



Fakultät für Medizin

Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie

Die Rolle von TIMP-1 in der tumorfördernden Stressantwort  
in Tumorzelle und Wirt

Haissi Cui

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Percy A. Knolle

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Achim Krüger

2. Univ.-Prof. Dr. Michael Groll

3. apl. Prof. Dr. Peter J. Nelson,  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 18.05.2015 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.11.2015 angenommen.



## Zusammenfassung

Während der Progression von malignen Tumorerkrankungen sind Tumorzellen extrinsischem Stress in Form von Sauerstoffmangel, Nährstoffmangel und Angriffen des Immunsystems ausgesetzt. Um mit dieser Form von Selektionsdruck umzugehen, werden Signalwege eingeschaltet, die Maßnahmen gegen einen solchen Stress einleiten können. Diese haben zum Beispiel eine verstärkte Angiogenese oder eine Abschwächung der Immunantwort zur Folge. In dieser Studie wurde gezeigt, dass *Tissue inhibitor of metalloproteinases-1* (TIMP-1) eine Rolle in dieser Tumorzellstressantwort einnehmen kann, in dem es zentrale Signalwege zur Stressreduktion aktiviert. TIMP-1 erhöhte die Aktivität des PI3K/AKT/HIF-1-Signalweges und steigerte die Expression der HIF-1-regulierten microRNA miR-210. Dies geschah über Interaktion der C-terminalen Domäne von TIMP-1 mit dem Tetraspanin CD63 und führte zu schnellerem Tumorwachstum in einem *Xenograft*-Modell unter verstärkter Angiogenese. *In vitro* konnte dieser pro-angiogene Effekt von TIMP-1 auf Exosomen mit erhöhten miR-210-Mengen zurückgeführt werden. Im Wirt bewirkte eine Erhöhung der systemischen TIMP-1-Spiegel eine Akkumulation von Lipiden in der Leber und eine Anreicherung von immunsuppressiver Arginase-1 in zirkulierenden Exosomen. Zusammengenommen wirkte TIMP-1 damit tumorfördernd in verschiedenen Stadien der Tumorprogression durch die Aktivierung zellulärer Signalwege, die Stress reduzierten und eine Manipulation des Wirtsorganismus zugunsten der Tumorzelle erlaubten.



## Abstract

During the progression of cancer, tumor cells are exposed to extrinsic stress originating from a lack of oxygen, a lack of nutrients, or attacks by the immune system. In order to escape this type of selective pressure, signaling pathways leading to stress release are activated. These can result, for example, in increased angiogenesis or a reduction of the immune response. In this study, it was shown that *Tissue inhibitor of metalloproteinases-1* (TIMP-1) may play a role in stress response by activating central pathways involved in stress release. TIMP-1 increased activity of the PI3K/AKT/HIF-1 signaling pathway which in turn cumulated in the increased expression of the HIF-1-regulated microRNA miR-210. This activation was mediated by the interaction of the C-terminal domain of TIMP-1 with the tetraspanin CD63 and led to increased tumor growth in a *xenograft* model together with augmented angiogenesis. *In vitro*, this pro-angiogenic effect of TIMP-1 was attributed to exosomes containing increased levels of miR-210. In the host, high systemic TIMP-1 levels led to an accumulation of lipids in the liver and an enrichment of immune-suppressive Arginase-1 in circulating exosomes. In summary, TIMP-1 is capable of promoting different stages of cancer progression by hijacking cellular mechanisms of stress release and by manipulating the host organism.



## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -Tub	alpha-Tubulin
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
C57Bl/6	Mausstamm C57Bl/6
CA9	Carboxische Anhydrase 9
Casp-3	Caspase 3
CD31	<i>Cluster of differentiation 31</i> (hier verwendet als Endothelzellmarker)
COX2	Cyclooxygenase 2
DBA/2	Mausstamm DBA/2
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2F3	Transkriptionsfaktor E2F3
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FGFRL1	<i>Fibroblast growth factor receptor-like 1</i>
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor-1</i>
HRE	<i>Hypoxia-response element</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICC	Immunocytochemie
IHC	Immunohistochemie
IP	Immunopräzipitation
Ktrl	Zellen/Tiere mit Kontrollvektor
mCherry	rot fluoreszierendes Protein
miRNA	microRNA
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MNT	<i>Max-binding protein MNT</i>
PCNA	<i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RAD52	DNA Reparaturprotein Rad52
RNA	Ribonukleinsäure
s.c.	subkutan
SDH/SDHD	Succinat-Dehydrogenase/Succinat Dehydrogenase Untereinheit D
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TIMP-1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i>
TIMP-1 <sup>hoch</sup>	Zellen/Tiere mit TIMP-1 Überexpression
VMP-1	<i>Vacuole membrane protein-1</i>
WB	Western Blot
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid



# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	1
1.1	Beteiligte Prozesse und Faktoren in Primärtumorbildung und Metastasierung .....	1
1.2	Metalloproteinasen – Funktion und Regulation .....	5
1.3	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i> – Funktion und Assoziation mit Tumorerkrankungen .....	7
1.4	TIMP-1-vermittelte Signaltransduktion .....	10
1.5	HIF-1 als Hauptregulator der zellulären Stressantwort .....	12
1.6	miR-210 – die Rolle von HIF-1-regulierter miRNA in der zellulären Stressantwort .....	13
1.7	Exosomen – Eigenschaften, Biogenese und Rolle im microRNA-Transport.....	17
1.8	TIMP-1 als möglicher Initiator der Tumorzellstressantwort .....	19
2.	Material und Methoden .....	20
2.1	Material .....	20
2.1.1	Versuchstiere .....	20
2.1.2	Zelllinien .....	21
2.1.3	Medien.....	22
2.1.4	Pufferlösungen.....	22
2.1.5	Antikörper .....	23
2.1.6	Primer .....	25
2.2	Injektionsmethoden und Verlaufskontrolle .....	26
2.2.1	Intravenöse Injektion .....	26
2.2.2	Intraperitoneale Injektion .....	27
2.2.3	Subkutane Injektion.....	27
2.2.4	Verlaufskontrolle von Primärtumoren.....	27
2.3	<i>Post mortem</i> -Analyse von Tierversuchspalten und immunohistochemische Analyse.....	27

2.3.1	Präparation von Versuchstieren.....	27
2.3.2	RNA-Isolation .....	28
2.3.3	Protein-Isolation .....	29
2.3.4	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)-Färbung.....	29
2.3.5	Einbetten von Organen für immunohistochemische Analysen .....	29
2.3.6	Immunohistochemische Analyse.....	29
2.3.7	Red Oil O Färbung von Lipiden.....	30
2.3.8	Sirius Red Färbung von Kollagenen.....	31
2.3.9	Isolation von Exosomen aus Mausblut.....	31
2.4	Zellbiologische Methoden .....	31
2.4.1	Kultivieren von Säugerzellen .....	31
2.4.2	Konditionieren von Zellen mit rekombinantem Protein oder synthetischen Inhibitoren .....	32
2.4.3	Herstellung lentiviraler Partikel.....	32
2.4.4	Infektion von Säugerzellen mithilfe lentiviraler Partikel .....	32
2.4.5	Immunozytochemie .....	33
2.4.6	Durchflusszytometrie .....	33
2.4.7	Alamar Blue-basierter Zellviabilitätsassay.....	34
2.4.8	Isolation von Exosomen aus Zellkulturüberstand .....	34
2.4.9	Charakterisierung von Exosomen mithilfe von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Dynamischer Lichtstreuung (DLS) .....	34
2.4.10	HUVEC <i>tube formation assay</i> .....	35
2.4.11	T-Zell Aktivierung.....	35
2.5	Proteinbiochemische Methoden .....	36
2.5.1	Protein-Isolation und Western Blot.....	36
2.5.2	Protein-Isolation für den Nachweis von HIF-1 $\alpha$ .....	37
2.5.3	Co-Immunopräzipitation .....	37
2.5.4	ELISA.....	37
2.5.5	SDH Assay .....	38

2.6	Molekularbiologische Methoden.....	38
2.6.1	Klonierung von Plasmiden zur Herstellung lentiviraler Vektoren .....	38
2.6.2	Herstellung kompetenter Zellen .....	39
2.6.3	Transformation von <i>E. coli</i> .....	39
2.6.4	DNA-Isolation .....	39
2.6.5	RNA-Isolation und cDNA Herstellung .....	40
2.6.6	qRT-PCR .....	40
2.7	Software.....	41
2.7.1	Bildauswertung.....	41
2.7.2	Statistik.....	41
3.	Ergebnisse .....	42
3.1	TIMP-1 führt zu einer Erhöhung von HIF-1 $\alpha$ über PI3K/AKT .....	42
3.2	Die Induktion stress-assoziiertes HIF-1-Signaltransduktion und die Regulation von miR-210 durch TIMP-1 .....	45
3.3	TIMP-1 führt zu einer Reduktion von miR-210-regulierten Proteinen .....	50
3.4	miR-210-Reduktion verringert die Metastasierung von Melanomzellen in die Lunge .....	52
3.5	Die Interaktion der C-terminalen Domäne von TIMP-1 mit CD63 ist notwendig für die TIMP-1-induzierte Erhöhung von miR-210.....	54
3.6	TIMP-1 beeinflusst Angiogenese durch Änderung des miR-210-Gehaltes der Exosomen ..	60
3.7	TIMP-1 verändert die Zusammensetzung von Wirtsexosomen .....	64
4.	Diskussion .....	69
5.	Literaturverzeichnis.....	80
6.	Publikationen.....	91
7.	Danksagung.....	93
8.	Eidesstattliche Erklärung.....	95



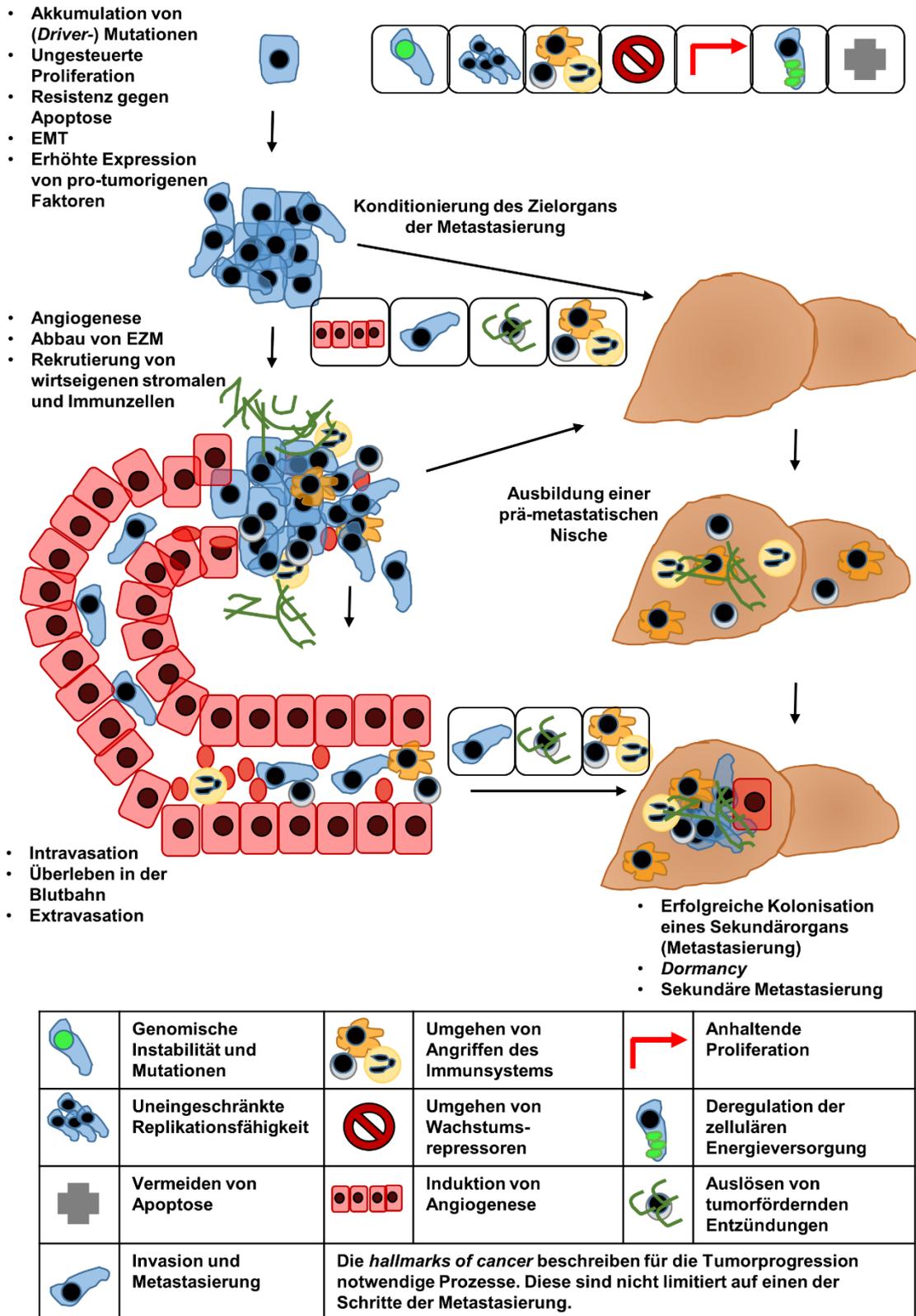
# 1. Einleitung

## 1.1 Beteiligte Prozesse und Faktoren in Primärtumorbildung und Metastasierung

In malignen Tumorerkrankungen wird eine effektive Behandlung und die Identifikation von möglichen therapeutischen Zielen durch die starke Inhomogenität und Diversität der zugrunde liegenden Mutationen erschwert (Vogelstein *et al.*, 2013; Tomasetti und Vogelstein, 2015). Allerdings konnten einige Parameter identifiziert werden, die für verschiedene Tumorentitäten gelten. Diese werden unter dem Begriff *hallmarks of cancer* zusammengefasst (Hanahan und Weinberg, 2000, 2011), Abbildung 1). Diese *hallmarks* umfassen zellintrinsische und zellextrinsische Veränderungen, die entscheidend für die Progression von malignen Tumorerkrankungen sind (Hanahan und Weinberg, 2000, 2011). Initial stehen dabei die Akkumulation von Mutationen in einer Zelle (Vogelstein *et al.*, 2013; Tomasetti und Vogelstein, 2015), die Transformation in eine Krebszelle (Hahn *et al.*, 1999) und die Ausbildung eines primären Tumors (Farber, 1984; Guiot *et al.*, 2003). Dabei entscheidend sind genetische Mutationen und das Außerkraftsetzen von regulatorischen Mechanismen, die eine unkontrollierte Proliferation (Cayama *et al.*, 1978; Lowe *et al.*, 2004) und das Vermeiden von Apoptose (Symonds *et al.*, 1994; Evan und Vousden, 2001) ermöglichen. Eine weitere Adaption erfolgt durch die Manipulation von Wirtszellen durch Tumorzellen um die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen zu optimieren (Semenza, 2003), eine mögliche Immunantwort abzuschwächen (Zou, 2005) oder Immunzellen zu Helfern der Tumorzellen zu programmieren (de Visser *et al.*, 2006). Diese Interaktion mit umliegenden stromalen Zellen erfolgt unter anderem über lösliche Faktoren oder Vesikel (Wels *et al.*, 2008) und fördert die Tumorprogression bis hin zur Metastasierung (Gupta und Massagué, 2006; Wels *et al.*, 2008).

Der Verlauf der Metastasierung lässt sich in verschiedene Schritte unterteilen (siehe Abbildung 1): Die Aktivierung transkriptioneller Programme zur Ausbildung von Metastasen steht dabei am Anfang (Yang und Weinberg, 2008; Ell und Kang, 2013). Die Zelle ist dadurch in der Lage, die lokale extrazelluläre Matrix zu durchbrechen (Boccaccio und Comoglio, 2006; Ell und Kang, 2013) und ein Fehlen von Zell-Zell-Kontakten und Substraten zu überleben (Frisch und Sreaton, 2001). Dies ermöglicht das Disseminieren von Tumorzellen aus dem primären Tumor und die Intravasation in Blutgefäße (Condeelis und Segall, 2003). In der Blutbahn sind Tumorzellen Scherkräften und Attacken des

Immunsystems ausgesetzt (Mehlen und Puisieux, 2006). Schließlich erreichen die disseminierten Zellen sekundäre Organe (Chambers *et al.*, 2002), in denen sie arretieren und extravasieren können (Reymond *et al.*, 2013). Hier wachsen Tumorzellen entweder zu Makrometastasen aus (Chambers *et al.*, 2002) oder gehen in *dormancy* über (Aguirre-Ghiso, 2007). Dabei entscheidend sind unter anderem die vorliegende Zytokinumgebung (Psaila und Lyden, 2009), die extrazelluläre Matrix (Mueller und Fusenig, 2004) und die Zusammensetzung von Zelltypen im Zielgewebe der Metastasierung (Psaila und Lyden, 2009; Sceneay *et al.*, 2013). Die notwendigen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Kolonisierung beschreibt das Konzept der prä-metastatischen Nische (Kaplan *et al.*, 2005). Dieses postuliert die Konditionierung des Zielorgans der Metastasierung durch vom Primärtumor sezernierte Faktoren (Sceneay *et al.*, 2013). Gewebespezifische molekulare Prozesse können so den Organotropismus von verschiedenen Tumorerkrankungen erklären (Psaila und Lyden, 2009; Sceneay *et al.*, 2013). Bei Brustkrebspatienten werden zum Beispiel überwiegend Metastasen in der Lunge und im Knochenmark gefunden, während Kolonkarzinome bevorzugt in die Leber metastasieren (Nguyen *et al.*, 2009). Diese als „*seed and soil*“ bereits 1889 an Brustkrebs beschriebene Beobachtung (Paget, 1889) wurde in den vergangenen Jahren in verschiedenen Krebsarten molekular untersucht (Sceneay *et al.*, 2013). Dabei wurden vom Primärtumor sezernierte Proteine und Vesikel identifiziert, die das Zielorgan der Metastasierung für die Ankunft von Tumorzellen vorbereiten (Abbildung 4, (Psaila und Lyden, 2009; Sceneay *et al.*, 2013). Diese Faktoren erhöhen die Suszeptibilität des Zielgewebes gegenüber Tumorzellen durch Rekrutierung von tumor-toleranten Immunzellen (Kitamura *et al.*, 2015). Dadurch ändert sich die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (Mueller und Fusenig, 2004), die Genexpression im Zielorgan (Sceneay *et al.*, 2013) und die Zytokinumgebung (Joyce und Pollard, 2009).



**Abbildung 1** - Schematische Übersicht über die hypothetische sequentielle Abfolge der Entstehung von malignen Tumoren, deren Metastasierung und die Einordnung der *Hallmarks of Cancer* in diesen Prozess. EMT: Epithelial-mesenchymale Transition, EZM: extra-zelluläre Matrix. Quellen: Fidler, 2003, Gupta und Massagué, 2006, Psaila und Lyden, 2009, Hanahan und Weinberg, 2011, Sceneay *et al.*, 2013.

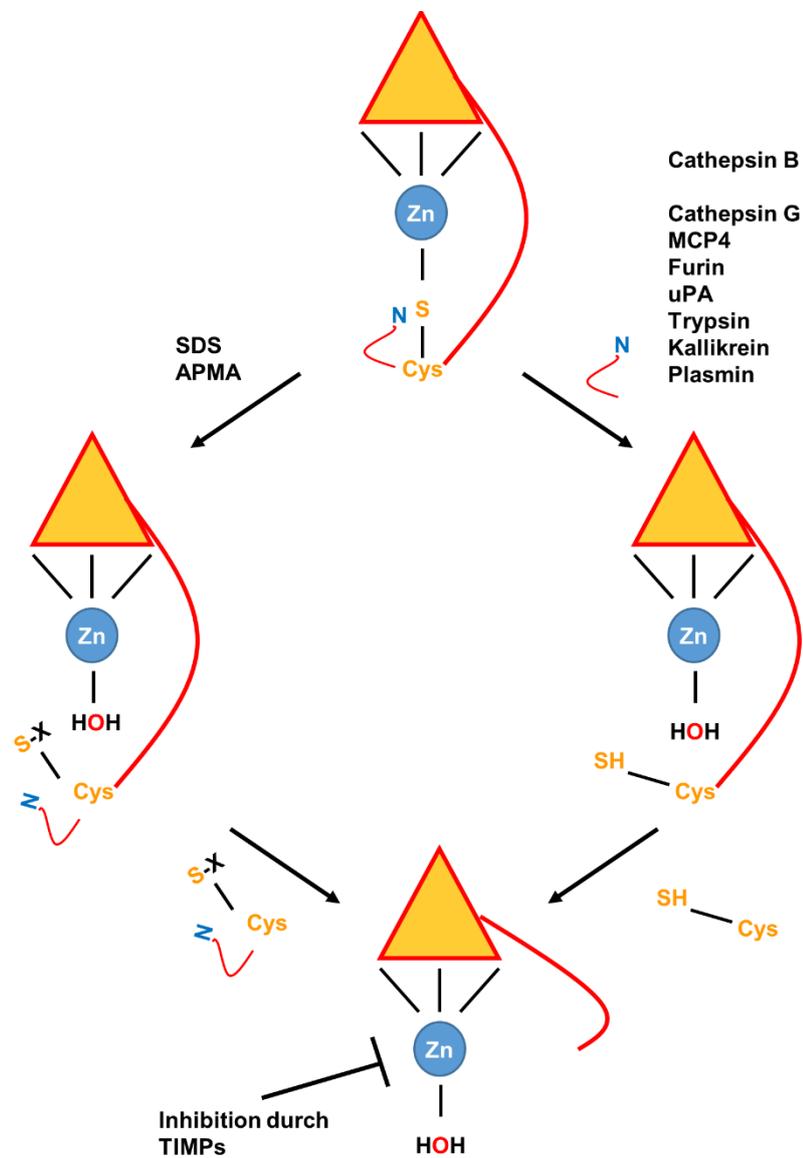
Bisher wurden unterschiedliche Proteine identifiziert, die die Bildung einer prä-metastatische Nische auslösen können: Dazu gehören zum Beispiel Lysyl Oxidase (Erler *et al.*, 2009), die die extrazelluläre Matrix im Zielorgan verändert (Erler *et al.*, 2009), S100A8/A9 und SAA3 (Hiratsuka *et al.*, 2008), die über die Aktivierung von Signaltransduktion Immunzellen rekrutieren (Hiratsuka *et al.*, 2008) und Zytokine wie zum Beispiel G-CSF (Kowanetz *et al.*, 2010), das die Expansion und Mobilisierung von Immunzellen steuert (Kowanetz *et al.*, 2010). Die Schäden durch metastasierende Tumorzellen sind enorm, die dabei anfallende metabolische Last und folgende Tumorkachexie (Argilés *et al.*, 2014), der Schaden an Organen und die gestörte Blutgerinnung (Ambrus *et al.*, 1975) stellen mit die häufigste Todesursache in Patienten dar (Ambrus *et al.*, 1975; Hanahan und Weinberg, 2011). Systemisch betrachtet kann so ein Missverhältnis oder eine erhöhte Expression von löslichen Faktoren - besonders bei multifunktionalen Proteinen und Enzymen wie zum Beispiel Proteasen - einen entscheidenden Einfluss auf die Tumorprogression nehmen.

## 1.2 Metalloproteinasen – Funktion und Regulation

Proteasen sind eine Enzymklasse, die die Hydrolyse von Peptidbindungen in Proteinen katalysieren (Berg et al., 2002). Sie werden nach ihrem aktiven Zentrum in verschiedene Gruppen unterteilt: Cystein-, Serin-, Threonin- und Aspartatproteasen mit der jeweiligen Aminosäure im aktiven Zentrum (McDonald, 1985) sowie Metalloproteasen, deren katalytisches Zentrum ein Metallion enthält (Rodríguez *et al.*, 2010). Die Regulation der Proteaseaktivität erfolgt häufig über post-translationale Aktivierung (Mason und Joyce, 2011). Viele Proteasen werden als Proenzym hergestellt und durch die Abspaltung einer regulatorischen Domäne aktiviert (Turk, 2006). Dies kann sowohl autokatalytisch als auch durch andere Proteasen erfolgen (Abbildung 2, (Chakraborti *et al.*, 2003)).

Diese gezielte Aktivierung durch andere Proteasen ist im Fall von extrazellulären Proteasen aus der Familie der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) fein ausbalanciert (Overall und Blobel, 2007; Krüger *et al.*, 2010). MMPs werden ebenso wie die Familie der *A Disintegrin and Metalloproteinase* (ADAM) zu den Metzincinen gezählt und enthalten beide ein koordiniertes Zinkatom im aktiven Zentrum (Gomis-Rüth, 2003). Ein Teil des Abbaus von extrazellulärer Matrix geht auf MMPs zurück (Overall und Kleifeld, 2006a). MMPs werden entsprechend ihrer Funktion daher vorwiegend sezerniert (Overall und Blobel, 2007). Dagegen befinden sich ADAMs in der Zellmembran und ermöglichen ein gezieltes Schneiden von Strukturproteinen an der invasiven Front (Khokha *et al.*, 2013). Der Abbau von extrazellulärer Matrix durch Metzincine beeinflusst die Zytokinumgebung der Tumorzellen (Mott und Werb, 2004), da zum Beispiel Wachstumsfaktoren in der Proteinmatrix sequestriert vorliegen und bei Entzündungen oder Gewebeschäden freigesetzt werden (Taipale und Keski-Oja, 1997; Hynes, 2009). Proteine der Extrazellulären Matrix können auch direkt Signale in die Zelle senden, so binden zum Beispiel Integrine an der Zelloberfläche Kollagene und senden dadurch pro-proliferative Signale an die Tumorzelle (Desgrosellier und Cheresh, 2010; Lukashev und Werb, 1998). Diese vielfältige Regulation der Signaltransduktion durch Komponenten der extrazellulären Matrix macht deren Abbau wichtig in der initialen Tumorentwicklung (Overall und Kleifeld, 2006a), bei Intra- und Extravasation (Gupta und Massagué, 2006) und auch in der Etablierung und dem Auswachsen von Metastasen (Zucker *et al.*, 2000; Overall und Kleifeld, 2006b). Dementsprechend ist die Aktivität der regulierenden Proteasen, der

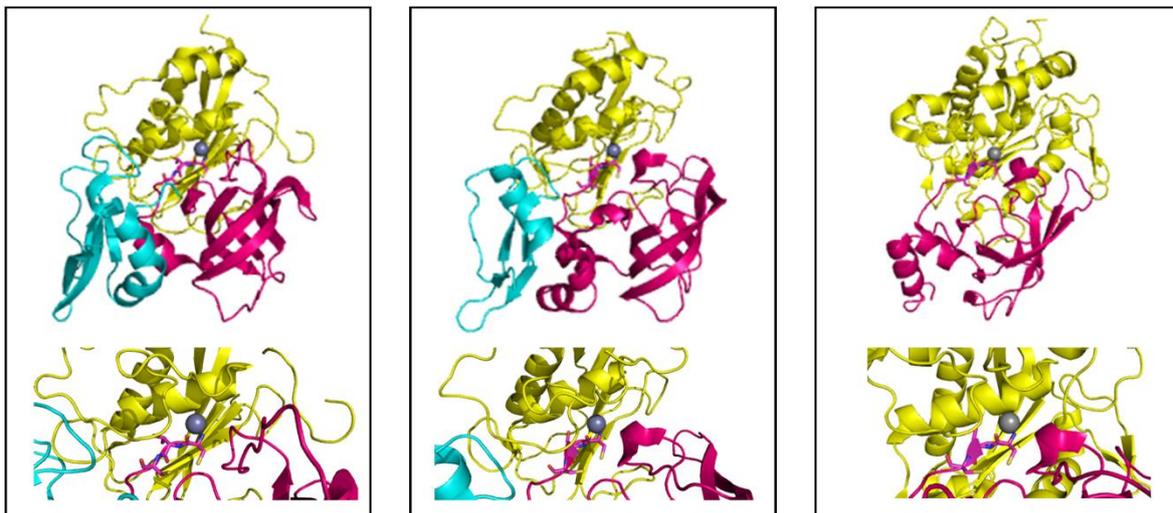
Matrix-Metalloproteinasen, ausschlaggebend in Tumorerkrankungen (Zucker *et al.*, 2000; Overall und Kleinfeld, 2006b).



**Abbildung 2** - Schematische Darstellung der MMP-Aktivierung. Die Abspaltung des Propeptides kann entweder durch anderen Proteasen oder autokatalytisch erfolgen. Quellen: Chakraborti *et al.*, 2003, Mason und Joice, 2011.

### 1.3 *Tissue inhibitor of metalloproteinases-1* – Funktion und Assoziation mit Tumorerkrankungen

MMPs werden in ihrer Aktivität zu großen Teilen von endogenen Inhibitoren aus der Familie der *Tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMP) kontrolliert (Murphy *et al.*, 1994). Die Mitglieder dieser Familie, TIMP-1 bis TIMP-4, binden und inhibieren mit unterschiedlichen Affinitäten MMPs und zum Teil ADAMs (Brew und Nagase, 2010). Alle vier sind sezernierte Breitspektrum-inhibitoren mit unterschiedlichen inhibitorischen Spektren, Expressionsmustern und physiologischen Bedeutungen (Brew und Nagase, 2010; Murphy, 2011). Die Inhibition über Bindung des Metallions im aktiven Zentrum einer Metalloprotease über den N-terminus der jeweiligen TIMPs ist in Abbildung 3 dargestellt.

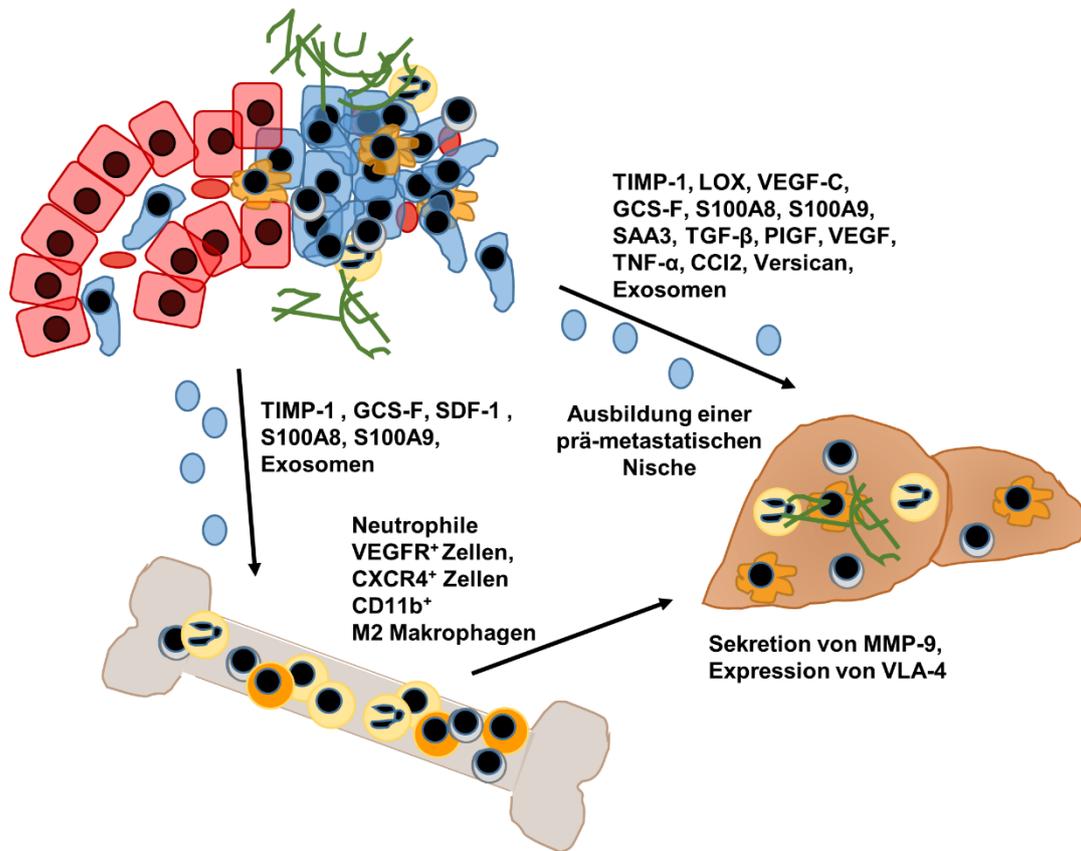


**Abbildung 3** - Inhibition von Matrix-Metalloproteinasen durch TIMPs. Links: TIMP-1 gebunden an MMP-3, Mitte: TIMP-2 gebunden an MMP-13, rechts: N-TIMP-3 gebunden an TACE (ADAM-17). Erstellt mit Pymol, PDB-Einträge: 1UEA, 2E2D, 3CKI. Gelb: Protease, pink: N-terminale Domäne von TIMP, blau: C-terminale Domäne von TIMP.

Von besonderem Interesse im Kontext von Tumorerkrankungen ist TIMP-1, das über verschiedene molekulare Mechanismen und Interaktionspartner eine Vielzahl von tumorfördernden Prozessen beeinflusst (Cruz-Munoz und Khokha, 2008; Brew und Nagase, 2010; Murphy, 2011; Ries, 2014). TIMP-1 kommt in verschiedenen Geweben vor (Uhlén *et al.*, 2015) und erreicht die höchsten Plasmaspiegel von allen TIMPs (Webb *et al.*, 2006). Die Expression von TIMP-1 wird dabei von Zytokinen gesteuert (Roeb *et al.*, 1994), die unter anderem den NFκB-Signaltransduktionsweg

aktivieren (Roeb *et al.*, 1994; Xia *et al.*, 2012) und so einen schnellen Anstieg von TIMP-1 in entzündlichen Prozessen erlauben (Hernandez-Gea und Friedman, 2011; Brumann *et al.*, 2012).

Interessanterweise sind erhöhte Spiegel von TIMP-1 in vielen Krebserkrankungen mit schlechter Prognose assoziiert (Ylisirniö *et al.*, 2000; Rauvala *et al.*, 2005; de Mingo *et al.*, 2007). Dieses augenscheinliche Paradoxon klärt sich bei genauer Betrachtung der molekularen Wirkungsweise von TIMP-1. So führen zum Beispiel erhöhte TIMP-1-Plasmaspiegel unter anderem zu der Ausbildung einer prä-metastatische Nische in der Leber (Seubert *et al.*, 2015). Während die bisher bekannten Faktoren vor allem auf die Lunge wirken (Sceneay *et al.*, 2013), bewirkt TIMP-1 eine spezifische Konditionierung der Leber (Seubert *et al.*, 2015). Im Detail führen erhöhte systemische TIMP-1-Spiegel zu einer gesteigerten hepatischen Expression von Zytokinen und Matrixproteinen (Seubert *et al.*, 2015). Außerdem kommt es zu einer Akkumulation des Zytokins SDF-1 (Seubert *et al.*, 2015) und dadurch zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (Seubert *et al.*, 2015). Diese Veränderung der Lebermikroumgebung bewirkt eine erhöhte Zugänglichkeit der Leber für zirkulierende Tumorzellen (Seubert *et al.*, 2015), die sich in der Leber ansiedeln (Seubert *et al.*, 2015) und sie kolonisieren können (Kopitz *et al.*, 2007).



	Endothelzelle		Tumorzelle (vor EMT)		Aggressive Tumorzelle (nach EMT)
	Neutrophiler Granulozyt		Makrophage		Monozyt
	Sonstige Immunzelle/-vorläuferzelle		Extrazelluläre Matrix		Exosom
	Blutplättchen				

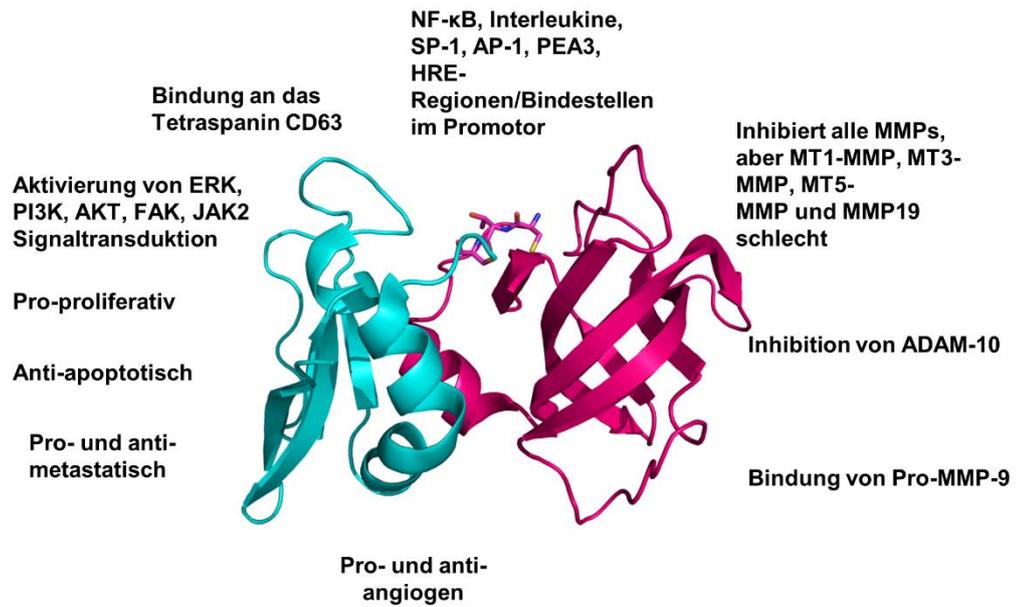
**Abbildung 4** - Schematische Darstellung der Ausbildung einer prä-metastatischen Nische mit beteiligten Faktoren und Zelltypen. Quellen: Psaila und Lyden, 2009, Sceneay *et al.*, 2013.

Neben dem Einfluss von TIMP-1 auf späte Stadien der Tumorprogression scheint TIMP-1 schon während der Etablierung eines Primärtumors eine Rolle zu spielen: Bereits in frühen Stadien von Lungenkrebs sind TIMP-1-Spiegel erhöht (Cui *et al.*, 2014). Zusätzlich aktiviert TIMP-1 eine Reihe von Signalwegen, die pro-proliferativ und anti-apoptotisch wirken (Cruz-Munoz und Khokha, 2008; Stetler-Stevenson, 2008; Murphy, 2011; Ries, 2014) und die dadurch vor allem in frühen Stadien während der Etablierung des primären Tumors von Bedeutung sind (Cayama *et al.*, 1978; Evan und Vousden, 2001).

## 1.4 TIMP-1-vermittelte Signaltransduktion

Um einen möglichen Transduktor dieser signalvermittelnden Eigenschaften von TIMP-1 zu identifizieren, wurden 2006 *yeast two hybrid screens* durchgeführt (Jung *et al.*, 2006). So wurde das Tetraspanin CD63 als bisher einziger ausschließlich C-terminal bindender Interaktionspartner von TIMP-1 identifiziert (Jung *et al.*, 2006). CD63 wird als möglicher Rezeptor von TIMP-1 diskutiert (Chirco *et al.*, 2006). Das Membranprotein CD63 wird vor allem in Endosomen, in Vesikeln endosomalen Ursprungs und auf der Zelloberfläche gefunden (Pols und Klumperman, 2009).

Interessanterweise vermittelt die Familie von Tetraspaninen, zu denen CD63 gehört, in Tetraspaninnetzwerken die Interaktion verschiedener Membranproteine zueinander (Hemler, 2005; Pols und Klumperman, 2009; Zöller, 2009; Hemler, 2014). CD63 interagiert auch mit membranständigen Rezeptoren (Pols und Klumperman, 2009). So könnte CD63 zur Weiterleitung von TIMP-1-induzierten Signalen auf zellulärer Ebene dienen. Zum Beispiel werden die zellulären Signalwege ERK und PI3K/AKT abhängig von CD63 durch TIMP-1 angesteuert (Jung *et al.*, 2006; Ridnour *et al.*, 2012; Toricelli *et al.*, 2013). Neben der Bindung an CD63 kann TIMP-1 auch durch Inhibition der *shedase* ADAM-10 Signalwege beeinflussen: Die Akkumulation der Rezeptortyrosinkinase MET infolge der Inhibition von ADAM-10 durch TIMP-1 ist ausreichend, um zu einer Aktivierung von MET zu führen (Schelter *et al.*, 2010, 2011a). Zudem reguliert TIMP-1 MET auf Genexpressionsebene (Schelter *et al.*, 2011b). In T-Zelllymphommetastasen führen erhöhte systemische TIMP-1-Spiegel zu einer gesteigerten MET-Expression über HIF-1 (Schelter *et al.*, 2011b). Eine Zusammenfassung der TIMP-1-vermittelten Signaltransduktion ist in Abbildung 5 dargestellt.

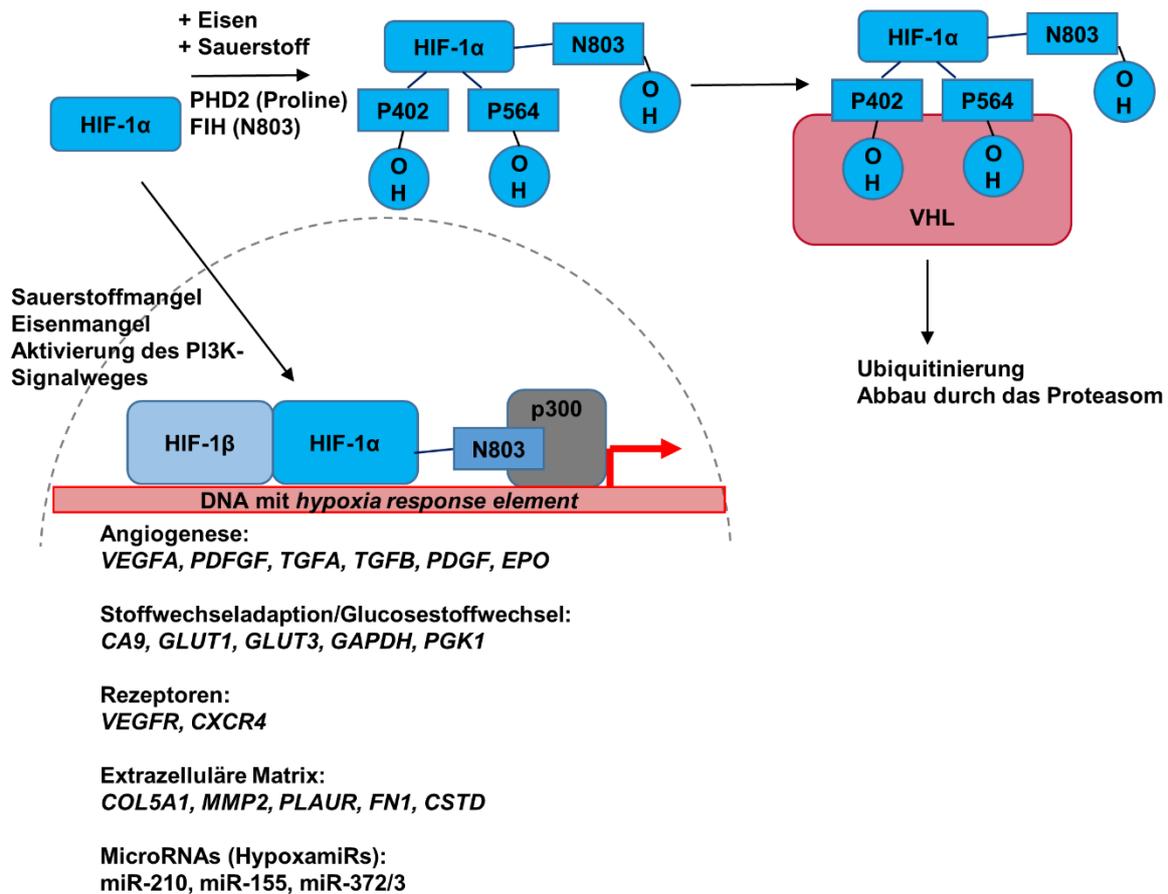


**Abbildung 5** – Regulation und bereits bekannte Funktionen von TIMP-1. Quellen: Brew und Nagase, 2010, Khokha, 2013, Ries, 2014. Abbildung erstellt mit Pymol, PDB: 1UEA

## 1.5 HIF-1 als Hauptregulator der zellulären Stressantwort

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 ist der zentrale Regulator in der zellulären Stressantwort (Semenza, 2000; Pugh und Ratcliffe, 2003; Semenza, 2010). Das Heterodimer HIF-1 besteht aus den Proteinen HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  (Semenza, 2000). HIF-1 $\beta$  wird konstitutiv exprimiert (Pugh und Ratcliffe, 2003), während HIF-1 $\alpha$ -Spiegel durch Hydroxylierung, anschließende Ubiquitinierung und Abbau durch das Proteasom streng reguliert werden (Pugh und Ratcliffe, 2003; Schofield und Ratcliffe, 2004; Kaelin Jr. und Ratcliffe, 2008). Die Hydroxylierung der Proline an Position 402 und 564 und Asparagin 803 erfolgt in Abhängigkeit von Sauerstoff und Eisen (Semenza, 2001). Ein Mangel dieser Co-Faktoren führt zu einer Stabilisierung und Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  (Kaelin Jr. und Ratcliffe, 2008). Daneben wird HIF-1 $\alpha$  auch durch verschiedene Signalwege induziert, vor allem durch PI3Ks (Déry *et al.*, 2005; Giaccia *et al.*, 2003). HIF-1 $\alpha$  bildet mit HIF-1 $\beta$  den Transkriptionsfaktor HIF-1 (Semenza, 2003), geht in den Kern und steuert dort die Regulation von stressmildernden Proteinen und regulatorischen RNAs (Giaccia *et al.*, 2003; Semenza, 2010). Diese Kontrolle erfolgt über Bindung an *hypoxia-response elements* (HREs) in den Promoterregion von Zielgenen (Pugh und Ratcliffe, 2003). HIF-1 reguliert neben anderen die Expression von pro-angiogenem *Vascular endothelial growth factor A* (VEGFA, (Liu *et al.*, 1995)), Glucosetransporter GLUT1 (Chen *et al.*, 2001) und Carboxyanhydrase 9 (CA9, (Wykoff *et al.*, 2000)). Die Regulation von HIF-1 $\alpha$  und HIF-1-Zielgenen ist in Abbildung 6 dargestellt. Neben der direkten transkriptionellen Regulation von HIF-1-Zielgenen kann HIF-1 auch indirekt über microRNAs Einfluss auf Proteinmengen nehmen (Chan *et al.*, 2012).

## Regulation der HIF-1A Expression durch PI3K-Signalweges



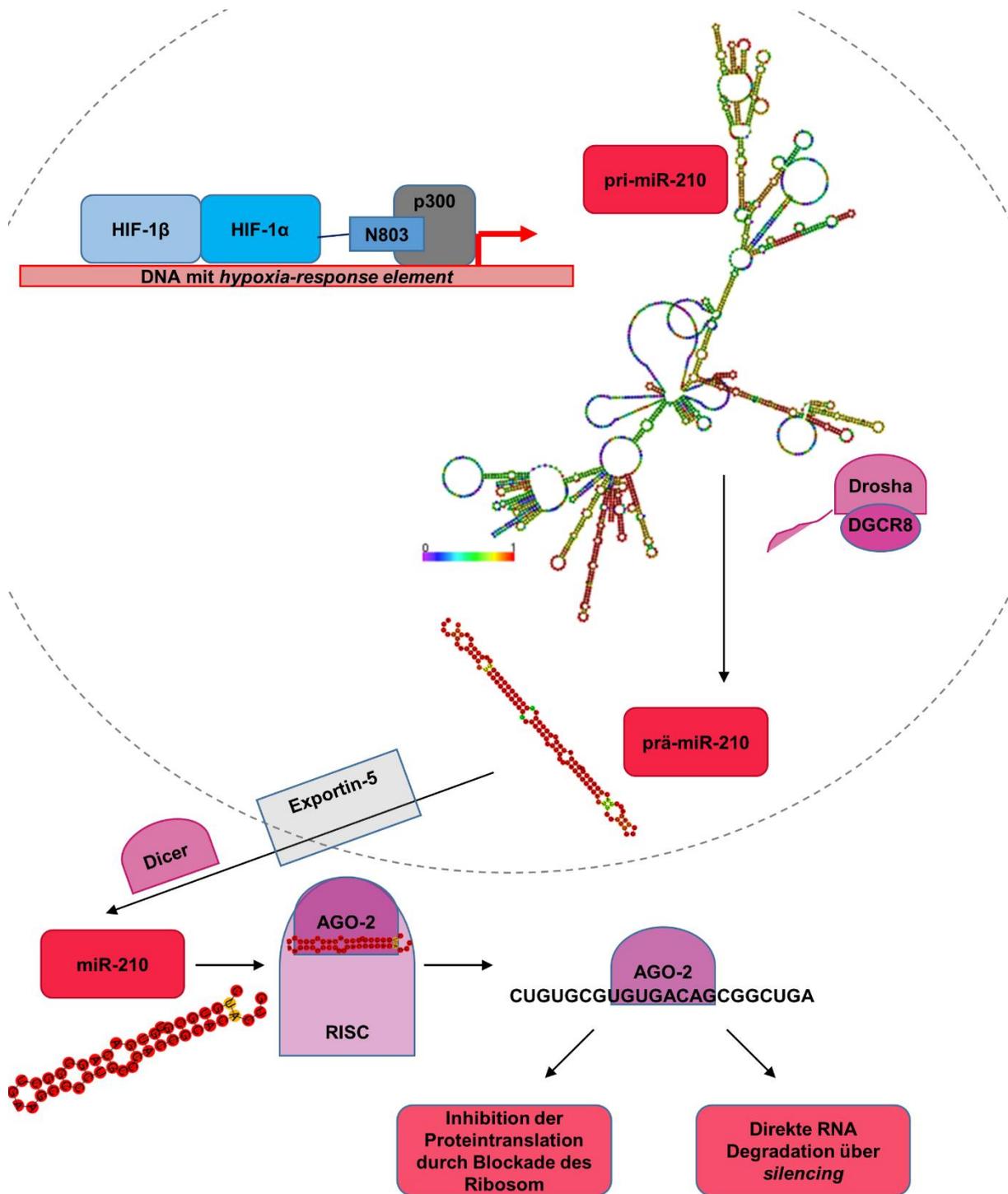
**Abbildung 6** - Darstellung der Regulation von HIF-1 $\alpha$ . PHD2: Prolylhydroxylase 2, FIH: *Factor inhibiting HIF-1*. P402, P564 und N803 kennzeichnen die Aminosäuren von HIF-1 $\alpha$ , die durch PHD2 und FIH hydroxyliert werden. VHL: Von Hippel Lindau, die für HIF-1 $\alpha$  zuständige E3-Ligase. p300: Co-Aktivator des HIF-1-Transkriptionsfaktors. Quellen: Kaelin Jr und Ratcliffe, 2008, Semenza, 2001, 2003, 2010.

## 1.6 miR-210 – die Rolle von HIF-1-regulierter miRNA in der zellulären Stressantwort

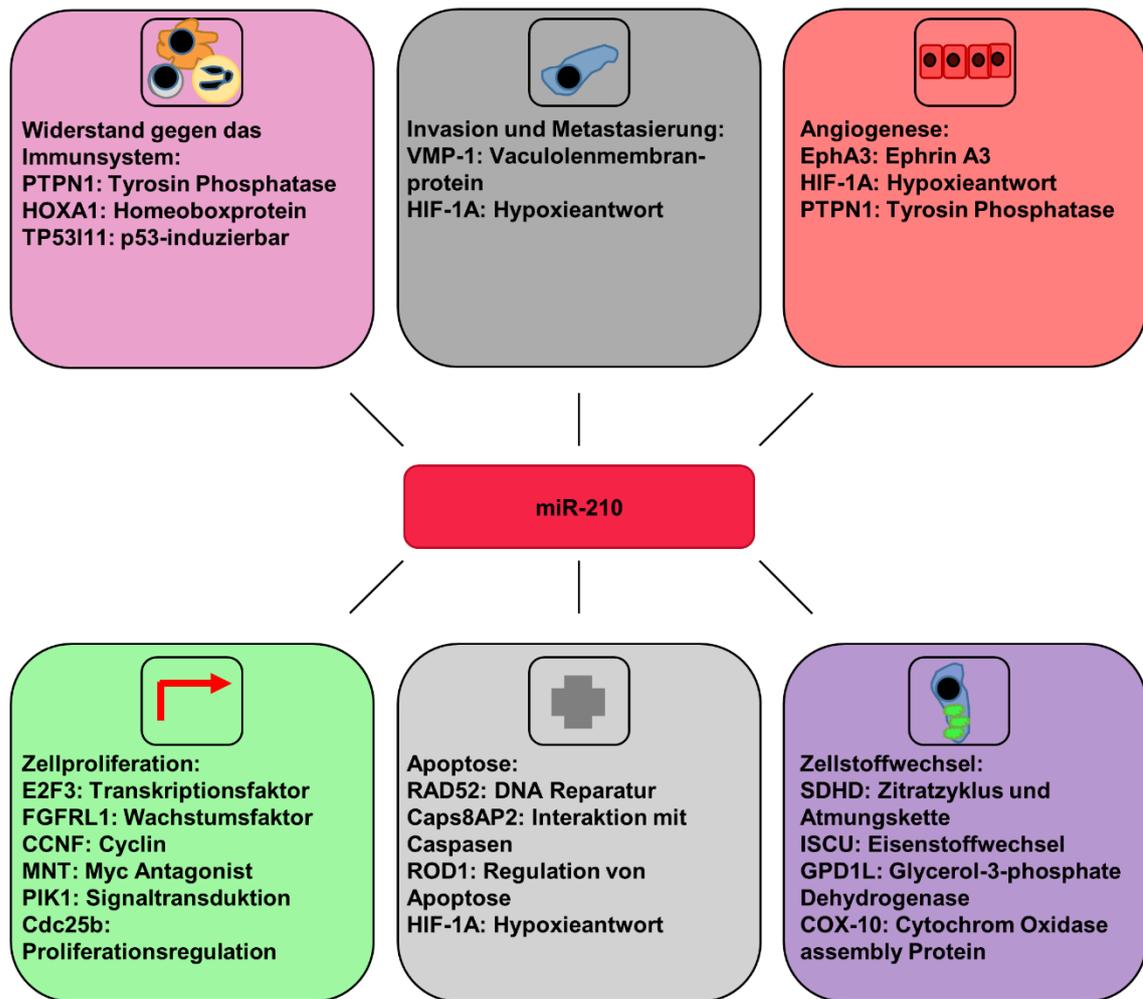
MicroRNAs sind kleine regulatorische RNAs mit 19-22 Nukleotiden (Winter *et al.*, 2009), die post-transkriptional mRNAs regulieren (Krol *et al.*, 2010). Es wird vermutet, dass 50 % aller mRNAs über miRNAs reguliert werden (Sun *et al.*, 2010). miRNAs entstehen durch die Prozessierung einer Vorläuferform, der pri-microRNA (pri-miRNA), über den Zwischenschritt der prä-microRNA (Winter *et al.*, 2009), Abbildung 7). Die reife miRNA kann über Integration in den RISC-Proteinkomplex die Proteintranslation auf zwei verschiedene Arten behindern: miRNAs können ähnlich siRNAs zu einem direkten Abbau einer komplementären mRNA führen (Bagga *et al.*, 2005), allerdings können sie auch über Bindung an die 3'UTR von mRNAs deren Translation durch das Ribosom blockieren (Fabian *et*

*al.*, 2010). Da eine Bindung der microRNAs an *core*-Bereiche ausreicht, kann eine microRNA viele mRNAs regulieren (Puisségur *et al.*, 2011). HIF-1 kontrolliert verschiedene microRNAs (Chan *et al.*, 2012), am robustesten reagiert dabei die microRNA miR-210 auf HIF-1 (Chan *et al.*, 2012). miR-210 bindet vor allem an die 3'UTR der mRNAs ihrer Ziel-mRNAs, bringt so die Translation zum Stillstand und führt schließlich zum Abbau der RNA (Sun *et al.*, 2010; Ivan und Huang, 2014). Dadurch ist miR-210 in der Lage, so verschiedene Proteine wie unter anderem Succinat Dehydrogenase Untereinheit D (SDHD, ein Teil von Komplex II der Atmungskette, (Puisségur *et al.*, 2011)), Eisentransportproteine (ISCU1/2, (Chen *et al.*, 2010; Favaro *et al.*, 2010; McCormick *et al.*, 2013)), DNA-Reparaturprotein RAD52 (Fasanaro *et al.*, 2009), Transkriptionsfaktor E2F3 (Giannakakis *et al.*, 2008; Fasanaro *et al.*, 2009), tumorassoziiertes VMP-1 (Ying *et al.*, 2011) und Ephrin EphA3 (Fasanaro *et al.*, 2008; Pulkkinen *et al.*, 2008) zu regulieren. Eine Übersicht über miR-210-Ziel-mRNAs und ihre Einordnung in die *hallmarks of cancer* ist in Abbildung 8 zu sehen.

Dadurch können HIF-1 und miR-210 den stärksten Stressfaktoren, denen eine Tumorzelle ausgesetzt ist, entgegenwirken: Mangel an Sauerstoff (Hypoxie) (Giaccia *et al.*, 2003), Angriffe des Immunsystems (Pardoll, 2012) und Mangel an Nährstoffen (Hsu und Sabatini, 2008). Zusammen kontrollieren HIF-1 und miR-210 die zelluläre Stressantwort durch Induktion von Angiogenese (Chan *et al.*, 2012), die Umstellung des Stoffwechsels (Puisségur *et al.*, 2011) und die Kontrolle von stromalen Zellen durch die Verpackung von miR-210 in Exosomen (Chan *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2014). Dabei ist vor allem die Kommunikation zwischen Tumorzellen und Wirtszellen von zentraler Bedeutung, die unter anderem Exosomen-vermittelt erfolgen kann.



**Abbildung 7** - Schematische Darstellung der miR-210-Biogenese. Pri-miR-210-Expression wird durch Bindung von HIF-1 an ein HRE-Element in der pri-miR-210-Promoterregion reguliert. Pri-miR-210 wird durch das Drosha/DGCR8-Heterodimer prozessiert und als prä-miR-210 durch Exportin-5 aus dem Kern ins Cytosol überführt. Dort erfolgt die weitere Prozessierung durch Dicer und die anschließende Integration in den RISC-Komplex durch die Bindung an Argonaut-2 (AGO-2). Die Bindung an AGO-2 ermöglicht die anschließende Degradierung von Ziel-mRNA. Neben dem Abbau der mRNA kann es jedoch auch zu einer Inhibition der Proteintranslation kommen, wenn das Ablesen der mRNA im Ribosom blockiert wird. Quellen: Winter *et al.*, 2009, Huang *et al.*, 2010. Sequenzen von miRbase, Sekundärstrukturberechnung über The Vienna RNA Websuite, Gruber *et al.*, 2008. Farbverlauf von violett nach rot stellt die Wahrscheinlichkeit dar, dass eine Basenpaarung vorliegt.

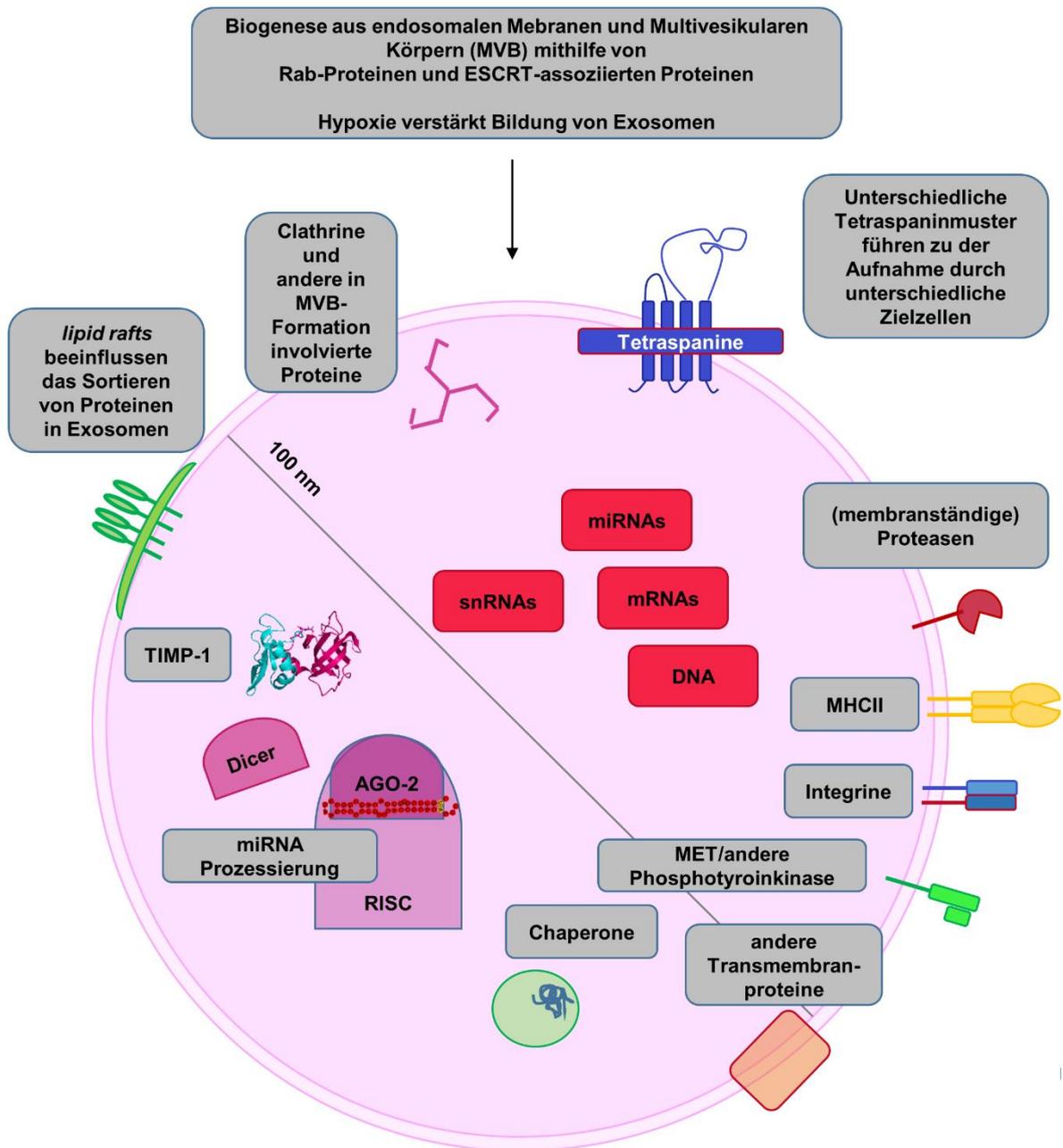


**Abbildung 8** - Übersicht über die Funktionen von miR-210-Ziel-mRNAs und ihre Einordnung in Tumor-assoziierte Signalwege, wie sie für die *Hallmarks of Cancer* beschrieben wurden. Quellen: Chan *et al.*, 2012, Qin *et al.*, 2014, Ivan und Huang, 2014.

## 1.7 Exosomen – Eigenschaften, Biogenese und Rolle im microRNA-Transport

Exosomen sind sezernierte, zelluläre Vesikel mit einer Doppelmembran, die einen Durchmesser von 30-100 nm haben (Azmi *et al.*, 2013) (Abbildung 9). Sie werden von verschiedenen Zelltypen sezerniert (Théry *et al.*, 2002). Exosomen transportieren DNAs, RNAs und Proteine von einer Spender- zu einer Empfängerzelle (Valadi *et al.*, 2007; Azmi *et al.*, 2013) und ermöglichen die funktionelle Anwesenheit von Molekülen, die von der Empfängerzelle nicht selber hergestellt werden (Peinado *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2014). Dadurch kann es zu einer direkten Manipulation von Wirtszellen durch Tumorzellen kommen (Valadi *et al.*, 2007; Azmi *et al.*, 2013). Tumorzell-exosomen übertragen so Eigenschaften von malignen Zellen auf nicht-transformierte stromale Zellen (Melo *et al.*, 2014). Der exosomale Transfer von microRNAs ermöglicht durch deren breites Spektrum an Ziel-mRNAs ein Umprogrammieren der Empfängerzelle (Valadi *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2012). Exosomen werden vermehrt abgegeben, wenn HIF-1 erhöht vorliegt und das Cargo der Exosomen verändert sich nach hypoxischem Stimulus (Park *et al.*, 2010; King *et al.*, 2012; Kucharzewska *et al.*, 2013). Neben ihrer Größe sind Exosomen gekennzeichnet durch Markerproteine, darunter die Tetraspanine CD63, CD9 und CD81 (Rana und Zöller, 2011; Rana *et al.*, 2012; Zöller, 2009). Exosomen spiegeln den cytosolischen Inhalt ihrer parentalen Zelle wieder (Stoorvogel *et al.*, 2002), es werden aber auch Moleküle gezielt in Exosomen angereichert (Stoorvogel *et al.*, 2002; Gassart *et al.*, 2003). In die Biogenese von Exosomen sind verschiedene Rab-Proteine involviert, die unter GTP-Verbrauch Proteine transportieren (Savina *et al.*, 2002; Ostrowski *et al.*, 2010; Pfeffer, 2010; Hsu *et al.*, 2010). Zudem lässt sich über die Zusammensetzung der Tetraspanine auf der Exosomenoberfläche beeinflussen, welche Zellen bevorzugt diese Exosomen aufnehmen (Rana und Zöller, 2011; Rana *et al.*, 2012).

Die Manipulation von Zielzellen macht Exosomen zu Schlüsselfaktoren in der Ausbildung einer prä-metastatischen Nische (Jung *et al.*, 2009; Peinado *et al.*, 2012). Die molekulare Zusammensetzung von Blutexosomen ist in malignen Tumorerkrankungen verändert, zum Beispiel liegen erhöhte Mengen der Tyrosinkinase MET vor (Peinado *et al.*, 2012). So vermindern Exosomen Selektionsdruck und Stress auf die Tumorzelle (Jung *et al.*, 2009; Peinado *et al.*, 2012; Sceneay *et al.*, 2013). Eine Untersuchung der Veränderung von Exosomenproduktion und -zusammensetzung in Abhängigkeit von TIMP-1 wäre von Interesse.



**Abbildung 9** - Schematische Darstellung eines Exosoms. Quellen: Rana *et al.*, 2012; Frühbeis *et al.*, 2012; Valadi *et al.*, 2007; Théry *et al.*, 2002, Melo *et al.*, 2014.

## 1.8 TIMP-1 als möglicher Initiator der Tumorzellstressantwort

Während der Progression von Krebserkrankungen erfahren Tumorzellen starken Selektionsdruck durch Hypoxie, Nährstoffmangel und Angriffe des Immunsystems. Diese Stressfaktoren begünstigen Expressionsmuster in Tumorzellen, die eine Anpassung erlauben und eine Manipulation des Wirtsorganismus zu Gunsten der Tumorzelle ermöglichen. Besonders von Interesse sind dabei die kritischen Momente des Primärtumorwachstums und der frühen Stadien der Metastasierung (Gillies und Gatenby, 2007). TIMP-1 ist in vielen Krebsarten stark erhöht, was auf einen Vorteil für TIMP-1-überexprimierende Tumorzellen hindeutet. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob TIMP-1 in der Lage ist, verschiedene Mechanismen zum *stress release* zu manipulieren und für die Tumorzelle zu nutzen. Dies könnte über den zentralen Stresssignalweg HIF-1 und die microRNA miR-210 erfolgen. Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Krüger zeigen bereits einen Zusammenhang zwischen TIMP-1 und HIF-1 in Metastasen (Schelter et al., 2011b). Über die Interaktion mit CD63 könnte TIMP-1 einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Tumorprogression nehmen. Die gesteigerte Exosomenproduktion unter Hypoxie könnte eine systemische Manipulation durch TIMP-1 ermöglichen. Diese Untersuchungen sollen zu einem tieferen molekularen Verständnis über die Rolle von TIMP-1 in Tumorentstehung und Metastasierung führen und könnten die starke Korrelation zwischen schlechter Prognose und hohen TIMP-1-Spiegeln erklären.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Versuchstiere

Die hier durchgeführten Tierversuche fanden im Zentrum für Präklinische Forschung am Klinikum rechts der Isar der TUM statt. Versuchstiere wurden bei Charles River, Köln, Deutschland, im Alter von 8-10 Wochen mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn bestellt. Alle Tiere wurden unter *Specific Pathogen Free* Bedingungen in für die Tierhaltung konzipierten Räumen mit 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Futter (Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser (autoklaviertes Trinkwasser). Zweimal wöchentlich wurden die Tiere entweder durch den betreuenden Wissenschaftler oder durch Tierpfleger in frische Käfige mit speziellem Holzgranulat als Einstreu umgesetzt. Die Tiere wurden in Gruppen von 5 Mäusen gehalten, es wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet. Als strukturierende Maßnahmen wurden rote Maushäuser verwendet, zusätzlich erhielten die Tiere Nestbaumaterialien in Form von autoklaviertem Zellstoff und Nestlets. Die Hygiene-Richtlinien entsprachen FELASA-Empfehlungen, *health monitoring* erfolgte regelmäßig durch die Untersuchung von *Sentinel*-Tieren.

Folgende Mauslinien wurden verwendet:

SCID ist eine immunsupprimierte Inzucht-Mauslinie, die durch Mutationen im *Scid*-Gen Defekte in frühen Stadien der T- und B-Zell-Lymphopoese aufweisen, während andere Blutzellen unbeeinflusst bleiben (Bosma und Carroll, 1991). Durch diese unzureichende Immunantwort sind SCID Mäuse gut geeignet, um Tumorwachstum und Metastasierung von humanen Zelllinien in einem *Xenograft*-Modell zu untersuchen.

Die DBA/2 Mauslinie ist eine Untergruppe der ältesten etablierten Inzucht-Mauslinie DBA (Holmes, 2003). Diese immunkompetente Mauslinie ist *syngen* zu L.CI-5s T-Zelllymphomzellen und wurden daher für Lebermetastasierungsstudien verwendet (Krüger *et al.*, 1994).

C57BL/6J ist eine sehr häufig verwendete Inzucht-Mauslinie (Mekada *et al.*, 2009). Diese Mäuse weisen einen H2-b Haplotyp auf und sind daher geeignet für immunologische Studien, die auf Präsentation des SIINFEKL-Peptides auf MHCI (H2kB) beruhen (Klein *et al.*, 1978).

### 2.1.2 Zelllinien

A549 wurde aus Tumormasse isoliert, die bei der Lobektomie eines 58-jährigen kaukasischen Mannes anfiel (Giard *et al.*, 1973; Lieber *et al.*, 1976). Diese Zellen haben einen humanen Karyotyp und stammen wahrscheinlich von Type II alveolaren Epithelzellen ab (Lieber *et al.*, 1976). A549 Zellen wurden von Katja Honert (Klinikum rechts der Isar der TUM, Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie) mit dem bakteriellen *lacZ*-Gen stabil transduziert, um eine einfache Detektion dieser Tumorzellen im Tiermodell durch 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)-Färbung (Krüger *et al.*, 1998) zu ermöglichen (A549L). In A549 Zellen wurde gezeigt, dass miR-210 zu einer Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  durch die Induktion einer positiven Rückkopplung über die miR-210-Ziel-mRNA *SDHD* führen kann (Puisségur *et al.*, 2011).

L.CI-5s wurde aus murinen Esb-T-Zelllymphomzellen isoliert, die mit dem *lacZ* Gen stabil transduziert wurden (Krüger *et al.*, 1994). Diese Zellen weisen einen starken Tropismus für die Leber in ihrem Metastasierungsverhalten auf (Krüger *et al.*, 1994).

B16F10 ist die aggressive Variante der B16F1 murinen Melanomzellen, die aus Lungenmetastasen isoliert wurden (Raz *et al.*, 1980). B16F10L Zellen wurden von Katja Honert (Klinikum rechts der Isar der TUM, Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie) mit dem bakteriellen *lacZ*-Gen stabil transduziert, um eine einfache Detektion dieser Tumorzellen im Tiermodell durch X-Gal-Färbung (Krüger *et al.*, 1998) zu ermöglichen (B16F10L).

Skov3ip entstand durch Injektion und Re-isolation einer humanen Ovarialkarzinomzelllinie (Yu *et al.*, 1993). Skov3ip Zellen wurden von Katja Honert (Klinikum rechts der Isar der TUM, Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie) mit dem bakteriellen *lacZ*-Gen stabil transduziert (Skov3ipL).

### 2.1.3 Medien

Medien: RPMI (Biochrom, Berlin, Deutschland), DMEM (Biochrom, Berlin, Deutschland)

Zusätze: 10 % FCS (PAN, PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland), 2 mM Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 10 mM HEPES (Gibco/Life Technologies, Carlsbad, USA), Arginin/Asparagin: 2,9 g L-Arginin + 0,9 g L-Asparagin (beides Sigma Aldrich, München, Deutschland) in 50 ml Wasser gelöst, 1:500 verdünnt.

PBS und Trypsin wurden ebenfalls von Biochrom, Berlin, Deutschland bezogen.

Zelllinie	Grundmedium	Zusätze
<b>A549L</b>	RPMI	10 % FCS 2 mM Glutamin
<b>B16F10L</b>	DMEM	10 % FCS
<b>SKOV3ipL</b>	DMEM	10 % FCS 2 mM Glutamin 10 mM HEPES 1 ml Asp/Arg pro 500 ml Medium
<b>L.CI-5s</b>	RPMI	10 % FCS 2 mM Glutamin 10 mM HEPES 1 ml Asp/Arg pro 500 ml Medium 0,05 mM $\beta$ -Mercaptoethanol

### 2.1.4 Pufferlösungen

20 x Phosphate-buffered saline (PBS): 2,8 M NaCl, 200 mM KCl, 160 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

10 x Tris-buffered saline (TBS): 500 mM Tris/HCl, pH 7,4, 1,5 M NaCl.

10 x Tris-buffered saline (TBS-T): 500 mM Tris/HCl, pH 7,4, 1,5 M NaCl, 1 % Tween-20.

10 x RIPA-Proteinlysepuffer: 0,5 M Tris-HCl, pH 7,4, 1,5 M NaCl, 2,5 % Desoxycholsäure, 10 % NP-40, 10 mM EDTA. Zugabe von Protease- und Phosphataseinhibitoren kurz vor Verwendung.

5x HIF-Lysepuffer: 250 mM Tris/Hcl, pH=7,4, 0,75 M NaCl, 5 % Triton X-100, 5 % Desoxycholsäure, 5 % SDS.

Proteinaufbereitungspuffer für Organe: 50 mM Tris/HCl, pH=7,5, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 200 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100.

Trenngel (2 Gele): 8,75 ml H<sub>2</sub>O, 6,25 ml Poylacrylamid (40 %, 29:1), 5,00 ml 1,5 M TRIS/HCl, pH8,6 mit 0,4 % SDS, 115 µl 10 % APS, 30 µl TEMED.

Sammelgel (2 Gele): 6,10 ml H<sub>2</sub>O, 1,25 ml PAA (40 %, 29:1), 2,50 ml 0,5 M TRIS/HCl, pH 6,8, 115 µl 10 % APS, 30 µl TEMED.

Laufpuffer für SDS-Gele: 25 mM Tris, pH=8,3, 190 mM Glycin, 0,1 % SDS.

Übertragspuffer auf Membranen: 5 mM Tris, pH=8,3, 190 mM Glycin, 20 % Methanol.

Blocking-Puffer: 5 % BSA in TBS-T.

5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)-Färbelösung: 1,64 g K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 2,10 g K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % Desoxycholsäure, 0,02 % NP-40.

### 2.1.5 Antikörper

Firmen: Cell Signaling, Leiden, Niederlande; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland; Abcam, Cambridge, UK; Biorbyt, Cambridge, UK; Millipore, Darmstadt, Deutschland; Calbiochem, Darmstadt, Deutschland, Thermo Scientific, Waltham, USA, DAKO, Hamburg, Deutschland.

Anwendung: WB: Western Blot, IHC: Immunohistochemie, ICC: Immunocytochemie, FC: Durchflusszytometrie (*flow cytometry*)

Antikörper	Anwendung	Verdünnung	Firma
<b>AKT</b>	WB	1:1000	Cell Signaling
<b>Arginase-1</b>	WB	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<b>CD31</b>	IHC	1:50	Abcam
<b>CD63</b>	WB, FC	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<b>CD81</b>	WB	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<b>CD9</b>	WB	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<b>Cleaved Caspase-3</b>	IHC	1:1000	Cell Signaling

<b>E2F3</b>	WB	1:200	Biorbyt
<b>FGFRL1</b>	WB	1:200	Biorbyt
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	WB	1:1000	Cell Signaling
<b>Integrin <math>\alpha</math>v</b>	WB	1:200	Biorbyt
<b>Integrin <math>\beta</math>1</b>	WB	1:200	Millipore
<b>Integrin <math>\beta</math>3</b>	WB	1:200	Millipore
<b>Integrin <math>\beta</math>5</b>	WB	1:200	Biorbyt
<b>P85</b>	WB	1:1000	Cell Signaling
<b>PCNA</b>	IHC	1:200	Abcam
<b>Phospho-Akt</b>	WB, IHC	1:1000	Cell Signaling
<b>PI3K P110<math>\alpha</math></b>	WB	1:1000	Cell Signaling
<b>PI3K P110<math>\beta</math></b>	WB, IHC	1:1000 (WB), 1:50 (IHC)	Cell Signaling
<b>PI3K P110<math>\gamma</math></b>	WB	1:1000	Cell Signaling
<b>RAD52</b>	WB, ICC	1:200 (WB), 1:50 (ICC)	Biorbyt
<b>SDHD</b>	WB, ICC	1:200 (WB), 1:50 (ICC)	Santa Cruz Biotechnology
<b>TCR</b>	FC	1:200	Biologend
<b>TIMP-1</b>	WB	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<b>VMP-1</b>	WB, ICC	1:200 (WB), 1:50 (ICC)	Biorbyt
<b><math>\alpha</math>-Tub</b>	WB	1:2000	Calbiochem Immunochemicals
<b>HRP-markierter Anti-Maus- Sekundärantikörper</b>	WB	1:10000	Thermo Scientific

<b>HRP-markierter Anti-Kaninchen- Sekundärantikörper</b>	WB	1:10000	Thermo Scientific
<b>Biotin-markierter Anti-Ratte- Sekundärantikörper</b>	IHC	1:1000	DAKO
<b>PE-markierter Anti- Kaninchen- Sekundärantikörper</b>	ICC, FC	1:500	Abcam
<b>FITC-markierter Anti-Kaninchen- Sekundärantikörper</b>	ICC	1:500	Santa Cruz

### 2.1.6 Primer

Für qRT-PCR wurden Primer benutzt, die mithilfe des *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* (<http://lifescience.roche.com/webapp>, Roche, Penzberg, Deutschland) erstellt wurden.

<i>Gen</i>	<b>Primer links</b>	<b>Primer rechts</b>	<b>Roche Probe Nummer</b>
<b>human</b>			
<b>CA9</b>	cctttgccagagttgacgag	gcaactgctcataggcactg	25
<b>CD63</b>	tgaaatgtgtgaagttcttgctc	caatcagtcgccactgcaca	18
<b>COX2</b>	cttcacgcacagttttcaag	tcaccgtaaataatgatttaagtccac	23
<b>E2F3</b>	gcactacgaagtccagatagtc	ataccccatcgggtgactg	17
<b>FGFRL1</b>	tacacctcgtcgtgctg	gacccccagaggagctgt	57
<b>GLUT1</b>	gagcgtccgaagactgat	tgaaaagtcccaccaatgc	15
<b>HIF1A</b>	cgcgaacgacaagaaaaag	gaagtggcaactgatgagca	71

<b>pri-miR-210 (AK123483)</b>	cagcgagacgagattacgc	ttctcctcactggctgttt	13
<b>RAD52</b>	ccaaacttatagcgtgacca	ttcatgtcctggctcttccta	48
<b>SDHD</b>	cagccctcactcttcatggt	agctttctgcaaggcatcc	57
<b>TIMP1</b>	gggcttcaccaagacctaca	tcaggggatggataaaca	76
<b>TIMP1, N-terminal domain</b>	ctgttggtgctgtggctgat	aggctggaattgcagaagg	3
<b>TIMP1, C-terminal domain</b>	gggcttcaccaagacctaca	tcaggggatggataaacag	76
<b>VEGFA</b>	ttaaacgaacgtactgcagatg	gagagatctggtcccgaaa	69
<b>VMP1</b>	gattgaagcctgcatgtgg	tctggtcagcacctgagag	16
<b>murin</b>			
<b>Cd31</b>	agcaagaagcaggaaggaca	catggggcaaggaagactc	75
<b>EphA3</b>	actacatctccacgccact	atggtgaactgggggagagt	7
<b>pri-miR-210 (Schueler <i>et al.</i>, 2012)</b>	cacacgctcagcaaacact	aacaccgactagccatcac	82

## 2.2 Injektionsmethoden und Verlaufskontrolle

### 2.2.1 Intravenöse Injektion

Intravenöse (i.v.) Injektion bezeichnet hier die Applikation von Tumorzellen, Vesikeln oder Wirkstoffen über die Schwanzvene. Um eine möglichst gute Sichtbarkeit dieser Venen zu gewährleisten und einen Verschluss der Venenklappen zu verhindern, wurden die Mäuse für 15-30 Minuten unter einer Infrarotlampe erwärmt. Die Injektion erfolgte mit einem Applikationsvolumen von 200 µl. Adenoviren und Zellen wurden von Katja Honert (Klinikum rechts der Isar der TUM, Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie) auf die gewünschte Konzentration eingestellt (Adenoviren:  $5 \times 10^8$  pfu/Tier, Zellen:  $1 \times 10^6$  Zellen pro Tier). Die Injektion von Tumorzellen und

Adenoviren wurde von Prof. Dr. rer. nat. Achim Krüger (Klinikum rechts der Isar der TUM, Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie) durchgeführt, die intravenöse Injektion von Exosomen erfolgte durch Julia Kobuch (Klinikum rechts der Isar der TUM, Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie) oder durch die Autorin.

### 2.2.2 Intraperitoneale Injektion

Intraperitoneale (i.p.) Injektion bezeichnet die Gabe von Substanzen in den Bauchraum. Dieses Verfahren hat den Vorteil sehr schnell und relativ stressfrei für die Tiere zu sein. Dadurch wird eine wiederholte Gabe von Inhibitoren und anderen therapeutisch wirksamen Substanzen möglich. Hierfür werden die Tiere mit einem speziellen Griff fixiert und es wird im rechten Winkel in den Bauchraum injiziert.

### 2.2.3 Subkutane Injektion

Eine subkutane (s.c.) Injektion von Tumorzellen erfolgte, um einen möglichst gut zugänglichen und quantifizierbaren Primärtumor zu erhalten, dessen Progression gut verfolgt werden kann. Die Applikation der Tumorzellen erfolgte hierbei unterhalb der Haut an beiden Flanken der vorher rasierten Maus. Subkutane Injektionen wurden von Prof. Dr. rer. nat. Achim Krüger (Klinikum rechts der Isar der TUM, Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie) durchgeführt.

### 2.2.4 Verlaufskontrolle von Primärtumoren

Mäuse mit Primärtumoren wurden zweimal wöchentlich (Montag und Donnerstag) kontrolliert. Dabei wurde die Tumorgöße mithilfe einer Schublehre kontrolliert. Zudem wurden die Mäuse auf ihr äußeres Erscheinungsbild überprüft.

## 2.3 *Post mortem*-Analyse von Tierversuchsproben und immunohistochemische Analyse

### 2.3.1 Präparation von Versuchstieren

Die Tötung der Mäuse erfolgte durch Ersticken in CO<sub>2</sub>. In Versuchen mit TIMP-1- oder CD63-überexprimierenden Tumoren oder miR-210-Modulierungen wurde Genickbruch verwendet, um die Sauerstoffsättigung der Tumore und Metastasen nicht zu beeinflussen. Das Fell wurde mit Ethanol

angefeuchtet, um eine Kontamination mit Haaren zu vermeiden. Blut wurde aus der unteren Hohlvene mit Hilfe von EDTA-gespülten Spritzen entnommen und durch Zentrifugation bei 500 g für 5 Minuten in Blutzellen und Plasma getrennt. Falls der Maus vorher Tumorzellen gespritzt worden waren, wurden von allen Organen Teile für eine 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)-Färbung entnommen. Zunächst wurden Pankreas und Milz präpariert, Teile wurden für die Einbettung in Paraffinblöcken fixiert oder für spätere RNA Isolation in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Leber wurde durch Greifen der Pfortader fixiert, freigeschnitten und anschließend für Cryoschnitte eingebettet, für die Einbettung in Paraffinblöcke fixiert oder für eine spätere RNA- oder Proteinisolation in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dabei wurde die Leber nach einem definiertem Schema aufgeteilt: Medialer Leberlappen für X-Gal-Färbung, oberer Teil des linken Leberlappens (nahe an den anderen Leberlappen) für Proteinisolation, unterster Teil des linken Leberlappens für RNA-Isolation, Zwischenstücke des linken Leberlappens für Cryoschnitte und Paraffinschnitte. Die Lunge wurde gemeinsam mit Herz und Thymus entnommen, die Lunge wurde für die Einbettung in Paraffinblöcke fixiert oder für eine spätere RNA-Isolation in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Thymus wurde für eine spätere RNA-Isolation in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Eine Niere wurde geteilt und Teile wurden für die Einbettung in Paraffinblöcke fixiert und für eine spätere RNA-Isolation in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Lymphknoten und Hirn wurden ebenfalls entnommen und für spätere Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### 2.3.2 RNA-Isolation

RNA wurde mithilfe des RNeasy Midi Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) oder mithilfe von Trizol (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert. Teilstücke des linken Leberlappens, des Tumors und der Lunge wurden für die RNA-Isolation verwendet. Für die Isolation mithilfe von Trizol wurden tiefgefrorene Leberstücke mithilfe von Zirkonia-Kügelchen in einem Mini Bead Beater, Cole-Parmer, Kehl/Rhein, Deutschland, zerstoßen.

### 2.3.3 Protein-Isolation

Teilstücke des linken Leberlappens wurden für die Protein-Isolation mithilfe von Zirkonia-Kügelchen in Proteinlysepuffer (siehe 2.1.4) in einem Mini Bead Beater, Cole-Parmer, Kehl/Rhein, Deutschland, zerstoßen.

### 2.3.4 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)-Färbung

Frische Organe wurden durch kurzes Waschen in PBS von Blut befreit und für 1-2 Stunden in einer Fixierlösung bestehend aus 4 % Formaldehyd (Applichem, Darmstadt, Deutschland) und 2 % Glutaraldehyd (Applichem, Darmstadt, Deutschland), gepuffert in PBS, fixiert. Anschließend wurden die Organe in X-Gal-Färbelösung über Nacht bei 4°C gefärbt. Wenn Tumorzellen gut sichtbar waren, wurden die Organe mit PBS gewaschen und anschließend in Fixierlösung gelagert.

### 2.3.5 Einbetten von Organen für immunohistochemische Analysen

Für die immunohistochemische Präparation von Paraffin-eingebetteten Organen wurden frische Organstücke für 24 Stunden in einer Fixierlösung bestehend aus 4 % Formaldehyd gepuffert in PBS fixiert. Diese wurden durch die AG Heikenwälder dehydriert und anschließend mithilfe eines *Paraffin Embedding System* (Dispenser Unit TBS88, Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland) in Paraffin eingebettet. Paraffinblöcke wurden mithilfe eines Paraffin-Mikrotoms HM355 Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland, in 5  $\mu$ m dicke Scheiben geschnitten, in ein 40°C warmes Schnittstreckerwasserbad gegeben, auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Für die immunohistochemische Präparation von Cryo-Schnitten wurden frische Organe in TissueTek (vertrieben durch Weckert Labortechnik, Kitzingen, Deutschland) eingebettet. Diese wurden auf Trockeneis eingefroren. Anschließend wurden die Cryo-Blöcke mithilfe eines Kryostat-Mikrotom HM500 OM von Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland in 8  $\mu$ m dicke Scheiben geschnitten oder bei -80°C gelagert.

### 2.3.6 Immunohistochemische Analyse

Bei der immunohistochemischen Analyse von Paraffin-eingebetteten Organen wurde wie folgt vorgegangen: Die Schnitte wurden in einer Xylol-Alkohol-Reihe (3 x 3 Minuten Xylol, 3 x 3 Minuten 100 % Ethanol, 2 x 3 Minuten 90 % Ethanol) entparaffiniert und anschließend in Wasser rehydriert.

Antigene wurden durch 3 x 5-minütiges Kochen in 0,01 M Zitratlösung, pH=6 freigelegt (Antigendemaskierung). Nach dem Auskühlen wurden endogene Peroxidasen durch 5-minütige Inkubation in 3 % Peroxidase blockiert und die Schnitte in TBS-Puffer regeneriert. Inkubation mit 100 µl des primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C, die verwendeten Verdünnungen können der Tabelle in 2.1.5 entnommen werden. Am nächsten Tag wurden die Objektträger dreimal in TBS-T gewaschen und die Schnitte mit Biotin-gekoppelten sekundären Antikörpern (Anbieter und Verdünnungen können der Tabelle in 2.1.5 entnommen werden) überschichtet. Nach 45 - 60minütiger Inkubation wurden die Schnitte erneut gewaschen und mit 1:500 verdünntem, Streptavidin-gekoppelten HRP-Komplex (DAKO, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger erneut gewaschen und mit AEC oder DAB Substrat (DAKO, Hamburg, Deutschland oder Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland) entwickelt. Um Aufschluss über die Gewebestruktur zu geben, wurden die Schnitte mit Hematoxylin (30-90 Sekunden Inkubation, 10 Minuten bläuen unter fließendem Wasser) gegengefärbt. Konservierung der gefärbten Gewebeschnitte erfolgte über Eindecken mit Glyceringelatine (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland).

Bei der immunohistochemischen Analyse von Cryoschnitten wurde wie folgt vorgegangen: Cryoschnitte wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, für 10 Minuten in -20°C kaltem Aceton fixiert und erneut für 15 Minuten getrocknet. Anschließend wurde die endogene Peroxidase durch Inkubation mit 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 Minuten blockiert und die Schnitte in TBS equilibriert. Inkubation des primären Antikörpers erfolgte über Nacht und die anschließenden Schritte wurden analog zur immunohistochemischen Analyse von Paraffinschnitten durchgeführt.

### 2.3.7 Red Oil O Färbung von Lipiden

Für das Anfärben von Lipiden in cryokonserviertem Lebergewebe wurde eine Red Oil O Färbung nach Mehlem *et al.* durchgeführt (Mehlem *et al.*, 2013). Lebergewebe wurde dabei für 5 Minuten mit einer Red Oil O Färbelösung (Mehlem *et al.*, 2013) inkubiert und anschließend mit Hematoxylin gegengefärbt (30-90 Sekunden Inkubation, 10 Minuten bläuen unter fließendem Wasser). Die Konservierung erfolgte durch Eindecken mit Glyceringelatine.

### 2.3.8 Sirius Red Färbung von Kollagenen

Paraffinschnitte wurden in einer Xylol-Alkohol-Reihe (3 x 3 Minuten Xylol, 3 x 3 Minuten 100 % Ethanol, 2 x 3 Minuten 90 % Ethanol) entparaffiniert und anschließend für 30 Minuten in Sirius Red in einer übersättigten Picrinsäurelösung gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in Wasser gewaschen und durch die inverse Xylol-Alkohol-Reihe wieder entwässert. Abschließend wurden die Schnitte in Eukitt eingedeckt.

### 2.3.9 Isolation von Exosomen aus Mausblut

100 µl Mausplasma (2.3.1) wurden mit 100 µl Thromboplastin C (Klinische Chemie, Klinikum rechts der Isar der TUM) gemischt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert, um vorhandene Gerinnungsfaktoren zu entfernen. Präzipitierte Proteine wurden durch Zentrifugation bei 10.000 g entfernt. Der Überstand wurde mit 50 µl Exoquick (Systems Bioscience, Mountain View, USA) für 30 Minuten bei 4°C inkubiert, um Exosomen aus dem Plasma zu fällen. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 4°C und 1500 g zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt und für weitere 5 Minuten zentrifugiert. Abschließend wurde das vorhandene Pellet in 100 µl PBS resuspendiert. Analysen zur Größe und Homogenität der Exosomen wurden direkt im Anschluss durchgeführt. Für weitere Untersuchungen wurden die Exosomen bei -80°C aufbewahrt.

## 2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Kultivieren von Säugerzellen

Säugerzellen wurden jeden Montag, Mittwoch und Freitag von Katja Honert (Klinikum rechts der Isar der TUM, Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie) oder der Autorin passagiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellkonfluenz konstant zwischen 80-95 % blieb. Eine Aufstellung der verwendeten Medien ist unter 2.1.3 zu finden. Regelmäßige Mycoplasmen-Tests wurden von Katja Honert (Klinikum rechts der Isar der TUM, Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie) durchgeführt, alle hier verwendeten Zelllinien waren zu jedem Zeitpunkt negativ für Mycoplasmen.

#### 2.4.2 Konditionieren von Zellen mit rekombinantem Protein oder synthetischen Inhibitoren

Säugerzellen wurden mit einer Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/well einer 6-well-Platte 12-18 Stunden vor Stimulus ausgesät. Rekombinantes Protein/Inhibitor/DMSO-Kontrollen wurden in der gewünschten Konzentration in vorgelegtes Medium mit 10 % FCS in ein Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben. Eine gute Durchmischung wurde durch Vortexen erreicht. Das Medium mit Protein oder Inhibitor wurde daraufhin zu den Zellen gegeben und die Zellen für den angegebenen Zeitraum inkubiert. Falls nicht anders erwähnt, erfolgte die Stimulation mit rekombinantem humanem TIMP-1 über 12 Stunden.

#### 2.4.3 Herstellung lentiviraler Partikel

Zur Herstellung lentiviraler Partikel der dritten Generation wurde die Verpackungszelllinie 293T verwendet.  $5 \times 10^6$  293T-Zellen wurden 24 Stunden vor der Co-Transfektion in 10 cm Schalen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 3 Helferplasmiden (6,6 µg pLP1, 5 µg pLP2, 3 µg pLPSVG) und 10 µg des Plasmides mit flankierenden LTR-Sequenzen und des Zielgens, bzw. der gewünschten shRNA-Sequenz transfiziert. Dafür wurde die DNA in 1,5 ml Optimem (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verdünnt, Lipofectamin-2000 (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) für 5 Minuten in 1,5 ml Optimem vorinkubiert und anschließend wurden DNA und Lipofectamin für 20 Minuten zur Bildung von DNA-Lipofectamin-Komplexen zusammen inkubiert. 293T Medium wurde abgenommen und durch 5 ml Optimem mit 10 % FCS ersetzt. Der DNA-Lipofectamin Komplex wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben und über Nacht auf den Zellen belassen. Am Tag 3 wurde morgens das Medium zu 10 ml Kompletmedium gewechselt. 48 Stunden nach der Co-Infektion, bzw. wenn Lyse der Zellen sichtbar war, erfolgte die Virusernte. Überstand mit lentiviralen Partikeln wurde durch einen 0,45 µm Filter filtriert, um Zelltrümmer zu entfernen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Viren möglichst nicht Scherkräften ausgesetzt wurden. Virushaltige Überstände wurden bis zur Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 2.4.4 Infektion von Säugerzellen mithilfe lentiviraler Partikel

Lentivirale Partikel wurden verwendet, um stabil shRNAs oder cDNA-Sequenzen in Säugerzellen zu exprimieren. Zellen wurden mit 1 ml virushaltigen Überstand in der Anwesenheit von 8 µg/ml Polybren (Sigma Aldrich, München, Deutschland) für 2 Stunden unter regelmäßigem Schwenken inkubiert.

Anschließend wurde mit 4 ml Medium aufgefüllt und die Zellen wurden für 48 Stunden belassen. Virusüberstände wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt, danach fielen die Zelllinien nicht mehr unter Sicherheitsstufe 2. Selektion mit Puromycin (Sigma Aldrich, München, Deutschland) erfolgte, falls notwendig, direkt im Anschluss. A549L Zellen wurden mit 20 µg/ml, L.CI-5s mit 35 µg/ml Puromycin behandelt, bis eine uninfizierte Kontrollzelllinie tot war (in der Regel innerhalb von 2-4 Tagen).

#### 2.4.5 Immunozytochemie

Zellen für Immunozytochemie wurden auf runden, unbehandelten Glasdeckgläsern mindestens 24 Stunden vor der Färbung ausgesät. Adhärente Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 1 Stunde mit 4 % PFA in PBS fixiert. Falls gewünscht, wurden die Zellen mit 0,5 % Triton X-100 (Applichem, Darmstadt, Deutschland) permeabilisiert. Zellen wurden für 1 Stunde mit primären Antikörper, verdünnt in 2 % FCS und 1 % BSA in PBS (ICC Puffer) inkubiert, mit PBS und ICC Puffer insgesamt dreimal gewaschen, für eine Stunde abgedunkelt mit fluoreszenzmarkiertem sekundären Antikörper und DAPI gefärbt. Anschließend wurden die Deckgläser mit Rotimount (Roth, Karlsruhe, Deutschland) auf Objektträger montiert und mit Nagellack fixiert. Objektträger, die mit Isotyp-Kontrolle anstatt mit Primärantikörper behandelt wurden, dienten als Kontrolle.

#### 2.4.6 Durchflusszytometrie

Zellen für Durchflusszytometrie wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur trypsinisiert und anschließend abgeschabt, um die Zahl der Oberflächenproteine möglichst vergleichbar zu halten. 100.000 Zellen wurden in FC-Röhrchen gegeben und in primären Antikörper verdünnt in PBS mit 1 % FCS (FC-Puffer) resuspendiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei 4°C wurden die FC-Röhrchen mit 4 ml FC-Puffer aufgefüllt, abzentrifugiert (300 x g, 3 Minuten) und in sekundärem Antikörper verdünnt in FC-Puffer erneut resuspendiert. Ungebundener sekundärer Antikörper wurde mit 4 ml FC-Puffer abgewaschen und die Zellen wurden für die Messung in 300 µl FC-Puffer resuspendiert. Zellen wurden mithilfe eines FACS Canto II, BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland, analysiert. Für den Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland)-vermittelten Proliferationsassay wurden Zellen mit 10 µM CFSE (gelöst in DMSO, verdünnt in PBS)

für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen über den gewünschten Zeitraum kultiviert (im Falle von B3Z-Zellen für 48 Stunden) und im FITC-Kanal eines Durchflusszytometers (FACS Canto II, BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) analysiert.

#### 2.4.7 Alamar Blue-basierter Zellviabilitätsassay

Zellen für die Analyse der Proliferation wurden in einer Zellzahl von 3,000 Zellen pro *well* einer 96-*well*-Platte (für A549L) in einem Volumen von 100 µl ausgesät. 4 Stunden nach Aussäen der Zellen sowie zu den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils 2 Stunden vor Auslesen des Messwertes 10 µl Alamar Blue (AbD Serotech, Düsseldorf, Deutschland) ins Medium gegeben. Die Umsetzung von Resazurin zu Resorufin, das stark fluoresziert (Anregung 540 nm, Emission 590 nm), ist abhängig von der Menge an Redoxequivalenten in der Zelle und daher ein Indikator für die Zahl an lebenden Zellen. Die Messungen wurden in Quadruplikaten durchgeführt.

#### 2.4.8 Isolation von Exosomen aus Zellkulturüberstand

Exosomen wurden entweder mithilfe von Exoquick-TC (Systems Bioscience, Mountain View, USA) nach Herstellerangaben isoliert oder mithilfe von Ultrazentrifugation abgetrennt. Dafür wurden zunächst tote Zellen und Zelltrümmer von konditioniertem Medium (6 x 5 ml auf 10 cm Platten für mindestens 24 Stunden) durch Zentrifugation bei 500 x g abgetrennt und das Medium anschließend durch einen 0,22 µm Filter filtriert, um größere Vesikel abzuscheiden. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand für 70 Minuten bei 100.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Exosomenpellet wurde in 100 µl PBS aufgenommen und Untersuchungen zu Form und Größe wurden noch am selben Tag durchgeführt. Für weitere Versuche wurden die Exosomen bei -80°C aufbewahrt.

#### 2.4.9 Charakterisierung von Exosomen mithilfe von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Dynamischer Lichtstreuung (DLS)

Die Charakterisierung von Homogenität und Größe der Exosomen erfolgte durch Transmissionselektronenmikroskopie mithilfe von Evi Stahl im Labor für Biomolekulare Nanotechnologie von Prof. Hendrik Dietz. Exosomenfraktionen wurden für 5 Minuten auf Formvar Carbon Film-beschichtete Kupfergitter gegeben (Electron Microscopy Sciences, München,

Deutschland), für 5 Minuten mit 2 % Paraformaldehyd fixiert und mit 2 % Uranylformiatlösung (enthielt 25 mM Natronlauge) für 40 Sekunden gefärbt. TEM-Bilder wurden mithilfe eines Philips CM100 Transmissionselektronenmikroskops bei 100 kV aufgenommen. Aufnahmen entstanden mithilfe einer AMT Megapixel CCD Kamera. Alle Bilder wurden bei einer Vergrößerung von 28500x aufgenommen. Zusätzlich wurde Homogenität und Partikelgröße mithilfe von Dynamischer Lichtstreuung an einem Zetasizer Nano ZS (Malvern, Herrenberg, Deutschland) und den entsprechenden Küvetten (folded capillary cells, Malvern, Herrenberg, Deutschland von Christian Plank, Klinikum rechts der Isar der TUM, Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie) untersucht. Dafür wurden 5 Gruppen bestehend aus jeweils 16 aufeinanderfolgenden Messungen ausgewertet.

#### 2.4.10 HUVEC *tube formation assay*

*HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) tube formation assays* wurden wie durch Arnaoutova und Kleinman beschrieben durchgeführt (Arnaoutova und Kleinman, 2010). 50 µl Matrigel (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) wurde in eine 96-well Platte gegeben und für 2 Stunden bei 37°C polymerisiert. *HUVEC* Zellen mit einer Passage < 10 wurden mit CellTracker Green (Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) gemäß Herstellerangaben angefärbt und anschließend wurden 15.000 markierte Zellen in Anwesenheit von Exosomen auf Matrigel ausgesät. Die Analyse erfolgte 18-24 Stunden später durch Auswertung von Fluoreszenzmikroskopbildern.

#### 2.4.11 T-Zell Aktivierung

Zur Überprüfung der Aktivität von T-Zellen wurden B3Z Hybridomazellen genutzt, die auf MHCI-Kb-restringierte SIINFEKL-Präsentation mit verstärkter Proliferation und IL-2 Sekretion reagieren (Limmer *et al.*, 2000; Basha *et al.*, 2011). Dafür wurden aus Femur und Tibia von C57Bl/6 Mäusen Knochenmarkszellen gespült, durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 100 µm gefiltert und in von L929 mit M-CSF-konditioniertes Medium ausgesät. Nach 7 Tagen wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Die isolierten Zellen waren CD11b<sup>+</sup> und wurden als antigen-präsentierende Makrophagen/Monozyten für die Stimulation der B3Z-Zellen verwendet. Diese wurden mit AdGOL (Adenovirus kodierend für GFP, Ovalbumin, Luciferase) oder einem Kontrollvirus mit einer MOI von 20 in Anwesenheit von Polybren für 90 Minuten bei 800 g bei 32°C zentrifugiert und

dabei infiziert. Nach zwei Tagen wurden B3Z-Zellen zu den nun Ovalbumin exprimierenden Makrophagen/Monozyten gegeben und für 18 Stunden kokultiviert. Konditioniertes Medium wurde zur Messung der IL-2-Spiegel abgenommen und die Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS Canto II, BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) auf Proliferation und T-Zell-Rezeptor-Expression (TCR) untersucht.

## 2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 2.5.1 Protein-Isolation und Western Blot

$2 \times 10^6$  Zellen für Protein-Isolationen wurden 24 Stunden vorher ausgesät und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 200-400  $\mu$ l RIPA-Lysepuffer aufgenommen und mit einem Zellschaber abgelöst. Zur vollständigen Lyse wurden die Zellen bei  $-80^\circ\text{C}$  oder  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren und so auch bis zur Verwendung aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurden die Zelllysate bei  $10.000 \times g$  für 5 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert, um unlösliche Fraktionen abzutrennen. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung mithilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits (Pierce, Rockford, USA) durchgeführt. Dafür wurden 10  $\mu$ l Zelllysate oder 10  $\mu$ l 1:10 verdünntes Zelllysate mit 200  $\mu$ l fertiger BCA Lösung (Puffer A: Puffer B 50:1) gemischt und für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Eine BSA-Standardreihe diente dabei als Referenz. 50 – 100  $\mu$ g Protein wurden in einem Volumen von 40  $\mu$ l mit 4 x Lämmli vermischt und bei  $95^\circ\text{C}$  für 5 Minuten erhitzt. 40  $\mu$ l der fertigen Proben wurden auf ein Gel mit einer angebrachten Acrylamidkonzentration (7,5 % > 150 kDa, 10 %: >80 kDa, 12 % <80 kDa) geladen und bei 120 V aufgetrennt, bis die Bromphenolblaubande des Ladepuffers aus dem Gel ausgelaufen war. Anschließend wurde das Gel in Western Blot Puffer equilibriert und zwischen extradickem Filterpapier (Biorad, München, Deutschland) auf eine PVDF-Membran (GE Healthcare, München, Deutschland) geschichtet. Die Proteinübertragung fand anschließend bei 15 V statt (45-105 Minuten, je nach Größe des Proteins). Anschließend wurde die Membran für eine Stunde mit 5 % BSA in TBS-T geblockt um unspezifische Bindungen zu vermeiden und über Nacht in primären Antikörper, verdünnt in 2,5 % BSA/TBS-T, inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Western Blot dreimal für mindestens 10 Minuten in TBS-T gewaschen und für mindestens 60 Minuten in sekundärem Antikörper, ebenfalls verdünnt in 2,5 % BSA/TBS-T, inkubiert. Im Anschluss wurde der Western Blot erneut

dreimal für mindestens 10 Minuten gewaschen und anschließend mit Clarity Western ECL Substrat (Biorad, München, Deutschland) in einer ChemiDoc Station (Biorad, Deutschland) entwickelt.

### 2.5.2 Protein-Isolation für den Nachweis von HIF-1 $\alpha$

Protein-Isolation für die Quantifizierung von HIF-1 $\alpha$  wurde mithilfe eines speziellen Lysepuffers durchgeführt, der zu einer besonders schnellen Zellyse durch den Einsatz von 1 % SDS im Puffer führte. Das zum Waschen verwendete PBS wurde mit Trockeneis zum einen CO<sub>2</sub> gesättigt und zum anderen soweit heruntergekühlt, dass ein Teil des PBS als Eis vorlag. Die Zellen wurden direkt aus dem Inkubator auf Trockeneis überführt, mit 10 ml eiskaltem PBS/10 cm Schale gewaschen, dieses wurde abgenommen und es wurden 400  $\mu$ l Lysepuffer dazugegeben. Die Zellen wurden schnell von der Platte geschabt und das Zellysat wurde auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.5.3 Co-Immunopräzipitation

Zur Co-Immunopräzipitation von intrazellulären oder Membranproteinen und ihren Interaktionspartnern wurden die Zellen mit PBS gewaschen und unter stringenten (NP-40 als Detergenz) oder sanften Bedingungen (Brij 98 als Detergenz) lysiert. Das Zellysat wurde auf vorher in TBS-equilibrierten Agarose-Beads mit Protein G gegeben und zusammen mit Antikörper oder Isotyp-Kontrolle für 3 Stunden bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Beads zweimal mit TBS gewaschen, in 30  $\mu$ l TBS aufgenommen und die Proteine durch Erhitzen in Lämmli-Puffer von den Beads eluiert. Die komplette flüssige Fraktion wurde auf ein SDS-Gel geladen und es wurde wie unter 2.5.1 beschrieben fortgeföhren.

### 2.5.4 ELISA

ELISAs wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt. DuoSet-ELISAs gegen humanes TIMP-1 oder humanes IL-2 wurden von R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland bezogen. Zum Entwickeln wurde BD TMB Substrate (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) benutzt und die Farbentwicklung bei 450 nm über einen Wallac Victor<sup>2</sup> (Perkin Elmer, Waltham, USA) ausgelesen. Zur Visualisierung von Unebenheiten der ELISA-Platte wurde zusätzlich die Absorption bei 590 nm gemessen.

### 2.5.5 SDH Assay

SDH Assays wurden wie beschrieben durchgeführt (Puisségur *et al.*, 2011). Zellen wurden in 100 mM Phosphatpuffer, pH=7,4, aufgenommen und durch zweimaliges wiederholtes Einfrieren und Auftauen lysiert und unlösliche Fraktionen wurden durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 5 Minuten bei 4°C abgetrennt. Das Zellysate wurde auf 0,2 mg/ml in einem Volumen von 20 µl verdünnt. 30 µl SDH Assay Puffer (20 mM Succinat, 50 µM 2,6-Dichloroindophenol, 100 µM ATP, 1 mM KCN (alle Sigma Aldrich, München, Deutschland) in Phosphatpuffer wurde zu dem Proteinlysate hinzugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Decylubiquinone (Enzo, Lörrach, Deutschland) gestartet und nach 30 Minuten wurde die Absorption bei 595 nm gemessen.

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 Klonierung von Plasmiden zur Herstellung lentiviraler Vektoren

SIN (Self-inactivating vectors) wurden basierend auf Vektoren, die von Schambach *et al.* entwickelt wurden, hergestellt (Schambach *et al.*, 2006). Ausgangsvektor war dabei pRRL.PPT.SF. Alle Klonierungen wurden nach demselben Schema durchgeführt: PCR des Inserts (Q5 Polymerase, NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) und Einbringen von BamHI- und NheI-Schnittstellen (Primer von Metabion, München, Deutschland), Verdau mit BamHI und NheI (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland), Dephosphorylierung und Ligation (Rapid DNA Dephos & Ligation Kit, Roche, Penzberg, Deutschland) und anschließende Transformation von kompetenten *E. coli* (siehe 2.6.3). Die Klonierung von N-TIMP-1, N-TIMP-1\_T2G, TIMP-1\_T2G und VV\_N-TIMP-1 erfolgte unter Mithilfe von Dominik Alterauge (Praktikant am Klinikum rechts der Isar der TUM, Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie), die Klonierung von VV\_TIMP-1 unter Mithilfe von Andreas Stengl (Praktikant am Klinikum rechts der Isar der TUM, Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie) und die Klonierung des Fusionsproteins CD63\_mCherry unter Mithilfe von Carolin Wander (Praktikantin am Klinikum rechts der Isar der TUM, Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie).

### 2.6.2 Herstellung kompetenter Zellen

TopTen *E. coli* Zellen wurden in einem Volumen von 250 ml in LB-Medium auf eine  $OD_{595} = 0,5$  wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen in vorgekühlten, sterilen Falcons für 10 Minuten auf Eis gehalten und bei  $2744 \times g$  für 5 Minuten bei  $4^{\circ}C$  zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 50 ml eiskalter, steriler 0,1 M  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien erneut bei  $988 \times g$  für 5 Minuten bei  $0^{\circ}C$  zentrifugiert und erneut in 50 ml eiskalter  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Abschließend inkubierten die Zellen für 20 Minuten auf Eis, bevor sie erneut bei  $988 \times g$  für 5 Minuten bei  $0^{\circ}C$  zentrifugiert wurden. Kompetente Zellen wurden in  $CaCl_2$ -Lösung mit 10 % Glycerin resuspendiert, bzw. es wird ein ungefährender Prozentanteil von 10 % sterilem Glycerin zur restlichen Calcium-Chlorid-Lösung gegeben. Das Volumen sollte 5 ml nicht überschreiten, um eine zu geringe Zelldichte zu vermeiden. Zellen wurden in Aliquots von 100  $\mu l$  in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei  $-70^{\circ}C$  gelagert.

### 2.6.3 Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut und mit der Ziel-DNA vermischt. Das Plasmid wurde in einem Hitzeschritt von 2 Minuten bei  $42^{\circ}C$  eingebracht und die Zellen wurden anschließend bei  $37^{\circ}C$  unter Schütteln für eine Stunde inkubiert (Erholungskultur). 200  $\mu l$  der Kultur wurden nach Transformation einer Ligation oder 50  $\mu l$  nach Transformation des sauberen Plasmides auf Agar-Platten mit einem angebrachten Antibiotikum (100  $\mu g/ml$  Ampicillin bei pRRL.PPT.SF-Vektoren) ausplattiert und über Nacht bei  $37^{\circ}C$  oder über drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Einzelklone wurden dann für eine weitergehende DNA-Isolation verwendet.

### 2.6.4 DNA-Isolation

Die DNA-Isolation erfolgte in verschiedenen Maßstäben nach Herstellerangaben mit dafür geeigneten Kit-Systemen. Für die Isolation kleiner DNA-Mengen zur Kontrolle nach einer Ligation wurde das mini-Plasmid Mini Prep Kit von Metabion (München, Deutschland) verwendet, während für große DNA-Mengen, wie sie vor allem für eine Transfektion zur Herstellung lentiviraler Vektoren benötigt wurden, das QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet wurde.

### 2.6.5 RNA-Isolation und cDNA Herstellung

Für die Isolation der RNA aus Zellkulturproben wurde Trizol (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zellen wurden 12-24 Stunden vor der RNA-Isolation ausgesät ( $2 \times 10^6$  Zellen/10 cm Schale,  $3 \times 10^5$  Zellen/6-well Platte), zweimal mit PBS gewaschen und in 1 ml (10 ml Platte) bzw. 0,5 ml (6-well Platte) Trizol aufgenommen. Zellen und Trizol wurden mit einem Zellschaber vermischt und in ein Reagenzgefäß übertragen. Zellen in Trizol wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Prozessierung aufbewahrt. Zur RNA-Isolation wurde pro ml Trizol 200  $\mu\text{l}$  Chloroform zugegeben und die Zellen durch heftiges Mischen mit einem Vortex-Gerät lysiert. Anschließend wurde das Trizol-Gemisch für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bei  $14.100 \times g$  bei  $4^\circ\text{C}$  für 15 Minuten zentrifugiert. Die sich dabei abscheidende wässrige Phase wurde in ein Reaktionsgefäß mit 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol/ml Trizol überführt und vermischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die nun ausgefällte DNA durch Zentrifugation bei  $14.100 \times g$  bei  $4^\circ\text{C}$  abgetrennt und mit 1 ml 70 % Ethanol/ml Trizol gewaschen. Danach wurde die RNA durch Zentrifugation bei  $3875 \times g$  abgetrennt und getrocknet. Die RNA wurde in 30  $\mu\text{l}$  RNase freies  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  im Kühlschrank gelagert um ein vollständiges Lösen zu erreichen. RNA wurde auf eine Konzentration von 100 ng/ $\mu\text{l}$  eingestellt und mithilfe des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) gemäß Herstellerangaben umgeschrieben. Dabei wurden 10  $\mu\text{l}$  RNA (Gesamtmenge 1  $\mu\text{g}$  RNA) eingesetzt. Zur Amplifikation von qRT-PCR-fähigen microRNA-Vorlagen wurden Primer von Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

### 2.6.6 qRT-PCR

Quantifizierung der mRNA-Expression wurde mithilfe von qRT-PCR basierend auf der Roche Universal Probe Library (Roche, Penzberg, Deutschland) durchgeführt. Die Auswahl der spezifischen Primer/Probe Kombination erfolgte mithilfe des Assay Design Centers (<http://lifescience.roche.com/shop/en/mx/overviews/brand/universal-probe-library>). 5  $\mu\text{l}$  der aus 2.6.5 erhaltenen cDNA wurden 1:100 in nukleasefreiem Wasser verdünnt (5  $\mu\text{l}$  cDNA + 495  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ ) und daraus wurde in einem weiteren Schritt eine 1:500 Verdünnung erstellt (100  $\mu\text{l}$  verdünnte cDNA + 400  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ ). 10  $\mu\text{l}$  1:100 verdünnte cDNA wurde für die Quantifizierung von Zielgenen benutzt, 10  $\mu\text{l}$  der

1:500 verdünnten cDNA für die Quantifizierung der 18S rRNA Kontrolle. Dazu wurde pro *well* ein vorher angesetzter Mix aus 12,5 µl FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche, Penzberg, Deutschland), 0,25 µl *forward* Primer, 0,25 µl *reverse* Primer, 0,25 µl Probe, 1,75 µl nukleasefreies Wasser mit einer Multistep-Pipette hinzugefügt. Nukleasefreies Wasser anstatt verdünnter cDNA wurde als Kontrolle mitgeführt.

Zur Quantifizierung von miRNA wurden Primer/Probe-Gemische von Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde cDNA in der angegebenen Menge an nukleasefreiem Wasser vorverdünnt und in den *wells* vorgelegt und anschließend 10 µl FastStart Universal Probe Master (Rox) zusammen mit 1 µl Primer/Probe-Gemisch mithilfe einer Multistep-Pipette in die *wells* hinzugegeben.

## 2.7 Software

### 2.7.1 Bildauswertung

Die densitometrische und sonstige Auswertung von Western Blots erfolgte mithilfe von Image Lab (Biorad, München, Deutschland) oder Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Konfokalmikroskopbilder von ICC und IHC wurden mithilfe von ZEN (Zeiss, München, Deutschland) erstellt, exportiert und ausgewertet. Image J wurde für die Quantifizierung von DAB-entwickelten IHC-Färbungen genutzt.

### 2.7.2 Statistik

Statistische Auswertung erfolgte über Origin 8 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) oder über Graph Pad Prism (GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, USA) durch Verwendung des Student's T-Test oder ANOVA, falls mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen wurden.

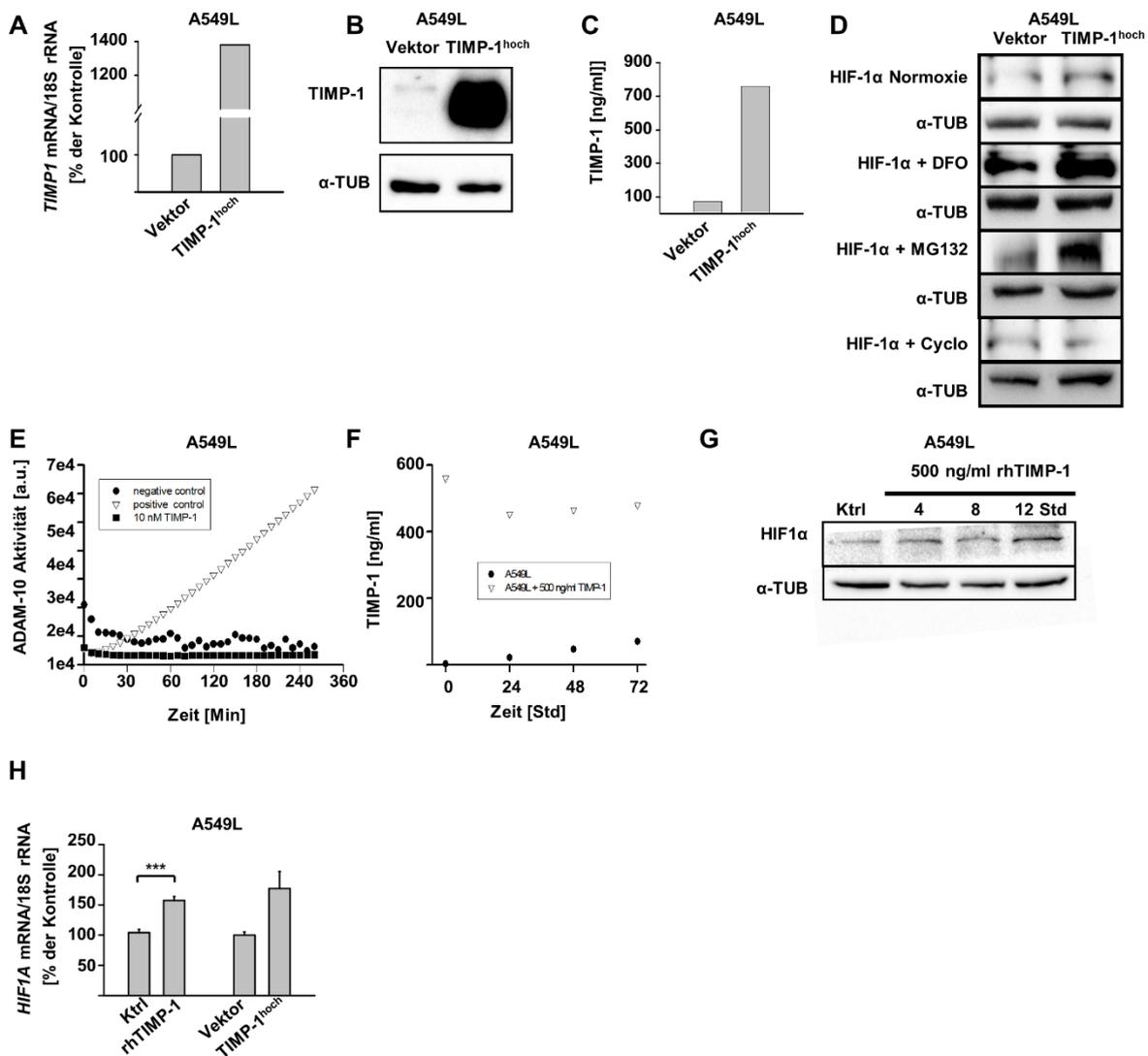
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 TIMP-1 führt zu einer Erhöhung von HIF-1 $\alpha$ über PI3K/AKT

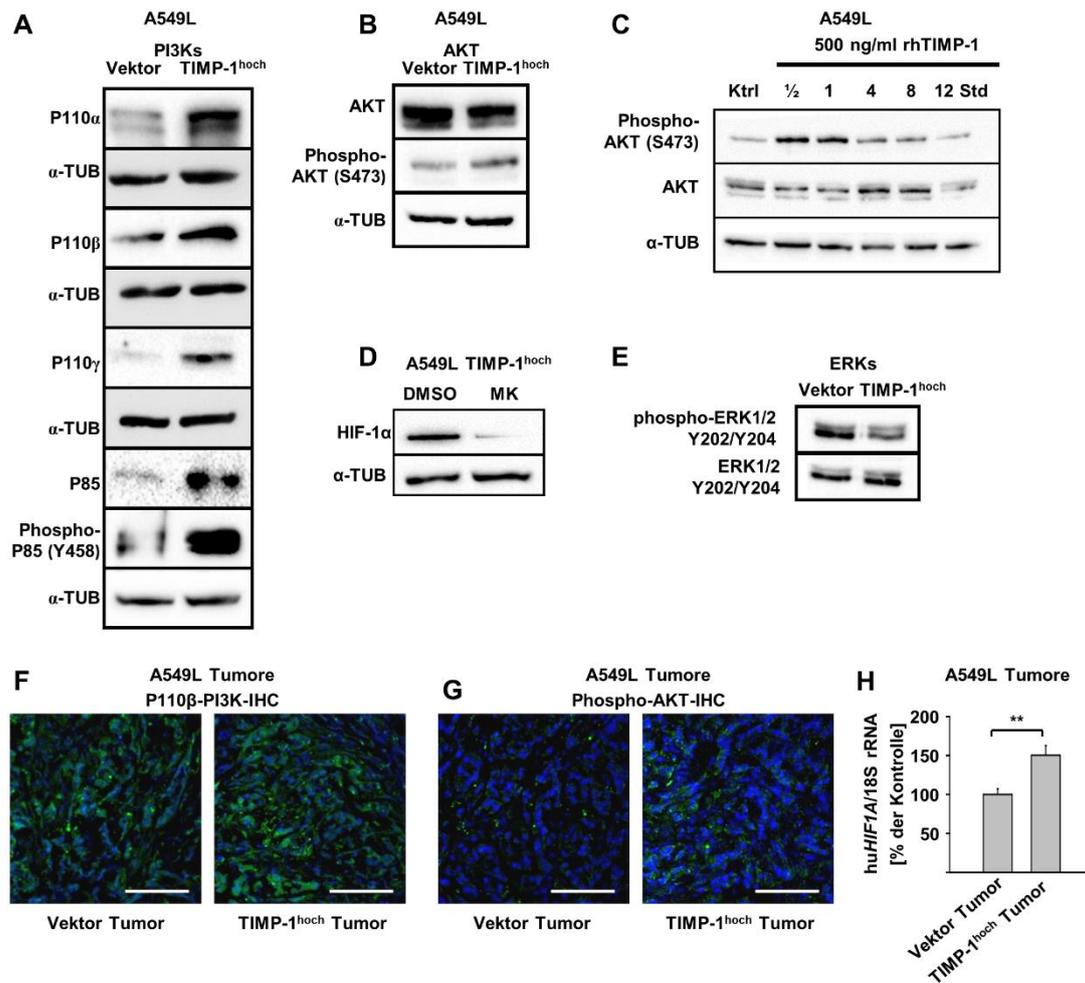
Der HIF-1-Signalweg steuert die Reaktion von Tumorzellen gegenüber Stressfaktoren wie Sauerstoffmangel, Nährstoffmangel oder Attacken des Immunsystems (Semenza, 2003). Basierend auf Vorarbeiten (Schelter *et al.*, 2011b), wurden die Auswirkungen von erhöhter TIMP-1-Expression in humanen Lungenkrebszelllinie A549L auf die Expression von HIF-1 untersucht. Da HIF-1 über die Stabilisierung der Untereinheit HIF-1 $\alpha$  reguliert wird, wurde HIF-1 $\alpha$  nach TIMP-1-Überexpression untersucht (Abbildung 10 A-C). Dabei kam es zu einem Anstieg von HIF-1 $\alpha$ -Protein (Abbildung 10D). Auch die Inkubation mit 500 ng/ml rekombinanten humanem TIMP-1 (rhTIMP-1) für 12 Stunden (Abbildung 10E, F) erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Protein in der Zelle (Abbildung 10G). Um den Mechanismus hinter dieser Erhöhung zu charakterisieren, wurde HIF-1 $\alpha$ -Protein durch die Inhibition von Prolyl-Hydroxylasen durch den Eisenchelator DFO (Abbildung 10D) oder durch den Proteasominhibitor MG132 (Abbildung 10D) stabilisiert. Trotz Blockade des Abbauweges war HIF-1 $\alpha$  weiterhin nach TIMP-1-Überexpression erhöht, was auf eine Regulation unabhängig von der Proteinstabilisierung deutete. Die Inhibition der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid führte zu einer Reduktion von HIF-1 $\alpha$  und legte eine Erhöhung von HIF-1 $\alpha$  durch TIMP-1 auf mRNA-Ebene nahe (Abbildung 10D). Sowohl die Zugabe von rekombinatem TIMP-1 ins Medium (Abbildung 10H) als auch die endogene Überexpression in den Tumorzellen löste eine Erhöhung der HIF-1A mRNA-Expression aus (Abbildung 10H).

Der PI3K/AKT-Signalweg ist ein Regulator der Expression von HIF-1 $\alpha$  (Semenza, 2010). Da TIMP-1 ein Aktivator des PI3K/AKT-Signalweges ist (Ries, 2014), wurde eine mögliche Erhöhung von PI3K/AKT als Regulator von HIF-1A in Abhängigkeit von TIMP-1 untersucht. Dabei wurde eine Erhöhung von p110-PI3Ks sowie von phosphoryliertem AKT (Abbildung 11A, B) gefunden, die durch TIMP-1 in einem kurzen Zeitraum induziert wurde und nach 24 Stunden wieder abflachte (Abbildung 11C). Eine direkte Abhängigkeit der Erhöhung von HIF-1 $\alpha$  durch den AKT-Signalweges zeigte eine Inkubation mit dem AKT-Inhibitor MK-2206. Dieser führte zu einer Reduktion von HIF-1 $\alpha$  bei TIMP-1-Überexpression (Abbildung 11D). ERK war hingegen nicht erhöht (Abbildung 11E). Auch im

Tiermodell waren erhöhte Mengen an PI3K P110 $\beta$ -Protein, phosphoryliertem AKT und HIF-1A-mRNA im TIMP-1-überexprimierenden Tumor zu finden (Abbildung 11F-H).



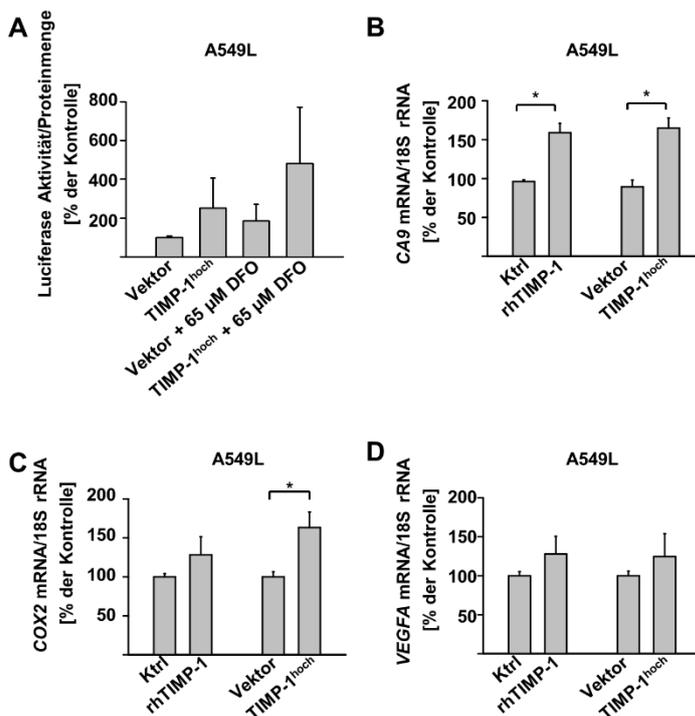
**Abbildung 10 - TIMP-1-Überexpression sowie Inkubation mit rekombinantem TIMP-1 führt zu einer Erhöhung von HIF-1 $\alpha$  auf mRNA- und Proteinebene.** (A) qRT-PCR-basierter Nachweis der TIMP-1-Expression zur Verifikation der lentiviralvermittelten Überexpression. (B) Western Blot-basierter Nachweis von TIMP-1 zur Verifikation der lentiviralvermittelten Überexpression. (C) ELISA-basierter Nachweis der sezernierten TIMP-1-Proteinspiegel zur Verifikation der lentiviralvermittelten Überexpression. (A-C) Eine repräsentative Messung (n=3) wird gezeigt. (D) Western Blot-basierte Untersuchung des Einflusses von TIMP-1 auf HIF-1 $\alpha$ -Protein.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. DFO: Eisenchelator und damit PHD2-Inhibitor Deferoxamine, MG132: Proteasominhibitor, Cyclo: Cycloheximid, Inhibitor der Proteintranslation. Ein repräsentativer Western Blot (n=5) wird gezeigt. (E) Nachweis der Aktivität von rekombinantem, humanem (rh) TIMP-1 durch Inhibition von ADAM-10. Positivkontrolle: kein TIMP-1, Negativkontrolle: kein ADAM-10. (F) Stabilität von TIMP-1 in Zellkulturmedium, nachgewiesen durch ELISA. (E, F) Eine repräsentative Messung (n=3) wird gezeigt. (G) Western Blot-Untersuchung des Einflusses von rhTIMP-1 auf HIF-1 $\alpha$ -Protein über die Zeit.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. (H) Einfluss von rhTIMP-1 und TIMP-1-Überexpression auf HIF1A mRNA-Expression. n=4. \*\*\*, P<0,001 (A-H) A549L: humane Lungenkrebszelllinie, Vektor: Vektorkontrolle, TIMP-1<sup>hoch</sup>: TIMP-1-Überexpression, Ktrl: Mediumkontrolle, rhTIMP-1: rekombinantes, humanes TIMP-1.



**Abbildung 11 - TIMP-1 Überexpression sowie Inkubation mit rekombinantem TIMP-1 führt zu einer Erhöhung von PI3K/AKT-Phosphorylierung.** (A) Western Blot-basierte Untersuchung des Einflusses von TIMP-1 auf verschiedene PI3K-Untereinheiten. Ein repräsentativer Western Blot (n=3) wird gezeigt. (B) Western Blot-basierte Untersuchung des Einflusses von TIMP-1 auf AKT und aktivem, phosphoryliertem AKT. Ein repräsentativer Western Blot (n=4) wird gezeigt. (C) Western Blot-basierte Untersuchung des Einflusses von TIMP-1 auf AKT und aktivem, phosphoryliertem AKT. Ein repräsentativer Western Blot (n=3) wird gezeigt. (D) Einflusses von rhTIMP-1 auf HIF-1 $\alpha$ -Proteinmengen über die Zeit, untersucht durch Western Blot. Ein repräsentativer Western Blot (n=3) wird gezeigt. (A-D)  $\alpha$ -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. MK: MK-2206 (E) Immunhistochemische Färbung von P110-PI3K Protein im Tumorgewebe (grünes Signal). Eine repräsentative IHC (n=5) wird gezeigt. (F) Immunhistochemische Färbung von phosphoryliertem AKT-Protein im Tumorgewebe (grünes Signal). Eine repräsentative IHC (n=3) wird gezeigt. (E, F) 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) wurde zur Gegenfärbung benutzt. Balken: 100  $\mu$ m. (G) Untersuchung der humanen HIF1A mRNA-Expression im Tumorgewebe durch qRT-PCR. \*\*, P<0,01. n=5. (A-G) A549L: humane Lungenkrebszelllinie, Vektor: Vektorkontrolle, TIMP-1<sup>hoch</sup>: TIMP-1-Überexpression, Ktrl: Mediumkontrolle, rhTIMP-1: rekombinantes, humanes TIMP-1.

### 3.2 Die Induktion stress-assoziiertes HIF-1-Signaltransduktion und die Regulation von miR-210 durch TIMP-1

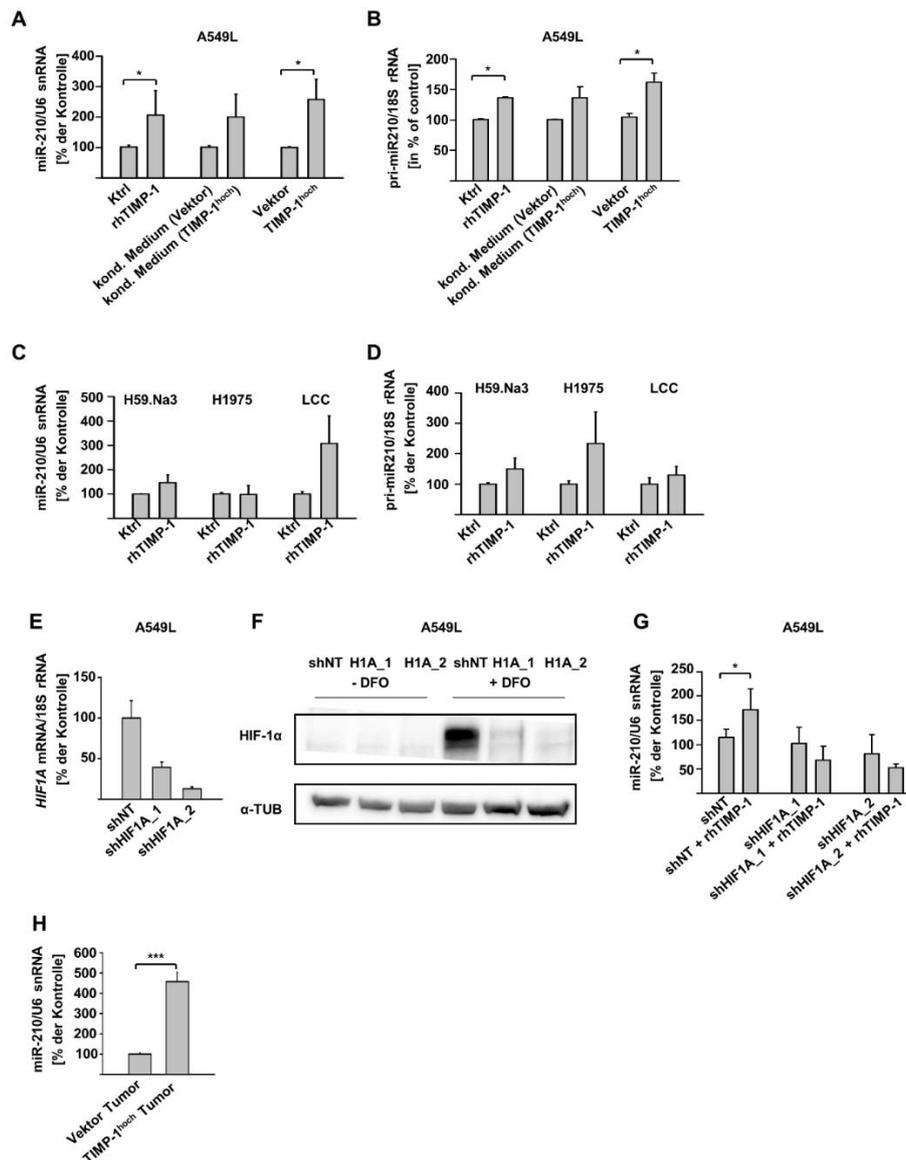
Um die biologische Bedeutung der TIMP-1-induzierten Hochregulation von HIF-1 einzuschätzen, wurden verschiedene HIF-1-Zielgene betrachtet. Die Bindung von HIF-1 an *hypoxia-response elements* (HRE) wurde in einem Luciferase-abhängigen Promoteraktivitätsassay getestet, um eine Erhöhung der transkriptionalen Aktivität von HIF-1 zu untersuchen. Luciferaseaktivität stieg nach TIMP-1-Überexpression an (Abbildung 12A). Auch die Expression der HIF-1-Zielgene *CA9*, *COX2* und *VEGFA* stieg nach Inkubation mit TIMP-1 oder durch endogene Überexpression von TIMP-1 an (Abbildung 12B-D).



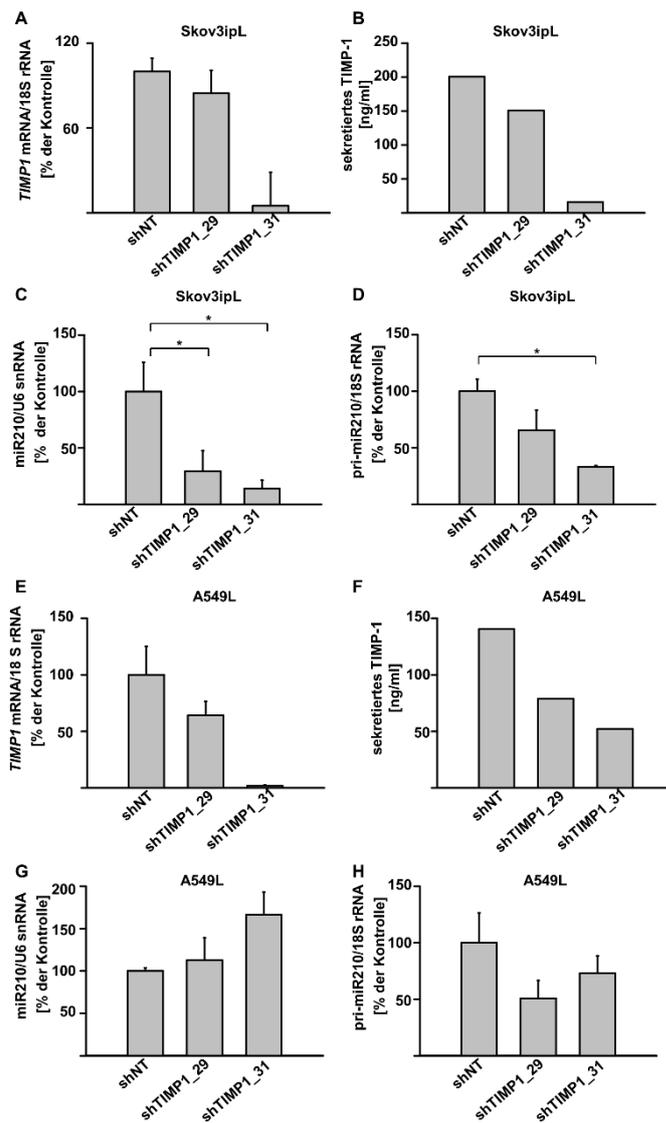
**Abbildung 12 - TIMP-1 Überexpression sowie Inkubation mit rekombinatem TIMP-1 führt zu einer erhöhten Expression von HIF-1 Zielgenen.** (A) Untersuchung des Einflusses von TIMP-1 auf HRE-Promoteraktivität. HRE: *hypoxia-response elements*. DFO: Eisenchelator und damit PHD2-Inhibitor Deferoxamine. n=3. (B) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von TIMP-1 sowie rhTIMP-1 auf das HIF-1-Zielgen *CA9* (kodiert für Carboxyanhydrase 9). n=5. (C) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von TIMP-1 sowie rhTIMP-1 auf das HIF-1-Zielgen *COX2* (kodiert für Cyclooxygenase-2). n=3. (D) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von TIMP-1 sowie rhTIMP-1 auf das HIF-1-Zielgens *VEGFA* (kodiert für *Vascular Endothelial Growth Factor A*). n=3. (A-D) A549L: humane Lungenkrebszelllinie, Vektor: Vektorkontrolle, TIMP-1<sup>hoch</sup>: TIMP-1-Überexpression, Ktrl: Mediumkontrolle, rhTIMP-1: rekombinantes, humanes TIMP-1. \*, P<0,05.

Da viele zelluläre Stressantworten durch die microRNA miR-210 erfolgen (Cui *et al.*, 2012), wurde Auswirkungen von TIMP-1 auf miR-210 untersucht. Sowohl miR-210 als auch ihr Vorläufer pri-miR-210 stiegen nach Inkubation mit TIMP-1, nach Inkubation mit konditioniertem Medium von einer TIMP-1-Überexpressionszelllinie und nach TIMP-1-Überexpression an (Abbildung 13A, B). Eine Erhöhung von miR-210 nach TIMP-1-Inkubation war auch in drei weiteren Lungenkrebszelllinien murinen und humanen Ursprungs zu finden (Abbildung 13C, D). Eine direkte Abhängigkeit des TIMP-1-induzierten miR-210-Anstieges von HIF-1 $\alpha$  konnte durch den *knock down* von HIF1A gezeigt werden: Eine stabile Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -Expression (Abbildung 13E, F) verhinderte den TIMP-1-induzierten Anstieg von miR-210 (Abbildung 13G). Im Tierversuch führte die erhöhte Expression von TIMP-1 in der Tumorzelle zu verstärkter miR-210-Expression (Abbildung 13H).

Ein weiterer Hinweis darauf, dass TIMP-1 zu einer Erhöhung von miR-210 führt, lieferte die Reduktion der TIMP-1-Expression mithilfe von shRNAi in zwei verschiedenen Tumorzelllinien. Der stabile *knock down* von TIMP-1 durch die Integration der shRNA ins Genom mithilfe von lentiviralen Vektoren und auch der latente *knock down* durch die Transfektion von siRNA führten zu einer Reduktion von pri-miR-210 (Abbildung 14 und Abbildung 15). Die Auswirkung auf reife miR-210 zeigte Schwankungen zwischen den einzelnen verwendeten shRNAs und siRNAs und war daher nicht aussagekräftig (Abbildung 14 und Abbildung 15).



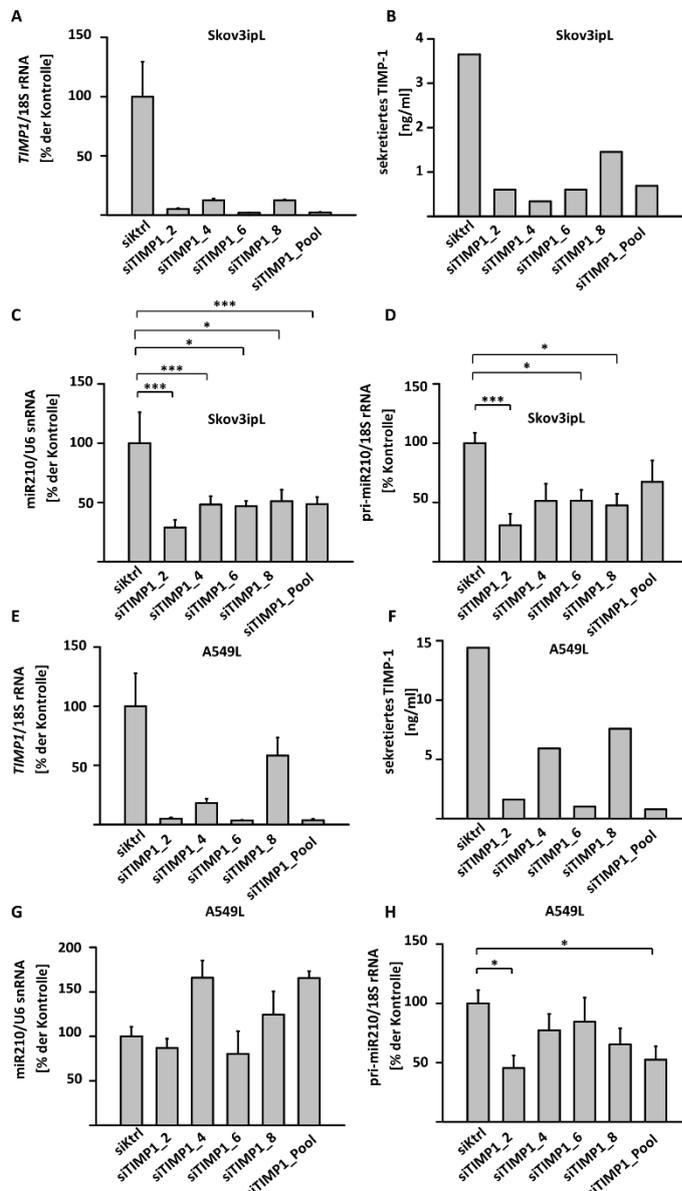
**Abbildung 13 - Erhöhte TIMP-1-Spiegel in der Zellumgebung führen zu einem HIF-1-abhängigen Anstieg der microRNA miR-210 und deren Vorläufer pri-miR-210.** (A) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von TIMP-1-Überexpression, von der Inkubation mit konditioniertem Medium mit hohem TIMP-1-Gehalt sowie von rhTIMP-1 auf die microRNA miR-210 in der humanen Lungenkrebszelllinie A549L. n=7. (B) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses der TIMP-1-Expression, des konditionierten Mediums mit hohem TIMP-1-Gehalt, sowie von rhTIMP-1 auf den microRNA-Vorläufer pri-miR-210 in der humanen Lungenkrebszelllinie A549L. n=7. (C) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von rhTIMP-1 auf die microRNA miR-210 in verschiedenen Lungenkrebszelllinien. n=3. (D) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von rhTIMP-1 auf den microRNA-Vorläufer pri-miR-210 in verschiedenen Lungenkrebszelllinien. n=3. (C, D) H59.Na3: murine großzellige Lungenkrebszelllinie, H1975: humane Adenokarzinomzelllinie, LCC: murine großzellige Lungenkrebszelllinie. (E) qRT-PCR-basierter Nachweis der Reduktion der HIF-1A mRNA-Expression durch *knock down*. Eine repräsentative Messung (n=3) wird gezeigt. (F) Nachweis der Reduktion der Protein-Mengen von HIF-1A durch RNAi-vermittelten *knock down* durch Western Blot.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Ein repräsentativer Western Blot (n=4) wird gezeigt. (G) Einfluss des *knock down* von HIF-1A auf den TIMP-1-vermittelten Anstieg von miR-210. miR-210 wurde durch qRT-PCR bestimmt. n=4. (H) Untersuchung der miR-210-Expression im Tumorgewebe durch qRT-PCR. n=5. (A-H) Vektor: Vektorkontrolle, TIMP-1<sup>hoch</sup>: TIMP-1-Überexpression, Ktrl: Mediumkontrolle, rhTIMP-1: rekombinantes, humanes TIMP-1. \*, P<0,05; \*\*\*, P<0,001.



#### Abbildung 14 - Stabile Reduktion der TIMP-1-Expression beeinflusst miR-210.

(A) qRT-PCR-basierter Nachweis der Reduktion der mRNA-Expression von TIMP-1 durch stabilen *knock down*. Eine repräsentative Messung (n=2) wird gezeigt. (B) Nachweis der Reduktion von TIMP-1-Protein durch stabilen *knock down* mittels ELISA. Eine repräsentative Messung (n=2) wird gezeigt. (C) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses der TIMP-1-Expression auf die microRNA miR-210. n=3. (D) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses der TIMP-1-Expression auf den microRNA-Vorläufer pri-miR-210. n=3. (E) qRT-PCR-basierter Nachweis der Reduktion der mRNA-Expression von TIMP-1 durch stabilen *knock down*. Eine repräsentative Messung (n=2) wird gezeigt. (F) Nachweis der Reduktion von TIMP-1-Protein durch stabilen *knock down* mittels ELISA. Eine repräsentative Messung (n=2) wird gezeigt. (G) Untersuchung des Einflusses der TIMP-1-Expression auf die microRNA miR-210 durch qRT-PCR. n=4. (H) Untersuchung des Einflusses

der TIMP-1-Expression auf den microRNA-Vorläufer pri-miR-210 durch qRT-PCR. n=4. (A-D) Skov3ipL: humanes Ovarialkarzinom. (E-H) A549L: humanes Lungenadenokarzinom. (A-H) shNT: shRNA Kontrolle ohne Zielgen, shTIMP-1\_29 und shTIMP-1\_31: shRNA gerichtet gegen TIMP-1. \*, P<0,05.

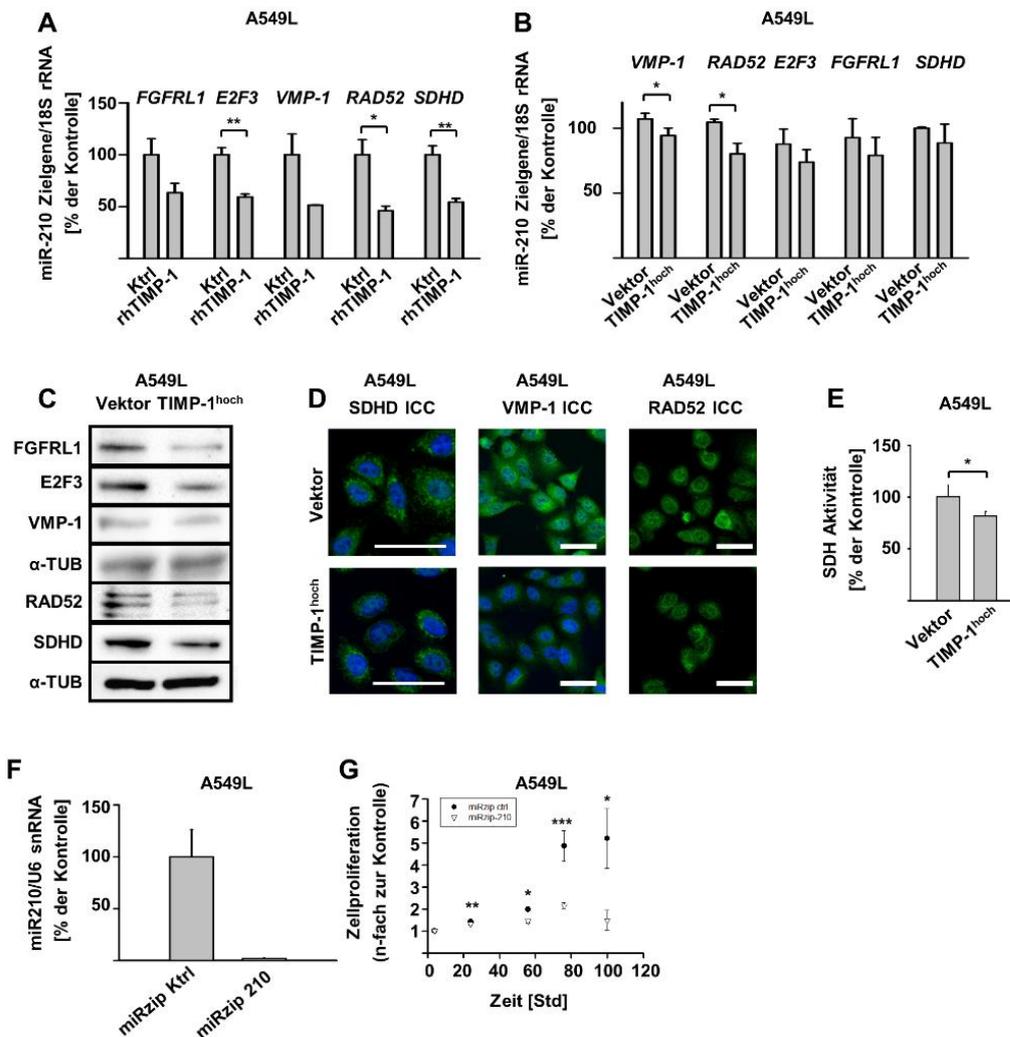


**Abbildung 15 - Latente Reduktion der TIMP-1-Expression beeinflusst miR-210.** (A) qRT-PCR-basierter Nachweis der Reduktion der mRNA-Expression von TIMP-1 durch latente *knock down*. Eine repräsentative Messung (n=2) wird gezeigt. (B) Nachweis der Reduktion von TIMP-1-Protein durch latente *knock down* mittels ELISA. Eine repräsentative Messung (n=2) wird gezeigt. (C) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses der TIMP-1-Expression auf die microRNA miR-210. n=4. (D) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses der TIMP-1-Expression auf den microRNA-Vorläufer pri-miR-210. n=4. (E) Nachweis der Reduktion der mRNA-Expression von TIMP-1 durch latente *knock down* mittels qRT-PCR. Eine repräsentative Messung (n=2) wird gezeigt. (F) Nachweis der Reduktion von TIMP-1-Protein durch latente *knock down* mittels ELISA. Eine repräsentative Messung (n=2) wird gezeigt. (G) Untersuchung des Einflusses der TIMP-1-Expression auf die microRNA

miR-210 durch qRT-PCR. n=4. (H) Untersuchung des Einflusses der TIMP-1-Expressions auf den microRNA-Vorläufer pri-miR-210 durch qRT-PCR. n=4. (A-D) Skov3ipL: humanes Ovarialkarzinom. (E-H) A549: humanes Lungenadenokarzinom. (A-H) siKtrl: siRNA Kontrolle ohne Zielgen, siTIMP-1\_1-8: siRNAs gerichtet gegen TIMP-1, siTIMP-1 Pool: Equimolares Gemisch aus den siRNAs 1-8. \*,  $P < 0,05$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ .

### 3.3 TIMP-1 führt zu einer Reduktion von miR-210-regulierten Proteinen

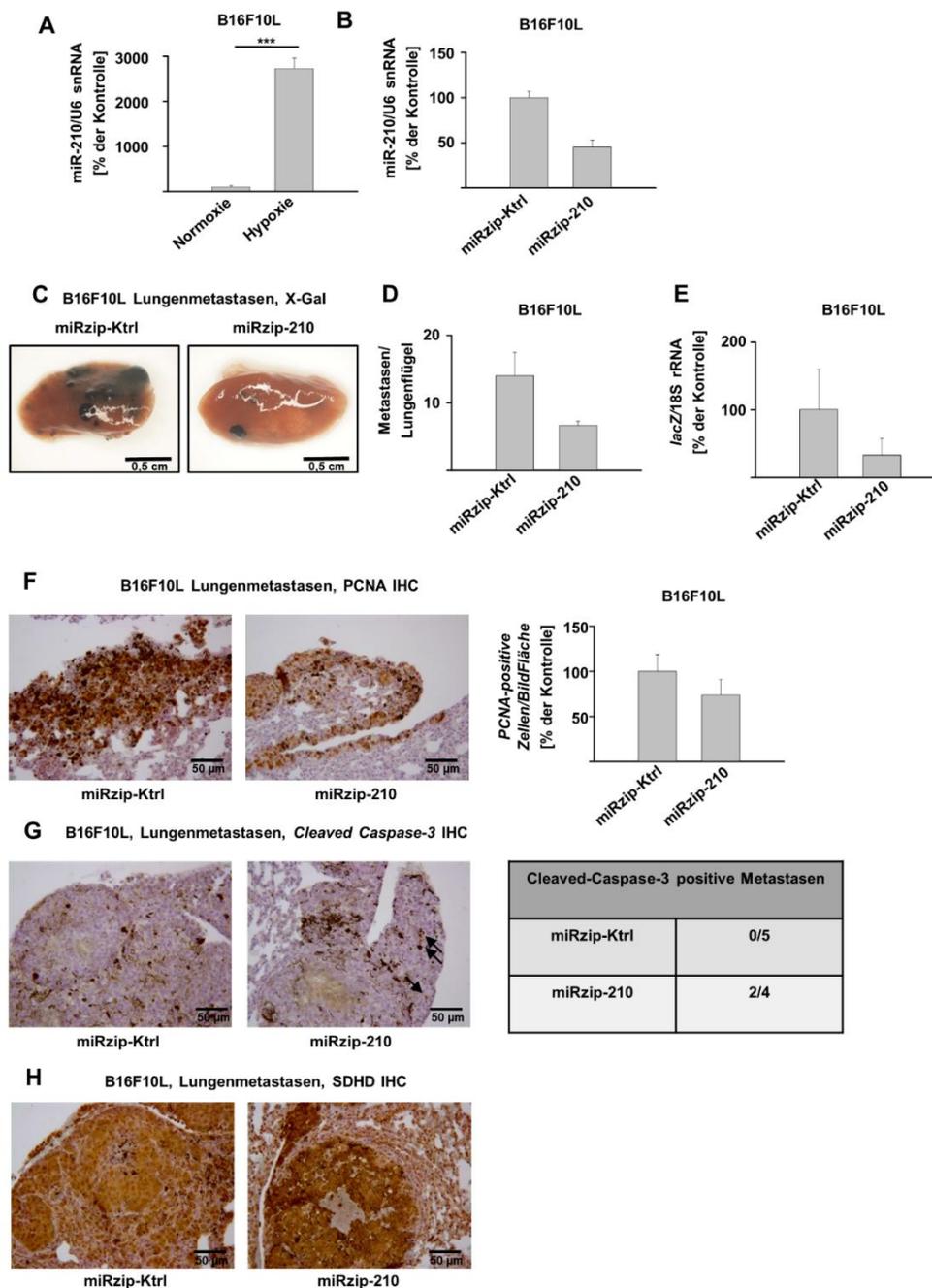
Um die biologische Bedeutung erhöhter miR-210-Mengen auf die Stressantwort in Tumorzellen abzuschätzen, wurde die Expression von miR-210-Ziel-mRNAs und -Proteinen untersucht. Fünf verschiedene miR-210-Ziel-mRNAs und -Proteine (Succinat Dehydrogenase Untereinheit D (SDHD, ein Teil von Komplex II der Atmungskette) (Puisségur *et al.*, 2011), DNA-Reparaturprotein RAD52 (Fasanaro *et al.*, 2009), Transkriptionsfaktor E2F3 (Fasanaro *et al.*, 2009; Giannakakis *et al.*, 2008), tumorassoziiertes VMP-1 (Ying *et al.*, 2011) und der Rezeptor FGFR1 (Tsuchiya *et al.*, 2011)) wurden untersucht und für alle fünf wurden Reduktionen der mRNA- und Proteinebenen durch Untersuchungen mittels qRT-PCR, Western Blot und Immunocytochemie gefunden (Abbildung 16A-D). Zudem war die Aktivität von Komplex II der Atmungskette, der das miR-210-Zielprotein SDHD beinhaltet, ebenfalls reduziert (Abbildung 16E). In der humanen Lungenkrebszelllinie A549L führte die stabile Reduktion von miR-210 mittels miRZip-vermitteltem Abbau von miR-210 (Abbildung 16F) zu einem kompletten Wachstumsarrest (Abbildung 16G).



**Abbildung 16 - Timp-1-Überexpression sowie Inkubation mit rekombinantem Timp-1 führt zu einer Reduktion von miR-210-Ziel-mRNAs und -Proteinen.** (A) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von rhTimp-1 auf verschiedene miR-210-Ziel-mRNAs. Inkubation erfolgte über 24 Stunden. n=3. (B) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von Timp-1 auf verschiedene miR-210-Ziel-mRNAs. n=3. (C) Untersuchung des Einflusses von Timp-1 auf verschiedene miR-210-Zielproteine durch Western Blot. α-Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Ein repräsentativer Western Blot (n=3 oder 4) wird gezeigt. (D) Untersuchung des Einflusses von Timp-1 auf verschiedene miR-210-Zielproteine durch Immunocytochemie. DAPI wurde zur Gegenfärbung benutzt. Balken: 50 µm. Eine repräsentative ICC (n=3) wird gezeigt. (E) Aktivität von Komplex II der Atmungskette und damit Nachweis über die Funktionalität des miR-210-Zielproteins SDHD in Abhängigkeit der Timp-1-Expression. n=5. (F) Nachweis der Reduktion von miR-210 durch miRZip durch qRT-PCR. Eine repräsentative Messung (n=2) wird gezeigt. (G) Wachstumskurve in Abhängigkeit von miR-210. Die Messung erfolgte in vierfachen Replikaten. Statistik bezieht sich auf technische Replikate. n=3. (A-G) A549L: humane Lungenkrebszelllinie, Vektor: Vektorkontrolle, Timp-1<sup>hoch</sup>: Timp-1-Überexpression, Ktrl: Mediumkontrolle, rhTimp-1: rekombinantes, humanes Timp-1, miRZip Ktrl: miRZip ohne Zielgen, miRZip 210: gegen miR-210 gerichtete microRNA-Inhibition. \*, P<0,05; \*\*, P<0,01.

### 3.4 miR-210-Reduktion verringert die Metastasierung von Melanomzellen in die Lunge

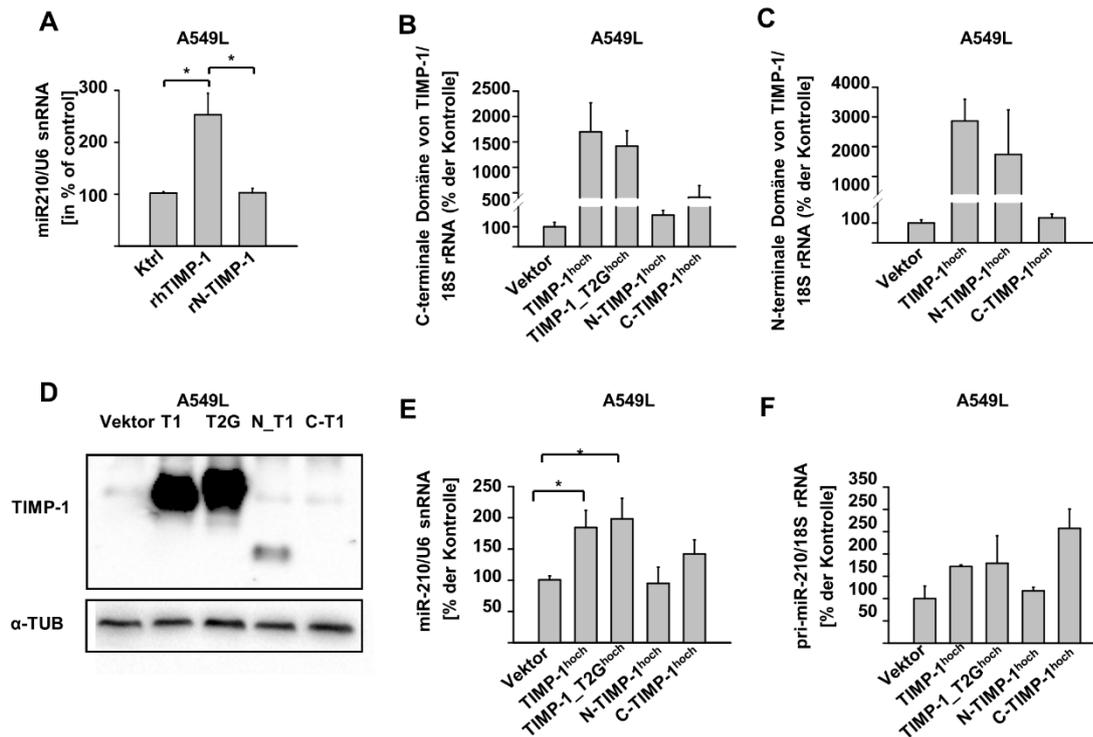
Die Rolle von miR-210 im Verlauf von Tumorerkrankungen konnte mithilfe der murinen B16F10L Melanomzelllinie (*syngen* zu C57Bl/6) gezeigt werden. Reduktion von miR-210 in dieser Zelllinie (Abbildung 17A, B) führte zu einer reduzierten Metastasierung (Abbildung 17C-E), vermutlich ausgelöst durch verringerte Proliferation und erhöhte Anfälligkeit gegenüber Apoptose (Abbildung 17F-G). Das miR-210-Zielprotein SDHD war qualitativ in miR-210-reduzierten Metastasen erhöht (Abbildung 17H).



**Abbildung 17 – Einfluss von miR-210 auf die Metastasierung von Melanomzellen.** (A) miR-210 unter Hypoxie, Nachweis durch qRT-PCR. \*\*\*,  $P < 0,001$ .  $n = 3$ . (B) Reduktion der microRNA miR-210 durch miRZip, Nachweis durch qRT-PCR. Eine repräsentative Messung ( $n = 4$ ) wird gezeigt. (C) Repräsentative Abbildung jeweils eines X-Gal-gefärbten linken Lungenflügels mit Metastasen in Abhängigkeit von miR-210 ( $n = 4$ ). (D) Makroskopische Lungenmetastasen pro linkem Lungenflügel in Abhängigkeit von miR-210. (E) Quantifizierung der Tumorlast durch qRT-PCR-basierten Nachweis von *lacZ* in Abhängigkeit von miR-210. (F) Immunohistochemische Färbung des Proliferationsmarkers PCNA in Abhängigkeit von miR-210 in der Tumorzelle (braune Färbung) und Quantifizierung. (G) Immunohistochemische Färbung des Apoptosemarkers *Cleaved Caspase 3* in Abhängigkeit von miR-210 in der Tumorzelle (braune Färbung). Pfeile indizieren positiv-gefärbte Zellen. (H) Immunohistochemische Färbung des miR-210-Zielproteins SDHD in Abhängigkeit von miR-210 in der Tumorzelle (braune Färbung). (F-H) Hämatoxylin wurde zur Gegenfärbung verwendet. (A-H) B16F10L: murine Melanomzelllinie, miRZip Ktrl: ungerichtete miRZip-Sequenz, miRZip 210: stabile Reduktion von miR-210. miRZip-Ktrl-Tiere:  $n = 5$ , miRZip-210-Tiere:  $n = 4$ .

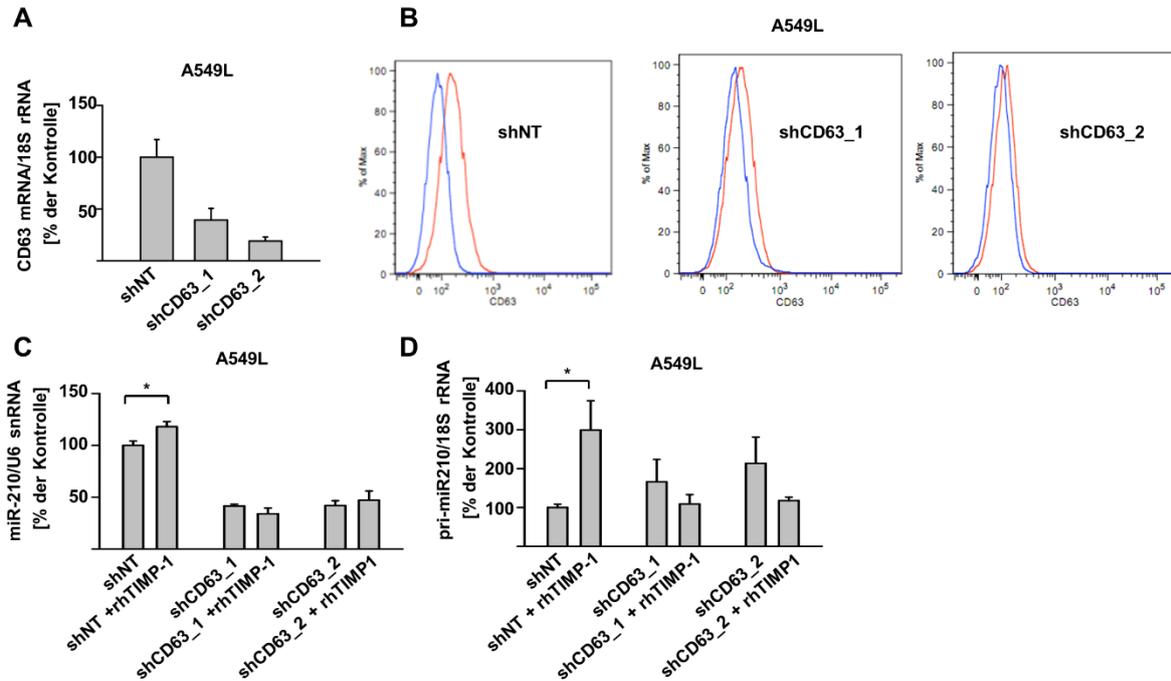
### 3.5 Die Interaktion der C-terminalen Domäne von TIMP-1 mit CD63 ist notwendig für die TIMP-1-induzierte Erhöhung von miR-210

Um die molekularen Mechanismen hinter dem Anstieg von miR-210 durch TIMP-1 zu untersuchen, nutzten wir die Modularität des TIMP-1-Proteins. TIMP-1 kann in eine N- und eine C-terminale Domäne geteilt werden, die individuell exprimiert weiterhin die jeweiligen Fähigkeiten von TIMP-1 (Proteaseinhibition durch die N-terminale Domäne, direkte Signaltransduktion durch die C-terminale Domäne) vermitteln (Brew und Nagase, 2010; D'Angelo *et al.*, 2014; Ries, 2014). Rekombinantes N-TIMP-1 sollte miR-210 erhöhen, falls die Inhibition von Proteasen ausreichend ist. Dies war nicht der Fall (Abbildung 18A). Daher wurden die einzelnen TIMP-1-Domänen in A549L Zellen exprimiert, um den Einfluss von C-terminalem TIMP-1 auf miR-210 zu untersuchen. Sowohl die Expression von C-TIMP-1 als auch einer nicht-inhibitorischen Mutante von TIMP-1 (Nagase und Brew, 2003) (TIMP-1\_T2G) (Abbildung 18B-D) führten zu einem Anstieg von miR-210, während N-TIMP-1 keinen Effekt hatte (Abbildung 18E, F).



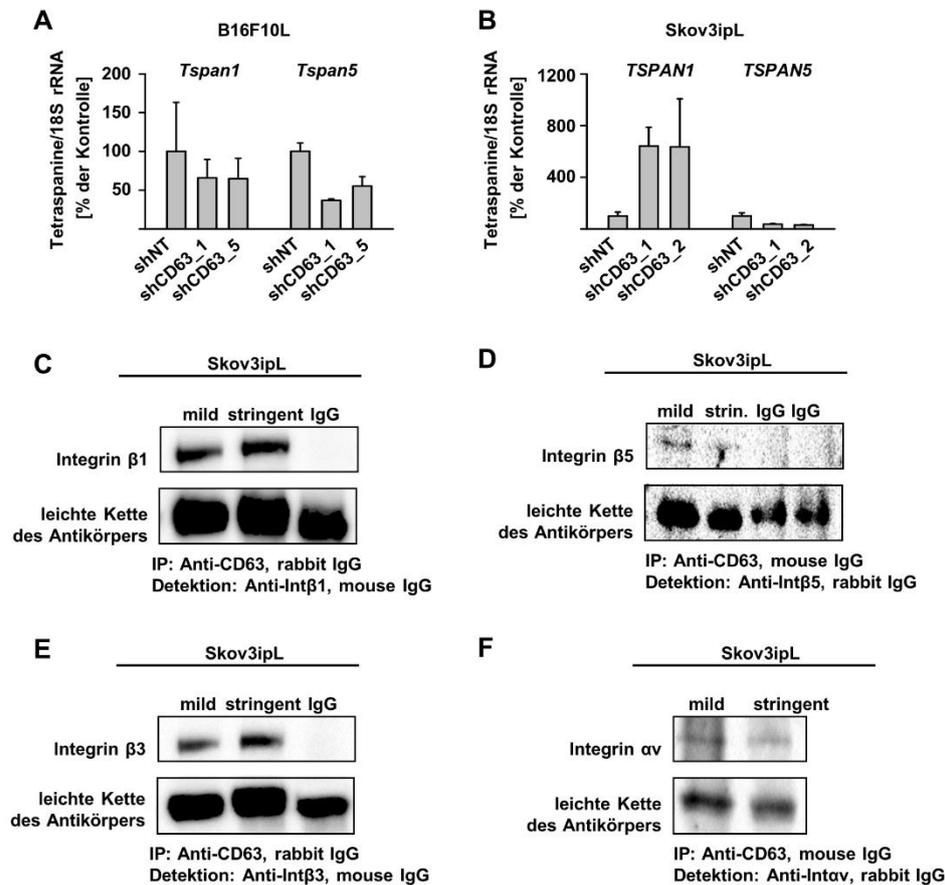
**Abbildung 18 - Die C-terminale Domäne von TIMP-1 ist notwendig für die Induktion des Anstiegs von miR-210.** (A) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von rhTIMP-1 und N-TIMP-1 auf die microRNA miR-210. n=4. (B) Verifikation der Überexpression der C-terminalen Domäne von verschiedenen TIMP-1-Domänen und Varianten auf mRNA-Ebene durch qRT-PCR. Eine repräsentative Messung (n=2) wird gezeigt. (C) Verifikation der Überexpression der N-terminalen Domäne von verschiedenen TIMP-1-Domänen und Varianten auf mRNA-Ebene durch qRT-PCR. Eine repräsentative Messung (n=2) wird gezeigt. (D) Verifikation der Überexpression der verschiedenen TIMP-1-Domänen und Varianten auf Proteinebene durch Western Blot.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Ein repräsentativer Western Blot (n=2) wird gezeigt. (E) Untersuchung des Einflusses von verschiedenen TIMP-1-Varianten und -Domänen auf die microRNA miR-210 durch qRT-PCR. n=5. (F) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von verschiedenen TIMP-1-Varianten und Domänen auf den microRNA-Vorläufer pri-miR-210. n=3. (A-F) A549L: humane Lungenkrebszelllinie, Ktrl: Mediumkontrolle, rhTIMP-1: rekombinantes, humanes TIMP-1, rN-TIMP-1: rekombinante, N-terminale Domäne von TIMP-1, Vektor: Vektorkontrolle, TIMP-1<sup>hoch</sup>: TIMP-1-Überexpression, TIMP-1\_T2G<sup>hoch</sup>: Expression einer TIMP-1-Variante mit Mutation in Threonin-2 und damit veränderter, protease-inhibitorischer Funktion, N-TIMP-1<sup>hoch</sup>: Expression der N-terminalen, protease-inhibitorischen Domäne von TIMP-1, C-TIMP-1<sup>hoch</sup>: Expression der C-terminalen, CD63-bindenden Domäne von TIMP-1. \*, P<0,05.

Da die Interaktion der C-terminalen Domäne mit CD63 beschrieben ist, wurde CD63 durch stabiles Einbringen von shRNA reduziert (Abbildung 19A, B). CD63 *knock down*-Zellen wiesen reduzierte miR-210-Mengen auf und reagierten nicht mehr auf TIMP-1 mit einem miR-210 Anstieg (Abbildung 19C, D).



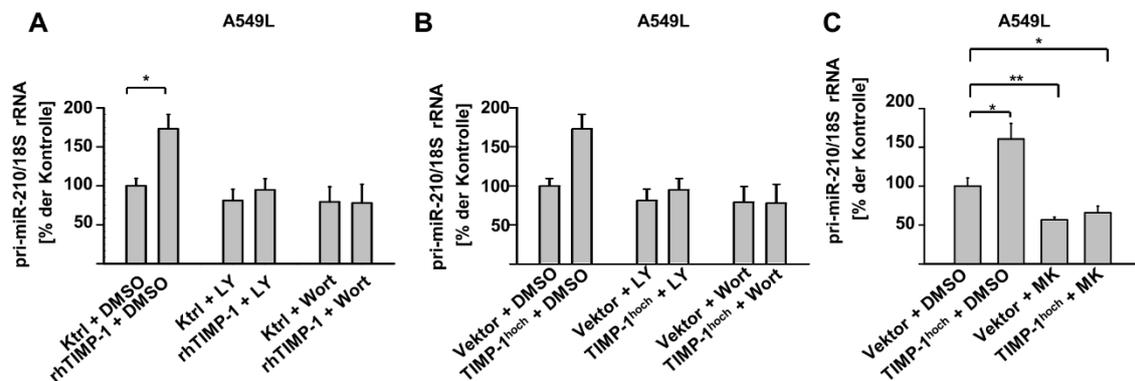
**Abbildung 19 - CD63 ist notwendig für den TIMP-1-induzierten Anstieg von miR-210.** (A) qRT-PCR-basierte Verifikation der Reduktion von CD63 auf mRNA-Ebene durch RNAi-vermittelten *knock down*. Eine repräsentative Messung (n=3) wird gezeigt. (B) Verifikation der Reduktion von CD63 auf Proteinebene durch RNAi-vermittelten *knock down* durch Durchflusszytometrie. Blau: Isotyp-Kontrolle, rot: Anti-CD63-Antikörper. Eine repräsentative Messung (n=3) wird gezeigt. (C) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von CD63 auf die durch rhTIMP-1-induzierte Erhöhung der microRNA miR-210. n=4. (D) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses CD63 auf die durch rhTIMP-1-induzierte Erhöhung des microRNA-Vorläufers pri-miR-210. n=4. (A-D) A549L: humane Lungenkrebszelllinie, Ktrl: Mediumkontrolle, rhTIMP-1: rekombinantes, humanes TIMP-1, shNT: shRNA Kontrolle ohne Zielgen, shCD63\_49 und shCD63\_51: shRNA gerichtet gegen CD63. \*, P<0,05.

In zwei anderen Zelllinien (humanes Ovarialkarzinom SKOV3ipL und murines Melanom B16F10L) konnte gezeigt werden, dass der *knock down* von CD63 zu einer veränderten Expression von Tetraspaninen und Proteasen führt (Abbildung 20).



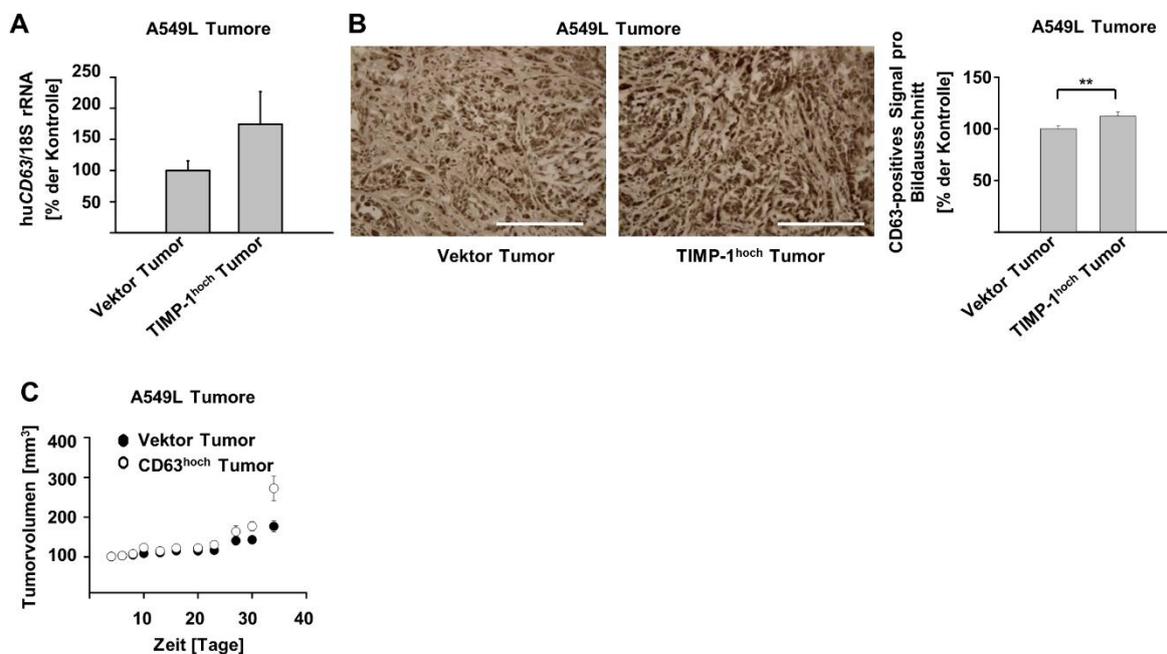
**Abbildung 20 - CD63 beeinflusst die Expression von anderen Tetraspaninen und interagiert mit Integrinen.** (A) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von CD63 *knock down* auf die Expression der Tetraspanine *Tspan1* und *Tspan5* in murinen Melanomazellen (B16F10L). n=3. (B) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von CD63 *knock down* auf die Expression der Tetraspanine *TSPAN1* und *TSPAN5* in humanen Ovarialkarzinomzellen (Skov3ipL). n=3. (C) Immunopräzipitation von CD63 zum Nachweis der Interaktion mit Integrin  $\beta 1$ . (D) Immunopräzipitation von CD63 zum Nachweis der Interaktion mit Integrin  $\beta 5$ . (E) Immunopräzipitation von CD63 zum Nachweis der Interaktion mit Integrin  $\beta 3$ . (F) Immunopräzipitation von CD63 zum Nachweis der Interaktion mit Integrin  $\alpha v$ . (C-F) Detektion durch Western Blot. Die leichte Kette des Antikörpers wurde als Ladekontrolle verwendet. Eine repräsentative IP (n=3) wird gezeigt. (A-F) shNT: shRNA Kontrolle ohne Zielgen, shCD63\_1, shCD63\_5, shCD63\_49 und shCD63\_51: shRNA gerichtet gegen CD63.

Da die Interaktion von TIMP-1 und CD63 als Regulator des PI3K/AKT-Signalweges beschrieben ist (Ries, 2014) und bereits eine Erhöhung von PI3K- und phosphoryliertem AKT gefunden worden war (Abbildung 11), wurde dieser Signalweg blockiert. Bei TIMP-1-Überexpression oder Inkubation führten alle drei verwendeten Inhibitoren zu einer Reduktion von pri-miR-210 (Abbildung 21). Durch die zum Teil sehr kurzen Halbwertszeiten der Inhibitoren von nur wenigen Minuten (Holleran *et al.*, 2003) wurde hier nur pri-miR-210-Expression betrachtet, da nicht mit einem derart schnellen *turn over* der reifen microRNA gerechnet wird (Baccarini *et al.*, 2011).



**Abbildung 21 - Der TIMP-1-induzierte Anstieg des microRNA-Vorläufers pri-miR-210 lässt sich mit Inhibitoren des PI3K/AKT-Signalweges blockieren.** (A) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von PI3K auf die rhTIMP-1-induzierte pri-miR-210-Expression. n=3. (B) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von PI3K auf die durch TIMP-1-Überexpression induzierte pri-miR-210 Expression. n=3. (A, B) LY: PI3K-Inhibitor LY294002, Wort: PI3K-Inhibitor Wortmannin. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde. (C) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von AKT auf die durch TIMP-1-Überexpression induzierte pri-miR-210-Expression. MK: AKT-Inhibitor MK-2206. Die Inkubation erfolgte für 8 Stunden. n=4 (A-C) A549L: humane Lungenkrebszelllinie, Ktrl: Mediumkontrolle, rhTIMP-1: rekombinantes, humanes TIMP-1, Vektor: Vektorkontrolle, TIMP-1<sup>hoch</sup>: TIMP-1-Überexpression, DMSO: Dimethylsulfoxid als Lösungsmittelkontrolle. \*, P<0,05. \*\*, P<0,01.

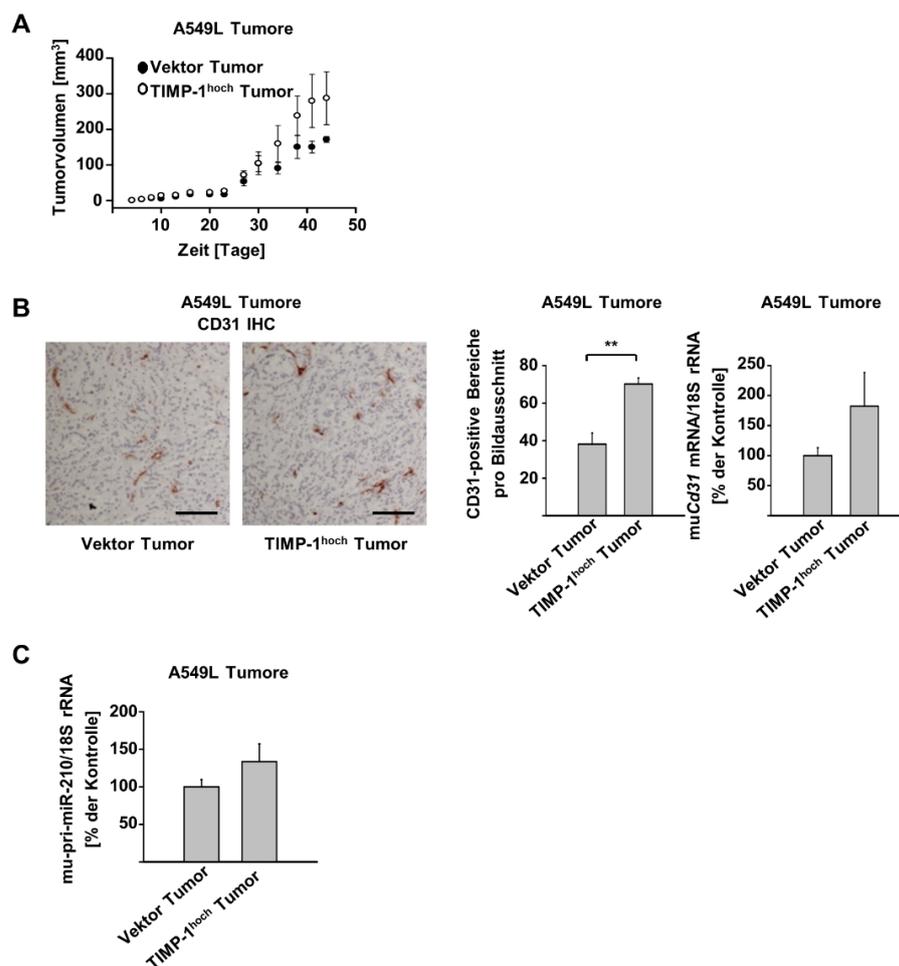
Im Tierversuch war eine Erhöhung von CD63 im TIMP-1-überexprimierenden Tumor zu finden (Abbildung 22A, B), was auf eine erhöhte Aktivierung der TIMP-1/CD63-Signaltransduktion in Stresssituationen hindeuten könnte. CD63-Überexpression in Tumorzellen führte zu verstärktem Tumorwachstum (Abbildung 22D).



**Abbildung 22 - TIMP-1-Überexpression im Tumor beeinflusst CD63-Expression und CD63-Überexpression fördert das Tumorwachstum.** (A) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von TIMP-1-Überexpression im Tumor auf die Expression von humanem CD63 auf mRNA-Ebene. n=5. (B) Untersuchung des Einflusses von TIMP-1-Überexpression im Tumor auf die Expression von humanem CD63 auf Proteinebene durch IHC und Quantifizierung der CD63-positiven Fläche pro Bild. Eine repräsentative IHC (n=3) wird gezeigt. n=3. \*\*, P<0,001. (C) Wachstum von Tumoren mit CD63-Überexpression. n=7. (A-C) A549L: humane Lungenkrebszelllinie, Vektor: Vektorkontrolle, TIMP-1<sup>hoch</sup>: TIMP-1-Überexpression, CD63<sup>hoch</sup>: CD63-Überexpression.

### 3.6 TIMP-1 beeinflusst Angiogenese durch Änderung des miR-210-Gehaltes der Exosomen

In den Tumoren mit TIMP-1-Überexpression war neben verstärktem Wachstum (Abbildung 23A) eine verstärkte Angiogenese auffällig (Abbildung 23B). Da TIMP-1 als anti-angiogener Faktor beschrieben ist (Cruz-Munoz und Khokha, 2008), wurden HIF-1-regulierte Faktoren untersucht, um die Ursache für die verstärkte Vaskularisierung zu finden. Da miR-210 pro-angiogen in Endothelzellen wirkt (Fasanaro *et al.*, 2008; Pulkkinen *et al.*, 2008), wurde die Expression von muriner pri-miR-210 in der Mikroumgebung der Tumorzellen untersucht und eine erhöhte Expression vorgefunden (Abbildung 23C).

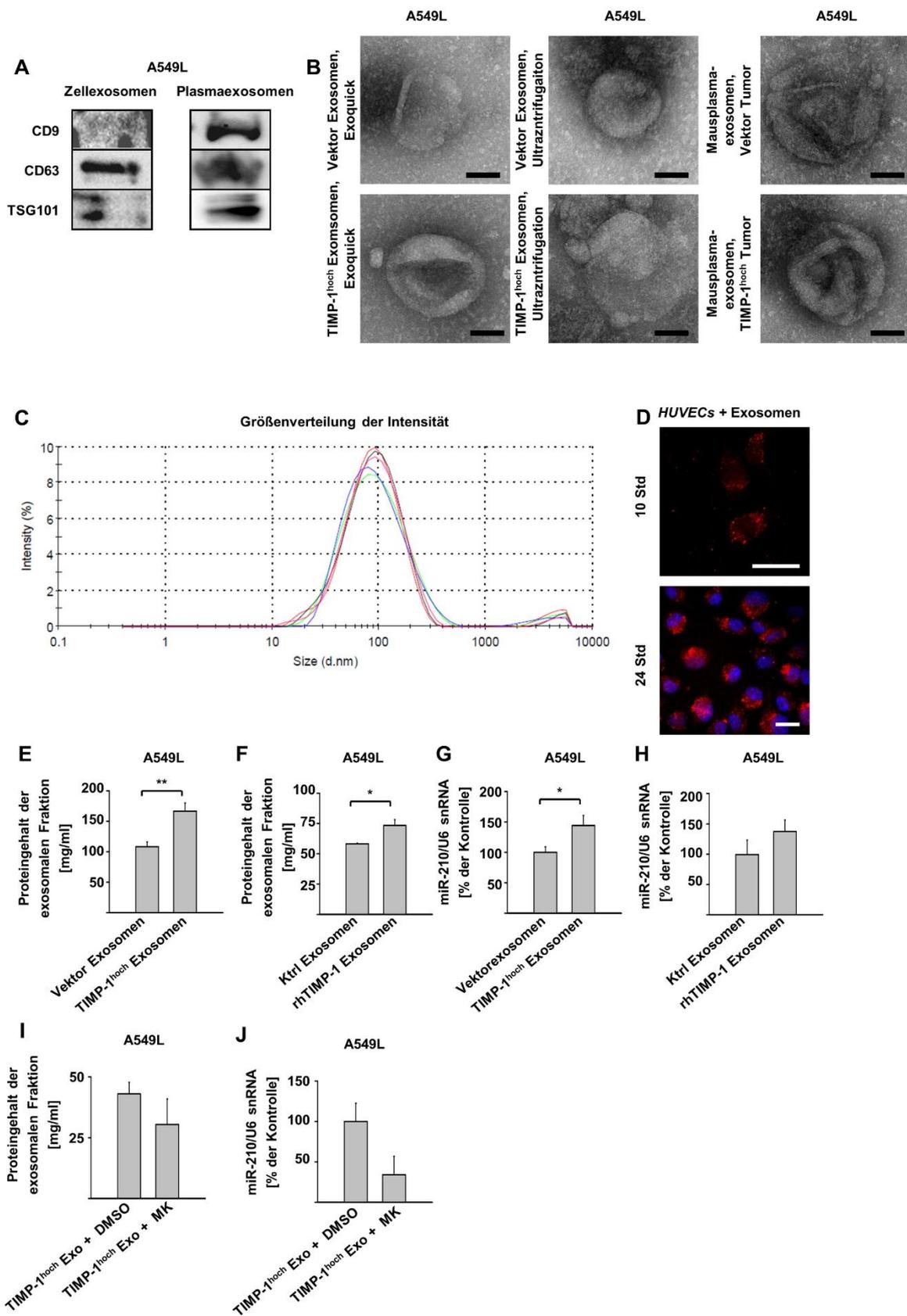


**Abbildung 23 - TIMP-1 Überexpression fördert Tumorwachstum und Angiogenese.** (A) Wachstum von Tumoren mit TIMP-1-Überexpression. n=7. (B) Untersuchung des Einflusses von TIMP-1 auf Angiogenese durch Anfärben des Endothelzellmarkers CD31 mittels IHC und Quantifizierung mittels qRT-PCR. n=5. (C) Expression der murinen microRNA-Vorläufers pri-miR-210 in Abhängigkeit von der TIMP-1 Expression der Tumorzellen in umliegenden stromalen Zellen. Nachweis durch qRT-PCR. n=5. \*\*, P<0,001.

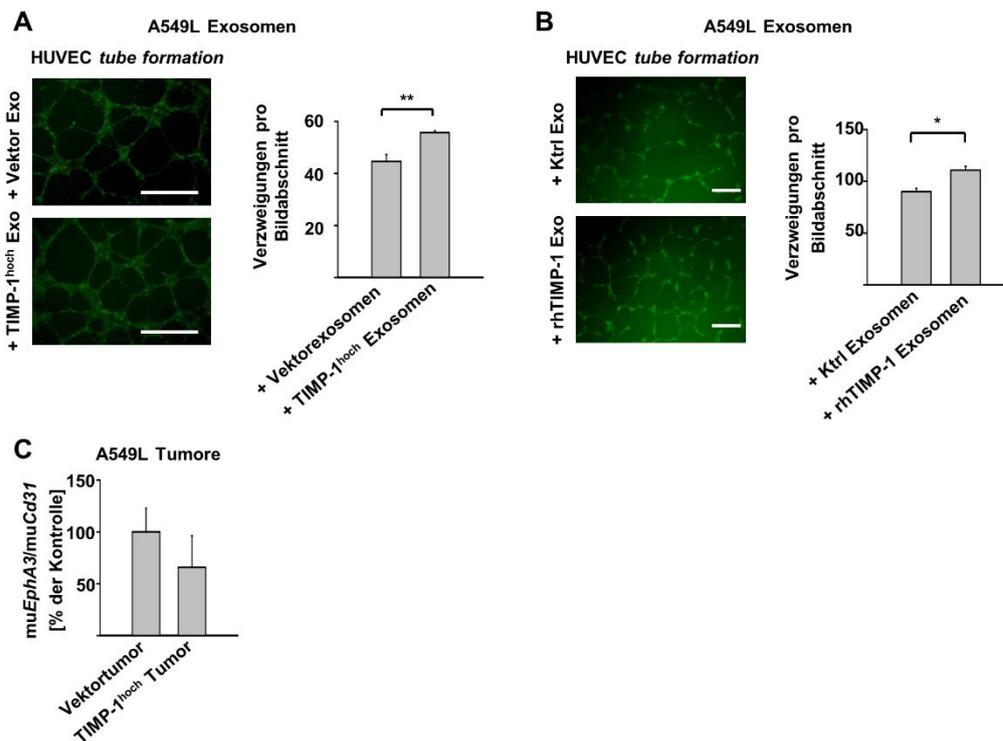
---

Um zu testen, ob TIMP-1 zu einer pro-angiogenen Akkumulation von miR-210 in Exosomen führt, wurden *in vitro* Exosomen von A549L Zellen mit und ohne TIMP-1-Überexpression (Abbildung 24A-D) oder nach Inkubation mit TIMP-1 isoliert. Neben einer Erhöhung des Gesamtproteingehalts (Abbildung 24E, F) und damit vermutlich der Exosomenproduktion wurden erhöhte Mengen an miR-210 relativ zu U6 snRNA gefunden (Abbildung 24G, H). Dieser Anstieg konnte durch die Gabe von AKT Inhibitoren blockiert werden (Abbildung 24I, J).

In einem *in vitro*-Angiogenesetest (*HUVEC tube formation assay*), in dem die Zahl der Endothelzellverzweigungen als Maß für das pro-angiogene Potential eines Stimulus dient, war eine erhöhte Dichte von Verzweigungen als Reaktion auf TIMP-1-Exosomen messbar (Abbildung 25A, B). Dafür könnte die Reduktion von EphrinA3 durch miR-210 für die gefundene erhöhte Angiogenese verantwortlich sein. *In vivo* lag EphrinA3 relativ zur Gesamtmenge an Endothelzellen reduziert vor, wenn TIMP-1 von der Tumorzelle überexprimiert wurde (Abbildung 25C).



**Abbildung 24 (vorherige Seite) - TIMP-1-Überexpression führt zu einer Anreicherung von miR-210 in Exosomen und einer gesteigerten Exosomenproduktion.** (A) Nachweis von exosomalen Proteinen durch Western Blot. Ein repräsentativer Western Blot (n=3) wird gezeigt. (B) Transmissionselektronenmikroskopieaufnahmen von Exosomen zum Nachweis der korrekten Größe. Eine repräsentative Aufnahme (n=4) wird gezeigt. Balken: 100  $\mu$ m. (C) Dynamische Lichtstreuung zur Untersuchung der Homogenität und Größe der Exosomen. Eine repräsentative Messung (n=5) wird gezeigt. (D) CD63-mCherry-markierte Exosomen werden durch *HUVEC* Endothelzellen erfolgreich aufgenommen. Nachweis durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie, Exosomen rot, Zellkern/DAPI blau dargestellt. Balken: 50  $\mu$ m. Ein repräsentatives Bild (n=2) wird gezeigt. (E) Proteingehalt der Exosomenfraktion in Abhängigkeit von TIMP-1. Nachweis durch BCA-Assay. n=5. (F) Proteingehalt der Exosomenfraktion in Abhängigkeit von rhTIMP-1. Nachweis durch BCA-Assay. n=3. (G) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von TIMP-1-Überexpression auf den Gehalt von microRNA miR-210 in Exosomen. n=6. (H) Untersuchung des Einflusses von rhTIMP-1 auf den Gehalt von microRNA miR-210 in Exosomen durch qRT-PCR. n=3. (I) Proteingehalt der Exosomenfraktion in Abhängigkeit von AKT-Inhibitor MK-2206. n=3. (J) qRT-PCR-basierte Untersuchung des Einflusses von AKT-Inhibitor MK-2206 auf den Gehalt von microRNA miR-210 in Exosomen. n=3. (A-H) A549L: humane Lungenkrebszelllinie, Ktrl: Mediumkontrolle, rhTIMP-1: rekombinantes, humanes TIMP-1, Vektor: Vektorkontrolle, TIMP-1<sup>hoch</sup>: TIMP-1-Überexpression. \*, P<0,05. \*\*, P<0,01.

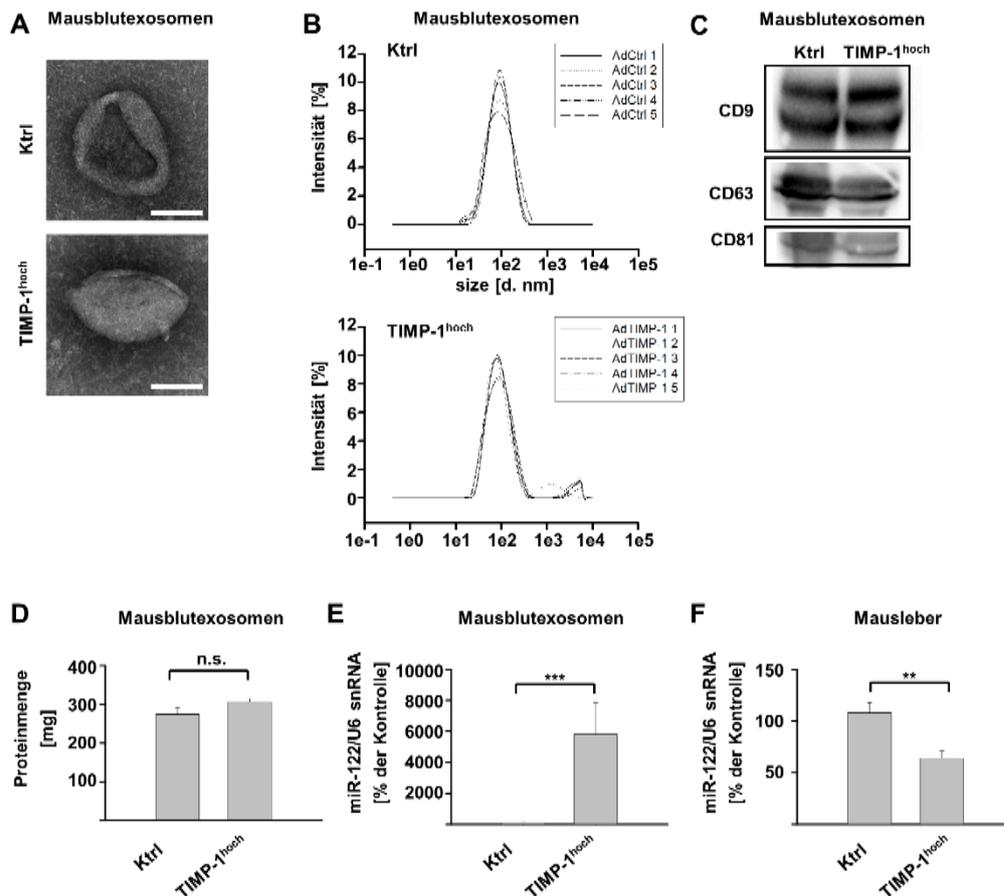


**Abbildung 25 - TIMP-1-Überexpression führt zu pro-angiogenen Exosomen und reduziert EphA3 in Tumorendothelzellen.** (A) *HUVEC tube formation assay* zur Untersuchung der angiogenen Eigenschaften von Tumorzell-exosomen in Abhängigkeit von TIMP-1-Überexpression *in vitro*. n=7. Balken: 1 mm. (B) *HUVEC tube formation assay* zur Untersuchung der angiogenen Eigenschaften von Tumorzell-exosomen in Abhängigkeit von rhTIMP-1 *in vitro*. n=3. Balken: 1 mm. (C) qRT-PCR-basierte Quantifizierung von Ephrin A3, einem anti-angiogenen Protein und miR-210-Ziel-mRNA in Endothelzellen im Tumor in Abhängigkeit von TIMP-1-Expression in den Tumorzellen. n=5. (A-C) A549L: humane Lungenkrebszelllinie, Ktrl: Mediumkontrolle, rhTIMP-1: rekombinantes, humanes TIMP-1, Vektor: Vektorkontrolle, TIMP-1<sup>hoch</sup>: TIMP-1-Überexpression. \*, P<0,05. \*\*, P<0,01.

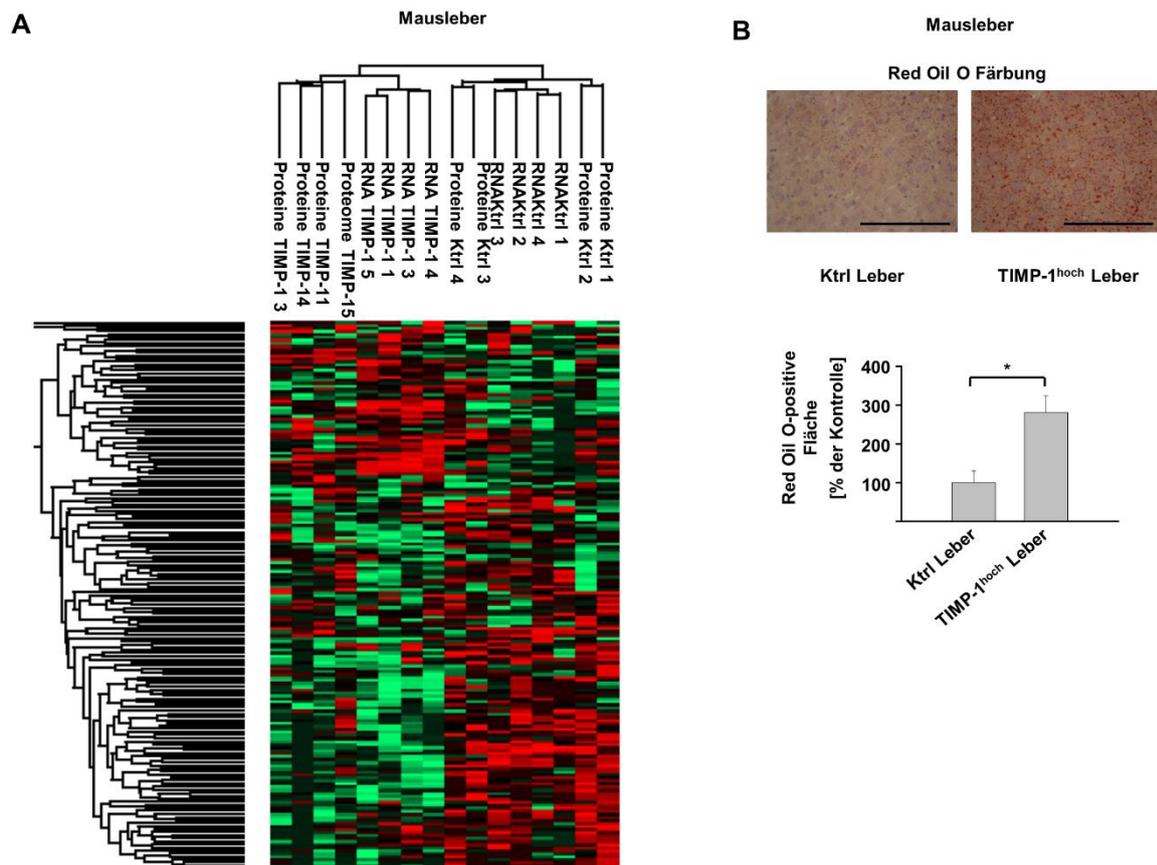
### 3.7 TIMP-1 verändert die Zusammensetzung von Wirtsexosomen

Um die hier gefundenen Ergebnisse zu generalisieren, wurde ein weiteres System untersucht. Hohe TIMP-1-Spiegel im Blut führen zur Ausbildung einer prä-metastatischen Nische (Seubert *et al.*, 2015). Um zu testen, ob es auch in Abwesenheit eines Primärtumors allein durch die Erhöhung der TIMP-1-Spiegel zu einer veränderte Exosomenzusammensetzung kommt, wurden Mausblutexosomen isoliert und auf Unterschiede in Zusammensetzung und Wirkung gegenüber Kontrolltieren untersucht (Abbildung 26A). Exosomen aus dem Blut von Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln stammten unter anderem aus der Leber, wie die Anwesenheit von leberspezifischer miR-122 zeigte (Abbildung 26E).

Im Gegensatz zum Anstieg in Blutexosomen war miR-122 in der Leber reduziert (Abbildung 26 F). Daher untersuchten wir die Leber mithilfe von Proteom- und Transkriptomanalysen in Zusammenarbeit mit Bernard Mari, Nizza, Frankreich und Fabian Coscia, Martinsried, Deutschland. Hier war eine Hochregulation des Fettstoffwechsels und eine Akkumulation von Lipiden in der Leber auffällig (Abbildung 27A-B).

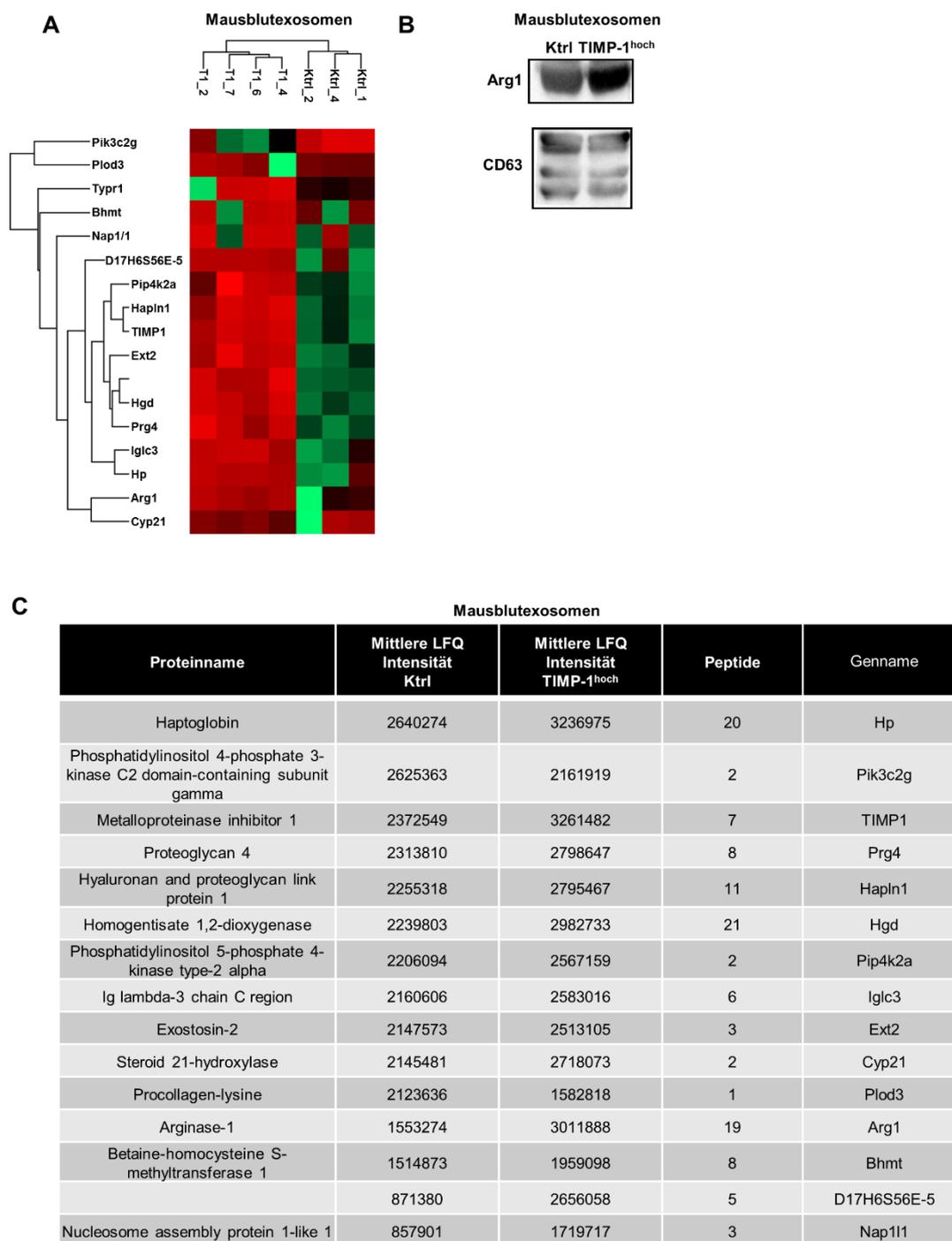


**Abbildung 26 - Hohe systemische TIMP-1-Spiegel führen zu einer Anreicherung der leberspezifischen microRNA miR-122 in Exosomen.** (A) Transmissionselektronenaufnahmen von Exosomen zum Nachweis der korrekten Größe. Eine repräsentative Aufnahme (n=4) wird gezeigt. Balken: 100  $\mu$ m. (B) Dynamische Lichtstreuung zur Untersuchung der Homogenität und Größe der Exosomen. AdCtrl: Ktrl-Adenovirus, AdTIMP-1: TIMP-1-Adenovirus. Eine repräsentative Messung (n=5) wird gezeigt. (C) Nachweis von exosomalen Proteinen durch Western Blot. Ein repräsentativer Western Blot (n=4) wird gezeigt. (D) Proteingehalt der Exosomenfraktion in Abhängigkeit von systemisch hohen TIMP-1-Spiegeln. Nachweis durch BCA-Assay. n=5. (E) Nachweis der leberspezifischen microRNA miR-122 in Exosomen durch qRT-PCR und Abhängigkeit von systemisch hohen TIMP-1-Spiegeln. n=5. (F) qRT-PCR-basierte Quantifizierung von miR-122 in der Leber in Abhängigkeit von hohen, systemischen TIMP-1-Spiegeln. n=5. (A-F) Ktrl: Kontrolladenovirus, TIMP-1<sup>hoch</sup>: hohe systemische TIMP-1-Spiegel durch adenoviral-induzierte, systemische Überexpression. \*\*, P<0,01; \*\*\*, P<0,001.



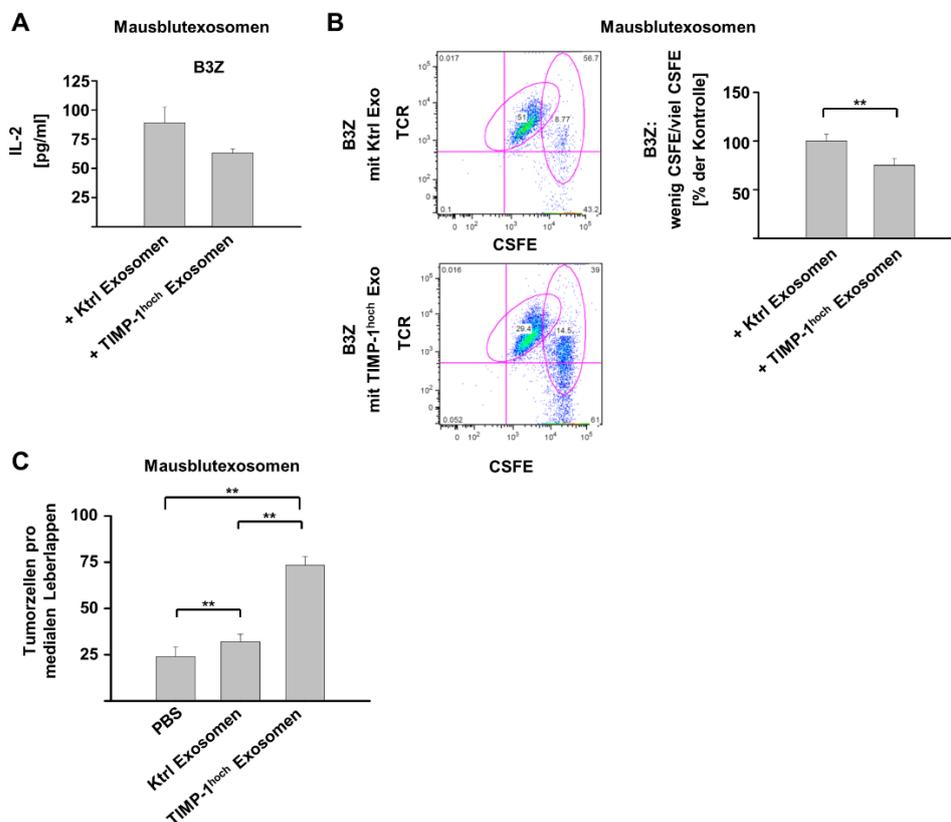
**Abbildung 27 - Veränderte Zusammensetzung an mRNA und Proteinen von fettstoffwechselassoziierten Faktoren und Akkumulation von Fett in der Leber bei hohen systemischen TIMP-1-Spiegeln.** (A) Massenspektrometrische Proteomanalyse und Microarray-basierte Transkriptomanalyse der Leber in Abhängigkeit von hohen, systemischen TIMP-1-Spiegeln. Dargestellt sind Proteine und mRNAs, die im Fettsäurestoffwechsel eine Rolle spielen in einer *heat map*. Grün: reduzierte mRNAs oder Proteine, rot: erhöhte mRNAs oder Proteine. Proteine TIMP-1: Proteomanalyse von Tieren mit hohen, systemischen TIMP-1-Spiegeln, Proteine Ktrl: Proteomanalyse der Kontrolltiere, RNA TIMP-1: RNA-Microarray-Untersuchung von Tieren mit hohen, systemischen TIMP-1-Spiegeln, RNA Ktrl: RNA-Microarray-Untersuchung von Tieren mit hohen, systemischen TIMP-1-Spiegeln. Striche auf der linken Seite symbolisieren jeweils ein Protein/eine mRNA, die mit dem Fettsäurestoffwechsel assoziiert ist. (B) Red Oil O-basierte immunhistochemische Färbung von Lipiden in der Leber sowie deren Quantifizierung. Balken: 100  $\mu$ m. n=3. (A, B) Ktrl: Kontrolladenovirus, TIMP-1<sup>hoch</sup>: hohe systemische TIMP-1-Spiegel durch adenoviral-induzierte, systemische Überexpression.

Eine Untersuchung der Exosomen in Zusammenarbeit mit Fabian Coscia in der Forschungsabteilung Proteomics und Signaltransduktion von Prof. Matthias Mann (Martinsried, Deutschland) zeigte, dass Leberproteine verändert in den Exosomen akkumulierten. Von besonderem Interesse war hier die Erhöhung von Arginase-1 in den Exosomen von Tieren mit hohen TIMP-1-Spiegeln (Abbildung 28), da Arginase-1 Einfluss auf die Immunantwort nimmt (Bronte und Zanovello, 2005).



**Abbildung 28 - Exosomen aus Mäusen mit hohen systemischen TIMP-1-Spiegeln weisen erhöhte Arginase-1-Mengen in ihren Exosomen auf.** (A) Massenspektrometrische Proteomanalyse von Blutexosomen in Abhängigkeit von hohen, systemischen TIMP-1-Spiegeln (T1). Dargestellt sind signifikant veränderte Proteine in einer *heat map* (*Welch test*). Rot: Erhöhte Proteinmengen in T1. Grün: Verringerte Proteinmengen in T1. (B) Verifikation des Arginase-1-Anstieges in Abhängigkeit von TIMP-1 durch Western Blot. Ein repräsentativer Western Blot (n=3) wird gezeigt. (C) Auflistung der in Exosomen durch hohe, systemische TIMP-1-Spiegel signifikant veränderten Proteine (*Welch test*). (A-C) Ktrl: Kontrolladenovirus, T1/TIMP-1<sup>hoch</sup>: hohe systemische TIMP-1-Spiegel durch adenoviral-induzierte, systemische Überexpression.

Um zu überprüfen, ob diese immunsuppressive Wirkung von Arginase-1 auch durch den Transfer über Exosomen zu erreichen war, wurden Exosomen aus Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln in einem Immunzellmodell zur T-Zellaktivierung getestet. B3Z T-Zellhybridome reagieren auf Stimulus mit Proliferation und IL-2 Produktion (Basha *et al.*, 2011; Limmer *et al.*, 2000). Diese Effekte waren verringert, wenn die B3Z-Zellen mit Exosomen aus Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln vorinkubiert wurden (Abbildung 29A, B). Diese immunsuppressive Wirkung von TIMP-1-Exosomen aus der Leber könnte einen der Gründe darstellen, weshalb die Übertragung von TIMP-1 Exosomen ausreicht, um die Metastasierung in die Leber zu fördern (Abbildung 29C).



**Abbildung 29 - Exosomen aus Tieren mit hohen, systemischen TIMP-1-Spiegeln wirken suppressiv auf T-Zellen und fördern die Metastasierung.** (A) ELISA-basierte Bestimmung der IL-2 Sekretion von T-Zell-Hybridomen (B3Z) nach Stimulation in Abhängigkeit von Exosomen aus Tieren mit hohen, systemischen TIMP-1-Spiegeln. Eine repräsentative Messung (n=3) wird gezeigt. (B) Einfluss von Exosomen aus Tieren mit hohen, systemischen TIMP-1-Spiegeln auf die Proliferation von stimulierten T-Zell-Hybridomen (B3Z). CSFE: Farbstoff zur Untersuchung der Proliferation, je niedriger das CSFE-Signal, desto öfter fand Zellteilung statt. n=3. (C) Metastasierung in die Leber nach Injektion mit Exosomen isoliert aus Tieren mit hohen, systemischen TIMP-1-Spiegeln, Kontrolltieren oder nur PBS. Tumorzellquantifikation erfolgte nach X-Gal-Färbung. L.CI-5s T-Zelllymphom wurde als Modellzelllinie verwendet. n=3. (A-C) Ktrl: Kontrolladenovirus, TIMP-1<sup>hoch</sup>: hohe systemische TIMP-1 Spiegel durch adenoviral-induzierte, systemische Überexpression. \*\*, P<0,01.

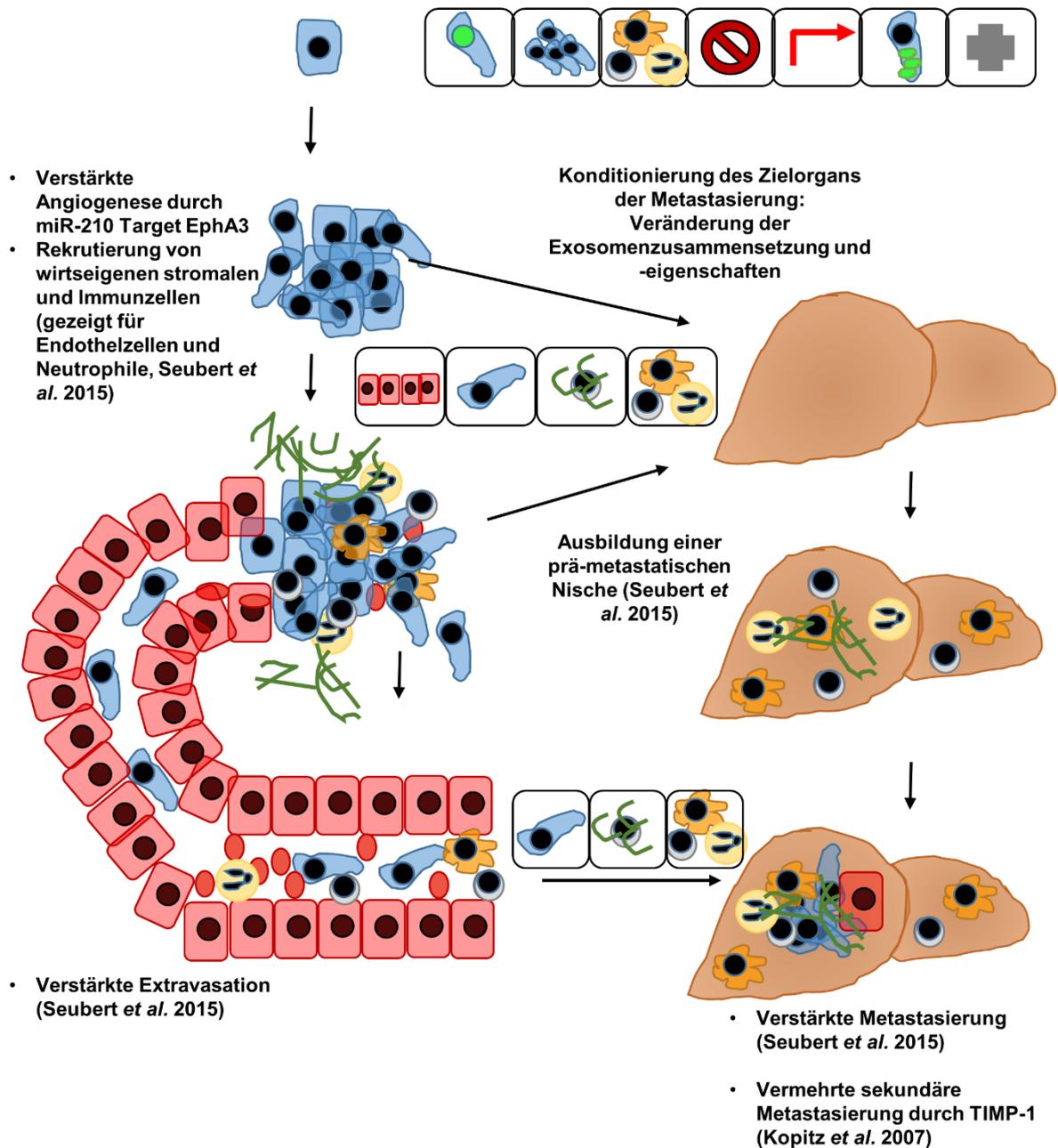
---

## 4. Diskussion

In dieser Studie wurden Aspekte der TIMP-1-induzierten Signaltransduktion in verschiedenen Modellen für Tumorwachstum und Metastasierung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass TIMP-1 in unterschiedlichen Stadien der Tumorprogression fördernd auf Tumorzellen wirkt (Abbildung 30, 31): Bei der initialen Etablierung des Primärtumors kam es zu verstärkter Angiogenese und erhöhtem Tumorwachstum durch Überexpression von TIMP-1. TIMP-1 aktivierte pro-proliferative und anti-apoptische Signalwege wie PI3K/AKT und HIF-1 in der Tumorzelle und führte zu einer gesteigerten Expression der microRNA miR-210. Über Exosomen konnte miR-210 auch auf Zellen des Wirtsorganismus übertragen werden und direkt das Verhalten von Endothelzellen beeinflussen. In späten Stadien förderten systemische hohe TIMP-1-Spiegel die Metastasierung durch Veränderung der Genexpression im Wirt: Ektopische Expression von TIMP-1 in der Leber führte zu Veränderungen des Fettstoffwechsels und zu einer Akkumulation von Lipiden. Indirekt veränderten systemisch hohe TIMP-1-Spiegel die Zusammensetzung von zirkulierenden Exosomen und könnten so eine immuntolerante Umgebung für Tumorzellen schaffen.

Besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang die Auswirkungen von TIMP-1 auf den Umgang der Tumorzelle mit zellulärem Stress während der Tumorprogression. So führte die durch TIMP-1 erhöhte Angiogenese zu einer verbesserten Versorgung des Tumors und damit zu einer Reduktion von Sauerstoff- und Nährstoffmangel während des Tumorwachstums. Die Nährstoffversorgung von metastasierenden Tumorzellen in der Leber wurde durch die Umstellung des Fettstoffwechsels verbessert und die Aggressivität des Immunsystems eingeschränkt. Damit agiert TIMP-1 als ein Faktor, der eine Modulation des Wirtsorganismus durch die Tumorzelle ermöglicht und so bessere Bedingungen für das Überleben der Tumorzelle schafft. Sowohl systemisch erhöhte TIMP-1-Spiegel als auch die endogen verstärkte Expression von TIMP-1 in der Tumorzelle erwiesen sich als vorteilhaft für die Tumorprogression. Tumorzellen mit dieser Eigenschaft (erhöhte TIMP-1-Expression) haben damit einen Überlebensvorteil und sind in der Lage zellulären Stressfaktoren zu entgehen. Dieser Befund könnte im direkten Zusammenhang mit erhöhten TIMP-1-Spiegeln in verschiedenen malignen Krebserkrankungen stehen (de Mingo *et al.*, 2007; Ylisirniö *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2011). Da TIMP-1

in den hier gezeigten Untersuchungen klar tumor- und metastasierungsfördernd wirkt, ist anzunehmen, dass hohe TIMP-1-Expression Tumorzellen einen Überlebensvorteil gibt.



**Abbildung 30 - TIMP-1 beeinflusst die Tumorprogression in allen kritischen Schritten (vergleiche Abbildung 1).** Quellen: Fidler, 2003; Gupta und Massagué, 2006; Psaila und Lyden, 2009; Hanahan und Weinberg, 2011; Sceney *et al.*, 2013.

Dieser Zusammenhang zwischen TIMP-1 und schlechter Prognose steht oftmals im Widerspruch mit bekannten Funktionen von TIMP-1. Unter anderem wird TIMP-1 häufig als anti-angiogenes Protein beschrieben (Cruz-Munoz und Khokha, 2008). Allerdings gibt es auch weitere Publikationen, die ebenfalls von einer pro-angiogenen Funktion von TIMP-1 berichten (Yoshiji *et al.*, 1998; de Lorenzo *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008). So wirkt TIMP-1 *in vitro* direkt pro-angiogen (Liu *et al.*, 2008) und eine verstärkte Vaskularisierung nach TIMP-1-Überexpression ist auch in anderen Tumormodellen beschrieben (Yoshiji *et al.*, 1998; de Lorenzo *et al.*, 2003). Möglicherweise bestimmen die Mengen an Oberflächenproteinen wie CD63 und die residuale Aktivität von PI3K/AKT und HIF-1 in Tumor- und Endothelzellen die Wirkungsweise von TIMP-1.

Die anti-angiogenen Eigenschaften von TIMP-1 werden auf die Inhibition von pro-angiogenen Proteasen zurückgeführt (Cruz-Munoz und Khokha, 2008). In der hier gezeigten Studie bewirkt TIMP-1 über CD63 eine vermehrte Exosomenproduktion durch HIF-1, die Akkumulation von miR-210 in diesen Exosomen und anschließend eine Reduktion von EphA3 durch miR-210. Dieser Mechanismus beruht vollständig auf der C-terminalen Domäne von TIMP-1 und verläuft unabhängig von der inhibitorischen Funktion, wie in dieser Arbeit gezeigt wird. Außerdem erlaubt der indirekte Mechanismus über sezernierte Exosomen und darin enthaltenes miR-210, dass Aktivierung und Rekrutierung von Endothelzellen örtlich und zeitlich getrennt von hohen lokalen TIMP-1-Konzentrationen ablaufen. Damit beruht der pro-angiogene Mechanismus auf einer Wirkung von TIMP-1 als Zytokin und steht nicht im Widerspruch zur anti-angiogenen Proteaseinhibition von TIMP-1.

Eine verstärkte Vaskularisierung des Tumorgewebes führt zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung und ermöglicht Tumorzellproliferation (Pugh und Ratcliffe, 2003). Schlüsselmoleküle in dieser Regulation sind HIF-1 und die von HIF-1 regulierte microRNA miR-210 (Ivan und Huang, 2014). Die Anwesenheit von miR-210 führte in der hier gezeigten Studie zu weniger *cleaved* Caspase-3-positiven, apoptotischen Zellen in Metastasen und zu einer erhöhten Proliferation. Damit schien die Reduktion von Tumorzellstress durch HIF-1 und miR-210 unterstützend auf ungehinderte Proliferation und das Überleben in Stresssituationen zu wirken. Zusätzlich sind anti-apoptotische Funktionen von miR-210 bekannt: Caspase-8-associated protein 2 (Kim *et al.*, 2009) und der pro-apoptotische Faktor VMP-1 beeinflussen Zellüberleben und Proliferation (Ying *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2014). Die Wirkungsweise

von miR-210 in der Regulation der Proliferation ist nicht eindeutig, auch anti-tumorigene und anti-proliferative Zielproteine waren reduziert: E2F3 (Giannakakis *et al.*, 2008) und FGFRL1 (Tsuchiya *et al.*, 2011) begünstigen das Tumorwachstum, wurden jedoch auch von miR-210 supprimiert.

miR-210 reguliert viele Signalwege (Chan *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2014), die die zelluläre Stressantwort steuern (Cui *et al.*, 2012). Mehrere Proteine, die in den Eisenstoffwechsel involviert sind (ISCU1/2 und TfR), werden von miR-210 beeinflusst (Favaro *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Yoshioka *et al.*, 2012; McCormick *et al.*, 2013), ebenso wie SDHD von Komplex II der Atmungskette (Puisségur *et al.*, 2011) und GPD1L (Kelly *et al.*, 2011), das HIF-1 $\alpha$  reguliert (Kelly *et al.*, 2011). Da die Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$  durch PHDs abhängig von Eisen und Sauerstoff ist (Kaelin Jr. und Ratcliffe, 2008), sind diese Proteine direkt involviert in die Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  und können damit einen *feedback loop* von miR-210 zu HIF-1 $\alpha$  bilden (Puisségur *et al.*, 2011). Die Akkumulation von Sekundärmetaboliten wie Succinat durch die Suppression von SDHD wirkt ebenfalls stabilisierend auf HIF-1 $\alpha$  (Puisségur *et al.*, 2011). Dies könnte auch in dem hier gezeigten Modell der Fall sein, in dem die Aktivität von SDH durch TIMP-1-Überexpression und anschließenden miR-210-Anstieg reduziert war. Darüber hinaus supprimiert miR-210 direkt HIF-1 $\alpha$ : In murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) wurde HIF-1 $\alpha$  als miR-210-Ziel-mRNA identifiziert (Qin *et al.*, 2014). Dieser Effekt scheint hier *in vitro* keine Rolle zu spielen, da konstant erhöhte HIF-1-mRNA und Protein-Mengen vorgefunden wurden. Diese Balance zwischen miR-210 und HIF-1 $\alpha$  könnte entscheidend für das Zellüberleben in einer Notsituation wie Hypoxie sein. Da hier miR-210 und HIF-1 $\alpha$  beide über 12 Stunden akkumulierten, ist eine gegenseitige Stabilisierung wahrscheinlich. Ein unnötiges Verharren in einem klassischem hypoxischen Zustand mit eingeschränkter metabolischer Funktion, wie sie für Tumorzellen sehr ungünstig ist (Heiden *et al.*, 2009), wird durch die miR-210-Expression vermieden. So ist miR-210 in der Lage, den durch HIF-1-induzierten Wachstumsarrest über die Kontrolle des Myc-Repressors MNT zu umgehen (Qin *et al.*, 2014).

Zusammen scheinen HIF-1 $\alpha$  und miR-210 so den Warburg-Effekt auslösen und/oder aufrechterhalten zu können. Der Warburg-Effekt beschreibt einen metabolischen Zustand, in dem Tumorzellen selbst bei normoxischen Bedingungen auf Glykolyse zur ATP-Gewinnung umschalten und unter hohem Glukoseverbrauch von anfallenden Metaboliten profitieren (Heiden *et al.*, 2009). Die ursprüngliche

Hypothese (Warburg, 1956), dass die Umstellung des Stoffwechsels ursächlich für die Entstehung von Krebs ist (Warburg, 1956), konnte widerlegt werden (Gatenby und Gillies, 2004). Allerdings schafft die Umstellung des Stoffwechsels auf aerobe Glykolyse Vorteile für die Tumorzelle (Gatenby und Gillies, 2004). Es entstehen mehr Metaboliten, die für Zellteilung notwendig sind und weniger schadhafte *reactive oxygen species* (Hsu und Sabatini, 2008). Dadurch könnte TIMP-1 über HIF-1 $\alpha$  und miR-210 eine Rolle in der Regulation des in vielen Krebsarten vorliegenden Warburg-Effektes (Heiden *et al.*, 2009) spielen. In dieser Studie wurde gezeigt, dass TIMP-1 über miR-210 direkten Einfluss auf die SDH-Aktivität nimmt. SDH ist sowohl am Zitratzyklus als auch an der Atmungskette beteiligt und damit maßgeblich an der Kontrolle des Zellmetabolismus beteiligt (Bardella *et al.*, 2011). Zudem kommt es bei der Umstellung zur aeroben Glykolyse auch zu einer Erhöhung der Fettsäuresynthese (Menendez und Lupu, 2007), wie sie in der vorliegenden Studie in der Leber vorgefunden wurde.

Versuche mit Julia Kobuch und Barbara Grünwald zeigten, dass die Erhöhung der systemischen TIMP-1-Spiegel durch einen A549L-Tumor auf 23 ng/ml im Blut ausreichen, um zur Ausbildung einer TIMP-1-induzierten prä-metastatischen Nische in der Leber zu führen (Seubert *et al.*, 2015). In den hier gezeigten Versuchen zum molekularen Hintergrund der TIMP-1-induzierten prä-metastatischen Nische wurde das adenovirale Modell (Seubert *et al.*, 2015) genutzt, um Kontaminationen durch Tumorzell-exosomen zu vermeiden. Jedoch hat diese Methode zum Nachteil, dass ein Großteil der TIMP-1-Expression ektopisch in der Leber stattfindet (Waddington *et al.*, 2008) und so möglicherweise Ergebnisse verfälscht. Im Kontext der immunsuppressiven Leberexosomen hingegen ist dieser Mechanismus sogar von Vorteil, da hier auf den inflammatorischen Status der Leber in der Ausbildung einer prä-metastatischen Nische abgezielt wird. Eine Untersuchung eines ähnlichen Mechanismus im Kontext von chronischen viralen Infektionen der Leber wäre von Interesse.

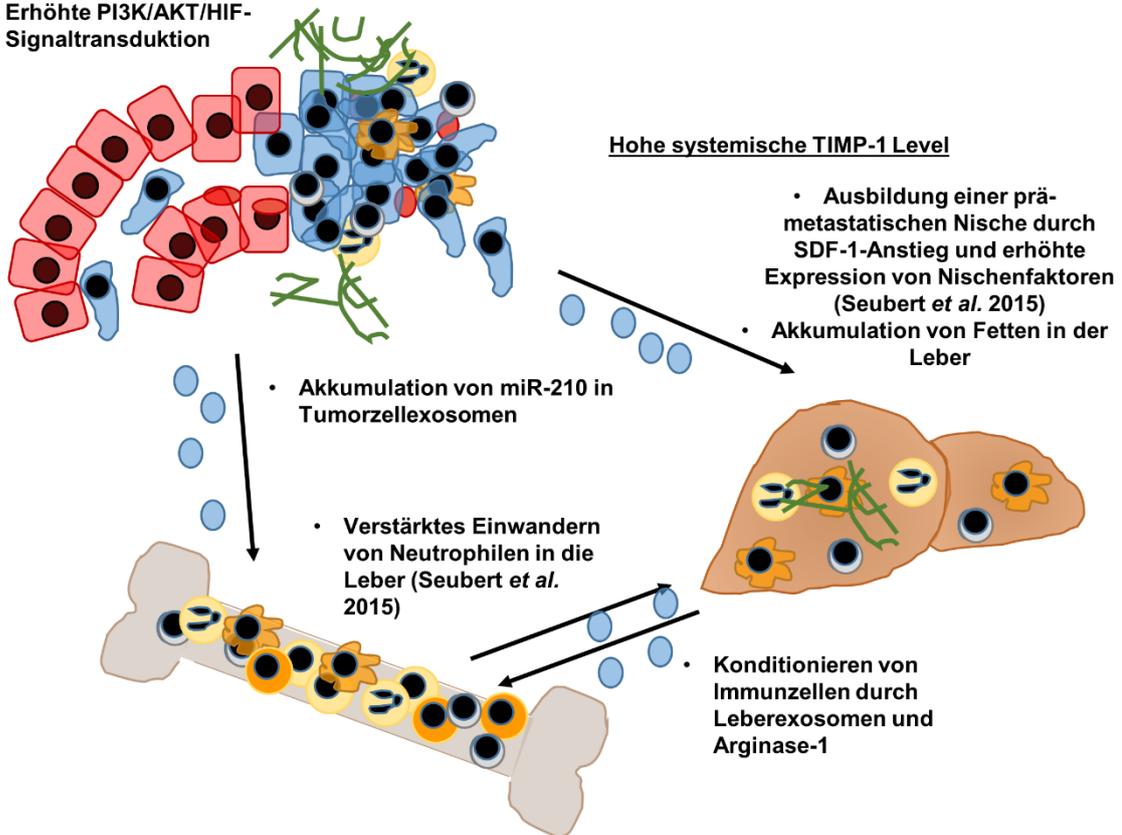
Die Rolle von Exosomen als Botschafter zwischen Tumorzellen und Wirtszellen in der prä-metastatischen Nische wird zunehmend besser untersucht (Peinado *et al.*, 2011; Sceneay *et al.*, 2013). Hier wurde gezeigt, dass nicht nur die Tumorzellen über Exosomen Einfluss auf Wirtszellen nehmen können, sondern auch ein prä-metastatisches Organ Exosomen aussenden kann, um zum Beispiel wie hier gezeigt Immunzellen zu beeinflussen. Zudem könnte ein Teil der Leberspezifität der TIMP-1-induzierten prä-metastatischen Nische (Seubert *et al.*, 2015) über die Anreicherung von

immunsuppressivem Arg-1 erklärt werden. Arg-1 wird in großen Mengen in der Leber exprimiert, da es im dort stattfindenden Harnstoffzyklus teilnimmt (Morris, 2002). Daneben reguliert Arginase-1 das Immunsystem und wird als Marker für suppressive regulatorische Immunzellen verwendet (Munder, 2009). Arg-1 reguliert in Immunzellen iNOS und dadurch die Freisetzung von stark inflammatorischem NO durch eine direkte Konkurrenz um L-Arginin (Munder, 2009). Besonders der Metabolismus von T-Zellen wird durch die Verfügbarkeit von L-Arginin gesteuert, so wirkt sich ein Mangel an Arginin auf die mRNA-Translation und die Expression des T-Zellrezeptors aus (Bronte und Zanovello, 2005). Zudem kommt ein erhöhter Arginase-1-Gehalt auch Tumorzellen direkt zugute (Colegio *et al.*, 2014). Ähnliches wäre im Falle von Exosomen-vermitteltem Arg-1-Transfer in der hier untersuchten hepatischen prä-metastatischen Nische denkbar.

Neben einer Veränderung der Exosomenkomposition führt TIMP-1 in der Leber zu einer verringerten Expression der microRNA miR-122. miR-122 ist ein zentraler Regulator des Hepatozytenstoffwechsels und ist stark assoziiert mit der Regulation des Fetthaushaltes (Jopling, 2012; Bandiera *et al.*, 2015). Die hier gezeigte Akkumulation von Fetten könnte eine potentielle Nährstoffquelle für ansiedelnde Tumorzellen darstellen. Damit könnten erhöhte TIMP-1-Spiegel die vor allem in späteren Stufen der Metastasierung wichtige Bereitstellung von Nährstoffen für das Auswachsen von Mikrometastasen erleichtern. Spezifische Fettsäuresynthethaseinhibitoren könnten zur Prüfung dieser Hypothese eingesetzt werden.

### TIMP-1 Überexpression in den Tumorzellen

- Verstärktes Tumorwachstum
- Verstärkte Angiogenese
- Erhöhte PI3K/AKT/HIF-Signaltransduktion



**Abbildung 31 - Lokale hohe TIMP-1-Expression im Tumor und hohe systemische TIMP-1-Spiegel fördern Tumorerkrankungen in unterschiedlichen Schritten der Progression über verschiedene Mechanismen.**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TIMP-1 sich in zwei Modellsystemen auf das Cargo von Exosomen auswirkt: In Tumorzellen kommt es zu einer verstärkten Bildung von Exosomen, wahrscheinlich über HIF-1, während in der Leber vermehrt Arg-1 und andere Proteine verpackt werden. Interessanterweise kommt in Exosomen vermehrt der TIMP-1-Interaktionspartner CD63 vor. Dort bildet CD63 zusammen mit anderen Tetraspaninen sogenannte *tetraspanin webs*, in denen Membranproteine akkumulieren und in räumliche Nähe zueinander gebracht werden (Hemler, 2005; Zöller, 2009; Pols und Klumperman, 2009). In dieser Studie wird gezeigt, dass es als Interaktionspartner der C-terminalen Domäne von TIMP-1 (Jung *et al.*, 2006) entscheidend ist für die TIMP-1-Signaltransduktion auf miR-210. CD63 wurde in einem möglichen *feed-forward loop* in Tumoren mit TIMP-1-Überexpression

verstärkt exprimiert. Die veränderte Expression könnte Einfluss auf die Biogenese von Exosomen haben und auch das Cargo dieser Exosomen verändern, da CD63 in den Transport von Membranproteinen involviert ist (Pols und Klumperman, 2009). Hier könnte die Untersuchung des verstärkten Tumorwachstums von CD63-überexprimierenden Zellen, wie sie in dieser Studie gefunden wurde, Hinweise auf zugrundeliegende Mechanismen geben. Über das Tetraspaninprofil von Exosomen ist ein gezieltes Ansteuern von bestimmten Zellen möglich (Rana *et al.*, 2012). Hier konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung von CD63 mit einer Veränderung der Expression von anderen Tetraspaninen einherging. Veränderung der Exosomen-aufnehmenden Zellpopulation nach Manipulation von TIMP-1 oder CD63 wären von Interesse. Mit CD63-mCherry-exprimierenden Zellen, wie sie hier verwendet wurden, stehen die notwendigen Werkzeuge zur Verfügung.

Auf zellulärer Ebene teilen sich Exosomen molekulare Eigenschaften mit Endosommembranen im Zellinneren und entstehen durch Fusion von Multivesikulären Körpern mit der Plasmamembran (Stoorvogel *et al.*, 2002). Die Rolle des ESCRT-Systems, des am besten untersuchten Systems zur Biogenese von Endosomen, ist umstritten (Baietti *et al.*, 2012; Hurley und Odorizzi, 2012; Colombo *et al.*, 2013). Einzelne Proteine des ESCRT-Komplexes sind an der Biogenese von Exosomen beteiligt und nehmen Einfluss auf das Cargo der Exosomen (Baietti *et al.*, 2012). Proteine der Rab-Familie von kleinen GTPasen kontrollieren die Exosomenbiogenese. Rab27a und Rab27b greifen an verschiedenen Stellen der Biogenese ein, beide nehmen Einfluss auf Form und Größe oder Lokalisation der multivesikulären Endosomen, möglichen Vorläuferstrukturen von Exosomen (Ostrowski *et al.*, 2010; Pfeffer, 2010). Rab11 und Rab35 beeinflussen die Freisetzung von Exosomen (Savina *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2010). Da erhöhte Proteinmengen in der exosomalen Fraktion nach TIMP-1-Stimulus vorlagen, könnte TIMP-1 über diese Effektorproteine Einfluss auf die Biogenese von Exosomen nehmen. Eine nähere Untersuchung der Expressionsmuster von Rab-Proteinen in Abhängigkeit von TIMP-1 könnte für die Analyse des genauen molekularen Mechanismus von Interesse sein.

CD63 *knock down* führte zu einem Anstieg der pri-miR-210-RNA, wohingegen reife miR-210 verringert war. Dies deutet auf eine Unterbrechung der miRNA-Prozessierung hin, was mit einem Ausschleusen des Drosha/Dicer-Systems im Zuge der erhöhten Exosomenfreisetzung zusammenhängen könnte (Winter *et al.*, 2009). Der stabile *knock down* von TIMP-1 führte zu einem gegensätzlichen Verhalten:

Während miR-210 leicht erhöht war, kam es zu einer Reduktion der pri-miR-210-Expression, wie für die Regulation durch TIMP-1 zu erwarten. Entscheidend könnten somit Lokalisation und Verfügbarkeit von TIMP-1 und CD63 sein. So wäre denkbar, dass die Bindung von TIMP-1 an CD63 dessen Übergang zwischen Endosom und Zelloberfläche stört und damit CD63 seinen weiteren Funktionen entzieht.

Die Bindung von TIMP-1 an CD63 induziert einen entscheidenden Signalweg: die PI3K/AKT-vermittelte Signaltransduktion (Ridnour *et al.*, 2012; Toricelli *et al.*, 2013; Ries, 2014). Diese scheint zeitlich in zwei Schritten abzulaufen: Während die Phosphorylierung von AKT über einen relativ kurzen Zeitraum anstieg und innerhalb von 24 Stunden wieder abflachte, schien es bei stabiler TIMP-1-Überexpression zu einer gesteigerten Expression oder Akkumulation von PI3K-Proteinen zu kommen. Hier fand sowohl eine gesteigerte Phosphorylierung von regulatorischen Untereinheiten statt als auch eine Akkumulation von PI3K-Proteinen der P110 Klasse, während Klasse III PI3Ks nicht verändert waren. Diese beiden Kinetiken deuten auf zwei regulatorische Mechanismen hin: Eine schnelle Komponente, die zu der akuten AKT-Phosphorylierung führt und einer langsameren, die die chronisch gesteigerte PI3K-Aktivität begründet. Die Phosphorylierungskinetik von AKT verlief ähnlich wie die für ERK beschriebene verstärkte Phosphorylierung (Jung *et al.*, 2006), im Überexpressionsmodell konnte aber keine veränderte ERK-Phosphorylierung gefunden werden. Denkbar ist, dass im Falle von ERK der Signalweg über die Zeit abstumpft, während AKT auch in einer stabilen Überexpression konstant phosphoryliert vorlag. Da im Tierversuch auch nach einer langen Wachstumsphase PI3K P100 $\beta$  und Phospho-AKT erhöht waren, schien die Aktivierung dieses Signalweges über einen längeren Zeitraum anzuhalten.

Untersuchungen mit verschiedenen Inhibitoren deuteten darauf hin, dass die Regulation von HIF-1 $\alpha$  durch TIMP-1 nicht auf Proteinebene stattfand, sondern durch Anstieg der HIF-1A mRNA-Expression. Die hier gezeigten Ergebnisse sprachen gegen eine HIF-1 $\alpha$  Regulation auf Proteinebene (Semenza, 2007): Die Inkubation mit einem Eisenchelator (Inhibition von PHDs) und die Zugabe von Proteasominhibitoren konnten den Anstieg von HIF-1 $\alpha$  durch TIMP-1 nicht unterbinden. Wäre eine Akkumulation aufgrund einer Störung des Abbaus von HIF-1 $\alpha$  der Auslöser für die Erhöhung unter normoxischen Bedingungen gewesen, sollten die Inhibitoren dies ausgleichen. Dahingegen führte die

Inhibition der Ribosomen zu einer Angleichung von HIF-1 $\alpha$ -Protein mit und ohne TIMP-1, was für eine verstärkte Proteintranslation spricht.

Neben der Interaktion mit CD63 sind auch Auswirkungen einer veränderten TIMP-1-Expression auf das proteolytische Gleichgewicht in der unmittelbaren Umgebung der Tumorzelle und im Wirtsorganismus zu beachten. TIMP-1 kann als Breitspektrum-inhibitor von Metalloproteinasen starke Auswirkungen auf die Lokalisation der MMP-Aktivität haben (Mason und Joyce, 2011). MMP-9 wird im Komplex mit TIMP-1 sezerniert (Ardi *et al.*, 2007; Roderfeld *et al.*, 2007), die Rate der Dissoziation und die Interaktion MMP-regulierender Proteine entscheiden daher über die MMP-9-Aktivität. Tetraspanine binden membranständige Proteasen (Takino *et al.*, 2003; Schröder *et al.*, 2013) und können eine Interaktion zwischen TIMPs und Proteasen vermitteln.

	<b>Genomische Instabilität und Mutationen durch RAD52 Suppression</b>		<b>Umgehen von Angriffen des Immunsystems durch Exosomen mit Arginase-1</b>		<b>Anhaltende Proliferation durch Induktion von PI3K/AKT</b>
	<b>Uneingeschränkte Replikationsfähigkeit</b>		<b>Umgehen von Wachstumsrepressoren</b>		<b>Deregulation der zellulären Energieversorgung durch Einfluss auf SDHD</b>
	<b>Vermeiden von Apoptosen durch TIMP-1</b>		<b>Induktion von Angiogenese durch Einflussnahme über miR-210 und EphA3</b>		<b>Auslösen von tumorfördernden Entzündungen durch verstärktes Einwandern von Neutrophilen</b>
	<b>Invasion und Metastasierung werden durch die Ausbildung der prä-metastatischen Nische verstärkt</b>	<b>Die hallmarks of cancer beschreiben für die Tumorprogression notwendige Prozesse. Der Einfluss der TIMP-1-gesteuerten Signalwege wird hier zusammengefasst dargestellt.</b>			

**Abbildung 32 - TIMP-1 beeinflusst wichtige Prozesse während der Progression von malignen Tumorerkrankungen.** Rot: TIMP-1-vermittelte Effekte. Quellen: Fidler, 2003, Gupta und Massagué, 2006, Hanahan und Weinberg, 2011.

Eine Annäherung und anschließende Inhibition von TIMP-1 über CD63 an ADAM-10 und andere membranständige Proteasen wäre möglich. Die Regulation einer membrangebundenen Protease durch Tetraspanine wurde bereits für MT1-MMP gezeigt (Takino *et al.*, 2003; Schröder *et al.*, 2013). Eine Untersuchung der Bindungen zeigte, dass beide um CD63 konkurrieren und TIMP-1 zu einer Stabilisierung von MT1-MMP an der Zelloberfläche führt, da der endosomengesteuerte Abbau nach Bindung an CD63 nicht mehr erfolgen kann (Warner, 2013; Warner *et al.*, 2013). Diese Studie weist auf eine mögliche Konkurrenz zwischen Protease-inhibitorischer Funktion von TIMP-1 und Bindung an CD63 hin. Eine solche könnte die Mengen an tatsächlich verfügbarem TIMP-1 und die daraus folgenden biologischen Effekte beeinflussen.

TIMP-1 kann über die hier gezeigte Regulation von HIF-1 und miR-210 auf fast alle eingangs erwähnten *hallmarks of cancer* Einfluss nehmen (zusammengestellt in Abbildung 32). Bei der Regulation der genomischen Stabilität, bei Angiogenese und der zellulären Energieversorgung ist die Induktion des HIF-1/miR-210-Signalweges entscheidend. Die Manipulation von Immunzellen am Beispiel von Neutrophilen (Seubert *et al.*, 2015) und T-Zellen sowie die Ausbildung einer prä-metastatischen Nische (Seubert *et al.*, 2015) werfen ein Licht auf die systemischen Effekte von TIMP-1 in malignen Tumorerkrankungen. Zellintrinsische anti-apoptotische Effekte von TIMP-1 sind bereits beschrieben (Cruz-Munoz und Khokha, 2008; Ries, 2014) und die hier hinzugefügten molekularen Details zur Stimulation des pro-proliferativen PI3K/AKT-Signalweges ergänzen das Verständnis von TIMP-1 in der Tumorzelle. Zusammengenommen weisen diese Eigenschaften von TIMP-1 auf die Komplexität der TIMP-1-Signaltransduktion hin und erlauben so eine Erklärung der paradoxen Wirkung von TIMP-1 in malignen Tumorerkrankungen.

Zusammengenommen wird hier gezeigt, dass TIMP-1 in verschiedenen Stadien die Tumorprogression und Metastasierung steuert und stress-lösende Signalwege stimuliert. TIMP-1 wirkte nicht nur auf Tumorzellen, auch stromale Zellen wurden mittels Exosomen beeinflusst. Die molekulare Charakterisierung von Signalwegen und systemischen Effekten trägt hoffentlich zu einem besseren Verständnis der Rolle von TIMP-1 in malignen Tumorerkrankungen bei.

## 5. Literaturverzeichnis

Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* 7, 834–846.

Ambrus, J.L., Ambrus, C.M., Mink, I.B., and Pickren, J.W. (1975). Causes of death in cancer patients. *J. Med.* 6, 61–64.

Ardi, V.C., Kupriyanova, T.A., Deryugina, E.I., and Quigley, J.P. (2007). Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 20262–20267.

Argilés, J.M., Busquets, S., Stemmler, B., and López-Soriano, F.J. (2014). Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat. Rev. Cancer* 14, 754–762.

Arnautova, I., and Kleinman, H.K. (2010). In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat. Protoc.* 5, 628–635.

Azmi, A.S., Bao, B., and Sarkar, F.H. (2013). Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev.* 32, 623–642.

Baccarini, A., Chauhan, H., Gardner, T.J., Jayaprakash, A.D., Sachidanandam, R., and Brown, B.D. (2011). Kinetic Analysis Reveals the Fate of a MicroRNA following Target Regulation in Mammalian Cells. *Curr. Biol.* 21, 369–376.

Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A.E. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs Results in Target mRNA Degradation. *Cell* 122, 553–563.

Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., et al. (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.* 14, 677–685.

Bandiera, S., Pfeffer, S., Baumert, T.F., and Zeisel, M.B. (2015). miR-122 - A key factor and therapeutic target in liver disease. *J. Hepatol.* 62, 448–457.

Bardella, C., Pollard, P.J., and Tomlinson, I. (2011). SDH mutations in cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1807, 1432–1443.

Basha, G., Novobrantseva, T.I., Rosin, N., Tam, Y.Y.C., Hafez, I.M., Wong, M.K., Sugo, T., Ruda, V.M., Qin, J., Klebanov, B., et al. (2011). Influence of Cationic Lipid Composition on Gene Silencing Properties of Lipid Nanoparticle Formulations of siRNA in Antigen-Presenting Cells. *Mol. Ther.* 19, 2186–2200.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). *Biochemistry* (W H Freeman).

Boccaccio, C., and Comoglio, P.M. (2006). Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat. Rev. Cancer* 6, 637–645.

Bosma, M.J., and Carroll, A.M. (1991). The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 323–350.

Brew, K., and Nagase, H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 55–71.

- Bronte, V., and Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 641–654.
- Brumann, M., Kusmenkov, T., Ney, L., Kanz, K.-G., Leidel, B.A., Biberthaler, P., Mutschler, W., and Bogner, V. (2012). Concentration Kinetics of Serum MMP-9 and TIMP-1 after Blunt Multiple Injuries in the Early Posttraumatic Period. *Mediators Inflamm.* 2012, e435463.
- Cayama, E., Tsuda, H., Sarma, D.S.R., and Farber, E. (1978). Initiation of chemical carcinogenesis requires cell proliferation. *Nature* 275, 60–62.
- Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., and Chakraborti, T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Mol. Cell. Biochem.* 253, 269–285.
- Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. (2002). Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2, 563–572.
- Chan, Y.C., Banerjee, J., Choi, S.Y., and Sen, C.K. (2012). miR-210: the master hypoxamir. *Microcirc. N. Y. N* 1994 19, 215–223.
- Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F., and Maity, A. (2001). Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J. Biol. Chem.* 276, 9519–9525.
- Chen, Z., Li, Y., Zhang, H., Huang, P., and Luthra, R. (2010). Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression. *Oncogene* 29, 4362–4368.
- Chirco, R., Liu, X.-W., Jung, K.-K., and Kim, H.-R.C. (2006). Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 99–113.
- Colegio, O.R., Chu, N.-Q., Szabo, A.L., Chu, T., Rhebergen, A.M., Jairam, V., Cyrus, N., Brokowski, C.E., Eisenbarth, S.C., Phillips, G.M., et al. (2014). Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 513, 559–563.
- Colombo, M., Moita, C., Niel, G. van, Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L.F., Théry, C., and Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell Sci.* 126, 5553–5565.
- Condeelis, J., and Segall, J.E. (2003). Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat. Rev. Cancer* 3, 921–930.
- Cruz-Munoz, W., and Khokha, R. (2008). The role of tissue inhibitors of metalloproteinases in tumorigenesis and metastasis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 45, 291–338.
- Cui, H., Grosso, S., Schelter, F., Mari, B., and Krüger, A. (2012). On the Pro-Metastatic Stress Response to Cancer Therapies: Evidence for a Positive Co-Operation between TIMP-1, HIF-1 $\alpha$ , and miR-210. *Front. Pharmacol.* 3, 134.
- Cui, H., Seubert, B., Stahl, E., Dietz, H., Reuning, U., Moreno-Leon, L., Ilie, M., Hofman, P., Nagase, H., Mari, B., et al. (2014). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 induces a pro-tumourigenic increase of miR-210 in lung adenocarcinoma cells and their exosomes. *Oncogene*.
- D'Angelo, R.C., Liu, X.-W., Najy, A.J., Jung, Y.S., Won, J., Chai, K.X., Fridman, R., and Kim, H.-R.C. (2014). TIMP-1 via TWIST1 Induces EMT Phenotypes in Human Breast Epithelial Cells. *Mol. Cancer Res. MCR*.
- Déry, M.-A.C., Michaud, M.D., and Richard, D.E. (2005). Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 535–540.

- Desgrosellier, J.S., and Cheresh, D.A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 9–22.
- Ell, B., and Kang, Y. (2013). Transcriptional control of cancer metastasis. *Trends Cell Biol.* *23*.
- Erler, J.T., Bennewith, K.L., Cox, T.R., Lang, G., Bird, D., Koong, A., Le, Q.-T., and Giaccia, A.J. (2009). Hypoxia-Induced Lysyl Oxidase Is a Critical Mediator of Bone Marrow Cell Recruitment to Form the Premetastatic Niche. *Cancer Cell* *15*, 35–44.
- Evan, G.I., and Vousden, K.H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* *411*, 342–348.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 351–379.
- Farber, E. (1984). The Multistep Nature of Cancer Development. *Cancer Res.* *44*, 4217–4223.
- Fasanaro, P., D'Alessandra, Y., Stefano, V.D., Melchionna, R., Romani, S., Pompilio, G., Capogrossi, M.C., and Martelli, F. (2008). MicroRNA-210 Modulates Endothelial Cell Response to Hypoxia and Inhibits the Receptor Tyrosine Kinase Ligand Ephrin-A3. *J. Biol. Chem.* *283*, 15878–15883.
- Fasanaro, P., Greco, S., Lorenzi, M., Pescatori, M., Brioschi, M., Kulshreshtha, R., Banfi, C., Stubbs, A., Calin, G.A., Ivan, M., et al. (2009). An Integrated Approach for Experimental Target Identification of Hypoxia-induced miR-210. *J. Biol. Chem.* *284*, 35134–35143.
- Favaro, E., Ramachandran, A., McCormick, R., Gee, H., Blancher, C., Crosby, M., Devlin, C., Blick, C., Buffa, F., Li, J.-L., et al. (2010). MicroRNA-210 Regulates Mitochondrial Free Radical Response to Hypoxia and Krebs Cycle in Cancer Cells by Targeting Iron Sulfur Cluster Protein ISCU. *PLoS ONE* *5*, e10345.
- Frisch, S.M., and Screaton, R.A. (2001). Anoikis mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 555–562.
- Gassart, A. de, Géminard, C., Février, B., Raposo, G., and Vidal, M. (2003). Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* *102*, 4336–4344.
- Gatenby, R.A., and Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* *4*, 891–899.
- Giaccia, A., Siim, B.G., and Johnson, R.S. (2003). HIF-1 as a target for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* *2*, 803–811.
- Giannakakis, A., Sandaltzopoulos, R., Greshock, J., Liang, S., Huang, J., Hasegawa, K., Li, C., O'Brien-Jenkins, A., Katsaros, D., Weber, B.L., et al. (2008). miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Biol. Ther.* *7*, 255–264.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., and Parks, W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* *51*, 1417–1423.
- Gillies, R.J., and Gatenby, R.A. (2007). Hypoxia and adaptive landscapes in the evolution of carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* *26*, 311–317.
- Gomis-Rüth, F.X. (2003). Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol. Biotechnol.* *24*, 157–202.
- Guiot, C., Degiorgis, P.G., Delsanto, P.P., Gabriele, P., and Deisboeck, T.S. (2003). Does tumor growth follow a “universal law”? *J. Theor. Biol.* *225*, 147–151.

- Gupta, G.P., and Massagué, J. (2006). Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* 127, 679–695.
- Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W., and Weinberg, R.A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464–468.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Heiden, M.G.V., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324, 1029–1033.
- Hemler, M.E. (2005). Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 801–811.
- Hemler, M.E. (2014). Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. *Nat. Rev. Cancer* 14, 49–60.
- Hernandez-Gea, V., and Friedman, S.L. (2011). Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6, 425–456.
- Hiratsuka, S., Watanabe, A., Sakurai, Y., Akashi-Takamura, S., Ishibashi, S., Miyake, K., Shibuya, M., Akira, S., Aburatani, H., and Maru, Y. (2008). The S100A8–serum amyloid A3–TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat. Cell Biol.* 10, 1349–1355.
- Holleran, J.L., Egorin, M.J., Zuhowski, E.G., Parise, R.A., Musser, S.M., and Pan, S. (2003). Use of high-performance liquid chromatography to characterize the rapid decomposition of wortmannin in tissue culture media. *Anal. Biochem.* 323, 19–25.
- Holmes, D.J. (2003). DBA/2 Mouse. *Sci. Aging Knowl. Environ.* 2003, as3.
- Hsu, P.P., and Sabatini, D.M. (2008). Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell* 134, 703–707.
- Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M.A., Bakhti, M., Grønberg, M., Möbius, W., Rhee, J., et al. (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A–C. *J. Cell Biol.* 189, 223–232.
- Hu, G., Drescher, K.M., and Chen, X.-M. (2012). Exosomal miRNAs: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Front. Genet.* 3, 56.
- Hurley, J.H., and Odorizzi, G. (2012). Get on the exosome bus with ALIX. *Nat. Cell Biol.* 14, 654–655.
- Hynes, R.O. (2009). The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science* 326, 1216–1219.
- Ivan, M., and Huang, X. (2014). miR-210: fine-tuning the hypoxic response. *Adv. Exp. Med. Biol.* 772, 205–227.
- Jopling, C. (2012). Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function. *RNA Biol.* 9, 137–142.
- Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 9, 239–252.
- Jung, K.-K., Liu, X.-W., Chirco, R., Fridman, R., and Kim, H.-R.C. (2006). Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J.* 25, 3934–3942.

- Jung, T., Castellana, D., Klingbeil, P., Hernández, I.C., Vitacolonna, M., Orlicky, D.J., Roffler, S.R., Brodt, P., and Zöller, M. (2009). CD44v6 Dependence of Premetastatic Niche Preparation by Exosomes. *Neoplasia* 11, 1093–1117.
- Kaelin Jr., W.G., and Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Mol. Cell* 30, 393–402.
- Kaplan, R.N., Riba, R.D., Zacharoulis, S., Bramley, A.H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D.D., Jin, D.K., Shido, K., Kerns, S.A., et al. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438, 820–827.
- Kelly, T.J., Souza, A.L., Clish, C.B., and Puigserver, P. (2011). A hypoxia-induced positive feedback loop promotes hypoxia-inducible factor 1alpha stability through miR-210 suppression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like. *Mol. Cell. Biol.* 31, 2696–2706.
- Khokha, R., Murthy, A., and Weiss, A. (2013). Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 649–665.
- Kim, H.W., Haider, H.K., Jiang, S., and Ashraf, M. (2009). Ischemic preconditioning augments survival of stem cells via miR-210 expression by targeting caspase-8-associated protein 2. *J. Biol. Chem.* 284, 33161–33168.
- King, H.W., Michael, M.Z., and Gleagle, J.M. (2012). Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* 12, 421.
- Kitamura, T., Qian, B.-Z., and Pollard, J.W. (2015). Immune cell promotion of metastasis. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 73–86.
- Klein, J., Flaherty, L., VandeBerg, J.L., and Shreffler, D.C. (1978). H-2 haplotypes, genes, regions, and antigens: First listing. *Immunogenetics* 6, 489–512.
- Kopitz, C., Gerg, M., Bandapalli, O.R., Ister, D., Pennington, C.J., Hauser, S., Flechsig, C., Krell, H.-W., Antolovic, D., Brew, K., et al. (2007). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. *Cancer Res.* 67, 8615–8623.
- Kowanzet, M., Wu, X., Lee, J., Tan, M., Hagenbeek, T., Qu, X., Yu, L., Ross, J., Korsisaari, N., Cao, T., et al. (2010). Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21248–21255.
- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* 11, 597–610.
- Krüger, A., Umansky, V., Rocha, M., Hacker, H.J., Schirmacher, V., and von Hoegen, P. (1994). Pattern and load of spontaneous liver metastasis dependent on host immune status studied with a lacZ transduced lymphoma. *Blood* 84, 3166–3174.
- Krüger, A., Schirmacher, V., and Khokha, R. (1998). The bacterial lacZ gene: an important tool for metastasis research and evaluation of new cancer therapies. *Cancer Metastasis Rev.* 17, 285–294.
- Krüger, A., Kates, R.E., and Edwards, D.R. (2010). Avoiding spam in the proteolytic internet: Future strategies for anti-metastatic MMP inhibition. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1803, 95–102.
- Kucharzewska, P., Christianson, H.C., Welch, J.E., Svensson, K.J., Fredlund, E., Ringnér, M., Mörgelin, M., Bourseau-Guilmain, E., Bengzon, J., and Belting, M. (2013). Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 7312–7317.

- Lee, J.-H., Choi, J.-W., and Kim, Y.-S. (2011). Plasma or serum TIMP-1 is a predictor of survival outcomes in colorectal cancer: a meta-analysis. *J. Gastrointest. Liver Dis. JGLD* 20, 287–291.
- Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., and Todaro, G. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 17, 62–70.
- Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H.-G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B., and Knolle, P.A. (2000). Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8<sup>+</sup> T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat. Med.* 6, 1348–1354.
- Liu, H., Chen, B., and Lilly, B. (2008). Fibroblasts potentiate blood vessel formation partially through secreted factor TIMP-1. *Angiogenesis* 11, 223–234.
- Liu, Y., Cox, S.R., Morita, T., and Kourembanas, S. (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ. Res.* 77, 638–643.
- De Lorenzo, M.S., Ripoll, G.V., Yoshiji, H., Yamazaki, M., Thorgerirsson, U.P., Alonso, D.F., and Gomez, D.E. (2003). Altered tumor angiogenesis and metastasis of B16 melanoma in transgenic mice overexpressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Vivo Athens Greece* 17, 45–50.
- Lowe, S.W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, 307–315.
- Lukashev, M.E., and Werb, Z. (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* 8, 437–441.
- Mason, S.D., and Joyce, J.A. (2011). Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol.* 21, 228–237.
- McCormick, R.I., Blick, C., Ragoussis, J., Schoedel, J., Mole, D.R., Young, A.C., Selby, P.J., Banks, R.E., and Harris, A.L. (2013). miR-210 is a target of hypoxia-inducible factors 1 and 2 in renal cancer, regulates ISCU and correlates with good prognosis. *Br. J. Cancer* 108, 1133–1142.
- McDonald, J.K. (1985). An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. *Histochem. J.* 17, 773–785.
- Mehlem, A., Hagberg, C.E., Muhl, L., Eriksson, U., and Falkevall, A. (2013). Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat. Protoc.* 8, 1149–1154.
- Mehlen, P., and Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nat. Rev. Cancer* 6, 449–458.
- Mekada, K., Abe, K., Murakami, A., Nakamura, S., Nakata, H., Moriwaki, K., Obata, Y., and Yoshiki, A. (2009). Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp. Anim. Jpn. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 58, 141–149.
- Melo, S.A., Sugimoto, H., O'Connell, J.T., Kato, N., Villanueva, A., Vidal, A., Qiu, L., Vitkin, E., Perelman, L.T., Melo, C.A., et al. (2014). Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell* 26, 707–721.
- Menendez, J.A., and Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 7, 763–777.
- De Mingo, M., Morán, A., Sánchez-Pernaute, A., Iniesta, P., Díez-Valladares, L., Pérez-Aguirre, E., de Juan, C., García-Aranda, C., Díaz-López, A., García-Botella, A., et al. (2007). Expression of MMP-9 and TIMP-1 as prognostic markers in gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 54, 315–319.

- Morris, S.M. (2002). Regulation of Enzymes of the Urea Cycle and Arginine Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 87–105.
- Mott, J.D., and Werb, Z. (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 558–564.
- Mueller, M.M., and Fusenig, N.E. (2004). Friends or foes — bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 839–849.
- Munder, M. (2009). Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br. J. Pharmacol.* 158, 638–651.
- Murphy, G. (2011). Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol.* 12, 233.
- Murphy, G., Willenbrock, F., Crabbe, T., O’Shea, M., Ward, R., Atkinson, S., O’Connell, J., and Docherty, A. (1994). Regulation of Matrix Metalloproteinase Activity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 732, 31–41.
- Nagase, H., and Brew, K. (2003). Designing TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) variants that are selective metalloproteinase inhibitors. *Biochem. Soc. Symp.* 201–212.
- Nguyen, D.X., Bos, P.D., and Massagué, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer* 9, 274–284.
- Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., et al. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* 12, 19–30.
- Overall, C.M., and Blobel, C.P. (2007). In search of partners: linking extracellular proteases to substrates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 245–257.
- Overall, C.M., and Kleinfeld, O. (2006a). Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 6, 227–239.
- Overall, C.M., and Kleinfeld, O. (2006b). Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy. *Br. J. Cancer* 94, 941–946.
- Paget, S. (1889). The Distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet* 133, 571–573.
- Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 12, 252–264.
- Park, J.E., Tan, H.S., Datta, A., Lai, R.C., Zhang, H., Meng, W., Lim, S.K., and Sze, S.K. (2010). Hypoxic Tumor Cell Modulates Its Microenvironment to Enhance Angiogenic and Metastatic Potential by Secretion of Proteins and Exosomes. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 1085–1099.
- Peinado, H., Lavotshkin, S., and Lyden, D. (2011). The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: Old sayings and new thoughts. *Semin. Cancer Biol.* 21, 139–146.
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., et al. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* 18, 883–891.
- Pfeffer, S.R. (2010). Two Rabs for exosome release. *Nat. Cell Biol.* 12, 3–4.

- Pols, M.S., and Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp. Cell Res.* 315, 1584–1592.
- Psaila, B., and Lyden, D. (2009). The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat. Rev. Cancer* 9, 285–293.
- Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* 9, 677–684.
- Puisségur, M.-P., Mazure, N.M., Bertero, T., Pradelli, L., Grosso, S., Robbe-Sermesant, K., Maurin, T., Lebrigand, K., Cardinaud, B., Hofman, V., et al. (2011). miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell Death Differ.* 18, 465–478.
- Pulkkinen, K., Malm, T., Turunen, M., Koistinaho, J., and Ylä-Herttuala, S. (2008). Hypoxia induces microRNA miR-210 in vitro and in vivo: Ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by miR-210. *FEBS Lett.* 582, 2397–2401.
- Qin, Q., Furong, W., and Baosheng, L. (2014). Multiple functions of hypoxia-regulated miR-210 in cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* CR 33, 50.
- Qu, A., Du, L., Yang, Y., Liu, H., Li, J., Wang, L., Liu, Y., Dong, Z., Zhang, X., Jiang, X., et al. (2014). Hypoxia-inducible MiR-210 is an independent prognostic factor and contributes to metastasis in colorectal cancer. *PloS One* 9, e90952.
- Rana, S., and Zöller, M. (2011). Exosome target cell selection and the importance of exosomal tetraspanins: a hypothesis. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 559–562.
- Rana, S., Yue, S., Stadel, D., and Zöller, M. (2012). Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 1574–1584.
- Rauvala, M., Puistola, U., and Turpeenniemi-Hujanen, T. (2005). Gelatinases and their tissue inhibitors in ovarian tumors; TIMP-1 is a predictive as well as a prognostic factor. *Gynecol. Oncol.* 99, 656–663.
- Raz, A., McLellan, W.L., Hart, I.R., Bucana, C.D., Hoyer, L.C., Sela, B.-A., Dragsten, P., and Fidler, I.J. (1980). Cell Surface Properties of B16 Melanoma Variants with Differing Metastatic Potential. *Cancer Res.* 40, 1645–1651.
- Reymond, N., d'Água, B.B., and Ridley, A.J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 13, 858–870.
- Ridnour, L.A., Barasch, K.M., Windhausen, A.N., Dorsey, T.H., Lizardo, M.M., Yfantis, H.G., Lee, D.H., Switzer, C.H., Cheng, R.Y.S., Heinecke, J.L., et al. (2012). Nitric Oxide Synthase and Breast Cancer: Role of TIMP-1 in NO-mediated Akt Activation. *PLoS ONE* 7, e44081.
- Ries, C. (2014). Cytokine functions of TIMP-1. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 71, 659–672.
- Roderfeld, M., Graf, J., Giese, B., Salguero-Palacios, R., Tschuschner, A., Müller-Newen, G., and Roeb, E. (2007). Latent MMP-9 is bound to TIMP-1 before secretion. *Biol. Chem.* 388, 1227–1234.
- Rodríguez, D., Morrison, C.J., and Overall, C.M. (2010). Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1803, 39–54.
- Roeb, E., Graeve, L., Müllberg, J., Matern, S., and Rose-John, S. (1994). TIMP-1 protein expression is stimulated by IL-1 beta and IL-6 in primary rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 349, 45–49.

- Savina, A., Vidal, M., and Colombo, M.I. (2002). The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J. Cell Sci.* *115*, 2505–2515.
- Sceneay, J., Smyth, M.J., and Möller, A. (2013). The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer Metastasis Rev.* *32*, 449–464.
- Schambach, A., Mueller, D., Galla, M., Versteegen, M.M.A., Wagemaker, G., Loew, R., Baum, C., and Bohne, J. (2006). Overcoming promoter competition in packaging cells improves production of self-inactivating retroviral vectors. *Gene Ther.* *13*, 1524–1533.
- Schelter, F., Kobuch, J., Moss, M.L., Becherer, J.D., Comoglio, P.M., Boccaccio, C., and Krüger, A. (2010). A Disintegrin and Metalloproteinase-10 (ADAM-10) Mediates DN30 Antibody-induced Shedding of the Met Surface Receptor. *J. Biol. Chem.* *285*, 26335–26340.
- Schelter, F., Grandl, M., Seubert, B., Schaten, S., Hauser, S., Gerg, M., Boccaccio, C., Comoglio, P., and Krüger, A. (2011a). Tumor cell-derived Timp-1 is necessary for maintaining metastasis-promoting Met-signaling via inhibition of Adam-10. *Clin. Exp. Metastasis* *28*, 793–802.
- Schelter, F., Halbgewachs, B., Bäumler, P., Neu, C., Görlach, A., Schrötzlmair, F., and Krüger, A. (2011b). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1-induced scattered liver metastasis is mediated by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Clin. Exp. Metastasis* *28*, 91–99.
- Schofield, C.J., and Ratcliffe, P.J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 343–354.
- Schröder, H.M., Hoffmann, S.C., Hecker, M., Korff, T., and Ludwig, T. (2013). The tetraspanin network modulates MT1-MMP cell surface trafficking. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *45*, 1133–1144.
- Schueler, M., Zhang, Q., Schlesinger, J., Tönjes, M., and Sperling, S.R. (2012). Dynamics of Srf, p300 and histone modifications during cardiac maturation in mouse. *Mol. Biosyst.* *8*, 495–503.
- Semenza, G.L. (2000). HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* *14*, 1983–1991.
- Semenza, G.L. (2001). HIF-1, O<sub>2</sub>, and the 3 PHDs: How Animal Cells Signal Hypoxia to the Nucleus. *Cell* *107*, 1–3.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 721–732.
- Semenza, G.L. (2007). Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) Pathway. *Sci. Signal.* *2007*, cm8–cm8.
- Semenza, G.L. (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *20*, 51–56.
- Seubert, B., Grünwald, B., Kobuch, J., Cui, H., Schelter, F., Schaten, S., Siveke, J.T., Lim, N.H., Nagase, H., Simonavicius, N., et al. (2015). Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 creates a premetastatic niche in the liver through SDF-1/CXCR4-dependent neutrophil recruitment in mice. *Hepatology*. *Baltim. Md* *61*, 238–248.
- Stetler-Stevenson, W.G. (2008). Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Cell Signaling: Metalloproteinase-Independent Biological Activities. *Sci. Signal.* *1*, re6–re6.
- Stoorvogel, W., Kleijmeer, M.J., Geuze, H.J., and Raposo, G. (2002). The Biogenesis and Functions of Exosomes. *Traffic* *3*, 321–330.
- Sun, W., Julie Li, Y.-S., Huang, H.-D., Shyy, J.Y.-J., and Chien, S. (2010). microRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* *12*, 1–27.

- Symonds, H., Krall, L., Remington, L., Saenz-Robles, M., Lowe, S., Jacks, T., and Van Dyke, T. (1994). p53-Dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* 78, 703–711.
- Taipale, J., and Keski-Oja, J. (1997). Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.* 11, 51–59.
- Takino, T., Miyamori, H., Kawaguchi, N., Uekita, T., Seiki, M., and Sato, H. (2003). Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 160–166.
- Théry, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 569–579.
- Tomasetti, C., and Vogelstein, B. (2015). Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* 347, 78–81.
- Toricelli, M., Melo, F.H., Peres, G.B., Silva, D.C., and Jasiulionis, M.G. (2013). Timp1 interacts with beta-1 integrin and CD63 along melanoma genesis and confers anoikis resistance by activating PI3-K signaling pathway independently of Akt phosphorylation. *Mol. Cancer* 12, 22.
- Tsuchiya, S., Fujiwara, T., Sato, F., Shimada, Y., Tanaka, E., Sakai, Y., Shimizu, K., and Tsujimoto, G. (2011). MicroRNA-210 regulates cancer cell proliferation through targeting fibroblast growth factor receptor-like 1 (FGFRL1). *J. Biol. Chem.* 286, 420–428.
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 785–799.
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., et al. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347, 1260419.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659.
- De Visser, K.E., Eichten, A., and Coussens, L.M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer* 6, 24–37.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science* 339, 1546–1558.
- Waddington, S.N., McVey, J.H., Bhella, D., Parker, A.L., Barker, K., Atoda, H., Pink, R., Buckley, S.M.K., Greig, J.A., Denby, L., et al. (2008). Adenovirus Serotype 5 Hexon Mediates Liver Gene Transfer. *Cell* 132, 397–409.
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science* 123, 309–314.
- Warner, R. (2013). Analysis Of The Structure And Function Of A Timp-1/cd63 Complex And Its Relationship To An Mt1-Mmp/cd63 Complex. Wayne State Univ. Diss.
- Warner, R.B., Jung, Y.-S., and Kim, H.-R.C. (2013). Abstract A25: Insights into TIMP-1/CD63 interaction and their functional relationship with MT1-MMP in cancer progression. *Cancer Res.* 73, A25–A25.
- Webb, C.S., Bonnema, D.D., Ahmed, S.H., Leonardi, A.H., McClure, C.D., Clark, L.L., Stroud, R.E., Corn, W.C., Finklea, L., Zile, M.R., et al. (2006). Specific temporal profile of matrix metalloproteinase release occurs in patients after myocardial infarction: relation to left ventricular remodeling. *Circulation* 114, 1020–1027.

- Wels, J., Kaplan, R.N., Rafii, S., and Lyden, D. (2008). Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev.* *22*, 559–574.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* *11*, 228–234.
- Wykoff, C.C., Beasley, N.J., Watson, P.H., Turner, K.J., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, G.D., Turley, H., Talks, K.L., Maxwell, P.H., et al. (2000). Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* *60*, 7075–7083.
- Xia, Y., Yeddula, N., Leblanc, M., Ke, E., Zhang, Y., Oldfield, E., Shaw, R.J., and Verma, I.M. (2012). Reduced cell proliferation by IKK2 depletion in a mouse lung cancer model. *Nat. Cell Biol.* *14*, 257–265.
- Yang, J., and Weinberg, R.A. (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Dev. Cell* *14*, 818–829.
- Ying, Q., Liang, L., Guo, W., Zha, R., Tian, Q., Huang, S., Yao, J., Ding, J., Bao, M., Ge, C., et al. (2011). Hypoxia-inducible MicroRNA-210 augments the metastatic potential of tumor cells by targeting vacuole membrane protein 1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* *54*, 2064–2075.
- Ylisirniö, S., Höyhty, M., and Turpeenniemi-Hujanen, T. (2000). Serum matrix metalloproteinases -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases -1, -2 in lung cancer--TIMP-1 as a prognostic marker. *Anticancer Res.* *20*, 1311–1316.
- Yoshiji, H., Harris, S.R., Raso, E., Gomez, D.E., Lindsay, C.K., Shibuya, M., Sinha, C.C., and Thorgeirsson, U.P. (1998). Mammary carcinoma cells over-expressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1 show enhanced vascular endothelial growth factor expression. *Int. J. Cancer* *75*, 81–87.
- Yoshioka, Y., Kosaka, N., Ochiya, T., and Kato, T. (2012). Micromanaging iron homeostasis: Hypoxia-inducible miR-210 suppresses iron homeostasis-related proteins. *J. Biol. Chem.* jbc.M112.356717.
- Yu, D., Wolf, J.K., Scanlon, M., Price, J.E., and Hung, M.C. (1993). Enhanced c-erbB-2/neu expression in human ovarian cancer cells correlates with more severe malignancy that can be suppressed by E1A. *Cancer Res.* *53*, 891–898.
- Zöller, M. (2009). Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 40–55.
- Zou, W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 263–274.
- Zucker, S., Cao, J., and Chen, W.-T. (2000). Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* *19*, 6642–6650.

## 6. Publikationen

Im direkten Zusammenhang mit der Dissertation stehende Publikationen:

Cui H, Seubert B, Stahl E, Dietz H, Reuning U, Moreno-Leon L, Ilie M, Hofman P, Nagase H, Mari B, Krüger A. „Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Induces a pro-Tumourigenic Increase of miR-210 in Lung Adenocarcinoma Cells and Their Exosomes“. *Oncogene* (29. September 2014): doi:10.1038/onc.2014.300.

Cui H\*, Grosso S\*, Schelter F, Mari B\*, und Krüger A\*. „On the Pro-Metastatic Stress Response to Cancer Therapies: Evidence for a Positive Co-Operation between TIMP-1, HIF-1 $\alpha$ , and miR-210“. *Frontiers in Pharmacology* 3 (12. July 2012): 134. doi:10.3389/fphar.2012.00134.

Weitere Publikationen:

Seubert B\*, Grünwald B\*, Kobuch J\*, Cui H\*, Schelter F, Schaten S, Siveke JT, Lim NH, Nagase H, Simonavicius N, Heikenwalder M, Reinheckel T, Sleeman JP, Janssen KP, Knolle PA Krüger A. „TIMP-1 Creates a Pre-Metastatic Niche in the Liver through SDF-1/CXCR4-Dependent Neutrophil Recruitment in Mice“. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 61, Nr. 1 (Januar 2015): 238-48. doi:10.1002/hep.27378.

Seubert B\*, Cui H\*, Simonavicius N, Honert K, Schäfer S, Reuning U, Heikenwalder M, Mari B und Krüger A. „Tetraspanin CD63 Acts as a pro-Metastatic Factor via  $\beta$ -Catenin Stabilization“. *International Journal of Cancer* 136, Nr. 10 (15. Mai 2015): 2304-15. doi:10.1002/ijc.29296.

\*Die Autoren haben gleichermaßen beigetragen.

Stein ML, Cui H, Beck P, Dubiella C, Voss C, Krüger A, Schmidt B und Groll M. „Systematic Comparison of Peptidic Proteasome Inhibitors Highlights the A-Ketoamide Electrophile as an Auspicious Reversible Lead Motif“. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 53, Nr. 6 (3. Februar 2014): 1679–83. doi:10.1002/anie.201308984.

Dubiella C, Cui H, Gersch M, Brouwer AJ, Sieber SA, Krüger A, Liskamp RMJ und Groll M. „Selective Inhibition of the Immunoproteasome by Ligand-Induced Crosslinking of the Active Site“. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 53, Nr. 44 (27. Oktober 2014): 11969–73. doi:10.1002/anie.201406964.

Akzeptierte Manuskripte:

Kobuch J, Cui H, Grünwald B, Saftig P, Knolle PA, Krüger A. “TIMP-1 signaling *via* CD63 triggers granulopoiesis and neutrophilia in mice.” *Haematologica*, 2015.

## 7. Danksagung

Als erstes gilt mein Dank meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Achim Krüger für die interessante Aufgabenstellung und das Thema meiner Doktorarbeit. Ohne die in seiner Gruppe erfolgten Vorarbeiten und die sehr gut etablierten Methoden wäre eine Bearbeitung dieser komplexen Thematik nicht möglich gewesen. Bei anfänglichen Schwierigkeiten stand er stets beratend zur Seite. Durch das Gewährleisten von Forschungsfreiheit zusammen mit kritischem Hinterfragen der Arbeiten ermöglichte er das Bearbeiten von interessanten Themen und ein flexibles Entwickeln der Projekte. Ich möchte mich daher sehr herzlich für das entgegengebrachte Vertrauen und die Zusammenarbeit bedanken. Ebenso bedanke ich mich für die lebhaften Diskussionen während der Laborbesprechungen und der Seminare. Auch die Gelegenheiten, meine Ergebnisse auf Winterschulen und Kongressen vorzustellen, waren sehr wertvoll. Weiterhin möchte ich mich bedanken, dass ich auch neben der alltäglichen Laborarbeit Einblick in das Erstellen von Anträgen verschiedener Art gewinnen und damit interessante Blicke über den Tellerrand hinaus erlangen konnte. Zuletzt gilt mein Dank für die Unterstützung während des Verfassens dieser Arbeit, das kritische Korrekturlesen und die dabei geleistete umfassende Hilfe.

Meinen Kollegen Julia Kobuch, Barbara Grünwald, Dirk Weinspach, Bastian Seubert, Dr. Sonja Bertold, Klaus Mantwill, Dr. Susanne Schaten und Katja Honert bin ich zu großem Dank und Freundschaft verpflichtet. Ohne sie wäre es ausgeschlossen gewesen, dass auch nur ein Teil der hier gezeigten Arbeit und die Menge an Spaß währenddessen zustande gekommen wären.

Ich möchte mich auch herzlich bei allen bedanken, die bereit waren, ein Praktikum, eine Masterarbeit oder eine Bachelorarbeit unter meiner Anleitung zu absolvieren: Carolin Wander, Claudia Buhler, Ramona Gerhards, Dominik Alterauge, Andreas Stengl, Christian Urban, Anna-Lena Späth, Ria Spallek, Tanja Wiersch, Katrin Fischer, Sandra Schäfer, Marietta Landgraf und Georg Sedlmeier waren mir in allen Lebenslagen eine große Hilfe in der Zeit in der sie da waren und die Zusammenarbeit war sehr erfreulich. Viele Projekte wären ohne ihre Mitarbeit nicht möglich gewesen und ich freue mich sehr, wann immer ich einen der hier Genannten treffe.

Weiterhin danke ich den Kooperationspartnern, die eine Methodenvielfalt ermöglicht haben, die sonst nicht denkbar gewesen wäre: Prof. Hideaki Nagase und Prof. Gillian Murphy erlaubten mit der

Bereitstellung von rekombinanten TIMP-1 überhaupt erst das Entstehen eines Großteils der Ergebnisse, Prof. Ute Reuning für die Einweisung in das Konfokalmikroskop, Evi Stahl und Prof. Hendrik Dietz für die Transmissionselektronenmikroskopiebilder (das ist ein langes Wort), Fabian Coscia am Lehrstuhl von Matthias Mann für die Proteomanalysen, Prof. Bernard Mari für das Erstellen eines Transkriptoms, Dr. Martin Stein, Christian Dubiella, Dr. Philipp Beck und Prof. Michael Groll für eine sehr interessante, ertragreiche Kooperation und alles danach, Dr. Dirk Wohlleber, Silke Hegenbarth, Dr. Bastian Höchst und Prof. Percy Knolle für die Bereitstellung des B3Z-basierten T-Zellaktivierungsassays und der technischen Hilfe auf dem Weg, für Journal Clubs und Gruppenseminare und allen zusammen für das immer sehr unkomplizierte, offene, freundliche und hilfsbereite Arbeitsklima. Es hat mich wirklich sehr gefreut.

Weiterhin möchte ich mich bei weiteren Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung/Institut für Molekulare Immunologie für die wirklich schöne Zeit und die guten Beziehungen bedanken: Dr. Youlia Kostova, Katja Dumler, Anja Wolf und PD Martina Anton für das Schaffen einer überaus angenehmen Arbeitsatmosphäre, Mehrije Ferizi, Zoreh Badiyan, Gerlinde Stejskal, Dr. Dialekti Vlaskou, PD Olga Mykhaylyk, Dr. Ulrike Schillinger, Dr. Christian Koch und Prof. Christian Plank für nette Unterhaltungen zu allen Gelegenheiten, Themen und Uhrzeiten, Dr. Vroni Girbinger, Sava Michailidou, Hildegard Kavelage und PD Per Sonne Holm für Plauschen und Gesellschaft, Josef Straßmair, Edelburga Hammerschmidt, Brigitte Kätzel, Sandra Kimmerle, Daniel Schätzlein und Dr. Anton Steger für alles am Laufen halten und nette Ganggespräche. Ich habe von jedem so viel lernen können und ich freue mich sehr, dass es so eine tolle Gemeinschaft und schöne Zeit während der gesamten Doktorarbeit war!

Ausdrücklich möchte ich an dieser Stelle noch Florian Praetorius, Evi Stahl und Julia Kobuch für das Korrekturlesen dieser Arbeit hervorheben. Vielen Dank für die Zeit und Mühe, die ihr investiert habt, ich hoffe, ich kann es bald zurückgeben!

Abschließend möchte ich mich bei Familie und Freunden bedanken. Vielen, vielen Dank für alles, ich mag euch wirklich sehr gerne!

## 8. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der Fakultät für Medizin der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Die Rolle von TIMP-1 in der tumorfördernden Stressantwort in Tumorzelle und Wirt

in *Experimental Medicine* am TUM Medical Graduate Center, am Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie

unter der Anleitung und Betreuung durch

Prof. Dr. rer. nat. Achim Krüger

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe