µl Acetyl Coenzym A und 0,5µl D-Threo [Dichloracetyl 1,2-¹⁴C] Chloramphenicol mit 1xReporter Lysis Puffer auf 90µl aufgefüllt und je nach Expressionsstärke der Chloramphenicol Acetyltransferase im Lysat 2-6 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Probe 1ml Ethylacetat zugegeben, 1min gevortext und bei 12500g für 5min bei 4°C abzentrifugiert. 950µl der oberen Ethylacetatphase wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und anschließend die Flüssigkeit in einer Vakuum-Trockenzentrifuge bei 40°C vollständig einreduziert. Danach wurde die lyophilisierte Probe mit 20µl Ethylacetat versetzt und chromatographisch auf einer mit Kieselgel beschichteten Platte aufgetrennt. Als Laufmittel diente Chloroform mit 5% (v/v) Methanol. Der Nachweis des acetylierten Chloramphenicols erfolgte auf Kodak Biomax MR-Filmen oder mit einem Fujifilm BAS-1800 II Phosphorimager.

3.8.2 Luciferase Assay

Die Zellen wurden mit den entsprechenden Luciferase-Reporterkonstrukten transfiziert und nach einer Inkubationszeit von 48-72 Stunden gemäß den Herstellerangaben (Luciferase Assay System, *Renilla* Luciferase Assay System, Dual-Glo™ Luciferase Assay System und Dual-Luciferase® Reporter Assay System) lysiert und entsprechend weiterverarbeitet, gemessen und ausgewertet. Als Positiv- und Negativkontrollen dienten, für die dualen Luciferaseassays, mit den Plasmiden pGL3Control und pGLBasic transfizierte Zellen. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden in den dualen Reporterassays die Ansätze immer mit dem Plasmid phRG-TK mittransfiziert.

3.9 Proteinanalytische Methoden

3.9.1 Triton X-100 Lyse von Zellen

Die Zellen wurden vor der Lyse in der Zellkulturschale mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis in einem entsprechenden Volumen TritonX-100 Lysepuffer für 10-15min inkubiert. Dem Puffer wurde vor jeder Lyse frisch 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1mM Natriumorthovanadat, 1mM β -Glycerolphosphat, 10mg/ml Aprotinin und 10mg/ml Leupeptin zugegeben. Nach 10-15min auf Eis wurde das Zelllysat gesammelt und bei 12500g für 20min bei 4°C abzentrifugiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde entweder als Gesamtzelllysat weiterverwendet oder einer Immunpräzipitation zugeführt.

3.9.2 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der BCA Protein Assay Kit nach Angaben des Herstellers verwendet und in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Als Standard wurde eine Rinderserumalbumin-Konzentrationsreihe (100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200µg Protein/ml) eingesetzt.

3.9.3 Immunpräzipitation von Proteinen

Für die Immunpräzipitation wurden je 30µl Protein A bzw. G Sepharose und das entsprechende Antiserum (1-5µg monoklonaler oder 3-10µg polyklonaler Antikörper) zu dem Zelllysate zugegeben. Bei einem zu geringen Volumen wurde der Ansatz mit einer entsprechenden Menge 1x HNTG Puffer versetzt. Die Probe wurde danach für 3-4 Stunden bei 4°C auf einem Umlaufgerät inkubiert und die gewonnenen Immunpräzipitate bei 6500rpm und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet 3x mit 500µl eiskaltem 1x HNTG Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde dem Präzipitat 30-50µl Lämmli-Puffer zugegeben und es bei 95°C für 4min erhitzt.

3.9.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran (Western-Blot)

Abhängig vom Molekulargewicht wurden die Proteine zunächst unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen in 5-15%igen SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Das eigentliche Trenngel wurde zu diesem Zweck mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet. Nach der Gelelektrophorese der Proteine wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Transfer erfolgte mit Transblot-SD Puffer für 1-2 Stunden bei 0,8mA/cm² in einer Semidry-Blotapparatur. Um den Erfolg des Transfers zu überprüfen wurden die Proteine auf der Membran mit einer Ponceau S Lösung angefärbt.

3.9.5 Immunoblot-Analyse

Für die Immundetektion wurden die Nitrozellulosefilter zunächst mit 1x NET-Gelatine für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend erfolgte in Abhängigkeit des nachzuweisenden Proteins die Inkubation des Filters für 1 Stunde mit einem monoklonalen Maus oder polyklonalen Kaninchen Primärantikörpers. Der entsprechende Antikörper wurde hierzu (falls nicht anders angegeben) in einer Verdünnung von 1µg/ml in 1x NET-Gelatine eingesetzt. Danach wurde die Lösung mit dem Primärantikörper entfernt und der Filter 3x mit 1x NET-Gelatine gewaschen. Als nächstes folgte die Inkubation des Filters für 30min bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden mit Meerrettich Peroxidase gekoppelten Zweitantikörpers. Dieser wurde in 1x NET-Gelatine gemäß den Herstellerangaben verdünnt eingesetzt. Die Zweitantikörperlösung wurde anschließend verworfen und der Filter über einen Zeitraum von 30min mit mehrmaligem Wechseln des Überstandes mit 1x Net-Gelatine gewaschen. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit einem ECL Western Blotting Detection System gemäß den Angaben des Herstellers. Der Nachweis der Substratreaktion erfolgte auf Kodak Biomax MR-Filmen. Filter, die für weitere Nachweise mit anderen Antikörpern verwendet wurden, wurden zunächst mit Western Blot Strip-Lösung für 30min bei 50°C oder 1 Stunde bei RT inkubiert und anschließend erneut blockiert und eingesetzt.

3.9.6 Analyse von Oberflächenproteinen mittels Durchflusszyometrie (FACS)

Für die FACS-Analyse wurden mindestens 2×10^5 Zellen pro Ansatz verwendet. Die Zellen wurden falls notwendig durch Zugabe von EDTA von der Zellkulturschale gelöst und anschließend einmal mit PBS gewaschen und in 50µl PBS pro Ansatz resuspendiert. Danach wurden 50µl einer Lösung des gewünschten ersten Antikörpers in einer entsprechenden Verdünnung zugegeben und der Ansatz 30min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und einmal mit PBS gewaschen.

Anschließend wurde das Pellet mit 50µl einer Lösung des gewünschten zweiten Antikörpers in einer entsprechenden Verdünnung resuspendiert und 30min lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert, der Überstand verworfen und einmal mit PBS gewaschen. Für den Nachweis toter, unspezifisch markierter Zellen wurde das Pellet mit 400µl einer 1‰ (v/v) Propidiumjodidlösung in PBS resuspendiert. Der Nachweis spezifisch markierter Zellen erfolgte fluorometrisch durch Fluorescein Isothiocyanat (FITC).

3.9.7 Analyse von Oberflächenproteinen mittels Immunzytochemie

Für die immunzytochemische Analyse wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen auf einen Objektträger aufgespinn. Die Fixierung der Zellen erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur durch Trocknen. Die so fixierten Objektträger wurden direkt für die Färbung eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Für die APAAP-Färbung wurden die Objektträger zunächst mit PBS (pH7,6) gewaschen. Anschließend erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen mit 20% (v/v) humanen AB-Serum in PBS. Danach wurden die Objektträger 60min mit dem ersten Antikörper, entsprechend verdünnt in 10% (v/v) AB-Serum in PBS, inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Objektträger 4x 5min mit PBS gewaschen und mit einem zweiten Antikörper, entsprechend verdünnt in PBS, für 30min inkubiert. Danach wurden die Objektträger erneut 4x 5min mit PBS gewaschen und mit einer 2% (v/v) APAAP-Lösung in PBS für 30min inkubiert. Nach erneutem 4x 5min waschen mit PBS erfolgte die Detektion mittels einer Neufuchsin-Färbelösung als chromogenes Substrat. Anschließend wurden die Objektträger 5x 5min in PBS gewaschen, einmalig mit destilliertem Wasser gespült und an der Luft getrocknet. Das Eindecken erfolgte mit Gel/Mount™. Sämtliche Schritte der Färbung wurden bei Raumtemperatur und in einer feuchten Kammer durchgeführt.

3.9.8 Elektromobility Shift Assay (EMSA)

Bei den verwendeten Zellen wurde 30min vor der Lyse das alte Medium entfernt und durch vorgewärmtes, frisches Vollmedium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen in der Zellkulturschale mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis in einem entsprechenden Volumen EMSA PufferA ohne Triton X-100 für 15min inkubiert. Dem EMSA PufferA wurde vor jeder Lyse frisch 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1mM Natriumorthovanadat, 10mg/ml Aprotinin und 10mg/ml Leupeptin zugegeben. Nach 15min auf Eis wurden 0,5% (v/v) Triton X-100 zugegeben und das Zelllysate weitere 15min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Lysat gesammelt und bei 12500 g für 20 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand mit der zytosolischen Fraktion in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Das verbliebene Pellet wurde anschließend mit einer genügenden Menge EMSA PufferB versetzt und gründlich durch wiederholtes Pipetieren aufgelöst. Dem EMSA PufferB wurde vor jeder Lyse frisch 10mg/ml Aprotinin und 10mg/ml Leupeptin zugegeben. Danach wurde der nukleäre Extrakt erneut bei 12500g für 20 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Für den EMSA wurden 3-10µg nukleärer Extrakt, 0,1µg Poly(dI-dC), 5×10^4 - 1×10^5 cpm eines mit T4-Polynukleotidkinase markierten Oligos und 1xEMSA Bindungspuffer mit doppelt destilliertem Wasser auf 25µl aufgefüllt und 15-30min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle der spezifischen Bindung des Oligos wurde zu jedem Ansatz eine Kompetitionskontrolle mitgeführt. Zu diesem Zweck wurde der nukleäre Extrakt vor der Zugabe des markierten Oligos mit einem 100fachen Überschuss des entsprechenden unmarkierten Oligos für 10min vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Probe unter nicht denaturierenden und nicht reduzierenden Bedingungen in einem 5%igen Polyacrylamid-Gel. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel auf Chromatographiepapier gegeben mit Frischhaltefolie abgedeckt und in einem Gelrockner bei 50°C 30-60min getrocknet. Der Nachweis des gebundenen Oligos erfolgte auf Kodak Biomax MR-oder MS Filmen oder mit einem Fujifilm BAS-1800 II Phosphorimager.

3.10 Zellbiochemische und biologische Untersuchungen

3.10.1 Luminometrische Bestimmung von lebenden Zellen

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wurden diese in einer entsprechenden Zellzahl in weiße 96-Loch-Platten mit 100 µl Medium ausgesät. Zu den jeweiligen Messpunkten wurde die Anzahl der lebenden Zellen mit dem CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay gemäß den Herstellerangaben bestimmt.

3.10.2 Expression von Proteinen unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-regulierten Promotors

Für die Erzeugung von Zelllinien, mit einer durch Tetrazyklin oder Doxyzyklin regulierten Expression bestimmter Proteine, wurde das Tet-Off Gene Expression System gemäß dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll durchgeführt. Nach monoklonaler Selektion der Zellen wurden nur Klone verwendet, deren Expression des gewünschten Proteins spezifisch durch Tetrazyklin oder Doxyzyklin inhibiert werden konnte.

3.10.3 Invasions-Assays

3.10.3.1 *Matrigel-Tumorinvasions-Assay*

Für den Matrigel-Tumorinvasions-Assay (Albini, Iwamoto et al. 1987) wurden Transwell Platten mit einer Polycarbonat Membran (12mm Durchmesser, 12µm Porengröße) verwendet. Das Matrigel wurde in eiskaltem, sterilem, doppelt destilliertem Wasser verdünnt, auf eine Membran gegeben (25µg/Membran) und unter einer sterilen Werkbank getrocknet. 30-60min vor dem Versuch wurde das Matrigel durch Zugabe von 200µl des entsprechenden Mediums ohne FCS und

Antibiotikum bei 37°C rekonstituiert. Die Zellen wurden nach dem Ablösen von der Zellkulturschale in serumfreiem Medium mit 0,1% BSA resuspendiert und in einer Dichte von 3×10^5 - 5×10^5 Zellen/Membran in 200µl Medium verteilt. Als Chemoattraktans diente konditioniertes Medium von NIH 3T3 Zellen, welches auf den Boden der Matrigel-Kammer unterhalb der Membran gegeben wurde. Nach 6-24 Stunden wurden Zellen am Filter mit Kristallviolett-Lösung fixiert und angefärbt. Die nicht invasiven Zellen wurden mittels eines Wattestäbchens vom oberen Teil der Membran entfernt und die am unteren Teil der Membran sitzenden invasiven Zellen durch Entfärben mit Methanol und anschließender vergleichender Messung der Absorption eines Aliquots bei 540nm im ELISA-Reader bestimmt. Alternativ wurden die Zellen mittels Trypsin vom unteren Teil der Membran gelöst und der Anteil der invasiven Zellen mit dem CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay gemäß den Herstellerangaben bestimmt. Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurden NIH 3T3 Zellen solange in einer Zellkulturschale kultiviert, bis sie eine Konfluenz von 100% erreicht hatten. Danach wurde das Vollmedium gegen Medium ohne FCS und Antibiotika ausgetauscht und für 24 Stunden auf den Zellen gelassen. Das Medium wurde vor der Zugabe mit 50µg/ml Ascorbinsäure und 0,1% Rinderserumalbumin versetzt. Danach wurde das konditionierte Medium steril filtriert und direkt verwendet oder bei -20°C gelagert.

3.10.3.2 *Hühnerei-Choreonallantoismembran (CAM)-Assay*

3.10.3.2.1 *Semiquantitative Auswertung des CAM Assay mittels Endpunkt-PCR*

Hinsichtlich der Durchführung der Methode wurde das Originalprotokoll der Arbeitsgruppe von Ossowski et al. mit einigen Modifikationen verwendet (Kim, Yu et al. 1998). Befruchtete und unbebrütete SPF Eier wurden nach dem Einlegen in die Brutkästen neun Tage inkubiert. Vor dem Beimpfen wurde bei allen Eiern die Ausbildung von Blutgefäßen mit Hilfe einer Auflichtlampe überprüft. Es wurde jeweils eine deutlich zu erkennende Verzweigung der Gefäße gesucht und auf der Schale markiert.

Danach wurde an der vorher markierten Stelle mit einem Diamantbohrer ein Loch in der Schale, sowie ein Zugang zum Luftsack des Eies gesetzt. Anschließend wurde das Ei so gehalten, dass die markierte Stelle nach oben zeigt und durch Ansetzen eines Vakuums die Luft aus dem Luftsack angezogen, wodurch sich die CAM an der perforierten Stelle von der Eischale ablöst. Nach Schaffung eines Fensters in der über dieser künstlichen Kammer liegenden Eischale wurden die Zellen auf der CAM inokuliert und die Eier für die gewünschte Zeit bebrütet. Zur Darstellung der Intravasation wurde die untere Chorionallantoismembran durch horizontales Aufschneiden der Eier und Abkippen des Inhaltes gewonnen und die genomische DNA der Membran mit dem Genomic DNA Purification Kit der Fa. Genra aufgearbeitet. Hierzu wurde das Material in jeweils 8-10ml Cell Lysis Solution und 100µg/ml Proteinase K unter Zuhilfenahme eines Dispergierstabes homogenisiert und über Nacht bei 55°C in einem Schüttler lysiert. Alternativ erfolgte die Lyse in 8-10ml DNAzol und 100µg/ml Proteinase K über Nacht im Schüttler bei 25°C. Alle weiteren Schritte erfolgten bei beiden Protokollen gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben, lediglich die Mengen wurden an das verwendete Lysevolumen angepasst. Die präzipitierte DNA wurde in 100-500µl des entsprechenden empfohlenen Puffers resuspendiert. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch photometrische Messung der Absorption bei 260nm (OD₂₆₀-Wert). Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Absorption bei 280nm (OD₂₈₀-Wert). Es wurden nur DNA verwendet, die eine Ratio OD₂₆₀/OD₂₈₀ von ~1,8 erreichten. Die Qualität der DNA wurde routinemäßig durch Auftrennung in einem TAE-Agarosegel überprüft. Für die semiquantitative PCR wurde der „puReTaq Ready-To-Go PCR Beads“ Kit verwendet. Es wurden die humanen Alu-Primer ALU-Sense und ALU-Antisense mit einer Endkonzentration von 0,4µM verwendet, die ein spezifisches Produkt von 220bp amplifizieren. Die radioaktive Markierung erfolgte durch Zugabe von 2µCi P³² α-dCTP zum Ansatz. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1.Schritt	Denaturierung	95°C, 5min	1 Zyklus
2.Schritt	Denaturierung	95°C, 30s	
	Anlagerung	63°C, 45s	
	Amplifikation	72°C, 45s	10 Zyklen, mit jeweils - 0,5°C/Zyklus
3.Schritt	Denaturierung	95°C, 30s	
	Anlagerung	59°C, 45s	
	Amplifikation	72°C, 45s	15 Zyklen
4.Schritt	Amplifikation	72°C, 10min	1 Zyklus

Anschließend erfolgte die Auftrennung der Fragmente unter nicht denaturierenden und nicht reduzierenden Bedingungen in einem 7%igen Polyacrylamid-Gel. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel auf Chromatographiepapier gegeben mit Frischhaltefolie abgedeckt und in einem Gelrockner bei 50°C 30-60min getrocknet. Der Nachweis der markierten Fragmente erfolgte auf Kodak Biomax MR-oder MS Filmen oder mit einem Fujifilm BAS-1800 II Phosphorimager.

3.10.3.2.2 Quantitative Auswertung des CAM Assays mittels Real-Time-PCR und TaqMan®-Proben

Für die Real-Time-PCR wurde genomische DNA aus Zelllinien oder Gewebe isoliert und mittels TaqMan® PCR Core Reagent Kit, TaqMan® Universal PCR Master Mix, SYBR® Green PCR Master Mix oder SYBR® Green PCR Core Reagent Kit gemäß den vom Hersteller empfohlenen Angaben mit den gewünschten Primern und Sonden untersucht. Für die Amplifikation wurde ein ABI PRISM® 7900HT der Firma Applied Biosystem, USA verwendet. Die Ansätze wurden jeweils in Triplikaten im 96well Format mit einem Gesamtvolumen von 25µl pro Loch angesetzt. Für das Design der Primer und Proben wurde die Software Primer Express der Firma Applied Biosystem, USA verwendet.

Als Template für die Primer und Proben diente die Sequenz der Alu-YB8 Subfamilie (Batzner, Deininger et al. 1996; Walker, Kilroy et al. 2003). Die Umrechnung der Zellzahlen in Genomgrößen basiert auf den unter www.genomsize.com veröffentlichten Daten diploider Genome: *Mus musculus* 6,5pg, *Gallus domesticus* 2,5pg und *Homo sapiens* 7pg.

Die PCR mit den Alu-spezifischen Primern YB8FWD und YB8REV wurde unter den folgende Bedingungen durchgeführt: Initiale Denaturierung für 10min bei 95°C gefolgt von 40 Zyklen mit 15s bei 95°C und 1min bei 74°C für Hybridisierung und Amplifikation. Es wurde der SYBR® Green PCR Core Reagent Kit verwendet mit 3mM MgCl₂ und einer Endkonzentration der Primer von jeweils 1µM. Die PCR mit den Alu-spezifischen Primern YB8FWD68, YB8REV244 und der TaqMan®Probe167 wurde unter den folgende Bedingungen durchgeführt: Initiale Denaturierung für 10min bei 95°C gefolgt von 40 Zyklen mit 15s bei 95°C und 1min bei 60°C für Hybridisierung und Amplifikation. Es wurde der TaqMan® Universal PCR Master Mix verwendet. Die PCR mit den Alu-spezifischen Primern YB8FWD182, YB8REV244 und der TaqMan®Probe202 wurde unter den folgende Bedingungen durchgeführt: Initiale Denaturierung für 10min bei 95°C gefolgt von 40 Zyklen mit 15s bei 95°C und 1min bei 60°C für Hybridisierung und Amplifikation. Es wurde der TaqMan® Universal PCR Master Mix verwendet. Nach der Ermittlung der optimalen Primerkonzentrationen für die Real-Time PCR wurden nur noch die Primer YB8FWD68, YB8REV244 mit einer Endkonzentration von 0,9µM und die TaqMan®Probe167 mit einer Endkonzentration von 250nM verwendet.

3.11 Quantifizierung und statistische Auswertung

Für die quantitative Auswertung der Phosphoimagerdaten wurde die Software AIDA Image Analyser Version 3.44.035 verwendet. Alternativ erfolgte bei nichtradioaktiven Proben die Auswertung der belichteten Filme mit der Software Scion Image Version Beta 0.4.0.2 der Firma Scion Corporation, USA. Die Auswertung der Daten der quantitativen PCR erfolgte mit der Software ABI PRISM 7000 SDS der Firma Applied Biosystem, USA. Für die Auswertung der Daten der FACS Analysen wurde die Software WinMDI Version 2.8 verwendet. Bei Bedarf wurden die Werte in eine

Microsoft Excel Datei exportiert und die Durchschnittswerte und Standardabweichung für jeden Messpunkt kalkuliert.

Die Signifikanz der Unterschiede zwischen unabhängigen Gruppen wurde bei Annahme einer Nicht-Normalverteilung der Daten mit dem Wilcoxon-Test für nicht verbundene Stichproben mit der Software SPSS Version 12.0 berechnet. Signifikanz wurde bei einem Alpha-Fehler von $p < 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Regulation des Invasionsgens uPAR durch den Tumorsuppressor Pdc4

4.1.1 Reziproke Expression von Pdc4 und uPAR in gastrointestinalen Zelllinien

Erste Studien gaben Grund zu der Vermutung, dass es sich bei Pdc4 um ein Protein handelt, welches eine Rolle im Ablauf des programmierten Zelltodes spielt (Shibahara, Asano et al. 1995). Bislang konnte aber eine Funktion von Pdc4 im Zusammenhang von Apoptose nicht weiter unterlegt werden. Neuere Studien legen viel mehr den Schluss nahe, dass es sich bei Pdc4 um ein Protein handelt, das bei der Suppression der neoplastischen Transformation von Zellen eine Rolle spielt. Eine biologische Funktion als Tumorsuppressor wird auch durch den Nachweis einer verminderten Expression des Proteins in renalen, Lungen- und Gliatumoren und den entsprechenden Tumorzelllinien unterlegt (Chen, Knosel et al. 2003). Dabei ist aber noch kaum bekannt, über welche Signalkaskaden oder Transkriptionsfaktoren dieser Einfluss von Pdc4 vermittelt wird und welche Schritte in der Tumorprogression gerade im Hinblick auf Invasion und Metastasierung von Pdc4 eventuell reguliert werden. In einem ersten Ansatz sollte zunächst die Expression von Pdc4 in verschiedenen gastrointestinalen Zelllinien untersucht werden, denn im Gegensatz zu der gut beschriebenen Expression von uPAR in diesen Tumorzelllinien lagen bisher keine Studien über die endogene Expression von Pdc4 im Zusammenhang mit gastrointestinalen Tumoren vor (Boyd, Florent et al. 1988). Folgende Schritte sollten dann erstmals eine mögliche Regulation des uPAR durch Pdc4 untersuchen. Die endogene Expression von uPAR und Pdc4 wurde in verschiedenen Kolonkarzinom- und Magenkarzinomzelllinien auf mRNA- und Proteinebene mittels RT-PCR- und Western-Blot-Analyse untersucht. Die für die Western-Blot-Analyse eingesetzten Antikörper erkennen humanen uPAR mit einem Molekulargewicht von 55-60kDa und humanes Pdc4 mit einem Molekulargewicht von 64kDa (Abb.6A).

Dabei zeigte sich, dass in Zelllinien mit einem relativ hohen endogenen uPAR Proteingehalt nur relativ geringe Mengen an endogenem Pdc4 zu finden sind. Umgekehrt zeigen Zelllinien mit einer relativ geringen endogenen Expression von uPAR eine hohe endogene Proteinmenge Pdc4. Typische Beispiele sind die Kolonkarzinomzelllinien RKO (Abb.6A, Spur1) und HCT-GEO (Abb.6A, Spur2), in denen sich diese reziproke Expression der beiden Proteine deutlich nachweisen lässt. Diese Beobachtung wird auch durch den Nachweis der entsprechenden mRNA-Mengen in den untersuchten Zelllinien belegt (Abb.6B). Auch hier zeigt sich nach der Untersuchung der mRNA-Mengen im direkten Vergleich die gleiche reziproke Verteilung in den verwendeten Zelllinien. Dies führte zu der Hypothese einer inversen Regulation der beiden Proteine in den gezeigten Karzinomzelllinien.

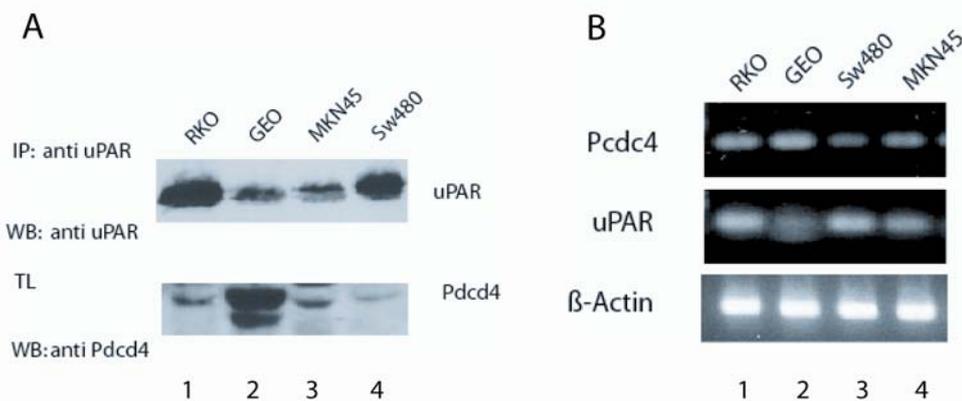


Abb.6: Reziproke Expression von uPAR und Pdc4 in verschiedenen gastrointestinalen Zelllinien. (A) Für den Nachweis von uPAR-Protein wurden Zelllysate einer Immunpräzipitation (IP) mit einem polyklonalen uPAR Antikörper (Mazar anti-uPAR) unterzogen. Für den Nachweis von Pdc4 Protein wurde Totallysat (TL) verwendet. Die Auftrennung erfolgte in einer 10%igen SDS-PAGE. Der Nachweis von uPAR und Pdc4 Protein erfolgte mittels Western-Blot (WB) mit einem monoklonalen Antikörper für uPAR (3937) und einem polyklonalen Antikörper für Pdc4 (anti-Pdc4). (B) Für den Nachweis von uPAR- und Pdc4-Transkripten wurde mRNA aus den Zellen isoliert und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Der Nachweis von uPAR (227bp) und Pdc4 (286bp) mRNA erfolgte mit spezifischen Primern für uPAR (uPARFWD/REV) und Pdc4 (Pdc4REV/FWD). Als Kontrolle zur Normalisierung der Ergebnisse wurde ein 300bp großes Fragment der mRNA von β -Actin mit spezifischen Primern (β -ActinFWD/REV) amplifiziert. Die Amplifikationsprodukte wurden in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und nach Anfärben mit Ethidiumbromid ausgewertet.

4.1.2 Pdc4 vermindert die mRNA- und Proteinmenge von uPAR auf der Zelloberfläche der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116

Die Kolonkarzinomzelllinien HCT-116 und RKO zeigen beide eine hohe Expression von uPAR, sowohl im Totallysate als auch auf der Oberfläche lebender Zellen (Daten nicht gezeigt) und zeigen ähnlich hohe Mengen an endogen exprimiertem Pdc4 (Abb.6). In diesem Modell sollte entsprechend überprüft werden, ob die Überexpression von Pdc4 die Expression von uPAR auf mRNA- und Proteinebene reguliert. Für beide Fragestellungen wurden HCT-116-Zellen mit einem Pdc4-Expressionsplasmid transfiziert. Danach wurde die mRNA der Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben, und unter Verwendung spezifischer Sonden gegen uPAR- und β -Actin-mRNA mittels Northern-Blot die entsprechenden Transkripte nachgewiesen. Als Vergleich dienten mit dem leeren Expressionsplasmid transfizierte Zellen (Abb.7). Die Expression von Pdc4 wurde mittels Western-Blot überprüft (Abb.7A). Nach Transfektion der Zellen mit dem Expressionsplasmid für Pdc4 zeigte sich eine deutliche Proteinbande bei 64kDa (Abb.7A, Spur 2). In der Northern-Blot-Analyse konnte, nach Normalisierung der Daten mit β -Actin, in diesen Zellen eine Reduktion von der uPAR-mRNA im Vergleich zu der Kontrolltransfektion nachgewiesen werden (Abb.7B, Spur 2).

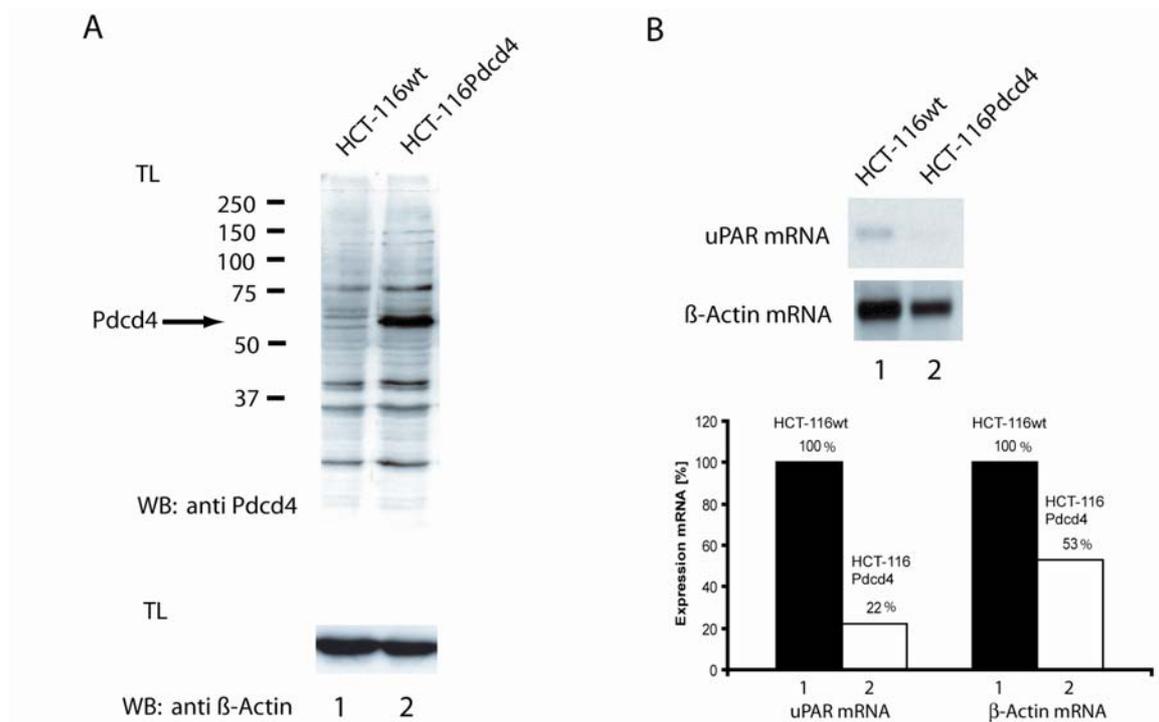


Abb.7: Pdc4 vermindert die Menge endogener *steady-state* uPAR-mRNA. Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 wurden transient mit einem Pdc4-Expressionsplasmids (pcDNA3.1(-)pdcd4) oder dem leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1(-)) transfiziert. **(A)** Für den Nachweis von Pdc4-Protein wurde Totallysate (TL) verwendet. Die Auftrennung erfolgte in einer 10%igen SDS-PAGE. Der Nachweis von Pdc4-Protein erfolgte mittels Western-Blot (WB) mit einem polyklonalen Antikörper für Pdc4 (anti-Pdc4). Als Konzentrationskontrolle wurde zusätzlich mit einem polyklonalen Antikörper gegen β -Actin (AC-15) immunoblottet. Der Molekulargewichtsstandard ist links in kDa angegeben. **(B)** Für den Nachweis von uPAR Transkripten wurde mRNA aus den Zellen isoliert und mittels Northern-Blot-Analyse untersucht. Die Normalisierung der uPAR-mRNA Menge erfolgte über den Nachweis von β -Actin-mRNA aus dem gleichen Ansatz. Die quantitative Auswertung erfolgte mit der Software Scion Image Version Beta 0.4.0.2. Die in diesem Ansatz gemessenen Intensitätsunterschiede sind als Balkendiagramm dargestellt.

Die Präsenz eines Proteins in der Zelle wird zum einen durch die Stabilität der mRNA und der damit verbundenen Translationseffizienz und zum anderen durch die Stabilität des Proteins selbst reguliert. Somit muss das Expressionsniveau von uPAR auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Zellen nicht die tatsächlich vorhandene Proteinmenge auf der Oberfläche widerspiegeln. Ferner kann die Proteinsynthese durch Mutationen beeinträchtigt werden. Der Nachweis der Oberflächenexpression von uPAR in den transfizierten Zellen erfolgte nach Aufbringen der Zellen auf Objekträger mittels APAAP Färbung und dem monoklonalen uPAR Antikörper R3. Die Expression von uPAR zeigt sich in einer rötlichen Anfärbung der Zelloberfläche (Abb.8). Eine als Negativkontrolle verwendete Isotypenkontrolle zeigte keine Anfärbung der verwendeten Zellen. Im direkten Vergleich der Pdc4-überexprimierenden zu den mit Leervektor transfizierten HCT-116-Zellen konnte eine deutlich schwächere Anfärbung in den Pdc4 überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden (Abb.8B). Dieses Ergebnis stützt die reziproke Regulierung von Pdc4 und uPAR in Kolonkarzinomzelllinien. Eine Überexpression von Pdc4 inhibiert die Transkription von uPAR auf mRNA-Ebene, sowie die Expression des Rezeptors auf der Oberfläche der untersuchten Zellen.

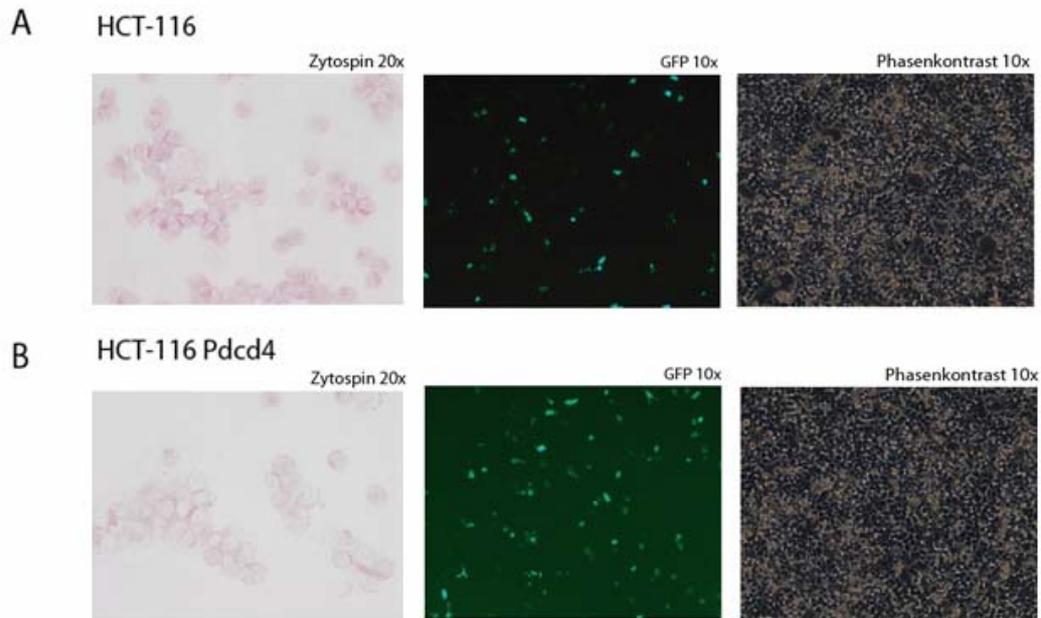


Abb.8: Pdc4 vermindert die Oberflächenexpression von uPAR. Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 wurden transient (**A**) mit einem Pdc4 Expressionsplasmids (pcDNA3.1(-)pdc4) oder (**B**) dem leeren Expressionsvektors (pcDNA3.1(-)) transfiziert. $2,5 \times 10^5$ der verwendeten Zellen wurden auf Objektträger aufgebracht. Der Nachweis von uPAR-Protein, auf der Oberfläche der Zellen, erfolgte mit einem primären uPAR Antikörper (R3; 1:200) und einem sekundären Kaninchen gegen Maus Antikörper (Rabbit Anti-Mouse IgGs; 1:25). Nach Inkubation der Objektträger mit einer APAAP-Lösung, erfolgte die Detektion mittels einer Neufuchsin-Färbelösung. Für die Transfektionskontrolle wurden die Zellen zusätzlich in jedem Ansatz mit $1 \mu\text{g}$ eines GFP-Expressionsplasmid Plasmids transfiziert.

4.1.3 Pdc4 inhibiert den Promotor des *uPAR*-Gens in der Kolonkarzinomzelllinie RKO

Es ist bekannt, dass die Expression des *uPAR*-Gens in Kolonkarzinomzelllinien maßgeblich transkriptionell durch verschiedene *cis*-aktive Elemente des Promotors reguliert wird (Wang, Skibber et al. 1994; Lengyel, Wang et al. 1996; Allgayer, Wang et al. 1999). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob der Einfluss von Pdc4 auf die Expression von uPAR durch Beeinflussung der transkriptionalen Aktivität des uPAR-Promotors zu erklären ist. Die Kolonkarzinomzelllinie RKO ist charakterisiert durch eine hohe endogene uPAR-Promotoraktivität, die für die hohe *uPAR*-Genexpression verantwortlich ist. Diese Promotoraktivität wird maßgeblich durch eine Region -403/+47bp relativ zum Start der Transkription innerhalb des Promotors vermittelt (Lengyel, Wang et al. 1996; Allgayer, Wang et al. 1999; Dang, Boyd et al. 1999; Wang, Dang et al. 2000; Hapke, Gawaz et al. 2001). RKO Zellen wurden transient mit einem CAT-Reporter Plasmid dessen Reporterexpression durch einen 449bp langes Element des basalen uPAR-Promotors reguliert wird, transfiziert. Es zeigte sich eine signifikante ($p < 0,05$, Wilcoxon-Test für nicht verbundene Stichproben) dosisabhängige Reduktion der Reporterexpression bei zunehmender Expression von Pdc4 (Abb.9).

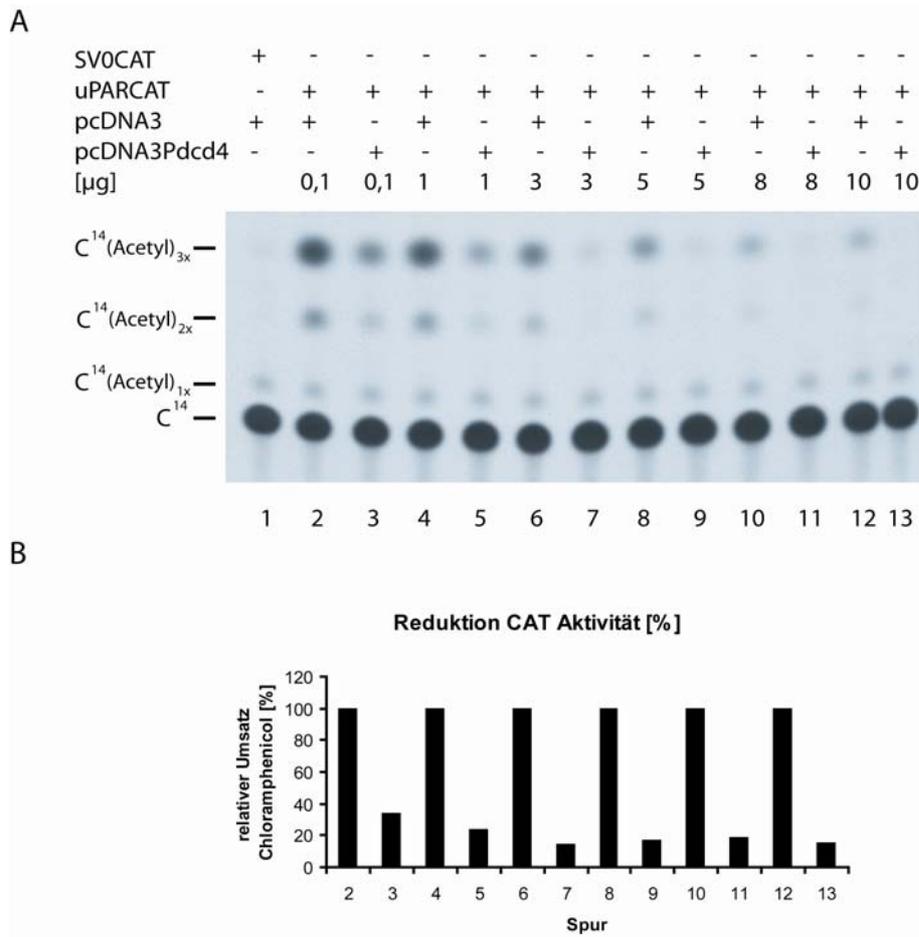


Abb.9: Dosisabhängige Suppression der uPAR Promotor Aktivität im CAT-Assay durch Pdc4.

(A) RKO Zellen mit einer Dichte von 80% Konfluenz wurden transient mit den angegebenen Mengen eines CAT-Reporterplasmids reguliert durch eine 398bp lange Sequenz des uPAR Promotors (uPAR CAT) und den angegebenen Mengen entweder des Leeren Expressionsvektors (pcDNA3.1(-)) oder des entsprechenden Pdc4-Expressionsplasmids (pcDNA3.1(-)pdcd4) transfiziert. Als Negativkontrolle wurden parallel zu den Ansätzen RKO mit 5 μ g eines CAT-Reporterplasmid ohne Promotoraktivität (SVOCAT) transfiziert. Für die Transfektionskontrolle wurden die Zellen zusätzlich in jedem Ansatz mit 3 μ g eines Luciferase-Reporter Plasmids transfiziert. Nach Normalisierung der Transfektionseffizienz wurden die Ansätze im CAT Assay auf die Umsetzung von Chloramphenicol durch die Chloramphenicolacetyltransferase getestet. Der Nachweis des acetylierten Chloramphenicols erfolgte nach Chromatographie autoradiographisch. C14 = nicht umgesetztes Chloramphenicol, C14(Acetyl)1-3x = ein-, zwei- und dreifach acetyliertes Chloramphenicol.

(B) Die quantitative Auswertung erfolgte mit einem Fujifilm BAS-1800 II Phosphorimager. Die in diesem Ansatz gemessenen relativen Umsätze von Chloramphenicol sind als Balkendiagramm dargestellt. Die innerhalb des Versuchansatzes, durch das Pdc4-Expressionsplasmid erreichte, durchschnittliche Reduktion der CAT-Aktivität war signifikant ($p < 0.05$).

Zusätzlich wurden RKO-Zellen transient mit einem Luciferase-Reporter Plasmid transfiziert. Dessen Reporterexpression wird durch einen, um eine 1071bp lange Sequenz vor dem basalen Promotor erweitern, uPAR-Promoters reguliert. Auch in diesem Ansatz zeigte sich die signifikante ($p < 0,05$, Mann-Whitney-Wilcoxon-Test für nicht verbundene Stichproben) dosisabhängige Reduktion der Reporterexpression bei Expression von Pdc4 (Abb.10).

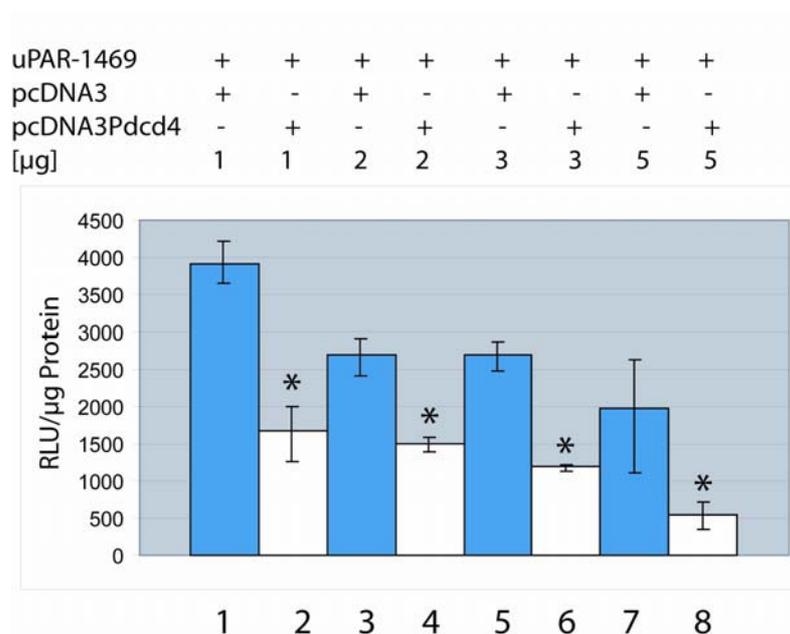


Abb.10: Dosisabhängige Suppression der uPAR Promotor Aktivität im Luciferase-Assay durch Pdc4. RKO-Zellen mit einer Dichte von 80% Konfluenz wurden transient mit den angegebenen Mengen eines Luciferase-Reporterplasmids reguliert durch eine 1469bp lange Sequenz des uPAR-Promoters (uPAR-1469) und den angegebenen Mengen entweder des leeren Expressionsvektors (pcDNA3.1(-)) oder des entsprechenden Pdc4 Expressionsplasmids (pcDNA3.1(-)pdcd4) transfiziert. Für die Transfektionskontrolle wurden die Zellen zusätzlich in jedem Ansatz mit 0,5 μ g eines Renillaluciferase-Reporterplasmid transfiziert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten nach Normalisierung der Transfektionseffizienz. Die durch das Pdc4-Expressionsplasmid erreichte Reduktion der Luziferaseaktivität war in den mit (*) gekennzeichneten Experimenten signifikant ($p < 0,05$).

Um diese Ergebnisse weiter zu unterstützen, wurden RKO Zellen stabil mit einem Pdc4 Expressionsplasmid transfiziert, dessen Expression durch Tetrazyklin gesteuert werden kann. In allen Experimenten wurde Tetrazyklin durch das Derivat Doxyzyklin ersetzt. Doxyzyklin hat den Vorteil einer doppelt so langen Halbwertszeit im Medium der Zellen und wirkt in einer 10fach geringeren Dosierung. Nach Selektion stabiler Klone konnte gezielt die Expression von Pdc4 in diesen Zellen, durch Zugabe von Doxyzyklin zum Medium, reguliert werden (Abb.11A). Nach 96 Stunden Kultivierung der Zellen in doxyzyklinfreiem Medium war eine Reduktion der Expression von Pdc4 um 84% nachweisbar (Abb.11B, Spur 5 und 6). Die durch Doxyzyklin regulierbaren RKO Klone (Abb.11C, Spur 3) und Wildtyp-RKO-Zellen (Abb.11C, Spur 2) wurden danach transient mit einem CAT-Reporter Plasmid, dessen Reporterexpression durch einen 449bp langes Element des uPAR Promotors reguliert wird, transfiziert und der Einfluss der Pdc4 Expression auf die uPAR Promotoraktivität verglichen. Es zeigte sich auch hier eine Reduktion der konstitutiven Promotoraktivität in den Doxyzyklin regulierten, Pdc4 exprimierenden Zellen (Abb.11B).

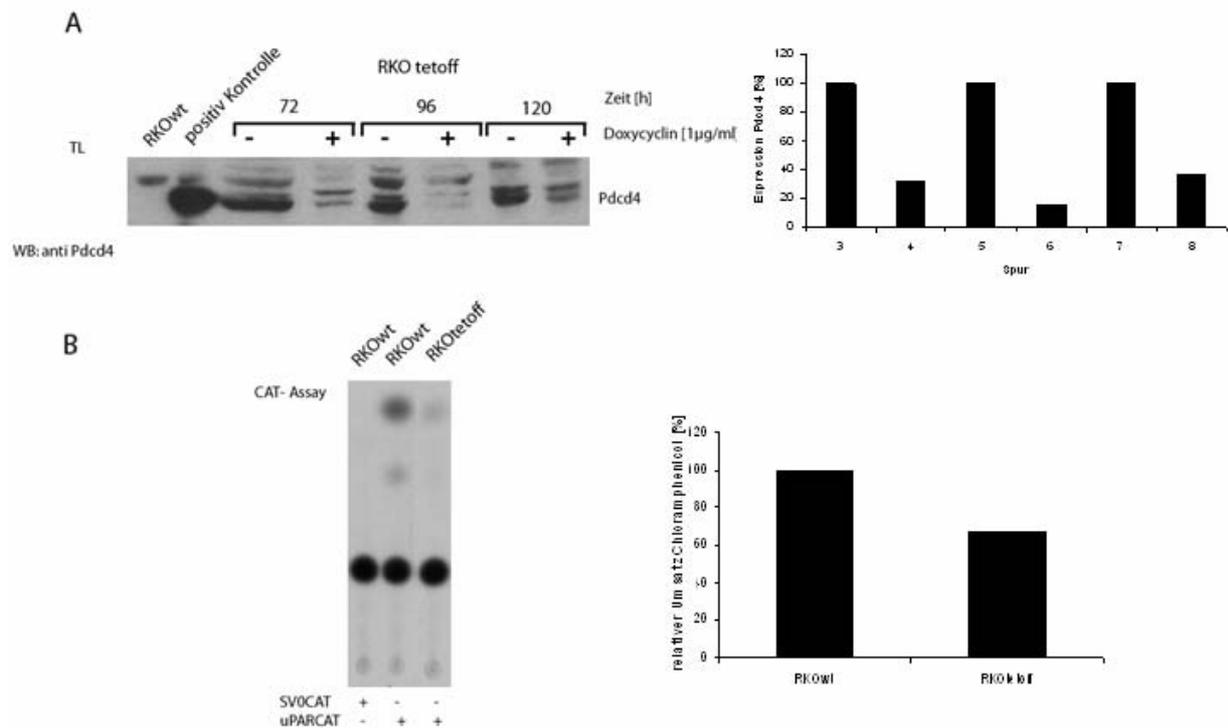


Abb.11: Suppression der uPAR Promotoraktivität in einem stabil transfizierten und tet-regulierbaren Pdc4-exprimierenden RKO Klon. (A) RKO-Kolonkarzinomzellen wurden stabil mit einem Tetrazyklin-regulierbaren Expressionsplasmid transfiziert. Die Zellen wurden nach Inhibition durch Doxyzyklin, einem stabileren Derivat des Tetrazyklin, lysiert und gleiche Mengen Totallysat verwendet. Die Auftrennung erfolgte in einer 10%igen SDS-PAGE. Der Nachweis von Pdc4-Protein erfolgte mittels Western-Blot (WB) mit einem polyklonalen Antikörper für Pdc4 (anti-Pdc4). Als Positiv-Kontrolle diente ein Lysat von HEK 293 Zellen, die transient mit einem Pdc4-Expressionsplasmid transfiziert wurden. Die Quantitative Auswertung erfolgte mit der Software Scion Image. Die in diesem Ansatz gemessenen Intensitätsunterschiede sind als Balkendiagramm dargestellt. **(B)** Stabil mit einem tet-regulierbaren Pdc4-Expressionsplasmid transfizierte RKO-Kolonkarzinomzellen wurden transient mit Wildtyp-uPAR-Promoter (uPARCAT) transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und hinsichtlich CAT Aktivität getestet. Parallel hierzu wurden Zellen mit uPARCAT als Positiv- und SV0CAT als Negativ-Kontrollen transfiziert. Die quantitative Auswertung erfolgte mit einem Fujifilm BAS-1800 II Phosphorimager. Der in diesem Ansatz gemessene relative Umsatz von Chloramphenicol ist als Balkendiagramm dargestellt.

4.1.4 Einfluss von Pdc4 auf verschiedene *cis*-Elemente des uPAR-Promotors

Nachdem die Reporteranalysen mit den Konstrukten des basalen und eines erweiterten uPAR-Promotors gezeigt hatten, dass die Expression von Pdc4 signifikant die Aktivität des uPAR-Promotors inhibiert, sollten nun potentielle Sequenzen lokalisiert werden, über die Pdc4 seinen Einfluss ausübt. In der Promotorregion des humanen *uPAR*-Gens finden sich mehrere gut beschriebene Promotorsequenzen, die für die Regulation der Promotoraktivität entscheidend sind (Dang, Boyd et al. 1999; Wang, Dang et al. 2000). Daneben wurden in den letzten Jahren weitere Sequenzen für Transkriptionsfaktoren gefunden, die nach verschiedenen Stimuli in der Lage sind, die transkriptionelle Aktivität des uPAR-Promotors zu steuern (Lengyel, Wang et al. 1996; Allgayer, Wang et al. 1999; Hapke, Gawaz et al. 2001). Zu diesem Zweck wurden Pdc4-transfizierten Zellen der Kolonkarzinomzelllinie RKO mit verschiedenen Luciferasereporterkonstrukten transfiziert, die verschiedene Deletionen und Mutationen einer 1498bp langen Sequenz des uPAR-Promotors enthalten (Hapke, Gawaz et al. 2001). Dabei zeigte sich, dass der inhibitorische Effekt einer Überexpression mit Pdc4 durch ein Promotorkonstrukt mit einer Deletion in der Promotorregion -402/-350 aufgehoben wurde (Abb.12, Spuren 3 und 4), mit möglichen Bindungssequenzen für die Transkriptionsfaktoren Sp-1, NF-1 und GATA-2 (Hapke, Gawaz et al. 2001). Im gleichen Ansatz wurden auch spezifische Mutationen der KonsensusMotive für die Transkriptionsfaktoren PEA3/ets und AP-1 an den Positionen -248 und 184 relativ zum Transkriptionstart mit der Wildtyppromotorsequenz verglichen (Abb.12, Spuren 11-14) (Lengyel, Wang et al. 1996; Hapke, Gawaz et al. 2001). Im Gegensatz zu der AP-1 Mutation, die keinen signifikanten Einfluss zeigte, konnte die Mutation des PEA3/ets Motivs ebenfalls, die durch Pdc4 induzierte Suppression des uPAR Promotors, abschwächen.

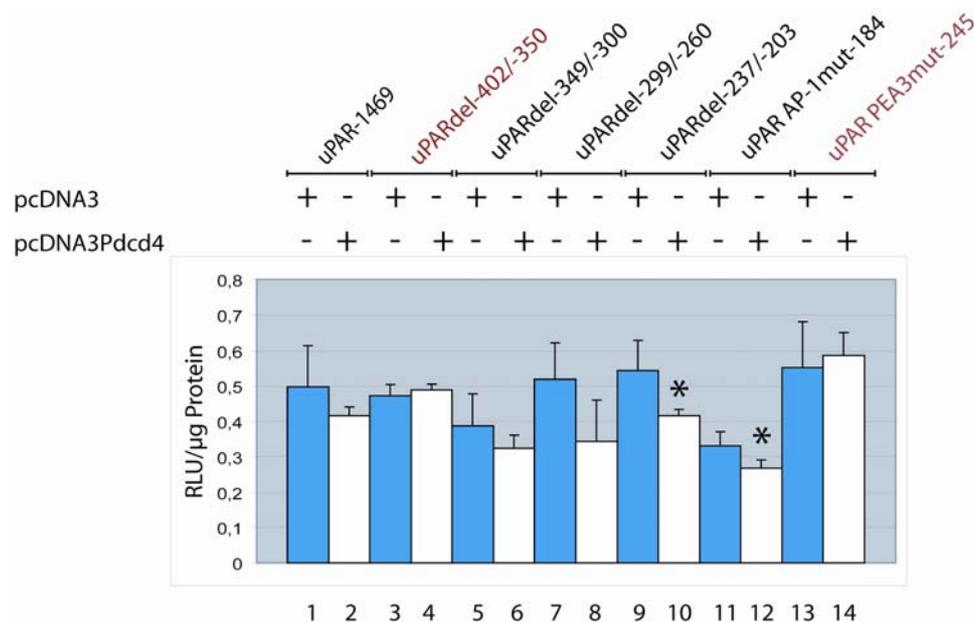


Abb.12: Der Einfluss von Pdc4 auf die Promotoraktivität wird über Region -402/-350bp und ein PEA3/ets Element (-245bp) vermittelt. RKO Zellen mit einer Dichte von 80% Konfluenz wurden transient mit 1µg des angegebenen und 3µg des leeren Expressionsvektors (pcDNA3.1(-)) oder des entsprechenden Pdc4 Expressionsplasmids (pcDNA3.1(-)pdcd4) transfiziert. Die Luciferase-Reporterplasmide werden durch eine 1469bp lange Sequenz des uPAR Promotors (uPAR-1469) oder den angegebenen Deletionen und Mutationen des uPAR Promotors reguliert. Für die Transfektionskontrolle wurden die Zellen zusätzlich in jedem Ansatz mit 0,5µg eines Renillaluciferase-Reporterplasmid transfiziert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten nach Normalisierung der Transfektionseffizienz. Die durch das Pdc4-Expressionsplasmid erreichte Reduktion der Luziferaseaktivität war in den mit (*) gekennzeichneten Experimenten signifikant ($p < 0,05$).

Zusätzlich wurde überprüft, ob ein AP-1 Konsensusmotiv an Position -190/-171 und ein Abschnitt des Promotors mit einem kombinierten Motiv für ein AP-2 ähnliches Protein, Sp-1 und Sp-3 innerhalb einer 398bp langen Region des basalen uPAR Promotors, welches durch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe näher charakterisiert wurde, als potentielle Mediatoren für die Pdc4-vermittelte Regulation des uPAR Promotors in Frage kommen (Lengyel, Wang et al. 1996; Allgayer, Wang et al. 1999).

Hierfür wurden CAT-Reporterplasmide in RKO-Zellen getestet, deren Expression durch verschiedene Mutationen einer 398bp langen Sequenz des uPAR Promotors gesteuert wird, welche die Bindung von AP-1 an die Region -190/-171, Sp-1/Sp-3 an Region und AP-2/Sp-1 sowie Sp-3 an Region -152/-135 verhindern (Abb.13). Die Mutation, welche zum Verlust der Bindung von AP-1 führt, zeigte in diesem Versuch keinen Einfluss auf die durch Pdc4 vermittelte Suppression der Promotoraktivität (Abb.13, Spuren 3 und 7). Im Gegensatz dazu hob die Mutation für die Sp-1/Sp-3 Bindungsstellen in der Region -152/-135, die Suppression des uPAR-Promotors durch Pdc4 nahezu auf (Abb.13, Spuren 4 und 8). Wurde für den Ansatz eine Mutation aller Bindungsstellen für AP-2, Sp-1 und Sp-3 innerhalb der Region -152/-135 verwendet, konnte kein Einfluss von Pdc4 auf die Promotoraktivität des Rezeptors beobachtet werden (Abb. 13, Spuren 5 und 9). Zusammenfassend lassen die Daten den Schluss zu, dass die Suppression potentiell durch Bindung von Transkriptionsfaktoren an Elemente an den Positionen -402/-350, -152/-135 und -245 relativ zum Transkriptionsstart vermittelt wird. Darüber hinaus lässt der Nachweis einer Beteiligung der Region -152/-135 mit Mutationen innerhalb der Sequenz für die Bindung von Sp-1 und Sp-3 einen direkten Einfluss dieser Transkriptionsfaktoren vermuten.

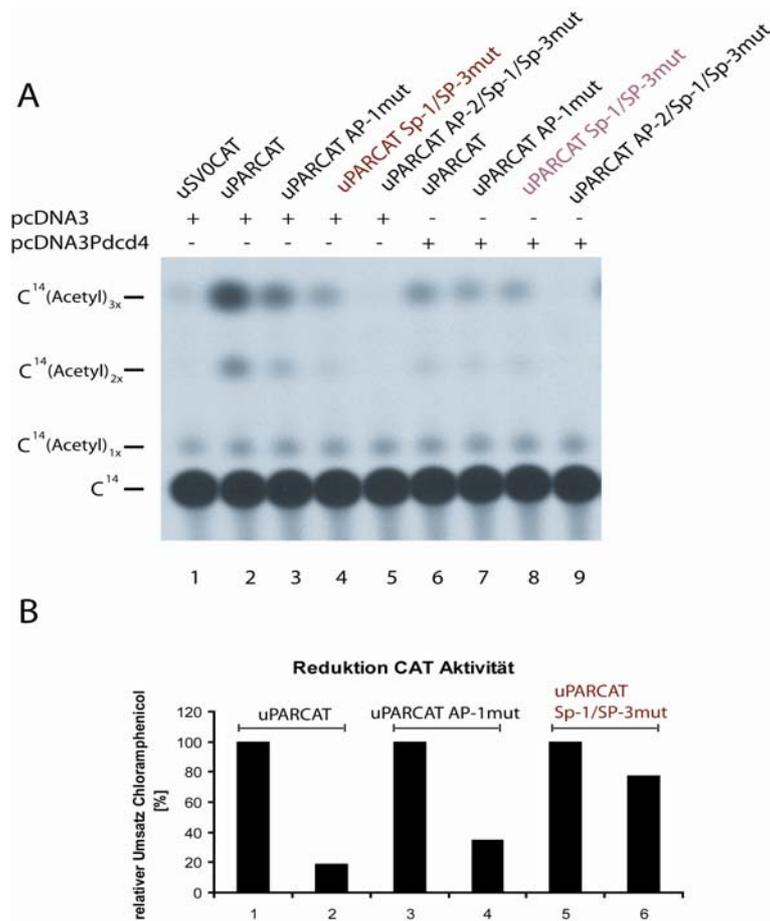


Abb.13: Funktionelle Beteiligung von Transkriptionsfaktoren der Sp-1 Familie an der Pdc4 vermittelten uPAR Promotor Suppression. (A) RKO Zellen mit einer Dichte von 80% Konfluenz wurden transient mit 5µg eines CAT-Reporterplasmids, reguliert durch eine 398bp lange Sequenz des uPAR Promotors (uPAR CAT) oder den angegebenen Mutationen des uPAR Promotors, und 3µg entweder des leeren Expressionsvektors (pcDNA3.1(-)) oder des entsprechenden Pdc4 Expressionsplasmids (pcDNA3.1(-)pcd4) transfiziert. Als Negativkontrolle wurden parallel zu den Ansätzen RKO mit 5µg eines CAT-Reporterplasmid ohne Promotoraktivität (SV0CAT) transfiziert. Für die Transfektionskontrolle wurden die Zellen zusätzlich in jedem Ansatz mit 0,5µg eines Luciferase-Reporter Plasmids transfiziert. Nach Normalisierung der Transfektionseffizienz wurden die Ansätze hinsichtlich der CAT-Aktivität getestet. Der Nachweis des acetylierten Chloramphenicols erfolgte nach Chromatographie autoradiographisch. C14 = nicht umgesetztes Chloramphenicol, C14(Acetyl)1-3x = ein-, zwei- und dreifach acetyliertes Chloramphenicol. **(B)** Die quantitative Auswertung erfolgte mit einem Fujifilm BAS-1800 II Phosphorimager. Der in diesem Ansatz gemessene relative Umsatz von Chloramphenicol ist als Balkendiagramm dargestellt.

4.1.5 Beteiligung von Transkriptionsfaktoren der Sp- und GATA- Familien an der Pdc4 vermittelten uPAR-Promotor Suppression

Um die Daten aus den Reportergen Analysen zu unterstützen, die eine potentielle Rolle der Region -402/-350 und -152/-135 als eine wichtige *cis*-aktive Sequenz in der Regulation des uPAR Promotors über Pdc4 annehmen lassen und um die Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die potentiell an diese Regionen binden, wurden EMSA Analysen durchgeführt. Es sollte die Frage geklärt werden, ob die beobachtete Suppression der Aktivität des Promotors sich auch in einer veränderten Bindung der Transkriptionsfaktoren an die entsprechenden Konsensussequenzen widerspiegelt. Nukleäre Extrakte der entsprechenden Zellen wurden nach Normalisierung mit einem ³²P-endmarkierten Oligo der Region -152/-135 inkubiert. In Vorarbeiten unserer Gruppe konnte für diese Region eine Bindung von drei Transkriptionsfaktoren im EMSA gezeigt werden, erkennbar durch drei spezifische Banden mit verringerter Mobilität im Gel, deren Identität durch Supershiftanalysen und Immunpräzipitation bestätigt werden konnte (Allgayer, Wang et al. 1999; Schewe, Leupold et al. 2003). Die oberste Bande entspricht hierbei einer Bindung von Sp-1, die mittlere einer Bindung von Sp-3 und die unterste einer Bindung von AP-2 α -ähnlichem Protein an das markierte Oligo. Es zeigte sich im Vergleich der nukleären Extrakte aus transient mit Pdc4 transfizierten Zellen zu mit leerem Vektor transfizierten RKO eine um dreifach höhere Bindung von Sp-3 an ein endmarkiertes Oligo der Region -152/-135 (Abb.14A,B).

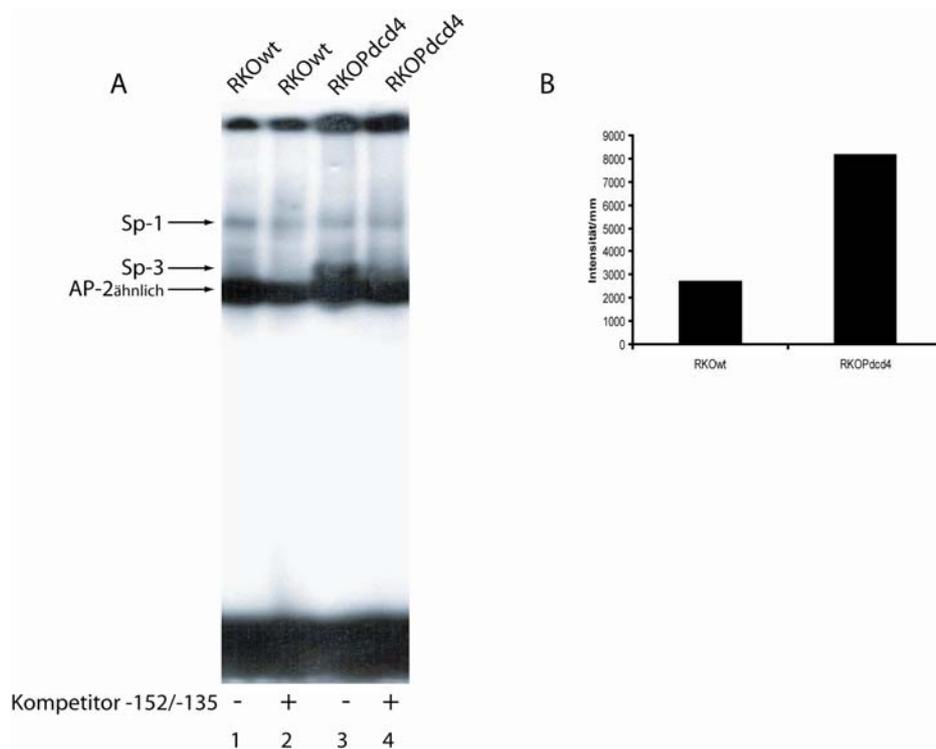


Abb.14: Überexpression von Pdc4 führt zu einer erhöhten Bindung von Sp-3 an Region -152/-135 des uPAR Promoters. (A) Gleiche Mengen nukleärer Extrakte der Koloncarcinomzelllinie RKO wurden nach Transfektion des leeren Expressionsvektors (pcDNA3.1(-)) oder des Pdc4-Expressionsvektors (pcDNA3.1Pdc4) mit einem ^{32}P endmarkiertem Oligonukleotid der Region -152/-135 des uPAR Promoters in Anwesenheit oder Abwesenheit eines 100fachen Überschusses von unmarkierter Kompetitorsequenz -152/-135 inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer nativen 5%igen PAGE. **(B)** Die quantitative Auswertung erfolgte mit der Software Scion Image. Die in diesem Ansatz gemessenen Intensitätsunterschiede sind als Balkendiagramm dargestellt.

EMSA Studien mit ^{32}P -endmarkierten Oligonukleotiden korrespondierend zu den putativen Konsensussequenzen für Sp-1, GATA-2 und NF-1 aus der Region -402/-350 des uPAR Promoters wiesen zusätzlich auch eine Bindung von Sp-1 und GATA-2 in normalisierten nukleären Extrakten der Kolonkarzinomzelllinie RKO nach. Eine spezifische Bindung von NF-1 in dieser Region konnte nicht bestätigt werden (Abb.15A, Spuren 1/3, 5/7 und 9/11).

Darüber hinaus zeigte der Vergleich nukleärer Extrakte aus Zellen mit einer transienten Überexpression von Pcd4 eine Reduktion der Bindung von Sp-1 und GATA-2 an die verwendeten Oligonukleotide (Abb.15B). Zusammen mit den Reportergeranalysen legen die Daten den Schluss nahe, dass eine Bindung von Sp-3 an das Promotorelement $-152/-135$ durch Pcd4 verstärkt, während Sp-1 und GATA-2 Bindung an Region $-402/-350$ vermindert wird. Die beschriebenen Transkriptionsfaktoren kommen somit als potentielle Mediatoren der Pcd4-vermittelten Suppression des uPAR-Promotors in Frage.

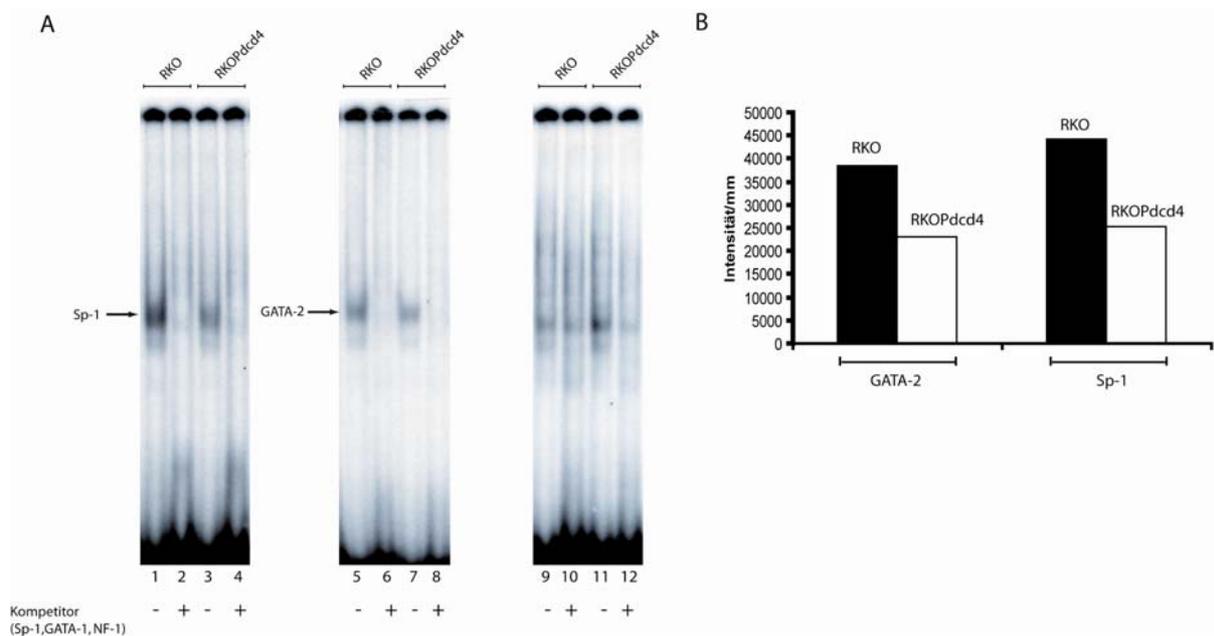


Abb.15 Überexpression von Pcd4 führt zu einer erniedrigten Bindung von Sp-1 und GATA-2 an Promotorregion $-402/-350$. (A) Gleiche Mengen nukleärer Extrakte der Koloncarcinomzelllinie RKO wurden nach Transfektion des leeren Expressionsvektors (pcDNA3.1(-)) oder des Pcd4-Expressionsvektors (pcDNA3.1Pcd4) mit einem ^{32}P -endmarkiertem Oligonukleotid der putativen *cis*-Elemente für Sp-1, GATA-2 und NF-1 aus Region $-402/-350\text{bp}$ des uPAR Promoters in Anwesenheit oder Abwesenheit eines 100fachen Überschusses von entsprechend unmarkierter Kompetitorsequenz inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer nativen 5%igen PAGE. (B) Die quantitative Auswertung erfolgte mit der Software Scion Image. Die in diesem Ansatz gemessenen Intensitätsunterschiede sind als Balkendiagramm dargestellt.

4.1.6 Pdc4 hemmt die Invasivität der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 im Intravasationsassay (CAM-Assay)

Die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung sind entscheidende Eigenschaften maligner Zellen. Der Rezeptor für uPA spielt innerhalb des Plasminogenaktivatorsystems eine zentrale Rolle während diesen Prozessen (siehe Einleitung, Kapitel 1.5.4). Nachdem in den vorangegangenen Versuchen eine Regulation der Expression von uPAR durch Pdc4 gezeigt wurde, sollte die Frage geklärt werden, ob eine Überexpression von Pdc4 auch direkt die Invasionsfähigkeit dieser Zellen inhibieren kann. Zu diesem Zweck wurden HCT-116-Zellen mit dem Expressionsplasmid für Pdc4 transfiziert und im Hühnerei-Choreonallantoismembran Assay hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Intravasation in die Blutgefäße des Hühnerembryos durch die Choreonallantoismembran (CAM) untersucht (Ossowski 1988). Die Zellen wurden auf die obere CAM aufgebracht und die Anzahl der eingewanderten Zellen durch eine semiquantitative humane Alu-PCR nach Aufarbeitung der genomischen DNA aus der unteren CAM ermittelt (Abb.16B) (Kim, Yu et al. 1998). Als Vergleich dienten Zellen der gleichen Zelllinie, die mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert wurden. Die Expression von Pdc4 wurde in einem parallelen Ansatz mittels Immunblotanalyse überprüft (Abb.16A, Spuren 1 und 2). Dabei zeigte sich in den mit Pdc4 transfizierten Zellen eine signifikant ($p < 0,05$, Mann-Whitney-Wilcoxon-Test für nicht verbundene Stichproben) geringere Intravasation (Abb.16C, Spuren 1 und 2).

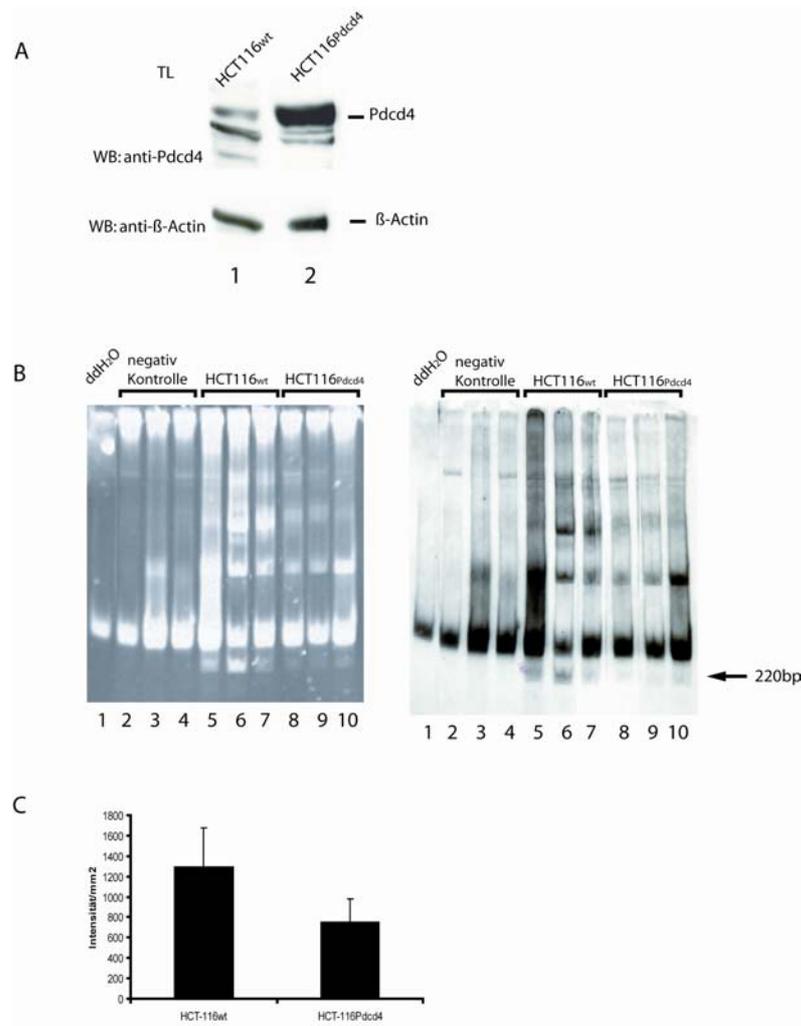


Abb.16: Pdc4 hemmt die Intravasationsfähigkeit der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 im CAM-Modell. **(A)** Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 wurden transient mit einem Pdc4-Expressionsplasmids (pcDNA3.1(-)pdcd4) oder dem leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1(-)) transfiziert. Der Nachweis von Pdc4-Protein erfolgte mittels Western Blot (WB) mit einem polyklonalen Antikörper für Pdc4 (anti-Pdc4). Als Konzentrationskontrolle wurde zusätzlich mit einem polyklonalen Antikörper gegen β-Actin (AC-15) immungeblottet. Die Auftrennung erfolgte in einer 10%igen SDS-PAGE. **(B)** 1×10^6 Zellen der transfizierten humanen Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 wurden parallel auf die obere CAM inokuliert. Nach 48h wurde genomische DNA der oberen CAM aufgearbeitet. 1µg-Aliquots der DNA wurden für die anschließende Amplifikation eingesetzt. Die PCR der Alu-Sequenzen erfolgte in Anwesenheit von ^{32}P -dCTP, die Amplifikationsprodukte wurden mittels PAGE aufgetrennt und nach Anfärben mit Ethidiumbromid autoradiographisch ausgewertet. Das 220bp große Fragment ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. **(C)** Die quantitative Auswertung erfolgte mit der Software Scion Image. Die in diesem Ansatz gemessenen Intensitätsunterschiede sind als Balkendiagramm dargestellt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten nach Normalisierung der Transfektionseffizienz. Die durch das Pdc4-Expressionsplasmid erreichte Reduktion der Intravasation war signifikant ($p < 0,05$).

Um zu untersuchen, ob Pdc4 einen Einfluss auf die Proliferationsrate hat und um auszuschließen, dass der beobachtete Unterschied im Intravasationsassay auf eine unterschiedliche Vermehrungsrate der Zellen zurückzuführen ist, wurden parallel ein Wachstumstest durchgeführt. HCT-116-Zellen, die mit dem Expressionsplasmid für Pdc4 oder dem entsprechenden Leervektor transfiziert worden waren, wurden für 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Transfektion in 96-Loch-Platten kultiviert und die Proliferationsrate durch Nachweis der lebenden Zellen zum entsprechenden Zeitpunkt ermittelt (Abb.17). Hierbei zeigte sich, dass die Zellen unabhängig von dem exprimierten Pdc4-Protein mit der gleichen Rate proliferieren. Demnach hat Pdc4 in diesen Zellen keinen Einfluss auf die basale Proliferation. Die Ergebnisse lassen aber auf eine durch Pdc4 vermittelte Suppression der Intravassation schließen.

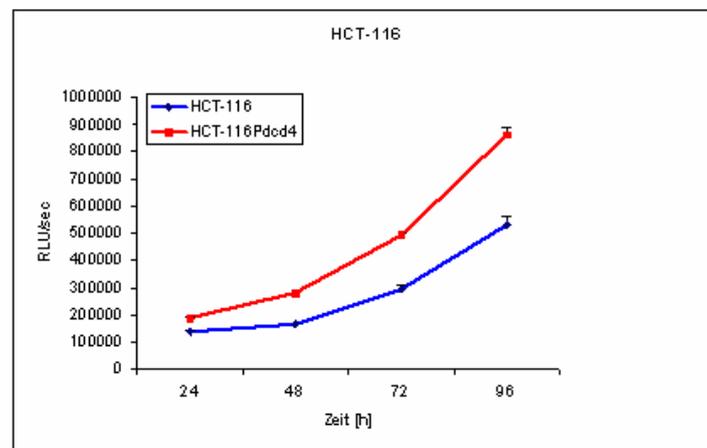


Abb.17: Pdc4 hat keinen Einfluss auf die Proliferation. Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 wurden transient mit einem Pdc4 Expressionsplasmids (pcDNA3.1(-)pdcd4) (rote Linie) oder dem leeren Expressionsvektors (pcDNA3.1(-)) (blaue Linie) transfiziert. Die Zahl der lebenden-Zellen wurde an den angegebenen Zeitpunkten luminometrisch bestimmt.

4.2 Methodische Etablierung eines quantitativen CAM-Assay mittels Real-Time-PCR

4.2.1 Methodische Etablierung des CAM-Assay und Auswertung mit Endpunkt-PCR

In vivo-Assays bieten die Möglichkeit die komplexen biologischen Prozesse zu untersuchen, die eine Tumorzelle während der Invasion, Intravasation und Metastasierung durchlaufen muss. Welche biochemischen Faktoren eine Krebszelle zur Dissemination über die Blut und Lymphgefäße befähigt, um anschließend im Körper Metastasen zu etablieren, sind hierbei von besonderem Interesse. Der Chorionallantois-Membran-(CAM)-Assay ist besonders geeignet, um gerade die Kinetik der Intravasation von Tumorzellen näher zu untersuchen (Ossowski und Reich 1980). Da der Assay bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit von den meisten Arbeitsgruppen semiquantitativ durchgeführt wurde, erfolgte zunächst die Etablierung der Methode unter Verwendung des Nachweises von humanen Alu-Sequenzen mittels Endpunkt-PCR (Kim, Yu et al. 1998). Der Nachweis spezifischer Fragmente wurde zunächst durch die Amplifikation seriell verdünnter humaner genomischer DNA in genomischer DNA der unteren CAM etabliert. Durch die Zugabe von ³²P-markiertem dCTP zu den Ansätzen war es nach der elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente möglich, diese autoradiographisch nachzuweisen. Bei Verwendung von humaner genomischer DNA equivalent zu 5000-185 Zellen wurde eine deutliche Bande mit der erwarteten Größe von 220bp amplifiziert. Unterhalb dieser Verdünnung wurde die Intensität des amplifizierten Produktes schwächer und die Amplifikation unspezifischer, größerer Fragmente wurde begünstigt (Abb.18A, B). Mit der verwendeten Alu-PCR war ein Nachweis humaner genomischer DNA von bis zu 7 humanen Zellen innerhalb der Hühner DNA möglich. Diese Menge entspricht einer Sensitivität von einer humanen Zelle in einem Hintergrund von 6×10^4 Hühnerzellen.

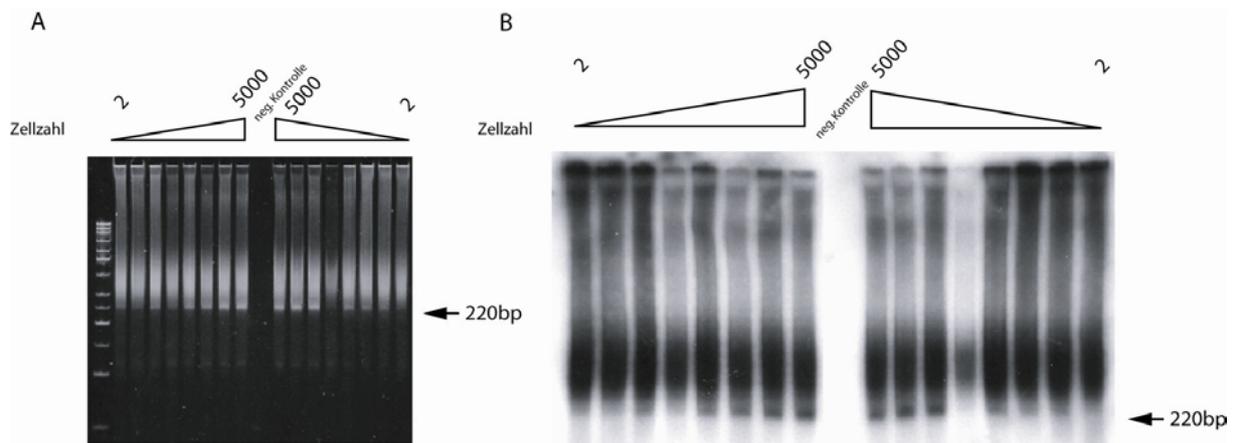


Abb.18: Semiquantitative PCR seriell verdünnter humaner genomischer DNA in genomischer DNA der unteren Chorioallantoismembran. Humane DNA wurde seriell in Dreierschritten mit genomischer DNA der unteren CAM verdünnt (equivalent zu 2-5000 Zellen der Melanomzelllinie MelJuso bzw. der Brustkrebszelllinie MDA-MB-435). 1µg Aliquots der DNA wurden für die anschließende Amplifikation eingesetzt. Die PCR der Alu-Sequenzen erfolgte in Anwesenheit von ^{32}P -CTP und die Amplifikationsprodukte wurden mittels PAGE aufgetrennt und nach Anfärben mit Ethidiumbromid **(A)** autoradiographisch **(B)** ausgewertet. Das 220bp große Fragment ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Zur Untersuchung der zeitlichen Kinetik erfolgte die Inokulation und Nachweis invasierter Zellen in der CAM unter Verwendung der Melanomlinie MelJuso und der Mamma-Karzinomlinie MDA-MB-231. Die Auswahl der Zelllinien erfolgte aufgrund der besonders hohen Invasionsfähigkeit dieser Zellen im Matrigelinvasionsassay (Daten nicht gezeigt). Für den Nachweis der zeitabhängigen Intravasation in die CAM wurden verschiedene Mengen MelJuso-Zellen auf die obere CAM aufgebracht und die genomische DNA der oberen und unteren CAM nach Inkubation der Eier aufgearbeitet und miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Invasion der Zellen in Abhängigkeit der verwendeten inokulierten Zellzahl nach 24 bis 48 Stunden Inkubation erfolgte (Abb.19B, untere CAM, Spuren 23, 24 und 28-30). Bei Verwendung von $3,33 \times 10^5$ Zellen konnte bis 24 Stunden nach der Inokulation noch eine spezifische Bande in der genomischen DNA der oberen CAM nachgewiesen werden (Abb.19B, obere CAM, Spuren 1-3). Nach 48 Stunden war dagegen kein Nachweis der Zellen in der genomischen DNA der oberen CAM mehr möglich (Abb.19B obere CAM, Spuren 4-9). Korrelierend hierzu war es nach 48 Stunden in

der unteren CAM möglich, eine deutliche Bande mit der erwarteten Grösse von 220bp zu amplifizieren, deren Intensität in den Proben, der nach 72 Stunden aufgearbeiteten CAM noch zunahm (Abb.19B untere CAM, Spuren 23-27). Ein ähnliches Bild der Intravasation ergab die Inokulation von 1×10^6 Zellen. Im Unterschied zu dem Ansatz mit der geringeren Zellzahl war unter diesen Bedingungen schon nach 24 Stunden kein Nachweis der Zellen in der oberen CAM mehr möglich (Abb.19B, obere CAM, Spuren 10-12), und ein spezifisches Fragment von 220bp konnte schon nach 24 Stunden in der unteren CAM amplifiziert werden (Abb.19B, untere CAM, Spuren 28-36).

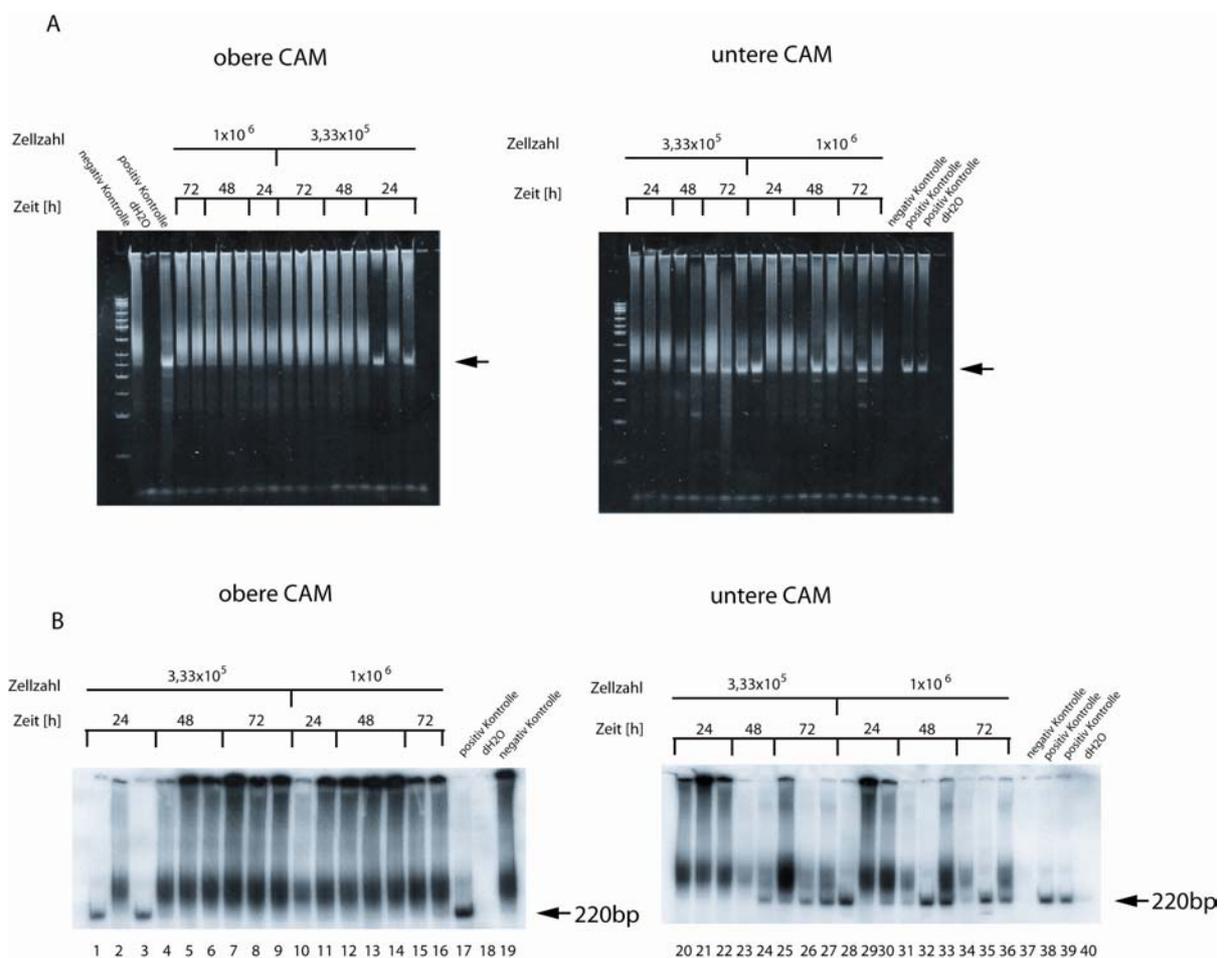


Abb.19: CAM Assay mit Melanomzelllinie MelJuso im zeitlichen Ablauf. $3,33 \times 10^5$ bzw. 1×10^6 Zellen der humanen Melanomzelllinie MelJuso wurden auf die obere CAM inokuliert. Nach 24, 48 und 72h wurde genomische DNA der oberen und unteren CAM aufgearbeitet. 1µg Aliquots der DNA wurden für die anschließende Amplifikation eingesetzt. Die PCR der Alu-Sequenzen erfolgte in Anwesenheit von ^{32}P -dCTP und die Amplifikationsprodukte wurden mittels PAGE aufgetrennt und nach Anfärben mit Ethidiumbromid **(A)** autoradiographisch **(B)** ausgewertet. Das 220bp große Fragment ist durch Pfeile gekennzeichnet.

In einem zweiten Experiment wurden verschiedene Mengen Zellen der Mammakarzinomlinie MDA-MB-435 auf die obere CAM aufgebracht und die Intravasation in die untere CAM nach 24 und 48 Stunden verglichen (Abb.20A, B). Auch bei Verwendung dieser Zellen zeigte sich eine Intravasation der Zellen nach 24 Stunden Inkubation (Abb.20B, Spuren 1-3). Eine Erhöhung der inokulierten Zellzahl führte zu einem verstärkten Signal des amplifizierten Produktes (Abb.20B Spuren 16-19). Eine Inkubation über 48 Stunden bis 72 Stunden hinaus führte zu keiner Verbesserung der Ergebnisse und wurde im Folgenden nicht mehr durchgeführt (Abb.20B Spuren 5-12; 20-27).

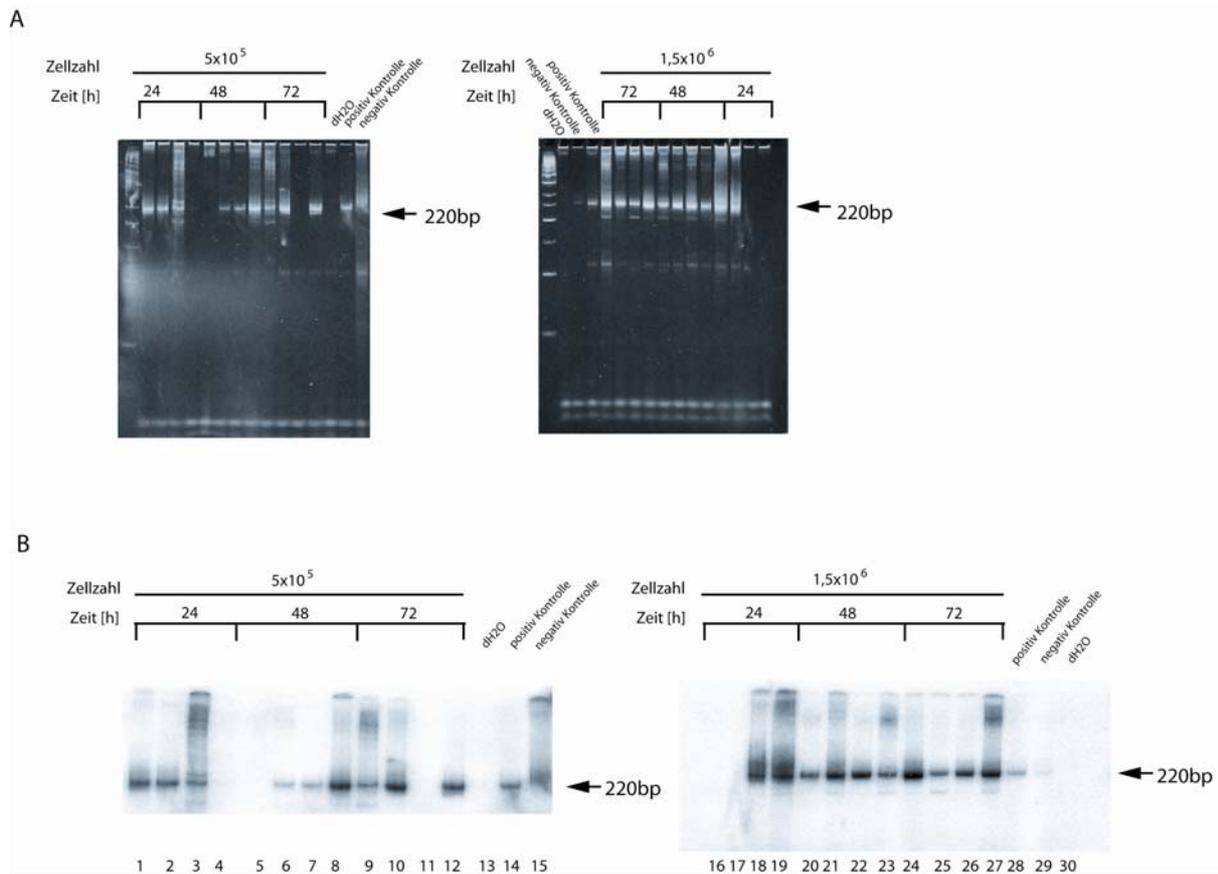


Abb.20: Etablierung des CAM Assays mit einer zweiten Zelllinie, der Brustkrebszelllinie MDA-MB-435. 5×10^5 bzw. $1,5 \times 10^6$ Zellen der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-435 wurden auf die obere CAM inokuliert. Nach 24, 48 und 72h wurde genomische DNA der oberen CAM aufgearbeitet. 1µg Aliquots der DNA wurden für die anschließende Amplifikation eingesetzt. Die PCR der Alu-Sequenzen erfolgte in Anwesenheit von ^{32}P -dCTP und die Amplifikationsprodukte wurden mittels PAGE aufgetrennt und nach Anfärben mit Ethidiumbromid (A) autoradiographisch (B) ausgewertet. Das 220bp große Fragment ist durch Pfeile gekennzeichnet.

Matrixmetalloproteasen (MMP) stellen neben den Serinproteasen des Urokinasesystems eine zweite wichtige Gruppe proteolytischer Enzyme dar, die von vielen malignen Zellen genutzt werden, um in das umgebende Gewebe unter Degradierung der extrazellulären Matrix zu invadieren (Edwards und Murphy 1998). Marimastat ist neben Batimastat der zweite synthetisch entwickelte MMP-Inhibitor, der in klinischen Studien evaluiert wurde und die Aktivität von verschiedenen MMPs durch die Bindung an Zink im katalytischen Zentrum dieser Proteasen spezifisch inhibiert (Wojtowicz-Praga, Dickson et al. 1997). Durch Einsatz dieses MMP-Inhibitors sollte gezeigt werden, dass das Modell die Wirkung eines bekannten Proteaseinhibitors verifizieren kann (Abb.21A, B). Da die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435 ihre Invasivität unter anderem durch die Aktivität von MMP-2 und 9 vermittelt, war eine reduzierte Intravasation dieser Zellen nach Behandlung mit dem Inhibitor, im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu erwarten (Rose, Connolly et al. 1995; Corcoran, Emmert-Buck et al. 1996). Nach 24 Stunden Inkubation und Aufarbeitung der genomischen DNA der unteren CAM zeigte sich, dass die Inkubation der inokulierten Zellen mit dem Proteaseinhibitor Marimastat zu einer deutlich reduzierten Invasionsfähigkeit im Vergleich zu den unbehandelten Zellen führte (Abb.21B Spuren 6-13). Bei Verwendung von unbehandelten Zellen konnte in allen aufgearbeiteten CAMs ein spezifisches Produkt von 220bp amplifiziert werden (Abb.21B, Spuren 6-13). Wurden die Zellen mit Marimastat behandelt, zeigte sich in der PCR entweder kein Produkt oder eine schwächere Amplifikation des 220bp großen Fragments.

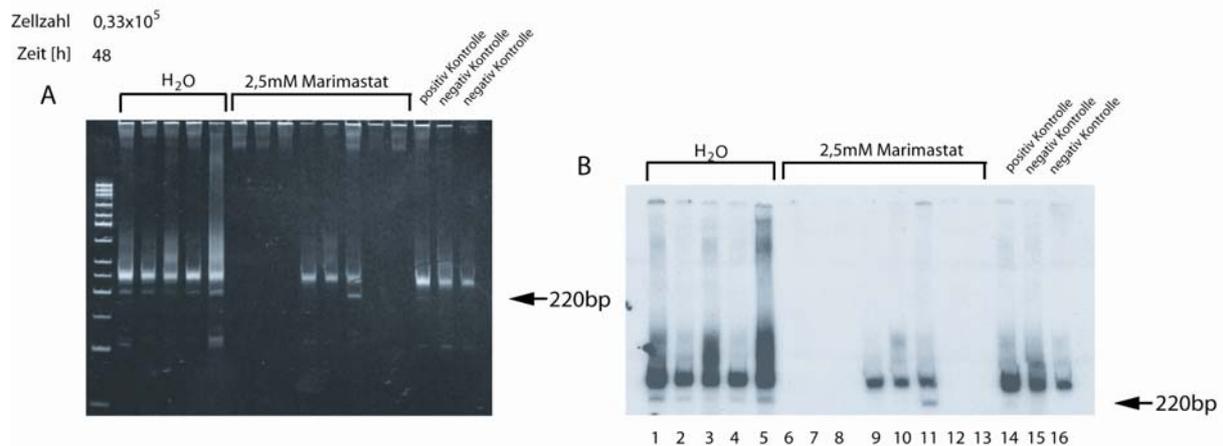


Abb.21: Der MMP-9-Inhibitor Marimastat hemmt die Invasionsfähigkeit der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435 im CAM-Modell. $0,33 \times 10^5$ Zellen der humanen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435 wurden auf die obere CAM inokuliert. Nach 48h wurde genomische DNA der oberen CAM aufgearbeitet. $1\mu\text{g}$ Aliquots der DNA wurden für die anschließende Amplifikation eingesetzt. Die PCR der Alu-Sequenzen erfolgte in Anwesenheit von ^{32}P -dCTP und die Amplifikationsprodukte wurden mittels PAGE aufgetrennt und nach Anfärben mit Ethidiumbromid (A) autoradiographisch (B) ausgewertet. Das 220bp große Fragment ist durch Pfeile gekennzeichnet.

4.2.2 Etablierung der quantitativen Auswertung des CAM-Assay mittels Real-Time-PCR unter Verwendung von TaqMan®-Proben

Ein erster Schritt, die Analyse invasiver Zellen hinsichtlich Quantifizierung zu verbessern, war die Entwicklung und Verwendung spezifischer humaner Alu-Sequenz Primer (Kim, Yu et al. 1998). Basierend auf den für den für semiquantitativen Nachweis verwendeten Alu-spezifischen Primern wurde mittlerweile von zwei Gruppen eine Real-Time-PCR unter Verwendung von SYBR Green als Farbstoff entwickelt (Mira, Lacalle et al. 2002; Zijlstra, Mellor et al. 2002). Andere Arbeiten zeigen, dass vor allem durch die Verwendung von Primern, die Alu-Sequenzen der YB8-Unterfamilie innerhalb des humanen Genoms nachweisen, eine besonders hohe Spezifität und Sensitivität des Nachweises humaner DNA erreicht

werden kann (Walker, Hughes et al. 2003; Walker, Kilroy et al. 2003). Aus diesem Grund wurden die von Walker et al. beschriebenen Alu-YB8-spezifischen Primer daraufhin getestet, ob durch deren Verwendung eine qualitative Verbesserung des Nachweises humaner DNA im CAM-Assay erreicht werden konnte. Hierfür wurde zunächst der Nachweis spezifischer Fragmente durch die Amplifikation seriell verdünnter humaner genomischer DNA in 500ng oder 250ng genomischer DNA der unteren CAM unter Verwendung der Primer ALUYB8 und SYBR Green gemäß dem Protokoll von Walker et al. durchgeführt (Abb.22). Mit der verwendeten Methode war ein Nachweis humaner genomischer DNA von bis zu 100 Zellen bei Verwendung von 250ng (Abb. 22A) bzw. von bis zu 1000 Zellen bei 500ng (Abb. 22B) Hühner-DNA möglich. Zudem zeigte die Auswertung der Schmelzkurven und die Überprüfung nach Auftragung der gebildeten PCR-Produkte auf Agarosegele, neben der spezifischen Bande noch ein unspezifisches Fragment, welches auch in Abwesenheit humaner DNA nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

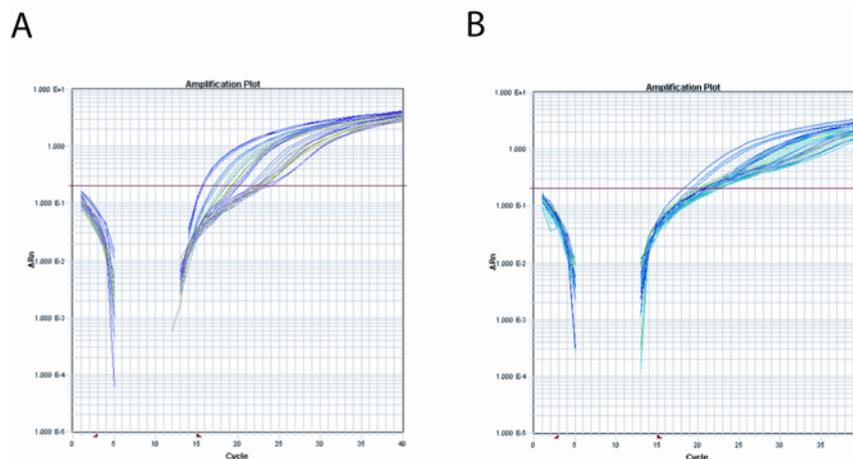


Abb.22: Nachweis humaner Alu-Sequenzen mit Alu-YB8 Primern (SYBR Green). Humane DNA (equivalent zu 1000, 300, 100, 30, 10, 3, 1 und 0,1 Zellen der Melanomzelllinie Mel Juso) wurde mit 250ng (A) oder 500ng (B) genomischer DNA der unteren CAM verdünnt und für die anschließende Amplifikation eingesetzt. ΔR_n wurde gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen. Die rote Linie markiert den Grenzyklus (Ct) der PCR an dem ein spezifisches Signal nachweisbar ist.

Da durch den Einsatz dieser Primer unter Verwendung von SYBR Green keine zufriedenstellende Verbesserung der Sensitivität erreicht werden konnte, wurden im nächsten Schritt, basierend auf den für die YB8-Alu-Familie veröffentlichte Konsensussequenz, eigene Primer (YB8FWD68/YB8REV244 und YB8FWD182/YB8REV244) und sequenzspezifische TaqMan®-Proben (Probe167 und Probe 202) entwickelt und die optimale Primer-Proben-Kombination ausgetestet (Abb. 23). Zu diesem Zweck wurde eine bestimmte Menge humaner genomischer DNA der Melanomzelllinie Mel-Juso in genomischer DNA der unteren CAM verdünnt und anschließend für die Amplifikation mit den zwei verschiedenen Primerkombinationen und unterschiedlichen Primerkonzentrationen eingesetzt. Hierbei zeigten sich für die Primerkombinationen 68/244 mit Probe 167 und 182/244 mit Probe 202 unter der Verwendung einer Konzentration von 900nM/300nM oder 900nM/900nM in beiden Fällen die frühesten Signale (Abb.23 A, B). Von der entsprechenden TaqMan®-Probe wurden konstant 250nM eingesetzt. Nach der Entscheidung für die Primer-Kombination 68/244 mit Probe167 wurde schließlich in einem zweiten Ansatz die optimale Primerkonzentration für diese Kombination ermittelt. Der Nachweis spezifischer Fragmente wurde durch die Amplifikation seriell verdünnter humaner genomischer DNA in genomischer DNA der unteren CAM etabliert (Abb. 24). Ein direkter Vergleich der Signale belegte, dass in beiden Fällen ein Nachweis humaner genomischer DNA von bis zu 1/10 Zelle im verwendeten Hühner-DNA Hintergrund möglich war (Abb. 24A, B).

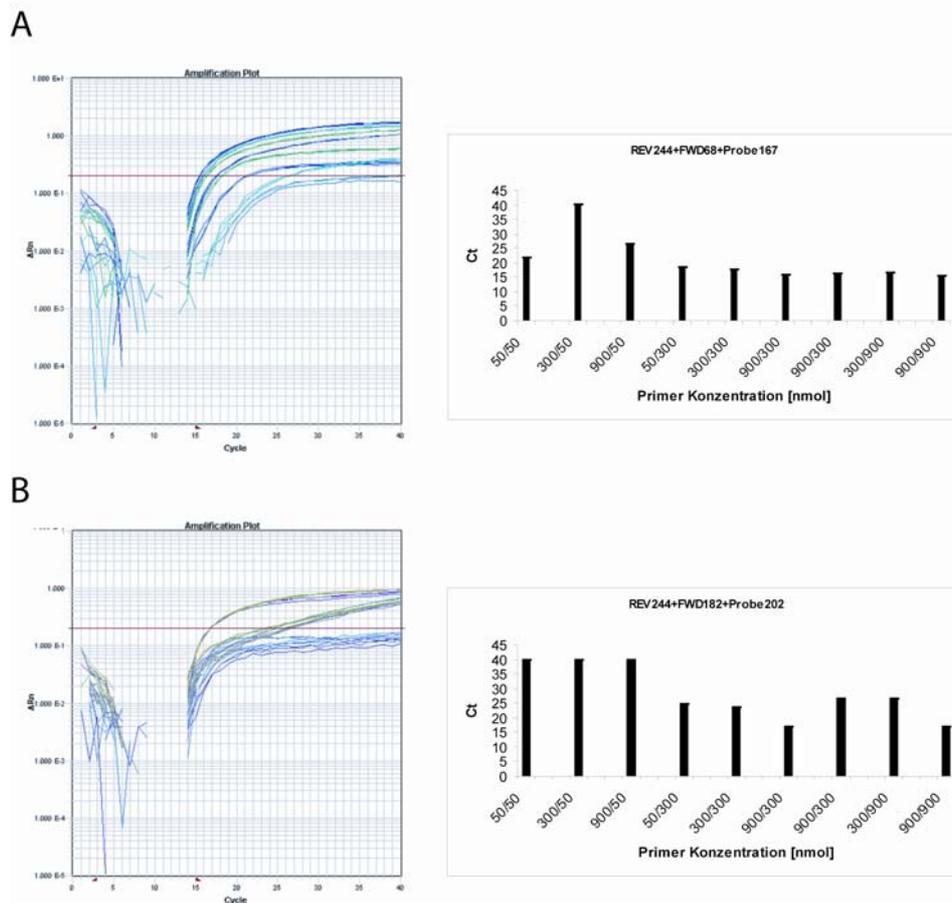


Abb.23: Ermittlung der optimalen Alu-YB8 Primerkombination und Konzentrationen. 50ng humane DNA der Melanomzelllinie MeIJusto wurde mit 795ng genomischer DNA der unteren CAM verdünnt und für die anschließende Amplifikation eingesetzt. Verschiedene Konzentrationskombinationen von 50-900nM der Sense- und Antisenseprimer YB8FWD68/YB8REV244 (A) und YB8FWD182/YB8REV244 (B) wurden mit jeweils 250nM Probe167 (A) oder Probe 202 (B) verwendet. ΔRn wurde gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen. Die rote Linie markiert den Grenzyklus (Ct) der PCR an dem ein spezifisches Signal nachweisbar ist.

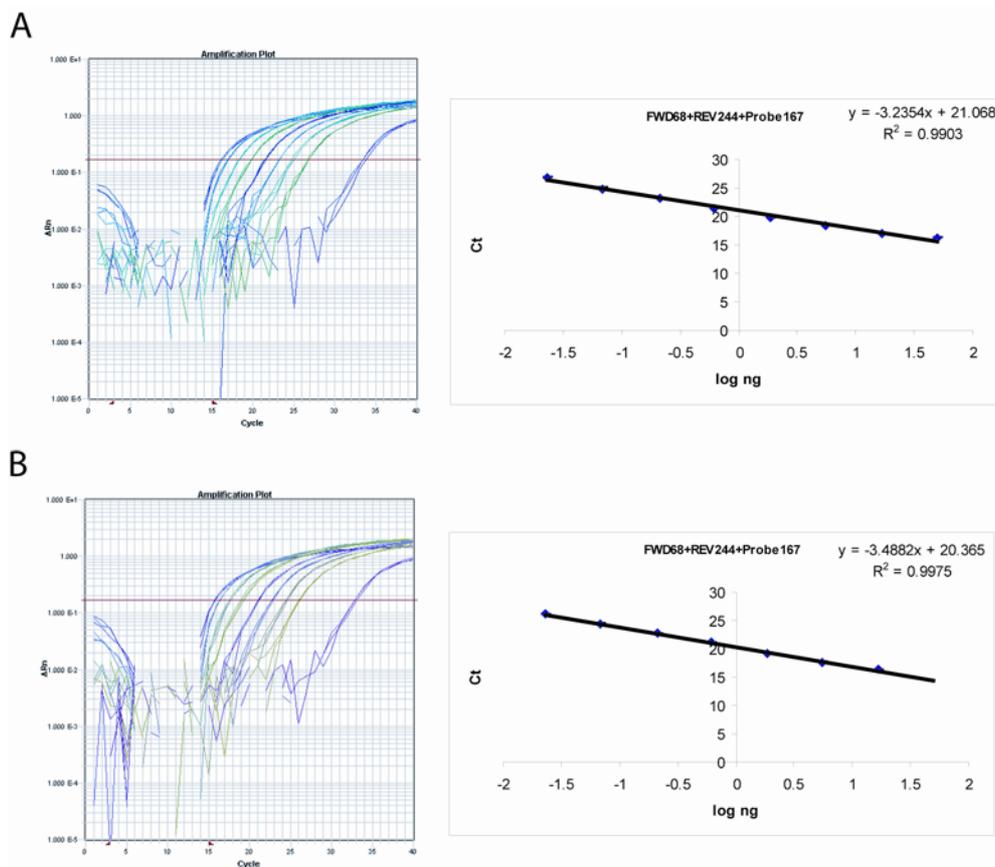


Abb.24: Ermittlung der optimalen Primerkonzentrationen für die Kombination YB8FWD68/ YB8REV244/Probe167. Humane DNA (äquivalent zu 1000, 300, 100, 30, 10, 3, 1 und 0,1 Zellen der Melanomzelllinie Mel Juso) wurde mit 560ng genomischer DNA der unteren CAM verdünnt und für die anschließende Amplifikation eingesetzt. Für den ersten Ansatz wurden 900nM/300nM YB8FWD68/YB8REV244 (A), für den zweiten Ansatz wurden 900nM/900nM YB8FWD68/YB8REV244 (B) mit 250nM Probe167 verwendet. Die rote Linie markiert den Grenzyklus (Ct) der PCR, an dem ein spezifisches Signal nachweisbar ist. Der R^2 Wert ist jeweils 99% für die errechneten Standardkurven.

Um die ermittelten PCR Bedingungen für die quantitative Auswertung in einem kolorektalen *in vivo* Experiment zu überprüfen, erfolgte die Inokulation und Nachweis invadierter Zellen in der CAM unter Verwendung der Kolonzelllinie RKO (Abb. 25). Nach der Aufarbeitung der genomischen DNA der unteren CAM wurden entweder 1,25 μ g oder 625ng DNA für die Amplifikation in der Real-Time-PCR eingesetzt. Als Standard wurde genomische DNA von RKO-Zellen seriell in 1,25 μ g CAM-DNA verdünnt und ebenfalls für die Amplifikation verwendet.

Über die so erzeugte Standardkurve konnte die Menge der invasiven Zellen, anhand der in der PCR gemessenen Zyklenzahl bis zum Erreichen eines spezifischen Signals, extrapoliert werden. Es zeigte sich, dass unabhängig von der eingesetzten Menge an genomischer CAM-DNA, ein Nachweis eingewanderter Zellen in der unteren CAM durch die spezifische Amplifikation humaner Alu-YB8-Sequenzen möglich war (Abb.25). Mit der verwendeten Alu-PCR war ein Nachweis humaner genomischer DNA von bis zu 0,7 humanen Zellen innerhalb der Hühner-DNA möglich. Diese Menge entspricht einer Sensitivität von weniger als einer humanen Zelle in einem Hintergrund von 5×10^5 Hühnerzellen.

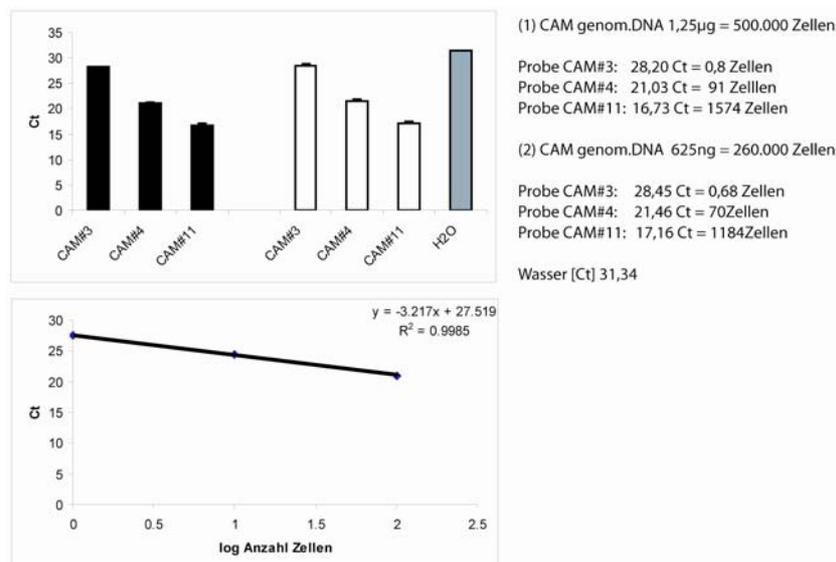


Abb. 25: CAM Assay mit der Kolonkarzinomzelllinie RKO. $0,5 \times 10^6$ Zellen der humanen Kolonkarzinomzelllinie RKO wurden auf die obere CAM inokuliert. Nach 52h wurde genomische DNA der unteren CAM aufgearbeitet und entweder 1,25µg (schwarze Balken) oder 625ng (weiße Balken) für den Nachweis eingewanderter Zellen verwendet. Als Standard wurde humane genomische DNA (equivalent zu 100, 10 und 1 Zellen der Kolonzelllinie Rko) mit 625ng genomischer DNA der unteren CAM verdünnt und ebenfalls für die Amplifikation eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne DNA. Zusätzlich ist die Umrechnung der Ct-Werte in Anzahl der nachgewiesenen, eingewanderten Zellen und die Anzahl der insgesamt eingesetzten Hühnerzellen dargestellt. Der R^2 Wert ist 99% für die errechnete Standardkurve.

Nachdem die Sensitivität und Spezifität der ausgewählten Primer/Probe-Kombination in diesem *in vivo* Experiment bestätigt werden konnte, wurde dieser Ansatz mit der in zwei Arbeiten beschriebenen quantitativen SYBR Green Alu-PCR hinsichtlich Sensitivität und Spezifität verglichen (Mira, Lacalle et al. 2002; Zijlstra, Mellor et al. 2002). Analog zu den vorherigen Ansätzen wurde humane genomische DNA der Melanomzelllinie Mel-Juso seriell in 1µg, 100ng und 10ng genomischer DNA der unteren CAM verdünnt und anschließend für die Amplifikation eingesetzt. Um eine Verfälschung der Daten zu vermeiden, wurden im Fall von SYBR Green als Farbstoff, die von Zijlstra et al veröffentlichten Bedingungen eingehalten. Im Vergleich mit den auf der YB8-Subfamilie basierenden Primern waren diese jedoch nicht sensitiv genug, um in einem Hintergrund von 1µg Hühner DNA humane DNA spezifisch nachzuweisen, ohne deutlich die Dynamik der PCR zu beeinflussen (Abb. 26A). Bei Verwendung der Primer YB8FWD68/YB8REV244 mit der sequenzspezifischen TaqMan®-Probe 167 konnte wiederum bis zu 1/10 Genom einer Zelle innerhalb des genomischen CAM-Hintergrundes nachgewiesen werden (Abb. 26B).

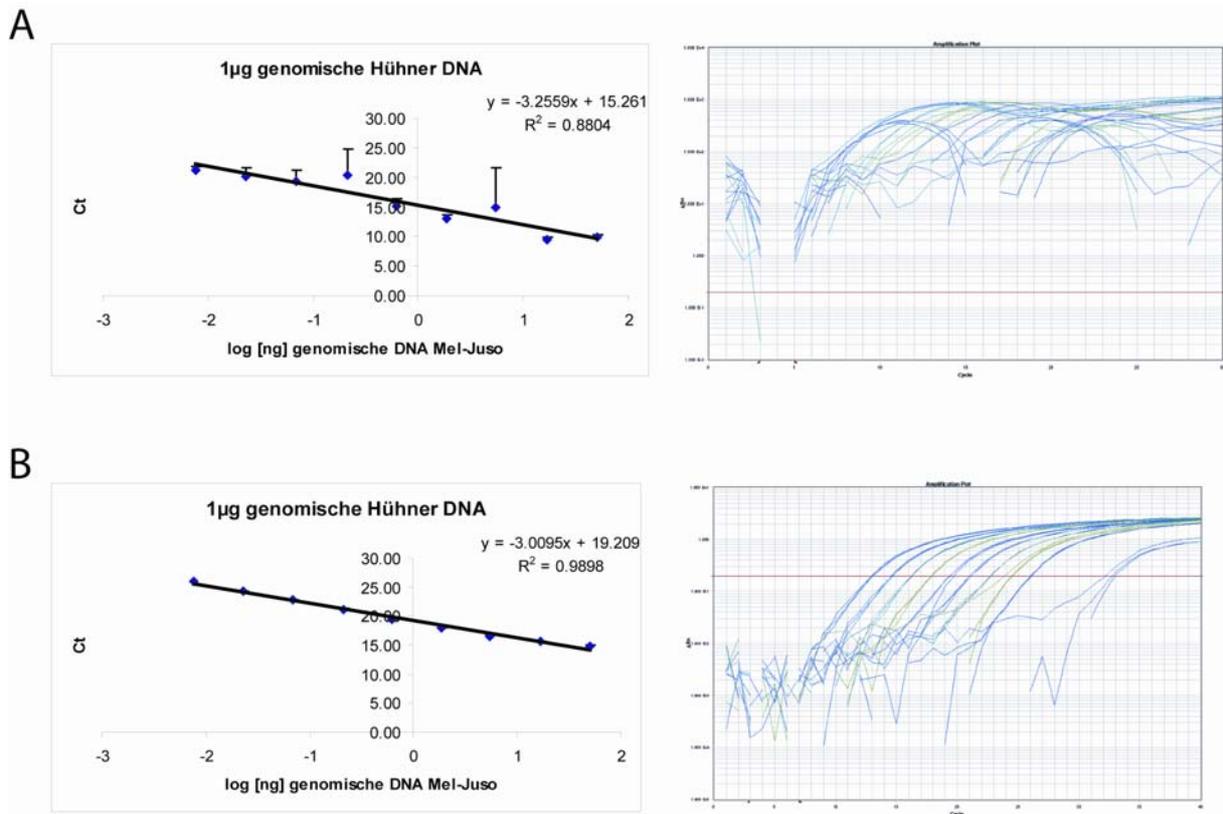


Abb. 26: Vergleich der quantitativen PCR humaner Alu-Sequenzen unter Verwendung von SYBR Green oder TaqMan®-Proben. Humane DNA (equivalent zu 1000, 300, 100, 30, 10, 3, 1 und 0,1 Zellen der Melanomzelllinie Mel-Juso) wurde mit 1µg genomischer DNA der unteren CAM verdünnt und für die anschließende Amplifikation eingesetzt. Bei Einsatz von SYBR Green ist ein Nachweis humaner genomischer DNA von bis zu 100 Zellen (**A**), bei Verwendung der spezifischen TaqMan®-Probe von 1/10 Zelle (**B**) unter Verwendung von 1µg Hühner DNA als Hintergrund möglich. ΔR_n wurde gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen. Die rote Linie markiert den Grenzyklus (Ct) der PCR an dem ein spezifisches Signal nachweisbar ist. Der R^2 Wert ist 88% (**A**) bei Verwendung von SYBR Green und 98% (**B**) bei Verwendung der TaqMan®-Probe für die errechneten Standardkurven.

Die Verwendung von sequenzspezifischen Alu-Primern der Subfamilie YB8 ermöglicht problemlos den Nachweis humaner DNA in einem Hintergrund von DNA verschiedener anderer Spezies (Walker, Kilroy et al. 2003). Zudem werden die meisten Studien zur Metastasierung von Tumorzellen an verschiedenen heterotoper und orthotoper Mausmodelle durchgeführt.

Aus diesem Grund sollte zusätzlich gezeigt werden, ob der Nachweis von humanen Mikrometastasen auch in solchen *in vivo* Assays mit den in dieser Arbeit etablierten Primern auf anderem Spezieshintergrund möglich ist. Zu diesem Zweck wurde humane genomische DNA der Melanomzelllinie Mel-Juso seriell in 1µg, 100ng und 10ng muriner genomischer DNA verdünnt und anschließend für die Amplifikation eingesetzt. Die verwendete genomische DNA wurde zuvor aus Lebergewebe von Balb/c Mäusen isoliert. Auch mit einem Hintergrund von 1µg und 2µg genomischer Maus-DNA, welcher einer Zellzahl von 154000 und 308000 muriner Zellen entspricht, konnte problemlos bis zu 1/10 humanes Genom oder 0,1 Zelle nachgewiesen werden (Abb.27 A, B).

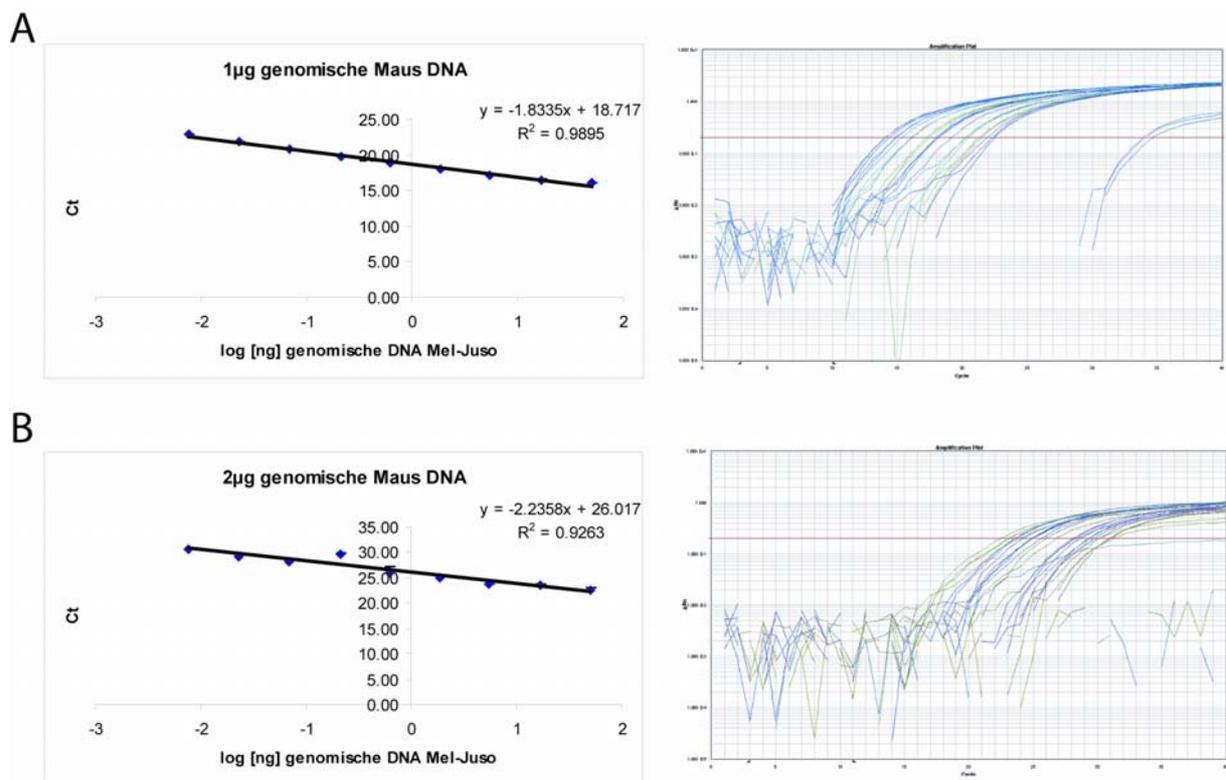


Abb. 27: Nachweis und Quantifizierung humaner Alu-Sequenzen in muriner genomischer DNA.

Humane DNA (equivalent zu 1000, 300, 100, 30, 10, 3, 1 und 0,1 Zellen der Melanomzelllinie Mel Juso) wurde mit 1µg **(A)** oder 2µg **(B)** muriner genomischer DNA aus Leber verdünnt und für die anschließende Amplifikation eingesetzt. ΔR_n wurde gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen. Die rote Linie markiert den Grenzyklus (Ct) der PCR an, dem ein spezifisches Signal nachweisbar ist. Der R^2 Wert ist 98% **(A)** bei Verwendung von 1µg muriner DNA und 92% **(B)** bei Verwendung von 2µg muriner DNA für die errechneten Standardkurven.

5 Diskussion

5.1 Regulation des Invasionsgens uPAR durch den Tumorsuppressor Pdcd4

Ein Tumor entsteht durch die Anhäufung zahlreicher, durch Umweltfaktoren ausgelöster, spontan auftretender oder vererbter Mutationen bestimmter Gene. Die dadurch ausgelösten Fehlregulationen des Zellwachstums führen zur Transformation gesunder Zellen und ermöglichen diesen, sich den strikt regulierten Vorgängen der Proliferation, Differenzierung und Apoptose ihres ursprünglichen Gewebeverbandes zu entziehen. Neben Protoonkogenen, die auf verschiedenen Ebenen das Wachstum von Zellen regulieren und in ihrer mutierten Form als Onkogene das Wachstumsverhalten ändern können, spielen vor allem Tumorsuppressorgene eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Tumoren. Proteine, die von Tumorsuppressorgen kodiert werden, verhindern normalerweise, dass eine einzelne Zelle transformiert und als autonome Tumorzelle weiter im Organismus bestehen kann.

Pdcd4 wurde zuerst als ein Protein beschrieben, das nach Induktion von Apoptose durch verschiedene Stimuli in seiner Expression hochreguliert wird (Shibahara, Asano et al. 1995). Weitere Studien führten aber bald zu der Vermutung, dass Pdcd4 darüber hinaus eine potentielle Rolle als Tumorsuppressor spielt (Cmarik, Min et al. 1999; Chen, Knosel et al. 2003; Jansen, Camalier et al. 2004). Über einen Einfluss des potentiellen Tumorsuppressors Pdcd4 auf den Urokinaserezeptor, sowie auf die Invasionsfähigkeit von Tumorzellen überhaupt, lagen zu Beginn dieser Studie keine Daten vor. In dieser Arbeit wurde erstmals die Funktion von Pdcd4 als möglicher transkriptional wirksamer Regulator der Urokinase-Rezeptor-Genexpression untersucht.

5.1.1 Reziproke Regulation von uPAR und Pdc4

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Magen- und Kolonkarzinomzelllinien hinsichtlich der endogenen Expression von Pdc4 und uPAR untersucht. Dabei war es besonders interessant, ob Unterschiede in der endogenen Pdc4-Expression eine Korrelation zu der endogenen Expression des Urokinase-Rezeptors zeigen. Sowohl bei der Analyse der Pdc4-Expression, als auch der uPAR-Expression, wurden in allen Zelllinien auf Proteinebene Banden mit den zu erwartenden Grössen von 64kDa für Pdc4 und 55-60kDa für uPAR nachgewiesen. Diese entsprechen den für beide Proteine publizierten Molekulargewichten (Behrendt, Ronne et al. 1990; Roldan, Cubellis et al. 1990; Yoshinaga, Matsushashi et al. 1999). Der Nachweis von Pdc4 war in allen untersuchten Zelllinien zu erwarten, da aus der Literatur Daten über die Verteilung der endogenen Expression von murinem und humanem Pdc4 vorlagen, die an normalem, adultem Mausgewebe und verschiedenen humanen Zelllinien und Geweben durchgeführt wurden. Für murines Pdc4 konnte hier eine ubiquitäre Expression in allen untersuchten Geweben belegt werden (Onishi, Hashimoto et al. 1998). Ähnlich den Mausdaten zeigen Studien auch für humanes Pdc4 eine Expression in verschiedenen Zell- und Gewebeproben (Azzoni, Zatsepina et al. 1998; Kang, Ahn et al. 2002; Chen, Knosel et al. 2003; Jansen, Camalier et al. 2004). Auch uPAR wird in einer Vielzahl von humanen Geweben und Zelltypen endogen exprimiert und lässt sich unter anderem in gastrointestinalen Tumoren und Zelllinien nachweisen (Boyd, Florent et al. 1988; Heiss, Babic et al. 1995). Passend hierzu zeigten alle in dieser Arbeit verwendeten Proben eine Expression des Rezeptors. Die zum Teil deutlichen Unterschiede in den Expressionsniveaus der einzelnen Zelllinien entsprechen den publizierten Daten über die Expression von uPAR in diesen gastrointestinalen Zelllinien (Boyd, Florent et al. 1988). Der Nachweis nur einer Proteinbande und eines mRNA-Transkriptes lassen bei beiden Proteinen weder unterschiedliche Spleißformen noch posttranslationelle Modifikationen vermuten. Lediglich bei der Kolonkarzinomzelllinie GEO konnte noch ein zweites Amplifikationsprodukt der uPAR-mRNA nach Auftrennung der Banden festgestellt werden.

Das wichtigste Ergebnis war die reziproke Verteilung der beiden Proteine in den untersuchten Zelllinien. Zellen mit einer hohen endogenen uPAR Expression wie RKO zeigten nur geringe Mengen von Pdc4 im Gegensatz zu Zellen mit einer niedrigen Expression des Rezeptors, wie zum Beispiel der Linie GEO. Im direkten Vergleich der Expression auf mRNA- und Proteinebene fiel interessanterweise auf, dass die beobachtete Verteilung der Expression beider Proteine wesentlich deutlicher auf der Proteinebene zu erkennen war. Die Ursache für diese Beobachtungen kann in einer unterschiedlichen Translationseffizienz der mRNA beziehungsweise Proteinstabilität in den verschiedenen Zelllinien liegen.

Pdc4 zeigt in einer Reihe von Tumorproben und Krebszellen im Vergleich zu Normalgewebe und Kontrollzelllinien eine Reduktion der Expression auf mRNA- und Proteinebene, und der Verlust der Expression korreliert mit einer schlechten Tumorprognose und Entwicklung (Chen, Knosel et al. 2003; Jansen, Camalier et al. 2004). Umgekehrt belegen eine Reihe von Studien, dass eine vermehrte Expression des Rezeptors für uPA in einem direkten Zusammenhang mit dem metastatischen Potential von Zelllinien *in vitro*, der Tumorprogression sowie der Überlebensrate von Patienten *in vivo* steht (Janicke, Schmitt et al. 1993; Kariko, Kuo et al. 1993; Ganesh, Sier et al. 1994; Kook, Adamski et al. 1994; Quattrone, Fibbi et al. 1995). Eine mögliche Erklärung für die reziproke Verteilung der Proteine in den untersuchten Zelllinien wäre somit, dass Pdc4 als möglicher Tumorsuppressor des Urokinasesystems Einfluss auf den invasiven Phänotyp ausübt. Unter dieser Voraussetzung sollten Zelllinien, mit einer hohen uPAR-Expression, keine hohe endogene Pdc4-Expression aufweisen und umgekehrt.

5.1.2 Die Suppression der uPAR-Expression auf transkriptioneller Ebene durch Pdc4

Durch Überexpressionsstudien mit Pdc4 in der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die vermehrte Produktion von Pdc4-Protein mit einer verminderten Oberflächenexpression von uPAR einherging.

Die Expression eukaryotischer Gene ist ein von der Zelle genau koordinierter Ablauf, angefangen mit der Aktivierung bestimmter Gene durch das Auflockern der Chromatinstruktur, Methylierung, Initiierung der RNA-Transkription, Termination der Elongation, Prozessierung der RNA, mRNA-Transport, mRNA-Stabilität bis hin zu der Translation in die gewünschte Aminosäuresequenz. Jeder dieser Schritte stellt einen Schlüsselpunkt dar, an dem die Expression eines bestimmten Proteins von der Zelle gelenkt werden kann, und entsprechend vielfältig sind die Einflussmöglichkeiten potentieller Tumorpromotoren oder Tumorsuppressoren in diesem Geschehen.

Verschiedene Studien lassen für Pdc4 einen Einfluss auf die zytoplasmatische Proteintranslation, aber auch eine Rolle für bestimmte Schritte des RNA-Metabolismus, -Transport oder -Processing erkennen. Es ist denkbar, dass auch die gezeigte supprimierende Wirkung von Pdc4 auf die uPAR-Expression über einen solchen Mechanismus vermittelt wird. So interagiert Pdc4 mit den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren eIF4A und eIF4G und ist so in die Translation von Proteinen involviert (Goke, Goke et al. 2002; Kang, Ahn et al. 2002). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte für Pdc4 eine zytoplasmatische Lokalisation und die Fähigkeit des Proteins gezeigt werden, die Helikaseaktivität von eIF4a und die cap-abhängige Translation zu inhibieren (Yang, Jansen et al. 2003). Eine andere Arbeitsgruppe konnte belegen, dass in Abhängigkeit des Wachstumsstadiums der Zelle Pdc4 nicht nur im Zytoplasma, sondern auch im Nukleus nachweisbar war (Yoshinaga, Matsushashi et al. 1999). Dies macht für Pdc4, neben seiner mutmaßlichen Rolle in der Translation, auch eine Rolle im RNA-Metabolismus der Zelle möglich. Die Zelle scheint in der Lage zu sein Pdc4 aus dem Nukleus in das Zytoplasma und umgekehrt aktiv zu transportieren und in humanen Fibroblasten ist Pdc4 in der Lage direkt an RNA zu binden. Dieser Interaktion wird durch die hydrophile aminoternale Region des Proteins vermittelt, die Abschnitte mit positiv und negativ geladenen Aminosäuren beinhaltet (Bohm, Sawicka et al. 2003). Hier befinden sich mehrere geclusterte Argininreste, wie man sie auch in anderen argininreichen RNA-Bindungsproteinen findet (Patel 1999). Es wird vermutet, dass Pdc4 somit in der Lage ist, Prozesse wie Splicing oder den Transport von RNA zwischen Nukleus und Zytoplasma zu beeinflussen. Dies würde auch im Einvernehmen mit Studiendaten stehen, die zeigen, dass die Überexpression von uPAR in malignen Zellen unter anderem durch eine veränderte

mRNA-Stabilität erklärt werden kann (Lund, Ellis et al. 1995; Lengyel, Wang et al. 1996; Shetty, Kumar et al. 1997; Gum, Juarez et al. 1998).

Andere Studien weisen dagegen auf eine Regulation von Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 oder NF κ B, durch Pdcd4 hin (Yang, Jansen et al. 2001; Yang, Knies et al. 2003; Young, Yang et al. 2003). Nachdem für uPAR mehrere für die Transkription des uPAR Gens wichtiger Promotorsequenzen unbestritten sind, die eine Regulierung der Expression des Rezeptors hauptsächlich auf der transkriptionellen Ebene bewirken, fokusierte diese Arbeit erstmals auf die Charakterisierung potentieller *cis*-Elemente des Promotors, über die Pdcd4 möglicherweise transkriptionell den uPAR regulieren könnte (Lengyel, Wang et al. 1996; Allgayer, Wang et al. 1999; Wang, Dang et al. 2000). In der Literatur finden sich mehrere Studien an Zelllinien, die einen Einfluss von verschiedenen Tumorpromotoren auf die Aktivität des Promotors und letztlich die Expression des Rezeptors beschreiben. Hierzu zählen Liganden wie der Epidermale-Wachstumsfaktor (EGF) (Boyd und Brattain 1989), der Vaskuläre-Endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) (Mandriota, Seghezzi et al. 1995), der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) (Mignatti, Mazziere et al. 1991), der Transformations-Wachstumsfaktor- β Type1 (TGF- β 1) (Lund, Ellis et al. 1995) sowie Interferon- α und γ (Wu, Murrell et al. 2002). Auch für einige zelluläre Proteine, wie Protein KinaseC (PKC) (Ando und Jensen 1996), Src (Allgayer, Wang et al. 1999) und Ras (Allgayer, Wang et al. 1999) ist ein direkter Einfluss auf die Regulation der Expression des uPAR Rezeptors bekannt. Es konnte bisher jedoch noch von keinem bekannten Tumorsuppressor ein Effekt auf die Aktivität des uPAR-Promotors gezeigt werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Promotorstudien konnten nun erstmals belegen, dass Pdcd4 einen Einfluss auf die Aktivität des uPAR-Promotors ausübt. Reporteranalysen mit der Kolonzelllinie RKO belegten, dass eine signifikante, dosisabhängige Reduktion der Aktivität des Promotors nach einer Erhöhung des Pdcd-Proteinlevels erfolgt. Dieser Einfluss von Pdcd4 auf die Promotoraktivität von uPAR konnte zudem durch gezieltes Ein- und Ausschalten der Proteinexpression in stabil transfizierten Zellen reproduziert werden. Dies ist besonders interessant, da im Bezug auf Pdcd4 eine direkte Beeinflussung der Transkription schon auf Promotorebene bisher noch nicht beschrieben wurde und zahlreiche Studien eine

hauptsächlich transkriptionelle Regulation des uPAR belegen. Es wurden in den letzten Jahren mehrere regulatorische Elemente innerhalb der Promotorsequenz beschrieben, über die ein solcher Effekt vermittelt wird. Es konnte gezeigt werden, dass Mitglieder verschiedener Transkriptionsfaktorfamilien innerhalb der Promotorsequenz an definierte *cis*-Elemente binden und damit die uPAR-Expression nach verschiedenen Stimuli vermitteln. Hierzu gehören Mitglieder der Sp-Familie, wie Sp-1 und Sp-3, Komponenten des AP-1 Komplexes, AP-2 Transkriptionsfaktoren, NFκB und PEA3, ein Mitglied der Ets-Transkriptionsfaktorfamilie (Lengyel, Wang et al. 1996; Allgayer, Wang et al. 1999; Dang, Boyd et al. 1999; Wang, Dang et al. 2000; Hapke, Gawaz et al. 2001).

Für Pdc4 konnten im Rahmen dieser Arbeit unter diesen bereits bekannten uPAR-Promotorelementen mehrere definiert werden, über die ein Einfluss von Pdc4 potentiell vermittelt wird. Unter diesen ist unter anderem ein PEA3-(*Polyomavirus Enhancer Activator 3*) Motiv an Position -248bp. Mitglieder der Ets-Transkriptionsfaktorfamilie, wie die der PEA3-Gruppe, spielen unter anderem eine Rolle als nukleäre Ziele der über Ras-initiierten MAP-Kinase-Signalkaskaden. Sie haben einen Einfluss bei Vorgängen der Proliferation, Differenzierung und onkogenen Transformation und es ist bekannt, dass sie eine positive Regulation der Expression verschiedener matrixdegradierender Proteasen u.a. auch in kolorektalen Karzinomen vermitteln (Gum, Lengyel et al. 1996; Ried, Jager et al. 1999; Lynch, Crawford et al. 2004). Daneben ist aber auch für verschiedene Ets-Familienmitglieder eine Funktion im Zusammenhang mit der Repression bestimmter Gene beschrieben worden (Giovane, Pintzas et al. 1994; Sgouras, Athanasiou et al. 1995). Zudem ist bekannt, dass nach Bindung von Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie eine negative Regulation der Promotoraktivität erfolgen kann (Goldberg, Treier et al. 1994; Chen und Boxer 1995). Neuere Studien belegen einen entscheidenden Einfluss eines Ets-Elements auf die durch Integrin vermittelte transkriptionelle Suppression des uPAR-Gens, wobei der bindende Transkriptionsfaktor PEA3 ist (Hapke, Gawaz et al. 2001). Die Rolle von PEA3 als negativer Regulator wird in einer weiteren Studie durch den Nachweis der Repression der *c-erb2*-Promotoraktivität unterlegt (Xing, Wang et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass PEA3 an diesen Promotor bindet und hierdurch zu einer negativen Regulation des *c-erb2*-Gens führt, wodurch das Zellwachstum *in vitro* und die Tumorentwicklung *in vivo* beeinflusst wird.

Die Autoren vermuten, dass PEA3 in ihrem System als negativ-regulatorischer Transkriptionsfaktor wirkt und mit einem weiteren positiv-aktivierenden Protein um diese Bindungsstelle innerhalb des Promotors konkuriert. Sie begründen diese Annahme mit der Beobachtung, dass nach Mutation dieser Bindungsstelle für PEA3 ein signifikanter Aktivitätsverlust im Vergleich zum Wildtyp-Promotor zu messen war. Insgesamt belegen diese Arbeiten eine Rolle von PEA3 als einen repressorisch wirksamen Transkriptionsfaktor. Die Daten in dieser Arbeit, die eine Aufhebung des suppressorischen Effekts durch Pcd4 auf uPAR bei Mutation des PEA3-Elements an Position -248bp zeigen, sind ein weiteres Indiz für PEA3 als Mediator einer durch dieses Protein vermittelten Suppression.

Eine weitere Region, die in den Reporteranalysen als Mediator der von Pcd4 vermittelten Suppression in dieser Arbeit identifiziert wurde, ist ein Abschnitt des Promotors mit einem kombinierten Motiv für ein AP-2 ähnliches Protein, Sp-1 und Sp-3 innerhalb der Region -152/-135bp des uPAR-Promotors, welches durch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe schon als wichtiges regulatorisches Element des uPAR-Gens näher charakterisiert wurde (Lengyel, Wang et al. 1996; Allgayer, Wang et al. 1999). Die in dieser Arbeit angefertigten Reporteranalysen konnten zeigen, dass die durch Pcd4 vermittelte Abschwächung der uPAR-Promotoraktivität durch eine Mutation dieser Region, welche die Bindung der Sp-Transkriptionsfaktorgruppe verhinderte, aufgehoben werden konnte. Unterstützt wurde dieses Ergebnis auch durch die entsprechenden EMSA-Studien dieser Region. So konnte für das kombinierte Sp-1/Sp-3/AP-2 Motiv nur eine Beeinflussung der Sp-3-Bindung nach Überexpression von Pcd4 im EMSA beobachtet und kompetetiert werden. Dies führt zu der Vermutung, dass Pcd4 den Einfluss auf den Promotor über eine verstärkte Sp-3-Bindung vermittelt und Sp-3 in diesem Fall als Silencerelement innerhalb der Sequenz genutzt wird. Sp-1 und AP-2 scheinen innerhalb dieses Elementes keine direkte Rolle in der Suppression des Promotors zu spielen. In diesem Zusammenhang ist besonders interessant, dass die Kolonkarzinomzelllinie GEO große Mengen an endogenem Sp-3 Protein exprimiert (Ammanamanchi und Brattain 2001). Hierdurch lässt sich potentiell die nur schwache endogene uPAR-Promotoraktivität in diesen Zellen erklären, zumal sich gerade in dieser Linie eine hohe endogene Menge Pcd4-Protein nachweisen ließ.

Zudem führt eine Stimulation dieser Zellen mit PMA zu einer erhöhten uPAR-Promotoraktivität und Expression von uPAR, vermittelt durch eine erhöhte Bindung von AP-2 und Sp-1 unter gleichzeitig verringerter Bindung von Sp-3 an diese Region -152/-135bp (Allgayer, Wang et al. 1999). Eine supprimierende Wirkung von Sp-3 wird auch durch mehrere andere Studien belegt. Sp-3 ist hier in der Lage, die durch Sp-1 vermittelte transkriptionale Aktivierung von Genen, durch Konkurrenz mit Sp-1 die Bindung am Promotor zu verhindern (Hagen, Muller et al. 1994; Luca, Majello et al. 1996; Yu, Datta et al. 2003). Über die biochemischen Mechanismen, die zu einer erhöhten Bindung von Sp-3 an das uPAR-Promotorelement -152/-135bp nach Pdc4 Transfektion führen, kann nur spekuliert werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass Pdc4 die Affinität von Sp-3 an dieses Element durch die Aktivierung von Signalwegen, die in einer biochemischen Modifikation des Transkriptionsfaktors enden, erhöht. Für Transkriptionsfaktoren wie Sp-1 und Sp-3 ist bekannt, dass ihre Fähigkeit, bestimmte Elemente innerhalb eines Promotors verstärkt zu binden, nicht durch eine vermehrte Induktion der Synthese des entsprechenden Proteins, sondern vielmehr durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen und Glykosylierungen beeinflusst wird (Yang, Su et al. 2001). Auch der Acetylungsgrad des Transkriptionsfaktors kann eine Rolle spielen. So konnte gezeigt werden, dass in der Brustkrebszelllinie MCF-7 die Acetylierung von Sp-3 den inhibitorischen Effekt aufhebt und Sp-3 dann als Aktivator der Transkription wirkt (Ammanamanchi, Freeman et al. 2003). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass für die Repression des uPAR-Promotors ausschließlich dieses gefundene Sp-Element eine Rolle spielt, zumal eine Arbeit zeigen konnte, dass Sp-3 eine bifunktionelle Rolle in der transkriptionellen Regulation spielen kann. In Abhängigkeit der vorhandenen Bindungsstellen innerhalb eines Promotors wirkt Sp-3 als Suppressor nach Bindung an mehrere *cis*-Elemente und als Aktivator beim Vorliegen nur einer Bindungsstelle (Majello, Luca et al. 1997).

Eine negativ-regulatorische Rolle auch für ein weiteres Sp-Motiv innerhalb des Promotors kann nicht völlig ausgeschlossen werden, da durch eine Deletion an Position -402/-350bp der durch Pdc4 vermittelte Einfluss aufgehoben werden konnte. Es handelt sich zum einen um eine Sequenz innerhalb des Promotors, die putative Sequenzen für die Transkriptionsfaktoren Sp-1-, NF-1 und GATA-2 enthält (Hapke, Gawaz et al. 2001). Es war bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit

jedoch noch nicht bekannt, ob tatsächlich die beschriebenen Transkriptionsfaktoren an diese Region binden und welchen Einfluss sie auf die transkriptionelle Regulation des Promotors ausüben. Durch Verwendung einzelner Abschnitte dieser Region, die zu den putativen GATA- und Sp-Sequenzen korrespondierten, konnte in einer EMSA-Studie für zwei der möglichen beteiligten Transkriptionsfaktorfamilien eine Bindung in nukleären Extrakten der Kolonkarzinomzelllinie RKO zumindest vermutet werden. Für Transkriptionsfaktoren der Sp- und GATA-Familie zeigten sich in beiden Fällen Unterschiede in der Bandenintensität nach Expression von Pdc4. In beiden Fällen war deren verminderte Bindung im EMSA nach Überexpression von Pdc4 in den verwendeten Zellen zu beobachten. Dieser Befund ist vor allem in Hinblick auf den gezeigten Einfluss des benachbarten PEA3-Motivs an Position -248bp interessant. Aus der Literatur ist bekannt, dass Transkriptionsfaktoren der Sp-Familie und Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie sich gegenseitig in ihrer Funktion beeinflussen. Dieser Effekt ist für verschiedene Promotoren beschrieben, die wie der uPAR-Promotor keine TATA-Box besitzen. Für den Prototyp dieser Transkriptionsfaktoren Ets1 ist bekannt, dass er seine Funktion als Komponente von größeren Transkriptionskomplexen ausübt und mit Sp-1 synergistisch interagiert, wodurch die Aktivität verschiedener zellulärer Gene reguliert werden kann (Gegonne, Bosselut et al. 1993; Dittmer, Gegonne et al. 1994). Es ist denkbar, dass auch PEA3 und Sp-Transkriptionsfaktoren sich in unserem Fall in einer ähnlichen Art gegenseitig beeinflussen, und dass beide Elemente für eine Beeinflussung des uPAR-Promotors durch Pdc4 synergistisch wirken.

Unklar bleibt, ob es sich bei der zweiten in dieser Arbeit gezeigten Bindung eines Transkriptionsfaktors an dieses Element -402/-350 tatsächlich um den Transkriptionsfaktor GATA-2 handelt. GATA-2 wird neben GATA-1 und 3 nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert und spielt eine Rolle in der Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen (Tsai, Keller et al. 1994). Andere Mitglieder der GATA-Familie, wie GATA-4, -5 und -6 wurden in Zellen des kardiovaskulären Systems, Verdauungstrakts, Urogenitaltrakts und Muskelgewebes nachgewiesen (Laverriere, MacNeill et al. 1994; Morrissey, Ip et al. 1996; Morrissey, Ip et al. 1997). Für GATA-6 ist darüber hinaus auch eine Expression in den Kolonkarzinomzellen RKO und DLD-1 nachgewiesen, und verhindert in diesen Zellen die Induktion der Apoptose (Shureiqi, Jiang et al. 2002). Nachdem in unserem Fall Supershiftanalysen für die

verschiedenen GATA-Untergruppen nicht möglich waren (Daten nicht gezeigt), bleibt unklar, welches Element der GATA-Familie hier möglicherweise die Pdc4 induzierte Suppression von uPAR mitvermittelt.

Überraschend war das Ergebnis, dass für Transkriptionsfaktoren des AP-1-Komplexes keine Beeinflussung durch Pdc4 nachgewiesen werden konnte. Die Transaktivierung dieses Faktors spielt eine entscheidend Rolle bei den beobachteten Transformationsprozessen im JB6 Mausmodell (Bernstein, Bravo et al. 1992). Durch Überexpressionsstudien konnte gezeigt werden, dass die nach TPA Stimulation induzierte Transaktivierung von AP-1 konzentrationsabhängig von Pdc4 inhibiert wird (Yang, Jansen et al. 2001). Durch die Verwendung einer allgemeinen AP-1 Konsensussequenz belegt diese Studie einen generellen Einfluss von Pdc4 auf die Aktivierung und Bindung von AP-1. Inwieweit die Aktivität einzelner natürlicher Promotoren hierdurch tatsächlich beeinflusst wird, kann so nicht beantwortet werden. Bei dem in unserer Arbeit verwendeten AP-1 Motiv handelt es sich jedoch um ein natürliches *cis*-Element, analog zu dem aus dem wildtyp uPAR-Promotor, was eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist. Tatsächlich sind innerhalb des uPAR-Promotors zwei Bindungssequenzen für AP-1 an den Positionen -99/-70bp und -190/-171bp beschrieben, die eine Rolle in der der PMA-induzierbaren Promotoraktivität spielen. Die Mutation keines der beiden *cis*-Elemente konnte jedoch die Wirkung von Pdc4 auf die Aktivität des uPAR-Promotors abschwächen (Lengyel, Wang et al. 1996; Dang, Boyd et al. 1999). Der an dem Mausmodell von Yang et al. beschriebene Einfluss von Pdc4 auf die Transaktivierung von AP-1 ist offensichtlich nicht auf die transkriptionelle Situation des uPAR in den verwendeten humanen Kolonzelllinien zu übertragen. Im Fall von uPAR spielen die AP-1 Konsensusmotive wohl ausschließlich als positive Regulatoren der über PMA und Ras gesteuerten Induktion der uPAR-Genexpression eine Rolle, während dagegen die von Pdc4 vermittelte Suppression der uPAR-Genexpression über andere Motive, wie die für AP-2/Sp-1/Sp-3 an Position -152/-135bp, PEA3 an Position -248bp sowie gegebenenfalls Sp-1/GATA-2 und NF1 an Position -402/-350bp gesteuert wird.

5.1.3 Hemmung der Invasivität durch Pdc4

In dieser Arbeit konnte erstmals ein Hinweis erbracht werden, dass eine Überexpression von Pdc4 nicht nur eine verminderte Aktivität des uPAR-Promotors, sowie eine geringere Expression des uPAR-Proteins auf der Zelloberfläche bewirkt, sondern auch zu einer Suppression zumindest eines Teils der Invasions- und Metastasierungskaskade der verwendeten Kolonkarzinomzellen führt. Dies ist naheliegend, nachdem das uPAR-System eines der wesentlichen Invasions- und Metastasierungssysteme von Karzinomen darstellt. Das hier verwendete CAM-Modell ist ein *in vivo* Assay, mit dem es möglich ist, einen potentiellen Regulator daraufhin zu untersuchen, wie er speziell den Vorgang der Intravasation von Tumorzellen in die Blutgefäße der Chorioallantoismembran eines befruchteten und bebrüteten Hühnereis, nach Invasion in die obere CAM, beeinflusst (Kim, Yu et al. 1998). Der beobachtete geringere Nachweis der Pdc4 überexprimierenden Kolonkarzinomzellen in der unteren CAM lässt den Schluss zu, dass Pdc4 möglicherweise zwei Schritte in der Metastasierungskaskade beeinflusst. Hierzu zählen die Invasion in die umgebende Matrix (obere CAM) und die Intravasation in die Blutbahn der Membran (untere CAM). Hierbei ist es möglich, dass Pdc4 entweder nur die Invasion in die obere CAM oder die Intravasation von der oberen CAM in die Gefäße hemmt, oder dass beide Teilschritte gleichzeitig beeinträchtigt werden. Die vorliegenden Daten können im Augenblick zwischen beiden Erklärungsmöglichkeiten nicht differenzieren. Mit Invasion und/oder Intravasation werden aber auf jeden Fall essentielle Teilschritte der Tumorprogression inhibiert, was auf eine mögliche klinische Relevanz von Pdc4 in Zukunft spekulieren lässt. Diese Hypothese wird unterstützt durch kürzlich erschienene klinische Daten, in denen Pdc4 in malignen Lungentumoren eine signifikant niedrigere Expression zeigt im Vergleich zum umgebenden Normalgewebe, und die Expression von Pdc4 mit einer schlechteren klinischen Prognose, sowie einem höheren Tumorgrading dieser invasiven Tumore zumindest in einem präliminaren Kollektiv, gekoppelt ist (Chen, Knosel et al. 2003). Eine potentiell wichtige klinische Bedeutung von Pdc4 für die Zukunft wird durch weitere Hinweise auf Pdc4 als möglicher Suppressor weiterer Phänomene im Rahmen der Tumorprogression unterstützt. Die meisten Zellen benötigen für ihr Wachstum eine feste Unterlage wie eine Basalmembran und

wachsen als Monolayer. Ein Verlust dieser Fähigkeit ist ein typisches Merkmal transformierter Zellen. Für Pcd4 ist bekannt, dass eine Überexpression in epidermalen JB6 Mauszellen die neoplastische Transformation dieser Zellen verhindert (Cmarik, Min et al. 1999). Durch Soft-Agar-Assays konnte ferner nachgewiesen werden, dass es möglich ist, den Phänotyp bereits transformierter JB6 Zellen durch stabile Überexpression von Pcd4 wieder zu unterdrücken (Yang, Knies et al. 2003). Ein Einfluss von Pcd4 auf die Proliferationsrate konnte in dieser Arbeit nicht belegt werden. Eine Erhöhung der Proliferationsrate ist neben dem Verlust der Kontaktinhibition ein Merkmal transformierter Zellen und kann zu einer Verfälschung von Daten bezüglich des Einflusses eines Proteins auf die Invasionsfähigkeit der Zellen führen. Die verminderte Invasion nach einer Überexpression von Pcd4 ist somit nicht durch eine geringere basale Proliferation der behandelten Zellen zu erklären. Diese Beobachtung steht allerdings im Gegensatz zu einer Studie die zeigt, dass eine Überexpression von Pcd4 zu einer Inhibition der Zellproliferation in neuronalen Zellen führt (Goke, Gregel et al. 2004).

5.2 Neuetablierung eines quantitativen Chreonallantoismembran (CAM)-Assay

Das Hühnerembryomodell ist eine im Vergleich zu anderen *in vivo* Assays relativ schnelle Methode, um das Verhalten von Tumorzellen innerhalb der Metastasierungskaskade zu analysieren. Das Modell bietet zu etablierten Mausmodellen mehrere Vorteile. Der sich entwickelnde Embryo bildet ein natürliches, immundefizientes System, das ohne die Gefahr von Abstossung die Analyse spontaner und experimenteller Metastasierung nach Transplantation von Fremdzellen ermöglicht. Die mit dem Embryo verbundenen extraembryonalen Membranen bilden zudem ein geschlossenes, leicht zu manipulierendes System. Zudem lassen sich alle Schritte der Metastasierungskaskade schnell und wenig kostenintensiv untersuchen (Zijlstra, Mellor et al. 2002). Durch die Entwicklung des Embryos in dem befruchteten Ei besteht jedoch eine natürliche Limitierung des Assays auf 7-9 Tage nach Inokulation der Zellen. In diesem Zeitraum ist die Analyse von Intravasation in die Blutzirkulation und Invasion in das Gewebe des Embryos

möglich. Aufgrund der limitierten Inkubationszeit können sich keine makroskopisch sichtbaren Metastasen ausbilden. Dies hat zur Folge, dass der Nachweis von einzelnen Zellen und Mikrometastasen zu einem wichtigen Bestandteil dieses Assays gehört. Eine effiziente Möglichkeit, auch geringe Mengen humaner genomischer DNA nachzuweisen, besteht in der Verwendung von PCR-Primern, die spezifisch humane Alu-Sequenzen amplifizieren (Kim, Yu et al. 1998; Sifis, Both et al. 2002). Wird ein solcher Nachweis mit den Vorteilen der Real-Time-PCR kombiniert, ist auch die quantitative Analyse invasiver Zellen im CAM-Assay möglich (Zijlstra, Mellor et al. 2002). Die bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit vorliegenden Publikationen über eine Quantifizierung invasiver Zellen im CAM Modell erwiesen sich jedoch aufgrund der beschriebenen Sensitivität und Spezifität als nicht geeignet, um eine entsprechende Auswertung in unseren Ansätzen zu gewährleisten. Dies machte die Etablierung eines alternativen quantitativen CAM-Assays notwendig.

5.2.1 Nachweis humaner genomischer DNA im CAM-Assay mittels Alu-Sequenz-PCR und radioaktiver Markierung der Fragmente

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Durchführung des CAM-Assay und die Auswertung mittels semiquantitativer Endpunkt-PCR reproduzierbar etabliert. Die für die Etablierung verwendeten Zelllinien wurden unter dem Aspekt ihres hohen invasiven Potentials ausgesucht und zuvor in einem Matrigelassay hinsichtlich der Fähigkeit, in eine künstliche extrazelluläre Matrix einzuwandern, untersucht. Die verschiedenen Schritte von der Vorbereitung der Eier, der Inokulation der Zellen, Inkubation der Eier, Aufarbeitung der genomischen DNA und Nachweis der eingewanderten Zellen mit einer Endpunkt-Alu-PCR wurden mit Modifikationen gemäß dem Protokoll von Kim et al durchgeführt (Kim, Yu et al. 1998). In allen Ansätzen ließ sich so bei Anwesenheit humaner genomischer DNA eine Bande mit der publizierten Größe von 220bp amplifizieren. Die erreichte Sensitivität von mindestens 60 humanen Zellen/ μ g genomischer CAM-DNA entspricht der in der Publikation beschriebenen Nachweisgrenze. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine mögliche Kontamination während der Aufarbeitung der Proben mit humaner DNA konnte durch die Verwendung von Eiern, die nur mit sterilem Medium beimpft und parallel aufgearbeitet wurden, ausgeschlossen werden. Bei Verwendung dieser

Kontrollproben konnte keine Amplifikation humaner Alu-Sequenzen nach der Aufarbeitung nachgewiesen werden. Dass es sich bei der in der PCR Reaktion nachgewiesenen humanen DNA tatsächlich um den Nachweis eingewanderter humaner Zellen in der Chorioallantoismembran handelt, konnte durch weitere Versuche belegt werden. So verkürzte sich die benötigte Inkubationszeit, bis Zellen in der unteren CAM nachweisbar waren, durch eine Erhöhung der Anzahl inokulierter Zellen. Der Vergleich zwischen Proben der genomischen DNA aus oberer und unterer CAM nach Inokulation humaner Zellen gab ferner Auskunft über den zeitlichen Verlauf der Invasation von der oberen CAM in die untere CAM, und die Verwendung eines bekannten Proteaseinhibitors Marimastat konnte analog zu den publizierten Daten die Invasion der behandelten Zellen vermindern (Kim, Yu et al. 1998). Somit war zunächst ein semiquantitativer CAM Assay analog zu den bereits publizierten Protokollen als Ausgangsbasis erreicht.

5.2.2 Etablierung des quantitativen Nachweises humaner Zellen im CAM-Assay

In einem zweiten Etablierungsschritt konnte in dieser Arbeit eine quantitative Auswertung des CAM-Assays mittels Real-Time-PCR entwickelt werden. Real-Time oder quantitative PCR ermöglicht einen sensitiven und quantitativen Nachweis von spezifischen Nukleinsäuresequenzen. Die Quantifizierung der gesuchten Fragmente wird durch die exakte Bestimmung des Zeitpunktes erreicht, an dem ein spezifisches Produkt zum ersten Mal entsteht (Higuchi, Dollinger et al. 1992; Higuchi, Fockler et al. 1993). Dies bietet einen entscheidenden Vorteil gegenüber der konventionellen Endpunkt-PCR, bei welcher eine akkurate Quantifizierung so nicht möglich ist. Die Methode der quantitativen PCR basiert auf dem Nachweis eines fluoreszierenden Reportermoleküls, dessen Signalintensität proportional zu dem amplifizierten Produkt ansteigt. Als Reportermoleküle dienen entweder interkalierende Farbstoffe (z.B. SYBR Green) oder sequenzspezifische, fluorogenische Proben (z.B. Molecular Beacon oder TaqMan®-Proben) (Lee, Connell et al. 1993; Livak, Flood et al. 1995). Ziel war es, eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität des Nachweises humaner DNA in dem Hühner-DNA Hintergrund zu erreichen. Hierfür war es notwendig, die Bedingungen so zu optimieren, dass eine Detektionsgrenze von unter 10 Zellen pro

Probe möglich war. Diese Zahl ergibt sich aus der Überlegung, dass höchstens 0,1% der inokulierten Zellen in das System invadieren und maximal 1% der aufgearbeiteten genomischen DNA letztlich für eine PCR verwendet wird (Fidler und Kripke 1977). Da in einer Real-Time-PCR üblicherweise zwischen 10-30ng als Template verwendet werden, macht die Verwendung von Zelllinien mit einem geringeren Invasionspotential es notwendig die PCR-Reaktion so zu optimieren, dass auch bei Einsatz wesentlich größerer DNA-Mengen ein Nachweis ohne Beeinflussung der PCR-Dynamik möglich ist. Aus den genannten Gründen wurden Primer gewählt, die spezifisch Alu-Sequenzen der YB8-Subfamilie amplifizieren. Diese werden bevorzugt für forensische Analysen verwendet, da es mit Hilfe solcher Primer möglich ist, auch noch geringste Mengen humaner DNA in Proben nachzuweisen. Sie sind dabei so spezifisch, dass sie humane DNA zudem sicher von der DNA anderer Spezies unterscheiden, auch wenn diese in einem hohen Überschuss in der Probe vorliegt (Walker, Kilroy et al. 2003). Der zunächst verfolgte Ansatz mit den von Walker et al. publizierten Primern unter Verwendung von SYBR Green als interkalierenden Farbstoff führte allerdings nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Ein spezifischer Nachweis humaner DNA war so nur bis zu einer Zahl von 1000 Zellen in einem Hintergrund von 500ng genomischer Hühner-DNA möglich. Zudem zeigte die Auswertung der Schmelzkurven und die Überprüfung nach Auftragung der gebildeten PCR-Produkte auf Agarosegele, neben der spezifischen Bande noch ein unspezifisches Fragment, welches auch in Abwesenheit humaner DNA nachgewiesen werden konnte. Die unspezifische Reaktion von SYBR Green mit jeglicher im Ansatz vorhandener doppelsträngiger DNA erschwerte zusätzlich eine genaue Detektion der amplifizierten spezifischen Fragmente. Dieser Effekt konnte schließlich durch Optimierung und Verwendung eigener auf der YB8-Konsensussequenz basierender Primer und Verwendung einer sequenzspezifischen TaqMan®-Probe umgangen werden. Der Einsatz sequenzspezifischer Proben ermöglicht den Nachweis spezifischer Fragmente und ist somit eine konsequente Weiterentwicklung zu interkalierenden Farbstoffen. TaqMan®-Proben basieren auf dem Prinzip des Fluorogenischen 5' Nuklease Assays. Die typischerweise 20-30bp langen Proben sind an einem Ende mit einem Fluoreszenzreporterfarbstoff und an dem anderen Ende mit einem Fluoreszenzunterdrücker gekoppelt. Während der PCR hybridisiert die Probe mit ihrem komplementären Einzelstrang in der Sequenz des durch die PCR-Oligonukleotide amplifizierten Fragmentes. Bei der Amplifikation wird

die Probe durch die 5'→3' Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase degradiert und der Quecher wird von dem Reporterfarbstoff getrennt. Erst danach ist eine Anregung und Detektion des Fluoreszenzfarbstoffes möglich. Mit dieser Modifikation war es schließlich möglich, die gewünschte Nachweisgrenze von 1/10 eines humanen Zellgenoms pro Probe zu erreichen. Auch der direkte Vergleich mit der von zwei Gruppen etablierten und auf dem Nachweis von SYBR Green basierenden quantitativen Alu-PCR zeigt eine Überlegenheit der in dieser Arbeit verwendeten Primer/Proben-Kombination (Mira, Lacalle et al. 2002; Zijlstra, Mellor et al. 2002). Die dort publizierten Primer waren nicht in der Lage in dem typischerweise eingesetzten Hintergrund von 1µg genomischer CAM-DANN humane Alu-Sequenzen nachzuweisen, ohne die Dynamik der PCR Reaktion deutlich zu beeinflussen.

Schließlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die verwendete Primer/Proben-Kombination auch spezifisch humane Alu-Sequenzen in einem Hintergrund von muriner genomischer DANN nachweisen kann. Hier war es sogar möglich, die Nachweisgrenze im Vergleich zu der Auswertung des CAM-Assays zu verdoppeln, da es auch in einem Hintergrund von 2µg muriner DANN möglich war bis zu 1/10 Zelle oder humanem Genom zu detektieren. Dieses Ergebnis ist besonders interessant, da die meisten Studien zur Invasion und Metastasierung an murinen *in vivo* Modellen, wie SCID- oder Nacktmäusen, durchgeführt werden. Durch die Anwendung der in unserem CAM-Assay entwickelten Primer wäre es nun theoretisch möglich, die Invasions- und Metastasierungsfähigkeit humaner Zellen in diesen Modellen schon nach der Bildung von Mikrometastasen in murinen Gewebeproben zu untersuchen. Das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll zur quantitativen Auswertung invasiver humaner Zellen stellt somit eine gut reproduzierbare und im Vergleich mit bestehenden Auswertungen sensitivere Alternative zum Nachweis invasiver humaner Zellen und Mikrometastasen im CAM-Assay und Mausmodell dar (Horst, Leupold et al. 2004).

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss des potentiellen Tumorsuppressors Pdc4 auf das invasionsassoziierte Urokinase-Rezeptorgen (uPAR), sowie auf den Invasionsvorgang selbst, untersucht. In verschiedenen gastrointestinalen Karzinomzelllinien wurde eine gegenläufige Expression von uPAR- und Pdc4-mRNA und -Protein nachgewiesen. In Reporteragen-Assays unter Verwendung von Wildtyp- und mutiertem uPAR-Promotor zeigte sich nach gleichzeitiger Transfektion von Pdc4 eine dosisabhängige Suppression der uPAR-Promotoraktivität. Ferner wurden verschiedene *cis*-Elemente innerhalb des Promotors als potentielle Mediatoren dieser Regulation identifiziert. Bei diesen handelt es sich potentiell um die Region -402/-350bp mit mutmaßlichen Bindestellen für Sp-1, GATA-1, NF-1 und einem PEA3/ets Element an Position -245 bp. Zusätzlich konnte durch eine Mutation der kombinierten Bindungsstelle für Sp-1 und Sp-3 an Position -152/-135bp, die über Pdc4 ermittelte Suppression der Promotoraktivität aufgehoben werden. In Gelshiftanalysen zeigte sich neben einer verminderten Bindung von Transkriptionsfaktoren der GATA- und Sp-Familie innerhalb der Region -402/-350bp insbesondere eine Erhöhung der Bindung von Sp-3 an Promotorregion -152/-135bp. Dies impliziert neben den oben genannten Mediatoren, dass Pdc4 durch Induktion der Bindung von Sp-3 an dieses Element den uPAR-Promotor supprimiert. Darüber hinaus konnte durch die Expression von Pdc4 die Invasionsfähigkeit der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 *in vivo* reduziert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Pdc4 die Promotoraktivität von uPAR über verschiedene *cis*-aktive Elemente des Promotors supprimiert und belegen erstmals die Regulation eines invasionsassoziierten Gens durch den potentiellen Tumorsuppressor Pdc4. Ferner wird erstmals Sp-3 als Mediator der Pdc4 vermittelten Genexpression vorgeschlagen. Daneben postulieren die Invasionsdaten auch eine Funktion von Pdc4 als potentiellen Suppressor von Teilschritten der Metastasierungskaskade.

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit ein neues quantitatives CAM-Modell etabliert werden, das die Invasion und Intravasation von Tumorzellen *in vivo* spezifisch im Hühnerei-Modell untersucht. Das Protokoll unterscheidet sich von den bisher publizierten Arbeiten durch die Verwendung einer spezifischen TaqMan®-Probe in

Kombination mit Primern, die spezifisch humane Alu-Sequenzen der YB8-Unterfamilie nachweisen. Durch diese Modifikationen wurde eine höhere Sensitivität der quantitativen Alu-PCR erreicht. Zusätzlich eröffnet die Spezifität der hier entwickelten Primer über den CAM-Assay hinaus die Möglichkeit, humane Zellen und Mikrometastasen auch in murinen *in vivo* Modellen wie SCID- oder Nacktmäusen nachzuweisen.

7 Abkürzungen

μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μM	Mikromol
μm	Mikrometer
Abb	Abbildung
ADAM	membranverankerte Metalloprotease-Desintegrinproteine
Amp _r	Ampicillinresistenz
AP	Aktivatorprotein
APC	adenomatöse Polyopsis Coli
Arg	Argenin
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATF	aminoterminales Fragment
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
Bcl	<i>B-cell leukemia/lymphoma</i>
bp	Basenpaar
Bq	Becquerel
CAM	Choreonallantoismembran
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Cdk	zyklinabhängige Kinase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEM	Choreonallantois-Embryo-Metastasierungsassay
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalovirus
CoA	Coenzym A
COX	Zyklohexokinase
CRM1	chromosome region maintenance 1
DCC	deletiert in kolorektalem Karzinom

dCTP	Deoxycytidin 5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DUG	death upregulated gene
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
eIF	eukaryotischer Translationsinitiierungsfaktor
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ErbB	<i>Erythroblastosis B</i>
et al.	und andere
ets	<i>E twenty-six</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
F1	Fibronektin Typ-1
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Scanner</i>
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
g	relative Beschleunigung
G	giga
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gly	Glycin
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
GSK	Glycogensynthasekinase
GTP	Guanidintriphosphat
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HMW	high molecular weight
HNPCC	hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom
H-Ras	<i>Harvey-Rat sarcoma</i>
IgG	Immunglobulin G
Ile	Isoleucin
J	Joule
Kan _r	Kanamycintesistenz
kb	Kilobase

K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KR	Kringel
K-Ras	<i>Kirsten-Murine sarcoma</i>
LB	Luria Bertani
LRP	low density lipoprotein receptor
M	Mol
MEM	Modified Eagle Medium
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
MMP	Matrixmetalloprotease
MMR	<i>mismatch repair</i>
mRNA	Boten-RNA
MSI	Mikrosatelitteninstabilität
MT-MMP	Membrantyp-Matrix-Metallo-Protease
Myb	<i>Myoblastosis</i>
Myc	<i>Myelocytomatosis</i>
N-CAM	neurales Zelladhäsionsmolekül
Neo _r	Neomycinresistenz
NES	nucleäres Exportsignal
NFκB	<i>nuclear transkription factor kappa-B</i>
ng	Nanoogramm
NK	Natural killer
nm	Nanoometer
nM	Nanomol
OD	optische Dichte
ODC	Ornithincarboxylase
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PAN	PAN Domäne
PAR	Protease-Aktivierter-Rezeptor
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion

Pdcd	Programmierter-Zelltod-Protein
PEA	<i>polyomavirus enhancer activator</i>
PKI	Proteinkinase A Inhibitor
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PNK	Polynukleotidkinase
Rev	<i>Regulator of virion protein expression</i>
RGB	Arg-Gly-Asp
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institut</i>
s	Sekunden
sc	<i>single chain</i>
SCID	<i>severe combined immuno-deficiency</i>
SIMP	integrale Serinmembranpeptidasen
Sp	<i>sequence specific</i>
Src	<i>Rous sarcoma</i>
T	tera
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
tc	<i>two chain</i>
TCF	T-Zellen Spezifischer Faktor
TE	Tris-EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
TIS	Topoisomerase Suppressor
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
tPA	Gewebe Type Plasminogenaktivator
TPA	Trans-2-Phenylzyklopropylamin
uPA	Urokinasetyp Plasminogen Aktivator
uPAR	Urokinasetype Plasminogen Aktivator
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

8 Literaturverzeichnis

- Ahmad, A. and I. Hart (1997). "Mechanisms of metastasis." Crit Rev Oncol Hematol **26**(3): 163-73.
- Albini, A., Y. Iwamoto, et al. (1987). "A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells." Cancer Res. **47**(12): 3239-45.
- Allgayer, H., R. Babic, et al. (1998). "Tumor-associated proteases and inhibitors in gastric cancer: analysis of prognostic impact and individual risk protease patterns." Clin Exp Metastasis **16**(1): 62-73.
- Allgayer, H., M. Heiss, et al. (1997). "Urokinase plasminogen activator receptor (uPA-R): one potential characteristic of metastatic phenotypes in minimal residual tumor disease." Cancer Res **57**(7): 1394-9.
- Allgayer, H., M. Heiss, et al. (1997). "Prognostic factors in gastric cancer." Br J Surg **84**(12): 1651-64.
- Allgayer, H., H. Wang, et al. (1999). "Transcriptional induction of the urokinase receptor gene by a constitutively active Src. Requirement of an upstream motif (-152/-135) bound with Sp-1." J Biol Chem **274**(26): 18428-37.
- Allgayer, H., H. Wang, et al. (1999). "Targeted disruption of the K-ras oncogene in an invasive colon cancer cell line down-regulates urokinase receptor expression and plasminogen-dependent proteolysis." Br J Cancer **80**(12): 1884-91.
- Allgayer, H., H. Wang, et al. (1999). "Transactivation of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene through a novel promoter motif bound with an activator protein-2alpha-related factor." J Biol Chem **274**(8): 4702-14.
- Ammanamanchi, S. and M. Brattain (2001). "Sp-3 is a transcriptional repressor of transforming growth factor-beta receptors." J Biol Chem **276**(5): 3348-52.
- Ammanamanchi, S., J. Freeman, et al. (2003). "Acetylated Sp-3 is a transcriptional activator." J Biol Chem **278**(37): 35775-80.
- Ando, Y. and P. Jensen (1996). "Protein kinase C mediates up-regulation of urokinase and its receptor in the migrating keratinocytes of wounded cultures, but urokinase is not required for movement across a substratum *in vitro*." Cell Physiol **167**(3): 500-11.

- Andreasen, P., L. Sottrup-Jensen, et al. (1994). "Receptor-mediated endocytosis of plasminogen activators and activator/inhibitor complexes." FEBS Lett **338**(3): 239-45.
- Anichini, E., G. Fibbi, et al. (1994). "Production of second messengers following chemotactic and mitogenic urokinase-receptor interaction in human fibroblasts and mouse fibroblasts transfected with human urokinase receptor." Exp Cell Res **213**(2): 438-48.
- Appella, E., E. Robinson, et al. (1987). "The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases." J Biol Chem **262**(10): 4437-40.
- Appl, H. and K. Klempnauer (2002). "Targeted disruption of c-myb in the chicken pre B-cell line DT40." Oncogene **21**(19): 3076-81.
- Aravind, L. and E. Koonin (2000). "Eukaryote-specific domains in translation initiation factors: implications for translation regulation and evolution of the translation system." Genome Res **10**(8): 1172-84.
- Azzoni, L., O. Zatsepina, et al. (1998). "Differential Transcriptional Regulation of CD161 and a Novel Gene, 197/15a, by IL-2, IL-15, and IL-12 in NK and T Cells." J Immunol. **161**(7): 243-53.
- Batzer, M., P. Deininger, et al. (1996). "Standardized nomenclature for Alu repeats." J Mol Evol **42**(1): 3-6.
- Behrendt, N., M. Ploug, et al. (1991). "The ligand-binding domain of the cell surface receptor for urokinase-type plasminogen activator." J Biol Chem **266**(12): 7842-7.
- Behrendt, N., E. Ronne, et al. (1996). "Domain interplay in the urokinase receptor. Requirement for the third domain in high affinity ligand binding and demonstration of ligand contact sites in distinct receptor domains." J Biol Chem **271**(37): 22885-94.
- Behrendt, N., E. Ronne, et al. (1990). "The human receptor for urokinase plasminogen activator. NH2-terminal amino acid sequence and glycosylation variants." J Biol Chem **265**(11): 6453-60.
- Bernstein, L., R. Bravo, et al. (1992). "12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate--induced levels of AP-1 proteins: a 46-kDa protein immunoprecipitated by anti-fra-1 and induced in promotion-resistant but not promotion-sensitive JB6 cells." Mol Carcinog **6**(3): 221-9.

- Bianchi, E., R. Cohen, et al. (1994). "The urokinase receptor is expressed in invasive breast cancer but not in normal breast tissue." Cancer Res **54**(4): 861-6.
- Blasi, F. (1988). "Surface receptors for urokinase plasminogen activator." Fibrinolysis **2**: 73-84.
- Blasi, F., J. Vassalli, et al. (1987). "Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors." J Cell Biol **104**(4): 801-4.
- Blood, C. and B. Zetter (1990). "Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis." Biochim Biophys Acta **1032**(1): 89-118.
- Bode, W. and K. Maskos (2003). "Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases." Biol Chem **384**(6): 863-72.
- Bohm, M., K. Sawicka, et al. (2003). "The transformation suppressor protein Pcd4 shuttles between nucleus and cytoplasm and binds RNA." Oncogene **22**(31): 4905-10.
- Bos, J. (1988). "The ras gene family and human carcinogenesis." Mutat Res **195**(3): 255-71.
- Bosma, G., R. Custer, et al. (1983). "A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse." Nature **301**(5900): 527-30.
- Boyd, D. and M. Brattain (1989). "Determination of the effects of epidermal growth factor on urokinase secretion and urokinase receptor display in a well-differentiated human colon carcinoma cell line." Cancer Res **49**(8): 1948-53.
- Boyd, D., G. Florent, et al. (1988). "Determination of the levels of urokinase and its receptor in human colon carcinoma cell lines." Cancer Res **48**(11): 3112-6.
- Buo, L., K. Bjornland, et al. (1994). "Expression and release of plasminogen activators, their inhibitors and receptor by human tumor cell lines." Anticancer Res **14**(6B): 2445-51.
- Cantero, D., H. Friess, et al. (1997). "Enhanced expression of urokinase plasminogen activator and its receptor in pancreatic carcinoma." Br J Cancer **75**(3): 388-95.
- Castellino, F. (1984). "Biochemistry of human plasminogen." Semin Thromb Hemost **10**(1): 18-23.
- Cavallaro, U., A. d. Vecchio, et al. (1993). "A conjugate between human urokinase and saporin, a type-1 ribosome-inactivating protein, is selectively cytotoxic to urokinase receptor-expressing cells." J Biol Chem **268**(31): 23186-90.

- Chantret, I., A. Barbat, et al. (1988). "Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines." Cancer Res. **48**(7): 1936-42.
- Chen, C. and H. Okayama (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." Mol Cell Biol **7**(8): 2745-52.
- Chen, H. and L. Boxer (1995). "Pi 1 binding sites are negative regulators of bcl-2 expression in pre-B cells." Mol Cell Biol **15**(7): 3840-7.
- Chen, Y., T. Knosel, et al. (2003). "Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis." Pathol **200**(5): 640-6.
- Clements, W., A. Lowy, et al. (2003). "Adenomatous polyposis coli/beta-catenin interaction and downstream targets: altered gene expression in gastrointestinal tumors." Clin Colorectal Cancer **3**(2): 113-20.
- Cmarik, J., H. Min, et al. (1999). "Differentially expressed protein Pcd4 inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 14037-42.
- Colburn, N., B. Koehler, et al. (1980). "A cell culture assay for tumor-promoter-dependent progression toward neoplastic phenotype: detection of tumor promoters and promotion inhibitors." Teratog Carcinog Mutagen **1**(1): 87-96.
- Conese, M., A. Nykjaer, et al. (1995). "alpha-2 Macroglobulin receptor/Ldl receptor-related protein(Lrp)-dependent internalization of the urokinase receptor." J Cell Biol **131**(6 Pt 1): 1609-22.
- Corcoran, M., M. Emmert-Buck, et al. (1996). "TIMP-2 mediates cell surface binding of MMP-2." Adv Exp Med Biol **389**: 295-304.
- Cubellis, M., T. Wun, et al. (1990). "Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1." EMBO J **9**(4): 1079-85.
- Dang, J., D. Boyd, et al. (1999). "A region between -141 and -61 bp containing a proximal AP-1 is essential for constitutive expression of urokinase-type plasminogen activator receptor." Eur J Biochem **264**(1): 92-9.
- Dang, J., Y. Wang, et al. (1995). "Sodium butyrate inhibits expression of urokinase and its receptor mRNAs at both transcription and post-transcription levels in colon cancer cells." FEBS Lett **359**(2-3): 147-50.

- DeLeo, A., G. Jay, et al. (1979). "Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(5): 2420-4.
- Deng, G., S. Curriden, et al. (1996). "Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release?" J Cell Biol **134**(6): 1563-71.
- Dittmer, J., A. Gegonne, et al. (1994). "Regulation of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene expression. Sp-1 binds through an inverted CACCC motif and regulates promoter activity in cooperation with Ets1." J Biol Chem **269**(34): 21428-34.
- Dong, Z., M. Birrer, et al. (1994). "Blocking of tumor promoter-induced AP-1 activity inhibits induced transformation in JB6 mouse epidermal cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 609-13.
- Duffy, M. (1987). "Do proteases play a role in cancer invasion and metastasis?" Eur J Cancer Clin Oncol **23**(5): 583-9.
- Duffy, M., D. Reilly, et al. (1990). "Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer." Cancer Res **50**(21): 6827-9.
- Dvorak, H. (1986). "Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing." N Engl J Med **315**(26): 1650-9.
- Edwards, D. and G. Murphy (1998). "Cancer. Proteases--invasion and more." Nature **394**(6693): 527-8.
- Ellis, V., N. Behrendt, et al. (1991). "Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor." J Biol Chem **266**(19): 12752-8.
- Ertongur, S., S. Lang, et al. (2004). "Inhibition of the invasion capacity of carcinoma cells by WX-UK1, a novel synthetic inhibitor of the urokinase-type plasminogen activator system." Int J Cancer **110**(6): 815-24.
- Estreicher, A., A. Wohlwend, et al. (1989). "Characterization of the cellular binding site for the urokinase-type plasminogen activator." J Biol Chem **264**(2): 1180-9.
- Fearon, E., K. Cho, et al. (1990). "Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers." Science **247**(4938): 49-56.
- Fearon, E. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-67.

- Felez, J., L. Miles, et al. (1990). "Regulation of plasminogen receptor expression on human monocytes and monocytoid cell lines." J Cell Biol **111**(4): 1673-83.
- Fidler, I. and M. Kripke (1977). "Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor." Science **197**(4306): 893-5.
- Fischer, U., J. Huber, et al. (1995). "The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs." Cell **82**(3): 475-83.
- Fornerod, M., M. Ohno, et al. (1997). "CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals." Cell **90**(6): 1051-60.
- Forrester, K., C. Almoguera, et al. (1987). "Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis." Nature **327**(6120): 298-303.
- Foulds, L. (1954). "The experimental study of tumor progression: a review." Cancer Res **14**(5): 327-39.
- Fromentel, C. C. d. and T. Soussi (1992). "TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis." Genes Chromosomes Cancer **4**(1): 1-15.
- Ganesh, S., C. Sier, et al. (1994). "Urokinase receptor and colorectal cancer survival." Lancet **344**(8919): 401-2.
- Gegonne, A., R. Bosselut, et al. (1993). "Synergistic activation of the HTLV1 LTR Ets-responsive region by transcription factors Ets1 and Sp-1." EMBO J **12**(3): 1169-78.
- Giovane, A., A. Pintzas, et al. (1994). "Net, a new ets transcription factor that is activated by Ras." Genes Dev **8**(13): 1502-13.
- Giovanella, B., C. Yim, et al. (1972). "Development of invasive tumors in the "nude" mouse after injection of cultured human melanoma cells." J Natl Cancer Inst **48**(5): 1531-3.
- Goke, A., R. Goke, et al. (2002). "DUG is a novel homologue of translation initiation factor 4G that binds eIF4A." Biochem Biophys Res Commun **297**(1): 78-82.
- Goke, R., C. Gregel, et al. (2004). "Programmed cell death protein 4 (PDCD4) acts as a tumor suppressor in neuroendocrine tumor cells." Ann N Y Acad Sci **1014**: 220-1.
- Goldberg, Y., M. Treier, et al. (1994). "Repression of AP-1-stimulated transcription by c-Ets-1." J Biol Chem **269**(24): 16566-73.

- Goldstein, L., G. Gherzi, et al. (1997). "Molecular cloning of seprase: a serine integral membrane protease from human melanoma." Biochim Biophys Acta **1361**(1): 11-9.
- Gorman, C., L. Moffat, et al. (1982). "Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells." Mol Cell Biol **2**(9): 1055-51.
- Groden, J., A. Thliveris, et al. (1991). "Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene." Cell **66**(3): 589-60.
- Gum, R., J. Juarez, et al. (1998). "Stimulation of urokinase-type plasminogen activator receptor expression by PMA requires JNK1-dependent and -independent signaling modules." Oncogene **17**(2): 213-25.
- Gum, R., E. Lengyel, et al. (1996). "Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences." J Biol Chem **271**(18): 10672-80.
- Gyetko, M., R. Sitrin, et al. (1995). "Function of the urokinase receptor (CD87) in neutrophil chemotaxis." Leukoc Biol **58**(5): 533-8.
- Hagen, G., S. Muller, et al. (1994). "Sp-1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp-3." EMBO J **13**(16): 3843-51.
- Hamilton, S. (1993). "The molecular genetics of colorectal neoplasia." Gastroenterology **105**(1): 3-7.
- Hanahan, D. and R. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hapke, S., M. Gawaz, et al. (2001). "beta(3)A-integrin downregulates the urokinase-type plasminogen activator receptor (u-PAR) through a PEA3/ets transcriptional silencing element in the u-PAR promoter." Mol Cell Biol **21**(6): 2118-32.
- Hedrick, L., K. Cho, et al. (1994). "The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis." Genes Dev **8**(10): 1174-83.
- Heiss, M., H. Allgayer, et al. (1995). "Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer." Nat Med **1**(10): 1035-9.
- Heiss, M., R. Babic, et al. (1995). "Tumor-associated proteolysis and prognosis: new functional risk factors in gastric cancer defined by the urokinase-type plasminogen activator system." J Clin Oncol **13**(8): 2084-93.

- Heiss, M., R. Babic, et al. (1996). "The prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator system is associated with tumour differentiation in gastric cancer." Eur J Surg Oncol **22**(1): 74-7.
- Heiss, M., E. Simon, et al. (2002). "Minimal residual disease in gastric cancer: evidence of an independent prognostic relevance of urokinase receptor expression by disseminated tumor cells in the bone marrow." J Clin Oncol **20**(8): 2005-16.
- Higuchi, R., G. Dollinger, et al. (1992). "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences." Biotechnology (N Y) **10**(4): 413-7.
- Higuchi, R., C. Fockler, et al. (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." Biotechnology (N Y) **11**(9): 1026-30.
- Hoffman, W., S. Biade, et al. (2002). "Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53." J Biol Chem **277**(5): 3247-57.
- Hollas, W., F. Blasi, et al. (1991). "Role of the urokinase receptor in facilitating extracellular matrix invasion by cultured colon cancer." Cancer Res. **51**(14): 3690-5.
- Hollas, W., N. Hoosein, et al. (1992). "Expression of urokinase and its receptor in invasive and non-invasive prostate cancer cell lines." Thromb Haemost **68**(6): 662-6.
- Hooper, J., J. Clements, et al. (2001). "Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes." J Biol Chem **276**(2): 857-60.
- Hooper, N., E. Karran, et al. (1997). "Membrane protein secretases." Biochem J **321**(Pt 2): 265-79.
- Horst, E. H. v. d., J. Leupold, et al. (2004). "TaqMan® based quantification of invasive cells in the chick embryo metastasis assay." Biotechniques in press.
- Hoyer-Hansen, G., E. Ronne, et al. (1992). "Urokinase plasminogen activator cleaves its cell surface receptor releasing the ligand-binding domain." J Biol Chem **267**(25): 18224-9.
- Huntington, J., R. Read, et al. (2000). "Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation." Nature **407**(6806): 923-6.
- Janicke, F., M. Schmitt, et al. (1993). "Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer." Breast Cancer Res Treat **24**(3): 195-208.

- Jankun, J., H. Merrick, et al. (1993). "Expression and localization of elements of the plasminogen activation system in benign breast disease and breast cancers." J Cell Biochem **53**(2): 135-44.
- Jansen, A., C. Camalier, et al. (2004). "Characterization of programmed cell death 4 in multiple human cancers reveals a novel enhancer of drug sensitivity." Mol Cancer Ther **3**(2): 103-10.
- Jiang, W., M. Puntis, et al. (1994). "Molecular and cellular basis of cancer invasion and metastasis: implications for treatment." Br J Surg **81**(11): 1576-90.
- Jo, M., K. Thomas, et al. (2003). "Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits cancer cell growth and invasion by direct urokinase-independent effects on cell signaling." Biol Chem **278**(47): 46692-8.
- Jones, P. and Y. D. Clerck (1982). "Extracellular matrix destruction by invasive tumor cells." Cancer Metastasis Rev **1**(4): 289-317.
- Kang, M., H. Ahn, et al. (2002). "Up-regulation of PDCD4 in senescent human diploid fibroblasts." Biochem Biophys Res Commun. **293**(1): 617-21.
- Kanse, S., C. Kost, et al. (1996). "The urokinase receptor is a major vitronectin-binding protein on endothelial cells." Exp Cell Res **224**(2): 344-53.
- Kapitanovic, S., S. Radosevic, et al. (1997). "The expression of p185(HER-2/neu) correlates with the stage of disease and survival in colorectal cancer." Gastroenterology **112**(4): 1103-13.
- Kariko, K., A. Kuo, et al. (1993). "Overexpression of urokinase receptor increases matrix invasion without altering cell migration in a human osteosarcoma cell line." Cancer Res **53**(13): 3109-17.
- Kasai, S., H. Arimura, et al. (1985). "Primary structure of single-chain pro-urokinase." J Biol Chem **260**(22): 12382-9.
- Kasai, S., H. Arimura, et al. (1985). "Proteolytic cleavage of single-chain pro-urokinase induces conformational change which follows activation of the zymogen and reduction of its high affinity for fibrin." J Biol Chem **260**(22): 12377-81.
- Kastan, M., O. Onyekwere, et al. (1991). "Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage." Cancer Res **51**(23 Pt 1): 6304-11.
- Kim, J., W. Yu, et al. (1998). "Requirement for Specific Proteases in Cancer Cell Intravasation as Revealed by a Novel Semiquantitative PCR-Based Assay." Cell **94**(3): 353-362.

- Kook, Y., J. Adamski, et al. (1994). "The effect of antisense inhibition of urokinase receptor in human squamous cell carcinoma on malignancy." EMBO J **13**(17): 3983-91.
- Kramer, M., H. Spring, et al. (1994). "Urokinase-type plasminogen activator enhances invasion of human T cells (Jurkat) into a fibrin matrix." J Leukoc Biol **56**(2): 110-6.
- Kranenburg, O. and W. Moolenaar (2001). "Ras-MAP kinase signaling by lysophosphatidic acid and other G protein-coupled receptor agonists." Oncogene **20**(13): 1540-6.
- Langer, D., A. Kuo, et al. (1993). "Regulation of the endothelial cell urokinase-type plasminogen activator receptor. Evidence for cyclic AMP-dependent and protein kinase C-dependent pathways." Circ Res **72**(2): 330-40.
- Lankat-Buttgereit, B., C. Gregel, et al. (2004). "Pdcd4 inhibits growth of tumor cells by suppression of carbonic anhydrase type II." Mol Cell Endocrinol **214**(1-2): 149-53.
- Lau, H. and M. Kim (1994). "Soluble urokinase receptor from fibrosarcoma HT-1080 cells." Blood Coagul Fibrinolysis **5**(4): 473-8.
- Laverriere, A., C. MacNeill, et al. (1994). "GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut." J Biol Chem **269**(37): 23177-84.
- Lee, L., C. Connell, et al. (1993). "Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes." Nucleic Acids Res **21**(16): 3761-6.
- Lengyel, E., H. Wang, et al. (1996). "Requirement of an upstream AP-1 motif for the constitutive and phorbol ester-inducible expression of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene." J Biol Chem **271**(38): 23176-84.
- Li, S., J. Couet, et al. (1996). "Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases." J Biol Chem **271**(46): 29182-90.
- Li, S., T. Okamoto, et al. (1995). "Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin." J Biol Chem **270**(26): 15693-701.
- Limongi, P., M. Resnati, et al. (1995). "Biosynthesis and apical localization of the urokinase receptor in polarized MDCK epithelial cells." FEBS Lett **369**(2-3): 207-11.

- Liotta, L. (1986). "Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture." Cancer Res. **46**(1): 1-7.
- Liotta, L., P. Steeg, et al. (1991). "Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation." Cell **64**(2): 327-36.
- Liu, G., M. Shuman, et al. (1995). "Co-expression of urokinase, urokinase receptor and PAI-1 is necessary for optimum invasiveness of cultured lung cancer cells." Int J Cancer **60**(4): 501-6.
- Livak, K., S. Flood, et al. (1995). "Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization." PCR Methods Appl **4**(6): 357-62.
- Luca, P. D., B. Majello, et al. (1996). "Sp-3 represses transcription when tethered to promoter DNA or targeted to promoter proximal RNA." J Biol Chem **271**(15): 8533-6.
- Lund, L., V. Ellis, et al. (1995). "Transcriptional and post-transcriptional regulation of the receptor for urokinase-type plasminogen activator by cytokines and tumour promoters in the human lung carcinoma cell line A549." Biochem J **310**(Pt 1): 345-52.
- Lund, L., E. Ronne, et al. (1991). "Urokinase receptor mRNA level and gene transcription are strongly and rapidly increased by phorbol myristate acetate in human monocyte-like U937 cells." J Biol Chem **266**(8): 5177-81.
- Lynch, C., H. Crawford, et al. (2004). "Epidermal growth factor upregulates matrix metalloproteinase-7 expression through activation of PEA3 transcription factors." Int J Oncol **24**(6): 1565-72.
- Macfarlane, S., M. Seatter, et al. (2001). "Proteinase-activated receptors." Pharmacol Rev **53**(2): 245-82.
- Majello, B., P. D. Luca, et al. (1997). "Sp-3 is a bifunctional transcription regulator with modular independent activation and repression domains." J Biol Chem **272**(7): 4021-6.
- Mandriota, S., G. Seghezzi, et al. (1995). "Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells." J Biol Chem **270**(17): 9709-16.
- Margolis, B. and E. Skolnik (1994). "Activation of Ras by receptor tyrosine kinases." J Am Soc Nephrol **5**(6): 1288-99.
- Meltzer, A. (1990). "Dormancy and breast cancer." J Surg Oncol **43**(3): 181-8.

- Mignatti, P., R. Mazziere, et al. (1991). "Expression of the urokinase receptor in vascular endothelial cells is stimulated by basic fibroblast growth factor." J Cell Biol **13**(5): 1193-201.
- Miles, L. and E. Plow (1987). "Receptor mediated binding of the fibrinolytic components, plasminogen and urokinase, to peripheral blood cells." Thromb Haemost **58**(3): 936-42.
- Min, H., L. Doyle, et al. (1996). "Urokinase receptor antagonists inhibit angiogenesis and primary tumor growth in syngeneic mice." Cancer Res **56**(10): 2428-33.
- Mira, E., R. Lacalle, et al. (2002). "Quantitative determination of tumor cell intravasation in a real-time polymerase chain reaction-based assay." Clin Exp Metastasis **19**(4): 313-8.
- Misumi, Y., Y. Hayashi, et al. (1992). "Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase IV, a serine proteinase on the cell surface." Biochim Biophys Acta **1131**(3): 333-6.
- Mizukami, I., N. Faulkner, et al. (1995). "Enzyme-linked immunoabsorbent assay detection of a soluble form of urokinase plasminogen activator receptor *in vivo*." Blood **86**(1): 203-11.
- Mohanam, S., R. Sawaya, et al. (1993). "Modulation of *in vitro* invasion of human glioblastoma cells by urokinase-type plasminogen activator receptor antibody." Cancer Res **53**(18): 4143-7.
- Moller, L., J. Pollanen, et al. (1993). "N-linked glycosylation of the ligand-binding domain of the human urokinase receptor contributes to the affinity for its ligand." J Biol Chem **268**(15): 11152-9.
- Moller LB, P. J., Ronne E, Pedersen N, Blasi F. (1993). "N-linked glycosylation of the ligand-binding domain of the human urokinase receptor contributes to the affinity for its ligand." J Biol Chem **268**(15): 11152-9.
- Morita, S., A. Sato, et al. (1998). "Cancer cells overexpress mRNA of urokinase-type plasminogen activator, its receptor and inhibitors in human non-small-cell lung cancer tissue: analysis by Northern blotting and in situ hybridization." Int J Cancer **78**(3): 286-92.
- Morrisey, E., H. Ip, et al. (1996). "GATA-6: a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm." Dev Biol **177**(1): 308-22.

- Morrisey, E., H. Ip, et al. (1997). "GATA-5: a transcriptional activator expressed in a novel temporally and spatially-restricted pattern during embryonic development." Dev Biol **183**(1): 21-36.
- Muehlenweg, B., S. Sperl, et al. (2001). "Interference with the urokinase plasminogen activator system: a promising therapy concept for solid tumours." Expert Opin Biol Ther **1**(4): 683-91.
- Mulcahy, H., M. Duffy, et al. (1994). "Urokinase-type plasminogen activator and outcome in Dukes' B colorectal cancer." Lancet **344**(8922): 583-4.
- Murphy, G., H. Stanton, et al. (1999). "Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation." APMIS **107**(1): 38-44.
- Nagase, H. and Y. Nakamura (1993). "Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene." Hum Mutat **2**(6): 425-34.
- Nekarda, H., P. Schlegel, et al. (1998). "Strong prognostic impact of tumor-associated urokinase-type plasminogen activator in completely resected adenocarcinoma of the esophagus." Clin Cancer Res **4**(7): 1755-63.
- Nekarda, H., M. Schmitt, et al. (1994). "Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer." Cancer Res **54**(11): 2900-7.
- Nguyen, D., D. Webb, et al. (2000). "Urokinase-type plasminogen activator stimulates the Ras/Extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway and MCF-7 cell migration by a mechanism that requires focal adhesion kinase, Src, and Shc. Rapid dissociation of GRB2/Sps-Shc complex is associated with the transient phosphorylation of ERK in urokinase-treated cells." J Biol Chem **275**(25): 19382-8.
- Nguyen, M., Y. Shing, et al. (1994). "Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane." Microvasc Res **47**(1): 31-40.
- Nishi, K., M. Yoshida, et al. (1994). "Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression." J Biol Chem **269**(9): 6320-4.
- Nusrat, A. and H. C. Jr. (1991). "An autocrine role for urokinase in phorbol ester-mediated differentiation of myeloid cell lines." J Clin Invest **87**(3): 1091-7.

- Ny, T., F. Elgh, et al. (1984). "The structure of the human tissue-type plasminogen activator gene: correlation of intron and exon structures to functional and structural domains." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(17): 5355-9.
- Nykjaer, A., M. Conese, et al. (1997). "Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes." EMBO J **16**(10): 2610-20.
- Nykjaer, A., B. Moller, et al. (1994). "Urokinase receptor. An activation antigen in human T lymphocytes." J Immunol **152**(2): 505-16.
- Nykjaer, A., C. Petersen, et al. (1990). "Urokinase receptors in human monocytes." Biochim Biophys Acta **1052**(3): 399-407.
- Oh, I. and E. Reddy (1999). "The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis." Oncogene **18**(19): 3017-33.
- Onishi, Y., S. Hashimoto, et al. (1998). "Cloning of the TIS gene suppressed by topoisomerase inhibitors." Gene **215**(2): 453-9.
- Onishi, Y. and H. Kizaki (1996). "Molecular cloning of the genes suppressed in RVC lymphoma cells by topoisomerase inhibitors." Biochem Biophys Res Commun **228**(1): 7-13.
- Ossowski, L. (1988). "*In vivo* invasion of modified chorioallantoic membrane by tumor cells: the role of cell surface-bound urokinase." J Cell Biol **107**(6 Pt 1): 2437-45.
- Ossowski, L. and E. Reich (1980). "Experimental model for quantitative study of metastasis." Cancer Res **40**(7): 2300-9.
- Ossowski, L. and E. Reich (1983). "Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis." Cell **35**(3 Pt 2): 611-9.
- Patel, D. (1999). "Adaptive recognition in RNA complexes with peptides and protein modules." Curr Opin Struct Biol **9**(1): 74-87.
- Pedersen, H., J. Grondahl-Hansen, et al. (1994). "Urokinase and plasminogen activator inhibitor type 1 in pulmonary adenocarcinoma." Cancer Res **54**(1): 120-3.
- Pedersen, N., M. Schmitt, et al. (1993). "A ligand-free, soluble urokinase receptor is present in the ascitic fluid from patients with ovarian cancer." J Clin Invest **92**(5): 2160-7.
- Peltomaki, P. (2003). "Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer." J Clin Oncol **21**(6): 1174-9.

- Pepper, M., A. Sappino, et al. (1993). "Upregulation of urokinase receptor expression on migrating endothelial cells." J Cell Biol **122**(3): 673-84.
- Plesner, T., N. Behrendt, et al. (1997). "Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR." Stem Cells **15**(6): 398-408.
- Plesner, T., M. Ploug, et al. (1994). "The receptor for urokinase-type plasminogen activator and urokinase is translocated from two distinct intracellular compartments to the plasma membrane on stimulation of human neutrophils." Blood **83**(3): 808-15.
- Ploug, M. (1998). "Identification of specific sites involved in ligand binding by photoaffinity labeling of the receptor for the urokinase-type plasminogen activator. Residues located at equivalent positions in uPAR domains I and III participate in the assembly of a composite ligand-binding site." Biochemistry **37**(47): 16494-505.
- Ploug, M., N. Behrendt, et al. (1991). "Protein structure and membrane anchorage of the cellular receptor for urokinase-type plasminogen activator." Semin Thromb Hemost **17**(3): 183-93.
- Ploug, M., H. Rahbek-Nielsen, et al. (1998). "Glycosylation profile of a recombinant urokinase-type plasminogen activator receptor expressed in Chinese hamster ovary cells." J Biol Chem **273**(22): 13933-43.
- Ploug, M., E. Ronne, et al. (1991). "Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol." J Biol Chem **266**(3): 1926-33.
- Pollanen, J. (1993). "The N-terminal domain of human urokinase receptor contains two distinct regions critical for ligand recognition." Blood **82**(9): 2719-29.
- Pyke, C., J. Eriksen, et al. (1993). "An alternatively spliced variant of mRNA for the human receptor for urokinase plasminogen activator." FEBS Lett **326**(1-3): 69-74.
- Pyke, C., P. Kristensen, et al. (1991). "The plasminogen activation system in human colon cancer: messenger RNA for the inhibitor PAI-1 is located in endothelial cells in the tumor stroma." Cancer Res **51**(15): 4067-71.
- Pyke, C., P. Kristensen, et al. (1991). "Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas." Am J Pathol **138**(5): 1059-67.

- Quattrone, A., G. Fibbi, et al. (1995). "Reversion of the invasive phenotype of transformed human fibroblasts by anti-messenger oligonucleotide inhibition of urokinase receptor gene expression." Cancer Res **55**(1): 90-5.
- Ragno, P., N. Montuori, et al. (1995). "Urokinase-type plasminogen activator/type-2 plasminogen-activator inhibitor complexes are not internalized upon binding to the urokinase-type-plasminogen-activator receptor in THP-1 cells. Interaction of urokinase-type plasminogen activator/type-2 plasminogen-activator inhibitor complexes with the cell surface." Eur J Biochem **233**(2): 514-9.
- Reinartz, J., J. Link, et al. (1994). "The receptor for urokinase-type plasminogen activator of a human keratinocyte line (HaCaT)." Exp Cell Res **214**(2): 486-98.
- Reiter, L., E. Kruithof, et al. (1993). "The role of the urokinase receptor in extracellular matrix degradation by HT29 human colon carcinoma cells." Int J Cancer **53**(3): 444-50.
- Renan, M. (1993). "How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data." Mol Carcinog **7**(3): 139-46.
- Resnati, M., M. Guttinger, et al. (1996). "Proteolytic cleavage of the urokinase receptor substitutes for the agonist-induced chemotactic effect." EMBO J **15**(7): 1572-82.
- Ried, S., C. Jager, et al. (1999). "Activation mechanisms of the urokinase-type plasminogen activator promoter by hepatocyte growth factor/scatter factor." J Biol Chem **274**(23): 16377-86.
- Riittinen, L., P. Limongi, et al. (1996). "Removal of domain D2 or D3 of the human urokinase receptor does not affect ligand affinity." FEBS Lett **381**(1-2): 1-6.
- Rijken, D., M. Hoylaerts, et al. (1982). "Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator." J Biol Chem **257**(6): 2920-5.
- Roldan, A., M. Cubellis, et al. (1990). "Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis." EMBO J **9**(2): 467-74.
- Romer, J., C. Pyke, et al. (1994). "Expression of uPA and its receptor by both neoplastic and stromal cells during xenograft invasion." Int J Cancer **57**(4): 553-60.

- Ronne, E., N. Behrendt, et al. (1991). "Cell-induced potentiation of the plasminogen activation system is abolished by a monoclonal antibody that recognizes the NH2-terminal domain of the urokinase receptor." FEBS **288**(1-2): 233-6.
- Rose, D., J. Connolly, et al. (1995). "Effects of linoleic acid and gamma-linolenic acid on the growth and metastasis of a human breast cancer cell line in nude mice and on its growth and invasive capacity *in vitro*." Nutr Cancer **24**(1): 33-45.
- Rygaard, J. and C. Povlsen (1969). "Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice." Acta Pathol Microbiol Scand **77**(4): 758-60.
- Sax, J. and W. El-Deiry (2003). "Identification and characterization of the cytoplasmic protein TRAF4 as a p53-regulated proapoptotic gene." J Biol Chem **278**(38): 36435-44.
- Scheffner, M., J. Huibregtse, et al. (1993). "The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53." Cell **75**(3): 495-505.
- Schewe, D., J. Leupold, et al. (2003). "Tumor-specific transcription factor binding to an activator protein-2/Sp-1 element of the urokinase-type plasminogen activator promoter in a first large series of resected gastrointestinal cancers." Clin Cancer Res **9**(6): 2267-76.
- Schlechte, W., G. Murano, et al. (1989). "Examination of the role of the urokinase receptor in human colon cancer mediated laminin degradation." Cancer Res **49**(21): 6064-9.
- Schlichter, U., O. Burk, et al. (2001). "The chicken Pcd4 gene is regulated by v-Myb." Oncogene **20**(6): 669-76.
- Schlichter, U., D. Kattmann, et al. (2001). "Identification of the myb-inducible promoter of the chicken Pcd4 gene." Biochim Biophys Acta. **1520**(1): 99-104.
- Schlöndorff, J. and C. Blobel (1999). "Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding." J Cell Sci **112**(Pt21): 3603-17.
- Schmalfeldt, B., W. Kuhn, et al. (1995). "Primary tumor and metastasis in ovarian cancer differ in their content of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and inhibitors types 1 and 2." Cancer Res **55**(18): 3958-63.
- Seiffert, D., G. Ciambone, et al. (1994). "The somatomedin B domain of vitronectin. Structural requirements for the binding and stabilization of active type 1 plasminogen activator inhibitor." J Biol Chem **269**(4): 2659-66.

- Sgouras, D., M. Athanasiou, et al. (1995). "ERF: an ETS domain protein with strong transcriptional repressor activity, can suppress ets-associated tumorigenesis and is regulated by phosphorylation during cell cycle and mitogenic stimulation." EMBO J **14**(19): 4781-93.
- Shetty, S., A. Kumar, et al. (1997). "Posttranscriptional regulation of urokinase receptor mRNA: identification of a novel urokinase receptor mRNA binding protein in human mesothelioma cells." Mol Cell Biol **17**(3): 1075-83.
- Shibahara, K., M. Asano, et al. (1995). "Isolation of a novel mouse gene MA-3 that is induced upon programmed cell death." Gene **166**(2): 297-301.
- Shureiqi, I., W. Jiang, et al. (2002). "GATA-6 transcriptional regulation of 15-lipoxygenase-1 during NSAID-induced apoptosis in colorectal cancer cells." Cancer Res **62**(4): 1178-83.
- Sier, C., H. Verspaget, et al. (1993). "Plasminogen activators in normal tissue and carcinomas of the human oesophagus and stomach." Gut **34**(1): 80-5.
- Sifis, M., K. Both, et al. (2002). "A more sensitive method for the quantitation of genomic DNA by Alu amplification." J Forensic Sci **47**(3): 589-92.
- Sliutz, G., H. Eder, et al. (1996). "Quantification of uPA receptor expression in human breast cancer cell lines by cRT-PCR." Breast Cancer Res Treat **40**(3): 257-63.
- Soravia, E., A. Grebe, et al. (1995). "A conserved TATA-less proximal promoter drives basal transcription from the urokinase-type plasminogen activator receptor gene." Blood **86**(2): 624-35.
- Stahl, A. and B. Mueller (1994). "Binding of urokinase to its receptor promotes migration and invasion of human melanoma cells *in vitro*." Cancer Res **54**(11): 3066-71.
- Stoppelli, M., A. Corti, et al. (1985). "Differentiation-enhanced binding of the amino-terminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(15): 4939/43.
- Tanikawa, C., K. Matsuda, et al. (2003). "p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis." Nat Cell Biol **5**(3): 216-23.
- Tate, K., D. Higgins, et al. (1987). "Functional role of proteolytic cleavage at arginine-275 of human tissue plasminogen activator as assessed by site-directed mutagenesis." Biochemistry **26**(2): 338-43.

- Thorsen, S., M. Philips, et al. (1988). "Kinetics of inhibition of tissue-type and urokinase-type plasminogen activator by plasminogen-activator inhibitor type 1 and type 2." Eur J Biochem **175**(1): 33-9.
- Tsai, F., G. Keller, et al. (1994). "An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2." Nature **371**(6494): 221-6.
- Vassalli, J., D. Baccino, et al. (1985). "A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase." J Cell Biol **100**(1): 86-92.
- Vassalli, J., J. Dayer, et al. (1984). "Concomitant secretion of prourokinase and of a plasminogen activator-specific inhibitor by cultured human monocytes-macrophages." J Exp Med **159**(6): 1653-68.
- Wagner, S., M. Atkinson, et al. (1995). "Modulation of urokinase and urokinase receptor gene expression in human renal cell carcinoma." Am J Pathol **147**(1): 183-92.
- Walker, J., D. Hughes, et al. (2003). "Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification." Anal Biochem **316**(2): 259-69.
- Walker, J., G. Kilroy, et al. (2003). "Human DNA quantitation using Alu element-based polymerase chain reaction." Anal Biochem. **315**(1): 122-8.
- Waltz, D. and H. Chapman (1994). "Reversible cellular adhesion to vitronectin linked to urokinase receptor occupancy." J Biol Chem **269**(20): 14746-50.
- Wang, H., J. Skibber, et al. (1994). "Transcriptional activation of the urokinase receptor gene in invasive colon cancer." Int J Cancer **58**(5): 650-7.
- Wang, Y., J. Dang, et al. (2000). "Identification of a novel nuclear factor-kappaB sequence involved in expression of urokinase-type plasminogen activator receptor." Eur J Biochem **267**(11): 3248-54.
- Wang, Y., C. Jones, et al. (1994). "Human urokinase receptor expression is inhibited by amiloride and induced by tumor necrosis factor and phorbol ester in colon cancer cells." FEBS Lett **353**(2): 138-42.
- Wei, Y., M. Lukashev, et al. (1996). "Regulation of integrin function by the urokinase receptor." Science **273**(5281): 1551-5.
- Wei, Y., D. Waltz, et al. (1994). "Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin." Biol Chem **269**(51): 32380-8.
- Wei, Y., X. Yang, et al. (1999). "A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling." J Cell Biol. 1999 **144**(6): 1285-94.

- Wen, W., J. Meinkoth, et al. (1995). "Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus." Cell **82**(3): 463-73.
- Wet, J. d., K. Wood, et al. (1987). "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells." Mol Cell Biol **7**(2): 725-37.
- Wilhelm, O., S. Wilhelm, et al. (1999). "Cellular glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D regulates urokinase receptor shedding and cell surface expression." J Cell Physiol **180**(2): 225-35.
- Wojtowicz-Praga, S., R. Dickson, et al. (1997). "Matrix metalloproteinase inhibitors." Invest New Drugs **15**(1): 61-75.
- Wu, S., G. Murrell, et al. (2002). "Interferon-alpha (Intron A) upregulates urokinase-type plasminogen activator receptor gene expression." Cancer Immunol Immunother **51**(5): 248-54.
- Wun, T., L. Ossowski, et al. (1982). "A proenzyme form of human urokinase." J Biol Chem **257**(12): 7262-8.
- Xing, X., S. Wang, et al. (2000). "The ets protein PEA3 suppresses HER-2/neu overexpression and inhibits tumorigenesis." Nat Med **6**(2): 189-95.
- Xue, W., I. Mizukami, et al. (1997). "Urokinase-type plasminogen activator receptors associate with beta1 and beta3 integrins of fibrosarcoma cells: dependence on extracellular matrix components." Cancer Res **57**(9): 1682-9.
- Yang, H., A. Jansen, et al. (2003). "The transformation suppressor Pdc4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation." Mol Cell Biol **23**(1): 26-37.
- Yang, H., A. Jansen, et al. (2001). "A novel transformation suppressor, Pdc4, inhibits AP-1 transactivation but not NF-kB or ODC transactivation." Oncogene **20**(6): 669-76.
- Yang, H., J. Knies, et al. (2003). "Pdc4 suppresses tumor phenotype in JB6 cells by inhibiting AP-1 transactivation." Oncogene **22**(24): 3712-20.
- Yang, X., K. Su, et al. (2001). "O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp-1 activation domain inhibits its transcriptional capability." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6611-6.
- Yoshinaga, H., S. Matsushashi, et al. (1999). "Novel human PDCD4 (H731) gene expressed in proliferative cells is expressed in the small duct epithelial cells of the breast as revealed by an anti-H731 antibody." Pathol Int. **49**(12): 1067-77.

- Yoshinaga, H., S. Matsuhashi, et al. (1999). "Novel human PDCD4 (H731) gene expressed in proliferative cells is expressed in the small duct epithelial cells of the breast as revealed by an anti-H731 antibody." Pathol Int **49**(12): 1067-77.
- Young, M., H. Yang, et al. (2003). "Promising molecular targets for cancer prevention: AP-1, NF-kappa B and Pdc4." Trends Mol Med. **9**(1): 36-41.
- Yu, B., P. Datta, et al. (2003). "Stability of the Sp-3-DNA complex is promoter-specific: Sp-3 efficiently competes with Sp-1 for binding to promoters containing multiple Sp-sites." Nucleic Acids Res **31**(18): 5368-76.
- Zajicek, G. (1987). "Long survival with micrometastases. At least 9% of breast cancer patients carry metastases for more than 10 years." The Cancer J **1**(4):14-15).
- Zijlstra, A., R. Mellor, et al. (2002). "A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction." Cancer Res. **62**(23): 7083-92.

Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name	Jörg Leupold
Geburtstag	20. August 1969
Geburtsort	Mainz-Mombach
Staataangehörigkeit	deutsch
Adresse	Waldfriedhofstr. 13 81377 München

Schulbildung:

1976-1980	Besuch der Heinrich-Mumbächer-Grundschule in Mainz-Bretzenheim
1980-1989	Besuch des Rabannus-Maurus-Gymnasiums in Mainz

Wehrdienst

1989-1990	Lahnstein
-----------	-----------

Hochschulstudium

1990-1997	Studium der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
1997	Diplom der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg in den Fächern Zellbiologie, Mikrobiologie, Biochemie und Klinische Chemie und Hämatologie. Diplomarbeit mit dem Thema: Tropismus der Foamyvirusinfektion und Charakterisierung der proviralen DNA während der Persistenz „ <i>in vivo</i> “ am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Virologie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg

Berufliche Tätigkeiten

1997-1998	Gemeinschaftspraxis-Labormedizin, Labor Clotten, Freiburg
1998-2000	Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung für Molekularbiologie, Martinsried
seit 2000	Promotion zum Dr. rer. nat.; Klinikum Grosshadern Klinische Forschung Chirurgie, Ludwig-Maximilians Universität, München

Publikationen

Falcone V, **Leupold J**, Clotten J, Urbanyi E, Herchenroder O, Spatz W, Volk B, Bohm N, Toniolo A, Neumann-Haefelin D, Schweizer M. (1999). „Sites of simian foamy virus persistence in naturally infected African green monkeys: latent provirus is ubiquitous, whereas viral replication is restricted to the oral mucosa”. Virology **257**(1):7-14

Leupold JH, Colburn NH, Yang HS, Lengyel E, Schildberg FW, Heiss MM, Allgayer H (2002). “First evidence for the new tumor suppressor Pcd4 as a regulator of u-PAR, an invasion related gene”. Proc Am Assoc Cancer Res **43**: 622

Schewe D, **Leupold JH**, Boyd DD, Lengyel ER, Wang H, Grützner U, Schildberg FW, Jauch KW, Allgayer H (2003). „Tumor-specific Transcription Factor Binding to an Activator Protein-2/Sp-1 Promotor Element of the Urokinase Type Plasminogen Activator Receptor Promoter in a First Large Series of Reected Gastrointestinal Cancers”. Clin Cancer Res **9**(6):2267-76

Leupold JH, Colburn NH, Yang HS, Boyd DD, Lengyel ER, Jauch KW, Allgayer H (2003). „Erster Hinweis auf eine Rolle des neu beschriebenen Tumor – Suppressorgens Pcd4 als Regulator des Invasionsmoleküls Urokinase Rezeptor“. Langenbecks Arch Surg 2003

Htun van der Horst E, **Leupold JH**, Schubbert R, Ullrich A, Allgayer H (2004). „TaqMan[®] based quantification of invasive cells in the chick embryo metastasis assay”. Biotechnology in press

Patentanmeldung

Allgayer H, **Leupold JH** (2003). „Tissue Specific Expression“. (PCT/EPO3/01671)