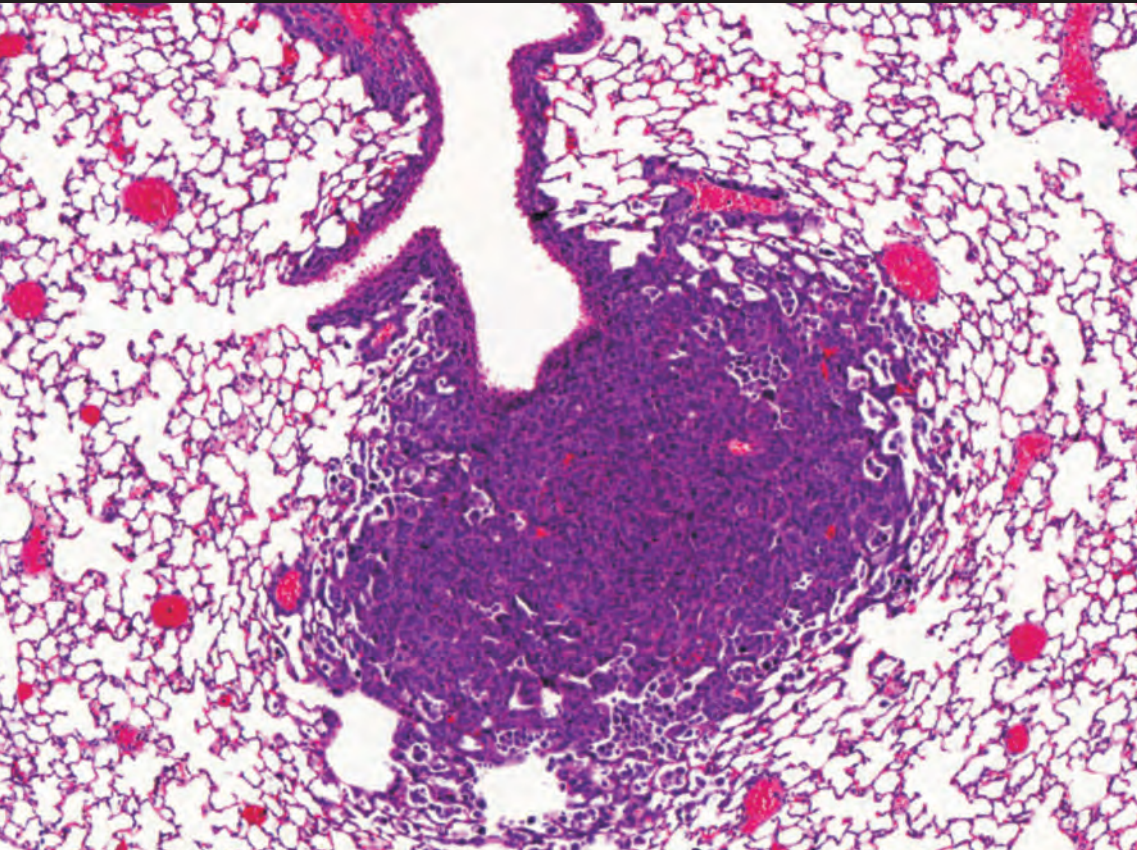


**EINFLUSS VON UROKINASEHEMMSTOFFEN AUF  
PRIMÄRTUMORWACHSTUM UND METASTASIERUNG  
DES KLEINZELLIGEN UND NICHT-KLEINZELLIGEN  
BRONCHIALKARZINOMS**

**INGRID MARIA HENNEKE**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Manfred Reinacher**

und

aus dem Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik und Poliklinik II

des Universitätsklinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Betreuer: Prof. Dr. med. Andreas Günther**

**Einfluss von Urokinasehemmstoffen auf Primärtumorwachstum und  
Metastasierung des kleinzelligen und nicht-kleinzelligen  
Bronchialkarzinoms**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Ingrid Maria Henneke**

Tierärztin aus Olsberg (Nordrhein-Westfalen)

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Manfred Reinacher  
Prof. Dr. med. Andreas Günther

Tag der Disputation: 08.03.2010

Meinen Eltern  
in Liebe und Dankbarkeit



## I. Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	1
II	Abkürzungsverzeichnis	5
1.	Einleitung	9
1.1	Das Bronchialkarzinom	9
1.1.1	Häufigkeit	9
1.1.2	Ätiologie	9
1.1.3	Histologische Klassifizierung	10
1.1.4	Klinische Klassifizierung	11
1.1.4.1	TNM-Klassifikation und Staging	11
1.1.4.2	Histopathologisches Grading	14
1.1.4.3	R-Klassifikation	14
1.1.5	Lokalisation	15
1.1.6	Metastasierung	15
1.1.7	Diagnose	16
1.1.8	Therapie	17
1.1.8.1	NSCLC	17
1.1.8.2	SCLC	20
1.1.9	Prognose	21
1.1.9.1	Allgemein	21
1.1.9.2	NSCLC	21
1.1.9.3	SCLC	22
1.2	Das Plasminogen-Aktivator/Plasmin-System	23
1.2.1	Der Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ (uPA)	23
1.2.2	Der Plasminogen-Aktivator-Rezeptor vom Urokinase-Typ (uPAR)	25
1.2.3	PAI-1 und PAI-2	26
1.2.4	Das uPA-System als prognostischer Marker	27
1.2.5	Die Rolle des Plasminogen-Aktivator Systems bei der hämatogenen Metastasierung	27
1.2.5.1	Die metastatische Kaskade	27
1.2.5.2	Die Rolle des uPA-Systems bei Tumorinvasion und Metastasierung	28
1.2.6	Die Rolle des Plasminogen-Aktivator/Plasmin-Systems bei	



	der Tumorangiogenese	29
	1.2.6.1 Angiogenese allgemein	29
	1.2.6.2 Der Angiogeneseprozess bei Tumoren	30
2.	Zielsetzung	32
3.	Material und Methoden	33
3.1	Material	33
	3.1.1 Versuchstiere	33
	3.1.2 Tierversuchsgenehmigung	33
	3.1.3 Injektionslösungen und Substanzen	34
	3.1.4 Tierexperiment	34
	3.1.5 Histologie	34
	3.1.6 Zellkultur	36
	3.1.7 SDS-PAGE/Western Blot	38
3.2	Methoden	40
	3.2.1 Zellkultur	40
	3.2.1.1 Auftauen und Kultivieren der Zellen	40
	3.2.1.2 Passagieren der Zellen	40
	3.2.1.3 Vorbereitung der Zellen zur Injektion	41
	3.2.1.4 Proliferationsassay	41
	3.2.1.5 Zytotoxizitätsassay	42
	3.2.2 Ansetzen der Inhibitorlösung	43
	3.2.3 Tierexperimente	44
	3.2.3.1 Versuchsdurchführung	44
	3.2.3.2 Weitere Versuchsansätze	45
	3.2.3.3 Entnahme der Lunge	46
	3.2.3.4 Entnahme des Primärtumors	46
	3.2.4 Volumen-CT	47
	3.2.5 Histologische Untersuchungen	48
	3.2.5.1 Entwässerung und Einbettung des Gewebes	48
	3.2.5.2 Entparaffinierung und Rehydrierung	48
	3.2.5.3 Immunhistochemische Färbung	49
	3.2.5.4 Auswertung der histologischen Gewebeschnitte	49
	3.2.6 SDS-PAGE und Western Blot	50
	3.2.6.1 Probengewinnung und Aufarbeitung	50

3.2.6.2	Herstellung von Polyacrylamidgelen	51
3.2.6.3	SDS-PAGE	52
3.2.6.4	Western Blot	53
3.2.7.	Statistik	54
4.	Ergebnisse	55
4.1	SDS-Page/Western Blot	55
4.1.1	Nachweis von uPA	55
4.1.2	Nachweis von uPAR	56
4.2	Einfluss des Urokinaseinhibitors CJ-463 auf das Primärtumorwachstum	57
4.3	Einfluss von CJ-463 auf die Vaskularisierung des Primärtumors	59
4.4	Einfluss des Urokinaseinhibitors CJ-463 auf die pulmonale Metastasierung	61
4.5	Einfluss von CJ-463 auf Primärtumorwachstum und Metastasierung bei uPA- und uPAR-KO Mäusen	63
4.5.1	Einfluss auf das Primärtumorwachstum bei uPA- und uPAR-KO Mäusen	63
4.5.2	Einfluss auf die pulmonale Metastasierung bei uPA- und uPAR-KO Mäusen	66
4.6	Einfluss von CJ-463 auf das Primärtumorwachstum beim kleinzelligen Bronchialkarzinom	68
4.7	Einfluss von CJ-463 auf die Proliferation von LLC Zellen	70
5.	Diskussion	72
5.1	Methodische Aspekte des tierexperimentellen Ansatzes	72
5.1.1	Heterotropes Lungenkarzinom Modell der Maus	72
5.1.2	Methoden zur Erfassung des Primärtumorwachstums und der Metastasierungsrate	73
5.1.3	Pharmakokinetische Aspekte	74
5.1.4	Sicherheitsaspekte	75
5.2	Rolle von Proteasen bei Primärtumorwachstum und Metastasierung	75
5.2.1	Grundsätzliche Überlegungen	75
5.2.2	Einfluss des uPA-Systems auf Migrationsverhalten und Metastasierungspotential von Tumorzellen	78
5.2.3	Einfluss des uPA-Systems auf Tumorangiogenese	

	und Primärtumorwachstum	82
5.3	Therapeutische Aspekte	85
6.	Zusammenfassung/Summary	86
7.	Literaturverzeichnis	88
8.	Anhang	106
8.1.	Rohdaten zum Primärtumorwachstum	106
8.2.	Rohdaten zur pulmonalen Metastasierung	112
8.3.	Rohdaten zur Tumervaskularisierung	114
8.4.	Rohdaten zum Proliferationsassay	115
9.	Danksagung	116
10.	Erklärung	117

## II. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
Asp	Asparagin
ATF	Aminoterminales Fragment
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovines Serumalbumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD-87	Urokinase-Rezeptor (uPAR)
cm	Zentimeter
cpm	counts per minute, Impulse pro Minute
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECL	enhanced chemiluminiscent
ECM	extrazelluläre Matrix
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FCS	fötales Kälberserum
FPRL 1	formylpeptide/receptor-like-1
FXa	Faktor Xa
G	Gauge
g	Gramm
GBB	Gamma-butyrobetaine
Gy	Gray

h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl-1-piperazin)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HMW	high molecular weight
HMW-uPA	high molecular weight urokinase
HPLC-Assay	high performance liquid chromatography Assay
i.p.	intraperitoneal
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
Ile	Isoleucin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
$k_i$	Dissoziationskonstante eines Inhibitors bei der Enzymkinetik
KO	knock out
LDH	Laktatdehydrogenase
LLC	lewis lung carcinoma
LMW	low molecular weight
LMW-uPA	low molecular weight urokinase
lp/cm	line pairs per cm
LRP	lipoprotein receptor-related protein-1
Lys	Lysin
mA	Milliampere
MetOH	Methanol
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
MMP	Matrixmetalloproteinase
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid

NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
Na-Deoxycholat	Natriumdeoxycholat
NADH	reduziertes Nicotinsäureamidadenindinucleotid
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
NSCLC	non small cell lung cancer
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PAI-2	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-2
PBS	Phosphate buffered saline
PDT	Photodynamische Therapie
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rpm	rounds per minute
SCID	severe combined immunodeficiency
SCLC	small cell lung cancer
scuPA	single chain urokinase type Plasminogen activator
SDS	sodium dodecyl sulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
SERPINE	Serinprotease-Inhibitoren
tcuPA	two chain urokinase type Plasminogen activator
TEMED	Tetramethyldiamin
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor- $\beta$ 1
TNM	Tumor Nodes Metastases
t-PA	tissue plasminogen activator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
UICC	union internationale contre le cancer
uPA	urokinase type plasminogen activator (Urokinase)
uPAR	urokinase type plasminogen activator receptor
VCT	Volumen-Computertomographie
VEGF	vascular endothelial growth factor
vs.	Versus
v/v	Volumen/Volumen
vWF	von Willebrand-Faktor

w/v	Masse/Volumen
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
$\gamma$ GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
$\mu$ CT	Mikro-Computertomographie
$\mu$ l	Mikroliter

## **1. Einleitung**

### **1.1. Das Bronchialkarzinom**

#### **1.1.1. Häufigkeit**

Bronchialkarzinome stellen die häufigsten bösartigen Tumorerkrankungen des Menschen in westlichen Ländern mit einer Inzidenz von etwa 50/100.000 dar (Senn et al. 2001). Weltweit gibt es jährlich etwa 1,3 Millionen Neuerkrankungen (Laack und Hossfeld 2000).

Allein in Deutschland sterben jährlich über 45000 Menschen an den Folgen eines Bronchialkarzinoms (Laack und Hossfeld 2000). Das Bronchialkarzinom ist somit in Deutschland der bei Männern am häufigsten zum Tode führende maligne Tumor, bei Frauen steht das Bronchialkarzinom nach Mammakarzinom und Kolonkarzinom an dritter Stelle der durch Malignome bedingten Todesursachen (Laack und Hossfeld 2000; Bray et al. 2003). Das Verhältnis Männer zu Frauen liegt momentan zwischen 5:1 und 3:1 (Thomas et al. 1996), wobei der Anteil der Frauen steigt (Senn et al. 2001). Das Altersmaximum liegt bei beiden Geschlechtern etwa bei 60-70 Jahren. 50 % der Patienten sind bei Diagnosestellung über 65 und 30 % über 70 Jahre alt (Gridelli et al. 2006).

#### **1.1.2. Ätiologie**

Die Induktion des Bronchialkarzinoms erfolgt fast ausschließlich durch Umweltfaktoren, wie z.B. die Inhalation anorganischer Stäube (Asbest) oder Tabakrauch, wobei das chronische Inhalationsrauchen der wichtigste ätiologische Faktor ist. 85 % aller Bronchialkarzinome werden durch Tabakrauch verursacht (Morr 1995). Das relative Erkrankungsrisiko ist im Vergleich zu Nichtrauchern 15-35fach erhöht (Jahn et al. 1990; Osann 1998). Die karzinogene Wirkung geht dabei von den polyzyklischen Kohlenwasserstoffen im Tabakkondensat aus, die zu einer persistierenden genetischen DNA Schädigung führen. Des Weiteren wird durch die enthaltenen Aldehyde und Zyanide der Ziliarapparat des Bronchialtraktes gelähmt und damit die bronchiale Reinigung und Eliminierung von kanzerogenen Substanzen verzögernd beeinflusst (Erbar 2002).

Auch Asbest kann zur Entstehung von Bronchialkarzinomen führen. Charakteristisch hierfür ist eine lange Latenzperiode von etwa 20 Jahren nach erfolgter Exposition (Quinlan et al.



1994; Mossman und Jee 1989; Mossman et al. 1990). Ein Zusammenhang von Asbeststaubexposition und der Entstehung von Mesotheliomen wurde schon 1960 von Wagner et al. in Südafrika festgestellt (Wagner et al. 1960). Die Tatsache, dass Asbest und Tabak Co-Faktoren bei der Entstehung von Lungenkrebs sind, wurde erst später festgestellt (Mossman et al. 2004).

Weitere Substanzen, die zur Entstehung eines Bronchialkarzinoms führen können, sind Chrom, Nickel, Kadmium, Beryllium, Arsen, sowie Kohleverbrennungsprodukte von Ruß und Teer (Erbar 2002). Auch ionisierende Strahlung wirkt kanzerogen.

Schließlich scheinen auch genetische Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen. So zeigten Schwartz et al., dass es bei Verwandten von nicht rauchenden Lungenkrebspatienten ein sechsfach erhöhtes Risiko gibt, an Lungenkrebs zu erkranken (Schwartz et al. 1996, 1999).

### **1.1.3. Histologische Klassifizierung**

Histologisch unterscheidet man das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom (*non small cell lung cancer*, NSCLC) von dem kleinzelligen Bronchialkarzinom (*small cell lung cancer*, SCLC) wobei nichtkleinzellige Bronchialkarzinome mit etwa 75-80% den größten Anteil der Bronchialkarzinome ausmachen. Nur 20-25% sind kleinzellige Bronchialkarzinome, die aber mit einer mittleren Lebenserwartung von 1-2 Jahren nach Diagnosestellung eine deutlich schlechtere Prognose aufweisen.

Im Gegensatz zum SCLC weist das NSCLC eine langsamere Proliferationsrate, eine niedrigere Tumorverdopplungszeit, eine spätere Metastasierungstendenz und eine mäßigerer Chemosensibilität auf (Laack und Hossfeld. 2000). Somit ist die histologische Unterscheidung bedeutend für die weitere Diagnostik, Therapie und Prognose.

Zu den kleinzelligen Bronchialkarzinomen werden alle Lungenkarzinome gezählt, die kleinzellige Bereiche aufweisen. Zu den nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen gehören Plattenepithelkarzinome, adenosquamöse Karzinome, Adenokarzinome und großzellige Karzinome (Erbar 2002).

In den letzten 20 Jahren haben die Plattenepithelkarzinome an Häufigkeit abgenommen und die Adenokarzinome zugenommen (Thomas et al. 1996). Dennoch ist das streng mit dem Zigarettenrauchen assoziierte Plattenepithelkarzinom noch immer das insgesamt am häufigsten vorkommende Bronchialkarzinom und macht etwa 40% aller Bronchialkarzinome aus (Riede und Costabel 1995). Sie werden am häufigsten bei Männern beobachtet, wogegen

bei Frauen das Adenokarzinom am häufigsten vorkommt. Insgesamt ist das Adenokarzinom das zweithäufigste Bronchialkarzinom (Gärtner et al. 1999).

#### **1.1.4. Klinische Klassifizierung**

##### **1.1.4.1. TNM-Klassifikation und Staging**

Entscheidend für Prognose und Therapie ist das Staging. Es wird unter Berücksichtigung des histologischen Typs nach verschiedenen Schemata bestimmt. Bei den nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen erfolgt die Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation der WHO. Hierbei steht T(= *tumor*) für die Ausbreitung des Primärtumors, N (= *nodes*) für die Ausdehnung auf regionäre Lymphknoten und M (= *metastasis*) für das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen.

Bei den kleinzelligen Bronchialkarzinomen dagegen wird zwischen *limited* und *extensive disease* unterschieden. Bei der *limited disease* sind Lunge und evtl. regionäre Lymphknoten ipsilateral befallen und es liegt keine Infiltration der Thoraxwand vor. Bei der *extensive disease* sind Lunge und Lymphknoten auch auf der kontralateralen Seite befallen und die Thoraxwand ist sowohl ipsilateral, als auch kontralateral infiltriert. Des Weiteren findet man bei der extensive disease eine Pleuritis carcinomatosa und Fernmetastasen (Leber, ZNS, Knochen, Lymphknoten) (Erbar 2002).

In Tabelle 1 und 2 sind die TNM-Klassifikation und die Stadieneinteilung nach UICC (union internationale contre le cancer) dargestellt.

<b>T</b>	<b>Primärtumor</b>
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden oder Nachweis von malignen Zellen im Sputum oder bei Bronchialspülungen, jedoch Tumor weder radiologisch noch bronchoskopisch sichtbar
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, kein bronchoskopischer Nachweis einer Infiltration proximal eines Lappenbronchus (Hauptbronchus frei)
T2	Tumor mit wenigstens einem der folgenden Kennzeichen hinsichtlich Größe oder Ausbreitung: Tumor mehr als 3 cm in größter Ausdehnung Tumor befällt Hauptbronchus, 2 cm oder weiter distal der Carina Tumor infiltriert viszerale Pleura assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus, aber nicht der ganzen Lunge
T3	Tumor jeder Größe mit direkter Infiltration einer der folgenden Strukturen: Brustwand (einschließlich der Sulcus-superior-Tumoren), Zwerchfell, mediastinale Pleura, parietales Pericard oder Tumor im Hauptbronchus weniger als 2 cm distal der Carina, aber Carina selbst nicht befallen oder Tumor mit Atelektase oder obstruktiver Entzündung der ganzen Lunge
T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration wenigstens einer der folgenden Strukturen: Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, Ösophagus, Wirbelkörper, Carina oder Tumor mit vom Primärtumor getrennten Tumorherden im gleichen Lappen oder Tumor mit malignem Pleuraerguß
<b>N</b>	<b>Regionäre Lymphknoten</b>
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen Hiluslymphknoten (einschließlich eines Befalls durch direkte Ausbreitung des Primärtumors in intrapulmonale Lymphknoten)
N2	Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
N3	Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen Hilus-, ipsi- oder kontralateralen Skalenus- oder supraklavikulären Lymphknoten
<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen, einschließlich vom Primärtumor getrennter Tumorherde in einem anderen Lungenlappen (ipsilateral oder kontralateral)

**Tab. 1: TNM-Klassifikation des Bronchialkarzinoms nach UICC (1997)**

Stadium	Primärtumor	Lymphknoten	Metastasen
Okkultes Karzinom	TX	N0	M0
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T1	N1	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	Mo
Stadium IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
Stadium IIIB	T4	jedes N	M0
	jedes T	N3	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

**Tab. 2: Stadiengruppierung der Bronchialkarzinome nach UICC (1997)**

### 1.1.4.2. Histopathologisches Grading

Neben Tumorstadium und Tumortyp ist der histologische Malignitätsgrad für Therapie und Prognose relevant. Graduiert werden folgende Tumoreigenschaften: Tumordifferenzierung, Zellproliferation, Nekroseneigung, Invasionsform und Metastasierungsneigung.

Diese Tumoreigenschaften sind anhand histologischer Schnittpräparate beurteilbar. So gelten zum Beispiel geringer Differenzierungsgrad, hohe Proliferationsaktivität (hohe Mitoserate) und spontane Nekroseneigung als prognostisch ungünstig.

Für das Grading existieren jedoch keine allgemein akzeptierten Definitionen, wie es für die Typisierung und Stadieneinteilung anderer Tumore der Fall ist. Zudem hat das Grading bei den meisten Bronchialkarzinomen, im Gegensatz zu manchen anderen Karzinomen, einen geringeren Stellenwert (Donhuijsen 1998). Beim kleinzelligen Bronchialkarzinom lässt sich ein Grading nicht durchführen (Müller und Theile 1994).

GX	Differenzierungsgrad kann nicht beurteilt werden
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	undifferenziert

*Tab. 3: Histopathologisches Grading der Lungentumoren (aus UICC 1997)*

### 1.1.4.3. R-Klassifikation

Die R-Klassifikation gibt an, ob postoperativ noch ein Residualtumor nachweisbar ist.

RX	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R1	kein Residualtumor
R2	mikroskopischer Residualtumor
R3	makroskopischer Residualtumor

*Tab. 4: R-Klassifikation (aus UICC 1997)*

### 1.1.5. Lokalisation

Bronchialkarzinome werden am häufigsten in der rechten Lunge und dort wiederum im Oberlappen getroffen, was vermutlich auf das größere Ventilationsvolumen und damit die größere Kontaktfläche für Karzinogene zurückzuführen ist (Müller 1987; Riede und Costabel 1995). Sowohl links, als auch rechts ist häufiger der Oberlappen betroffen (Müller und Theile 1994).

Man unterscheidet folgende Karzinomtypen, je nachdem, in welchem Abschnitt des Bronchialsystems das Karzinom entsteht:

- a) zentrales, hilusnahes Bronchialkarzinom:

Dies ist mit 70 % der häufigste topographische Typ. Er ist röntgenologisch schwer fassbar, aber bronchoskopisch zugänglich.

- b) peripheres Bronchialkarzinom:

Das periphere Bronchialkarzinom macht etwa 25 % der topographischen Typen aus. Es hat keine makroskopisch nachweisbare Beziehung zu einem größeren Bronchus und entsteht im Lungenmantel als röntgenologischer Rundherd.

Eine Sonderform ist der Pancoast-Tumor. Er entsteht in der Lungenspitze und infiltriert frühzeitig und direkt Thoraxwand, Plexus brachialis und Halssympathikus, was klinisch zu Schmerzen, Armschwäche und einem Horner-Syndrom führt.

- c) diffus infiltrierendes Bronchialkarzinom:

Dieser seltene topographische Typ macht nur etwa 2,5 % der Bronchialkarzinome aus. (Riede und Costabel 1995).

### 1.1.6. Metastasierung

Bronchialkarzinome können sowohl auf hämatogenem, als auch auf lymphogenem Wege metastasieren. Bei der lymphogenen Metastasierung sind die peribronchialen Lymphknoten erste Station des Ausbreitungswegs. Es folgen tracheobronchiale und paratracheale Lymphknoten. Von dort aus setzt sich die lymphogene Metastasierung in die cervicalen, subaortalen, präösophagealen und in die im vorderen Mediastinum gelegenen Lymphknoten fort (Erbar 2002). Die Fernmetastasierung erfolgt auf hämatogenem Wege. Fernmetastasen finden sich bevorzugt in Leber, ZNS, Skelett und Nebenniere (Matthews und Gordon 1977; Morr 1995; Vogt-Moykopf et al. 1991).

Das hochmaligne SCLC metastasiert früh (Gärtner et al. 1999). Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose liegt die Metastasierungsrate bei 30%. Bei der Obduktion liegt sie bei über 90 %.

Beim zum NSCLC gehörenden Plattenepithelkarzinom ist die Metastasierungsrate zum Zeitpunkt des Todes bedeutend niedriger als beim kleinzelligen Bronchialkarzinom. Sie liegt hier nur bei 50 % (Thomas et al. 1996).

### **1.1.7. Diagnose**

Die Früherkennung des Bronchialkarzinoms ist schwierig, da die klinische Symptomatik gering bzw. unspezifisch ist (Gärtner et al. 1999). In der Regel sind unspezifische Symptome wie Reizhusten und Gewichtsverlust die ersten Hinweise auf ein Bronchialkarzinom. In 10 % der Fälle wird ein Bronchialkarzinom sogar zufällig als röntgenologischer Rundherd nachgewiesen und durch zytologische und histologische Untersuchungen bestätigt, ohne dass der Patient zuvor Beschwerden hatte (Thomas et al. 1996). In bereits fortgeschrittenen Stadien kann es zu trockenem Reizhusten, Dyspnoe, Hämoptoe, Stridor, Pleuraschmerz, Heiserkeit, Dysphagie und oberer Einflussstauung kommen (Erbar 2002; Morr 1995).

Die klinische Manifestation ist je nach Lokalisation und Größe des Tumors unterschiedlich. So kommt es zum Beispiel bei zentral gelegenen Karzinomen häufig zur Einengung der Bronchien, welche zu einer peripheren Retentionspneumonie und/oder Atelektasen führt. Peripher gelegene Bronchialkarzinome dagegen bleiben über längere Zeit klinisch stumm. Erst bei Pleurabefall oder Fernmetastasierung zeigen sie erste Symptome. Zu motorischen und sensorischen Störungen durch Infiltration des Plexus brachialis kommt es bei lokaler Karzinomausbreitung im Bereich der Lungenspitze (Pancoast-Tumor).

Häufig verursacht eine Metastase das erste klinische Zeichen eines Bronchialkarzinoms. Man spricht dann von einem okkulten Tumor. So sind zum Beispiel pathologische Knochenfrakturen typisch für Skelettmetastasen. Aber auch Metastasen in ZNS, Leber, Pleura und Lymphknoten können charakteristische klinische Symptome hervorrufen (Thomas et al. 1996).

Man kann die Diagnostik des Bronchialkarzinoms in drei Bereiche einteilen:

- a) standardisierte Diagnostik
- b) weiterführende Diagnostik
- c) Diagnostik zur Bestimmung des Operationsrisikos

Zunächst erfolgt die Durchführung der standardisierten Diagnostik mit allgemeiner und spezieller Anamnese, körperlicher Untersuchung und Basis-Laboruntersuchungen (BSG, GBB,  $\gamma$ GT, alkalische Phosphatase). Des Weiteren gehören das Thorax-Röntgen und die Sputumzytologie sowie die Bronchoskopie mit Biopsie zur standardisierten Diagnostik. Die Bronchoskopie sichert in mehr als 70 % der Fälle die Diagnose (Senn et al. 2001).

Bei der weiterführenden Diagnostik sollte im Hinblick auf Stadieneinteilung und Resektabilität des Primärtumors eine Computertomographie des Thorax durchgeführt werden. Insbesondere ist sie bei unklarem Thorax-Röntgenbild indiziert.

Zur Abklärung, ob mediastinale Lymphknoten befallen sind, sollte eine Mediastinoskopie durchgeführt werden.

Die Thorakoskopie bietet Erweiterungsmöglichkeiten zur diagnostischen Thorakotomie. Sie kann vor allem bei pleuranahem Befund und Pleurakarzinose eingesetzt werden.

Um extrathorakale Fernmetastasen auszuschließen, können folgende diagnostische Maßnahmen angewendet werden: Sonographie oder CT des Oberbauches, Skelettszintigraphie, Skelettröntgen, Knochenmarksbiopsie, Schädel-CT (bei klinischem Verdacht).

Um das Operationsrisiko zu bestimmen, werden folgende Untersuchungen vorgenommen:

Bei Verdacht auf koronare Durchblutungsstörungen EKG, evtl. Ergometrie, Lungenfunktionsprüfung. Bei pathologischen Daten der Lungenfunktion wird zusätzlich die Ganzkörperplethysmographie angewandt und es erfolgt eine eingehende kardiologische Abklärung. Falls diese Funktionsanalysen grenzwertig sind, ist die sequenzielle Perfusionsszintigraphie indiziert (Senn et al. 2001).

## **1.1.8. Therapie**

### **1.1.8.1. NSCLC**

Für das lokal begrenzte Bronchialkarzinom ist die *Operation* die effektivste Therapieform mit potentiell kurativem Ansatz (Laack und Hossfeld 2000; Hoffmann et al. 2006). Voraussetzung für die chirurgische Therapie ist jedoch, dass sich die Erkrankung auf den Thorax beschränkt, eine komplette Resektion möglich ist und der dazu nötige Eingriff dem Patienten zumutbar ist (Hoffmann et al. 2006). Standardverfahren sind die Lobektomie, die Bilobektomie und die Pneumonektomie (Laack und Hossfeld 2000; Hoffmann et al. 2006). Es sollte sich um einen



möglichst schonenden, aber angemessen radikalen Eingriff handeln (Erbar 2002). Parenchymsparende Verfahren, wie zum Beispiel die Manschettenresektion sind vor allem bei älteren Patienten und Patienten mit eingeschränkter Lungenfunktion von Bedeutung (Laack und Hossfeld 2000). Zusätzlich zum Primärtumor müssen bei der Operation auch die ihn drainierenden Lymphknotenstationen komplett entfernt werden (Laack und Hossfeld 2000). Bei Patienten im Stadium I und II zeigt, sofern Operabilität besteht, das primär chirurgische Vorgehen derzeit die besten Langzeitergebnisse (Macha 2003). Für das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom wird therapeutisch auch in Zukunft das operative Vorgehen als potentiell kuratives Verfahren im Vordergrund stehen (Seeger 1999).

Bei Inoperabilität von Patienten im Stadium I und II wird die *Strahlentherapie* mit kurativem Ziel eingesetzt. Hierbei werden Gesamtdosen von 60-70 Gy über 6-8 Wochen appliziert. Bei Nachweis eines mediastinalen Lymphknotenbefalls ist eine *adjuvante postoperative Strahlentherapie* angezeigt. Die Indikation einer *additiven postoperativen Strahlentherapie* liegt bei unvollständiger Tumorsektion (R1/R2) vor.

Durch eine *adjuvante Strahlenbehandlung* versucht man das hohe Lokalrezidivrisiko zu reduzieren. Hierbei werden Dosen von 50-60 Gy über einen Zeitraum von mindestens 5-7 Wochen appliziert, wobei das Strahlenfeld das ehemalige Tumorbett und das Mediastinum umfasst (Laack und Hossfeld 2000).

Die *palliative Strahlentherapie* bietet Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium des Bronchialkarzinoms eine wichtige Therapieoption mit hoher Effektivität und nur geringer Nebenwirkungsrate. Ziel ist hier eine Verbesserung der Lebensqualität (Fleckenstein et al. 2006).

Das Standardverfahren bei fortgeschrittenem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (Stadium III und metastasiertes Stadium IV) ist die *palliative Chemotherapie* (Schütte 2005). So berichtet Schütte über eine Metaanalyse von 1995, in der gezeigt werden konnte, dass eine palliative Chemotherapie gegenüber alleinigem „best supportive care“ einen 1-Jahres-Überlebensvorteil von 10 % und eine Reduktion des Sterberisikos von 27 % bedingt (Schütte 2005; Stout et al. 2000). Mit der palliativen Chemotherapie werden eine Verbesserung der Lebensqualität und eine Lebensverlängerung angestrebt (Laack und Hossfeld 2000; Schütte 2005; Macha 2003).

Die Chemotherapie kommt jedoch nicht nur als palliative Chemotherapie zum Einsatz, sondern kann auch als *Induktionschemotherapie* mit dem Ziel den Primärtumor zu verkleinern, eingesetzt werden. Hierdurch soll eine bessere Resektabilität erreicht werden,

bzw. eine Resektion überhaupt erst ermöglicht werden. Eine Operation sollte etwa 3-4 Wochen nach Beendigung der Induktionschemotherapie erfolgen. Zudem soll durch die Induktionschemotherapie eine Beseitigung okkulten Mikrometastasen erreicht werden (Laack und Hossfeld 2000).

Bei über zwei Dritteln der Patienten entwickeln sich trotz vollständiger Tumorresektion Fernmetastasen. Durch eine *adjuvante Chemotherapie* soll dies verhindert werden. Ältere Studien der 70er und 80er Jahre zeigten keinen Vorteil hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens und der Gesamtüberlebenszeit der Patienten. In anderen Studien hingegen ist ein Vorteil für die adjuvant chemotherapierten Patienten beobachtet worden (Laack und Hossfeld 2000; Holmes und Gail 1986; Holmes 1994; Lad 1994). Drei aktuellere große randomisierte Studien zeigten nach vollständiger Tumorresektion im Stadium IB-IIIB eine signifikante Verlängerung der Überlebensrate durch eine adjuvante Kombinationschemotherapie (Arriagada et al. 2004, Douillard et al. 2006, Strauss 2005).

Eine *kombinierte Chemoradiotherapie* soll die lokale Tumorkontrolle verbessern und zu einer Eradikation von Mikrometastasen führen. Die Chemoradiotherapie kann sequenziell, simultan und alternierend erfolgen. Einige Arbeitsgruppen berichten über einen teilweise deutlichen Überlebensvorteil für simultan chemoradiotherapierte Patienten (Laack und Hossfeld 2000, Holmes 1994; Schaake-Koning et al. 1992; Soresi et al. 1998; Soresi et al. 1994). Drei Studien zeigten für inoperable Patienten in Stadium III, dass die kombinierte Chemoradiotherapie signifikant günstigere Überlebensraten als die alleinige Bestrahlungstherapie erbringt (Auperin et al. 2006, Kelsey et al. 2006, Pfister et al. 2004).

*Endobronchiale Therapiemaßnahmen* spielen eine wichtige Rolle in der palliativen Situation. Besonders im fortgeschrittenen Tumorstadium sind häufig die zentralen Atemwege beteiligt. Hierdurch kommt es oft zu starken Beeinträchtigungen mit klinischen Symptomen. So sind zum Beispiel das Wiederöffnen oder Offenhalten der zentralen Atemwege bei intraluminärem Tumorstadium, sowie die Stillung von Tumorblutungen wichtige Einsatzbereiche der endobronchialen Therapiemaßnahmen. Es werden, je nach Lokalisation des Tumors, unter anderem folgende Techniken eingesetzt: Ballondilatation, Elektrokauter, Kryotherapie, starre Bronchoskopie, PDT (Zerstörung des Tumors durch eine photochemische Reaktion) (Laack und Hossfeld 2000).

*Neuere Therapieformen* stellen die Behandlung mit Erlotinib, einem Inhibitor der Tyrosinkinase des epidermalen Wachstumsfaktors EGFR und Bevacizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen den Wachstumsfaktor VEGF dar.

Das in Deutschland seit September 2005 zur Behandlung von Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem NSCLC zugelassene Erlotinib hemmt die Tyrosinkinase des epidermalen Wachstumsfaktors EGFR. Wird EGFR aktiviert, fördert er die Zellproliferation und Angiogenese des Tumors. Erlotinib besetzt hochselektiv und reversibel die ATP-Bindungsstellen der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne des EGFR, hemmt somit die Phosphorylierung und antagonisiert die Signaltransduktion. Auf diese Weise werden Proliferation und Angiogenese gehemmt, die Apoptose gefördert und die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber Strahlen- und Chemotherapie erhöht (Sheperd et al. 2005).

Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen den Wachstumsfaktor VEGF und gehört damit zu den so genannten Angiogeneseinhibitoren. Der Wirkstoff bindet an den Wachstumsfaktor und verhindert das Andocken an den VEGF-Rezeptor auf der Oberfläche von Endothelzellen benachbarter Blutgefäße. Somit wird die Gefäßneubildung blockiert und bereits entwickelte Gefäße bilden sich zurück. In Deutschland ist Bevacizumab seit Januar 2005 für Patienten mit fortgeschrittenem Dickdarm- oder Enddarmkrebs zugelassen und wird aufgrund der Therapieerfolge auch bei anderen Indikationen getestet. Seit August 2007 ist Bevacizumab zur First-Line-Therapie des fortgeschrittenen NSCLC zugelassen.

### 1.1.8.2. SCLC

Das kleinzellige Bronchialkarzinom ist gegenüber Zytostatika sehr empfindlich (Schalhorn 2002). Die *Chemotherapie* stellt daher beim kleinzelligen Bronchialkarzinom den primären Behandlungsansatz dar (Seeger 1999).

Hierbei bringt eine Kombinationschemotherapie bessere Erfolge, als die *Monochemotherapie* (Schalhorn 2002). Nach einer *Polychemotherapie* liegen die Remissionsraten bei 70-80 %, wovon 30-40 % Vollremissionen sind. Jedoch beträgt die Remissionsdauer nur 8-9 Monate (Erbar 2002). Danach treten trotz initial gutem Ansprechen häufig Rezidive auf (Müller).

Das Standardtherapieschema ist das ACO-II-Schema. Hier wird eine Kombination aus Adriamycin, Cyclophosphamid und Vincristin in mehreren aufeinander folgenden Behandlungszyklen eingesetzt (Erbar 2002). Bei unzureichendem Ansprechen auf diese Therapie wird auf ein alternatives Kombinationsschema umgestellt. Eine ergänzende Bestrahlung erfolgt, falls nach vier Behandlungszyklen keine Vollremission erreicht wird.

Der Bereich des Primärtumors wird zusätzlich bestrahlt, da 80 % der Rezidive in diesem Bereich auftreten. Da auch mit großer Häufigkeit Hirnmetastasen auftreten, sollte eine

prophylaktische Hirnbestrahlung mit einer Dosis von 40 Gy durchgeführt werden (Erbar 2002).

Bei sehr früher Erkennung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist ein zusätzliches operatives Vorgehen in Erwägung zu ziehen (Seeger 1999). Da sich bei Diagnosestellung allerdings nur ca. 15 % der Patienten in einem frühen Stadium befinden, ist die chirurgische Therapie nur für ein kleines Patientenkollektiv relevant (Sunder-Plassmann 1998). Anschließend an die Operation sollte in jedem Fall eine adjuvante Chemotherapie erfolgen (Schalhorn 2002). Im Stadium I des kleinzelligen Bronchialkarzinoms wurden durch eine Kombination aus Operation und Chemotherapie 5-Jahres-Überlebensraten von bis zu 60 % erreicht. Eine Operation steht nur für Patienten im Stadium I und II zur Diskussion. Leider konnte für Resektionen im Stadium IIIa bisher auch in Kombination mit Radiochemotherapie kein zusätzlicher Nutzen gesichert werden (Sunder-Plassmann 1998).

### **1.1.9. Prognose**

#### **1.1.9.1. Allgemein**

Insgesamt gesehen ist die Prognose des Bronchialkarzinoms heute immer noch schlecht und hat sich trotz aller Behandlungsfortschritte nicht wesentlich verbessert. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt derzeit über alle Stadien gemittelt bei etwa 15 % (Herth 2005).

Ein Grund für die schlechte Prognose ist, dass das Bronchialkarzinom keine spezifischen klinischen Symptome hat und somit keine frühzeitige Diagnosestellung möglich ist (Herth 2005).

Zum Zeitpunkt der Diagnose sind viele Karzinome schon inoperabel. Nur etwa 15 % der Patienten befinden sich bei Diagnosestellung in einem frühen Stadium (Sunder-Plassmann 1998).

#### **1.1.9.2. NSCLC**

Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom ist neben dem histopathologischen Typ die Ausbreitung des Tumors, also das Tumorstadium, der wichtigste prognostische Parameter (Laack und Hossfeld 2000). So beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten im Stadium

I nach kompletter Resektion 50-75 %, im Stadium II nur noch 30-50 %. Im Stadium IIIA variiert die 5-Jahres-Überlebensrate je nach Lymphknotenstatus zwischen 10 % und 40 %. Für das Stadium IIIB liegt sie nach alleiniger Strahlentherapie bei etwa 5 %, im fernmetastasierten Stadium sogar unter 2 % (Laack und Hossfeld 2000).

Andere prognostisch wichtige Faktoren sind das Auftreten von Fernmetastasen, der Gewichtsverlust des Patienten in den letzten 6 Monaten vor Diagnosestellung, das Geschlecht (Frauen haben bessere Überlebenschancen) und die Konzentration der Laktatdehydrogenase im Serum (ein Anstieg der LDH im Serum spricht für eine schlechtere Prognose) (O'Connell et al. 1986; Sørensen et al. 1989; Finckelstein et al. 1986).

### **1.1.9.3. SCLC**

Beim kleinzelligen Bronchialkarzinom liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei nur 1-10 % (Drings 1990; Matthews 1976; Mountain 1986). Die wesentlichen prognosebestimmenden Parameter sind, wie auch beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, Tumorausbreitung, Zellaufbau des Tumors, Gewichtsverlust vor Behandlungsbeginn, Alter, Geschlecht und Allgemeinzustand des Patienten, sowie serologische Parameter (Erbar 2002).

Die mittlere Überlebenszeit ohne Therapie liegt bei etwa 3 Monaten. Bei chemoradiotherapierten Patienten im Stadium Extensive Disease liegt sie bei 6-10 Monaten und bei chemoradiotherapierten Patienten im Stadium Limited Disease bei etwa 16 Monaten (Senn et al. 2001).

## 1.2. Das Plasminogen-Aktivator/Plasmin-System

Das Plasminogen-Aktivator/Plasmin-System besteht aus den Plasminogen-Aktivatoren t-PA (Gewebeplasminogenaktivator) und Urokinase (uPA), deren Rezeptor (uPAR, CD87), den natürlichen Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 sowie der Serinprotease Plasmin. Neben der Aktivierung fibrinolytischer Prozesse spielt das Plasminogen-Aktivator/Plasmin-System unter anderem eine wichtige Rolle bei Tumorinvasion und Metastasierung (Schmitt et al. 1997).

### 1.2.1. Der Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ (uPA)

Urokinase ist eine Serinprotease bestehend aus 411 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 54 kDa (Steinmetzer 2003, Rabbani und Gladu 2002).

Urokinase wird von einer Vielzahl verschiedener Zellen, wie zum Beispiel vaskulären Endothel- und glatten Muskelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten und Monozyten, aber auch von malignen Tumorzellen in Form eines einkettigen Polypeptids (single chain Urokinase) synthetisiert. Diese auch als Prourokinase bezeichnete Form besteht aus drei Domänen: der N-terminalen *growth-factor-like* Domäne (AS 4-43), der zentralen *kringle* Domäne (AS 47-135) und der C-terminalen Serinproteasendomäne (AS 144-411, siehe Abbildung 1). Die N-terminale *growth-factor-like* Domäne ist verantwortlich für die Interaktion von Urokinase mit ihrem Rezeptor (CD87/uPAR) (Stepanova und Tkachuk 2002), die Serinproteasendomäne enthält die Aminosäuren des aktiven Zentrums (His<sup>204</sup>, Asp<sup>255</sup>, Ser<sup>358</sup>) und ist für die katalytische Aktivität verantwortlich.

uPA wird hauptsächlich durch Plasmin, jedoch auch durch andere Proteasen, in die enzymatisch aktive zweikettige Form (two-chain uPA, tcuPA) umgewandelt. Durch Spaltung der Peptidbindung Lys<sup>158</sup>-Ile<sup>159</sup> entstehen zwei Polypeptidketten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind. Die die Wachstumsfaktor- und Kringeldomäne umfassende Kette wird auch als A-Kette (*A-chain*) und die das katalytische Zentrum enthaltende Kette auch als B-Kette (*B-chain*) bezeichnet. Diese aktive Urokinase wiederum katalysiert die Plasminogenspaltung. Das gebildete Plasmin kann nun sowohl Pro-Matrixmetalloproteasen (MMPs), als auch zusätzliches Pro-uPA aktivieren (Schweinitz et al. 2004).

Bindet Urokinase an ihren zellulären Rezeptor, welcher über eine Glycosylphosphatidylinositol-Kette in der Zellmembran verankert ist, wird ihre proteolytische Aktivität um ein Vielfaches erhöht (Plow et al. 1986).

Neben der aus 411 Aminosäuren bestehenden hochmolekularen Form (*high molecular weight urokinase*, HMW-uPA) existiert noch eine 33 kDa große niedermolekulare Form (*low molecular weight urokinase*, LMW-uPA), die durch Plasminspaltung der Lys135-Lys 136 Bindung hervorgeht und über eine verkürzte A-Kette ohne Kringel- und Wachstumsfaktor-Domäne verfügt, aber volle spezifische Aktivität besitzt (Günzler et al. 1982).

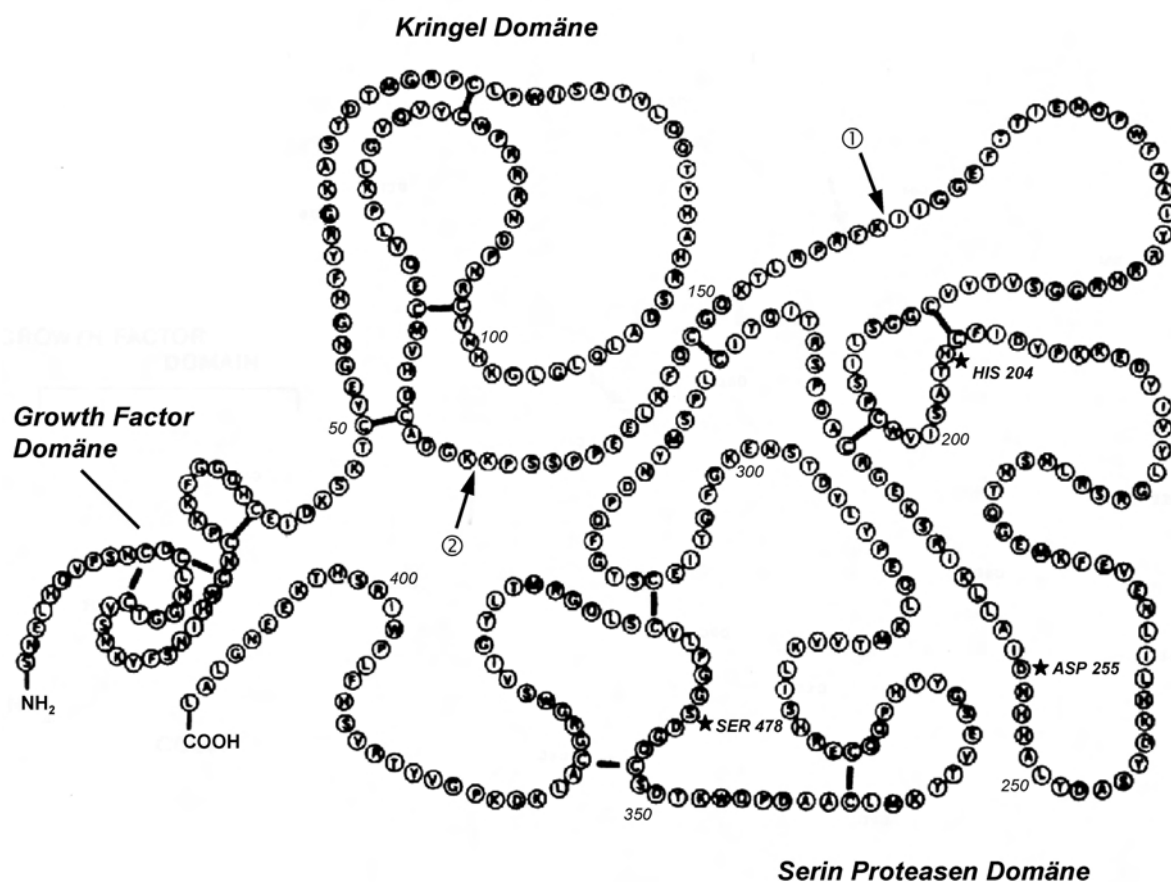


Abb. 1: Struktur und Domänen der Urokinase. Es handelt sich um ein einkettiges Polypeptid mit 411 Aminosäuren. Pfeil 1: Plasmin-Spaltstelle für die Konversion von single-chain uPA in enzymatisch aktive zweikettige Form (two-chain uPA); Pfeil 2: Plasmin-Spaltstelle für die Generierung von low-molecular weight uPA; mit \* gekennzeichnet sind die Aminosäuren des aktiven Zentrums; Balken stellen Disulfidbrücken dar.

### 1.2.2. Der Plasminogen-Aktivator-Rezeptor vom Urokinase-Typ (uPAR)

Der Urokinaserezeptor (uPAR, CD 87) ist ein hochglycosyliertes, extrazelluläres, cysteinreiches Protein mit einem Molekulargewicht von 50-60 kDa (Ge und Elghetany 2003, Nielsen et al. 1988, Plesner et al. 1997). Er wird als einkettiges Polypeptid, bestehend aus 313 Aminosäureresten, freigesetzt. Posttranslational werden am C-terminalen Ende 30 Aminosäurereste abgespalten (Montuori 2002). Das mature Protein besteht aus drei homologen Domänen, wobei die C-terminale dritte Domäne das Molekül über eine Glycosylphosphatidyl-Inositol-Kette in der Zellmembran verankert (Montuori et al. 2002, Danø et al. 1994). Die N-terminale Domäne des Rezeptors vermittelt die Bindung von Urokinase (Stepanova und Tkachuk 2002, Behrendt et al. 1991). Dennoch ist für eine hohe Bindungsaffinität das gesamte Polypeptid mit seinen drei Domänen notwendig. Die Bindungsaffinität der isolierten ersten Rezeptordomäne ist etwa 2000-mal geringer als die des intakten Rezeptors (Stepanova und Tkachuk 2002, Ploug et al. 1994).

Durch Bindung von Urokinase an ihren Rezeptor wird die fibrinolytische Aktivität auf die Zelloberfläche fokussiert. Darüber hinaus kann der Urokinaserezeptor mit Integrinen bzw. dem G-Protein-gekoppelten chemotaktischen Rezeptor FPRL1 in Wechselwirkung treten und so Zelladhäsion und Migration modulieren (Wei et al. 1996, Resnati et al. 2002). Für die Vermittlung adhäsiver Eigenschaften sind die Vitronektin-bindenden Domänen 2 und 3 von Bedeutung (Ge und Elghetany 2003, Colman et al. 1997). Für die Interaktion mit dem extrazellulären Matrixprotein Vitronktin ist ebenfalls die Bindung von uPA an uPAR erforderlich. Nach uPA-Bindung werden Vitronektinbindungsstellen exponiert. Die uPA/uPAR-Vitronektin-Interaktion induziert dann eine Reorganisation des Cytoskeletts und vermittelt zusammen mit der Aktivierung von Integrinen eine Migration der Zelle.

Neben der in der Plasmamembran verankerten Form des Urokinaserezeptors gibt es auch eine gelöste Form, welche in humanem Plasma und Urin entdeckt wurde (Ge und Elghetany 2003, Montuori et al. 2002, Rønne et al. 1995, Sier et al. 1999).

uPAR wird von Monozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Mastzellen der Haut und dendritischen Zellen freigesetzt (Ge und Elghetany 2003, Ghannadan et al. 1998, Ebner et al. 1998, Guilbert et al. 1999, Plesner et al. 1994). Nicht freigesetzt wird der Urokinaserezeptor von Erythrozyten, Thrombozyten oder ruhenden B- und T-Lymphozyten (Ge und Elghetany 2003). Nach bakterieller Infektion und auf inflammatorische Stimuli (Cytokine) hin ist die Expression gesteigert.



In der klinischen Diagnostik von Tumorerkrankungen ist uPAR als Prognosefaktor von Bedeutung. Bei verschiedenen malignen Tumoren, wie zum Beispiel Colon-, Magen-, Mamma- und Blasenkarzinom wird uPAR vermehrt freigesetzt (Ge und Elghetany 2003, Nakata et al. 1998, Fisher et al. 2000, Champelovier et al. 2002, Memarzadeh et al. 2002, Mohanam et al. 1999, Foekens et al. 2000, Guyton et al. 2000).

Eine erhöhte uPAR-Expression korreliert mit schlechter Prognose hinsichtlich Fernmetastasierung und Rezidiven (Ge und Elghetany 2003, Fisher et al. 2000, Memarzadeh et al. 2002, Mohanam et al. 1999, Foekens et al. 2000, Guyton et al. 2000).

### **1.2.3. PAI-1 und PAI-2**

Reguliert wird das uPA-System durch die physiologischen Gegenspieler Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren Typ 1 und Typ 2 (PAI-1, PAI-2). Diese beiden zur Gruppe der SERPINE (SERine Protease INhibitor) gehörenden Urokinaseinhibitoren binden beide an das aktive Zentrum der Urokinase, hemmen die enzymatische Aktivität, allerdings auf unterschiedliche Weise. PAI-1 bildet mit uPA und uPAR einen trimären Komplex, der über den LRP-Rezeptor (CD 91) in die Zelle internalisiert wird (Nykjaer et al. 1997, Casslen et al. 1998, Conese und Blasi 1995).

PAI-1 und uPA werden dort lysosomal abgebaut; uPAR dagegen kehrt an die Migrations-/Invasionsfront der Zelle zurück und steht für erneute Bindung von uPA zur Verfügung.

Der trimäre Komplex aus uPAR, uPA und PAI-2 dagegen wird nicht internalisiert, sondern auf der Zelloberfläche prozessiert. Durch Spaltung des Komplexes entstehen zwei Fragmente. Eines der Fragmente umfasst PAI-2 und die B-Kette von uPA. Dieses 70 kDa große Fragment wird ins Medium freigesetzt oder in die Zelle aufgenommen und abgebaut. Das zweite Fragment ist die A-Kette des uPA (ATF, aminoterminales Ende von uPA) und hat ein Molekulargewicht von 22 kDa. Dieses Fragment bleibt an der Zelloberfläche an uPAR gebunden und verhindert so die erneute Bindung von uPA an den uPA-Rezeptor (Ragno et al. 1995, Ragno et al. 1998).

Neben uPA sind für PAI-1 weitere Interaktionspartner bekannt (Heparin, Fibrin, Vitronectin). Für Tumorinvasion und Metastasierung spielt dabei die Interaktion von PAI-1 mit dem extrazellulären Matrixprotein Vitronectin eine wichtige Rolle. PAI-1 interferiert mit der Bindung des uPA/uPAR-Komplexes sowie Integrinen an Vitronectin (Stefansson und Lawrence 1996) und reguliert dadurch die Balance zwischen Adhäsion und Loslösung von

Zellkontakten, die für die Migration von Zellen entscheidend ist (Lauffenburger und Horwitz 1996).

#### **1.2.4. Das uPA-System als prognostischer Marker**

Einige Studien haben gezeigt, dass Krebspatienten höhere uPA- und uPAR-Spiegel im Blut, bzw. Serum und im Tumorgewebe aufweisen und dies mit einer schlechten Prognose korreliert. So zum Beispiel bei NSCLC (Pappot et al. 1997; Pedersen et al. 1994), colorektalen Karzinomen (Stephens et al. 1997; Ganesh et al. 1994) und Mammakarzinomen (Riisbro et al. 2002; Grøndahl-Hansen et al. 1995). Dies macht sie zu diagnostischen Markern und interessanten Angriffspunkten für Medikamente zur Krebstherapie (Schweinitz et al. 2004, Duffy 1996, Sier et al. 1998). So berichten beispielsweise Ertongur et al. (Ertongur et al. 2004) von einer Überexpression von Komponenten des uPA-Systems in malignen Tumoren (Brust-, Magen-, Lungen-, Prostata-, Colorektales Karzinom und andere Karzinome), welche mit einer schlechten Prognose korrelieren. Ebenso weisen Schmitt et al. (Schmitt et al. 1997) darauf hin, dass bei vielen malignen Tumoren eine Überexpression von uPA, uPAR und PAI-1 eng mit einem verkürzten remissionsfreien Überleben und/oder einer verkürzten Gesamtüberlebenszeit in Zusammenhang steht. uPA ist bereits ein etablierter prognostischer Marker bei Brust- und Ovarialkrebs (Liotta et al. 1991; Konecny et al. 2001; Duffy 2002a, 2002b). Während Offersen et al. (Offersen et al. 2007) uPA und PAI-1 nicht als prognostische Marker bei Lungentumoren identifizieren konnten, berichten Werle et al., dass erhöhte PAI-1- und uPAR- Spiegel als prognostische Marker für das Gesamtüberleben von NSCLC-Patienten dienen (Werle et al. 2004).

#### **1.2.5. Die Rolle des Plasminogen-Aktivator/Plasmin-Systems bei der hämatogenen Metastasierung**

##### **1.2.5.1. Die metastatische Kaskade**

Bei der Tumordinvasion und Metastasierung wandern Zellen aus dem Primärtumor aus und bilden an einer entfernten Stelle des Körpers eine Tochtergeschwulst (Metastase). Hierzu sind

eine Reihe aufeinander folgender Vorgänge notwendig, welche man als metastatische Kaskade bezeichnet (McKinnell et al. 1998, Reuning et al. 1998).

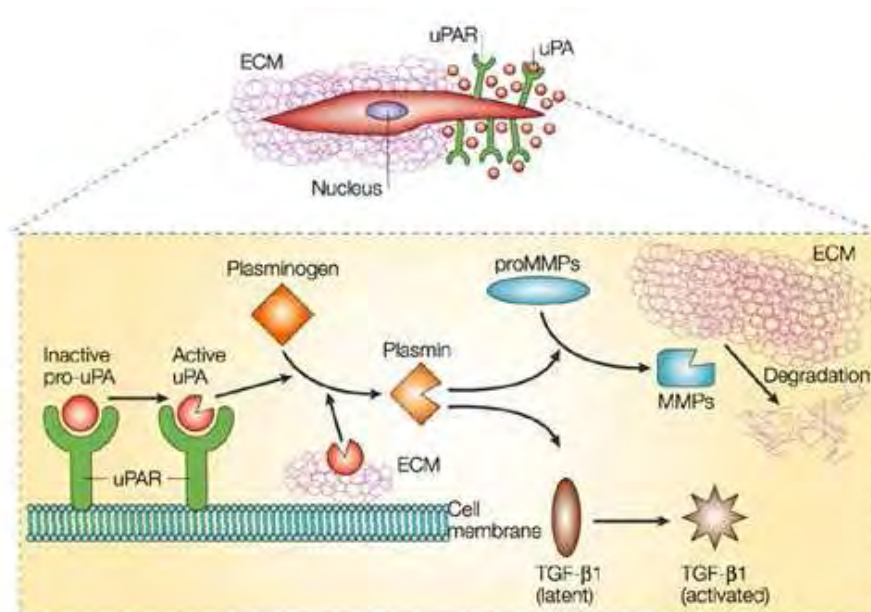
Zunächst lösen sich einzelne Tumorzellen aus dem Primärtumor-Zellverband. Anschließend erfolgen Adhäsion an die Basalmembran und Invasion durch die extrazelluläre Matrix (ECM). Nun können die Tumorzellen in die Blutgefäße einwandern (Intravasation) und werden mit dem Blut an entfernte Stellen des Körpers transportiert. Dort erfolgen die erneute Adhäsion an die Basalmembran, die Extravasation und die erneute Invasion der Zellen durch die extrazelluläre Matrix in das Gewebe, um dort eine Metastase zu bilden. Für den Abbau der extrazellulären Matrix ist eine gerichtete proteolytische Aktivität der Tumorzellen notwendig, welche durch mehrere proteolytische Systeme vermittelt wird. Diese Systeme interagieren miteinander und aktivieren sich gegenseitig (Koblinski et al. 2000).

Bei den zum Abbau der ECM notwendigen proteolytischen Systemen handelt es sich um:

- die Serinproteasen (Plasmin, uPA, tPA) (Schmitt et al. 1997)
- die Matrixmetalloproteinasen (Cockett et al. 1998; Kahari und Saarialho-Kere 1999)
- die Cysteinproteinasen (z.B. Cathepsin B, H, L) (Sloane 1990; Michaud und Gour 1998)
- die Aspartatproteinasen (z.B. Cathepsin D) (Garcia et al. 1996; Rochefort et al. 1996, Rochefort und Liaudet-Coopman 1999)

### **1.2.5.2. Die Rolle des uPA-Systems bei Tumorinvasion und Metastasierung**

Das uPA-System nimmt eine zentrale Rolle bei der Tumorinvasion und Metastasierung ein (Steinmetzer 2003; Rabbani und Gladu 2002). Zum einen aktiviert uPA die Protease Plasmin und gewährleistet so eine zielgerichtete proteolytische Aktivität auf der Zelloberfläche, zum anderen interagiert uPA mit diversen weiteren proteolytischen Systemen. So wird z.B. single-chain uPA neben Plasmin auch durch andere Proteasen, wie Cathepsin B und L und Kallikrein, aktiviert (Schweinitz et al. 2004, Schmitt et al. 2000, Lee et al. 2000). Das durch Urokinase aktivierte Plasmin wiederum kann Matrixmetalloproteinasen aktivieren (Schweinitz et al. 2004). Somit kann Plasmin direkt oder indirekt über Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen Bestandteile der ECM, wie zum Beispiel Kollagen, Laminin und Fibronectin, abbauen (Stepnova und Tkachuk 2002; Aguirre Ghiso et al. 1999), wodurch das Ausbrechen der Tumorzellen aus dem Zellverband des Primärtumors, deren Invasion in andere Gewebe und die Bildung von Metastasen ermöglicht wird



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Abb. 2: Schematische Darstellung der Rolle von uPAR als uPA-Rezeptor und der aus der Bindung von pro-uPA resultierenden Aktivierungswege, welche letztendlich zum Abbau der ECM und somit zur Tumormetastasierung führen (nach Blasi und Carmeliet, 2002). Die inaktive Pro-Form der Urokinase bindet an ihren sich auf der Zelloberfläche befindenden Rezeptor (uPAR) und wird in aktive Urokinase umgewandelt. Diese aktiviert Plasminogen zu Plasmin. Plasmin kann nun direkt oder indirekt (über Aktivierung von MMPs) Komponenten der extrazellulären Matrix abbauen. Daneben kann Plasmin auch Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- $\beta$  aktivieren.

## 1.2.6. Die Rolle des Plasminogen-Aktivator/Plasmin-Systems bei der Tumorangiogenese

### 1.2.6.1. Angiogenese allgemein

Unter Angiogenese versteht man die Neubildung von Gefäßen durch Aussprossung oder Teilung schon bestehender Gefäße. Dies geschieht durch Migration und Proliferation von Endothelzellen (Folkman und Klagsbrun 1987, Beck und D'Àmore 1997, Risau 1998).

Unter physiologischen Bedingungen findet die Neubildung von Gefäßen nur bei wenigen Vorgängen, wie zum Beispiel Embryogenese und Reproduktion, statt (Folkman und Shing 1992, Gargett und Rogers 2001, John und Tuszynski 2001). Bei der Wundheilung erfüllt die Angiogenese ebenfalls eine wichtige biologische Funktion (Folkman 1995, John und

Tuszynski 2001). Aber auch bei pathologischen Prozessen, wie der Tumorprogression und Metastasierung spielt die Neubildung von Gefäßen eine entscheidende Rolle (Hanahan und Folkman 1996, Folkman 1995, Folkman und Klagsbrun 1987, Folkman 1990).

Um über eine Größe von 1-2 mm<sup>3</sup> wachsen und den damit verbundenen erhöhten Nährstoffbedarf decken zu können, benötigen Tumore eine gesteigerte Blutversorgung (John und Tuszynski 2001). Parallel zur Proliferation der Tumorzellen kommt es also auch zur Proliferation von Endothelzellen. Dies vermutete Folkman bereits 1972 und schloss daraus, dass die Hemmung einer solch pathologischen Angiogenese auch eine Reduktion von Tumorgröße und Metastasenbildung zur Folge haben könnte (Folkman 1972).

Auch gegenwärtig ist die tumorinduzierte Angiogenese Gegenstand der Forschung. Ihre Hemmung stellt eine potentiell wertvolle und zunehmend etablierte Methode der Krebstherapie dar (Dhanabal et al. 2005).

#### **1.2.6.2. Der Angiogeneseprozess bei Tumoren**

Hat ein Tumor eine Größe von 1-3 mm<sup>3</sup> (Folkman 1990, Folkman 1995, Gasparini et al. 1994, John und Tuszynski 2001) überschritten, sendet er proangiogene Signalmoleküle aus. Durch die Hypoxie der Zellen im Tumorrinneren wird beispielsweise die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und bFGF (*basic fibroblast growth factor*) induziert. Diese gelangen durch Diffusion zu bereits vorhandenen Blutgefäßen und binden dort an spezifische Oberflächenrezeptoren der Endothelzellen, welche dadurch aktiviert werden (Eatock et al. 2000, Murota et al. 2000). Es wird eine komplexe Signalkaskade ausgelöst, die vor allem die Expression des Plasminogen-Aktivator Systems und der Matrix-Metalloproteasen zur Folge hat. Gemeinsam mit anderen proteolytischen Enzymen bauen diese die extrazelluläre Matrix und die Basalmembran der Blutgefäße ab. Es folgt die Proliferation von Endothelzellen und deren Loslösen und Auswandern aus dem Zellverband (Eatock et al. 2000, John und Tuszynski 2001). Von den Endothelzellen werden Adhäsionsmoleküle, so genannte Integrine, freigesetzt, welche die Migration und Reifung der Endothelzellen vermitteln (Eatock et al. 2000).

Aus den zunächst als Gefäßsprossen heranwachsenden Endothelzellen entstehen unter Mitwirkung von Wachstumsfaktoren Kapillaren, die sich zu Netzwerken verbinden und somit eine Blutzirkulation im Tumor ermöglichen. Die Tumorzellen sind nun imstande zu proliferieren (Hammersen et al. 1985). Durch Anschluss des Tumorzellverbandes an das

Gefäßsystem des Körpers wird die hämatogene Metastasierung ermöglicht (Weidner et al. 1991).

## **2. Zielsetzung**

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss verschiedener Dosierungen des synthetischen Urokinaseinhibitors CJ-463 auf Primärtumorwachstum und pulmonale Metastasierung des kleinzelligen und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms an einem Mausmodell getestet werden. Als Kontrollgruppen sollten mit Kochsalzlösung bzw. dem unwirksamen Stereoisomer CJ-1106 behandelte Mäuse dienen.

Zudem sollte herausgefunden werden, ob CJ-463 Tumorwachstum und Metastasierung bei uPA-KO- und uPAR-KO-Mäusen beeinflusst. Ziel dieser Versuche war festzustellen, ob sich in Abwesenheit von Wirts-Urokinase (uPA) oder deren Rezeptor (uPAR) Primärtumoren und Lungenmetastasen entwickeln und ob der synthetische Urokinaseinhibitor CJ-463 auch in Abwesenheit von Wirts-uPA bzw. Wirts-uPAR das Primärtumorwachstum hemmt.

Zur Überprüfung der Frage, worauf der Effekt der Inhibitorbehandlung auf das Primärtumorwachstum zurückzuführen ist, wurde untersucht, ob die Behandlung mit dem Inhibitor einen Einfluss auf die Vaskularisierung des Primärtumors hat.

Eine weitere Aufgabe bestand im Nachweis von uPA und uPAR in verschiedenen Organen gesunder Mäuse, in Primärtumoren, sowie in LLC-Zellen mittels molekularbiologischer Methoden (SDS-PAGE, Western Blot). Dieser Punkt schien unter anderem dadurch interessant zu sein, dass in vielen Publikationen über eine Überexpression der Komponenten des uPA-Systems bei verschiedenen Karzinomen berichtet wird.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Versuchstiere**

Für die Versuche wurden männliche Mäuse des Zuchtstammes C57Bl6/N mit einem Gewicht von 18-20 g zu Versuchsbeginn und männliche SCID-Mäuse mit einem Alter von etwa 8 Wochen zu Versuchsbeginn verwendet. Zuchtbetrieb und Lieferant der Tiere war Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland. Die Versuchstiere wurden für die Dauer der Versuche im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Giessen gehalten.

Die Fütterung erfolgte mit Altromin<sup>R</sup> Standarddiätfutter ad libidum. Die Tiere hatten jederzeit unbegrenzten Zugang zu Leitungswasser. Die Umgebungstemperatur betrug im Mittel 25 °C. Die Beleuchtungsdauer im Tierstall beträgt 12 Stunden pro Tag.

##### **3.1.2. Tierversuchsgenehmigung**

Die durchgeführten Versuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt. Der für die Versuche geltende Tierversuchsantrag „Wirksamkeit von Urokinasehemmstoffen beim Bronchialkarzinom“ kann unter dem Aktenzeichen GI-20/10 Nr.48/2004 eingesehen werden.



### 3.1.3. Injektionslösungen und Substanzen:

Ketaminhydrochlorid (100mg/ml) (Ketavet <sup>R</sup> )	Pfizer, Karlsruhe
Physiologische Kochsalzlösung	Baxter S.A., München
Sevofluran (Sevorane <sup>R</sup> )	Abbott, Wiesbaden
uPA Inhibitor (CJ-463)	Curacyte, München
unwirksames Stereoisomer (CJ-1106)	Curacyte, München
Xylazinhydrochlorid (Rompun <sup>R</sup> )	Bayer, Leverkusen

### 3.1.4. Tierexperiment:

#### Geräte/Instrumente:

Präparationsbesteck	Martin Medizintechnik, Tuttlingen
Schieblehre	Mitutoyo, U.K.Ltd., England

#### Verbrauchsmaterial:

Einmalhandschuhe Nobagove <sup>R</sup>	Noba Verbandmittel Danz GmbH, Wetter
Einmalspritze, 1ml, 20 ml (Inject Luer <sup>R</sup> )	Braun, Melsungen
Greiner Tubes (15 ml)	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen
Haushaltsbindfaden Nr.12	
Heidelberger Verlängerung	M.Schilling GmbH, Gelnhausen-Hailer
Kanüle, 26G1/2“ (BD Microlance <sup>R</sup> )	Beckton-Dickinson,
Mulltupfer, pflaumengross	Beese, Barbüttel
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Venenverweilkanüle, 20G (Vasocan Braunüle <sup>R</sup> )	Braun, Melsungen

### 3.1.5. Histologie:

#### Geräte:

Digitale Kamera (DC 300 F)	Leica Microsystems, Nussloch
Heizplatte	Leica Microsystems, Nussloch
Kühlplatte (EG 1150 C)	Leica Microsystems, Nussloch
Mirax-Scanner	Zeiss, Göttingen
Paraffinausgießstation (EG 1140 H)	Leica Microsystems, Nussloch
Paraffinstreckbad (HI 1210)	Leica Microsystems, Nussloch
Rotationsmikrotom, vollautomatisch	Leica Microsystems, Nussloch
Stereomikroskop, Durchlicht (DMLA)	Leica Microsystems, Nussloch
Vakuumgewebefixationsautomat (TP 1050)	Leica Microsystems, Nussloch
Wasserbad	Leica Microsystems, Nussloch

#### Verbrauchsmaterial:

Deckgläser, 24x36 mm	R.Langenbrinck, Emmerdingen
Einbettkassetten mit Deckel	Leica Microsystems, Nussloch
Eindeckmedium, Xylol-löslich (Pertex <sup>R</sup> )	Medite GmbH, Burgdorf
Mikrotomklingen S35	Feather, Japan (über Produkte für die Medizin AG, Köln)
Objektträger (Super Frost Plus <sup>R</sup> )	R.Langenbrinck, Emmerdingen
Paraffin Einbettmedium (Paraplast Plus <sup>R</sup> )	R.Langenbrinck, Emmerdingen

#### Chemikalien/Reagenzien:

Avidin-Biotin Blocking Kit	Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Ethanol (70 %,95 %, 99,6 %)	Fischer, Saarbrücken
Erstantikörper: anti-vWF polyclonal, rabbit anti human IHC solution	Dako, Cytomation, Hamburg
Formaldehyd, säurefrei	Roth, Karlsruhe
Isopropanol (99,8 %)	Fluka, Chemie, Buchs, Schweiz

Kaliumhydrogenphosphat, pro analysi	Merck, Darmstadt
Methanol, reinst	Fluka, Chemie, Buchs, Schweiz
Methylgrün Counterstain	Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen
Natriumchlorid, pro analysi	Roth, Karlsruhe
Normal Goat Serum	Alexis Biochemicals, Grünberg
Roti-Histol	Roth, Karlsruhe
Vectastain Elite ABC Kit, rabbit IgG	Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen
Vector VIP Substrat Kit	Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen
Wasserstoffperoxid, 30 %, pro analysi	Merck, Darmstadt
Xylol	Roth, Karlsruhe

### 3.1.6. Zellkultur:

#### Geräte:

β-Counter	Pacard, Rockville, MD
Brutschrank (Heracell)	Heraeus GmbH, Hanau
ELISA-Reader	Bio Tek Instruments, Highland Park, VT
Mikroskop	Leica Microsystems, Nussloch
Neubauer-Zählkammer	Merck, Darmstadt
Pipetboy	Fischer-Scientific
Pipetten	Eppendorf GmbH, Wesselin-Berzdorf
Saugpumpe	Merck, Darmstadt
Sterilbank (Herasafe)	Heraeus GmbH, Hanau
Vortexer (REAX 2000)	Heidolph, Schwalbach
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel
Zentrifuge	Heraeus GmbH, Hanau

#### Verbrauchsmaterialien:

Bottle-top-Filter	Millipore Corporation, Billerica, MA
Greiner Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen

Petrischalen (Cellstar <sup>R</sup> )	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Plastikpipetten (10 ml, 50 ml)	Fisher Scientific, Schwerte
48-well-Platten	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen

Chemikalien/Reagenzien:

Cytotoxicity Detection Kit (#164479)	Roche, Mannheim
FCS (foetales Kälberserum)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
<sup>3</sup> H-Thymidin	Perkin Elmer
HEPES	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Baxter SA, München
PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin (10000 U Penicillin/ml, 10 mg Streptomycin/ml)	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640 Kulturmedium	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Scintillation-Fluid	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe

Zellen:

H-510-Zellen	zur Verfügung gestellt von Arbeitsgruppe Professor Preissner, Biochemisches Institut, Friedrichstrasse 24, 35392 Giessen
LLC-Zellen(ATCC-Nr.: CRL-1642)	ATCC, Manassas, USA (über LGC Promochem, Wesel)

### 3.1.7. SDS-PAGE/Western Blot:

#### Geräte:

Elektrophoresekammer	Bio Rad, München
Gelgießapparatur	Bio Rad, München
Heizblock	Biozym Scientific GmbH, Hess.Oldendorf
Hypercassette™	Amersham, Buckinghamshire, UK
pH-Meter	Hanna Instruments,
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Vortexer (REAX 2000)	Heidolph, Schwabach
Wipptisch	Janke & Kunkel, Staufen

#### Verbrauchsmaterialien:

Filterpapier	Bio Rad, München
Hyperfilm™	Amersham Pharmacia, Freiburg
PVDF-Transfermembran	Amersham Pharmacia, Freiburg
Pipettenspitzen	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht

#### Chemikalien/Reagenzien:

APS (Ammoniumpersulfat)	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Paesel und Lorei, Hanau
EDTA	Merck, Darmstadt
(w/v) Na-Deoxycholat	Roth, Karlstuhe
ECL-Plus	Amersham Pharmacia, Freiburg
Entwickler	Amersham Pharmacia, Freiburg
Ethanol	Fischer, Saarbrücken
Glycin	Merck, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Fluka, Chemie, Buchs, Schweiz
Mercaptoethanol	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim

Methanol	Fluka, Chemie, Buchs, Schweiz
Mol-Marker	Roche, Mannheim
Natriumchlorid, pro analysi	Roth, Karlsruhe
uPAR-Positivkontrolle (human urokinase receptor positive control, No. 129PC)	American Diagnostica, Stamford, Connecticut, USA
Primärantikörper, uPA-Blot, (rabbit anti rodent uPA, No. 1190)	American Diagnostica, Stamford, Connecticut, USA
Primärantikörper, uPAR-Blot (anti mouse uPAR, Cat No.AF534)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
Sekundärantikörper, goat ant rabbit IgG, No.P0448	Dako Cytomation, Hamburg
Sekundärantikörper, rabbit anti goat IgG, No.E0466	Dako Cytomation, Hamburg
TEMED	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim
Tween 20	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Zellkultur**

#### **3.2.1.1. Auftauen und Kultivieren der Zellen**

Für jeden Versuchsdurchlauf wurde ein in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagertes Aliquot der Tumorzellen im Wasserbad bei 37 °C für 1-2 Minuten aufgetaut und anschließend in eine Petrischale mit 10 ml Kulturmedium gegeben. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37° C und in 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert.

Das Kulturmedium setzte sich wie folgt zusammen:

Für LLC-Zellen:

RPMI-1640

2 mM L-Glutamin

5 % fetales Kälberserum

1 % PenicillinStreptomycin-Lösung (10000 U Penicillin/ml, 10 mg Streptomycin/ml)

Bei der humanen Zelllinie H-510 enthielt das Kulturmedium zusätzlich 20 mM HEPES.

#### **3.2.1.2. Passagieren der Zellen**

Die LLC-Zellen wurden 2-3-mal pro Woche passagiert, die H-510-Zellen etwa alle 8-10 Tage. Nach Absaugen des Zellüberstandes und Waschen der adhärennten Zellen mit PBS wurden diese durch Trypsinierung (LLC) oder mit Hilfe eines Zellschabers (H-510) vom Boden der Petrischale gelöst und anschließend in ein Falcon Cup überführt, in dem FCS-haltiges Medium zur Inaktivierung des Trypsins vorgelegt wurde. Die Zellen wurden für 6 Minuten bei 300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und auf Petrischalen ausplattiert. Das Splitverhältnis betrug 1:3 (LLC) bzw. 1:2 (H-510).

### 3.2.1.3. Vorbereitung der Zellen zur Injektion

Nach Bestimmung des Anteils der lebenden Zellen mit Trypanblau und Zählung der Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, wurden jeweils  $3 \times 10^6$  LLC-Zellen bzw.  $10 \times 10^7$  H-510-Zellen in 200  $\mu$ l sterilfiltrierter Kochsalzlösung resuspendiert und den Mäusen subkutan in die rechte Flanke injiziert.

### 3.2.1.4. Proliferationsassay

Der Proliferationsassay ermöglicht die Quantifizierung des Wachstums von Zellen in An- oder Abwesenheit von proliferationsbeeinflussenden Stoffen.

Dem Proliferationsassay liegt folgendes Prinzip zugrunde: Eine definierte Anzahl an Zellen wird in die Vertiefungen einer 48-well-Platte gesät. Anschließend wird ein die Proliferation beeinflussender Stoff bzw. Medium zugefügt. Nun werden die Zellen für eine bestimmte Zeit (z.B. 24 h) bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wird  $^3\text{H}$ -Thymidin in jede Vertiefung gegeben und für einen weiteren Zeitraum (hier 2-6 h) bei 37 °C inkubiert. Bei jeder Zellteilung inkorporieren die Zellen  $^3\text{H}$ -Thymidin in ihre DNA. Je höher die Proliferationsrate ist, desto mehr  $^3\text{H}$ -Thymidin wird in die DNA eingebaut. Nach der Inkubation werden die Zellen geerntet, zur DNA-Freisetzung behandelt und die aufgenommene Radioaktivität in einem  $\beta$ -Counter gemessen. Um die Proliferationshemmung in Anwesenheit eines Inhibitors zu berechnen, wurde folgende Formel angewandt:

$$\text{Hemmung der Proliferation (\%)} = [\text{cpm (unbehandelt)} - \text{cpm (behandelt)}] / \text{cpm (unbehandelt)}$$

In der vorliegenden Arbeit wurde der Proliferationsassay durchgeführt, um zu testen, ob und in welcher Konzentration der uPA- Inhibitor CJ-463 die Proliferation von LLC-Zellen hemmt. Dazu wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in die Vertiefungen einer 48-well-Platte gegeben. Nach 12stündiger Inkubation bei 37 °C wurde das Medium entfernt und durch ein so genanntes Silencingmedium (Medium mit nur 0,1 % FCS) ersetzt (200  $\mu$ l pro Vertiefung). Anschließend wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und der in Silencingmedium gelöste Inhibitor zugegeben. Kontrollen erhielten frisches Silencingmedium ohne Inhibitor. Nach einer Inkubation von 24 h bei 37 °C wurden 0,6  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin in jede Vertiefung gegeben. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt



von 2-6 h. Danach wurde das radioaktive Medium entfernt, die Zellen 4-mal mit PBS gewaschen und anschließend 200 µl 0,5 N NaOH in jede Vertiefung gegeben. Die 48-well-Platte wurde nun über Nacht bei 4 °C gelagert und am nächsten Morgen für 30 Minuten auf dem Rütteltisch geschüttelt. Nun wurden 100 µl aus jeder Vertiefung in ein Probenröhrchen gegeben, 2 ml „Scintillation-Fluid“ zugefügt, gevortext und die Radioaktivität in einem β-Counter gemessen. Zum Schluss wurde die Hemmung der Proliferation mit Hilfe der obigen Formel berechnet.

### **3.2.1.5. Zytotoxizitätsassay**

Der Zytotoxizitätsassay sollte Aufschluss darüber geben, ob die Behandlung der LLC-Zellen mit dem uPA-Inhibitor CJ-463 einen zytotoxischen Effekt hatte.

Dazu wurde das Cytotoxicity Detection Kit von Roche # 1644793 benutzt, welches die Quantifizierung von Zelltod und Zelllyse ermöglicht. Bei Beschädigung einer Zellplasmamembran kann Laktat-Dehydrogenase (LDH) im Überstand der Zellkulturen durch einen enzymatischen Test mit Hilfe einer Farbreaktion quantifiziert werden.

Diese Farbreaktion läuft folgendermaßen ab: Im ersten Schritt wird  $\text{NAD}^+$  durch die LDH-katalysierte Umwandlung von Laktat zu Pyruvat zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert. In der zweiten enzymatischen Reaktion werden 2 H vom  $\text{NADH}/\text{H}^+$  zum Tetrazoliumsalz (blassgelbe Färbung) transferiert, welches dadurch zu Formazan (rote Färbung) reduziert wird.

Die Menge des gebildeten Formazans korreliert also mit der Erhöhung der LDH-Aktivität und ist somit proportional zur Zahl der lysierten/geschädigten Zellen.

Bei dem Zytotoxizitätsassay ging man folgendermaßen vor:

Aus jeder Vertiefung der im Proliferationsassay verwendeten 48-well-Platte wurden 100 µl des Überstandes entnommen und in eine 96-well-Platte pipettiert. Nach Zugabe der frisch angesetzten Lösung aus dem Kit, erfolgte eine 30minütige Inkubation unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Absorption des gebildeten Formazans in einem ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen.

Als Kontrollen wurden mitgeführt: background control (nur Assaymedium), low control (= spontane LDH Freisetzung; Assaymedium mit Zellen), high control (= maximale LDH Freisetzung; Zugabe von 100 µl Triton-X zu den Zellen; 30minütige Inkubation).

Um die Zytotoxizität in % zu bestimmen, wurde zunächst die Absorption der background control von der Absorption der einzelnen Vertiefungen subtrahiert. Anschließend wurden die berechneten Werte in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = (\text{Absorption} - \text{low control}) / (\text{high control} - \text{low control}) \times 100$$

### **3.2.2. Ansetzen der Inhibitorlösung**

Der hier verwendete Urokinaseinhibitor CJ-463 wurde von der Firma Curacyte entwickelt. Dieser uPA-Inhibitor hemmt uPA sehr selektiv und wird im Tier relativ langsam mit einer Halbwertszeit von etwa einer Stunde eliminiert.

CJ-463 ist in Lösung bei einer Temperatur von -20 °C bis +25 °C 6 Monate stabil.

In den Tierexperimenten der vorliegenden Arbeit wurde die Inhibitorlösung mit der entsprechenden Konzentration (10, 25 oder 100 mg/kg KGW) am Tag des Behandlungsbeginns frisch angesetzt. Dazu wurde die benötigte Menge des Inhibitors, welcher in Pulverform vorlag, auf einer Feinwaage abgewogen und anschließend in isotoner Kochsalzlösung gelöst.

Die angesetzte gebrauchsfertige Lösung wurde nun in Eppendorf-cups aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20 °C aufbewahrt. Täglich wurde vor Behandlung der Mäuse die benötigte Menge der Inhibitorlösung aufgetaut und auf Körpertemperatur erwärmt.

Ebenso wurde mit dem unwirksamen Stereoisomer des uPA-Inhibitors, CJ-1106, verfahren. Dieses wurde in einer Konzentration von 10 mg/kg KGW eingesetzt.

### 3.2.3. Tierexperimente

#### 3.2.3.1. Versuchsdurchführung

Für die Experimente wurden männliche C57Bl6N-Mäuse der Firma Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland verwendet. Die Mäuse hatten zu Versuchsbeginn ein Gewicht von 18 bis 20 g bei einem Alter von 8 Wochen.

Zur subcutanen Injektion der Lewis lung carcinoma-Zellen wurden die Tiere mit Sevofluran narkotisiert. Die Injektion erfolgte mit einer 26G Nadel an der rechten Flanke der Mäuse. Jeder Maus wurden 3 Millionen LLC Zellen, gelöst in 200 µl isotoner Kochsalzlösung, injiziert.

Sieben Tage nach Tumorzellinokulation wurden längster und kürzester Durchmesser des an der Injektionsstelle gewachsenen Primärtumors erstmals mittels einer digitalen Schieblehre gemessen. Das Tumolvolumen wurde anhand folgender Formel berechnet: Länge x (Breite)<sup>2</sup>/2.

Nun wurden die Tiere so in verschiedene Gruppen verteilt, dass alle Gruppen in etwa das gleiche mittlere Tumolvolumen aufwiesen. Eine Gruppe erhielt ab Tag 7 des Experiments zweimal täglich eine i.p.-Injektion mit 200 µl isotoner Kochsalzlösung. Diese Gruppe diente als Kontrollgruppe. Eine Gruppe wurde zweimal täglich mit CJ-1106, einem unwirksamen Stereoisomer des Urokinaseinhibitors CJ-463, behandelt. Die übrigen Gruppen wurden zweimal täglich mit dem Urokinaseinhibitor CJ-463 in verschiedenen Dosierungen behandelt (10 mg/kg; 25 mg/kg; 100 mg/kg). Die Behandlung erfolgte ebenfalls per i.p.-Injektion.

Ab Tag 7 nach der Tumorzellinokulation wurden Länge und Breite des Primärtumors jeden zweiten Tag mit einer digitalen Schieblehre gemessen und das Tumolvolumen berechnet. Die durchschnittlichen Tumorumfänge der verschiedenen Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe wurden miteinander verglichen.

Um eventuelle Lungenmetastasen zu entdecken, wurden die Tiere an Tag 7, 14 und 19 des Versuchs in einem Volumen-CT (VCT) untersucht (siehe 3.2.4.). Hierzu wurden die Mäuse mit einem Ketamin/Xylazin-Gemisch narkotisiert. Die Narkoselösung wurde intraperitoneal verabreicht. Sie enthielt Ketamin, Xylazin und isotone Kochsalzlösung in einem Verhältnis von 1:1:2 (100 µl:100 µl:200 µl). Jede Maus erhielt 50 µl der Narkoselösung.

Am letzten Tag des Experiments (Tag 19 nach Tumorzellinjektion) wurden die Mäuse mit einer Überdosis Narkose getötet. Lunge und Primärtumor wurden für weitergehende Untersuchungen (Histologie, molekularbiologische Analysen) entnommen.

### **3.2.3.2. Weitere Versuchsansätze**

#### Früherer Behandlungsbeginn:

Es wurden zusätzlich Versuche mit C57Bl6/N-Mäusen durchgeführt, bei denen bereits einen Tag vor Tumorzellinjektion mit der Behandlung begonnen wurde. Hier wurden zwei verschiedene Dosierungen des uPA Inhibitors getestet (10 mg/kg KGW, 100 mg/kg KGW) und mit einer Kochsalzbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Der Versuchsablauf wich bis auf den früheren Behandlungsbeginn nicht vom zuvor beschriebenen Versuchsablauf ab.

#### Versuch mit uPA-ko Mäusen und uPAR-ko Mäusen:

Um festzustellen, ob der uPA Inhibitor CJ-463 auch in Abwesenheit von uPA bzw. uPAR Tumorwachstum und pulmonale Metastasierung beeinflusst, wurden Versuche mit *knock out* Mäusen durchgeführt. Der oben beschriebene Versuchsablauf wurde beibehalten, jedoch wurde hier nur eine Inhibitorosis (10 mg/kg KGW) eingesetzt und mit einer Kochsalzbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

#### Versuch mit der humanen Kleinzelllinie H-510:

Um den Einfluss des uPA Inhibitors auch auf Wachstum und pulmonale Metastasierung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms zu testen, wurden zusätzlich Versuche mit der humanen kleinzelligen Zelllinie H-510 durchgeführt. Da diese Zellen ein langsames Wachstum als die bisher verwendeten LLC-Zellen aufwiesen, wurden Versuchsdauer und Zeitraum bis zum Behandlungsbeginn entsprechend angepasst. Zu Beginn des Versuchs wurden 10 Millionen Zellen in 200 µl Kochsalzlösung gelöst und subkutan in die rechte Flanke der Mäuse injiziert. Erste Tumormessung und Behandlungsbeginn erfolgten an Tag 21 nach Tumorzellinjektion, die Bestimmung des Tumolvolumens alle 4 Tage. Der Versuch wurde an Tag 53 beendet. Die Behandlung erfolgte mit einer Inhibitorosis von 10 mg/kg KGW. Wie in den zuvor beschriebenen Versuchen wurde die inhibitorbehandelte Gruppe mit einer Kontrollgruppe (isotone Kochsalzlösung) verglichen. Ansonsten wurde der bisherige Versuchsablauf

beibehalten. Da die hier verwendeten humanen Zellen nur bei B- und T-Zell-defizienten Mäusen Tumore ausbilden, wurden hier B- und T-Zell-defiziente SCID-Mäuse verwendet.

### **3.2.3.3. Entnahme der Lunge**

Zunächst wurden ventraler Halsbereich, Thorax und craniales Abdomen mit Braunol<sup>R</sup> desinfiziert. Anschließend wurde ein medianer Hautschnitt vom cranialen Abdomen bis zum ventralen Halsbereich gesetzt. Nach Präparation der Haut wurde der Processus xiphoideus mit einer Pinzette erfasst und das Abdomen im epigastrischen Winkel eröffnet. Im Anschluss wurde das Diaphragma mit einer Präparierschere vorsichtig entfernt und das Sternum bis zur Apertura thoracis cranialis median durchtrennt. Die Rippenbögen wurden auseinandergespreizt und seitlich fixiert. Im ventralen Halsbereich wurde die Trachea durch stumpfes Präparieren von Bindegewebe und Muskelgewebe dargestellt. Nach Vorverlagerung der Trachea mittels einer stumpfen Pinzette wurde zwischen zwei Knorpelspangen eine Inzision gesetzt, über welche später zur Formalinfixierung der Lunge eine Braunüle in die Trachea eingeführt wurde. Zuvor wurde die Lunge über das Herz mit isotoner Kochsalzlösung blutleer gespült. Dazu wurde im linken Ventrikel des Herzens ein Schnitt zum Abfluss der Spüllösung gesetzt und eine Kanüle in den rechten Ventrikel eingeführt, über die die Spüllösung verabreicht wurde.

Nun erfolgte die Fixierung der Lunge für die histologische Aufarbeitung. Dabei wurde über die Trachea eine 3,7%ige Formaldehydlösung mit einem Druck von 20 cm Wassersäule in die Lunge eingeleitet. Anschließend wurde die Trachea unterhalb der Inzision ligiert, die Lunge vorsichtig herauspräpariert und in ein mit 3,7%iger Formaldehydlösung gefülltes Falcon-cup überführt. Die Lunge wurde über Nacht bei 4 °C fixiert. Am nächsten Tag wurde sie in eine Einbettkassette überführt und bis zur Entwässerung bei 4 °C in PBS gelagert.

### **3.2.3.4. Entnahme des Primärtumors**

Zunächst wurde die rechte Flanke im Bereich des Primärtumors mit Braunol<sup>R</sup> desinfiziert. Nun wurde ein Hautschnitt gesetzt und der Primärtumor vorsichtig freigelegt und herauspräpariert. Anschließend wurde der Tumor mit einem Skalpell in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde für molekularbiologische Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren

und bei -80 °C gelagert. Die zweite Hälfte wurde in ein Gefäß mit 3,7%iger Formaldehydlösung überführt und ebenso wie die Lunge über Nacht bei 4 °C fixiert. Am folgenden Tag wurden die Tumorthälften in Einbettkassetten überführt und bis zur Entwässerung bei 4 °C in PBS gelagert.

#### **3.2.4. Volumen-CT**

Um den Verlauf der pulmonalen Metastasierung über den Beobachtungszeitraum untersuchen zu können, wurden die Mäuse an Tag 7, 14 und 19 nach Tumorzellinokulation in einem so genannten Volumen-CT gescannt. Dieses Gerät wurde für eine dreidimensionale Bildgebung mit hoher Auflösung von der Firma GE entwickelt.

Das VCT kombiniert die Vorzüge des  $\mu$ CT mit den Vorzügen in der Klinik eingesetzter CT-Scanner. Anstelle vieler Detektorenreihen (wie bei klinisch genutzten CTs) werden hier zwei flat-panel-Detektoren benutzt, die eine Pixelgröße von weniger als 0,04 mm<sup>2</sup> besitzen und eine hervorragende Bildgebung ermöglichen. Rekonstruierte VCT-Bilder haben eine hohe Auflösung.

Im Gegensatz zum  $\mu$ CT, welches unter anderem auf Grund der langen Scanzzeiten und hohen Strahlendosen für wiederholte nichtinvasive Messungen ungeeignet ist, bietet das VCT die Möglichkeit, lebende Mäuse wiederholt zu scannen und so eine individuelle Verlaufsanalyse erstellen zu können. Das VCT erlaubt es eine ganze Maus während eines Scans von nur 16 Sekunden darzustellen (Kiessling et al. 2005).

Um die Tiere zu scannen, war es erforderlich sie zu narkotisieren. Dies erfolgte mittels einer i.p.-Injektion eines Ketamin/Xylazin-Gemischs (12,5 $\mu$ l Ketavet 100mg/ml; 12,5 $\mu$ l Rompun 2%ige Injektionslösung; 25 $\mu$ l NaCl pro Maus). Am Ende jedes Tierversuchs wurden die VCT-scans rekonstruiert und konnten anschließend computergestützt ausgewertet werden. Die Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Susanne Greschus und Frau Kathrin Respondek aus dem Institut für Neuroradiologie des Uniklinikums in Giessen.

Bei der Auswertung wurden die Scans aller Versuchstiere einzeln auf pulmonale Metastasen untersucht und die Anzahl der Metastasen pro Lunge festgestellt. Im Anschluss wurden die verschiedenen inhibitorbehandelten Gruppen bezüglich der durchschnittlichen Anzahl pulmonaler Metastasen mit der kochsalzbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

### 3.2.5. Histologische Untersuchungen

#### 3.2.5.1. Entwässern und Einbettung des Gewebes

Die in Einbettkassetten überführten und in PBS gelagerten formalinfixierten Gewebestücke wurden über Nacht im geschlossenen Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten entwässert und danach in Paraffin eingegossen.

Nun konnten 3 µm dünne Gewebeschnitte angefertigt werden, welche mit einer immunhistochemischen Färbemethode gefärbt wurden.

#### 3.2.5.2. Entparaffinierung und Rehydrierung

20 Minuten	Schnitte in Brutschrank bei 60 °C	Entparaffinierung
10 Minuten	Rotihistol	Entparaffinierung
10 Minuten	Rotihistol	Entparaffinierung
5 Minuten	Rotihistol	Entparaffinierung
5 Minuten	Ethanol 99,6 %	Rehydrierung
5 Minuten	Ethanol 99,6 %	Rehydrierung
5 Minuten	Ethanol 96 %	Rehydrierung
5 Minuten	Ethanol 70 %	Rehydrierung

*Tab. 5: Tabellarische Darstellung der Alkoholreihe zur Entparaffinierung und Rehydrierung von Gewebeschnitt*

### 3.2.5.3. Immunhistochemische Färbung

Durch immunhistochemische Anfärbung des Gefäßendothels erfolgte die Analyse des Vaskularisierungsgrades des Primärtumors. Zu diesem Zweck wurden Gewebeschnitte der Kontrollgruppe und der mit der höchsten Inhibitorosis behandelten Gruppe mit einem Antikörper gegen von Willebrand-Faktor inkubiert. Die einzelnen Schritte und Inkubationszeiten sind in Tab. 6 angegeben.

Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte		
15 Minuten	20ml 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 180 ml MetOH	Block endogener Peroxidasen
3 x 5 Minuten	PBS	waschen
10 Minuten	Trypsin Digest all <sup>R</sup> 1:3	proteolytische Demaskierung
3 x 15 Minuten	PBS	waschen
60 Minuten	10 % BSA	Block unspezifischer Bindungen
15 Minuten	Avidin Blocking Reagenz	Block endogenen Avidins
3 x 5 Minuten	PBS	waschen
15 Minuten	Biotin Blocking Reagenz	Block endogenen Biotins
3 x 15 Minuten	PBS	waschen
30 Minuten	Primärantikörper anti-vWF	Verdünnung 1:400, 37 °C
3 x 15 Minuten	PBS	waschen
20 Minuten	biotinylierter Sekundärantikörper	Vectastain ABC Elite Kit
3 x 5 Minuten	PBS	waschen
20 Minuten	ABC-Reagenz	Vectastain ABC Elite Kit
1 Minute 30 sec	Vector VIP <sup>R</sup>	violettes Chromogen
3 x 15 Minuten	PBS	waschen
2 Minuten	Methylgrün	Gegenfärbung der Zellkerne
Dehydrieren und Eindecken der Gewebeschnitte mit Pertex		

Tab. 6: Protokoll zur Immunhistochemischen Färbung von Gefäßendothelien ( anti von Willebrand-Faktor Färbung)

### 3.2.5.4. Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe eines digitalen Slide-Scanners (Mirax-Scan, Zeiss) eingescannt. Anschließend wurde der Anteil der Gefäße an der Gesamtumorfläche mit einer Bildanalyse- und Auswertsoftware (Axiovision, Zeiss) quantifiziert.



### 3.2.6. SDS-PAGE und Western Blot

#### 3.2.6.1. Probengewinnung und Aufarbeitung

Als Proben für SDS-PAGE und Western Blot dienten Lunge, Herz, Leber und Nieren einer gesunden C57Bl6N-Maus, sowie Tumoren, welche an Tag 19 des Tierexperiments entnommen wurden.

Die entnommenen Organe und die vorsichtig herauspräparierten Tumore wurden in Eppendorf-Cups überführt, schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

Zusätzlich zu Organen und Tumorgewebe wurden Zelllysate von LLC-Zellen als Probe in der SDS-PAGE eingesetzt. Dazu wurden die adhärenen Zellen mit Hilfe von Trypsin-EDTA vom Boden der Petrischale gelöst, in ein 50 ml Falcon-Cup überführt und bei 11000 rpm für 6 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde das gewonnene Zellpellet schockgefroren und bis zur Probenaufarbeitung bei -80 °C gelagert.

Zum Zellaufschluss wurden die gefrorenen Gewebestücke mit Hilfe von Mörser und Pistill unter Zugabe von flüssigem Stickstoff fein zermahlen und nach Zugabe eines Aufschlusspuffers homogenisiert. Nach Inkubation auf Eis für eine Stunde wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 13000 rpm und bei 4 °C für 10 Minuten abgetrennt. Der gewonnene Überstand mit enthaltenen Proteinen wurde in neue Eppendorf-Cups überführt und im Anschluss der jeweilige Proteingehalt bestimmt.

#### Aufschlusspuffer:

150 mM NaCl

50 mM Tris

5 mM EDTA

1 % Triton-X-100

0,5 % (w/v) Na-Deoxycholat

1 mM PMSF (vor Gebrauch des Puffers frisch hinzufügen)

der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt

### 3.2.6.2. Herstellung von Polyacrylamidgelen

Vorbereitend für SDS-PAGE und Western Blot wurden 10%ige Laemmli-Gele gegossen. Dazu wurden zwei mit Ethanol gereinigte Glasplatten mit integriertem Abstandhalter in eine Gelgießapparatur eingespannt. Mit einem wasserfesten Stift wurde etwa 1,5 cm unterhalb der oberen Glasplattenkante eine Markierung angebracht, um die Trenngelhöhe festzulegen. Nach Vorbereitung der Trenngellösung wurde diese zügig zwischen die beiden Glasplatten bis zur Markierung gegossen. Zur Ausbildung einer glatten Oberfläche wurde das Trenngel mit Aqua dest. überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das Aqua dest. gründlich entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. In die noch flüssige Sammelgellösung wurde ein Kamm eingesetzt. Auf diese Weise wurden geeignete Taschen zur Aufnahme der Proben geschaffen. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die Gelkassette in die Elektrophoresekammer eingesetzt.

	Sammelgel	Trenngel
Acrylamidlösung	1,33 ml	3,33 ml
Sammelgelpuffer	2,00 ml	-
Trenngelpuffer	-	3,33 ml
Aqua dest.	6,57 ml	3,20 ml
SDS (10 %ige Lösung in A.dest.)	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	10 µl	10 µl
Ammoniumperoxidsulfat (APS), 10 % in Aqua dest.	100 µl	50 µl

Tab. 7: Gießvorschrift zur Herstellung eines 10%igen Lämmli-Gels

#### Trenngelpuffer (100ml):

1,125 M Tris

30% (w/v) Saccharose

der pH wurde mit HCl auf 8,8 eingestellt

#### Sammelgelpuffer (100ml):

0,625 M Tris

der pH wurde mit HCl auf 6,8 eingestellt

### 3.2.6.3. SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE (*sodium[Natrium]dodecylsulfate-polyacrylamide-gel*elektrophoresis) werden Proteine im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das hier angewandte Verfahren mit Tris/Glycin Laufpuffer geht auf Laemmli (Laemmli 1970) zurück. Die Proben wurden mit 4x-Probenpuffer im Verhältnis 3:1 (Volumenteile) gemischt und für 5 Minuten zur Denaturierung aufgeköcht. Anschließend wurden sie für 5 Minuten bei 13000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und vom Überstand eine Menge, die 50 µg Protein enthielt, auf das 10%ige SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur späteren Identifizierung der Proteine wurde zusätzlich ein Molekulargewichts-Marker aufgetragen. Nach Einsetzen des Gels in die Elektrophoresekammer und Auffüllen der Kammer mit Laufpuffer erfolgte die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld bei 15 mA pro Gel (bei einer Gelgröße von 8 x 8 cm). Nachdem die Lauffront das Gelende erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt. Das Gel wurde vorsichtig zwischen den Glasplatten entfernt und zur Vorbereitung für den Western Blot in Transferpuffer überführt.

#### Pufferzusammensetzungen:

##### 4x Probenpuffer:

5 g SDS  
25 ml Sammelgelpuffer  
40 ml Glycerin  
Spatelspitze Bromphenolblau  
mit Aqua dest. auf 100ml auffüllen

##### 10x Laufpuffer:

20 g SDS  
60 g Tris  
288 g Glycin  
mit Aqua dest auf 2 Liter auffüllen, pH mit HCl auf 8,6 einstellen

##### 1x Laufpuffer:

100 ml 10x Laufpuffer  
10 ml 10 % SDS  
mit Aqua dest auf 1 Liter auffüllen

### 3.2.6.4. Western Blot

Beim Western Blot werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine vom Acrylamidgel durch ein angelegtes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran transferiert und können so anschließend mit Hilfe von spezifischen Antikörpern identifiziert werden.

Hier erfolgte der Proteintransfer mittels einer *semi-dry*-Blotapparatur. Zur Vorbereitung des Transfers wurden PVDF-Membran und Filterpapier entsprechend der Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Membran wurde für 30 Sekunden mit Methanol befeuchtet, danach für 60 Sekunden in A.dest. gewaschen und anschließend in Western-Blot-Puffer äquilibriert. Das zurechtgeschnittene Filterpapier wurde gut mit Western-Blot-Puffer durchfeuchtet und zusammen mit der PVDF-Membran und dem Gel schichtförmig zwischen den Elektroden angeordnet: mit Blotpuffer getränktes Filterpapier wurde auf die ebenfalls mit Blotpuffer befeuchtete Anode der Blotkammer gelegt. Darüber wurde die PVDF-Membran und direkt darauf das Gel gelegt. Zwischen Gel und der Kathode wiederum befand sich eine Schicht mit Filterpapier. Vor dem Schließen der Blotkammer wurden eventuell eingeschlossene Luftblasen mit Hilfe einer Glaspipette vorsichtig entfernt. Der Proteintransfer erfolgte für 1,5 Stunden bei  $2 \text{ mA/cm}^2$ .

Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren wurde die Membran nach dem Proteintransfer für 2 Stunden in TBST mit 5 % Milchpulver geblockt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper, welcher im Verhältnis 1:1000 in Blockpuffer gelöst wurde. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  auf einem Wipptisch.

Am nächsten Tag wurde die Membran für 3 x 15 Minuten in TBST (tris buffered saline mit Tween) gewaschen. Es folgte eine zweistündige Inkubation mit dem im Verhältnis 1:500 in Blockpuffer gelösten Zweitantikörper. Durch erneutes Waschen in TBST für 3 x 15 Minuten wurden unspezifisch angelagerte Liganden entfernt. Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines Chemiluminiszenz Substrates (ECL Plus) durch Belichtung eines Röntgenfilmes. Dieser wurde zwischen 1 und 15 Minuten und nötigenfalls zusätzlich über Nacht aufgelegt und anschließend entwickelt.

Western Blot Puffer (Transferpuffer):

20mM Tris

150 mM Glycin

20% Methanol

der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,3-8,5 eingestellt

10xTBS (Tris-gepufferte Kochsalzlösung [*Tris-buffered saline*]):

24,2g Tris

80,0g NaCl

1000ml Aqua dest.

der pH wurde mit HCl auf 7,6 eingestellt

1xTBST(Tris-gepufferte Kochsalzlösung [*Tris-buffered saline*] mit Tween):

100ml 10xTBS

900ml Aqua dest.

1,0ml Tween 20

Blockpuffer:

TBST mit 5% Milchpulver

### **3.2.7. Statistik**

Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist mit n aufgeführt. Es wurden bei allen Gruppen Median und Interquartile ermittelt. Mit Hilfe des Computerprogramms Graph Pad Prism 4 wurden durch den Mann-Whitney-U-Test die Signifikanzen ermittelt. Bei einem Wert von  $p \leq 0,05$  wurden die Ergebnisse als schwach signifikant (\*) interpretiert. Lag die Wahrscheinlichkeit bei  $p \leq 0,01$  wurden die Daten als signifikant (\*\*), bzw. bei  $p \leq 0,001$  als hoch signifikant (\*\*\*) gekennzeichnet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. SDS-PAGE/Western Blot gestützter Nachweis von uPA und uPAR

Um das Vorhandensein von Urokinase (uPA) und deren Rezeptor (uPAR; CD87) in verschiedenen Organen der Maus, dem durch Injektion von LLC-Zellen verursachten Primärtumor und den LLC-Zellen nachzuweisen, wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine uPA und uPAR mittels spezifischer Antikörper durch Western Blot nachgewiesen.

#### 4.1.1. Nachweis von uPA

Bei dem Versuch des Nachweises von uPA zeigte sich in allen untersuchten Organen (Niere, Lunge, Herz, Leber), im Tumorgewebe, sowie im aus LLC-Zellen gewonnenen Lysat eine uPA Proteinexpression. Im Western Blot waren mehrere immunoreaktive Banden unterschiedlicher Größe detektierbar (Abb. 3). Die stärkste Expression konnte in der Lunge, gefolgt von Niere und Leber gefunden werden. In Tumorgewebe und LLC-Zellen war die uPA Expression zwar nachweisbar, aber vergleichsweise gering. Im Herz war praktisch keine uPA nachweisbar. In Lunge und Niere dominierten zwei Banden mit ca. 50 bzw. 43 kDa. Möglicherweise ist der Unterschied im Molekulargewicht auf einen unterschiedlichen Glycosylierungsgrad zurückzuführen. In der Leber war nur die 50 kDa-Form detektierbar. LLC und Tumorextrakt wiesen eine Hauptbande bei ca. 50 kDa und eine etwas schwächere Bande bei etwa 33 kDa auf, die möglicherweise die niedermolekulare Form der Urokinase darstellt (*low molecular weight uPA*). Diese Bande war auch in der Lunge zu finden.



Abb. 3: Nachweis von uPA mittels Western Blot. Von den jeweiligen Organ- bzw. Zellextrakten wurden jeweils 50 µg Protein pro Spur aufgetragen.

#### 4.1.2. Nachweis von uPAR

Bei dem Nachweis von uPAR in verschiedenen Organen der Maus, im Tumorgewebe und in einem LLC-Zelllysate, zeigte sich eine sehr starke Expression des Proteins vor allem im Tumorgewebe. Hier waren kräftige Doppelbanden im Bereich bei ca. 50 und 60 kDa zu erkennen. Auch im aus LLC-Zellen gewonnenen Lysat zeigte sich eine starke uPAR-Expression. Eine Bande bei einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa war erkennbar. In der Lunge konnte ebenfalls uPAR nachgewiesen werden. Die Expression des Proteins war jedoch geringer als im Tumorgewebe und im Zelllysate. In Niere, Herz und Leber konnte keine uPAR-Expression nachgewiesen werden.

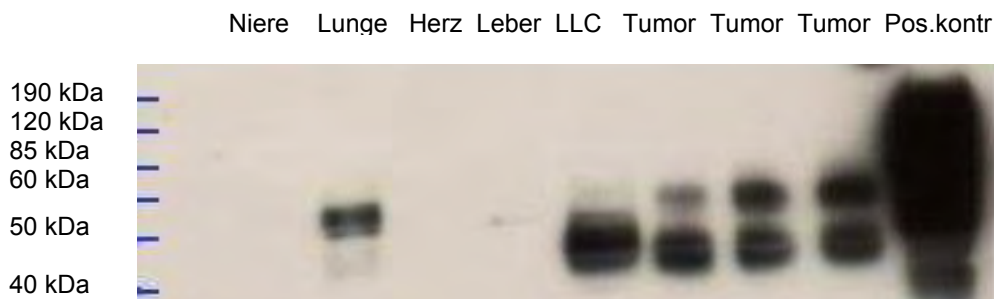


Abb. 4 : Nachweis von uPAR mittels Western Blot. Von den jeweiligen Organ- bzw. Zellextrakten wurden jeweils 50 µg Protein pro Spur aufgetragen.

## 4.2. Einfluss des Urokinaseinhibitors CJ-463 auf das Primärtumorwachstum

Am Lewis Lung Carcinoma (LLC) Modell wurde der Einfluss des Urokinaseinhibitors CJ-463 auf Primärtumorwachstum und Metastasierung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der Inhibitor in der Lage war, das Primärtumorwachstum dosisabhängig und signifikant zu reduzieren. In der höchsten Inhibitor-dosis von 100 mg/kg KGW war der Hemmeffekt am effektivsten und führte zu einer im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikanten Reduktion des Primärtumorvolumens auf etwa die Hälfte. Auch bei den anderen inhibitor-behandelten Gruppen war im Vergleich zur Kontrollgruppe eine, wenn auch weniger deutliche, Verringerung des Primärtumorvolumens ersichtlich. Das Stereoisomer CJ-1106 zeigte keine Beeinflussung des Primärtumorwachstums.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 5 zusammengefasst.

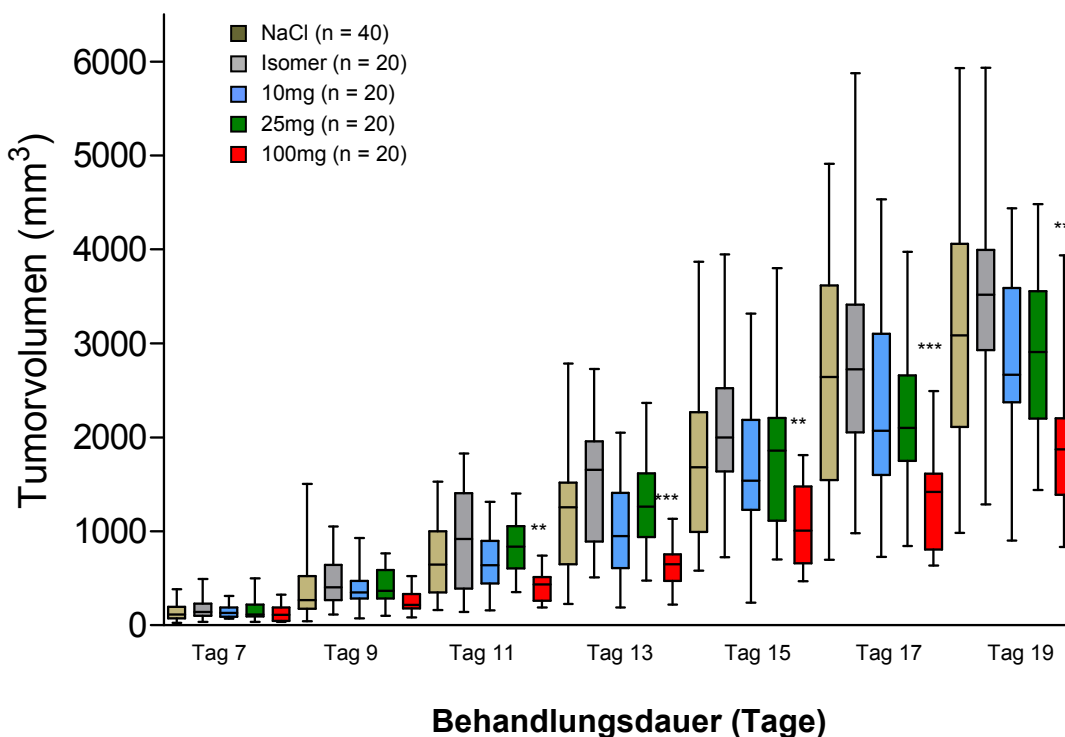


Abb. 5: Effekt des Urokinaseinhibitors CJ-463 auf das Primärtumorwachstum (Behandlung ab Tag 7). Dargestellt ist das Tumorvolumen (Median und Interquartile) aus  $n = 40$  (NaCl-behandelte Kontrollen),  $n = 20$  (mit Stereoisomer behandelte Kontrollgruppe und inhibitor-behandelte Gruppen) an Tag 7, 9, 11, 13, 15, 17 und 19 des Versuchs. \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$



Eine stärkere Hemmung des Primärtumorwachstums konnte durch einen früheren Beginn der Behandlung erzielt werden. In diesem Versuchsansatz wurde bereits einen Tag vor der Tumorzellinokulation mit der Behandlung begonnen. Hier wurde eine Dosierung des Urokinaseinhibitors von 100 mg/kg KGW eingesetzt und die inhibitorbehandelte Gruppe mit einer Kochsalzbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Hier bewirkte die Behandlung mit der Inhibitor-dosis von 100 mg/kg eine signifikante Verringerung des Primärtumorvolumens. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.

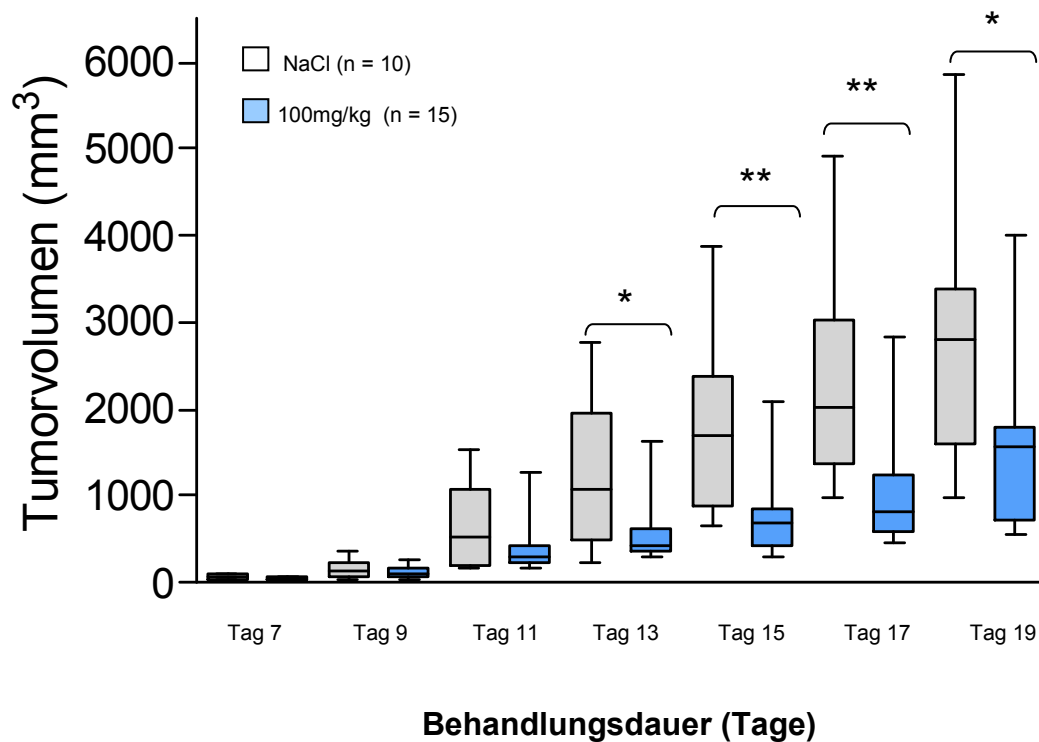
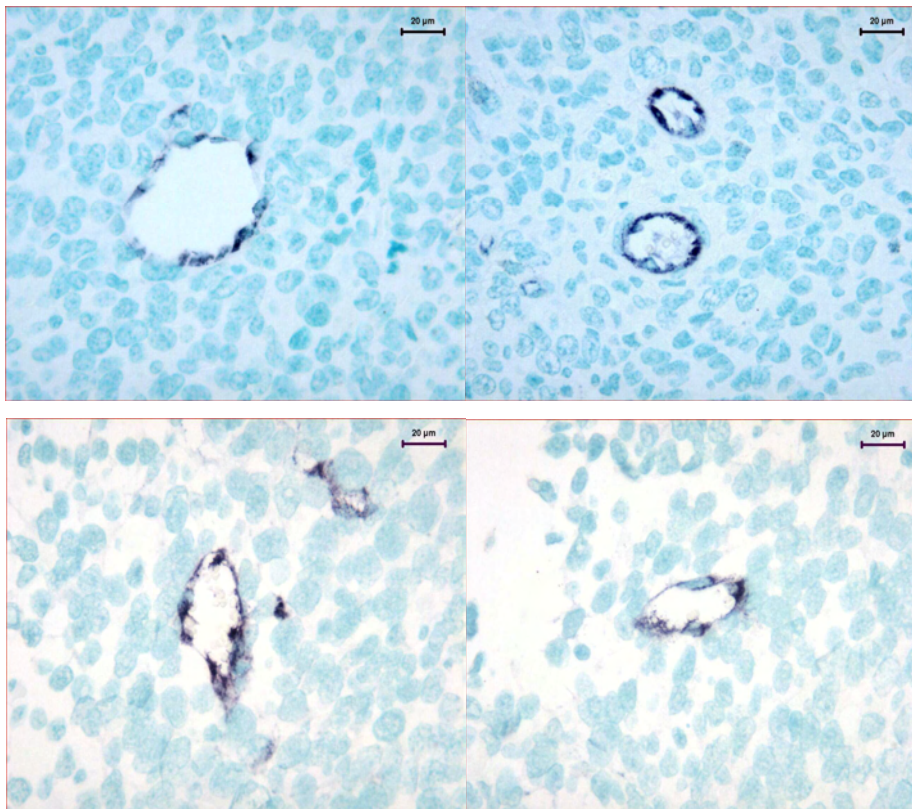


Abb. 6: Einfluss von CJ-463 auf das Primärtumorwachstum bei Behandlungsbeginn an Tag - 1. Dargestellt ist das durchschnittliche Tumorvolumen (Median und Interquartile) der inhibitorbehandelten Gruppe (n = 15) im Vergleich zur NaCl-behandelten Kontrollgruppe (n = 10). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$

### 4.3. Einfluss von CJ-463 auf die Vaskularisierung des LLC Primärtumors

Zur Überprüfung der Frage, worauf der Effekt der Inhibitorbehandlung auf das Primärtumorwachstum zurückzuführen ist, wurde untersucht, ob die Behandlung mit dem Inhibitor einen Einfluss auf die Vaskularisierung des Primärtumors hat.

Hierzu wurden die Gefäße der Tumoren immunhistochemisch angefärbt (anti von Willebrand-Faktor-Färbung), der gesamte Schnitt mit Hilfe eines digitalen Slide-Scanners eingescannt (Mirax Scan, Zeiss) und der Anteil der Gefäße an der Gesamttumorfläche mit einer Bildanalyse- und Auswertsoftware (Axiovision, Zeiss) quantifiziert. Gefärbte Schnitte des Tumorgewebes sind in Abb. 7 exemplarisch dargestellt.

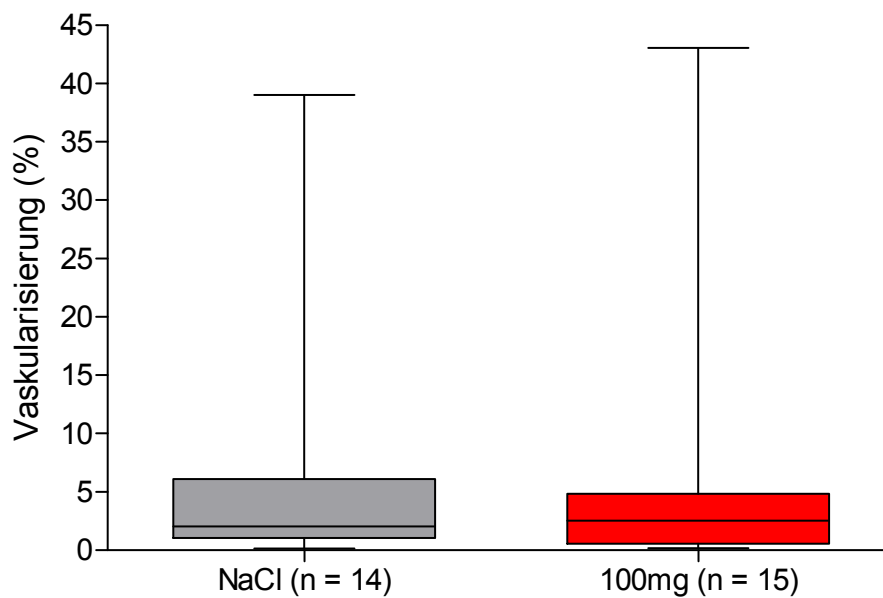


*Abb. 7: Durch IHC gefärbte Gefäße des Primärtumors bei 20er Objektivvergrößerung.*

*Oben: Tumor einer Kontrollmaus*

*Unten: Tumor einer inhibitorbehandelten Maus*

In der mit 100 mg/kg des Inhibitors behandelten Gruppe betrug der Vaskularisierungsgrad des Primärtumors durchschnittlich 7,31 % (bezogen auf die Gesamttumorfläche), in der mit isotoner Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe 5,50 %. Es zeigte sich also kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.



*Abb. 8: Dargestellt ist der Vaskularisierungsgrad der Primärtumoren der Kontrollgruppe (NaCl, n = 14) und der inhibitorbehandelten Gruppe (100 mg/kg ab d 7, n = 15) in % der Gesamttumorfläche (Median und Interquartile).*

#### 4.4. Einfluss des Urokinaseinhibitors CJ-463 auf die pulmonale Metastasierung

Um den Einfluss des Urokinaseinhibitors auf die Metastasierung in die Lunge zu untersuchen, wurden die LLC-inokulierten Mäuse an Tag 7, 14 und 19 des Versuchs in einem VCT gescannt. Hierbei konnte die Metastasenbildung intraindividuell an der lebenden Maus über den gesamten Behandlungszeitraum erfasst werden. Durch diese Technik wurden Metastasen ab einer Größe von etwa 200  $\mu\text{m}$  erfasst. Nach Auswertung der VCT-Scans wurden die verschiedenen Behandlungsgruppen im Bezug auf die Anzahl der Lungenmetastasen miteinander verglichen.

Die axialen und coronaren Lungenschnitte in Abbildung 9 zeigen beispielhaft eine sich im Verlauf des Versuchs vergrößernde pulmonale Metastase.

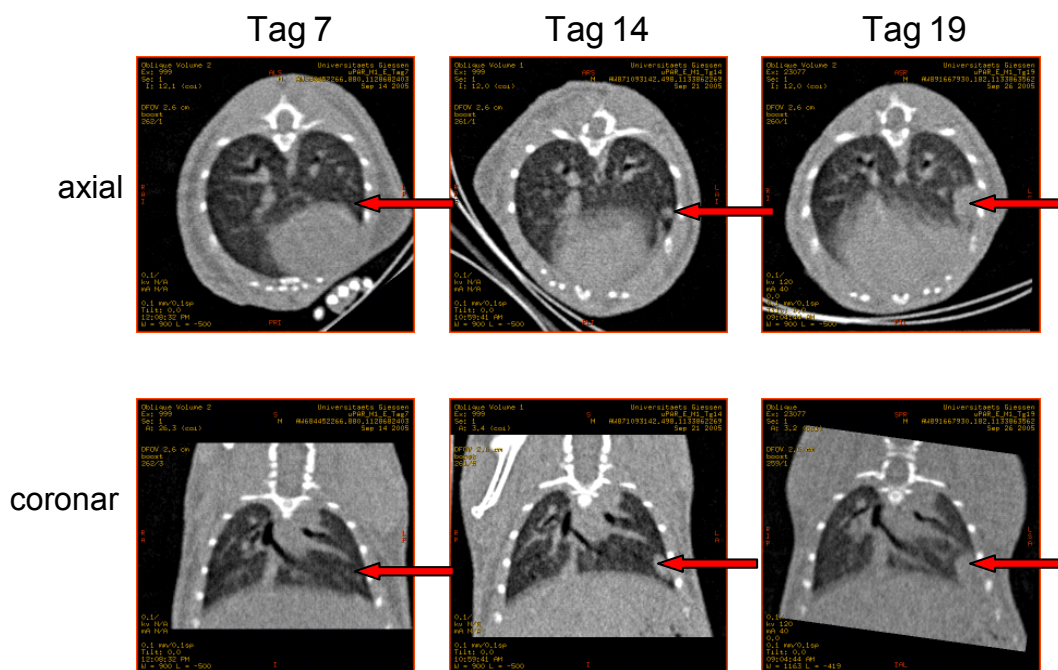


Abb. 9: Pulmonale Metastasierung im Versuchsverlauf.

Die Bilder zeigen eine Lungenmetastase zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchs.

An Tag 7 ist die Metastase kaum, an Tag 14 und 19 deutlich erkennbar (Metastase durch Pfeile gekennzeichnet). Oben axialer Schnitt, unten coronarer Schnitt durch die Lunge.

Wie in Abbildung 10 ersichtlich, zeigte sich in Analogie zu dem Einfluss auf das Primärtumorwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere Anzahl an Lungenmetastasen bei einer Inhibitor-dosis von 25 mg/kg KGW, bzw. 100 mg/kg KGW ab d 7.

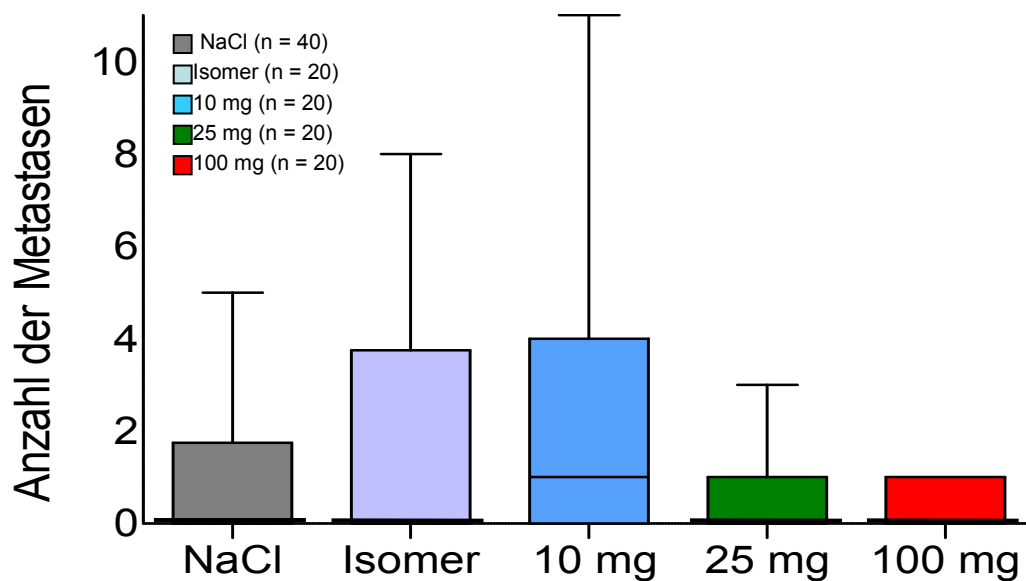


Abb. 10: Durchschnittliche Anzahl der Lungenmetastasen pro Maus an Tag 19 des Versuchs  
Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl an pulmonalen Metastasen (Median und Interquartil) bei den mit verschiedenen Dosen des Inhibitors behandelten Gruppen (n = 20) im Vergleich zur Kochsalzbehandelten Kontrollgruppe (n = 40) und der mit dem Stereoisomer des uPA-Inhibitors behandelten Kontrollgruppe (n = 20).

#### **4.5. Einfluss von CJ-463 auf Primärtumorwachstum und Metastasierung bei uPA- und uPAR-KO-Mäusen**

Ziel dieser Versuche war festzustellen, ob sich in Abwesenheit von Wirts-Urokinase (uPA) oder deren Rezeptor (uPAR) Primärtumoren und Lungenmetastasen entwickeln und ob der synthetische Urokinaseinhibitor CJ-463 auch in Abwesenheit von Wirts-uPA bzw. Wirts-uPAR das Primärtumorwachstum hemmt.

Der bisherige Versuchsablauf wurde beibehalten, jedoch wurde hier nur eine Inhibitor-dosis von 10 mg/kg KGW zur Behandlung der Mäuse eingesetzt. Die inhibitorbehandelte Gruppe wurde im Bezug auf das Primärtumorwachstum und die pulmonale Metastasierung mit einer Kontrollgruppe (mit isotoner Kochsalzlösung behandelt) verglichen.

Zu diesem Zeitpunkt waren die Versuche mit der hohen Inhibitor-dosis von 100 mg/kg noch nicht durchgeführt worden. Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Menge des Inhibitors konnten die Versuche mit den uPA- und uPAR-KO-Mäusen nicht mehr mit der höheren Inhibitor-dosis, welche bei Wildtyp-Mäusen das Primärtumorwachstum signifikant hemmte, wiederholt werden.

##### **4.5.1. Einfluss auf das Primärtumorwachstum bei uPA- und uPAR-KO-Mäusen**

Sowohl bei den uPA-KO-Mäusen als auch bei den uPAR-KO-Mäusen entwickelten sich Primärtumore. Das Wachstum der Primärtumore bei uPAR-KO-Mäusen war mit dem bei wt-Mäusen (C57Bl6/N) vergleichbar. Durch Behandlung der uPAR-KO-Mäuse mit CJ-463 wurde das Primärtumorwachstum signifikant gehemmt (Abb. 12). Bei den uPA-KO-Mäusen hingegen konnte durch Behandlung mit dem Urokinaseinhibitor CJ-463 keine Hemmung des Primärtumorwachstums erzielt werden. Am Ende des Versuchs zeigten die inhibitorbehandelten Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe sogar ein leicht erhöhtes Primärtumorvolumen (Abb. 11). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zur Entwicklung des Primärtumors nicht zwingend die wirtseigene Urokinase oder uPAR notwendig sein muss. Allerdings scheint die therapeutische Wirksamkeit des Urokinase-Inhibitors vorzugsweise auf Blockade der wirtseigenen Urokinase zu beruhen. Des Weiteren ist der uPA-Rezeptor des Wirts für die Urokinase-vermittelten Effekte bzw. die Wirksamkeit des Inhibitors nicht zwingend erforderlich.

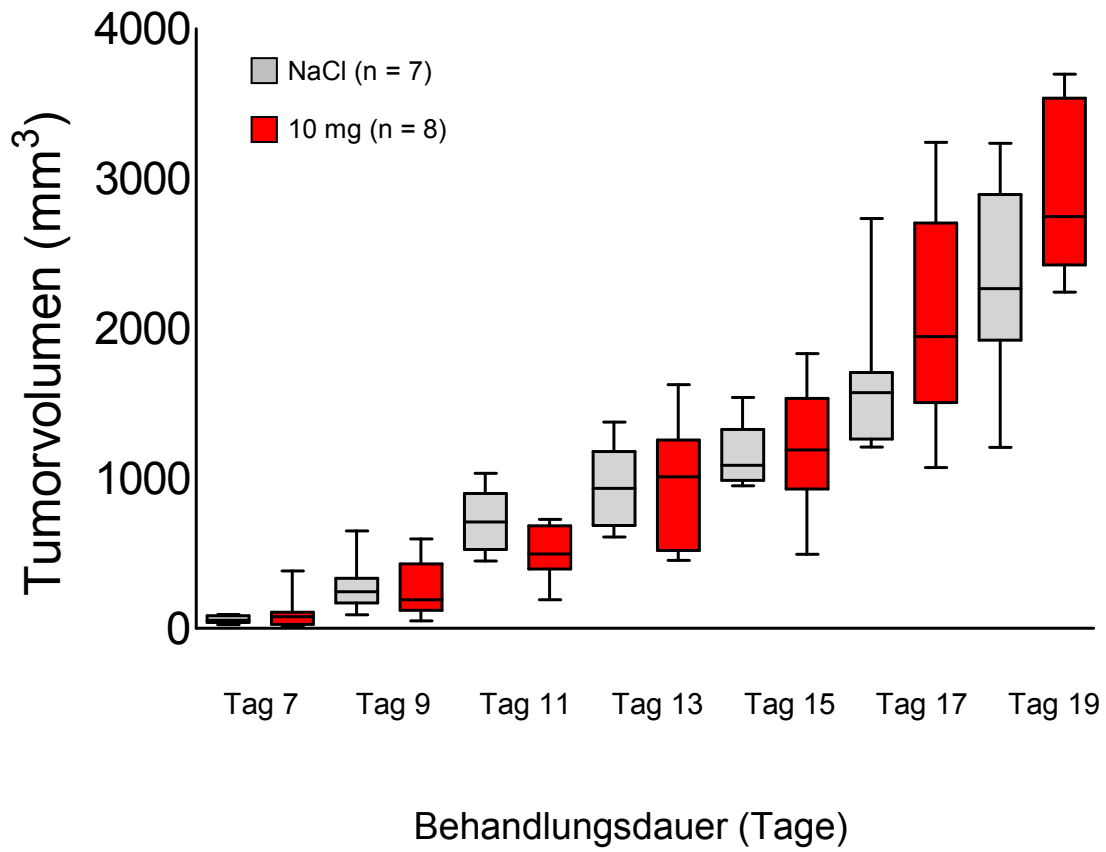


Abb. 11: Primärtumorvolumen inhibitorbehandelter uPA-KO-Mäuse (10 mg/kg KGW, n = 8) im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl, n = 7). Dargestellt sind Median und Interquartile.

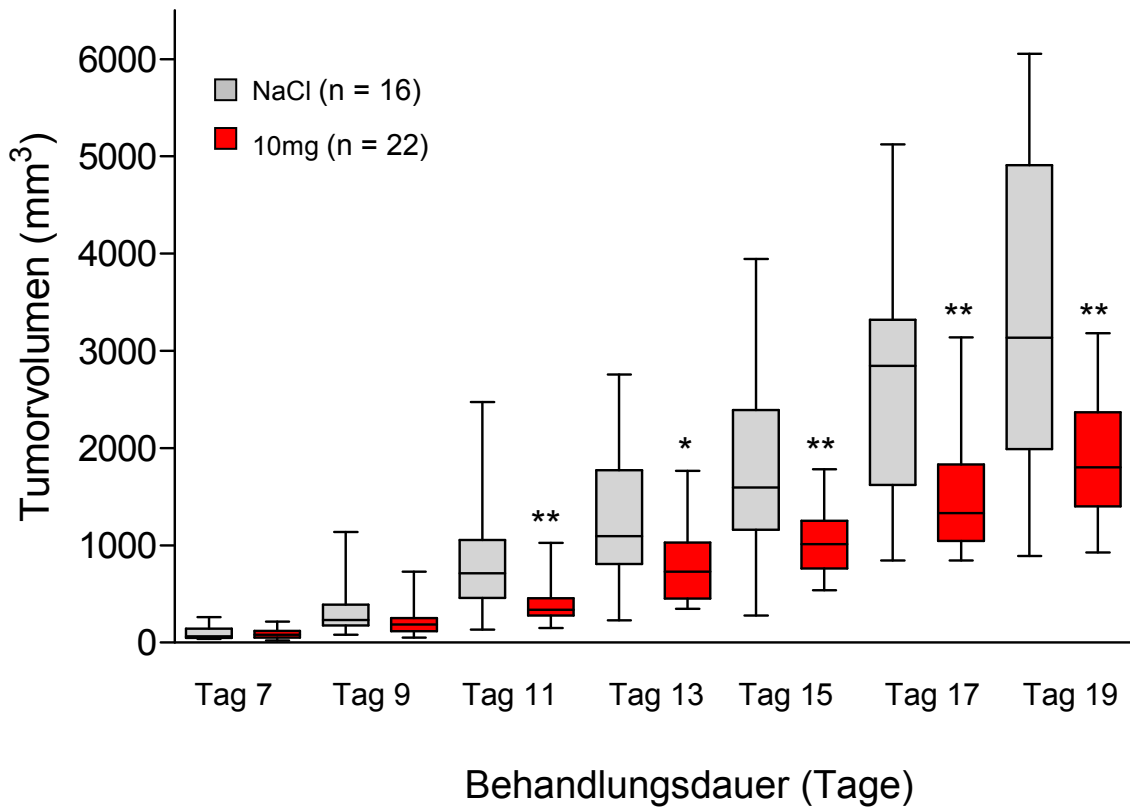


Abb. 12: Primärtumorvolumen inhibitorbehandelter uPAR-KO-Mäuse (10 mg/kg KGW, n = 22) im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl, n = 16). Dargestellt sind Median und Interquartile. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$



#### 4.5.2. Einfluss auf die pulmonale Metastasierung bei uPA- und uPAR-KO-Mäusen

Hinsichtlich der pulmonalen Metastasierung zeigte sich, dass sowohl die uPA-KO-Mäuse, als auch die uPAR-KO-Mäuse Metastasen in der Lunge aufwiesen.

Betrachtet man die durchschnittliche Anzahl der pulmonalen Metastasen pro Maus, so ergibt sich bei den inhibitorbehandelten uPAR-KO-Mäusen eine durchschnittliche Metastasenzahl von 1,364, welcher eine Anzahl von einer Metastase pro Maus in den mit Kochsalz behandelten uPAR-KO-Mäusen und eine Anzahl von 1,2 in kochsalzbehandelten wt-Mäusen gegenübergestellt. Diese Unterschiede waren nicht signifikant.

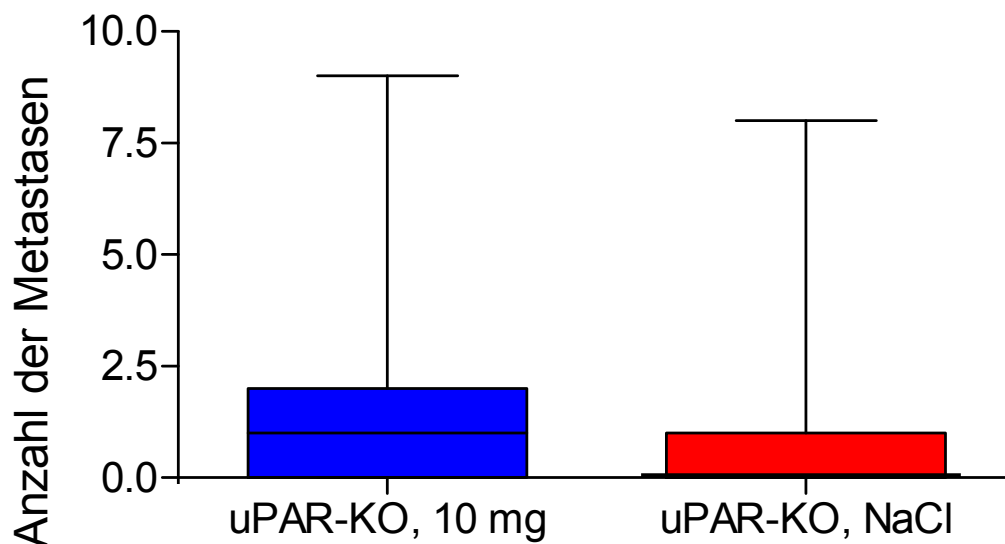


Abb. 13: Effekt des Urokinaseinhibitors CJ-463 auf die pulmonale Metastasierung bei uPAR-KO-Mäusen.

Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl der pulmonalen Metastasen (Median und Interquartile) aus  $n = 22$  (Inhibitorbehandlung) und  $n = 16$  (uPAR-KO-Kontrollen) an Tag 19 des Versuchs.

Im Vergleich zu einer weiteren Kontrollgruppe (kochsalzbehandelte wt-Mäuse) war die Zahl der Metastasen bei den uPA-KO-Mäusen um ca. 50 % (inhibitorbehandelt) bzw. 70 % (kochsalzbehandelt) reduziert (Abb. 14).

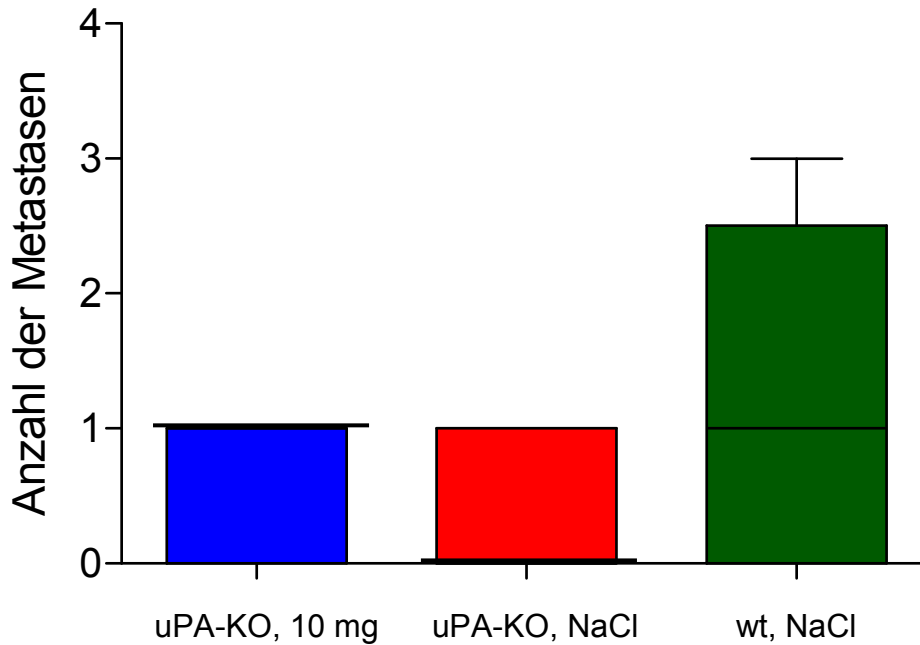


Abb. 14: Effekt des Urokinaseinhibitors CJ-463 auf die pulmonale Metastasierung bei uPAR-KO-Mäusen.

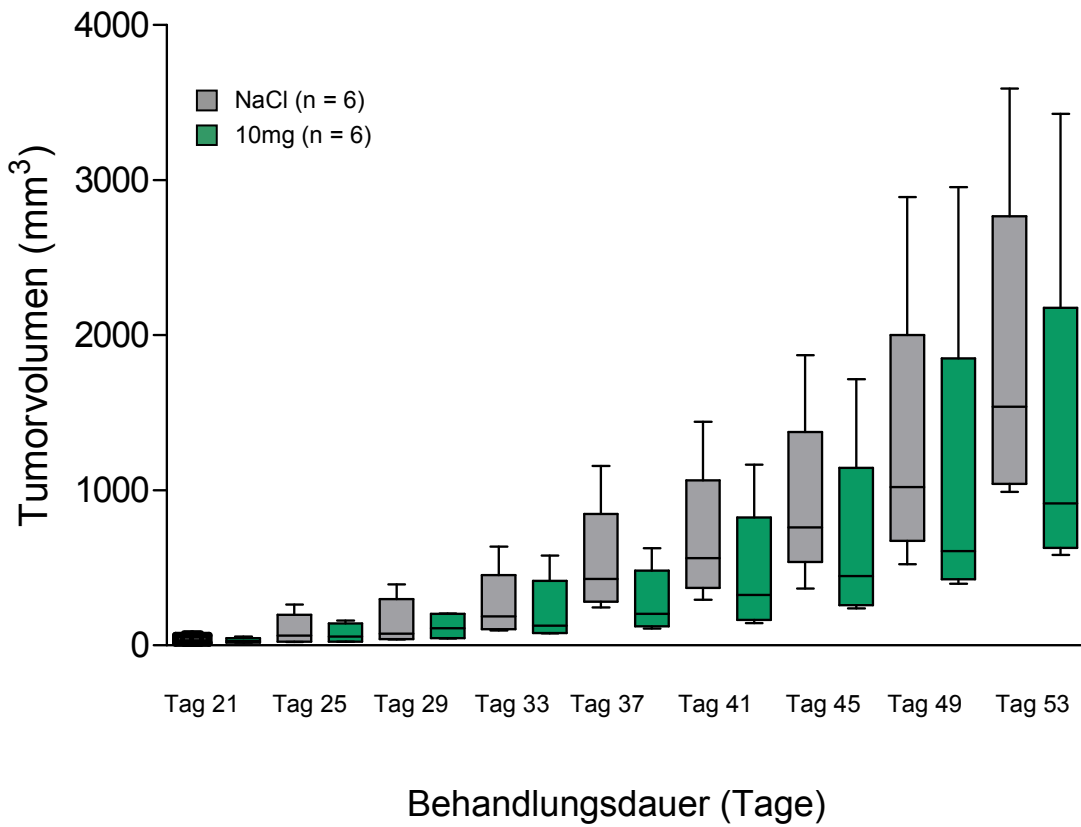
Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl der pulmonalen Metastasen (Median und Interquartile) aus  $n = 8$  (Inhibitorbehandlung),  $n = 7$  (uPA-KO-Kontrollen), bzw.  $n = 5$  (wt-Kontrollen) an Tag 19 des Versuchs.

#### **4.6. Einfluss von CJ-463 auf das Primärtumorwachstum beim kleinzelligen Bronchialkarzinom**

Da in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des Urokinaseinhibitors CJ-463 auf Primärtumorwachstum und Metastasierung sowohl beim nicht-kleinzelligen, als auch beim kleinzelligen Bronchialkarzinom getestet werden sollte, wurde neben dem Lewis lung carcinoma (LLC) auch eine kleinzellige humane Zelllinie im Versuch eingesetzt. Dabei haben wir uns für die humane Zelllinie H-510 entschieden. Da diese humanen Zellen nur bei T-Zell-defizienten oder B- und T-Zell-defizienten Mäusen Tumoren ausbilden, wurden für diesen Versuch SCID-Mäuse verwendet.

Da sich die H-510-Zellen langsamer vermehren als die bisher verwendeten LLC-Zellen, wurden Versuchsdauer und der Zeitraum bis zum Behandlungsbeginn entsprechend angepasst. Erste Tumormessung und Behandlungsbeginn erfolgten 21 Tage nach subkutaner Injektion von 10 Millionen H-510-Zellen. Die Behandlung erfolgte ab Tag 21 zwei Mal täglich per i.p.-Injektion mit einer Inhibitorosis von 10 mg/kg KGW. Die Kontrollgruppe erhielt zwei Mal täglich eine i.p.-Injektion mit 200 µl NaCl. Länge und Breite des Primärtumors wurden ab Tag 21 jeden vierten Tag mit einer digitalen Schieblehre gemessen und das Tumolvolumen berechnet. Am Tag 53 wurde der Versuch beendet.

Wie bei den vorhergehenden Versuchen zeigte sich auch hier eine Hemmung des Primärtumorwachstums durch die zweimal tägliche Verabreichung des Urokinaseinhibitors. Wie in Abbildung 15 ersichtlich, zeigten die inhibitorbehandelten Mäuse am Ende des Versuchs ein geringeres Primärtumolvolumen als die Kontrollgruppe. Jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant. Die Verwendung einer humanen Zelllinie hat den Vorteil, dass der hier durchgeführte Versuch möglicherweise besser auf die Behandlung des humanen Bronchialkarzinoms übertragbar ist.



*Abb. 15: Einfluss des Urokinaseinhibitors CJ-463 auf das Primärtumorwachstum der humanen Zelllinie H-510*

*Dargestellt ist das durchschnittliche Tumolvolumen (Median und Interquartile) der inhibitorbehandelten Gruppe (10 mg/kg, n = 6) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 6).*

#### 4.7. Einfluss von CJ-463 auf die Proliferation von LLC-Zellen

Durch einen Proliferationsassay sollte überprüft werden, ob und in welcher Konzentration der Urokinaseinhibitor CJ-463 die Proliferation von LLC-Zellen *in vitro* hemmt.

Es wurden folgende Konzentrationen des Inhibitors getestet: 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 6,25 mg/ml, 3,125 mg/ml und 1,5625 mg/ml. Die Proliferation der Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit des Urokinaseinhibitors wurde durch Quantifizierung des Thymidineinbau bestimmt.

Bei einer Inhibitorosis von 100 mg/ml zeigte sich eine statistisch signifikante Hemmung der Proliferation um 26,06 %. Eine Hemmung der Proliferation um 10,3 % konnte bei einer Dosis von 50 mg/ml erzielt werden. Diese erwies sich jedoch als nicht signifikant. Die übrigen getesteten Inhibitorosierungen hatten keinen Einfluss auf die Zellproliferation.

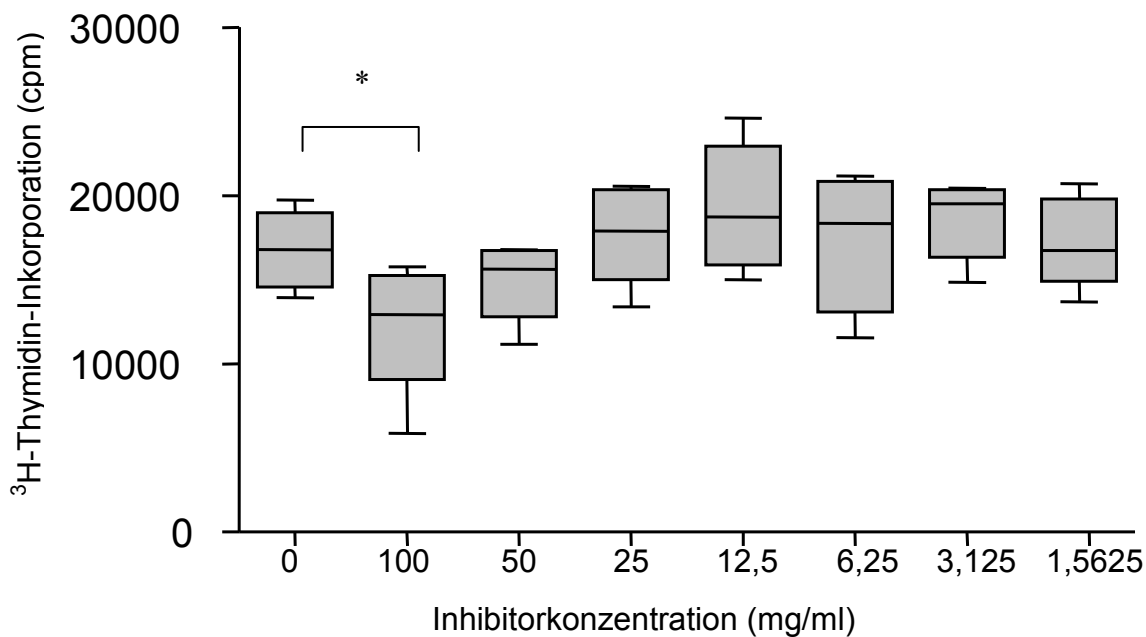


Abb. 16: Darstellung der Proliferationsbeeinflussung von LLC-Zellen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen des uPA-Inhibitors CJ-463. Dargestellt sind Median und Interquartile. \*  $p \leq 0,05$

Durch die Durchführung eines Zytotoxizitätsassays wurde untersucht, inwieweit die Hemmung der Proliferation durch einen zytotoxischen Effekt des Inhibitors auf die LLC Zellen zustande kommt. Hier zeigte sich jedoch bei keiner der im Proliferationsassay eingesetzten Dosierungen ein zytotoxischer Effekt auf die Tumorzellen.

## **5. Diskussion**

### **5.1. Methodische Aspekte des tierexperimentellen Ansatzes**

#### **5.1.1. Heterotropes Lungenkarzinom-Modell der Maus**

##### LLC-Modell

Um den Effekt des synthetischen uPA-Inhibitors CJ-463 auf Tumorstadium und Metastasierung zu testen, musste zunächst ein geeignetes Tumormodell gefunden werden. Unsere Wahl fiel auf das Lewis Lung Carcinoma (LLC)-Modell, da dieses sich in früheren Studien als gut reproduzierbares Modell bewährt hatte (O'Reilly et al. 1994, Palumbo et al. 2002, Bugge et al. 1997, Savai et al. 2005).

Die erstmals 1951 von Dr. Margaret R. Lewis aus einem Epidermoid-Karzinom einer Mäuselunge isolierten Lewis Lung Carcinoma Zellen (Rashidi et al. 2000, Sugiura und Stock 1955) sind Grundlage des weit verbreiteten Lewis-Lungen-Karzinom-Modells und bedeutsam für Studien über Tumormetastasierung, Tumorangiogenese und neoadjuvante Chemotherapie (Rashidi et al. 2000, O'Reilly et al. 1994, Fichtner und Tanneberger 1987, Himmele et al. 1986, Gorelik et al. 1980). Das Modell ist in immunkompetenten Mäusen durch ein rasches Primärtumorstadium und eine ausgeprägte Metastasierungsrate gekennzeichnet (Bugge et al. 1997). Diese Aspekte konnten auch in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden. In diesem Modell wurde bereits eine Reduktion der Metastasierungsrate durch Antikörper gegen die katalytische Domäne der uPA und durch uPA-Rezeptor-Antagonisten nachgewiesen (Bugge et al. 1997, Skriver et al. 1984, Kobayashi et al. 1994).

##### H-510-SCID-Maus-Modell

Zusätzlich zu dem LLC-Modell sollte der Urokinaseinhibitor CJ-463 an einem small cell lung cancer (SCLC)-Modell getestet werden. Dazu wählten wir die humane Zelllinie H-510 aus, welche bereits in anderen Studien verwendet wurde. So zeigten beispielsweise Tannø et al 2004, dass VEGFs, welche eine wichtige Rolle bei Tumorstadium und Metastasierung spielen, in verschiedenen SCLC-Zelllinien, unter anderem auch der Zelllinie H-510, exprimiert werden (Tannø et al. 2004).

Da humane Tumorzellen in immunkompetenten Mäusen aufgrund der Xenoantigenität keine Tumore ausbilden, wurden für diese Versuche SCID-Mäuse verwendet. Die SCID (*severe combined immunodeficiency*)-Maus besitzt infolge eines genetischen Defektes kein funktionsfähiges Immunsystem. Sie ist weder zu einer T- noch B-Zell-vermittelten Immunantwort fähig, weshalb transplantierte humane Zellen nicht abgestoßen werden. Anhand eines Vorversuchs hatten wir festgestellt, dass das Tumorwachstum bei den B- und T-Zell-defizienten SCID-Mäusen rascher als in T-Zell-defizienten Nude-Mäusen erfolgt. Daher bevorzugten wir für unsere Versuche die SCID-Mäuse. Diese Mäuse wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen verwendet. Zum Beispiel untersuchten Kalemkerian et al. die Aktivität von Dolastin 10, einem cytotoxischen Peptid in SCLC Zellen, in vitro (unter anderem H-510) und in einem SCID-Maus Modell in vivo (Kalemkerian et al. 1999).

Die gewählten tierexperimentellen Ansätze erscheinen also geeignet, um die Fragestellung erfolgreich zu bearbeiten.

### **5.1.2. Methoden zur Erfassung des Primärtumorwachstums und der Metastasierungsrate**

Zur Überprüfung des Primärtumorwachstums wurden Länge und Breite des Primärtumors jeden zweiten Tag (beim SCLC-Modell jeden vierten Tag) mit einer digitalen Schieblehre gemessen und das Tumolvolumen anhand der im Methodenteil hinterlegten Formel berechnet. Diese Methode wurde bereits in vielen Studien angewendet (z.B. Bugge et al. 1997) und ist einfach durchführbar.

Um den Einfluss des Urokinaseinhibitors auf den pulmonalen Metastasierungsgrad zu untersuchen wurden VCT-Untersuchungen bei den Mäusen durchgeführt. Ein klarer Vorteil dieses Vorgehens besteht in der Wiederholbarkeit der Anwendung am selben Tier und des exzellenten Auflösungsvermögens des VCT unter den bildgebenden Verfahren. Die Auflösung beträgt hier 20-25 lp/cm, abhängig vom verwendeten Rekonstruktionsfilter (Greschus et al. 2005).

Entsprechend konnte mittels des angewandten VCT-Verfahrens eine Reduktion der pulmonalen Metastasierung in einigen der inhibitorbehandelten Gruppen (25 mg/kg; 100 mg/kg) gegenüber den Kontrollen nachgewiesen werden. Ein möglicher Kritikpunkt der hier gewählten Methode könnte allerdings sein, dass auch im VCT Metastasen erst ab einer



Größe von etwa 200 µm eindeutig als solche identifizierbar sind. Der darunter liegende Größenbereich (Mikrometastasen) kann letztlich nur über histologische Verfahren dargestellt werden. Eine nicht unerhebliche Rolle spielt in diesem Zusammenhang sicher auch, dass die Mäuse während der VCT-Untersuchung noch atmen und so der große Vorteil der VCT Methode nur beschränkt zum Tragen kommt. Ein Labeling der Tumorzellen mit dem Ziel der sicheren Aufdeckung im Rahmen histologischer Verfahren, wie anderweitig bereits publiziert, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

### 5.1.3. Pharmakokinetische Aspekte

Der in dieser Arbeit verwendete uPA-Inhibitor (CJ-463) wird im Tier mit einer Halbwertszeit von etwa einer halben Stunde eliminiert (persönliche Mitteilung von Dr. Helmut Giersiefen, Curacyste, anlässlich einer Projektbesprechung in Gießen 2005; Schweinitz et al. 2004).

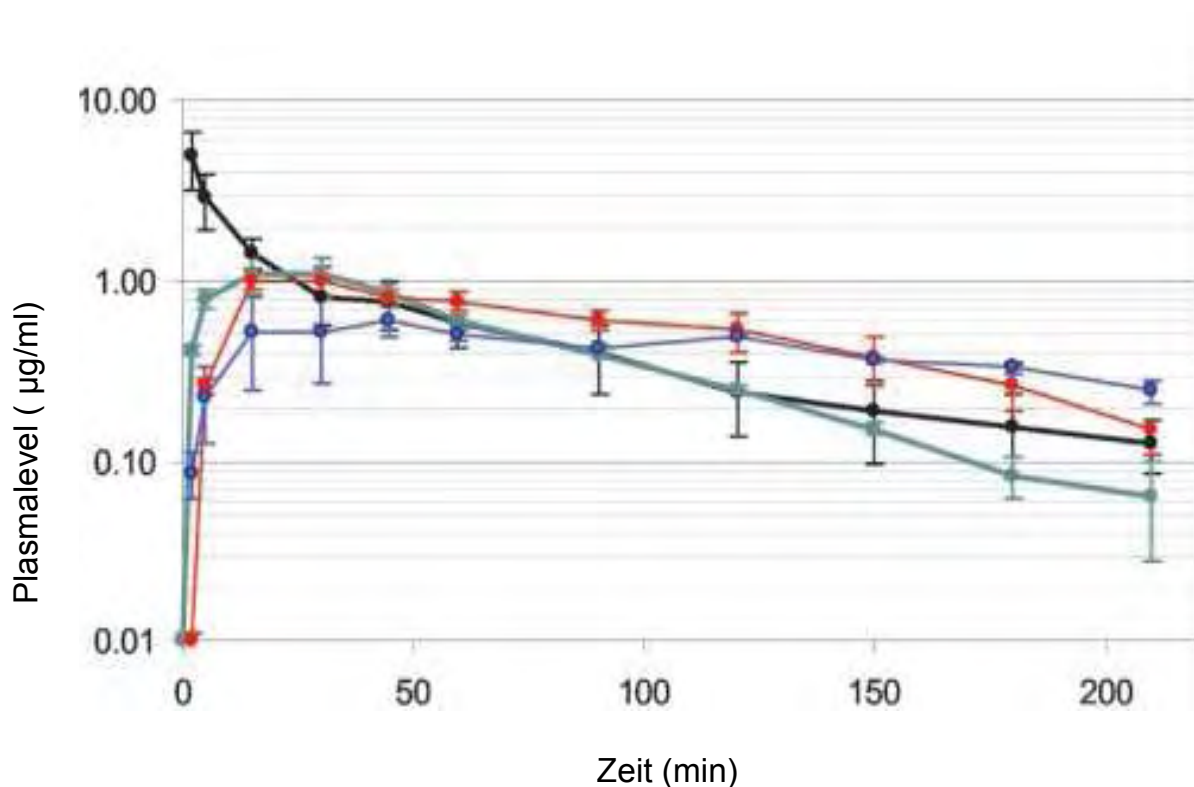


Abb. 17: Plasmalevel von CJ-463 in Ratten nach intravenöser (schwarz), intraperitonealer (grün) und subkutaner (rot) Applikation von 1mg/kg (bestimmt durch Chromogen-Assay). Die blaue Kurve zeigt den Plasmalevel nach subkutaner Applikation (bestimmt durch HPLC-Assay) (Abb. nach Schweinitz et al. 2004).

#### **5.1.4. Sicherheitsaspekte**

Der hier verwendete Urokinaseinhibitor wurde von den Versuchstieren gut vertragen. Es konnten keinerlei Nebenwirkungen beobachtet werden. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Schweinitz et al überein, welche den Inhibitor in einem Fibrosarkom-Modell getestet haben (Schweinitz et al. 2004).

### **5.2. Rolle von Proteasen bei Primärtumorwachstum und Metastasierung**

#### **5.2.1. Grundsätzliche Überlegungen**

Malignes Tumorwachstum ist oftmals gekoppelt an eine Überexpression verschiedener Proteasen, wie zum Beispiel der Serinproteasen, Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und Cathepsine (Banke et al. 2003, Noel et al. 1997, Lah und Kos 1998). Diese Proteasen spielen eine wichtige Rolle bei den für das Tumorwachstum und die Tumorausbreitung elementaren Prozessen wie Angiogenese, Migration und Metastasierung (Banke et al. 2003, Reuning et al. 1998, Koblinski et al. 2000, Egebald und Werb 2002). Aus dieser Erkenntnis resultierte die Entwicklung von synthetischen Proteaseinhibitoren als neuer Therapieansatz der Behandlung von Malignomen (Banke et al. 2003, Lah und Kos 1998, Hidalgo und Eckhardt 2001, Rockway et al. 2002). Zunächst konzentrierte sich die Forschung unter anderem auf MMP-Inhibitoren. Dies vermutlich vor dem Hintergrund, dass MMPs ein breites Spektrum an Komponenten der extrazellulären Matrix abbauen können und in alle Aspekte der Tumorprogression verwickelt sind (Chambers und Matrisian 1997). Jedoch zeigten einige klinische Studien, in denen MMP-Inhibitoren getestet wurden zum Teil enttäuschende Ergebnisse (Schweinitz et al. 2004). So konnte in einer Phase III-Studie, in der der MMP-Inhibitor Prinomastat bei Patienten mit NSCLC im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie mit Gematabine-Cisplatin getestet wurde, weder eine Reduktion der Mortalität noch eine Verlängerung der krankheitsfreien Intervalle durch die zusätzliche Gabe dieses Inhibitors nachgewiesen werden (Zucker et al. 2000; Bissett et al. 2005). Die Firmen Bayer und Agouron haben ihre Phase III-Studien mit den MMP-Inhibitoren Bay 12-9566 und Prinomastat eingestellt, da keine klinische Wirksamkeit nachgewiesen werden konnte (Zucker et al. 2000). Auch der MMP-Inhibitor Marimastat zeigte in klinischen Studien mit an

Pankreaskarzinomen und Karzinomen des Gastrointestinaltraktes erkrankten Patienten keine therapeutische Überlegenheit gegenüber Gemcitabine (Zucker et al. 2000).

Neben den MMPs spielt möglicherweise auch das uPA-System eine wichtige Rolle bei Tumorwachstum und Metastasierung (Schmitt et al. 1997). Hohe uPA-, uPAR- und PAI-1-Spiegel korrelieren häufig mit einer schlechten Prognose für Krebspatienten. So ist dies zum Beispiel bei NSCLC (Pappot et al. 1997; Pedersen 1994), colorektalen Karzinomen (Stephens et al. 1997; Ganesh et al. 1994) und Mammakarzinomen (Riisbro et al. 2002; Grøndahl-Hansen et al. 1995) der Fall.

Aus diesem Grund schien es interessant zu überprüfen, ob auch in den Primärtumoren unserer Versuchstiere ein hoher Expressionsgrad an uPA und uPAR vorhanden ist.

Bezüglich uPA zeigten sich im Lysat der LLC-Zellen und des homogenisierten Tumorgewebes Doppelbanden im Bereich eines Molekulargewichtes von 40-50 kDa. Jedoch war die Expression geringer als in den Wirtsorganen. Zusätzlich war bei einigen der Proben eine dritte Bande sichtbar, welche ein Molekulargewicht von 30 kDa aufwies.

Laut Literatur wird uPA als einkettiges Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 54 kDa freigesetzt (Stepanova und Tkachuk 2002). Der unprozessierte Precursor (*high molecular weight uPA*) hat laut Swiss-Prot-Datenbank ein Molekulargewicht von 48 kDa. Daneben existiert eine niedermolekulare Form (*low molecular weight uPA*), die eine um Growth factor like-Domäne und Kringle-Domäne verkürzte A-Kette aufweist und ein Molekulargewicht von 33 kDa besitzt (Stepanova und Tkachuk 2002). Unterschiede im Molekulargewicht können durch unterschiedliche Glykosylierung verursacht sein. Die hier gefundenen Banden stimmen hinsichtlich des Molekulargewichts mit den Angaben in der Literatur überein. Bei der dritten Bande, welche bei etwa 30 kDa zu sehen ist, handelt es sich vermutlich um *low molecular weight uPA*.

Bezüglich uPAR konnten deutliche Doppelbanden im Molekulargewichtsbereich von 45-60 kDa in den Tumorgeweben nachgewiesen werden. Bei dem aus LLC-Zellen gewonnenen Lysat zeigte sich eine Einzelbande bei etwa 45-50 kDa. Bei der aus einer gesunden Mäuselunge gewonnenen Probe war eine einzelne Bande im Bereich von 50-60 kDa erkennbar, welche etwas schwächer ausgeprägt war, als die Banden bei LLC-Lysat und Tumorgewebe.

In der Literatur ist für den maturen uPA-Rezeptor ein Molekulargewicht von 55-60 kDa angegeben (Stepanova und Tkachuk 2002), wobei die Glykosylierung für etwa die Hälfte des Molekulargewichts verantwortlich ist. Nach vollständiger Deglycosylierung hat uPAR ein

Molekulargewicht von etwa 35 kDa (Høyer-Hansen et al. 1997). Auch in der Swiss Prot-Datenbank ist für uPAR ein Molekulargewicht von etwa 35 kDa angegeben.

Die im hier durchgeführten Western Blot zu erkennenden Banden zwischen 50-60 kDa stimmen also mit dem in der Literatur für die glycosylierte Form des Urokinaserezeptors angegebenen Molekulargewicht überein. Die Doppelbanden bei den Tumorzellen könnten auf das gleichzeitige Vorhandensein glycosylierter wie partiell deglycosylierter Formen von uPAR hinweisen. Im Vergleich zu den Wirtsorganen war die Expression von uPAR im Tumorgewebe besonders stark. Somit konnte die Aussage bestätigt werden, dass es bei verschiedenen Tumorerkrankungen oftmals zu einer Überexpression von uPAR kommt.

Die Expression von PAI-1 in Tumorgewebe und LLC-Lysat wurde in der hier vorliegenden Arbeit nicht überprüft.

Da PAI-1 ein natürlicher uPA-Inhibitor ist, könnte erwartet werden, dass er Tumorstadium und Metastasierung hemmt (Duffy 2004), indem er uPA abfängt und die perizelluläre Lyse begrenzt. Dies wurde tatsächlich auch in einigen Studien bestätigt - hier reduzierten hohe PAI-1-Spiegel die Bildung von Metastasen (Alizadeh et al. 1995, Ma et al. 1997). In den meisten anderen Studien wurde dagegen gezeigt, dass PAI-1 Tumordinvasion und Metastasierung eher fördert als hemmt. Zum Beispiel fanden Liu et al, dass die Co-Expression von uPA und PAI-1 für die optimale Invasion von Lungenkarzinom-Zellen durch eine artifizielle Membran notwendig ist (Liu et al. 1995). Bajou et al zeigten in einer Studie, dass PAI-1-Defizienz in Mäusen die Angiogenese verringerte und die Tumorzellinvasion verhinderte (Bajou et al. 1998). Mögliche Mechanismen, über die PAI-1 zur Tumorausbreitung beiträgt, sind unter anderem die Modulation von Zelladhäsion und Migration durch Bindung an Vitronektin, einen Bestandteil der ECM (Loskutoff et al. 1999), Beteiligung an der Angiogenese (Bajou et al. 1998) und die Stimulation der Zellproliferation (Webb et al. 2001).

### 5.2.2. Einfluss des uPA-Systems auf Migrationsverhalten und Metastasierungspotential von Tumorzellen

Grundsätzlich existieren verschiedene Möglichkeiten das uPA-System zu beeinflussen:

- Reduktion der uPA- und/oder uPAR-Expression mit Hilfe von Antisense-Nukleotiden
- Einsatz von uPAR-Antagonisten; dies führt zu einer langsameren Aktivierung von uPA und zur Aufhebung der Zelloberflächenfokussierung der proteolytischen Aktivität. Es wurden hierzu bereits Peptide entwickelt, welche etwa genauso gut an den Rezeptor binden wie uPA selbst.
- Einsatz von uPA-Antagonisten; auch hier kann über die Verhinderung der Bindung von uPA an uPAR die Fokussierung der proteolytischen Aktivität auf die Zelloberfläche verhindert werden. Löslicher uPAR, der mit zelloberflächen-gebundenem uPAR um die Bindungsstelle zu uPA konkurriert, erwies sich ebenfalls als möglicher Ansatzpunkt.
- Einsatz synthetischer Inhibitoren des katalytischen Zentrums (*active site Inhibitoren*) der uPA zur Blockade der proteolytischen Aktivität. Derartige Inhibitoren müssen hochspezifisch sein, da aufgrund der Strukturverwandtschaft sonst auch verwandte Serinproteasen gehemmt werden, wodurch es eventuell zu Nebenwirkungen kommen könnte.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte das uPA-System mit Hilfe eines synthetischen uPA-Inhibitors beeinflusst werden. Es wurde der Einfluss des Urokinaseinhibitors CJ-463 auf Primärtumorwachstum, Tumorangiogenese und Metastasierungsrate untersucht.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte das Primärtumorwachstum eines LLC- und eines SCLC-Tumors durch zweimal tägliche Behandlung mit CJ-463 deutlich gehemmt werden. Ebenfalls konnte in einigen der mit CJ-463 behandelten Gruppen (100 mg/kg; 25 mg/kg) eine Reduktion der Metastasierungsrate erzielt werden. Eine Reduktion des Vaskularisierungsgrades durch Gabe des uPA-Inhibitors konnte nicht nachgewiesen werden.

Vor dem Hintergrund der hier gemachten Beobachtungen und der in Abbildung 18 zusammengefassten Erkenntnisse lassen sich folgende Hypothesen zur Bedeutung des Urokinase-Systems für das Wachstum des Primärtumors und die Metastasierung aufstellen:

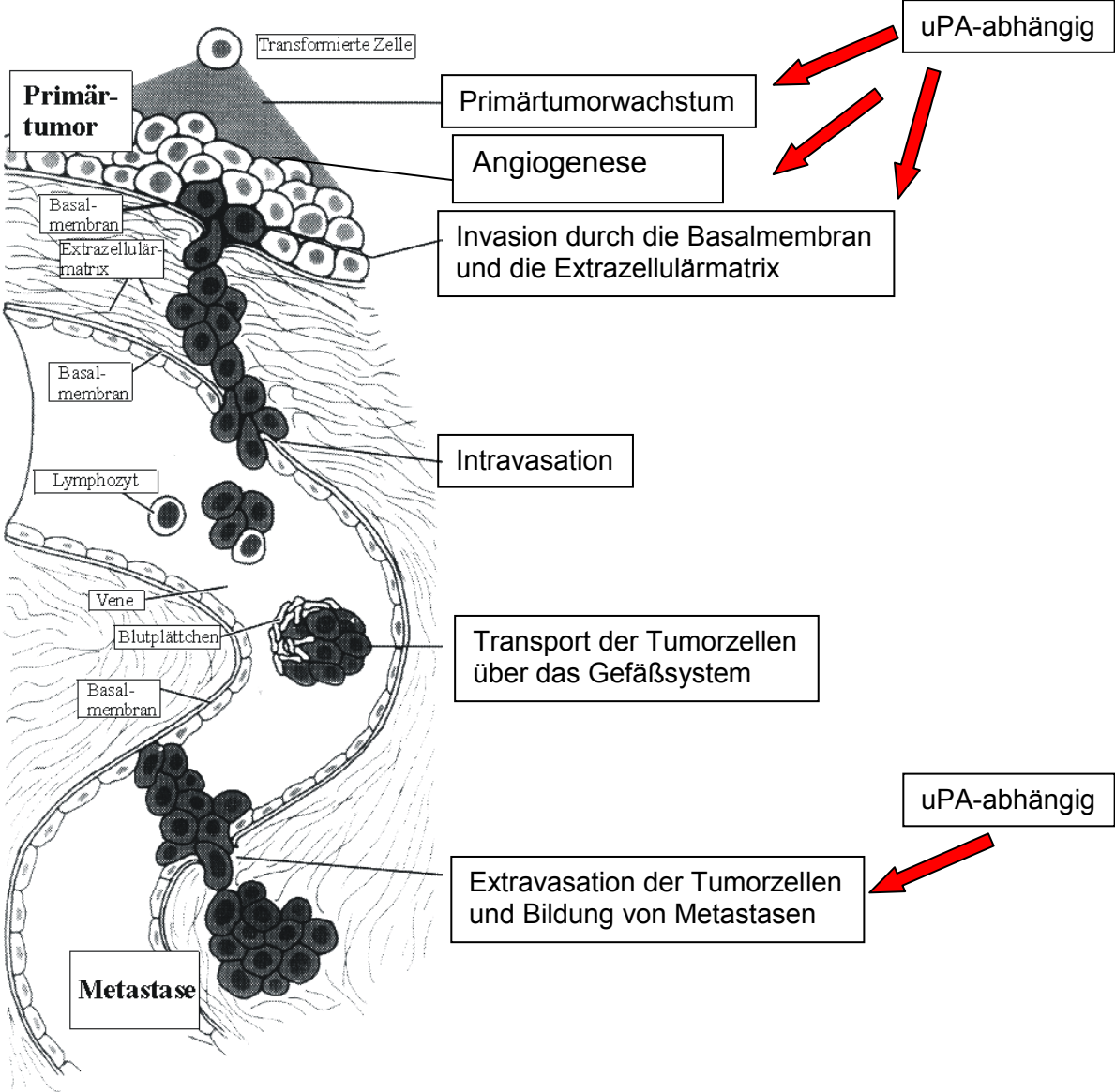


Abb. 18: Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasierung als uPA-abhängige Prozesse (Abbildung modifiziert nach McKinnell et al. 1998)

Das Urokinase-System nimmt wesentlichen Einfluss auf das Migrationsverhalten und das Metastasierungspotential von Tumorzellen. Urokinase aktiviert die Protease Plasmin und gewährleistet so eine zielgerichtete proteolytische Aktivität auf der Zelloberfläche, zum anderen interagiert uPA mit diversen weiteren proteolytischen Systemen. So wird z.B. single-chain-uPA neben Plasmin auch durch andere Proteasen wie Cathepsin B und L und Kallikrein aktiviert (Schmitt et al. 2000; Lee et al. 2000). Das durch Urokinase aktivierte Plasmin wiederum kann sowohl Matrixmetalloproteasen als auch zusätzliches pro-uPA aktivieren (Schweinitz et al. 2004). Somit kann Plasmin direkt oder indirekt über Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen Bestandteile der ECM, wie zum Beispiel Kollagen, Laminin und Fibronectin, abbauen (Stepnova und Tkachuk 2002; Aguirre Ghiso et al. 1999), wodurch das Ausbrechen der Tumorzellen aus dem Zellverband des Primärtumors, deren Invasion in andere Gewebe und die Bildung von Metastasen ermöglicht wird.

Es ist bereits bekannt, dass synthetische uPA-Inhibitoren die Tumormetastasierung beeinflussen. Anfangs gab es allerdings nur wenige effiziente uPA-Inhibitoren. Die meisten zeigten kaum oder keine Selektivität für uPA. Sie hemmten auch Enzyme der Blutgerinnungskaskade (z.B. Faktor Xa) und des Verdauungstraktes (Sperl et al. 2000; Banke et al. 2003). So testeten beispielsweise Banke et al. 2003 eine Reihe von synthetischen uPA-Inhibitoren in einem murinen T-Zell-Lymphom-Modell. Dabei konnten sie durch zweimal tägliche Verabreichung der Inhibitoren in einer Dosis von 0,5 mg/kg KGW eine signifikante Reduktion der Lebermetastasen zwischen 20 % und 40 % erzielen. Durch Erhöhung der Dosis auf 1,5 mg/kg KGW wurde der antimetastatische Effekt noch erhöht (35-95 % Reduktion der Metastasen im Vergleich zur Kontrollgruppe). In diesem Modell erwiesen sich uPA-Inhibitoren mit der höchsten Faktor Xa-Selektivität am wirksamsten.

Mittlerweile wurden neue, potente und selektivere uPA-Inhibitoren entwickelt.

Amilorid, ein Diuretikum, stellt einen selektiven Urokinaseinhibitor dar, der im Mausmodell die Bildung pulmonaler Metastasen verhinderte (Vasalli et al. 1985). Allerdings ist Amilorid im Vergleich zu anderen Inhibitoren, wie zum Beispiel den 4-substituierten Benzothiophen-2-carboxamidinen oder 4-Aminomethylphenyl-guanidin-Derivaten, ein relativ schwacher uPA-Inhibitor.

Für den uPA-Inhibitor B-428 konnte gezeigt werden, dass er uPA-vermittelte Prozesse wie die Degradation der extrazellulären Matrix, Tumorzelladhäsion, Migration und Invasion *in vitro* effektiv hemmen kann (Alonso et al. 1996). In einem Mammakarzinom-Maus-Modell hemmt dieser Inhibitor die lokale Tumordinvasion (Alonso et al. 1996).

Durch Optimierung der oben genannten und von Banke et al getesteten synthetischen uPA-Inhibitoren konnte eine verlängerte Halbwertszeit und eine bessere Selektivität erreicht werden. Einer dieser durch Optimierung entstandenen synthetischen uPA-Inhibitoren ist der in dieser Arbeit verwendete Inhibitor CJ-463 (Benzylsulfonyl-D-Ser-Ser-4 Aminobenzylamid). CJ-463 hemmt uPA sehr selektiv ( $K_i = 20 \text{ nM}$ ), andere Serinproteasen werden weitaus weniger effizient inhibiert (z.B.  $K_i \text{ Plasmin} = 750 \text{ nM}$ ,  $K_i \text{ tPA} = 11.000 \text{ nM}$ ,  $K_i \text{ FXa} = 13.000 \text{ nM}$ ). In einer Studie von Schweinitz et al. konnten durch zweimalige tägliche intraperitoneale Verabreichung von 1,5 mg/kg CJ-463 die Bildung von Lungenmetastasen in einem humanen Fibrosarkom-Modell in Nacktmäusen signifikant reduziert werden (Schweinitz et al. 2004). Eine zusätzliche Überlebensstudie ergab einen deutlichen Überlebensvorteil der inhibitorbehandelten Mäuse gegenüber der Kontrollgruppe (Schweinitz et al. 2004).

Auch in den Versuchen der hier vorliegenden Arbeit konnte in einigen der mit CJ-463 behandelten Gruppen (100 mg/kg und 25 mg/kg) eine Reduktion der Metastasierungsrate erzielt werden. Jedoch erwiesen sich die Werte statistisch als nicht signifikant.

In einem Versuch mit uPA-KO-Mäusen und wt-Kontrollen zeigte sich, dass die Metastasierungsrate in den kochsalzbehandelten uPA-KO-Mäusen (0,43 Metastasen pro Maus) geringer war, als in den kochsalzbehandelten wt-Kontrollen (1,2 Metastasen pro Maus). Diese Daten bestätigen die Aussage, dass uPA eine bedeutende Rolle bei der Metastasierung einnimmt. Zwischen inhibitorbehandelten (0,625 Metastasen pro Maus) und kochsalzbehandelten (0,43 Metastasen pro Maus) uPA-KO-Mäusen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Metastasierungsrate, wobei die durchschnittliche Anzahl an pulmonalen Metastasen bei den inhibitorbehandelten uPA-KO-Mäusen sogar etwas höher war als bei der kochsalzbehandelten uPA-KO-Mäusen. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass für die Wirksamkeit des uPA-Inhibitors wirtseigene Urokinase vorhanden sein muss.

Neben der Migration von Tumorzellen ist auch die Leukozytenmigration in die Lunge bei Pneumonien uPA-abhängig. Bereits 1996 konnte von Gyetko et al. am Beispiel einer Infektion mit *Cryptococcus neoformans* gezeigt werden, dass uPA für das Einwandern von Entzündungszellen in die Lunge eine wichtige Rolle spielt. Gesunde wt- und uPA-KO-Mäuse wurden mit *Cryptococcus neoformans* infiziert und anschließend die Zahl der Entzündungszellen in der Lunge untersucht. 21 Tage nach Inokulation des Keims wiesen die Lungen der uPA-KO-Mäuse weniger Entzündungszellen auf als die der wt-Mäuse. Während die Anzahl der CFUs in den Organen der uPA-KO-Mäuse weiter anstieg, nahm sie in denen der wt-Mäuse wieder ab. Überlebensstudien zeigten, dass 15 von 19 uPA-KO-Mäusen



starben, während fast alle wt-Mäuse überlebten (nur 3 von 19 wt-Mäusen starben) (Gyetko et al. 1996). Ähnliches konnte 1999 von Beck et al. für Infektionen mit *Pneumocystis carinii* gezeigt werden (Beck et al. 1999).

### **5.2.3. Einfluss des uPA-Systems auf Tumorangiogenese und Primärtumorwachstum**

Über die Beeinflussung der Angiogenese nimmt Urokinase entscheidend Einfluss auf das Primärtumorwachstum. Dass durch Hemmung der Vaskularisierung das Tumorwachstum beeinflusst werden kann, zeigten bereits Studien, in denen VEGF-Antikörper auf ihre therapeutische Wirksamkeit hin untersucht wurden. Präklinische und klinische Studien mit VEGF-Antikörpern zeigten vielversprechende Ergebnisse bei verschiedenen Krebserkrankungen (NSCLC, Mammakarzinom, colorektales Karzinom, Nierenkarzinom) (Sandler et al. 2004, Sledge und Miller 2002, Kabbinavar et al. 2003, Hurwitz et al. 2003, Yang et al. 2002). Beispielsweise führte die Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) zwischen Juli 2001 und April 2004 eine randomisierte Phase III-Studie mit 878 NSCLC-Patienten durch. 444 Patienten erhielten Paclitaxel und Carboplatin, 434 erhielten zusätzlich Bevacizumab (Avastin), einen monoklonalen VEGF-Antikörper (15 mg/kg alle drei Wochen). Die mit Bevacizumab behandelten Patienten zeigten eine längere mittlere Überlebenszeit gegenüber den nur mit Paclitaxel und Carboplatin behandelten Patienten (12,3 Monate vs. 10,3 Monate). Zusätzlich zeigten die mit Bevacizumab Behandelten eine bessere Überlebensrate (23 % vs. 15 % nach zwei Jahren), ein längeres progressionsfreies Überleben (6,2 Monate vs. 4,5 Monate) und eine bessere Ansprechrate (35 % vs. 15 %) (Sandler und Herbst 2006). In einer von Escudier et al. durchgeführten randomisierten Phase III-Studie erhielten Patienten mit zuvor unbehandeltem metastasierenden renalen Karzinom Interferon $\alpha$ -2a und Bevacizumab (n = 327) oder Interferon $\alpha$ -2a und Placebo (n = 322). Das progressionsfreie Überleben war in der mit Interferon $\alpha$ -2a und Bevacizumab behandelten Patientengruppe signifikant verlängert (10,2 Monate vs. 5,4 Monate) (Escudier et al. 2007). In der hier vorliegenden Arbeit konnte keine Reduktion der Tumolvaskularisierung durch Gabe des uPA-Inhibitors nachgewiesen werden. Tumoren behandelter und nicht behandelter Tiere zeigten keinen Unterschied im Vaskularisierungsgrad. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte sein, dass durch den Inhibitor nur sich neu bildende Kapillaren gehemmt werden, jedoch nicht größere Gefäße, die bereits vor Behandlungsbeginn entstanden sind. Eine

histologische Analyse der Tumoren von Mäusen, welche ab Tag -1 behandelt wurden, erscheint sinnvoll, um dies näher zu untersuchen.

Wood et al., die einen VEGF-Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitor testeten, berichten, dass durch den von ihnen verwendeten Inhibitor zwar die Bildung von kleinsten Gefäßen im Tumorrinneren gehemmt werden konnte, jedoch kein Effekt auf größere Gefäße in der Peripherie des Tumors ersichtlich war (Wood et al. 2000). Auch Wood et al gehen in ihrer Studie davon aus, dass größere, vor Behandlungsbeginn entstandene Gefäße nicht sensitiv auf den Inhibitor reagieren.

Obwohl wir keine Reduktion des Vaskularisierungsgrades in den Primärtumoren der inhibitorbehandelten Mäuse feststellen konnten, konnte das Primärtumorwachstum durch zweimalig tägliche Behandlung mit dem uPA-Inhibitor deutlich gehemmt werden. Ab einer Dosierung von zweimalig täglich 100 mg/kg KGW konnte eine signifikante Reduktion des Primärtumorvolumens von 36 % erreicht werden. Eine noch stärkere Hemmung des Primärtumorwachstums wurde durch einen früheren Behandlungsbeginn (einen Tag vor Tumorzellinjektion) erzielt. Bei einer Dosis von 10 mg/kg und 25 mg/kg KGW konnte das Primärtumorwachstum ebenfalls gehemmt werden. Hier waren die Ergebnisse jedoch nicht statistisch signifikant.

Über eine Hemmung des Primärtumorwachstums durch synthetische Urokinaseinhibitoren ist bislang so gut wie gar nichts publiziert worden. Bei den meisten bisher getesteten uPA-Inhibitoren wurde nur über eine Hemmung der Metastasierung berichtet. In einer Arbeit aus 2005 testeten Setyono-Han et al. die Wirksamkeit des Urokinaseinhibitors WX-UK1, einem 3-Aminophenylalanin-Derivat, an einem Ratten-Mammakarzinom-Modell. Sie fanden heraus, dass WX-UK1 sowohl die Metastasierung als auch das Primärtumorwachstum des BN 472 Ratten-Mammakarzinom in dosisabhängiger Weise beeinflusst. Die Behandlung erfolgte hier einmalig täglich ab Tag drei nach der Tumortransplantation über einen Zeitraum von bis zu 35 Tagen. Die minimale effektive Dosis lag zwischen 0,15 und 0,3 mg/kg/Tag (Setyono-Han et al. 2005).

Für die therapeutische Wirksamkeit des hier untersuchten Inhibitors scheint vor allem die Hemmung der Urokinaseaktivität und weniger uPAR-vermittelte, zelluläre Signaltransduktionswege verantwortlich zu sein.

Die durch Plasminspaltung aus der inaktiven Vorstufe scuPA generierte tcuPA aktiviert Plasmin und beeinflusst hierüber sowohl direkt, als auch indirekt die Aktivierung von MMPs und den Abbau von ECM-Komponenten wie Fibronectin, Laminin oder Kollagen (Stepanova und Tkachuk 2002; Aguirre Ghiso et al. 1999). Der Abbau der ECM ermöglicht das

Ausbrechen von Tumorzellen aus dem Zellverband und deren Invasion in andere Gewebe, was zur Metastasierung des Primärtumors führen kann. Auch Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel TGF- $\beta$ 1 können direkt durch uPA oder indirekt über Plasmin aktiviert werden. Diese Wachstumsfaktoren binden an ihre Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Stepanova und Tkachuk 2002) und können unter anderem zur Stimulierung des Tumorwachstums führen.

Bindet uPA an uPAR, welcher über eine Glycosylphosphatidylinositol-Kette in der Zellmembran verankert ist, wird seine proteolytische Aktivität stark erhöht (Plow et al. 1986). Darüber hinaus kann der Urokinaserezeptor mit Integrinen und dem G-Protein gekoppelten chemotaktischen Rezeptor FPRL1 in Wechselwirkung treten und so Zelladhäsion und Migration modulieren (Wei et al. 1996, Resnati et al. 2002). Für die Vermittlung adhäsiver Eigenschaften sind die Vitronektin bindenden Domänen 2 und 3 von Bedeutung (Ge und Elghetany 2003, Colman et al. 1997). Für die Interaktion mit dem extrazellulären Matrixprotein Vitronektin ist ebenfalls die Bindung von uPA an uPAR erforderlich. Nach uPA Bindung werden Vitronektinbindungsstellen exponiert. Die uPA/uPAR-Vitronektin-Interaktion induziert dann eine Reorganisation des Cytoskeletts und vermittelt zusammen mit der Aktivierung von Integrinen eine Migration der Zelle.

Anhand der hier gewonnenen Ergebnisse erscheint es jedoch klar, dass im Vordergrund der hier beobachteten Wirksamkeit des Inhibitors vor allem die proteolytische Funktion von Bedeutung ist. Der uPAR-vermittelten zellulären Signaltransduktion kommt hier eher eine untergeordnete Bedeutung zu. So zeigte der uPA-Inhibitor in unseren Untersuchungen bei den uPA-KO-Mäusen keine Wirksamkeit mehr auf das Primärtumorwachstum. Bei den uPAR-KO-Mäusen konnte dagegen eine signifikante Hemmung des Primärtumorwachstums bei der inhibitorbehandelten Gruppe erzielt werden. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass für die Wirksamkeit des uPA-Inhibitors wirtseigene Urokinase vorhanden sein muss.

Ebenso wie die Untersuchungen an uPA-KO-Mäusen deuten die Ergebnisse des im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Proliferationsassays darauf hin, dass der Therapieeffekt des Inhibitors durch Inhibition der stromalen uPA erreicht wird. Der Inhibitor hemmte die Proliferation der Tumorzellen in vitro nur in einer sehr hohen Konzentration (100 mg/ml) signifikant. Die im Tierversuch eingesetzten Dosierungen waren erheblich geringer und hatten somit keinen Einfluss auf die Proliferation der Tumorzellen.

### 5.3. Therapeutische Aspekte

Die Prognose des Bronchialkarzinoms ist heute noch immer schlecht, da der Tumor zum Zeitpunkt der Diagnosestellung für kurative Ansätze oftmals bereits zu groß oder metastasiert ist. Die meisten Patienten sind zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits inoperabel. Nur etwa 15 % der Patienten befinden sich bei Diagnosestellung noch in einem frühen Stadium (Sunder-Plassmann 1998). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt derzeit über alle Stadien gemittelt bei etwa 15 % (Herth 2005).

Wie bereits erwähnt, zeigten präklinische und klinische Studien, in denen VEGF-Antikörper getestet wurden, viel versprechende Ergebnisse bei verschiedenen Krebserkrankungen (unter anderem beim NSCLC). Jedoch traten bei der Behandlung mit VEGF-Antikörpern Nebenwirkungen wie Tumorblutungen, Hypertension, Thrombosen, Proteinurie und Epistaxis auf (Sandler und Herbst 2004, Herbst 2005). In einer Phase II-Studie traten mit hoher Prävalenz lebensbedrohliche Lungenblutungen bei Patienten mit squamöser Zellhistologie auf (Sandler et al. 2006).

Derartige Nebenwirkungen haben wir während unserer Versuche mit dem uPA-Inhibitor CJ-463 nicht beobachtet. Auch bei anderen klinisch getesteten uPA-Inhibitoren, beispielsweise dem Inhibitor WX-671 (Vorstufe (*Prodrug*) des von Willex entwickelten Medikaments WX-UK1) der Firma Willex, traten derartige Nebenwirkungen nicht auf. Dieser Inhibitor ist im Vergleich zu dem von uns getesteten Inhibitor weniger uPA-spezifisch.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass uPA-Inhibitoren sich als weiteres, effizientes Therapieprinzip anbieten und sie zudem auch die Option der Beeinflussung der Metastasierung bieten.

In Übereinstimmung mit diesem Konzept wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Wirksamkeit des uPA-Inhibitors CJ-463 an einem hochmalignen, früh metastasierenden Bronchialkarzinom des Menschen, nämlich einer SCLC-Zelllinie, dokumentiert. Auch in diesem Modell konnte das Primärtumorwachstum durch zweimalig tägliche Gabe von CJ-463 gehemmt werden.

## 6. Zusammenfassung

Das Bronchialkarzinom ist die häufigste bösartige Tumorerkrankung des Menschen. Das Plasminogen-Aktivator/Plasmin-System spielt eine zentrale Rolle in der Tumorgenese. Durch Bindung von Urokinase an ihren Rezeptor wird die proteolytische Aktivität auf die Zelloberfläche fokussiert und begünstigt so das Ausbrechen einzelner Tumorzellen aus dem Zellverband, deren Invasion in anderes Gewebe und somit die Bildung von Metastasen. Eine Hemmung der Urokinaseaktivität stellt somit einen potentiellen Ansatz zur Anti-Tumor-Therapie dar. In der vorliegenden Studie haben wir den Einfluss eines synthetischen, niedermolekularen Urokinaseinhibitors vom Benzamidin-Typ auf Tumorwachstum, Tumervaskularisierung und Metastasierung an einem Lewis Lung Carcinoma-Modell, sowie an einem SCLC-Modell untersucht.

Die Behandlung der Mäuse mit dem uPA-Inhibitor CJ-463 führte in allen Dosierungen zu einer Reduktion des Tumolvolumens, wobei sich die Dosis von 100 mg/kg am wirksamsten erwies. Eine Reduktion pulmonaler Metastasen durch Behandlung mit dem uPA-Inhibitor konnte nur für die 25 mg/kg und 100mg/kg Gruppe beobachtet werden. Bei den mit dem unwirksamen Stereoisomer CJ-1106 behandelten Tieren konnte keine Beeinflussung des Tumorwachstums und der Metastasierung beobachtet werden. Eine Beeinflussung der Tumervaskularisierung durch den uPA-Inhibitor CJ-463 konnte nicht beobachtet werden.

Im SCLC-Modell konnte durch Behandlung mit dem uPA-Inhibitor eine Reduktion des Primärtumorwachstums erzielt werden. Diese erwies sich jedoch als statistisch nicht signifikant.

In Versuchen mit uPA-KO- und uPAR-KO-Mäusen zeigte sich, dass sowohl Primärtumorwachstum als auch Metastasierung in Abwesenheit wirtseigener Urokinase bzw. wirtseigenem Urokinase-Rezeptor möglich ist. Die Behandlung mit dem uPA-Inhibitor CJ-463 führte in den uPAR-KO-Mäusen zu einer signifikanten Reduktion des Primärtumorwachstums gegenüber der Kochsalzbehandelten Kontrollgruppe. Bei uPA-KO-Mäusen hingegen konnte das Primärtumorwachstum nicht durch Behandlung mit CJ-463 reduziert werden. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass für die Wirksamkeit des uPA-Inhibitors wirtseigene (stromale) Urokinase erforderlich ist. Ebenso deuten die Ergebnisse des im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Proliferationsassays darauf hin, dass der Therapieeffekt durch Inhibierung der Stromalen Urokinase erreicht wird.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ein synthetischer, niedermolekularer Urokinaseinhibitor vom Benzamidin-Typ zu einer Regression des Tumorwachstums führen und eine Therapieoption zur Behandlung des Lungenkarzinoms darstellen kann.

## **Summary**

Lung cancer is the most common malignancy in humans. The urokinase-type plasminogen activator (uPA)-system plays a pivotal role in tumorigenesis. Upon binding to uPAR, uPA is activated. This allows tumor cells to detach from the primary tumor, invade into surrounding tissues and form metastases. As a result, the uPA-system represents an interesting target for anti cancer strategies.

In the present study we investigated the influence of the synthetic low molecular weight urokinase-inhibitor CJ-463 on primary tumor growth, tumor vascularisation and formation of metastases in a murine Lewis lung carcinoma model and a small cell lung cancer (SCLC) model employing human H-510 cells. We observed that CJ-463 suppressed primary tumor growth, with the highest efficacy seen in the 100 mg/kg group. In contrast, treatment with CJ-1106, the non-inhibitory stereoisomer of CJ-463, showed no effect on tumor growth. Treatment with CJ-463 did not result in a statistically significant reduction of tumor vascularisation. In the SCLC model, treatment with CJ-463 resulted in a reduction of tumor growth. However, the results did not reach statistical significance.

In experiments employing mice deficient for uPA or uPAR, respectively, both uPA-KO mice and uPAR-KO mice showed primary tumor growth and metastasis formation. This indicates that the host's uPA or uPAR do not represent a strict requirement of primary tumor growth and metastasis. Treatment of uPAR-KO mice with CJ-463 resulted in a statistically significant reduction of primary tumor growth, whereas treatment did not show any effect on primary tumor growth in uPA-KO mice. These results clearly demonstrate that the therapeutic effect of CJ-463 was achieved via inhibition of host uPA. These findings are supported by the results of the proliferation assay we performed.

In summary, our results suggest that synthetic low molecular weight urokinase inhibitors may be potent antitumor agents representing promising novel compounds for reducing tumor progression.

## 7. Literatur

Aguirre Ghiso JA, Alonso DF, Farias EF, Gomez DE, de Kier Joffè E, 1999,  
Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production  
Its relationship with the invasive phenotype.  
Eur J Biochem 263, 295-304

Alizadeh H, Ma D, Berman M, Bellingham D, Comerford SA, Gething MJH et al, 1995,  
Tissue-type plasminogen activator-induced invasion and metastasis of murine melanomas.  
Curr Eye Res 14, 449-458

Alonso DF, Farias EF, Ladeda V, Davel L, Puricelli L, Bal de Kier Joffè E, 1996,  
Effects of synthetic urokinase inhibitors on local invasion and metastasis in a murine  
mammary tumor model.  
Breast Cancer Res Treat 40, 209-223

Arriagada R, Bergman B, Dunant A, LeChevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J, 2004,  
Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell  
lung cancer.  
N Engl J Med 350, 351-360

Auperin A, LePechoux C, Pignon JP, Koning C, Jeremic B, Clamon G, Einhorn L, Ball D,  
Trovo MG, Groen HJ, Bonner JA, LeChevalier T, Arriagada R, 2006,  
Concomitant radio-chemotherapy based on platin compounds in patients with locally advanced  
non-small cell lung cancer (NSCLC): a meta-analysis of individual data from 1764 patients.  
Ann Oncol 17, 473-483

Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C et al, 1998,  
Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and  
vascularisation.  
Nat Med 4, 923-928

Banke IJ, Arlt MEJ, Pennington C, Kopitz Ch, Steinmetzer T, Schweinitz A, Gansbacher B,  
Quigley JP, Edwards DR, Stürzebecher J, Krüger A, 2003,  
Increase of anti-metastatic efficacy by selectivity- but not affinity-optimization of synthetic  
serine protease inhibitors.  
Biol Chem 384, 1515-1525

Beck L, Jr, D'Amore PA, 1997,  
Vascular development: cellular and molecular regulation.  
FASEB J 11, 365-373

Beck JM, Preston AM, Gyetko MR, 1999  
Urokinase-type plasminogen activator in inflammatory cell recruitment and host defense  
against *Pneumocystis carinii* in mice.  
Infection and Immunity 67, 879-884

Behrendt N, Ploug M, Patthy L, Houen G, Blasi F, Dano K, 1991,  
The legend-binding domain of the cell surface receptor for urokinase-type plasminogen activator.  
J Biol Chem 266, 7842-7847

Bissett D, O'Byrne KJ, von Pawel J, Gatzemeier U, Price A, Nicolson M, Mercier R, Mazabel E, Penning C, Zhang MH, Collier MA, Shepherd FA, 2005,  
Phase III study of matrix metalloproteinase inhibitor prinomastat in non-small-cell lung cancer.  
J Clin Oncol 23, 842-849

Bray F., Guerra Yi M., Parkin D.M., 2003,  
The comprehensive cancer monitoring programme in europe.  
European Journal of Public Health 13, 61-66

Bugge TH, Kombrinck KW, Xiao Q, Holmbäck K, Daugherty CC, Witte DP, Degen JL, 1997,  
Growth and dissemination of lewis lung carcinoma in plasminogen deficient mice.  
Blood 90, 4522-4531

Casslen B, Gustavsson B, Angelin B, Gafvels M, 1998,  
Degradation of urokinase plasminogen activator (UPA) in endometrial stromal cells requires both the UPA receptor and the low-density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor.  
Mol Hum Reprod 4, 585

Chambers AF, Matrisian LM, 1997,  
Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis.  
J Natl Cancer Inst 89, 1260-1270

Champelovier P, Boucard N, Levacher G, Simon A, Seigneurin D, Praloran V, 2002,  
Plasminogen- and colony-stimulating factor-1-associated markers in bladder carcinoma: diagnostic value of urokinase Plasminogen activator receptor and Plasminogen activator inhibitor type-2 using immunocytochemical analysis.  
Urol Res 30, 301-309

Cockett MI, Murphy G, Birch ML, O'Connell JP, Crabbe T, Millican AT, Hart IR, Docherty AJ, 1998,  
Matrix metalloproteinases and metastatic cancer (Review).  
Biochemical Society Symposia 63, 295-313

Colman RW, Pixley RA, Najamunnisa S, et al, 1997,  
Binding of high molecular weight kininogen to human endothelial cells is mediated via a site within domains 2 and 3 of the urokinase receptor.  
J Clin Invest 100, 1481-1487

Conese M, Blasi F, 1995,  
Urokinase/ urokinase receptor system: internalization/degradation of urokinase-serpin complexes: mechanism and regulation.  
Biol Chem Hoppe Seyler 376, 143-155



Danø K, Behrendt N, Brunner N, Ellis V, Ploug M, Pyke C, 1994,  
Fibrinolysis 8, 189-203

Dhanabal M, Jeffers M, Larochele WJ  
Anti-angiogenic therapy as a cancer treatment paradigm.  
Curr Med Chem Anti-Canc Agents 5, 115-130

Donhuijsen, K., 1998,  
Histologisches Malignitätsgrading, Prinzipien, Möglichkeiten und klinische Relevanz.  
Dt Ärztebl 95, A-2391-2395

Douillard JY, Rosell R, DeLena M, Carpagnano F, Ramlau R, Gonzales-Larriba JL, Grodzki T, Pereira JR, Le Groumellec A, Lorusso V, Clary C, Torres AJ, Dahabreh J, Souquet PJ, Astudillo J, Fournel P, Artal-Cortes A, Jassem J, Koubkova L, His P, Riggi M, Hurteloup P, 2006,

Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial.  
Lancet Oncol 7, 719-727

Drings P, 1991,  
Die Chemotherapie des Bronchialkarzinoms In: Drings P, Vogt-Moykopf I (Hrsg.):  
Thoraxtumoren Diagnostik- Staging- gegenwärtiges Therapiekonzept.  
Springer, Berlin, Heidelberg, New York. 219-230

Duffy MJ, 1996,  
Proteases as prognostic markers in cancer.  
Clin Cancer Res, 2, 613-618

Duffy MJ, 2004,  
The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy.  
Curr Pharm Des 10, 39-49

Duffy MJ, Duggan C, 2004,  
The urokinase plasminogen activator system : a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer.  
Clin Biochem 37, 541-548

Eatock MM, Schatzlein A, Kaye SB, 2000,  
Tumor vasculature as a target for anticancer therapy.  
Cancer Treat Rev 26, 191-204

Eatock MM, Schatzlein A, Kaye SB, 2000,  
Tumor vasculature as a target for anticancer therapy.  
Cancer Treat.Rev 26, 191-204

Ebner S, Lenz A, Reider D, Fritsch P, Schuler G, Romani N, 1998,  
Expression of maturation-/migration-related molecules on human dendritic cells from blood and skin.  
Immunology 198, 568-587

Egebald M, Werb Z, 2002,  
New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.  
Nature Rev Cancer 2, 161-174

Erbar P  
Bronchialkarzinom  
In: Erbar (Hrsg.): Onkologie Compact Lehrbuch, Pathophysiologie, Klinik und Therapie  
maligner Tumoren  
Schattauer, 4.Auflage, 2002, 298-310

Ertongur S, Lang S, Mack B, Wosiokowski K, Muehlenweg B, Gires O, 2004,  
Inhibition of the invasion capacity of carcinoma cells by WX-UK 1, a novel synthetic  
inhibitor of the urokinase-type Plasminogen activator system.  
Int J Cancer 110, 815-24

Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczyluk C, Chevreau C,  
Filipek M, Melichar B, Bajetta E, Gorbunova V, Bay JO, Bodrogi I, Jagiello-Gruszfeld A,  
Moore N, AVOREN Trial investigators, 2007,  
Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma : a  
randomised, double-blind phase III trial.  
Lancet 370, 2103-2111

Fichtner I, Tanneberger S, 1987,  
Preoperative (neoadjuvante) chemotherapy in the murine lewis lung carcinoma and possible  
implications for clinical use.  
Anticancer Research 7, 227-233

Finckelstein DM, Ettinger DS, Ruckdeschel JC, 1986,  
Long-term survivors in metastatic non-small-cell lung cancer: an Eastern Cooperative  
Oncology Group Study.  
J Clin Oncol 4, 702-709

Fisher JL, Field CL, Zhou H, Harris TL, Henderson MA, Choong PF, 2000,  
Urokinase Plasminogen activator system gene expression is increased in human breast  
carcinoma and its bone metastases: a comparison of normal breast tissue, non-invasive and  
invasive carcinoma and osseous metastases.  
Breast Cancer Res Treat 61, 1-12

Fleckenstein J, Appold S, Rube Ch, 2006,  
Palliative Radiotherapie beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom.  
Onkologie 12, 780-785

Foekens JA, Peters HA, Look MP, et al., 2000,  
The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients.  
Cancer Res 60, 636-643

Folkman J, 1972,  
Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors.  
Ann.Surg 175, 409-416

- Folkman J, 1995,  
Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease.  
Nat Med 1, 27-31
- Folkman J, 1990,  
What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?  
J Natl Cancer Inst 82, 4-6
- Folkman J, Klagsbrun M, 1987,  
Angiogenic factors.  
Science 235, 442-447
- Folkman J, Shing Y, 1992,  
Angiogenesis.  
J Biol Chem 267, 10931-10934
- Ganesh S, Siene CEM, Heerding MM, Griffioen G, Lamers CBHW, Verspaget HW, 1994,  
Diagnostic relevance of plasminogen activators and their inhibitors in colorectal cancer.  
Cancer Res 54, 4065
- Garcia M, Platet N, Liaudet E, Laurent V, Derocq D, Brouillet JP, Rochefort H, 1996,  
Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis (Review).  
Stem Cells 14, 642-650
- Gargett CE, Rogers PA, 2001,  
Human endometrial angiogenesis.  
Reproduction 121, 181-186
- Gärtner V, Albers, J, Brugger, W, Budbach, W, Duda, S, Friedel, G, Hruska, D, Sökler, M, Uckmann, FP, 1999,  
Bronchialkarzinom, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.  
Schriftreihe „Therapieempfehlungen“ des Interdisziplinären Tumorzentrums Tübingen ISSN 1438-8979, Hrsg.: Interdisziplinäres Tumorzentrum Tübingen am Klinikum der Eberhard-Karls-Universität
- Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, Maluta S, Dalla PP, Caffo O, Barbareschi M, Boracchi P, Marubini E, Pozza F, 1994,  
Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma  
J Clin Oncol 12, 454-466
- Ge Y, Elghetany MT, 2003,  
Urokinase plasminogen activator receptor (CD87): something old, something new.  
Laboratory Hematology 9, 67-71
- Ghannadan M, Baghestanian M, Wimazal F et al., 1998,  
Phenotypic characterization of human skin mast cells by combined staining with toluidine blue and CD antibodies.  
J Invest Dermatol 11, 689-695

- Gorelik E, Segal S, Feldman M, 1980,  
Control of lung metastases progression in mice: role of growth kinetic of 3LL lewis lung carcinoma and host immunity reactivity.  
J Natl Cancer Inst 65, 1257-1264
- Greschus S, Kiessling F, Lichy MP, Moll J, Mueller MM, Savai R, Rose F, Ruppert C, Günther A, Luecke M, Fusenig NE, Semmler W, Traupe H, 2005,  
Potential applications of flat-panel volumetric CT in morphologic and functional small animal imaging.  
Neoplasia 7, 730-740
- Gridelli C, Rossi A, Maione P, Ferrara C, Del Gaizo F, Nicoletta D, Guerriero C, Colantuoni G, 2006,  
Erlotinib in a previously treated advanced non-small cell lung cancer elderly patient: a clinical case.  
Targ Oncol 1, 56-58
- Grøndahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist C, Brunner N, Mouridsen HT, Danø K, Blichert-Toft M, 1993,  
High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis.  
Cancer Res 54, 2513
- Guilbert M, Ferland C, Bosse M, Flammand N, Lavigne S, Laviolette M, 1999,  
5-Oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid induces important eosinophil transmigration through basement membrane components: comparison of normal and asthmatic eosinophils.  
Am J Respir Cell Mol Biol 21, 97-104
- Günzler WA, Steffens GJ, Otting F, Kim SM, Frankus E, Flohé L, 1982,  
The primary structure of high molecular mass urokinase from human urine. The complete amino acid sequence of the A chain.  
Hoppe Seylers Z Physiol Chem 363, 1155-1165
- Guyton DP, Evans DM, Sloan-Stakleff KD, 2000,  
Urokinase Plasminogen activator receptor (uPAR): a potential indicator of invasion for in situ breast cancer.  
Breast J 6, 130-136
- Gyetko MR, Chen G-H, Mc Donald RA, Goodman R, Huffnagle GB, Wilkinson CC, Fuller JA, Toews GB, 1996,  
Urokinase is required for the pulmonary response to *Cryptococcus neoformans*.  
J Clin Invest 97, 1818-1826
- Hammersen F, Endrich B, Messmer K, 1985,  
The fine structure of tumor blood vessels.I. Participation of non endothelial cells in tumor angiogenesis.  
Int J Microcirc Clin Exp 4, 31-43
- Hanahan D, Fokman J, 1996,  
Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.  
Cell 86, 353-364

Herbst R, Johnson DH, Mininberg E, Carbone DP, Henderson T, Kim ES, Blumenschein G, Lee JJ, Liu DD, Truong MT, Hong WK, Tran H, Tsao A, Xie D, Ramies DA, Mass R, Seshagiri S, Eberhard DA, Kelley SK, Sandler A, 2005,  
Phase I/II Trial Evaluating the Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Monoclonal Antibody Bevacizumab in Combination With the HER-1/Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine kinase inhibitor erlotinib for patients with recurrent non-small-cell lung cancer.  
J Clin Oncol 23, 2544-2555

Herth FJF, 2005,  
Frühe Symptome sind selten; Epidemiologie, Symptomatik und Diagnostik des Bronchialkarzinoms.  
Kliniker 34, 202-205

Hidalgo M, Eckhardt SG, 2001,  
Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy  
J Natl Cancer Inst 93, 178-193

Himmele JC, Rabenhorst B, Werner D, 1986,  
Inhibition of lewis lung tumor growth and metastasis by Ehrlich ascites tumor growth in the same host.  
J Cancer Res Clin Oncol 111, 160-165

Hoffmann H, Dienemann H, Passlick B, 2006,  
Chirurgische Therapie des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms.  
Onkologie 12, 728-736

Holmes EC, 1994,  
Surgical adjuvant therapy for stage II and III adenocarcinoma and large-cell undifferentiated carcinoma.  
Chest 106 (Suppl.VI), 293-296

Holmes EC, Gail M, 1986,  
Surgical adjuvant therapy for stage II and III adenocarcinoma and large-cell undifferentiated carcinoma.  
J Clin Oncol 4, 710-715

Høyer-Hansen G, Behrendt N, Ploug M, Danø K, Preissner KT, 1997,  
The intact urokinase receptor is required for efficient vitronectin binding: receptor cleavage prevents ligand interaction.  
FEBS Lett 420, 79-85

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Cartwright T et al, 2003,  
Bevacizumab (a monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor) prolongs survival in first-line colorectal cancer (CRC): results of a phase III trial of Bevacizumab in combination with bolus IFL (irinotecan, 5-fluorouracil, Leucovorin) as first-line therapy in subjects with metastatic CRC (abstract).  
Proc Am Soc Clin Oncol 22, 3646

International Union Against Cancer 1997 (UICC)  
TNM Klassifikation maligner Tumoren, 5.Auflage, S.89-95

Jahn I, Jöckel KH, Ahrens W, Drescher K, Müller KM, Witzko KH, 1990,  
Results of the epidemiology of lung cancer in females.  
Pneumologie 44, 14-23

John A, Tuszynski G, 2001,  
The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis.  
Pathol Oncol Research 7, 14-23

Kabbinavar F, Hurwitz H, Fehrenbacher L et al, 2003,  
Randomized trial comparing bevacizumab plus 5-FU/leucovorin with 5-FU/leucovorin alone  
in patients with metastatic colorectal cancer.  
J Clin Oncol 21, 60-5

Kahari VM, Saarialho-Kere U, 1999,  
Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor growth and invasion (Review).  
Annals of Medicine 31, 34-45

Kalemkerian GP, Ou X, Adil MR, Rosati R, Khouli MM, Madan SK, Pettit GR, 1999,  
Activity of dolastatin 10 against small-cell lung cancer in vitro and in vivo: induction of  
apoptosis and bcl-2 modification.  
Cancer Chemother Pharmacol 43, 507-515

Kelsey CR, Werner-Wasik M, Marks LB, 2006,  
Stage III Lung cancer: two or three modalities? The continued role of thoracic radiotherapy.  
Oncology 20, 1210-1219; discussion 1219, 1223, 1225

Kiessling F, Greschus S, Lichy MP, Bock M, Fink C, Vosseler S, Moll J, Mueller MM,  
Fusenig NE, Traupe H, Semmler W, 2004,  
Volumetric computed tomography (VCT): a new technology for non-invasive, high-resolution  
monitoring of tumor angiogenesis.  
Nat Med 10, 1133-1138

Kobayashi H, Gotoh J, Shinohara H, Moniwa N, Terao T, 1994,  
Inhibition of the metastasis of lewis lung carcinoma by antibody against urokinase-type  
plasminogen activator in the experimental and spontaneous metastasis model.  
Thromb Haemost 71, 474-480

Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF, 2000,  
Unraveling the role of proteases in cancer (Review).  
Clinica Chimica Acta 291, 113-135

Konecny G, Untch M, Pihan A, Kimmig R, Gropp M, Stieber P, Hepp H, Slamon D, Pegram  
M, 2001,  
Association of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor with disease progression  
and prognosis in ovarian cancer.  
Clin Cancer Res 7, 1743-1749

Künzel S, Schweinitz A, Reissmann S, Stürzebecher J, Steinmetzer T, 2002,  
4-amidinobenzylamine-based inhibitors of urokinase.  
Bioorg Med Chem Lett 12, 645-648

Laack E, Hossfeld DK, 2000,  
Therapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms.  
Dt Ärztebl 97, A-373-384

Lad T, 1994,  
The comparison of CAP chemotherapy and radiotherapy to radiotherapy alone for resected lung cancer with positive margin or involved highest sampled paratracheal node (stage IIIA).  
Chest 106 (Suppl.VI), 302-306

Laemmli UK, 1970,  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
Nature 227, 680-5

Lah TT, Kos J, 1998,  
Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis.  
Biol Chem 379, 125-130

Lauffenburger DA, Horwitz AF, 1996,  
Cell migration: a physically integrated molecular process.  
Cell 84, 359-369

Lee SL, Dickson RB, Lin CY, 2000,  
Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease.  
J Biol Chem 275, 36720-36725

Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson, WG, 1991,  
Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation.  
Cell 64, 327-336

Liu G, Shuman MA, Cohen RL, 1995,  
Co-expression of urokinase, urokinase-receptor and PAI-1 is necessary for optimum invasiveness of cultured lung cancer cells.  
Int J cancer 60, 501-506

Loskutoff DJ, Curriden SA, Hu G, Deng G, 1999,  
Regulation of cell adhesion by PAI.  
APMIS 107, 54-61

Ma D, Gerard RD, Li X-Y, Alizadeh H, Nierderkorn JY, 1997,  
Inhibition of metastasis of intraocular melanomas by adenovirus-mediated gene transfer of plasminogen activator inhibitor type-1 in an athymic mouse model.  
Blood 90, 2738-2746

Macha HN, 2003,  
Bronchial carcinoma. Epidemiology, diagnosis and therapy.  
Internist 44 Suppl 1, 28-34

- Matthews M, 1976,  
Problems in morphology and behaviour of bronchopulmonary malignant disease.  
In: Israel I, Chahanian P (ed.): Lung Cancer: Natural history, prognosis and therapy.  
Academic Press, 23-62
- Matthews M, Gordon P, 1977,  
Morphology of pulmonary and pleural malignancies.  
In: Strauss M (ed): Lung Cancer Clinical Diagnosis and Treatment  
Grune and Satton, New York 245-253
- McKinnell RG, Parchment RE, Perantoni AO, Pierce GB, 1998,  
„The biological Basis of Cancer“, Book Ed., Cambridge University Press
- Memarzadeh S, Kozak KR, Chang L et al., 2002,  
Urokinase plasminogen activator receptor: prognostic biomarker for endometrial cancer.  
Proc Natl Acad Sci 99, 10647-10652
- Michaud S, Gour BJ, 1998,  
Cathepsin B inhibitors as potential anti-metastatic agents (Review).  
Expert Opinion on Therapeutic Patents 8: 645-672
- Mohanam S, Gladson CL, Rao CN, Rao JS, 1999,  
Biological significance of the expression of urokinase-type plasminogen activator receptors  
(uPARs) in brain tumors.  
Front Biosci 4, D178-D187
- Montuori N, Carriero MV, Salzano S, Rossi G, Ragno P, 2002,  
The cleavage of the urokinase receptor regulates its multiple functions.  
J Biol Chem 277, 46932-46939
- Morr H, 1995,  
Tumoren  
In: Fabel H. (Hrsg.): Pneumologie  
Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore 1995: 519-551
- Mossmann BT, Bignon J, Corn M, Eaton A, Gee JBL, 1990,  
Asbestos: scientific developments and implications for public policy.  
Science 247, 294-301
- Mossmann BT, Gee JBL, 1989,  
Asbestos related diseases.  
N Eng J Med 320, 1721-1730
- Mossmann BT, Klein G, zur Hausen H, 2004,  
Modern criteria to determine the etiology of human carcinogens.  
Seminars in Cancer Biology 14, 449-452
- Mountain CF, 1986,  
A new international staging system for lung cancer.  
Chest 89, 225-233



Müller KM, 1987,  
Pathologische Anatomie der Lungentumoren.  
In: Frommhold W., P.Gerhard: Tumoren der Lunge  
Thieme, Stuttgart 1987, 16-28

Müller KM, Theile A, 1994,  
Lungentumoren.  
Internist 35, 710-723

Müller MR  
Das Bronchialkarzinom  
Skript „Der Respirationstrakt“, Hrsg.: Block LH, Sitzwohl C, Zimpfler M  
[www.anaesthesiologie.at/basf/skript/075-089-Block12.pdf](http://www.anaesthesiologie.at/basf/skript/075-089-Block12.pdf)

Murota SI, Onodera M, Morita I, 2000,  
Regulation of angiogenesis by controlling VEGF receptor.  
Ann.NY Acad Sci 902, 208-212

Nakata S, Ito K, Fujimori M et al., 1998,  
Involvement of vascular endothelial growth factor and urokinase-type plasminogen activator  
receptor in microvessel invasion in human colorectal cancers.  
Int J Cancer 79, 179-186

Nielsen LS, Kellerman GM, Behrendt N, Picone R, Dano K, Blasi F, 1988,  
A 55,000-65,000 Mr receptor protein for urokinase type plasminogen activator: identification  
in human tumor cell lines and partial purification.  
J Biol Chem 263, 2358-2363

Noel A, Gilles C, Bajou K, Devy L, Kebers F, Lawalle JM, Maquoi E, Munaut C, Remacle A,  
Foidart JM, 1997,  
Emerging roles for proteinases in cancer.  
Invasion Metastasis 17, 221-239

Nykjaer M, Conese EI, Christensen D, Olson O, Cremona J, Gliemann J, Blasi F, 1997,  
Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA serpin complexes.  
EMBO J 16, 2610

O'Connell JP, Kris MG, Gralla RJ et al, 1986,  
Frequency and prognostic importance of pretreatment clinical characteristics in patients with  
advanced non-small-cell lung cancer treated with combination chemotherapy.  
J Clin Oncol 4, 1604-1614

Offersen BV, Riisbro R, Knoop A, Brüner N, Overgaard J, Danish Breast Cancer  
Cooperative Group (DBCG) Tumor Biology Committee, 2007,  
Lack of association between level of plasminogen activator inhibitor-1 and estimates of tumor  
angiogenesis in early breast cancer.  
Acta Oncol 46, 782-791

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J, 1994,  
Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastasis by lewis lung carcinoma.  
Cell 79, 315-325

Osann KE, 1998,  
Epidemiology of lung cancer.  
Curr Opin Pulm Med 4, 198-204

Palumbo JS, Potter JM, Kaplan LS, Talmage K, Jackson DG, Degen JL, 2002,  
Spontaneous hematogenous and lymphatic metastasis, but not primary tumor growth or angiogenesis, is diminished in fibrinogen-deficient mice.  
Cancer Research 62, 6966-6972

Pappot H, Høyer-Hansen G, Rønne E, Hansen HH, Brüner N, Danø K, Grøndahl-Hansen J, 1997,  
Elevated plasma levels of urokinase plasminogen activator receptor in non-small cell lung cancer patients.  
Eur J cancer 33, 867-72

Pedersen H, Brüner N, Francis D, Osterlind K, Rønne E, Høi Hansen H, Danø K, Grøndahl-Hansen J, 1994,  
Prognostic impact of urokinase, urokinase receptor, and type 1 plasminogen activator inhibitor in squamous and large cell lung cancer tissue.  
Cancer Res 54, 4671-4675

Persönliche Mitteilung von Herrn Dr. Helmut Giersiefen (Firma Curacyte) anlässlich einer Projektbesprechung in Gießen, Februar 2005

Pfister DG, Johnson DH, Azzoli CG, Sause W, Smith TJ, Baker S Jr, Olak J, Stover D, Strawn JR, Turrisi AT, Somerfield MR, 2004,  
American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003.  
J Clin Oncol 22, 330-353

Plesner T, Behrendt N, Ploug M, 1997,  
Structure, function and expression on blood and marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR.  
Stem Cells 15, 398-408

Plesner T, Ralfkiaer E, Wittrup M et al., 1994,  
Expression of the receptor for urokinase-type plasminogen activator in normal and neoplastic blood cells and hematopoietic tissue.  
Am J Clin Pathol 102, 835-841

Ploug M, Ellis V, Dano K, 1994,  
Ligand interaction between urokinase-type plasminogen activator and its receptor probed with 8-anilino-1-naphthalenesulfonate. Evidence for a hydrophobic binding site exposed only on the intact receptor.  
Biochemistry 33, 8991-8997

Plow EF, Freany DE, Plescia J, Miles LA, 1986,  
The plasminogen system and cell surfaces : evidence for plasminogen and urokinase receptors  
on the same cell type.  
J Cell Biol 103, 2411-2420

Quinlan TR, Marsh JP, Janssen YMW, Born PA, Mossmann BT, 1994,  
Oxygen radicals and asbestos-mediated disease.  
Environ Health Perspect 102 (Suppl 10), 107-110

Rabbani SA, Gladu J, 2002,  
Urokinase receptor antibody can reduce tumor volume and detect the presence of occult tumor  
metastases in vivo.  
Cancer Research 62, 2390-2397

Ragno P, Montuori B, Covelli B, Hoyer-Hansen G, Rossi G, 1998,  
Differential expression of a truncated form of the urokinase-type plasminogen-activator  
receptor in normal and tumor thyroid cells.  
Cancer Res 58, 1315

Ragno P, Montuori N, Rossi G, 1995,  
Urokinase type plasminogen activator/type-2 plasminogen-activator inhibitor complexes are  
not internalized upon binding to the urokinase-type plasminogen-activator receptor in THP-1  
cells. Interaction of urokinase-type plasminogen activator/type-2 plasminogen-activator  
inhibitor complexes with the cell surface.  
Eur J Biochem 233, 514

Rashidi B, Yang M, Jiang P, Baranov E, An Z, Wang X, Moossa AR, Hoffman RM, 2000,  
A highly metastatic lewis lung carcinoma orthotopic green fluorescent protein model.  
Clinical & Experimental Metastasis 18, 57-60

Reuning U, Magdolen V, Wilhelm O, Fischer K, Lutz V, Graeff H, Schmitt M, 1998,  
Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and  
metastasis (review).  
Int J Oncol 13, 893-415

Resnati M, Pallavicini I, Wang JM, Oppenheim J, Serhan CN, Romano M, Blasi F, 2002,  
The fibrinolytic receptor for urokinase activates the G protein-coupled chemotactic receptor  
FPRL1/LXA4R.  
Proc Natl Acad Sci USA 99, 1359-64

Riede U-N, Costabel U  
Bronchialkarzinome  
In: Riede, Schaefer (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pathologie  
4.Auflage  
Thieme, 1995, 648-653

Riisbro R, Christensen IJ, Pironen T et al, 2002,  
Prognostic significance of soluble urokinase plasminogen activator receptor in serum and  
cytosol of tumor tissue from patients with primary breast cancer.  
Clin Cancer Res 8, 1132

- Risau W, 1998,  
Development and differentiation of endothelium.  
Kidney Int Suppl 67, S3-S6
- Rocheffort H, Liaudet-Coopman E, 1999,  
Cathepsin D in cancer metastasis: a protease and a ligand (Review).  
APMIS 107, 86-95
- Rocheffort H, Liaudet E, Garcia M, 1996,  
Alterations and role of human cathepsin D in cancer metastasis (Review).  
Enzyme& Protein 49, 106-116
- Rockway TW, Nienaber V, Giranda VL, 2002,  
Inhibitors of the protease domain of urokinase-type plasminogen activator.  
Curr Pharm Des 8, 2541-2558
- Ronne E, Pappot H, Grondahl-Hansen J, Hoyer-Hansen G, Plesner T, Hansen NE, Dano K, 1995,  
The receptor for urokinase plasminogen activator is present in plasma from healthy donors and elevated in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria.  
Br J Haematol 89, 576-581
- Sandler A, Herbst R, 2006,  
Combining target agents : blocking the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor pathways.  
Clin Cancer Res 12(14 Suppl)
- Sandler AB, Johnson DH, Herbst RS, 2004,  
Anti-vascular endothelial growth factor monoclonals in non-small cell lung cancer.  
Clin Cancer Res 10, 4258s-4262s (Suppl.)
- Savai R, Wolf JC, Greschus S, Eul BG, Schermuly RT, Hänze J, Voswinkel R, Langheinrich AC, Grimminger F, Traupe H, Seeger W, Rose F, 2005,  
Analysis of tumor vessel supply in lewis lung carcinoma in mice by fluorescent microsphere distribution and imaging with micro- and flat-panel computed tomography.  
Am J Pathol 167, 937-946
- Schaake-Koning C, van de Bogaert W, Dalesio O et al, 1992,  
Effects of concomitant cisplatin and radiotherapy on inoperable non-small cell lung cancer.  
N Engl J Med 326, 524-530
- Schalhorn A, 2002,  
Moderne Chemotherapie beim Bronchialkarzinom.  
Internist 43, 416-430
- Schmitt M, Wilhelm OG, Reuning U, Krüger A, Harbeck N, Lengyel E, Graeff H, Gänsbacher B, Kessler H., Bürgle M, Stürzebecher J, Sperl S, Magdolen V, 2000,  
Fibrinol Proteol 14, 114-132

Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reuning U, Ulm K, Höfler H, Jänicke F, Graeff H, 1997,  
Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy.  
Thromb Haemost 78, 285-296

Schütte W, 2005,  
Palliative Chemotherapie des fortgeschrittenen NSCLC.  
Pneumologie 2, 260-267

Schwartz AG, Rothrock M, Yang P, Swanson GM, 1999,  
Increased cancer risk among relatives of nonsmoking lung cancer cases.  
Genetic Epidemiology 17, 1-15

Schwartz AG, Yang P, Swanson GM, 1996,  
Familial risk of lung cancer among nonsmokers and their relatives.  
Am J Epidemiol 144, 554-562

Schweinitz A, Steinmetzer T, Banke I, Arlt MJE, Stürzebecher A, Schuster O, Geissler A, Giersiefen H, Zeslawska E, Jacob U, Krüger A, Stürzebecher J, 2004,  
Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastatic agents.  
J Biol Chem 279, 33613-33622

Seeger W, 1999,  
Pneumologie.  
Internist 40, 391-400

Senn HJ, Drings P, Glaus A, Jungi WF, Pralle HB, Sauer R, Schlag PM  
Bronchialkarzinom.  
In: Sturm A, Largiader F, Wicki O (Hrsg.): Checkliste Onkologie  
5. Auflage, Thieme, 2001, 245-255

Setyono-Han B, Stürzebecher J, Schmalix WA, Muehlenweg B, Sieuwerts AM, Timmermans M, Magdolen V, Schmitt M, Klijn JG, Foekens JA, 2005,  
Suppression of rat breast cancer metastasis and reduction of primary tumor growth by the small synthetic urokinase inhibitor WX-UK1.  
Thromb Haemost 93, 779-786

Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsch V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van Kooten M, Dediu M, Findlay B, Tu D, Johnson D, Bezjak A, Clark G, Santabarbara P, Seymour L, 2005,  
Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer.  
N Engl J Med 353, 123-132

Sier CF, Sidenius N, Mariani A, Aletti G, Agape V, Ferrari A, Casetta G, Stephens RW, Brunner N, Blasi F, 1999,  
Presence of urokinase-type plasminogen activator receptor in urine of cancer patients and its possible clinical relevance.  
Lab Invest 79, 717-722

Sier CF, Stephens R, Bizik J, Mariani A, Bassan M, Pedersen N, Frigerio L, Ferrari A, Dano K, Brunner N, Blasi F, 1998,  
The level of urokinase-type plasminogen activator receptor is increased in serum of ovarian cancer patients.  
Cancer Res 58, 1843-1849

Skriver L, Larsson LI, Keiklberg V, Nielsen LS, Andreassen PB, 1984,  
Immunocytochemical localization of urokinase-type plasminogen activator in lewis lung carcinoma.  
J Cell Biol 99, 752

Sledge GW Jr, Miller KD, 2002,  
Angiogenesis and antiangiogenic therapy.  
Curr Probl Cancer 26, 1-60

Sloane BF, 1990,  
Cathepsin B and cystatins: evidence for a role in cancer progression (Review).  
Seminars in Cancer Biology 1, 137-152

Sørensen JB, Badsberg JH, Olsen J, 1989,  
Prognostic factors in inoperable adenocarcinoma of the lung: A multivariate regression analysis of 259 patients.  
Cancer Research 49, 5748-5754

Soresi E, Clerici M, Borghini U et al, 1994,  
A randomized trial comparing radiation therapy versus radiation therapy plus cisidichlorodiammine platinum (II) in the treatment of locally advanced non-small cell lung cancer: Follow-up at 5 yr. Cuneo Lung Cancer Study Group, first international lung cancer conference: Non-small cell lung cancer management- open questions and controversies, October 7-8, Alba, Cuneo, Italy

Soresi E, Clerici M, Grilli R et al, 1998,  
A randomized clinical trial comparing radiation therapy versus radiationtherapy plus cisplatin in the treatment of locally advanced non-small cell lung cancer.  
Semin Oncol 15 (Suppl.VII), 20-25

Sperl S, Jacob U, Arroyo de Prada N, Stürzebecher J, Wilhelm OG, Bode W, Magdolen V, Huber R, Moroder L, 2000,  
(4-Aminomethyl)phenylguanidine derivatives as nonpeptidic highly selective inhibitors of human urokinase.  
PNAS 97, 5113-5118

Stefansson S, Lawrence DA, 1996,  
The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin.  
Nature 383, 441-443

Steinmetzer T, 2003,  
Synthetic urokinase inhibitors as potential antitumor drugs.  
IDrugs 6, 138-46

Stepanova VV, Tkachuk VA, 2002,  
Urokinase as a multidomain protein and polyfunctional cell regulator.  
Biochemistry (Moscow) 67, 109-118

Stephens RW, Pedersen AN, Nielsen HJ, Hamers MJ, Høyer-Hansen G, Rønne E, Dybkjaer E, Danø K, Brüner N, 1997,  
ELISA determination of soluble urokinase receptor in blood from healthy donors and cancer patients.  
Clin Chem 43, 1868-76

Stout R, Barber P, Burt P, Hopwood P, Swindell R, Hodgetts J, Lomax L, 2000,  
Clinical and quality of life outcomes in the first United Kingdom randomized trial of endobronchial brachytherapy (intraluminal radiotherapy) vs. external beam radiotherapy in the palliative treatment of inoperable non-small cell lung cancer.  
Radiother Oncol 56, 323-7

Strauss GM, 2005,  
Adjuvant chemotherapy of lung cancer: methodologic issues and therapeutic advances.  
Hematol Oncol Clin North Am 19, 263-281

Sugiura K, Stock CC, 1955,  
Studies in a tumor spectrum.III. The effect of phosphoramides on the growth of a variety of mouse and rat tumors.  
Cancer Res 15, 38-51

Sunder-Plassmann L, 1998,  
Stellenwert der Operation bei kleinzelligem Bronchialkarzinom.  
Onkologie 4, 1035-1038

Swiss prot  
<http://ca.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl>  
Aufrufdatum : 30.03.2005

Tannø S, Ohsaki Y, Nakanishi K, Toyoshima E, Kikuchi K, 2004,  
Human small cell lung cancer cells express functional VEGF receptors, VEGFR-2 and VEGFR-3.  
Lung Cancer 46, 11-9

Thomas C, Gebert G, von Wickert P  
Lungentumoren.  
In: Thomas (Hrsg.): Spezielle Pathologie  
Schattauer, 1996, 138-145

Vasalli JD, Baccino D, Belin DA, 1985,  
A cellular binding site for Mr 55,000 form of the human plasminogen activator urokinase.  
J Cell Biol 100, 86-92

Vogt- Moykopf I, Krysa S, Probst G, Bülzebruck H, Schirren J, Branscheid D, Anyanwu E, Bauer E, Stoelben E, 1991,  
Die chirurgische Therapie des Bronchialkarzinoms.  
In: Drings P, Vogt-Moykopf I (Hrsg.) Thoraxtumoren Diagnostik- Staging- gegenwärtiges  
Therapiekonzept.  
Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1991: 170-186

Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P, 1960,  
Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Providence.  
Br J Ind Med 17, 260-271

Webb DJ, Thomas KS, Gonias SL, 2001,  
Plasminogen activator inhibitor 1 functions as a urokinase response modifier at the level of  
cell signalling and thereby promotes MCF-7 cell growth.  
J Cell Biol 152, 741-752

Wei Y, Lukashev M, Simon DI, Bodary SC, Rosenberg S, Doyle MV, Chapman HA, 1996,  
Regulation of integrin function by the urokinase receptor.  
Science 273, 1551-1555

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J, 1991,  
Tumor angiogenesis and metastasis –correlation in invasive breast carcinoma.  
N Engl J Med, 324, 1-8

Werle B, Kotzsch M, Lah TT, Kos J, Gabrijelcic-Geiger D, Spiess E, Schirren J, Ebert W,  
Fiehn W, Luther T, Magdolen V, Schmitt M, Harbeck N, 2004,  
Cathepsin B, plasminogenactivator-inhibitor (PAI-1) and plasminogenactivator-receptor  
(uPAR) are prognostic factors for patients with non-small cell lung cancer.  
Anticancer Res 24, 4147-4161

Wood JM, Bold G, Buchdunger E, Cozens R, Ferrari S, Frei J, Hofmann F, Mestan J, Mett H,  
O'Reilly T, Persohn E, Rösel J, Schnell C, Stover D, Theuer A, Towbin H, Wenger F,  
Woods-Cook K, Menrad A, Siemeister G, Schirner M, Thierauch KH, Schneider MR, Dreus  
J, Martiny-Baron G, Totzke F, Marmè D, 2000,  
PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor  
receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and  
tumor growth after oral administration.  
Cancer Research 60, 2178-2189

Yang JC, Haworth L, Steinberg SM, Rosenberg SA, Novotny W, 2002,  
A randomized double-blind placebo-controlled trial of bevacizumab (anti-VEGF antibody)  
demonstrating a prolongation in time to progression in patients with renal cell cancer.  
Proc Am Soc Clin Oncol 21 (Suppl.1), 15

Zucker S, Cao J, Chen WT, 2000,  
Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment.  
Oncogene 19, 6642-6650



## 8. Anhang

### 8.1. Rohdaten zum Primärtumorwachstum

(angegeben ist das Tumolvolumen in mm<sup>3</sup>)

Wildtyp-Mäuse

NaCl:

	Tag 7	Tag 9	Tag 11	Tag 13	Tag 15	Tag 17	Tag 19
<b>Maus 1</b>	238,20	796,14	983,02	2146,04	3256,15	3607,86	3650,96
<b>Maus 2</b>	371,02	539,88	942,96	1419,97	1680,91	3680,66	4423,36
<b>Maus 3</b>	109,41	317,53	591,93	2622,36	3061,48	4134,33	3663,87
<b>Maus 4</b>	147,27	235,90	295,15	690,64	1747,88	2240,51	
<b>Maus 5</b>	97,93	253,21	331,11	784,49	942,41	1235,90	1277,33
<b>Maus 6</b>	185,87	297,31	927,15	1429,12	1684,07	3628,10	5927,95
<b>Maus 7</b>	382,60	519,56	703,76	999,12	1308,66	2976,62	3274,44
<b>Maus 8</b>	43,91	119,44	255,58	528,75	581,48	696,93	1602,74
<b>Maus 9</b>	223,68	1502,45	1513,09	2783,83	3497,92	4154,58	5186,53
<b>Maus 10</b>	358,98	601,40	1035,03	1970,53	2076,16	3472,87	4283,02
<b>Maus 11</b>	147,68	469,29	918,18	1457,94	2269,54	3758,17	4381,27
<b>Maus 12</b>	123,71	882,19	1164,24	1695,51	3222,19	3724,56	3858,98
<b>Maus 13</b>	141,95	522,08	837,96	1863,07	2668,34	4634,85	4885,16
<b>Maus 14</b>	40,71	119,60	194,61	423,93	683,73	1292,81	2157,04
<b>Maus 15</b>	218,88	365,35	579,88	1528,60	1978,50	3025,02	4111,49
<b>Maus 16</b>	199,60	592,03	1400,05	1436,12	1492,00	1935,45	2903,19
<b>Maus 17</b>	114,05	323,79	1069,54	1339,14	2285,61	4210,16	5734,47
<b>Maus 18</b>	85,32	198,29	1179,74	1500,96			
<b>Maus 19</b>	124,88	214,71	754,92	818,77	1199,18	1755,62	1922,87
<b>Maus 20</b>	154,71	793,43	1287,30	1366,75	2471,35	2772,85	4009,86
<b>Maus 21</b>	240,02	258,36	455,87	1171,30	1245,61	1449,80	2078,65
<b>Maus 22</b>	246,51	621,70	898,40	1181,39	1646,94	2026,08	2199,81
<b>Maus 23</b>	41,98	239,16	297,66	499,05	993,41	2746,84	3070,69
<b>Maus 24</b>	93,58	386,43	1021,99	1245,19	2056,83	1031,42	1731,38
<b>Maus 25</b>	64,50	145,49	366,48	553,28	960,14	1884,41	2959,38
<b>Maus 26</b>	192,54	276,48	509,12	1474,74	1604,42	2534,29	3401,04
<b>Maus 27</b>	181,73	294,77	505,95	879,84	1870,84	2837,45	3099,46
<b>Maus 28</b>	97,99	207,07	409,56	554,20	856,31	1450,96	2146,16
<b>Maus 29</b>	234,39	522,68	774,01	928,29	1014,50		
<b>Maus 30</b>	59,48	131,57	321,87	540,58	581,69	1020,75	1117,55
<b>Maus 31</b>	34,19	103	164,33	225,28	670,47		
<b>Maus 32</b>	81,27	361,83	1529,93	2763,56	3867,17	4909,72	5860,1
<b>Maus 33</b>	77,57	170,32	523,76	1271,59	2495,46	2644,5	3249,09
<b>Maus 34</b>	29,11	43,13	535,84	1360,02	1444,99	2026,06	2813,29
<b>Maus 35</b>	108,74	184,33	262,38	875,86	1928,14	2001,57	2167,37
<b>Maus 36</b>	42,27	120,67	518,34	610,65	1291,64	1639,48	2061,07
<b>Maus 37</b>	112,76	226,94	875,27	1787,14	2099,47	2798,56	2842,5
<b>Maus 38</b>	106,81	215,16	1284,31	2152,92	2228,93	3233,68	3509,8
<b>Maus 39</b>	38,61	110,34	188,26	592,01	969,13	1079,14	1108,67
<b>Maus 40</b>	25,73	54,22	215,36	370,1	777,49	975,01	984,99

**Stereoisomer:**

	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 9</b>	<b>Tag 11</b>	<b>Tag 13</b>	<b>Tag 15</b>	<b>Tag 17</b>	<b>Tag 19</b>
<b>Maus 1</b>	106,80	380,78	887,73	1763,19	1998,23	3538,05	3891,85
<b>Maus 2</b>	494,82	572,05	1003,02	2114,20	3946,75	5873,33	5934,48
<b>Maus 3</b>	146,41	377,73	446,98	1040,82	1793,77	2939,33	3763,08
<b>Maus 4</b>	333,71	415,88	1068	1570,59	1637,53	2189,32	3523,11
<b>Maus 5</b>	154,95	386,14	763,36	1306,92	1593,18	2599,28	3040,46
<b>Maus 6</b>	341,40	614,58	809,56	1451,7	2467,86	3305,14	4323,9
<b>Maus 7</b>	134,64	175,18	329,3	709,26			
<b>Maus 8</b>	102,71	340,22	641,82	1982,78	2403,83	2590,58	3928,64
<b>Maus 9</b>	66,18	112,16	142,37	533,64	1651,17	1779,04	2929,28
<b>Maus 10</b>	252,37	431,65	946,34	1414,93	1694,29	2052,82	
<b>Maus 11</b>	103,08	312,93	1325,79	2725,4	3150,43	5326,63	5347,57
<b>Maus 12</b>	33,7	141,76	199,48	508,34	725,6	981,3	1286,29
<b>Maus 13</b>	86,56	219,48	240,43	736,51	1207,38	1793,25	2362,52
<b>Maus 14</b>	86,92	195,42	283,31	554,32	1248,72	1310,44	1888,11
<b>Maus 15</b>	168,7	554,26	1482,28	1885,94	2253,57	2542,28	3582,6
<b>Maus 16</b>	245,53	1050,32	1827,11	2036,59	2403,97	2475,47	2929,56
<b>Maus 17</b>	100,71	669,96	957,61	1934,21	2572,47	2723,51	3061,64
<b>Maus 18</b>	212,51	697,72	1520,12	1767,18	2576,09	2723,85	3200,79
<b>Maus 19</b>	157,98	1006,5	1513,17	1832,49	1854,54	2903,5	3509,47
<b>Maus 20</b>	109,35	882,98	1815,27	2172,07	2523,87	3410,31	4055,5

**10 mg/kg:**

	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 9</b>	<b>Tag 11</b>	<b>Tag 13</b>	<b>Tag 15</b>	<b>Tag 17</b>	<b>Tag 19</b>
<b>Maus 1</b>	120,19	302,58	573,83	2049,81	2424,23	4534,02	
<b>Maus 2</b>	143,69	276,95	527,19	598,65	729	2068,14	2280,26
<b>Maus 3</b>	313,47	700,3	836,18	1670,76	3316,55	3474,55	4122,35
<b>Maus 4</b>	181,78	359,08	638,49	873,38	885,03	1268,57	
<b>Maus 5</b>	257,81	331,22	403,73	617,01	646,87	726,66	901,26
<b>Maus 6</b>	91,3	315,09	286,76	515,81	1518,59	1868,41	2460,7
<b>Maus 7</b>	207,54	291,04	308,17	440,9	1300,39	2070,74	3409,06
<b>Maus 8</b>	66,16	147,72	592,72	886,26	1153,48	1396,34	2089,83
<b>Maus 9</b>	183,42	474,72	484,44	797,7	1794,19	3112,6	3456,25
<b>Maus 10</b>	139,41	183,7	281,23	554,46	1551,35	1597,44	2510,28
<b>Maus 11</b>	110,39	367,73	639,15	752,48	1622,16	1906,02	2662,37
<b>Maus 12</b>	147,84	167,08	908,45	1171,38	1750,45		
<b>Maus 13</b>	67,58	73,99	157,13	188,61	243,14	808,03	994,55
<b>Maus 14</b>	191,87	342,47	690,64	1481,35	1524,85	2268,12	2758,13
<b>Maus 15</b>	95,18	819,96	884,52	1064,09	2152,27	3553,83	4431,38
<b>Maus 16</b>	84,59	379,83	1274,86	1790,62	2327,1	3101,99	4437,83
<b>Maus 17</b>	74,35	672,73	1059,27	2024,93	2665,04	2712,78	3720,32
<b>Maus 18</b>	80,72	469,69	1099,39	1283,66	1449,1	1616,46	3268,11
<b>Maus 19</b>	115,75	452,45	680,74	1010,15	2220,34	2330,96	2617,93
<b>Maus 20</b>	244,62	926,79	1315,23	1333,74	1461,13	1803,76	2534,66

**25 mg/kg:**

	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 9</b>	<b>Tag 11</b>	<b>Tag 13</b>	<b>Tag 15</b>	<b>Tag 17</b>	<b>Tag 19</b>
<b>Maus 1</b>	273,44	763,56	1026,39	2297,2	3142,78	3973,42	4330,28
<b>Maus 2</b>	219,88	587,95	691,72	814,69	1080,78	2097	2856,74
<b>Maus 3</b>	187,74	507,51	924,68	1666,22	1913,19	3626,87	3644,01
<b>Maus 4</b>	300,76	626,99	921,04	1561,51			
<b>Maus 5</b>	102,34	314,89	519,67	927,59	1113,65	2257,35	2909,47
<b>Maus 6</b>	297,74	400,86	1059,24	2368,84	2426,66	2661,58	3905,56
<b>Maus 7</b>	156,78	330,96	1103,3	1846,39	3798,2	3851,87	
<b>Maus 8</b>	100,13	584,28	1223,33	1319,14	1885,48	1926,49	2468,04
<b>Maus 9</b>	498,84	660,74	1402,54	1528,92	2205,05	2372,3	
<b>Maus 10</b>	218,69	305,84	656,92	1251,71	1860,44	1913,32	3469,61
<b>Maus 11</b>	103,53	184,78	762,36	1510,44	1611,42	1745,88	2205,87
<b>Maus 12</b>	33,26	100,36	354,01	477,18	700,38	1461,99	1671,38
<b>Maus 13</b>	84,93	158,18	573,36	1236,58	1998,71	3109,75	3422,84
<b>Maus 14</b>	80,7	264,44	889,84	1158,24	1381,93	1931,54	3186,86
<b>Maus 15</b>	105,25	439,69	1138,34	1689,27	2026,77	2083,4	4479,35
<b>Maus 16</b>	59,4	320,37	524,22	739,84	812,47	842,91	1439,32
<b>Maus 17</b>	48	160,35	634,5	779,89	918,28	1294,58	1868,52
<b>Maus 18</b>	110,97	302,53	694,39	950,04	1237,06	1481,58	2193,37
<b>Maus 19</b>	113,43	632,18	909,78	956,19	1300,22	2218,5	2915,16
<b>Maus 20</b>	208,1	417,13	1052,32	1268,8	2519,22	2588,91	2684,05

**100 mg/kg:**

	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 9</b>	<b>Tag 11</b>	<b>Tag 13</b>	<b>Tag 15</b>	<b>Tag 17</b>	<b>Tag 19</b>
<b>Maus 1</b>	323,43	523	688,66	1131,13			
<b>Maus 2</b>	39,56	216,3	295,41	656,43	728,45	776,57	2031,65
<b>Maus 3</b>	51,02	197,09	313,68	869,02	1271,43	1377,43	3933,87
<b>Maus 4</b>	55,99	377,56	558,12	749,75	1529,09	1726,8	2128,7
<b>Maus 5</b>	45,47	219,45	231,26	409,33	470,01	1460,94	2080,79
<b>Maus 6</b>	241,13	338,14	522,21	890,14			
<b>Maus 7</b>	152,64	323,97	721,99	825,6	1792,95	2488,98	3109,51
<b>Maus 8</b>	34,96	116,53	269,31	504,71	1809,23	1915,69	2274,73
<b>Maus 9</b>	40,17	83,27	189,44	383,56	1483,09	1589,14	1798,31
<b>Maus 10</b>	273,15	405,11	500,03	675,58	998,44	1143,11	1366,49
<b>Maus 11</b>	238,5	344,09	740,84	753,36	1202,42	1630,04	1891,08
<b>Maus 12</b>	106,96	171,15	438,02	569,83	1465,69	1567,53	1757,25
<b>Maus 13</b>	83,75	190,41	454,43	646,32	1195,14	1542,29	2077,91
<b>Maus 14</b>	50,62	109,11	190,45	440,44	624,85	744,51	1306,81
<b>Maus 15</b>	126,07	209,3	432,98	611,06	953,53	1117,3	1408,48
<b>Maus 16</b>	44	88,96	195,9	220,75	521,61	634,04	1848,04
<b>Maus 17</b>	219,22	262,15	503,09	755,47	693,78	835,54	1213,05
<b>Maus 18</b>	132,19	251,31	459,36	564,93	1007,83	1465,02	3931,65
<b>Maus 19</b>	129,71	258,13	394	709,21	949,56	1070,55	1527,28
<b>Maus 20</b>	113,4	202,8	252,39	339,52	537,67	690,16	832,12

**100 mg/kg ab d -1:**

	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 9</b>	<b>Tag 11</b>	<b>Tag 13</b>	<b>Tag 15</b>	<b>Tag 17</b>	<b>Tag 19</b>
<b>Maus 1</b>	78,81	130,31	475,33	626,72	793,91	1587,99	1766,37
<b>Maus 2</b>	41,34	62,4	238,71	441,37	1075,22	1101,45	1603,33
<b>Maus 3</b>	51,69	75,11	311,9	351,17	439,37	536,88	545,06
<b>Maus 4</b>	63,43	77,35	475,75	535,52	838,03	857,47	1798,99
<b>Maus 5</b>	21,67	29,31	324,01	359,23	422,33	603,25	647,85
<b>Maus 6</b>	48,19	229,91	289,15	386,04	1094,88	1115,39	1447,12
<b>Maus 7</b>	53,66	213,96	1287,94	1622,24	2070,93	2822,2	4018,24
<b>Maus 8</b>	65,55	104,74	183,03	614,08	698,6	1229,91	1569,11
<b>Maus 9</b>	23,6	92,92	229,53	460,55	522,66	771,33	1202,47
<b>Maus 10</b>	20,56	137,92	217,31	366,59	411,81	714,14	866,34
<b>Maus 11</b>	24,42	42,21	255,73	355,19	494,04	809,46	1601,17
<b>Maus 12</b>	31,73	156,78	437,32	519,74	821,5	832,98	3035,17
<b>Maus 13</b>	73	262,15	293,25	750,52	779,94	1445,56	2374,3
<b>Maus 14</b>	32,28	45,66	174,85	400,07	524,64	570,9	723,3
<b>Maus 15</b>	20,98	95,51	209,78	286,13	308,56	469	663,92

**uPA-KO-Mäuse****NaCl:**

	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 9</b>	<b>Tag 11</b>	<b>Tag 13</b>	<b>Tag 15</b>	<b>Tag 17</b>	<b>Tag 19</b>
<b>Maus 1</b>	49,41	170,35	815,25	935,72	987,61	1265,18	2269,89
<b>Maus 2</b>	26,09	650,2	1034,94	1180,97	1326,92	1399,73	2894,97
<b>Maus 3</b>	94,86	279,3	602,25	850,34	1058,28	1613,94	2449,84
<b>Maus 4</b>	85,46	243,59	529,42	686,86	1121,47	1574,45	1978,55
<b>Maus 5</b>	86,04	335,29	903,24	1377,54	1541,78	2733,63	3239,75
<b>Maus 6</b>	54,32	235,46	712,77	1035,59	1088,07	1707,44	1923,98
<b>Maus 7</b>	42,99	92,91	452,68	611,31	950,18	1210,5	1209,2

**10 mg/kg:**

	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 9</b>	<b>Tag 11</b>	<b>Tag 13</b>	<b>Tag 15</b>	<b>Tag 17</b>	<b>Tag 19</b>
<b>Maus 1</b>	106,68	207,12	443,06	552,35	809,17	1075,96	2414,1
<b>Maus 2</b>	98,74	416,86	727,12	1100,01	1320,56	2148,28	2246,21
<b>Maus 3</b>	112,93	443,82	721,47	1361,26	1835,73	3246,55	3441,04
<b>Maus 4</b>	15,66	51,58	191,89	924,99	1056,82	2215,73	2437,88
<b>Maus 5</b>	58,7	70,74	362,43	490,5	1064,62	1750,05	2547,24
<b>Maus 6</b>	38,13	173,84	433,64	453,8	496,41	1308,6	2947,86
<b>Maus 7</b>	383,75	596,83	648,09	1629,2	1747,22	1709,43	3635,17
<b>Maus 8</b>	15,98	172,23	550,93	1158,26	1319,31	3194,82	3696,94

**uPAR-KO-Mäuse****NaCl:**

	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 9</b>	<b>Tag 11</b>	<b>Tag 13</b>	<b>Tag 15</b>	<b>Tag 17</b>	<b>Tag 19</b>
<b>Maus 1</b>	218,03	431,56	1325,88	2754,08	3942,97	4144,75	4907,79
<b>Maus 2</b>	45,33	78,97	203,02	450,79	540,97	1011,75	2079,85
<b>Maus 3</b>	54,22	385,04	917,31	2183,89	2401,99	2829,13	3393,77
<b>Maus 4</b>	91	168,57	1396,05	1790,15	3072,67	3611,87	5124,48
<b>Maus 5</b>	41,62	269,42	1014,09	1331,86	1393,05	2890,21	3498,28
<b>Maus 6</b>	119,67	233,05	383,26	1425,36	1774,97	2862,8	
<b>Maus 7</b>	46,62	231,01	539,56	592,87	1227,96	2084,77	2459,17
<b>Maus 8</b>	121,7	194,74	346,88	916,52	1210,75	1569,34	1682,27
<b>Maus 9</b>	58,32	101,06	135,81	230,76	278,61	844,03	887,47
<b>Maus 10</b>	63,39	186,14	698,56	967,09	1109,02	1489,25	1687,5
<b>Maus 11</b>	38,21	194,77	532,98	874,57	2370,27	3025,45	3739,12
<b>Maus 12</b>	159,83	394,11	1092,1	1754,58	2381,25	4052,93	6005,91
<b>Maus 13</b>	65,14	166,31	664,46	862,36	1007,74	1668,45	1990,68
<b>Maus 14</b>	237,56	477,7	739,84	1224,43	1412,17	2867,9	3132,43
<b>Maus 15</b>	52,01	313,09	721,3	752,63	1781,43	2492,77	2657,7
<b>Maus 16</b>	262,94	1138,75	2475,05	2753,89	3109,8	5122,56	6053,49

**10 mg/kg:**

	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 9</b>	<b>Tag 11</b>	<b>Tag 13</b>	<b>Tag 15</b>	<b>Tag 17</b>	<b>Tag 19</b>
<b>Maus 1</b>	40,44	49,77	255,29	1009,5	1193,89	1329,28	1671,09
<b>Maus 2</b>	35,79	123,54	324,89	428,97	1145,67	1231,09	1828,44
<b>Maus 3</b>	125,66	183,09	354,7	509,27	965,44	1647,03	1771,3
<b>Maus 4</b>	62,27	78,28	289,16	477,72	1011,53	1475,27	1999,04
<b>Maus 5</b>	93,9	174,17	314,94	961,52	1015,9	1838,85	2028,21
<b>Maus 6</b>	132,55	168,29	512,1	835,86	1681,96	1821,97	2581,57
<b>Maus 7</b>	106,95	206,4	597,54	1514,6			
<b>Maus 8</b>	109,42	328,95	396,55	1043,28	1203,26	1584,08	2632,23
<b>Maus 9</b>	102,42	158,02	358,11	748,51	1304,31	1975	2501,38
<b>Maus 10</b>	132,09	266,04	383,72	870,85	947,45	1136,44	2232,79
<b>Maus 11</b>	86,73	169,12	299,5	1338,68	1646,11	3136,94	3178,47
<b>Maus 12</b>	24,04	365,47	409,93	1013,88	1109,67	1459,96	1840,44
<b>Maus 13</b>	70,85	112,18	266,41	360,4	743,5	845,15	1439,14
<b>Maus 14</b>	30	110,67	348,99	417,08	612,83	1222,93	1230,83
<b>Maus 15</b>	54,95	215,85	249,41	426,27	546,48	854,62	1064,19
<b>Maus 16</b>	218,23	228,13	321,6	490,93	537,81	876,47	926,2
<b>Maus 17</b>	52,22	193,08	271,6	706,8	879,12	1049,03	1273,4
<b>Maus 18</b>	203,77	588,77	1023,81	1762,62	1781,15	2447,53	
<b>Maus 19</b>	63	100,8	149	347,44	619,37	1024,03	1370,92
<b>Maus 20</b>	113,76	729,71	1000,08	1213,29	1511,18	2248,1	2765,56
<b>Maus 21</b>	77,16	245,63	501,97	632,19	781,45	1151,56	1428,54
<b>Maus 22</b>	77,53	221,09	300,2	476,08	897,68	1043,36	1728,84

## SCID-Mäuse (SCLC-Modell)

### NaCl:

	Tag 21	Tag 25	Tag 29	Tag 33	Tag 37	Tag 41	Tag 45	Tag 49	Tag 53
<b>Maus 1</b>	11,89	24,42	37,73	96,17	244,19	293,71	366,84	521,02	990,21
<b>Maus 2</b>	18,07	97,57	109,06	210,71	527,23	684,51	880,68	1010,49	1375,96
<b>Maus 3</b>	14,46	21,44	40,5	108,15	328,8	446,85	707,72	1109,67	1943,29
<b>Maus 4</b>	56	132,28	203,56	272,34	536,01	614,04	764,96	828,74	1087,27
<b>Maus 5</b>	75,28	262,42	391,51	636,28	1157,66	1441,68	1871,36	2892,22	3589,15
<b>Maus 6</b>	13,63	24,82	38,64	162,59	315,27	510,63	756,17	1029,42	1698,62

### 10 mg/kg:

	Tag 21	Tag 25	Tag 29	Tag 33	Tag 37	Tag 41	Tag 45	Tag 49	Tag 53
<b>Maus 1</b>	55,9	125,76	196,83	578,05	626,63	1165,41	1714,49	2954,33	3426,75
<b>Maus 2</b>	16,39	24,86	51,14	77,2	108,2	143,17	277,95	397,38	582,66
<b>Maus 3</b>	22,01	74,54	115,92	142,02	222,08	430,44	571,39	668,27	914,3
<b>Maus 4</b>	38,78	158,55	204,98	252,6	337,91	484,5	533,78	747,8	
<b>Maus 5</b>	28,86	39,24	106,34	110,14	180,57	215,82	357,04	451,77	673,08
<b>Maus 6</b>	17,26	25,77	44	83,23	140,26	184,41	237,91	546,79	922,61

## 8.2. Rohdaten zur pulmonalen Metastasierung

(angegeben ist die Anzahl der im Volumen-CT sichtbaren pulmonalen Metastasen)

### Wildtyp-Mäuse

	NaCl	Stereoisomer	10 mg/kg	25 mg/kg	100 mg/ kg
Maus 1	1	0	0	1	0
Maus 2	0	0	0	0	0
Maus 3	0	1	0	1	0
Maus 4	0	1	0	0	0
Maus 5	0	0	0	0	1
Maus 6	4	5	7	0	0
Maus 7	0	7	11	0	0
Maus 8	2	0	3	0	0
Maus 9	0	8	0	0	0
Maus 10	0	0	1	0	0
Maus 11	0	0	0	1	0
Maus 12	0	0	1	0	0
Maus 13	0	0	0	2	0
Maus 14	0	1	8	0	1
Maus 15	4	0	1	3	1
Maus 16	0	3	6	0	0
Maus 17	5	0	4	3	1
Maus 18	0	0	2	0	1
Maus 19	0	4	4	3	0
Maus 20	3	7	0	0	1
Maus 21	2				
Maus 22	0				
Maus 23	0				
Maus 24	1				
Maus 25	0				
Maus 26	1				
Maus 27	2				
Maus 28	0				
Maus 29	1				
Maus 30	4				
Maus 31	1				
Maus 32	1				
Maus 33	1				
Maus 34	1				
Maus 35	2				
Maus 36	2				
Maus 37	0				
Maus 38	0				
Maus 39	0				
Maus 40	0				

## uPA-KO-Mäuse

	uPA-KO, 10 mg/kg	uPA-KO, NaCl	WT, NaCl
<b>Maus 1</b>	0	0	1
<b>Maus 2</b>	1	0	2
<b>Maus 3</b>	0	0	0
<b>Maus 4</b>	1	1	3
<b>Maus 5</b>	1	0	0
<b>Maus 6</b>	1	1	
<b>Maus 7</b>	0	1	
<b>Maus 8</b>	1		

## uPAR-KO-Mäuse

	uPAR-KO, 10 mg/kg	uPAR-KO, NaCl
<b>Maus 1</b>	0	5
<b>Maus 2</b>	4	0
<b>Maus 3</b>	2	0
<b>Maus 4</b>	1	0
<b>Maus 5</b>	2	0
<b>Maus 6</b>	0	1
<b>Maus 7</b>	3	0
<b>Maus 8</b>	2	1
<b>Maus 9</b>	0	0
<b>Maus 10</b>	1	0
<b>Maus 11</b>	1	0
<b>Maus 12</b>	0	1
<b>Maus 13</b>	0	0
<b>Maus 14</b>	0	0
<b>Maus 15</b>	9	0
<b>Maus 16</b>	2	8
<b>Maus 17</b>	0	
<b>Maus 18</b>	1	
<b>Maus 19</b>	0	
<b>Maus 20</b>	0	
<b>Maus 21</b>	2	
<b>Maus 22</b>	0	



### 8.3. Rohdaten zur Tumervaskularisierung

#### NaCl:

	<b>Gefäße</b>	<b>Tumor, gesamt</b>	<b>Vask. (%)</b>
<b>Maus 1</b>	163485	18021030	0,91
<b>Maus 2</b>	70413	180528	39
<b>Maus 3</b>	188740	18586984	1,02
<b>Maus 4</b>	156915	58584542	2,66
<b>Maus 5</b>	676950	19138432	3,54
<b>Maus 6</b>	179799	28387040	6,2
<b>Maus 7</b>	128544	9719112	1,32
<b>Maus 8</b>	118920	11075061	1,07
<b>Maus 9</b>	45986	1274466	3,61
<b>Maus 10</b>	405519	31712495	1,28
<b>Maus 11</b>	32932	22494795	0,15
<b>Maus 12</b>	456812	32089038	1,4
<b>Maus 13</b>	2248165	37456435	6
<b>Maus 14</b>	2671512	30353157	8,8

#### 100 mg/kg:

	<b>Gefäße</b>	<b>Tumor, gesamt</b>	<b>Vask. (%)</b>
<b>Maus 1</b>	2057006	42476100	4,84
<b>Maus 2</b>	3928	2234965	0,176
<b>Maus 3</b>	339618	11388152	2,98
<b>Maus 4</b>	224837	937397	23,99
<b>Maus 5</b>	390601	21222728	1,84
<b>Maus 6</b>	148269	344400	43,05
<b>Maus 7</b>	988369	4656365	21,23
<b>Maus 8</b>	667247	26310766	2,54
<b>Maus 9</b>	228687	40788494	0,56
<b>Maus 10</b>	379219	12908372	2,94
<b>Maus 11</b>	186576	24841647	0,75
<b>Maus 12</b>	115978	25649840	0,45
<b>Maus 13</b>	151977	28283374	0,54
<b>Maus 14</b>	761043	25132839	3,03
<b>Maus 15</b>	206603	27542350	0,75

#### 8.4. Rohdaten zum Proliferationsassay

<b>0 mg/ml</b>	<b>100 mg/ml</b>	<b>50 mg/ml</b>	<b>25 mg/ml</b>	<b>12,5 mg/ml</b>	<b>6,25 mg/ml</b>	<b>3,125 mg/ml</b>	<b>1,5 mg/ml</b>
13918,8	15754,8	16797,8	18123	19006,4	20192	18818,8	13681,4
18192,4	12758	16614	20566,8	21249,8	21168,4	20197,6	18850
15782,4	14724,4	16385	20091,4	24612,8	20526	20438,4	20709,8
19727,8	12243,6	14909,6	17641,8	16739,6	11537,2	17820,2	17248,4
15224,2	13062,4	14398,8	16569,8	18456	16459,2	14826	16165
17786	5863,8	11157,6	13399,6	14994	14570,2	20252,8	16231,6

## 9. Danksagung

Für die Überlassung des interessanten Themas und die kompetente fachliche Betreuung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Günther bedanken, der es mir ermöglicht hat, die Daten der vorliegenden Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Manfred Reinacher danke ich für seine Bereitschaft, die Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin zu vertreten. Auch möchte ich ihm herzlich für sein Interesse an meiner Arbeit und die hilfreichen Anregungen bei der Korrektur danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Werner Seeger bedanke ich mich für das Stipendium, das die Anfertigung der Arbeit erst möglich machte.

Ein großes Dankeschön gilt auch Herrn Dr. Clemens Ruppert, der mir bei den Versuchen und der Erstellung der Arbeit hilfreich zur Seite stand.

Frau Dr. Martina Korfei danke ich für die Einarbeitung in die Western Blot-Technik.

Für die Hilfe bei der Rekonstruktion und Auswertung der Volumen CT scans bedanke ich mich bei Frau Dr. Susanne Greschus, Frau Kathrin Respondek und Herrn Dr. Martin Obert.

Allen Mitarbeitern des Labors danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die kollegiale Zusammenarbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei Silke Köbrich und Kathrin Petri für ihre Freundschaft und die schöne gemeinsame Zeit im Haus c.

Bei der Firma Curacyte, München möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Substanzen bedanken.

Meiner Schwester Katja danke ich für ihre Unterstützung und ihre Hilfe bei der Korrektur der Arbeit.

Ganz besonders möchte ich meinen lieben Eltern danken, die Zeit meines Lebens immer für mich da waren und ohne deren Hilfe es nicht möglich gewesen wäre meinen Berufswunsch zu verfolgen, und schließlich auch noch eine Dissertation anzustreben.

## **10. Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

Gießen, im März 2010

*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5586-8



9 783835 955868

