

Charakterisierung kolorektaler Tumorzellen nach stabiler Transfektion mit Matrix-Metalloproteinase-9 und der MMP-9-Hämopexindomäne

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Schröder, Frauke Kathleen
aus Lörrach

Gießen 2017

Aus dem Zentrum für Innere Medizin des
Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Schwerpunkt Gastroenterologie
Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb

Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb

Gutachter: Prof. Dr. med. Ludger Fink

Tag der Disputation: 30.11.2017

Schröder, F; Churin, Y; Reinhard, J; Roderfeld, M; Schröder, D; Zahner, D; Roeb, E: Ge-
steigerte Karzinogenese im Abcb4^{-/-}/HBV^{+/-}-Hybrid-Maus Modell. Zeitschrift für Gastro-
enterologie 2014; 52 – KG095.

Kurzvortrag DGVS Leipzig September 2014

Schröder, F; Churin, Y; Reinhard, J; Roderfeld, M; Schröder, D; Zahner, D; Roeb, E: Ge-
steigerte Karzinogenese im Abcb4^{-/-}/HBV^{+/-}-Hybrid-Maus Modell.

meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 KOLOREKTALES KARZINOM	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Pathogenese	2
1.1.4 Symptome	3
1.1.5 Risikofaktoren	3
1.1.6 Diagnostik	4
1.1.7 Klassifikation und Prognose	6
1.1.8 Metastasierungswege	8
1.1.9 Therapie	8
1.2 EXTRAZELLULÄRMATRIX	9
1.2.1 Funktion	9
1.2.2 Aufbau	10
1.3 MATRIX-METALLOPROTEINASEN	11
1.3.1 Funktion	11
1.3.2 Struktur	13
1.3.3 Gelatinasen	16
1.3.4 Regulation	17
1.3.5 Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen	18
1.4 MMP-9/PEX-9 UND DAS KOLOREKTALE KARZINOM	20
1.4.1 Zellmigration	20
1.4.2 Tumorzellinvasion und Metastasierung	21
1.5 ZIEL DER ARBEIT	23
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 MATERIALIEN	25
2.1.1 Geräte	25
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	26
2.1.3 Reagenzien und Chemikalien	27
2.1.4 Antibiotika	28

2.1.5 Vektoren/Plasmide	28
2.1.6 Kommerzielle Kits	29
2.1.7 Software	29
2.2 METHODEN.....	30
2.2.1 Plasmide	30
2.2.1.1 Expressionskonstrukte.....	30
2.2.1.2 Vektoren	31
2.2.2 Gentechnische Methoden.....	32
2.2.2.1 RT-PCR	32
2.2.2.2 Isolierung der Plasmid-DNA.....	34
2.2.2.2.1 Minipräparation	34
2.2.2.2.2 Maxipräparation	35
2.2.2.2.3 DNA-Aufreinigung aus dem Agarosegel oder der PCR	35
2.2.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	36
2.2.2.3.1 NanoDrop	36
2.2.2.3.2 Photometer.....	36
2.2.2.4 Restriktionsverdau.....	37
2.2.2.5 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	38
2.2.2.6 DNA Elution aus dem Agarosegel	38
2.2.2.7 Transformation	39
2.2.2.8 Ligation	39
2.2.2.9 Sequenzierung	39
2.2.3 Stabile Transfektion	40
2.2.3.1 Transfektionsreaktion.....	40
2.2.3.2 Antibiotikabehandlung	40
2.2.4 Zellkulturtechniken	41
2.2.4.1 Zelllinie	41
2.2.4.2 Zellen auftauen und auslegen.....	41
2.2.4.3 Zellzählung.....	42
2.2.4.4 Subkultur und Einfrieren.....	42
2.2.4.5 Kollagen-Beschichtung der Deckgläser	43

2.2.5 Zytologische Methoden	43
2.2.5.1 DAPI-Färbung.....	43
2.2.6 Proteinchemische Methoden.....	44
2.2.6.1 Zellvorbereitung.....	44
2.2.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Amidoschwarz	44
2.2.6.3 Proteinfällung	45
2.2.6.4 Western-Blot.....	45
2.2.6.4.1 Proteinauftrennung	45
2.2.6.4.2 Proteintransfer	46
2.2.6.4.3 Proteinnachweis.....	47
2.2.7 Phospho-Kinase Array	48
2.2.7.1 Zellvorbereitung.....	48
2.2.7.2 Phospho-Kinase Array Durchführung.....	49
2.2.8 Molekularbiologische Methoden	49
2.2.8.1 Zellvorbereitung.....	49
2.2.8.2 RNA-Isolation	50
2.2.8.3 Reverse Transkription	51
2.2.8.4 Quantitative RT-PCR.....	51
3 ERGEBNISSE.....	54
3.1 KLONIERUNG.....	54
3.1.1 Erfolgreiche Klonierung des Expressionsvektors (pVLX-TRE3G)	55
3.1.1.1 Validierung der Gensequenz MMP-9.....	56
3.1.1.2 Validierung der Gensequenz PEX-9.....	57
3.1.1.3 Erfolgreiche Klonierung in den Vektor pLVX-TRE3G.....	58
3.1.2 Erfolgreiche Klonierung des Expressionsvektors (pVLX-TRE3G-ZsGreen1) ...	59
3.1.2.1 Gelextraktion von MMP-9 und PEX-9	60
3.1.2.2 Klonierung der Inserts in den Vektor pLVX-TRE3G-ZsGreen1	61
3.1.3 Transfektion und Auswahl der Klone	63
3.1.3.1 Klonselktion anhand der ZsGreen1-Fluoreszenz	63
3.1.3.2 Klonauswahl anhand der Expression von MMP-9 und PEX-9 im Western-Blot	65

3.2 EXPRESSION VON MMP-9 UND PEX-9	66
3.3 CHARAKTERISIERUNG DER PLASMIDE	68
3.3.1 Expressionssteigerung von MMP-9 auf Proteinebene	68
3.3.2 Steigerung Proteineexpression von MMP-9 und PEX-9 im Langzeitversuch	69
3.3.3 Proteom Profiler Array.....	70
3.3.3.1 Ergebnisse des Proteom Profiler Array bei MMP-9	70
3.3.3.2 Ergebnisse des Proteom Profiler Array bei PEX-9	73
3.3.4 Genexpression auf mRNA-Ebene bei MMP-9	75
3.3.5 Positiver Nachweis der Proteineexpression von eNOS und Akt bei MMP-9.....	76
3.4 AUSBILDUNG VON TUMOREN IM TRANSGENEN MAUSMODELL	77
4 DISKUSSION	79
4.1 DISKUSSION DER METHODEN	81
4.1.1 Klonierung	81
4.1.2 Western-Blot	83
4.1.3 Phospho-Kinase-Array.....	83
4.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE	84
4.2.1 Langzeitexpression.....	84
4.2.2 Erfolgreicher Einsatz der transgenen Zellen im Mausmodell.....	85
4.2.3 Relevanz der durch MMP-9 regulierten Phospho-Kinasen	86
4.2.3.1 eNOS und Akt	86
4.2.4 Keine signifikante Regulation beim Phospho-Kinase Array von PEX-9	88
4.2.5 Relevanz der mit eNOS interagierenden Gene	88
4.2.5.1 VEGF	88
4.2.5.2 MYB.....	90
4.3 LIMITATIONEN DER ARBEIT	90
4.4 AUSBLICK	91
5 ZUSAMMENFASSUNG	93
6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	97
7 TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	100
8 ANHANG	103
8.1 EXPRESSIONSKONSTRUKTE.....	103

8.2 AUSWERTUNG DES PHOSPHOKINASE-ARRAYS	106
9 LITERATURVERZEICHNIS	112
10 ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION.....	137
11 DANKSAGUNG.....	138

1 EINLEITUNG

1.1 KOLOREKTALES KARZINOM

1.1.1 Definition

Beim kolorektalen Karzinom (KRK) handelt es sich um eine maligne Neoplasie, die von Epithelzellen ausgeht. Von rektaler Herkunft werden diejenigen Tumore bezeichnet, die in einem Bereich bis 16cm aboral der Anokutanlinie auftreten. Kolonkarzinome machen 60% aller kolorektalen Tumore aus, wobei 40% davon im Sigma lokalisiert sind. Rektale Karzinome haben einen Anteil von 40% an allen KRK (Crysandt, 2010).

1.1.2 Epidemiologie

Das KRK ist bei beiden Geschlechtern der dritthäufigste Tumor der westlichen Welt (Jemal, 2011). Siegel et al. prognostizierten für die USA 132.700 Neudiagnosen des KRK im Jahr 2015 und 49.700 Todesfälle durch diese Erkrankung (Siegel, 2015). Im Jahr 2010 wurden in den USA 142.570 neue Fälle von Darmkrebs diagnostiziert (Dietel, 2012). In Deutschland gab es 2013 etwa 63.000 Neuerkrankungen. Bei 26.000 Todesfällen pro Jahr handelt es sich beim KRK um einen der häufigsten malignen Tumore in Deutschland (Pox, 2013). Mit steigendem Alter erhöht sich das Risiko, an einem Karzinom des Darms zu erkranken. Etwa die Hälfte der Patienten hat das siebzigste Lebensjahr bereits überschritten. Es sind mehr Männer als Frauen betroffen, wobei die Gründe hierfür noch nicht umfassend geklärt sind (Meissner, 2006; Murphy, 2011).

2013

1) je 100.000 Personen, altersstandardisiert nach Europastandard

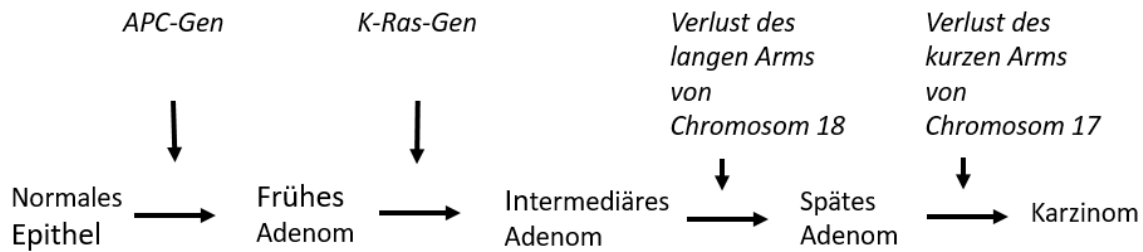
	Männer	Frauen
Neuerkrankungen	34.050	28.360
standardisierte Erkrankungsrate ¹	56,6	36,3
Sterbefälle	13.608	12.085
standardisierte Sterberate ¹	21,6	13,0
5-Jahres-Prävalenz	114.190	95.120
relative 5-Jahres-Überlebensrate	63%	63%

Tabelle 1: Darmkrebs-Statistik, modifiziert nach Robert-Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten

1.1.3 Pathogenese

Fearon und Vogelstein haben 1990 die Adenom-Karzinom-Sequenz postuliert. Sie konnten nachweisen, dass verschiedene Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen zusammen zur Tumorentstehung führen (Fearon und Vogelstein, 1990). Diese Veränderung vom normalen Epithel bis zum Karzinom dauert nach heutiger Erkenntnis in etwa zehn Jahre. Das ursprüngliche Konzept von Fearon und Vogelstein wird kontinuierlich weiterentwickelt und es werden stetig neue Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen entdeckt (Leslie, 2002; Vogelstein, 2013; Giannakis, 2014). Mikroskopisch tritt das Adenokarzinom am häufigsten (70%) auf. Doch tragen nicht alle polypösen Adenome das gleiche Risiko, zu einem Karzinom zu entarten. Villöse Polypen tendieren wesentlich häufiger zur Degeneration als tubuläre Polypen (Muto, 1975; Shussman und Wexner, 2014).

Adenom-Karzinom-Sequenz



Modifiziert nach Fearon et al.

Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz

Dargestellt sind der Allel-Verlust im Bereich des APC-Gens, die Punktmutation im K-Ras-Protoonkogen und der Allel-Verlust im Tumorsuppressorgen auf den Chromosomen 18q und 17p. Letzteres geht mit einer Mutation des p53-Gens einher (Fearon und Vogelstein, 1990).

1.1.4 Symptome

Die Symptome des KRK treten meist erst in einem späten Krankheitsstadium auf und sind oft unspezifisch. Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, Müdigkeit und Fieber werden oft beschrieben, zudem sind lageabhängige Beschwerden wie Angina pectoris, abdominale Krämpfe, Obstruktion und eine hypochrome, mikrozytäre Anämie möglich. Jede Veränderung der Stuhlgeohnheiten ist verdächtig, sowie ungewollter übermäßiger Gewichtsverlust. Rektal gelegene Tumore können zu Tenesmen und „Bleistiftstühlen“ führen, wobei weiter proximal gelegene Karzinome eher Teerstühle verursachen (Dietel, 2012).

1.1.5 Risikofaktoren

Als Risikofaktoren für das KRK gelten unter anderem bestimmte Lebensweisen: Übergewicht (BMI > 25kg/m²), mangelnde Bewegung, unzureichender Konsum von Obst und Gemüse und der Verzehr von rotem Fleisch sind Wegbereiter des Kolonkarzinoms. Im selben Zusammenhang wird auch der Konsum von Zigaretten, besonders in Kombination mit Alkohol, diskutiert (Ghadirian, 1997; Giacosa, 1999; Friedenreich, 2002; Johnson, 2013; Rasool, 2013). Das Übergewicht spielt Studien zufolge bei Männern eine größere Rolle bei der Karzinomentstehung als bei Frauen (Larsson, 2007). 2-5% der kolorektalen Karzinome sind erblich bedingt (Pox, 2015). Als erblicher Faktor ist die familiäre adenomatöse Polyposis coli

(FAP) bekannt, eine autosomal-dominant vererbte, relativ seltene Erkrankung, bei der sich im gesamten Dickdarm adenomatöse Polypen ausbilden (Kastrinos und Syngal, 2011). Bei dieser Patientengruppe fehlt durch eine Deletion des langen Arms des Chromosoms 5 das *APC-Gen* und somit ein Tumorsuppressorgen. Unbehandelt führt die Krankheit mit fast hundertprozentiger Sicherheit zum kolorektalen Karzinom, meist vor dem fünfzigsten Lebensjahr (Galiatsatos und Foulkes, 2006).

Bei dem hereditären nicht polypösen Kolonkarzinom (HNPCC) handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte Präkanzerose. Die Mikrosatelliteninstabilitäten sind auf den Chromosomen 2 und 3 in den Genen *hMSH2* und *hMLH1* gelegen und verursachen Fehler bei der DNA-Replikation, was zu einem abnormen Zellwachstum führt (Lynch, 2009). Neben dem Kolonkarzinom tritt das Endometriumkarzinom ebenfalls häufig bei den Patienten mit HNPCC auf. Ob eine Person an der Erbkrankheit leidet, kann anhand der Amsterdam-Kriterien eruiert werden (Steinke, 2013). Chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie die Colitis ulcerosa oder der Morbus Crohn stellen weitere Risikofaktoren für die Entstehung des Darmkrebses dar (Rogler, 2014; Yashiro, 2014).

1.1.6 Diagnostik

Da die beschriebenen Symptome des KRK (Kapitel 1.1.4) relativ unspezifisch sind und erst spät auftreten, kommt den Vorsorgeuntersuchungen zur Früherkennung der Erkrankung eine enorme Wichtigkeit zu (Kolligs und Graser, 2014). Screening-Verfahren sollten bei asymptomatischen Personen ab einem Alter von 50 Jahren durchgeführt werden, bei familiärer Häufung bereits früher (Winawer, 1997; Imperiale, 2002; Birkner, 2003; Pox, 2013). Folgende Untersuchungen werden zu diagnostischen Zwecken durchgeführt:

Laborchemische Untersuchung:

Blutbild: Zeichen der Anämie

Tumormarker CEA (Carcinoembryonales Antigen): Der Marker wird im Verlauf kontrolliert und kann auf ein erhöhtes Rezidivrisiko hinweisen (Pox, 2013).

Nicht-invasive Untersuchung:

Digital-rektale Untersuchung: Bei dieser klinischen Untersuchung wird auf tastbare Resistenzen oder Blut am Fingerling geachtet.

Fäkaler Okkultbluttest (FOBT): Der guajakbasierende FOBT (gFOBT) detektiert die Pseudoperoxidase-Aktivität des Hämoglobins. Bei dem gFOBT werden bei drei aufeinanderfolgenden Stuhlgängen je zwei Stuhlproben auf Blut untersucht. Das Hämoglobin färbt sich bei Zugabe von Wasserstoffperoxid blau. Fällt der Test positiv aus, macht dies eine Koloskopie erforderlich (Dietel, 2012). Die Durchführung der Vorsorgeuntersuchung mittels gFOBT senkt die Sterblichkeit durch das kolorektale Karzinom (Hewitson, 2008). Ein neuer iFOBT weist immunchemisch das Globin im Hämoglobin nach. Er ist spezifisch für menschliches Blut, im Gegensatz zum gFOBT, der falsch positive Werte bedingt durch bestimmte Nahrungsmittel oder Medikamente anzeigen kann. Studien haben gezeigt, dass der iFOBT sensibler und spezifischer ist als der gFOBT und mehr KKK aufspürt (Zhu, 2010; Duffy, 2014).

Invasive Diagnostik:

Ileo-Koloskopie: Die Ileo-Koloskopie besitzt die höchste Spezifität und Sensitivität und ist somit der Goldstandard für die Diagnostik des KKK. Die Endoskopie ist nicht nur diagnostisch, sondern auch therapeutisch anwendbar. Sowohl Winawer et al. als auch Citarda et al. haben schon vor circa 15 Jahren gezeigt, dass die Polypektomie im Zuge einer Koloskopie das Darmkrebsrisiko signifikant verringert (Winawer, 1993; Winawer, 1997; Citarda, 2001). Auch neue Studien zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit, an einem kolorektalen Karzinom zu sterben, durch die Entfernung adenomatöser Polypen während der Koloskopie sinkt (Zauber, 2012). Brenner et al. haben aus einer Langzeitstudie den Schluss gezogen, dass es bei unauffälligem Befund ausreicht, die Untersuchung in zehnjährigen Abständen zu wiederholen (Brenner, 2001). Eine aktuelle Studie der gleichen Arbeitsgruppe ergab, dass der präventive Langzeiteffekt von diesem Screeningverfahren (Koloskopie) sogar höher ist, als durch die bisherigen kürzeren Follow-up-Studien angenommen. Das Maximum der Risikoreduktion liegt ca. 15 Jahre nach einem Screening mittels Koloskopie und 20-25 Jahre nach der initialen Koloskopie im Falle einer zehnjährigen Wiederholung (Brenner, 2016).

Chromoendoskopie: Die Chromoendoskopie ermöglicht durch unterschiedliche endoskopische Färbemethoden die kontrastreichere Darstellung von suspekten Schleimhautarealen im

Einleitung

Vergleich zur Endoskopie (Gossner, 2001). Die Untersuchung wird vor allem bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder hereditären Präkanzerosen zur besseren Detektion der Läsionen durchgeführt (Kiesslich, 2003; Hurlstone, 2005).

Endosonographie: Die Endosonographie ist eine Ultraschalluntersuchung, die von innen durchgeführt wird. Sie spielt eine bedeutende Rolle bei der Bestimmung der Tiefeninfiltration des Tumors in die verschiedenen Wandschichten des Darms (Norton, 1999; Hunerbein, 2003).

Tumorstaging: Das Tumorstaging dient der Visualisierung der Tumorausbreitung. Hierzu wird eine Röntgenaufnahme des Thorax, eine Sonographie des Abdomens und ggf. ein CT des Thorax oder des Abdomens durchgeführt (Böhm, 2009).

Neuere Screening-Verfahren, die sich auf den Vormarsch befinden, sind die Kapselkoloskopie, bei der eine Kapsel samt Lichtquelle und Kamera geschluckt wird, und die virtuelle Koloskopie, die mittels Computer- oder Magnetresonanztomographie durchgeführt wird (Kolligs und Graser, 2014).

1.1.7 Klassifikation und Prognose

Die Klassifikation des KRK dient dazu, es international einheitlich zuordnen und Aussagen über die Prognose und die damit verbundene Therapie treffen zu können. Bei der TNM-Klassifikation steht das T für die Ausbreitung des Primärtumors, N für das Fehlen oder Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen und M für das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen.

Stadium Ia	Infiltration in Mukosa und Submukosa → <i>Dukes State A</i>
Stadium Ib	Infiltration in Tunica muscularis propria → <i>Dukes State A</i>
Stadium II	T3 und T4 ohne Lymphknotenmetastasierung → <i>Dukes State B</i>
Stadium III	Lymphknotenmetastase → <i>Dukes State C</i>
Stadium IV	Fernmetastase → <i>Dukes State D</i>

Tabelle 2: UICC-Stadieneinteilung (Union internationale contre le cancer, 1987)

Einleitung

T0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ: keine Ausbreitung durch die Muscularis mucosae
T1	Infiltration in die Tela submucosa
T2	Infiltration in die Tunica muscularis propria
T3	Infiltration aller Wandschichten, Subserosa
T4	a) Perforation des viszeralen Peritoneums, b) Infiltration der Nachbarorgane
N0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	a) 1 Lymphknotenmetastase, b) 2-3 Lymphknotenmetastase, c) 3 Satellitenmetastasen
N2	a) 4-6 Lymphknotenmetastasen, b) ≥ 7 Lymphknotenmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	a) Fernmetastasen in einem Organ, b) Fernmetastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum

Tabelle 3: TMN-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms, modifiziert nach Wittekind (Wittekind, 2011)

Die Prognose des KKR ist weitgehend vom Ausbreitungsstadium bei der Diagnosestellung abhängig. Dieses umfasst die lokale Tumorausbreitung, die lokale Lymphknotenmetastasierung und die Fernmetastasierung. Die Blut- oder Lymphgefäßinfiltration sind weitere wichtige Faktoren hinsichtlich der Prognose des KKR (Compton, 2000; Chok und Law, 2007; Betge, 2012). Zudem spielen die Histologie sowie der postoperative Residualtumor (R) eine Rolle. Das Rezidivrisiko ist in den ersten vier Jahren nach der primären Operation am höchsten (Böhm, 2009). Ebenso spricht ein präoperativ erhöhtes CEA für eine höhere Rezidivwahrscheinlichkeit (Dietel, 2012).

1.1.8 Metastasierungswege

Das KKR streut lymphogen in die regionalen Lymphknoten, paraaortal und inguinal. Hämatogen gelangen die Tumorzellen über den Pfortaderkreislauf in die Leber. Von dort kann es zu einem Befall der Lunge kommen. Das distale Rektumkarzinom stellt hier eine Ausnahme dar und metastasiert aufgrund seines Blutabflusses über die Vena cava inferior primär in die Lunge. Eine Metastasierung per continuitatem bedeutet, dass der Tumor ohne sichtbare Grenzen in Nachbarorgane und angrenzende Strukturen übergeht (Böhm, 2009; Dietel, 2012).

1.1.9 Therapie

Die Therapieempfehlung bezieht sich auf eine evidenzbasierte Konsensuskonferenz und ist in der S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ niedergeschrieben (Pox, 2013).

Radikalchirurgisch:

In Abhängigkeit der betroffenen Gefäße und des Lymphabflussgebiets wird beim Kolonkarzinom, jedoch nicht beim Rektumkarzinom, eine radikalchirurgische Therapie durchgeführt. Das bedeutet, dass der tumortragende Dickdarmabschnitt zusammen mit den lokalen Lymphabflussbahnen entfernt wird. Hierbei ist auf einen ausreichenden Sicherheitsabstand zum tumorösen Gewebe zu achten (Pox, 2013).

Adjuvante Chemotherapie:

Die adjuvante Chemotherapie wird nach einer operativen Behandlung durchgeführt, um das Rezidivrisiko zu verringern und um gegen Mikrometastasen vorzugehen. Diese Art der Therapie wird nicht bei Stadium UICC I-Patienten, die eine R0 Resektion erhielten (Resektion im Gesunden), durchgeführt. Die adjuvante Chemotherapie wird zudem von den Nebenerkrankungen des Patienten abhängig gemacht (Pox, 2013).

Neoadjuvante Radiochemotherapie:

Die neoadjuvante Radiochemotherapie ist eine vor der Operation durchgeführte Kombination aus Strahlen- und Chemotherapie. Sie ist bei den UICC Stadien II und III des Kolonkarzinoms und beim Rektumkarzinom indiziert. Diese Therapie führt zu einer verbesserten Operabilität und erhöht die Überlebensrate (Cammà, 2000; Sauer, 2004; Eich, 2011).

Chemotherapie:

Das Chemotherapieschema beinhaltet die folgenden Zytostatika bei der Behandlung des kolorektalen Karzinoms:

5-Fluoruracil intravenös oder oral als Capecitabin

Folinsäure

Irinotecan (CTP-11)

Oxaliplatin

Monoklonale Antikörper: Cetuximab, Bevacizumab und Panitumumab

In jedem Fall sollte fünf Jahre lang eine halbjährliche Nachkontrolle mit Anamnese, körperlicher Untersuchung und Bluttest (unter anderem CEA) durchgeführt werden. Eine komplette Koloskopie sollten die Patienten innerhalb von 6 Monaten postoperativ erhalten, dann nach einem Jahr und bei weiterhin unauffälligem Befund alle 5 Jahre (Pox, 2013).

1.2 EXTRAZELLULÄRMATRIX

1.2.1 Funktion

Die verschiedenen Gewebe des menschlichen Körpers bestehen nicht allein aus Zellen, sondern auch aus einem die Zellen umgebenden Geflecht von Makromolekülen: der extrazellulären Matrix (EZM) (Alberts, 2014). Sie gehört zu den wichtigsten Regulatoren der Zell- und Gewebefunktion im menschlichen Körper. Die extrazelluläre Matrix ist aus unterschiedlichen biochemischen Bestandteilen wie Faserproteinen, Glykoproteinen, Proteoglykanen und Polysacchariden aufgebaut. Die verschiedenen Bestandteile verleihen der EZM durch ihre spezielle Zusammensetzung, Steifigkeit und räumliche Struktur, wodurch die EZM eine statische Funktion innehat. Die EZM ist für die Zelladhäsion, den Gewebeaufbau und die Informationsübermittlung der Organe essentiell. Die Faserproteine bilden ein engmaschiges Gitter, wohingegen die Proteoglykane für die visköse Komponente verantwortlich sind. Hierdurch dient die EZM den Zellen als Schutz und Dämpfer bei Scher- und Deformationsstress (Cox und Erler, 2011). Im Bindegewebe sezernieren die Fibroblasten die Makromoleküle der EZM, wobei auch Chondroblasten oder Osteoblasten diese Aufgabe übernehmen können.

Physiologisch ist die EZM für die Embryonalentwicklung und die Wundheilung verantwortlich, hat also auch eine dynamische Aufgabe (Roeb und Matern, 2001). Zudem ist sie maßgeblich an der Zellproliferation und -migration beteiligt und dient als Filter, z.B. als Diffusionsbarriere für Metabolite. In ihr können Wachstumsfaktoren und Zytokine gespeichert werden (Hohenester, 2002; Hynes, 2009). Eine spezielle EZM ist die Basalmembran, die das Epithel oder Endothel vom Stroma trennt und weniger durchlässig ist als die interstitielle Matrix (Lu, 2012).

1.2.2 Aufbau

Die in der Extrazellulärmatrix enthaltenen Proteoglykane und Faserproteine sind untereinander gut organisiert und bilden so die Histo-Architektur der verschiedenen Gewebe. Diese Moleküle sind in der Lage, Polymere zu bilden, weshalb ihnen benannte Gerüstfunktion zukommt (Aumailley, 1998). Zu den Faserproteinen gehören einerseits Strukturproteine wie Kollagen Typ I-IV - der Hauptbestandteil der EZM - und Elastin, andererseits Adhäsionsproteine wie Fibronectin und Laminin. Kollagen Typ IV ist besonders in der Basalmembran, die die EZM abgrenzt, vorhanden. Diese wird bei der Tumorausbreitung und Metastasierung durchbrochen. Beispiele für die am Anfang des Kapitels genannten Proteoglykane sind Aggrecan, Perlecan und Decorin. Sie bestehen aus Proteinen und Glykosaminoglykanen (Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat, Heparin, Keratansulfat), wobei es sich um Polysaccharide handelt. Die Glykosaminoglykane sind negativ geladen und ziehen osmotisch wirksame Kationen wie Na^+ an, was wiederum durch den Einstrom von großen Mengen Wasser zu einem Quelldruck führt. Die wässrige Phase der Polysaccharide ist für die Diffusion von Hormonen, Nährstoffen und Metaboliten zwischen Gewebe und Blut verantwortlich.

Die EZM befindet sich in einem steten Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau (tissue remodeling). Lokale Gewebezellen und eingewanderte Immunzellen wirken durch Interleukine und Transmitter, wie die *Transforming Growth Faktoren* (TGF) $-\alpha$ und $-\beta 1$, stimulierend auf die EZM ein. Denselben Einfluss haben Glykoproteine durch ihre *Epithelial Growth Factor* (EGF)-ähnliche Domäne. Bei der Embryogenese, im Wachstum oder bei der Wundheilung überwiegt der EZM-Abbau (Agren, 1992; Breckon, 1995; Mattot, 1995). Ist dieser pathologisch verstärkt, entstehen Krankheitsbilder wie die rheumatische Arthritis, pemphigoid

Hauterkrankungen und die Parodontose (Koop, 1994). Dabei spielen die Phagozytose und Proteasen eine wesentliche Rolle:

- Serin-/Threoninproteasen
- Zysteinproteinasen
- Aspartatproteinasen
- Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

Letztere haben eine besondere Bedeutung, da sie in der Lage sind, fast alle Bestandteile der EZM abzubauen. Bei einer verminderten Aktivität der MMPS kann es zu fibrotischen Prozessen im Körper kommen (Engel, 1989; Hohenester, 2002; Giannelli, 2003; Bonnans, 2014).

1.3 MATRIX-METALLOPROTEINASEN

1.3.1 Funktion

Nach dem jetzigen Stand der Forschung sind mehr als 23 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) bekannt, die sich vermutlich aus einem Ursprungsgen entwickelt haben (Kessenbrock, 2010). Die ersten MMPs wurden 1962 von Gross und Lapiere in Kaulquappen entdeckt (Gross und Lapiere, 1962). Seither beschäftigt sich die Forschung mit MMPs als Mediatoren zwischen Zellen und deren Umgebung. Sie spielen eine zentrale Rolle beim Abbau der Extrazellulärmatrix (EZM), interagieren aber auch mit Nicht-Matrix-Proteinen wie Zytokinen und Chemokinen. Somit haben die MMPs Anteil an den Entzündungs- und Immunreaktionen im menschlichen Körper (Parks, 2004). MMPs wirken sowohl bei der Homöostase als auch bei der Gewebeumformung mit und sind bei der Tumormigration, -invasion und Metastasierung von großer Relevanz. Zudem sind sie an Vorgängen wie der Apoptose, der Proliferation, der Zelldifferenzierung und der Angiogenese beteiligt (Lee, 2000; Abécassis, 2003; Björklund, 2005; Di Girolamo, 2006). MMPs haben nicht nur Einfluss auf die Metastasierung, es wurde auch eine Beeinflussung des Wachstums des Primärtumors beobachtet (Chambers, 1997).

Einleitung

MMPs	Ursprünglicher Name	Kollagenöse Substrate	Nicht-kollagenöse Substrate
MMP-1	Kollagenase-1	Kollagen Typ I II III VII VIII X Gelatin	Aggrecan, Nidogen, proTNF α , IL-1, L-Selektin, Casein, 1-Antitrypsin, Ovostatin, Serpins
MMP-2	Gelatinase-A	Kollagen Typ I IV V VII X XI XIV Gelatin	Elastin, Laminin, Fibronectin, Versican, Aggrecan, Myelinbase-Protein, Amyloid, proTNF α , proMMP-9, proMMP-13
MMP-3	Stromelysin-1	Kollagen Typ II IV IX X Gelatin	Aggrecan, Casein, Decorin, Elastin, Fibronectin, Nidogen, Laminin, Perlecan, Versican, proMMP-1, proMMP-8, proMMP-9, E-Cadherin
MMP-7	Matrilysin-1	Kollagen Typ I II III IV V X	Aggrecan, Elastin, Laminin, Enactin, proMMP-2, proMMP-7, proTNF α
MMP-8	Kollagenase-2	Kollagen Typ I II III IV VII VIII X Gelatin	Aggrecan, Nidogen, Laminin, proMMP-8, α -Antiplasmin
MMP-9	Gelatinase-B	Kollagen Typ IV V VII X XIV	Fibronectin, Laminin, Nidogen, Versican, Plasminogen, TGF- β
MMP-10	Stromelysin-2	Kollagen Typ III IV V Gelatin	Fibronectin, Laminin, Nidogen, proMMP-1, proMMP-8, proMMP-10
MMP-11	Stromelysin-3		Laminin, α ₁ -Antitrypsin
MMP-12	Makrophagen Metalloelastase		Elastin, Plasminogen
MMP-13	Kollagenase-3	Kollagen Typ I II III IV V IX X XI Gelatin	Aggrecan, Fibronectin, Laminin, Perlecan, Tenascin, Plasminogen-Aktivator-2, proMMP-9, proMMP-13
MMP-14	MT1-MMP	Kollagen Typ I II III Gelatin	Aggrecan, Nidogen, Laminin, Perlecan, Fibronectin, Fibrin, Vitronectin, CD44, proMMP-2, proMMP-13, α/β -Integrin
MMP-15	MT2-MMP	Kollagen Typ I II III Gelatin	Aggrecan, Nidogen, Laminin, Perlecan, Fibronectin, Vitronectin, proMMP-2, proMMP-13

Einleitung

MMP-16	MT3-MMP	Kollagen Typ I III Gelatin	Aggrecan, Casein, Laminin, Perlecan, Fibronectin, Vitronectin, proMMP-2, proMMP-13
MMP-17	MT4-MMP	Gelatin	Fibrin, Fibronectin
MMP-19	RASI-1	Kollagen Typ I IV	Aggrecan, Casein, Laminin, Fibronectin, Nidogen
MMP-20	Enamelysin	Gelatin	Aggrecan, Amelogenin
MMP-21			α_1 -Antitrypsin
MMP-23	CA-MMP	Gelatin	
MMP-24	MT5-MMP	Gelatin	Chondroitinsulfate, Dermatin sulfate, Fibronectin, pro-MMP-2, proMMP-13
MMP-25	Leukolysin, MT6-MMP	Kollagen Typ IV Gelatin	Fibrin, Fibronectin, pro-MMP-2
MMP-26	Matrilysin-2	Kollagen Typ IV	Casein, Fibrinogen, Fibronectin, β_1 -Proteinase-Inhibitor
MMP-28	Epilysin	Gelatin	Casein

Tabelle 4: MMPs, modifiziert nach Somerville (Somerville, 2003)

1.3.2 Struktur

Bei den MMPs handelt es sich um zinkabhängige Endopeptidasen. Sie können aufgrund ihrer Substratspezifität in sechs Subgruppen unterteilt werden: Kollagenasen, Gelatinasen, Matrilysine, Stromelysine, Membrantyp-MMPs und die nichtklassifizierten MMPs (Nagase und Woessner, 1999; Nagase, 2006).

Die typische Struktur der MMPs setzt sich aus einem Signalpeptid (17-20 Aminosäuren), einem Propeptid (80 Aminosäuren), einem katalytischen Zentrum (170 Aminosäuren), einem Verbindungsteil variabler Länge, der sogenannten Hinge-Region und einer Hämopexin-ähnlichen Domäne (PEX; 200 Aminosäuren) zusammen (Benoit de Coignac, 2000). Die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 besitzen zusätzlich eine im katalytischen Zentrum lokalisierte

Fibronektin Typ II-Domäne. Bei der MMP-9 kommt außerdem eine kollagenähnliche Domäne hinzu. Diese Domänen vermitteln die Interaktion mit der EZM. Die membranständigen MMPs (MT-MMP) enthalten zudem eine Transmembrandomäne (Bode, 1999). Die inaktiven MMPs werden durch die Spaltung nach der konservierten Sequenz PRCGXPD aktiviert (Massova, 1998).

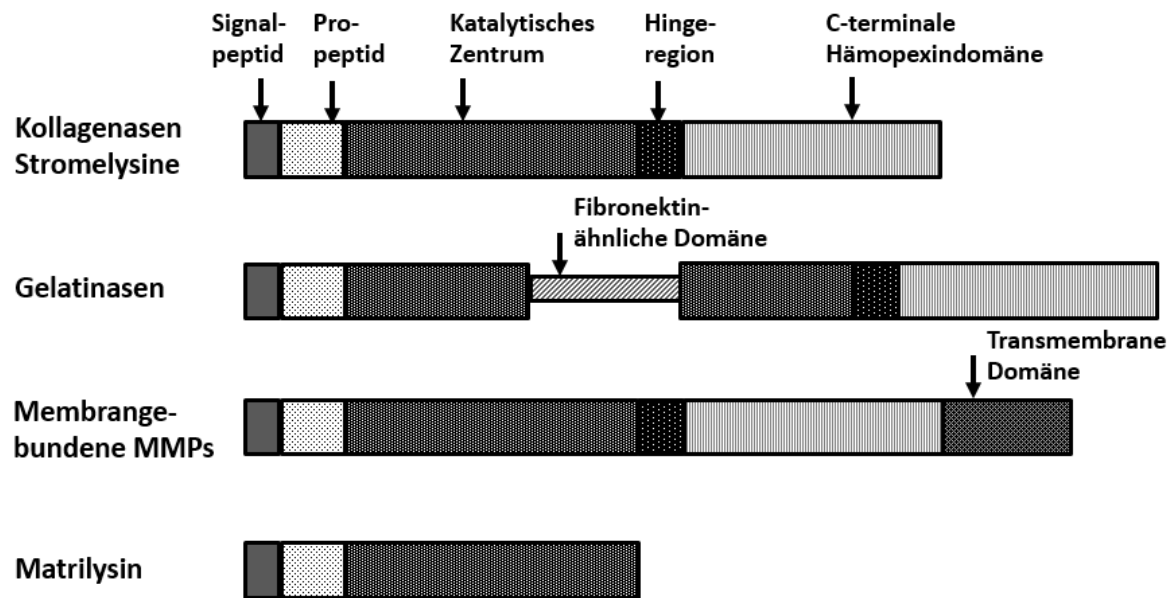


Abbildung 2: MMP-Modell, modifiziert nach Curran (Curran, 2000)

Signalpeptid:

Das Signalpeptid besteht aus einem Rest von 17-20 Aminosäuren (Bode, 1999). Die intrazellulär gebildeten MMPs werden mittels des Signalpeptids in das endoplasmatische Retikulum befördert, von wo sie in den extrazellulären Raum sezerniert werden. Hierbei wird das Signalpeptid abgespalten. Nur MMP-17 besitzt kein Signalpeptid (Puate, 1996).

Propeptid:

Das N-terminale Ende des Propeptides ist hydrophob. Nahe des C-terminalen Endes befindet sich eine Autoinhibitor-Sequenz (PRCGXPD), die ein Zystein enthält und durch eine Thiol-

Einleitung

Gruppe gegenüber dem aktiven Zentrum positioniert wird. Es geht mit dem dort befindlichen Zink-Ion eine Bindung ein (Cystein-switch) und blockiert so das katalytische Zentrum. Zur Katalyse wäre an der vierten Bindungsstelle ein Wassermolekül notwendig. Zur Aktivierung der MMPs muss das Propeptid abgespalten werden (Vallee, 1990).

Katalytisches Zentrum:

Die katalytische Domäne der MMPs weist eine abgeflachte ellipsoide Form und eine Gesamtlänge von 160-170 Aminosäuren auf. Das C-terminale befindliche Zink-Ion ist für die enzymatische Aktivität verantwortlich und wird durch drei Histidin-Reste und einen Zystein-Rest stabilisiert. Zudem hat das katalytische Zentrum eine Bindungsstelle für Kalzium (Bode, 1999).

Hinge-Region:

Die Hinge-Region ist für die Substratspezifität der einzelnen MMPs entscheidend. Ihre Länge variiert zwischen 2 und 75 Aminosäuren und ist sehr prolin-reich. MMP-9 weist die längste Hinge-Region auf (Pourmotabbed, 1994).

Hämopexin-ähnliche Domäne (PEX):

Außer MMP-7, MMP-23 und MMP-26 besitzen alle MMPs eine C-terminale Hämopexin-ähnliche Domäne (Jenne, 1987). Diese besteht aus einer vierblättrigen Propellerstruktur, die durch Disulfidbrückenbindungen zwischen Zysteinresten der „Blätter“ I und IV erzeugt wird. In dem sich daraus gebildeten Tunnel werden einige Kationen (Kalzium) und Anionen (Chlorid) beherbergt. Der Propeller beinhaltet außerdem eine Kalzium-Bindungsstelle (Murphy, 1997). Die vier „Blätter“ sind je aus 48 Aminosäuren aufgebaut, wobei jedes „Blatt“ aus einer α -Helix und vier antiparallelen β -Faltblättern aufgebaut ist. Das vierte „Blatt“ der PEX-Domäne vermittelt eine nicht-kovalente, hydrophobe Dimer-Bildung (Sternlicht, 2001; Cha, 2002). Die PEX-Domäne ist für die Substratspezifität und die Bindung der Substrate mitverantwortlich und spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der MMPs (Li, 1995; Gomis-Rüth, 1996; O'Farrell und Pourmotabbed, 2000).

Fibronektin-ähnliche Domäne:

Die Gelatinasen A (MMP-2) und B (MMP-9) besitzen wie bereits erwähnt eine Fibronektin-ähnliche Domäne im katalytischen Zentrum, die aus einer dreifach wiederholten 58-Aminosäuresequenz besteht (Steffensen, 1995; Banyai, 1996). Diese dient den Gelatinasen dazu, mit verschiedenen Kollagenen und Gelatinen zu interagieren (Allan, 1995). Das heißt zum einen, Gelatine zu binden und zum anderen eine gelatinolytische Aktivität inne zu haben (Collier, 1992; Pourmotabbed, 1994).

Transmembrandomäne:

Die Transmembrandomäne besteht aus 80 bis 110 Aminosäuren, wobei 20 davon in der Zellmembran verankert sind. Diese hydrophobe Sequenz befindet sich am C-Terminus. Wenn sich im Inneren die zytoplasmatische Domäne anschließt, wird dies als Typ-I-membranständig bezeichnet. Das trifft bei MMP-14, MMP-15 und MMP-16 zu. Ist die Verankerung ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker, wie bei MMP-17 und MMP-25, wird dies Typ-II-membranständig genannt.

1.3.3 Gelatinasen

Der Gruppe der Gelatinasen werden bisher zwei Mitglieder zugeordnet, denen eine wichtige Funktion bei der Degradierung der Kollagene zugewiesen wird. Besonders die MMP-9 steht im Fokus dieser Arbeit.

MMP-2:

Die Gelatinase A hat ein Molekulargewicht von 72kDa (inaktiv) und wird unter anderem von Tumor umgebenden Stromazellen gebildet. Sie ist die am häufigsten mit der Tumorentstehung, der Invasivität sowie der Metastasierung in Zusammenhang gebrachte Matrix-Metalloproteinase (Nabeshima, 2002). Die Arbeitsgruppen Roeb und Collins haben herausgefunden, dass MMP-2 auch beim kolorektalen Karzinom vermehrt exprimiert wird (Collins, 2001; Roeb, 2001). Im Verlauf vom Adenom zum Adenokarzinom nimmt die Menge an MMP-2 zu (Papadopoulou, 2001). Gelatinase A spaltet vor allem Kollagen IV, aber auch andere in *Tabelle 4* aufgelistete EZM-Bestandteile. Zudem kann sie MMP-9 proteolytisch aktivieren (Basset, 1997).

MMP-9:

Die Gelatinase B wurde 1974 erstmalig entdeckt und ist besonders für ihren Einfluss auf die Zellmigration bekannt, da sie in der Lage ist, EZM-Bestandteile wie Kollagen, Aggrecan, Elastin und Laminin abzubauen (Sopata, 1974; Shapiro, 1998; Bergers, 2000). Des Weiteren ist sie bei pathologischen Prozessen kardiologischer, neurologischer und entzündlicher Art sowie bei der Angiogenese beteiligt. Sie hat mit 92kDa (inaktiv) ein höheres Molekulargewicht als MMP-2. Die Aktivierung erfolgt unter anderem durch eine Plasmin-Stromelysin-1-Kaskade. Die Expression der MMP-9 kann durch verschiedene Zelltypen induziert werden (Partridge, 1997; Ramos-DeSimone, 1999). Keratinozyten, Monozyten, Alveolarmakrophagen, Leukozyten und viele maligne Zellen synthetisieren die Gelatinase B (Westermarck, 1999). Die Herkunft der MMP-9 hat einen Einfluss auf deren Funktion und Aktivität. Von neutrophilen Zellen synthetisiertes MMP-9 ist frei von TIMP-1 und kann deshalb schneller aktiviert werden (Ardi, 2007). In einem Hautkrebs-Mausmodell haben Coussens et al. beschrieben, dass MMP-9, welches durch Knochenmarkszellen produziert wurde, die Angiogenese und das Tumorwachstum stimuliert (Coussens, 2000). Derselbe Einfluss von durch Stromazellen sezernierter-MMP-9 konnte für das Ovar- und das Zervixkarzinom bei Mäusen nachgewiesen werden (Huang, 2002; Giraudo, 2004). Bei Patienten mit Brustkrebs hatten diejenigen mit hoher stromaler MMP-9-Expression eine schlechtere Überlebensrate als die mit einer hohen Expression der MMP-9 in Karzinomzellen (Pellikainen, 2004). Eine sich ändernde Bedeutung von MMP-9 bei der Krebsentstehung konnte im Mausmodell belegt werden. Zu Beginn ist MMP-9 ein Promotor der Tumorgenese, im fortgeschrittenen Stadium kann sie als antikarzinogenes Enzym wirken (Deryugina und Quigley, 2006). Von Brustkrebszellen produziertes MMP-9 war bei in vitro Versuchen für die Invasivität des Tumors nötig, im Mausmodell für die Vaskularisation des Tumors und die Entstehung von Lungenmetastasen. Als die MMP-9-Expression ausgeschaltet wurde, verwandelte sich der Tumor in einen weniger malignen Phänotypen (Mehner, 2014).

1.3.4 Regulation

Die Regulation der MMPs findet auf mehreren Ebenen statt. Die MMPs werden als inaktive Zymogene (Proenzyme) von Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen, proinflammatorischen Zellen und Tumorzellen synthetisiert und durch Proteasenspaltung aktiviert (Birkedal-

Hansen, 1993; Basset, 1997; Egeblad, 2002). Die Expression ist transkriptionell durch eine Vielzahl an extrazellulären Faktoren, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und durch den Zellkontakt mit der EZM geregelt (Westermarck, 1999). Diese Signale können positiv oder negativ sein. Eine Hemmung erfolgt durch spezifische Inhibitoren (Kapitel 1.3.5). Es existiert für jeden Tumor - wie für jede andere Zelle auch - ein sehr komplexes und individuelles Expressions- und Regulationsmuster der MMP-Familie, welches sich in der Wirtsantwort widerspiegelt (Heppner, 1996; Zucker, 2004).

1.3.5 Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen

Ein allgemeiner Hemmer der MMPs ist das Serumprotein α 2-Makroglobulin (Opdenakker, 2001). Natürliche spezifische Inhibitoren der MMPs sind die Tissue Inhibitors of Matrix-Metalloproteinasen (TIMPs), kleine, extrazelluläre Proteine (Moore, 2012). TIMPs hemmen mit ihrem N-terminalen Ende die MMPs, indem sie nicht-reversible Komplexe bilden. Mit der C-terminalen Domäne wirken sie bei Protein-Protein-Interaktionen mit (Willenbrock, 1993). Es gibt bislang vier bekannte TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4), die jeweils aus zwei über Disulfidbrücken verbundenen Domänen bestehen. Zu 35-40% sind ihre Aminosäuresequenzen identisch. Sie besitzen zwölf konservierte Zystein-Reste und bilden 1:1-Komplexe mit den MMPs. TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 sind löslich, TIMP-3 ist membrangebunden (Brew, 2000; Yeh und Sheu, 2014).

TIMP-1 bindet am stärksten an MMP-9, entweder kompetitiv oder allosterisch, was zu einer unvollständigen Homodimer-Bildung führt (Dufour, 2010). Zudem interagiert *TIMP-1* mit pro-MMP-9, MMP-3, MMP-14, MMP-16 und MMP-19 (Goldberg, 1992).

TIMP-2 interagiert vor allem mit pro-MMP-2.

TIMP-3 bindet an alle MMPs, pro-MMP-2 und pro-MMP-9 (Lee, 2004). Er kommt ausschließlich in der EZM vor (Gomez, 1997).

TIMP-4 bindet an MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 und MMP-9.

Die Expression der TIMPs wird durch proinflammatorische Zytokine (z.B. Interleukin-6 oder TGF- β) gesteigert, nur TIMP-2 wird vorwiegend konstitutiv exprimiert. Eine Überexpression von TIMP-1 führt zur Fibrose von Leber, Lunge, Pankreas und Niere (Wang, 1996). Bei Mäusen mit malignem Melanom führte die Überexpression von TIMP-1 zu einer Reduktion des tumorbildenden und des metastatischen Potentials. Der Primärtumor war in diesen

Mäusen kleiner und auch die Tumorzinzidenz seltener (Khokha, 1994). Auch in anderen Tumoren werden erhöhte TIMP-Werte mit der Verminderung der Metastasierung und der Invasion assoziiert (Krüger, 1998). Neuere Studien konnten jedoch zeigen, dass der TIMP-1-Wert beim kolorektalen Karzinom mit dem Tumorstadium assoziiert ist (Mroczo, 2010). Jensen et al. haben in ihrer Studie herausgefunden, dass TIMP-1 - unabhängig von seiner Rolle als MMP-Inhibitor (MMPI) - mit einer schlechten Prognose beim KKK einhergeht und die Überlebensrate senkt (Jensen, 2010).

Nachdem die tragende Rolle der MMPs bei der Tumorzinzision und -metastasierung herausgefunden war, wurde versucht, MMP-Inhibitoren synthetisch herzustellen. Die präklinischen Studien verliefen vielversprechend, doch in der klinischen Anwendung traten Probleme auf (Hua, 2011). Batimastat ist ein Beispiel für einen Breitspektrum-MMPI, der im Modell zu einer Hemmung des Tumorzinzistums und der Metastasierung führte (Giavazzi, 1998; Prontera, 1999). In der klinischen Anwendung fielen bedauerlicherweise vermehrt Lebermetastasen bei Patienten mit einem T-Zelllymphom auf (Krüger, 2001). Marisamat, ein anderer auf Hydroxamat-basierender Matrix-Metalloproteinasen-Inhibitor (MMPI), konnte in Phase III-Untersuchungen keine Unterschiede zur Placebogruppe aufweisen. Zusätzlich traten bei höheren Dosierungen Nebenwirkungen wie das muskuloskelettale Syndrom auf (Bramhall, 2002). Da die Funktionen der MMPs bei der Tumorzinzibildung und Metastasierung nicht gänzlich geklärt und die wechselnden Interaktionen der MMPs noch nicht ausreichend bekannt sind, sollte von der weiteren Entwicklung von Breitspektrum-MMP-Inhibitoren abgesehen werden. Gegenstand der momentanen Forschung sind Inhibitoren der Transkription der MMPs, Stimulatoren der endogenen TIMPs und Antikörper gegen spezifische MMPs (Devy, 2009). Es sollte außerdem bedacht werden, dass MMPs auch auf nicht proteolytische Art und Weise wirken können, beispielsweise durch ihre Hämopexindomäne (PEX): Eine Studie zeigte, dass die Bindung der PEX-Domäne der MMP-9 an spezifische Rezeptoren durch die Aktivierung von Signalwegen B-CLL-Zellen vor Apoptose schützt (Redondo-Muñoz, 2010). Die PEX-Domäne einer Drosophila Matrix-Metalloproteinasen führt im Gegensatz zur Katalytischen-Domäne zur Gewebezinzision (Glasheen, 2009). Die übermäßige Verästelung von Brustepithel ist auf die Hämopexindomäne von MMP-3 zurückzuführen (Correia, 2013). Daher könnte die PEX-Domäne einen neuen Ansatzpunkt für die Entwicklung von MMPIs darstellen (Kessenbrock, 2015). Dufour et al. haben bereits ein Molekül

entdeckt, das spezifisch an die PEX-Domäne von MMP-9 bindet, somit die Homodimer-Bildung von MMP-9 behindert und durch die Blockade des CD44-EGFT-MAKP-Signalwegs die Tumorzellproliferation, -invasion und -migration beeinträchtigt (Dufour, 2011). Remacle et al. konnten ebenfalls demonstrieren, dass ein PEX-Inhibitor zur Unterdrückung des Tumorstwachstums führt (Remacle, 2012). Somit ist die Entwicklung synthetischer MMPIs weiterhin attraktiv für die Forschung, allerdings sollten die MMPI zukünftig MMP- und substratspezifisch sein (Gialeli, 2011). Deshalb ist ein besseres Verständnis der pro- und antikanzinogenen Wirkung der einzelnen MMPs nötig (Martin und Matrisian, 2007).

1.4 MMP-9/PEX-9 UND DAS KOLOREKTALE KARZINOM

1.4.1 Zellmigration

Die Fähigkeit von Karzinomzellen zu migrieren, führt dazu, dass sie ihre Position im Gewebe ändern und in andere Organe metastasieren können. Bereits 1998 entdeckten Johnsen et al., dass die Tumorzellen zur Migration und Invasion dieselben Mechanismen wie bei der physiologischen Zellumformung, beispielsweise in der Embryonalentwicklung, verwenden (Johnsen, 1998). Für die Zellmigration muss die Basalmembran degradiert und somit erst das Kollagen durchbrochen werden (Liotta, 1980). Da MMP-9 die Kapazität hat, die EZM-Kollagene zu degradieren, spielt sie bei der Regulation der Zellmigration eine Rolle (Kapitel 1.3.3). Besonders die Hämpexindomäne (Kapitel 1.3.2) der MMP-9 ist in die Zellmigration involviert. Die PEX-9-Domäne interagiert sehr gut mit Gelatin und Kollagen Typ I und fast ebenso gut mit Kollagen Typ IV. Bindungen zu Elastin, Laminin und Fibrinogen konnten nachgewiesen werden, sind aber bei weitem nicht so stark wie die mit Gelatin oder Kollagen (Sancéau, 2003; Burg-Roderfeld, 2007). Urgate-Bezal zeigte mit ihrer Arbeitsgruppe, dass die PEX-Domäne von MMP-9 (PEX-9) den Abbau der EZM durch MMP-9 bei CLL-Zellen verhindert, indem sie durch ihr erstes und viertes „Blatt“ an Gelatine bindet und diese so für MMP-9 abschirmt. Hierbei wirkt PEX-9 nicht als reiner MMP-9-Antagonist. Rekombinante PEX-9 war nämlich auch in der Lage die Degradation von Gelatine durch MMP-2 zu hemmen (Urgate-Bezal, 2016). PEX-9 bindet außer Gelatine auch andere Oberflächenproteine wie CD44, Reck, Ku, LRP-1, LRP-2. CD44 ist ein Membran-Glykoprotein und vermittelt die Bindung zwischen Zellen und der EZM (Aruffo, 1990). CD44 kann durch die Verbindung

mit Aktin-Mikrofilamenten die Zellmigration regulieren. Die Bindung des ersten „Blattes“ der PEX-9-Domäne an CD44 führt zu einer gesteigerten Zellwanderung. Zudem werden die MAP-Kinase - und PI3K-Signalwege initialisiert und sind somit in eine gesteigerte Zellmigration involviert. MMP-9 bildet durch seine PEX-Domäne Homodimere. Diese MMP-9-Homodimere verstärken nachweislich die Migration der Zelle (Sternlicht und Werb, 2001; Piccard, 2007; Dufour, 2008; Dufour, 2010).

Ezhilarasan et al. haben gezeigt, dass mit PEX-9 transfizierte Klone die Invasivität und Angiogenese von Glioblastomzellen hemmen und so das Tumorwachstum aufhalten (Ezhilarasan, 2009). Durch eine rekombinante PEX-9 konnte bei metastasierenden kolorektalen Karzinomzellen *in vitro* die Migration und Adhäsion reduziert werden (Burg-Roderfeld, 2007). Außerdem führt PEX-9 konditioniertes Medium - Kulturmedium, in dem der Faktor PEX-9 aufgrund der Sezernierung durch andere Zellen enthalten ist - durch die Aktivierung von Caspasen und deren Signalwegen zu einer gesteigerten Apoptose in der verwendeten Zelllinie (Degterev, 2003; Ezhilarasan, 2009). Die PEX-Domäne von proMMP-9 hat eine höhere Affinität zu Komponenten der EZM als MMP-9. Roeb et al. haben 2002 bei Melanomzellen gezeigt, dass ein rekombinantes PEX-9 die Migration signifikant verringert. Die Hämopexin-domäne von MMP-9 wurde als ein Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein in *Escherichia coli* exprimiert (Roeb, 2002). Bis heute fehlen eindeutige Daten zum Einfluss von PEX-9 auf Tumore des Gastrointestinaltrakts.

1.4.2 Tumorzellinvasion und Metastasierung

Erhöhte Expressionswerte von MMP-2 und MMP-9 wurden in einigen menschlichen Tumoren bereits vor 30 Jahren festgestellt, beispielsweise beim Ovarialkarzinom, beim Prostatakarzinom, beim Harnblasenkarzinom und beim Brustkrebs (Davies, 1993a; Davies, 1993b; Hamdy, 1994; Naylor, 1994). Beim kolorektalen Karzinom konnten in der Zymographie im Vergleich zur normalen Darmmukosa gesteigerte Werte von den Gelatinasen A und B festgestellt werden (Liabakk, 1996). Erhöhte mRNA-Werte von MMP-2 und MMP-9, die in KRK gemessen wurden, scheinen bei der Krebsentstehung eine Rolle zu spielen, da sie in der gesunden Mukosa nicht nachweisbar waren. Es konnte belegt werden, dass es bei der Tumorgenese des kolorektalen Karzinoms zum Verlust von Kollagen Typ IV der Basalmembran kommt und dieser mit der Erhöhung der aktiven Form von MMP-2 und MMP-9 assoziiert ist

(Zeng, 1999). Bereits bei den Präkanzerosen können die MMPs erhöht sein (Rath, 2006). Es wurden zudem erhöhte Serumspiegel der Gelatinasen bei Patienten mit KRK gemessen (Dragutinovic, 2011). Über eine Korrelation mit dem Krebsstadium gibt es unterschiedliche Studien. Allerdings ist ein Zusammenhang zwischen der Proteinexpression der Proteinasen und der Metastasierung des KRKs beschrieben worden (Mook, 2004). Eine andere Studie zeigte keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression in KRK und gesundem Darmgewebe (Masuda, 1999). Jedoch konnten erhöhte Werte der MMP-9-Genexpression in Lebermetastasen bei KRK mit der Tumorentwicklung und der steten Tumorprogression in Zusammenhang gebracht werden (Koumura, 1997; Waas, 2003). Auf die enorme Bedeutung der aktiven Form der Gelatinasen und anderer MMPs im Tumorgewebe wiesen Baker et al. hin (Baker, 2000). Die aktive Form ist umso höher, je ausgedehnter das pathologische Stadium des Tumors ist (Baker, 2002). Eine andere Studie demonstrierte, dass das MMP-9-Expressionslevel auf RNA-Ebene mit der Rückfall- und Rezidivrate bei kolorektalen Karzinomen in Verbindung gebracht werden kann (Zeng, 1996). Buhmeida et al. spezifizierten diese Aussage noch und publizierten, dass die Höhe der MMP-9-Expression verlässliche Prognosen über Hochrisiko-Patienten im Stadium UICC II des KRK gäbe und anhand dessen der Profit einer adjuvanten Therapie abgeschätzt werden könne (Buhmeida, 2009). Eine weitere Studie konnte eine Korrelation zwischen dem MMP-9-Wert und der Invasionstiefe, der Lymphknoten- und Fernmetastasierung bei Patienten mit KRK feststellen (Chu, 2012). Eine finnische Arbeitsgruppe kam zu dem davon abweichenden Ergebnis, dass die niedrige MMP-9-Expression im Dukes' Stadium B des KRKs eine schlechte Prognose vorhersagen kann (Koskensalo, 2012). Die Verteilung von MMP-9 in den kolorektalen Karzinomgeweben ist unterschiedlich. Die Expression wurde vor allem in den tiefen Rändern der Tumore und den Ulzerationen gefunden. Außerdem war MMP-9 häufiger bei späteren Tumorstadien nachzuweisen und verhielt sich invers zu der Verteilung des Typ IV Kollagens (Jeziorska, 1994). Roeb et al. haben belegt, dass MMP-9 im Kolonkarzinom im Vergleich zum Rektumkarzinom vermehrt gebildet wird (Roeb, 2001). Trotz all dem - teils auch widersprüchlichen - Wissen über MMP-9 beim kolorektalen Karzinom sind die genauen Signalwege der Migration, Invasion und Metastasierung noch nicht entschlüsselt.

1.5 ZIEL DER ARBEIT

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind zinkabhängige Endopeptidasen, denen eine bedeutende Aufgabe beim Umbau der extrazellulären Matrix zukommt (Nagase und Woessner, 1999; Nagase, 2006; Kessenbrock, 2010). Ihre lokale Produktion, sei es durch die Tumorzellen selbst oder durch das umliegende Gewebe, ist mit einem erhöhten invasiven und metastatischen Potential der Tumorzellen assoziiert. Zudem sind die MMPs an der Apoptose, der Proliferation, der Angiogenese und der Zelldifferenzierung beteiligt (Björklund, 2005). Die MMPs bestehen aus einem Signalpeptid, einem Propeptid, einer zinkbindenden katalytischen Domäne, einer prolin-reichen Hinge-Region und einer C-terminalen Hämopexin-ähnlichen Domäne (PEX) (Massova, 1998). Die PEX-Domäne liegt durch die Bildung von Disulfidbrücken als vierblättriger Propeller vor (Cha, 2002).

Die Gelatinase MMP-9 wurde unter anderem in Darmkrebsgewebe und dessen Umgebung nachgewiesen (Zeng, 1999; Roeb, 2001). Sie degradiert die EZM und hat deshalb große Relevanz bei der Metastasierung des kolorektalen Karzinoms. Dieser maligne Tumor ist der dritthäufigste Tumor der westlichen Welt und geht mit einer hohen krebsassoziierten Letalität einher (Jemal, 2011). Es existieren nur wenige Arbeiten über den Zusammenhang von MMP-9 und dessen Hämopexindomäne (PEX-9) mit dem Tumorgeschehen (Sternlicht und Werb, 2001; Sancéau, 2003; Björklund, 2005; Burg-Roderfeld, 2007). In der Literatur fehlen Daten zu dem Einfluss von PEX-9 auf Tumoren des Gastrointestinaltrakts, insbesondere auf das kolorektale Karzinom. Um den Einfluss von PEX-9 *in vivo* auf das Tumorwachstum, die Angiogenese, die Kommunikation zwischen Tumor und Stroma und die Signalwege beim kolorektalen Karzinom zu ergründen, sollten transgene Zellen im Nacktmausmodell untersucht werden. Für diese grundlegenden Experimente waren zunächst geeignete *in vitro* Modelle notwendig.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Charakterisierung stabil transfizierter Zellen mit Expression von MMP-9 oder MMP-9-PEX (der sogenannten PEX-9). Zunächst sollten Doxycyclin-induzierbare Vektoren für beide Proteine kloniert werden. Diese Doxycyclin-induzierbaren Expressionsvektoren sollen in Folgearbeiten im Tierversuch (Nacktmausmodell) eingesetzt werden. Gegenstand dieser Dissertation war die prinzi-

Einleitung

pielle Verwendbarkeit der entsprechenden stabil transfizierten (Tumor)-Zellen im Tiermodell. Die eigentlichen Tierversuche werden im Rahmen einer über die Doktorarbeit hinausgehenden umfangreichen tierexperimentellen Studie charakterisiert.

Folgende Aufgabestellungen waren Grundlage dieser Arbeit:

1. Konstruktion eines geeigneten *in vitro* Modells: Etablierung kolorektaler Karzinomzelllinien, die MMP-9, PEX-9 oder einen Kontrollvektor stabil exprimieren. Dafür sollten zunächst die entsprechenden Expressionskonstrukte kloniert und stabil in humane kolorektale Karzinomzellen (SW-620) transfiziert werden.
2. Kontrolle der Expression bzw. Sekretion von MMP-9 und/oder von PEX-9 auf RNA -und Proteinebene. Hierbei sollte geklärt werden, ob das erzeugte *in vitro* Modell für weitere Analysen und die Nacktmausversuche prinzipiell verwendbar ist.
3. *In vitro* Charakterisierung der stabilen Zellen zur Identifizierung und Charakterisierung intrazellulärer Signalwege, die bei der Metastasierung eine Rolle spielen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 Geräte

Absaugflasche	Fa. Nalgene Thermo Scientific, Dreieich
Autoklav Varioklav®	Fa. HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim
Brutschrank	Fa. Memmert GmbH, Schwabach
Bunsenbrenner, Powerjet	Fa. Campingaz, Hungen
CO ₂ Inkubator IG 150	Fa. Jouan, Unterhaching
Eismaschine	Fa. Manitowoc Company, Manitowoc
Elisa Reader Fusion	Fa. Packard BioScience Co, Meriden
Fastblot B44	Fa. Biometra, Göttingen
Flow Laminin Air HB 2448	Fa. Heraeus instruments, Hanau
Freezing Container	Fa. Nalgene Thermo Scientific, Dreieich
Gefrierschrank (-20°C)	Fa. Bosch, Stuttgart
Gefrierschrank (-80°C)	Fa. Thermo Scientific, Dreieich
Gel-Elektrophorese-Kammer	Fa. Biometra, Göttingen
Gelkammer	Fa. Fischer Scientific, Schwerte
Kamera Coolpix5400	Fa. Nikon, Düsseldorf
Kühlschrank (4°C)	Fa. Bosch, Stuttgart
Magnetrührer RH B2	Fa. IKA, Staufen
Mikroskop DM IL	Fa. Leica, Wetzlar
Mikroskop Leitz DM RB	Fa. Leica, Wetzlar
Millipore-Anlage	Fa. Merck, Darmstadt
NanoDrop ND Spectrophotometer	Fa. Thermo Scientific, Dreieich
Neubauer Zählkammer	Fa. LO-Laboroptik, Friedrichsdorf
pH-Meter handylab 2BNC	Fa. Schott, Mainz
Photometer Spectronic Genesys 10 Bio	Fa. Thermo Scientific, Dreieich
Pipetten Research Plus	Fa. Eppendorf, Hamburg
Pipetten Typ Pipetus	Fa. Hirschmann, Eberstadt

Material und Methoden

QRT-PCR System Step One Plus	Fa. Applied Biosystems, Darmstadt
Rocking Platform	Fa. VWR International, Darmstadt
Schüttelinkubator SI-300R	Fa. Lab Companion, Oxford
Stickstofftank Locator 8plus	Fa. Thermo Scientific, Dreieich
Thermocycler T3000	Fa. Biometra, Göttingen
Thermo-Shaker	Fa. Universal Labortechnik, Leipzig
Tischzentrifuge Mikro200r	Fa. Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Rotanta 460R	Fa. Hettich, Tuttlingen
UV-Lampe Reprostar 3	Fa. LAMAG®, Berlin
Vortexer	Fa. VWR International, Darmstadt
Wasserbad A 100	Fa. Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifuge GS-6KR	Fa. Beckman, Krefeld

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

6-Well-Platte	Fa. Greiner, Frickenhausen
12-Well-Platte	Fa. Greiner, Frickenhausen
24-Well-Platte	Fa. Greiner, Frickenhausen
96-Well-Platte	Fa. Nunc, Thermo Scientific, Dreieich
Amersham Hyperfilm ECL	Fa. GE Healthcare, Solingen
Cellstar® Cell cultur dish	Fa. Greiner, Frickenhausen
Cellstar® T75 Teilkulturflaschen #658175	Fa. Greiner, Frickenhausen
Cellulose Acetate Sheets	Fa. Sigma-Aldrich, Hamburg
Clear-View Snap-Cap Microtube	Fa. Sigma-Aldrich, Hamburg
CL-XPoseure® Film clear blue	Fa. Thermo Scientific, Dreieich
Deckgläser rund, 12mm d	Fa. R. Langenbrinck, Emmendingen
Einwegskalpell	Fa. Father, Köln
Gel Blot Paper	Fa. VWR International, Darmstadt
Hämocytometer Deckgläser	Fa. R. Langenbrinck, Emmendingen
Injekt-F Spritzen	Fa. B Braun, Melsungen
Kanülen 21G	Fa. BD Microlance, Heidelberg
Kryoröhrchen, Cry.S	Fa. Greiner, Frickenhausen
MicroAmp Fast Reaction Tubes	Fa. Applied Biosystems, Darmstadt

Material und Methoden

MicroAmp Optical 8-Cap Strip	Fa. Applied Biosystems, Darmstadt
Objektträger	Fa. R. Langenbrinck, Emmendingen
PCR Filter Tips	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen, steril	Fa. Greiner, Frickenhausen
Pipetten, mit Spitze	Fa. Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, Biosphere Quality Tips	Fa. Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß	Fa. BD Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäß	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
RNase frei Pipettenspitzen mit Filter	Fa. Greiner, Frickenhausen
Serologische Pipetten	Fa. Greiner, Frickenhausen
Spitzenbox	Fa. Axygen Fisher Scientific, Schwerte
Transfer Membrane Immobilion®-R	Fa. Millipore, Darmstadt

2.1.3 Reagenzien und Chemikalien

2-Propanol	Fa. Sigma-Aldrich, Hamburg
6xLoading Dye	Fa. Thermo Sientific, Dreieich
Accutase® Solution, #A6964	Fa. Sigma-Aldrich, Hamburg
Aceton	Fa. Roth, Karlsruhe
Advantage® HD Polymerase Mix	Fa. Clontech, Saint-Germain-en-Laye
Agarose Broad Range	Fa. Roth, Karlsruhe
Collagen I High Concentration	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
DAPI	Fa. Sigma-Aldrich, Hamburg
dH ₂ O	Filtriert durch Millipore-Anlage
DPBS, #BE17-512F	Fa. Lonza, Basel
Einfriermedium CM-1, #800125	Fa. Cell line service, Eppelheim
Essigsäure 100%	Fa. Merck, Darmstadt
Ethanol	Apotheke der JLU Gießen
Ethidiumbromid	Fa. Roth, Karlsruhe
FBS Tet System Approved, #631106	Fa. Clontech, Saint-Germain-en-Laye
Fluorescent Mounting Medium, #S3023	Fa. Dako, Hamburg
Mass-Ruler Express reverse DNA Ladder Mix	Fa. Thermo Sientific, Dreieich

Material und Methoden

Methanol	Apotheke der JLU Gießen
Milchpulver	Fa. Roth, Karlsruhe
Page Ruler Plus, Prestained Protein Ladder, #26619	Fa. Thermo Scientific, Dreieich
Ponceau S Essigsäure	Fa. Roth, Karlsruhe
RLT-Puffer	Fa. Qiagen, Hilden
RNase freies Wasser	Fa. Qiagen, Hilden
RPMI 1640, #R8758	Fa. Sigma-Aldrich, Hamburg
Stella Competent Cells	Fa. Clontech, Saint-Germain-en-Laye
SW-620 Zellen, #300466-111	Fa. Cell line service, Eppelheim
SYBR® Green PCR Master Mix, #4309155	Fa. Applied Biosystems, Darmstadt
Trichloressigsäure	Fa. Roth, Karlsruhe
Trypan blue stain 0,4%, #15250	Fa. Gibco, Darmstadt
Xfect® Transfection Reagent	Fa. Clontech, Saint-Germain-en-Laye
β-Mercaptoethanol	Fa. Roth, Karlsruhe

Agarplatten:

Zur Agarplattenherstellung wurden 10g LB-Agar mit 250ml ddH₂O gemischt, autoklaviert und auf dem Magnetrührer auf 50°C abgekühlt. Anschließend wurden 500ml des LB-Agar-gemischs mit 500µl Ampicillin (100mg/ml) versetzt und je 25ml in eine Platte gegossen.

2.1.4 Antibiotika

Ampicillin Natriumsalz, #K029.1	Fa. Roth, Karlsruhe
Doxycyclin, #631311, 1mg/ml	Fa. Clontech, Saint-Germain-en-Laye
Geneticin Selektiv Antibiotikum (50mg/ml)	Fa. Life Tech, Gibco, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin, #DE17-602E	Fa. Lonza, Basel
Puromycin Selektiv Antibiotikum (10mg/ml)	Fa. Life Tech, Gibco, Darmstadt

2.1.5 Vektoren/Plasmide

MMP-9 cDNA, IMAGE ID: 4054882

GenBank: BC006093

Response-Vektor pLVX-TRE3G-ZsGreen1, #631353	Fa. Clontech, Hamburg
---	-----------------------

Material und Methoden

2.1.6 Kommerzielle Kits

EndoFree® Plasmid maxi Kit	Fa. Qiagen, Hilden
Humanes Phospho-Kinase Array Kit ARY003	Fa. R&D Systems, Inc., Wiesbaden
In-Fusion® HD Cloning Kit	Fa. Clontech, Saint-Germain-en-Laye
iScript cDNA Synthese Kit	Fa. Bio Rad, München
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Fa. Clontech, Saint-Germain-en-Laye
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Fa. Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Fa. Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Fa. Qiagen, Hilden
TopTaq® DNA Polymerase Kit	Fa. Qiagen, Hilden
Turbo DNA-free Kit	Fa. Ambion, Darmstadt

2.1.7 Software

Bildbearbeitung	Adobe Photoshop CS5
Bildbearbeitung	GNU Image Manipulation Programm, GIMP 2.8
Gelelektrophorese	Infinity Capture
Gelelektrophorese	Phytec Vision 2.2
qPCR-Programm	StepOne Software Version 2.2.2
Quantifizierung des Proteom Profilers	BioDocAnalyze® Software von Biometra®
Sequenzierungskontrolle	Finch TV 1.4.0 (© 2004-2006) Geospiza Inc., VCBI/BLAST

2.2 METHODEN

2.2.1 Plasmide

Die Klonierung diente dazu, bestimmte DNA-Moleküle in Wirtszellen zu vermehren, was zu einer Überexpression dieser Gene in den Zellen führte. Für diese Arbeit wurden Plasmide, die die humane MMP-9 bzw. die Hämpexindomäne der humanen MMP-9 (PEX-9) enthalten, erstellt und diese dann stabil in SW-620 kolorektalen Karzinomzellen überexprimiert.

Für die Klonierung musste zu Beginn ein geeigneter Vektor gewählt und durch Restriktionsenzyme linearisiert werden. Auch die Inserts wurden vorab amplifiziert, präpariert und aufgereinigt. Anschließend wurden der Vektor und das Insert ligiert und in kompetente Zellen transformiert. Die Kompetenz einer Zelle beschreibt deren Fähigkeit, DNA aufzunehmen und zu vermehren.

2.2.1.1 Expressionskonstrukte

Das Expressionskonstrukt des Plasmids **pLVX-TRE3G-ZsGreen1-hMMP-9 (MMP-9)** enthielt den vollständigen offenen Leserahmen hMMP-9/MMP-9 von 2127 Nukleotide der MMP-9 cDNA und kodierte für 707 Aminosäuren. Das Insert MMP-9 wurde mit den Oligonukleotiden hMMP-9 ORF C3F und hMMP-9 ORF C3R vom Plasmid *pLVX-TRE3G-hMMP-9* amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde mittels In-Fusion Enzym in den lentiviralen Response-Vektor pLVX-TRE3G-ZsGreen1 eingefügt.

Das Expressionskonstrukt des Plasmids **pLVX-TRE3G-ZsGreen1-hMMP-9-PEX (PEX-9)** enthielt den kompletten offenen Leserahmen hMMP-9/MMP-9 von 672 (3-65 und 1521-2129) Nukleotide der MMP-9 cDNA und kodierte für 222 Aminosäuren. Das Insert PEX-9 wurde mittels der Oligonukleotide hMMP-9 ORF C3F und hMMP-9 ORF C3R vom Plasmid *pLVX-TRE3G-hMMP-9-PEX* amplifiziert und das 705bp große PCR-Fragment mit Hilfe des In-Fusion Enzyms in den genannten Vektor eingefügt. Das Fragment wurde durch Fusion der 95bp großen Sekretionsdomäne und der 650bp langen Hämpexindomäne erzeugt.

Der Vektor exprimierte Doxycyclin-abhängig ZsGreen1 und humanes MMP-9 bzw. PEX-9 in Zellen mit Tet-On 3G Transaktivator-Protein und wurde mittels der Restriktionsenzyme MluI und EcoRI linearisiert.

Material und Methoden

Expressionskonstrukte	pLVX-TRE3G-ZsGreen1-hMMP9-PEX	pLVX-TRE3G-ZsGreen1-hMMP9
Nukleotide	672 (3-65 und 1521-2129)	2127 (3-2129)
Aminosäuren	222 (AS 1-20 und 506-707)	707 (AS 1-707)
PCR-Fragment	705bp	2160bp
Primer	hMMP-9 ORF C3F (5'-g ccc ccg <u>gga cgc gt cc acc atg agc ctc tgg cag ccc c</u>) hMMP-9 ORF C3R (5'- c tac ccg gta <u>gaa ttc cta gtc ctc agg gca ctg cag gat</u>)	hMMP-9 ORF C3F (5'-g ccc ccg <u>gga cgc gt cc acc atg agc ctc tgg cag ccc c</u>) hMMP-9 ORF C3R (5'- c tac ccg gta <u>gaa ttc cta gtc ctc agg gca ctg cag gat</u>)
Restriktionsenzyme	Mlul EcoRI	Mlul EcoRI
Expressionskonstrukte	pLVX-TRE3G-hMMP9-PEX	pLVX-TRE3G-hMMP9
PCR-Fragment	704bp	2159bp
Primer	hMMP-9 ORF C1F (5't ctt ata ctt <u>gga tcc acc atg agc ctc tgg cag ccc ctg</u>) hMMP-9 ORF C1R (5't tcc cat atg <u>acg cgt cta gtc ctc agg gca ctg cag gat</u>) hMMP-9 ORF C2R (5'-g act caa agg cac agt <u>ggc agc aaa gca gca gcc cag cac</u>) hMMP-9 ORF C2F (5'-c tgc tgc ttt gct gcc <u>act gtg cct ttg agt ccg gtg gac</u>)	hMMP-9 ORF C1F (5't ctt ata ctt <u>gga tcc acc atg agc ctc tgg cag ccc ctg</u>) hMMP-9 ORF C1R (5't tcc cat atg <u>acg cgt cta gtc ctc agg gca ctg cag gat</u>)
Restriktionsenzyme	BamHI Mlul	BamHI Mlul

Tabelle 5: Expressionskonstrukte

2.2.1.2 Vektoren

Die Gene, die durch Wirtszellen überexprimiert werden sollten, wurden durch die Vektoren in die Wirtszellen eingeschleust. Die Vektoren besaßen verschiedene Sequenzen, wie beispielsweise einen Replikationsstart, eine Antibiotika-Resistenz oder eine Klonierungsstelle, an der die Insert-DNA in das Plasmid eingebracht werden konnte.

pLVX-TRE3G

Der Vektor pLVX-TRE3G war 7810bp groß und verfügte über Resistenzgen-Sequenzen, zum einen eine gegen Ampicillin, die bei der Transformation benötigt wurde und zum anderen eine gegen Puromycin, die für die stabile Transfektion notwendig war. Des Weiteren war eine Multiple Cloning Site (MCS) vorhanden, eine Region, in der die Restriktionsenzyme schneiden, um das Insert integrieren zu können. Zudem enthielt der Vektor einen Promotor, eine Nukleotid-Sequenz, die die Genexpression reguliert. Genauso wichtig war die sogenannte ori-Region, eine Sequenz, an der die Replikation begonnen wird.

pLVX-TRE3G-ZsGreen1

Der Vektor pLVX-TRE3G-ZsGreen1 besaß zusätzlich zu den zuvor bei dem pLVX-TRE3G-Vektor beschriebenen Regionen noch eine IRES-Sequenz und eine Abfolge für ZsGreen1. Somit ermöglichte dieser Vektor die simultane Expression des gesuchten Proteins und ZsGreen1. Hierbei handelte es sich um eine optimierte Variante des grün fluoreszierenden Proteins der Krustenanemone *Zoanthus species*. Dieses Protein wurde dazu verwendet, die Transfektionseffizienz durch die Fluoreszenz zu überprüfen. Durch die Internal Ribosome Entry Site (IRES), die zwischen der MCS und ZsGreen1 lag, wurde ZsGreen1 unabhängig von dem gesuchten Protein exprimiert und so ein möglicher Einfluss von ZsGreen1 auf das gesuchte Protein verhindert.

2.2.2 Gentechnische Methoden

2.2.2.1 RT-PCR

Bei der Real time Polymerasen-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde zunächst die RNA in DNA umgeschrieben und anschließend eine definierte DNA-Sequenz spezifisch vermehrt.

Die RT-PCR diente der Amplifikation der zu untersuchenden Gene, weshalb jeweils eine präparative PCR angesetzt wurde. Das Insert für das PEX-9-Konstrukt musste aus zwei Untereinheiten konstruiert werden, die jeweils erst einzeln amplifiziert und dann ligiert wurden. Für die Vermehrung der MMP-9-Sequenz und der PEX-Domäne wurde ein 50µl Ansatz vorbereitet, für die Sekretionsdomäne der PEX-Domäne wurde das Doppelte eingesetzt.

50µl-Ansatz:

5xPuffer	10µl
dNTP	1µl
Primer F	1µl
Primer R	1µl
HD Polymerase	0,5µl
Template (5ng)	1µl
dH ₂ O	35,5µl

Material und Methoden

<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklen</i>
94°C	2min	1
94°C	30sek	30
63°C	5sek	30
72°C	3min	30
72°C	10min	1
4°C	Pause	1

Tabelle 6: PCR-Programm MMP-9

Die Annealing-Temperatur von 72°C variierte je nach Länge des Inserts und veränderte so das PCR-Programm bei der PEX-Domäne zu 72°C für 1min und bei der Sekretionsdomäne zu 72°C für 20sek. Außerdem wurde die Zykluszahl sowohl bei der PEX-Domäne als auch bei der Sekretionsdomäne auf 35 Zyklen erhöht. Die jeweils eingesetzten Primer sind dem Kapitel Expressionskonstrukte (Kapitel 2.2.1.1) zu entnehmen. Für die Ligations-PCR wurde der 50µl-Ansatz wie bereits beschrieben pipettiert, mit veränderten Template-Mengen; 5,8µl von der PEX-Domäne und 0,92µl von der Sekretionsdomäne. Mit dH₂O wurde das Reaktionsgefäß jeweils auf 50µl aufgefüllt.

Das Laufprogramm der Ligations-PCR war ebenfalls abweichend von der präparativen PCR, da zwei Schritte zum Erhalt des Endprodukts notwendig waren. Der erste Schritt der Ligations-PCR diente dem Aneinanderlagern der zwei Insert-Fragmente (PEX-Domäne und Sekretionsdomäne). Im zweiten PCR-Schritt wurde das vereinte Fragment nach Zugabe der Primer amplifiziert.

Temperatur	Zeit	Zyklen		Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	2min	1	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">Primer</div> 	94°C	2min	1
94°C	30sek	15		94°C	30sek	15
63°C	15sek	15		63°C	5sek	15
72°C	1min	15		72°C	1,5min	15
72°C	5min	1		72°C	5min	1
4°C	Pause	1		4°C	Pause	1

Tabelle 7: Ligations-PCR

2.2.2.2 Isolierung der Plasmid-DNA

2.2.2.2.1 Minipräparation

Für die Isolierung im kleinen Maßstab wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit verwendet. Die im Folgenden aufgeführten Reagenzien wurden, wenn nicht anders vermerkt, diesem Kit entnommen. Zur Vorbereitung wurden die Bakterienkulturen im Schüttelinkubator bei 37°C über Nacht inkubiert. 2ml dieser Bakterienkultur wurden durch die Zentrifugation bei 6800g für 3min bei Raumtemperatur (RT) in einem Reaktionsgefäß pelletiert. Das Pellet wurde in 250µl Puffer P1 resuspendiert, dann mit 250µl Puffer P2 aufgefüllt und alles vier bis sechs Mal geschwenkt. 350µl des Puffer N3 wurden im Anschluss hinzugefügt und das Schwenken wiederholt. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 17900g und RT. Die Überstände wurden daraufhin in eine QIAprep Spin Column überführt, für 60sek bei 17900g und RT zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nun wurde zum Waschen 500µl des Puffer PB auf die Säule geben und der vorherige Zentrifugationsschritt wiederholt. Im Folgenden wurden 750µl Puffer PE auf die Säule pipettiert und die Zentrifugation zuerst wie oben durchgeführt, dann bei 1500rpm für 1min wiederholt. Hiernach wurde die QIAprep Spin Column auf

ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß gesteckt und 50µl Puffer EB (10mM Tris-Cl) auf die Säule pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1min bei RT wurde zum Eluieren 1min bei RT und 17900g zentrifugiert.

2.2.2.2.2 Maxipräparation

Zur Vorbereitung für die Aufreinigung mit dem Endo Free Plasmid Maxi Kit wurden 100ml LB-Medium plus Ampicillin mit 200µl der Starterkultur in einen 500ml Erlenmeyerkolben überführt und für 16h bei 37°C und 200rpm inkubiert. 50ml dieser Verdünnung wurden bei 3600rpm für 15min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10ml Puffer P1 resuspendiert. Dann wurden 10ml Puffer P2 hinzugefügt, vier bis sechs Mal geschwenkt und bei Raumtemperatur für 5min inkubiert. Die Zelllösung wurde mit 10ml vorgekühltem Puffer P3 ergänzt und erneut vier bis sechs Mal geschwenkt. Das gesamte Lysat wurde nun in einen vorbereiteten QIAfilter Cartridge geschüttet und bei RT für 10min inkubiert. Durch Druck, der mittels eines Stempels ausgeübt wurde, wurde das Lysat in ein frisches 50ml Reaktionsgefäß filtriert. Dann wurden 2,5ml Puffer ER dazugeben und nach 10-maligem Schwenken auf Eis für 30min inkubiert. Nachdem das QIAGEN-tip 500 mit 10ml Puffer QBT equilibriert wurde, wurde das filtrierte Lysat in QIAGEN-tip umgeschüttet, sodass es durch die Schwerkraft getrieben hindurchfloss. Mit derselben Methode wurde das QIAGEN-tip zweimal mit 30ml Puffer QC gewaschen. Auch die DNA wurden nach dem Schwerkraftprinzip mit 15ml Puffer QN eluiert. Um die folgende Präzipitation durchzuführen wurde die Probe mit 10,5ml Isopropanol gemischt und in einem 50ml Reaktionsgefäß für 30min bei 4°C 15000g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Stabpipette abgenommen und das DNA-Pellet mit 5ml Endotoxin free 70% Ethanol gewaschen, bei 15000g und 4°C für 10min zentrifugiert und der Überstand wie zuvor abgenommen. Zum Trocknen wurden die Reaktionsgefäße mit offenem Deckel bei 37°C für 5-10min auf den Thermoblock gestellt. Als Letztes wurde die DNA-Probe in 200µl Endotoxin free Puffer TE gelöst.

2.2.2.2.3 DNA-Aufreinigung aus dem Agarosegel oder der PCR

Die Aufreinigung fand mittels des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits statt. Es wurden 200µl Puffer NTI pro 100mg Agarosegel hinzugefügt und circa 10min bei 50°C inkubiert bis

Material und Methoden

das Gel gelöst war. 700µl der Probe wurden dann auf eine Clean-up-Säule geladen und während 30sek bei 11.000g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang solange wiederholt, bis die gesamte Probe geladen war. Zum Waschen wurden 700µl Puffer NT3 auf die Säule überführt und die Proben für 30sek bei RT und 11.000g zentrifugiert. Nach der Wiederholung des Waschschrtes wurde die Säule zum Trocknen der Membran nochmals erst für 1min, nach Entfernung des Durchflusses dann für 30sek bei 11.000g zentrifugiert. Zum Eluieren der DNA wurden 22µl Puffer NE zentral auf die Säule pipettiert, 1min bei RT inkubiert und abschließend 1min bei RT und 11.000g zentrifugiert. Bei zu Beginn mehrerer Banden im Agarosegel wurden diese zusammengehörigen Proben an diesem Schritt wieder zusammengeführt. Für die PCR-Aufreinigung wurden die Proben mit dem zweifachen Volumen des Puffers NTI gemischt. Die weiteren Schritte waren denen der Gel-Aufreinigung identisch.

2.2.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

2.2.2.3.1 NanoDrop

Um die Reinheit der DNA und die jeweilige Konzentration zu bestimmen, wurden je 2µl der DNA auf das NanoDrop Spectrophotometer aufgetragen und bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen. Der Quotient aus A260 und A280 beschreibt die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen (Gallagher, 2007).

Der DNA-Gehalt wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Absorption bei 260nm} \times V \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 40 \text{ (Multiplikationsfaktor)} = K_{\text{DNA}}$$

2.2.2.3.2 Photometer

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und deren Reinheit erfolgten nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bei einer Absorption von 260nm. Die Messung erfolgte gegen einen Leerwert: destilliertes Milliporewasser. Eine Absorption (A₂₆₀) von 1 entsprach dabei einer Konzentration von 50µg/ml für doppelsträngige DNA. Zur Berechnung der Nukleinsäure-Konzentration wurde folgende Formel verwendet:

$$c A_{260} V f F = K$$

c: Konzentration der Nukleinsäure-Lösung ($\mu\text{g/ml}$)

A_{260} : Absorption bei 260nm

Vf: Verdünnungsfaktor

F: Konzentrationsfaktor ($F = 50\mu\text{g/ml}$ für dsDNA)

2.2.2.4 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA an spezifischen Positionen schneiden können. Bei den Schnittstellen handelt es sich um Palindrome.

Die Restriktionsendonukleasen wurden zur Isolierung der gesuchten Genfragmente und zur Bestimmung ihrer Größe verwendet. Der jeweilige Reaktionsansatz wurde unter Verwendung der entsprechenden Puffer für 1h bei 37°C auf dem Thermoblock inkubiert.

50 μl -Ansatz

10xPuffer	5 μl
Restriktionsenzyme (10U/ μl)	1,25 μl
DNA	10 μg
dH ₂ O	ad 50 μl

10 μl -Ansatz

10xPuffer	2 μl
Restriktionsenzyme	0,2 μl
DNA	0,5 μg
dH ₂ O	ad 10 μl

Restriktionsenzym	Puffer
EcoRI	Puffer EcoRI
MluI	Puffer R
BamHI	Puffer BamHI
XhoI	Puffer Tango

Tabelle 8: Restriktionsenzyme

2.2.2.5 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode zur Auftrennung von DNA-Sequenzen nach ihrer Größe. Die Fragmente können anhand des Vergleichs mit einem Marker einer DNA-Sequenzgröße zugeordnet werden. Die Nukleotide sind aufgrund ihrer Phosphatgruppe negativ geladen und wandern so zur Anode. Die Agarose unterstützt durch ihre netzartige Struktur die Auftrennung der Nukleinsäuren.

Diese Methode wurde zur Kontrolle von Plasmidpräparationen und Restriktionen sowie zu Präparationen der DNA-Fragmente eingesetzt. Es wurde einprozentige Agarose mit 1xTAE-Puffer gemischt, aufgekocht und mit Ethidiumbromid versehen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80V für 30min mit 1xTAE als Laufpuffer. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht analysiert. Dazu wurden Proben zuvor mit 6xLoading Dye versehen.

2.2.2.6 DNA Elution aus dem Agarosegel

Für die Gelextraktion und die damit verbundene Aufreinigung des PCR-Produkts des Inserts MMP-9 und der Vektoren wurden die Proben mit 6xLoading Dye auf ein frisches einprozentiges Agarosegel in vier Taschen und einmal 5µl des DNA Ladder Mix aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer elektrischen Spannung von 60V für 30min durchgeführt, die Banden durch eine UV-Lampe bei der Wellenlänge von 366nm sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten.

2.2.2.7 Transformation

Für die Transformation wurde die rekombinante DNA in Bakterien eingebracht, welche die Plasmide vermehrten. Dazu wurden kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und 1µl (5ng) der Plasmid-DNA mit 50µl dieser Zellen gut gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Nach einem 60-sekündigen Hitzeschock bei 42°C folgte eine weitere Inkubation für 1-2min auf Eis. Das Reaktionsgefäß wurde mit 37°C warmem SOC-Medium auf 500µl aufgefüllt und 1h bei 37°C und 220rpm inkubiert. 5µl des Ansatzes wurden mit LB-Medium auf 100µl angereichert, auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde zum Erstellen einer Starterkultur ein Klon der Platte gepickt, anschließend 5ml LB-Medium plus Ampicillin (Endkonzentration: 100µg/ml) damit beimpft. Diese Kultur wurde 8h bei 200rpm und 37°C inkubiert. Danach folgte die DNA-Isolation (Kapitel 2.2.2.2).

2.2.2.8 Ligation

Um die aufgereinigten Inserts in den Vektor einzubringen, wurde das In-Fusion® HD Cloning Kit verwendet.

5xIn-Fusion® HD Enzym Premix	2µl
Linearisierter Vektor	0,4µl
Aufgereinigtes PCR-Fragment	2µl in dH ₂ O
dH ₂ O	ad 10µl

Es wurden 50ng des MMP-9-Fragments und 25ng des PEX-9-Fragments eingesetzt. Vom Vektor pLVX-TRE3G-ZsGreen1 wurden ebenfalls 50ng verwendet, vom Vektor pLVX-TRE3G 500ng in 0,5µl. Das Reaktionsgemisch wurde für 15min bei 50°C inkubiert und danach auf Eis gestellt.

2.2.2.9 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde ein 250ng/µl Ansatz aus DNA-Probe und TE Puffer im Verhältnis 1:4 erstellt. Die Sequenzierung wurde durch das Unternehmen SeqLab (Göttingen) durchgeführt und die Sequenzen mittels der Software Finch TV 1.4.0 (© 2004-2006) überprüft. Jedes Insert und alle erstellten Plasmide wurden vollständig sequenziert.

TE Puffer:

10mM Tris auf pH 8 mit HCl

1mM EDTA

2.2.3 Stabile Transfektion

Unter einer stabilen Transfektion versteht man den dauerhaften Einbau der DNA von MMP-9 und PEX-9 in das Genom der SW-620 Zellen. Das Verfahren wurde mit Hilfe des Xfect® Transfection Reagents durchgeführt.

2.2.3.1 Transfektionsreaktion

Es wurden 400.000 Zellen/Well in eine 6-Well-Platte in 2ml Medium (RPMI 1640 + 10% FBS + 1% Pen/Strep) ausgelegt. Nach 24h wurden folgende Ansätze hergestellt:

0,75µg Transaktivator + 3µg (Vektor)

0,75µg Transaktivator + 3µg (PEX-9)

0,75µg Transaktivator + 3µg (MMP-9)

Es wurden 0,75µl des Transaktivator-Plasmids (pLVX-EF1a-Tet3G, Clontech) und je 3µl der Expressions-Plasmids mit 96,25µl Reaktionspuffer (jede Probe auf 100µl mit dem Reaktionspuffer aufgefüllt) vermischt und für 5sek gevortext. Hinzu kamen 1,125µl des Xfect Polymers. Die Zelllösung wurde per Vortexer für 10sek gründlich gemischt. Danach wurden die Proben 10min bei RT inkubiert und abzentrifugiert. Die 100µl wurden in ein Well einer 6-Well-Platte mit SW-620 Zellen überführt und die Platte gut geschwenkt. Diese wurde dann für 4h im Brutschrank bei 37°C inkubiert und danach das Medium gewechselt, um die Transfektionsreagenzien und tote Zellen zu entfernen. Es wurden 2ml frisches Medium pro Well der 6-Well-Platte auf die Zellen gegeben.

2.2.3.2 Antibiotikabehandlung

Zur Selektion der stabil transfizierten Zellen diente die Behandlung mit Selektivantibiotika. Für die Antibiotikabehandlung wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen und danach 2ml Medium in jedes Well pipettiert.

RPMI 1640 + 10% FBS
+ 1% Pen/Strep
+ 800µg/ml G418
+ 5µg/ml Puromycin

Die Konzentrationen der Antibiotika wurden zuvor durch Titration ermittelt.

2.2.4 Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturversuche wurden an einem Laminar-Flow-Arbeitsplatz durchgeführt. Dessen spezielle Belüftung verhinderte die Kontaminationen der Zellen, sodass er einen Reinraum-arbeitsplatz darstellte.

2.2.4.1 Zelllinie

SW-620

Organismus	Homo sapiens
Alter und Ethnie	51-jähriger Kaukasier
Geschlecht	Männlich
Gewebe, Morphologie	Kolon, epithelial
Zelltyp	Kolorektales Adenokarziom, Dukes` Typ C
Beschreibung	Isolation aus einer Lymphknotenmetastase

Tabelle 9: Charakterisierung der Zelllinie

2.2.4.2 Zellen auftauen und auslegen

Zur Versuchsdurchführung wurden die Zellen bei 37°C aufgetaut und 1:10 mit dem Kulturmedium resuspendiert. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation für 5min mit 1000rpm bei RT. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 15ml Medium RPMI 1640, 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) versehen. Die Zellsuspension wurde in eine T75 Zellkulturflasche ausgelegt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.4.3 Zellzählung

Die Zellzählung diente dazu, jeweils die gleiche Menge an Zellen oder eine vorbestimmte Menge an Zellen in verschiedenen Zellkulturflaschen auszulegen. Mittels der Färbung mit 0,4% Trypanblau wurden Informationen über die Vitalität der Zellen erlangt und somit beschränkte sich die Zählung auf die vitalen Zellen. Die Zählkammer war in vier Quadranten unterteilt. Ein Aliquot der Zellsuspension (10 μ l) wurde mit der Färbelösung im Verhältnis 1:2 gemischt. 11 μ l des Zellgemisches wurden an den Übergang zwischen Deckglas und Zählkammer pipettiert und durch Kapillarkräfte in die Kammer gesogen. Die Zellen wurden unter einem Inversmikroskop mittels eines 10er-Objektivs (100fache absolute Vergrößerung) gezählt, wobei mäanderförmig vorgegangen wurde. Zellen, die die untere oder rechte Grenzlinie eines Quadranten berührten, wurden mitgezählt.

Die Gesamtzahl der Zellen errechnete sich wie folgt:

$$Z \times F \times V \times 10^4 = \text{Gesamtzellzahl}$$

Z: Mittelwert der Zellen aus vier Quadranten

F: Verdünnungsfaktor mit Trypanblau

V: Gesamtvolumen der Zellsuspension

10⁴: Kammerfaktor der Neubauer-Zählkammer; Quadrantenfläche: 1mm², Kammertiefe 0,1mm ergibt 0,1 μ l

2.2.4.4 Subkultur und Einfrieren

Bei einer Konfluenz von circa 80% wurden die Zellen zweimal pro Woche gesplittet. Das alte Medium wurde aus der Zellkulturflasche abgesaugt und der Zellrasen mit 6ml 1xPBS gewaschen. Als nächstes wurden die Zellen mit 3ml Accutase® bedeckt und 5min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die gelösten Zellen wurden in frischem Medium in einer neuen Zellkulturflasche ausgelegt.

Zum Einfrieren der Zellen wurde diese anstatt mit frischem Kulturmedium mit 1ml Einfriermedium resuspendiert und in einem Kryoröhrchen, das in eine Einfrierbox mit Isopropanol gestellt wurde, bei -80°C gelagert. Nach 24h wurde das Kryoröhrchen in den Stickstofftank zur längerfristigen Aufbewahrung überführt.

2.2.4.5 Kollagen-Beschichtung der Deckgläser

Die Zellen wurden auf einem runden Deckglas mit 12mm Durchmesser herangezogen, um sie dann auf einem Objektträger unter dem Mikroskop darstellen zu können. Damit die Zellen besser auf den Deckgläsern haften, wurden diese zunächst mit Kollagen beschichtet.

Zuerst wurde 0,1%ige Essigsäure aus 50µl 100% Essigsäure und 50ml H₂O hergestellt und diese dann steril filtriert. Danach wurde die 1% Kollagenlösung mit 0,1%iger Essigsäure im Verhältnis 1:100 gemischt und 200µl des Kollagenlösung-Gemischs auf jedes Deckglas in einer 24-Well-Platte überführt. Hierzu wurde das dreifache Volumen an 1xPBS (600µl) hinzugefügt, 5-10min bei RT inkubiert und wieder abgenommen. Abschließend wurden die Deckgläser nochmals mit 1xPBS gewaschen.

2.2.5 Zytologische Methoden

2.2.5.1 DAPI-Färbung

Die DAPI-Färbung diente dazu, spezielle Zellbestandteile nachzuweisen (Kapusinski, 1995). Es wurden 40.000 Zellen in einer 24-Well-Platte in 500µl Medium ausgesät. Die Deckgläser wurden in 70% Ethanol getaucht, mit dem Bunsenbrenner abgeflammt und in das jeweilige Well gelegt. Nun folgte eine Inkubationsdauer von zwei Tagen im CO₂ Inkubator bei 37°C und 5% CO₂. Zur Fixierung wurde nach Absaugung des Mediums 500µl -20°C kaltes Methanol in jedes Well transferiert und für 10min bei -20°C inkubiert. Darauf folgte ein dreimaliger Waschvorgang mit 1xPBS (500µl) und die Deckgläser wurden mittels einer Pinzette in eine 12-Well-Platte überführt. Abermals wurde mit 1ml 1xPBS pro Well gewaschen. Als Letztes wurden 30µl im Verhältnis 1:10000 in PBS verdünntes DAPI direkt auf die Zellen pipettiert und für 3min belassen. Darauf folgte nach einem erneuten Waschschrift mit PBS die Einbettung mit Dako Fluorescent Mounting Medium. Die Objektträger wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und mit der Kamera fotografiert. Zuletzt wurden die Bilder mit der Photoshop-Software bearbeitet und zugeschnitten.

2.2.6 Proteinchemische Methoden

2.2.6.1 Zellvorbereitung

400.000 Zellen wurden pro einer 6-Well-Platte ausgelegt und für 2 Tage in Doxycyclin-haltigem Medium (100ng/ml) oder ohne Doxycyclin-Induktion in Kultur gehalten. Der Mediumüberstand wurde in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt, 5min bei RT und 2000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2ml Reaktionsgefäß pipettiert, dieses in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Auf den Zellrasen wurde 300µl 1xLämmli-Puffer pro Well pipettiert, die Wells gründlich ausgekratzt und die Zellen im Lämmli-Puffer in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden darin für 10min bei 90°C gekocht.

2.2.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Amidoschwarz

Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Amidoschwarz wurde zur Quantifizierung von Proteinen in Lämmli-Puffer durchgeführt. Der saure Farbstoff band an die Aminogruppe der Proteine und färbte sie somit. Im basischen Auflöser wurde die Bindung gelöst, woraufhin die Proteinkonzentration photometrisch gemessen werden konnte. Zu Beginn wurde ein Standard durch Lösen von 50mg/ml BSA in 1xLämmli-Puffer (50µg/µl) und 1:2 Verdünnung bis zu einem Wert von 0,78µg/µl hergestellt. Es wurden pro Probe und Standard 1µl auf ein Stück Celluloseacetat-Folie getropft, diese getrocknet und dann die Folie 10min in der Amidoschwarz-Lösung gefärbt. Anschließend wurde die Folie mehrmals mit der Entfärbelösung gewaschen bis der Hintergrund weiß erschien. Die Protein-Punkte wurden nach erneutem Trocknen der Folie mit einem Skalpell ausgeschnitten und in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 400µl Auflöser wurde das Reaktionsgefäß gevortext bis der Folienteil komplett aufgelöst war. Je Probe und Standard wurden zweimal 100µl (Doppelbestimmung) in eine 96-Well-Platte pipettiert und im Elisa Reader gegen den Blank bei 630nm gemessen (Schaffner und Weissmann, 1973). Die verwendeten Lösungen sind nachstehend genauer beschrieben.

Stammlösung

0,25% Amidoschwarz-Pulver: 125mg
45% MeOH: 22,5ml
0,5ml 100% TCA
10% Eisessig: 5ml

Cellulose-Acetat-Auflöser

40ml Ameisensäure/Methansäure
5ml Eisessig
45% Aqua dest.: 22,5ml

Amidoschwarz-Entfärbelösung

Dieselbe Lösung wie oben, jedoch ohne Farbstoff

2.2.6.3 Proteinfällung

Die Fällungsmethode der TCA Protein Präzipitation wurde zur selektiven Anreicherung und Konzentrierung von Proteinen genutzt.

Zu dem Probenvolumen wurde ein Viertel des Volumens an TCA pipettiert (1,5ml Überstand und 375µl TCA). Das Gemisch wurde auf einem Vortexer gemischt und auf Eis bei 4°C für 10min inkubiert. Als nächstes erfolgte die Zentrifugation bei 14000rpm und 4°C für 5min. Der Überstand wurde abgenommen, ohne das Proteinpellet zu beschädigen. 1ml eines bei -20°C vorgekühlten Acetons wurde zum Waschen zu dem Pellet hinzugefügt und der Zentrifugationsprozess wiederholt. Es wurde insgesamt zweimal mit Aceton gewaschen und das Proteinpellet bei geöffnetem Reaktionsgefäß bei 95°C für 5min im Thermo-Shaker getrocknet. Das Proteinpellet wurde danach in 75µl 1xLämmli-Puffer aufgenommen und bei 90°C im Thermo-Shaker zum Denaturieren aufgeköcht.

2.2.6.4 Western-Blot

2.2.6.4.1 Proteinauftrennung

Der erste Schritt des Western-Blots beinhaltete die Auftrennung des Proteingemischs nach Proteingröße und Ladung mittels einer Gel-Elektrophorese. Hierzu wurde zunächst ein Trenngel (unten beschrieben) hergestellt, dieses mit Ethanol begradigt und das Sammelgel direkt auf das Trenngel gegossen. In das Sammelgel wurde ein aus 15 Taschen bestehender Kamm eingeführt. Jede Tasche wurde mit 15µl Probengemisch - 20µg Protein - beladen. Zusätzlich wurden 5µl des Page Rulers Plus als Größenmarker aufgetragen. Für die Gel-Elektrophorese wurde eine Spannung von 130V angelegt, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Material und Methoden

Trenngel 8% SDS-Gel

2,65ml Gel 30
2,5ml 4xResolving Puffer
Ad 10ml H₂O
100µl APS 10%
10µl TEMED

Trenngel 10% SDS-Gel

3,33ml Gel 30
2,5ml 4xResolv. Puffer
Ad 10ml H₂O
100µl APS 10%
10µl TEMED

Trenngel 12% SDS-Gel

4ml Gel 30
2,5ml 4xResolv. Puffer
Ad 10ml H₂O
100µl APS 10%
10µl TEMED

Sammelgel

0,33ml Gel 30
0,83ml 4xStacking Puffer
2,13ml H₂O
40µl APS 10%
4µl TEMED

10xElektrophoresePuffer

10g SDS
30g Tris
144g Glycin
ad 1000ml Aqua dest.

2.2.6.4.2 Proteintransfer

Bei einem Strom der Stärke 72mA pro Gel, der senkrecht zum Polyacrylamidgel verlief, wurde geblottet, d.h. die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden auf eine PDVF-Membran transferiert. Die Proteine wanderten in Richtung der Anode, wobei sie auf der Membran haften blieben. Hierzu wurden zwei Filterpapiere in der Anodenlösung 1 gewässert. Darüber wurde ein Filterpapier gelegt, das in Anodenlösung 2 getränkt war. Darauf wurde die Nitrozellulosemembran gelegt, die zuvor in Methanol aktiviert wurde, danach das Gel und zuoberst drei in Kathodenlösung eingeweichte Filterpapiere. Es wurde darauf geachtet, dass alle Luftblasen aus den Zwischenräumen entfernt waren. Im Folgenden sind die verwendeten Puffer aufgelistet.

Anodenlösung 1

75ml 2M Tris base
100ml Methanol 20%
pH 10,4

Anodenlösung 2

6,25ml 2M Tris base
100ml Methanol 20%
pH 10,4

Kathodenlösung

2,6g Aminocaproic acid
100ml Methanol 20%
250µl SDS 20%
pH 7,6

2.2.6.4.3 Proteinnachweis

Um den Erfolg des Proteintransfers zu überprüfen, wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau S in 5%iger Essigsäure eingefärbt. Die Membran wurde 5min in TBS-T gewaschen, bevor die unspezifischen Bindungsstellen mit 5%iger Milchpulver in TBS-T für eine Stunde geblockt wurden. Daraufhin folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper in 10ml Milch-TBS-T. Die Inkubation erfolgte über Nacht. Am darauffolgenden Morgen wurde die Membran dreimal je 10min mit TBS-T gewaschen und mit dem Sekundärantikörper im Verhältnis 1:3000 in 10ml Milch-TBS-T für 1h bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift à dreimal 10min mit TBS-T wurde die Membran mit ECL entwickelt. Die verwendeten Röntgenfilme waren vom Typ Amersham Hyperfilm. Als beste Expositionszeit der Membranen auf dem Röntgenfilm ergab sich für MMP-9 1sek, für MMP-9-PEX 1min, für eNOS 10min, für AKT 30sek und für P-AKT 1h.

ECL Substrat-Rezept:

100mM Tris-HCl pH 8,5	10ml
35% H ₂ O ₂	2,6µl
90mM Coumaric in DMSO	25µl
250mM Lumino1 in DMSO	50µl

TBS-T

20mM Tris pH 7,5
137mM NCL
0,1% Tween 20

<u>Erstantikörper</u>	Ursprung	Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller
hMMP-9	Goat	Polyclonal IgG AF911	1:1000	R&D Systems
Phospho-eNOS	Rabbit	Ser1177 #95721	1:1000	Cell Signaling
eNOS	Mouse	6H2 #5880	1:1000	Cell Signaling
Phospho-Akt	Rabbit	Ser473 #4060	1:2000	Cell Signaling
Akt	Rabbit	Pan C67E7 # 4691	1:1000	Cell Signaling
α -Tubulin	Mouse	B-7 Sc-5286	1:1000	Santa Cruz
<u>Zweitantikörper</u>	Ursprung	Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller
Anti-goat	Donkey	IgG HRP-linked Sc-2020	1:3000	Santa Cruz
Anti-rabbit	Goat	IgG HRP-linked Sc-2054	1:3000	Santa Cruz
Anti-mouse	Goat	IgG HRP-linked Sc-2031	1:3000	Santa Cruz

Tabelle 10: Antikörper-Auflistung

2.2.7 Phospho-Kinase Array

Der humane Phospho-Kinase Array ist ein sensitives Hilfsmittel, um die Phosphorylierungszustände von 46 Kinase-Phosphorylierungsstellen zu detektieren.

2.2.7.1 Zellvorbereitung

Circa 400.000 Zellen wurden je einer 6-Well-Platte ausgelegt und für zwei Tage in Doxycyclin-haltigem Medium (100ng/ml) oder ohne Doxycyclin-Induktion inkubiert. Das Medium wurde abgenommen, der Zellrasen mit 1ml Lyse Puffer 6 bedeckt, die Zellen abgeschabt, mit einer Pipette resuspendiert und bei 6°C für 30min geschwenkt. Dann wurde bei RT und 4000rpm 5min zentrifugiert und die Proteinbestimmung mittels Amidoschwarz (Kapitel 2.2.6.2) durchgeführt.

Zellen MMP-9 -Dox: 201,2 μ l + 132,8 μ l Lyse Puffer 6 = 334 μ l Zellysat

Zellen MMP-9 +Dox: 271,8 μ l + 62,2 μ l Lyse Puffer 6 = 334 μ l Zellysat

2.2.7.2 Phospho-Kinase Array Durchführung

Der Phospho-Kinase Array wurde für eine bessere Sensitivität in einen Teil A und einen Teil B pro Zellysat unterteilt und komplett bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle genannten Reagenzien waren dem Human Phospho-Kinase Array Kit entnommen. Zuerst wurde 1ml Array Puffer 1 in jedes Well der 8-Well-Platte pipettiert und Part A und Part B Membranen mit der Zahl nach oben mittels flacher Pinzette in gegenüberliegende Wells gelegt. Nach Beendigung des einstündigen Blockens auf einem Schwenker wurde der Puffer 1 aus der Platte entfernt, das Zellysat mit Array Puffer 1 auf 2ml aufgefüllt, und je 1ml auf die Part A und B Membran pipettiert. Die Reaktion lief über Nacht bei 6°C auf einem Schwenker ab. Zum Waschen wurden die zusammengehörigen Membranen in einer Plastikbox der Maße 8x11cm dreimal mit 20ml 1xWash Puffer für 10min inkubiert. Als nächstes wurde für jede Part A bzw. B Membran 20 μ l Detection Antibody Cocktail A bzw. B in 1ml 1xArray Puffer 2/3 gelöst und je 1ml zu den Membranen in ein Well überführt. Die Inkubationszeit betrug hierzu 2h bei RT unter stetigem Schwenken. Die darauffolgenden Waschschrte liefen ab wie bereits beschrieben, jedoch in jeweils separaten Plastikboxen. Anschließend wurde Streptavidin-HRP in 1xArray Puffer 2/3 im Verhältnis 1:2000 gelöst, 1ml in jedes Well pipettiert, daraufhin die Membranen wieder vorsichtig hineingelegt und 30min bei RT schwenkend inkubiert. Die folgenden Waschschrte wurden wie beschrieben durchgeführt. Nach dem Abtropfen der Membranen wurden diese mit 1ml ECL-Substrat (Kapitel 2.2.6.4.3) benetzt, für 1min inkubiert und 1min entwickelt. Die Quantifizierung der Punkte auf den Membranen wurde mittels BioDocAnalyze® Software von Biometra® durchgeführt (die Details der Auswertung sind im Anhang aufgeführt).

2.2.8 Molekularbiologische Methoden

2.2.8.1 Zellvorbereitung

Für die RNA-Isolierung wurden etwa 400.000 Zellen je Well einer 6-Well-Platte ausgelegt und für zwei Tage in Doxycyclin-haltigem Medium (100ng/ml) oder ohne Doxycyclin-Induktion weitergezogen. Das Medium wurde abgenommen und der Zellrasen mit 1xPBS ge-

waschen. Pro Well wurden die Zellen in 600 μ l RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol im Verhältnis 1:100 aufgenommen, in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und durch eine 1ml-Spritze mit einer 21G-Kanüle durch fünfmaliges Aufziehen homogenisiert.

2.2.8.2 RNA-Isolation

Die RNA wurden aus den Zellen isoliert, um eine qPCR durchführen zu können. Der gesamte Vorgang wurde bei Raumtemperatur und nach dem Protokoll des RNeasy Mini Kits durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen entstammten, sofern nicht anders angegeben, diesem Kit. Zuerst wurde das homogenisierte Zellysat mit 600 μ l 70% Ethanol gut gemischt und auf die Spin-Column übertragen. Diese wurde daraufhin für 15sek bei 10000rpm zentrifugiert, was zum Ausfällen der RNA führte. Das Auffangröhrchen wurde vorsichtig ausgeleert und die Spin-Column mit 700 μ l RW1-Waschpuffer beladen, worauf eine Zentrifugation für 15sek bei 10000rpm folgte. Das Auffangröhrchen wurde nach diesem Schritt durch ein frisches ersetzt und Spin-Column mit 500 μ l RPE-Puffer beladen und für 15sek bei 10000rpm zentrifugiert. Die Zentrifugation wurde für 2min wiederholt. In der Zwischenzeit wurden pro Probe 32 μ l RNase-freies Wasser im Thermo-Shaker auf 70°C erhitzt. Das Auffanggefäß unter der Säule wurde abermals verworfen. Zur vollständigen Entfernung des restlichen Ethanols wurde für 1min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nun wurde ein RNase-freies 1,5ml-Reaktionsgefäß unter die Spin-Column gesteckt und 32 μ l RNase-freies Wasser genau in die Mitte der Säulenmembran pipettiert. Das Wasser wirkte 5min bei RT ein, um die RNA zu eluieren, bevor der letzte Zentrifugationsschritt für 2min bei 10000rpm folgte.

Um die Verunreinigung mit DNA zu vermeiden, wurde die mRNA mit dem Desoxyribonuklease-Kit behandelt. Die verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders markiert, diesem Kit entnommen. Zu den 30 μ l mRNA wurden 3 μ l an 10xTURBO DNase Puffer sowie 1 μ l TURBO DNase in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und für 25min im Thermo-Shaker bei 37°C inkubiert. Zu der Lösung (34 μ l) wurden 3,4 μ l DNase-Inaktivator pipettiert, gemischt und 2min bei RT inkubiert. Nach 1,5min bei 10000rpm in der Zentrifuge wurden die Überstände in einem neuen Reaktionsgefäß auf Eis gestellt. Die Reinheit der RNA-Probe und deren Konzentration wurden mit dem NanoDrop Spectrophotometer (Kapitel 2.2.2.3.1) bestimmt.

2.2.8.3 Reverse Transkription

Um die Proben in die qPCR einsetzen zu können, musste diese erst durch das Enzym Reverse-Transkriptase zu cDNA umgeschrieben werden. Als Matrize diente die bereits prozessierte mRNA, die aufgrund des Spleißens nur noch aus Exons bestand. Zu 250ng RNA-Probe (auf 5µl mit dH₂O aufgefüllt) wurden aus dem iScript cDNA Synthese Kit 4µl 5xiScript Reaction Mix, 1µl iScript Reverse Transcriptase mit 10µl RNase-freiem Wasser gemischt, sodass ein Endvolumen von 20µl in einem 0,6ml Tube enthalten war. Folgendes Programm des Thermocyclers wurde für die Transkription verwendet:

<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
25°C	5min
42°C	30min
85°C	5min
4°C	Pause

Tabelle 11: Transkriptionsprogramm

Die verschiedenen Temperaturen waren für den Ablauf der reversen Transkription wichtig. Bei 25°C erfolgte die Anlagerung der Primer an die Matrize (mRNA). Bei 42°C hatte die Reverse Transkriptase ihr Wirkmaximum und wurde bei 85°C wieder denaturiert.

Die Proben wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.2.8.4 Quantitative RT-PCR

Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) diente dazu, eine gewünschte Sequenz einer Nucleinsäure enzymabhängig zu vervielfältigen und die gewonnene DNA-Menge zu quantifizieren. Die zu vermehrende Region wurde durch die Primer festgelegt. Das Verfahren begann mit der Aktivierung der DNA-Polymerase für 10min bei 95°C. Bei dem „Two-Step-Verfahren“ wurde für die Denaturierung, bei der die komplementären DNA-Stränge voneinander abgelöst wurden, die Temperatur von 95°C für 15sek gehalten. Danach wurde die Temperatur auf 60°C gesenkt, damit die sogenannte Hybridisierung, die Anlagerung der Primer, beginnen konnte. Bei gleicher Temperatur fand die Elongation, also der Anbau der Nukleotide statt. Diese Schritte wurden 40 Mal wiederholt, wobei die DNA-Menge exponentiell anstieg.

Material und Methoden

<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklen</i>
95°C	10min	1
95°C	15sek	40
60°C	1min	40
4°C	Pause	1

Tabelle 12: qRT-PCR-Programm

Alle Schritte wurden auf Eis pipettiert. Pro Probe wurde ein 20µl-Ansatz erstellt, bestehend aus 10,4µl SYBR® Green, 2µl Primer der Firma Qiagen, sonst je 0,4µl für den Forward und den Reversed Primer eines Paares (Tabelle 13), 5,6µl bzw. 6,8µl destilliertes Wasser und jeweils 2µl cDNA-Probe. Der SYBR® Green Master Mix enthielt SYBR® Green I Dye, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP, ROX Passive Reference Dye und optimierte Pufferbestandteile. SYBR® Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der Doppelstrang-DNA bindet, blaues Licht der Wellenlänge 494nm absorbiert und grünes Licht der Wellenlänge 521nm emittiert. Der ROX-Referenzfarbstoff war nötig, um die Fluoreszenz-Fluktuationen zwischen den Proben während der Analyse zu korrigieren. Als Housekeeping-Gen wurde das PPIA-Gen (Peptidylprolyl Isomerase A) verwendet. Hierbei handelt es sich eine endogene Kontrolle, denn PPIA ist ein Gen, das nicht reguliert wird, weshalb die Proben auf dessen Expression normalisiert werden konnten. Zum Überprüfen der Qualität der quantitativen RT-PCR wurde zudem eine Non Template Control (NTC) ohne cDNA-Probe analysiert.

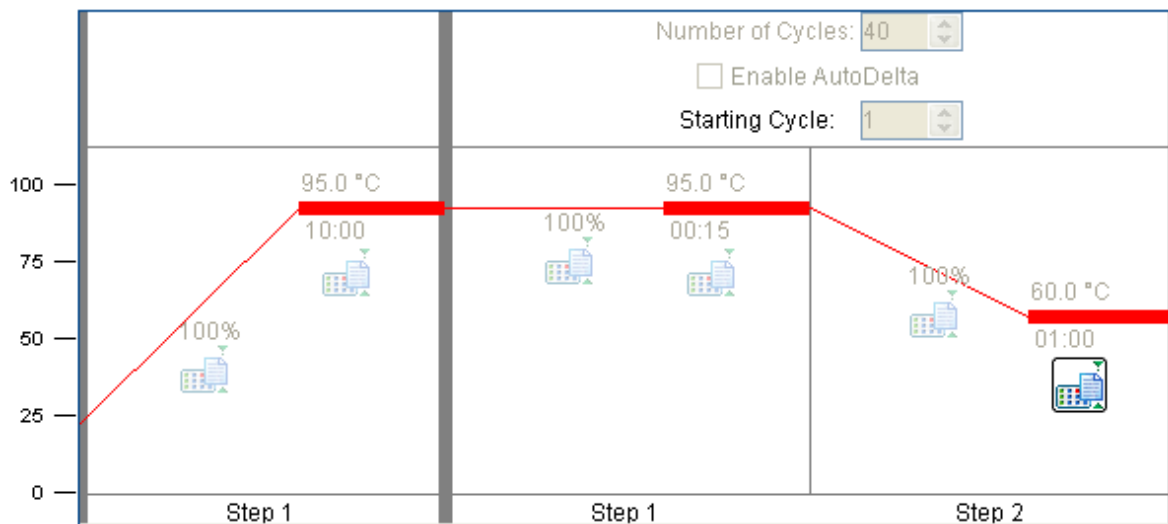


Abbildung 3: PCR-Temperaturprofil (Screenshot: StepOne Software)

Material und Methoden

Gen	Annealing-Temperatur	Sequenz	Katalognummer	Hersteller
<i>hPPIA</i>	60°C	nicht beschrieben	QT00040040	Qiagen
<i>hMMP-9</i>	60°C	nicht beschrieben	QT01866137	Qiagen
<i>NOS3</i>	60°C	F: ggt aac cag cac att tgg ga R: gag atg ctg ttg aag cgg at	Q6512D03 Q6512D04	Invitrogen
<i>VEGFa</i>	60°C	F: cta cct cca tgc caa gt R: agc tgc gct gat aga cat cc	Q6512D05 Q6512D06	Invitrogen
<i>MYB</i>	60°C	F: gca cca gca tca gaa gat ga R: ctt tcc aca gga tgc agg tt	Q6512D07 Q6512D08	Invitrogen

Tabelle 13: Verwendete Primer

Nach dem PCR-Durchlauf erfolgte eine Schmelzpunktanalyse. Anhand dieser Analyse- methode konnten Verunreinigungen, wie beispielsweise zusammengelagerte Primer oder Kon- taminationen, erkannt werden. Dazu wurde das PCR-Produkt erhitzt, dabei einem Tempera- turgradienten ausgesetzt und die Fluoreszenz gemessen. Die Auswertung der qRT-PCR er- folgte mit der StepOne Software 2.2.2 an einem Dell Computer. Es wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode zum Errechnen der jeweiligen Genexpression verwendet. Hierzu wurde jeweils die Expres- sion des Doxycyclin-induzierten MMP-9 Klons mit derjenigen ohne Induktion verglichen und die Expression des zu untersuchenden Gens dem des Housekeeping-Gens gegenüberge- stellt. Es wurde jeweils der Mittelwert aus drei Messwerten bestimmt. Für die Errechnung eines statistischen Mittelwerts war die Anzahl der Datensätze zu gering.

3 ERGEBNISSE

3.1 KLONIERUNG

Die Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) im Tumorgewebe ist mit dem Tumorstadium, der Invasivität und der Metastasierungsfähigkeit eines Tumors assoziiert. Dies trifft auch und insbesondere auf das kolorektale Karzinom zu. Es wurden bereits einige Breitspektrum-Inhibitoren der MMPs als antitumorale Medikamente entwickelt. Leider blieben klinische Studienerfolge bisher aus (Said, 2014). Durch ein besseres Kenntnis der durch einzelne MMPs bzw. MMP-Bestandteile induzierten intrazellulären Signalwege der Krebsentstehung kann gezielter an antikarzinogenen Strategien gearbeitet werden. Um den Einfluss der Matrix-Metalloprotease-9 (MMP-9) und ihrer nicht-katalytisch wirksamen Hämpexindomäne (PEX-9) auf die Pathogenese des kolorektalen Karzinoms zu klären, wurden MMP-9 und PEX-9 möglichst tumornah exprimiert. Hierzu wurden die DNA für MMP-9 oder PEX-9 in die Tumorzellen selbst, d.h. in die kolorektale Karzinomzelllinie SW-620, integriert und Doxycyclin-abhängig exprimiert. Als Kontrolle wurde der Vektor ohne Insert verwendet. Die Zellen der Linie SW-620 entstammen einem kolorektalen Adenokarzinom und wurden aus einer Lymphknotenmetastase isoliert. Diese Zelllinie etablierten Leibovitz et al. im Jahr 1976 (Leibovitz, 1976).

Zur Amplifikation von MMP-9 und MMP-9-PEX (kurz PEX-9) (siehe Schema der Expressionskonstrukte in Kapitel 8.1) wurde jeweils eine präparative RT-PCR angesetzt. Das Insert für das PEX-9-Konstrukt wurde aus zwei Untereinheiten, der Sekretionsdomäne und der Hämpexindomäne, konstruiert.

Die Vektoren wurden in kompetente Bakterien transformiert, auf Ampicillin-haltigen Agarplatten zur Selektion ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde mittels EndoFree Plasmid Maxi Kit isoliert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Danach folgte die Linearisierung der Vektoren mit Hilfe spezifischer Restriktionsendonukleasen. Nach diesem präparativen Verdau der Vektoren erfolgte eine weitere Aufreinigung mittels des QIAquick PCR Purifikation Kits. Hiernach wurden die Vektoren aus dem DNA-Agarosegel ausgeschnitten und isoliert.

3.1.1 Erfolgreiche Klonierung des Expressionsvektors (pVLX-TRE3G)

Zuerst erfolgte die Klonierung von MMP-9 und PEX-9 in den pVLX-TRE3G-Vektor. Dazu wurde dieser durch die Restriktionsenzyme BamHI und XhoI linearisiert.

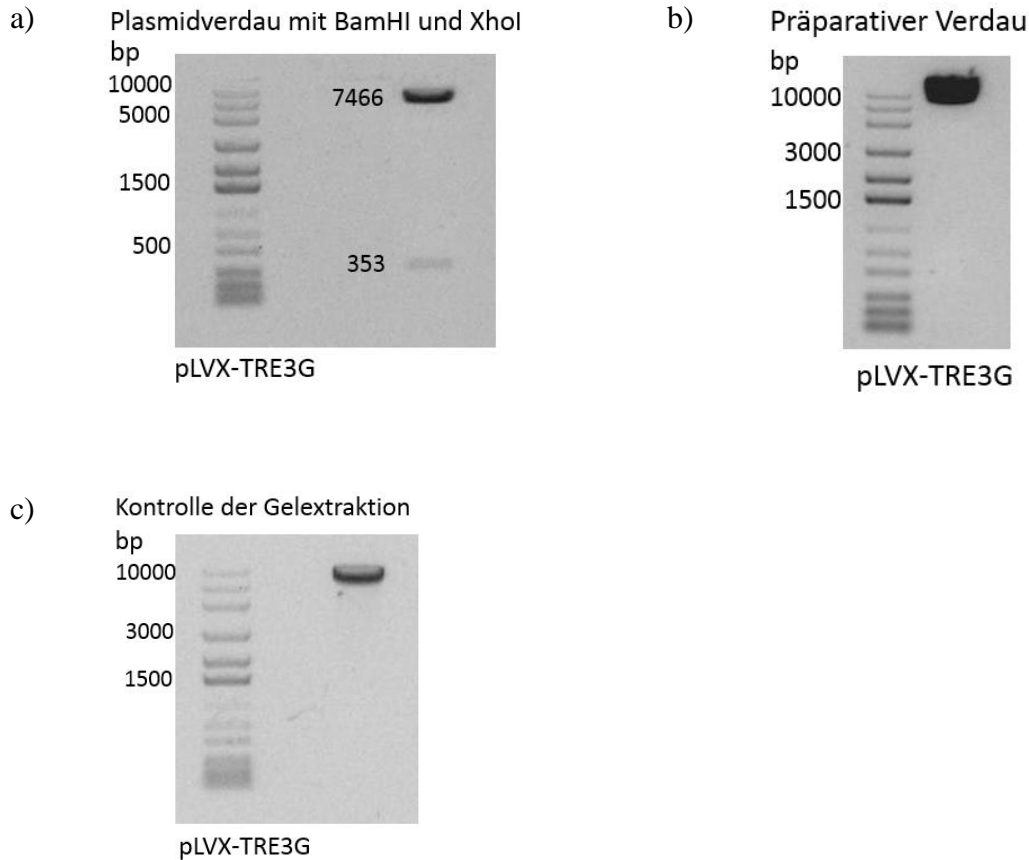


Abbildung 4: Präparation des Vektors pVLX-TRE3G

In dieser Abbildung wird die Aufbereitung des Vektors pVLX-TRE3G, die vor der Klonierung notwendig war, dargestellt. Bild a) zeigt den Kontrollverdau des Vektors mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI und die daraus entstandenen Fragmente. Der präparative Verdau (b) wurde mit den Enzymen BamHI und MluI durchgeführt. Die Gelextraktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 366nm. Bild c) zeigt das Kontrollgel nach der Aufreinigung, die Bande liegt in der gesuchten Höhe von 7820bp.

3.1.1.1 Validierung der Gensequenz MMP-9

Der präparative PCR-Ansatz des MMP-9 Inserts wurde aufgrund seiner Größe in mehrere Taschen eines DNA-Gels pipettiert, per Gel-Elektrophorese aufgetrennt und die Banden unter der UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 366nm ausgeschnitten. Die DNA wurde danach mittels NucleoSpin Gel and PCR clean-up Purification Kit aufgereinigt.

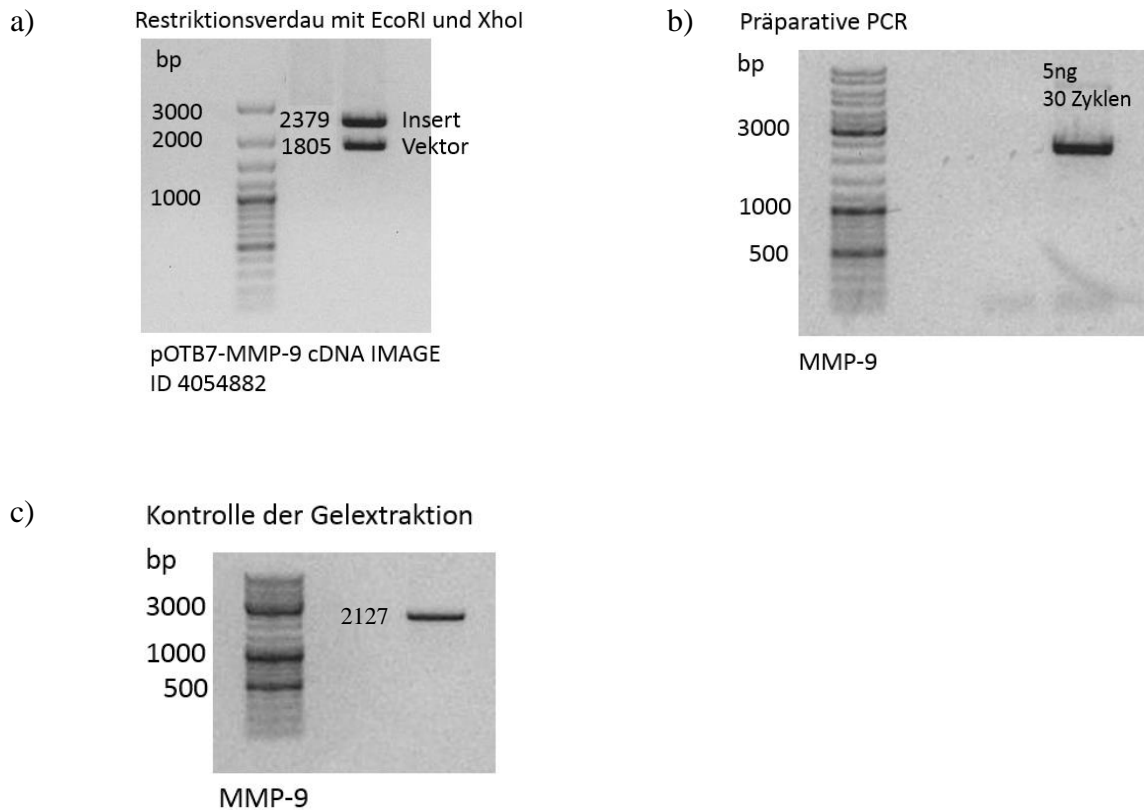


Abbildung 5: Insert MMP-9

Das Plasmid pOTB7-MMP-9 war die Ausgangs-cDNA zur Generation des Inserts MMP-9. Der Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI wurde in (a) visualisiert. Zur Aufbereitung wurde eine präparative PCR durchgeführt (b) und das Amplifikat auf ein DNA-Agarosegel aufgetragen. Die Banden wurden bei einer Absorption von 366nm ausgeschnitten. Die erfolgreiche Extraktion und die Größe des Fragments wurden durch die DNA-Auftrennung per Gel-Elektrophorese mit einer Bande von 2127bp bestätigt (c).

3.1.1.2 Validierung der Gensequenz PEX-9

Für die Herstellung des Inserts PEX-9 wurde eine Ligations-PCR pipettiert, um die 650bp große PEX-Domäne mit der 95bp großen Sekretionsdomäne zu verbinden. Die Sekretionsdomäne war für die Ausschleusung der PEX-Domäne essentiell. Hierzu musste dasselbe Verhältnis an Basen eingesetzt werden. Somit wurden 250ng der PEX-Domäne und 36,8ng der Sekretionsdomäne verwendet. Die DNA wurde danach mittels NucleoSpin Gel and PCR clean-up Purification Kit aufgereinigt.

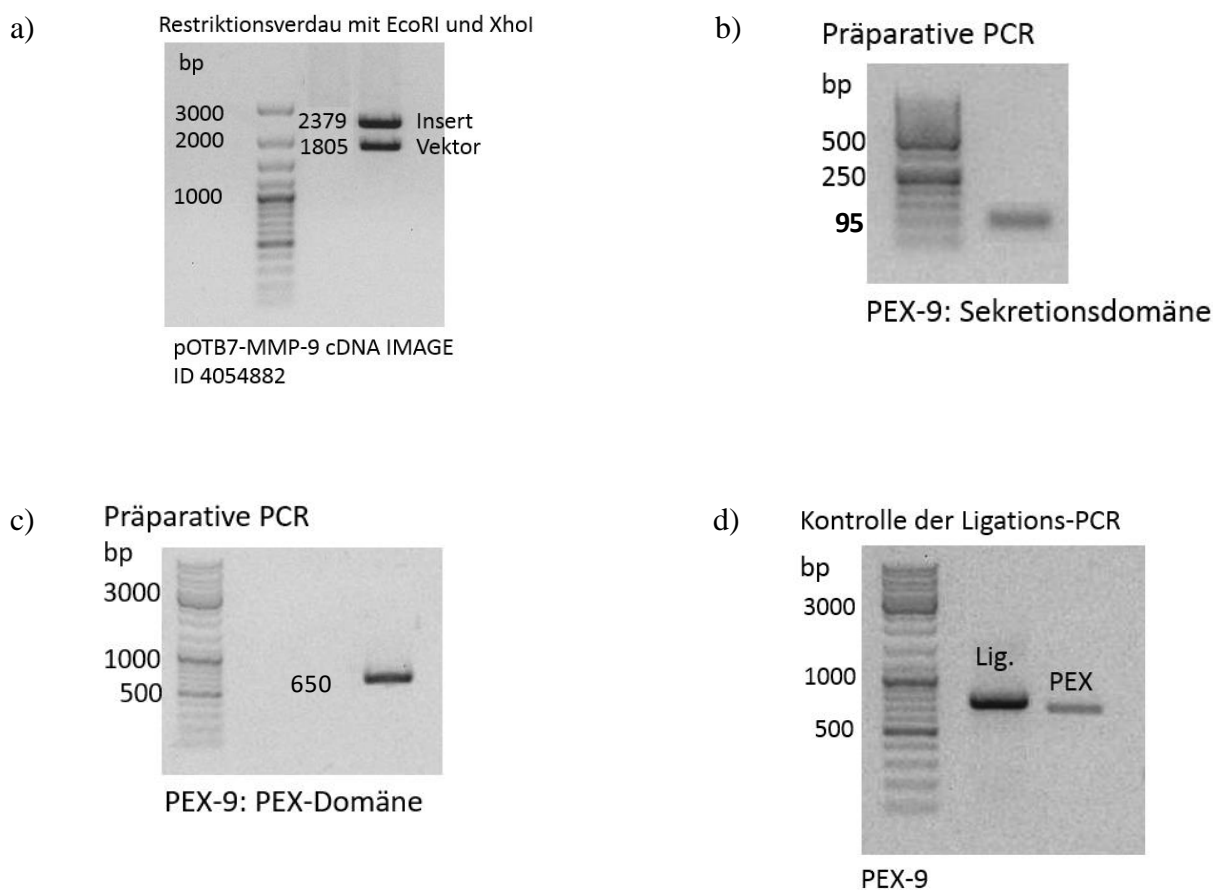


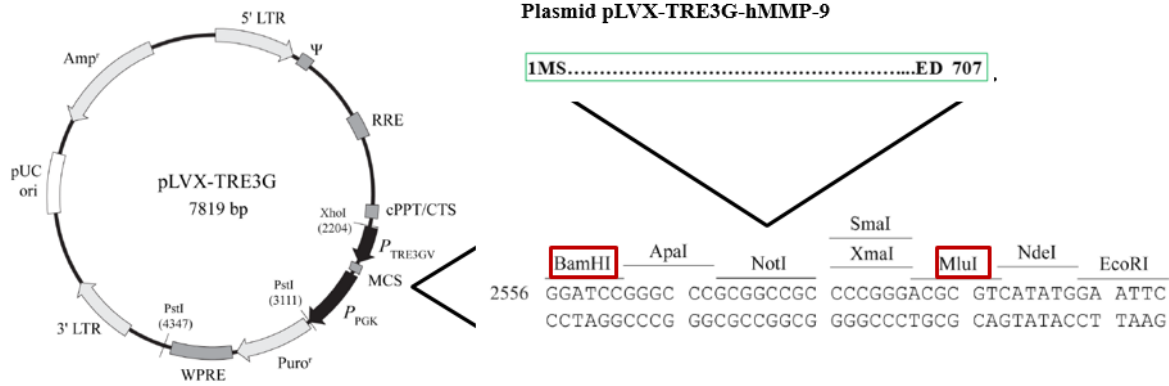
Abbildung 6: Insert PEX-9

Das Insert PEX-9 wurde aus dem Plasmid pOTB7-MMP-9 amplifiziert (a). Hierzu wurde je ein präparativer PCR-Ansatz der PEX-Domäne und der Sekretionsdomäne pipettiert, bestehend aus 650bp (b) und 95bp (c). Die beiden Domänen wurden per Ligations-PCR miteinander verbunden (d).

3.1.1.3 Erfolgreiche Klonierung in den Vektor pLVX-TRE3G

Um die Inserts in die Vektoren einzubringen, wurde das In-Fusion® HD Cloning Kit verwendet. Die Plasmide wurden dann in kompetente Bakterien transformiert und die DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit isoliert.

a)



b)

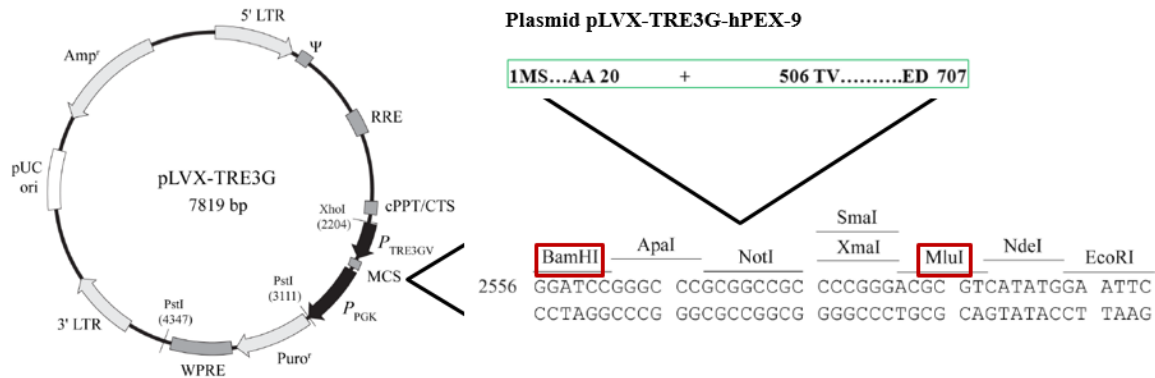


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Klonierung

Bild a) zeigt den schematischen Ablauf der Klonierung des Plasmids MMP-9: den Vektor pLVX-TRE3G, die zur Linearisierung verwendeten Restriktionsenzyme und das aus 707 Aminosäuren bestehende Insert. Die 222 Aminosäuren des Inserts PEX-9 wurden, wie in Bild b) visualisiert, in den linearisierten Vektor kloniert: die roten Rechtecke markieren die Restriktionsenzyme, die grünen Rahmen umranden die jeweiligen Inserts.

Ergebnisse

Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung wurde eine Restriktionsanalyse angefertigt, wobei die Endprodukte auf ein Agarosegel aufgetragen und unter der UV-Lampe sichtbar gemacht wurden. Für die folgende komplette Sequenzierung der Plasmide durch das SeqLab-Labor und die Kontrolle anhand der Software Finch TV wurden die Plasmide mittels Endo-Free Plasmid Maxi Kit aufgereinigt und im Verhältnis 1:4 mit TE gemischt.

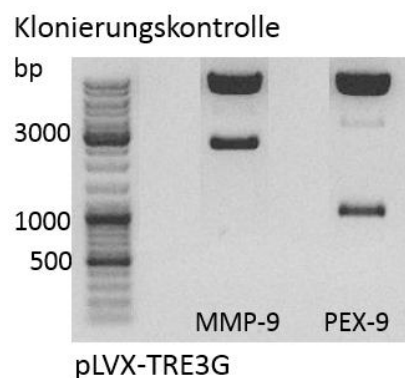


Abbildung 8: Klonierungskontrolle

Zur Kontrolle der gelungenen Klonierung wurde nochmal ein Agarose-Gel angefertigt. Bei MMP-9 waren die Fragmente 7440bp und 2486bp groß und wurden mit *XhoI* und *MluI* geschnitten, bei PEX-9 waren die Fragmente 7440bp und 1031bp groß.

3.1.2 Erfolgreiche Klonierung des Expressionsvektors (pVLX-TRE3G-ZsGreen1)

In einem zweiten Klonierungsschritt wurden die Inserts, also die zu untersuchenden Genesequenzen, die für MMP-9 und PEX-9 codieren, aus dem pVLX-TRE3G-Vektor amplifiziert und in den Vektor pVLX-TRE3G-ZsGreen1 integriert. Dieser Vektor hat durch das enthaltene ZsGreen1 den Vorteil, dass man die Zellen anhand der „gelungen Transfektion“ besser selektieren kann. Zudem war dieses Vorgehen für die geplanten *in vivo* Mausmodelle hilfreich, um das Tumorausmaß anhand der grünen Fluoreszenz zu bestimmen. Bei diesem Vektor wurde der präparative Verdau erst mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* durchgeführt, das Produkt mittels QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und dann mit dem Restriktionsenzym *MluI* verdaut. Durch die Agarose-Gelelektrophorese wurden die Fragmente aufgetrennt und anschließend aus der Gelmatrix eluiert.

Ergebnisse

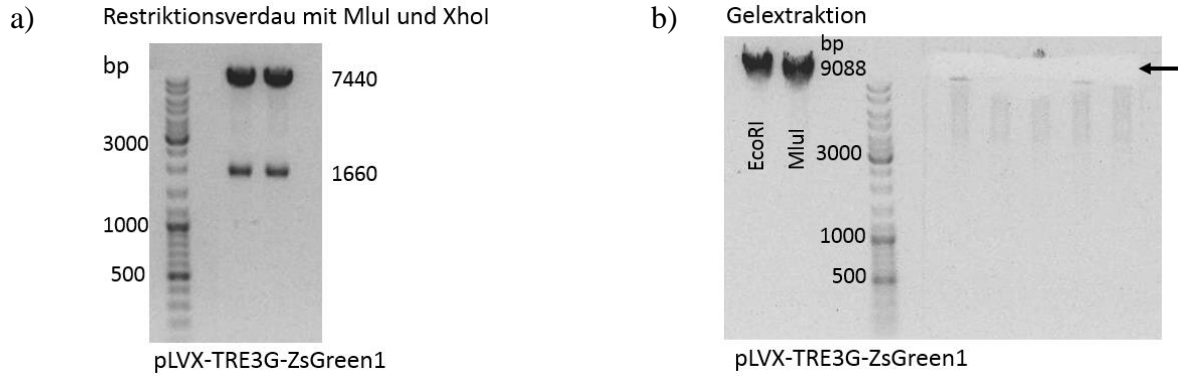


Abbildung 9: Präparation des Vektors pLVX-TRE3G-ZsGreen1

Auf dem Bild a) ist der Kontrollverdau des Vektors mit den Restriktionsenzymen MluI und XhoI dargestellt. Bild b) zeigt rechts das Agarose-Gel nach der Extraktion der Banden (siehe Pfeil) und auf der linken Seite des Markers die DNA-Banden jeweils nach dem Restriktionsverdau mit EcoRI oder MluI.

3.1.2.1 Gelextraktion von MMP-9 und PEX-9

Um die Inserts aus dem Vektor pVLX-TR3G zu gewinnen, wurden diese via Gelelektrophorese extrahiert und aufgereinigt.

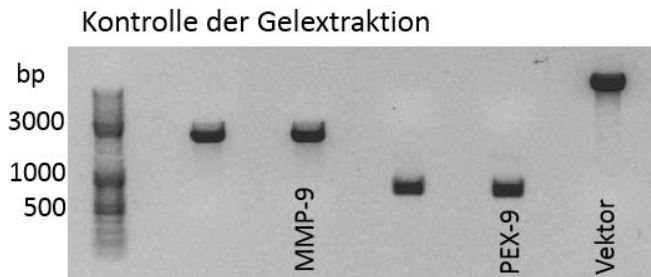


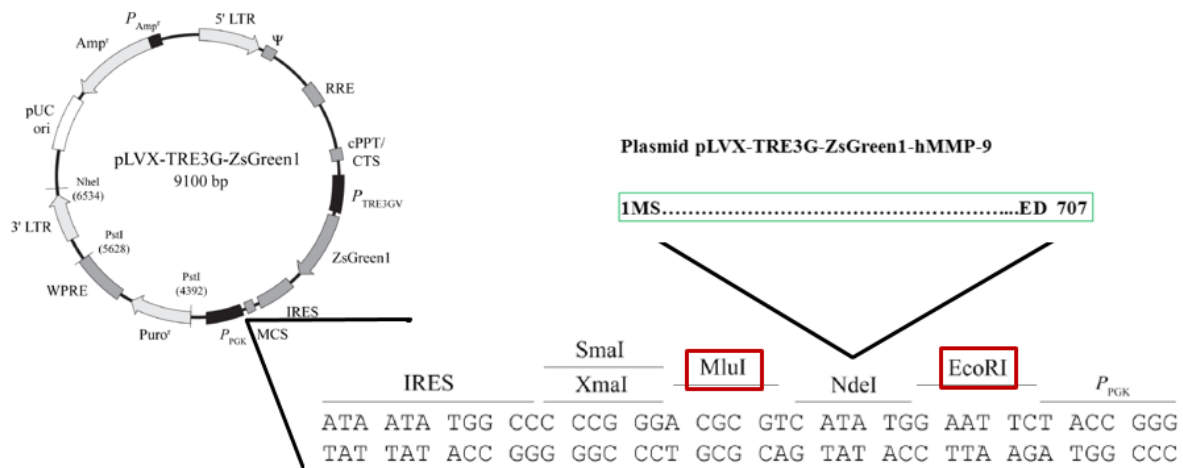
Abbildung 10: Kontrolle der Gelextraktion

Die Inserts MMP-9 und PEX-9 wurden aus dem Vektor pLVX-TRE3G amplifiziert, in die Gelelektrophorese eingesetzt und anschließend extrahiert. Nach der Aufreinigung der DNA wurde ein Kontrollgel angefertigt, das die Kontrollbanden der Inserts MMP-9 und PEX-9 und des Vektors beinhaltet.

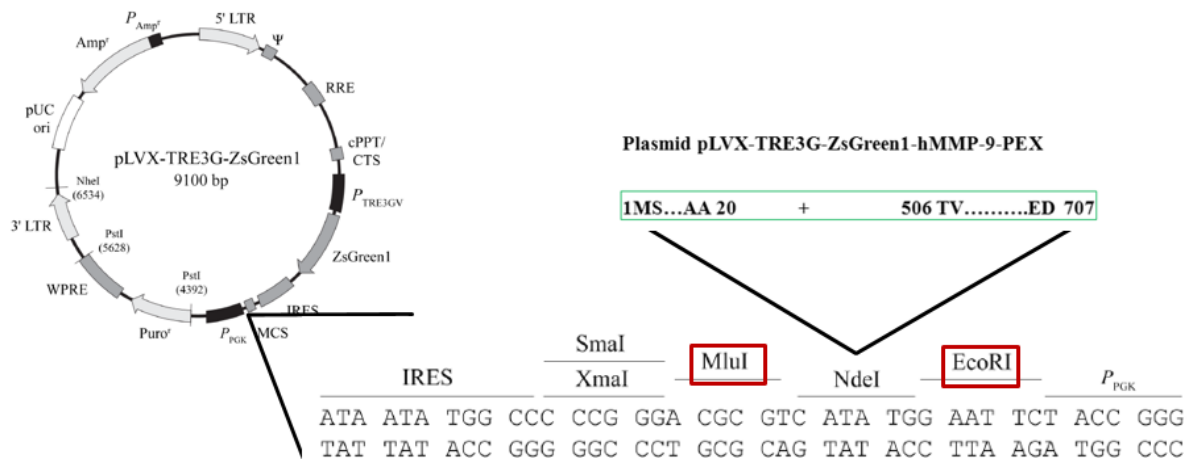
3.1.2.2 Klonierung der Inserts in den Vektor pLVX-TRE3G-ZsGreen1

Die Klonierung erfolgt mittels In-Fusion® Cloning Kit und wurde durch eine Restriktionsanalyse kontrolliert. Die Plasmide wurden in kompetente Bakterien transformiert. Nach der Isolierung dieser Plasmide aus den transformierten Zellen per EndoFree Plasmid Maxi Kit wurden sie mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen gespalten, vom SeqLab sequenziert und nach Überprüfung der Korrektheit der Sequenzen als Modelle für die folgenden Experimente ausgewählt.

a)



b)



Ergebnisse

c)

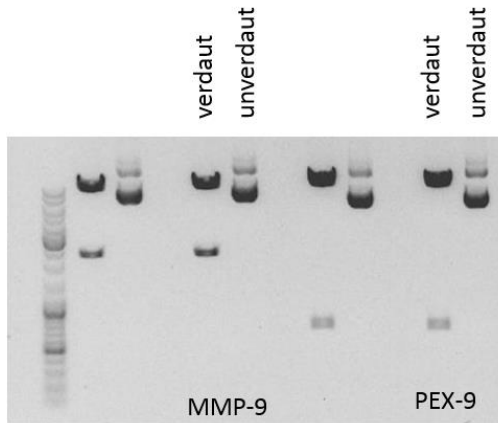


Abbildung 11: Klonierung in den Vektor pLVX-TRE3G-ZsGreen1

Die Bilder a) und b) zeigen schematisch die Zusammensetzung der neu generierten Plasmide. In der Multiple Cloning Site des Vektors wurde dieser an den spezifischen Schnittstellen der Restriktionsenzyme, die durch die roten Kästen in der Abbildung hervorgehoben wurden, linearisiert. An dieser Stelle wurden die in den grünen Kästen gezeigten, zu untersuchenden Gene MMP-9 und PEX-9 inkloniert. Das Bild c), auf dem die Plasmide vor und nach der Spaltung mit EcoRI und MluI dargestellt sind, verdeutlicht die erfolgreiche Klonierung.

3.1.3 Transfektion und Auswahl der Klone

Pro neu generiertem Plasmid wurden mehrere Klone kultiviert und diese auf die Expression von MMP-9 bzw. PEX-9 untersucht. Von jedem Konstrukt wurde der Klon mit der größten Reinheit nach stabiler Transfektion und mit der stärksten Expression von MMP-9 bzw. PEX-9 für die weiteren Experimente ausgewählt.

3.1.3.1 Klonselktion anhand der ZsGreen1-Fluoreszenz

Zuerst wurden die verschiedenen Plasmide unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet, um einerseits die Zellmorphologie zu beurteilen und andererseits die Expression von ZsGreen1 in den stabil transfizierten kolorektalen Karzinomzellen sichtbar zu machen. Dazu wurde das ZsGreen1, das auch Doxycyclin-abhängig exprimiert wird, grünfluoreszierend dargestellt. Die DAPI-Färbung diente der Visualisierung der Zellkerne. Somit war darstellbar, wie viele der vorhandenen Zellen fluoreszieren. Die Menge der fluoreszierenden Zellen war ein Maß für die Reinheit der Klone und spiegelte das Gelingen der Transfektion wieder. Die Zellen wurden hierfür einen Tag in 6-Well-Platten kultiviert und nach zwei Tagen mit oder ohne Doxycyclin-Behandlung geerntet.

a)



Ergebnisse

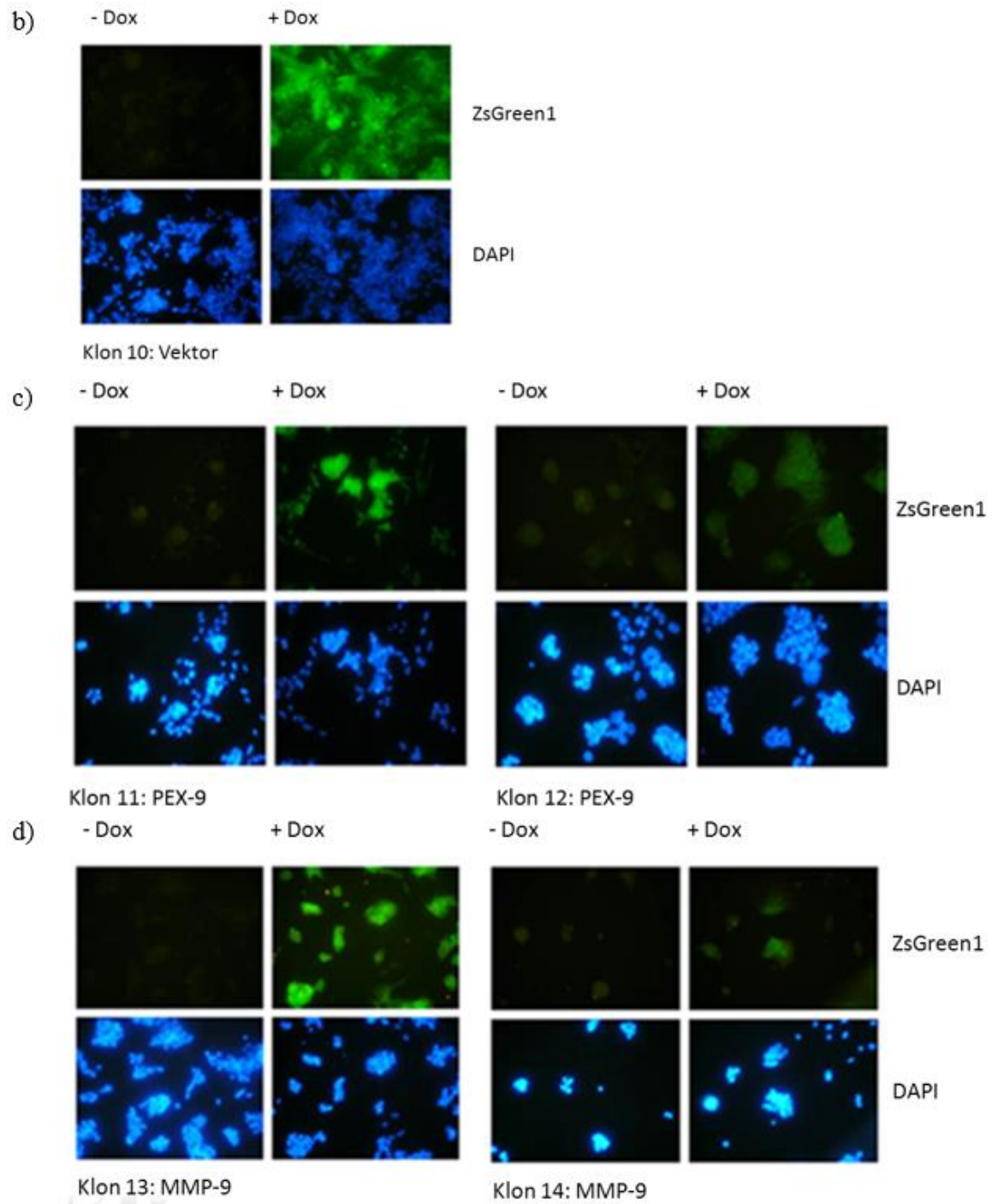


Abbildung 12: Klonselktion anhand der ZsGreen1-Fluoreszenz

Ergebnisse

Bild a) zeigt die Behandlung der Zellen vor dem Versuchsstart. Es wurden jeweils Doxycyclin-induzierte Zellen und solche ohne Induktion bezüglich ihrer ZsGreen1-Expression verglichen. Zudem wurden die Zellen (blau-angefärbten Zellkerne) auf ihre ZsGreen1-Expression untersucht, um die Transfektion zu überprüfen. Als nächster Schritt wurden verschiedene Klone desselben Plasmids auf ihre Expressionsintensität getestet. So wurden für den Vektor (b), für PEX-9 (c) und für MMP-9 (d) jeweils die besten Klone ausgewählt.

Anhand der Farbintensität des ZsGreen1s und der Übereinstimmung mit den durch DAPI-blau gefärbten Zellkernen wurde die stabile Transfektion überprüft und die Vorauswahl der Klone getroffen. Bei dem Kontrollvektor pLVX-TRE3G-ZsGreen1 war der Klon mit der laborintern vergebenen Nummer K10 am stärksten fluoreszenzmarkiert, bei dem Konstrukt pLVX-TRE3G-ZsGreen1-PEX-9 war die beste Übereinstimmung der grün und blau leuchtenden Farbe im Klon 11. Beim Konstrukt pLVX-TRE3G-ZsGreen1-MMP-9 war die Übereinstimmung im Klon 13 am stärksten.

Ein weiteres Kriterium zur Auswahl der Klone war die Zellmorphologie. Durch das Mikroskop betrachtet war die Zellform bei den ausgewählten Klonen ohne pathologische Veränderungen.

3.1.3.2 Klonauswahl anhand der Expression von MMP-9 und PEX-9 im Western-Blot

Zunächst wurden die MMP-9- und PEX-9-Expression der unterschiedlichen Klone auf Proteinebene geprüft. Als Untersuchungsmethode wurde der Western-Blot angewendet. Es bestätigte sich das Bild, das sich bereits bei der Fluoreszenz-Untersuchung abzeichnete. Klon Nummer 13 des Plasmids MMP-9 zeigte sowohl im Zelllysate als auch im Mediumüberstand eine stärkere MMP-9-Expression als die Vergleichsklone, z.B. Klon 14. Im Falle von Plasmid PEX-9 war die Expression im Klon 11 sichtbar gesteigert im Vergleich zu der des Klon 12. Anhand der Intensität der Western-Blot-Banden, einhergehend mit dem Ergebnis der Fluoreszenz-Darstellung, konnte die Wahl der besten Klone getroffen werden: Klon 11 mit dem Konstrukt pLVX-TRE3G-ZsGreen1-PEX-9 (PEX-9) und Klon 13 mit dem Konstrukt pLVX-TRE3G-ZsGreen1-MMP-9 (MMP-9). Außerdem zeigt dieses Testergebnis, dass SW-620 kolorektale Karzinomzellen die Hämoepithelomäne von MMP-9 exprimieren können.

3.2 EXPRESSION VON MMP-9 UND PEX-9

Die ausgewählten Klone PEX-9, MMP-9 und entsprechende Kontrollklone wurden sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene auf ihre MMP-9-Expression hin kontrolliert. Hierzu wurden die Zellen einen Tag in Kulturmedium herangezogen und dann zwei Tage entweder mit oder ohne Doxycyclin weiter gezüchtet.

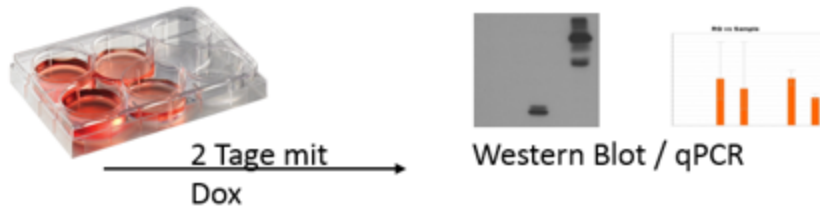
Es konnte so gezeigt werden, dass die Erstellung neuer funktionsfähiger Expressionskonstrukte gelungen war. Auf mRNA-Ebene waren deutlich erhöhte Expressionen nach Doxycyclin-Induktion für PEX-9 und MMP-9 zu sehen, sowohl mit FCS als auch ohne FCS im Medium. Die PCR wurde dreifach durchgeführt und der Mittelwert der Ergebnisse gebildet. In der Kontrolle blieb die Expression aus.

Als nächstes wurden die ausgewählten Klone auf Proteinebene analysiert, indem sowohl das Zelllysate als auch der Mediumüberstand auf MMP-9- bzw. PEX-9-Protein hin untersucht wurden. Die sezernierten Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (siehe Abbildung 13). Die 92kDa-Bande zeigt die Proteinexpression von proMMP-9 an. Auf Höhe von circa 25kDa befindet sich die Hämpexindomäne von MMP-9. Wie erwartet ließ sich bei den Zellen mit dem stabil transfizierten Kontrollvektor keine Expression der gesuchten Proteine nachweisen. Bei diesem Experiment wurde als Ladekontrolle des Blots das α -Tubulin mit aufgeführt.

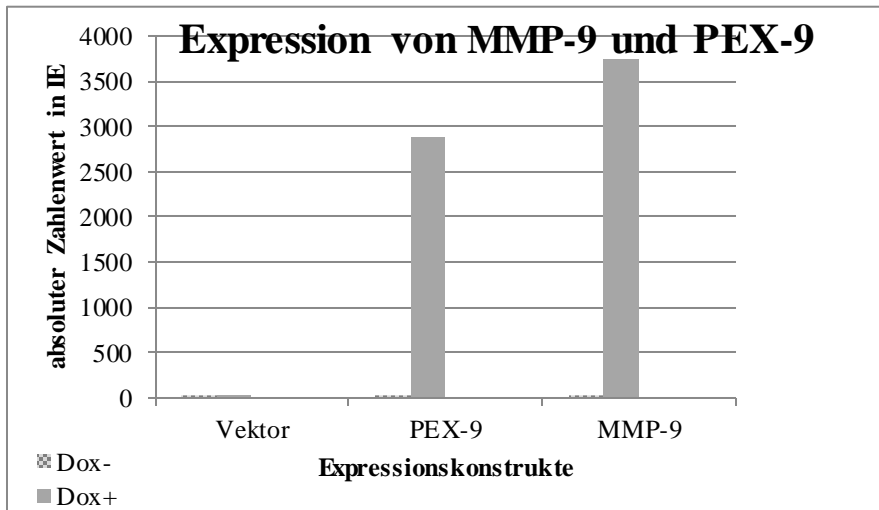
Zusammenfassend verdeutlichen die Abbildungen in 13, dass das Auswahlverfahren geeignet und die Wahl der Klone zielführend waren. Zudem zeigten diese Experimente, dass SW-620 kolorektale Karzinomzellen MMP-9 und PEX-9 in Zellkultur exprimieren können. Es wurden somit geeignete, tumornahe *in vitro* Modelle konstruiert, die MMP-9 bzw. PEX-9 stabil exprimieren können.

Ergebnisse

a)



b)



c)

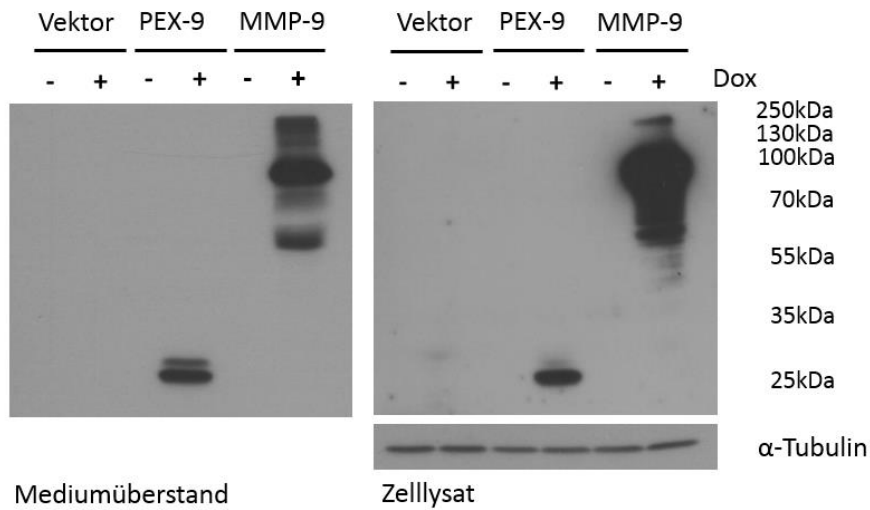


Abbildung 13: Nachweis der PEX-9- und MMP-9-Expression

Bild a) stellt die Behandlung der Zellen vor Versuchsstart dar. Deutlich sichtbar war die Überexpression von PEX-9 und MMP-9 bei Induktion auf mRNA-Ebene (b). Der Western-Blot bekräftigte dieses Ergebnis und visualisierte die PEX-9-Expression im Mediumüberstand und im Zelllysat (c). Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin aufgetragen.

3.3 CHARAKTERISIERUNG DER PLASMIDE

3.3.1 Expressionssteigerung von MMP-9 auf Proteinebene

Um herauszufinden, ob die Expression von MMP-9 auch kurzfristig von Doxycyclin gesteigert wird, wurden die Zellen ein, zwei und drei Tage in Doxycyclin-haltigem Medium (100ng/ml) kultiviert. Zudem wurde untersucht, ob unterschiedliche Doxycyclin-Konzentrationen (20ng/ml und 500ng/ml) nach zwei und drei Tagen der Exposition einen Einfluss auf die MMP-9-Expression ausüben.

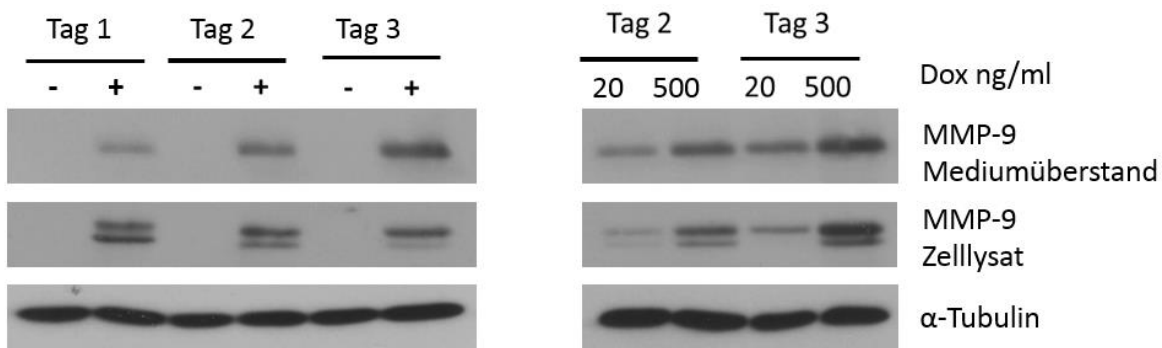


Abbildung 14: Expression von MM-9 bei unterschiedlicher Doxycyclin-Exposition

Deutlich sichtbar war, dass bei längerer Verweildauer der Zellen in Doxycyclin-haltigem Medium die Expression von MMP-9 im Mediumüberstand zunahm. Im Lysat zeigte sich eine Doppelbande, wobei die obere Bande bei längerer Doxycyclin-Exposition kräftiger wurde, die untere schwächer. Es war außerdem zu beobachten, dass die Expressionsbande bei niedrigeren Doxycyclin-Dosen schwächer und bei höheren stärker wurde. Die ohne Doxycyclin im Medium gewachsenen Zellen exprimierten die Proteine gar nicht. Daraus schlossen wir,

Ergebnisse

dass die MMP-9-Expression von der Doxycyclin-Konzentration und von der Expositionsdauer gegenüber Doxycyclin abhängig war. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Expression von MMP-9 durch Doxycyclin induziert wird.

3.3.2 Steigerung Proteinexpression von MMP-9 und PEX-9 im Langzeitversuch

Nachdem bestätigt wurde, dass die Zellklone MMP-9 bzw. PEX-9 exprimieren, wurde im Langzeitverlauf beobachtet, wie sich die Proteinexpression während einer achtwöchigen Exposition mit Doxycyclin in Medium verhält. Dies war besonders in Anbetracht der geplanten Tumorwachstumsexperimente im Mausmodell von Bedeutung. Zu drei Zeitpunkten (2 Wochen, 4 Wochen und 8 Wochen) wurde MMP-9 und PEX-9 sowohl im Mediumüberstand als auch im Zelllysat per Western-Blot visualisiert.

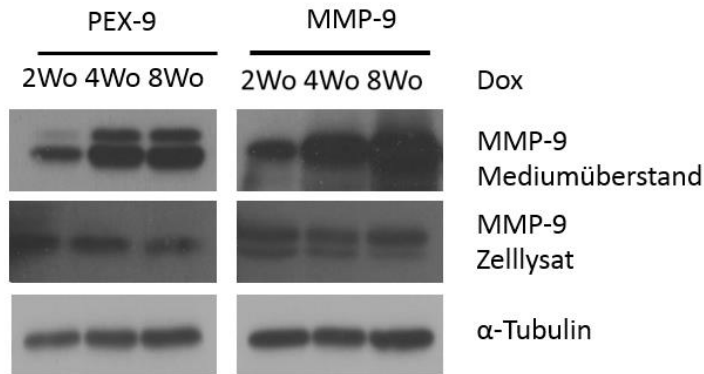


Abbildung 15: Langzeitexposition mit Doxycyclin

Messung von MMP-9 und PEX-9 nach 2, 4 und 8 Wochen bei den Konstrukten PEX-9 und MMP-9, α -Tubulin ist als Ladekontrolle aufgetragen.

Es konnte demonstriert werden, dass im Mediumüberstand die Menge an MMP-9 bzw. PEX-9 auch über einen langen Zeitraum hinweg konstant bleibt bzw. zunimmt. Das heißt, dass bei längerer Doxycyclin-Exposition mehr MMP-9 bzw. PEX-9 sezerniert, also aus der Zelle ausgeschleust wird. In der Zelle selbst bleibt die Expression gleich bzw. nimmt leicht ab.

3.3.3 Proteom Profiler Array

Mittels eines Proteom Profiler Arrays wurden 46 Kinasen untersucht, um einen Anhalt dafür zu finden, welche Funktionen durch die Expression der Transgene MMP-9 und PEX-9 in den Zellen ausgelöst wurden.

Die Zellen, die mit Doxycyclin kultiviert wurden, wurden hierbei mit denen ohne Doxycyclin-Induktion verglichen, indem sie jeweils auf eine Membran A und eine Membran B überführt wurden. So konnten besonders spezifische Phospho-Kinasen untersucht werden. Zur Überprüfung der Aussagekraft des Arrays waren auf jeder Membran Positiv- und Negativkontrollen aufgetragen.

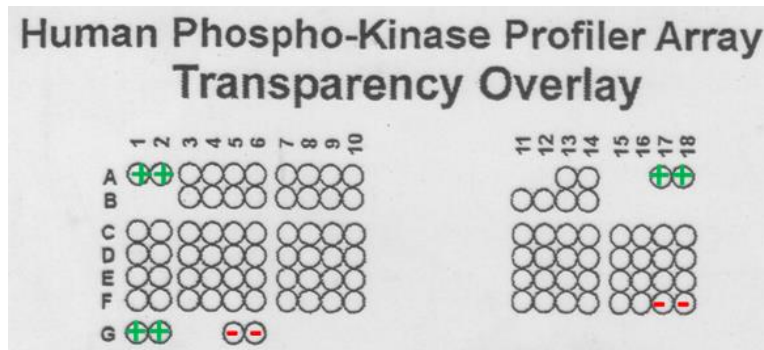


Abbildung 16: Schablone der Membranen A und B des Phospho-Kinase-Arrays

Die Orte der Positiv-Kontrolle sind mit einem grünen Kreuz markiert, die der Negativ-Kontrolle mit einem roten Minus-Zeichen.

3.3.3.1 Ergebnisse des Proteom Profiler Array bei MMP-9

Die Probe (Zelllysate), die in den Phospho-Kinase Array eingesetzt wurde, wurde zuerst auf ihre MMP-9-Expression per Western-Blot untersucht. Im Anschluss an den Nachweis der MMP-9-Expression, konnte die Probe zur Prüfung verschiedener Phosphorylierungsstufen unterschiedlicher Signalproteine in den Proteom Profiler Array eingesetzt werden.

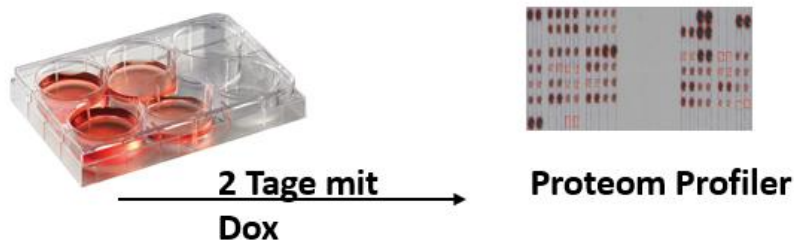
Sehr deutlich ergab sich eine stärkere Phosphorylierung an der Position S1177 der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) bei den Zellen, die nicht dem Antibiotikum Doxycyclin ausgesetzt waren, also keine Induktion von MMP-9 aufwiesen. Auch Akt war

Ergebnisse

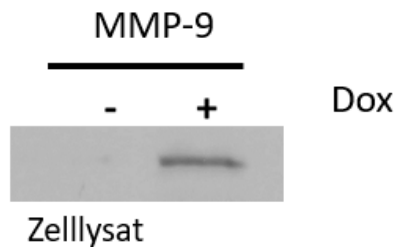
bei Zellen ohne Doxycyclin-Induktion an der Position S473 stärker phosphoryliert. Die computergestützte densitometrische Auswertung der Signalintensitäten demonstrierte eine circa zweifach stärkere Phosphorylierung von Akt. Im Vergleich hierzu war eNOS vierfach stärker phosphoryliert. Dieses Auswertungsergebnis bezog sich auf einen Röntgenfilm, der eine Minute lang entwickelt wurde. Bei beiden Proteinen handelt es sich um Kinasen, die eine tragende Rolle im NO-Signalweg einnehmen. Das bedeutet, dass Klone, die mit MMP-9 neu generiert wurden, weniger phosphoryliertes eNOS und auch weniger phosphoryliertes Akt besitzen.

Im Folgenden ist der teils mit bloßem Auge erkennbare Unterschied nochmals graphisch dargestellt. Details zur Auswertung des Arrays sind dem Anhang zu entnehmen.

a)



b)



Ergebnisse

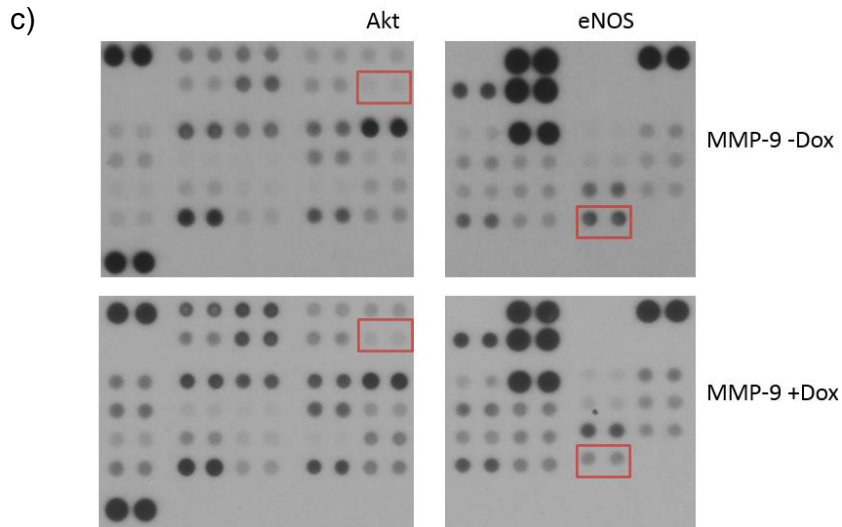
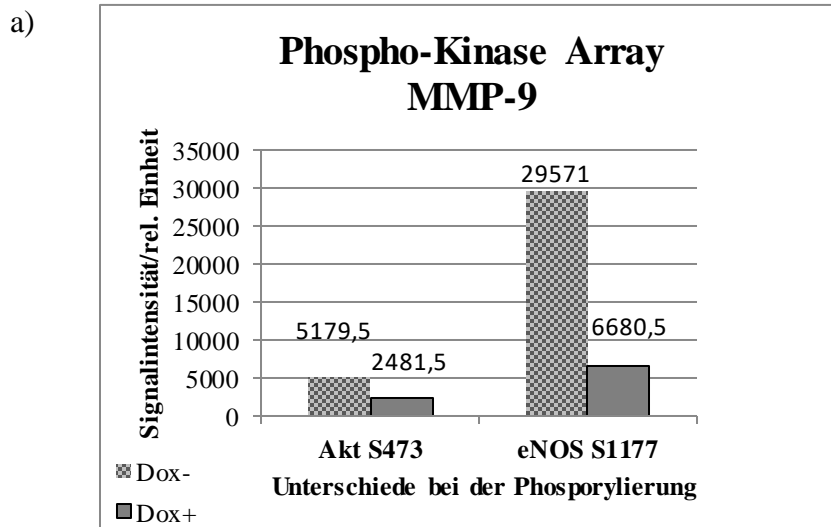


Abbildung 17: Proteom Profiler MMP-9

Die Zellen wurden, wie in Bild a) gezeigt, 2 Tage mit Doxycyclin-haltigem Medium induziert oder ohne Induktion weitergezogen. Danach wurden die Zellen auf ihre MMP-9-Expression mittels eines Antikörpers gegen MMP-9 kontrolliert (b) und - als dieser Test positiv ausfiel - der Array durchgeführt. Es wurden jeweils eine Membran A und B ausgewertet (c). Durch die roten Kästen sind die veränderten Phosphorylierungs-Stellen Akt S473 und eNOS S1177 gekennzeichnet.



b)

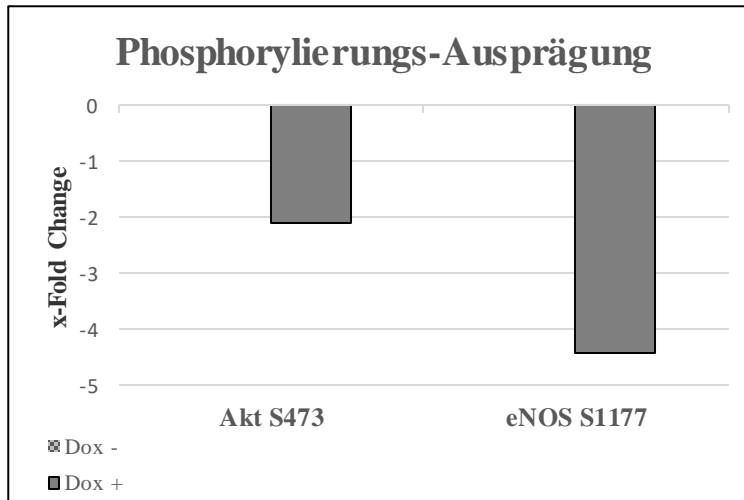


Abbildung 18: Auswertung des Proteom Profilers

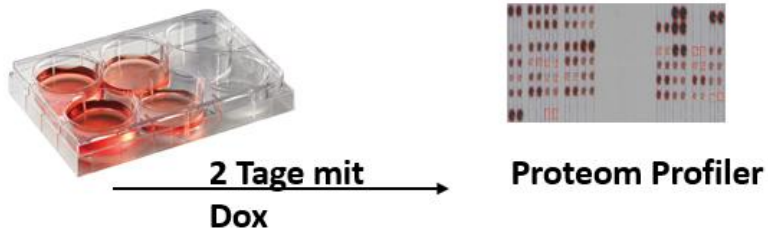
Durch den Array, der mit MMP-9 transfizierten Zellen durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass die Zellen aus der Kultivierung ohne Doxycyclin stärkere Phosphorylierungen bei Akt S473 und eNOS S1177 aufweisen als die Zellen aus der Kultivierung mit benanntem Stoff (a). Das Volumen beschreibt das Dichtevolumen der Punkte und wird als Summe aller Grauwerte der Pixel, die zu einer Fläche gehören, angegeben. Der Hintergrund ist bereits abgezogen (Biometra GmbH, 2012). Zur besseren Visualisierung, ist in der Graphik b) das Ergebnis als X-Fold-Change-Diagramm (Quotient aus den Einzelintensitäten) abgebildet worden. Hier ist der Unterschied in absoluten Zahlen graphisch dargestellt.

3.3.3.2 Ergebnisse des Proteom Profiler Array bei PEX-9

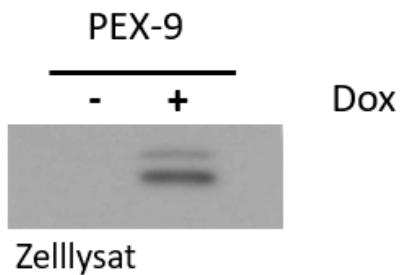
In diesem Experiment wurde die eingesetzte Probe (Zelllysate) mittels Western-Blot auf ihre PEX-9-Expression geprüft. Nach positivem Ergebnis wurde die Probe in den Phospho-Kinase-Array eingesetzt. Es ergab sich kein Unterschied zwischen den Doxycyclin-induzierten Zellen und denen, die ohne Doxycyclin kultiviert worden waren.

Ergebnisse

a)



b)



c)

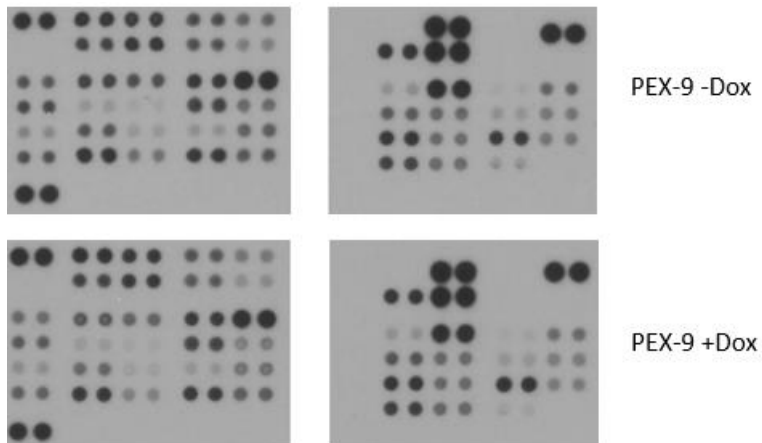


Abbildung 19: Proteom Profiler PEX-9

Die Zellen wurden, wie in Bild a) gezeigt, zwei Tage in Doxycyclin-haltigem Medium herangezogen. Danach wurden die Zellen mittels Antikörper gegen PEX-9 (ein polyklonales Antiserum gegen MMP-9, das die PEX-9 erkennt) auf ihre PEX-9-Expression hin kontrolliert (b) und - als dieser Test positiv ausfiel - der Array durchgeführt. Es zeigt sich kein Einfluss durch die PEX-9-Expression

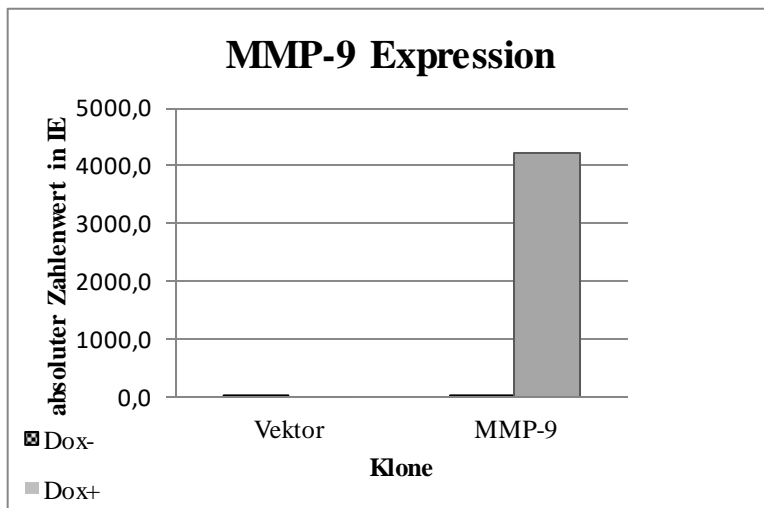
3.3.4 Genexpression auf mRNA-Ebene bei MMP-9

Nach den Ergebnissen des Phospho-Kinase Arrays wurde die Expression von MMP-9 auf mRNA-Ebene untersucht. Zunächst wurde die Überexpression von MMP-9 kontrolliert. Diese war vorhanden. Anschließend wurden für das MMP-9-Konstrukt auf mRNA-Ebene sowohl eNOS als auch die Gene analysiert, die mit eNOS interagieren (*MYB*, *VEGF*).

a)



b)



c)

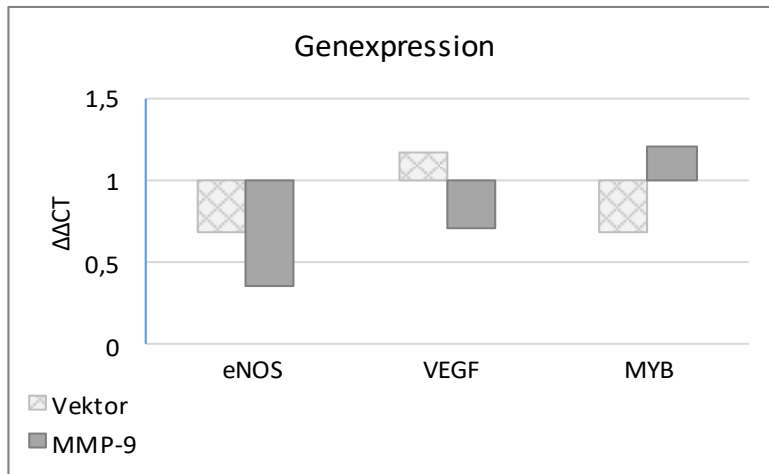


Abbildung 20: Genexpression auf mRNA-Ebene

Das Schema der Zellvorbereitung ist auf Bild a) zu sehen. Graphik b) zeigt die Überexpression (Kopienanzahl) von MMP-9 bei Doxycyclin-Induktion (Mittelwert aus drei Bestimmungen), Graphik c) demonstriert das Ergebnis der PCR für die Gene eNOS, VEGF und MYB. Es wurde nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet, jeweils die Ausprägung der Expression bei Doxycyclin-Induktion im Verhältnis zum Housekeeping-Gen und zum Wert ohne Doxycyclin-Induktion. Dargestellt ist der Vergleich zwischen dem Vektor und MMP-9, um den Einfluss des ZsGreen1 einschätzen zu können.

Die eNOS-Expression wurde bei Doxycyclin-Induktion geringer, was nicht allein durch ZsGreen1 oder andere Vektorbestandteile ausgelöst wurde. Hierzu ist als Vergleich der Vektor mit aufgetragen. VEGF wurde bei Doxycyclin-induzierten Zellen vermindert, MYB vermehrt exprimiert.

3.3.5 Positiver Nachweis der Proteinexpression von eNOS und Akt bei MMP-9

Die Ergebnisse des Phospho-Kinase Arrays des Konstrukts MMP-9 wurden auf Proteinebene verifiziert. Es wurden die gleichen Proben wie im Proteom Profiler eingesetzt. Zuerst wurde versucht, die auffälligsten Unterschiede zu reproduzieren. Hierfür wurde ein Western-Blot mit dem P-eNOS Antikörper durchgeführt. Allerdings war es nicht möglich, die Banden stark genug abzubilden, sodass die Unterschiede zwischen Zellen mit und ohne Doxycyclin-

Ergebnisse

Behandlung nicht zu beurteilen waren. Verschiedene Entwicklungszeiten, unterschiedliche Entwickler (ECL) und höhere Konzentrationen an Antikörpern wurden erfolglos ausprobiert. Deshalb wurden die Proben nun im Western-Blot auf ihre Expression von *P-Akt* und *eNOS* getestet.

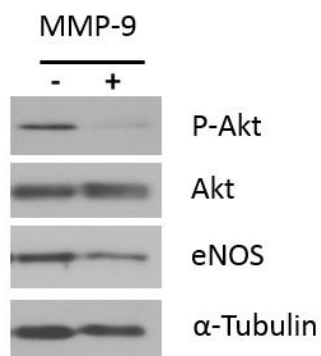


Abbildung 21: Western-Blot

Expression von Phospho-Akt, Akt, eNOS und α-Tubulin beim MMP-9-Konstrukt.

Der Western-Blot zeigt, dass sowohl die Bande von P-Akt (60kDa) im Vergleich zu der Ladekontrolle Akt (60kDa) als auch die Bande von eNOS (140kDa) im Vergleich zur Ladekontrolle α-Tubulin (55kDa) nach Doxycyclin-Induktion schwächer waren. Dies bestätigt die Ergebnisse des Phospho-Kinase Arrays. Die verminderte Phosphorylierung von P-eNOS (Phospho-eNOS) kann nach unseren Befunden durch eine verminderte Expression von eNOS bedingt sein, da letzteres in Doxycyclin-induzierten Zellen ebenfalls geringer exprimiert wird.

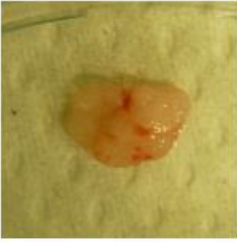
3.4 AUSBILDUNG VON TUMOREN IM TRANSGENEN MAUSMODELL

Die in dieser Arbeit konstruierten Expressionskonstrukte MMP-9, PEX-9 und die Kontrolle führten in den Mausmodellen nach subkutaner Injektion der Zellen allesamt zu Tumoren.

Ergebnisse

a)

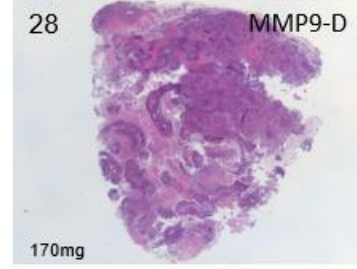
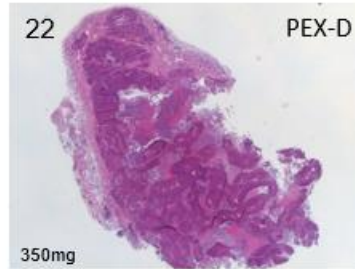
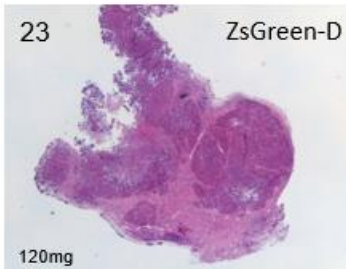
Vektor -Dox



PEX-9 -Dox



MMP-9 -Dox



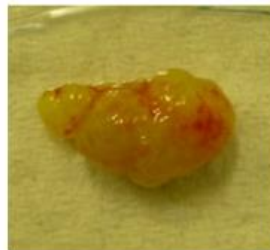
Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Marion Sölter.

b)

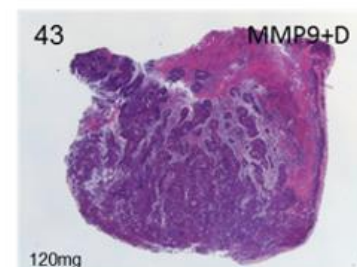
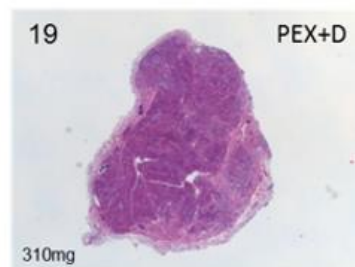
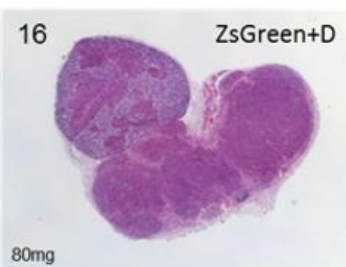
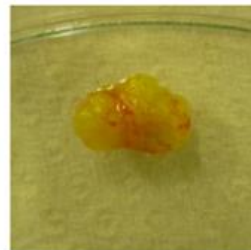
Vektor +Dox



PEX-9 +Dox



MMP-9 +Dox



Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Marion Sölter.

Abbildung 22: Tumorwachstum der Expressionskonstrukte nach subkutaner Injektion im Nacktmausmodell

In Bild a) sind die Tumore ohne Doxycyclin-Induktion, in Bild b) die Ergebnisse mit Doxycyclin dargestellt. Die obere Reihe zeigt die Tumore, die untere jeweils die dazugehörigen histologischen Schnitte.

4 DISKUSSION

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist der dritthäufigste Tumor der westlichen Welt (Krebsregisterdaten Robert Koch Institut, Stand 12/2015). Metastasierung, Invasivität und Angiogenese sind entscheidende Parameter bezüglich der Aggressivität des kolorektalen Karzinoms. Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) spielen hierbei eine wichtige Rolle, da sie am Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind. Die Gelatinasen MMP-9 und MMP-2 werden in kolorektalen Karzinomzellen im Vergleich zum gesunden umgebenden Gewebe verstärkt exprimiert (Roeb, 2001; Kessenbrock, 2010). Besonders MMP-9 ist bei verschiedenen Tumoren für die Bildung von neuen Blutgefäßen während des Tumorwachstums, für die Tumoringression und die Tumormetastasierung verantwortlich (Bergers, 2000; Coussens, 2000; Zheng, 2006; Merdad, 2014). Die Expression der Proteinasen kann vom Tumorgewebe selbst oder von den umliegenden Stromazellen ausgehen (Westermarck, 1999). Eine kurative Therapie des kolorektalen Karzinoms ist vor allem im metastasierten Stadium noch nicht möglich. Die Entwicklung von Breitband-Inhibitoren der MMPs scheiterte in der Vergangenheit aufgrund fehlender Spezifität (Hua, 2011). Die entwickelten Inhibitoren wurden vor allem in klinischen Studien bei Patienten im Endstadium eines Karzinoms getestet, ohne dass die Wirkweise der MMPs bekannt war (Jodele, 2006). Die Breitband-Inhibitoren sollten katalytisch wirksam sein. Jedoch spielen nach neueren Erkenntnissen bei der Metastasierung auch nicht-katalytische Mechanismen eine Rolle, sodass die entwickelten Inhibitoren das Outcome der Patienten nicht verbessern konnten (Redondo-Muñoz, 2010). Zudem wurden unerwünschte Nebenwirkungen wie die Zunahme von Lebermetastasen oder das Auftreten eines muskuloskelettalen Syndroms dokumentiert (Krüger, 2001; Bramhall, 2002). Die gezielte Inhibition einzelner MMPs oder sogar einzelner Bestandteile einer MMP ist daher ein interessanter Ansatzpunkt in der antitumoralen Therapie geworden. Dazu ist es notwendig, die individuelle Rolle der jeweiligen Peptide der MMPs zu kennen. Die beim kolorektalen Karzinom (KRK) verstärkt exprimierten Gelatinasen bestehen aus einem Signalpeptid, einem Propeptid, einem katalytischen Zentrum, einer fibronektin-ähnlichen Domäne, einer Hinge-Region und der Hämpexindomäne (PEX) (Benoit de Coignac, 2000).

Im Boyden-Chambermodell konnte an Melanomzellen nachgewiesen werden, dass die Hämpexindomäne der MMP-9 eine hohe Affinität an das Substrat Gelatine hat. Hieraus resultiert, dass rekombinante PEX-9 die MMP-9-Aktivität antagonisiert und daher sowohl die

Diskussion

MMP-9-Aktivität als auch die Tumorzellinvasion hemmt. Die Migration von malignen Melanomzellen *in vitro* war im Beisein von rekombinanter PEX-9 reduziert (Roeb, 2002). Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von Redondo-Muñoz. Bei leukämischen B-Zellen konnte gezeigt werden, dass die solitäre PEX-9 durch Bindungen an zelluläre Oberflächenproteine Überlebenssignale induziert und somit die Tumorzellen vor Apoptose schützt (Redondo-Muñoz, 2010). Diese unterschiedlichen Wirkungsweisen bezüglich des Effekts von PEX-9 auf das Überleben der malignen Zellen und auf das Tumorwachstum können auf die verschiedenen Zellarten, die jeweilige Signalkaskade beziehungsweise den Wirkmechanismus zurückzuführen sein: bei Melanomzellen wirkt PEX-9 antagonistisch auf die Migration, bei chronisch lymphatischen Leukämiezellen löst PEX-9 durch Rezeptorbindungen eine Signalkaskade aus, die die Zellen vor Apoptose schützt.

Rekombinante PEX-9 konnte die Migration von kolorektalen Karzinomzellen (SW-620 und LS174) im modifizierten Boyden Chamber-Experiment hemmen. Die Adhäsion der Karzinomzellen an Komponenten der EZM (Kollagen Typ I und Gelatin), ein erster Schritt im Abbau der EZM, konnte durch PEX-9 reduziert werden (Burg-Roderfeld, 2007). Der genaue molekulare Mechanismus konnte bislang noch nicht geklärt werden.

Die Interaktion von MMPs, besonders MMP-9 und PEX-9, mit den Tumorzellen spielt nach dem jetzigen Stand der Literatur eine wichtige Rolle bei der Tumordinvasion und -ausbreitung des kolorektalen Karzinoms (Roeb, 2001; Burg-Roderfeld, 2007; Hua, 2011; Said, 2014). Zunächst waren *in vivo* Untersuchungen von kolorektalen Karzinomzellen notwendig, um ein genaueres Verständnis der Signalwege und die Entwicklung von antitumoralen und antimetastatischen Therapien voranzutreiben. Ziel der Tierversuche ist, die hemmende Wirkung von PEX-9 auf das Tumorwachstum und die Angiogenese von kolorektalen Karzinomzellen im Mausmodell zu verifizieren und zu entschlüsseln. Dadurch sollen sich konkrete therapeutische Möglichkeiten für die Anwendung der PEX-9 beim kolorektalen Karzinom manifestieren.

Als Vorbereitung der Nacktmausversuche wurden in der hier vorliegenden Arbeit kolorektale Karzinomzellen stabil mit MMP-9 und PEX-9 transfiziert und die Expression der transfizierten Gensequenzen auf RNA und Proteinebene kontrolliert. Diese stabil MMP-9 und PEX-9 exprimierenden Zellen wurden für die Nacktmausmodelle zur Erzeugung subkutaner Tumore

Diskussion

verwendet. *In vivo* wurden das Tumorwachstum und die Angiogenese makroskopisch und histologisch untersucht. Die Tierversuchsergebnisse selbst sind nicht Bestandteil der vorliegenden Dissertation, können aber als Beweis der erfolgreichen Etablierung spezifischer Tumorzellen grundsätzlich und qualitativ herangezogen werden.

Die Charakterisierung der stabil transfizierten Tumorzellen *in vitro* (also in Zellkultur) ist ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit unter besonderer Berücksichtigung von Signalwegen und Proteinexpression.

Die Ergebnisse der Arbeit können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Im Zelllysate der Tumorzellen, die MMP-9 unter Doxycyclin-Induktion stabil exprimierten, konnte eine geringere Menge an phosphoryliertem eNOS (P-eNOS) und phosphoryliertem Akt (P-Akt) im Vergleich zu den Zellen ohne Induktion nachgewiesen werden.
2. Unsere Versuche zeigten bei den Zellen des Konstruktes MMP-9 nach Doxycyclin-Induktion einen Abfall der eNOS-Expression auf Protein- und RNA-Ebene sowie der VEGF-Expression auf RNA-Ebene.
3. Die Zellen des MMP-9-Konstrukts wiesen nach Doxycyclin-Induktion im Vergleich zum alleinigen Vektor eine gesteigerte Expression des Onkogens *MYB* auf RNA-Ebene auf.

4.1 DISKUSSION DER METHODEN

4.1.1 Klonierung

Ziel der Arbeit war es, durch stabile Transfektion kolorektale Zellen zu etablieren, die mittels Doxycyclin-Induktion MMP-9, PEX-9 oder den alleinigen Vektor exprimieren. Simultan zur Expression der genannten Proteine wurde ZsGreen1 exprimiert, um die Transfektionseffizienz anhand der Fluoreszenz überprüfen zu können.

ZsGreen ist ein grün fluoreszierendes Protein der Krustenanemone *Zoanthus species*. Durch das im Vektor pLVX-TRE3G-ZsGreen1 enthaltene ZsGreen1 wurden Zellen erzeugt, die unter Fluoreszenz sichtbar sind. Dadurch sind diese Zellen in den Mausversuchen besser zu

Diskussion

detektieren. Um einen Einfluss auf die Genexpression der Plasmide durch ZsGreen1 auszuschließen, wurde der reine Vektor, der ebenso ZsGreen1 enthält, als Kontrolle eingesetzt.

Für die gezielte Anschaltung des Transgens wurde ein Vektor ausgewählt, der durch das Antibiotikum Doxycyclin induzierbar ist. Doxycyclin kann unter Umständen die Zellproliferation oder Geneexpression beeinflussen (Ahler, 2013). Doxycyclin wird auch zur antitumoralen Therapie eingesetzt, da es beim KRK Apoptose auslösen, Zellproliferation vermindern und Invasion hemmen kann (Onoda, 2004; Onoda, 2006). Daher haben wir für den Klonierungsprozess einen Vektor gewählt, der sehr sensitiv für das Antibiotikum ist, um dessen Dosis so niedrig wie möglich zu halten. Diese Anforderung traf auf das pLVX-TRE3G-ZsGreen1-System zu (Zhou, 2006).

Die transfizierten Tumorzellen exprimierten ein Transaktivatorprotein, das sogenannte Tet-On 3G. Durch die Bindung von Doxycyclin an das Transaktivatorprotein kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins. Dieses System hat eine höhere Sensitivität gegenüber Doxycyclin als die beiden Vorgängermodelle des gewählten Transaktivators (Tet-On System und Tet-On Advanced System). Durch die Konformationsänderung wurde der TRE3G-Promotor aktiviert und induzierte die Expression von ZsGreen1, MMP-9 oder PEX-9. Das Tet-On System arbeitet mittels einer An- bzw. Ausschaltung der Genexpression durch die Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Auslösers (Doxycyclin) (Goverdhan, 2005).

Die Wahl des Promotors, der das Transaktivatorprotein exprimiert, beruhte auf der Notwendigkeit einer langfristigen stabilen Expression der Reporterproteine ZsGreen1, MMP-9 und PEX-9 in unseren Versuchen. Der in dieser Arbeit verwendete Promotor EF1-alpha (*human elongation factor 1a promoter*) ist dem häufiger verwendeten CMV-Promotor (*cytomegalovirus immediate-early promoter*) insofern überlegen, da bei stabil transfizierten Zellen mit EF1-alpha weniger *Silencing* (Gen-Stillelegung) beobachtet wurde. Gemessen wurden die Unterschiede der Expression anhand des Fluoreszenzfarbstoffs GFP (*green fluorescent protein*). Durch den Promotor EF1-alpha entstand eine langfristige Expression des Transaktivators (Teschendorf, 2002). Als Grund der erhöhten Gen-Stillelegung bei Verwendung eines CMV-Promotors konnte dessen Methylierung festgestellt werden (Brooks, 2004). Dies war ein weiterer Grund für die Wahl eines anderen Promotors.

4.1.2 Western-Blot

Der Western-Blot diente dazu, Proteine (hier MMP-9, PEX-9, eNOS, Akt) mittels spezifischer Antikörper korrekt zu identifizieren. Eine Fehlinterpretation kann durch unspezifische Banden verursacht werden. Diese können zum Beispiel durch Proteasen-Degradation entstehen. Zur Vermeidung von unspezifischen Banden kann die gesamte Proteinmenge oder die Antikörpermenge reduziert werden (Mahmood und Yang, 2012). Im Western-Blot waren die von uns verwendeten Antikörper - die teilweise von unterschiedlichen Herstellern bezogen wurden - in ihrer Qualität nicht zu normieren. hMMP-9 ist ein polyklonaler Antikörper, der sowohl MMP-9 als auch PEX-9 detektieren kann. Bei Western-Blot-Untersuchungen wurden in unter 1% Kreuzreaktionen mit rekombinant hergestellten MMP-1, -2, -3, -7, -8, -10, -12 und -13 festgestellt (R&D Systems, product details). Phospho-eNOS (monoklonal) wirkt nur, wenn eine Phosphorylierung an Ser117 stattgefunden hat. Dass P-eNOS in unseren Versuchen nicht darstellbar war, könnte z.B. daran liegen, dass die Ser117 Phosphorylierung nicht ausreichend stattgefunden hat. Zur Ausschaltung weiterer Fehlerquellen wurden die Antikörperkonzentration, die Entwicklungszeit und die Entwicklungsdauer überprüft und gezielt optimiert. Phospho-Akt (polyklonal) detektiert nur die Phosphorylierung von Akt an der Ser473 Seite. Der verwendete Akt-Antikörper ist monoklonal. Die Unterschiede zwischen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern sind ihr Bildungsort und ihre Bindungsstelle. Polyklonale Antikörper entstehen aus B-Zellen und binden daher an unterschiedliche Epitope eines Antigens. Monoklonale Antikörper erkennen nur ein spezifisches Epitop und gehen auf einen B-Lymphozyten (einen Zellklon) zurück. Aufgrund der Herkunft aus einer gemeinsamen Zelllinie haben monoklonale Antikörper eine höhere Spezifität als polyklonale Antikörper und die erzielten Ergebnisse sind gut reproduzierbar (Hauk, 2014).

4.1.3 Phospho-Kinase-Array

Der Phospho-Kinase-Array wurde durchgeführt, um schnell und sensitiv eine Vielzahl an Phosphorylierungen zeitgleich untersuchen zu können. Die Phosphorylierung wird durch Kinasen katalysiert und spielt bei der Signaltransduktion eine wichtige Rolle. Durch das Hinzufügen einer Phosphatgruppe an ein Protein werden dessen Aktivität und/oder Funktion geändert (Graves und Krebs, 1999).

Phospho-Kinase-Arrays haben in zahlreichen und unterschiedlichen Studien wichtige Ergebnisse hervorgebracht. 2011 stellte beispielsweise eine französische Arbeitsgruppe anhand des Phospho-Kinase-Arrays fest, dass die Leucinsupplementation die Phosphorylierung von PI3K, Akt, AMPK, p38, MAPK, JNK, GSK-3 α/β , STAT3 und STAT5 erhöht und somit die Zellproliferation im menschlichen Dünndarm durch den PI3K/Akt/GSK-3 β -Catenin Signalweg erhöht wird (Coëffier, 2011). Bei Untersuchungen des diffusen malignen Mesothelioms wurde ein Phospho-Kinase-Array verwendet, um die nachgeschalteten Aktivitäten von Akt-positiven Zellen mit den Akt-knockdown Zellen zu vergleichen. Durch einen Phospho-Kinase-Array konnte dabei gezeigt werden, dass die Gen-Stillegung von Akt zu Änderungen an verschiedenen Phosphorylierungs-Stellen geführt hat. Unter anderem hat die *Akt*-Downregulation verminderte Phospho-CREB1-Mengen zur Folge, und kann so als therapeutisches Ziel einer Tumorbehandlung betrachtet werden (Yamada, 2015).

Ein weiterer Vorteil des Arrays lag darin, dass gleichzeitig mehrere Protein-Kinasen, die beim KRK eine Rolle spielen, auf ihre Phosphorylierung hin untersucht werden konnten. Es handelte sich zunächst um ein breit angelegtes Screening, nach dessen Ergebnis mit weiteren gezielten Methoden (z.B. Western-Blot und PCR) spezifische Faktoren untersucht werden konnten. Das verwendete Verfahren mit Mehrfachantikörpern bot zudem die Möglichkeit, Probenmenge zu sparen (R&D System, product details).

4.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

4.2.1 Langzeitexpression

Langzeitversuche mit Zellkulturen über mehrere Wochen wurden mit Hinblick auf die anschließenden Nacktmaus-Versuche durchgeführt. Im Tiermodell waren für die Tumoranalysen Wachstums- und Beobachtungsphasen von 3-8 Wochen nötig. Dieser Zeitraum wurde nach Sichtung einschlägiger Literaturangaben gewählt: Trainer et al. untersuchte die Kanzerogenität humaner kolorektaler Karzinomzelllinien. Im Mausmodell konnten binnen 10 Tagen nach Injektion von SW-620 Zellen Tumoren palpirt werden. Sie erreichten 20-60 Tage nach der Inokulation einen Durchmesser von 1 cm (Trainer, 1988). Bei den Analysen des Onkogens *KRAS* im Kolonkarzinom von Le Roll et al. wuchsen die subkutanen Tumoren der SW-620 Zellen im Mausmodell 21 Tage (Le Rolle, 2016). Zur

Beurteilung des Einflusses von Fischöl auf das Wachstum von Kolontumoren im Nacktmausmodell (Balb/c) wurden SW-620 Zellen subkutan injiziert und die Tumore nach 23 Tagen untersucht (Bathen, 2008). Die exakte Tumorstadiumsdauer *in vivo* in unserem Setting wurde in einem Vorversuch festgelegt (Tumorstadiumgröße: ca. 1cm Durchmesser, Tumorstadiumvolumen: 500mm³). In den *in vitro* Langzeitversuchen konnte eine größere MMP-9- und PEX-9-Expression bei langzeitiger Doxycyclin-Induktion nachgewiesen werden. Im Hinblick auf die Tierversuche war die Transgenexpression *in vitro* über die geplante Tierversuchsdauer essentiell. Uns gelang eine Visualisierung der konstanten Transgenexpression über mehrere Wochen. Ergänzend wurde gezeigt, dass ein Untersuchungszeitpunkt um die vierte Woche für die weiteren Mausexperimente geeignet ist. Im Western-Blot war zu diesem Untersuchungszeitpunkt die Bande von MMP-9 und PEX-9 im Mediumüberstand und im Zellysate im Vergleich zu den anderen Untersuchungszeiten ähnlich stark darstellbar. Dies bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt die Expression von MMP-9 und PEX-9 in der Zelle stabil war und kontinuierlich Proteine aus der Zelle ausgeschleust wurden.

4.2.2 Erfolgreicher Einsatz der transgenen Zellen im Mausmodell

Um das Tumorstadiumwachstum und die Angiogenese des kolorektalen Karzinoms im Mausmodell erforschen zu können, wurden die in dieser Arbeit erstellten Expressionskonstrukte in stabil transfizierten Tumorzellen bei Mäusen in den rechten dorsalen Flankenbereich subkutan injiziert. Es wurde ein xenogenes Mausmodell gewählt (humane Zellen in murinem Gewebe), um die Effekte der transgenen Zellen klar von den Nacktmaus-eigenen Proteinen unterscheiden zu können. Den Nacktmäusen fehlt der Thymus und somit ein Teil der Immunabwehr (Pantelouris, 1968). Das Immunsystem besteht aus einem angeborenen und einem erworbenen System. Die Immunantwort kann wiederum in eine zelluläre und eine humorale unterteilt werden. Der Thymus stellt den Ausreifungsort der Immunzellen dar (Neumann, 2008). Infolge der Thymusaplasie können die Mäuse keine funktionsfähigen T-Lymphozyten ausbilden. Durch die fehlende zelluläre Immunabwehr wurden die injizierten humanen kolorektalen Karzinomzellen von den Tieren nicht abgestoßen (Gould, 2015). Die Doxycyclin-Induktion erfolgte über das Futter. Die verwendete kolorektale Zelllinie SW-620 war bereits dafür bekannt, nach subkutaner Injektion solide, palpable nicht metastasierende Tumore auszubilden (Stragand, 1981; Kim, 2009). Die Zelllinie ist gut erforscht und reagiert, wie zuvor in

der Arbeitsgruppe AG Roeb demonstriert wurde, auf rekombinante PEX-9 (Burg-Roderfeld, 2007). Aufgrund der Genmutationen in dieser aus einer Lymphknotenmetastase stammenden kolorektalen Zelllinie war von einem schnellen Tumorwachstum auszugehen (Ahmed, 2013).

In den Nacktmaus-Versuchen werden in weiteren Analysen, die außerhalb der vorliegenden Promotion stattfinden, Unterschiede von MMP-9 und der PEX-9 auf Tumorwachstum und Angiogenese bei kolorektalen Karzinomzellen untersucht. Die Tumorgröße wurde mit Hilfe eines Messschiebers zu unterschiedlichen, definierten Zeitpunkten dokumentiert. Nach Entnahme der Tumore wurde das jeweilige Gewicht bestimmt. Die histopathologischen Untersuchungen zur Klassifikation der Tumore sind noch in Arbeit. Nach vollständiger Auswertung der Versuche werden diese zusammengefasst und publiziert.

Als ein wichtiges und entscheidendes Ergebnis der vorliegenden Dissertation ist anzusehen, dass die etablierten Expressionskonstrukte in SW-620 Zellen zu einem Tumorwachstum bei allen Versuchstieren führten.

4.2.3 Relevanz der durch MMP-9 regulierten Phospho-Kinasen

Ein weiterer Teil dieser Arbeit war die Charakterisierung der stabil transfizierten Zellen, um einen tieferen Einblick in die Signalwege und die Tumorausbreitung *in vitro* zu erlangen.

Durch die Durchführung des Phospho-Kinase Arrays wurde belegt, dass MMP-9 einen Einfluss auf die kolorektalen Karzinomzellen und die intrazellulären Signalwege hat. Durch MMP-9 änderte sich die Aktivierung verschiedener Signalwege in kolorektalen Karzinomzellen. Eine abnorme Kinaseaktivität spielt bei einigen Erkrankungen sowie bei der Krebsentstehung eine Rolle (Cohen, 2001).

4.2.3.1 eNOS und Akt

Im Phospho-Kinase-Array wurden bei dem Expressionskonstrukt MMP-9 bei Doxycyclin-Induktion eNOS an der Ser1177 und Akt an der Stelle Ser473 vermindert phosphoryliert. Im Western-Blot ließ sich dieses Ergebnis reproduzieren: verminderte Bandenstärke bei P-Akt und eNOS bei Doxycyclin-Induktion. Die endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthasen (eNOS, auch *NOS3* genannt), die katalytisch aktiv sind, liegen als Homodimere vor. Sie verfügen über eine C-terminale Reduktase-Domäne und eine N-terminale Oxygenase-Domäne (Pfeiffer, 1999). Diese endotheliale Isoform der NOS spielt bei der Blutdruckeinstellung, der

Diskussion

Angiogenese und dem vaskulären Umbau eine ausschlaggebende Rolle (Shesely, 1996; Murohara, 1998; Rudic, 1998; Balligand, 2009; Förstermann und Sessa, 2012). eNOS synthetisiert NO aus L-Arginin und NADPH. NO ist ein freies Radikal, welches bei vielen Prozessen als biologischer Mediator fungiert, z.B. bei der Neurotransmission und bei antitumoralen Aktivitäten (Fukumura, 2006). Der eNOS-NO-Signalweg scheint auch einen wichtigen Einfluss auf die Angiogenese zu haben. Die Ausschaltung von eNOS führte im Tierversuch zu einer reduzierten Bildung neuer Blutgefäße (Smith, 2002). Die eNOS-Aktivität wird durch co- und post-translationale Lipidmodifikation reguliert. Scherstress und metabolischer Stress führen durch eine Phospholipase-C-Ca²⁺-Calmodulin Bindung zu einer eNOS-Aktivierung (Sessa, 2004). Fulton et al. 1999 haben nachgewiesen, dass eNOS von Akt phosphoryliert wird und es durch diese Enzymaktivierung zur NO-Produktion kommt (Fulton, 1999). Michell und Dimmeler haben diese Tatsache im selben Jahr bestätigt (Dimmeler, 1999; Michell, 1999). Diese früheren Erkenntnisse spiegeln sich in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wieder. Im Phospho-Kinase-Array von MMP-9 waren bei Doxycyclin-Induktion sowohl das P-Akt als auch das P-eNOS erniedrigt. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Überexpression von Osteopontin bei Gliomzellen über den Akt-eNOS-NO-Signalweg zur gesteigerten Angiogenese führt (Wang, 2011).

Im Jahr 2008 zeigte Lim et al., dass die verminderte Phosphorylierung von eNOS die Tumorentstehung verhindert und die Tumoraufrechterhaltung verringert. Dies lässt vice versa vermuten, dass der PI3K–Akt–eNOS–(wild-type)-Ras Signalweg zum Tumorwachstum führt. Diese Aussage wurde an eNOS-knockout Mausmodellen nach der Injektion mit Pankreas-Tumorzellen ermittelt (Lim, 2008). eNOS wurde im Gefäßsystem vieler Tumore entdeckt und ging mit erhöhter Tumorangiogenese und Metastasierung einher. Ying beschrieb, dass niedrig pathologische NO-Werte, die durch eNOS entstanden sind, prokarzinogen wirken (Ying, 2007). NO kann zu einem Effekt, die im Zusammenhang mit der Tumorausbreitung stehen, modulieren (Invasion, Angiogenese, Metastasierung, Apoptose), zum anderen wurden antitumorale Aktivitäten beschrieben (Choudhari, 2013). Die Zellen mit Doxycyclin-Induktion wiesen in unseren durchgeführten Versuchen bei MMP-9 geringere Mengen an phosphoryliertem eNOS auf. MMP-9 könnte eventuell einen tumorhemmenden und anti-angiogenetischen Einfluss auf die kolorektalen Karzinomzellen haben. Ob sich der antitumorale Einfluss in *in vivo* Experimenten bestätigen lässt, bleibt zu überprüfen.

Neuste Untersuchungen konnten sogar eine Relevanz einzelner Basenpaar-Variationen von eNOS auf die Therapienebenwirkungen von Bevacizumab nachweisen. Der Angiogenese-Hemmer Bevacizumab kann, je nach eNOS-Polymorphismus und -menge bei Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom das Risiko einer Hypertension erhöhen (Di Salvatore, 2017).

4.2.4 Keine signifikante Regulation beim Phospho-Kinase Array von PEX-9

Im Phospho-Kinase Array der PEX-9 zeigten sich keine eindeutigen Unterschiede in der Phosphorylierung mit und ohne Doxycyclin-Induktion. Dennoch ist es möglich, dass Unterschiede der Regulation verschiedener Signalwege existieren, die durch diesen Array nicht erfasst wurden.

4.2.5 Relevanz der mit eNOS interagierenden Gene

Bei der Regulation von Signalwegen gibt es zahlreiche Interaktionen. Daher haben wir die regulierenden Gene von eNOS auf ihre Genexpression überprüft. Aus der Literatur ist bekannt, dass VEGF eNOS induziert (Tanimoto, 2002). Es gibt noch viele weitere Proteine, die eNOS regulieren und mit eNOS interagieren, je nach Lokalisation von eNOS: z.B. das heat shock protein 90 (hsp90), Caveolin-1, Protein-Kinase A (PKA) oder Östrogene (Fleming und Busse, 2003; Förstermann und Sessa, 2012; Siragusa und Fleming, 2016). Wir haben uns bei den weiteren Untersuchungen auf die Karzinom-relevanten Proteine fokussiert.

4.2.5.1 VEGF

Die Angiogenese ist ein wichtiger Faktor bei der Tumorentstehung und Metastasierung. Der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ist ein Zytokin, das für die physiologische Angiogenese notwendig ist. Er wird aber auch von vielen Tumoren gebildet (Senger, 1993). Das Gen, welches für VEGF codiert, liegt auf Chromosom 6 (Vincenti, 1996). Ein hoher VEGF-Level konnte bei Patienten mit kolorektalem Karzinom besonders bei denjenigen mit Lymphknotenmetastasen gefunden werden. Das Gesamt-VEGF war bereits bei Adenomen im Vergleich zur gesunden Mukosa erhöht. Die zwei Isoformen 121 und 165 waren im Tumorgeewebe signifikant gesteigert (George, 2001). Dies lässt vermuten, dass VEGF einen Einfluss auf die Tumorstreuung hat. Auch Wong et al. haben gezeigt, dass die VEGF-Menge im Verlauf der Adenom-Karzinom-Sequenz stetig zunimmt. Dies bedeutet, dass der Grundstein der

Diskussion

Angiogenese schon in der prämaligen Phase der Tumorentstehung gelegt wird. Der Hauptbildungsort des VEGFs sind die Tumorzellen selbst (Wong, 1999). Die Hemmung von VEGF oder seinem Rezeptor führt zu vermindertem vaskulären Wachstum und somit zu einer Tumorreduktion und verminderter Metastasierung (Ferrara, 2004). Willett et al. zeigten, dass die Blockade von VEGF mittels eines anti-VEGF-Antikörpers (Bevacizumab) die Tumorperfusion und Gefäßdichte bei Patienten mit kolorektalem Karzinom senkt (Willett, 2004). In neueren Versuchen konnte intrazelluläres VEGF als intrakriner „Überlebensfaktor“ kolorektaler Karzinomzellen ausgemacht werden. Durch einen VEGF-knockout konnte in Zellkulturversuchen bei HCT116, SW-480 und HT29 Zellen vermindertes Zellwachstum, vermehrte Apoptose und erhöhte Chemosensitivität festgestellt werden (Bhattacharya, 2016). In einer weiteren Studie beleuchtete Lee verschiedene Aktivierungsformen des VEGF durch MMPs. Durch MMP gespaltenes VEGF führte zur Erweiterung bereits bestehender Gefäße, kaum aber zur Neovaskularisation. Im Gegenteil dazu förderte MMP-resistentes VEGF das Wachstum vieler kleiner Gefäße (Lee, 2005).

Eine Zellkulturstudie demonstrierte, dass die bereits beschriebene eNOS-Aktivierung mittels Phosphorylierung durch Akt für die VEGF-vermittelte Migration der endothelialen Zellen notwendig ist (Dimmeler, 2000). Auch VEGF kann eNOS regulieren. Bei Endothelzellen (HUVEC) wurde bereits früh eine erhöhte Menge an eNOS unter VEGF-Inkubation festgestellt und eine hierdurch erhöhte Freisetzung von NO. Dies führte *in vitro* zu einer Endothelzellproliferation (Papapetropoulos, 1997). Yang et al. zeigten ebenfalls, dass VEGF zu einer erhöhten Aktivität von eNOS und NO-Produktion führt, was zur Blutgefäßausbildung durch endotheliale Vorläuferzellen, Proliferation der Vorläuferzellen und zur Differenzierung dieser Zellen notwendig ist (Yang, 2012).

Unsere Versuche zeigten bei den Zellen mit Doxycyclin-Induktion beim MMP-9-Konstrukt einen Abfall von eNOS und VEGF im Vergleich zur Kontrolle. Es könnte durch den Abfall von eNOS und VEGF zu einer verminderten Angiogenese im Tumor kommen. Fukumura et al. konnten nach Hinzufügen von VEGF eine verringerte Angiogenese bei Untersuchungen von eNOS-knock-out-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp feststellen. eNOS konnte hierbei als ein Vermittler der VEGF-induzierten Angiogenese eruiert werden (Fukumura, 2001).

4.2.5.2 MYB

In unseren Untersuchungen zeigt sich in kolorektalen Tumorzellen eine gesteigerte Expression von MYB auf mRNA-Ebene beim MMP-9-Konstrukt unter Doxycyclin-Induktion im Vergleich zum Vektor. Zur MYB-Familie gehören die Untergruppen A, B und c-Myb. Das Onkogen entstammt dem Avian Myeloblastosis Virus (AMV), das 1941 isoliert wurde (Hall, 1941). Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor. Er besteht aus einer N-terminalen DNA-Bindungsdomäne, einer zentralen Transaktivationsdomäne und einer C-terminalen Regulationsdomäne (Oh, 1999). MYB wurde in vielen Kolonkarzinomzelllinien gefunden (Trainer, 1988). Biroccio et al. untersuchten kolorektale Tumore von über neunzig Patienten und konnten eine erhöhte Expression von c-Myb mit einer schlechteren Prognose in Verbindung bringen. Die Überexpression von c-Myb war mit verminderter Apoptose in den Tumorzellen assoziiert (Biroccio, 2001). Die Kolonzellendifferenzierung wird durch MYB verhindert (Ramsay, 2005). Hugo et al. konnten Mutationen des Intron I von MYB als Ursache der Überexpression von MYB beim kolorektalen Karzinom ausmachen (Hugo, 2006). In einem transgenen Mausmodell mit kolorektalen Zellen ergab sich bei MYB-Überexpression eine schlechte Prognose. Zudem konnte eine Interaktion von MYB mit Tumorsuppressorgenen und Zellzyklusregulatoren nachgewiesen werden (Malaterre, 2016). Tichý et al. stellten bei Patienten mit metastasiertem KKR einen negativen Zusammenhang zwischen dem c-Myb Proteinlevel und der metastatischen Streuung fest (Tichý, 2016).

4.3 LIMITATIONEN DER ARBEIT

Die in diesem Projekt durchgeführten Charakterisierungen basierten auf Zellkulturexperimenten. Da es sich um *in vitro* Untersuchungen handelte, war der Einfluss des umliegenden Gewebes (Stromazellen) auf die Expressionskonstrukte PEX-9 und MMP-9 in SW-620 Zellen nicht zu eruieren. In Bezug auf MMP-9 haben viele Arbeitsgruppen herausgefunden, dass die Expression dieser Protease von den Stromazellen ausgeht (Huang, 2002; Giraud, 2004; Pellikainen, 2004). Der Interaktion zwischen Tumorzellen und dem Gewebe kommt eine große Bedeutung zu, besonders bei der Angiogenese, der Invasion und der Metastasierung, weshalb weitere *in vivo* Untersuchungen im Mausmodell auf Basis der in dieser Arbeit stabil transfizierten Zellen begonnen wurden.

In den durchgeführten Versuchen kam die kolorektale Zelllinie SW-620 zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um eine kolorektale Karzinomzelllinie, die in Mäusen relativ schnell solide Tumore ausbildet (Trainer, 1988). Des Weiteren konnte in vorausgegangenen Forschungsarbeiten nachgewiesen werden, dass diese Zelle auf PEX-9 reagiert (Burg-Roderfeld, 2007). SW-620 stammt von einer Metastase eines kolorektalen Karzinoms eines 51-jährigen kaukasischen Mannes. Für unsere Versuche wurden sechs verschiedene Konstrukte erstellt, die anschließend stabil in SW-620 transfiziert wurden. Um die Tauglichkeit der Modell-Konstrukte bezüglich der Aussagen zu den Signalwegen bei den Tumorzellen *in vivo* zu bekräftigen, ist die Bestätigung durch Experimente mit weiteren kolorektalen Zelllinien, z.B. LS174T, geplant. Es existieren unterschiedliche kolorektale Karzinomzelllinien mit unterschiedlichen Genmutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (*BRAF*, *KRAS* und *PIK3*) (Ahmed, 2013). Deren Einfluss auf MMP-9 und PEX-9 im Zusammenhang mit Tumorzellwachstum und -invasion konnte mit der vorliegenden Arbeit nicht überprüft werden.

4.4 AUSBLICK

Es fehlen Daten über den Einfluss von PEX-9 und MMP-9 auf solide Tumore des Gastrointestinaltrakts und besonders auf kolorektale Karzinomzellen. Ausgehend von dieser Dissertation ergeben sich einige interessante Anhaltspunkte, die tiefergehend untersucht werden können: Wie wird die Angiogenese der Tumore durch MMP-9 und PEX-9 beeinflusst? Lassen sich in den soliden Tumoren Unterschiede der eNOS-, MYB- und VEGF-Expression je nach Expressionskonstrukt nachweisen? Es wurde hier ein wichtiges Modell zur weiteren Untersuchung der PEX-9 entwickelt. Um die Bedeutung *in vivo* zu analysieren, ist die Charakterisierung der SW-620 Zellen mit den drei Expressionskonstrukten im Mausmodell und ihre Auswirkung auf die Tumorgröße, das Tumorwachstum, die Histologie und vor allem die Metastasierung von Bedeutung. Langfristig gesehen ist das erstrebenswerte und wichtigste Ziel, Gene bzw. Proteine zu identifizieren, die in die Metastasierung kolorektaler Karzinomzellen primär und sekundär involviert sind. Es gilt herauszufinden, in welchem Tumorstadium welche Faktoren aktiviert werden, um diese gezielt inhibieren zu können (Duffy, 2008).

Wichtige Fragen, die in den folgenden Jahren im Mausmodell beantwortet werden müssen, sind:

Diskussion

1. Lassen sich Angiogenese und Metastasierung von kolorektalen Karzinomzellen im Mausmodell durch PEX-9 beeinflussen?

2. Welche intrazellulären Signalwege werden aktiviert?

Nur wenn diese Fragen beantwortet sind, werden sich potentielle neue antitumorale Strategien entwickeln lassen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist der dritthäufigste maligne Tumor der westlichen Welt. Durch verschiedene Mutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen entsteht durch die sogenannte Adenom-Karzinom-Sequenz aus gesundem Gewebe ein Kolonkarzinom. Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist einer der wichtigsten Regulatoren der Zell- und Gewebefunktion. Ein wesentlicher Bestandteil der EZM sind die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Diese spielen insbesondere beim Gewebeumbau eine wichtige Rolle. Derzeit sind über 23 MMPs bekannt. Sie werden durch die Tumorzellen selbst oder vom umliegenden Gewebe produziert und sind bedeutsam für die Entstehung, Invasivität und Metastasierung von malignen Zellen. Beim kolorektalen Karzinom sind vor allem die Gelatinasen (MMP-9 und MMP-2) involviert. MMP-9 kommt im kolorektalen Karzinom und dessen Umgebung vor und besteht aus einem Signalpeptid, einem Propeptid, einem katalytischen Zentrum, einer Fibronectin Typ II Domäne, der Hinge-Region und einer Hämpexin-ähnlichen Domäne (PEX). Die Hämpexindomäne hat die Form eines vierblättrigen Propellers und reguliert die Substratbindung. Versuche, unspezifische Breitband-Inhibitoren der MMPs zu generieren, zeigten in klinischen Studien keinen Benefit. Jedoch konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die Hämpexindomäne von MMP-9 (PEX-9) die Invasivität und Angiogenese von Glioblastomzellen hemmt und die Zellmigration von malignen Melanomzellen reduziert. Ergebnisse, die das kolorektale Karzinom und KRK-Zellen betreffen, fehlten bislang.

In dieser Dissertation wurden Doxycyclin-induzierbare kolorektale Zelllinien (SW-620) stabil transfiziert. Durch die Doxycyclin-induzierbare Expression von MMP-9 und PEX-9 in diesen Zellen wurde eine Basis für weitere Untersuchungen *in vivo* geschaffen. MMP-9 und PEX-9 wurden zunächst in den Vektor pLVX-TRE3G-ZsGreen1 kloniert. Die Expression der Konstrukte in Zellen wurde erfolgreich auf RNA- und Proteinebene verifiziert. Die transgenen Zellen wurden im Rahmen eines proof of principle Nacktmäusen injiziert und bildeten allesamt Tumore aus. Die erfolgreiche Etablierung der transgenen Zellen liefert die Grundlage für weitere *in vivo* Analysen zur Tumorentstehung und der darin involvierten Signalwege. Inwiefern PEX-9 die Angiogenese, das Tumorwachstum, die Invasivität und die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms *in vivo* beeinflusst, wird in laufenden Nacktmausmodellen untersucht. Hieraus können Möglichkeiten für neue antitumorale Therapien entwickelt werden.

Zusammenfassung

In vitro wurden Unterschiede zwischen MMP-9 und PEX-9 transgenen Zellen untersucht. Im Phosphokinase-Array zeigte sich eine deutlich schwächere Phosphorylierung von eNOS und Akt nach MMP-9-Induktion. Bei der Kontrolle auf Protein- und RNA-Ebene konnten weitere Unterschiede nachgewiesen werden. VEGF wurde vermindert exprimiert und MYB vermehrt. Die verminderte Phosphorylierung von eNOS kann Tumorwachstum reduzieren und eine geringere Menge an VEGF kann zu einer Reduktion der Angiogenese führen. MYB verhindert die Zelldifferenzierung in Kolonzellen und die Apoptose der Karzinomzellen. Die Bedeutung dieser *in vitro* Erkenntnisse ist in weiteren Zell- und Mausversuchen zu spezifizieren.

SUMMARY

The colorectal carcinoma is the third-most common malignant tumor in the western world. A colon carcinoma develops from healthy tissue through the so called adenoma carcinoma sequence by mutations taking place in oncogenes or tumorsuppressorgenes. The extracellular matrix (ECM) is one of the most important regulators of the cell and tissue function. Matrix metalloproteinases (MMPs), which are essential components of the ECM, play a key role particularly within the tissue rebuilding process. Currently, more than 23 matrix metalloproteinases are known. They have a leading impact in tumorigenesis, invasivity and metastatic spread due to their production in the tumor cells and the surrounding tissue. The gelatinases (MMP-9 and MMP-2) are especially involved in the genesis of the colorectal carcinoma. MMP-9 is found in the colorectal carcinoma and its surroundings and consists of a signal-peptid, a propeptid, a catalytic centre, a fibronectin type II domain, the hinge-region and a hemopexin-like domain (PEX). The hemopexin domain is shaped like a four-bladed propeller and regulates the substrate connection. Attempts to generate unspecific broadband inhibitors of the MMPs proved unsuccessful in clinical studies. However, it could be shown, that PEX-9 inhibits invasivity and angiogenesis of glioblastoma cells and reduces migration of malignant melanoma cells. Results concerning the colorectal carcinoma and CRC cells were missing.

Doxycycline-induced colorectal cell lines (SW-620) were stable transfected as part of this work. A base for further *in vivo* research could thus be laid by stably expression MMP-9 and PEX-9. MMP-9 and PEX-9 were cloned in the vector pLVX-TRE3G-ZsGreen1. The expression was controlled successfully at RNA and protein levels. In further *in vivo* experiments, the transgenic cells could be injected in nude-mice, all of which developed tumors. The successful establishment of transgenic cells lays the foundation for further *in vivo* examinations of tumor genesis and pathways involved. The extent of PEX-9 effects on angiogenesis, tumor growth, invasivity and metastatic spread *in vivo* is subject of mouse models currently conducted. New possibilities for anti-tumoral therapies could be derived from these models.

In a second step, the differences between MMP-9 and PEX-9 transgenic cells were examined *in vitro*. The phosphokinase-array showed a notably weaker phosphorylation of eNOS and

Zusammenfassung

Akt showed in MMP-9 induction. Review at protein and RNA level revealed even more differences. VEGF was also expressed in reduced amount, while MYB was increased. Diminished phosphorylation of eNOS may reduce tumorgrowth. Lower amount of VEGF leads to a reduction in angiogenesis. MYB prevents cell differentiation in colorectal cells and apoptosis of the carcinoma cells. The meaning and significance of this in vitro assaying are to be specified in additional cell and mouse experiments.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC-Gen	Adenomatöses Polyposis Coli Gen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
CEA	karzinoembryonales Antigen
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CMV-Promotor	cytomegalovirus immediate-early promoter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxycyclin
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1-alpha	human elongation factor 1 α promoter
EGF	Epithelial Groth Faktor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EZM	extrazelluläre Matrix
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis coli
FBS	Fetal Bovine Serum
FOBT	fäkaler okkultter Bluttest
G	Gauge
GFP	green fluorescent protein

Abkürzungsverzeichnis

ggf.	gegebenenfalls
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HNPCC	hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom
HRP	Meerrettichperoxidase
Hsp90	heat shock protein 90
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
kDa	Kilodalton
KRK	kolorektales Karzinom
LZE	Langzeitexperiment
µl	Mikroliter
mA	Milliampere
MAP-Kinase	mitogen-activated protein Kinase
MCS	Multiple Cloning Site
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMPI	Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor
mRNA	Messenger-RNA
MT-MMP	membranständige Matrix-Metalloproteinase
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenin dinukleotidphosphat
nm	Nanometer
NTC	Non Template Control
PAGE	Polyacrylamid gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin, Streptomycin

Abkürzungsverzeichnis

PEX	Hämopexindomäne
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Protein-Kinase A
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT	quantitative Real time
R	Residualtumor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real time Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sek	Sekunde
TBS-T	Tris-Buffered Saline mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEA	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N,N,-Tetramethyldiamin
TGF	Transforming Growth Faktor
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
Tris	Tris(Hydroxy)aminomethan
UICC	Union internationale contre le cancer
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	zum Beispiel
ZP	Zeitpunkt

Nukleobasen:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

7 TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Tabelle 1: Darmkrebs-Statistik	2
Tabelle 2: UICC-Stadieneinteilung	6
Tabelle 3: TMN-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms	7
Tabelle 4: MMPs	13
Tabelle 5: Expressionskonstrukte	31
Tabelle 6: PCR-Programm MMP-9.....	33
Tabelle 7: Ligations-PCR.....	34
Tabelle 8: Restriktionsenzyme	38
Tabelle 9: Charakterisierung der Zelllinie.....	41
Tabelle 10: Antikörper-Auflistung	48
Tabelle 11: Transkriptionsprogramm	51
Tabelle 12: qRT-PCR-Programm	52
Tabelle 13: Verwendete Primer	53
Tabelle 14: Auswertung des Phospho-Kinase-Arrays von MMP-9	107
Tabelle 15: Auswertung des Phospho-Kinase-Arrays von PEX-9.....	109

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

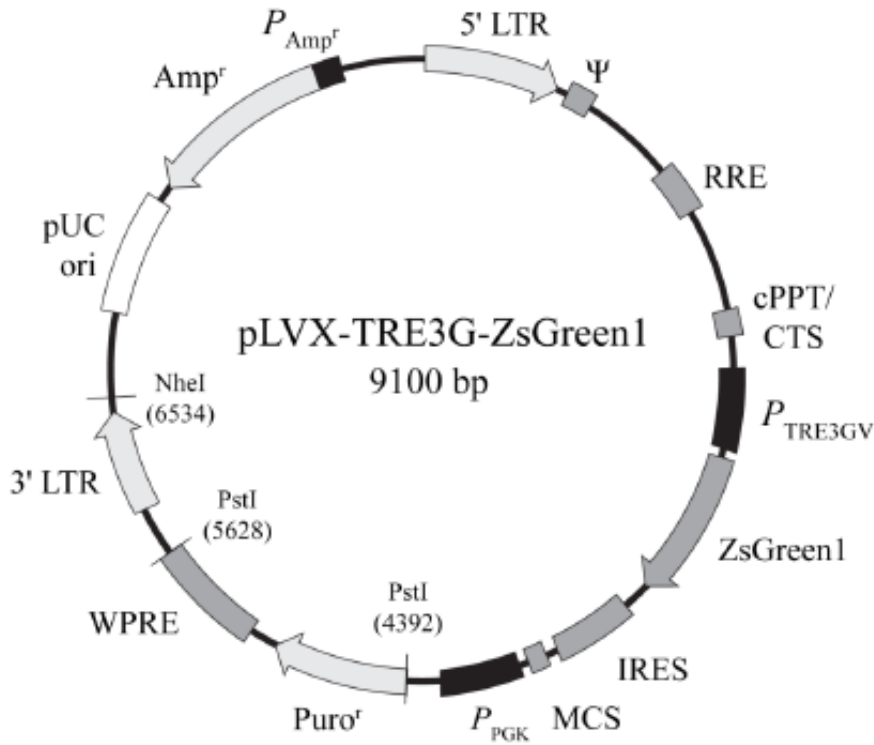
Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz.....	3
Abbildung 2: MMP-Modell	14
Abbildung 3: PCR-Temperaturprofil	52
Abbildung 4: Präparation des Vektors pLVX-TRE3G	55
Abbildung 5: Insert MMP-9.....	56
Abbildung 6: Insert PEX-9.....	57
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Klonierung.....	58
Abbildung 8: Klonierungskontrolle	59
Abbildung 9: Präparation des Vektors pLVX-TRE3G-ZsGreen1	60
Abbildung 10: Kontrolle der Gelextraktion	60
Abbildung 11: Klonierung in den Vektor pLVX-TRE3G-ZsGreen1	62
Abbildung 12: Klonselktion anhand der ZsGreen1-Fluoreszenz	64
Abbildung 13: Nachweis der PEX-9- und MMP-9-Expression.....	67
Abbildung 14: Expression von MM-9 bei unterschiedlicher Doxycyclin-Exposition.....	68
Abbildung 15: Langzeitexposition mit Doxycyclin	69
Abbildung 16: Schablone der Membranen A und B des Phospho-Kinase-Arrays.....	70
Abbildung 17: Proteom Profiler MMP-9	72
Abbildung 18: Auswertung des Proteom Profilers	73
Abbildung 19: Proteom Profiler PEX-9	74
Abbildung 20: Genexpression auf mRNA-Ebene	76
Abbildung 21: Western-Blot	77

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abbildung 22: Tumorwachstum der Expressionskonstrukte nach subkutaner Injektion im Nacktmausmodell.....	78
Abbildung 23: Biometra® BioDoc Analyze Programm MMP-9	110
Abbildung 24: Biometra® BioDoc Analyze Programm PEX-9	111

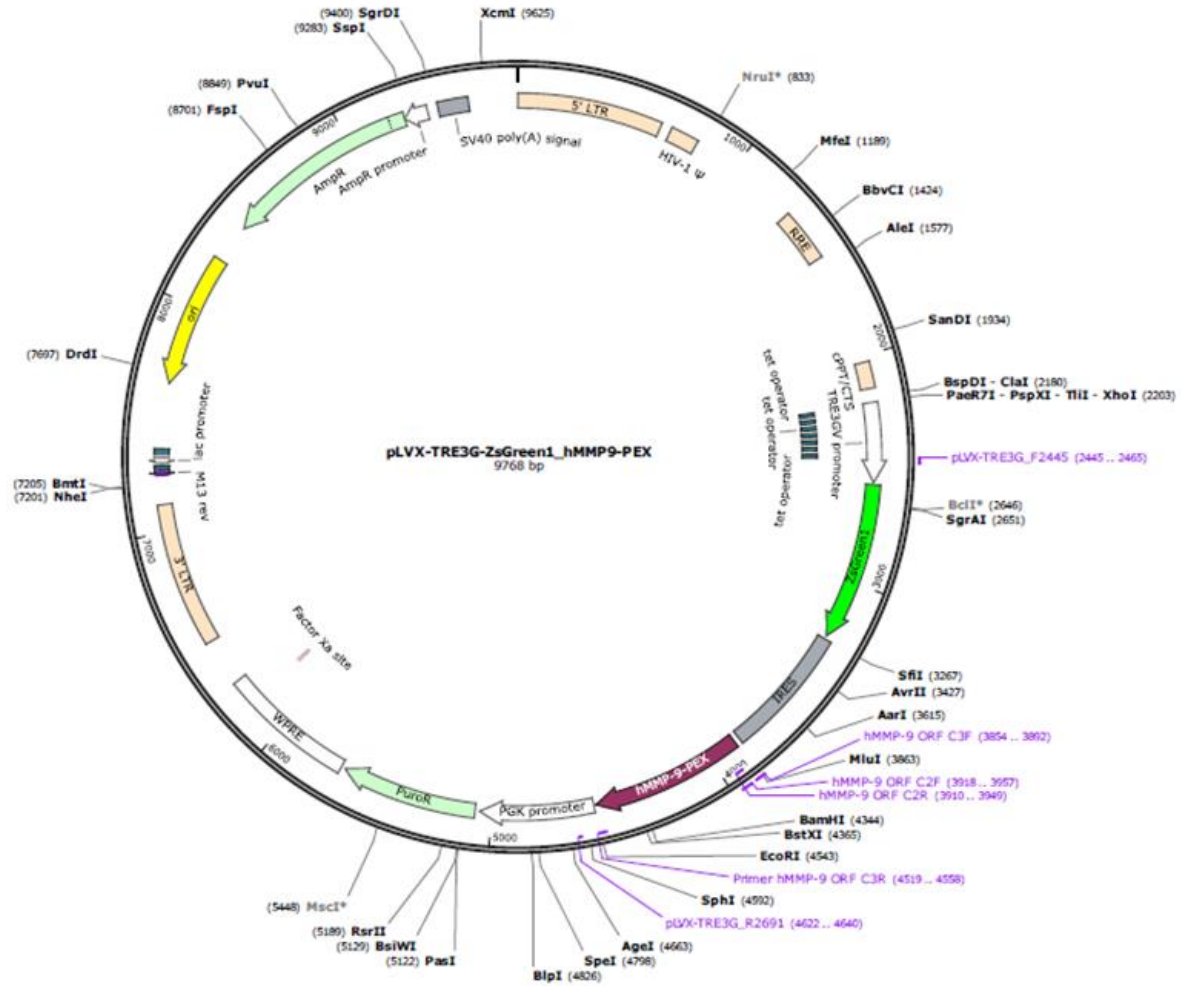
8 ANHANG

8.1 EXPRESSIONSKONSTRUKTE



	IRES			SmaI XmaI		MluI		NdeI		EcoRI		P _{PGK}		
3846	ATA	ATA	TGG	CCC	CCG	GGA	CGC	GTC	ATA	TGG	AAT	TCT	ACC	GGG
	TAT	TAT	ACC	GGG	GGC	CCT	GCG	CAG	TAT	ACC	TTA	AGA	TGG	CCC

Anhang



8.2 AUSWERTUNG DES PHOSPHOKINASE-ARRAYS

MMP-9				
Signalprotein	Phosphorylierung	DOX -	DOX +	x-fache Regulation
Referenzpunkt	-	88898	92348	0,96
p38 α	T180/Y182	18030,5	17855,5	1,01
ERK 1/2	T202/Y204, T185/Y187	19259,5	26487,5	0,73
JNK pan	T183/Y185, T221/Y223	7315	5381,5	1,36
GSK-3 α/β	S21/ S9	7316,5	5291,5	1,38
p53	S392	104061,5	89146	1,17
Referenzpunkt	-	114431,5	113446	1,01
MEK 1/2	S218/S222, S222/S226	8056,5	7208	1,12
MSK 1/2	S376/S360	28490,5	23281,5	1,22
AMPK α 1	T174	9595,5	7536	1,27
Akt	S473	5179,5	2481,5	2,09
Akt	T308	39864	30994	1,29
p53	S46	117132	91590,5	1,28
TOR	S2448	7113	8425	0,84
CREB	S133	36009	30413	1,18
HSP 27	S78/S82	22371,5	20185,5	1,11
AMPK α 2	T172	22456	18301,5	1,23
β -Catenin	-	72590	61940,5	1,17
p70 S6 Kinase	T389	4449,5	2998,5	1,48
p53	S15	112518	107983,5	1,04
p27	T198	3291	2650	1,24
Praxillin	Y118	10787,5	8982	1,20
Src	Y419	9818	10171,5	0,97
Lyn	Y397	2344,5	3041,5	0,77
Lck	Y394	2420	2608	0,93
STAT2	Y689	15725	15034	1,05
STAT5a	Y694	5940	5567	1,07
p70 S6 Kinase	T421/S424	10551	10227	1,03
RSK 1/2/3	S380/S386/S377	8293,5	8369	0,99
p27	T157	3792	3505,5	1,08
PLC γ -1	Y783	8162	6491,5	1,26
Fyn	Y420	3648,5	4548	0,80
Yes	Y426	7138,5	7049,5	1,01
Fgr	Y412	3926	3760,5	1,04
STAT3	Y705	2995,5	2114	1,42
STAT5b	Y699	8026	8718,5	0,92
p70 S6 Kinase	T229	7587	8484	0,89
RSK 1/2	S221/S227	8141	8338	0,98

Anhang

c-Jun	S63	20260,5	21006,5	0,96
Pyk2	Y402	7462	6170,5	1,21
Hck	Y411	7966,5	11219	0,71
Chk-2	T68	54408,5	59873,5	0,91
FAK	Y397	6911,5	5788,5	1,19
STAT6	Y641	27998,5	25757,5	1,09
STAT5a/b	Y694/Y699	10530,5	10495,5	1,00
STAT1	Y701	23336,5	21399	1,09
STAT4	Y693	8628	8727,5	0,99
eNOS	S1177	29571	6680,5	4,43
Negativkontrolle	-	1663,5	1600,5	1,04
Referenzpunkt	-	110514,5	108717	1,02
Negativkontrolle	-	1721,5	1194,5	1,44

Tabelle 14: Auswertung des Phospho-Kinase-Arrays von MMP-9 mittels der BioDocAnalyse Software von Biometra® tabellarisch dargestellt. Die Werte wurden je doppelt bestimmt und die Mittelwerte der Bestimmungen von DOX- und DOX+ einander gegenüber gestellt.

Anhang

PEX-9				
Signalprotein	Phosphorylierung	DOX -	DOX +	x-fache Regulation
Referenzpunkt	-	80584	91262,5	0,88
p38α	T180/Y182	62069,5	69183	0,90
ERK 1/2	T202/Y204, T185/Y187	54484,5	53478	1,02
JNK pan	T183/Y185, T221/Y223	31877,5	31137	1,02
GSK-3α/β	S21/ S9	22019,5	18194	1,21
p53	S392	104348	116861	0,89
Referenzpunkt	-	109550	111792	0,98
MEK 1/2	S218/S222, S222/S226	38563,5	38167,5	1,01
MSK 1/2	S376/S360	57278	52477	1,09
AMPKα1	T174	27421,5	25405,5	1,08
Akt	S473	12311,5	10925,5	1,13
Akt	T308	63584	58323	1,09
p53	S46	85342,5	77995	1,09
TOR	S2448	25625,50	20462	1,25
CREB	S133	46256,5	36810	1,26
HSP 27	S78/S82	33900	26175	1,30
AMPKα2	T172	56683,5	52493	1,08
β-Catenin	-	86901	95750	0,91
p70 S6 Kinase	T389	11302	11303	1,00
p53	S15	99994,5	91713	1,09
p27	T198	3572	3258,5	1,10
Praxillin	Y118	23277	21090	1,10
Src	Y419	33870,50	25860,50	1,31
Lyn	Y397	7792	7572,5	1,03
Lck	Y394	3854,5	3440	1,12
STAT2	Y689	46636,5	44839	1,04
STAT5a	Y694	22295	16687,5	1,34
p70 S6 Kinase	T421/S424	26450	29172	0,91
RSK 1/2/3	S380/S386/S377	22884	21871,5	1,05
p27	T157	9317	9254	1,01
PLCγ-1	Y783	17252,5	15950,5	1,08
Fyn	Y420	9495	12285	0,77
Yes	Y426	29236,5	22578,5	1,29
Fgr	Y412	7947	6239,5	1,27
STAT3	Y705	10739,5	9462,5	1,13
STAT5b	Y699	27496	23574	1,17
p70 S6 Kinase	T229	58571,5	57442	1,02
RSK 1/2	S221/S227	21373,5	22635	0,94
c-Jun	S63	51443,5	66179	0,78

Anhang

Pyk2	Y402	17456,5	14727	1,19
Hck	Y411	28853	25334	1,14
Chk-2	T68	67950,5	58387,5	1,16
FAK	Y397	17361,5	13754,5	1,26
STAT6	Y641	58427,5	56001	1,04
STAT5a/b	Y694/Y699	29088,5	30519	0,95
STAT1	Y701	44575	47017	0,95
STAT4	Y693	23483,5	24596,5	0,95
eNOS	S1177	5343	5193	1,03
Negativkontrolle	-	1032	982	1,05
Referenzpunkt	-	94706	86393,5	1,10
Negativkontrolle	-	857,5	831,5	1,03

Tabelle 15: Auswertung des Phospho-Kinase-Arrays von PEX-9 mittels der BioDocAnalyse Software von Biometra® tabellarisch dargestellt. Es wurde der Mittelwert der Doppelbestimmung ohne Doxycyclin dem Mittelwert mit Doxycyclin-Induktion gegenübergestellt, um die x-fache Regulation zu bestimmen.

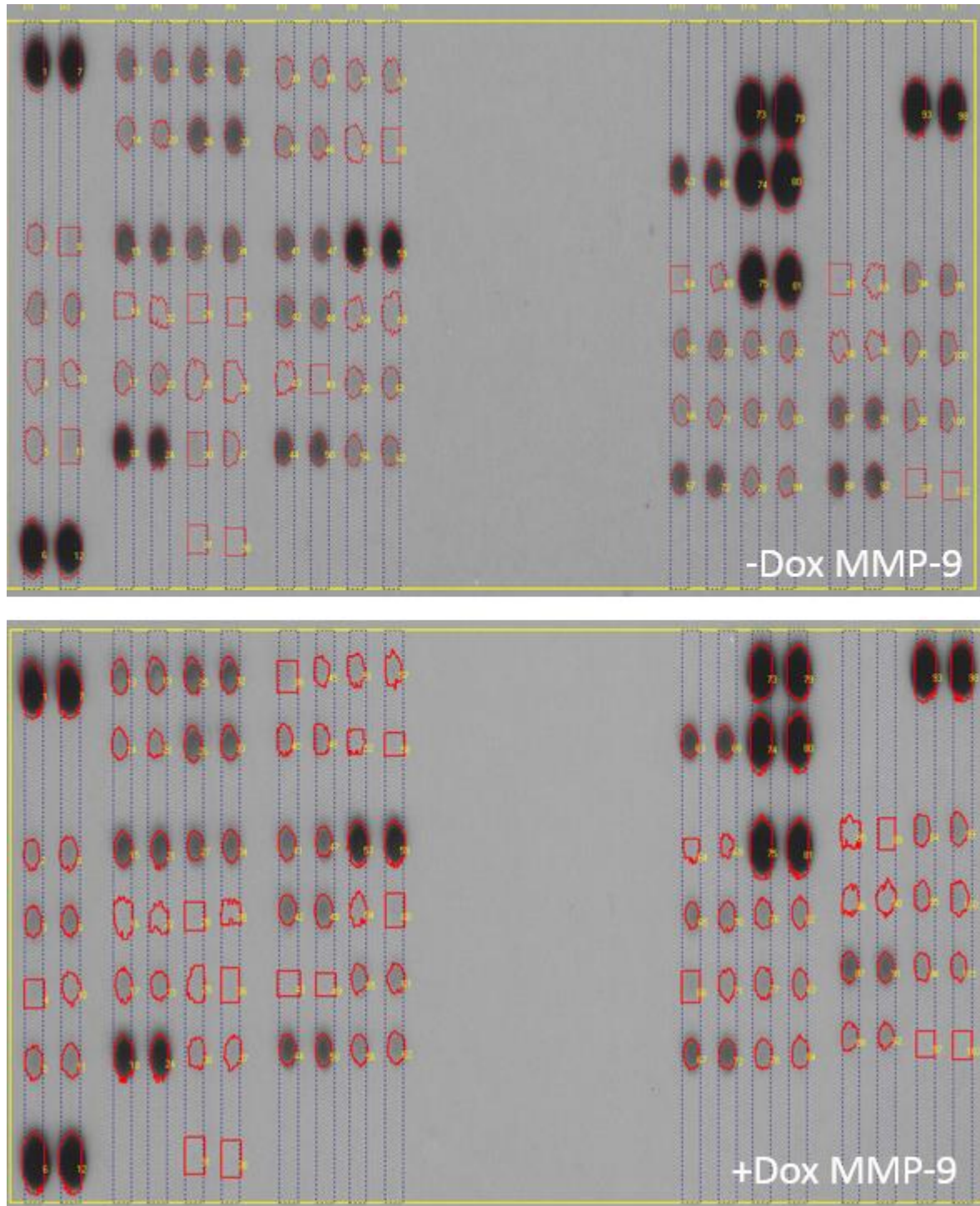


Abbildung 23: Biometra® BioDocAnalyze Programm MMP-9

Anhang

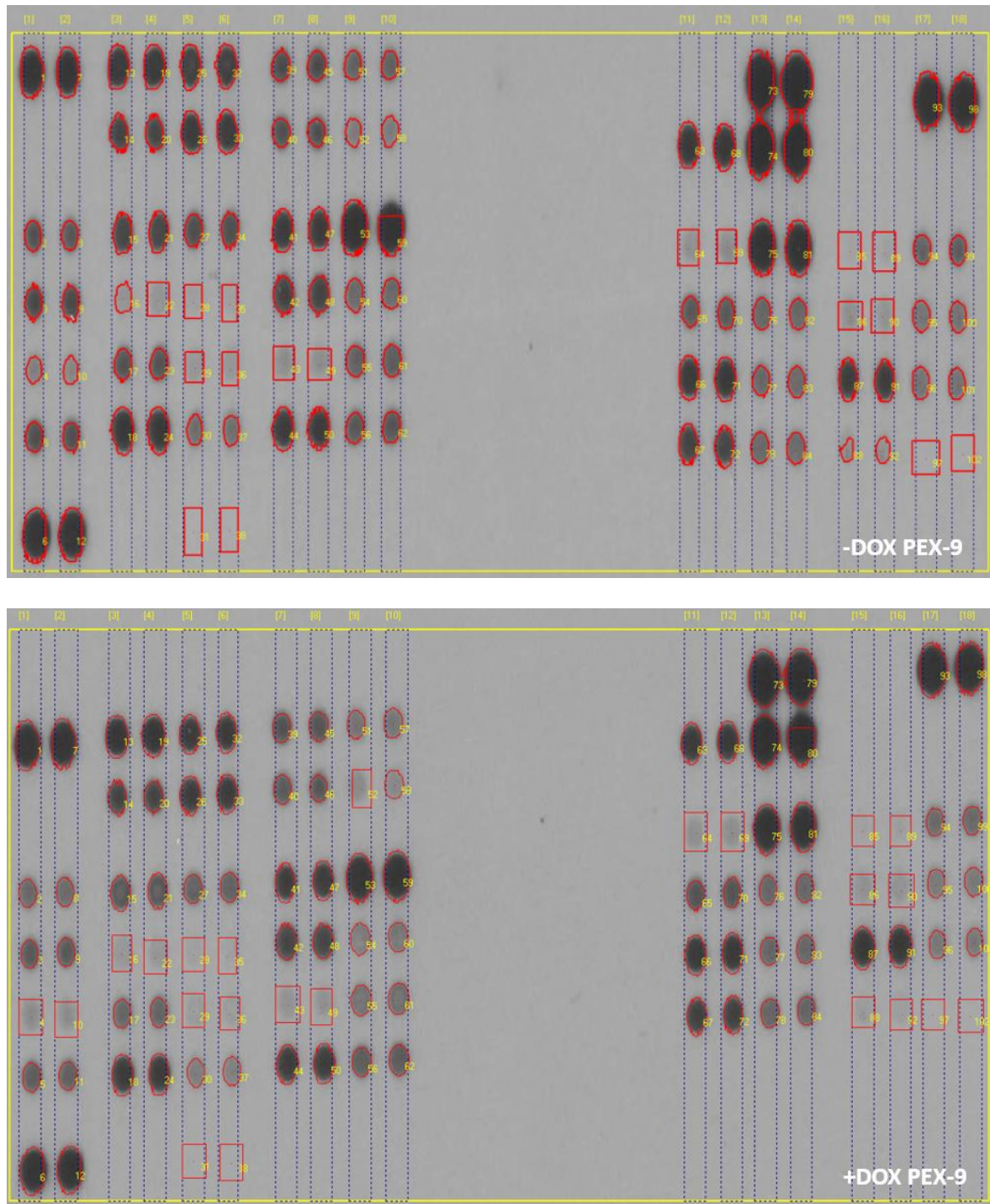


Abbildung 24: Biometra® BioDocAnalyse Programm PEX-9

9 LITERATURVERZEICHNIS

Abécassis I, Olofsson B, Schmid M, Zalzman G, Karniguian A (2003): RhoA induces MMP-9 expression at CD44 lamellipodial focal complexes and promotes HMEC-1 cell invasion. *Experimental Cell Research* 291 (2): 363–376.

Agren MS, Taplin CJ, Woessner Jr. F, Eagistein WH, Mertz PM (1992): Collagenase in Wound Healing: Effect of Wound Age and Type. *Journal of Investigative Dermatology* 99 (6): 709–714.

Ahler E, Sullivan W, Cass A, Braas D, York AG, Bensinger SJ, Graeber TG, Christofk HR (2013): Doxycycline alters Metabolism and Proliferation of Human Cell Lines. *Plos one* 8 (5): 1–7.

Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA (2013): Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* 2: 1–8.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (2014): *Molecular biology of the cell*. Garland Science, 6th edition, New York, NY.

Allan JA, Docherty A, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ (1995): Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochemical Journal* 309 (1): 299–306.

Ardi VC, Kupriyanova TA, Deryugina EI, Quigley JP (2007): Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (51): 20262–20267.

Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B (1990): CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61 (7): 1303–1313.

Aumailley M, Gayraud B (1998): Structure and biological activity of the extracellular matrix. *Journal of Molecular Medicine* 76 (3): 253–265.

Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ (2000): Matrix-Metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *The British Journal of Surgery* 87 (9): 1215–1221.

Baker EA, Leaper DJ (2002): Measuring gelatinase activity in colorectal cancer. *European Journal of Surgical Oncology* 28 (1): 24–29.

Balligand JL, Feron O, Dessye C (2009): NOS Activation by Physical Forces: From Short-Term Regulation of Contraction to Chronic Remodeling of Cardiovascular Tissues. *Physiological Reviews* 89 (2): 481–534.

Banyai L, Tordai H, Patthy L (1996): Structure and Domain-Domain Interactions of the Gelatin-binding Site of Human 72-Kilodalton Type IV Collagenase (Gelatinase A, Matrix-Metalloproteinase 2). *Journal of Biological Chemistry* 271 (20): 12003–12008.

Basset P, Okada A, Chenard M, Kannan R, Stoll I, Anglard P, Bellocq J, Rio M (1997): Matrix-Metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: Therapeutic implications. *Matrix Biology* 15 (8,9): 535–541.

Bathen TF, Holmgren K, Lundemo A, Hjelstuen MH, Krokan HE, Gribbestad IS, Schonberg SA (2008): Omega-3 Fatty Acids Suppress Growth of SW620 Human Colon Cancer Xenografts in Nude Mice. *Anticancer research* 28 (6A): 3717–3724.

Benoit de Coignac A, Elson G, Delneste Y, Magistrelli G, Jeannin P, Aubry J, Berthier O, Schmitt D, Bonnefoy J, Gauchat J (2000): Cloning of MMP-26. *European Journal of Biochemistry* 267 (11): 3323–3329.

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D (2000): Matrix-Metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature cell biology* 2: 737–744.

Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Kornprat P, Schlemmer A, Rehak P, Vieth M, Hoefler G, Langner C (2012): Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer* 118 (3): 628–638.

Bhattacharya R, Ye XC, Wang R, Ling X, McManus M, Fan F, Boulbes D, Ellis LM (2016): Intracrine VEGF Signaling Mediates the Activity of Prosurvival Pathways in Human Colorectal Cancer Cells. *Cancer Research* 76 (10): 3014–3024.

Biometra GmbH (2012): BDA Gel-Analyse-Handbuch. Anleitung zur Installation zur Durchführung der Gel-Analyse. Analytik jena company.

Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA (1993): Matrix-Metalloproteinases: A Review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 4 (2): 197–250.

Birkner BR (2003): Evidenz-basierte Prävention des kolorektalen Karzinoms. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 128 (49): 2598–2603.

Biroccio A, Benassi B, D’Agnano I, D’Angelo C, Buglioni S, Mottolese M, Ricciotti A, Citro G, Cosimelli M, Ramsay RG, Calabretta B, Zupi G (2001): c-Myb and Bcl-x Overexpression Predicts Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *American Journal of Pathology* 158 (4): 1289–1299.

Björklund M, Koivunen E (2005): Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochimica et Biophysica acta* 1755 (1): 37–69.

Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams H, Tschesche F, Maskos H, Nagase K (1999): Structural properties of Matrix-Metalloproteinases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55 (4): 639–652.

Bonnans C, Chou J, Werb Z (2014): Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (12): 786–801.

Böhm M, Hallek M, Schmiegel W (2009): *Innere Medizin*. Urban und Fischer, 6. Auflage, München.

Bramhall SR, Schulz J, Nemunaitis J, Brown PD, Baillet M, Buckels JAC (2002): A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* 87: 161–167.

Breckon JJ, Hembry RM, Reynolds JJ, Meikle MC (1995): Matrix-Metalloproteinases and TIMP-1 localization at sites of osteogenesis in the craniofacial region of the rabbit embryo. *The Anatomical record* 242 (2): 177–187.

Brenner H, Arndt V, Stürmer T, Stegmaier C, Ziegler H, Dohm G (2001): Long-lasting reduction of risk of colorectal cancer following screening endoscopy. *British Journal of Cancer* 85 (7): 972–976.

Brenner H, Kretschmann J, Stock C, Hoffmeister M (2016): Expected long-term impact of screening endoscopy on colorectal cancer incidence: a modelling study. *Oncotarget* 7 (30): 48168–48179.

Brew K, Dinakarandian D, Nagase H (2000): Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1477 (1,2): 267–283.

Brooks AR, Harkins RN, Wang P, Qian HS, Liu P, Rubanyi GM (2004): Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *The Journal of Gene Medicine* 6 (4): 395–404.

Buhmeida A, Bendardaf R, Hilska M, Collan Y, Laato M, Syrjänen S, Syrjänen K, Pyrhönen S (2009): Prognostic significance of Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) in stage II colorectal carcinoma. *Journal of gastrointestinal cancer* 40: 91–97.

Burg-Roderfeld M, Roderfeld M, Wagner S, Henkel C, Grötzing J, Roeb E (2007): MMP-9-hemopexin domain hampers adhesion and migration of colorectal cancer cells. *International Journal of Oncology* 30: 985–992.

Cammà C, Giunta M, Fiorica F, Pagliaro L, Craxì A, Cottone M (2000): Preoperative Radiotherapy for Resectable Rectal Cancer A Meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association* 284 (8): 1008–1015.

Cha H, Kopetzki E, Huber R, Lanzendörfer M, Brandstetter H (2002): Structural Basis of the Adaptive Molecular Recognition by MMP9. *Journal of Molecular Biology* 320 (5): 1065–1079.

Chambers AF, Matrisian LM (1997): Changing views of the role of Matrix-Metalloproteinases in metastasis. *Journal of the National Cancer Institute* 89 (17): 1260–1270.

Chok KS, Law WL (2007): Prognostic factors affecting survival and recurrence of patients with pT1 and pT2 colorectal cancer. *World Journal of Surgery* 31 (7): 1485–1490.

Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V (2013): Nitric oxide and cancer: a review. *World Journal of Surgical Oncology* 11: 1–11.

Chu D, Zhao Z, Zhou Y, Li Y, Li J, Zheng J, Zhao Q, Wang W (2012): Matrix-Metalloproteinase-9 is associated with relapse and prognosis of patients with colorectal cancer. *Annals of Surgical Oncology* 19 (1): 318–325.

Citarda F, Tomasella G, Capocacciab R, Barcherinib S, Crespia M (2001): Efficacy in standard clinical practice of colonoscopic polypectomy in reducing colorectal cancer incidence. *Gut* 48 (6): 812–815.

Coëffier M, Claeysens S, Bensifi M, Leclaire S, Boukhettala N, Maurer B, Donnadieu N, Lavoinne A, Cailleux A, Dechélotte P (2011): Influence of leucine on protein metabolism, phosphokinase expression, and cell proliferation in human duodenum. *The American Journal of Clinical Nutrition* 93 (6):1255–1262.

Cohen P (2001): The role of protein phosphorylation in human health and disease. *The FEBS Journal* 268 (19): 5001–5010.

Collier IE, Krasnov PA, Strongin AY, Birkedal-Hansen H, Goldberg GI (1992): Alanine Scanning Mutagenesis and Functional Analysis of the Fibronectin-like Collagen-binding Domain from Human 92-kDa Type IV Collagenase. *Journal of Biological Chemistry* 267: 6776–6781.

Collins HM, Morris TM, Watson SA (2001): Spectrum of Matrix-Metalloproteinase expression in primary and metastatic colon cancer: relationship to the tissue inhibitors of metalloproteinases and membrane type-1-Matrix-Metalloproteinase. *British Journal of Cancer* 84 (12): 1664–1670.

Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS (2000): Prognostic Factors in Colorectal Cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 124 (7): 979–994.

Correia AL, Mori H, Chen EI, Schmitt FC, Bissell MJ (2013): The hemopexin domain of MMP3 is responsible for mammary epithelial invasion and morphogenesis through extracellular interaction with HSP90 β . *Genes & development* 27: 805–817.

Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z (2000): MMP-9 Supplied by Bone Marrow-Derived Cells Contributes to Skin Carcinogenesis. *Cell* 103 (3): 481–490.

Cox TR, Ertler JT (2011): Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Disease models & mechanisms* 4: 165–178.

Crysanndt M, Hempfing B, Wilms M (2010): *Facts Innere Medizin. Kolorektales Karzinom.* KVM der Medizinverlag, 1. Auflage: 233–238, Marburg.

Curran S, Murray G (2000): Matrix-Metalloproteinases. *European Journal of Cancer* 36 (13): 1621–1630.

Davies B, Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow LG, Rubens RD, Balkwill FR (1993): Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *British Journal of Cancer* 67 (5): 1126–1131.

Davies B, Waxman J, Wasan H, Abel P, Williams G, Krausz T, Neal D (1993): Levels of Matrix Metalloproteases in Bladder Cancer Correlate with Tumor Grade and Invasion. *Cancer Research* 53 (22): 5365–5369.

Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003): A decade of caspases. *Oncogene* 22: 8543–8567.

Deryugina EI, Quigley JP (2006): Matrix-Metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer metastasis reviews* 25 (1): 9–34.

Devy L, Huang L, Naa L, Yanamandra N, Pieters H, Frans N, Chang E, Tao Q, Vanhove M, Lejeune A, van Gool R, Sexton DJ, Kuang G, Rank D, Hogan S, Pazmany C, Ma YL, Schoonbroodt S, Nixon AE, Ladner RC, Hoet R, Henderikx P, Tenhoor C, Rabbani SA, Valentino ML, Wood CR, Dransfield DT (2009): Selective inhibition of Matrix-Metalloproteinase-14 blocks tumor growth, invasion, and angiogenesis. *Cancer Research* 69 (4): 1517–1526.

Di Girolamo N, Indoh I, Jackson N, Wakefield D, McNeil HP, Yan W, Geczy C, Arm JP, Tedla N (2006): Human Mast Cell-Derived Gelatinase B (Matrix-Metalloproteinase-9) Is Regulated by Inflammatory Cytokines: Role in Cell Migration. *The Journal of Immunology* 177 (4): 2638–2650.

Dietel M, Suttorp N, Zeitz M (2012): *Harrisons Innere Medizin.* ABW Wissenschaftsverlag, 18. Auflage, Berlin.

Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM (2000): Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at Ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Letters* 477 (3): 258–262.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999): Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601–605.

Di Salvatore M, Pietrantonio F, Orlandi A, Del Re M, Berenato R, Rossi E, Caporale M, Guarino D, Martinetti A, Basso M, Mennitto R, Santonocito C, Mennitto A, Schinzari G, Bossi I, Capoluongo E, Danesi R, de Braud F, Barone C (2017): IL-8 and eNOS polymorphisms predict bevacizumab-based first-line treatment outcomes in RAS mutant metastatic colorectal cancer patients. *Oncotarget* 8 (10): 16887–16898.

Dragutinovic V, Radonjic N, Petronijevic N, Tatic S, Dimitrijevic I, Radovanovic N, Krivokapic Z (2011): Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and -9 (MMP-9) in preoperative serum as independent prognostic markers in patients with colorectal cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry* 355 (1): 173–178.

Duffy MJ, Lamerz R, Haglund C, Nicolini A, Kalousová M, Holubec L, Sturgeon C (2014): Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update. *International Journal of Cancer* 134 (11): 2513–2522.

Duffy MJ, McGowan PM, Gallagher WM (2008): Cancer invasion and metastasis: changing views. *The Journal of pathology* 214 (3): 283–293.

Dufour A, Sampson NS, Li J, Kuscu C, Rizzo RC, Deleon JL, Zhi J, Jaber N, Liu E, Zucker S, Cao J (2011): Small-molecule anticancer compounds selectively target the hemopexin domain of Matrix-Metalloproteinase-9. *Cancer Research* 71 (14): 4977–4988.

Dufour A, Sampson NS, Zucker S, Cao J (2008): Role of the hemopexin domain of Matrix-Metalloproteinases in cell migration. *Journal of Cellular Physiology* 217 (3): 643–651.

Dufour A, Zucker S, Sampson NS, Kuscu C, Cao J (2010): Role of Matrix-Metalloproteinase-9 dimers in cell migration: design of inhibitory peptides. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (46): 35944–35956.

Egeblad M, Werb Z (2002): New functions for the Matrix-Metalloproteinases in cancer progression. *Nature reviews. Cancer* 2: 161–174.

Eich HT, Stepien A, Zimmermann C, Hellmich M, Metzger R, Hölscher A, Müller R (2011): Neoadjuvant radiochemotherapy and surgery for advanced rectal cancer. Prognostic significance of tumor regression. *Strahlentherapie und Onkologie: Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 187 (4): 225–230.

Engel J (1989): EGF-like domains in extracellular matrix proteins: Localized signals for growth and differentiation? *FEBS Letters* 251 (1,2): 1–7.

Ezhilarasan R, Jadhav U, Mohanam I, Rao JS, Gujrati M, Mohanam S (2009): The hemopexin domain of MMP-9 inhibits angiogenesis and retards the growth of intracranial glioblastoma xenograft in nude mice. *International Journal of Cancer* 124 (2): 306–315.

Fearon ER, Vogelstein B (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 (5): 759–767.

Ferrara N, Hillan KJ, Gerber H, Novotny W (2004): Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature reviews Drug discovery* 3: 391–400.

Fleming I, Busse R (2003): Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology* 284 (1): R1–R12.

Förstermann U, Sessa WC (2012): Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal* 33 (7): 829–837.

Friedenreich CM, Orenstein MR (2002): Physical Activity and Cancer Prevention: Etiologic Evidence and Biological Mechanisms. *American Society for Nutritional Sciences* 132 (11): 3456–3464.

Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun C, Buerk DG, Huang PL, Jain RK (2001): Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (5): 2604–2609.

Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK (2006): The role of nitric oxide in tumour progression. *Nature reviews Cancer* 6: 521–534.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC (1999): Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399: 597–601.

Galiatsatos P, Foulkes WD (2006): Familial adenomatous polyposis. *The American Journal of Gastroenterology* 101: 385–398.

Gallagher SR, Desjardins PR (2007): Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current protocols in human genetics Appendix 3D: A.3D.1–A.3D.21*

George ML, Tutton MG, Janssen F, Arnaout A, Abulafi AM, Eccles SA, Swift RI (2001): VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in Colorectal Cancer Progression. *Neoplasia* 3 (5): 420–427.

Ghadirian P, Lacroix A, Maisonneuve P, Perret C (1997): Nutritional factors and colon carcinoma. A case-control study involving French Canadians in Montréal, Quebec, Canada. *Cancer* 80 (5): 858–864.

Giacosa A (1999): Energy intake, overweight, physical exercise and colorectal cancer risk. *European Journal of Cancer Prevention* 8 (6): 53–60.

Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK (2011): Roles of Matrix-Metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *The FEBS journal* 278 (1): 16–27.

Giannakis M, Hodis E, Mu XJ, Yamauchi M, Rosenbluh J, Cibulskis K, Saksena G, Lawrence MS, Qian ZR, Nishihara R, Van Allen E, Hahn WC, Gabriel SB, Lander ES, Getz G, Ogino S, Fuchs CS, Garraway LA (2014): RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. *Nature Genetics* 46 (12): 1264–1266.

Giannelli G, Quaranta V, Antonaci S (2003): Tissue remodelling in liver diseases. *Histology and Histopathology* 18: 1267–1274.

Giavazzi R, Garofalo A, Fern C, Lucchini V, Bone EA, Chiari S, Brown PD, Nicoletti MI, Taraboletti G (1998): Batimastat, a synthetic inhibitor of Matrix-Metalloproteinases,

potentiates the antitumor activity of cisplatin in ovarian carcinoma xenografts. *Clinical Cancer Research* 4 (4): 985–992.

Giraud E, Inoue M, Hanahan D (2004): An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* 114: 623–633.

Glasheen BM, Kabra AT, Page-McCaw A (2009): Distinct functions for the catalytic and hemopexin domains of a *Drosophila* Matrix-Metalloproteinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (8): 2659–2664.

Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL (1992): Interaction of 92-kDa Type IV Collagenase with the Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Prevents Dimerization, Complex Formation with Interstitial Collagenase, and Activation of the Proenzyme with Stromelysin. *The Journal of Biological Chemistry* 267 (7): 4583–4591.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997): Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *European Journal of Cell Biology* 74 (2): 111–122.

Gomis-Rüth FX, Gohlke U, Betz M, Knäuper V, Murphy G, López-Otín C, Bode W (1996): The helping hand of collagenase-3 (MMP-13): 2.7 Å crystal structure of its C-terminal haemopexin-like domain. *Journal of Molecular Biology* 264 (3): 556–566.

Gossner L, Jung M (2001): Chromoendoskopie, Vergrößerungsendoskopie, optische Biopsie. Spielerei oder tatsächliche Verbesserung? *Der Internist* 42 (4): 484–493.

Gould SE, Junttila MR, de Sauvage FJ (2015): Translational value of mouse models in oncology drug development. *Nature Medicine* 21 (5): 431–439.

Goverdhana S, Puntel M, Xiong W, Zirger JM, Barcia C, Curtin JF, Soffer EB, Mondkar S, King GD, Hu J, Sciascia SA, Candolfi M, Greengold DS, Lowenstein PR, Castro MG (2005): Regulatable Gene Expression Systems for Gene Therapy Applications: Progress and Future Challenges. *Molecular Therapy* 12 (3): 189–211.

Graves JD, Krebs EG (1999): Protein Phosphorylation and Signal Transduction. *Pharmacology & Therapeutics* 82 (2-3): 111–121.

Gross J, Lapiere C (1962): Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48: 1014–1022.

Hall WJ, Bean CW, Pollard M (1941): Transmission of fowl leukosis through chick embryos and young chicks. *American Journal of Veterinary Research* 2: 272–279.

Hamdy FC, Fadlon EJ, Cottam D, Lawry J, Thurrell W, Silcocks PB (1994): Matrix-Metalloproteinase 9 expression in primary human prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia. *British Journal of Cancer* 69 (1): 177–182.

Hauk A (2014): Der Unterschied zwischen mono- und polyklonalen Antikörpern. *Biologie in unserer Zeit* 44 (3): 156.

Heppner KJ, Matrisian LM (1996): Expression of most Matrix-Metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *American Journal of Pathology* 149 (1): 273–282.

Hewitson P, Glasziou P, Watson E, Towler B, Irwig L (2008): Cochrane systematic review of colorectal cancer screening using the fecal occult blood test (hemoccult): an update. *The American Journal of Gastroenterology* 103: 1541–1549.

Hohenester E, Engel J (2002): Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. *Matrix Biology* 21 (2): 115–128.

Hua H, Li M, Luo T, Yin Y, Jiang Y (2011): Matrix-Metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68: 3853–3868.

Huang S (2002): Contributions of Stromal Metalloproteinase-9 to Angiogenesis and Growth of Human Ovarian Carcinoma in Mice. *Cancer Spectrum Knowledge Environment* 94 (23): 1134–1142.

Hugo H, Cures A, Suraweera N, Drabsch Y, Purcell D, Mantamadiotis T, Phillips W, Dobrovic A, Zupi G, Gonda TJ, Iacopetta B, Ramsay RG (2006): Mutations in the MYB Intron 1 Regulatory Sequence Increase Transcription in Colon Cancers. *Genes, Chromosomes and Cancer* 45 (12): 1143–1154.

Hunerbein M (2003): Endorectal ultrasound in rectal cancer. *Colorectal Disease* 5 (5): 402–405.

Hurlstone DP, Karajeh M, Cross SS, McAlindon ME, Brown S, Hunter MD, Sanders DS (2005): The role of high-magnification-chromoscopic colonoscopy in hereditary nonpolyposis colorectal cancer screening: a prospective "back-to-back" endoscopic study. *The American Journal of Gastroenterology* 100: 2167–2173.

Hynes RO (2009): The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326 (5957): 1216–1219.

Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF (2002): Results of screening colonoscopy among persons 40 to 49 years of age. *The New England Journal of Medicine* 346: 1781–1785.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011): Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61 (2): 69–90.

Jenne D, Stanley KK (1987): Nucleotide sequence and organization of the human S-protein gene: repeating peptide motifs in the "pexin" family and a model for their evolution. *Biochemistry* 26 (21): 6735–6742.

Jensen SA, Vainer B, Bartels A, Brünner N, Sørensen JB (2010): Expression of Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) by colorectal cancer cells and adjacent stroma cells--associations with histopathology and patients outcome. *European Journal of Cancer* 46 (18): 3233–3242.

Jeziorska M, Haboubi NY, Schofield PF, Ogata Y, Nagase H, Woolley DE (1994): Distribution of gelatinase B (MMP-9) and type IV collagen in colorectal carcinoma. *International Journal of Colorectal Disease* 9 (3): 141–148.

Jodele S, Blavier L, Yoon JM, DeClerck YA (2006): Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer and Metastasis Reviews* 25 (1): 35–43.

Johnsen M, Lund LR, Rømer J, Almholt K, Danø K (1998): Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Current Opinion in Cell Biology* 10 (5): 667–671.

Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, Berry DA (2013): Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer causes & control: CCC* 24 (6): 1207–1222.

Kapuscinski J (1995): DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotechnic & Histochemistry* 70 (5): 220–233.

Kastrinos F, Syngal S (2011): Inherited colorectal cancer syndromes. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)* 17 (6): 405–415.

Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010): Matrix-Metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141 (1): 52–67.

Kessenbrock K, Wang C, Werb Z (2015): Matrix-Metalloproteinases in Stem Cell Regulation and Cancer. *Matrix Biology* 44–46: 184–190.

Khokha R (1994): Suppression of the Tumorigenic and Metastatic Abilities of Murine B16-F10 Melanoma Cells In Vivo by the Overexpression of the Tissue Inhibitor of the Metalloproteinases-1. *Journal of the National Cancer Institute* 86 (4): 299–304.

Kiesslich R, Fritsch J, Holtmann M, Koehler HH, Stolte M, Kanzler S, Nafe B, Jung M, Galle PR, Neurath MF (2003): Methylene blue-aided chromoendoscopy for the detection of intraepithelial neoplasia and colon cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124 (4): 880–888.

Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen D, Zhang X, Norton L, Massagué J (2009): Tumor Self-Seeding by Circulating Cancer Cells. *Cell* 139 (7): 1315–1326.

Kolligs FT, Graser A (2014): Früherkennung des kolorektalen Karzinoms. *Coloproctology* 36: 21–27.

Koop S, Khokha R, Schmidt EE (1994): Overexpression of Metalloproteinase Inhibitor in B16F10 Cells Does Not Affect Extravasation but Reduces Tumor Growth. *Cancer Research* 54 (17): 4791–4797.

Koskensalo S, Hagström J, Linder N, Lundin M, Sorsa T, Louhimo J, Haglund C (2012): Lack of MMP-9 expression is a marker for poor prognosis in Dukes' B colorectal cancer. *BMC Clinical Pathology* 12: 24.

Koumura H, Sugiyama Y, Kunieda K, Saji S (1997): Significance in gene expression of matrix-metalloproteinase-9, urokinase-type plasminogen activator and tissue inhibitor of metalloproteinase for metastases of gastric and/or colo-rectal cancer. *Gan to Kagaku Ryoho Cancer & Chemotherapy* 24 (2): 324–331.

Krüger A, Sanchez-Sweatman OH, Martin DC, Fata JE, Ho AT, Orr FW, Rütther U, Khokha R (1998): Host TIMP-1 overexpression confers resistance to experimental brain metastasis of a fibrosarcoma cell line. *Oncogene* 16: 2419–2423.

Krüger A, Soeldt R, Sopov I, Kopitz C, Arlt M, Magdolen V, Harbeck N, Gänsbacher B, Schmitt M (2001): Hydroxamate-Type Matrix-Metalloproteinase Inhibitor Batimastat Promotes Liver Metastasis. *Cancer Research* 61 (4): 1272–1275.

Larsson SC, Wolk A (2007): Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies^{1–3}. *The American Journal of Clinical Nutrition* 86 (3): 556–565.

Lee M, Murphy G (2004): Matrix-Metalloproteinases at a glance. *Journal of Cell Science* 117: 4015–4016.

Lee PP, Hwang JJ, Murphy G, Ip MM (2000): Functional significance of MMP-9 in tumor necrosis factor-induced proliferation and branching morphogenesis of mammary epithelial cells. *Endocrinology* 141 (10): 3764–3773.

Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, Iruela-Arispe ML (2005): Processing of VEGF-A by Matrix-Metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *The Journal of Cell Biology* 169 (4): 681–691.

Leibovitz A, Stinson J, McCombs W, McCoy C, Mazur K, Mabry N (1976): Classification of Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Research* 36 (12): 4562–4569.

Le Rolle AF, Chiu TK, Zeng Z, Shia J, Weiser MR, Paty PB, Chiu VK (2016): Oncogenic KRAS activates an embryonic stem cell-like program in human colon cancer initiation. *Oncotarget* 7 (3): 2159–2174.

Li J, Brick P, O'Hare MC, Skarzynski T, Lloyd LF, Curry VA, Clark IM, Bigg HF, Hazleman BL, Cawston TE (1995): Structure of full-length porcine synovial collagenase reveals a C-terminal domain containing a calcium-linked, four-bladed β -propeller. *Structure* 3 (6): 541–549.

Liabakk N, Talbot I, Smith RA, Wilkinson K, Balkwill F (1996): Matrix Metalloprotease 2 (MMP-2) and Matrix Metalloprotease 9 (MMP-9) Type IV Collagenases in Colorectal Cancer. *Cancer Research* 56 (1): 190–196.

Lim K, Ancrile BB, Kashatus DF, Counter CM (2008): Tumour maintenance is mediated by eNOS. *Nature* 452 (3): 646–649.

Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S (1980): Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284: 67–68.

Lu P, Weaver VM, Werb Z (2012): The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *The Journal of Cell Biology* 196 (4): 395–406.

Lubin F, Rozen P, Arieli B (1997): Nutritional and lifestyle habits and water-fiber interaction in colorectal adenoma etiology. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 6 (2): 79–85.

Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR (2009): Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clinical Genetics* 76 (1): 1–18.

Mahmood T, Yang PC (2012): Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences* 4 (9): 429–434.

Malaterre J, Pereira L, Putoczki T, Millen R, Paquet-Fifield S, Germann M, Liu J, Cheasley D, Sampurno S, Stacker SA, Achen MG, Ward RL, Waring P, Mantamadiotis T, Ernst M, Ramsay RG (2016): Intestinal-specific activatable Myb initiates colon tumorigenesis in mice. *Oncogene* 35: 2475–2484.

Martin MD, Matrisian LM (2007): The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer metastasis reviews* 26: 717–724.

Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S (1998): Matrix-Metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *The FASEB Journal* 12 (12): 1075–1095.

Masuda H, Aoki H (1999): Host expression of Matrix-Metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in normal colon tissue affects metastatic potential of colorectal cancer. *Diseases of the Colon & Rectum* 42 (3): 393–397.

Mattot V, Raes MB, Henriët P, Eeckhout Y, Stehelin D, Vandebunder B, Desbiens X (1995): Expression of interstitial collagenase is restricted to skeletal tissue during mouse embryogenesis. *Journal of Cell Science* 108: 529–535.

Mehner C, Hockla A, Miller E, Ran S, Radisky DC (2014): Tumor cell-produced Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget* 5 (9): 2736–2749.

Meissner HI, Breen N, Klabunde CN, Vernon SW (2006): Patterns of colorectal cancer screening uptake among men and women in the United States. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 15 (2): 389–394.

Merdad A, Karim S, Schulten HJ, Dallol A, Buhmeida A, Al-Thubaity F, Gari MA, Chaudhary A, Abuzenadah AM, Al-Qahtani MH (2014): Expression of Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Primary Human Breast Cancer: MMP-9 as a Potential Biomarker for Cancer Invasion and Metastasis. *Anticancer Research* 34 (3): 1355–1366.

Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S, Montellano P de, Kemp BE, Pearson RB (1999): The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Current Biology* 9 (15): 845–848.

Mook ORF, Frederiks WM, Van Noorden CJF (2004): The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1705 (2): 69–89.

Moore CS, Crocker SJ (2012): An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology. *The American Journal of Pathology* 180 (1): 12–16.

Mroczko B, Groblewska M, Okulczyk B, Kedra B, Szmítkowski M (2010): The diagnostic value of Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) and tissue inhibitor of Matrix-Metalloproteinases 1 (TIMP-1) determination in the sera of colorectal adenoma and cancer patients. *International Journal of Colorectal Disease* 25 (10): 1177–1184.

Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM (1998): Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *The Journal of Clinical Investigation* 101 (11): 2567–2578.

Murphy G, Devesa SS, Cross AJ, Inskip PD, McGlynn KA, Cook MB (2011): Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age. *International Journal of Cancer* 128 (7): 1668–1675.

Murphy G, Knäuper V (1997): Relating Matrix-Metalloproteinase structure to function: Why the “hemopexin” domain? *Matrix Biology* 15 (8,9): 511–518.

Muto T, Bussey HJR, Morson BC (1975): The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36 (6): 2251–2270.

Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T (2002): Matrix-Metalloproteinases in tumor invasion: Role for cell migration. *Pathology International* 52 (4): 255–264.

Nagase H, Visse R, Murphy G (2006): Structure and function of Matrix-Metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* 69 (3): 562–573.

Nagase H, Woessner JF (1999): Matrix-Metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* 274: 21491–21494.

Naylor MS, Stamp GW, Davies BD, Balkwill FR (1994): Expression and activity of MMPS and their regulators in ovarian cancer. *International Journal of Cancer* 58 (1): 50–56.

Neumann J (2008): Immunbiologie, Eine Einführung. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Norton SA, Thomas MG (1999): Staging of rectosigmoid neoplasia with colonoscopic endoluminal ultrasonography. *The British Journal of Surgery* 86 (7): 942–946.

O'Farrell TJ, Pourmotabbed T (2000): Identification of structural elements important for Matrix-Metalloproteinase type V collagenolytic activity as revealed by chimeric enzymes. Role of fibronectin-like domain and active site of gelatinase B. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (36): 27964–27972.

Onoda T, Ono T, Dhar DK, Yamanoi A, Fujii T, Nagasue N (2004): Doxycycline inhibits cell proliferation and invasive potential: combination therapy with cyclooxygenase-2 inhibitor in human colorectal cancer cells. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 143 (4): 207–216.

Onoda T, Ono T, Dhar DK, Yamanoi A, Fujii T, Nagasue N (2006): Tetracycline analogues (doxycycline and COL-3) induce caspase-dependent and -independent apoptosis in human colon cancer cells. *International Journal of Cancer* 118 (5): 1309–1315

Oh IH, Reddy EP (1999): The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene* 18: 3017–3033.

Opdenakker G, Van den Steen P, Dubois B, Nelissen I, van Coillie E, Masure S, Proost P, van Damme J (2001): Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *Journal of Leukocyte Biology* 69 (6): 851–859.

Pantelouris EM (1968): Absence of Thymus in a Mouse Mutant. *Nature* 217: 370–371.

Papadopoulou S, Scorilas A, Arnogianaki N, Papapanayiotou B, Tzimogiani A, Agnantis N, Talieri M (2001): Expression of Gelatinase-A (MMP-2) in Human Colon Cancer and Normal Colon Mucosa. *Tumor Biology* 22 (6): 383–389.

Papapetropoulos A, García-Cardeña G, Madri JA, Sessa WC (1997): Nitric Oxide Production Contributes to the Angiogenic Properties of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Endothelial Cells. *Journal of Clinical Investigation* 100 (12): 3131–3139.

Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS (2004): Matrix-Metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature reviews Immunology* 4: 617–629.

Partridge CA, Phillips PG, Niedbala MJ, Jeffrey, John J (1997): Localization and activation of type IV collagenase/gelatinase at endothelial focal contacts. *The American Physiological Society* 272 (5): 813–822.

Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma V (2004): Expression of Matrix-Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 10 (22): 7621–7628.

Pfeiffer S, Mayer B, Hemmes B (1999): Nitric Oxide: Chemical Puzzles Posed by a Biological Messenger. *Angewandte Chemie International Edition* 38 (12): 1714–1731.

Piccard H, Van den Stehen PE, Opdenakker G (2007): Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in Matrix-Metalloproteinases and other proteins. *Journal of Leukocyte Biology* 81 (4): 870–892.

Pourmotabbed T (1994): Relation between Substrate Specificity and Domain Structure of 92-kDa Type IV Collagenase. *Annals of the New York Academy of Sciences* 732: 372–374.

Pox C, Aretz S, Bischoff SC, Graeven U, Hass M, Heußner P, Hohenberger W, Holstege A, Hübner J, Kolligs F, Kreis M, Lux P, Ockenga J, Porschen R, Post S, Rahner N, Reinacher-Schick A, Riemann JF, Sauer R, Sieg A, Scheppach W, Schmitt W, Schmoll HJ, Schulmann K, Tannapfel A, Schmiegel W (2013): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom Version 1.0 - Juni 2013 AWMF-Registernummer: 021/007OL. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 51 (8): 753–854.

Robert-Koch-Institut (Stand 12/2015): Neue Daten zu Krebs in Deutschland. Im Internet: https://www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2015/11_2015.html

Pox CP (2015): Stratifizierte und risikoadaptierte Früherkennung genetischer Kolonkarzinome. *Gastroenterologie* 10 (6): 32–38.

Prontera C, Mariani B, Rossi C, Poggi A, Rotilio D (1999): Inhibition of Gelatinase A (MMP-2) by Batimastat and Captopril reduces tumor growth and lung metastases in mice bearing Lewis lung carcinoma. *International Journal of Cancer* 81 (5): 761–766.

Puente XS, Pendás AM, Llano E (1996): Molecular Cloning of a Novel Membrane-type Matrix-Metalloproteinase from a Human Breast Carcinoma. *Cancer Research* 56 (5): 944–949.

Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, Nagase H, French DL, Quigley JP (1999): Activation of Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) via a Converging Plasmin/Stromelysin-1 Cascade Enhances Tumor Cell Invasion. *Journal of Biological Chemistry* 274: 13066–13076.

Ramsay RG, Ciznadija D, Sicurella C, Reyes N, Mitchelhill K, Darcy PK, D'abaco G, Mantamadiotis T (2005): Colon Epithelial Cell Differentiation Is Inhibited by Constitutive

c-Myb Expression or Mutant APC Plus Activated RAS. *DNA and Cell Biology* 24 (1): 21–29.

Rasool S, Kadla SA, Rasool V, Ganai BA (2013): A comparative overview of general risk factors associated with the incidence of colorectal cancer. *Tumour Biology* 34 (5): 2469–2476.

Rath T, Roderfeld M, Graf J, Wagner S, Vehr A, Dietrich C, Geier A, Roeb E (2006): Enhanced expression of MMP-7 and MMP-13 in inflammatory bowel disease: a precancerous potential? *Inflammatory Bowel Diseases* 12 (11): 1025–1035.

Redondo-Muñoz J, Ugarte-Berzal E, Terol MJ, Van den Steen PE, Hernández del Cerro M, Roderfeld M, Roeb E, Opdenakker G, García-Marco JA, García-Pardo A (2010): Matrix-Metalloproteinase-9 promotes chronic lymphocytic leukemia b cell survival through its hemopexin domain. *Cancer Cell* 17 (2): 160–172.

Remacle AG, Golubkov VS, Shiryaev SA, Dahl R, Stebbins JL, Chernov AV, Cheltsov AV, Pellecchia M, Strongin AY (2012): Novel MT1-MMP small-molecule inhibitors based on insights into hemopexin domain function in tumor growth. *Cancer Research* 72 (9): 2339–2349.

Roeb E, Dietrich CG, Winograd R, Arndt M, Breuer B, Fass J, Schumpelick V, Matern S (2001): Activity and cellular origin of gelatinases in patients with colon and rectal carcinoma differential activity of matrix metalloproteinase-9. *Cancer* 92 (10): 2680–2691.

Roeb E, Matern S (2001): Matrixmetalloproteinasen als Promotoren der Tumorinvasion und Metastasierung. Eine Übersicht unter besonderer Berücksichtigung des Gastrointestinaltraktes. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 39 (9): 807–813.

Roeb E, Schleinkofer K, Kernebeck T, Pötsch S, Jansen B, Behrmann I, Matern S, Grötzinger J (2002): The Matrix-Metalloproteinase 9 (mmp-9) hemopexin domain is a novel gelatin binding domain and acts as an antagonist. *The Journal of biological chemistry* 277 (52): 50326–50332.

Rogler G (2014): Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Letters* 345 (2): 235–241.

Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC (1998): Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *The Journal of Clinical Investigation* 101 (4): 731–736.

Said AH, Raufman J, Xie G (2014): The role of Matrix-Metalloproteinases in colorectal cancer. *Cancers* 6 (1): 366–375.

Sancéau J, Truchet S, Bauvois B (2003): Matrix-Metalloproteinase-9 silencing by RNA interference triggers the migratory-adhesive switch in Ewing's sarcoma cells. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 36537–36546.

Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, Karstens J, Liersch T, Schmidberger H, Raab R (2004): Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 351 (17): 1731–1740.

Schaffner W, Weissmann C (1973): A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Analytical Biochemistry* 56 (2): 502–514.

Senger DR, Van De Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo K, Yeo T, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF (1993): Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer and Metastasis Reviews* 12 (3): 303–324.

Sessa WC (2004): eNOS at a glance. *Journal of Cell Science* 117 (12): 2427–2429.

Shapiro SD (1998): Matrix-Metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Current Opinion in Cell Biology* 10 (5): 602–608.

Shesely E, Maeda N, Kim H, Desai K, Krege J, Laubach V, Sherman P, Sessa W, Smithies O (1996): Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (23): 13176–13181.

Shussman N, Wexner SD (2014): Review Colorectal polyps and polyposis syndromes. *Gastroenterology Report* 2 (1): 1–15.

Siegel R, Miller K, Jemal A (2015): Colorectal cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 65 (1): 5–29.

Siragusa M, Fleming I (2016): The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction. *European Journal of Physiology* 468: 1125–1137.

Smith RS, Lin KF, Agata J, Chao L, Chao J (2002): Human Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Delivery Promotes Angiogenesis in a Rat Model of Hindlimb Ischemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 22: 1279–1285.

Somerville RPT, Oblander SA, Apte SS (2003): Matrixmetalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biology* 4: 216.

Sopata I, Dancewicz AM (1974): Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 370 (2): 510–523.

Steffensen B, Wallon U, Overall C (1995): Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. *Journal of Biological Chemistry* 270: 11555–11566.

Steinke V, Engel C, Büttner R, Schackert HK, Schmiegel WH, Propping P (2013): Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)/Lynch syndrome. *Deutsches Ärzteblatt international* 110 (3): 32–38.

Sternlicht MD, Werb Z (2001): How Matrix-Metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17: 463–516.

Stragand JJ, Barlogie B, White RA, Drewinko B (1981): Biological properties of the human colonic adenocarcinoma cell line SW 620 grown as a xenograft in the athymic mouse. *Cancer Research* 41 (9): 3364–3369.

Tanimoto T, Jin ZG, Berk B (2002): Transactivation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor Flk-1/KDR Is Involved in Sphingosine 1-Phosphate-stimulated Phosphorylation of Akt and Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS). *The Journal of Biological Chemistry* 277: 42997–43001.

Teschendorf C, Warrington K, Siemann D, Muzyczka N (2002): Comparison of the EF-1 alpha and the CMV promoter for engineering stable tumor cell lines using recombinant adeno-associated virus. *Anticancer research* 22 (6A): 3325–3330.

Tichý M, Knopfová L, Jarkovský J, Pekarčíková L, Veverková L, Vlček P, Katolická J, Čapov I, Hermanová M, Šmarda J, Beneš P (2016): Overexpression of c-Myb is associated with suppression of distant metastases in colorectal carcinoma. *Tumor Biology* 37: 10723–10729.

Trainer D, Kline T, McCabe F, Faucette L, Feild J, Chaikin M (1988): Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *International Journal of Cancer* 41 (2): 287–296.

Vallee BL, Auld DS (1990): Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Biochemistry* 87 (1): 220–224.

Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico MG (1996): Assignment of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene to Human Chromosome 6p21.3. *Circulation* 93 (8): 1493–1495.

Waas ET, Wobbes T, Lomme RMLM, DeGroot J, Ruers T, Hendriks T (2003): Matrix-Metalloproteinase 2 and 9 activity in patients with colorectal cancer liver metastasis. *The British Journal of Surgery* 90 (12): 1556–1564.

Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE (1996): Molecular Cloning and Characterization of Human Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 4. *Journal of Biological Chemistry* 271: 30375–30380.

Wang Y, Yan W, Lu X, Qian C, Zhang J, Li P, Shi L, Zhao P, Fu Z, Pu P, Kang C, Jiang T, Liu N, You Y (2011): Overexpression of osteopontin induces angiogenesis of endothelial progenitor cells via the $\alpha\text{v}\beta\text{3}/\text{PI3K}/\text{AKT}/\text{eNOS}/\text{NO}$ signaling pathway in glioma cells. *European Journal of Cell Biology* 90 (8): 642–648.

Westermarck J, Kähäri V (1999): Regulation of Matrix-Metalloproteinase expression in tumor invasion. *The FASEB Journal* 13 (8): 781–792.

Willenbrock F, Crabbe T, Slocombe PM, Sutton CW, Docherty AJP, Cockett MI, O'Shea M, Brocklehurst K, Phillips IR, Murphy G (1993): The activity of the tissue inhibitors of metalloproteinases is regulated by C-terminal domain interactions: A kinetic analysis of the inhibition of gelatinase A. *Biochemistry* 32 (16): 4330–4337.

Willett CG, Boucher Y, Di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK (2004): Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivas-
cular effects in human rectal cancer. *Nature Medicine* 10 (2): 145–147.

Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, Godlee F, Stolar MH, Mulrow CD, Woolf SH, Glick SN, Ganiats TG, Bond JH, Rosen L, Zapka JG, Olsen SJ, Giardiello FM, Sisk JE, van Antwerp R, Brown-Davis C, Marciniak DA, Mayer RJ (1997): Colorectal cancer screening: Clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 112 (2): 594–642.

Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Waye JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF, Ackroyd F, Shike M, Kurtz RC, Hornsby-Lewis L, Gerdes H, Stewart ET (1993): Prevention of Colorectal Cancer by Colonoscopic Polypec-
tomy. *The New England Journal of Medicine* 329 (27): 1977–1981.

Wittekind C, Meyer HJ (2011): TNM: Klassifikation maligner Tumoren. Wiley-Blackwell, 7. Auflage, Weinheim.

Wong MP, Cheung N, Yuen ST, Leung SY, Chung LP (1999): Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression. *International Journal of Cancer* 81 (6): 845–850.

Yamada T, Amann JM, Fukuda K, Takeuchi S, Fujita N, Uehara H, Iwakiri S, Itoi K, Shilo K, Yano S, Carbon DP (2015): Akt Kinase-Interacting Protein 1 Signals through CREB to Drive Diffuse Malignant Mesothelioma. *Cancer Research* 75 (19): 4188–4197.

Yang L, Guan H, He J, Zeng L, Yuan Z, Xu M, Zhang W, Wu X, Guan J (2012): VEGF increases the proliferative capacity and eNOS/NO levels of endothelial progenitor cells through the calcineurin/NFAT signalling pathway. *Cell Biology International* 36 (1): 21–27.

Yashiro M (2014): Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* 20 (44): 16389–16397.

Yeh Y, Sheu B (2014): Matrix-Metalloproteinases and their inhibitors in the gastrointestinal cancers: current knowledge and clinical potential. *Metalloproteinases in Medicine*; Dovepress 1: 3–13.

Ying L, Hofseth LJ (2007): An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer. *Cancer Research* 67 (4): 1407–1410.

Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ, Lansdorp-Vogelaar I, van Ballegooijen M, Hankey BF, Shi W, Bond JH, Schapiro M, Panish JF, Stewart ET, Waye JD (2012): Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *The New England Journal of Medicine* 366 (8): 687–696.

Zeng Z (1999): Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 20 (5): 749–755.

Zeng ZS, Huang Y, Cohen AM, Guillem JG (1996): Prediction of Colorectal Cancer Relapse and Survival via Tissue RNA Levels of Matrix-Metalloproteinase-9. *Journal of Clinical Oncology* 14 (12): 3133–3140.

Zheng H, Takahashi H, Murai Y, Cui Z, Nomoto K, Niwa H, Tsuneyama K, Takano Y (2006): Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are Closely Linked to Growth, Invasion, Metastasis and Angiogenesis of Gastric Carcinoma. *Anticancer research* 26 (5A): 3579–3584.

Zhou X, Vink M, Klaver B, Berkhout B, Das A (2006): Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. *Gene therapy* 13: 1382–1390.

Zhu MM, Xu XT, Nie F, Tong JL, Xiao SD, Ran ZH (2010): Comparison of immunochemical and guaiac-based fecal occult blood test in screening and surveillance for advanced colorectal neoplasms: a meta-analysis. *Journal of Digestive Diseases* 11 (3): 148–160.

Zucker S, Vacirca J (2004): Role of Matrix-Metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 23 (1): 111–117.

10 ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum Unterschrift

11 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Elke Roeb, die mir durch die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe die Möglichkeit gegeben hat, dieses Projekt zu bearbeiten. Ich bin ihr für ihre persönliche Unterstützung und ihre Geduld sehr dankbar.

Ich danke PD Dr. Martin Roderfeld für seine Hilfestellung, seine Interesse an meiner Arbeit und seine stets offenes Ohr. Durch ihn herrschte fortwährend eine aufgeschlossene Arbeitsatmosphäre.

Ein weiterer Dank geht an Frau Dr. Marion Sölter für ihre Betreuung und den Überblick über das Projekt. Dr. Yura Churin danke ich für die wertvollen Ratschläge, die offene Art und seine Zeit.

Ich möchte mich recht herzlich bei Annette Tuschner bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein großes Dankeschön gilt Jennifer Rausch, ohne die ich mir die Zeit im Labor nicht hätte vorstellen können. Ich habe die Zeit der kollegialen Zusammenarbeit und der freundschaftlichen Beziehung zueinander sehr genossen.

Vielen Dank an meine Mitdoktoranden für die angenehme und kurzweilige Zeit im Labor und den Austausch untereinander. Alles Gute für Euch!

Ganz besonders möchte ich meiner Familie für ihr Vertrauen in mich, ihre Zusprache und die unerschöpfliche Unterstützung, die mir diesen Weg erst ermöglicht haben, danken.