

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Schuff-Werner

**Untersuchungen zur Modulation des perizellulären fibrinolytischen Systems
unterschiedlicher Pankreaskarzinomzelllinien durch das extrazelluläre Matrixprotein
Thrombospondin-1**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Wolfgang Brehmer
Rostock 2008

urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0103-7

Dekan:	Prof. Dr. med. E. C. Reisinger
1. Gutachter:	PD. Dr. med. Michael Steiner
2. Gutachter:	Prof. Dr. med. Mathias Freund
3. Gutachter:	Prof. Dr. med. J.-Mathias Löhr
Dissertationsort:	Rostock
Tag der öffentlichen Verteidigung:	18. Februar 2009

MEINEN ELTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Perizelluläres fibrinolytisches System	2
1.1.1 Komponenten des Plasminogenaktivator-Systems	3
1.1.2 Rolle des PA-Systems in der Tumorpathogenese	10
1.2 Thrombospondin-1	13
1.2.1 Struktur des TSP-1	13
1.2.2 TSP-1-Rezeptoren und Liganden	14
1.2.3 Expression und Funktion des TSP-1	16
1.2.4 TSP-1 in der Tumorpathogenese	17
1.3 Zielsetzung	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Zellkultur	23
2.2 Plasminogenisolierung	25
2.3 Isolierung von TSP-1 aus humanen Thrombozyten	26
2.4 Fibronektin	26
2.5 Analysen der perizellulären fibrinolytischen Aktivität	26
2.5.1 Voruntersuchungen	26
2.5.2 Aktivitätsanalysen unter basalen Zellkulturbedingungen	27
2.5.3 Aktivitätsanalysen unter Amiloridhemmung	28
2.5.4 Aktivitätsanalysen unter Matrixstimulation	29
2.5.5 Aktivitätsanalysen unter löslicher TSP-1- und FN-Stimulation	29
2.6 Quantifizierung des uPA, uPAR, PAI-1 und PAI-2	30
2.6.1 Herstellung der Zellkulturüberstände und Zellextrakte	30
2.6.2 ELISA	31
3. Statistik	32
4 Ergebnisse	34
4.1 Voruntersuchungen	34
4.1.1 Zellquantifizierung mittels Proteinanalyse	34
4.1.2 Festlegung der Plasminogenkonzentrationen	34
4.1.3 Optimierung der Zelldichte	36
4.2 Aktivitätsanalysen unter Amiloridhemmung	40

4.3	Aktivitätsanalysen unter TSP-1- und FN-Stimulation	43
4.3.1	Aktivitätsanalysen unter Matrixstimulation	43
4.3.2	Aktivitätsanalysen unter löslicher TSP-1- und FN-Stimulation	45
4.4	Quantifizierung der Einzelkomponenten des PA-Systems	48
4.4.1	Konzentration des uPA in den Zellextrakten und konditionierten Medien	48
4.4.2	Konzentration des uPAR in den Zellextrakten und konditionierten Medien	52
4.4.3	Konzentration des PAI-1 in den Zellextrakten und konditionierten Medien	57
4.4.4	Konzentration des PAI-2 in den Zellextrakten und konditionierten Medien	62
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	65
5.	Diskussion	68
5.1	Diskussion der Methode	68
5.2	Diskussion der Ergebnisse	69
5.3	Mögliche Bedeutung der Ergebnisse in Bezug zur Tumorphagenese	78
6.	Zusammenfassung	87
7.	Literaturverzeichnis	89

Thesen

Selbständigkeitserklärung

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ATF	amino-terminal fragment
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation
cm	Zentimeter
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ERK	Ras-extracellular signal-regulated kinase
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FN	Fibronektin
FN-M	Fibronektin-Matrix
g	Erdbeschleunigung
GPCR	G-protein-coupled receptor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HMW	high-molecular-weight
HSPG	heparan sulphate proteoglycans
IAP	integrin associated protein
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
LDL	low density lipoproteins
LK	Lymphknoten
LRP	lipoprotein receptor-related protein
M	mol/l
mg	Milligram
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	messenger ribonucleic acid
MTP	Mikrotiterplatte
ng	Nanogram
nm	Nanometer
PA	Plasminogenaktivator
PAI	Plasminogenaktivatorinhibitor
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PDGF	plateled derived growth factor
Plg.	Plasminogen
µl	Mikroliter
rpm	rotation per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
sec	Sekunde
SuPAR	soluble urokinase-type plasminogen activator receptor
TGF-β	transforming growth factor-beta
TIMP	tissue inhibitor of MMP
TNF-α	tumor necrosis factor-alpha
TSP-1	Thrombospondin-1

TSP-M	Thrombospondin-1-Matrix
tPA	tissue-type Plasminogenaktivator
U	Unit
uPA	urokinase-type plasminogen activator
uPAR	urokinase-type plasminogen activator receptor
UV	Ultraviolettstrahlung
VEGF	vascular endothelial growth factor
VN	Vitronektin

1 Einleitung

Die Tumorphathogenese stellt keinen isolierten Prozess einzelner entarteter Zellen dar. Vielmehr muss jeder Tumor als ein funktionelles, eng mit der unmittelbaren Umgebung verbundenes Gewebe betrachtet werden, dessen Struktur und Funktion durch dynamische Interaktionen mit der Mikroumgebung - der Extrazellulären Matrix (EZM) - aufrechterhalten und moduliert wird (125).

Die EZM ist definiert als ein komplexes Geflecht aus Makromolekülen, Proteinen, Proteoglykanen und adhäsiven Glykoproteinen, die von den in ihr befindlichen Zellen synthetisiert und sezerniert werden. Prinzipiell sind Faserproteine, die entsprechend ihrer Funktion weiter in Strukturproteine (z.B. Kollagen und Elastin) und Adhäsionsproteine (Fibronektin und Laminin) unterteilt werden und die Proteoglykane (z.B. Aggrecan und Perlecan) zu unterscheiden. Bei letzteren handelt es sich um stark geladene, kovalent an Proteine gebundene Glykosaminoglykane, die jedoch auch in einer ungebundenen Form vorkommen können (z. B. Heparin, Hyaluronsäure).

Neben der strukturellen und mechanischen Unterstützung der Zellen und Gewebe fungiert die EZM auch als Speicherort zahlreicher, von den Zellen sezernierter, biologisch aktiver Moleküle wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und Proteasen und ist hierüber an der auto- und parakrinen räumlichen und zeitlichen Steuerung verschiedener Zellvorgänge beteiligt.

Somit kann die EZM als eine Art „zelluläres Gedächtnis“ angesehen werden, dessen Zusammensetzung und Eigenschaften die zellbiologische Aktivität der in ihr lokalisierten Zellen widerspiegelt. Die Bestandteile der EZM wiederum interagieren mit den Zelloberflächenrezeptoren der Zellen/Tumorzellen wodurch unterschiedliche physiologische und pathophysiologische Prozesse (z.B. Informationsweitergabe und Stoffwechselprozesse, Adhäsion, Motilität, Transformation, Invasion und Metastasierung) kontrolliert und moduliert werden (125).

Daneben besteht auch eine enge Interaktion und Kooperation zwischen der Tumorzelle und den Stromazellen. So werden angrenzende Stromazellen durch verschiedene Signalmoleküle zur Expression zahlreicher aktiver Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine, angiogenetischer Faktoren und Proteasen stimuliert, welche ihrerseits die umliegende EZM aktivieren und Verhalten bzw. Eigenschaften der Tumorzellen regulieren und modulieren (39).

Eines unter den vielen Molekülen, die aktiv an der Modulation des extrazellulären Milieus und der Beeinflussung zellulärer physio- und pathophysiologischer Funktionen beteiligt sind, ist das Matrixstrukturprotein Thrombospondin-1 (TSP-1). Diese modulierenden Eigenschaften werden auch von einigen anderen, funktionell ähnlichen Proteinen (z.B. Osteopontin, Tenascin C) geteilt und führten zur Bezeichnung der matrizellulären Proteine (22).

Eine Beteiligung des TSP-1 an der Pathogenese maligner Tumoren ist in den zurückliegenden Jahren mehrfach beschrieben worden; über dessen Bedeutung liegen jedoch widersprüchliche Daten vor. Hierfür werden, neben möglichen methodischen Problemen (z.B. unterschiedliche Darreichungsformen des TSP-1), die komplexen Wirkungsmechanismen dieses multifunktionellen Glykoproteins verantwortlich gemacht (147).

Ein pathogenetischer Mechanismus wird in der Modulation des perizellulären fibrinolytischen Systems/Plasminogenaktivator (PA)-Systems gesehen. Neben der direkten Interaktion des TSP-1 mit Komponenten des PA-Systems konnten einige Studien auch eine Modulation einzelner Faktoren auf der Expressionsebene nachweisen (141).

1.1 Perizelluläres fibrinolytisches System

Um- und Abbau der extrazellulären Matrix spielen in der Tumorphagenese eine zentrale Rolle. Phänomene wie Zellmigration, Tumorinvasion und Metastasierung wären ohne eine räumlich und zeitlich kontrollierte Degradation der unmittelbar an den Tumorzellen angrenzenden EZM nicht möglich. Hierfür bedient sich der Tumor einer Vielzahl proteolytischer Enzyme, die von den Tumorzellen selbst und/oder den ortsständigen Stromazellen in Kooperation mit der Tumorzelle gebildet werden.

Inzwischen wurden zahlreiche Proteasen und Proteasesysteme beschrieben (Matrixmetalloproteinasen, Aspartyl- und Zysteinproteasen), die direkt oder indirekt in die Tumorentwicklung involviert sind (41, 149). Unter diesen proteolytischen Systemen kommt dem perizellulären fibrinolytischen System eine dominierende Stellung zu. Zahlreiche Studien bestätigen dessen Bedeutung in tumorbiologischen Prozessen wie Zellinvasion, Metastasierung und Angiogenese (7, 32, 130). Zentrales Substrat dieses komplexen Systems ist das Plasminogen (Plg), dessen Aktivierung zu und Wirkung als Plasmin durch zahlreiche Faktoren (u.a. tPA, uPA, uPAR, PAI-1 und PAI-2) moduliert und reguliert wird. Zusammengenommen bilden sie das Plasminogenaktivator-System (PA-System).

Die Expression und Funktion der Komponenten des PA-Systems unterliegen komplexen Regulationsmechanismen, an denen eine Vielzahl von Faktoren (Wachstumsfaktoren,

Zytokine, Endozytoserezeptoren, Integrine und extrazelluläre Matrixproteine) beteiligt sind (110).

Es muss jedoch betont werden, dass eine klare funktionelle Abgrenzung zwischen den einzelnen Proteasen bzw. Proteasensystemen wegen der komplexen und teilweisen gegensätzlichen Aufgaben nicht möglich ist. Zudem weisen die verschiedenen Proteasen eine vielfältige, teils überlappende Substratspezifität auf und können sich häufig direkt oder indirekt gegenseitig aktivieren bzw. inhibieren (39).

1.1.1 Komponenten des Plasminogenaktivator-Systems

Plasminogen, ein einkettiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ~ 92 kDa wird hauptsächlich in der Leber produziert und ist sowohl im Plasma (1,5 – 2 µmol/L) als auch in der interstitiellen Flüssigkeit vorzufinden.

Die beiden wichtigsten physiologischen Plasminogenaktivatoren (PA) sind tPA und uPA. Der bedeutendste physiologische Inhibitor des Plasmins ist das α -2-Antiplasmin. Als Zelloberflächenrezeptoren dienen dem Plasminogen Proteine mit einem carboxyterminalen Lysin-Rest. Unter anderem wurden α -Enolase, Amphoterin und Annexin II als Plasminogenrezeptoren identifiziert (61, 105). Die Aktivierung des Plasminogens beinhaltet die Hydrolyse einer Peptidbindung (Arg561-Val562) und geschieht in einem geringen Umfang durch pro-uPA, wesentlich effizienter jedoch durch den an der Zelloberfläche lokalisierten uPA. Voraussetzung hierfür ist ebenfalls die Bindung des Plasminogens an der Zellmembran (48). Das führt zu einer potenten, zellvermittelten sowie lokal begrenzten perizellulären Fibrinolyse. Plasminogen kann selbst pro-uPA in uPA umwandeln und hierüber seine eigene Aktivierung beschleunigen (49). Auch tPA katalysiert die Umwandlung von Plasminogen in proteolytisch aktives Plasmin. Dies geschieht jedoch primär zelloberflächenunabhängig und spielt bei der intravasalen Fibrinolyse eine wichtige Rolle.

Die aktive Serinprotease Plasmin besteht aus zwei über Disulfidbindungen verbundenen Polypeptidketten. Die katalytisch aktive Serinproteinase-Domäne ist in der C-terminalen B-Kette lokalisiert. Plasmin zeichnet sich durch eine breite Substratspezifität aus und spaltet eine Vielzahl von (Matrix-)Proteinen wie Aggrecan, Fibronectin (FN), Laminin, Vitronectin (VN), Proteoglykane und Fibrin (8, 28, 90, 106). Zusätzlich aktiviert Plasmin andere Proteasen wie die Matrixmetalloproteinasen (MMP) -1, -2, -9 und 13, was u. a. den Abbau der EZM weiter verstärkt (130, 8). Studien der vergangenen Jahre konnten eine enge Kooperation sowie funktionelle Überlappung beider Systeme (Plasmin- und MMP-System) in zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen nachweisen (39, 103, 110). Durch den

Abbau der EZM werden diverse biologisch aktive Moleküle wie TGF- β , bFGF oder VEGF freigesetzt, die ihrerseits Prozesse wie Zellproliferation, Adhäsion und Invasion beeinflussen. Freigesetzte, aber noch inaktive Faktoren können durch Plasmin direkt oder indirekt (z. B. über MMPs) aktiviert werden (98, 130, 155). Neben dessen zentraler Rolle bei der intravasalen Fibrinolyse ist Plasmin über die Modulation und den Abbau zahlreicher Proteine an einer Vielzahl physiologischer sowie pathophysiologischer Prozesse wie Ovulation, Embryonalentwicklung, entzündlichen Prozessen, Wundheilung, Angiogenese, Tumorinvasion und Metastasierung beteiligt.

uPA ist eine Serinprotease mit einem Molekulargewicht von 53 kDa. Er wird durch unterschiedliche Zellen (z.B. Nierentubulizellen, Monozyten, Pneumozyten Keratinozyten, Fibroblasten, Tumorzellen) als einkettiges Proenzym (pro-uPA) mit geringer intrinsischer enzymatischer Aktivität exprimiert und sezerniert. Pro-uPA kann anschließend mittels proteolytischer Spaltung an Position Lys158-Ile159 durch verschiedene Proteasen wie Cathepsin B/L, Kallikrein, Tryptase, Wachstumsfaktoren etc. in die enzymatisch ca. 250fach aktivere zweikettige Form, den HMW-uPA (high-molecular-weight) prozessiert werden. Der bedeutendste physiologische Aktivator des pro-uPA scheint jedoch Plasmin selbst zu sein. HMW-uPA besteht aus zwei, durch Disulfidbrücken miteinander verbundenen Ketten. Die Tertiärstruktur setzt sich aus drei unterschiedlichen Domänen zusammen. Die N-terminale A-Kette beinhaltet eine Wachstumsfaktor-Domäne, gefolgt von einer Kringel-Domäne. Beide zusammen bilden das inaktive Amino-Terminale-Fragment (ATF). Die Wachstumsfaktor-Domäne vermittelt über eine Sequenz von 13 Aminosäuren die Bindung an uPAR. In der karboxyterminalen Region der B-Kette ist die Serin-Protease-Domäne lokalisiert. Sie stellt die enzymatisch aktive Region des Proteins dar und ist für die Generierung des Plasmins verantwortlich (17, 94, 110, 130).

Sowohl pro-uPA als auch zweikettiges uPA binden spezifisch an uPAR, was eine starke Zunahme ihrer enzymatischen Aktivität zur Folge hat. Aus der Interaktion des pro-uPA/uPA mit uPAR resultiert bei gleichzeitiger Zellmembranbindung des Plasminogens eine effiziente und fokussierte Plasmingenerierung in unmittelbarer Umgebung der Zellmembran. Plasmin wiederum katalysiert dann die Umwandlung des pro-uPA in den aktiveren uPA, wodurch der Prozess weiter beschleunigt wird. Freier uPA bzw. lösliche uPA/uPAR-Komplexe besitzen eine deutlich niedrigere enzymatische Aktivität (48, 49, 123).

uPA kann uPAR zwischen den Domänen 1 und 2 spalten. Das findet verstärkt an der Zelloberfläche statt und wird als ein negativer Feedbackmechanismus im komplexen

Regulationsprozess der Plasminogenaktivierung angesehen (70). Durch die Spaltung wird auch die Assoziation des uPAR mit den Integrinen beeinflusst.

Löslicher und rezeptorgebundener uPA bilden spezifische Komplexe mit den Inhibitoren PAI-1 und -2. Das führt nicht nur zur uPA-Hemmung, sondern nach Bindung der Komplexe an membranassoziiertem uPAR, zu deren Internalisierung und lysosomalen Degradation. Beide Mechanismen regulieren direkt und indirekt sowohl die Plasminaktivierung als auch die Zelladhäsion (37, 50).

Durch die Bindung an uPAR moduliert uPA unabhängig von seiner enzymatischen Aktivität weitere Prozesse wie Zelladhäsion, Migration, Proliferation und Chemotaxis.

Die Serinprotease tPA wird als einkettiges, ~70kDa schweres Glykoprotein synthetisiert. Durch Proteolyse einer einzelnen Polypeptidbindung wird es in die, durch eine Disulfidbrücke verbundene, 10-50fach enzymatisch (fibrinolytisch) aktivere zweikettige Form überführt. Die katalytisch aktive Serin-Protease-Domäne ist in der B-Kette lokalisiert. Über die A-Kette wird u. a. die Fibrinbindung vermittelt (7, 110).

Viele normale und neoplastische Zellen sind zur Bildung von tPA befähigt. Physiologischer Hauptsyntheseort ist jedoch die Gefäßendothelzelle. Die Regulation der tPA-Aktivität ist komplex. Neben den bekannten PAI sind u. a. verschiedene Matrixproteine wie Fibrin, FN und TSP daran beteiligt. Im Blut ist PAI-1 der bedeutendste tPA-Inhibitor. Die Clearance der tPA-PAI-1-Komplexe findet über das LRP (lipoprotein receptor-related protein) in Hepatozyten statt (83, 110).

tPA bindet an Zelloberflächenrezeptoren wie Annexin II und Amphoterin. Ein zellmembrangebundener Rezeptor mit hoher tPA-Affinität konnte jedoch bislang nicht nachgewiesen werden (61, 110).

tPA spielt eine zentrale Rolle bei der intravasalen Fibrinolyse. Die hohe Affinität zum Fibrinogen/Fibrin begünstigt seine lokale Anreicherung und führt zu einer gesteigerten Affinität gegenüber dem Plasminogen. Das ermöglicht eine gezielte und effiziente Plasminogen-Aktivierung bzw. Fibrinolyse (110, 139).

Auch extrazelluläre Matrixproteine (u.a. Fibronectin, Laminin, Thrombospondin) können tPA und Plasminogen binden. Möglicherweise hat das regulatorische Bedeutung im Prozess der perizellulären Fibrinolyse nach Fibrin(ogen)austritt aus dem Gefäßbett (139). Inzwischen konnten weitere, von der enzymatischen Aktivität unabhängige Funktionen des tPA nachgewiesen werden (162).

uPAR (CD87) hat ein Molekulargewicht von ~55 kDa und ist als voll prozessiertes Protein stark glykolysiert. Seine Tertiärstruktur wird durch drei homologe Repeats, den Domänen D1-D3 mit je ca. 90 Aminosäuren gebildet. Die uPA-Bindungsstelle ist in D1 und D3 lokalisiert. Mit dem in der C-terminalen Region lokalisierten Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) ist uPAR mit der äußeren Zellmembran ohne direkten Kontakt zum Zytosol verbunden (7, 20, 110, 123).

uPAR wird auch in löslicher Form (suPAR) gefunden. Durch proteolytische Spaltung in Nähe des GPI-Ankers oder Hydrolyse des GPI-Ankers durch Phospholipasen kann der Rezeptor als intaktes Molekül von der Zellmembran abgespalten werden. Das führt zu funktionellen Veränderungen (u. a. Abnahme der Plasmingenerierung durch Verlust der Co-Lokalisation zwischen Plasminogen und pro-uPA sowie Reduktion der uPA/PAI-1-Endozytose), alteriert jedoch nicht die Bindungsfähigkeit zu VN oder uPA. Auch alternatives Splicing wurde als Quelle löslichen uPAR beschrieben (98). Über die Interaktion mit Integrinen kann suPAR weiterhin mit den Zelloberflächen sowie extrazellulären Matrixproteinen assoziieren (7, 75).

Im Gegensatz dazu wird die Proteolyse des uPAR in der Verbindungsregion zwischen D1 und D2 von einer vollständigen Veränderung der biologischen Eigenschaften des Rezeptors begleitet. Zahlreiche Proteasen wie uPA, Plasmin, neutrophile Elastase und verschiedene MMPs können den Rezeptor in dieser Region spalten (7, 148). Die Abspaltung von D1 durch uPA findet auf der Zelloberfläche stark beschleunigt statt und setzt hier, im Unterschied zum suPAR, die Bindung von uPA mit dem Rezeptor voraus (68). Der Prozess führt zu einem (fast) vollständigen Verlust der uPA-Bindungsaffinität und hemmt die Plasmingenerierung, die Zelladhäsion sowie die uPAR/Integrin-Assoziation (15, 39, 107). Die löslichen D2D3-Fragmente könnten als Chemotaxine eine Rolle in der Zellmigration spielen.

Zusammen mit membrangebundenem Plasminogen/Plasmin bilden uPA/uPAR ein sehr effizientes, zelloberflächenassoziiertes proteolytisches System, welches durch gezielte lokale Degradation von EZM- und Zelladhäsionsmoleküle eine zentrale Rolle im Prozess der Zellmigration und Tumordinvasion einnimmt (7, 8). Die spezifische Lokalisation des uPAR in Zellmembrankompartimenten (wie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakt, Migrationsfront) wird über die Assoziation zwischen uPAR, uPA, Integrinen und VN reguliert (148).

Inzwischen konnte eine Vielzahl weiterer Funktionen des uPAR über die Plasmingenerierung hinaus nachgewiesen werden. uPAR und suPAR bindet an VN und vermittelt hierüber die Adhäsion vieler Zellen. Durch Bindung des uPA (bzw. des enzymatisch inaktiven ATF-Fragments) nimmt die Affinität zu VN stark zu (43, 170, 171). Die Spaltung des uPAR

verhindert eine effiziente uPAR-Vitronectin-Bindung (69). PAI-1 kann diese Adhäsionsfunktion ebenfalls modulieren.

uPAR besitzt keine transmembrane Domäne. Die laterale Assoziation mit unterschiedlichen transmembranen Proteinen ermöglicht jedoch eine transmembrane Signaltransduktion. Für viele dieser Funktionen ist eine Komplexbildung mit uPA notwendig, ohne jedoch dessen enzymatische Aktivität vorauszusetzen (113). Inzwischen konnten unterschiedliche transmembrane Partner identifiziert werden. Unter anderem bindet uPAR bzw. der uPA/uPAR-Komplex an verschiedene Integrine ($\alpha 3\beta 1$ -, $\alpha 5\beta 1$ -, $\alpha v\beta 3$ - bzw. $\alpha v\beta 5$ -Integrin), an GPCR (G-protein-coupled-receptor) und Caveolin. Diese Interaktion kann mit einer Aktivierung diverser Kinasen (wie Tyrosin- und Serinproteinkinasen) einhergehen und zahlreiche physiologische Prozesse wie Zellmigration, Adhäsion, Differenzierung und Proliferation modulieren (7, 20, 75, 113).

In Abhängigkeit der Zellen und der EZM-Komponenten können uPA/uPAR/Integrin-Komplexe an unterschiedliche Matrixmoleküle (VN, FN, Laminin und Kollagen) adhären (7, 38). Durch die Assoziation des uPA/uPAR mit den Integrinen werden teilweise auch die Funktionen der aktivierten Integrine modifiziert (108). PAI-1 kann diese Interaktionen wiederum beeinflussen.

Pro-uPA-, uPA- und ATF-Gradienten üben eine chemotaktische Wirkung auf uPAR exprimierende Zellen aus. Die Bindung des uPA an seinen Rezeptor führt zur Demaskierung eines chemotaktischen Epitops zwischen der D2 und D3 Domäne. Es wird angenommen, dass diese chemotaktische Sequenz dann mit FPFL1, einem transmembranen Adaptor der GPCR-Familie (G-protein-coupled receptor) interagiert und zur Induktion intrazellulärer Signale und Chemotaxis führt. Spaltprodukte des suPAR, die das aktive D2D3-Fragment enthalten sind durch direkte Interaktion mit FPRL1 ebenfalls zur Chemotaxis befähigt (20, 75, 110).

uPAR spielt in Assoziation mit dem LRP/alpha 2-MR-Komplex (alpha2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein) und VLDL auch eine Rolle bei der Endozytose der PA und PAI (34, 35, 110).

Unter den bekannten Serin-Proteinase-Inhibitoren (SERPINE) zählen PAI-1 und PAI-2 zu den wichtigsten physiologischen PA-Inhibitoren.

PAI-1 ist ein einkettiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ~50 kDa, das von unterschiedlichen Zellen (z. B. Endothelzellen, Thrombozyten, glatte Muskelzellen, Adipozyten und Tumorzellen) synthetisiert wird. Als Hauptquelle des zirkulierenden PAI-1 wird die Leber angenommen. Die PAI-1-Genexpression kann durch zahlreiche Stimulatoren

wie Endotoxine, Wachstumsfaktoren, Entzündungsmediatoren, Hormone oder Hypoxie beeinflusst werden (42, 101). Das reaktive Zentrum ist in der C-terminalen Region lokalisiert. Der von den Zellen in einer aktiven Form sezernierte PAI-1 ist in Lösung instabil und konvertiert schnell durch spontane Konformationsänderung in eine inaktive (latente) Form mit einer Halbwertszeit von 1 bis 2 Stunden. PAI-1 bindet mit hoher Affinität an die Somatomedin B-Region des VN. Diese Interaktion stabilisiert das Molekül, alteriert aber auch dessen Spezifität (89, 100).

PAI-1 inhibiert durch Komplexbildung schnell und spezifisch die beiden PA, fungiert in diesem Prozess aber selbst als Substrat und wird inaktiviert (114). PAI-1 bindet sowohl den löslichen als auch uPAR gebundenen uPA, nicht jedoch pro-uPA. Die uPA-PAI-1-Komplexe werden nach Bindung an uPAR in Assoziation mit dem LRP/alpha 2-MR internalisiert und abgebaut (9, 170). Eine direkte Interaktion des PAI-1 mit dem uPAR ist nicht möglich (36).

PAI-1 spielt unabhängig von seiner Funktion als PA-Inhibitor eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion und Migration. Eine entscheidende Ursache hierfür ist seine hohe Affinität zu VN. Die PAI-1 Bindungsstelle der Somatomedin B Domäne des VN überlappt sich mit der des uPAR und befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur einzigen RGD-Sequenz des Moleküls. Die Folge ist eine kompetitive Inhibition der uPAR-abhängigen Bindung der Zellen an VN sowie sterische Blockade der angrenzenden RGD-Sequenz. Letzteres führt wiederum zur Hemmung der Integrin vermittelten Zelladhäsion (38, 42).

Die Zellinteraktion mit VN wird weiterhin durch uPA beeinflusst. Zum einen verstärkt dessen Bindung an uPAR die Affinität des Rezeptors zu VN, zum anderen führt die Komplexbildung des uPA (und auch des tPA) mit PAI-1 zu dessen Affinitätsabnahme gegenüber VN (43).

Ein weiterer Mechanismus, über den PAI-1 als Anti-Adhäsionsmolekül wirkt, ist dessen Bindung an den uPA-uPAR-Integrin-Komplex. Hierbei wird das Integrin inaktiviert und der gesamte Komplex nach Assoziation mit dem LRP internalisiert. uPA und PAI-1 werden anschließend lysosomal degradiert, während Rezeptor und Integrine erneut an die Zelloberfläche gelangen. Über einen polarisierenden Endozytosezyklus könnten die „wiederverwerteten“ uPAR bzw. Integrine an die Migrationsfront der Zelle gelangen und dort als Adhäsionsmoleküle die Migration weiter fördern. (7, 38, 42). Über diesen Mechanismus werden neben der Plasminogenaktivierung und der Zellbindung an VN auch die durch uPAR/Integrin vermittelte Adhäsion zu anderen Matrixmolekülen (z. B. FN, Kollagen) beeinflusst (38, 42). Der anti-adhäsive Effekt des PAI-1 auf unterschiedliche Matrixmoleküle ist somit auch vom Verhältnis zwischen der uPAR- und Integrin-Konzentration abhängig, da nur die mit uPA/uPAR-assoziierten Integrine durch PAI-1 inaktiviert werden. Zelladhäsion

durch Integrine ohne uPAR-Assoziation werden (mit Ausnahme der VN-Bindung) hingegen nicht durch PAI-1 beeinflusst (38).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass PAI-1 neben seiner Rolle als PA-Inhibitor eine wichtige Funktion als anti-adhäsives Molekül ausübt. Beide Funktionen beeinflussen die Zellmotilität und Invasion, wobei in Abhängigkeit zahlreicher Faktoren (wie Konzentration und Relation von uPA, uPAR und PAI-1, Lokalisation, Funktion und Konzentration der Integrine, Zusammensetzung der Matrix), sowohl pro- als auch anti-migratorische Effekte resultieren können (7, 43, 151, 171).

Ein weiteres Mitglied der Serpin-Familie ist PAI-2. Das Zymogen wird hauptsächlich als intrazelluläres, 47kDa schweres, nicht-glykolysiertes Protein vorgefunden. Die sezernierte, quantitativ seltenere Form des PAI-2 ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 60 kDa. Unter bestimmten Umständen (z. B. bei Malignomen) kann glykolysiertes PAI-2 jedoch stark zunehmen. Auch zytosolischer (nicht-glykolysierter) PAI-2 wird gelegentlich extrazellulär vorgefunden (84, 99). Beide Formen können löslichen und rezeptorgebundenen uPA inhibieren, wenn auch mit geringerer Effizienz als PAI-1. Pro-uPA bildet hingegen keine stabilen Komplexe mit PAI-2, und auch einkettiger tPA wird im Gegensatz zu seiner aktiveren, zweikettigen Form kaum gehemmt (50, 52, 84). Durch Komplexbildung mit uPA nimmt die Affinität des uPAR-gebundenen Aktivators zum LRP stark zu. Das führt, ähnlich wie bei PAI-1, zu einer uPA/uPAR-vermittelten Endozytose und lysosomalen Abbau des Inhibitors sowie zu einer gesteigerten Clearance des uPA von der Zelloberfläche (35, 37, 52).

Die PAI-2-Plasmakonzentrationen sind in der Regel unterhalb der Nachweisgrenze, können jedoch unter bestimmten physio- und pathophysiologischen Bedingungen erheblich zunehmen. Wie bei PAI-1 sind zahlreiche Zellarten (z. B. Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen, Mikroglia) zur PAI-2-Synthese befähigt. Die basale PAI-2-Expression ist in den meisten Zellen sehr gering, kann aber nach Stimulation (z.B. durch Entzündungsreize) stark ansteigen. Viele unterschiedliche Faktoren (TNF- α , IL1, cAMP, LPS, TGF- β , Hormone, Zytokine, vasoaktive Peptide, Toxine) können die PAI-2-Expression (teilweise) zellspezifisch bzw. entwicklungsabhängig regulieren (84, 99).

Die Funktion des PAI-2 ist nicht auf die Inhibition der PA beschränkt. Durch den intrazellulären PAI-2 werden Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung sowie die Zellprotektion bei Virusinfektionen beeinflusst (99, 181). Außerdem scheint intrazellulärer PAI-2 die Apoptose unterschiedlicher Zellen zu modulieren. Möglicherweise werden hierüber benigne und maligne Prozesse beeinflusst (45, 183).

1.1.2 Rolle des PA-Systems in der Tumorphathogenese

Die zentrale Rolle des PA-Systems in den Prozessen der Tumorprogression, -invasion und -metastasierung ist heute allgemein anerkannt.

Viele Tumorzellen sind *in vitro* zur Synthese und Sekretion von uPA, tPA, uPAR, sowie PAI-1 und -2 befähigt (110, 119, 129, 157) und Gewebeanalysen verschiedener invasiver menschlicher Tumoren weisen meist signifikant höhere Konzentrationen einzelner oder mehrerer Komponenten des PA-Systems als im korrespondierenden gesunden bzw. nicht malignen Gewebe auf (18, 27, 119, 145, 156). Höhere Konzentrationen einzelner Faktoren sind zudem auch im Serum von Karzinompatienten beschrieben worden (120, 152).

Durch zahlreiche Studien belegt ist auch eine Korrelation zwischen dem PA-System und der Tumorprogression bzw. der Prognose. Erhöhte uPA-, uPAR- und PAI-1-Expression ist vielfach mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, höheren Metastasierungsraten und verkürzten Gesamtüberlebenszeiten assoziiert (56, 59, 62, 65, 77, 144), während zunehmende PAI-2-Konzentrationen häufig mit einem positiven Krankheitsverlauf korrelieren (23, 156, 180).

Die Expression der Komponenten des PA-Systems findet in den Tumor- und/oder Stromazellen statt und variiert zwischen den Tumoren (7, 39). Differenzen bestehen auch hinsichtlich des Expressionsmusters der PA-Faktoren. Diese können auch innerhalb gleicher Tumorarten variieren, was möglicherweise auf unterschiedliche Differenzierungsstadien zurückzuführen ist (7). Im Gegensatz zum Expressionsort korreliert das Expressionsmuster mit der Tumorprogression bzw. Prognose.

Innerhalb des Karzinomgewebes sind die einzelnen Faktoren vorwiegend am Tumorrand/Tumorinvasionsfront lokalisiert, was auf eine erhöhte Tumorinvasion dieser Regionen zurückgeführt wird (54, 58, 112, 126, 136, 157).

Die Rolle des PA-Systems in der Tumorzellinvasion ist durch zahlreiche *in vitro* Untersuchungen belegt. Als wichtigster Mechanismus wird die zelloberflächen-assoziierte perizelluläre Proteolyse/Fibrinolyse durch verstärkte Plasmingenerierung angenommen (5, 91, 103). Diese ermöglicht die kontrollierte Degradation der EZM und ist Voraussetzung für die gezielte Tumorzellinvasion und Metastasierung (8, 130). Daneben sind jedoch auch andere, nicht-proteolytische Mechanismen, wie z.B. die Aktivierung und Modulation von Integrinen/Integrinfunktionen oder die Beeinflussung der Zelladhäsion, Chemotaxis und Zellproliferationsrate durch uPA/uPAR beschrieben worden, von denen ebenfalls ein Einfluss auf die Tumorprogression angenommen wird (7, 20, 150).

Wie oben aufgeführt, gehen neben uPA und dessen Rezeptor auch erhöhte PAI-1-Konzentrationen häufig mit verstärkter Tumorprogression und reduziertem Gesamtüberleben einher. Diese unerwarteten Ergebnisse waren Anlass zu weiteren Forschungen über Funktion und Auswirkung des Inhibitors in der Tumorphathogenese.

Inzwischen sind zahlreiche weitere Funktionen des PAI-1 bekannt, die unabhängig von der PA-Hemmung zellbiologische Eigenschaften wie Adhäsion und Invasion beeinflussen können (7, 38, 42). Als wichtigste Ursache für die tumorfördernde Wirkung des Inhibitors wird jedoch dessen Schutzfunktion vor exzessiver Degradation der umliegenden Matrix gesehen (13).

Im Gegensatz zu PAI-1 ist eine gesteigerte PAI-2-Expression im Karzinomgewebe häufig mit einem reduzierten Tumorwachstum, einer niedrigeren Metastasierungsrate sowie besserer Prognose assoziiert (23, 97, 156, 180). Weiterhin ließen sich durch in vitro Untersuchungen eine Hemmung der Matrixdegradation sowie Tumorzellinvasion durch erhöhte PAI-2-Konzentrationen nachweisen (84, 85, 108). Einzelne Studien am Endometriumkarzinom erzielten jedoch gegenteilige Resultate, was möglicherweise auf eine gewebespezifische Wirkung des Inhibitors zurückzuführen ist (115, 117).

Unabhängig von der PA-Hemmung könnte PAI-2 auch über intrazelluläre Effekte eine Rolle in der Tumorphathogenese spielen. So üben hohe intrazelluläre Konzentrationen des Inhibitors einen anti-apoptischen Effekt auf Zellen aus, worüber benigne und maligne proliferative Prozesse beeinflusst werden könnten (45, 183). In Abhängigkeit des Expressionsortes bzw. der zellulären Lokalisation könnten somit unterschiedliche Wirkungen des PAI-2 auf die Tumorprogression resultieren (145).

Neben dem zellmembrangebundenen uPAR konnte auch die lösliche Form des Rezeptors mit der Tumorphathogenese assoziiert werden. Sowohl der gespaltene uPAR (D2D3-Fragment) als auch der lösliche, ankerlose uPAR (suPAR) werden im Kulturmedium verschiedener Tumorzellen und in Körperflüssigkeiten zahlreicher Tumorpatienten (in erhöhten Konzentrationen) gefunden (146, 148, 152).

Über die Bedeutung des suPAR in der Tumorphathogenese liegen jedoch widersprüchliche Daten vor. Einige Studien berichten über eine negative Korrelation zwischen ansteigenden suPAR-Konzentrationen und der Prognose (94). In anderen Untersuchungen hingegen führten erhöhte Werte des löslichen uPAR zu einer starken Reduktion der Tumorzellproliferation und Plasminogenaktivierung/proteolytischen Aktivität in vitro sowie einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums und Metastasierung in vivo (146, 152). Ein möglicher

Zusammenhang zwischen dem endogenen uPA-uPAR-Signalsystem, der relativen suPAR-Konzentration und dessen pathophysiologischen Wirkung ist kürzlich beschrieben worden (75).

Die Funktionen des tPA in der Tumorphathogenese sind weit weniger erforscht als beim uPA. Allgemein scheint tPA jedoch eine eher untergeordnete Rolle in diesem Prozess zu spielen. Gleichwohl gibt es einige Publikationen, die auch tPA eine große Bedeutung in der Tumorprogression zusprechen. Das könnte insbesondere für tumorbiologische Prozesse des Pankreaskarzinoms zutreffen (119).

Über die Funktion und Bedeutung des tPA in der Tumorphathogenese liegen jedoch widersprüchliche Studienergebnisse vor (21, 65, 156).

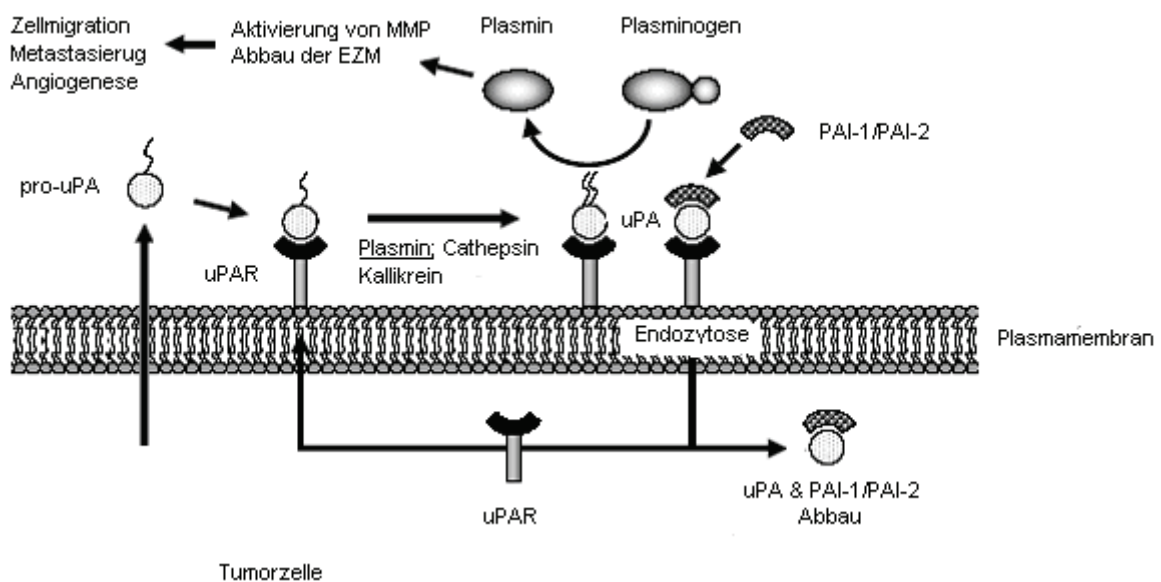


Abb. 1: Schematische Darstellung des Plasminogenaktivator-Systems (modifiziert nach 32)

1.2 Thrombospondin-1

1.2.1 Struktur des TSP-1

Das Glykoprotein TSP-1 wurde erstmals 1971 von Baenzinger und Mitarbeiter als erstes Mitglied der Thrombospondinfamilie nach Thrombinstimulation aus aktivierten humanen Thrombozyten isoliert (11).

Bis heute sind neben dem TSP-1 noch drei weitere Vertreter dieser Proteinfamilie bekannt. Aufgrund ihrer strukturellen Homologien werden sie in zwei Untergruppen eingeteilt. Der Subgruppe A werden die zwei homotrimeren Proteine TSP-1 und TSP-2 und der Subgruppe B die pentameren Proteine TSP-3, TSP-4 und COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) zugeordnet. Das Molekulargewicht dieser matrizellulären Proteine variiert zwischen 420 und 520kDa.

Homotrimeres TSP-1 wird aus drei identischen, durch Disulfidbrücken miteinander verbundenen Polypeptidketten (Untereinheiten) gebildet. Das Molekulargewicht beträgt ca. 450 kDa. Jede Untereinheit setzt sich aus zwei globulären Domänen (N-terminal und C-terminal) sowie einer langen und schmalen Verbindungsregion zusammen. Die Verknüpfung der Untereinheiten zu Trimeren ist in einer 22 -50 Aminosäuren großen, an der N-terminalen Domäne angrenzenden Region (Verbindungsregion) lokalisiert und über Disulfidbindungen eng benachbarter Cysteinreste realisiert. Die N-Glykosylierung wird auf 10kDa je Kette geschätzt (86, 147).

Jede Polypeptidkette setzt sich aus sechs unterschiedlichen Domänen zusammen, die nachfolgend kurz erläutert werden (Abbildung 2).

Die N-terminale Domäne ist etwa 200 Aminosäuren groß und enthält eine Vielzahl wichtiger Sequenzen, die unter anderem Eigenschaften wie Zelladhäsion, Hämostase, Chemotaxis und Angiogenese beeinflussen (29, 158, 178). Hier sind Bindungsstellen für Heparin (HBD), verschiedene Integrine ($\alpha 3\beta 1$ -, $\alpha 4\beta 1$ - und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin) und HSPG (heparan sulphate proteoglycans) lokalisiert (172).

Die 97 Aminosäuren umfassende Prokollagen Homologe Domäne befindet sich hinter der kurzen Verbindungsregion. Peptidsequenzen dieses Abschnittes sollen die Angiogenese und Chemotaxis hemmen (160).

Die Typ I Repeat Domäne enthält drei repetitive Sequenzen. In ihr sind wichtige Funktionen wie Zelladhäsion, Aktivierung des latenten TGF- β und Inhibition der Angiogenese lokalisiert

(87, 143, 167). Hier erfolgt die Bindung des CD36 Rezeptors und einer Vielzahl von Proteinen wie Plasminogen, Thrombin, Fibronectin und Kollagen (31).

Die folgende Typ II Repeat Domäne setzt sich ebenfalls aus drei sich wiederholenden Motiven zusammen und besitzt Homologien zu EGF und vielen Oberflächen- und Sekretionsmolekülen. Die genaue Funktion dieser Domäne ist unbekannt.

Die Typ III Repeat Domäne ist reich an Aspartylresten, über deren polare Hydroxylgruppen Kalzium gebunden wird. Die Kalziumbindungsfähigkeit beeinflusst die Konformation und diese wiederum die Funktion des Proteins (88). Diese Domäne enthält unter anderem die RGD-Sequenz, welche die Bindung an Integrine vermittelt und eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion spielt (88). Bedeutung hat diese Domäne auch in der Hemmung proteolytisch aktiver Enzyme, wie der neutrophilen Elastase und Cathepsin G (67).

Die globuläre karboxyterminale Domäne ist hochkonservativ und zeigt keine Homologien zu anderen bekannten Proteinsequenzen. Diese Region ist in zahlreichen Zellinteraktionen involviert. Von besonderem Interesse ist hierbei die Fähigkeit zur Interaktion mit dem IAP (Integrin Associated Protein, CD47), welches an der Regulierung verschiedener Integrinfunktionen beteiligt ist (57).

1.2.2 TSP-1-Rezeptoren und Liganden

Die Multidomänstruktur des TSP-1 ermöglicht eine Vielzahl von Interaktionen mit unterschiedlichen Bindungspartnern. Liganden des TSP-1 können andere Komponenten der EZM wie die Strukturproteine Fibronectin, Laminin und Kollagen sein (31). Hierüber vermittelt TSP-1 die Wechselbeziehung zwischen (Matrix)Proteinen und Zelloberflächenrezeptoren.

Zahlreich sind auch die Interaktionen zwischen TSP-1 und unterschiedlichen Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF, bFGF und TGF- β) sowie Proteasen (z.B. Cathepsin G, Elastase, Plasminogen). Durch die Bindung mit TSP-1 werden deren Eigenschaften direkt und/oder indirekt beeinflusst (140, 141).

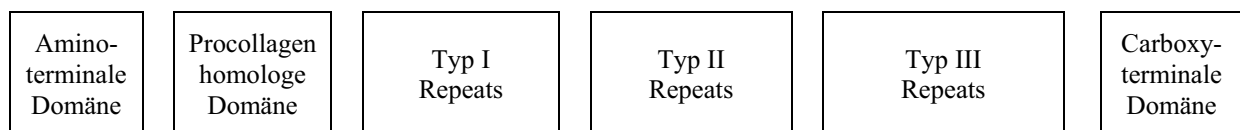
Auch an der Zelloberfläche verfügt TSP-1 über verschiedene Bindungspartner. Einer der wichtigsten Rezeptoren sind die Integrine und das Integrin Assoziierte Protein (IAP bzw. CD47). Über die RGD-Sequenz im Typ III Repeat bindet TSP-1 an das Integrin $\alpha v \beta 3$. Weitere Integrine, mit denen TSP-1 interagiert, sind $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 1$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha II b \beta 3$ oder $\alpha 2 \beta 1$. Über diese Interaktion werden zahlreiche biologische Prozesse moduliert (67). Das IAP bindet an die VVM-Sequenz der C-terminalen Domäne, wodurch Funktionen unterschiedlicher Integrine beeinflusst werden (57).

Eine Vielzahl von Nicht-Integrin-Rezeptoren sind inzwischen beschrieben worden. Zu diesen gehört der CD36 Rezeptor, ein Vertreter aus der Klasse B der Scavenger-Rezeptor-Familie. Der CD36 bindet an die CSVTCG-Sequenz der Typ I Repeat Domäne und beeinflusst hierüber wichtige Prozesse wie Zelladhäsion und Angiogenese (74, 153).

Ein weiterer Vertreter der Scavenger Rezeptoren aus der LDL-Rezeptorfamilie ist das LRP (Low-density lipoprotein Receptor-related Protein). Der LRP-Rezeptor ist am Metabolismus vieler Proteasen (u.a. MMPs) und Proteasen-Komplexe (u. a. uPA-PAI-1-Komplex) beteiligt (66). Auch freies TSP-1 kann nach Bindung über seine amino-terminale Domäne an das LRP schnell internalisiert und degradiert werden (104).

In den vergangenen Jahren wurde mit Angiocidin ein weiterer TSP-1 Rezeptor identifiziert. Er wird von unterschiedlichen Tumorzellen sowie Endothelzellen exprimiert, interagiert mit der CSVTCG-Sequenz des TSP-1 und spielt eine Rolle in der Zelladhäsion und Tumorprogression (141, 174).

Über die heparin-bindende Region in der amino-terminalen Domäne und einer noch nicht genau definierten Region im Typ I Repeat bindet TSP-1 mit hoher Affinität an Heparin, Sulfatiden und HSPG. Die Interaktion mit HSPG geschieht sowohl in der EZM als auch an der Zelloberfläche und kann zu Modifikationen des Zellverhaltens führen (169). Die Bindungsfähigkeit an HSPG ist auch Voraussetzung für eine effiziente Endozytose des TSP-1 über das LRP-1.



Aminoterminaler Domäne: Hämostase, Zelladhäsion, Endozytose, Chemotaxis, Stimulation der Angiogenese
Procollagenhomologe Domäne: Hemmung der Angiogenese, Hemmung der Chemotaxis
Typ I Repeats Domäne: Aktivierung des latenten TGF- β , Zelladhäsion, Hemmung der Angiogenese
Typ III Repeats Domäne: Zelladhäsion, Bindung von Kalzium
Carboxyterminale Domäne: Chemotaxis, Zellproliferation

Abb. 2: Schematische Darstellung der Multidomänstruktur und Funktionen einer Polypeptidkette des Thrombospondin-1 (modifiziert nach 147)

1.2.3 Expression und Funktion des TSP-1

Seit seiner Isolierung aus Thrombozyten ist TSP-1 in weiteren Zellen und Geweben beschrieben worden. Zahlreiche Zellarten wie Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen und Gliazellen sind zur Synthese des TSP-1 befähigt (73, 109, 131). Sezerniertes TSP-1 wird in die EZM inkorporiert. Das Matrixmolekül wurde im peritubulären Bindegewebe der Niere, in der Basalmembran der Drüsenepithelien von Haut und Lunge, in der dermalen-epidermalen Zone der Haut, in kleinen Blutgefäßen und zwischen glatten Muskelzellen nachgewiesen (177). Im Plasma gesunder Personen können mittlere TSP-1 Konzentrationen von 124 ng/ml, unter pathologischen Bedingungen jedoch erheblich höhere Werte gemessen werden (165, 179).

Im adulten Gewebe ist die TSP-1-Konzentration geringer als im embryonalen Gewebe und dessen Expression nimmt in proliferierenden Zellen zu (147). Das steht im Einklang mit der Annahme, dass TSP-1 als matrizelluläres Protein primär modulierende Funktionen im Verlauf akuter und subakuter Situationen ausübt. Physio- und pathophysiologische Prozesse, die mit einer Gewebeum- und Neubildung einhergehen (z.B. Wachstum, Entwicklung, Wundheilung, oder Tumorprogression), sind mit einer erhöhten TSP-1-Expression verbunden (51).

Wie andere matrizelluläre Proteine bindet TSP-1 an eine Vielzahl von Matrixproteinen und Zelloberflächenrezeptoren. Diese Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen führen zu intrazellulären Signalen, wodurch diverse Zelleistungen wie Adhäsion, Migration, Chemotaxis, Proliferation und Apoptose (74, 88, 95, 122, 159) moduliert werden. TSP-1 spielt als Hauptbestandteil der Alpha-Granula in Thrombozyten auch eine entscheidende Rolle in der irreversiblen Thrombusformation (51).

Auch Tumorzellen sind zur TSP-1-Expression befähigt (140). Während einige Karzinomzelllinien eine erniedrigte Expressionsrate im Vergleich zu gesunden Zellen aufweisen (140), sind die TSP-1-Konzentrationen im Tumorgewebe häufig erhöht.

Neben seiner Rolle in der Tumorphathogenese scheint TSP-1 auch in anderen pathophysiologischen Vorgängen involviert zu sein (51, 147).

1.2.4 TSP-1 in der Tumorphathogenese

Die komplexe und widersprüchliche Rolle des TSP-1 in der Tumorphathogenese wird durch zahlreiche Studien belegt.

Im Blut vieler Tumorpatienten wurden erhöhte TSP-1-Konzentrationen gemessen und bei Kolonkarzinompatienten waren die TSP-1-Serumwerte signifikant mit dem Tumorstadium und der venösen Tumorinvasion assoziiert (165, 179). Auch in den Geweben unterschiedlicher Tumoren ließen sich erhöhte TSP-1-Werte nachweisen und viele dieser Studien bestätigten eine positive Korrelation zwischen erhöhter TSP-1-Expression und klinischen Parametern wie Tumorstadium, Lymphknoten-Befall oder Metastasierung. Dabei stellte sich das Matrixmolekül als negativer prognostischer Marker in Bezug auf rezidivfreies Intervall und Überlebensrate heraus (124, 154, 161).

In weiteren in vitro- und vivo-Untersuchungen nahmen Zellmotilität und Invasion von Pankreas- und Mammakarzinomzellen in Anwesenheit von TSP-1 deutlich zu (124, 154, 161), während Antikörper gegen den TSP-1-Rezeptor zu einer signifikanten Hemmung der Tumorzelladhäsion und Ausbreitung führten (174).

Andere Studien wiederum erbrachten gegenteilige Resultate. So war der Verlust stromaler TSP-1-Expression im duktalem Carcinoma in situ (DCIC) mit einem aggressiveren histologischen Grad assoziiert (135) und beim Mamma- und Harnblasenkarzinom korrelierten niedrige TSP-1-Expressionen signifikant mit höheren Rezidivquoten und schlechterer Prognose. Hier erwies sich TSP-1 als ein positiver unabhängiger prognostischer Faktor (60, 135). In einer weiteren Studie am squamösen Hautkarzinom führte eine TSP-1-Überexpression zu extensiven Nekrosen, Abnahme der Gefäßdichte und Inhibition des Tumorwachstums, ohne jedoch die Tumorzellproliferationsrate sowie Apoptose zu beeinflussen (153). Vergleichbare Ergebnisse zeigten auch Untersuchungen an Mammakarzinomzelllinien (176), und im orthotopen Mausmodell konnten Tumorwachstum sowie Angiogenese des Pankreas- bzw. Harnblasenkarzinoms über eine systemische Behandlung mit TSP-1-Peptiden signifikant gehemmt werden (132, 182).

Die Herkunft des TSP-1 im Tumor kann von der malignen Zelle selbst und/oder von den peritumoralen Stromazellen abstammen (55, 71, 164, 173), wobei der Expressionsort interessanterweise für die TSP-Wirkung einiger Tumoren von Bedeutung zu sein scheint (71). Gegenstand intensiver Forschung der vergangenen Jahre war auch der Einfluss des TSP-1 auf die Angiogenese. Hierbei stellte sich das Matrixmolekül als potenter Modulator der Angiogenese heraus, der sowohl pro- als auch anti-angiogenetische Eigenschaften besitzt (78,

79, 82, 128, 132, 158). Die Angiogenese ist eng mit der Tumorphagenese verbunden und zahlreiche Studien konnten eine positive Korrelation zwischen zunehmender Gefäßbildung und fortgeschrittenem Tumorstadium sowie schlechter Prognose nachweisen (24, 80, 142).

Im folgenden Abschnitt sollen die komplexen Funktionen des TSP-1 im Prozess der Tumorprogression und Angiogenese kurz dargestellt und auf die möglichen Ursachen der konträren Studienergebnisse eingegangen werden.

In der Tumorphagenese sind Zelladhäsion und Motilität von zentraler Bedeutung. Beide Phänomene können durch TSP-1, welches adhäsive, haptotaktische und chemotaktische Eigenschaften besitzt, beeinflusst werden (147). Vermittelt werden diese TSP-1-Wirkungen unter anderem über Integrinrezeptoren, mit denen das Matrixmolekül direkt oder indirekt interagieren kann (141).

Ein wichtiges Integrin in der Tumorphagenese ist das $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin (25). Über diesen Vitronektinrezeptor vermittelt TSP-1 die Adhäsion vieler Zellen (57, 163). Darüber hinaus bindet das Matrixmolekül mit der VVM-Sequenz der C-Domäne an das Integrin-assoziierte Protein (IAP bzw. CD47) wodurch die Funktionen dieses Integrins (aber auch anderer Integrine wie z.B. $\alpha\text{2}\beta\text{3}$ -Integrin) moduliert werden können. Beispielsweise führt diese Interaktion bei menschlichen Melanomzellen zur Aktivierung diverser Kinasen sowie einer Zunahme der Zellmigration und Invasion (163). Interessanterweise ist jedoch die Überexpression des intakten TSP-1 mit einer signifikanten und dosisabhängigen Reduktion des Tumorwachstums und Metastasierung der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435 verbunden, wogegen TSP-1 mit fehlender C-Domäne die Tumorprogression fördert (176).

In einer weiteren Studie an Mammakarzinomzelllinien wurde die pro-adhäsive und chemotaktische Wirkung des TSP-1 über das $\alpha\text{3}\beta\text{1}$ -Integrin vermittelt. Hierbei spielte die Konformation des Matrixmoleküls eine entscheidende Rolle, denn nur immobilisiertes, nicht jedoch lösliches TSP-1 war zur Interaktion mit diesem Integrin an der Zelloberfläche befähigt. Die Aktivität des Integrins ließ sich wiederum durch unterschiedliche pharmakologische und physiologische Signale beeinflussen, wobei gleiche Stimuli je nach Zelllinie unterschiedliche Effekte zeigten (29).

Über das gleiche Integrin werden auch Zellmigration und Proliferation beeinflusst. In einer Studie an Endothelzellen wurden beide Prozesse durch immobilisiertes TSP-1 nach Verlust der Zell-Zell-Kontakte gefördert, während lösliches TSP-1 unabhängig von der CD36-Expression Zellmigration, Proliferation und Angiogenese - vermutlich über Interaktion mit dem immobilisierten Matrixmolekül - hemmten. Das bedeutet, dass neben dem

Rezeptorexpressionsmuster und der Konformation des Moleküls auch die Zell-Zell-Kontakte die Wirkung des TSP-1 modulieren können (30).

Neben den Integrinen spielen weitere Rezeptoren in der Vermittlung der TSP-1-Wirkung eine wichtige Rolle. Unter diesen ist CD36 von besonderer Bedeutung. Dieser Zelloberflächenrezeptor wird von unterschiedlichen Zellarten exprimiert und ist in Zellprozessen wie Adhäsion und Apoptose involviert. Auch einige Tumorzelllinien exprimieren CD36 auf ihrer Zelloberfläche (33) und vermitteln hierüber die Adhäsion an TSP-1. Die genaue Funktion von CD36 auf den Tumorzellen ist noch unklar; möglicherweise werden hierüber Invasions- bzw. Metastasierungseigenschaften beeinflusst (147, 153).

Durch zahlreiche Studien belegt ist der Zusammenhang zwischen der CD36-Expression auf Endothelzellen und der anti-angiogenetischen Wirkung des TSP-1. Die Bindung des Matrixmoleküls an diesen Rezeptor wird über die CSVTCG-Sequenz der Typ I Repeat Domäne vermittelt und induziert die Zellapoptose über die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalmoleküle. Die Folge ist eine Hemmung der Endothelzellmigration und Angiogenese (40, 74, 140, 167). Die Suppression des Endothelzellwachstums/Gefäßbildung durch TSP-1 bzw. seiner Peptide wurde in vielen Studien mit einer signifikanten Inhibition des Tumorwachstums assoziiert (132). Inzwischen sind noch weitere anti-angiogenetische Regionen des TSP-1-Moleküls identifiziert worden (72, 160).

Bezüglich der Wirkung des intakten TSP-1 auf die Angiogenese besteht jedoch eine kontroverse Datenlage. So übt immobilisiertes TSP-1 bei fehlender CD36-Expression einen proliferations- und migrationsfördernden Effekt auf Endothelzellen aus (30). In einer anderen Studie erhöhte intaktes TSP-1 dosisabhängig die Endothelzellinvasion im Matrixgel und die Angiogenese in der Kornea (158).

Möglicherweise fungiert TSP-1 als Quelle pro- und anti-angiogenetischer Fragmente, die durch definierte Proteolyse freigesetzt werden. So zeigte ein 25kDa großes Fragment aus der N-terminalen-Domäne des TSP-1 einen pro-angiogenetischen Effekt, während ein anderes, 140kDa Fragment mit fehlender N-terminaler-Domäne die FGF-2 induzierte Angiogenese hemmte. Demzufolge könnten in Abhängigkeit von Verfügbarkeit und Funktionalität bestimmter Molekülfragmente unterschiedliche Wirkungen auf die Tumorphathogenese resultieren (158). Unbestritten ist heute jedoch die anti-tumorale bzw. -angiogenetische Wirkung der isolierten Typ I Domäne aus TSP-1 (132, 167, 181).

Ein weiterer bekannter Nicht-Integrin-Rezeptor ist das Angiocidin. Dieser, mit der CSVTCG-Sequenz des TSP-1 interagierende Zelloberflächenrezeptor wird von unterschiedlichen Tumorzellen (sowie Endothelzellen) exprimiert und ist in der Tumorzelladhäsion, Invasion und Metastasierung involviert (141, 174).

Die Wirkung des TSP-1 wird zusätzlich durch andere Faktoren beeinflusst. So wurden biphasische, konzentrationsabhängige Effekte des TSP-1 beschrieben. Demnach dominiert bei niedrigen TSP-1-Konzentrationen die anti-angiogenetische Wirkung über CD36, während zunehmende Konzentrationen die Abnahme desselben an der Zelloberfläche fördern, was einen überwiegend pro-angiogenetischen Stimulus des TSP-1 über LAP zur Folge hat (40).

Eine weitere interessante Beobachtung wurde anhand einer Studie eines Mammakarzinoms gemacht. Nach initialer Hemmung der Angiogenese und des Tumorwachstums durch TSP-1 nahmen Gefäßproliferations- und Tumorwachstumsraten wieder zu. Die Autoren führen dies auf eine, durch TSP-1 begünstigte, kompensatorisch gesteigerte VEGF-Synthese zurück und weisen dabei auf die mögliche Gefahr des TSP-1 als anti-angiogenetisches Therapeutikum hin, welches zu Resistenzbildung sowie aggressiveren Tumoren führen könnte (55).

TSP-1 interagiert auch auf vielfältige Weise mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF, bFGF und TGF- β) (143, 170). Von besonderem Interesse ist hierbei die Aktivierung des latenten TGF- β durch TSP-1 (143).

TGF- β ist ein multipotenter Wachstumsfaktor, der in Abhängigkeit vom Tumor bzw. Tumorstadium sowohl tumorfördernde als auch tumorsuppressive Eigenschaften aufweist (46). Die enge Verbindung zwischen TSP-1 und TGF- β und dessen mögliche Bedeutung für die Tumorphathogenese ist inzwischen eingehend untersucht worden.

So konnte beispielsweise eine durch TGF- β indirekt vermittelte tumorhemmende Wirkung des TSP-1 nachgewiesen werden (102). Im Gegensatz dazu förderte in einer anderen Studie die Aktivierung des TGF- β durch TSP-1 die Tumorprogression (47).

Eine besondere Bedeutung scheint hierbei der Modulation des PA-Systems zuzukommen. In mehreren Untersuchungen wurde unter dem Einfluss des TGF- β bzw. TSP-1 ein deutlicher Anstieg des uPAR, zelloberflächengebundenem uPA und der PAI-1-Expression bei gleichzeitig signifikant zunehmender Tumorzellinvasion beobachtet. Es ließ sich zumindest bei einigen Zelllinien die indirekte Wirkung des TSP1 über eine verstärkte TGF- β -Aktivität nachweisen (1, 4, 10).

Auch im Pankreaskarzinom ist der Einfluss des TGF- β auf die Tumorprogression mehrfach beschrieben und ein Zusammenhang mit dem MMP- und PA-System in diesem Prozess bestätigt worden (2, 3, 47).

Das PA-System ist für die Tumorpathogenese von zentraler Bedeutung. Wie bereits dargestellt, werden einzelne Komponenten des PA-Systems über die TSP-1 vermittelte Aktivierung des TGF- β beeinflusst.

Darüber hinaus besitzt das Matrixmolekül vermutlich auch eine direkte modulierende Wirkung auf das PA-System. Untersuchungen an einer transfizierten Mammakarzinomzelllinie (MDA-MB-435) zeigten einen signifikanten Anstieg der uPAR- und PAI-1-Expression bei den Zellen mit erhöhter TSP-1-Synthese. Parallel dazu stieg auch die Tumorzellinvasion deutlich an, wogegen die Tumorzelladhäsion signifikant abnahm. Als Ursache hierfür konnte eine proportional zur TSP-1-Expression zunehmende zellassoziierte uPA- bzw. Plasminaktivität aufgrund erhöhter zellgebundener uPAR-Konzentrationen verantwortlich gemacht werden. Im Gegensatz zu den oben angeführten Studien wurde die Wirkung des TSP-1 unabhängig von TGF- β vermittelt (5). Ein möglicher Mechanismus wäre die Interaktion des TSP-1 mit dem $\alpha v \beta 3$ -Integrin. Die Stimulation dieses Rezeptors ist mit einer erhöhten uPAR- und PAI-1-Expression sowie der Konzentration des zelloberflächenassoziierten Plasmins verbunden (81), dessen Hemmung hingegen führt zu einer Reduktion von Tumorwachstum und Angiogenese (25). Spezifische Untersuchungen liegen jedoch derzeit nicht vor.

Neben dem PA-System spielen die MMPs eine essentielle Rolle in der Tumorpathogenese (96) und auch dieses System wird durch TSP-1 beeinflusst. Das geschieht zum einen indirekt über eine erhöhte Plasminaktivität, jedoch weisen einige Veröffentlichungen auch auf eine direkte Modulation spezifischer MMPs (MMP-2 und MMP-9) bzw. TIMPs (TIMP-1 und -2) durch TSP-1 hin (16, 127, 137, 158). Eine sichere Beurteilung ist wegen einer unzureichenden Datenlage sowie sich häufig widersprechender Studienergebnisse derzeit nicht möglich.

Abschließend soll noch ein weiterer pathogenetischer Mechanismus des TSP-1 in Bezug zur Metastasierung kurz dargestellt werden. Viele Tumorerkrankungen sind mit einer verstärkten Thrombozytenaktivierung und -aggregation assoziiert, was wiederum mit einem erhöhten Metastasierungspotential einhergeht. Tumorzellen können sich in die Thrombozytenaggregate einlagern und gelangen anschließend als Tumor-Plättchen-Embolus in die Zielorgane der Metastasierungswege. In diesem Prozess scheint auch dem TSP-1 eine wichtige Rolle

zuzukommen. So induziert das Glykoprotein die (irreversible) Plättchenaggregation und schützt darüber hinaus über seine Anti-Plasmin-Aktivität den Embolus vor dessen fibrinolytischen Abbau (140).

Anhand tierexperimenteller Studien konnte die Bedeutung des TSP-1 im Metastasierungsprozess mehrfach bestätigt werden (140).

1.3 Zielsetzung

Der kontrollierte Abbau der Tumorzell-assoziierten EZM ist ein essentielles Ereignis in den komplexen Prozessen der Tumorprogression, -invasion und -metastasierung. Von zentraler Bedeutung ist hierbei das PA-System, dessen Komponenten durch zahlreiche Faktoren moduliert und reguliert werden.

In viele tumorpathologische Prozesse involviert ist auch das Matrixmolekül TSP-1. Einige Veröffentlichungen deuten auf eine Modulation des PA-Systems als einen der möglichen pathogenetischen Mechanismen des TSP-1 hin. Systematische Daten zur Beeinflussung des perizellulären fibrinolytischen Systems an unterschiedlichen Karzinomzelllinien liegen jedoch nicht vor.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll anhand fünf unterschiedlicher Pankreaskarzinomzelllinien und zwei Vergleichszelllinien eine systematische Untersuchung über den Einfluss des TSP-1 auf die perizelluläre fibrinolytische Aktivität und die Expression der Komponenten des PA-Systems durchgeführt werden.

Hierbei stehen folgende Fragen im Mittelpunkt:

1. Übt TSP-1 einen Einfluss auf die perizelluläre fibrinolytische Aktivität der untersuchten Zelllinien aus? Sind Differenzen zwischen den Zelllinien zu beobachten?
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen (verändertem) Expressionsmuster des PA-Systems und der perizellulären fibrinolytischen Aktivität?
3. Findet eine Modulation des Expressionsmusters der PA-Komponenten unter dem Einfluss des TSP-1 statt? Bestehen Unterschiede zwischen den Zelllinien?
4. Wirkt sich die Modulation des PA-Systems durch TSP-1 auch auf die sekretorischen Leistungen der Zellen aus?
5. Sind Wirkunterschiede zwischen der löslichen bzw. immobilisierten TSP-1-Stimulation nachweisbar?

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Als zelluläre Modelle wurden insgesamt fünf Zelllinien humaner Pankreaskarzinome und eine Zervixkarzinom- bzw. Mammakarzinomzelllinie verwendet.

Vergleichszelllinien

Als Vergleichszelllinien kamen die humane Zervixkarzinomzelllinie HeLa (DSMZ Nr. ACC 57) und die humane Mammakarzinomzelllinie MCF-7 (DSMZ ACC 115) zur Anwendung.

Die Zelllinie **HeLa** wurde 1951 aus einem epithelalem Zervixkarzinom (Adenokarziom) einer 31jährigen Patientin etabliert. Die Zelllinie **MCF-7** stammt aus Zellen eines Pleuraergusses einer 69jährigen Patientin mit metastasierendem Mammakarzinom und wurde 1970 etabliert. Beide Zelllinien bilden epithelähnliche, adhärente und als Monolayer wachsende Zellen. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 50 Stunden.

Pankreaskarzinomzelllinien

Die folgenden fünf humanen Pankreaskarzinomzelllinien wurden verwendet:

BxPC-3 (ATCC Nr. CRL-1687): Die Zelllinie entstammt einem Adenokarzinom des Pankreas und bildet epitheliale, adhärent wachsende Zellen. Im Nacktmausmodell entwickeln die Zellen subkutane Tumoren. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 24 Stunden.

Panc-1 (ATCC Nr. CRL-1469): Die Zelllinie stammt aus dem Ductus eines epithelialen Pankreaskarzinoms. Die epithelialen adhären Zellen wachsen als Monolayer mit einer Verdopplungszeit von ca. 52 Stunden.

AsPC-1 (ATCC Nr. CRL-1682): Die Zelllinie wurde aus dem Xenograft (Gewebe) einer Nacktmaus gewonnen, dessen ursprüngliche Abstammung Asciteszellen einer Patientin mit metastasierendem Pankreasadenokarzinom sind. Die adhärent wachsenden Zellen haben eine Verdopplungszeit von ca. 34 Stunden.

Capan-1 (DSMZ Nr. ACC 244): Die Zelllinie wurde 1974 aus einer Lebermetastase eines Adenokarzinoms des Pankreas etabliert. Die Zellen wachsen in Nacktmäusen, bilden Metastasen und sind 5-FU resistent. Morphologisch zeichnen sich die Zellen durch ein fibroblastisch, semi-konfluentes und adhären Wachstum aus und bilden lockere adhären Zellfoci. Die als Monolayer wachsenden Zellen haben eine Verdopplungszeit von ca. 97

Stunden. Die Herstellung einer Einzelzellsuspension gestaltete sich bei dieser Zelllinie besonders schwer.

PaCa-44: Die Zelllinie entstammt einem Adenokarzinom des Pankreas und wurde freundlicherweise von Professor M. Löhr zur Verfügung gestellt. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 35 Stunden.

Zellkulturbedingungen

Sämtliche Zelllinien wurden in Kulturflaschen (Greiner, Solingen) ausgesät.

Das Kulturmedium setzte sich wie folgt zusammen: 89 % RPMI (RPMI-1640 Medium, 2,0 g/l NaHCO₃, 0,532 g/l N-Acetyl-l-alanyl-l-glutamin; Biochrom), 10 % fetales Kälberserum (GIBCO BRL), 1 % Penicillin/Steptomycin 100 mg/ml (Biochrom). Die Zellen wurden in 75 cm² Polystyren Flaschen mit Mikrofilter bei 37°C und 5% CO₂ in einem befeuchteten Begasungsbrutschrank inkubiert. Die Zellarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen in einer Reinraumwerkbank statt. Das Zellkulturmedium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Hierbei wurden die Zellen nach Abnahme des alten Mediums mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS mit Ca²⁺/Mg²⁺) gespült und anschließend mit frischem Kulturmedium bedeckt (12 ml/75 cm²).

Zur Herstellung einer Zellsuspension wurden die Kulturen nach vorsichtiger Spülung mit sterilem PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) und Zugabe einer sterilen Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 % in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺, 2 ml/75 cm²) für 5 Minuten in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in serumfreiem Nährmedium aufgenommen, durch Zentrifugation bei 70 g für 5 min sedimentiert und in frischem Kulturmedium resuspendiert.

Das Passagieren (Umsetzen) der Zellkulturen erfolgte bei einer 90 bis 100% Konfluenz. Nach Herstellung einer Zellsuspension, wurden 3-6 x 10⁶ Zellen/75cm² erneut in Kultur genommen. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte mittels Zellzählung (Neubauer-Zählkammer). In den Versuchen wurden möglichst identische Passagen der jeweiligen Zelllinien eingesetzt. Um die Gefahr zellbiologischer Veränderungen zu reduzieren, kamen nur die jeweils ersten 12 Passagen zur Anwendung.

Bestimmung der Vitalität:

Die Zellkulturen wurden regelmäßig auf ihre Vitalität kontrolliert. Hierfür wurden je 27 µl einer 0,5%igen Trypanblau-Lösung (Biochrom KG) mit 37 µl der Zellsuspension gemischt und 5 min bei 37°C inkubiert. Bei spätapoptotischen bzw. nekrotischen Zellen gelangt Trypanblau durch Verlust der Permeabilitätsschranke der Zellmembran in die Zelle. Der Anteil blauer Zellen kann lichtmikroskopisch in einer Zählkammer ermittelt werden.

Das gleiche Verfahren wurde auch zur Kontrolle der Zellvitalität in den Mikrotiterplatten (MTP) in Anschluss der Messversuche angewendet. Hierbei wurde wie folgt vorgegangen: Abnahme der Überstände und einmaliges Waschen (RPMI-1640) der zu untersuchenden Wells. Zugabe von Medium (74 µl) und Trypanblau (54 µl) und 5-minütige Inkubation bei 37°C. Vorsichtiges Entfernen des Überstandes, zweimaliges Waschen (RPMI-1640) und abschließende mikroskopisch Untersuchung.

2.2 Plasminogenisolierung

Das Plasminogen wurde aus Humanplasma mittels Affinitätschromatographie an Lysin-Sepharose gereinigt. Es kam das semiautomatische Econo-Chromatographiesystem (Bio-Rad) zur Anwendung.

Nach Auftrag des Plasmavolumens (150-200 ml) wurde die Lysin-Sepharose-Säule mit 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,5 gespült, bis in der UV-Detektion wieder die Grundlinie erreicht wurde. Unspezifisch an die Säule gebundene Proteine wurden mit 0,5 M NaCl in Phosphatpuffer eluiert. Der spezifische Eluationsschritt bestand im Auftrag von 0,2 M Epsilon-Aminocaprinsäure (E-ACA). Die Peakfraktionen unter diesen Eluationsbedingungen wurden gesammelt.

Die gepoolten Fraktionen wurden einer Gelfiltration an Sephadex G-25 in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4 unterzogen, um niedermolekulare Komponenten inklusive E-ACA vom Plasminogen abzutrennen. Die Proteinkonzentrationen im Eluat wurden auf MTP mit Humanserumalbumin als Standard mit einer Farbstoffbindungsmethode durchgeführt.

Der Nachweis der Reinheit der Präparate erfolgte mit der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Für die Untersuchungen kam eine Präparation mit einer Plasminogenkonzentration von 0,72 mg/ml zur Anwendung.

2.3 Isolierung von TSP-1 aus humanen Thrombozyten

Das humane Thrombospondin-1 wurde aus einem max. 48h alten Spender-Thrombozytenkonzentrat isoliert.

Folgende Puffer kamen zur Anwendung:

- a) Thrombozytenwaschpuffer: 0,15 M NaCl, 0,02 M Tris, 0,005 M Glucose, 10 Vol% ACD, pH 7,4
- b) Aggregationspuffer: 0,15 M NaCl; 0,05 M Tris
- c) Tris-Äquilibrierungspuffer 0,15 M, pH 7,4
- d) Tris-Elutionspuffer: 0,05 M Tris, pH 7,4 mit 0,25/0,35/0,55/2.0 M NaCl

Das Thrombozytenkonzentrat wurde mit dem gleichen Volumen an Thrombozytenwaschpuffer (pH 6,5, eingestellt mit 1 M Citronensäure) versetzt und bei 900 g, 4°C für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in Thrombozytenwaschpuffer resuspendiert, 6 min bei 200 g, 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet erneut mit Thrombozytenwaschpuffer resuspendiert und zentrifugiert. Das Sediment wurde dann in Aggregationspuffer resuspendiert, 3 U/ml humanes Thrombin (SIGMA) hinzugegeben und die Suspension bei 37°C für 2 min gerührt. Nach erfolgter Thrombozytenaggregation wurde das Thrombin durch Zugabe von 6 U/ml Hirudin neutralisiert, die Aggregate für 30 min in einem Eisbad sedimentiert und der abgenommene Überstand für 12 min bei 900 g, 4°C zentrifugiert. Die Reinigung des Proteins erfolgte mittels Affinitätschromatographie an einer Heparin-Sepharose-Säule. Die Säule wurde mit Äquilibrierungspuffer gespült, der TSP-haltige Extrakt aus den Thrombozyten aufgetragen und mit Elutionspuffer mit steigendem NaCl-Gehalt eluiert.

2.4 Fibronektin

Das Fibronektin stammte aus Humanplasma. Der Reinheitsgrad wurde mit > 95% (SDS-PAGE) angegeben (Roche).

2.5 Analysen der perizellulären fibrinolytischen Aktivität

2.5.1 Voruntersuchungen

Zur Optimierung der Messbereiche wurden Vorversuche durchgeführt.

Festlegung der Plasminogenkonzentration:

50000 Zellen/Well wurden in drei Reihen einer Mikrotiterplatte (MTP, 96-Napf-Zellkulturplatten, Greiner) eingesät und bis zu einer 90%igen Konfluenz inkubiert.

Anschließend wurden Aktivitätsmessungen mit unterschiedlichen Plasminogenkonzentrationen von jeweils 10, 20 bzw. 50 µg/ml pro Reihe durchgeführt (s. 2.5.2). Über die graphische Darstellung der Messwerte konnten dann optimale Plasminogenkonzentrationen festgelegt werden.

Optimierung der Zelldichte:

Aus Zellkulturuntersuchungen ist bekannt, dass sich unter konfluenten Wachstumsbedingungen die Stoffwechselsituation der Zelle verändern bzw. reduzieren kann. Um einen solchen Einfluss der Zelldichte auf die Zelleistung zu überprüfen, wurde die fibrinolytische Aktivität nach variiertem Zelleinsatz analysiert. Hierfür wurde in Schritten von je 25000 Zellen/Well die Zellzahl jeder Reihe einer MTP bis zu einer Einsaat von 150000 Zellen/Well gesteigert. Nach einer 24-stündigen Inkubation folgte dann die Aktivitätsbestimmung mit anschließender Vitalitätskontrolle (s. 2.1) und Proteinkonzentrationsbestimmung. Über die erhobenen Parameter (Zellzahl, Wachstumsrate und Aktivität) konnten dann die optimalen Zelldichten ermittelt werden.

Quantifizierung der Zellen durch Proteinanalyse:

Eine weitere Voruntersuchung galt der Quantifizierung der Zellen durch Proteinkonzentrationsanalysen. Hierdurch sollte ein Bezug von Proteingehalt zur Zellzahl hergestellt und deren Linearität zueinander überprüft werden. Die Einsaat der Zellen von 25000 bis 150000 Zellen/Well folgte dem obigen Arbeitsschema. Die MTP wurde gleich danach für 10 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Die anschließende Proteinbestimmung (neue MTP, 10 µl/Well Probe, Messung bei 550 nm) wurde nach der BCA Methode (BCA Protein Assay, Pierce) unter Aufstellung einer Standardkurve und Doppelwertbestimmung durchgeführt.

Mit der gleichen Vorgehensweise wurden auch die Zellquantifizierungen nach Matrix- bzw. löslicher TSP/FN-Stimulation durchgeführt und mit denen der unstimulierten Zellen verglichen (s. unten).

2.5.2 Aktivitätsanalysen unter basalen Zellkulturbedingungen

Für die Messung der fibrinolytischen Aktivität fanden MTP mit 96 Vertiefungen Verwendung. Zellsuspension und Zellzahlbestimmung wurden nach dem unter 2.1 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Einsaat erfolgte unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Voruntersuchungen. Nach 24stündiger Inkubation im Begasungsbrutschrank wurde das Medium vollständig abgenommen und nach zweimaligem Waschen der Zellen mit

PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) durch 200 μl /Well RPMI (ohne Phenolrot) mit der entsprechenden (zelllinienabhängigen) Plasminogenkonzentration ersetzt. Die erste Linie blieb durchgehend zur Leerwertbestimmung plasminogenfrei. Abschließend wurde in jedes Well 10 μl eines plasmin-spezifischen chromogenen Substrates (S-2251, Haemochrom bzw. Spectrozyme UK, American Diagnostica, Endkonzentration 0,4 mM) pipettiert. Die Messung der Extinktion am Plattenreader bei 405 nm erfolgte alle 30 min über 4 Stunden.

Die Versuchsreihe wurde mit einer Vitalitätskontrolle abgeschlossen.

2.5.3 Aktivitätsanalysen unter Amiloridhemmung

Amilorid findet als Na^+ -Kanalblocker pharmakologische Anwendung als Diuretikum. Eine weitere Eigenschaft des Amilorids ist die spezifische Hemmung des uPA, während die enzymatische Aktivität des tPA unbeeinflusst bleibt (168).

Im Expressionsmuster der beiden Aktivatoren uPA und tPA können je nach Zelllinie qualitative und quantitative Unterschiede bestehen.

Der folgende Versuch sollte durch die Behandlung der Zellen mit Amilorid und anschließender Aktivitätsbestimmung eine Aussage über die relative quantitative Bedeutung des uPA in den verwendeten Zelllinien ermöglichen.

Um differenziertere Ergebnisse zu erzielen, wurden verschiedene Vorgehensweisen der Amiloridbehandlung angewendet. Hierbei wurden einige Zellen vor der Aktivitätsbestimmung über 24 Stunden in einer Amiloridlösung inkubiert, der anschließenden Messzyklus erfolgte dann mit oder ohne Amilorid, andere Zellen wiederum erhielten die Amiloridlösung nur während der Messungen. Wie in allen anderen Versuchsreihen, erfolgten die Messungen im Vergleich zu unbehandelten Zellkulturen gleicher Passage.

In 4 Reihen einer MTP wurden die Zellen eingesät und 24 Stunden inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) wurden 200 μl RPMI (ohne Zusätze) in jedes Well pipettiert. Für die Reihe 3 war dem RPMI eine 0,1 mM Amiloridlösung beigelegt worden. Nach einer weiteren 24-stündigen Inkubation und nachfolgenden Waschvorgängen wurde die unter 2.5.2 beschriebene Aktivitätsbestimmung durchgeführt. Der RPMI-Lösung von Reihe 3 und 4 waren hierbei außer den üblichen Plasminogen- und Substratkonzentrationen noch Amilorid (0,1 mM) zugesetzt worden

Den Messungen folgte anschließend eine Vitalitätskontrolle (s. 2.1).

2.5.4 Aktivitätsanalysen unter Matrixstimulation

Zur Matrixbeschichtung wurden TSP-1 bzw. FN in Konzentrationen von 10 µg/ml und BSA als 1,5% Lösung verwendet. Für alle folgenden Arbeitsschritte wurde als Lösungsmittel und Waschsubstanz stets PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) verwendet

In je einer MTP-Reihe wurden jeweils 100 µg/Well der entsprechenden Lösung pipettiert und abgeklebt über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Morgen wurde der Überstand abgenommen und alle beschichteten Wells einmal mit einer 0,1% BSA Lösung gespült. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden anschließend 100 µl einer 1,5% BSA-Lösung in jedes Well gegeben und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach drei Waschvorgängen erfolgte dann die Zelleinsaat. Als Bezugspunkt wurde eine MTP-Reihe ohne Matrix („basal“) mit Zellen gleicher Passage verwendet. Das weitere Vorgehen glich den unter 2.5.2 beschriebenen Arbeitsschritten.

Um einen möglichen Einfluss der Matrix auf das Wachstumsverhalten der Zelllinien auszuschließen, wurden nach den Aktivitätsbestimmungen und Vitalitätskontrollen (s. 2.1) Proteinbestimmungen zur Messung der Zellquantität durchgeführt (s. 2.5.1).

2.5.5 Aktivitätsanalysen unter löslicher TSP-1- und FN-Stimulation

Drei Reihen einer MTP wurden mit Zellen besät und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) wurden 100 µl RPMI-Medium (ohne Zusätze) in jedes Well gegeben. Das RPMI-Medium der zweiten und dritten Reihe enthielt zusätzlich jeweils 40 µg/ml TSP bzw. FN. In einigen Versuchsreihen kamen auch TSP Konzentrationen von 10 µg/ml zur Anwendung. Es folgte eine weitere 24-stündige Inkubation im Begasungsbrutschrank und anschließend die unter 2.5.2 erläuterte Aktivitätsbestimmung. Auch in diesem Versuch wurde stets eine unstimulierte Zellkultur gleicher Passage als Kontrolle mitgeführt.

Um einen möglichen Einfluss des löslichen TSP bzw. FN auf das Wachstumsverhalten der Zelllinien auszuschließen, wurde auch hier den Aktivitätsbestimmungen und Vitalitätskontrollen (s. 2.1) eine Proteinbestimmungen zur Messung der Zellquantität nachgestellt (s. 2.5.1).

2.6 Quantifizierung des uPA, uPAR, PAI-1 und PAI-2

2.6.1 Herstellung der Zellkulturüberstände („konditionierte Medien“) und Zellextrakte

Die folgenden Vorbereitungen wurden für jede Zelllinie zweimal mit unterschiedlichen Passagen wiederholt.

Für die Herstellung der Medien kamen 6 Petrischalen pro Zelllinie zur Anwendung. Zur Matrixbeschichtung wurden in zwei dieser Schalen je 5 ml einer TSP-1- bzw. FN-Lösung (Konzentration: 10 µg/ml), und in einer weiteren Schale 5 ml einer 1,5% BSA-Lösung gegeben, diese dann mit Folien abgeklebt und für 24 Stunden bei 4°C belassen. Anschließend wurde der Überstand der Petrischalen mit der TSP- bzw. FN-Matrix abgesaugt, beide Schalen mit 0,1%igem BSA gewaschen, und nach Zugabe von 5 ml einer 1,5% BSA-Lösung für weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden alle drei beschichteten Petrischalen noch dreimal mit PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen.

In diesen 3 beschichteten und weiteren 4 unbeschichtete Petrischalen wurden je ca. 1,5 Mio. Zellen einer Zelllinie gleicher Passage eingesät und für 24 bis 48 Stunden bei 37°C im Begasungsbrutschrank inkubiert. Nach Ausbildung eines sukongruenten Zellrasens von ca. 90% wurden die Petrischalen zweimal mit PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen und dann mit je 5ml RPMI-Medium (ohne Zusätze) bedeckt. Zur Herstellung der konditionierten Medien unter Einfluss des löslichen TSP-1 bzw. FN waren im RPMI-Medium von zwei unbeschichteten Schalen zusätzliche TSP-1- bzw. FN-Konzentration von je 40 µg/ml enthalten.

Nach einer 24stündigen Inkubation bei 37°C im Begasungsbrutschrank wurden alle Zellkulturüberstände vorsichtig abgenommen. Um tote Zellen bzw. Zelldebris aus dem Medium zu entfernen folgte eine 10-minütige Zentrifugation (15000 rpm, 4°C) mit anschließender Poolung und Portionierung der Überstände. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

Zur Gewinnung der Zellextrakte wurde wie folgt vorgegangen:

Nach Entfernung der Zellkulturüberstände wurden die Kulturschalen zweimal vorsichtig mit warmen (37°C) PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen und die Überstände restlos abgesaugt. Dann wurde 1 ml eiskalter Lysepuffer (50 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl, 0,25% Na-Deoxycholat; 1% (v/v) Np-40) in jede Petrischale hinzugegeben und nach kurzer Einwirkzeit mit einem Zellschaber die Zellen vom Boden gelöst. Dem Lysepuffer waren Proteinaseinhibitoren (Phenylmethylsulfonylfluorid und N-Ethylmaleimid) beigefügt, um eine Inaktivierung der zu untersuchenden Enzyme durch lysosomale Proteinase zu verhindern. Anschließend wurde

das Zellysate 10 Minuten in Eppendorfröhrchen auf Eis belassen, resuspendiert (Vortex) und für 15 Minuten zentrifugiert (15000 rpm, 4°C). Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -80°C.

Die verwendeten ELISA geben die Konzentration der jeweils zu untersuchenden Substanz in ng/ml der Probelösungen wieder. Um diese auf die Proteinkonzentrationen (oder Zellzahlen) beziehen zu können, wurden Messungen der Proteinkonzentrationen aus jedem Proben-Pool nach der BCA-Methode (s. 2.5.1) durchgeführt. Diese Werte ermöglichten eine Umrechnung (ng Substanz/mg Protein). Da für die konditionierten Medien immer nur eine genau definierte Menge an Medium verwendet wurde, konnten auch hier die Substanzkonzentrationen aus den ELISA auf die Proteinkonzentrationen der Zellextrakte bezogen werden.

2.6.2 ELISA

Es wurden ELISA-Systeme in Sandwich-Konfiguration nach den Angaben der Hersteller verwendet:

- uPA-ELISA (Biopool TintElize uPA, Product #111120, Sweden)
- uPAR-ELISA (IMUBIND Total uPAR ELISA Kit, American diagnostica inc. Product #893, USA)
- PAI-1-ELISA (PAI-1 ANTIGEN REAGENT KIT, Technoclone, Artikel Nr. TC11070)
- PAI-2-ELISA (IMUBIND PAI-2 ELISA Kit, American diagnostica inc. Product #823, USA)

3 Statistik

Für die graphische Darstellung und statistische Analyse der Messergebnisse kamen das Sigma-Plot-Programm (Systat Software Inc.), das InStat-Programm (GraphPAD Software) und das Tabellenkalkulationsprogramm Excel XP (Microsoft) zur Anwendung.

Häufigkeit der Messungen:

Die Aktivitätsanalysen wurden in der Regel dreimal, bei unklaren Ergebnissen auch häufiger durchgeführt. Bei den ELISA fanden aus Kostengründen meist nur zwei Messungen (jeweils Doppelwerte mit unterschiedlichen Passagen) statt.

Statistische Verfahren:

Graphische Darstellung und statistische Auswertung erfolgten anhand der Mittelwerte und der Standardabweichung.

Analyse der Aktivitätsbestimmungen:

Nach graphischer Darstellung der Kurvenverläufe (s. Abbildung 3) wurde der annähernd lineare Bereich der sigmoidal verlaufenden Kurve ermittelt und deren mittlere Steigung berechnet. Dieser Kurvenabschnitt repräsentiert annähernd die maximale Extinktionszunahme pro Zeiteinheit und ist ein indirektes Maß für die proteolytische Aktivität der Zellen. Der gewählte Zeitabschnitt betrug hierbei in der Regel 60 Minuten. Der Quotient wurde anschließend mit 1000 multipliziert (Delta Analyse) und die Mittelwerte bzw. Standardabweichungen dann statistisch analysiert und in Form von Balkendiagrammen dargestellt.

Signifikanzuntersuchungen:

Die statistische Beurteilung der jeweils unabhängigen Stichproben erfolgte bei den Aktivitätsbestimmungen mittels t-Test (zweiseitig). Bei den ELISA kam der u-Test (zweiseitig) zur Anwendung, der im Gegensatz zum t-Test keine Normalverteilung der Messwerte voraussetzt.

Um die statistische Vergleichbarkeit der Gruppen untereinander durchzuführen, war zusätzlich festzustellen, ob die Streuung der Merkmalsausprägung der Stichproben ähnlich ist oder nicht. Das erfolgte durch Überprüfung der Varianzunterschiede mittels des F-Tests.

Festlegung der Signifikanzgrenzen:

Als wahrscheinlich signifikant wurden Mittelwertunterschiede ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5% ($p < 0,05$) definiert, als sicher signifikant solche unter 1% ($0,01 > p > 0,001$). Werte unter 0,1% Irrtumswahrscheinlichkeit ($p < 0,001$) wurden als hochsignifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Voruntersuchungen

4.1.1 Zellquantifizierung mittels Proteinanalyse

Für jede Pankreaskarzinomzelllinie wurde das Verhältnis von Zellzahl zur Proteinkonzentration ermittelt. Das ermöglichte später, den Daten der ELISA- bzw. Aktivitätsmessungen die zugehörigen Zellzahlen zuzuordnen, Linearitäten zu überprüfen und Zellwachstumsraten zu ermitteln.

Berechnet wurden die Proteinkonzentrationen bezogen auf je 100000 Zellen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Zelllinien und jeweilige Proteinkonzentration in μg pro 100000 Zellen

Zelllinie	$\mu\text{g}/100000$ Zellen
Capan-1	ca. 306
PaCa-44	ca. 500
BxPC-3	ca. 400
Panc-1	ca. 863
AsPC-1	ca. 341

Die Ergebnisse veranschaulichen die teilweise großen Unterschiede zwischen Zellzahl und Proteinkonzentration der verwendeten Zelllinien. So hatten zum Beispiel Zellen von Panc-1 eine fast dreimal höhere Proteinkonzentration als die Zellen von Capan-1. In den weiteren Versuchen wurden die Messergebnisse zellbiologischer Leistungen nur auf die Proteinkonzentration der jeweiligen Zellen bezogen. Umrechnungen sind jedoch anhand der obigen Tabelle möglich.

4.1.2 Festlegung der Plasminogenkonzentrationen

Zur Optimierung der Messbereiche in den Aktivitätsanalysen wurden durch Voruntersuchungen die Plasminogenkonzentrationen für jede Zelllinie festgelegt. Hierfür

wurden nach subkonfluentem Wachstum der Zellen Aktivitätsmessungen mit 10, 20 bzw. 50 $\mu\text{g/ml}$ Plasminogen durchgeführt.

Nachfolgend sollen anhand der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 exemplarisch die Kurvenverläufe einer Messung dargestellt werden (Abbildung 3).

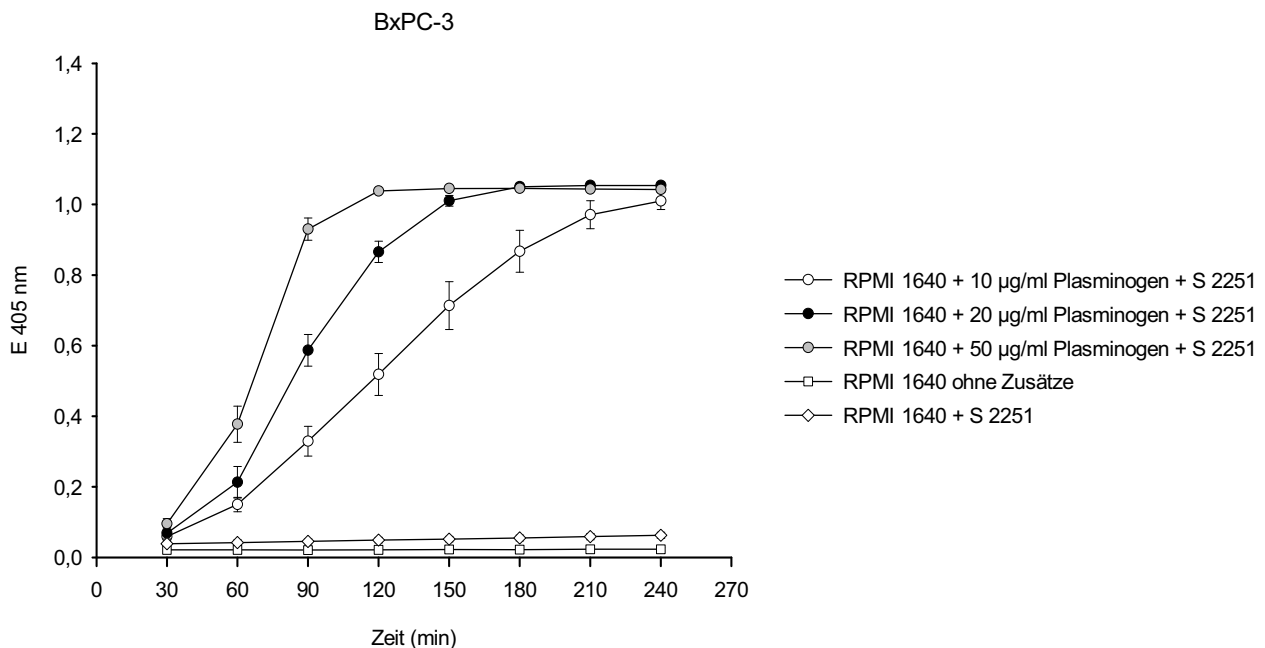


Abb. 3: Verlauf der proteolytischen Aktivität der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 unter variabler Plasminogenkonzentration

Auf der Abszisse sind die Messintervalle eingetragen (30minütig über 4 Stunden), die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm ist auf der Ordinate abzulesen. Die Kurvenverläufe repräsentieren die Extinktionsveränderungen pro Zeiteinheit und sind ein indirektes Maß für die proteolytische Aktivität der Zellen (Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin). Im steilsten, annähernd linearen Kurvenabschnitt, ist die Umwandlung des chromogenen Substrates pro Zeiteinheit durch aktiviertes Plasmin am größten (maximale Extinktionszunahme pro Zeiteinheit). Dieser, als maximale fibrinolytische Aktivität definierte Bereich, wurde als Vergleichsparameter für die statistische Analyse verwendet.

Im obigen Beispiel wurde die Plasminogenkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ gewählt; der Kurvenverlauf zeigt hier den deutlichsten linearen Abschnitt.

Auf die gleiche Weise wurden auch bei den anderen Zelllinien die Plasminogenkonzentrationen festgelegt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Gewählte Plasminogenkonzentrationen aller Zelllinien

Zelllinie	Plasminogen ($\mu\text{g/ml}$)
HeLa	50
MCF-7	20
BxPC-3	10
Panc-1	20
AsPC-1	10
Capan-1	10
PaCa-44	10

4.1.3 Optimierung der Zelldichte

Aus Untersuchungen an Zellkulturen ist bekannt, dass die Zelldichte Einfluss auf die Stoffwechsellistung ausübt, d.h. diese modifizieren bzw. verringern kann. Um die verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien auf solche Einflüsse zu untersuchen, wurden Aktivitätsmessungen nach unterschiedlicher Zelleinsaat durchgeführt (Abbildungen 3-10) und anschließend die Zellzahlen sowie Wachstumsraten ermittelt. Über die Ergebnisse konnten dann optimale Zelleinsaat für die weiteren Untersuchungen festgelegt werden.

Die Zelleinsaat betrug unter Berücksichtigung der Verdopplungszeiten je nach Zelllinie zwischen 25000 und 150000 pro Well einer Mikrotiterplatte, die Inkubation erfolgte über 24 Stunden. Diese Untersuchungen wurden nur bei den Pankreaskarzinomzelllinien durchgeführt.

In den folgenden Balkendiagrammen werden die maximalen Extinktionszunahmen pro Minute bei einer Wellenlänge von 405 nm bei definierten Zelleinsaat dargestellt.

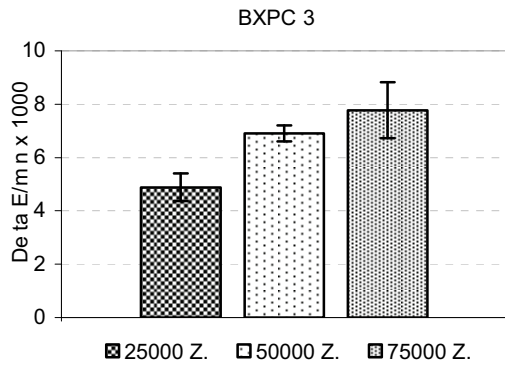


Abb. 4: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie BxPC-3 nach unterschiedlicher Zelleinsaat

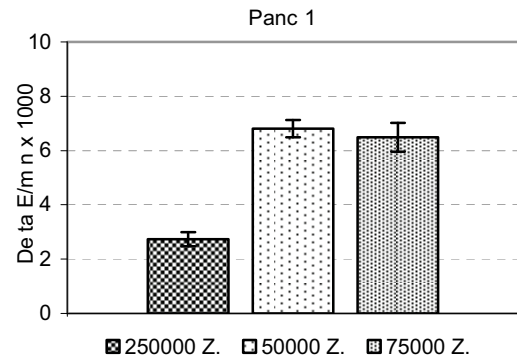


Abb. 5: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie Panc-1 nach unterschiedlicher Zelleinsaat

BxPC-3 zeigte mit zunehmender Einsaat und Zellzahl auch einen stetigen Anstieg der fibrinolytischen Aktivität (Abbildung 4). Das Verhältnis von Zellzahl zur Aktivität war bei niedrigster Zelleinsaat am größten, nahm aber mit zunehmender Zelldichte im analysierten Bereich nur geringfügig ab. Ein Plateau wurde nicht erreicht. Die Wachstumsraten waren mit ca. 80% bei einer Einsaat von 50000 Zellen am höchsten (Tabelle 3).

Panc-1 zeigte bei einer Einsaat von 25000 Zellen nur eine geringe fibrinolytische Aktivität und Wachstumsrate, erreichte jedoch sein Maximum schon bei einer Einsaat von 50000 Zellen. Höhere Zelldichten führten zu keinem weiteren Anstieg bzw. sogar leichter Abnahme (Abbildung 5). Die höchsten Wachstumsraten von ca. 70% wurden ebenfalls bei einer mittleren Zelleinsaat von 50000 Zellen erzielt (Tabelle 3).

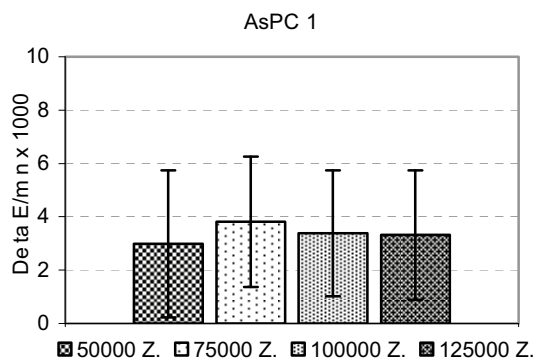


Abb. 6: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie AsPC-1 nach unterschiedlicher Zelleinsaat

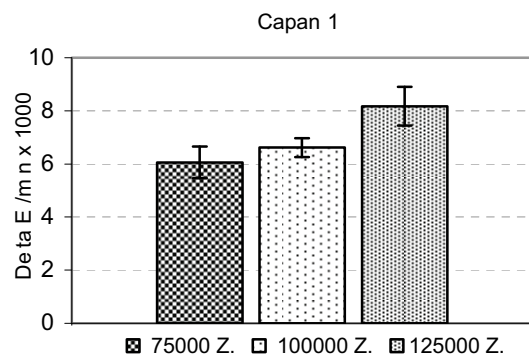


Abb. 7: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie Capan-1 nach unterschiedlicher Zelleinsaat

AsPC-1 präsentierte zunächst eine Zunahme der fibrinolytischen Aktivität mit einem Maximum bei einer Zelleinsaat von 75000 Zellen, um anschließend, bei weiter steigender Zelleinsaat und -dichte, an Aktivität abzunehmen (Abbildung 6). Die Wachstumsraten waren insgesamt gering und nahmen bei höherer Zelleinsaat etwas ab (Tabelle 2).

Capan-1 zeichnete sich durch sehr kleine und dicht wachsende Zellen aus. Mit höherer Zelleinsaat und -dichte nahm auch die fibrinolytische Aktivität zu und erreichte, ähnlich wie bei der Zelllinie BxPC-3, kein Plateau (Abbildung 7). Bezogen auf die Zellzahl waren auch hier die Aktivitäten bei niedrigster Einsaat am höchsten. Die Wachstumsraten nahmen im untersuchten Bereich kaum ab (Tabelle3).

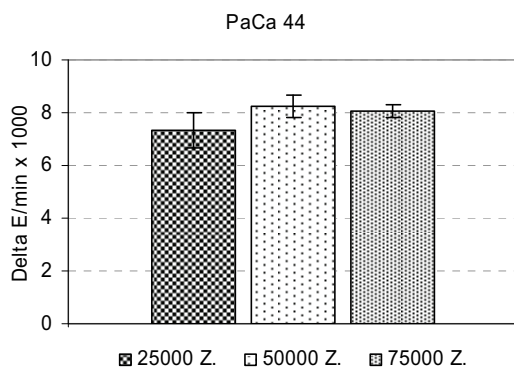


Abb. 8: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie PaCa-44 nach unterschiedlicher Zelleinsaat

PaCa-44 zeigte trotz hoher Wachstumsraten nur einen initialen und geringfügigen Anstieg der fibrinolytischen Aktivität und erreichte mit steigender Zelleinsaat und -dichte ein Plateau (Abbildung 8). Die Wachstumsraten nahmen mit höherer Einsaat kontinuierlich ab (Tabelle 2).

In der folgenden Tabelle sind die erhobenen Daten und mikroskopischen Befunde zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Daten der Zellkulturuntersuchungen zur Optimierung der Zelldichte

Zelllinie	Einsaat	Zellrasen	Zellzahl/Well	Wachstum (%)
BxPC-3	25000	subkonfluent	ca. 38.000	ca. 50
	50000	konfluent	ca. 90.000	ca. 80
	75000	konfluent	ca. 123.000	ca. 65
Panc-1	25000	subkonfluent	ca. 32.000	ca. 30
	50000	konfluent	ca. 86.000	ca. 70
	75000	konfluent	ca. 112000	ca. 50
AsPC-3	50000	Zellnester	ca. 60.000	ca. 20
	75000	subkon.- konflu.	ca. 90.000	ca. 20
	100000	konfluent	ca. 142.000	ca. 15
	125000	konfluent	ca. 160.000	ca. 15
Capan-1	75000	subkonflu.	ca. 120.000	ca. 60
	100000	subkon.- konflu.	ca. 150.000	ca. 50
	1250000	konfluent	ca. 200.000	ca. 60
PaCa-44	25000	subkonfluent	ca. 45.000	ca. 80
	50000	konfluent	ca. 88.000	ca. 75
	75000	konfluent	ca. 120.000	ca. 60

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich die verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien unter den gewählten Veränderungen wie Zelleinsaat und -dichte in ihrem Wachstums- und Aktivitätsverlauf nicht einheitlich verhielten. Einige Zelllinien zeigten bei hoher Zelldichte ein Aktivitätsplateau bzw. eine Aktivitätsabnahme, während bei anderen die Gesamtaktivität trotz konfluenten Wachstums weiter zunahm. Die Wachstumsraten waren meist unter mittlerer oder niedrigster Zelleinsaat am höchsten und höhere Zelldichten führten zu einer (auf die Zellzahl bezogen) relativen Aktivitätsabnahme.

In den weiteren Untersuchungen wurde mit folgenden Zelleinsaaten pro Well gearbeitet: BxPC-3: 50.000; Panc-1: 50.000; AsPC-3: 75.000; Capan-1: 100.000, PaCa-44: 50.000.

4.2 Aktivitätsanalysen unter Amiloridhemmung

Amilorid hat die Eigenschaft, uPA-Rezeptoren zu blockieren. Hierdurch wird die Bildung von uPA, nicht jedoch die des tPA gehemmt. In den folgenden Versuchen wurde diese Eigenschaft genutzt, um den Einfluss der jeweiligen Aktivatoren in den untersuchten Zelllinien zu analysieren.

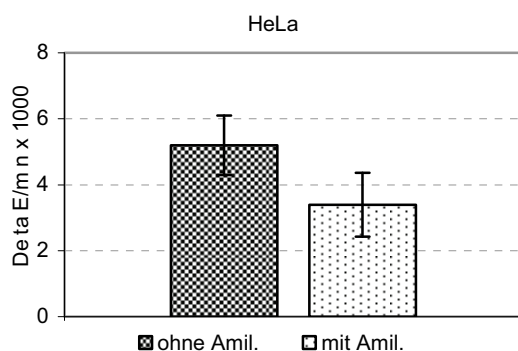


Abb. 9: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie HeLa; Kontrolle versus Amiloridhemmung

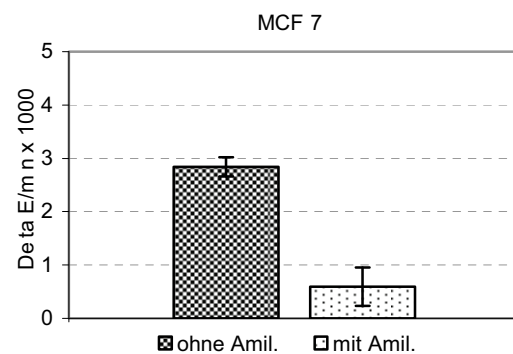


Abb. 10: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie MCF-7; Kontrolle versus Amiloridhemmung

Die Zervixkarzinomzelllinie HeLa zeigte unter dem Amilorid eine Abnahme der maximalen fibrinolytischen Aktivität von ca. 35% (Abbildung 9) und fiel somit deutlich geringer aus als bei der Mammakarzinomzelllinie MCF-7, die unter Amilorid fast 80% ihrer Aktivität verlor (Abbildung 10).

Bei den Versuchsreihen mit den Pankreaskarzinomzelllinien wurden die Amiloridzugaben weiter modifiziert.

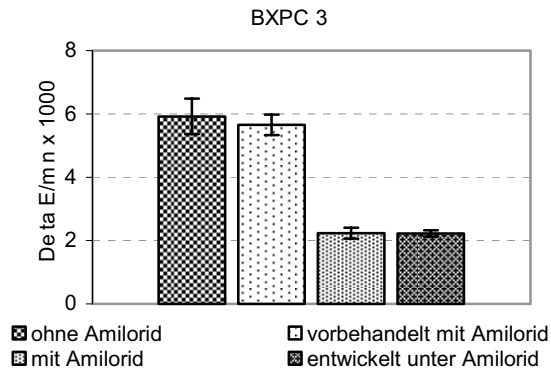


Abb. 11: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie BxPC-3; Kontrolle versus modifizierte Amiloridhemmung

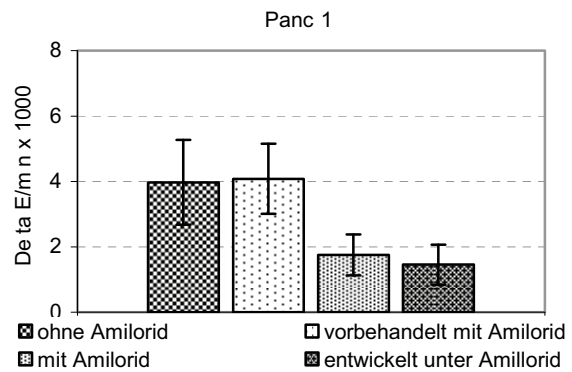


Abb. 12: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie Panc-1; Kontrolle versus modifizierter Amiloridhemmung

Auch bei den Pankreaskarzinomzelllinien war die Hemmung der fibrinolytischen Aktivität durch das Amilorid deutlich erkennbar (Abbildungen 11-13 und 15; Tabelle 4). Eine Ausnahme bildete die Zelllinie Capan-1 (Abbildung 14). Hier fiel die Hemmung mit ca. 16% deutlich geringer aus (Tabelle 4).

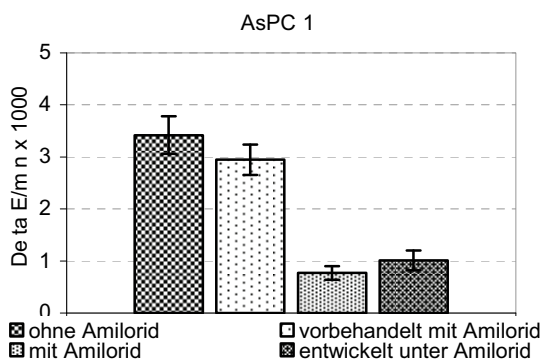


Abb. 13: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie AsPC-1; Kontrolle versus modifizierte Amiloridhemmung

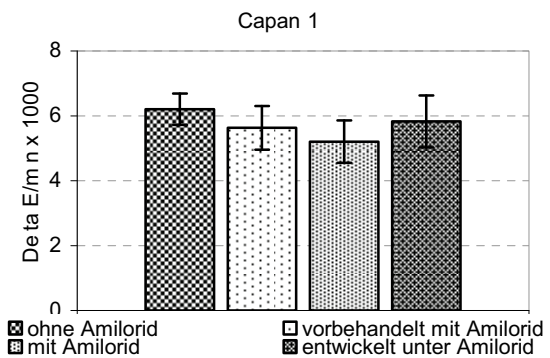


Abb. 14: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie Capan-1; Kontrolle versus modifizierte Amiloridhemmung

Am stärksten war die Hemmung bei den Zellen, denen Amilorid sowohl 24 Stunden vor als auch während der Messungen und den Zellen, denen Amilorid nur im Verlauf der Messungen beigelegt wurden (Säulen 3 und 4, Abbildungen 11-13 und 15). Wurden die Zellen hingegen nur vor, nicht aber während der Messungen mit Amilorid behandelt, fiel die Hemmung wesentlich geringer aus (Abbildungen 11-13 und 15; Säulen 2).

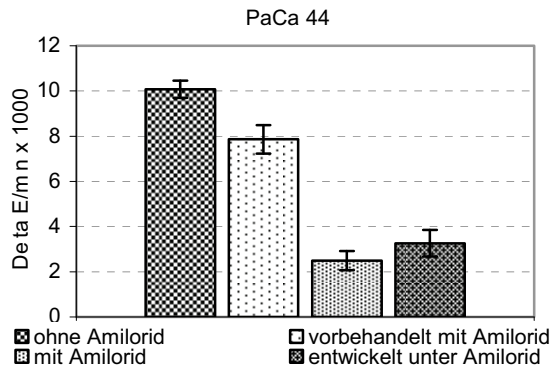


Abb. 15: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie PaCa-44; Kontrolle versus modifizierte Amiloridhemmung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wie auch die meisten untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien deutlich durch Amilorid in ihrer fibrinolytischen Aktivität gehemmt wurden. Entscheidend schien dabei die Amiloridwirkung im Verlauf der Messungen zu sein. Die ausschließlich mit Amilorid vorbehandelten Zellen zeigten hingegen kaum eine Aktivitätsminderung. Eine Ausnahme bildeten die Zelllinien Capan-1 und HeLa. Hier war die maximale Hemmung durch Amilorid relativ gering.

In der folgenden Tabelle werden die prozentualen Hemmungen der maximalen fibrinolytischen Aktivitäten durch Amilorid zusammenfassend dargestellt:

Tabelle 4: Maximale Hemmung der fibrinolytischen Aktivität durch Amilorid

Zelllinien	Hemmung (%)
HeLa	36
MCF-7	80
BxPC-3	62
Panc-1	56
AsPC-1	77
Capan-1	16
PaCa-44	70

4.3 Aktivitätsanalysen unter TSP-1- und FN-Stimulation

In den folgenden Versuchsreihen wurde der Einfluss der beiden Matrixmoleküle TSP-1 und FN auf die fibrinolytische Aktivität untersucht. Zuerst wurden die beiden Moleküle immobilisiert den Tumorzellen als Matrixproteine angeboten (Matrixstimulation), anschließend folgten Untersuchungen nach definierter Zugabe von löslichem TSP-1 bzw. FN zum Zellkulturmedium.

4.3.1 Aktivitätsanalysen unter Matrixstimulation

Für die Beschichtung der MTP kamen Konzentrationen von jeweils 10 µg/ml gereinigtem TSP-1 bzw. FN zur Anwendung. Um eine unspezifische Matrixstimulierung auszuschließen, wurde parallel zu den beiden genannten Matrizes und Kontrollzellen auch eine Stimulation mit einer BSA-Matrix (1,5%igen Lösung) durchgeführt.

Analysiert wurden die maximalen Aktivitäten (maximalen Extinktionszunahme pro Minute) und diese mit denen der Kontrollzellen verglichen.

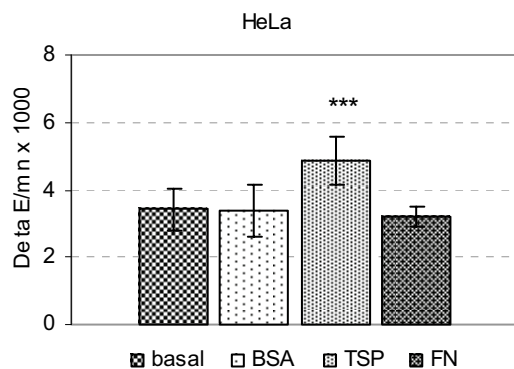


Abb. 16: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie HeLa nach Matrixstimulation; Kontrolle versus TSP-1, FN- bzw. BSA-Matrix; *** $p < 0,001$

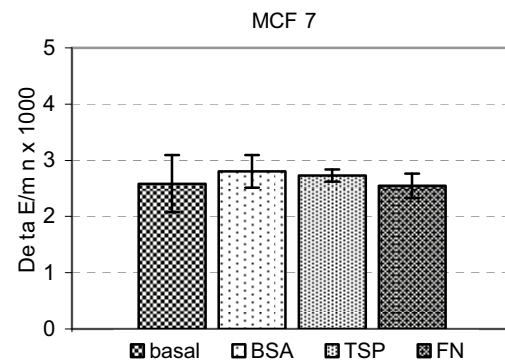


Abb. 17: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie MCF-7 nach Matrixstimulation; Kontrolle versus TSP-1, FN- bzw. BSA-Matrix

Die maximale fibrinolytische Aktivität nahm bei der Zelllinie **HeLa** unter dem Einfluss der TSP-1-Matrix mit über 30% deutlich und hochsignifikant zu ($p < 0,0001$). Die FN- und BSA-Matrizes zeigten keinen Effekt auf die gemessene Aktivität (Abbildung 16).

Bei der Zelllinie **MCF-7** wurde durch keine der drei Matrizes die fibrinolytische Aktivität signifikant beeinflusst (Abbildung 17).

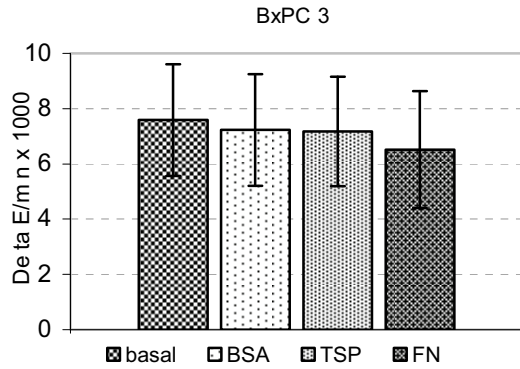


Abb. 18: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie BxPC-3 nach Matrixstimulation; Kontrolle versus TSP-1, FN- bzw. BSA-Matrix

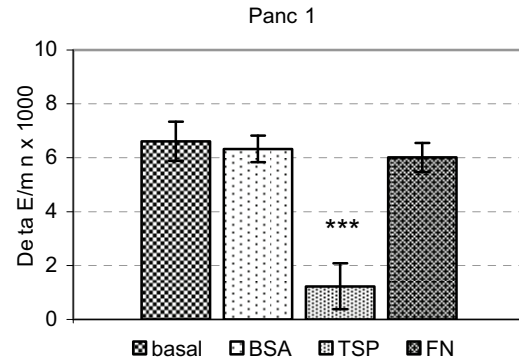


Abb. 19: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie Panc-1 nach Matrixstimulation; Kontrolle versus TSP-1, FN- bzw. BSA-Matrix; *** $p < 0,001$

Da traf auch für die Pankreaskarzinomzelllinie **BxPC-3** zu (Abbildung 18). Unter der FN-Matrix schien die Aktivität den Kontrollzellen gegenüber etwas abzunehmen, ohne jedoch einen signifikanten Wert zu erreichen.

Anders verhielt es sich bei der Zelllinie **Panc-1** (Abbildung 19). Hier kam es unter der TSP-1-Stimulation zu einer über 80%igen und hochsignifikanten Reduktion der fibrinolytischen Aktivität ($p < 0,0001$). Die FN- bzw. BSA-Matrix hingegen übten auch hier keinen signifikanten Einfluss auf die gemessene Aktivität aus.

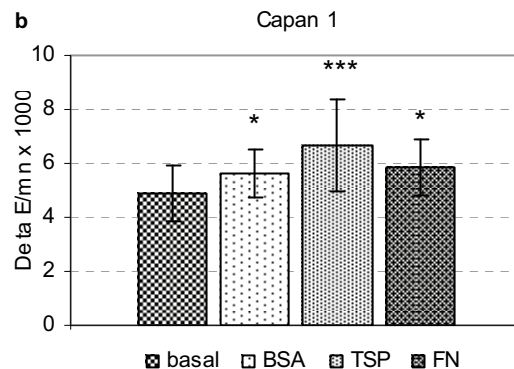
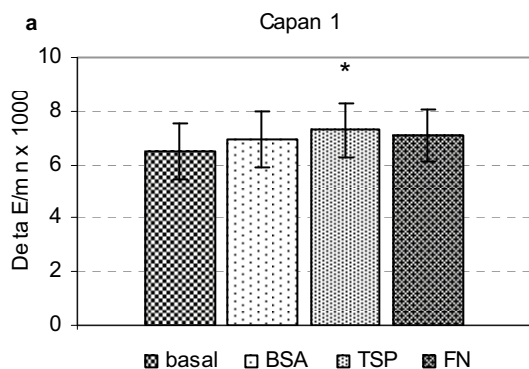


Abb. 20 a und b: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie Capan-1 (a) mittlere fibrinolytische Aktivität zwischen der 60igsten und 120igsten Minuten (b) nach Matrixstimulation; Kontrolle versus TSP-1, FN- bzw. Matrix; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Bei der Zelllinie **Capan-1** nahm die maximale Aktivität unter dem Einfluss aller drei Matrizes leicht zu, erreichte aber nur unter dem TSP-1 einen wahrscheinlich signifikanten Wert (Abbildung 20 a; TSP: $p < 0,05$).

Interessanterweise wurden bei dieser Zelllinie auch Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Aktivitätszunahme beobachtet. Analysen des Aktivitätsverlaufes zwischen der 60. und 90. Minute zeigten eine hochsignifikante Zunahme der mittleren Aktivität unter der TSP-1-Matrix im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. (Abbildung 20 b; $p < 0,001$). Beschleunigte Aktivitätszunahmen waren auch unter der FN- bzw. BSA-Matrix zu verzeichnen. Diese fielen jedoch deutlich geringer aus als unter der TSP-1-Matrix (FN bzw. BSA: $p < 0,05$).

Einen solchen Einfluss der Matrices auf den zeitlichen Verlauf der Aktivitätszunahme ließ sich nur bei der Zelllinie Capan-1 feststellen. Auf eine graphische Abbildung der anderen Zelllinien wurde folglich verzichtet.

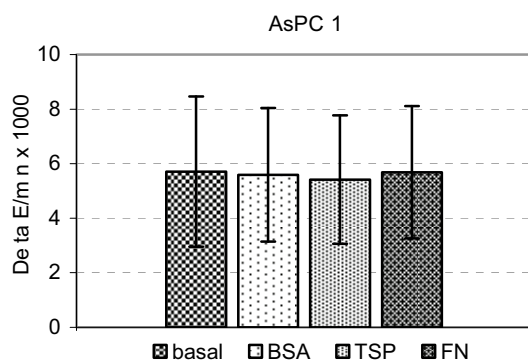


Abb. 21: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie AsPC-1 nach Matrixstimulation; Kontrolle versus TSP-1, FN- bzw. BSA-Matrix;

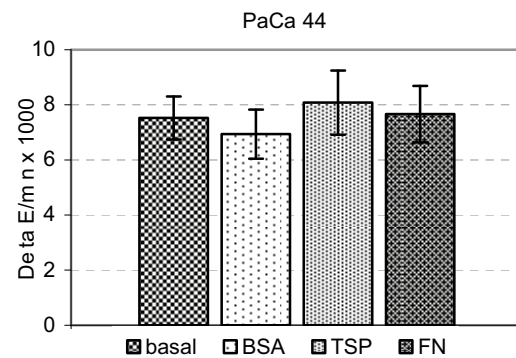


Abb. 22: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie PaCa-44 nach Matrixstimulation; Kontrolle versus TSP-1, FN- bzw. BSA-Matrix

Bei den Zelllinien **AsPC-1** und **PaCa-44** wurde die fibrinolytische Aktivität durch keine der drei Matrices signifikant verändert (Abbildungen 21 und 22).

4.3.2 Aktivitätsanalysen unter löslicher TSP-1- und FN-Stimulation

In diesen Untersuchungen wurde der Einfluss des im Kulturmedium gelösten TSP-1 und FN auf die fibrinolytische Aktivität untersucht. Gewählt wurden Konzentrationen von je 40 µg/ml gereinigtem TSP-1 bzw. FN sowie eine Inkubationszeit von 24 Stunden. In Paralleluntersuchungen kamen auch TSP-1-Konzentrationen von 10 µg/ml zur Anwendung. Da diese keine Unterschiede zu den höheren Konzentrationen aufwiesen, wurde auf eine separate Darstellung verzichtet.

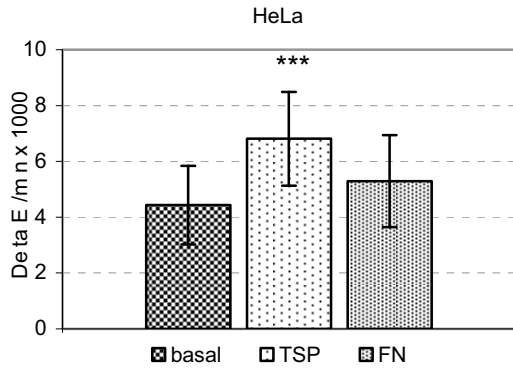


Abb. 23: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie HeLa nach TSP-1 und FN Stimulierung; Kontrolle versus TSP-1 bzw. FN im Medium; *** $p < 0,001$

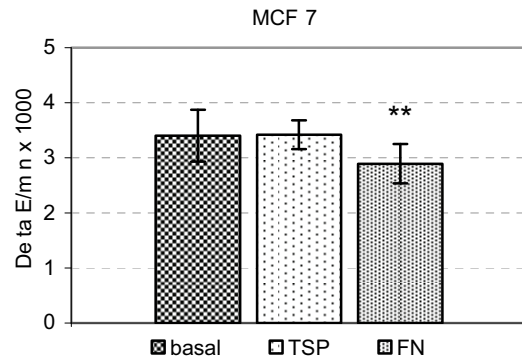


Abb. 24: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie MCF-7 nach TSP-1 und FN Stimulierung; Kontrolle versus TSP-1 bzw. FN; ** $p < 0,01$

Bei der Zelllinie **HeLa** nahm die fibrinolytische Aktivität auch unter löslichen TSP-1 mit über 50% deutlich und hochsignifikant zu (Abbildung 23; $p < 0,001$). Lösliches FN zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität.

Bei der Zelllinie **MCF-7** wurde die fibrinolytische Aktivität nicht durch TSP-1 beeinflusst (Abbildung 24). Lösliches FN hingegen schien, anders als unter der FN-Matrix, die Aktivität leicht zu senken ($p < 0,01$).

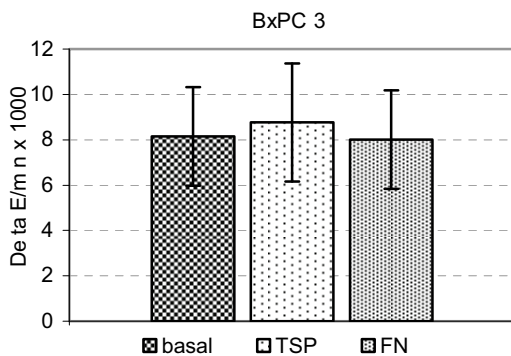


Abb. 25: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie BxPC-3 nach TSP-1 und FN Stimulierung; Kontrolle versus TSP-1 bzw. FN im Medium

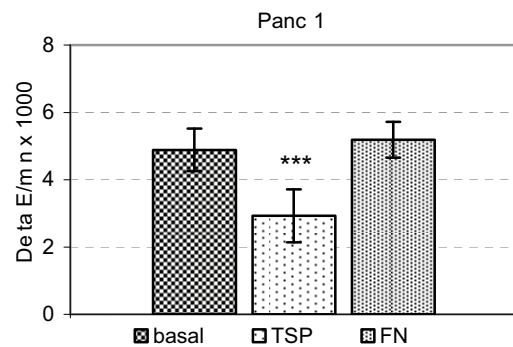


Abb. 26: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie Panc-1 nach TSP-1 und FN Stimulierung; Kontrolle versus TSP-1 bzw. FN im Medium; ** $p < 0,01$

Bei der Pankreaskarzinomzelllinie **BxPC-3** zeigten weder TSP-1 noch FN eine signifikante Wirkung auf die fibrinolytische Aktivität (Abbildung 25).

Anders verhielt es sich mit der Zelllinie **Panc-1** (Abbildung 26). Wie bei der Matrixstimulation übte auch lösliches TSP-1 einen starken inhibitorischen Effekt auf die fibrinolytische Aktivität aus ($p < 0,001$). Die Aktivitätshemmung fiel jedoch mit 40% geringer aus als unter der TSP-1-Matrix (80%). Lösliches FN zeigte keine Wirkung auf die fibrinolytische Aktivität.

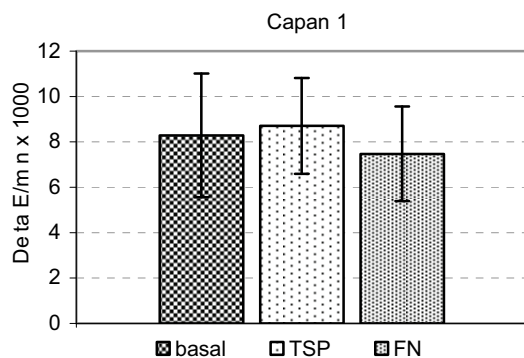


Abb. 27: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie Capan-1 nach TSP-1 und FN Stimulierung; Kontrolle versus TSP-1 bzw. FN im Medium

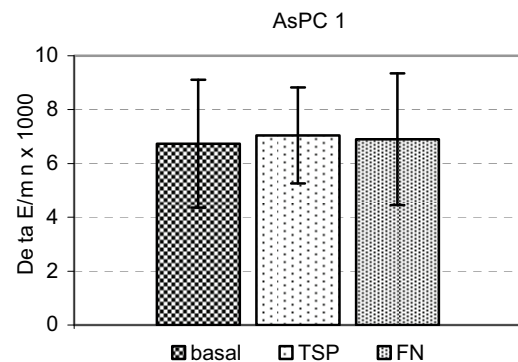


Abb. 28: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie AsPC-1 nach TSP-1 und FN Stimulierung; Kontrolle versus TSP-1 bzw. FN im Medium

Bei der Zelllinie **Capan-1** hatten die löslichen Matrixmoleküle keinen Einfluss auf die maximale fibrinolytische Aktivität und auch der zeitliche Verlauf der Aktivitätszunahme (ohne Abbildung) blieb unverändert (Abbildung 27). Lösliches und immobilisiertes TSP-1 zeigten somit unterschiedliche modulierende Eigenschaften in Bezug auf das PA-System.

Die beiden Zelllinie **AsPC-1** und **PaCa-44** wurden in ihrer fibrinolytischen Aktivität nicht durch gelöstes TSP-1 bzw. FN signifikant verändert (Abbildungen 28 und 29).

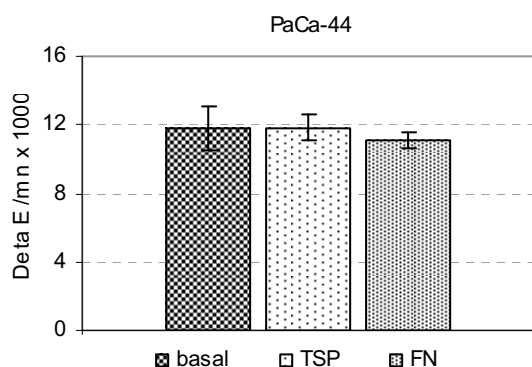


Abb. 29: Maximale fibrinolytische Aktivität der Zelllinie PaCa-44 nach TSP-1 und FN Stimulierung; Kontrolle versus TSP-1 bzw. FN im Medium

4.4 Quantifizierung der Einzelkomponenten des PA-Systems

In den folgenden Versuchsreihen wurden die Einzelparameter des PA-Systems mittels ELISA quantifiziert. Die Untersuchungen erfolgten nach Lyse der Zellen im Zellextrakt sowie nach 24-stündiger Inkubation in den konditionierten Medien, um sekretorische Leistungen zu quantifizieren. Sowohl unter basalen Zellkulturbedingungen als auch nach TSP-1- bzw. FN-Stimulation wurden folgende Parameter analysiert: uPA, dessen Rezeptor uPAR und die beiden Inhibitoren PAI-1 und PAI-2. Auch hier wurden den Tumorzellen beide Matrixmoleküle in löslicher sowie immobilisierter Form (Matrix) angeboten. Als unspezifische Matrix wurde erneut eine BSA-Beschichtung gewählt. Es kamen mindestens zwei Doppelmessungen unterschiedlicher Passagen zur Anwendung.

4.4.1 Konzentrationen des uPA in den Zellextrakten und konditionierten Medien

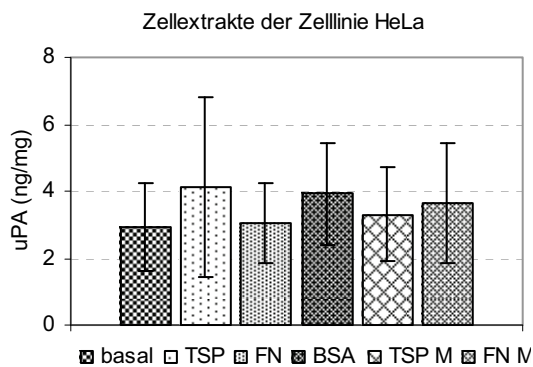


Abb. 30: uPA-Konzentrationen im Zellextrakt der Zelllinie HeLa nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Zellkulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus Matrixmoleküle und BSA

In den Zellextrakten der Zervixkarzinomzelllinie **HeLa** waren die basalen uPA-Konzentrationen gering, eine signifikante Modulation durch die beiden Matrixmoleküle wurde nicht beobachtet (Abbildung 30). Der Mittelwert war unter dem löslichen TSP-1 zwar deutlich erhöht, blieb jedoch aufgrund der relativ großen Standardabweichung unter der Signifikanzgrenze (p 0,68). In den konditionierten Medien war in keiner Probe uPA nachweisbar (ohne Abbildung).

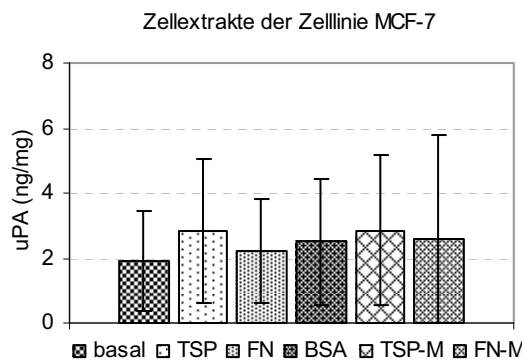


Abb. 31: uPA-Konzentrationen im Zellextrakt der Zelllinie MCF-7 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix

Ähnlich verhielt es sich mit der Mammakarzinomzelllinie **MCF-7** (Abbildung 31). Die uPA-Konzentrationen waren in den Zellextrakten sehr niedrig und eine quantitative Modifikation unter dem TSP-1 bzw. FN blieb auch hier aus.

Ebenfalls nicht nachweisbar war uPA in allen konditionierten Überständen (ohne Abbildung).

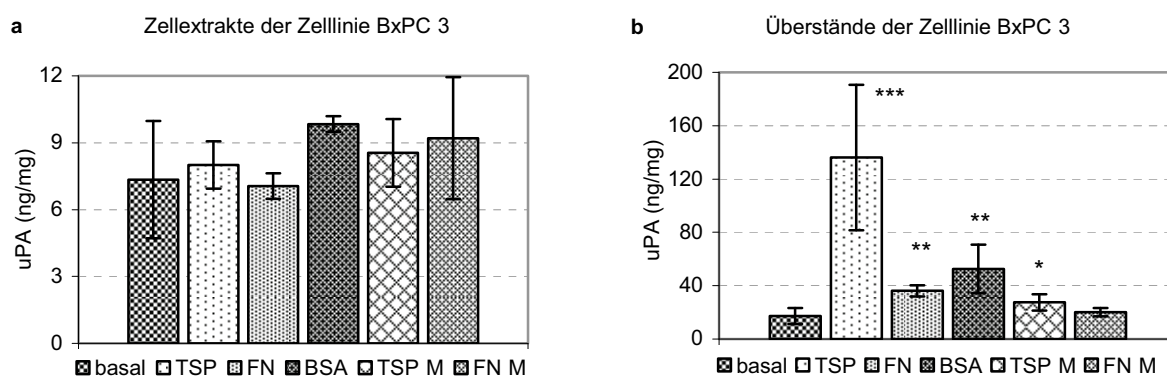


Abb. 32 a und b: uPA-Konzentrationen im Zellextrakt (**a**) und konditioniertem Überstand (**b**) der Zelllinie BxPC-3 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Bei der Pankreaskarzinomzelllinie **BxPC-3** wurde die uPA-Konzentration der Zellextrakte durch lösliches TSP-1 bzw. FN nicht beeinflusst. Auch unter den drei Matrices wurden, trotz höherer Mittelwerte, keine signifikanten Konzentrationsunterschiede erreicht (Abbildung 32 a).

Anders verhielt es sich mit den Messergebnissen der konditionierten Überstände. Die uPA-Expression nahm hier unter der löslichen TSP-1-Stimulation von $17 \text{ ng/mg} \pm 6$ auf $136 \text{ ng/mg} \pm 54$ hochsignifikant zu ($p < 0,0001$).

Deutlich geringer, aber ebenfalls signifikant war der uPA-Anstieg unter löslichem FN. Bei den Matrices kam es dagegen nur unter der unspezifischen BSA zu einem signifikanten Konzentrationsanstieg des uPA (Abbildung 32 b).

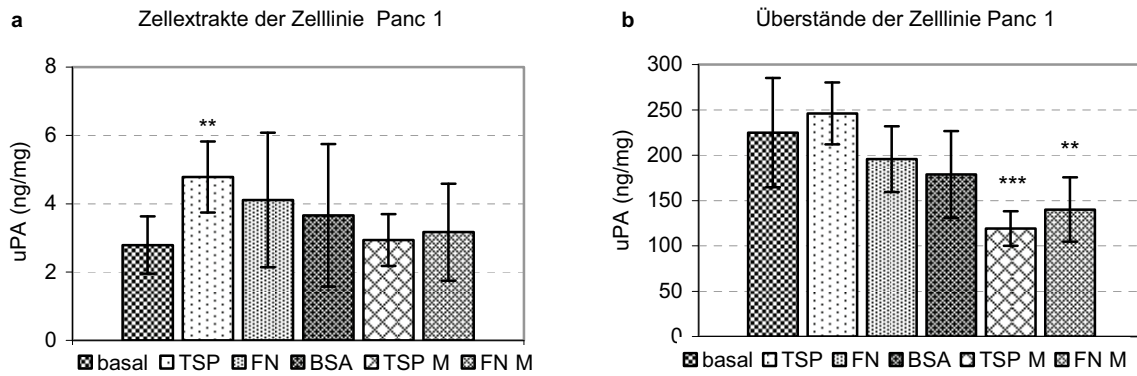


Abb. 33 a und b: uPA-Konzentrationen im Zellextrakt (a) und konditioniertem Überstand (b) der Zelllinie Panc-1 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

In den Zellextrakten von **Panc-1** waren die gemessenen uPA-Konzentrationen gering. Unter den beiden gelösten Matrixmolekülen wurde die uPA-Expression deutlich gesteigert, erreichte aber nur bei TSP-1 einen signifikanten Wert ($2,8 \text{ ng/mg} \pm 0,8$ gegenüber $4,8 \text{ ng/mg} \pm 1,0$ in den Kontrollzellen; $p < 0,01$). Die verwendeten Matrices blieben ohne signifikanten Einfluss auf den uPA-Gehalt der Zellextrakte (Abbildung 33 a).

Die Analysen der konditionierten Überstände zeigten eine hohe basale uPA-Sekretion, die sich unter Stimulation der gelösten Matrixmoleküle nicht signifikant veränderten (Abbildung 33 b). Anders verhielt es sich bei der TSP-1 bzw. FN-Matrix. Unter deren Einfluss kam es zu einer deutlichen Reduktion der uPA-Konzentration in den Überständen (TSP-1: $119 \text{ ng/mg} \pm 19$; FN: $140 \text{ ng/mg} \pm 35$ gegenüber $224 \text{ ng/mg} \pm 60$ im Kontrollmedium; $p < 0,001$ bzw. $p < 0,01$).

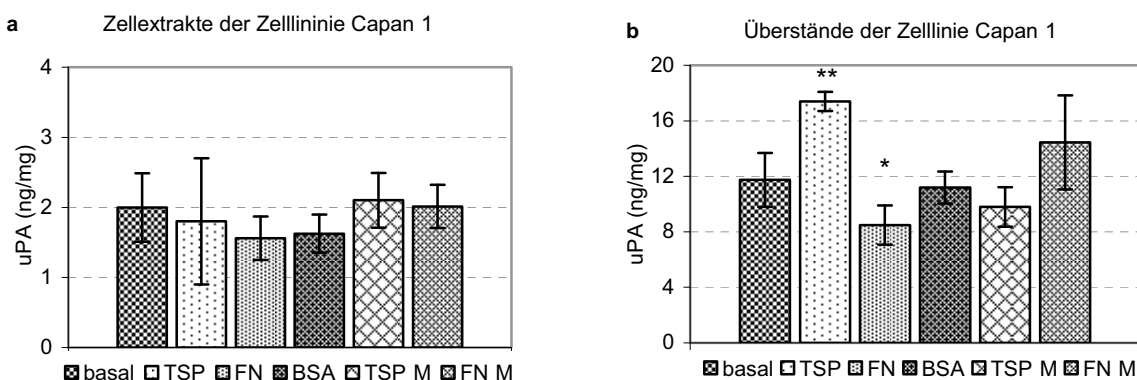


Abb. 34 a und b: uPA-Konzentrationen im Zellextrakt (a) und konditioniertem Überstand (b) der Zelllinie Capan-1 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Bei **Capan-1** waren die uPA-Konzentrationen der Zellextrakte ebenfalls niedrig. Die Stimulation durch TSP-1 bzw. FN führte hier bei keiner der Analysen zu einer signifikanten quantitativen Veränderung der uPA-Expression (Abbildung 34 a).

In den konditionierten Medien wurde hingegen eine über 30% Konzentrationszunahme des uPA unter gelöstem TSP-1 beobachtet (17,4 ng/mg \pm 0,7 gegenüber 11,7 ng/mg \pm 1,9 im Kontrollmedium; $p < 0,01$), während lösliches FN hier eine leichte Reduktion der uPA-Sekretion bewirkte (8,5 ng/mg \pm 1,4 gegenüber 11,7 ng/mg \pm 1,9 im Kontrollmedium; $p < 0,05$). Die drei Matrices blieben ohne signifikanten Einfluss auf die uPA-Konzentration der Überstände (Abbildung 34 b)

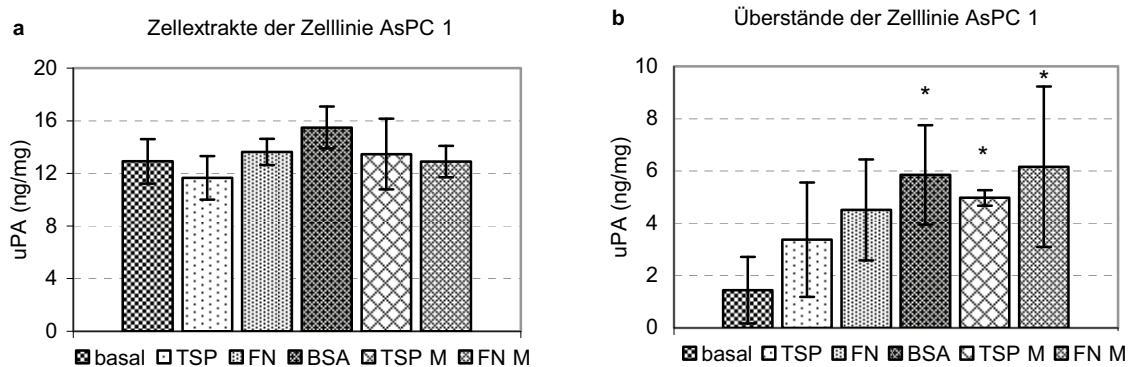


Abb. 35 a und b: uPA-Konzentrationen im Zellextrakt (a) und konditionierten Überstand (b) der Zelllinie AsPC-1 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, * $p < 0,05$

In den Zellextrakten der Zelllinie **AsPC-1** führte keines der beiden Matrixmoleküle zu einer signifikanten Veränderung der uPA-Konzentration (Abbildung 35 a).

Die in den konditionierten Medien gemessenen uPA-Werte waren vergleichsweise gering. Nur die drei Matrices bewirken eine leichte und wahrscheinlich signifikante Zunahme der uPA-Sekretion (Abbildung 35 b; $p < 0,05$)

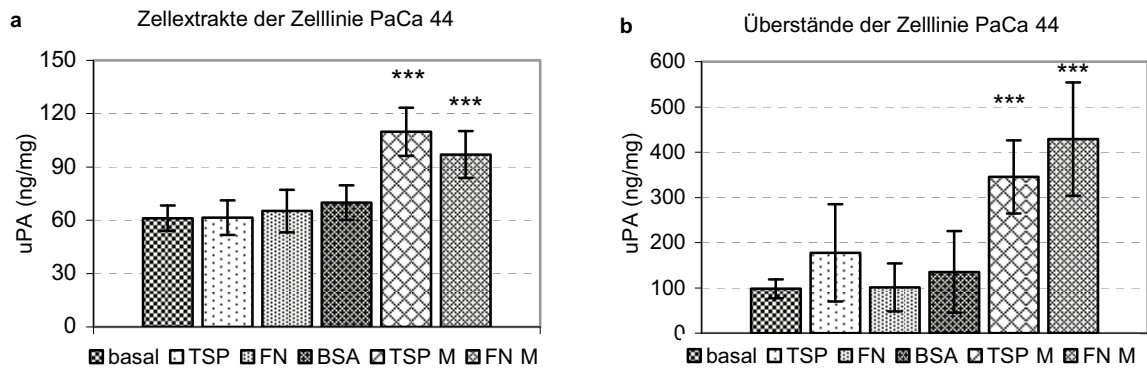


Abb. 36 a und b: uPA-Konzentrationen im Zellextrakt (a) und konditioniertem Überstand (b) der Zelllinie PaCa-44 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, *** p<0,001

Die Zellextrakte von **PaCa-44** wiesen die höchsten gemessenen uPA-Werte aller untersuchten Zelllinien auf. Die löslichen Matrixmoleküle zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die uPA-Expression, wogegen beide Matrices sowohl in den Zellextrakten als auch in den konditionierten Medien einen hochsignifikanten Anstieg der uPA-Konzentrationen bewirkten. Unter der TSP- bzw. FN-Matrix nahmen die uPA-Expressionen im Zellextrakt um 80 bzw. 60% (TSP-M: 109 ng/mg ± 13,5; FN-M: 97 ng/mg ± 13,2) gegenüber den unstimulierten Zellen zu (61,2 ng/ml ± 7,2; p<0,001). In den konditionierten Medien stiegen die uPA-Konzentrationen sogar um das 3,5 bzw. 4,5fache an (TSP-M: 345 ng/mg ± 81 bzw. FN-M: 429 ng/mg ± 125 gegenüber 97 ng/mg ± 21 im Kontrollmedium; p<0,001). Die unspezifischen BSA-Matrices waren davon nicht betroffen (Abbildungen 36 a und b).

4.4.2 Konzentrationen des uPAR in den Zellextrakten und konditionierten Medien

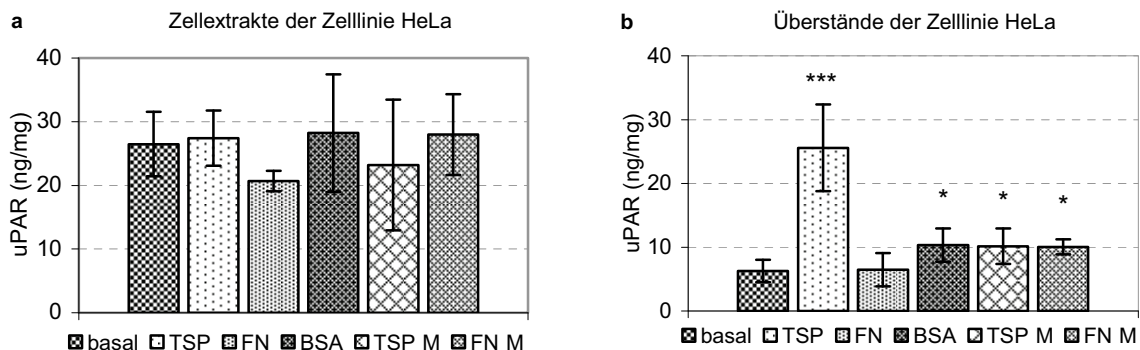


Abb. 37 a und b: uPAR-Konzentrationen im Zellextrakt (a) und konditioniertem Überstand (b) der Zelllinie HeLa nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, * p<0,05; *** p<0,001

Die Zervixkarzinomzelllinie **HeLa** wies hohe uPAR-Konzentrationen in allen Zellextrakten auf. Eine signifikante Modulation fand durch die beiden Matrixmoleküle nicht statt (Abbildung 37 a). Lösliches FN schien zwar eine leichte Reduktion des uPAR zu bewirken, diese blieb aber unterhalb der festgelegten Signifikanzgrenze ($p < 0,067$).

Anders präsentierten sich die Ergebnisse der konditionierten Medien. Hier induzierte lösliches TSP-1 eine 4-fache Zunahme der uPAR-Sekretion. Die Konzentrationen des Rezeptors stiegen unter der TSP-1-Stimulation hochsignifikant an ($25,6 \text{ ng/mg} \pm 6,8$ gegenüber $6,2 \text{ ng/mg} \pm 1,7$ in den Kontrollzellen; $p < 0,0001$). Eine Zunahme des uPAR wurde auch unter allen drei Matrices beobachtet, fiel jedoch vergleichsweise gering aus ($p < 0,05$). Das gelöste FN zeigte keinen Effekt auf die uPAR-Konzentration (Abbildung 37 b).

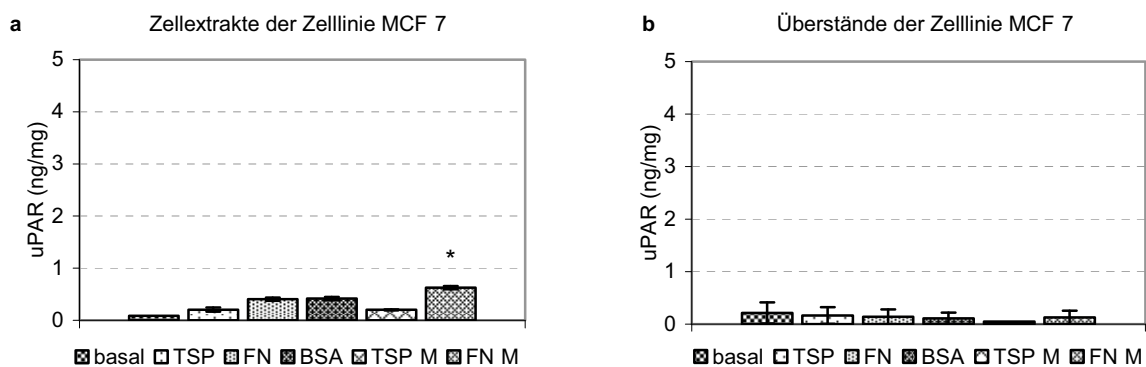


Abb. 38 a und b: uPAR-Konzentrationen im Zellextrakt (**a**) und konditioniertem Überstand (**b**) der Zelllinie MCF-7 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, * $p < 0,05$

Bei der Mammakarzinomzelllinie **MCF-7** waren die gemessenen uPAR-Werte der Zellextrakte sowie konditionierten Überstände sehr niedrig (Abbildungen 38 a und b). Quantitative Veränderungen des uPAR waren unter den beiden Matrixmolekülen nur in den Zellysaten nachweisbar. Möglicherweise nimmt hier die uPAR-Expression unter der FN-Matrix geringfügig zu (FN-M: $0,63 \text{ ng/mg} \pm 0,22$ gegenüber $0,2 \text{ ng/mg} \pm 0,2$ im Kontrollmedium; $p < 0,05$).

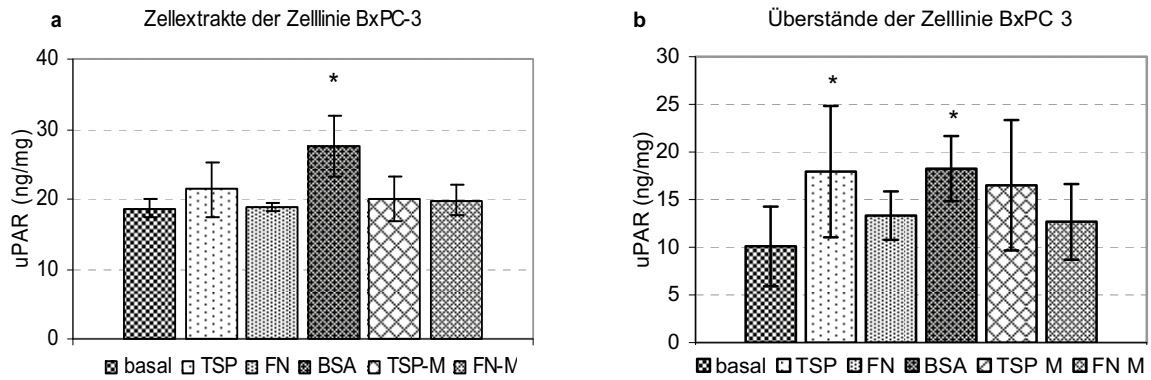


Abb. 39 a und b: uPAR-Konzentrationen im Zellextrakt (a) und konditioniertem Überstand (b) der Zelllinie BxPC-3 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, * $p < 0,05$

In den Zellextrakten der Pankreaskarzinomzelllinie **BxPC-3** wurde die uPAR-Konzentration nicht durch TSP-1 bzw. FN signifikant verändert (Abbildung 39 a). Nur die unspezifische BSA-Matrix schien einen leichten Anstieg des uPAR zu bewirken ($p < 0,05$).

In den konditionierten Überständen nahm unter der TSP-1-Stimulation die uPAR-Konzentration leicht zu (Abbildung 39 b). Wahrscheinlich signifikante Werte wurden aber nur durch lösliches TSP-1 erzielt ($17,9 \text{ ng/mg} \pm 6,9$ gegenüber $10,1 \text{ ng/mg} \pm 4,2$ im Kontrollmedium; $p < 0,05$). Unter der BSA-Matrix stieg die uPAR-Sekretion ebenfalls geringfügig an ($p < 0,05$).

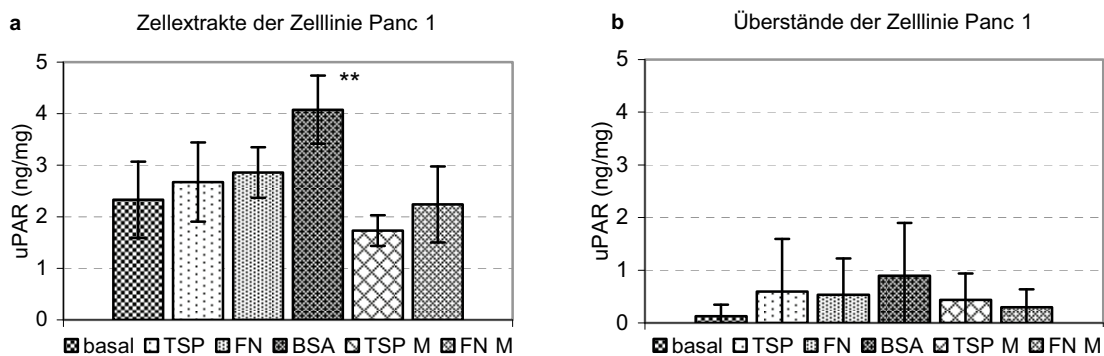


Abb. 40 a und b: uPAR-Konzentrationen im Zellextrakt (a) und konditioniertem Überstand (b) der Zelllinie Panc-1 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, ** $p < 0,01$

Bei der Pankreaskarzinomzelllinie **Panc-1** waren die gemessenen uPAR-Konzentrationen der Zellextrakte niedrig. Weder TSP-1 noch FN übten einen signifikanten Einfluss auf die uPAR-

Expression aus. Allein die unspezifische BSA-Matrix führte zu einem leichten, aber signifikanten Anstieg des uPAR ($p < 0,01$; Abbildung 40 a).

In den konditionierten Medien waren die uPAR-Konzentrationen äußerst gering und ein signifikanter Effekt auf die uPAR-Sekretion durch die beiden Matrixmoleküle ließ sich nicht nachweisen (Abbildung 40 b).

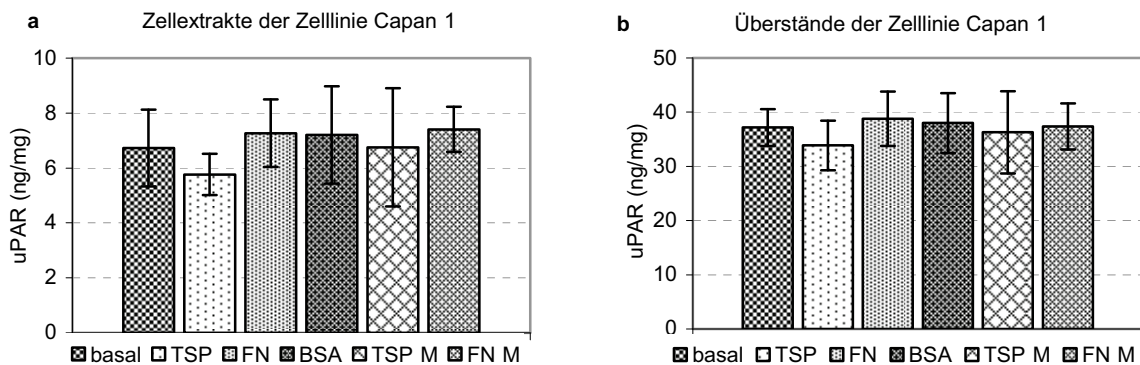


Abb. 41 a und b: uPAR-Konzentrationen im Zellextrakt (a) und konditioniertem Überstand (b) der Zelllinie Capan-1 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix

Bei der Zelllinie **Capan-1** übten weder die beiden Matrixmoleküle noch die unspezifische BSA-Matrix einen Einfluss auf den uPAR-Gehalt der Zellextrakte aus (Abbildung 41 a). In den konditionierten Medien wurden relativ hohe basale uPAR-Konzentrationen gemessen. Auch hier wurde uPAR nicht durch die angebotenen Matrixmoleküle signifikant modifiziert (Abbildung 41 b).

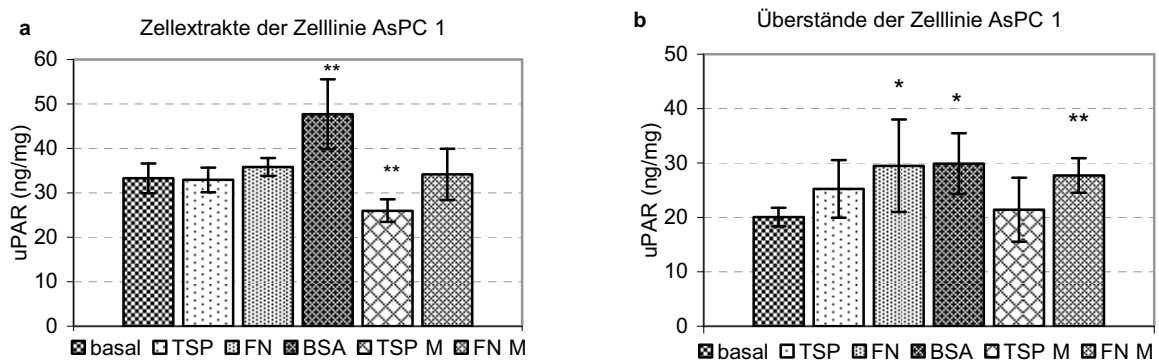


Abb. 42 a und b: uPAR-Konzentrationen im Zellextrakt (a) und konditioniertem Überstand (b) der Zelllinie AsPC-1 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

In den Zellextrakten von **AsPC-1** stieg die uPAR-Konzentration nur unter dem Einfluss der unspezifischen BSA-Matrix signifikant an ($p < 0,01$), während die TSP-Matrix zu einer signifikanten Reduktion des uPAR führte (TSP-M: $26 \text{ ng/mg} \pm 2,5$ gegenüber $33,3 \text{ ng/mg} \pm 3,4$ in den Kontrollzellen; $p < 0,01$). Die gelösten Matrixmoleküle und die FN-Matrix zeigten keinen Effekt auf die uPAR-Konzentrationen der Zellextrakte (Abbildung 42 a).

In den konditionierten Überständen bewirkten lösliches und immobilisiertes FN eine leichte Konzentrationszunahme des uPAR (Abbildung 42 b). Sicher signifikante Werte wurden wegen der geringeren Standardabweichung jedoch nur unter der FN-Matrix erreicht (FN-M: $p < 0,01$). Zu einem leichten Anstieg des uPAR kam es auch unter der BSA-Matrix ($p < 0,05$).

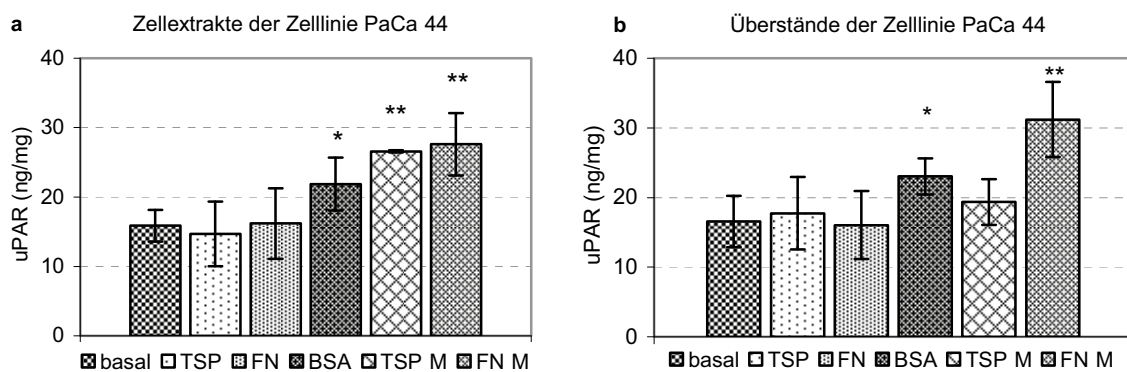


Abb. 43 a und b: uPAR-Konzentrationen im Zellextrakt (a) und konditioniertem Überstand (b) der Zelllinie PaCa-44 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Bei der Zelllinie **PaCa-44** nahmen die uPAR-Expressionen unter allen verwendeten Matrizes deutlich zu, während die löslichen Matrixmoleküle keinen quantitativen Einfluss auf den uPAR der Zellextrakte zeigten (Abbildung 43 a). Besonders hoch und sicher signifikant waren der uPAR-Anstieg unter der TSP-1- bzw. FN-Matrix (TSP-M: $26,6 \text{ ng/mg} \pm 0,18$; FN-M: $27,6 \text{ ng/mg} \pm 4,5$ gegenüber $15,8 \text{ ng/mg} \pm 2,3$ in den Kontrollzellen; $p < 0,01$), am niedrigsten bei der unspezifischen BSA-Matrix ($21,8 \text{ ng/mg} \pm 3,8$; $p < 0,05$).

In den konditionierten Medien wurde unter der FN-Matrix ein fast zweifacher Konzentrationsanstieg des uPAR beobachtet ($31,2 \text{ ng/mg} \pm 5,4$ gegenüber $16,6 \text{ ng/mg} \pm 3,7$ im Kontrollmedium; $p < 0,01$). Vergleichsweise gering war dagegen der Anstieg unter der BSA-Matrix ($p < 0,05$). TSP-1 und lösliches FN hatten keinen Einfluss auf die uPAR-Konzentration der konditionierten Überstände (Abbildung 43 b).

4.4.3 Konzentrationen des PAI-1 in den Zellextrakten und konditionierten Medien

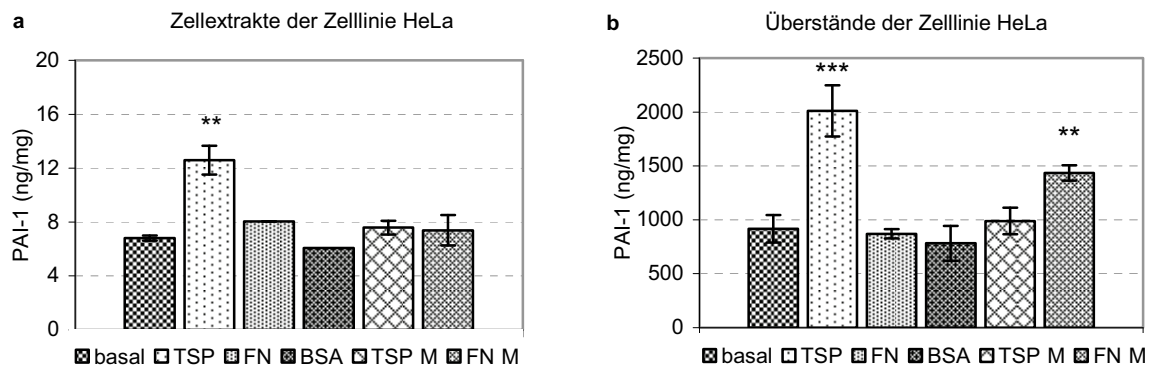


Abb. 44 a und b: PAI-1-Konzentrationen im Zellextrakt (a) und konditioniertem Überstand (b) der Zelllinie HeLa nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

In den Zellextrakten der Zervixkarzinomzelllinie **HeLa** waren die PAI-1-Konzentrationen niedrig. Unter löslichem TSP-1 wurde ein fast zweifacher Anstieg des PAI-1 beobachtet (12,6 ng/mg \pm 4,4 gegenüber 6,8 ng/mg \pm 1,8 in den Kontrollzellen; $p < 0,01$). FN und die drei Matrizes übten hingegen keinen quantitativen Einfluss auf den PAI-1 der Zellysate aus (Abbildung 44 a). In den konditionierten Medien ließen sich hohe PAI-1-Werte nachweisen. Auch hier wurde unter löslichem TSP-1 ein starker PAI-1-Anstieg verzeichnet. Die Konzentration des Inhibitors nahm über das Doppelte zu (2010 ng/mg \pm 238 gegenüber 917 ng/mg \pm 128 im Kontrollmedium; $p < 0,001$).

Etwas geringer, aber ebenfalls signifikant, war der Anstieg unter der FN-Matrix (1453 ng/mg \pm 71,3; $p < 0,01$). Lösliches FN und die TSP-1-Matrix hatten keinen Einfluss auf die PAI-Sekretion (Abbildung 44 b).

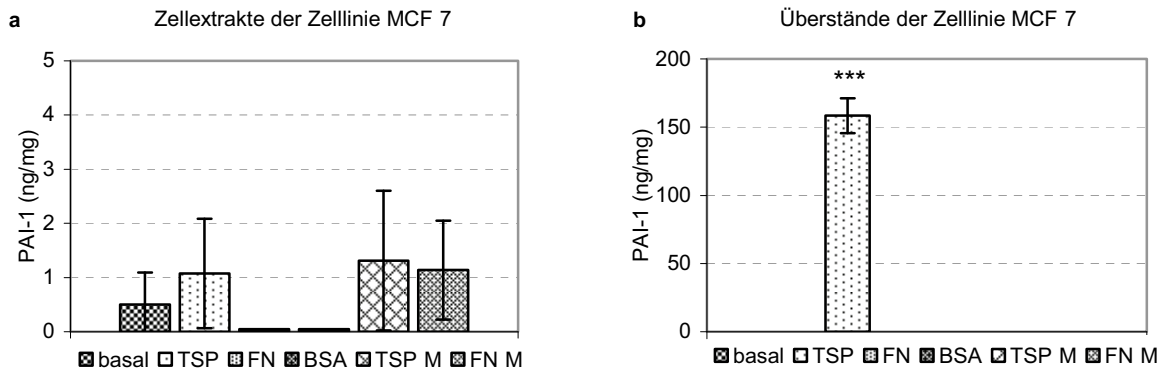


Abb. 45 a und b: PAI-1-Konzentrationen im Zellextrakt (a) und konditioniertem Überstand (b) der Zelllinie MCF-7 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, *** p<0,001

Bei der Mammakarzinomzelllinie **MCF-7** waren die gemessenen PAI-1-Konzentrationen der Zellextrakte sehr niedrig und eine Modulation durch beide Matrixproteine nicht nachweisbar (Abbildung 45 a).

In den Analysen der konditionierten Medien ließ sich nur nach der Stimulation durch lösliches TSP-1 eine PAI-1-Expression nachweisen (158 ng/mg ± 12,7 gegenüber ~0 ng/mg in den Kontrollzellen; p<0,001) In alle anderen Proben konnten mit der verwendeten Methode keine PAI-1-Werte quantifiziert werden (Abbildung 45 b).

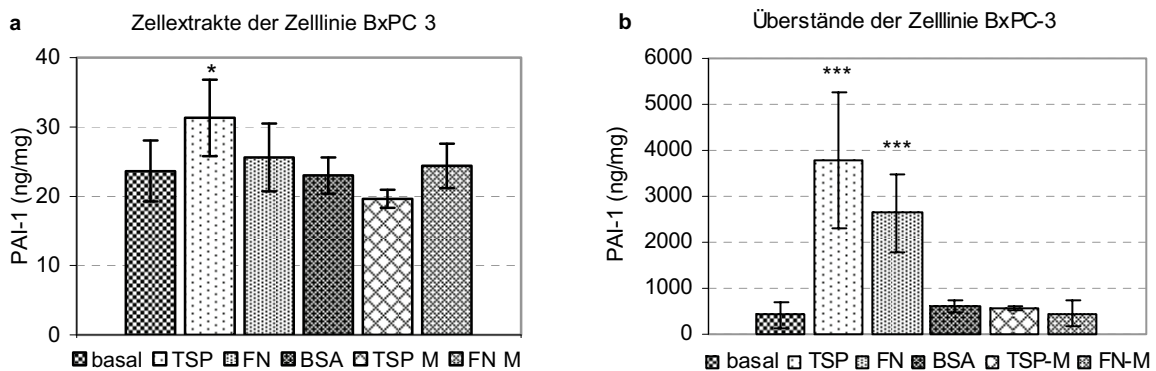


Abb. 46 a und b: PAI-1-Konzentrationen im Zellextrakt (a) und konditioniertem Überstand (b) der Zelllinie BxPC-3 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, * p<0,05; *** p<0,001

In den Zellextrakten der Pankreaskarzinomzelllinien **BxPC-3** führte lösliches TSP-1 zu einem leichten und wahrscheinlich signifikanten Anstieg der PAI-1-Expression (p<0,05). Die Stimulation durch lösliches FN bzw. den drei Matrices zeigte keinen quantitativen Einfluss auf den PAI-1 im Zellextrakt (Abbildung 46 a).

Einen sehr starken Konzentrationsanstieg ließ sich dagegen in den konditionierten Medien nachweisen. Unter löslichem TSP-1 und FN nahmen die PAI-1-Konzentrationen um das 8- bzw. 6-fache zu (TSP-1: 3769 ng/mg \pm 1487; FN: 2634 ng/mg \pm 861 gegenüber 419 ng/mg \pm 275 in den Kontrollzellen; $p < 0,001$). Die als Matrix angebotenen Matrixproteine blieben dagegen ohne Einfluss auf die PAI-1-Sekretion dieser Zelllinie in das konditionierte Medium. (Abbildung 46 b).

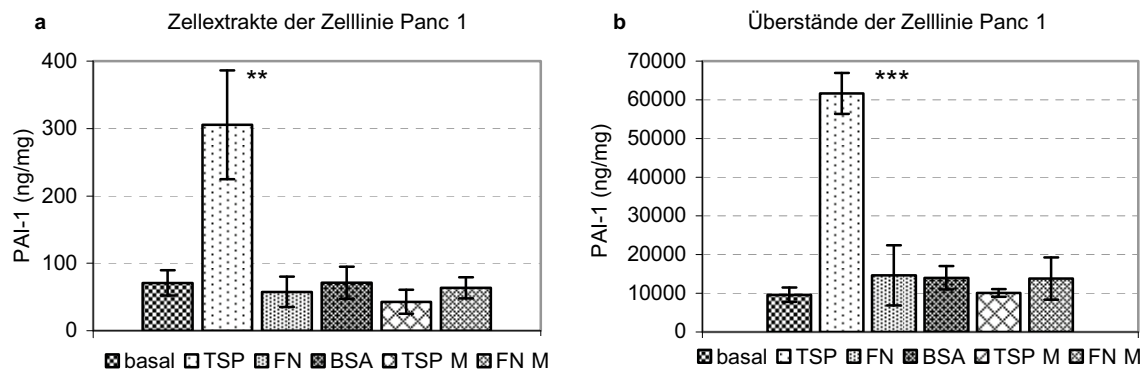


Abb. 47 a und b: PAI-1-Konzentrationen im Zellextrakt (a) und konditioniertem Überstand (b) der Zelllinie Panc-1 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Bei der Zelllinie **Panc-1** nahm die PAI-1-Expression der Zellextrakte unter löslichem TSP-1 um mehr als das 4fache zu (305 ng/mg \pm 80,7 gegenüber 70,9 ng/mg \pm 18,7 in den Kontrollzellen). FN sowie immobilisiertes TSP-1 blieben ohne Wirkung auf die Expression des Inhibitors (Abbildung 47 a).

Ähnlich präsentierten sich die Ergebnisse der Analysen der konditionierten Medien. Hier ließen sich schon unter unstimulierten Zellkulturbedingungen sehr hohe PAI-1-Konzentrationen nachweisen (Abbildung 47 b), die unter löslichem TSP-1 noch einmal um ein Vielfaches anstiegen (61651 ng/mg \pm 5310 gegenüber 9626 ng/mg \pm 1838 im Kontrollmedium; $p < 0,0001$). Wiederum ohne Einfluss blieben dagegen die TSP-1-Matrix und FN (Abbildung 47 b).

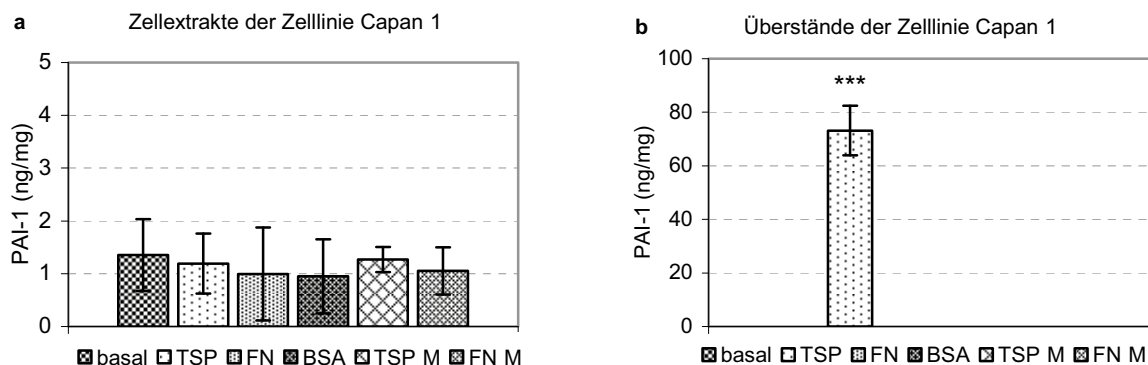


Abb. 48 a und b: PAI-1-Konzentrationen im Zellextrakt (a) und konditioniertem Überstand (b) der Zelllinie Capan-1 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, *** p<0,001

In den Zellextrakten der Zelllinie **Capan-1** waren die PAI-1-Konzentrationen niedrig; eine messbare Modulation durch TSP-1 bzw. FN blieb aus (Abbildung 48 a).

In den konditionierten Überständen der unstimulierten Zellen konnten keine PAI-1-Konzentrationen nachgewiesen werden. Zu einer Expression des Inhibitors kam es nur unter dem Einfluss des löslichen TSP-1 (73,2 ng/mg ± 9,3 gegenüber ~0 ng/mg im Kontrollmedium; p<0,001), während FN und die verwendeten Matrices keine messbaren Veränderungen der PAI-1-Konzentrationen bewirkten (Abbildung 48 b).

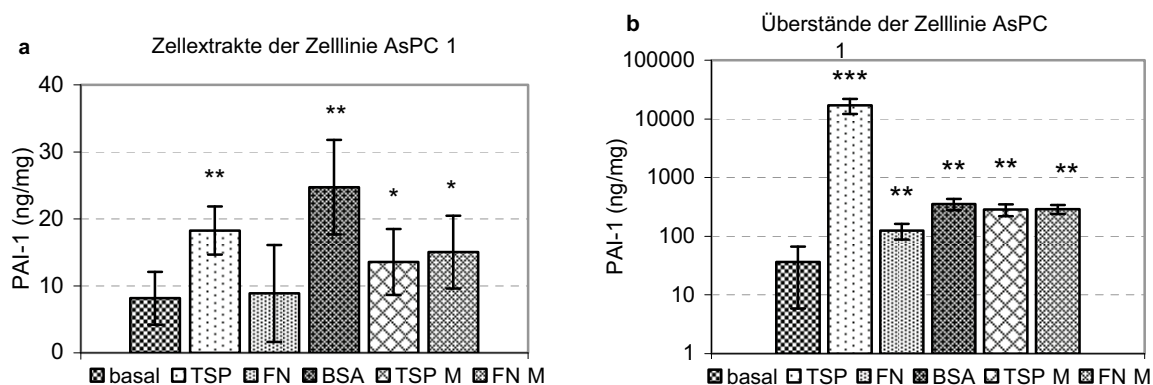


Abb. 49 a und b: PAI-1-Konzentrationen im Zellextrakt (a) und konditioniertem Überstand (b) der Zelllinie AsPC-1 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

Bei der Zelllinie **AsPC-1** führte lösliches TSP-1 zu einem zweifachen Konzentrationsanstieg des PAI-1 in den Zellextrakten (18,2 ng/mg ± 5,6 gegenüber 8,2 ng/mg ± 3,9 in den Kontrollzellen; p<0,01). Auch unter den drei Matrices, insbesondere bei der unspezifischen BSA-Matrix, waren erhöhte PAI-1-Expressionen im Zelllysate nachweisbar (BSA: p<0,01;

MTSP: $p < 0,05$; MFN: $p < 0,05$). Ohne Wirkung auf die Expression des Inhibitors blieb hingegen lösliches FN (Abbildung 49 a).

Eindeutiger präsentierten sich die Ergebnisse der Analysen der konditionierten Überstände (Abbildung 49 b). Die Konzentration des PAI-1 stieg unter löslichem TSP-1 um das 450-fache an ($17020 \text{ ng/mg} \pm 4880$ gegenüber $36,5 \text{ ng/mg} \pm 30,6$ im Kontrollmedium; $p < 0,0001$). Wegen der extrem hohen Differenz wurde zur besseren graphischen Darstellung eine logarithmische Skalierung gewählt (Abbildung 49 b).

Deutlich geringer fielen die Konzentrationszunahmen unter löslichem FN bzw. den drei Matrices aus, aber auch hier wurde die basale PAI-1-Sekretion der Kontrollzellen um ein Vielfaches übertroffen (FN: $125 \text{ ng/mg} \pm 36,9$; BSA: $603 \text{ ng/mg} \pm 138$; TSP-M: $569 \text{ ng/mg} \pm 34,4$; FN-M: $444 \text{ ng/mg} \pm 290$; $p < 0,01$).

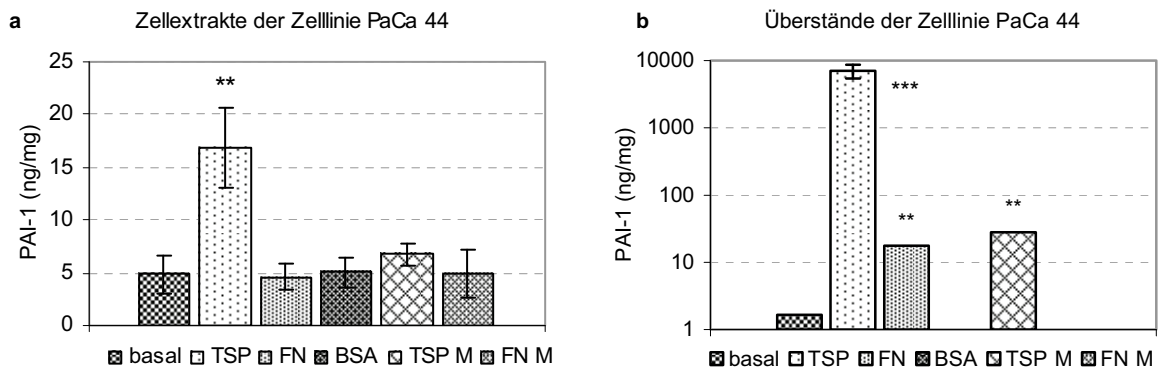


Abb. 50 a und b: PAI-1-Konzentrationen im Zellextrakt (a) und konditioniertem Überstand (b) der Zelllinie PaCa-44 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

In den Zellextrakten der Zelllinie **PaCa-44** ließen sich bei den Kontrollzellen nur niedrige PAI-1-Konzentrationen nachweisen. Zu einer signifikanten Zunahme der PAI-1-Expression kam es nur unter löslichem TSP-1 ($16,8 \text{ ng/mg} \pm 3,8$ gegenüber $4,9 \text{ ng/mg} \pm 1,8$ in den Kontrollzellen; $p < 0,01$). Die TSP-1-Matrix und FN zeigten keinen Einfluss auf die PAI-1-Expression in den Zellextrakten (Abbildung 50 a).

Im konditionierten Medium der Kontrollzellen waren PAI-1-Konzentrationen kaum messbar. Ähnlich wie bei den anderen Zelllinien nahm auch hier die PAI-1-Expression unter löslichem TSP-1 stark zu ($7050 \text{ ng/mg} \pm 16033$ gegenüber $1,6 \text{ ng/mg} \pm 2,6$ im Kontrollmedium; $p < 0,0001$) und wegen der großen Konzentrationsdifferenzen wurde auch hier eine logarithmische Skalierung gewählt (Abbildung 50 b).

Vergleichsweise gering fiel dagegen der Einfluss des löslichen FN bzw. der des immobilisierten TSP-1 aus ($17,8 \text{ ng/mg} \pm 16$ bzw. $27,8 \text{ ng/mg} \pm 5,5$; $p < 0,01$). In allen anderen Proben ließen sich keine PAI-1-Konzentrationen sichern.

4.4.4 Konzentrationen des PAI-2 in den Zellextrakten und konditionierten Medien

Die PAI-2-Analysen konnten nur an einem Teil der Proben durchgeführt werden.

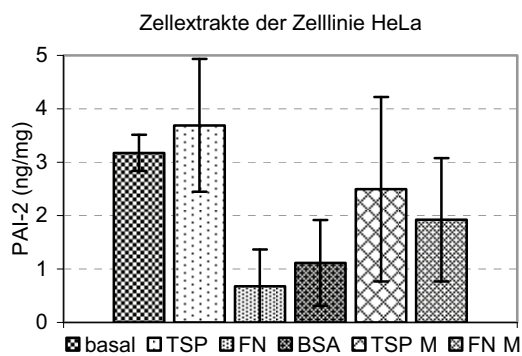


Abb. 51: PAI-2-Konzentrationen im Zellextrakt der Zelllinie HeLa nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix

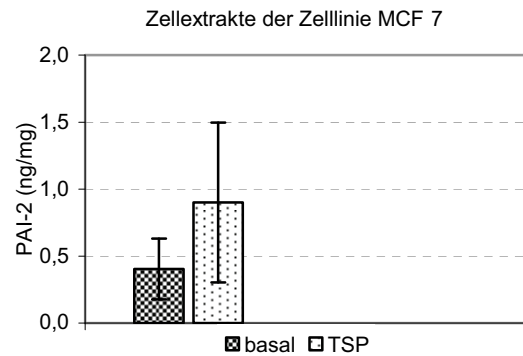


Abb. 52: PAI-2-Konzentrationen im Zellextrakt der Zelllinie MCF-7 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix

Bei der Zelllinie **HeLa** wurden niedrige PAI-2-Konzentrationen mit relativ großen Standardabweichungen gemessen. Signifikante Konzentrationsunterschiede waren nicht nachweisbar (Abbildung 51). In den konditionierten Medien ließen sich mit der verwendeten Methode keine PAI-2-Konzentrationen nachweisen (ohne Abbildung).

Bei der Zelllinie **MCF-7** wurden die basalen PAI-2-Konzentrationen der Kontrollzellen nur mit denen der durch lösliches TSP-1 stimulierten Zellen verglichen. In beiden Zellextrakten waren die PAI-2-Werte sehr niedrig und signifikante Unterschiede nicht erkennbar (Abbildung 52). In den konditionierten Medien konnten keine PAI-2-Konzentrationen nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

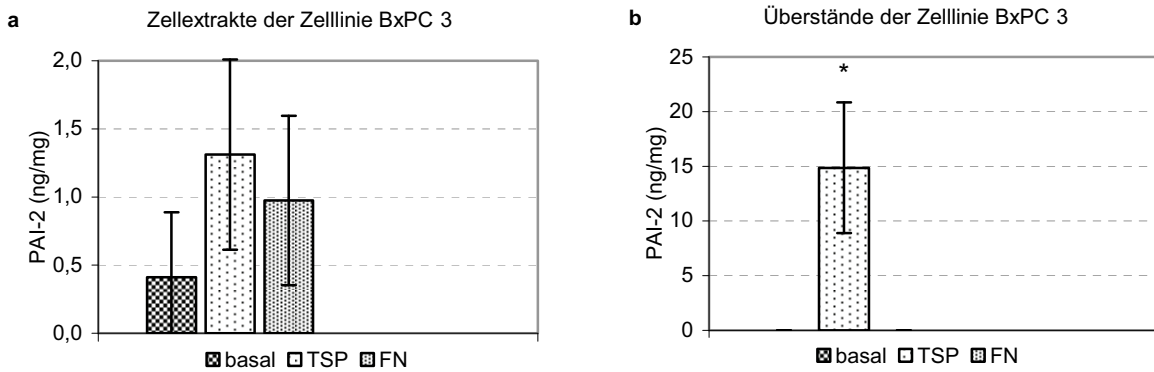


Abb. 53 a und b: PAI-2-Konzentrationen im Zellextrakt (**a**) und konditioniertem Überstand (**b**) der Zelllinie BxPC-3 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium; Kontrolle versus TSP-1 und FN, * $p < 0,05$

Bei der Pankreaskarzinomzelllinie **BxPC-3** wurden die basalen PAI-2-Konzentrationen der Kontrollzellen nur mit denen durch lösliches TSP-1 und FN stimulierten Zellen verglichen. Die in den Zellextrakten gemessenen PAI-2-Werte fielen sehr gering aus. Trotz deutlich höherer Mittelwerte unter beiden Matrixmolekülen wurden keine signifikanten Konzentrationsunterschiede erreicht (Abbildung 53 a).

Anders verhielt es sich bei den Analysen der konditionierten Überstände. Hier konnte ein starker und signifikanter Anstieg des Inhibitors unter der löslichen TSP-1-Stimulation verzeichnet werden ($14,87 \text{ ng/mg} \pm 5,99$ gegenüber $\sim 0 \text{ ng/mg}$ in den Kontrollzellen; $p < 0,05$). Nicht messbar hingegen war PAI-2 in den Medien der Kontrollzellen bzw. der Proben nach FN-Stimulation (Abbildung 53 b).

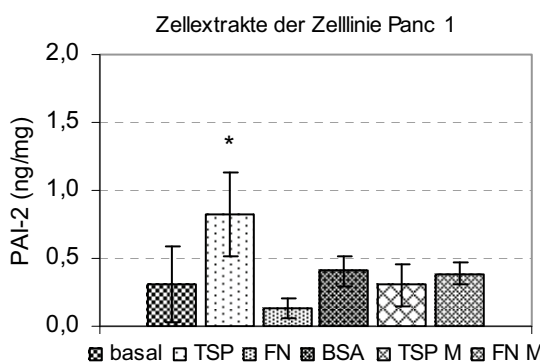


Abb. 54: PAI-2-Konzentrationen im Zellextrakt der Zelllinie Panc-1 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, * $p < 0,05$

In den Zellextrakten der Zelllinie Panc-1 waren die PAI-2-Konzentrationen ebenfalls sehr niedrig (Abbildung 54). Ein leichter und signifikanter Anstieg ließ sich nur unter der löslichen TSP-1-Stimulierung beobachten ($0,828 \text{ ng/mg} \pm 0,313$ gegenüber $0,3 \text{ ng/mg} \pm 0,285$ in den

Kontrollzellen; $p < 0,05$). Nicht nachweisbar war PAI-2 in den Proben der konditionierten Medien (ohne Abbildung).

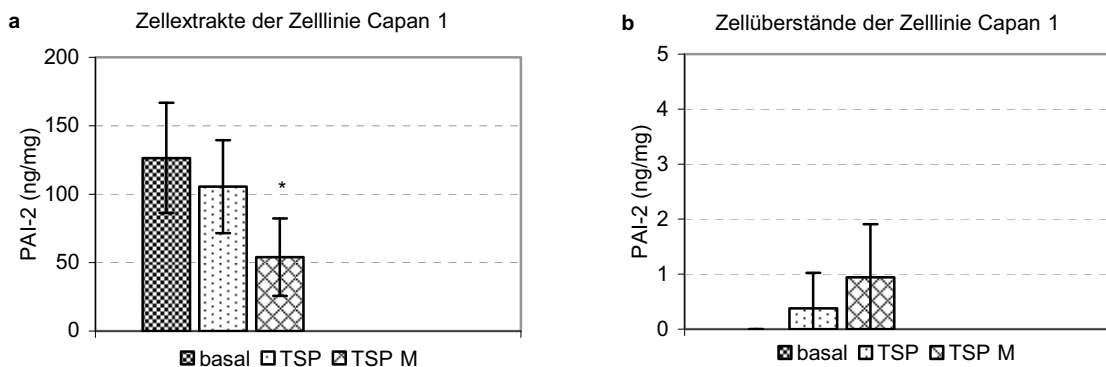


Abb. 55 a und b: PAI-2-Konzentrationen im Zellextrakt (**a**) und konditionierten Überstand (**b**) der Zelllinie Capan-1 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium; Kontrolle versus TSP-1 und FN, * $p < 0,05$

Bei der Zelllinie **Capan-1** wurde ausschließlich der Einfluss des löslichen bzw. immobilisierten TSP-1 auf die PAI-2-Expression untersucht. In den Zellextrakten der Kontrollzellen ließen sich hohe Konzentrationen des Inhibitors nachweisen. Hierbei zeigte sich unter der TSP-1-Matrix eine signifikante Reduktion der PAI-2-Werte ($54 \text{ ng/mg} \pm 28,32$ gegenüber $\pm \sim 0 \text{ ng/mg}$ in den Kontrollzellen; $p < 0,05$), wogegen lösliches TSP-1 ohne signifikante Wirkung blieb. Wegen fehlender Analysen der BSA-Proben konnte eine unspezifische Matrix-Wirkung jedoch nicht ausgeschlossen werden (Abbildung 55 a).

Kaum bzw. nicht nachweisbar war PAI-2 hingegen in den konditionierten Medien (Abbildung 55 b).

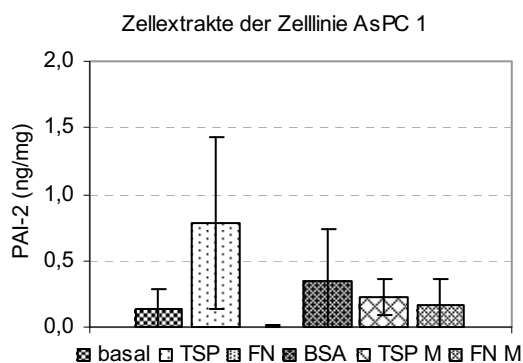


Abb. 56: PAI-2-Konzentrationen im Zellextrakt der Zelllinie AsPC-1 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix

In den Zellextrakten der Zelllinie **AsPC-1** waren die gemessenen PAI-2-Konzentrationen äußerst gering. Ein Anstieg des Mittelwertes ließ sich unter löslichem TSP-1 beobachten;

dieser blieb jedoch wegen der hohen Standardabweichung unterhalb der festgelegten Signifikanzgrenze (Abbildung 56). In den Analysen der konditionierten Medien konnten keine PAI-2-Konzentrationen gesichert werden (ohne Abbildung).

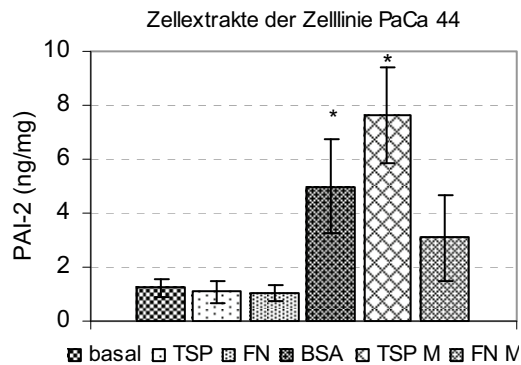


Abb. 57: PAI-2-Konzentrationen im Zellextrakt der Zelllinie PaCa-44 nach Stimulation durch TSP-1 und FN im Kulturmedium bzw. als Matrix; Kontrolle versus TSP-1 und FN bzw. TSP-1-, FN- und BSA-Matrix, * p<0,05

Niedrige PAI-2-Konzentrationen wiesen auch die Zellextrakte der Zelllinie **PaCa-44** auf (Abbildung 57). Zu einer deutlichen und signifikanten Zunahme des PAI-2 kam es unter der TSP-1-Matrix (7,61 ng/mg ± 1,78 gegenüber 1,22 ng/mg ± 0,32 in den Kontrollzellen; p<0,05). Da auch unter der BSA-Matrix ein signifikanter Anstieg des Inhibitors verzeichnet wurde, ist eine spezifische Stimulation unwahrscheinlich (4,99 ng/mg ± 1,76; p<0,05). Ein leichter, aber nicht signifikanter Anstieg wurde auch unter der FN-Matrix beobachtet. Nicht nachweisbar war PAI-2 wiederum in den konditionierten Medien aller Proben (ohne Abbildung).

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Nachfolgend werden die wichtigsten Ergebnisse zusammenfassend dargestellt (Tabelle 5).

In der Mehrzahl der untersuchten Zelllinien war uPA der dominierende PA. Eine geringe Aktivitätsminderung durch Amilorid wurde vor allem bei Capan-1 und HeLa beobachtet, was auf tPA als Hauptaktivator des Plasminogens schließen lässt.

In der fibrinolytischen Aktivität sowie basalen Expression einzelner Parameter des PA-Systems bestanden zwischen den einzelnen Zelllinien zum Teil erhebliche Unterschiede.

Nur drei der sieben Zelllinien zeigten eine signifikante Veränderung ihrer fibrinolytischen Aktivität unter Bedingungen der TSP-1-Stimulation. Bei der Zervixkarzinomzelllinie HeLa nahm die Aktivität sowohl unter löslichem wie auch matrixgebundenem TSP-1 hochsignifikant zu, während bei der Zelllinie Panc-1 die fibrinolytische Aktivität durch beide

Stimuli hochsignifikant abnahm. Bei der Zelllinie Capan-1 führte nur immobilisiertes TSP-1 zu einer (initialen) Aktivitätszunahme.

Auf die Expression von uPA und uPAR übten lösliches sowie immobilisiertes TSP-1 keine einheitlichen Wirkungen aus.

Ein signifikanter Anstieg der uPA-Expression wurde im Zellextrakt von Panc-1 unter dem löslichen bzw. bei PaCa-44 unter dem immobilisierten TSP-1 beobachtet. In den konditionierten Medien der Zelllinien BxPC-3 und Capan-1 stieg uPA unter löslichem und bei PaCa-44 unter immobilisierten TSP-1 an. Zu einer signifikanten Abnahme des uPA kam es hingegen nach TSP-1-Matrixstimulation im konditionierten Medium der Zelllinie Panc-1.

Eine signifikante Zunahme der uPAR-Konzentration wurde nach Stimulation durch lösliches TSP-1 nur in den konditionierten Medien der Zelllinie HeLa und, wenn auch deutlich geringer, BxPC-3 beobachtet. Unter immobilisiertem TSP-1 nahm uPAR nur im Zellextrakt der Zelllinie PaCa-44 zu, während es bei der Zelllinie AsPC-1 unter gleicher Matrixstimulation zu einer Abnahme des Rezeptors kam.

Einheitlicher präsentierten sich die Wirkungen des TSP-1 auf die PAI-1-Expression. Lösliches TSP-1 führte bei allen untersuchten Zelllinien zu einer hochsignifikanten Zunahme der PAI-1-Sekretion in den konditionierten Medien. Dabei wurden in Abhängigkeit von der Zelllinie extrem hohe Konzentrationen erreicht (Panc-1, AsPC-1). Auch in den Zellextrakten wurden, mit Ausnahme der Zelllinien MCF-7 und Capan-1, signifikant höhere PAI-1-Konzentrationen gemessen. Die Zunahmen fielen jedoch vergleichsweise gering aus. Immobilisiertes TSP-1 bewirkte nur in den konditionierten Medien der beiden Zelllinien AsPC-1 und PaCa-44 einen Anstieg des Inhibitors.

Ein signifikanter Anstieg der PAI-2-Konzentrationen wurde durch lösliches TSP-1 im Zellextrakt von Panc-1 bzw. konditioniertem Medium von BxPC-3 beobachtet. Bei der Zelllinie Capan-1 nahm hingegen PAI-2 im Zellextrakt signifikant ab.

Tabelle 5: Tabellarische Zusammenfassung der fibrinolytischen Aktivität sowie der Einzelkomponenten des fibrinolytischen Systems

Zelllinie	Proben	fib. Akt.	uPA		uPAR		PAI-1		PAI-2	
			ZE	KM	ZE	KM	ZE	KM	ZE	KM
HeLa	basal	+	+	o	++	+	+	+++	+	o
	TSP	↑↑↑	-	-	-	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	-	-
	FN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BSA	-	-	-	-	↑	-	-	-	-
	TSP-M	↑↑↑	-	-	-	↑	-	-	-	-
	FN-M	-	-	-	-	↑	-	↑↑	-	-
MCF-7	basal	++	+	o	o/+	o/+	o/+	o	o/+	o
	TSP	-	-	-	-	-	-	↑↑↑	-	-
	FN	↓↓↓	-	-	-	-	-	-	-	-
	BSA	-	-	-	-	-	-	-	/	/
	TSP-M	-	-	-	-	-	-	-	/	/
	FN-M	-	-	-	-	↑	-	-	/	/
BxPC-3	basal	+++	+	++	++	+	++	+++	o/+	o
	TSP	-	-	↑↑↑	-	↑	↑	↑↑↑	-	↑
	FN	-	-	↑↑	-	-	-	↑↑↑	-	-
	BSA	-	-	↑↑	↑	↑	-	-	/	/
	TSP-M	-	-	↑	-	-	-	-	/	/
	FN-M	-	-	-	-	-	-	-	/	/
Panc-1	basal	++	+	+++	+	o/+	++	+++	o/+	o
	TSP	↓↓↓	↑↑	-	-	-	↑↑	↑↑↑	↑	-
	FN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BSA	-	-	-	↑↑	-	-	-	-	-
	TSP-M	↓↓↓	-	↓↓↓	-	-	-	-	-	-
	FN-M	-	-	↓↓↓	-	-	-	-	-	-
Capan-1	basal	+++	+	++	+	++	+	o	+++	o
	TSP	-	-	↑↑	-	-	-	↑↑↑	-	-
	FN	-	-	↓	-	-	-	-	/	/
	BSA	-	-	-	-	-	-	-	/	/
	TSP-M	↑/(↑↑↑)	-	-	-	-	-	-	↓	-
	FN-M	-	-	-	-	-	-	-	/	/
AsPC-1	basal	+++	++	+	++	++	+	++	o/+	o
	TSP	-	-	-	-	-	↑↑	↑↑↑	-	-
	FN	-	-	-	-	↑	-	↑↑	-	-
	BSA	-	-	↑	↑↑	↑	↑↑	↑↑	-	-
	TSP-M	-	-	↑	↓↓	-	↑	↑↑	-	-
	FN-M	-	-	↑	-	↑↑	↑	↑↑	-	-
PaCa-44	basal	+++	++	++	++	++	+	+	o/+	o
	TSP	-	-	-	-	-	↑↑	↑↑↑	-	-
	FN	-	-	-	-	-	-	↑↑	-	-
	BSA	-	-	-	↑	↑	-	-	↑	-
	TSP-M	-	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	-	-	↑↑	↑	-
	FN-M	-	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑	-	-	-	-

Legende:

ZE = Zellextrakt; KM = konditioniertes Medium

+++ = sehr stark; ++ = mäßig stark; + = schwach; o/+ = gar nicht bzw. sehr schwach

Zunahme: ↑↑↑ = hochsignifikant; ↑↑ = sicher signifikant; ↑ = wahrscheinlich signifikant

Abnahme: ↓↓↓ = hochsignifikant; ↓↓ = sicher signifikant; ↓ = wahrscheinlich signifikant

/ = keine Messung

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methode

In vitro durchgeführte Analysen an Zellkulturen erlauben eine gezielte und systematische Untersuchung bestimmter tumorzellbiologischer Eigenschaften.

Sie eignen sich besonders gut zur Untersuchung spezieller Teilaspekte komplexer Prozesse, ermöglichen eine kontrollierte und systematische Manipulation einzelner Einflussgrößen (unter Ausschluss anderer, unerwünschter Faktoren) und bieten zudem den Vorteil einer weitgehenden Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit unter definierten Bedingungen.

Jedoch besitzen Zellkulturtechniken in Anbetracht der komplexen physio- und pathophysiologischen Ereignisse in lebenden Organismen naturgemäß eine eingeschränkte Aussagekraft.

Das zweidimensionale Umfeld einer Petrischale kann die biologischen Eigenschaften und das Verhalten von Zellen verändern (119). Zudem bleiben zahlreiche Einflussfaktoren wie das extrazelluläre Milieu (Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Proteasen etc.) und die Kooperation zwischen den verschiedenen Zellarten (z.B. Stromazellen, Entzündungszellen, Endothelzellen) unberücksichtigt (39).

Demnach müssen in vitro Analysen immer im Gesamtkontext gesehen bzw. interpretiert werden. Direkte Rückschlüsse auf komplexe biologische Abläufe sind in der Regel nicht möglich.

Die enzymatische Plasminaktivität als Maß der perizellulären fibrinolytischen Aktivität wurde mittels etablierter spektrophotometrischer Verfahren bestimmt und als Bezugspunkt der annähernd linear verlaufende Abschnitt der sigmoidalen Aktivitätskurve gewählt.

Die Stimulation durch TSP-1 erfolgte methodisch in Anlehnung an vorangegangene Studien (2, 3). Hier muss jedoch bedacht werden, dass extern zugegebenes TSP-1 möglicherweise eine unterschiedliche Wirkung ausübt als das durch die Tumorzellen exprimierte TSP-1. Ein solcher Unterschied ließ sich anhand einer Studie mit transfizierten Mammakarzinomzellen bestätigen, in der Tumorzell-produziertes TSP-1 einen signifikant stärkeren Einfluss auf das PA-System ausübte als vergleichbare extern zugeführte TSP-1-Konzentrationen (5).

Um die Gefahren von wesentlichen zellulären Veränderungen zu reduzieren, wurde die Anzahl der verwendeten Zellkulturpassagen auf maximal 12 begrenzt. Eine Veränderung der Zelleigenschaften ist jedoch nicht mit Sicherheit auszuschließen.

Die Herstellung der Zellextrakte und konditionierten Medien wurde nach allgemeinen zellbiologischen Verfahren durchgeführt.

Die Analysen der PA-Komponenten erfolgten anhand kommerzieller ELISA-Systeme. Aufgrund der großen Probenanzahl und der Kosten musste die Anzahl der Untersuchungen jedoch meist auf zwei Doppelwertbestimmungen unterschiedlicher Passagen begrenzt werden. Zusätzliche Analysen wurden nur bei unklaren Ergebnissen durchgeführt.

Die statistische Auswertung ist daher nur begrenzt aussagekräftig und die vorliegende Untersuchung als Studie mit orientierendem Charakter (Pilotstudie) anzusehen, deren Ergebnisse durch weitere Untersuchungen bestätigt werden müssen.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Im ersten Teil dieses Abschnittes werden die Untersuchungsergebnisse mit der aktuellen Datenlage verglichen. Hierbei sollen die Ergebnisse ähnlicher Studien kurz vorangestellt und anschließend Zusammenhänge sowie mögliche Ursachen erörtert werden. Weiterhin sollen mögliche Zusammenhänge zwischen veränderten Expressionsmustern und gemessener fibrinolytischer Aktivität diskutiert werden.

Der zweite Teil befasst sich dann mit der möglichen Bedeutung der Ergebnisse in Bezug zur Tumorphagenese.

Expression der Komponenten des PA-Systems unter basalen Zellkulturbedingungen

Vorangegangene Studien belegen die Expression und Sekretion von uPA, tPA, uPAR sowie PAI-1 und -2 durch zahlreiche Tumorzellen. Unter den einzelnen Zelllinien konnten jedoch erhebliche quantitative Unterschiede beobachtet werden (63, 110, 119, 129, 157). Das trifft auch für Zellen aus Pankreaskarzinomen zu. Untersuchungen von Kakkar et al. an acht verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien ergaben eine große Variabilität im Expressionsmuster beider PA und PAI (76).

Auch Gewebeuntersuchungen an Tumoren zeigen ein heterogenes Expressionsmuster des PA-Systems. Meist dominiert die Expression im Tumorrandbereich und einzelne Komponenten können je nach Tumor von verschiedenen Zellarten (Tumorzellen und/oder Stromazellen) synthetisiert werden (71, 85, 164, 173). Spezifische Expressionsmuster für bestimmte Karzinome lassen sich in der Regel nicht beobachten.

Diese Befunde decken sich in weiten Teilen mit den vorliegenden Untersuchungsergebnissen. Die meisten der nichtstimulierten Zelllinien exprimieren die Komponenten des PA-Systems

und auch hier können Expressionsmuster und Intensität einzelner Faktoren stark variieren. Bei einigen Zelllinien waren einzelne Faktoren nicht nachweisbar.

Unterschiede müssen auch in Bezug auf die tPA-Expression angenommen werden. Ein quantitativer Nachweis des tPA wurde nicht durchgeführt, jedoch lassen Aktivitätsanalysen unter dem Amilorideinfluss auch für diesen Faktor deutliche Unterschiede zwischen den Zelllinien vermuten.

Expression der Komponenten des PA-Systems unter löslicher TSP-1-Stimulation

Der Einfluss des löslichen TSP-1 auf das PA-System konnte in den vergangenen Jahren anhand mehrerer Studien nachgewiesen werden.

Wie Albo et al. anhand der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 zeigten, führte TSP-1 zu einem signifikanten Anstieg von uPAR und uPA im Zellextrakt sowie des PAI-1-Gehaltes der konditionierten Medien (2, 10).

In einer anderen, gentransfizierten Mammakarzinomzelllinie (MDA-MB-435) war die TSP-1-Expression mit einer direkt proportionalen und signifikanten Zunahme der zellassozierten uPA- und Plasminaktivität korreliert. Neben dem uPA waren auch die uPAR-Konzentrationen der Zellextrakte sowie die PAI-1-Konzentration der konditionierten Medien signifikant erhöht (1).

Von besonderem Interesse ist die Studie an zwei Pankreaskarzinomzelllinien (AsPC-1 und COLO-357) von Albo et al. Auch hier berichten die Autoren von einem signifikanten und dosisabhängigen Anstieg des PAI-1 in den konditionierten Medien beider Zelllinien. Ohne signifikanten Effekt blieb lösliches TSP-1 hingegen auf die uPA-Expression sowie die PAI-1-Konzentration im Zellextrakt (3). Eine vorangegangene Studie der gleichen Arbeitsgruppe beschreibt zusätzlich einen signifikanten Anstieg des uPAR im Zellextrakt der Zelllinie AsPC-1 nach TSP-1-Stimulation (2).

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse bestätigen die modulierenden Eigenschaften des TSP-1 auf das PA-System.

Besonders eindrucksvoll stellte sich die Wirkung des TSP-1 auf die PAI-1-Expression dar. Unter der löslichen TSP-1-Stimulation nahmen bei allen Zelllinien die PAI-1-Konzentrationen der konditionierten Medien hochsignifikant zu. Das deckt sich mit den Daten der oben aufgeführten Studien.

Im Unterschied zu der Studie von Albo et al. (3) wurde auch in den meisten Zellextrakten der Pankreaskarzinomzelllinien eine signifikante Zunahme des PAI-1 beobachtet.

Möglicherweise ist das auf einen erhöhten Umsatz des Inhibitors zurückzuführen. Hohe Synthese- und Sekretionsraten auf der einen sowie verstärkte Endozytose und intrazellulärer Abbau auf der anderen Seite könnten zu einem relativen PAI-1-Anstieg im Zellextrakt führen. Eine intrazelluläre Speicherung, wie sie in Megakaryozyten und Thrombozyten beschrieben wird, erscheint eher unwahrscheinlich.

Differenzen zu früheren Studien bestehen auch hinsichtlich der uPAR-Expression. Mit Ausnahme der Zelllinie PaCa-44 wurden keine signifikanten Zunahmen des uPAR-Gehalts unter TSP-1 im Zellextrakt festgestellt. Das trifft auch für die Zelllinie AsPC-1 zu und steht somit im Widerspruch zu den Ergebnissen von Albo et al. (3).

Neben zellmembrangebundenem uPAR existieren auch lösliche Formen des Rezeptors (suPAR). Die Herkunft des suPAR wird auf alternatives Splicing und/oder proteolytische Spaltung in Nähe des GPI-Ankers bzw. Hydrolyse des GPI-Ankers durch Phospholipasen zurückgeführt (7). SuPAR wird u. a. im Medium zahlreicher Tumorzellkulturen sowie in erhöhten Konzentrationen bei Tumorpatienten vorgefunden (146, 148, 152). Einige Studien der letzten Jahre weisen auf eine mögliche Rolle des suPAR im Prozess der Karzinogenese hin (75, 94). Über einen Einfluss des TSP-1 auf suPAR von Zellkulturen liegen jedoch keine Veröffentlichungen vor.

Auch in der vorliegenden Arbeit ließen sich mit Ausnahme der Zelllinien MCF-7 und Panc-1 suPAR-Konzentrationen in den konditionierten Medien der Tumorzellen nachweisen. Bei der Zelllinie Capan-1 waren diese sogar um ein Vielfaches höher als die zellassozierten uPAR-Konzentrationen. Darüber hinaus wurde in zwei der sieben Zelllinien eine signifikante Modulation des suPAR unter der löslichen TSP-1-Stimulierung festgestellt. So stiegen im konditionierten Medium der Zervixkarzinomzelllinien HeLa die suPAR-Werte um ein Vielfaches an, weniger eindrucksvoll, aber ebenfalls signifikant auch bei der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3. Da uPAR nur in den Medien zunahm, die zellassozierten uPAR-Konzentrationen hingegen unbeeinflusst blieben, muss von einer verstärkten Sekretion bei alternativem Splicing ausgegangen werden (98).

Wie vorangegangene Studien zeigen, ist die Wirkung des löslichen TSP-1 auf die uPA-Expression unter den Tumorzelllinien nicht einheitlich.

In der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 wird unter der TSP-1-Stimulation ein signifikanter Anstieg des uPA in den Zellextrakten verzeichnet (4, 6, 10), während die Konzentrationen der konditionierten Medien unbeeinflusst bleiben (10).

In transfizierten Mammakarzinomzellen nehmen die uPA-Konzentrationen im Zellextrakt ebenfalls zu, die Gesamtkonzentrationen bleiben jedoch wegen der gleichzeitigen Abnahme des Aktivators im konditionierten Medium unverändert. Da auch die uPAR-Konzentrationen der Zellextrakte ansteigen, gehen die Autoren lediglich von einer verstärkten Rezeptorbindung des uPA bei unveränderter Expressionsintensität aus (5). Im Gegensatz dazu werden in den Pankreaskarzinomzelllinien Colo und AsPC-1 trotz zunehmender uPAR-Expression keine signifikanten Veränderungen der uPA-Konzentrationen im Zellextrakt beobachtet (2, 3).

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse bestätigen die heterogene Wirkung des löslichen TSP-1 auf die uPA-Expression.

Bei den Pankreaskarzinomzelllinien BxPC-1 und Capan-1 stiegen die Konzentrationen des Aktivators in den konditionierten Medien um ein Vielfaches an. Keine Veränderungen zeigten dagegen die Analysen der Zellextrakte, was einer unveränderten zellassozierten Expression des uPAR entspricht. Eine solche isolierte Zunahme des uPA im konditionierten Medium wurde bisher nicht beschrieben.

Bei der Zelllinie Panc-1 waren die uPA-Konzentrationen der Zellextrakte, nicht jedoch die der konditionierten Medien unter der TSP-1-Stimulation signifikant erhöht. Interessanterweise blieb die uPAR-Expression hierbei unbeeinflusst. Eine zunehmende Rezeptorbindung ist aufgrund hoher basaler uPA-Konzentrationen der Medien sowie (unverändert) geringer zellassoziierter uPAR-Expressionen unwahrscheinlich. Möglicherweise liegt hier eine verstärkte intrazelluläre Anreicherung des Aktivators vor. Neben einer gesteigerten Synthese wäre auch eine zunehmende Endozytose des uPA, bedingt durch die hohen PAI-1-Konzentrationen der konditionierten Medien nach TSP-1-Stimulation denkbar (66). Weiterführende Untersuchungen mittels mRNA-Analyse sowie Durchflusszytometrie könnten hierüber detaillierte Auskünfte liefern.

Bei den anderen Zelllinien wurde keine signifikante Veränderung der uPA-Expression unter löslichem TSP-1 beobachtet.

Über eine Modulation der PAI-2-Expression durch TSP-1 liegen derzeit keine Veröffentlichungen vor, jedoch weisen viele Studien auf eine Rolle des Inhibitors in der Tumorphagenese hin (63, 136, 156).

Grundsätzlich können zwei Formen des PAI-2 unterschieden werden. Der intrazelluläre, nicht-glykosylierte PAI-2, der quantitativ den wichtigsten Anteil darstellt sowie der sezernierte, extrazellulär lokalisierte Inhibitor, eine glykosylierte Form, die

physiologischerweise nur einen kleinen Prozentsatz des gesamten PAI-2 ausmacht. Unter bestimmten Umständen kann der extrazelluläre PAI-2 jedoch erheblich zunehmen (84).

Die verwendeten ELISA ermöglichten den Nachweis beider PAI-2-Formen.

Die basale Expression des PAI-2 war meist sehr niedrig, was den Ergebnissen früherer Studien an Pankreaskarzinomzelllinien entspricht (76). Eine Ausnahme bildete die Zelllinie Capan-1, die sich durch hohe zelluläre PAI-2-Konzentrationen auszeichnete.

Der Einfluss des löslichen TSP-1 fiel insgesamt gering aus. In der Zelllinie Panc-1 nahmen der zellassoziierte und bei BxPC-3 der extrazelluläre PAI-2 signifikant zu. Interessanterweise konnte eine signifikante Abnahme von PAI-2 im Zellextrakt von Capan-1 nach Stimulation durch immobilisiertes TSP-1 beobachtet werden.

Als eine Funktion des intrazellulären PAI-2 wird die Regulation der Zellapoptose angenommen (183). Durchgeführte Vitalitätskontrollen sowie Proteingehaltsmessungen lieferten in der vorliegenden Untersuchung jedoch keine Hinweise auf eine Beeinflussung von Zellwachstum und Apoptose durch veränderte PAI-2-Expressionen. Genauere quantitative Analysen (Apoptosemarker, Zellzyklusanalysen) können für weitere Untersuchungen empfohlen werden.

Expression der Komponenten des PA-Systems unter der TSP-1-Matrix

Auch über den Einfluss von Matrix-inkorporiertem bzw. immobilisiertem TSP-1 auf das PA-System liegen noch keine veröffentlichten Studien vor. Es gibt jedoch Hinweise, dass beide TSP-1-Formen über unterschiedliche biologische Eigenschaften verfügen, die auf eine veränderte Konformation des Proteins zurückführbar sind. So führte immobilisiertes, nicht jedoch lösliches TSP-1, zur Stimulation der Zelladhäsion und Migration von Mammakarzinomzellen (29). In einer anderen Untersuchung an Endothelzellen förderte nur das immobilisierte Protein über eine Interaktion mit den $\alpha 3\beta 1$ -Integrinen die Zellproliferation und Angiogenese, während lösliches TSP-1 diese Prozesse hemmte (30).

Mit der vorliegenden Studie ließen sich anhand parallel durchgeführter Matrix-Stimulationen auch Unterschiede zwischen löslichem und immobilisiertem TSP-1 in Bezug auf die Modulation des PA-Systems nachweisen.

Bei den Zelllinien HeLa und Panc-1 führten beide TSP-1-Stimulationen zu signifikanten Veränderungen der fibrinolytischen Aktivität; bei Capan-1 hingegen nahm die Aktivität nur unter der Matrixstimulation zu.

Eine gesteigerte Expression einzelner Faktoren des PA-Systems ließ sich meist nur unter der löslichen TSP-1-Stimulation beobachten. Eine Ausnahme bildete die Zelllinie PaCa-44, die allein durch immobilisiertes TSP-1 zu erhöhter uPA- und uPAR-Expression stimuliert wurde. Das war jedoch kein spezifischer Effekt der TSP-1-Matrix, da gleichsinnige Veränderungen auch unter der FN-Matrix verzeichnet wurden.

Bemerkenswerterweise ist die Reduktion einzelner Komponenten ausschließlich unter der TSP-1-Matrix nachweisbar. Besonders auffällig ist die starke und hochsignifikante Abnahme der uPA-Expression im konditionierten Medium der Zelllinie Panc-1. Auch hier übt FN, nicht jedoch die unspezifische BSA-Matrix, einen vergleichbaren Einfluss aus. Weniger deutlich sind hingegen die Reduktionen des uPAR bei AsPC-1 und des PAI-2 bei Capan-1 in den jeweiligen Zellextrakten. Darüber hinaus beeinflusste nur immobilisiertes TSP-1 die zelluläre PAI-2-Expression der Zelllinien Capan-1 und PaCa-44. Letztere wurde jedoch auch durch die unspezifische BSA-Matrix stimuliert.

Mögliche Ursachen der unterschiedlichen TSP-1-Wirkung

Bei der Betrachtung der Untersuchungsergebnisse fällt auf, dass die Modulation des PA-Systems, mit Ausnahme der PAI-1-Expression, unter den Zelllinien stark variiert.

Diese uneinheitliche Wirkung des TSP-1 wird durch andere Studien bestätigt und ist möglicherweise die zentrale Ursache für die kontroverse Datenlage und Bewertung des TPS-1 in der Tumorphogenese.

Folgende Ursachen könnten hierfür verantwortlich sein:

- TSP-1 kann, bedingt durch seine komplexe molekulare Struktur, mit unterschiedlichen Rezeptoren auf der Zelloberfläche interagieren. Seine Wirkung ist somit eng mit dem Rezeptorexpressionsmuster der Zellen verbunden.

Tumorzellen zeichnen sich häufig durch eine veränderte Rezeptorexpression aus (93, 138) und selbst Zelllinien gleicher Tumorarten können hier deutliche Differenzen aufweisen. Die Folge könnte eine unterschiedliche Reaktion der Tumorzellen auf TSP-1 sein (22, 29, 33).

- Die biologische Wirkung des TSP-1 wird durch seine Konformation mitbestimmt. Eine Konformationsänderung z. B. durch Immobilisierung des Proteins kann mitunter entgegengesetzte Effekte auf Tumorzellen nach sich ziehen (29, 30). Auch in dieser Arbeit ließ sich ein solcher Einfluss nachweisen.

- TSP-1 verfügt über zahlreiche intramolekulare kryptische Sequenzen, die durch proteolytische Spaltung des Moleküls freigelegt und aktiv werden können. Spezifische

Proteasen wären demnach in der Lage, unterschiedlich aktive TSP-1-Fragmente zu generieren. Beispielsweise konnten Taraboletti et al. in Abhängigkeit dieser Fragmente gegenteilige Effekte auf die Expression von MMPs, TIMPs sowie der Angiogenese beobachten. Über die Expression zelleigener spezifischer Proteasen wäre somit eine Modulation der biologischen Wirkung des TSP-1 denkbar (158).

- TSP-1 ist selbst in der Lage, die Funktion anderer aktiver Proteine zu modulieren. Über diesen Mechanismus werden indirekt viele Wirkungen des TSP-1 vermittelt. Das trifft auch für das PA-System zu. Von zentraler Bedeutung ist hierbei TGF- β , auf den nachfolgend kurz eingegangen werden soll.

Die Rolle des TGF- β in der Tumorphagenese ist komplex und noch unvollständig geklärt. Allgemein wird jedoch angenommen, dass dieser multipotente Wachstumsfaktor eine im Frühstadium der Karzinomentwicklung tumorsuppressive, im späteren Verlauf hingegen tumorfördernde Wirkung ausübt. Dieser biphasische Effekt wird auf einen Sensibilitätsverlust der Tumorzellen gegenüber der wachstumshemmenden Wirkung des TGF- β sowie Veränderung des TGF- β -Signals auf Transkriptionsebene zurückgeführt (46, 98).

Als eines der vielen Wirkungsmechanismen wird die Modulation des PA-Systems angenommen. TSP-1 aktiviert latentes TGF- β und bildet aktive Komplexe mit diesem Wachstumsfaktor (141, 143).

In zahlreichen Untersuchungen führte TGF- β nach dessen Aktivierung durch TSP-1 zu verstärkter Expression des uPAR, PAI-1 sowie Zunahme des zellassoziierten uPA. Eine direkte Wirkung des TSP-1 auf das PA-System konnte in diesen Studien anhand Antikörper-Untersuchungen ausgeschlossen werden (1-4, 10). Die Höhe des gesamten TGF- β (aktiv/inaktiv) kann unter den Zelllinien deutliche Differenzen aufweisen (5). Das könnte möglicherweise den unterschiedlichen Einfluss von TSP-1 auf die Expression der PA-Komponenten in verschiedenen Zelllinien mit erklären.

In einer anderen Studie mit TSP-1 produzierenden Mammakarzinomzellen ließ sich jedoch auch eine TGF- β unabhängige Wirkung des TSP-1 auf das PA-System beobachten (5).

Aktivitätsanalysen im Zusammenhang mit dem Expressionsmuster des PA-Systems

Allgemein fiel der Einfluss des TSP-1 auf die fibrinolytische Aktivität der untersuchten Zelllinien relativ gering aus. Nur drei der sieben Zelllinien zeigten eine signifikante Beeinflussung ihrer fibrinolytischen Aktivität. Dieses Ergebnis steht scheinbar im Widerspruch zu den häufig veränderten Expressionsmustern des PA-Systems unter der TSP-

1-Stimulation (s. Tabelle 5). Darüber hinaus fällt es schwer, einen klaren Zusammenhang zwischen der veränderten fibrinolytischen Aktivität und den veränderten PA- und PAI-Expressionsmustern zu erkennen.

Folgende Ursachen könnten hierfür verantwortlich sein:

Die Messungen erfassen lediglich die zellassozierten Aktivitäten. Die im konditionierten Medium enthaltenen löslichen Komponenten wurden nicht in die Aktivitätsanalysen einbezogen. Eine veränderte Konzentration löslicher PA-Komponenten beeinflusst jedoch die Plasminaktivität der konditionierten Medien (1). Darüber hinaus muss auch von einer direkten und/oder indirekten Modulation (autokrin und parakrin) der zellassozierten fibrinolytischen Aktivität sowie der Zellmigration/Invasion durch hohe Konzentrationen löslicher PA-Komponenten ausgegangen werden. Beispielsweise könnte suPAR freies uPA binden und hierüber seine Interaktion mit dem an der Zelloberfläche gebundenem uPAR reduzieren (48). Freies uPA wiederum kann parakrin an benachbarte Zellen binden und die Plasminaktivierung sowie Zellmigration fördern (118). Die Bedeutung des extrazellulären PAI-1 für die Plasminaktivität und Zellinvasion konnte ebenfalls anhand zahlreicher Studien demonstriert werden (13 und 91).

Unberücksichtigt blieben auch die zellulären Lokalisationen der analysierten Komponenten. So ermöglicht die angewendete Methode keine Differenzierung zwischen intrazellulärem und zelloberflächengebundenem uPA. Entscheidend für die zellassozierte fibrinolytische Aktivität ist jedoch ausschließlich die membrangebundene Form (48). Obwohl angenommen wird, dass der zellassozierte uPA als teilweise äquivalent zum rezeptorgebundenen uPA betrachtet werden kann (10), ist eine primäre intrazelluläre Anreicherung nicht mit Sicherheit auszuschließen. Eine weiterführende Untersuchung mittels Durchflusszytometrie könnte hierüber genauere Informationen liefern.

Veränderungen in der tPA-Expression blieben unberücksichtigt.

tPA ist neben uPA der wichtigste physiologische PA, scheint jedoch im Prozess der Tumorphathogenese nur eine vergleichsweise untergeordnete Rolle zu spielen. Gleichwohl gibt es einige Studien, die tPA als zentralen PA beschreiben. Das trifft auch auf das Pankreaskarzinom zu (19, 119).

Untersuchungen an Pankreaskarzinomzelllinien bestätigen die Expression des uPA in nahezu allen Zelllinien. In einigen, meist gut differenzierten Zelllinien sind mitunter jedoch hohe

tPA-Konzentrationen nachweisbar und die Invasion dieser Zellen lässt sich sowohl durch uPA- als auch tPA-Antikörper signifikant hemmen (76, 119).

Widersprüchlicher sind die Daten in Bezug auf die tPA-Expression im Pankreaskarzinomgewebe. In einer immunhistochemischen Studie von Takeuchi et al. waren 78% der Gewebeproben positiv für uPA und nur 8% für tPA (156). In einer anderen Studie hingegen war tPA der vorrangig exprimierte Aktivator und uPA in nur 3 von 14 duktalem Adenokarzinomen nachweisbar. Dieses Ergebnis veranlasste die Autoren, tPA als spezifischen und wichtigsten PA im neoplastischen Prozess des Pankreaskarzinoms anzusehen (119).

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von Aktivitätsanalysen unter Amilorideinfluss der relative Anteil des tPA an der fibrinolytischen Aktivität untersucht. Dabei konnte bei allen Zelllinien eine variable Reduktion der gemessenen Aktivitäten beobachtet werden, was auf eine, wenn auch unterschiedlich starke tPA-Expression schließen lässt. Hohe tPA-Anteile wurden in der Pankreaskarzinomzelllinie Capan-1 (>80%) sowie der Zervixkarzinomzelllinie HeLa (>60%) verzeichnet, mit über 40% immer noch relativ hoch auch bei der Zelllinie Panc-1.

Interessanterweise wurden die fibrinolytischen Aktivitäten unter der TSP-1-Stimulation primär bei den Zelllinien mit hohem tPA-Anteil moduliert; ein Zusammenhang mit veränderter zellassoziierter uPA- und/oder uPAR-Expression ließ sich dabei nicht erkennen. Möglicherweise wurde hier die tPA-Expression durch TSP moduliert. Eine sichere Aussage ist jedoch wegen fehlender quantitativer tPA-Analysen nicht möglich.

Veröffentlichungen über den Einfluss des TSP-1 auf die tPA-Expression maligner Zellen liegen derzeit nicht vor.

An dieser Stelle soll noch auf ein besonders auffälliges Untersuchungsergebnis eingegangen werden. Bei der Zelllinie PaCa-44 wurde unter der TSP-1- bzw. FN-Matrix ein hochsignifikanter Anstieg der uPA- und uPAR-Konzentration in den Zellextrakten beobachtet, während der PAI-1-Gehalt unverändert blieb. Dennoch wurde die zellassozierte fibrinolytische Aktivität nicht signifikant beeinflusst. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu anderen Studien, in denen zunehmende zellassozierte uPAR- und uPA-Expressionen mit höheren Plasminaktivitäten assoziiert sind (5, 6, 48). Eine Erklärung konnte hierfür nicht gefunden werden.

5.3. Mögliche Bedeutung der Ergebnisse im Bezug auf die Tumorphagenese

Im folgenden Abschnitt soll auf die mögliche pathophysiologische und klinische Bedeutung der erhobenen Daten eingegangen werden.

Die Bedeutung des PA-Systems in der Tumorphagenese ist heute unumstritten. Viele Tumorzellen sind *in vitro* zur Synthese und Sekretion von uPA, tPA, uPAR, sowie PAI-1 und -2 befähigt (110, 112, 129, 157) und zahlreiche Studien belegen die zentrale Rolle dieser Proteine im Prozess der Zellmigration und Tumorinvasion (52, 68, 119, 148). Weiterhin zeigen Gewebesanalysen verschiedener invasiver Tumoren meist signifikant höhere Konzentrationen einzelner oder mehrerer Komponenten des PA-Systems als im korrespondierenden gesunden Gewebe (27, 119, 144, 156) sowie eine verstärkte lokale Expression der Komponenten im Tumorrandbereich bzw. an der Tumorinvasionsfront (54, 58, 112, 126, 136, 157). Umfangreich belegt ist auch die Korrelation zwischen dem PA-System sowie verschiedenen klinischen Parametern und Prognose. Erhöhte uPA und/oder uPAR und/oder PAI-1-Konzentrationen im Tumor korrelieren häufig mit einem fortgeschrittenerem Krankheitsstadium und schlechterer Prognose (56, 59, 62, 65, 77, 144), eine zunehmende PAI-2-Expression hingegen ist (meist) mit einem positiveren Krankheitsverlauf assoziiert (23, 156, 180).

Ebenfalls in die Tumorphagenese involviert ist TSP-1. Die große Anzahl komplexer und widersprüchlicher Studienergebnisse führte jedoch zu einer uneinheitlichen Beurteilung der Funktion und Bedeutung des TSP-1 im Karzinom. So sprechen viele Autoren dem TSP-1 anti-angiogenetische/anti-tumorale Eigenschaften zu, während andere zu gegenteiligen Ergebnissen kommen (60, 124, 135, 140, 153, 154). Als Ursache hierfür werden zahlreiche Faktoren verantwortlich gemacht (s. Kapitel 1.2.4).

Einer der möglichen pathogenetischen Mechanismen ist die Modulation des PA-Systems. Diese kann indirekt über die Aktivierung des TGF- β geschehen (3, 4, 143), andere, TGF- β unabhängige Mechanismen sind jedoch wahrscheinlich (5). Denkbar wäre beispielsweise eine Modulation des PA-Systems über das $\alpha v \beta 3$ -Integrin. TSP-1 interagiert auf unterschiedliche Weise mit diesem Rezeptor (RGD-Sequenz und IAP) und vermittelt hierüber neben der Zelladhäsion auch die Invasion und Chemotaxis unterschiedlicher Zellen (57, 88 163). Die Aktivierung dieses Vitronektinrezeptors ist in anderen Studien wiederum mit einem

signifikanten Anstieg der uPAR- und PAI-1-Expression sowie verstärkter Zellinvasion assoziiert (81).

Die Beeinflussung des PA-Systems könnte weitreichende pathophysiologische Konsequenzen nach sich ziehen. Plasmin ist am Abbau der EZM beteiligt (7, 28, 90, 106), aktiviert andere Proteasen (7, 103, 130) und spielt eine zentrale Rolle bei der Tumorzellinvasion und Metastasierung (8, 91, 103). Auch in der (Tumor)Angiogenese ist die Serinprotease involviert (116, 130). Neben der Regulierung der Plasminaktivität beeinflussen uPA, uPAR sowie PAI-1 und -2 noch zahlreiche andere biologische Funktionen (20, 42).

Durch die vorliegende Arbeit wurde die Modulation des PA-Systems durch TSP-1 bestätigt. Der Einfluss des Matrixmoleküls fiel jedoch unter den verwendeten Zelllinien uneinheitlich aus. Bei zwei der sieben Zelllinien wurde die fibrinolytische Aktivität signifikant gesteigert (HeLa und Capan-1, letztere jedoch nur unter der TSP-1-Matrix), bei einer weiteren hingegen signifikant gehemmt (Panc-1). Alle anderen Zelllinien zeigten keine Veränderung ihrer fibrinolytischen Aktivität.

Diese unterschiedliche Beeinflussung der Plasmingenerierung verschiedener Zelllinien ist möglicherweise eine weitere Erklärung für die diskrepante Rolle des TSP-1 in der Tumorphagenese. So könnte eine gesteigerte zellassoziierte Plasminaktivität die Zellmigration und -invasion durch gezielte lokale Degradation der EZM fördern, während eine abnehmende Aktivität mit einer Hemmung derselben verbunden wäre (5, 91, 103).

Ebenfalls uneinheitlich präsentierte sich der Einfluss des TSP1 auf die meisten Komponenten des PA-Systems. Auf die mögliche Bedeutung dieser Modulation soll nachfolgend näher eingegangen werden.

uPA

Drei der fünf analysierten Pankreaskarzinomzelllinien (BxPC-3, Capan-1, PaCa-44) zeigten unter der TSP-1-Stimulierung (lösliches oder immobilisiertes TSP-1) eine starke Zunahme der uPA-Konzentration in den jeweiligen Zellmedien (s. Tabelle 5).

Eine gesteigerte Sekretion des Aktivators könnte verschiedene Effekte in der Tumorphagenese haben. Über die Bindung an den zellassoziierten uPAR nimmt die lokale Plasmingenerierung an der Zelloberfläche zu (48). Hierbei ist auch eine parakrine Bindung des uPA am Rezeptor angrenzender Zellen denkbar, worüber die Zellinvasion und Proliferation benachbarter (uPAR exprimierender) Tumorzellen, aber auch anderer Zellen (z.B. Stromazellen, Endothelzellen) moduliert werden könnten (39, 118).

Eine gegenseitige Beeinflussung der Zellen durch Expression unterschiedlicher Komponenten des PA-Systems wurde inzwischen durch zahlreiche in vitro und vivo Tumorstudien bestätigt (118, 145). Zudem werden einzelne Komponenten des PA-Systems häufig verstärkt am Tumorrand bzw. der Invasionsfront exprimiert (54, 126, 136, 157) und eine mögliche Kooperation zwischen den Tumor- und Stromazellen (z.B. Fibroblasten, Entzündungszellen) von vielen Autoren postuliert (39, 126).

Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang auch die Kooperation zwischen den Tumorzellen und Endothelzellen. Zum einen fördert von den Tumorzellen bereit gestelltes uPA und PAI-1 die Endothelzellinvasion bzw. Angiogenese, zum anderen werden die Endothelzellen zur eigenen Expression beider Faktoren stimuliert (12).

Unabhängig von der Plasminaktivierung könnten veränderte uPA-Konzentrationen auch direkt die Tumorzelladhäsion und Migration beeinflussen.

Folgende Mechanismen sind hierfür verantwortlich:

- Eine Affinitätsabnahme von PAI-1 zu VN durch Bindung des uPA an den Inhibitor. Hierdurch werden Integrin- und uPAR-Bindungsstellen frei (42).
- Eine starke Affinitätszunahme von uPAR zu VN durch Bindung des uPA an den Rezeptor (43, 171).
- Eine chemotaktische Wirkung des uPA auf uPAR-exprimierende Zellen. Verantwortlich hierfür ist die Demaskierung eines chemotaktischen Epitops des uPAR, welches dann mit FPFL1 interagiert und zur Induktion intrazellulärer Signale führt (20, 110, 119).
- Eine laterale Assoziation des uPA/uPAR-Komplexes mit diversen Integrinen. Das kann zur Aktivierung intrazellulärer Kinasen führen und die Interaktionen/Funktionen der Integrine beeinflussen (7, 20, 113, 175). Neben der Zelladhäsion und Migration werden hierüber auch Zelldifferenzierung und Proliferation moduliert (53).

Somit könnte eine durch TSP-1 modulierte uPA-Expression unterschiedliche zellbiologische Prozesse beeinflussen.

In der Tumorpathogenese scheint der gesteigerten Plasminaktivierung jedoch die größte Bedeutung zuzukommen. Hohe uPA- bzw. Plasminaktivitäten führen zu einem verstärkten Matrixabbau und einer zunehmenden Zellmigration und -invasion (5, 6, 26, 103). Zudem sind erhöhte uPA-Expressionen in zahlreichen Studien mit einer verstärkten Tumorprogression und -angiogenese, erhöhten Metastasierungsraten sowie schlechterer Prognose assoziiert (59, 62, 77, 144). Eine durch TSP-1 stimulierte uPA-Expression könnte demnach die Tumorprogression zusätzlich verstärken.

uPAR

Unterschiedlich fiel auch der Einfluss von TSP-1 auf die uPAR-Expression der Zellen aus.

Bei einer Zelllinie (PaCa-44) nahm der zellassozierte uPAR unter der TSP-1-Matrix zu; bei zwei weiteren Zelllinien (HeLa und BxPC-3) wurde unter dem löslichen TSP-1 ein signifikanter Anstieg des uPAR im konditionierten Medium verzeichnet.

Zunehmender zellassoziierter uPAR könnte auf vielfältige Weise die Tumorprogression beeinflussen.

Gemeinsam mit uPA bildet uPAR ein effizientes, zelloberflächenassoziertes proteolytisches System, welches durch gezielte, lokale Degradation der EZM eine zentrale Rolle in der Tumorzellinvasion und Metastasierung einnimmt (8). In Studien von Albo et al. an Tumorzellen führte eine gesteigerte uPAR-Expression nach TSP-1- bzw. TGF- β -Stimulation zur signifikanten Zunahme der Zellinvasion. Diese konnte durch Antikörper gegen uPA bzw. uPAR oder durch Hemmung der Plasmingenerierung an der Zelloberfläche gehemmt werden (2, 4, 5).

Weiterhin moduliert uPAR über eine laterale Assoziation mit Integrinen zahlreiche Prozesse wie Zelladhäsion, Migration und Proliferation (7, 20, 98, 113).

Diese, von der Plasmingenerierung unabhängigen Funktionen des Rezeptors könnten ebenfalls die Tumorprogression beeinflussen (20, 148, 150). Jedoch scheint, zumindest bezüglich der zunehmenden Tumorzellinvasion nach TSP-1-Stimulierung, der durch uPAR/uPA vermittelten Plasmingenerierung die größte Bedeutung zuzukommen (5).

Ähnlich wie für uPA wurde eine erhöhte uPAR-Konzentration in zahlreichen Studien mit einer fortgeschrittenen Tumorentwicklung und schlechterer Gesamtüberlebensrate assoziiert (27, 56). Bei einigen Tumoren scheint uPAR auch mit dem Dysplasiegrad sowie Tumorstadium zu korrelieren (17).

Einzelne Untersuchungen erzielten jedoch gegenteilige Resultate. Beispielsweise waren im Ovarialkarzinom die uPAR-Expression im schlecht differenzierten Karzinom und fortgeschrittenem Tumorstadium erniedrigt, hohe Konzentrationen des Rezeptors hingegen mit einer längeren Gesamtüberlebenszeit der Patientinnen assoziiert (2). Dieser Effekt des uPAR scheint jedoch tumorspezifischer Natur zu sein und ist möglicherweise auf die vielseitigen Funktionen des Rezeptors zurückzuführen (2).

Eine erhöhte suPAR-Expression wird in vielen Studien im Zusammenhang mit der Tumorphathogenese beschrieben (98). Bezüglich deren Bedeutung liegen jedoch kontroverse

Daten vor. In Untersuchungen an Ovarialkarzinompatientinnen korrelierten erhöhte suPAR-Plasmakonzentrationen signifikant mit einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit und im Kolonkarzinom stellten sich erhöhte suPAR-Konzentrationen als ein negativer, unabhängiger prognostischer Faktor heraus (146, 152).

In anderen Studien an Ovarial- und Mammakarzinomzelllinien führten erhöhte suPAR-Konzentrationen (durch Supplementierung bzw. erhöhter Synthese eines rekombinanten suPAR nach Transfektion der Tumorzellen) hingegen zu einer starken Reduktion der Tumorzellproliferation, der Plasminogenaktivierung/proteolytische Aktivität in vitro sowie zur signifikanten Hemmung des Tumorwachstums und Metastasierung in vivo (94). Die Autoren führen das auf eine durch Bindung des uPA an suPAR bedingte Reduktion der uPA/uPAR-Interaktion auf der Zelloberfläche zurück. Hierbei wirkt suPAR als eine Art hochaffiner Kompetitor, der freie uPA bindet und hierdurch deren Zelloberflächenbindung verhindert (94).

Neben der Eigenschaft des suPAR, freie uPA „abzufangen“, beeinflusst dieser auch auf eine direkte, uPA unabhängige Weise die Tumorprogression. Das wird auf eine Hemmung der Signalaktivität des membrangebundenen uPAR zurückgeführt, vermutlich über eine kompetitive Verdrängung des uPA/uPAR-Komplexes von seinem Signal-Adaptor-Protein. Jo et al. konnten über diesen Mechanismus in Abhängigkeit der Zellart unterschiedliche Effekte des suPAR nachweisen. Bei Tumorzellen mit potentem autokrinen uPA-uPAR-Signalsystem führte suPAR zu einer Reduktion der ERK-Aktivierung. Die ERK (Ras-extracellular signal-regulated kinase) spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellproliferation, Migration und Invasion. Bei fehlender uPAR-Expression hingegen wirkte suPAR als partieller Agonist (mit schwacher intrinsischer Aktivität) und führte zu einer Aktivierung dieser intrazellulären Kinase. Je nach Tumorzelle und suPAR-Sekretion wäre somit wahlweise eine Inhibition oder Förderung der Tumorprogression möglich (75).

Aufgrund der häufig erhöhten uPA und/oder uPAR-Expressionen in malignen Zellen (43, 148) muss jedoch von einer überwiegend hemmenden Wirkung des suPAR auf die Tumorentwicklung ausgegangen werden.

Durch Modulation der suPAR-Konzentrationen könnte TSP-1 über die genannten Mechanismen die Tumorphathogenese beeinflussen.

PAI-1

Einheitlicher präsentierte sich die Wirkung des TSP-1 in Bezug auf die PAI-1-Expression. Unter dem löslichen Matrixmolekül wurde ein starker Anstieg des Inhibitors in allen konditionierten Zellkulturmedien beobachtet. Meist waren auch die PAI-1-Konzentrationen der Zellextrakte erhöht.

Die Expression des PAI-1 nimmt im malignen Tumorgewebe häufig zu. Interessanterweise sind erhöhte PAI-1-Konzentrationen vielfach mit einer zunehmenden Aggressivität der Erkrankung sowie kürzerer Überlebenszeit assoziiert (17, 23, 59, 64, 121). Diese Beobachtung schien lange Zeit im Widerspruch zur bekannten Funktion des PAI-1 als zentraler Inhibitor der Plasminogenaktivatoren zu stehen (42).

Wenngleich die genauen Mechanismen der Beeinflussung von Tumorwachstum und -ausbreitung durch PAI-1 noch spekulativer Natur sind, lieferten Untersuchungen der vergangenen Jahren neue Erkenntnisse über die komplexen Abläufe der Tumorphathogenese und die Funktionen des PAI-1.

Demnach stellt die für die Zellinvasion und -metastasierung erforderliche perizelluläre Proteolyse einen räumlich und zeitlich limitierten Prozess dar, der unkontrolliert zu einer Hemmung der Tumorprogression führen kann. So ist beispielsweise eine exzessive Degradation der umliegenden Matrix mit einer reduzierten Tumordinvasion verbunden. Diese wird auf einen zu starken Verlust der Zelladhäsion an die EZM zurückgeführt (14).

Für die Regulation der extrazellulären Proteolyse scheint PAI-1 essentiell zu sein. Hohe bzw. zu niedrige Konzentrationen des Inhibitors führen gleichermaßen zu einer Hemmung der Tumorprogression und Vaskularisation (13, 44).

Daneben scheint auch dessen Lokalisation/Expressionsort von Bedeutung zu sein. In Untersuchungen von Bajou et al. erwies sich die PAI-1-Produktion durch die umliegenden Stromazellen als besonders wichtig (14). Eine mangelnde Synthese des Inhibitors durch diese Zellen führte zu einer Abnahme von Tumorwachstum/Invasion bzw. Angiogenese und ließ sich auch durch erhöhte PAI-1-Expressionen in den Tumorzellen nicht kompensieren (13, 14).

Immunhistochemische und mRNA-Untersuchungen an Tumorgeweben lassen jedoch keine zellspezifische PAI-1-Expression erkennen. So wird der Inhibitor in einigen Tumoren primär durch Stromazellen produziert (111, 136), während andere Studien die Tumorzellen bzw. diverse Zellarten als Expressionsort des PAI-1 beschreiben (112, 166).

Die Kontrolle der perizellulären Proteolyse wird als wichtigster Mechanismus in der tumorprogressiven Wirkung des PAI-1 angesehen (13).

Darüber hinaus könnte PAI-1 über seine - von seiner enzymatischen Aktivität unabhängigen - anti-adhäsiven Eigenschaften die Tumorprogression beeinflussen.

Folgende Mechanismen werden hierfür verantwortlich gemacht:

- Eine kompetitive Hemmung der uPAR-Bindung an VN durch PAI-1. Das kann zur Reduktion der Zelladhäsion sowie Zunahme der Motilität bestimmter Karzinomzellen führen (42, 151).

- Eine sterische Blockade der RGD-Sequenz der Somatomedin B Region durch Bindung des PAI-1 an VN. Die Folgen können eine Inhibition der Integrinbindung sowie Abnahme der Zellmigration sein (38, 43).

- Eine Interaktion des PAI-1 mit dem uPA/uPAR/Integrinkomplex an der Zelloberfläche. Hierüber wird die Zelladhäsion an diverse Matrixmoleküle beeinflusst. Das geschieht durch Inaktivierung der Integrine und anschließender (LRP-abhängiger) Internalisierung des gesamten Komplexes. Während der LRP-uPAR-Integrin-Komplex wieder an die Zelloberfläche gelangt, werden uPA und PAI-1 lysosomal degradiert. Ein möglicher polarisierender Endozytosezyklus könnte die Zellmigration zusätzlich beeinflussen (7, 34, 38, 42).

Die komplexen Wirkungen des PAI-1 auf die Zellmigration/Invasion werden durch zahlreiche weitere Faktoren beeinflusst. So spielen neben der Konzentration und Lokalisation des Inhibitors auch das Expressionsmuster der Integrine, die Konzentrationen des uPA und uPAR sowie die Zusammensetzung der EZM eine Rolle (7, 42, 43, 134, 150).

In Abhängigkeit dieser Faktoren könnte die unter der TSP-1-Stimulation zunehmende PAI-1-Expression einen unterschiedlichen Einfluss auf die Tumorprogression ausüben. Hierbei wären sowohl tumorfördernde als auch hemmende Auswirkungen denkbar. In Anbetracht der großen Anzahl übereinstimmender Studien, in denen eine erhöhte PAI-1-Expression im Primärtumor mit einer signifikanten Zunahme der Tumorprogression, des Metastasierungsrisikos und einer kürzeren Gesamtüberlebensrate korreliert, muss jedoch primär von einem tumorfördernden Effekt ausgegangen werden (23, 59, 65, 77, 112, 136).

An dieser Stelle soll auch noch einmal die Rolle des PAI-1 im Prozess der Tumorangiogenese hervorgehoben werden. Gemeinsam mit anderen Komponenten des PA-Systems erwies sich die Anwesenheit des Inhibitors als essentiell für eine effektive Angiogenese (12, 13). Als Hauptursache wird auch hier die Regulation der Matrixdegradation angenommen (130). Die

Tumervaskularisation korreliert wiederum mit der Tumorprogression und Prognose (24, 80, 142).

Somit könnte TSP-1 über eine Modulation der PAI-1-Expression auch die Angiogenese indirekt beeinflussen. Dies könnte möglicherweise eine weitere Ursache für die widersprüchliche Wirkung des Matrixmoleküls bezüglich der Angiogenese darstellen.

PAI-2

Der Einfluss des TSP-1 auf die PAI-2-Expression fiel vergleichsweise gering und heterogen aus. Bei drei Zelllinien stiegen die Konzentrationen von PAI-2 im konditionierten Medium bzw. Zellextrakt signifikant an (BxPC-3, Panc-1 und PaCa-44), bei einer weiteren ließ sich hingegen eine deutliche Reduktion des Inhibitors im Zellextrakt beobachten (Capan-1). Da bei dieser Zelllinie aber keine BSA-Matrix verwendet wurde, ist eine unspezifische Stimulation nicht mit Sicherheit auszuschließen.

Bei zwei der sieben Zelllinien (MCF-7 und BxPC-3) wurden keine TSP-1-Matrixstimulationen durchgeführt.

Verglichen mit PAI-1 sind Funktion und Auswirkungen von PAI-2 in der Tumorpathogenese wenig erforscht. Gleichwohl deuten Studien auf eine Rolle des PAI-2 in der Tumorpathogenese hin. Der Inhibitor wird von unterschiedlichen Tumorzellen exprimiert (76, 129, 156) und kann immunhistologisch bzw. mittels mRNA-Analysen in zahlreichen Karzinomgeweben - meist verstärkt am Tumorrand und/oder Invasionsfront - in Tumorzellen und/oder Stromazellen nachgewiesen werden (112, 136, 145, 156).

Im Gegensatz zum PAI-1 ist eine hohe PAI-2-Expression im Karzinom meist mit einem geringeren Tumorwachstum, einer reduzierten Metastasierungshäufigkeit sowie besseren Prognose korreliert (23, 97, 156, 180).

In einigen Studien jedoch wurden erhöhte PAI-2-Konzentrationen mit einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit assoziiert. Möglicherweise ist das auf eine gewebespezifische Wirkung des PAI-2 zurückzuführen (115, 117).

Für die Funktion des PAI-2 ist seine Lokalisation von Bedeutung.

Extrazellulärer PAI-2 hemmt spezifisch uPA und tPA und beeinflusst hierüber die Matrixdegradation und Zellinvasion (84). Zudem ist die Bindung an den uPA/uPAR-Komplex mit einer gesteigerten Clearance des uPA von der Zelloberfläche verbunden (35).

Die genauen Funktionen des intrazellulären PAI-2 sind im Detail noch nicht geklärt. Beschrieben werden u. a. eine Beeinflussung der Zellproliferation und -differenzierung (99, 181). Weiterhin werden eine anti-apoptotische Wirkung und ein möglicher Zusammenhang

mit proliferativen Prozessen angenommen. So korreliert eine PAI-2-Überexpression in Keratinozyten signifikant mit einer reduzierten Apoptose sowie der Bildung von Papillomen, und PAI-2 cDNA transfizierte Zervixkarzinomzellen (HeLa) weisen einen erhöhten Schutz vor dem apoptotischen Potential von TGF- α auf (45, 183). Wegen der benötigten hohen Konzentrationen ist die physiologische Relevanz jedoch umstritten (99). Anders könnte sich die Situation in pathologischen Prozessen darstellen, die häufig mit erhöhter PAI-2-Expression einhergehen (84).

Die durch TSP-1 modulierte PAI-2-Expression könnte demzufolge eine unterschiedliche Wirkung auf die Tumorprogression ausüben. Eine zunehmende Sekretion des PAI-2 könnte zur verstärkten Hemmung der PA, einem reduzierten Matrixabbau sowie abnehmender Zellinvasion und Metastasierung führen (85, 108, 133). Ansteigende intrazelluläre PAI-2-Konzentrationen könnten dagegen über die Hemmung der Zellapoptose die Tumorprogression fördern, während eine Reduktion der intrazellulären PAI-2-Konzentration mit einer Hemmung derselben verbunden wäre (183).

Die Wirkung des intrazellulären PAI-2 ist möglicherweise eine Erklärung für die in manchen Studien beschriebene positive Korrelation zwischen hoher PAI-2-Konzentration und schlechter Prognose (115, 117). Unterstützt wird diese Annahme durch eine Studie von Shiomi et al., in der eine lokalisationsabhängige Wirkung von PAI-2 nachgewiesen wurde. Demnach war die PAI-2-Expression in Stromazellen eines Ösophaguskarzinoms mit einer guten Prognose assoziiert, während die Expression in Tumorzellen mit einer schlechten Prognose korreliert war (145).

Somit lässt sich auch für die durch TSP-1 modulierte Expression des PAI-2 keine generelle Aussage bezüglich der Wirkung auf die Tumorprogression machen.

6 Zusammenfassung

In den Prozessen der Tumorprogression, -invasion und -metastasierung ist die Degradation der extrazellulären Matrix von zentraler Bedeutung. Unter den an diesem Abbau beteiligten proteolytischen Systemen kommt dem perizellulären fibrinolytischen System bzw. PA-System eine dominierende Stellung zu. Dieses komplexe System setzt sich aus mehreren, miteinander interagierenden Komponenten zusammen, die durch zahlreiche unterschiedliche Faktoren in ihrer Expression und Funktion moduliert und reguliert werden.

Gegenstand intensiver Forschung der vergangenen Jahre war weiterhin das Matrixmolekül TSP-1. Inzwischen ist sicher, dass TSP-1 nicht als inertes Matrixstrukturprotein angesehen werden kann, sondern vielmehr das extrazelluläre Milieu aktiv moduliert und zelluläre Funktionen beeinflusst. Zudem konnten umfangreiche Untersuchungen belegen, dass TSP-1 und dessen Rezeptoren eine wichtige Rolle in vielen tumorpathologischen Prozessen zukommt.

Unter den zahlreichen pathogenetischen Mechanismen ist in den letzten Jahren auch eine Modulation des PA-Systems beschrieben worden. Systematische Daten zur Beeinflussung des perizellulären fibrinolytischen Systems durch TSP-1 an unterschiedlichen Zelllinien eines Karzinoms lagen jedoch bisher nicht vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand fünf verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien und zweier Vergleichszelllinien der Einfluss des löslichen bzw. immobilisierten TSP-1 auf die fibrinolytische Aktivität und die Expression und Sekretion von uPA, uPAR, PAI-1 und PAI-2 untersucht.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Der Einfluss von TSP-1 auf die perizelluläre fibrinolytische Aktivität fiel uneinheitlich aus. Während viele Zelllinien keine Veränderungen ihrer fibrinolytischen Aktivität erkennen ließen, nahm diese bei anderen Zelllinien signifikant zu oder ab.

TSP-1 modulierte die Expression aller untersuchten Faktoren des PA-Systems. Jedoch bestanden auch hier erhebliche Differenzen unter den Zelllinien. Auffallend war die starke Zunahme der Expression und Sekretion von PAI-1 bei allen Zelllinien. Wesentlich geringer und heterogener fiel dagegen die Modulation der anderen Faktoren aus.

Ein Zusammenhang zwischen der veränderten Expression der untersuchten Faktoren und der perizellulären fibrinolytischen Aktivität ließ sich nicht erkennen.

Es konnten unterschiedliche Wirkungen zwischen löslichem bzw. immobilisiertem TSP-1 nachgewiesen werden. Veränderungen ließen sich häufig nur bei Anwendung einer der beiden TSP-Formen beobachten. In einigen Proben führte immobilisiertes TSP-1 auch zu einer Abnahme einzelner Faktoren.

Die Untersuchungsergebnisse bestätigen die modulierende Wirkung von TSP-1 auf das perizelluläre fibrinolytische System.

Zudem konnte erstmalig ein Einfluss von TSP-1 auf die PAI-2-Expression und den löslichen uPAR (suPAR) nachgewiesen sowie ein konformationsabhängiger Effekt des Matrixproteins auf die fibrinolytische Aktivität bzw. das PA-System bestätigt werden.

Wegen fehlender Zusammenhänge zwischen veränderter fibrinolytischer Aktivität und Expressionsmuster des PA-Systems müssen jedoch weitere Wirkungsmechanismen angenommen werden.

Die komplexen Untersuchungsergebnisse reflektieren die multifunktionellen Strukturen und Eigenschaften von TSP-1. Demnach können in Abhängigkeit von den Tumorzelllinien und der Konformation des Moleküls unterschiedliche, teilweise gegensätzliche Effekte auf das PA-System auftreten. Diese führen möglicherweise zu unterschiedlichen tumorbiologischen Wirkungen, was eine weitere Erklärung für die widersprüchliche Bewertung des TSP-1 in der Tumorphagenese sein könnte.

7 Literaturverzeichnis

1. Albo D, Arnoletti JP, Castiglioni A et al. Thrombospondin (TSP) and transforming growth factor beta 1 (TGF-beta) promote human A549 lung carcinoma cell plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) production and stimulate tumor cell attachment in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;203:857-65.
2. Albo D, Berger DH, Tuszynski GP. The effect of thrombospondin-1 and TGF-beta 1 on pancreatic cancer cell invasion. *J Surg Res.* 1998;76:86-90.
3. Albo D, Berger DH, Vogel J, Tuszynski GP. Thrombospondin-1 and transforming growth factor beta-1 upregulate plasminogen activator inhibitor type 1 in pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg.* 1999;3:411-7.
4. Albo D, Berger DH, Wang TN, Hu X, Rothman V, Tuszynski GP. Thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta 1 promote breast tumor cell invasion through up-regulation of the plasminogen/plasmin system. *Surgery.* 1997;122:493-9; discussion 499-500.
5. Albo D, Rothman VL, Roberts DD, Tuszynski GP. Tumour cell thrombospondin-1 regulates tumour cell adhesion and invasion through the urokinase plasminogen activator receptor. *Br J Cancer.* 2000;83:298-306.
6. Albo D, Tuszynski GP. Thrombospondin-1 up-regulates tumor cell invasion through the urokinase plasminogen activator receptor in head and neck cancer cells. *J Surg Res.* 2004;120:21-6.
7. Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57:25-40.
8. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review. *Int J Cancer* 1997; 72: 1 22
9. Andreasen PA, Nielsen LS, Kristensen P et al. Plasminogen activator inhibitor from human fibrosarcoma cells binds urokinase-type plasminogen activator, but not its proenzyme. *J Biol Chem.* 1986;26:7644-51.
10. Arnoletti JP, Albo D, Granick MS, Solomon MP et al. Thrombospondin and transforming growth factor-beta 1 increase expression of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer.* 1995;76:998-1005.
11. Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW. A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68:240-3.
12. Bajou K, Lewalle JM, Martinez CR, Soria C, Lu H, Noel A, Foidart JM. Human breast adenocarcinoma cell lines promote angiogenesis by providing cells with uPA-PAI-1 and by enhancing their expression. *Int J Cancer.* 2002;100:501-6.

13. Bajou K, Maillard C, Jost M et al. Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth. *Oncogene*. 2004;23:6986-90.
14. Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med*. 4:923-8.
15. Behrendt N, Ronne E, Dano K. Domain interplay in the urokinase receptor. Requirement for the third domain in high affinity ligand binding and demonstration of ligand contact sites in distinct receptor domains. *J Biol Chem*. 1996;271:22885-94
16. Bein K, Simons M. Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. *J Biol Chem*. 2000;275:32167-73.
17. Berger DH. Plasmin/plasminogen system in colorectal cancer. *World J Surg*. 2002;26:767-71.
18. Bianchi E, Cohen RL, Thor AT et al. The urokinase receptor is expressed in invasive breast cancer but not in normal breast tissue. *Cancer Res*. 1994;54:861-6.
19. Bizik J, Lizonova A, Stephens RW et al. Plasminogen activation by t-PA on the surface of human melanoma cells in the presence of alpha 2-macroglobulin secretion. *Cell Regul*. 1991;1:895-905.
20. Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol*;3:932-43.
21. Borgfeldt C, Bendahl PO, Gustavsson B et al. High tumor tissue concentration of urokinase plasminogen activator receptor is associated with good prognosis in patients with ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2003;107:658-65.
22. Bornstein P. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest*. 2001;107:929-34.
23. Borstnar S, Vrhovec I, Svetic B, Cufer T. Prognostic value of the urokinase-type plasminogen activator, and its inhibitors and receptor in breast cancer patients. *Clin Breast Cancer*. 2002;3:138-46.
24. Bosari S, Lee AK, DeLellis RA et al. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol*. 1992;23:755-61.
25. Brooks PC, Stromblad S, Klemke R et al. Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest*. 1995;96:1815-22.
26. Cajot JF, Schleuning WD, Medcalf RL et al. Mouse L cells expressing human prourokinase-type plasminogen activator: effects on extracellular matrix degradation and invasion. *J Cell Biol*. 1998;109:915-25.
27. Cantero D, Friess H, Deflorin J, et al. Enhanced expression of urokinase plasminogen activator and its receptor in pancreatic carcinoma. *British Journal of Cancer* 1997;75:388-395

28. Chain D, Kreizman T, Shapira H, Shaltiel S. Plasmin cleavage of vitronectin. Identification of the site and consequent attenuation in binding plasminogen activator inhibitor-1. *FEBS Lett.* 1991;285:251-6.
29. Chandrasekaran S, Guo N, Rodrigues RG et al. Pro-adhesive and chemotactic activities of thrombospondin-1 for breast carcinoma cells are mediated by $\alpha 3\beta 1$ integrin and regulated by insulin-like growth factor-1 and CD98. *J Biol Chem.* 1999;274:11408-11416.
30. Chandrasekaran L, He CZ, Al-Barazi H et al. Cell contact-dependent activation of $\alpha 3\beta 1$ integrin modulates endothelial cell responses to thrombospondin-1. *Mol Biol Cell.* 2000;11:2885-900.
31. Chen H, Herndon ME, Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol.* 2000;19:597-614.
32. Choong PF, Nadesapillai AP. Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis. *Clin Orthop Relat Res.* 2003;(415 Suppl):S46-58.
33. Clezardin P, Frappart L, Clerget M et al. Expression of thrombospondin (TSP1) and its receptors (CD36 and CD51) in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast. *Cancer Res.* 1993;53:1421-30.
34. Conese M, Nykjaer A, Petersen CM et al. $\alpha 2$ Macroglobulin receptor/Ldl receptor-related protein(Lrp)-dependent internalization of the urokinase receptor. *J Cell Biol.* 1995;131:1609-22.
35. Croucher D, Saunders DN, Ranson M. The urokinase/PAI-2 complex: a new high affinity ligand for the endocytosis receptor low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 2006;281:10206-13.
36. Cubellis MV, Andreasen P, Ragno P et al. Accessibility of receptor-bound urokinase to type-1 plasminogen activator inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;86:4828-32.
37. Cubellis MV, Wun TC, Blasi F. Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *EMBO J.* 1990;9:1079-85.
38. Czekay RP, Aertgeerts K, Curriden SA, Loskutoff DJ. Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol.* 2003;160:781-91.
39. Dano K, Behrendt N, Hoyer-Hansen G et al. Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost.* 2005;93:676-81.
40. Dawson DW, Pearce SF, Zhong R et al. CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol.* 1997;138:707-17.
41. Decock J, Paridaens R, Cufer T. Proteases and metastasis: clinical relevance nowadays? *Curr Opin Oncol.* 2005;17:545-50.

42. Dellas C, Loskutoff DJ. Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thromb Haemost.* 2005;93:631-40.
43. Deng G, Curriden SA, Wang S et al. Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? *J Cell Biol.* 1996; 134:1563-71.
44. Devy L, Blacher S, Grignet-Debrus C et al. The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *FASEB J.* 2002;16:147-54.
45. Dickinson JL, Bates EJ, Ferrante A, Antalis TM. Plasminogen activator inhibitor type 2 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. Evidence for an alternate biological function. *J Biol Chem.* 1995;270:27894-904.
46. Dumont N, Arteaga CL. Transforming growth factor-beta and breast cancer: Tumor promoting effects of transforming growth factor-beta. *Breast Cancer Res.* 2000;2:125-32.
47. Ellenrieder V, Hendler SF, Ruhland C et al. TGF-beta-induced invasiveness of pancreatic cancer cells is mediated by matrix metalloproteinase-2 and the urokinase plasminogen activator system. *Int J Cancer.* 2001;93:204-11.
48. Ellis V, Behrendt N, Dano K. Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. *J Biol Chem.* 1991;266:12752-8.
49. Ellis V, Scully MF, Kakkar VV. Plasminogen activation initiated by single-chain urokinase-type plasminogen activator. Potentiation by U937 monocytes. *J Biol Chem.* 1989;264:2185-8.
50. Ellis V, Wun TC, Behrendt N, Ronne E, Dano K. Inhibition of receptor-bound urokinase by plasminogen-activator inhibitors. *J Biol Chem.* 1990;265:9904-8.
51. Esemuede N, Lee T, Pierre-Paul D, Sumpio BE, Gahtan V. The role of thrombospondin-1 in human disease. *J Surg Res.* 2004;122:135-42.
52. Estreicher A, Muhlhauser J, Carpentier JL et al. The receptor for urokinase type plasminogen activator polarizes expression of the protease to the leading edge of migrating monocytes and promotes degradation of enzyme inhibitor complexes. *J Cell Biol.* 1990;111:783-92.
53. Fisher K, Lutz V, Wilhelm O et al. Urokinase induces proliferation of human ovarian cancer cells: characterization of structural elements required for growth factor function. *FEBS Lett.* 1998;438:101-5.
54. Fisher JL, Mackie PS, Howard ML, Zhou H, Choong PF. The expression of the urokinase plasminogen activator system in metastatic murine osteosarcoma: an in vivo mouse model. *Clin Cancer Res.* 2001;7:1654-60.
55. Fontana A, Filleur S, Guglielmi J, Frappart L et al. Human breast tumors override the antiangiogenic effect of stromal thrombospondin-1 in vivo. *Int J Cancer.* 2005;116:686-91.

56. Ganesh S, Sier CF, Heerding MM et al. Urokinase receptor and colorectal cancer survival. *Lancet*. 1994;344:401-2.
57. Gao AG, Lindberg FP, Dimitry JM et al. Thrombospondin modulates alpha v beta 3 function through integrin-associated protein. *J Cell Biol*. 1996;135:533-44.
58. Gladson CL, Pijuan-Thompson V, Olman MA et al. Up-regulation of urokinase and urokinase receptor genes in malignant astrocytoma. *Am J Pathol*. 1995;146:1150-60.
59. Grondahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist C et al. 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*. 1993;53:2513-21.
60. Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP et al. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:219-27.
61. Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J Biol Chem*. 1994;269:21191-7.
62. Hasui Y, Marutsuka K, Asada Y, Osada Y. Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in patients with superficial bladder cancer. *Urology*. 1996;47:34-7.
63. He C, He P, Liu LP, Zhu YS. Analysis of expressions of components in the plasminogen activator system in high- and low-metastatic human lung cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2001;127:180-6.
64. Heiss MM, Babic R, Allgayer H et al. Tumor-associated proteolysis and prognosis: new functional risk factors in gastric cancer defined by the urokinase-type plasminogen activator system. *J Clin Oncol*. 1995;13:2084-93.
65. Herszenyi L, Plebani M, Carraro P et al. The role of cysteine and serine proteases in colorectal carcinoma. *Cancer*. 1999;86:1135-42.
66. Herz J, Strickland DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest*. 2001;108:779-84.
67. Hogg PJ, Jimenez BM, Chesterman CN. Identification of possible inhibitory reactive centers in thrombospondin 1 that may bind cathepsin G and neutrophil elastase. *Biochemistry*. 1994;33:6531-7.
68. Hollas W, Blasi F, Boyd D. Role of the urokinase receptor in facilitating extracellular matrix invasion by cultured colon cancer. *Cancer Res*. 1991;51:3690-5.
69. Hoyer-Hansen G, Behrendt N, Ploug M et al. The intact urokinase receptor is required for efficient vitronectin binding: receptor cleavage prevents ligand interaction. *FEBS Lett*. 1997;420:79-85.
70. Hoyer-Hansen G, Ronne E, Solberg H et al. Urokinase plasminogen activator cleaves its cell surface receptor releasing the ligand-binding domain. *J Biol Chem*. 1992;267:18224-9.

71. Ioachim E, Michael MC, Salmas M et al. Thrombospondin-1 expression in urothelial carcinoma: Prognostic significance and association with p53 alterations, tumour angiogenesis and extracellular matrix components. *BMC Cancer*. 2006;6:140
72. Iruela-Arispe ML, Lombardo M, Kruttsch HC et al. Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. *Circulation*. 1999;100:1423-31.
73. Jaffe EA, Ruggiero JT, Leung LK et al. Cultured human fibroblasts synthesize and secrete thrombospondin and incorporate it into extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 ;80:998-1002.
74. Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE et al. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med*. 2000;6:41-8.
75. Jo M, Thomas KS, Wu L, Gonias SL. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits cancer cell growth and invasion by direct urokinase-independent effects on cell signaling. *J Biol Chem*. 2003;278:46692-8.
76. Kakkar AK, Chinswangwatanakul V, Tebbutt S et al. A characterization of the coagulant and fibrinolytic profile of human pancreatic carcinoma cells. *Haemostasis*. 1998;28:1-6.
77. Kaneko T, Konno H, Baba M et al. Urokinase-type plasminogen activator expression correlates with tumor angiogenesis and poor outcome in gastric cancer. *Cancer Sci*. 2003;94:43-9.
78. Kasper HU, Ebert M, Malfertheiner P et al. Expression of thrombospondin-1 in pancreatic carcinoma: correlation with microvessel density. *Virchows Arch*. 2001;438:116-20.
79. Kawahara N, Ono M, Taguchi K et al. Enhanced expression of thrombospondin-1 and hypovascularity in human cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 1998;28:1512-7.
80. Khan AW, Dhillon AP, Hutchins R et al. Prognostic significance of intratumoural microvessel density (IMD) in resected pancreatic and ampullary cancers to standard histopathological variables and survival. *Eur J Surg Oncol*. 2002;28:637-44.
81. Khatib AM, Nip J, Fallavollita L et al. Regulation of urokinase plasminogen activator/plasmin-mediated invasion of melanoma cells by the integrin vitronectin receptor alphaVbeta3. *Int J Cancer*. 2001;91:300-8.
82. Kodama J, Hashimoto I, Seki N et al.. Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in invasive cervical cancer: correlation with angiogenesis and prognosis. *Clin Cancer Res*. 2001;7:2826-31.
83. Kooistra T, Schrauwen Y, Arts J, Emeis JJ. Regulation of endothelial cell t-PA synthesis and release. *Int J Hematol*. 1994;59:233-55.
84. Kruithof EK, Baker MS, Bunn CL. Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood*. 1995;86:4007-24.

85. Laug WE, Cao XR, Yu YB et al. Inhibition of invasion of HT1080 sarcoma cells expressing recombinant plasminogen activator inhibitor 2. *Cancer Res.* 1993;53:6051-7.
86. Lawler J. The structural and functional properties of thrombospondin. *Blood.* 1986;67:1197-209.
87. Lawler J, Detmar M. Tumor progression: the effects of thrombospondin-1 and -2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:1038-45.
88. Lawler J, Weinstein R, Hynes RO. Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors. *J Cell Biol.* 1988;107:2351-61.
89. Lindahl TL, Sigurdardottir O, Wiman B. Stability of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). *Thromb Haemost.* 1989;62:748-51
90. Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R. et al. Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res.* 41(11 Pt 1):4629-36
91. Liu G, Shuman MA, Cohen RL. Co-expression of urokinase, urokinase receptor and PAI-1 is necessary for optimum invasiveness of cultured lung cancer cells. *Int J Cancer.*1995; 60:501-6.
92. Lohr M, Trautmann B, Gottler M et al. Expression and function of receptors for extracellular matrix proteins in human ductal adenocarcinomas of the pancreas. *Pancreas.* 1996;12:248-59.
93. Lohr M, Trautmann B, Gottler M et al. Human ductal adenocarcinomas of the pancreas express extracellular matrix proteins. *Br J Cancer.* 1994;69:144-51.
94. Magdolen V, Kruger A, Sato S et al. Inhibition of the tumor-associated urokinase-type plasminogen activation system: effects of high-level synthesis of soluble urokinase receptor in ovarian and breast cancer cells in vitro and in vivo. *Recent Results Cancer Res.* 2003;162:43-63.
95. Majack RA, Goodman LV, Dixit VM. Cell surface thrombospondin is functionally essential for vascular smooth muscle cell proliferation. *J Cell Biol.* 1988;106:415-22.
96. Mandal M, Mandal A, Das S et al. Clinical implications of matrix metalloproteinases. *Mol Cell Biochem.* 2003;252:305-29.
97. Marutsuka K, Hasui Y, Asada Y et al. Effects of suramin on metastatic ability, proliferation, and production of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 2 in human renal cell carcinoma cell line SN12C-PM6. *Clin Exp Metastasis.* 1995;13:116-22.
98. Mazziere R, Blasi F. The urokinase receptor and the regulation of cell proliferation. *Thromb Haemost.* 2005;93:641-6.
99. Medcalf RL, Stasinopoulos SJ. The undecided serpin. The ins and outs of plasminogen activator inhibitor type 2. *FEBS J.* 2005;272:4858-67.

100. Meijer M. van., Gebbink RK, Preissner KT, Pannekoek H. Determination of the vitronectin binding site on plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). *FEBS Lett.* 1994;352:342-6
101. Mengele K, Harbeck N, Reuning U et al. Tumor-associated prognostic factors of the plasminogen activator family: determination and clinical value of u-PA, t-PA, PAI-1, and PAI-2. *Hamostaseologie.* 2005;25:301-10.
102. Miao WM, Seng WL, Duquette M et al. Thrombospondin-1 type 1 repeat recombinant proteins inhibit tumor growth through transforming growth factor-beta-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res.* 2001;61:7830-9.
103. Mignatti P, Robbins E, Rifkin DB. Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. *Cell.* 1986;47:487-98.
104. Mikhailenko I, Krylov D, Argraves KM et al. Cellular internalization and degradation of thrombospondin-1 is mediated by the amino-terminal heparin binding domain (HBD). High affinity interaction of dimeric HBD with the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 1997;272:6784-91.
105. Miles LA, Dahlberg CM, Plescia J et al. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry.* 1991;30:1682-91.
106. Mochan E, Keler, T. Plasmin degradation of cartilage proteoglycan. *Biochim Biophys Acta.* 1984;800:312-5.
107. Montuori N, Carriero MV, Salzano S et al. The cleavage of the urokinase receptor regulates its multiple functions. *J Biol Chem.* 2002;277:46932-9.
108. Mueller BM, Yu YB, Laug WE. Overexpression of plasminogen activator inhibitor 2 in human melanoma cells inhibits spontaneous metastasis in scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:205-9.
109. Munjal ID, Crawford DR, Blake DA et al. Thrombospondin: biosynthesis, distribution, and changes associated with wound repair in corneal endothelium. *Eur J Cell Biol.* 1990;52:252-63. Erratum in: *Eur J Cell Biol* 1991;55:IV.
110. Myohanen H, Vaheri A. Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:2840-58
111. Naitoh H, Eguchi Y, Ueyama H et al. Localization of urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1, 2 and plasminogen in colon cancer. *Jpn J Cancer Res.* 1995;86:48-56.
112. Nakamura M, Konno H, Tanaka T et al. Possible role of plasminogen activator inhibitor 2 in the prevention of the metastasis of gastric cancer tissues. *Thromb Res.* 1992;65:709-19.
113. Nguyen DH, Hussaini IM, Gonias SL. Binding of urokinase-type plasminogen activator to its receptor in MCF-7 cells activates extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 which is required for increased cellular motility. *J Biol Chem.* 1998;273:8502-7.

114. Nielsen LS, Andreasen PA, Grondahl-Hansen, J et al. Plasminogen activators catalyse conversion of inhibitor from fibrosarcoma cells to an inactive form with a lower apparent molecular mass. *FEBS Lett.* 1986;196:269-73.
115. Nordengren J, Fredstorp Lidebring M et al. High tumor tissue concentration of plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2) is an independent marker for shorter progression-free survival in patients with early stage endometrial cancer. *Int J Cancer.* 2002;97:379-85.
116. Oh CW, Hoover-Plow J, Plow EF. The role of plasminogen in angiogenesis in vivo. *J Thromb Haemost.* 2003;1:1683-7.
117. Osmak M, Babic D, Abramic M et al. Plasminogen activator inhibitor type 2: potential prognostic factor for endometrial carcinomas. *Neoplasma.* 2001;48:462-7.
118. Ossowski L, Clunie G, Masucci MT, Blasi F. In vivo paracrine interaction between urokinase and its receptor: effect on tumor cell invasion. *J Cell Biol.* 1991;115:1107-12.
119. Paciucci R, Tora M, Diaz VM, Real FX. The plasminogen activator system in pancreas cancer: role of t-PA in the invasive potential in vitro. *Oncogene.* 1998;16:625-33.
120. Pappot H, Hoyer-Hansen G, Ronne E et al. Elevated plasma levels of urokinase plasminogen activator receptor in non-small cell lung cancer patients. *Eur J Cancer.* 1997;33:867-72.
121. Pedersen H, Grondahl-Hansen J, Francis D et al. Urokinase and plasminogen activator inhibitor type 1 in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1994;54:120-3.
122. Phan SH, Dillon RG, McGarry BM, Dixit VM. Stimulation of fibroblast proliferation by thrombospondin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;163:56-63.
123. Ploug M, Gardsvoll H, Jorgensen TJ et al.. Structural analysis of the interaction between urokinase-type plasminogen activator and its receptor: a potential target for anti-invasive cancer therapy. *Biochem Soc Trans.* 2002;30:177-83.
124. Poon RT, Chung KK, Cheung ST et al. Clinical significance of thrombospondin 1 expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:4150-7.
125. Pupa SM, Menard S, Forti S, Tagliabue E. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J Cell Physiol.* 2002;192:259-67.
126. Pyke C, Kristensen P, Ralfkiaer E et al. Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas. *Am J Pathol.* 1991;138:1059-67.
127. Qian X, Rothman VL, Nicosia RF, Tuszynski GP. Expression of thrombospondin-1 in human pancreatic adenocarcinomas: role in matrix metalloproteinase-9 production. *Pathol Oncol Res.* 2001;7:251-9.
128. Qian X, Wang TN, Rothman VL et al. Thrombospondin-1 modulates angiogenesis in vitro by up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells. *Exp Cell Res.* 1997;235:403-12.

129. Quax PH, van Muijen GN, Weening-Verhoeff EJ et al. Metastatic behavior of human melanoma cell lines in nude mice correlates with urokinase-type plasminogen activator, its type-1 inhibitor, and urokinase-mediated matrix degradation. *J Cell Biol.* 1991;115:191-9.
130. Rakic JM, Maillard C, Jost M et al. Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:463-73.
131. Reed MJ, Iruela-Arispe L, O'Brien ER et al.. Expression of thrombospondins by endothelial cells. Injury is correlated with TSP-1. *Am J Pathol.* 1995;147:1068-80.
132. Reiher FK, Volpert OV, Jimenez B et al. Inhibition of tumor growth by systemic treatment with thrombospondin-1 peptide mimetics. *Int J Cancer.* 2002;98:682-9.
133. Reiter LS, Kruithof EK, Cajot JF, Sordat B. The role of the urokinase receptor in extracellular matrix degradation by HT29 human colon carcinoma cells. *Int J Cancer.* 1993;53:444-50.
134. Reuning U, Magdolen V, Hapke S, Schmitt M. Molecular and functional interdependence of the urokinase-type plasminogen activator system with integrins. *Biol Chem.* 2003;384:1119-31.
135. Rice AJ, Steward MA, Quinn CM. Thrombospondin 1 protein expression relates to good prognostic indices in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Clin Pathol.* 2002;55:921-5.
136. Robert C, Bolon I, Gazzeri S et al. Expression of plasminogen activator inhibitors 1 and 2 in lung cancer and their role in tumor progression. *Clin Cancer Res.* 1999;5:2094-102.
137. Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF et al. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:12485-90.
138. Roussel E, Gingras MC, Ro JY et al. Loss of alpha 1 beta 1 and reduced expression of other beta 1 integrins and CAM in lung adenocarcinoma compared with pneumocytes. *J Surg Oncol.* 1994;56:198-208.
139. Salonen EM, Saksela O, Vartio T et al. Plasminogen and tissue-type plasminogen activator bind to immobilized fibronectin. *J Biol Chem.* 1985;260:12302-7.
140. Sargiannidou I, Qiu C, Tuszynski GP. Mechanisms of thrombospondin-1-mediated metastasis and angiogenesis. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30:127-36.
141. Sargiannidou I, Zhou J, Tuszynski GP. The role of thrombospondin-1 in tumor progression. *Exp Biol Med (Maywood).* 2001;226:726-33.
142. Schuch G, Kisker O, Atala A, Soker S. Pancreatic tumor growth is regulated by the balance between positive and negative modulators of angiogenesis. *Angiogenesis.* 2002;5:181-90.
143. Schultz-Cherry S, Chen H, Mosher DF et al. Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1. *J Biol Chem.* 1995;270:7304-10.

144. Shin SJ, Kim KO, Kim MK et al. Expression of E-cadherin and uPA and their association with the prognosis of pancreatic cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2005;35:342-8. Erratum in: *Jpn J Clin Oncol.* 2005;35:487.
145. Shiomi H, Eguchi Y, Tani T et al. Cellular distribution and clinical value of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and plasminogen activator inhibitor-2 in esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2000;156:567-75.
146. Sier CF, Stephens R, Bizik J et al. The level of urokinase-type plasminogen activator receptor is increased in serum of ovarian cancer patients. *Cancer Res.* 1998;58:1843-9.
147. Sid B, Sartelet H, Bellon G et al. Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004;49:245-58.
148. Sidenius N, Blasi F. The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2003;22:205-22.
149. Skrzydlewska E, Sulkowska M, Koda M, Sulkowski S. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 2005;11:1251-66.
150. Stahl A, Mueller BM. Binding of urokinase to its receptor promotes migration and invasion of human melanoma cells in vitro. *Cancer Res.* 1994;54:3066-71.
151. Stefansson S, Lawrence DA. The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature.* 1996;383:441-3.
152. Stephens RW, Nielsen HJ, Christensen IJ. Plasma urokinase receptor levels in patients with colorectal cancer: relationship to prognosis. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:869-74.
153. Streit M, Velasco P, Brown LF et al. Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Pathol.* 1999;155:441-52.
154. Sutton CD, O'Byrne K, Goddard JC et al. Expression of thrombospondin-1 in resected colorectal liver metastases predicts poor prognosis. *Clin Cancer Res.* 2005;11:6567-73.
155. Taipale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.* 1997;11:51-9.
156. Takeuchi Y, Nakao A, Harada A et al. Expression of plasminogen activators and their inhibitors in human pancreatic carcinoma: immunohistochemical study. *Am J Gastroenterol.* 1993;88:1928-33.
157. Tan X, Egami H, Nozawa F et al. Analysis of the invasion-metastasis mechanism in pancreatic cancer: involvement of plasmin(ogen) cascade proteins in the invasion of pancreatic cancer cells. *Int J Oncol.* 2006;28:369-74.
158. Taraboletti G, Morbidelli L, Donnini S et al. The heparin binding 25 kDa fragment of thrombospondin-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and TIMP-2 production in endothelial cells. *FASEB J.* 2000;14:1674-6.

159. Taraboletti G, Roberts DD, Liotta LA. Thrombospondin-induced tumor cell migration: haptotaxis and chemotaxis are mediated by different molecular domains. *J Cell Biol.* 1987;105:2409-15.
160. Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ et al. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol.* 1993;122:497-511.
161. Tringler B, Grimm C, Sliutz G et al. Immunohistochemical expression of thrombospondin-1 in invasive vulvar squamous cell carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2005;99:80-3.
162. Tsirka SE. Tissue plasminogen activator as a modulator of neuronal survival and function. *Biochem Soc Trans.* 2002;30:222-5.
163. Trotter MJ, Colwell R, Tron VA. Thrombospondin-1 and cutaneous melanoma. *J Cutan Med Surg.* 2003;7:136-41.
164. Tuszynski GP, Nicosia RF. Localization of thrombospondin and its cysteine-serine-valine-threonine-cysteine-glycine-specific receptor in human breast carcinoma. *Lab Invest.* 1994;70:228-33.
165. Tuszynski GP, Smith M, Rothman VL et al. Thrombospondin levels in patients with malignancy. *Thromb Haemost.* 1992;67:607-11. Erratum in: *Thromb Haemost* 1992;68:485.
166. Umeda T, Eguchi Y, Okino K et al. Cellular localization of urokinase-type plasminogen activator, its inhibitors, and their mRNAs in breast cancer tissues. *J Pathol.* 1997;183:388-97.
167. Vailhe B, Feige JJ. Thrombospondins as anti-angiogenic therapeutic agents. *Curr Pharm Des.* 2003;9:583-8.
168. Vassalli JD, Belin D. Amiloride selectively inhibits the urokinase-type plasminogen activator. *FEBS Lett.* 1987 Apr 6;214(1):187-91.
169. Vogel T, Guo NH, Krutzsch HC et al. Modulation of endothelial cell proliferation, adhesion, and motility by recombinant heparin-binding domain and synthetic peptides from the type I repeats of thrombospondin. *J Cell Biochem.* 1993;53:74-84.
170. Waltz DA, Chapman HA. Reversible cellular adhesion to vitronectin linked to urokinase receptor occupancy. *J Biol Chem.* 1994;269:14746-50.
171. Waltz, DA., Natkin, LR., Fujita, RM et al. Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin. *J Clin Invest.* 1997;100:58-67.
172. Wang S, Herndon ME, Ranganathan S et al. Internalization but not binding of thrombospondin-1 to low density lipoprotein receptor-related protein-1 requires heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biochem.* 2004;91:766-76.

173. Wang-Rodriguez J, Urquidi V, Rivard A, Goodison S. Elevated osteopontin and thrombospondin expression identifies malignant human breast carcinoma but is not indicative of metastatic status. *Breast Cancer Res.* 2003;5:R136-43.
174. Wang TN, Qian XH, Granick MS et al. Inhibition of breast cancer progression by an antibody to a thrombospondin-1 receptor. *Surgery.* 1996;120:449-54.
175. Wei Y, Lukashev M, Simon DI et al. Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science.* 1996;273:1551-5.
176. Weinstat-Saslow DL, Zabrenetzky VS et al. Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis. *Cancer Res.* 1994;54:6504-11.
177. Wight TN, Raugi GJ, Mumby SM, Bornstein P. Light microscopic immunolocalization of thrombospondin in human tissues. *J Histochem Cytochem.* 1985;33:295-302.
178. Yabkowitz R, Dixit VM, Guo N et al. Activated T-cell adhesion to thrombospondin is mediated by the alpha 4 beta 1 (VLA-4) and alpha 5 beta 1 (VLA-5) integrins. *J Immunol.* 1993;151:149-58.
179. Yamashita Y, Kurohiji T, Tuszynski GP et al. Plasma thrombospondin levels in patients with colorectal carcinoma. *Cancer.* 1998;82:632-8.
180. Yoshino H, Endo Y, Watanabe Y, Sasaki T. Significance of plasminogen activator inhibitor 2 as a prognostic marker in primary lung cancer: association of decreased plasminogen activator inhibitor 2 with lymph node metastasis. *Br J Cancer.* 1998;78:833-9.
181. Yu H, Maurer F, Medcalf RL. Plasminogen activator inhibitor type 2: a regulator of monocyte proliferation and differentiation. *Blood.* 2002;99:2810-8.
182. Zhang X, Galardi E, Duquette M et al. Antiangiogenic treatment with three thrombospondin-1 type 1 repeats versus gemcitabine in an orthotopic human pancreatic cancer model. *Clin Cancer Res.* 2005;11:5622-30.
183. Zhou HM, Bolon I, Nichols A et al. Overexpression of plasminogen activator inhibitor type 2 in basal keratinocytes enhances papilloma formation in transgenic mice. *Cancer Res.* 2001;61:970-6.

Thesen

1. Eines der wichtigen Charakteristika maligner Tumoren ist ihre Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung. Voraussetzung hierfür ist eine gezielte und kontrollierte Degradation der unmittelbar an den Tumorzellen angrenzenden extrazellulären Matrix durch proteolytische Enzyme.
2. Inzwischen sind eine Vielzahl von Proteasen und Proteasesystemen beschrieben worden, die direkt oder indirekt in die Tumorphathogenese involviert sind. Unter diesen proteolytischen Systemen kommt dem perizellulären fibrinolytischen System eine dominierende Stellung zu.
3. Zentrales Substrat des perizellulären fibrinolytischen Systems ist das Plasminogen, dessen Aktivierung zu und Aktivität als Plasmin durch zahlreiche Faktoren moduliert und reguliert wird. Die wichtigsten unter ihnen sind tPA, uPA, uPAR und die beiden Inhibitoren PAI-1 bzw. PAI-2. Zusammen genommen bilden sie das Plasminogenaktivator-System (PA-System).
4. Expression und Funktion der Komponenten des PA-System unterliegen einem komplexen Regulationsmechanismus, an dem viele Faktoren beteiligt sind. Einige Studien der vergangenen Jahre weisen auch auf einen modulierenden Einfluss des Thrombospondin-1 (TSP-1) auf das PA-System hin.
5. Das Matrixprotein TSP-1 wird durch zahlreiche Zellarten synthetisiert und ist in unterschiedlichen Geweben nachweisbar. Seine komplexe Struktur ermöglicht die Interaktion mit einer Vielzahl von Bindungspartnern, wodurch das extrazelluläre Milieu aktiv moduliert und zelluläre Funktionen beeinflusst werden.
6. Umfangreiche Studien der letzten Jahre weisen zudem auf eine Rolle des TSP-1 und dessen Rezeptoren in tumorpathologischen Prozessen hin. Es wird angenommen, dass die zeitliche und räumliche Regulation der TSP- und dessen Rezeptor-Expression als spezialisierte Leistungen maligner Zellen und/oder dessen Stromaanteils Tumoreigenschaften wie Proliferation, Invasion, Angiogenese und Metastasierung beeinflussen. Über die Bedeutung des TSP-1 für die Tumorphathogenese liegen jedoch kontroverse Studienergebnisse vor.

7. Neuere Untersuchungen deuten auf eine Modulation des PA-Systems als eines der pathogenetischen Bindeglieder zwischen der TSP-1-Expression und dessen Rezeptoren im malignen Gewebe auf der einen und phänotypischen Tumoreigenschaften wie Zellinvasion und Metastasierung auf der anderen Seite hin. Systematische Daten zur Beeinflussung des perizellulären fibrinolytischen Systems durch TSP-1 an unterschiedlichen Zelllinien eines Karzinoms liegen jedoch derzeit nicht vor.
8. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, anhand unterschiedlicher Pankreaskarzinomzelllinien sowie zweier Vergleichszelllinien eine systematische Untersuchung über den Einfluss des TSP-1 auf die perizelluläre fibrinolytische Aktivität und die Expression der Komponenten des PA-Systems durchzuführen.
9. Die Untersuchungen beinhalteten Aktivitätsanalysen sowie die Quantifizierung der einzelnen Faktoren des PA-Systems unter dem Einfluss des löslichen bzw. immobilisierten TSP-1. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, um einer möglichen konformationsabhängigen Wirkung des TSP-1 Rechnung zu tragen. Weiterhin wurden differenzierte Analysen von Zellextrakt und konditioniertem Medium durchgeführt, um sekretorische Zelleistungen mitzuerfassen. Die parallele Verwendung eines zweiten Matrixmoleküles (Fibronectin) sowie einer unspezifischen BSA-Matrix sollte dem Nachweis der TSP-1-Spezifität dienen.
10. In der vorliegenden Arbeit wurden die modulierenden Eigenschaften des TSP-1 auf das perizelluläre fibrinolytische System bestätigt. Die Wirkung des TSP-1 war jedoch uneinheitlich. Während die meisten Zelllinien unter TSP-1 keine veränderte fibrinolytische Aktivität aufwiesen, nahm diese bei einigen zu bzw. ab. Gleichfalls heterogen stellte sich der Einfluss des TSP-1 auf die Expression der Komponenten des PA-Systems dar. Eine Ausnahme bildete die meist deutliche Zunahme der PAI-1-Expression unter dem Einfluss des TSP-1.
11. Anhand der durchgeführten Studie ließen sich ferner unterschiedliche Effekte zwischen löslichem und immobilisiertem TSP-1 nachweisen. Das lässt eine konformationsabhängige Wirkung des TSP-1 nun auch im Bezug zur Modulation des PA-Systems vermuten.

12. Ein Zusammenhang zwischen der fibrinolytischen Aktivität und verändertem Expressionsmuster einzelner Faktoren ließ sich nicht erkennen. Das könnte auf andere, durch TSP-1 beeinflussbare Mechanismen hindeuten.

13. Zusammengenommen weisen die Ergebnisse auf eine komplexe sowie heterogene Wirkung des TSP-1 im Bezug zum PA-System hin. Hierbei scheinen Faktoren wie Zellspezifität und Molekülkonformation die Modulation des PA-Systems entscheidend mit zu beeinflussen. Das könnte eine weitere Ursache für die kontroverse Studienlage bezüglich der Wirkung des TSP-1 auf die Tumorpathogenese und dessen prognostische Bedeutung darstellen.

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Die Stellen der Arbeit, die anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall unter Angaben der Quelle kenntlich gemacht.

Tessin, 1. April 2008

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. P. Schuff-Werner als Direktor des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin möchte ich für die Bereitstellung des Labors danken.

Meinem Doktorvater und Mentor Herrn PD Dr. med. M. Steiner danke ich für das Überlassen des Themas und die engagierte Betreuung. Er begleitete meine Arbeit stets wohlwollend mit seinen kritischen und konstruktiven Anregungen.

Ein ganz besonderer Dank geht an das Laborteam Frau Hamp, Frau Röhring und Frau Dreissiger, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ferner danke ich meinem Bruder Frédéric Brehmer und Frau Sabine Fink für das Korrekturlesen und meiner Verlobten Dörte Fink für die liebevolle Unterstützung.