

Regulation der Phorbol-12-myristat-13-acetat-induzierten Matrix-
Metalloproteinase-9-Expression in humanen
Brustkrebszelllinien durch Stickstoffmonoxid

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Christine Jespersen

geb. am 19.10.1977 in Darmstadt

Mainz, 2008

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Matrix-Metalloproteinasen | 1 |
| 1.1.1. Einteilung, Lokalisierung und Struktur der MMPs | 1 |
| 1.1.2. Regulation der MMPs | 4 |
| 1.1.3. Rolle von MMPs bei der Tumorentstehung: mechanistische Grundlagen | 8 |
| 1.1.4. Rolle von MMPs bei der Tumorentstehung: pathophysiologische Grundlagen | 10 |
| 1.1.5. Bedeutung von MMP-Inhibitoren als zukünftige Krebstherapeutika | 11 |
| 1.2. Brustkrebszelllinien als Modelle des Mammakarzinoms | 13 |
| 1.3. Die Protein-Kinase-C-Familie | 13 |
| 1.4. Transkriptionskontrolle durch Histonacetylierungen: Rolle der Histondeacetylasen | 14 |
| 1.5. Stickstoffmonoxid (NO) | 14 |
| 1.5.1. Duale Rolle von NO in der Tumorgenese | 15 |
| 2. Material und Methoden | 19 |
| 2.1. Material | 19 |
| 2.1.1. Chemikalien und Reagenzien | 19 |
| 2.1.2. Antikörper und Sera | 22 |
| 2.1.3. Zelllinien | 22 |
| 2.1.4. Enzyme | 23 |
| 2.1.5. Plasmide | 23 |
| 2.1.6. Oligonukleotide | 23 |
| 2.1.7. Kits und ELISAs | 24 |
| 2.1.8. Sonstige Verbrauchsmaterialien | 24 |
| 2.1.9. Puffer und Lösungen | 24 |
| 2.1.10. Geräte | 28 |
| 2.2. Methoden | 29 |
| 2.2.1. Zellbiologische Methoden | 29 |
| 2.2.1.1. Kultivierung von humanen Brustkrebszellen und RAW-264.7-Makrophagen | 29 |
| 2.2.1.2. Stimulation von humanen Brustkrebszellen und RAW-264.7-Makrophagen | 29 |
| 2.2.1.3. Migrationsassay (Transwellassay) | 30 |
| 2.2.1.4. Kokultur | 31 |
| 2.2.2. Molekularbiologische Methoden | 32 |
| 2.2.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen | 32 |
| 2.2.2.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 32 |
| 2.2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren | 32 |
| 2.2.2.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen | 32 |
| 2.2.2.5. Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT) | 33 |
| 2.2.2.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) | 33 |
| 2.2.2.7. Real-Time PCR (Taqman) | 34 |
| 2.2.3. Manipulation von DNA | 35 |
| 2.2.3.1. Restriktionsendonuklease-Verdau | 35 |
| 2.2.3.2. Klonierung von PCR-Produkten mittels TOPO™ TA-Cloning Kit und Transformation | 36 |
| 2.2.3.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien | 36 |
| 2.2.3.4. DNA-Sequenzierung | 37 |
| 2.2.3.5. Transiente Transfektion und Reportergen-Untersuchung | 37 |
| 2.2.4. Biochemische Methoden | 38 |
| 2.2.4.1. Präparation von Zelllysaten | 38 |
| 2.2.4.2. Herstellung von Kernextrakten und zytosolischen Lysaten | 39 |
| 2.2.4.3. Bestimmung des Proteingehaltes | 39 |
| 2.2.4.4. Proteinpräzipitation mit Trichloressigsäure (TCA) | 39 |
| 2.2.4.5. Immunpräzipitation | 40 |
| 2.2.4.6. Western-Blot | 40 |
| 2.2.4.7. „Electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) | 43 |
| 2.2.4.8. Transkriptionsfaktor-Assay | 44 |
| 2.2.4.9. PKC-Assay | 44 |
| 2.2.4.10. Griess-Assay | 44 |
| 2.2.4.11. SDS-PAGE-Zymographie | 44 |
| 2.2.4.12. <i>In-vitro</i> -Zymographie | 45 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| 2.2.4.13. | Immunfluoreszenz | 45 |
| 2.2.4.14. | MMP-9-Aktivitäts-Assay | 45 |
| 2.2.4.15. | MMP-Antikörper-Array | 46 |
| 2.2.4.16. | Metabolische Markierung mit ³⁵ S-Methionin und ³⁵ S-Cystein | 46 |
| 2.2.4.17. | RNA-Isolation aus präparierten Polysomen | 47 |
| 2.2.4.18. | LDH-Assay | 47 |
| 3. | Ergebnisse | 48 |
| 3.1. | Effekt des Phorbolesters TPA und des NO-Donors DETA-NO auf die MMP-9-Spiegel im Zellkulturüberstand | 48 |
| 3.1.1. | Identifizierung von TPA- und/oder NO-regulierten MMPs und TIMPs | 48 |
| 3.1.2. | Expression der MMP-9 in verschiedenen Brustkrebszelllinien | 51 |
| 3.1.3. | Ausschluss von zytotoxischen Effekten durch TPA oder DETA-NO mittels LDH-Assay | 52 |
| 3.1.4. | Wirkung verschiedener NO-Donoren auf die TPA-induzierte MMP-9-Aktivität und Expression | 52 |
| 3.1.5. | Untersuchung zur cGMP-Abhängigkeit der NO-Effekte | 55 |
| 3.1.6. | Einfluss von ROS-Inhibitoren auf die gelatinolytische Aktivität von MMP-9 | 57 |
| 3.1.7. | Zeitabhängige Wirkung von DETA-NO auf die TPA-induzierten MMP-9-Spiegel | 57 |
| 3.2. | Effekt von DETA-NO auf die TPA-induzierte intrazelluläre MMP-9-Expression | 59 |
| 3.2.1. | Wirkung von DETA-NO auf die TPA-induzierten MMP-9-Spiegel | 59 |
| 3.2.2. | Untersuchung zu möglichen Effekten von exogenem NO auf die Proteinstabilität der MMP-9 | 61 |
| 3.2.3. | Wirkung von DETA-NO auf die Proteinneusynthese von MMP-9 | 62 |
| 3.2.4. | Potenzielle Effekte von exogenem NO auf den Gehalt der polysomalen MMP-9-mRNA | 63 |
| 3.3. | Wirkung von DETA-NO auf die TPA-induzierte MMP-9-mRNA-Expression | 65 |
| 3.3.1. | Regulation der MMP-9-mRNA-Expression durch NO | 65 |
| 3.3.2. | Potenzielle Effekte von DETA-NO auf die MMP-9-mRNA-Stabilität | 66 |
| 3.4. | Wirkung von NO auf die Promotoraktivität von MMP-9 | 67 |
| 3.5. | Wirkung von NO auf für die MMP-9-Expression relevante Transkriptionsfaktoren | 70 |
| 3.6. | Mögliche NO-vermittelte Modulation der Histonacetylierung und deren Einfluss auf die MMP-9-Expression | 77 |
| 3.7. | Untersuchung zu NO-modulierten und für die MMP-9-Expression relevanten Signalwegen | 78 |
| 3.8. | Kokultur-Experimente mit Makrophagen und MCF-7-Zellen | 82 |
| 3.8.1. | Potenzieller Effekt des von Makrophagen produzierten NO auf die TPA-induzierte MMP-9-Expression in MCF-7-Zellen | 83 |
| 3.9. | Untersuchung zu möglichen Effekten von NO auf die Migration von MCF-7-Zellen | 86 |
| 3.10. | Effekte von DETA-NO auf MDA-MB-231-Zellen | 87 |
| 3.10.1. | Modulation der TPA-induzierten MMP-9-Aktivität in MDA-MB-231-Zellen durch DETA-NO | 87 |
| 3.10.2. | Einfluss von NO auf die MMP-9-mRNA-Expression in MDA-MB-231-Zellen | 88 |
| 4. | Diskussion | 89 |
| 4.1. | Regulation der TPA-induzierten MMP-9-Expression durch NO | 90 |
| 4.2. | Rolle des cGMP und der Radikalbildung für die MMP-9-Expression | 100 |
| 4.3. | Einfluss von NO auf MMP-9-vermittelte Funktionen | 102 |
| 4.4. | Schlussfolgerung | 102 |
| 5. | Zusammenfassung | 104 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 106 |

1. Einleitung

1.1. Matrix-Metalloproteinasen

Im Jahr 1962 wurde erstmals ein Enzym beschrieben, das in der Lage war, Kollagenfasern zu degradieren (Gross und Lapiere, 1962; Xenopus-Kollagenase). Heute, mehr als fünfundvierzig Jahre später, sind mehr als 24 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) bekannt, zu denen auch die genannte Kollagenase gehört. Außer in Vertebraten wurden zahlreiche MMPs auch in Invertebraten und im Pflanzenreich identifiziert, beispielsweise in *Drosophila*, *C. elegans* und in *Arabidopsis thaliana* (für eine Übersicht s.: Somerville, 2003).

Biochemisch sind MMPs zinkabhängige Endopeptidasen, die an physiologischen und pathophysiologischen Umbauprozessen der Extrazellulären Matrix (ECM) beteiligt sind.

MMPs besitzen die folgenden gemeinsamen Charakteristika (Powell et al., 1996):

1. Sämtliche Mitglieder der MMP-Familie zeigen eine charakteristische Domänenstruktur (Abb. 1.1).
2. Substrate für MMPs sind überwiegend Proteine, welche am Aufbau der ECM und der Basalmembran beteiligt sind.
3. Die proteolytische Aktivität sämtlicher MMPs wird spezifisch durch ihre endogenen Inhibitoren, den „tissue inhibitors of matrix metalloproteinases“ (TIMPs) gehemmt.
4. Die meisten MMPs werden als inaktive Proenzyme sezerniert, während einige wenige ausschließlich als transmembrane Proenzyme nachweisbar sind.
5. Das aktive Zentrum aller MMPs enthält ein Zinkion und benötigt als einen weiteren Kofaktor Kalzium.
6. Eine maximale Enzymaktivität der MMPs wird im physiologischen pH-Bereich erreicht (zwischen pH 7,2 und pH 7,4).

1.1.1. Einteilung, Lokalisierung und Struktur der MMPs

Ursprünglich wurden MMPs nach ihrer Substratspezifität in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Matrilysine unterteilt (Egeblad und Werb, 2002). Inzwischen wurde zur besseren Übersichtlichkeit eine fortlaufende Nummerierung eingeführt und anerkannt (s. Tab. 1.1).

Tab. 1.1 Die MMP-Familie und ihre Substrate

| Enzym | Pseudonym | Kollagen-Substrate | Weitere Substrate |
|--------|---------------------|-------------------------|--|
| MMP-1 | Kollagenase-1 | I,II,III,VII,VIII,X | Aggrecan, Gelatine, MMP-2, MMP-9, TNF- α , IGF-BP-2, IGF-BP-3, IL-1 β , Perlecan, α 1-Proteinase-Inhibitor |
| MMP-2 | Gelatinase A | I,II,III,IV,V,VI,I,X,XI | Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Laminin, MMP-9, MMP-13, IL1- β , TGF- β , TNF- α , IGF-BP-3, IGF-BP-5, α 1-Proteinase-Inhibitor |
| MMP-3 | Stromelysin-1 | II,III,IV,IX,X,XI | Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Gelatine, Laminin, MMP-7, MMP-8, MMP-13, IGF-BP-3, Plasminogen, TNF- α , IL-1 β , E-Cadherin, Perlecan, α 1-Proteinase-Inhibitor |
| MMP-7 | Matrilysin | IV,X | Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Gelatine, Laminin, MMP-1, MMP-2, MMP-9, Fas-L, TNF- α , Plasminogen, α 1-Proteinase-Inhibitor |
| MMP-8 | Kollagenase-2 | I,II,II,V,VII,VI,II,X | Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Gelatine, Laminin, TNF- α , IGF-BP, α 1-Proteinase-Inhibitor |
| MMP-9 | Gelatinase B | IV,V,VII,X,XI,V | Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Gelatine, IL1- β , TGF- β , TNF- α , Plasminogen, α 1-Proteinase-Inhibitor, IL-2R α |
| MMP-10 | Stromelysin-2 | III,IV,V | Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Gelatine, Laminin, MMP-1, MMP-8 |
| MMP-11 | Stromelysin-3 | | Aggrecan, Fibronectin, Laminin, IGF-BP-1, α 1-Proteinase-Inhibitor |
| MMP-12 | Metalloelastase | IV | Elastin, Fibronectin, Gelatine, Laminin, Plasminogen, TNF- α , α 1-Proteinase-Inhibitor |
| MMP-13 | Kollagenase-3 | I,II,III,IV | Aggrecan, Gelatine, TNF- α |
| MMP-19 | RASI, Stromelysin-4 | IV | Fibronectin, Aggrecan, COMP, Laminin, Gelatine |
| MMP-20 | Enamelysin | | Aggrecan, Amelogenin, COMP |
| MMP-21 | | | |
| MMP-23 | CA-MMP | | |
| MMP-26 | Matrilysin-2 | IV | Gelatine, Fibronectin, IGF-BP-1, MMP-9, α 1-Proteinase-Inhibitor |
| MMP-28 | Epilysin | | |
| MMP-14 | MT1-MMP | I,II,III | Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Gelatine, Laminin, MMP-2, MMP-13, CD44, TNF- α , α 1-Proteinase-Inhibitor |
| MMP-15 | MT2-MMP | | Fibronectin, Gelatine, Laminin, MMP-2, TNF- α |
| MMP-16 | MT3-MMP | | MMP-2, TNF- α |
| MMP-17 | MT4-MMP | | Fibrin, Gelatine, TNF- α |
| MMP-24 | MT5-MMP | | |
| MMP-25 | MT6-MMP | IV | Gelatine, Fibronectin, Laminin, α 1-Proteinase-Inhibitor |
| MMP-27 | MMP-22, C-MMP | | |

Verändert nach: Chakraborti et al., *Molecular and Cellular Biology*, 2003; Overall und Lopez-Otin, *Nature Reviews Cancer*, 2002; Overall <http://www.clip.ubc.ca/lab/contact.html>.

Mit Ausnahme von MMP-7, MMP-23 und MMP-26 besitzen alle MMPs eine Prodomäne, eine katalytische Domäne und eine Hämapexin-/Vitronectin-ähnliche Domäne (Abb. 1.1). Sämtliche MMPs werden durch das N-terminale Propeptid in einem latenten Zustand gehalten („Cystein-switch“). Dieser wird normalerweise erst nach der Abspaltung des Propeptids aufgehoben. Die katalytische Domäne, welche über eine hochkonservierte Bindungsregion für

Zink verfügt, ist mit der Hämapexin-/Vitronektin-ähnlichen Domäne über eine Gelenkregion („Hinge“-Region) verbunden.

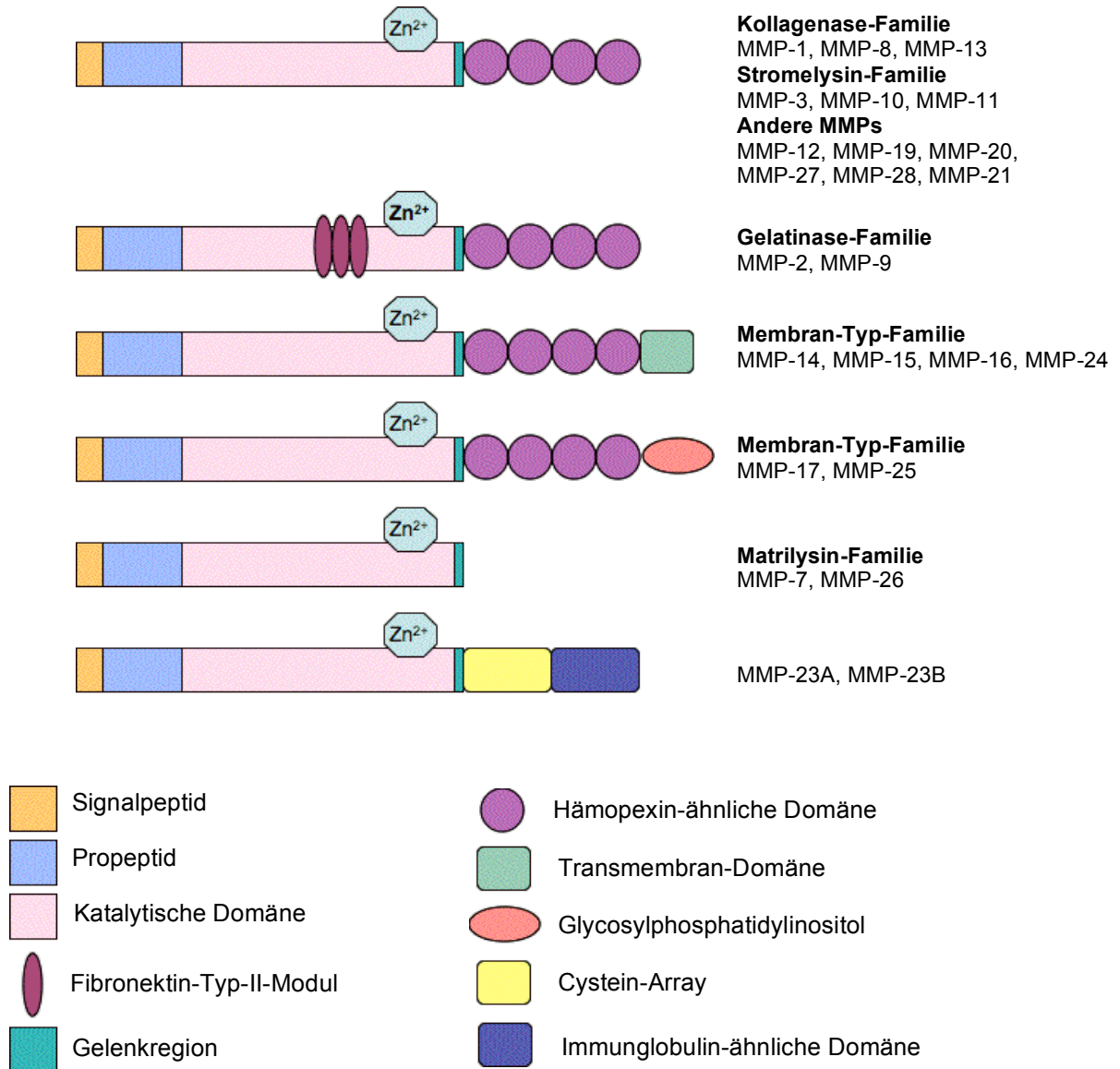


Abb. 1.1 Die Domänenstruktur der MMPs

Verändert nach Overall und Lopez-Otin, *Nature Reviews Cancer*, 2002

Für die Substratspezifität und die Interaktion mit den TIMPs ist die Hämapexin-/Vitronektin-ähnliche Domäne von essenzieller Bedeutung. Einige MMPs (MMP-14 bis MMP-17 sowie MMP-24 und MMP-25) können hingegen nicht sezerniert werden, sondern sind über eine Transmembran-Domäne oder über ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Rest in der Plasmamembran verankert. Diese werden daher als membranständige (MT)-MMPs zusammengefasst (für eine Übersicht s.: Sternlicht und Werb, 2001). MMP-23A und

MMP-23B besitzen zwar eine identische Aminosäuresequenz, werden aber von zwei unterschiedlichen Genen kodiert. Anstelle der Hämpexin-Domäne verfügen diese über eine Immunglobulin-ähnliche und eine „Cystein Array“-Domäne (Gururajan et al., 1998; Velasco et al., 1999).

Die als Gelatinasen zusammengefassten MMP-2 und MMP-9 besitzen innerhalb des Aminoterminus der katalytischen Domäne zusätzlich „Tandem-Fibronektin-Typ-II-Domänen“, welche als spezifische Bindungsdomänen für Gelatine dienen (Shipley, 1996). MMP-9 weist innerhalb seiner Gelenkregion eine zusätzliche Domäne auf, die dem Kollagen des Typs V sehr ähnelt, deren Funktion aber bislang noch unbekannt ist (Somerville, 2003).

1.1.2. Regulation der MMPs

Die Regulation der proteolytischen MMP-Aktivität findet mindestens auf drei verschiedenen Ebenen statt: der Genexpression, der Aktivierung der Pro-MMPs sowie der Inhibition durch TIMPs (Abb. 1.2). Sämtliche MMPs werden als inaktive Pro-MMPs synthetisiert, welche durch den bereits erwähnten „Cystein-switch“ in ihrer latenten Form gehalten werden. Er bezeichnet die Interaktion zwischen einer Cysteinsulphohydryl-Gruppe der Prodomäne und dem zentralen Zinkatom der katalytischen Domäne (Van Wart und Birkedal-Hansen, 1990; Springman et al., 1990).

Während die meisten MMPs als latente Enzyme sezerniert werden, besitzen MMP-11, MMP-27 und sämtliche MT-MMPs ein Furin-ähnliches Erkennungsmotiv. Dieses Motiv ermöglicht bereits eine intrazelluläre Aktivierung durch Subtilisin-ähnliche Serinproteasen (Pei und Weiss, 1995). Sezernierte MMPs können durch bereits aktivierte MMPs oder durch verschiedene Serinproteasen aktiviert werden (für eine Übersicht s.: Sternlicht und Werb, 2001; Woessner und Nagase, 2000).

Die Aktivität von MMPs wird außerdem durch intrinsische Inhibitoren wie die zuvor erwähnten TIMPs reguliert. MMPs und TIMPs bilden zumeist stöchiometrische Komplexe in einem Verhältnis von 1:1, welche dann die Aktivierung der gebundenen MMP verhindern (Brew et al., 2000). Neben den TIMPs spielt ein zweiter endogener Inhibitor eine wichtige Rolle: das α -2-Makroglobulin, ein Plasmaprotein, welches an MMPs bindet und mit diesen einen katalytisch inaktiven MMP-Makroglobulin-Komplex bildet (Sottrup-Jensen und Birkedal-Hansen, 1989).

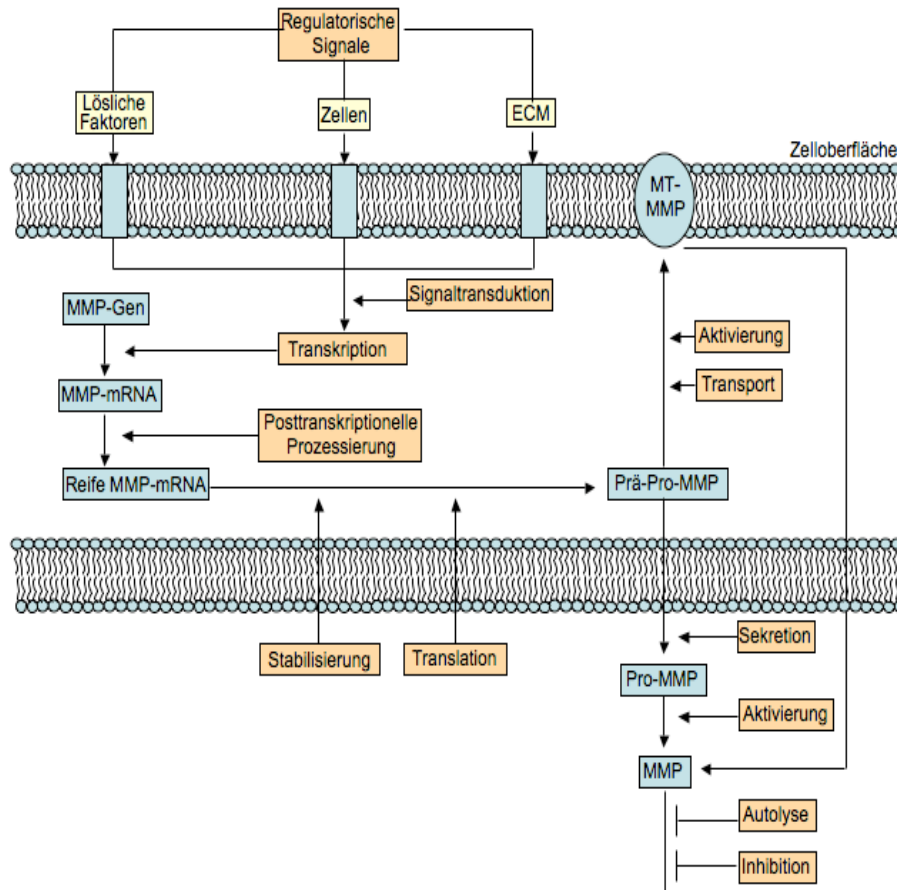


Abb. 1.2 Regulationsebenen der MMPs (nach Overall und Lopez-Otin, *Nature Reviews Cancer*, 2002)

Die konstitutive Expression, die für fast alle beschriebenen MMPs unter den meisten physiologischen Bedingungen gering ist, kann unter bestimmten Voraussetzungen, bei denen Umbauprozesse der ECM stattfinden, induziert werden. Zu den potentesten Stimuli vieler MMPs zählen proinflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und die als Tumorpromotoren wirksamen Phorbolester (Kheradmand et al., 1998; Sternlicht und Werb, 1999). Die Vielfalt der externen Stimuli für MMPs spiegelt sich auf Ebene der die MMPs regulierenden Signaltransduktionswege wider. Diese beinhalten besonders häufig Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK)-abhängige Signalwege, zu denen die p38-MAPK, die Jun-N-terminalen Kinasen/Stress-aktivierten Proteinkinasen (JNK/SAPK) und die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) zählen (Westermarck und Kähäri, 1999; Simon et al., 1998; Johansson et al., 2000; Eberhardt et al., 2000a).

Der ERK1/2-Signalweg kann beispielsweise durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und anderen Mitogenen stimuliert werden. Im Gegensatz dazu werden die JNK/SAPK- und p38-MAPK-Signalwege vorwiegend durch Stress-Stimuli wie UV und Sauerstoffradikale oder durch inflammatorische Zytokine induziert (Robinson et al., 1997; Paul et al., 1997). Durch

eine MAPK-abhängige Phosphorylierung können für die MMP-Transkription wichtige Transkriptionsfaktoren wie z.B. Aktivator Protein 1 (AP-1) (Franklin et al., 1995; Kajanne et al., 2007; Lee et al., 2007) oder Ets (Liu et al., 2005; Lynch et al., 2004) aktiviert werden (Newberry et al., 1997; Weng et al., 2008; Cortez et al., 2007; Reunanen et al., 2002).

Ein weiterer zentraler Regulationsweg über den die Aktivierung der MMP-Expression erfolgt ist die Protein-Kinase-C (PKC) (s. Kapitel 1.3), welche in den meisten Zellen durch eine Stimulation mit dem Phorbol-ester 12-O-Tetradekanoylphorbol-13-Azetat (TPA) aktiviert wird. Wie bereits erwähnt, können Phorbol-ester wie TPA sowie bestimmte Wachstumsfaktoren und Zytokine zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 führen (Chakraborti et al., 2003; McDonnell et al., 1990). AP-1-bindende Promotorregionen werden daher auch als TPA-responsible Elemente (TRE) bezeichnet (Angel et al., 1987; Lee et al., 1987). Der AP-1-Komplex setzt sich in den meisten Fällen aus den Untereinheiten c-Jun und c-Fos zusammen. AP-1-Transkriptionsfaktoren sind Leucin-Zipper-Proteine, die an die DNA-Konsensus-Sequenz 5'-TGAG/CTCA-3' binden (Karin et al., 1997). Viele MMPs besitzen in ihrem Promotor mindestens eine Bindungsstelle für AP-1, welche häufig etwa 70bp aufwärts des Transkriptionsstarts lokalisiert ist. Neben dieser AP-1-Bindungsstelle sind in dem 5'-Bereich von MMP-1, -3 und -9 zusätzliche Bindungsstellen für AP-1 zu finden (s. Abb. 1.3) (Gum et al., 1996; Chakraborti et al., 2003).

Konservierte „Polyoma enhancer A binding protein 3“- („E26 transformation-specific“ (PEA3/Ets) Elemente, an die Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie binden, sind ebenfalls in fast allen induzierbaren MMPs zu finden (Gum et al., 1996; Chakraborti et al., 2003) (Abb.1.3). Diese liegen in den betreffenden MMP-Promotoren häufig in unmittelbarer Nähe eines AP-1 Elementes, so auch im Falle des MMP-9-Promotors (Abb. 1.3). Ets-Transkriptionsfaktoren sind Proteine mit einem Helix-turn-helix-Motiv, die durch eine hochkonservierte Ets-Domäne charakterisiert sind, welche der Erkennung der PEA3-spezifischen Promotorsequenz (CGGAA/T) dient (Sharrocks et al., 1997). Sie bilden häufig Komplexe mit anderen Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 und wirken dann als Koaktivatoren (Carrère et al., 1998).

Des Weiteren können einige induzierbare MMPs wie z.B. MMP-1 (Fan et al., 2006; Bond et al. 1999), -3 (Bond et al., 1999), -9 (Hah et al., 2003) und -14 (Han et al., 2001) durch die Stimulation inflammatorischer Stimuli über den Transkriptionsfaktor Nuklear-Faktor- κ B (NF κ B) induziert werden (Mercurio und Manning, 1999). Für MMP-9 ist bereits ein cis-regulatorisches NF κ B Element 600bp aufwärts des Transkriptionsstarts beschrieben worden. An dieses Element bindet NF κ B als Dimer, welches sich meistens aus den Untereinheiten

p65/p50 zusammensetzt. Im inaktiven Zustand ist NFκB als Komplex mit dem inhibitorischen kappa-B-Protein (IκB) im Zytosol assoziiert. Die Aktivierung von NFκB wird über eine Phosphorylierung des IκB vermittelt, welche zu einer Ubiquitinierung und einem proteolytischen Abbau von IκB führt. Durch den Abbau des IκBs kann NFκB in den Zellkern translozieren und dort zu einer Aktivierung NFκB-abhängiger Zielgene wie z.B. MMP-9 führen (für eine Übersicht s.: Chen und Greene, 2004). Einige MMP-Promotoren, u.a. auch MMP-9 (s. Abb. 1.3), enthalten zusätzlich sogenannte GC-Boxen, welche als Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der „Specificity protein 1“ (Sp1)-Familie identifiziert worden sind (s. Abb. 1.3; Gum et al., 1996). Der Transkriptionsfaktor Sp1 wird ubiquitär in Säugetieren exprimiert und reguliert Gene, die an zellulären Homöostase-Prozessen beteiligt sind, wie z.B. die Superoxid-Dismutase (Cawley et al., 2004; Minc et al., 1999). Das Zinkfingerprotein Snail (Boulay et al., 1987), das zur Snail-Proteinfamilie gehört, ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der bei der Expression einiger MMPs, einschließlich MMP-9, nachweislich beteiligt ist. Eine detaillierte Bindungssequenz für Snail konnte in MMP-Promotoren indessen bislang nicht identifiziert werden (Miyoshi et al., 2004; Yokoyama et al., 2003; Jordà et al., 2005). Ein Transkriptionsfaktor, der inhibierend auf die MMP-9-Expression wirkt, ist der so genannte Wilms Tumor Faktor 1 (WT-1), ein Transkriptionsfaktor mit einem Zinkfinger-Motiv, welcher an GC- und TC-reiche DNA-Konsensussequenzen bindet (Marcet-Palacios et al., 2007). Der Name des Transkriptionsfaktors ist auf sein kodierendes Gen WT-1 zurückzuführen. Dieses auch als Wilms-Tumor-Suppressorgen bezeichnete Gen ist bei 10-15% aller Patienten mit Wilms-Tumoren, einem nach seinem Entdecker Dr. Max Wilms benannten Nierentumor, mutiert (Haber et al., 1990).

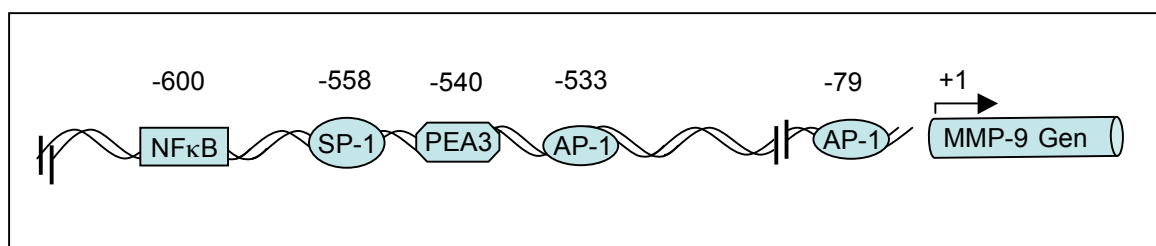


Abb. 1.3 Schematische Darstellung eines für die MMP-9-Regulation wichtigen Teils des Promotors

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass einzelne MMPs, wie die MMP-9, zusätzlich auch auf der posttranskriptionellen Ebene reguliert werden können. So wird in Mesangiumzellen der Ratte der Abbau der MMP-9-mRNA über die Hemmung des mRNA-stabilisierenden Faktors HuR verstärkt (Akool et al., 2003). Die Regulation der MMP-mRNA-Stabilität spielt

auch bei MMP-11 und MMP-13 eine wichtige funktionelle Rolle (Delany und Canalis, 2001; Rydziel et al., 2004). Auch bei diesen MMPs ist die Bindung von mRNA-stabilisierenden oder destabilisierenden Faktoren an AU-reiche Elemente in der 3'untranslatierten Region (3'UTR) der mRNA von zentraler Bedeutung (Fan und Steitz, 1998; Peng et al., 1998). Daneben kann aber auch die Translationseffizienz der MMP-9-mRNA durch eine Beschleunigung des Transportprozesses von MMP-9-Transkripten an die Polysomen erhöht werden. Die Erhöhung der Translation ist wie die Regulation der mRNA-Stabilität auf regulatorische Sequenzen innerhalb der 3'UTR der MMP-9-mRNA zurückzuführen (Fähling et al., 2005).

Ferner ist bekannt, dass die Transkriptionseffizienz von MMPs durch Histonmodifizierungen wie z.B. Acetylierungen maßgeblich bestimmt wird, da diese zu Veränderungen der Chromatinstruktur führen können (s. Kapitel 1.4; Ma et al., 2004; Yan et al., 2003, 2004; Young et al., 2005). Für MMP-9 konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass Interferon- γ (IFN- γ)/„signal transducer and activator of transcription- α “ (STAT1- α) die Bildung des MMP-9-Transkriptionskomplexes verhindert, indem es die Acetylierung von H3/H4 und somit die Rekrutierung von Polymerase II an den MMP-9-Promotor behindert (Ma et al., 2005).

1.1.3. Rolle von MMPs bei der Tumorentstehung: mechanistische Grundlagen

Wie eingangs erwähnt, sind MMPs an zahlreichen physiologischen, pathophysiologischen und entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt. MMPs spielen beispielsweise in der Embryogenese, der Wundheilung sowie in entzündlichen Prozessen und Tumorerkrankungen eine zentrale Rolle (für eine Übersicht s.: Sternlicht und Werb, 2001).

Krebs ist nach Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. (http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort_2.html). Das Mammakarzinom ist mit einem Anteil von ca. 20% aller Krebserkrankungen bei Frauen der häufigste bösartige Tumor in der weiblichen Bevölkerung (<http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/organ.html>).

Charakteristika einer Krebserkrankung sind eine Erhöhung des Krebszellwachstums, der Zellproliferation, eine verringerte Apoptose der Zellen sowie Prozesse wie Tumorangiogenese, Tumordinvasion und Metastasierung.

Neben der Fähigkeit, zahlreiche Komponenten der extrazellulären Matrix degradieren zu können, sind MMPs zusätzlich in der Lage, eine große Anzahl an Nicht-Matrix-Substraten umzusetzen (zusammengefasst in Tab. 1.1, Abb. 1.4). Dazu zählen Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Chemokine, Zytokine, Adhäsionsmoleküle und apoptotische

Mediatoren (Somerville et al., 2003; Coussens et al., 2002). So kann die Proliferation von Zellen durch MMPs erhöht werden, indem diese die Freisetzung der wachstumsfördernden Zytokine „Transforming growth factor α “ (TGF- α) (Peschon et al., 1998) und „Insulin-like growth factor“ (IGF) von der Zellmembran (Mañes et al., 1997, 1999) initiieren. Andererseits können MMPs das Wachstum von Krebszellen durch das „Shedding“ des „Transforming growth factor β “ (TGF- β) vom latenten TGF- β -Komplex inhibieren (Yu und Stamenkovic, 2000).

MMPs sind auch an der Regulation apoptotischer Prozesse beteiligt. Beispielsweise führt die Freisetzung des membrangebundenen FAS-Liganden durch MMP-7 in Abhängigkeit des Zellsystems zur Apoptose benachbarter Zellen (Powell et al., 1999), kann aber gleichzeitig die Apoptose von Krebszellen hemmen (Mitsiades et al., 2001).

Des Weiteren spielen MMPs eine wichtige Rolle in der Angiogenese. Einige MMPs, darunter auch MMP-9, können z.B. durch die Erhöhung der Verfügbarkeit von prominenten Proangiogenese-Faktoren wie „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF), „Fibroblast growth factor“ (FGF-2) und TGF- β zu der Ausbildung neuer Gefäßstrukturen führen (Bergers et al., 2000). Im Gegensatz dazu sind einige MMPs wie z.B. MMP-2, MMP-7, MMP-9 und MMP-12 in der Lage, Plasminogen zu spalten und so Angiostatin, einen prominenten Inhibitor der Angiogenese, freizusetzen (Dong et al., 1997; Cornelius et al., 1998; Gorrin-Rivas et al., 2000). Ferner wurde in einer Studie gezeigt, dass die Bildung des endogenen Angiogenese-Inhibitors Tumstatin durch eine über MMP-9-vermittelte Spaltung von Typ-IV-Kollagen zu einem Rückgang der pathologischen Angiogenese und damit des Tumorwachstums führen kann (Hamano et al., 2003).

Daneben besitzen viele MMPs die Fähigkeit, Immunreaktionen gegen Krebszellen zu beeinflussen. Beispielsweise kann MMP-9 die Proliferation von T-Lymphozyten durch die Spaltung des Interleukin-2-Rezeptor- α (IL-2- α) auf T-Lymphozyten verhindern (Sheu et al., 2001).

Die genannten Beispiele veranschaulichen die hohe Komplexität der MMP-vermittelten Regulation im Tumorgeschehen. Sie machen ebenfalls deutlich, dass einzelne MMPs auch tumorinhibierende Funktionen haben können, so dass die generelle MMP-Inhibition als Anti-Krebstherapie differenziert bewertet werden muss (s. Kapitel 1.1.5).

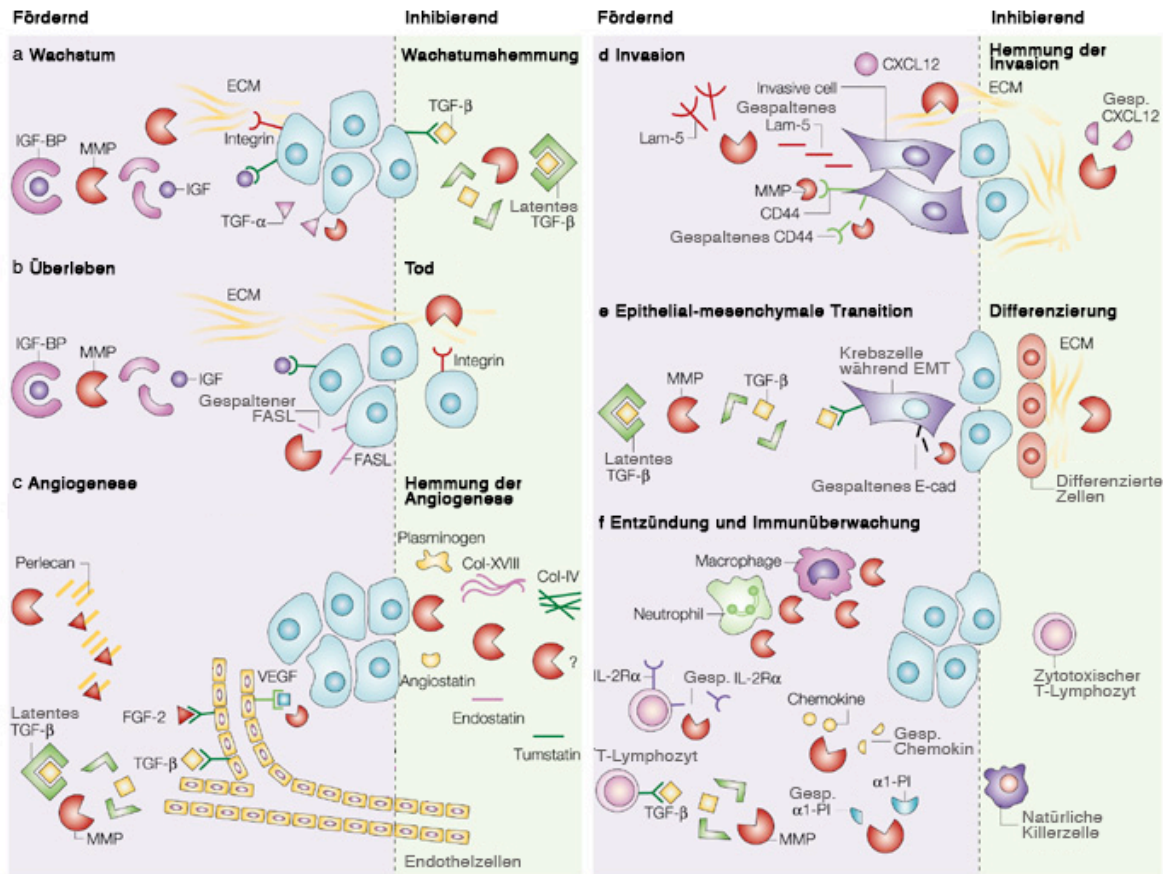


Abb. 1.4 Funktionen der MMPs in Krebs (nach Egeblad und Werb, *Nature Reviews Cancer*, 2002)

1.1.4. Rolle von MMPs bei der Tumorentstehung: pathophysiologische Grundlagen

Der erste Hinweis darauf, dass MMPs aktiv zur Progression von Krebs beitragen, konnte anhand von Tiermodellen erbracht werden. In Transplantationsversuchen erlangten nichtinvasive Krebszellen maligne Eigenschaften allein dadurch, dass die Expression einzelner MMPs durch eine Xenotransplantation massiv verstärkt wurde. Umgekehrt konnte die Aggressivität hochmaligner Tumorzellen durch die Hemmung einzelner MMPs signifikant reduziert werden. In einem Hautkrebsmodell mit MMP-9-defizienten Mäusen konnte beispielsweise eine verringerte Karzinogenese in der Haut festgestellt werden. Durch die nachfolgende Transplantation von Knochenmark mit MMP-9-exprimierenden Zellen konnte die reduzierte Karzinogenese wiederum aufgehoben werden (Coussens et al., 2000; Egeblad und Werb, 2002).

Beim Menschen lässt sich in nahezu allen Krebsarten eine erhöhte Aktivität und Expression von bestimmten MMPs im Vergleich zum gesunden Gewebe feststellen (Egeblad und Werb,

2002). Dabei korreliert in vielen Tumoren der Expressionsgrad einzelner MMPs häufig mit dem erreichten Tumorstadium und damit letztlich mit einer schlechteren Prognose für den betreffenden Patienten. Die funktionelle Bedeutung von MMPs in Krebs ist allerdings widersprüchlich und lässt sich keinesfalls pauschalisieren. So ist aus der Literatur bekannt, dass die erhöhte Expression einzelner MMPs überraschenderweise mit einer günstigen Prognose korreliert. In Darmkrebs beispielsweise besteht ein direkter Zusammenhang zwischen den Expressionsspiegeln von MMP-9 und MMP-12 und einer verbesserten Prognose der untersuchten Krebspatienten (Yang et al., 2001; Takeha et al., 1997).

Ähnlich widersprüchliche Ergebnisse über die Rolle von MMPs sind auch bei Brustkrebspatienten beobachtet worden (Li et al., 2004; Talvensaaari-Mattila et al., 2005; Pellikainen et al., 2004). Daher kann vermutet werden, dass die Rolle einzelner MMPs bei (Brust-)krebs einem komplexen Netzwerk vieler Faktoren wie z.B. Lokalisierung des Tumors, Tumorstadium oder Ursprung des Tumors unterliegt. Da MMPs sowohl pro- als auch anti-metastatische Eigenschaften zugeschrieben werden (Deryugina et al., 2006), kann davon ausgegangen werden, dass die Expressionsspiegel von MMPs als ein prognostischer Faktor einer Tumorerkrankung ungeeignet sind.

1.1.5. Bedeutung von MMP-Inhibitoren als zukünftige Krebstherapeutika

In den neunziger Jahren wurden, auf der Basis viel versprechender präklinischer *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien, einige synthetische MMP-Inhibitoren entwickelt, die bereits nach kurzer Zeit schon in klinischen Studien an Krebspatienten getestet worden sind (Tab. 1.2). Die Ergebnisse von Phase-III-Studien der meisten dieser synthetischen MMP-Inhibitoren waren jedoch enttäuschend. So mussten viele dieser Studien aufgrund des fehlenden therapeutischen Nutzens oder wegen zu starken Nebenwirkungen vorzeitig abgebrochen werden (für eine Übersicht s.: Egeblad und Werb, 2002). Beispielsweise musste eine Studie mit Tanomastat (Bay 12-9566), einem MMP-2, -3- und -9-spezifischen Inhibitor, an Patienten mit kleinzelligen Bronchialkarzinomen frühzeitig beendet werden, da die mit Tanomastat behandelten Patienten eine kürzere Überlebensrate hatten als Patienten, die nur mit einem Placebo behandelt wurden (Coussens et al., 2002). Ein weiteres Beispiel für das Versagen eines MMP-Inhibitors ist Marimastat (BB-2516), ein oraler Breitband-MMP-Inhibitor. Patienten mit metastasierendem Brustkrebs, die Marimastat erhielten, zeigten keinen Anstieg des progressionsfreien Überlebens im Vergleich zur Placebo-Gruppe. Ein höherer Marimastat-Spiegel korrelierte indessen mit einer erhöhten Skelettmuskulatur-Toxizität, die dann eine verkürzte Lebenserwartung zur Folge hatte (Sparano et al., 2004).

Die klinischen Studien der Phase III wurden vorwiegend an Patienten durchgeführt, die sich bereits in einem Spätstadium der Krebserkrankung befanden. Zudem konnte zum damaligen Zeitpunkt nicht auf das mittlerweile umfangreiche Wissen über die komplexen Wirkmechanismen der MMPs und deren differenzierte Rolle bei Krebs zurückgegriffen werden. Beispielsweise war zum Zeitpunkt des Studienbeginns noch nicht bekannt, dass MMPs auch angiogenese-inhibierende Wirkungen besitzen. Zudem können viele MMP-Inhibitoren starke Nebenwirkungen auf den Bewegungsapparat auslösen (Jodele et al., 2006). Die komplexe Regulation und die Vielfalt von MMP-Substraten wurden erst in den letzten 10 Jahren erfasst, so dass viele der gezeigten Nebenwirkungen und die fehlende Wirksamkeit vieler MMP-Inhibitoren nachträglich erklärt werden können. Ein besseres Verständnis um Mechanismen, welche die MMP-Transkription regulieren und das Wissen darüber, welche MMPs in bestimmten Krebsarten und -stadien von funktioneller Bedeutung sind, sind wichtige Voraussetzungen für die Entwicklung und Etablierung verbesserter MMP-inhibierender Pharmaka.

Tab. 1.2 MMP- Inhibitoren in der klinischen Entwicklung für die Krebstherapie

| Inhibitor | Struktur | Spezifität | Stellungnahme | Referenzen |
|-------------------------|---------------------|--------------|---|-----------------------|
| Marimastat (BB-2516) | Peptidderivat | Breitband | Überlebensvorteil in einem Teil von Magenkrebspatienten | Bramhall et al., 2002 |
| | | | Überlebensvorteil bei Patienten mit Glioblastom (Glioblastoma multiforme) in Kombination mit Temozolomid | Groves et al., 2002 |
| | | | Kein Überlebensvorteil in NSCL, SCL und Ovarkrebspatienten | Coussens et al., 2002 |
| | | | Kein Überlebensvorteil gegenüber der Placebo-Gruppe in Brustkrebspatienten; erhöhte Skelettmuskulatur-Toxizität | Sparano et al., 2004 |
| Tanomastat (BAY12-9566) | Nicht-Peptidderivat | MMP-2, -3,-9 | Entwicklung gestoppt, weil die mit Tanomastat behandelten Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinoms (SCLC) bzw. Pankreaskrebspatienten ein geringeres Überleben aufwiesen als die Kontrollgruppe | Coussens et al., 2002 |
| Prinomastat (AG3340) | Nicht-Peptidderivat | Breitband | Kein Überlebensvorteil in Patienten mit NSCL | Coussens et al., 2002 |
| | | | Kein Unterschied in der Progression von Prostatakrebs | |
| | | | Studie mit nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC)-Patienten aufgrund fehlender Wirksamkeit vorzeitig beendet | |
| BMS-275291 | Nicht-Peptidderivat | Breitband | BMS-275291 zusätzlich zur Chemotherapie erhöht die Toxizität und verbessert nicht das Überleben von Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC | Leighl et al., 2005 |

Verändert nach Overall und Lopez-Otin, *Nature Reviews Cancer*, 2002 und Coussens et al., *Science*, 2002.

1.2. Brustkrebszelllinien als Modelle des Mammakarzinoms

Ein Großteil des derzeitigen Kenntnisstandes zu Ursachen und Entwicklung von Brustkrebs basiert auf zahlreichen *In-vivo*- und *In-vitro*-Studien mit verschiedenen Brustkrebszelllinien (Lacroix und Leclerc, 2004). Die weltweit am häufigsten verwendete Mammakarzinomzelllinie MCF-7 stammt aus einer pleuralen Effusion einer Brustkrebspatientin (Soule et al., 1973; Dickson et al., 1986; Burdall et al., 2003). MFC-7-Zellen sind östrogenrezeptor-positiv und besitzen *in vitro* eine geringe Invasivität (Thompson et al., 1992). Die in dieser Arbeit ebenfalls verwendete Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 leitet sich ebenfalls aus einer pleuralen Effusion ab (Cailleau et al., 1978). Im Gegensatz zu MCF-7-Zellen exprimieren diese Zellen jedoch keinen Östrogenrezeptor und zeigen *in vitro* ein relativ starkes invasives Potenzial (Thompson et al., 1992).

1.3. Die Protein-Kinase-C-Familie

Die PKC-Enzymfamilie besteht aus verschiedenen Serin-Threonin-Kinasen und wird in drei Gruppen von Isoformen unterteilt. Die klassischen PKC-Isoformen (cPKCs) werden durch die intrazellulären Botenstoffe Ca^{2+} und Diacylglycerol (DAG) aktiviert, die neuen PKC-Isoformen (nPKCs) sind hingegen Ca^{2+} -unabhängig und werden allein durch DAG aktiviert, während die atypischen PKC-Isoenzyme (aPKC) sowohl Ca^{2+} - als auch DAG-unabhängig sind. Zu den klassischen PKC-Isoformen zählen PKC- α , PKC- β I, PKC- β II und PKC- γ , während sich die neuen PKC-Isoenzyme aus den Isotypen PKC- δ , PKC- ϵ , PKC- η und PKC- θ zusammensetzen. Den atypischen PKC-Isoformen werden PKC- ζ und PKC- λ zugeordnet (für eine Übersicht s.: Griner und Kazanietz, 2007). PKCs werden ubiquitär exprimiert, wobei PKC- α , PKC- β und PKC- δ die am weitesten verbreiteten Isoformen darstellen (Wetsel et al., 1992). PKC-Isoformen besitzen verschiedene und zum Teil sogar gegensätzliche Funktionen, insbesondere bei der Regulierung von Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose und Angiogenese (Blobe et al., 1994; Ron und Kazanietz, 1999; Fields und Gustafson, 2003). Es ist daher wenig erstaunlich, dass die Fehlregulation einzelner Mitglieder dieser Kinasen häufig der Tumorgenese zugrunde gelegt werden kann. Unter physiologischen Bedingungen werden PKCs durch zahlreiche Wachstumsfaktoren aktiviert (Koivunen et al., 2006), die molekularen Wirkorte einzelner PKCs sind allerdings immer noch sehr wenig untersucht. Zu den wichtigsten bislang identifizierten Zielstrukturen der PKCs zählen MAPK, insbesondere ERK1/2 (Cai et al., 1997; Ueda et al., 1996; Burgering et al., 1993), sowie die Transkriptionsfaktoren NF κ B (Shirakawa et al., 1989) und AP-1 (Kontny et al., 1992; Tseng et al 1994).

1.4. Transkriptionskontrolle durch Histonacetylierungen: Rolle der Histondeacetylasen

Die zentrale Bedeutung der Chromatinstruktur bzw. des Acetylierungsstatus der Histone für die Regulation der Gentranskription in eukaryotischen Zellen ist in der letzten Dekade deutlich geworden. Für den Acetylierungsstatus der Histone sind einerseits Histonacetyltransferasen (HATs) (Roth et al., 2001) verantwortlich, die Histone acetylieren, und andererseits Histondeacetylasen (HDACs), welche die acetylierten Histone wieder deacetylieren (Marks et al., 2003). Eine starke Acetylierung ist mit einer offenen („aktiven“) Chromatinstruktur assoziiert, da spezifische positiv geladene Lysinreste in den Histonen durch Acetylierung neutralisiert werden. Diese Veränderungen führen dann nachfolgend zu verringerten intra- bzw. internukleosomalen DNA-Histon-Interaktionen und machen die DNA damit für die Transkriptionsmaschinerie besser zugänglich. Durch die Aktivität verschiedener intrazellulärer HDACs kann dieser Zustand wieder rückgängig gemacht werden. Die daraus resultierende kompakte Chromatinstruktur erlaubt es der Transkriptionsmaschinerie nicht mehr oder in stark reduziertem Ausmaß, an die DNA zu binden, was letztlich zu einer transkriptionellen Repression des betreffenden Gens führt (für eine Übersicht s.: Li et al., 2007; Kouzarides et al., 2007).

Bislang konnten drei verschiedene Familien von Histondeacetylasen identifiziert und charakterisiert werden (Kouzarides, 1999). Zur Klasse I gehören HDAC 1, 2, 3 und 8, welche überwiegend im Nukleus lokalisiert sind. HDACs dieser Klasse sind ubiquitär in vielen humanen Zelllinien und Geweben nachweisbar. Zur Klasse II zählen die HDAC 4-7 sowie 9 und 10 (Verdin et al., 2003), welche im Gegensatz zu Klasse-I-HDACs zwischen Zellkern und dem Zytoplasma „shutteln“ und zusätzlich nur in einigen wenigen humanen Geweben exprimiert werden. Die auch als Sirtuine bezeichneten HDACs der Klasse III unterscheiden sich indessen sowohl strukturell als auch mechanistisch sehr stark von den anderen beschriebenen Klassen (Blander et al., 2004). So zählen Histonproteine nicht zu den primären Substraten der Sirtuine (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001). Außerdem benötigen sie im Gegensatz zu den anderen Klassen für ihre Aktivierung den Kofaktor NAD^+ (Santos-Rosa und Caldas, 2005; Verdone et al., 2005).

1.5. Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein freies Radikal, welches durch die Oxidation der Aminosäure L-Arginin durch NO-Synthasen (NOS) gebildet wird. Als weitere Endprodukte entstehen dabei Citrullin und Wasser. Bislang sind drei unterschiedliche NOS-Isoformen identifiziert

worden, von denen die endotheliale NOS (eNOS) und die neuronale NOS (nNOS) konstitutiv exprimiert werden, während die induzierbare NOS-Isoform (iNOS) in den meisten Zellen und Geweben durch bakterielle Lipopolysaccharide und inflammatorische Zytokine wie Interferon- β (IL-1 β) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) induziert wird (Moncada et al., 1991; Nathan et al., 1994). NO ist ein gasförmiger Botenstoff, der an zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist. Zu den wichtigsten NO-kontrollierten Funktionen zählen die Regulation des Gefäßtonus (Ignarro, 1987, 1988; Palmer et al., 1987; Furchgott et al., 1989), die Aggregation von Thrombozyten (Azuma et al., 1986), Entzündungen (Tiao et al., 1994; Harbrecht et al., 1995), Neurotransmission (Bredt et al., 1990), Zelldifferenzierung (Peunova et al., 1995; Morbidelli et al., 1996), Zellmigration (MacIntyre et al., 1991; Noiri et al., 1998) und Apoptose (Sarih et al., 1993; Albina et al., 1993; Messmer et al., 1996; Beauvais et al., 1995; Mannick et al., 1994; Chun et al., 1995).

In niedrigen Konzentrationen stimuliert NO die Aktivität der Guanylatzyklase und führt damit zur erhöhten Bildung von zyklischem GMP (cGMP) (Arnold et al., 1977, für eine Übersicht s.: Beck et al., 1999). cGMP ist ein wichtiges Botenmolekül, über welches viele physiologische Funktionen des NOs wie etwa die Relaxation vaskulärer Muskelzellen vermittelt werden (Gruetter et al., 1979). Hohe Konzentrationen, wie sie nach einer Aktivierung der iNOS-Expression messbar sind, spielen hingegen eine wichtige Rolle bei der zytotoxischen Zellabwehr von Immunzellen, insbesondere von Makrophagen und Monozyten. Damit verbunden besitzen hohe NO-Mengen eine wichtige pathophysiologische Bedeutung, da NO nachweislich bei chronischen Entzündungsprozessen wie z.B. der Rheumatoiden Arthritis, der Arteriosklerose, der Psoriasis und beim septischen Schock kausal für das Krankheitsgeschehen verantwortlich gemacht werden können (für eine Übersicht s.: Moncada et al., 1991).

1.5.1. Duale Rolle von NO in der Tumorgenese

Die Bedeutung von NO in Tumoren ist noch immer umstritten, da NO die Tumor-Progression sowohl erhöhen als auch hemmen kann (für eine Übersicht s.: Fukumura, 2006). In den meisten Tumoren lässt sich im Vergleich zum benachbarten gesunden Gewebe eine erhöhte Expression und Aktivität von iNOS nachweisen. Allerdings ist noch unklar, ob erhöhte iNOS-Spiegel nicht ein allgemeines Charakteristikum aller menschlichen Tumoren sind (Lechner, 2005).

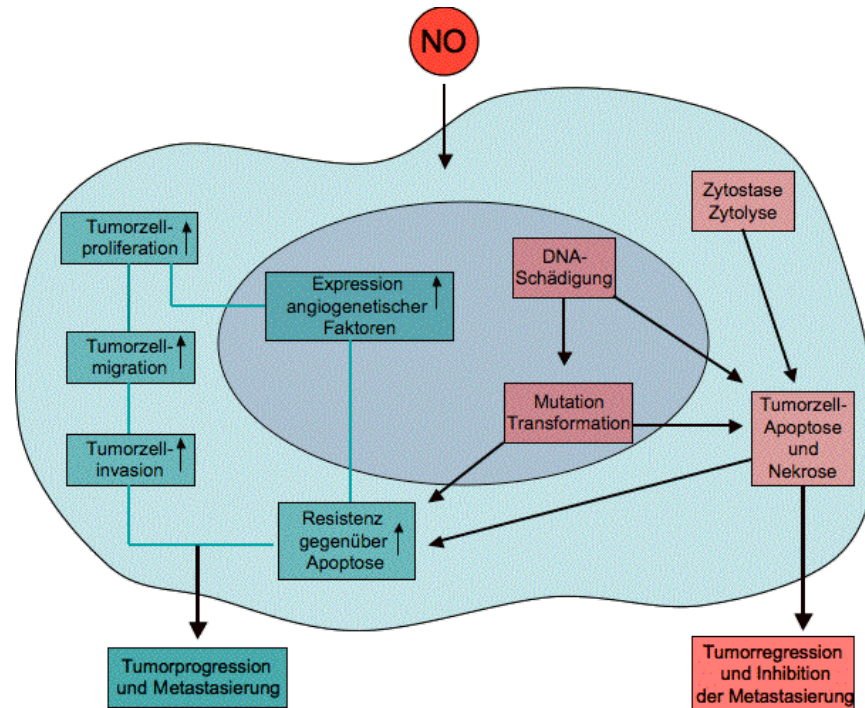


Abb. 1.5 Unterschiedliche Aktionsmechanismen des NOs auf Tumorzellen (verändert nach Fukumura, *Nature Cancer Reviews*, 2006)

Effekte von zellulär gebildetem NO auf den Tumor sind sehr wahrscheinlich sowohl von der Aktivität und der Lokalisierung der verschiedenen NOS-Isoformen und damit der Konzentration und der Dauer der NO-Exposition abhängig, hängen gleichzeitig aber auch entscheidend von der zellulären Sensitivität des betroffenen Gewebes gegenüber NO ab. Außerdem ist von besonderer Bedeutung, ob das NO von den Tumorzellen selbst oder von den umgebenden Stromazellen gebildet wird (Fukumura, 2006).

Hohe NO-Konzentrationen besitzen meistens zytotoxische und zytostatische Effekte (Abb. 1.5). So wurde mehrfach ein positiver Zusammenhang zwischen der Höhe der NO-Produktion und der Apoptoserate festgestellt, so z.B. in MCF-7-Zellen (Binder et al, 1999), in kolorektalen Karzinomzellen (Radomski et al., 1991), in Pankreas-Karzinomzellen (Bruns et al., 2000) oder in ovariellen Karzinomzellen (Rieder et al., 2000). In humanen Ovarialkarzinomzellen führt die exogene Gabe des NO-Donors „S-nitroso-N-acetylpenicillamine“ (SNAP) zu einer Wachstumshemmung der betroffenen Tumorzellen (Cantuaria et al., 2000). Im Gegensatz dazu scheinen niedrige NO-Konzentrationen die Angiogenese, das Tumorwachstum und die Proliferation von Tumorzellen eher zu begünstigen (Xu, 2002). So kann NO über eine Aktivierung der VEGF-Synthese zu einer Steigerung der Angiogenese beitragen (Jozkowicz et al., 2001; Kon et al., 2003; Dulak et al.,

2000; Papapetropoulos et al., 1997; Fukumura et al., 2001). Weiterhin ist NO in der Lage, die Bildung endogener Angiogenese-Inhibitoren wie z.B. Angiostatin und Thrombostatin-1 zu blockieren, was ebenfalls zur Angiogenese beiträgt (Matsunaga et al., 2002; Vamvakas et al., 1997).

Auch in Mammakarzinomen sind für NO sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Wirkungen auf das Tumorwachstum beschrieben worden (für eine Übersicht s.: Gatti et al., 2004). Allerdings lassen die Ergebnisse der meisten bisher durchgeführten Patientenstudien auf eine positive Korrelation zwischen der Höhe der iNOS-Expression und dem Tumorgrad schließen (Thomsen et al., 1995; Reveneau et al., 1999; Vakkala et al., 2000; Loibl et al., 2002; Bulut et al., 2005; Nakamura et al., 2006). In der weltweit bislang umfangreichsten Patientenstudie wurden Biopsien von 161 Brustkrebspatienten auf die Expressionsspiegel von iNOS mit Hilfe immunhistochemischer Methoden untersucht und in eine Korrelation zu klassischen prognostischen Markern wie Lymphknotenstatus, Alter, Hormonrezeptorstatus, Tumorgröße und Differenzierungsstatus gebracht. Das Ergebnis dieser Studie hat gezeigt, dass Patienten mit einer vergleichbar hohen iNOS-Expression im Brustkrebsgewebe eine signifikant schlechtere Überlebensprognose hatten als solche Patienten, in deren Brustgewebe nur eine geringe oder gar keine iNOS-Expression nachzuweisen war (Loibl et al., 2005).

Zielsetzung

In dieser Dissertation sollte der Einfluss des ubiquitären und multifunktionellen Signalmoleküls Stickstoffmonoxid (NO) auf die Expression und Aktivität der Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) in Brustkrebszellen untersucht werden. Hauptziel der Arbeit war die Identifizierung molekularer Mechanismen, über die NO die verschiedenen Regulationsebenen der MMP-9-Expression und/oder Aktivität beeinflusst. Dabei sollten potenzielle und dosisabhängige Effekte von NO sowohl auf die Aktivität von MMP-9 als auch auf die Proteinsyntheserate, die Proteinstabilität, die mRNA-Stabilität und schließlich die Transkription von MMP-9 im Fokus der Untersuchungen stehen.

Die im Rahmen dieser Untersuchungen festgestellte NO-vermittelte transkriptionelle Regulation der MMP-9-Expression sollte dann mechanistisch erklärt werden. Hier war die Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität in dem verwendeten Zellsystem durch NO verändert wird genauso unabdingbar, wie die Untersuchung der übergeordneten Signalkaskaden, welche in spezifischer Weise durch NO moduliert werden können.

Das bisherige Scheitern des pharmakologischen Therapiekonzeptes mit synthetischen MMP-Inhibitoren ist auch Folge der fehlenden Kenntnis über die vielfältigen und komplexen Funktionen einzelner MMPs und zeigt gleichzeitig den hohen Aufklärungsbedarf der zugrunde liegenden Regulationsmechanismen der zellulären MMP-Kontrolle auf. Vor dem Hintergrund einer in vielerlei Hinsicht widersprüchlichen Datenflut über die funktionelle Bedeutung beider Mediatoren (NO und MMP-9) bei der Krebsentstehung war das Ziel dieser Arbeit auch, die komplexen regulatorischen Mechanismen und das mögliche Zusammenspiel beider Faktoren anhand des Zellmodells der MCF-7-Zellen näher zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

| | |
|--|------------------------------------|
| Aceton | VWR, Darmstadt |
| Actinomycin D | Calbiochem, Schwalbach |
| Acrylamidlösung (30% Acrylamid mit 0.8% Bisacrylamid) | Roth, Karlsruhe |
| Agar | Gibco Life Technologies, Karlsruhe |
| Agarose | Eurogentec, Köln |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Ammoniumsulfat | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Ampicillin | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| APMA (4-Aminophenyl-Quecksilberazetat) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Aprotinin | Roche, Mannheim |
| Borsäure | Appllichem, Darmstadt |
| Bradford-Reagenz | Roth, Karlsruhe |
| Bromphenolblau | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Calciumchlorid (CaCl ₂) | Merck, Darmstadt |
| CGP41251 | Calbiochem, Schwalbach |
| Chemikalien zur Sequenzanalyse (Big dye Terminator Premix, Template Suppression Reagent) | PE Biosystems, Weiterstadt |
| Chloroform | Merck, Darmstadt |
| Coomassie Brilliant-Blau | Appllichem, Darmstadt |
| Cycloheximid | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| DETA-NONOate | Alexis, Grünberg |
| Dibutyryl-cGMP | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Diethylpyrokarbonat (DEPC) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Appllichem, Darmstadt |
| Diphenyleneiodonium (DPI) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Dithiothreitol (DTT) | Appllichem, Darmstadt |
| D-MEM + 4500 mg/l Glucose + GlutaMAX I - Pyruvat | Gibco Life Technologies, Karlsruhe |
| D-MEM + 4500 mg/l Glucose + Pyridoxinhydrochlorid +L-Glutamin | Gibco Life Technologies, Karlsruhe |

| | |
|--|---|
| - Natriumpyruvat | |
| - L-Methionin | |
| - L-Cystein | |
| Essigsäure | Merck, Darmstadt |
| Ethanol | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Fluoromount-G (Fluoreszenz-Eindeck-Medium) | Biozol Diagnostica, Eching (Southern Biotech, Alabama) |
| Formaldehyd | Fluka, Seelze |
| Formamid | Merck, Darmstadt |
| γ -Interferon (Maus) | Calbiochem, Schwalbach |
| γ - ³² P-dATP | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Gelatine | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Glycerol | Roth, Karlsruhe |
| β -Glycerophosphat | Merck, Darmstadt |
| Glycin | Merck, Darmstadt |
| Gö6976 | Calbiochem, Schwalbach |
| Griess-Reagenz | Merck, Darmstadt |
| HEPES | Roth, Karlsruhe |
| Histondeacetylase-Inhibitor III (M344) | Calbiochem, Schwalbach |
| Iodoacetamid | Calbiochem, Schwalbach |
| Isopropylthiogalaktosid (IPTG) | Appllichem, Darmstadt |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck, Darmstadt |
| Kollagen IV aus humaner Plazenta | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Ladepuffer (DNA/RNA) (6x) | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| <i>Clasto</i> -Lactacystin β -Lacton | Calbiochem, Schwalbach |
| Leupeptin | Roche, Mannheim |
| Lithiumchlorid | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| LPS von <i>E. coli</i> , Serotype R515 | Alexis, Läufelingen, Schweiz |
| Magermilchpulver | Merck, Darmstadt |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| ³⁵ S-Methionin/ ³⁵ S-Cystein | Amersham Biosciences, Freiburg |
| β -Mercaptoethanol | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Mithramycin A | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| MMP-9-Inhibitor | Calbiochem, Schwalbach |
| Molekulargewichtstandard (DNA) | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Molekulargewichtstandard (Protein) | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| N-Acetylcystein (NAC) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Natriumchlorid (NaCl) | Merck, Darmstadt |

| | |
|---|------------------------------------|
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Appllichem, Darmstadt |
| Natriumfluorid (NaF) | Fluka, Seelze |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumvanadat (NaV) | Calbiochem, Schwalbach |
| Desoxy-Nukleotidtriphosphat (dNTP) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Natriumpyrophosphat | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| N ^G -monomethyl-L-arginin (L-NMMA) | Alexis, Grünberg |
| NP-40 (IGEPAL CA-630) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Oligonukleotid-(dT)-Primer | Promega, Mannheim |
| Paraformaldehyd | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| PD98059 | Calbiochem, Schwalbach |
| Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml | Gibco Life Technologies, Karlsruhe |
| Pepstatin A | Roche, Mannheim |
| Pepton 140 | Gibco Life Technologies, Karlsruhe |
| Phenylmethyl-sulfonyl-fluorid (PMSF) | Roche, Mannheim |
| Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) | Gibco Life Technologies, Karlsruhe |
| Ponceau S | Amersham, Freiburg |
| 2-Propanol | Fluka, Seelzen |
| Propidiumiodid | Chemicon International, UK |
| Random-Hexamer-Primer | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Rinder-Serumalbumin (BSA), fettsäurefrei | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| RNase A | Merck, Darmstadt |
| Rottlerin | Calbiochem, Schwalbach |
| Saccharose | Roth, Karlsruhe |
| SB203580 | Calbiochem, Schwalbach |
| Sepharose-Protein G | Amersham Biosciences, Freiburg |
| S-Nitroso-N-penicillamine (SNAP) | Alexis, Grünberg |
| SP600125 | Calbiochem, Schwalbach |
| Spermine-NONOate | Alexis, Grünberg |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Phorbol-12-myristate-13-acetat-(TPA) | Calbiochem, Schwalbach |
| Transfektionsreagenz Effectene | Qiagen, Hilden |
| Trichloressigsäure (TCA) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Trichostatin A | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| TritonX-100 | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| TRIzol-Reagenz | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Trypsin/EDTA | Gibco Life Technologies, Karlsruhe |
| Tween 20 | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| D-Galactopyranosid (X-Gal) | Appllichem, Darmstadt |
| Zellkultur-Einsätze | Nunc, Wiesbaden |

2.1.2. Antikörper und Sera

| | |
|---|---|
| Anti-Phospho-Akt Ser (473) (9271) | Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main |
| Anti-Akt (9272) | Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main |
| Anti-c-Fos (6-2H-2F) (sc-447) | Santa Cruz, Heidelberg |
| Anti-c-Jun (H-79) (sc-1694) | Santa Cruz, Heidelberg |
| Anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (9211S) | Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main |
| Anti-Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (E10) (9106) | Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main |
| Anti-Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (9255S) | Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main |
| Anti-SAPK/JNK (G9) (9255) | Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main |
| Anti-p44/42 MAPK (9252) | Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main |
| Anti-p38 MAPK (9212) | Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main |
| Anti-STAT-1- α (sc-345) | Santa Cruz, Heidelberg |
| Anti-NF κ B p65 (sc-109) | Santa Cruz, Heidelberg |
| Anti-Nucleolin C23 (MS-3) (sc-8031) | Santa Cruz, Heidelberg |
| Anti-MMP-9 AB-8 (IM72) | Calbiochem, Schwalbach |
| Anti-MMP-9 MAB13415 | Chemicon, Hofheim |
| Anti- β -Aktin (A5441) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Anti-Phospho-EIF-4E (Ser209) (9741) | Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main |
| Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus IgG | Gibco Life Technologies, Karlsruhe |
| Ziege anti-Kaninchen IgG HRP | Santa Cruz, Heidelberg |
| Ziege anti-Maus IgG HRP | Santa Cruz, Heidelberg |
| Ziegenserum | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Fötiales Kälberserum | Gibco Life Technologies, Karlsruhe |

2.1.3. Zelllinien

Sämtliche der in der Arbeit verwendeten humanen Brustkrebszelllinien (MCF-7, MDA-MB-231 und MDA-MB-435) wurden von Dr. P. Gutwein, Institut für Allgemeine Pharmakologie, Klinikum der J.W. Goethe Universität, Frankfurt zur Verfügung gestellt.

Die RAW-264.7-Makrophagen wurden zur Verfügung gestellt von Prof. J. Pfeilschifter, Institut für Allgemeine Pharmakologie Klinikum der J.W. Goethe Universität, Frankfurt.

2.1.4. Enzyme

| | |
|--|------------------------------------|
| <i>Eco RI</i> | MBI Fermentas, St.Leon-Rot |
| <i>Xba I</i> | MBI Fermentas, St.Leon-Rot |
| <i>Sal I</i> | MBI Fermentas, St.Leon-Rot |
| Reverse Transkriptase Superscript II (200U/ μ l) | Gibco Life Technologies, Karlsruhe |
| RNase out (40U/ μ l) | Gibco Life Technologies, Karlsruhe |
| BioTherm-DNA-Polymerase (5U/ μ l) | Genecraft, Lüdinghausen |
| T4-DNA-Ligase (1U/ μ l) | Invitrogen, Groningen (NL) |

2.1.5. Plasmide

| | |
|------------------------------|---|
| MMP-9-Promotor in pGL3-Basic | zur Verfügung gestellt von Dr. D. D. Boyd, Houston, Texas |
| MMP-9-3'UTR | zur Verfügung gestellt von Dr. M. Fähling, Berlin |

2.1.6. Oligonukleotide

A. Oligonukleotide für Real-time-PCR

| | |
|---------------------------------------|---|
| GAPDH-Sonde (VIC/TAMRA) 4310884E | Applied Biosystems Applera, Weiterstadt |
| MMP-9-Sonde (FAM/TAMRA) Hs00234579_m1 | Applied Biosystems Applera, Weiterstadt |

B. Oligonukleotide für EMSA

Tab. 2.1 Oligonukleotide für EMSA

| Human | 5'-3'-Richtung |
|--------------------------------|-----------------------|
| AP-1-Oligo MMP-9-spezifisch | AAGTGCTGACTCAGGGGTCAG |
| Sp1- Consensus-Oligo | ATTCGATCGGGCGGGGCGAGC |

Alle verwendeten Consensus-Oligonukleotide wurden von Santa Cruz (Heidelberg) bezogen.

C. Primer für PCR

Tab. 2.2 Primer für PCR

| Human | Primer 1 (sense) 5'-3'-Richtung | Primer 2 (antisense) 5'-3'-Richtung | Länge des Amplikons |
|---|------------------------------------|--|------------------------|
| EF2 | GCGGTCAGCACACTGGCATA | GACATCACCAAGGGTGTGCAG | 178bp |
| MMP-9-Primer für PCR/EMSA | CACTGTCCACCCCTCAGAGC | GCCACTTGTCGGCGATAAGG | 263bp |
| MMP-9-3'UTR mit je XBA- oder SAL-Schnitt- stelle | TCTAGAGGCTCCCGTCCTGCT | GTCGACAAAGGTTAGAGAATCCAA | 203bp |

2.1.7. Kits und ELISAs

| | |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH) | Roche Diagnostics |
| ECL-Reagenz | Amersham Pharmacia, Freiburg |
| ECL-Reagenz „Advanced“ | Amersham Pharmacia, Freiburg |
| „Enzymatic shearing kit“ | Active motif, Rixensart, Belgien |
| Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden |
| MMP-9-Aktivitäts-Assay | Amersham Biosciences, Freiburg |
| MMP-Antikörper-Array | Raybiotech, Norcross, GA |
| PKC-Aktivitäts-Assay | Promega, Mannheim |
| Plasmid-Aufreinigungs-Kit | Macherey-Nagel, Düren |
| TA-cloning Kit | Gibco Life Technologies, Karlsruhe |
| TOPOTM TA-Cloning Kit | Invitrogen, Groningen (NL) |
| Transkriptionsfaktor-Assay | Active motif, Rixensart, Belgien |

2.1.8. Sonstige Verbrauchsmaterialien

| | |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran | Millipore, Eschborn |
| Genescreen | PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim |
| Nick Columns; Sephadex G50 DNA grade | Amersham Pharmacia, Freiburg |
| Röntgenfilme | Kodak, Stuttgart |
| Whatman Papier (3MM) | Merck, Darmstadt |
| Zellkulturflaschen/-schalen | Greiner, Frickenhausen |
| 6-Well-Platten, 96-Well-Platte | Greiner, Frickenhausen |
| ELISA-Testplatten | Greiner, Frickenhausen |
| Szintillationsgefäße | Becton Dickinson, Heidelberg |

2.1.9. Puffer und Lösungen

| | |
|--------------------------------|--|
| 3 x Bindungspuffer für EMSA | 12% (w/v) Ficoll 60mM HEPES (pH 7,9) 150mM KCl 3mM EDTA 3mM DTT 0,75mg/ml BSA |
| Blockierlösung | 5% (v/v) Ziegen Serum 0,1% (v/v) Triton X-100 in PBS |
| D-MEM (Wachstumsmedium) 500 ml | + 50ml fötales Kälberserum (10%) + 5ml Penicillin-Streptomycin 10.000U/ml |

| | |
|--------------------------------------|---|
| D-MEM (Hungermedium) 500 ml | + 1ml BSA/PBS (1%) + 5ml Penicillin-Streptomycin 10.000U/ml |
| Fixierlösung für EMSA-Gele | 10% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Eisessig |
| DNA/RNA-Ladepuffer (6 x) | 0,2M EDTA (pH 8,0) 0,2% (w/v) Bromphenolblau 0,2% (v/v) Xylencyanol (v/v) |
| D-MEM (ohne Met/Cys) 500 ml | + 1ml BSA/PBS (1%) + 5ml Penicillin-Streptomycin 10.000U/ml 10% (w/v) HEPES + 5ml 100x L-Glutamin |
| Entfärbelösung für Zymogrammgele | 30% (v/v) Methanol 10% (v/v) Eisessig |
| Entwicklungspuffer für Zymogrammgele | 0.2M NaCl 5mM CaCl ₂ 0.02% (w/v) Brij 35 in 50mM Tris-HCL pH 7.6 |
| Färbelösung für Zymogrammgele | 30% (v/v) Methanol 10% (v/v) Eisessig 0,05% (w/v) Coomassie Blau |
| HEPES-Puffer | 10mM HEPES pH 7.6 100mM NaCl |
| Hochsalz-Puffer für IP | 50mM Tris pH 7.4 500mM NaCl 0.2% (v/v) TritonX-100 2mM EDTA 2mM EGTA 0.1% (w/v) SDS |
| Laemmli-Puffer (4 x) | 125mM Tris/ HCl pH 6,8 50mM DTT 40% (v/v) Glycerin |

| | |
|--|---|
| | 10% (w/v) SDS |
| | 0,01% (w/v) Bromphenolblau |
| Luria-Bertani Medium (LB) | 1% (w/v) Bacto-Trypton |
| | 0,5% (w/v) Bacto-Hefe-Extrakt |
| | 1% (w/v) NaCl |
| | 50µg/ml Ampicillin (nach dem Autoklavieren zugeben) |
| | pH 7,4 |
| LB-Ampicillin-Agar | LB-Medium (ohne Ampicillin) |
| | 1,5% (w/v) Bacto-Agar |
| | 50µl/ml Ampicillin (nach dem Autoklavieren zugeben) |
| | pH 7,4 |
| Homogenisierungspuffer für die Extraktion von zellulärem Gesamtprotein | 50mM Tris pH 7.4 |
| | 150mM NaCl |
| | 10% (v/v) Glycerol |
| | 1% (v/v) TritonX-100 |
| | 2mM EDTA |
| | 2mM EGTA |
| | 40mM β-Glycerophosphat |
| | 50mM Natriumfluorid* |
| | 10mM Natriumpyrophosphat |
| | 200µM Natriumvanadat* |
| | 2mM DTT* |
| | 50mg/ml Leupeptin* |
| | Aprotinin* |
| | Pepstatin A* |
| | *unmittelbar vor Verwendung zugeben |
| Niedrigsalz-Puffer für IP | 50mM Tris pH 7.4 |
| | 150mM NaCl |
| | 0.2% (v/v) TritonX-100 |
| | 2mM EDTA |
| | 2mM EGTA |
| | 0.1% (w/v) SDS |
| 10 x PAGE (pH 8,5) | 25mM Tris |
| | 192mM Glycin |

| | |
|--|--|
| | 1% (w/v) SDS |
| PBS/EDTA | 1mM EDTA in 1 x PBS, pH 8,0 |
| PUB-Puffer | 100mM NaCl 10mM TRIS 10mM EDTA 1% (w/v) SDS pH 7,4 |
| Puffer A (hypotonischer Puffer) | 10mM HEPES (pH 7.9) 10mM KCl 0.1mM EDTA 0.1mM EGTA 0.5mM PMSF * 0.1mM DTT* 50mg/ml Leupeptin* *unmittelbar vor Verwendung zugeben |
| Puffer C (hypertonischer Puffer) | 20mM HEPES (pH 7.9) 25% (v/v) Glycerol 0.4M NaCl 1mM EDTA 1mM EGTA 0.5mM PMSF * 1mM DTT * 50mg/ml Leupeptin* *unmittelbar vor Verwendung zugeben |
| RIPA-Puffer | 10mM Tris/HCl pH 8 140mM NaCl 1% (v/v) Triton X-100 0,1% (w/v) SDS |
| Sammelgel-Puffer (pH 6,8) | 0,5M Tris/HCl pH 6,8 |
| Sammelpuffer für Zymogramm-Gelelektrophorese | 4% (w/v) SDS 0.005% (w/v) Bromphenolblau 20% (v/v) Glycerin in 0.5M Tris/HCl pH 6.8 |

| | |
|-----------------------|---|
| TBS-Tween (TBS-T) | 0,05% (v/v) Tween-20 |
| Towbin-Transferpuffer | 25mM Tris 192mM Glycin 20% (v/v) Methanol |
| 10 x TBE | 1M Tris 1M Borsäure 250mM EDTA (pH 8.2) |
| Trenngel-Puffer | 1,5M Tris/HCl pH 8,8 |

2.1.10. Geräte

| | |
|--|---|
| Auto Lumat LB953 | Berthold, Bad Wildbad |
| ABI Prism™ 310 Genetic Analyser | Applied Biosystems Applera, Weiterstadt |
| Bakterien-Inkubator | Heraeus, Hanau |
| Bakterienschüttler, Unitron | Infors, Einsbach |
| Begasungsbrutschrank (BBD 6220) | Heraeus, Hanau |
| Biofuge fresco | Heraeus, Hanau |
| Detektionssystem (BAS 1500 Fuji Film) | Raytest, Straubenhardt |
| Elektrophoresekammer | Bio-Rad, München |
| FACS-Gerät (FACSCalibur) | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135TV | Zeiss, Göttingen |
| Geltrockner (Model 583) | Bio-Rad, München |
| GeneAmp PCR System Thermal Cycler (9700) | Applied Biosystems Applera, Weiterstadt |
| GeneAmp 5700 Sequence Detection System | Applied Biosystems Applera, Weiterstadt |
| Herasafe Sterilbank | Heraeus, Hanau |
| 7700 HT Sequence Detection System | Applied Biosystems Applera, Weiterstadt |
| Hyperprocessor (Filmentwickler) | Amersham Pharmacia, Freiburg |
| Lichtmikroskop Axiovert 25 | Zeiss, Göttingen |
| Megafuge 1.0 R | Heraeus, Hanau |
| NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Nikon Eclipse E600 | Nikon, Düsseldorf |
| Packard TriCarb 2100 TR | |
| Liquid Scinillation Analyzer (β- und γ-conter) | GMI, Ramsey, USA |
| Microplate Reader Sunrise | Tecan, Neustadt |
| UV-Gel Kamera, GelDoc 1000 | Bio-Rad, München |
| Ultraschallbad Transsonic digital S | Bender & Hobein, Singen |
| Ultrazentrifuge Avanti centrifuge (J30I) | Beckman, Krefeld |
| Ultrazentrifuge Optima TLX | Beckman, Krefeld |
| Semidry-Blot-Apparatur | Bio-Rad, München |

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Kultivierung von humanen Brustkrebszellen und RAW-264.7-Makrophagen

Die humanen Brustkrebszelllinien wurden in Fötalen Kälberserum (FKS)-haltigem Vollmedium bis zu einer Zelldichte von 80-90% in Zellkulturflaschen (175cm²) bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Als Vorbereitung für die Kryo-Konservierung wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS durch die Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung vom Kulturflaschen-Boden abgelöst. Nach einer Inkubationszeit von 3-5min wurde das Trypsin durch Zugabe von Wachstumsmedium inaktiviert und die Zellen nachfolgend bei einer Umdrehung von 800Upm in einer Tischzentrifuge für 5min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml FKS aufgenommen, je 500µl in je ein Kryoröhrchen überführt (1000µl/Gefäß) und für weitere 15 min auf Eis gestellt. Danach wurden tropfenweise 500µl 20% (v/v) DMSO/FKS zugegeben und die Zellen nachfolgend für weitere 30min auf Eis gelagert. Anschließend wurde die Zellsuspension über Nacht bei -80°C langsam heruntergekühlt, bevor sie in Flüssigstickstoff (-190°C) dauerhaft gelagert wurde.

Zum Passagieren der Zellen wurden diese einmal mit PBS gewaschen und im Anschluss mit 5ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C für 3min inkubiert, bis sich die Zellen durch leichtes Klopfen von der Fläche der Kulturflasche ablösten. Die abgelösten Zellen wurden in 10ml Wachstumsmedium resuspendiert, bei 800Upm für 5min zentrifugiert und dann in einer Verdünnung von 1:4 in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.1.2. Stimulation von humanen Brustkrebszellen und RAW-264.7-Makrophagen

Für die Experimente wurden konfluente Brustkrebszellen oder subkonfluente RAW-264.7-Makrophagen einmal mit PBS gewaschen und durch die Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung vom Kulturflaschen-Boden abgelöst, in Wachstumsmedium aufgenommen und in einer Konzentration von ca. $3,5 \times 10^5$ Zellen pro Well auf 6-Well-Platten (wenn nicht anders beschrieben) ausgesät. Nach spätestens 24h wurde das Wachstumsmedium durch FKS-freies Hungermedium ersetzt. Nach weiteren 24h in Hungermedium wurden die Zellen für die angegebenen Zeitpunkte mit einzelnen oder mehreren der in Tabelle 2.2 aufgeführten Substanzen behandelt.

Tab. 2.2 Stimulatoren und Inhibitoren für die Zellkultur

| Substanz | Eigenschaft | Endkonzentration |
|--|-------------------------------|------------------|
| TPA | Phorbolster | 10-100nM |
| DETA-NONOate | NO-Donor | 100-500 μ M |
| SNAP | NO-Donor | 100-500 μ M |
| Spermine-NONOate | NO-Donor | 100-500 μ M |
| LPS | TLR 4-Aktivator | 1 μ g/ml |
| IFN- γ (Maus) | Th-1-Zytokin | 100U/ml |
| Rottlerin | PKC δ -Inhibitor | 10 μ M |
| Gö6976 | PKC α/β -Inhibitor | 20nM |
| CGP4251 | PKC α/β -Inhibitor | 100nM |
| PD98059 | MEK-Inhibitor | 30 μ M |
| SP600125 | JNK-Inhibitor | 10 μ M |
| SB203580 | p38-Inhibitor | 10 μ M |
| N-Acetylcystein (NAC) | Antioxidanz | 10mM |
| Diphenyleiodonium (DPI) | NADPH-Oxidase-Inhibitor | 10 μ M |
| Cycloheximid | Translations-Inhibitor | 10 μ g/ml |
| Trichostatin A (TSA) | HDAC-Inhibitor | 100-250nM |
| Mithramycin A | SP1-Inhibitor | 100-150nM |
| Actinomycin D | RNA-Synthese-Inhibitor | 10 μ g/ml |
| Histondeacetylase-Inhibitor III (M344) | HDAC-Inhibitor | 100-150nM |
| Clasto-Lactacystin β -Lacton | Proteasom-Inhibitor | 5 μ M |
| L-NMMA | iNOS-Inhibitor | 1mM |
| Dibutryl-cGMP | Second Messenger | 100-500 μ M |

2.2.1.3. Migrationsassay (Transwellassay)

Die Migration von MCF-7-Zellen wurde mit Hilfe einer modifizierten Boyden-Kammer (Keely, 2001) untersucht. Dazu wurden so genannte Transwellplatten der Firma *Nunc* verwendet. Die Porengröße der Polycarbonatmembran betrug 8 μ M.

Vor Versuchsbeginn wurde die Unterseite des Transwells (Membraneinsatz mit Polycarbonatmembran) zunächst mit Kollagen IV (20 μ g/ml) bei 37°C für 2h beschichtet. Anschließend wurden die Transwell-Einsätze mit PBS gewaschen und auf eine neue 24-Well-Platte platziert. Die zuvor für 24h in Hungermedium kultivierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. In der unteren Kammer wurden 600 μ l Hungermedium vorgelegt. In die obere Kammer wurden 100 μ l der Zellsuspension (1×10^5 Zellen) zusammen mit dem jeweiligen Stimulus pipettiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen für 24h bei 37°C inkubiert. Die nicht migrierten Zellen wurden mit Hilfe eines Wattestäbchens von der Membranoberfläche der oberen Kammer entfernt. Danach

wurde die Membran mit PBS gewaschen und für 30min in 550 μ l Formaldehyd (4%) fixiert. Das Transwell wurde mit 100% Methanol gewaschen und die Zellkerne für 15min bei 37°C mit DAPI (1 μ g/ml) angefärbt. Anschließend wurde überschüssiges DAPI durch Waschen mit Methanol entfernt. Die Membran wurde für 24h bei 37°C getrocknet. Die migrierten Zellen wurden mit Hilfe der DAPI-Färbung durch ein Fluoreszenzmikroskop (380nm) mit einem 20 x Objektiv quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte durch individuelle Zählung von 4 Gesichtsfeldern pro Membran.

2.2.1.4. Kokultur

Vor Beginn der Kokultur-Experimente wurden Transwell-Einsätze zunächst für 1h bei 37°C mit Medium inkubiert. Zur Durchführung der Kokultur-Versuche wurden RAW-264.7-Makrophagen auf die Oberfläche der Transwell-Einsätze (Porengröße von 0,02 μ M) mit einer ungefähren Zelldichte von $2,9 \times 10^5$ pro Einsatz ausgesät. Nach erreichter Adhärenz der Zellen (in der Regel nach 16h) erfolgte die Stimulation der Makrophagen mit IFN- γ und Lipopolysacchariden (LPS) für eine Dauer von 6h. Die MCF-7-Zellen wurden zunächst getrennt von den Makrophagen in einer Dichte von ca. $3,5 \times 10^5$ MCF-7-Zellen pro Well in 6-Wells kultiviert und mit den entsprechenden Substanzen stimuliert. Nach Zugabe der Stimuli wurden die Zellkultureinsätze mit den Makrophagen in die MCF-7-tragenden Zellkultur-Wells überführt. Ein Teil der überführten Zellkultureinsätze wurde zuvor mit PBS gewaschen um die Stimuli vor dem Zelltransfer zu entfernen. Hier wurden nur mit Medium bedeckte Makrophagen in die Zellkultureinsätze transferiert. Alle Zellen wurden daraufhin für 24h bei 37°C kokultiviert.

Im verwendeten Kokultursystem wird ein direkter Zellkontakt zwischen MCF-7-Zellen und Makrophagen durch die Porenmembran des Transwells verhindert. Der Austausch von löslichen Botenstoffen zwischen den verschiedenen Zellen wird hingegen durch die Diffusion zwischen den Transwells gewährleistet. Nach Abschluss der Kokultur wurde der Einsatz mit den Makrophagen entfernt und die Überstände der MCF-7-Zellen für weitere Untersuchungen verwendet.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen

Die Gesamt-RNA aus humanen Brustkrebszellen wurde mit Hilfe des Trizol®-Reagenz (Sigma Aldrich, Taufkirchen) nach Vorgaben des Herstellers isoliert. Nach Entsalzen des RNA-Präzipitats in Isopropanol wurde dieses für 5-10min bei 37°C getrocknet und in 30-50µl H₂O/0.1% DEPC aufgenommen. Bevor die Gesamtmenge der isolierten RNA bestimmt wurde, wurden die Proben zur vollständigen Lösung für weitere 10min bei 60°C inkubiert. Die Qualität der isolierten RNA wurde durch die gelelektrophoretische Auftrennung von 1µg isolierter RNA auf einem Agarosegel (1%) überprüft.

2.2.2.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch ermittelt, indem die optische Dichte (OD) der Proben bei einer Wellenlänge von 260nm mit Hilfe eines NanoDrop ND-1000 Spektrophotometers gemessen wurde. Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$K [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

V= Verdünnung; F= Faktor (40 für RNA, 50 für DNA)

2.2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden zur Analyse elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt.

Für die Auftrennung von DNA-Molekülen wurde ein Gel aus 1% (w/v) Agarose in 1 x TBE Puffer mit Ethidiumbromid (0,5µg/µl) verwendet. Die Elektrophorese wurde in 1 x TBE-Puffer mit einer Spannung von 10V/cm² Gel durchgeführt. Die Größe der DNA-Fragmente wurde anhand eines zusätzlich aufgetragenen DNA-Molekulargewichtsmarkers ermittelt. Nach dem Auftrennen der Nukleinsäuren wurden die Gele unter UV-Licht mit einer assoziierten Kamera (GelDoc 1000, Bio-Rad) fotografiert.

2.2.2.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „*Qiaquick Gel Extraction Kit*“ der Firma Qiagen verwendet. Dieses System beruht auf einer Kieselgel-Membran, die sowohl an einzel- als auch doppelsträngige DNA bindet. Für die Extraktion wurden die zu isolierenden DNA-Fragmente mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten und nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.2.5. Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT)

Bei der Reversen-Transkriptase-Reaktion wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurden hier gen-unspezifische Random Hexamer Primer verwendet.

Reverse Transkriptase-Reaktion:

500ng RNA
6 μ l Random Hexamer Primer
ad 11 μ l H₂O/ 0,1% DEPC

Der erste Schritt der RT-Reaktion, der zur Anlagerung der Random Hexamer Primer an die RNA führte, wurde für 10min bei 70°C durchgeführt und durch den Transfer der Proben auf Eis abgestoppt.

Danach wurde der Reaktion

4 μ l 5 x First Strand Puffer
2 μ l 0,1 M DTT
1 μ l dNTP Mix (10mM) [dATP, dCTP, dGTP, dTTP]
1 μ l RNase out (40U/ μ l)
1 μ l Superscript-II RNase H-RT (200U/ μ l)

zugegeben und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gemischt. Der Ansatz wurde zuerst für 10min bei Raumtemperatur und im Anschluss daran für weitere 50min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Erhitzen der Proben für 5min bei 95°C (Inaktivierung des Enzyms) und nachfolgendes Abkühlen auf 4°C beendet.

2.2.2.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation von spezifischen cDNAs wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion angewandt, ein Verfahren, welches die spezifische exponentielle Amplifikation einer definierten, von zwei Oligonukleotid-Primern begrenzten, DNA-Sequenz ermöglicht (Mullis et al., 1992). In Kombination mit der RT-Reaktion (s. 2.2.2.5) wurde die PCR zum semi-quantitativen Nachweis von mRNA verwendet.

Ein PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 100-500ng cDNA
- 3 μ l 10 x Reaktionspuffer
- 1 μ l dNTP (je 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 1 μ l Vorwärts-Primer (50ng/ μ l)
- 1 μ l Rückwärts-Primer (50ng/ μ l)
- 1 μ l Biotherm DNA-Polymerase (5U/ μ l)
- ad 30 μ l H₂O/0,1% DEPC

Die Reaktion wurde in einem „GeneAmp PCR System Thermal Cycler (9700)“ durchgeführt. Die Bedingungen variierten abhängig von dem zu untersuchenden Gen sowie dem GC-Gehalt der Primer (siehe Tab. 2.1). Die Reaktionsbedingungen für die verschiedenen Versuche sind in folgender Tabelle zusammengefasst (Tab. 2.3).

Tab. 2.3 PCR-Bedingungen

| Primer | Denaturierung | Anheftung | Elongation | Zyklenzahl |
|-------------|---------------|-------------|------------|------------|
| MMP-9 | 94°C, 1min | 52°C, 2min | 72°C, 1min | 35 |
| EF2 | 93°C, 20sec | 55°C, 30sec | 72°C, 1min | 30 |
| 3'UTR-MMP-9 | 94°C, 1min | 58°C, 1min | 72°C, 1min | 30 |

Sämtliche Reaktionen wurden einheitlich mit einem initialen Denaturierungsschritt für 5min bei 94°C begonnen und nach dem letzten Reaktionszyklus durch Inkubation bei 72°C und nachfolgendes Abkühlen auf 4°C beendet.

2.2.2.7. Real-Time PCR (Taqman)

Die Ansätze wurden in Duplikaten pipettiert und sämtliche Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Für die Analyse wurden jeweils 500ng RNA unter Verwendung von Hexanukleotid-Primern in cDNA umgeschrieben.

Folgende Pipettierschemata wurden für die Analysen verwendet:

| | |
|---|---|
| GAPDH: | MMP-9: |
| 1 μ l cDNA | 1 μ l cDNA |
| 1,25 μ l Sonde (VIC-markiert) | 1,25 μ l Sonde (FAM-markiert) |
| inklusive Primer | inklusive Primer |
| 12,5 μ l PCR-Mix (Applied Biosystems) | 12,5 μ l PCR-Mix (Applied Biosystems) |
| 0,5 μ l ROX Referenzfarbstoff | 0,5 μ l ROX Referenzfarbstoff |
| 9,75 μ l H ₂ O | 9,75 μ l H ₂ O |

Die Proben wurden sorgfältig durchmischt und anschließend in eine 96-Well-Platte pipettiert. Der PCR-Lauf wurde in einem „7700 HT Sequence Detection System“ der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Folgende PCR-Bedingungen wurden verwendet:

| | | |
|------|-------|-------------|
| 50°C | 2min | |
| 95°C | 2min | |
| 95°C | 15sec | } 40 Zyklen |
| 60°C | 60sec | |

Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode ausgewertet. Um die relative Expressionsregulation zu erhalten, wurde der CT-Wert ("*threshold cycle*") des zu untersuchenden Gens mit dem CT-Wert eines durch die verwendete Stimulation nicht regulierten Gens (GAPDH) verrechnet und danach mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Relative Expression: } 2^{-(\Delta C_T - \Delta\Delta C_T)}$$

ΔC_T : Differenz der CT-Werte zwischen reguliertem und unreguliertem Gen

$\Delta\Delta C_T$: Differenz zwischen den regulierten Proben ΔC_T ($\Delta\Delta C_T$) und der Kontrolle ΔC_T (C ΔC_T)

2.2.3. Manipulation von DNA

2.2.3.1. Restriktionsendonuklease-Verdau

Zu analytischen Zwecken wurde 1 μ g Plasmid-DNA mit 1Unit Restriktionsendonuklease in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem in 10-20 μ l Gesamtvolumen für 1h bei 37°C

verdaut. Für präparative Zwecke wurden 5µg Plasmid-DNA in einem 50µl Ansatz für mindestens 2h verdaut. Die zugegebene Menge der Restriktionsendonuklease wurde der Menge des Verdau angepasst, sollte aber nie 10% des Gesamtvolumens überschreiten.

2.2.3.2. Klonierung von PCR-Produkten mittels TOPO™ TA-Cloning Kit und Transformation

PCR-Produkte wurden mit Hilfe des TOPO™ TA-Cloning Kits (Invitrogen) in den TOPO-Vektor kloniert.

Ansatz für Ligationsreaktion:

2µl PCR-Produkt

2µl ddH₂O

1µl Salz-Lösung

1µl Vektor

Der Ligationsansatz wurde für 5min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. 2µl des Ligationsansatzes wurden mit 50µl „One shot TM“ kompetenten *E. coli* Bakterien (Stamm „XL-1-Blue“) gemischt und für 10min auf Eis inkubiert. Die Transformation der Bakterien erfolgte durch einen Hitzeschock für 30sec bei 42°C. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis wurden die Bakterien mit 250µl SOC-Medium versetzt und für 1h bei 37°C (300Upm) geschüttelt.

Je 50µl der Bakteriensuspension wurden auf eine zuvor mit 50µl X-Gal (40mg/ml in DMSO) und 50µl IPTG (100mM) bestrichenen LB-Ampicillin-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht in einem Bakterien-Inkubator (Haereus) bei 37°C inkubiert. Das Bestreichen der Platten mit X-Gal und IPTG ermöglichte eine Blau/Weiß-Selektion der Bakterienklone. Anschließend wurden weiße (in der Regel positiven Klone) gepickt, in 2ml LB-Medium überführt, dem 50µg/ml Ampicillin zugesetzt wurde, und über Nacht bei 37°C in einem Bakterieninkubator geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde am nächsten Tag zur Isolierung der Plasmid-DNA mittels Minipräparation verwendet.

2.2.3.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) aus Bakterien isoliert. 1ml einer Übernachtskultur (siehe 2.2.3.2) wurde in einem Reaktionsgefäß für 1min bei 13.000Upm (Biofuge fresco, Rotor F178818) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100µl Puffer P1 (Resuspendierungspuffer)

resuspendiert. Anschließend wurden 200 μ l *Puffer P2* (Neutralisierungspuffer) und 150 μ l *Puffer P3* (Lysispuffer) hinzugefügt und der komplette Ansatz gemischt. Zur Abtrennung von Zelltrümmern und chromosomaler DNA folgte ein Zentrifugationsschritt für 15min bei 13.000Upm und 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Präzipitation der Nukleinsäuren mit 800 μ l Isopropanol gemischt. In einem weiteren Zentrifugationsschritt (15min bei 13.000Upm und 4°C) wurde die Plasmid-DNA pelletiert. Das Pellet wurde mit 100 μ l 70% Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 30-50 μ l H₂O gelöst.

2.2.3.4. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde mit Hilfe des ABI-Prism™ 310 Genetic Analyser durchgeführt, dessen Methode auf der Didesoxynukleotid-Kettentermination-Reaktion basiert (Sanger et al., 1977). Die Rohdaten wurden mit Hilfe der "Abi Prism"-Sequenzierungsanalysen-Software ausgewertet. Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem Thermocycler (GeneAmp 9700) mit 25 Zyklen der folgenden Reaktionsschritte durchgeführt: 96°C für 10sec, 55°C für 5sec, 60°C für 4min. Für den Detektionsprozess wurden die Proben wie vom Hersteller vorgeschrieben vorbereitet.

Sequenzierungsreaktion:

x μ l PCR-Produkt oder Plasmid-DNA aus Minipräparation (10-100ng)
4 μ l Sequenzierungs-Premix
1 μ l Primer (3-10pmol)
ad 10 μ l H₂O

2.2.3.5. Transiente Transfektion und Reporter-gen-Untersuchung

Klonierung eines MMP-9-Reporterplasmids:

Für die Generierung eines hybriden Reportergens aus 3'UTR- und 5'UTR-Bereichen erfolgte zunächst eine Amplifikation des MMP-9-3'UTR-Fragmentes aus dem pGL3p-Vektor. Dabei wurden über Primerverlängerung die Schnittstellen *XbaI* (5'Ende) und *Sall* (3'Ende) eingeführt. Anschließend wurde das PCR-Produkt in den TOPO™-Vektor (beschrieben in Kapitel 2.2.3.2) subkloniert und nachfolgend mit den oben genannten Restriktionsenzymen wieder aus dem Plasmid herausgeschnitten. Der hierzu notwendige enzymatische Verdau der Plasmid-DNA wurde bei 37°C für mindestens 2h nach folgenden Reaktionsansätzen durchgeführt.

| | |
|----------------------------------|--------------------------|
| 5µg MMP-9-Promotor in pGL3-Basic | 15µl 3'UTR in TOPO |
| 1µl <i>XbaI</i> | 1,5µl <i>XbaI</i> |
| 1µl <i>SalI</i> | 1,5µl <i>SalI</i> |
| 5µl Puffer H | 5µl Puffer H |
| ad 50µl H ₂ O | ad 50µl H ₂ O |

Die Reaktionsansätze wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und das geschnittene DNA-Fragment mit Hilfe der unter Abschnitt 2.2.2.4 beschriebenen Methode aus dem Gel eluiert.

Die Ligation wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Reaktion wurden 1µl Vektor (16ng/µl) und 7µl DNA-Fragment (34ng/µl) verwendet. Die Ligation erfolgte bei 14°C über Nacht. 2µl der Reaktion wurden wie in Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben zur Transfektion von *E.coli* (Stamm „XL-1-Blue“) eingesetzt, welche anschließend auf Agar mit Ampicillin (50µg/ml) ausplattiert wurden. Die Plasmide wurden nach der in Kapitel 2.2.3.3 beschriebenen Methode isoliert.

Die transiente Transfektion von MCF-7-Zellen wurde mit Hilfe des Transfektions-Reagenz „Effectene“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden ein Tag vor der Transfektion ca. 350.000 Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät. Für die Transfektion wurde zwischen 200-800ng DNA eingesetzt.

Um die Effizienz der Reporter-Expression zu bestimmen, wurde das „Dual-Luciferase Reporter Assay System“ der Firma Promega verwendet. Die Proben wurden nach Angaben des Herstellers aufbereitet und mit Hilfe eines Luminometers (Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) analysiert.

2.2.4. Biochemische Methoden

2.2.4.1. Präparation von Zelllysaten

Die Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurden wie bereits in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben kultiviert. Die Zellen wurden vor der Zellyse mit PBS (4°C) gewaschen und durch Abschaben in Homogenisierungspuffer (200µl/Well einer 6-Well-Platte) aufgenommen. Die Zellen wurden durch Sonifizieren im Ultraschallbad (Transsonic digital S) für 3min bei 80% der maximal möglichen Leistung aufgeschlossen. Um die Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Proben bei 13.000Upm und 4°C für 10min zentrifugiert (Biofuge fresco, Rotor F178818). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Der Proteingehalt der Zellhomogenate wurde mit Hilfe der Bradford-Methode (siehe 2.2.4.3) bestimmt.

2.2.4.2. Herstellung von Kernextrakten und zytosolischen Lysaten

Zur Gewinnung von Kernextrakten und zytosolischen Extrakten wurden die Zellen zunächst mit PBS (4°C) gewaschen und anschließend in 0,5ml eiskaltem PBS/EDTA (1mM, pH 8,0) von den Zellkulturschalen abgeschabt. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 1min bei 5.000Upm (Biofuge fresco, Rotor F178818) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 300µl kaltem hypotonem („Puffer A“) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15min auf Eis wurden 20µl NP-40 (10%) zugegeben und das Gemisch für 10sec mittels Vortexen gemischt. Anschließend wurden die Kerne und die Zellfragmente durch eine Zentrifugation bei 13.000Upm für 1min sedimentiert. Der Überstand mit den zytosolischen Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert. Das Pellet wurde in 70µl hypertonem Puffer („Puffer C“) für 20min unter ständigem und starkem Schütteln resuspendiert. Kern- und Zelldebris wurden durch einen abschließenden Zentrifugationsschritt bei 13.000Upm für 20min bei 4°C abgetrennt, die löslichen Kernproteine aliquotiert und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration der isolierten Homogenate wurde mit Hilfe der Bradford-Methode (siehe 2.2.4.3) ermittelt.

2.2.4.3. Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinmenge in zellulären, zytosolischen oder nukleären Lysaten wurde mit Hilfe der Bradford-Methode ermittelt (Bradford, 1976).

Hierzu wurden die Proben meistens vorverdünnt (zwischen 1:40 und 1:200) und für eine Doppelbestimmung jeweils 200µl in eine 96-Well-Platte pipettiert. Zum Erstellen einer Eichkurve wurden verschiedene, festgelegte Konzentrationen von BSA (20-80µg/ml) eingesetzt. Zu den Proben wurden jeweils 50µl des *Roti-Quant*-Reagenz (Roth) vorgelegt. Die optische Dichte der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 595nm und einer Referenz-Wellenlänge von 450nm in einem Mikroplatten-Lesegerät (Tecan) gemessen. Aus den Absorptionswerten wurde dann mit Hilfe der Software „Magellan“ (Tecan) der Proteingehalt der Proben ermittelt.

2.2.4.4. Proteinpräzipitation mit Trichloressigsäure (TCA)

Diese Methode wurde zur Anreicherung von Proteinen aus dem Zellkulturüberstand verwendet. Hierzu wurden 900µl des Zellkulturüberstandes mit 100µl einer TCA-Lösung (50%) versetzt, gemischt und für 10min bei 13.000Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpräzipitat zweimal mit je 200µl Aceton gewaschen

(Zentrifugation jeweils für 2min bei 13.000Upm und 4°C). Danach wurde das Proteinpräzipitat bei 37°C für 30min getrocknet und anschließend in 30-60µl reduzierendem Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein Polyacrylamid-Gel zur Western-Blot-Analyse wurden die Proben für 10min bei 95°C denaturiert.

2.2.4.5. Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurde in der Regel 300-500µg Protein eingesetzt. Um zuvor unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde 5% FKS (v/v) zum Lysat zugegeben. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von 1,5mM Iodoacetamid und des Primärantikörpers. Der Ansatz wurde mit Lysispuffer auf ein Volumen von 1ml aufgefüllt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 75µl Protein-G-Sepharose-„Beads“ zum IP-Ansatz zugegeben und die Probe für eine Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Rotieren inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose durch Zentrifugieren (1min) bei 4500Upm sedimentiert und das Pellet mindestens dreimal mit Niedrigsalz- und anschließend mit Hochsalzpuffer gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt (1min bei 4500rpm) wurde das Sepharose-Sediment mit Hilfe einer Hamilton-Pipette getrocknet und in 20-25µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach 10-15minütiger Denaturierung bei 95°C wurden die Proben direkt auf ein SDS-haltiges Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

2.2.4.6. Western-Blot

Die Western-Blot-Technik dient der Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen in komplexen Proteingemischen aus Zell- oder Gewebeproben. Zur Auftrennung der Proteine wurde die Methode der diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE nach Laemmli, 1970) durchgeführt.

Tab. 2.4 Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel (je 100mm²) bei der SDS-PAGE

| | | Puffer | Acrylamid | ddH ₂ O | 20% SDS | 10% APS | TEMED |
|----------------------|-----|--------|-----------|--------------------|---------|---------|-------|
| Trenngel- Puffer | 12% | 5ml | 8ml | 6,7ml | 100µl | 200µl | 10µl |
| | 10% | 5ml | 6,7ml | 8ml | 100µl | 200µl | 10µl |
| | 8% | 5ml | 5,4ml | 9,3ml | 100µl | 200µl | 10µl |
| Sammelgel- Puffer | | 2,5ml | 1,3ml | 6ml | | 60µl | 20µl |

Für den immunologischen Nachweis intrazellulärer Proteine wurden 20-50 μ g Gesamtprotein (siehe 2.2.4.1) verwendet. Das Lysat wurde in 4 x Laemmli-Puffer aufgenommen und direkt auf das Gel aufgetragen. Zur Untersuchung von extrazellulären Proteinen wurde die Proteinmenge aus 1ml TCA-gefälltem Zellkulturüberstand (siehe 2.2.4.3) verwendet.

Für die Western-Blot-Analyse wurden die Proben für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und auf ein Mini-Proteingel (System der Firma Biorad) geladen. Anschließend wurden die Proben in 1 x PAGE-Puffer bei 100V (bei konstanter Stromstärke) für 2-3h elektrophoretisch aufgetrennt.

Transfer auf eine PVDF-Membran:

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels Elektrotransfer (Transferkammer, Bio-Rad) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Zur Aktivierung wurde die Membran für 15sec in unverdünntes Methanol gelegt, und nach mehrfachem Waschen mit deionisiertem Wasser in den Transferpuffer überführt. Für den Transfer wurden vier Filterpapiere (Whatman 3MM) mit Transferpuffer benetzt und auf die untere Auflagefläche (Anode) der Transferkammer gelegt. Direkt darüber wurde die PVDF-Membran platziert. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde kurz in Transferpuffer gewaschen, auf die PVDF-Membran gelegt und mit vier weiteren Filterpapieren bedeckt, die ebenfalls mit Transferpuffer getränkt waren. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden vor dem Transfer entfernt. Der Transfer wurde bei RT mit einer konstanten Stromstärke von 70mA pro Mini-Gel für 70min durchgeführt. Durch Anfärben der Proteine auf der Membran mit Ponceau-S-Lösung wurde die Effizienz des Protein-Transfers kontrolliert. Die PVDF-Membran wurde nach dem Transfer an der Luft getrocknet und bis zur Immundetektion bei 4°C aufbewahrt oder direkt mit dem Blockierungspuffer inkubiert.

Immundetektion:

Die getrocknete Membran (s.o.) wurde zur Aktivierung für 15sec in Methanol getaucht, für 2min in deionisiertem Wasser gewaschen und für mindestens 1h in Blockierungspuffer geschüttelt. Anschließend wurde die Membran mit dem Primär-Antikörper (s. Tab 2.5) über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde der Blot mehrfach mit Waschpuffer (TBST) gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit dem „*horseradish-peroxidase*“ (HRP)-gekoppelten spezies-spezifischen Sekundär-Antikörper (s. Tab. 2.5) für 1h bei RT. Die Bedingungen für die Western-Blot-Analysen sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst.

Nach Wiederholung des Waschschrattes wurde die Membran bei Raumtemperatur mit dem ECL- oder ECL-Advanced-Detektions-Kit für 2 bzw. 5min entwickelt und die Chemolumineszenz mit Hilfe von Röntgenfilmen detektiert. Der Röntgenfilm (Kodak) wurde

dabei in einer Autoradiographie-Kassette bei Raumtemperatur exponiert und in einer Entwicklermaschine (Hyperprocessor, Amersham) entwickelt.

Tab. 2.5 Western-Blot-Bedingungen

| Primär-Antikörper | Blockierungspuffer | Verdünnung (in Blockierungspuffer) | Sekundär-Antikörper |
|-------------------|--------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| c-Jun | 2% MM | 1:1000 | 1h Anti-Kaninchen-HRP 1:10.000 |
| SAPK/JNK | 2% MM | 1:1000 | |
| NFκB p65 | 2% MM | 1:5000 | |
| Nucleolin | 1% MM | 1:1000 | |
| Phospho-p38 | 2% Adv | 1:1000 | |
| Phospho-Akt | 2% MM | 1:1000 | |
| p44/42 | 2% MM | 1:1000 | |
| Phospho-eIF-4E | 2% Adv | 1:500 | |
| c-Fos | 2% MM | 1:1000 | 1h Anti-Maus-HRP 1:10.000 |
| Phospho-SAPK/JNK | 2% MM | 1:1000 | |
| MMP-9 | 1% MM | 1:300 | |
| HDAC-1 | 2% MM | 1:1000 | |
| Akt | 10% MM | 1:1000 | |
| Phospho-p44/42 | 2% Adv | 1:1000 | |
| Phospho-c-Jun | 2% MM | 1:1000 | |
| β-Aktin | 2% MM | 1:10.000 | |
| p38 | 2% MM | 1:1000 | |

HRP = horseradish-peroxidase = Meerrettichperoxidase

MM = Magermilchpulver

Adv = Advanced

2.2.4.7. „Electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA)

Die EMSA-Methode wird zum Nachweis von DNA-Protein-Wechselwirkungen verwendet.

Zusammensetzung des Gels (30ml):

- 1,8ml 10x TBE
- 5,4ml Acrylamid (30%)
- 30 μ l TEMED
- 400 μ l APS (10%)
- 28,8ml H₂O

Radioaktive Endmarkierung doppelsträngiger DNA mit T4-Kinase:

20pmol der doppelsträngigen Oligonukleotide wurden mit 10 μ l Wasser verdünnt, für 2min bei 95°C erhitzt und anschließend auf Eis gebracht. Für die Kinase-Reaktion wurden 2 μ l 10 x Polynukleotid-Kinase (PNK)-Puffer, 1 μ l PNK (20U), 5 μ l [γ -³²P]-dATP (spezifische Aktivität: 6000Ci/mmol) hinzugefügt und die Proben für 1h bei 37°C inkubiert. Um eine vollständige Renaturierung der Einzelstrang-DNA zu ermöglichen, wurden die Proben über Nacht bei RT abgekühlt. Zur Auftrennung der radioaktiv markierten Oligonukleotide von den freien Nukleotiden wurden Sepharose-haltige Nick-Säulen (Amersham Biosciences) verwendet. Die Bestimmung des radioaktiven Einbaus erfolgte mit Hilfe der Szintillationsmessung. Für die Bindungsreaktion wurden 30.000cpm (ca. 2 μ l) der markierten Probe eingesetzt.

Bindungsreaktion:

- Radioaktiv markierte ds-DNA-Oligonukleotide (1,0-0,5ng)
- 3 x Bindungspuffer
- Protein aus nuklearen Extrakten (1-5 μ g)

Die Proben wurden mit hypertonischem Puffer („Puffer C“) auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l aufgefüllt und für 45min auf Eis gestellt. Für eine Supershift-Analyse, welche für die Identifizierung von DNA-bindenden Komplexen verwendet wurde, wurden die entsprechenden Antikörper (10ng/ml) für 30min oder über Nacht mit der radioaktiv markierten DNA-Probe bei 4°C inkubiert.

Elektrophorese der DNA-Proteinkomplexe:

Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen und bei 200V (bei konstanter Stromstärke) in 1 x TBE für 90min elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für 30min bei Raumtemperatur in einer speziellen Fixierungslösung fixiert. Das Gel wurde unter Vakuum für 2h bei 80°C getrocknet und radioaktive Signale mit Hilfe eines Phosphoimagers ausgewertet.

2.2.4.8. Transkriptionsfaktor-Assay

Die Transkriptionsfaktor-Assays (*Active motif*) für p-c-Jun, c-Fos und p65 wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Aufarbeitung der nukleären Extrakte erfolgte ebenfalls nach dem Protokoll des Herstellers. Für den Assay wurden jeweils 5µg der Probe eingesetzt.

2.2.4.9. PKC-Assay

Die Durchführung des PKC-Assay (*Promega*) erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers. Für die PKC-Reaktion wurden unverdünnte Proteinlysate verwendet. Es wurden jeweils 10µl der Proben auf die Membran aufgetragen.

2.2.4.10. Griess-Assay

Nitrit (NO₂⁻) ist ein stabiles Endprodukt von NO, welches aus der Reaktion mit molekularem O₂ entsteht. Zur Bestimmung der Stickstoffmonoxid-Produktion der Zelle wurde die Nitritmenge mit Hilfe des Griess-Reagenz in Zellkulturüberständen gemessen. Hierzu wurden 100µl des jeweiligen Zellkulturüberstandes auf einer ELISA-Platte mit 100µl der gebrauchsfertigen Griess-Lösung versetzt. Die Absorption wurde bei 540nm gemessen und der Nitritgehalt anhand einer Natriumnitrit-Standardkurve ermittelt.

2.2.4.11. SDS-PAGE-Zymographie

Die Analyse des Gelatinase-Gehaltes im Zellkulturüberstand wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE-Zymographie durchgeführt. Im Gegensatz zur herkömmlichen SDS-PAGE enthalten Zymographie-Gele (Trenn- und Sammelgele) zusätzlich Gelatine (0,1%), die von in den Proben enthaltenen Gelatinasen enzymatisch abgebaut wird. Verdauter Gelatine-Bereiche sind als ungefärbte Banden im ansonsten mit Coomassie blau gefärbten Gel erkennbar.

Zur Analyse wurden 1-10µl des Zellkulturüberstandes mit Wasser auf ein Volumen von 10µl aufgefüllt, mit 2 x Probenpuffer versetzt und direkt auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese (s. Kapitel 2.2.4.6) wurden die Proteine für 30min mit TRITON X-100 (2,5%)

renaturiert. Daraufhin wurde das Gel über Nacht bei 37°C im Entwicklungspuffer inkubiert. Die Färbung erfolgte in einer Coomassie-Färbelösung für die Dauer von 15min bis zu 1h. Anschließend wurde das Gel für ca. 15min in einer Entfärbelösung entfärbt, solange bis sich die hellen lytischen Zonen deutlich vom blauen Hintergrund abheben. Die Größe der Proteine wurde durch Vergleich mit einem Proteinmarker ermittelt. Die Gele wurden abschließend mit einem Imaging Densitometer System von Biorad eingescannt.

2.2.4.12. *In-vitro*-Zymographie

Mit dieser Methode wurden Effekte von exogen zugeführten Substanzen auf die MMP-9-Aktivität in zellfreien Kulturüberständen untersucht. Hierzu wurden 100µl von Zellkulturüberständen einer zuvor für 24h mit TPA stimulierten 6-Well-Platte mit der entsprechenden Substanz für einige Stunden bei Raumtemperatur bzw. 37°C inkubiert. Die Untersuchung der Proben erfolgte wiederum mittels SDS-PAGE-Zymographie.

2.2.4.13. Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden MCF-7-Zellen mit einer ungefähren Dichte von 1×10^5 /Well in 12-Well-Platten auf Deckgläsern (\varnothing 18mm) ausgelegt und für 24h in serumfreiem Medium inkubiert. Nach 24-stündiger Stimulation mit den entsprechenden Substanzen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Paraformaldehyd (2% w/v) für 15min bei RT fixiert. Nach Wegwaschen der Fixierlösung mit PBS wurden die Zellen mit Blockierlösung bei Raumtemperatur für 15min inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Inkubation mit dem Primär-Antikörper (1:200 in Blockierlösung) für 1h bei RT. Danach wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und mit dem Sekundär-Antikörper unter Lichtausschluss für weitere 30min inkubiert (Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Maus-IgG, 1:250 in Blockierlösung). Anschließend wurden die Zellen wiederum mit PBS gewaschen und die Zellkerne mit einer DAPI-Färbelösung (0,2µg/ml in PBS) angefärbt. Nach dem Wegwaschen der DAPI-Lösung wurden die Zellen mit einem gebrauchsfertigem Eindeckmedium (Fluoromount-G) eingedeckt. Zur Aufnahme der Immunfluoreszenzbilder wurde das Mikroskop Nikon Eclipse E600 (Nikon, Düsseldorf) verwendet. Die Aufnahmen wurden mit der Software „Image J und Zeiss LSM Browser“ bearbeitet.

2.2.4.14. MMP-9-Aktivitäts-Assay

Der „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) für die Bestimmung der MMP-9-Aktivität in Zellkulturüberständen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die

eingesetzten Zellkulturüberstände wurden zuvor mit Assay-Puffer 1:10 verdünnt und mit dem MMP-Aktivator (4-Aminophenyl-Quecksilberazetat) APMA aktiviert.

2.2.4.15. MMP-Antikörper-Array

Die Durchführung des MMP-Antikörper-Arrays erfolgte nach Herstellerangaben. Hierfür wurden Zellkulturüberstände aus sechs unterschiedlichen Experimenten vereinigt und anschließend mit 1 x Blockierungspuffer 1:3 verdünnt.

2.2.4.16. Metabolische Markierung mit ^{35}S -Methionin und ^{35}S -Cystein

Um den Einfluss von NO auf die Neusynthese von MMP-9 zu untersuchen, wurden die Zellen mit ^{35}S -Methionin- und ^{35}S -Cystein markiertem Kulturmedium versetzt und damit die Neusynthese von radioaktiv markiertem MMP-9 über Autoradiographie ermittelt. Hierzu wurden die MCF-7-Zellen zunächst für 24h in serumfreiem Medium kultiviert, mehrfach mit PBS gewaschen und für 14h mit den jeweiligen Stimulationsmedien inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Stimulationsmedium gewechselt und die Zellen mit denselben Stimuli für weitere 2h in nunmehr methionin- und cysteinfreiem Medium inkubiert. Danach wurden die neu synthetisierten Proteine durch Zugabe eines $30\mu\text{Ci}$ ^{35}S -Methionin/Cystein-Mixes für 6h radioaktiv markiert. Die Zellen wurden nachfolgend mehrfach mit eiskaltem PBS gewaschen und in $200\mu\text{l}/6$ -Well Homogenisierungspuffer aufgenommen. Der Aufschluss der MCF-7-Zellen erfolgte durch Sonifizierung im Ultraschallbad (Ultraschallbad Transsonic digital S) für 3min bei 80% der maximalen Leistung. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurden die aufgeschlossenen Zellen bei 13.000Upm für 10min (4°C) zentrifugiert (Biofuge fresco, Rotor F178818) und das Lysat in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Der radioaktive Einbau des ^{35}S wurde mit Hilfe der Szintillationszählung überprüft, indem 1/100 des Probenvolumens im Szintillationsmessgerät gemessen wurde. Anschließend erfolgte eine Immunpräzipitation (Abschnitt 2.2.4.5) mit einem MMP-9-spezifischen Antikörper, wobei für jede Immunpräzipitation die gleiche Menge an radioaktivem Extrakt eingesetzt wurde. Nach mehreren Waschschritten wurde der Überstand mit einem β -Aktin-spezifischen Antikörper erneut immunpräzipitiert, um eine Ladungskontrolle zu ermöglichen. Die präzipitierten Proben wurden mittels SDS-PAGE (s. Kapitel 2.2.4.6) aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele für 30min bei Raumtemperatur fixiert, unter Vakuum 2h bei 80°C getrocknet und mit einer Detektionsplatte exponiert, die mit Hilfe eines Phosphoimagers ausgewertet wurde.

2.2.4.17. RNA-Isolation aus präparierten Polysomen

Für die Isolierung von Polysomen wurden MCF-7-Zellen (ca. $3,5 \times 10^5$ Zellen pro Well einer 6-Well-Platte) zunächst mit PBS gewaschen, anschließend in Ethylendiamintetraazetat-(EDTA)-haltigem PBS von den Kulturschalen abgeschabt und für 2min bei 1000Upm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in $30\mu\text{l}$ Homogenisierungspuffer aufgenommen. Nachfolgend wurden die Proben für 15min bei 13.000Upm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nach der Proteinbestimmung der Proben wurden gleiche Proteinmengen auf ein Sucrosekissen (1M) im Zentrifugationsröhrchen geschichtet. Daraufhin erfolgte ein Ultrazentrifugationsschritt bei $100.000\times g$ für 2h. Das Pellet wurde danach in einem Volumen von $100\mu\text{l}$ PUB-Puffer gelöst und Ribonukleinsäuren über Nacht bei -80°C mit Lithiumchloridlösung gefällt. Nach Zentrifugation für 15min bei 13.000Upm und 4°C wurde das RNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und dann bei RT getrocknet. Nach Aufnahme der RNA in $10\mu\text{l}$ DEPC-haltigem Wasser wurde die RNA durch eine RT-PCR in cDNA umgeschrieben 2.2.2.5 und auf einem Agarosegel detektiert. Für die Gelelektrophorese wurde die gesamte isolierte RNA-Menge eingesetzt.

2.2.4.18. LDH-Assay

Der Laktatdehydrogenase (LDH)-Zytotoxizitäts-Assay ist ein kolorimetrischer Assay, der quantitativ die Zytotoxizität und Zytolyse von Zellen über die Messung der LDH-Freisetzung geschädigter Zellen bestimmt.

Die Durchführung des LDH-Zytotoxizitäts-Assays erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Alle Experimente wurden in Doppelbestimmung mit unverdünnten Zellkulturüberständen durchgeführt. Das Reagenz wurde nach Angaben des Herstellers gemischt und zusammen mit dem Überstand in einer 96-Well-Platte inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Proben bei 495nm.

3. Ergebnisse

3.1. Effekt des Phorbolesters TPA und des NO-Donors DETA-NO auf die MMP-9-Spiegel im Zellkulturüberstand

TPA ist ein in der Grundlagenforschung häufig verwendeter Stimulus, welcher die Expression zahlreicher Gene induziert. Die zur Gruppe der Phorbolester zählende Substanz ist besonders durch ihre potenten tumor-promovierenden Eigenschaften gekennzeichnet. Sie aktiviert, analog zu Diacylglycerol, sowohl die Klasse von konventionellen als auch neuen Isoformen der PKC. In der Literatur finden sich einige Beispiele dafür, dass die Inkubation von MCF-7-Zellen mit TPA eine massive Induktion der MMP-9-Expression und Sekretion bewirkt (Liu et al., 2002; Johnson et al., 1999). Zur Aufklärung der NO-vermittelten Mechanismen auf die stimulierte MMP-9-Expression wurde dieser Stimulus gewählt, weil dieser aus unserer Sicht eine starke und reproduzierbare Expression der MMP-9 versprach. In dieser Dissertation wurde der Fokus sowohl auf die parakrine als auch auf die endokrine Wirkung von NO auf Tumorzellen gelegt, da neben Tumorzellen selbst auch den Tumor infiltrierende und benachbarte Stromazellen für die NO-Produktion im Tumorgewebe verantwortlich sind (Fukumura et al., 2006). Um diese Situation in Zellkultur zu simulieren, wurden daher verschiedene zellpermeable NO-Donoren appliziert.

3.1.1. Identifizierung von TPA- und/oder NO-regulierten MMPs und TIMPs

Zunächst sollte die Wirkung von NO auf verschiedene MMPs und TIMPs untersucht werden. Als Modellsystem wurden MCF-7-Zellen ausgewählt, da diese zu den am besten charakterisierten und am meisten verwendeten Brustkrebszelllinien zählen (Lacroix und Leclercq, 2004).

Zur Identifizierung NO-regulierter MMPs und TIMPs wurde ein Antikörper-Array verwendet. Wie in Abb. 3.1 zu sehen, zeigt keines der im Assay getesteten Proteine eine hohe basale Expression. Lediglich TIMP-2 zeigt eine etwas stärkere basale Expression (OD/mm <0,16). Nach einer 24-stündigen Stimulation mit TPA (100nM) zeigt sich hingegen ein deutlich unterschiedliches Expressionsmuster der einzelnen Proteasen und Antiproteasen. Besonders deutlich ist der Anstieg der TIMP-1- und MMP-10-Expression (auf OD/mm ~0,78). Darüber hinaus zeigt auch die MMP-9 deutlich erhöhte Expressionsspiegel nach TPA-Stimulation der Zellen (auf OD/mm = 0,51). Die Expression von MMP-1 und TIMP-2 wird dagegen durch TPA weniger stark verändert (von OD/mm = 0,02 auf OD/mm = 0,41 bzw. von OD/mm < 0,16 auf OD/mm = 0,43). Durch die zusätzliche Behandlung der Zellen mit

DETA-NO (500 μ M) werden die Proteinspiegel von TIMP-1, MMP-1 und MMP-9 deutlich reduziert (um durchschnittlich OD/mm 0,2-0,3), wohingegen die Expression von MMP-10 nahezu unverändert bleibt (von OD/mm = 0,78 auf OD/mm = 0,65). Ebenfalls nur geringfügig verändert zeigt sich die Expression von TIMP-2 (von OD/mm = 0,43 auf OD/mm = 0,35). Da MMP-9 die stärkste Modulation, sowohl durch TPA als auch durch NO aufwies, haben wir unsere nachfolgenden Untersuchungen auf diese MMP beschränkt.

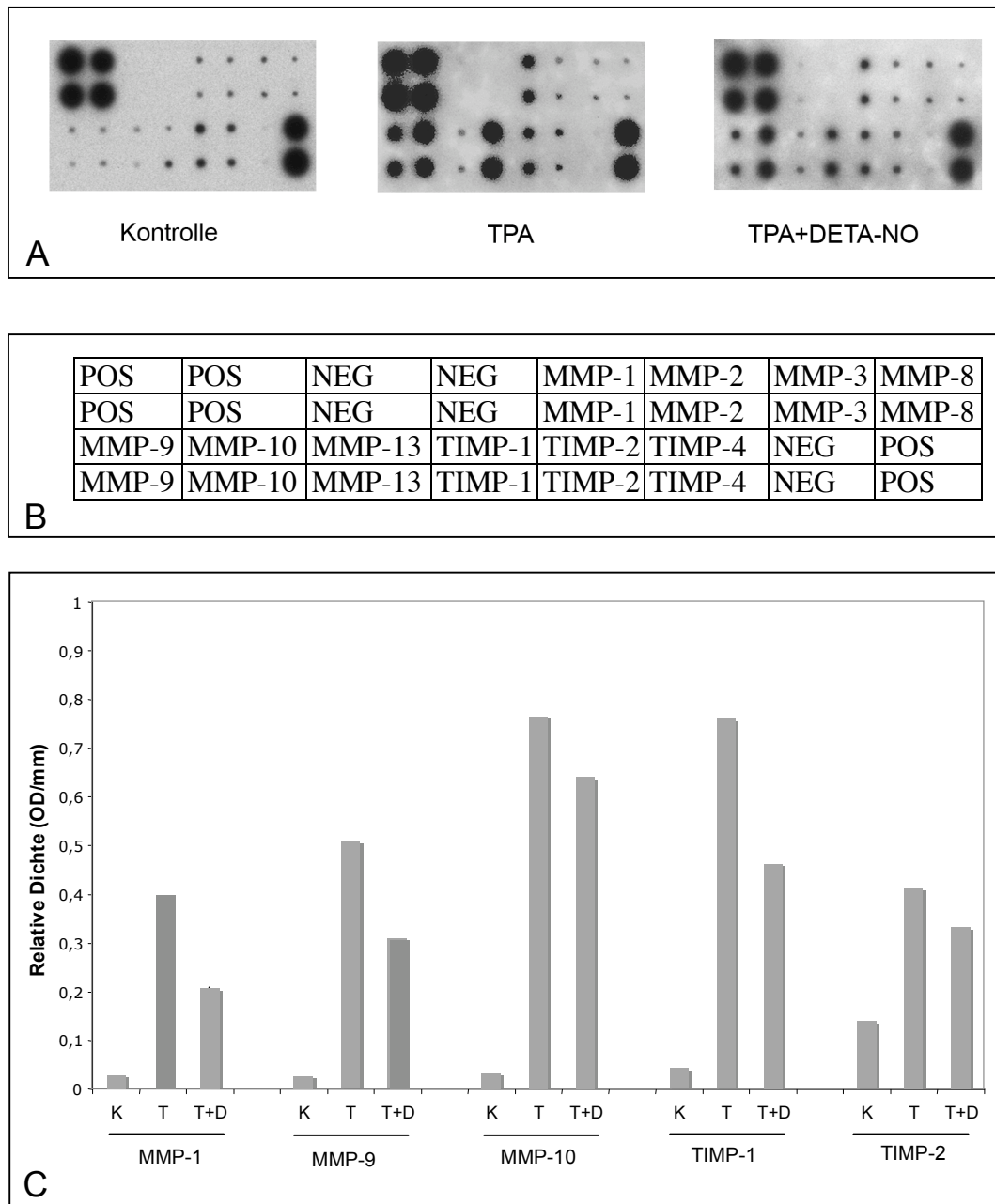


Abb. 3.1 Effekt von TPA und DETA-NO auf die Expression von verschiedenen MMPs und TIMPs

DETA-NO inhibiert die TPA-induzierte MMP-9- und TIMP-1-Expression. MCF-7-Zellen wurden für 24h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500 μ M] stimuliert. **(A)** Für den Antikörper-Array wurden Zellkulturüberstände aus sechs vereinigten Versuchen eingesetzt. Es wurde 1ml des 1:3 verdünnten Zellkulturüberstandes verwendet. **(B)** Die Angaben in der Tabelle entsprechen den jeweiligen Primär-Antikörpern, die auf den einzelnen Membranflächen verankert sind. POS=Positivkontrolle, NEG=Negativkontrolle. **(C)** Densitometrische Auswertung der am stärksten regulierten MMPs und TIMPs. K=Kontrolle, T=TPA [100nM], T+D=TPA [100nM] plus DETA-NO [500 μ M].

3.1.2. Expression der MMP-9 in verschiedenen Brustkrebszelllinien

Um zu untersuchen, ob der beobachtete Effekt zellspezifisch nur in MCF-7-Zellen vorzufinden ist, wurden Expressionsstudien zur MMP-9 auch in anderen Mammakarzinomzelllinien durchgeführt. Daher wurden zu den bereits verwendeten schwach invasiven MCF-7-Zellen zusätzlich die hoch invasiven MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen eingesetzt.

Wie in Abb. 3.2 zu sehen, zeigt die Zelllinie MDA-MB-231 eine schwache konstitutive MMP-9-Expression. Wie in MCF-7-Zellen, so führt auch in diesen Zellen die Stimulation mit TPA zu einer Hochregulation der MMP-9-Expression. Daher wurde diese Mammakarzinomzelllinie in einigen Schlüsselexperimenten zusätzlich zu MCF-7-Zellen verwendet (s. Kapitel 3.10). In MCF-7-Zellen ist interessanterweise keine konstitutive MMP-9-Expression nachweisbar. Die bereits in der Literatur beschriebene und eingangs erwähnte starke Steigerung der MMP-9-Aktivität in MCF-7-Zellen nach TPA-Stimulation konnte somit in dieser Arbeit bestätigt werden (Liu et al., 2002). MDA-MB-435-Zellen zeigen im Unterschied hierzu unter keiner der untersuchten Bedingungen eine Sekretion von MMP-9 (Abb. 3.2).

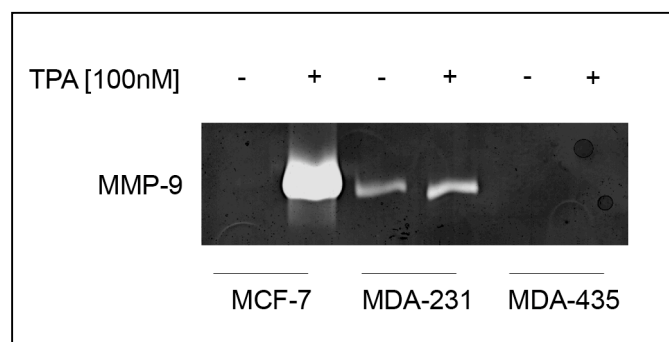


Abb. 3.2 Basale und TPA-induzierte MMP-9-Sekretion in verschiedenen Brustkrebszelllinien

MCF-7-Zellen zeigen die stärkste Induktion der MMP-9-Expression nach TPA-Stimulation. MCF-7-, MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen wurden für 24h mit TPA [100nM] stimuliert. Jeweils 10 μ l der Zellkulturüberstände wurden auf ein SDS-Zymographie-Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die lytische Bande entspricht der inaktiven Pro-MMP-9-Form (92kDa). Die Größe der Bande wurde mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers ermittelt.

3.1.3. Ausschluss von zytotoxischen Effekten durch TPA oder DETA-NO mittels LDH-Assay

Bevor weitere Experimente durchgeführt wurden, sollte ausgeschlossen werden, dass die verringerte Aktivität von MMP-9 durch eine erhöhte, NO-bedingte Zelltoxizität verursacht wird. Zur Bestimmung möglicher zytotoxischer Effekte der eingesetzten Substanzen verwendeten wir ein Laktat-Dehydrogenase-Assay (LDH-Assay). Als Messgröße gilt hier die Menge von extrazellulärem LDH, da LDH nur von toten Zellen ins Kulturmedium freigesetzt wird.

Weder TPA noch DETA-NO führten zu einer signifikanten Erhöhung der LDH-Freisetzung, was darauf hinweist, dass keine der verwendeten Substanzen unter den Versuchsbedingungen einen zytotoxischen Effekt auf MCF-7-Zellen ausübt (Abb. 3.3).

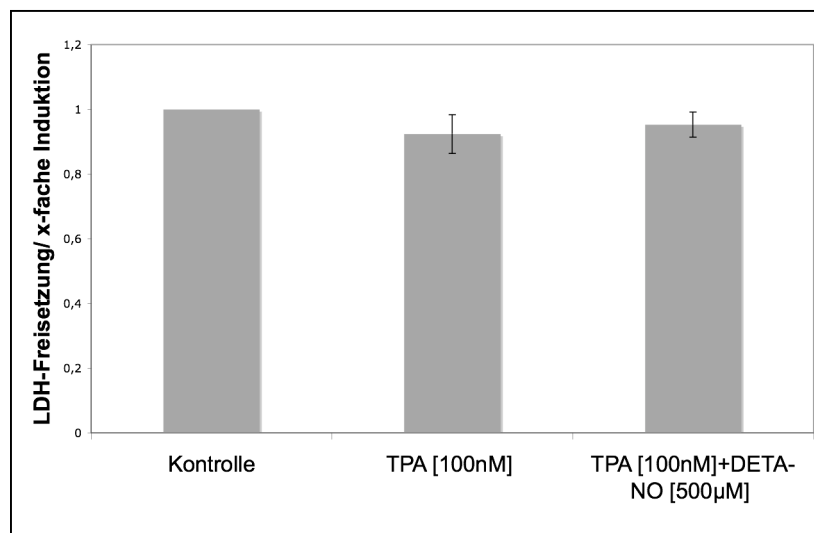


Abb. 3.3 LDH-Freisetzung als Indikator für die Zytotoxizität einer Substanz

Weder TPA [100nM] noch TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] verursachen zytotoxische Effekte im gewählten Zellmodell. Je 100µl von unverdünnten Zellkulturüberständen wurden für die Messung der LDH-Aktivität eingesetzt. Die Daten sind als x-fache Induktion, bezogen auf die unstimulierte Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung (n=3).

3.1.4. Wirkung verschiedener NO-Donoren auf die TPA-induzierte MMP-9-Aktivität und Expression

Der zuvor gezeigte Anstieg der extrazellulären MMP-9-Spiegel durch TPA und dessen Reduktion durch DETA-NO sollte nachfolgend mit unterschiedlichen Methoden bestätigt werden (Abb. 3.1). Mit Hilfe einer Dosis-Wirkungsreihe sollte zunächst eine dosisabhängige Reduktion der TPA-induzierten MMP-9-Spiegel durch unterschiedliche DETA-NO-Konzentrationen nachgewiesen werden. Abbildung 3.4 A zeigt die gelatinolytische Aktivität von MMP-2 und MMP-9 im Zymogramm. Dabei entspricht die obere lytische Bande der

latentem Pro-MMP-9-Form. Durch die gewählten experimentellen Bedingungen wird eine vollständige Rückfaltung des latenten Propeptids in das aktive Zentrum verhindert, so dass auch die inaktive Pro-Form in der Lage ist, das Substrat Gelatine im Zymogramm umzusetzen.

Die Stimulation in Abb. 3.4 A erfolgte in serumhaltigem Medium. Wie die Abbildung zeigt, ist unter diesen Bedingungen in MCF-7-Zellen eine konstitutive Expression der MMP-2-Bande erkennbar; diese wird jedoch durch keine der gewählten Stimulationsbedingungen verändert (Liu et al., 2002). Die durch TPA induzierte Aktivitätssteigerung kann durch die Gabe unterschiedlicher DETA-NO-Mengen stufenweise reduziert werden. Das Regulationsmuster von MMP-9 wird indessen durch die serumfreien Bedingungen nicht beeinflusst. Die folgenden Versuche wurden ausnahmslos in serumfreiem Medium durchgeführt, da die Zugabe von einem hohen Serumgehalt (10% FKS) bereits zu einer Aktivierung mitogen-aktivierbarer Signalwege führen kann.

Die Ergebnisse der Zymographie sollten in weiteren Experimenten mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen MMP-9-Aktivitäts-Assays verifiziert werden. Die Auswertung des Aktivitäts-Assay weist auf eine ähnliche NO-abhängige Regulation hin, wie sie bereits im Zymogramm sichtbar war (Abb. 3.4 B). Auch bei diesem Assay zeigt sich, dass die MMP-9-Aktivität durch TPA-Stimulation signifikant erhöht wird. Die zusätzliche Gabe von DETA-NO führt hingegen zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der MMP-9-Aktivität (Abb. 3.4 B). Da im Aktivitäts-Assay nur die enzymatisch aktive Form von MMP-9 detektiert werden kann, war es notwendig, die überwiegend latente MMP-9 vor der Analyse zu aktivieren. Aus diesem Grund wurden sämtliche Überstände der MCF-7-Zellen vor der Durchführung des Aktivitäts-Assays mit dem MMP-9-Aktivator 4-Aminophenyl-Quecksilberazetat (APMA) ($250\mu\text{M}$) behandelt. Dies zeigt auch, dass in MCF-7-Zellen die TPA-induzierte MMP-9 ausschließlich als inaktives Proenzym sezerniert wird.

Eine NO-abhängige Reduktion der extrazellulären MMP-9-Spiegel konnte nachfolgend auch in TCA-gefällten Zellkulturüberständen mittels Western-Blot-Analyse bestätigt werden (Abb. 3.4. C).

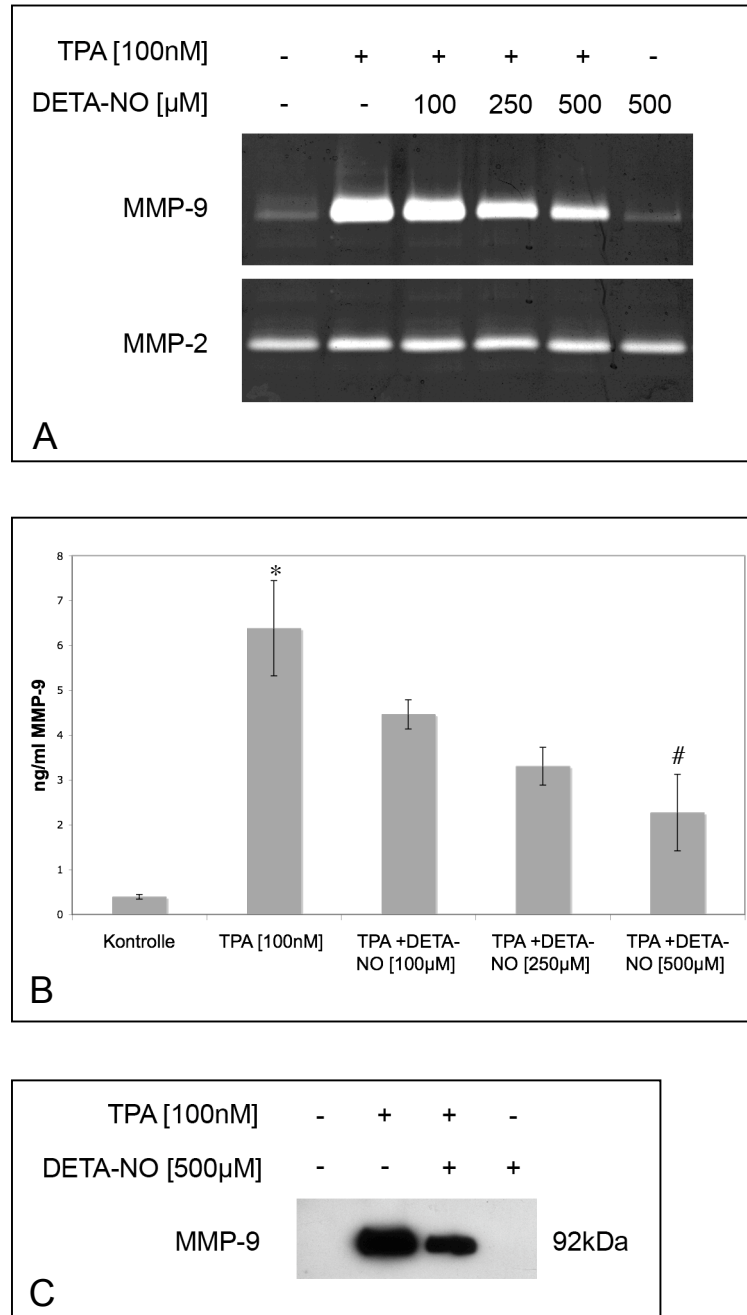


Abb. 3.4 Effekt von DETA-NO auf die TPA-induzierte gelatinolytische Aktivität von MMP-9

Reduktion der TPA-induzierten MMP-9-Expression durch DETA-NO. MCF-7-Zellen wurden für 24h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus den angegebenen Konzentrationen DETA-NO stimuliert. (A) Jeweils 1µl des Zellkulturüberstandes wurde über SDS-Zymographie elektrophoretisch aufgetrennt. Die langsam migrierende lytische Bande entspricht der inaktiven Pro-MMP-9-Form (92kDa). Die schneller migrierende Bande repräsentiert die MMP-2 (72kDa). Die Größe der Banden wurde mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers ermittelt. (B) Für die Aktivitätsmessung von MMP-9 wurde eine 1:10 verdünnte Menge des Zellkulturüberstandes verwendet. Die Proben wurden mit APMA (250µM) aktiviert. Die Abbildung zeigt den MMP-9-Gesamtgehalt im Zellkulturüberstand in ng/ml. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (MW) ± STD (n=3) dargestellt. * $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrolle, # $p < 0,05$ als statistisch signifikant bezogen auf den TPA-stimulierten Wert angesehen. (C) 900µl der Zellkulturüberstände wurden zur Proteinpräzipitation mit 50% Trichloressigsäure eingesetzt. Die Proben wurden in einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die MMP-9 mit einem monoklonalen anti-MMP-9-Antikörper detektiert.

Um auszuschließen, dass die gemessenen NO-Effekte nicht substanzspezifisch verursacht werden, wurden zusätzlich modulatorische Effekte anderer NO-Donoren untersucht. Dabei unterscheiden sich die einzelnen NO-Donoren im Wesentlichen in der Zerfallszeit mit der eine definierte und konstante NO-Menge freigesetzt wird. Bei 37°C liegt die Halbwertszeit von DETA-NO bei etwa 20h (Keefer et al., 1996), die von Spermine-NO bei ungefähr 40min (Keefer et al., 1996) und die von S-Nitroso-N-penicillamine (SNAP) in einer Größenordnung von 6h (Feelisch und Stamler, 1996; Roy et al., 1994). Sämtliche NO-Donoren zeigen einen vergleichbaren hemmenden Effekt auf die TPA-induzierten extrazellulären MMP-9-Expressionsspiegel (Abb. 3.5).

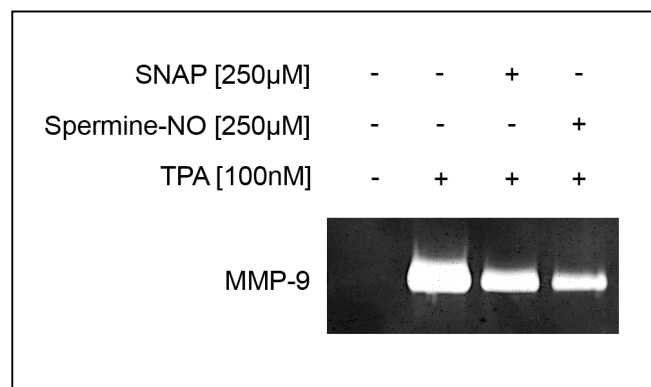


Abb. 3.5 Effekt von Spermine-NO und SNAP auf die TPA-induzierte extrazelluläre MMP-9-Aktivität

Verminderung der TPA-induzierten MMP-9-Spiegel durch Spermine-NO und SNAP. MCF-7-Zellen wurden für 24h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus Spermine-NO [250µM] bzw. plus SNAP [250µM] stimuliert. Jeweils 10µl der Zellkulturüberstände wurden für die SDS-Zymographie verwendet. Die lytische Bande entspricht der latenten MMP-9-Form (92kDa). Die Größe der Bande wurde anhand eines Molekulargewichtsstandards ermittelt.

3.1.5. Untersuchung zur cGMP-Abhängigkeit der NO-Effekte

Da viele der bekannten NO-Effekte über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase vermittelt werden, wurden MCF-7-Zellen mit dem membranpermeablen cGMP-Analogen Dibutyryl (db)-cGMP stimuliert. Wie in Abb. 3.6 A,B gezeigt, ist sowohl im Zellkulturüberstand als auch in Zellysaten keine Veränderung der TPA-induzierten MMP-9-Expression nach der Gabe des db-cGMPs (250µM) zu erkennen. Die Behandlung der Zellen mit DETA-NO führt im Vergleich zu db-cGMP zu einer deutlichen Reduktion der gelatinolytischen MMP-9-Aktivität (Abb. 3.6 A). Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde zusätzlich der Einfluss von Oxadiazoloquinoxalin (ODQ), einem Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase, auf die TPA-induzierten MMP-9-Spiegel untersucht. Die Kostimulation mit ODQ (10µM) führt überraschenderweise zu einer schwachen Erhöhung der MMP-9-Sekretion (Abb. 3.6 C). Eine verstärkte MMP-9-Sekretion ist nach ODQ-Stimulation bei einer

zusätzlichen Stimulation der Zellen mit DETA-NO zu erkennen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass der durch NO hervorgerufene Effekt nicht über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase vermittelt wird, obwohl endogenes cGMP eine schwach hemmende Wirkung auf die MMP-9-Sekretion zeigt.

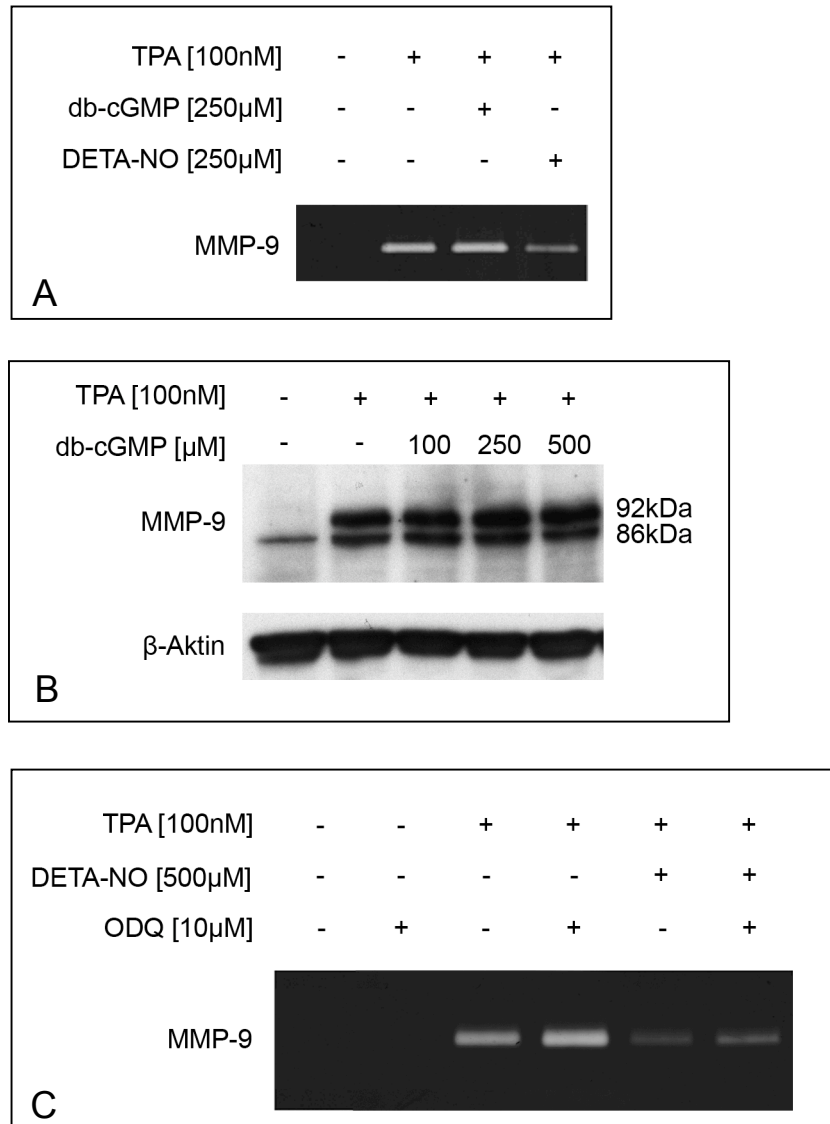


Abb. 3.6 Potenzieller Effekt von cGMP auf die extrazellulären und intrazellulären MMP-9-Spiegel

Der Effekt von DETA-NO auf die MMP-9-Expression wird nicht über cGMP-vermittelt. (A,C) Je 1 μ l der Zellkulturüberstände wurden für die SDS-Zymographie verwendet. Die lytische Bande repräsentiert die inaktive Pro-Form der MMP-9. (B) Gesamtzell-Proteine wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils 30 μ g Gesamtprotein eingesetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem MMP-9-spezifischen Antikörper analysiert. Als Ladungskontrolle wurde der jeweilige Gehalt von β -Aktin bestimmt.

3.1.6. Einfluss von ROS-Inhibitoren auf die gelatinolytische Aktivität von MMP-9

Um zu prüfen, ob der reduzierende Effekt von NO auf MMP-9-Spiegel möglicherweise auch durch eine verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen erklärt werden kann, wurde die Wirkungen des Antioxidanz N-Acetylcystein (NAC) und des NADPH-Oxidase-Inhibitors Diphenyleneiodonium (DPI) auf die TPA-induzierte MMP-9-Sekretion untersucht. Wie Abb. 3.7 zeigt, führt die zusätzliche Behandlung mit beiden Substanzen zu einer nahezu vollständigen Hemmung der TPA-induzierten MMP-9-Sekretion. Diese Resultate machen deutlich, dass redox-vermittelte Mechanismen eine essenzielle Rolle bei der NO-vermittelten MMP-9-Inhibition spielen.

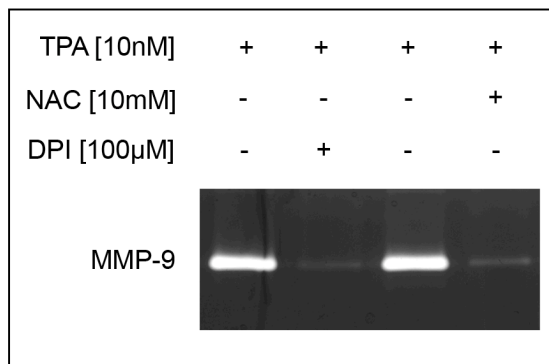


Abb. 3.7 Effekte von DPI und NAC auf die gelatinolytische Aktivität von MMP-9

DPI und NAC inhibieren die TPA-induzierte MMP-9-Aktivität. MCF-7-Zellen wurden für 24h mit TPA [10nM] oder TPA [10nM] plus NAC [10mM] bzw. plus DPI [100µM] stimuliert. 5µl des Zellkulturüberstandes wurden auf ein SDS-Zymographie-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die lytische Bande bei 92kDa repräsentiert die inaktive Pro-MMP-9-Form.

3.1.7. Zeitabhängige Wirkung von DETA-NO auf die TPA-induzierten MMP-9-Spiegel

In einem nächsten Schritt sollten Experimente zur näheren Aufklärung des Ablaufs der beobachteten NO-Effekte durchgeführt werden. Dabei sollte aufgeklärt werden, ob NO auch nach TPA-Stimulation inhibitorisch auf die MMP-9-Expressionsspiegel Einfluss nehmen kann. Ein Anstieg der MMP-9-Expression ist bereits nach 8h TPA-Stimulation detektierbar, während DETA-NO zu diesem Zeitpunkt noch keine hemmende Wirkung auf die MMP-9-Sekretion aufweist (Abb. 3.8 A, links). Nach einer 24h-Stimulation mit TPA zeigt sich hingegen die bereits beschriebene NO-vermittelte Abnahme der MMP-9-Aktivitätsspiegel (Abb. 3.8 A, rechts).

Die Vorstimulation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen TPA (100nM und 500nM) führt sowohl nach 8h als auch nach 24h zu einer deutlichen Induktion der extrazellulären MMP-9-Spiegel, während die um 8h bzw. 24h verspätete Zugabe von DETA-NO keinen Einfluss mehr auf die MMP-9-Aktivität zeigt (Abb. 3.8 B). Aufgrund dieser Daten lässt sich schließen, dass beide Substanzen mindestens gleichzeitig gegeben werden müssen, damit NO

seine inhibitorische Wirkung auf die MMP-9-Sekretion ausüben kann. Hieraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass NO bereits einen direkten Einfluss auf die TPA-aktivierten Signalwege, die schließlich zur MMP-9-Sekretion führen, nimmt.

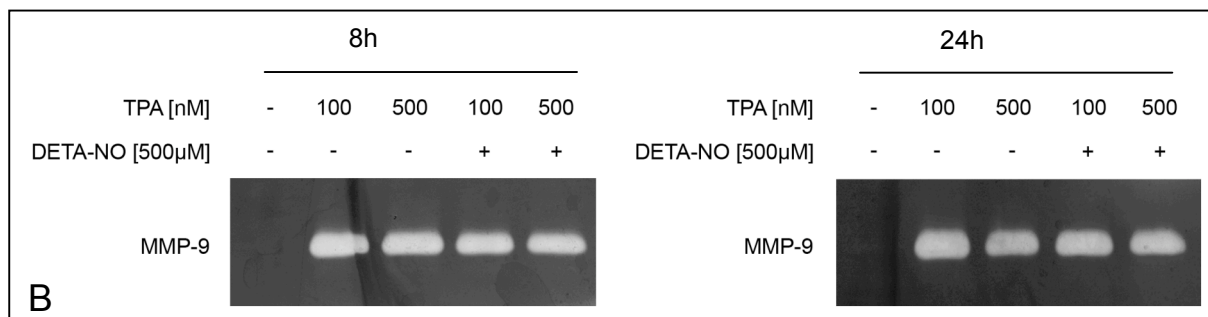
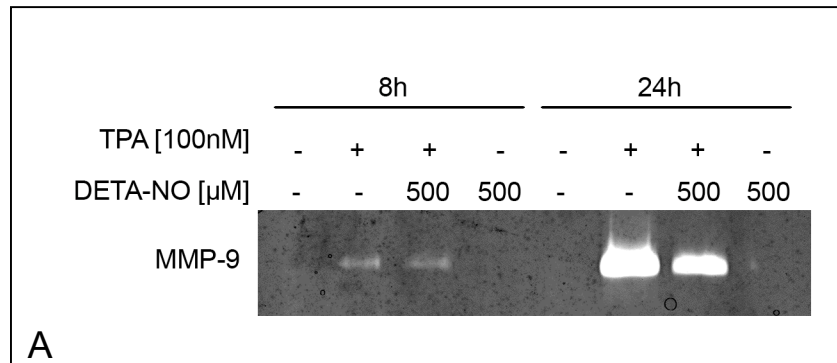


Abb. 3.8 Zeitabhängige Wirkung von DETA-NO auf die TPA-induzierte gelatinolytische MMP-9-Aktivität nach verschiedenen Zeitpunkten

Die Reduktion der TPA-induzierten MMP-9-Expression tritt nur auf, wenn DETA-NO und TPA gleichzeitig gegeben werden. Je 1μ l des Zellkulturüberstandes wurde mittels SDS-Zymographie elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden zeigen die gelatinolytische Aktivität von MMP-9. Die Bestimmung der Bandengröße erfolgte durch einen Molekulargewichtsstandard. **(A)** MCF-7-Zellen wurden für 8h bzw. 24h mit TPA [100nM] oder parallel mit TPA [100nM] plus DETA-NO [500 μ M] inkubiert. **(B)** MCF-7-Zellen wurden für 8h bzw. 24h mit den entsprechenden Konzentrationen TPA stimuliert und für weitere 24h zusätzlich mit DETA-NO [500 μ M] behandelt.

In der Literatur gibt es verschiedene Belege dafür, dass NO über posttranslationelle Modifikationen Enzyme in ihrer Aktivität verändern kann (für eine Übersicht s.: Martínez-Ruiz und Lamas 2007; Gow A. et al., 2004). So ist bekannt, dass die humane MMP-9 neuronaler Zellen über eine direkte und NO-abhängige S-Nitrosylierung aktiviert wird (Gu et al., 2002). Um zu untersuchen, ob die MMP-9 aus MCF-7-Zellen unter den gegebenen Bedingungen ebenfalls ein direktes Substrat für eine NO-abhängige Aktivitätsänderung ist, wurden *In-vitro*-Zymographien durchgeführt. Dazu wurden Zellkulturüberstände von TPA-stimulierten Zellen gesammelt und nachträglich mit DETA-NO (500 μ M) behandelt. Wie dieser zellfreie Test zeigt (Abb. 3.9), ist keine Veränderung der extrazellulären MMP-9-Aktivitätsspiegel zu erkennen. Somit war auszuschließen, dass die zuvor

beschriebene NO-abhängige Verminderung der MMP-9-Sekretion auf einer direkten inhibitorischen Wirkung des NO auf die MMP-9-Aktivität beruht.

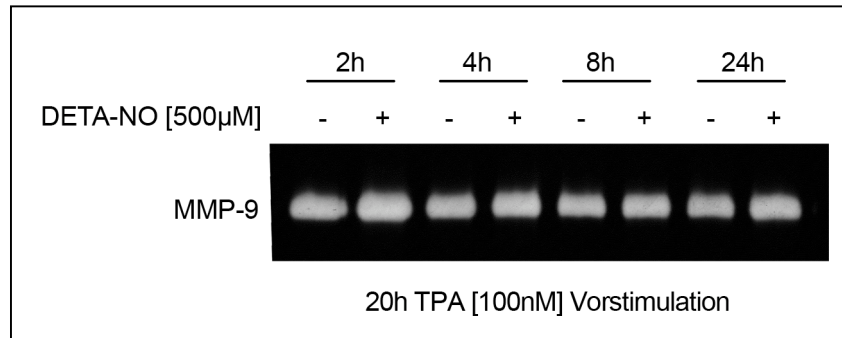


Abb. 3.9 Identifizierung möglicher direkter modifizierender Effekte von DETA-NO auf die TPA-induzierte gelatinolytische MMP-9-Aktivität mit Hilfe zellfreier NO-Inkubation

DETA-NO bewirkt keine Veränderung der extrazellulären MMP-9-Aktivität im zellfreien Test. MCF-7-Zellen wurden für 20h mit TPA [100nM] stimuliert. 100µl der Zellkulturüberstände wurden für die angegebenen Zeiträume mit DETA-NO [500µM] bei 37°C *in vitro* inkubiert. Je 10µl der Zellkulturüberstände wurden mittels SDS-Zymographie aufgetrennt. Die lytische Bande entspricht der latenten Pro-MMP-9-Form (92kDa).

3.2. Effekt von DETA-NO auf die TPA-induzierte intrazelluläre MMP-9-Expression

3.2.1. Wirkung von DETA-NO auf die TPA-induzierten MMP-9-Spiegel

Um zu überprüfen, ob der inhibierende Effekt von exogenem NO auf die TPA-induzierte MMP-9-Sekretion auf eine Verminderung der intrazellulären MMP-9-Proteinspiegel zurückzuführen ist, wurden Gesamtzellextrakte isoliert und mit Hilfe der Western-Blot-Analyse untersucht. Wie Abb. 3.10 zeigt, wird unter der Stimulation von TPA (100nM) eine MMP-9-Bande detektierbar, deren Intensität nach zusätzlicher Stimulation mit DETA-NO (500µM) stark herabgesetzt wird. Diese TPA- und NO-regulierte Pro-MMP-9-Form wird durch eine migrierende Bande bei 92kDa repräsentiert, während die schneller migrierende MMP-9-positive Bande der aktiven 86kDa schweren MMP-9 entspricht.

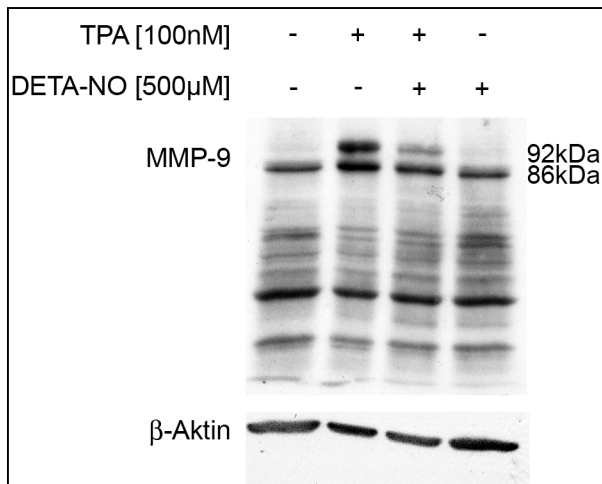


Abb. 3.10 Einfluss von NO auf die MMP-9-Expression in der Zelle

DETA-NO reduziert den intrazellulären MMP-9-Gehalt. MCF-7-Zellen wurden für 24h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500 μ M] bzw. mit DETA-NO [500 μ M] allein stimuliert. Die Gesamtproteine der Zellen wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Für die Western-Blot-Analysen wurden jeweils 30 μ g Protein eingesetzt. Die Proteine wurden in einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen MMP-9 detektiert.

Ein vergleichbarer Effekt des NOs zeigt sich bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der zellulären MMP-9-Spiegel. Abbildung 3.11 zeigt eine fluoreszenzmarkierte MMP-9-Färbung in MCF-7-Zellen nach Stimulation mit TPA im Vergleich zur Stimulation von Zellen die mit TPA plus DETA-NO behandelt wurden. Unter Kontrollbedingungen ist eine gleichmäßig schwache MMP-9-Färbung lediglich im Zytosol und an den Membranen sichtbar. Nach Stimulation der Zellen mit TPA wird eine Erhöhung der MMP-9-Spiegel anhand einer deutlichen Intensivierung der Fluoreszenz-Färbung sichtbar. Die zusätzliche Gabe des NO-Donors DETA-NO bewirkt eine Abschwächung des MMP-9-Signals, wobei interessanterweise die Intensität der MMP-9-Färbung in perinukleären Zellbereichen nahezu unverändert bleibt.

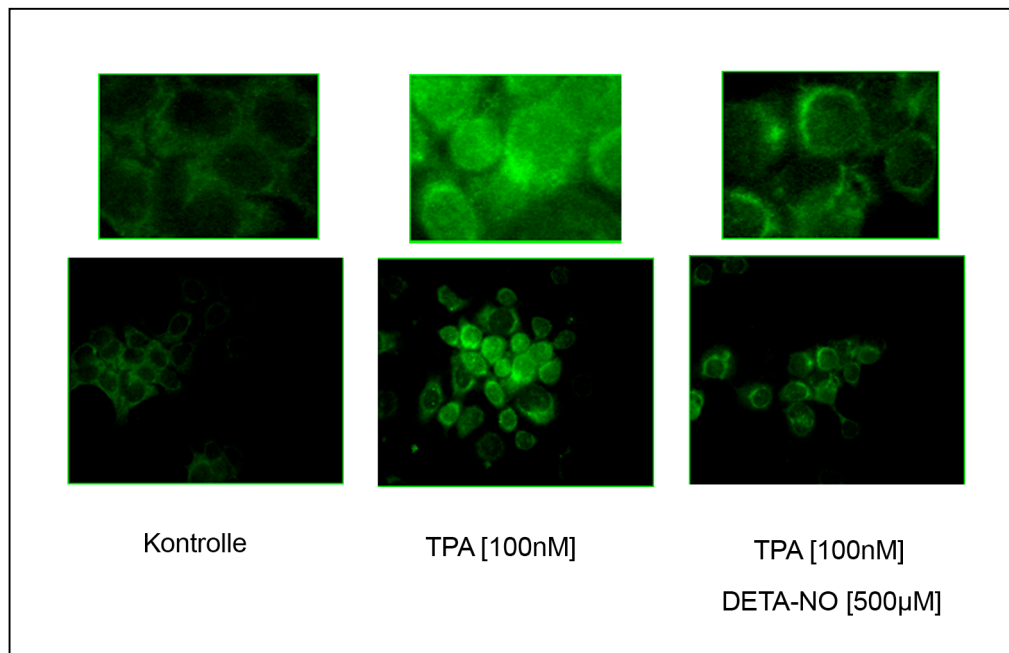


Abb. 3.11 Lokalisierung und Expression von MMP-9 nach Stimulation mit TPA und DETA-NO

Reduktion der MMP-9-Expression durch DETA-NO nach der fluoreszenzmarkierten Färbung von MMP-9. MCF-7-Zellen wurden für 24h mit TPA [100nM] oder mit TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] stimuliert. Die Zellen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, fixiert, sukzessive mit einem anti-MMP-9-Antikörper und einem anti-Maus-Antikörper (Alexa 488) inkubiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes bei 20 x facher Vergrößerung aufgenommen.

3.2.2. Untersuchung zu möglichen Effekten von exogenem NO auf die Proteinstabilität der MMP-9

2002 wurde in der Literatur beschrieben, dass exogenes NO eine Degradation der neutralen Ceramidase über einen Ubiquitin/Proteasom-abhängigen Weg verstärken kann (Franzen et al., 2002). Daher wurde nachfolgend untersucht, ob mit Lactacystin, einem selektiven Proteasominhibitor, der negative Effekt des NOs auf die MMP-9-Expression revertiert werden kann. Die Behandlung mit Lactacystin (10µM) konnte das Ausmaß der NO-vermittelten MMP-9-Reduktion nicht verändern. Dies lässt darauf schließen, dass die Effekte des NOs auf die MMP-9-Proteinspiegel nicht auf einen verstärkten proteasom-vermittelten Abbau des MMP-9-Proteins zurückgeführt werden können (3.12 A).

Um zu untersuchen, ob NO möglicherweise einen Einfluss auf die Proteinstabilität der MMP-9 hat, wurden Experimente mit dem Translationshemmstoff Cycloheximid durchgeführt. Wie Abb. 3.12 B zeigt, ist in allen der mit Cycloheximid (10µg/ml)-behandelten Zellen eine gleichmäßige Reduktion der Proteinmenge zu erkennen, während DETA-NO keinen zusätzlichen Einfluss auf die Degradationszeit von MMP-9 zu nehmen scheint.

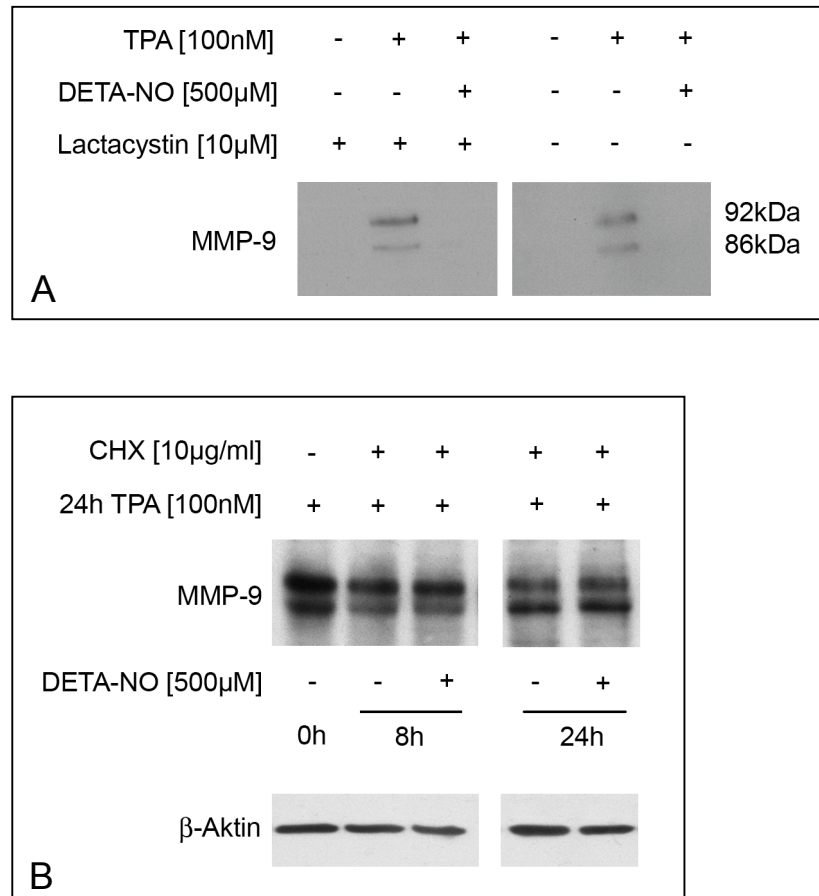


Abb. 3.12 Mögliche Effekte von DETA-NO auf die Proteinestabilität von MMP-9

DETA-NO hat keinen Einfluss auf die Proteinestabilität von MMP-9. **(A)** MCF-7-Zellen wurden für 30min mit Lactacystin [10µM] vorinkubiert. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen. Anschließend wurde für 24h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] stimuliert. Die Gesamtproteine wurden, wie im Methodenteil beschrieben, aufgearbeitet. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils 40µg Gesamtprotein eingesetzt. **(B)** MCF-7-Zellen wurden mit TPA für 24h stimuliert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Cycloheximid [10µg/ml] für 30min vorinkubiert. Im Anschluss daran erfolgte eine zusätzliche Stimulation mit DETA-NO [500µM] für die jeweils angegebene Zeitdauer. Als Kontrolle dienen unbehandelte MCF-7-Zellen.

3.2.3. Wirkung von DETA-NO auf die Proteinneusynthese von MMP-9

In einem nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die NO-bedingte Reduktion der MMP-9-Proteinspiegel auf eine verminderte Proteinneusynthese zurückgeführt werden kann. Wie Abb. 3.13 zeigt, wird die MMP-9-Proteinneusynthese durch TPA induziert, während eine gleichzeitige Stimulation mit DETA-NO zu einer deutlich verringerten Neusynthese von MMP-9 führt, wie anhand der abgeschwächten radioaktiv-markierten bei 92kDa migrierenden Bande ersichtlich wird.

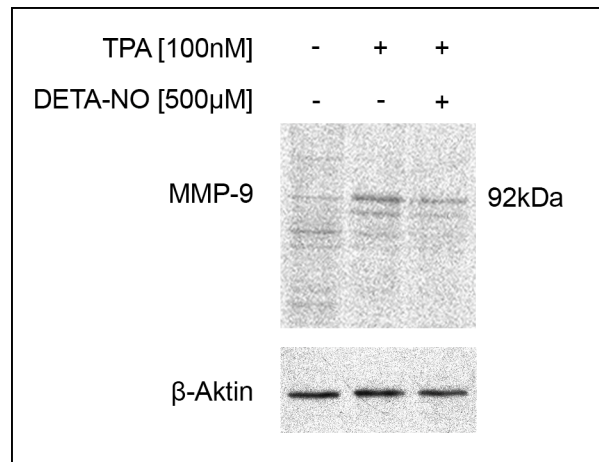


Abb. 3.13 Potenzieller Einfluss von DETA-NO auf die Proteinneusynthese von MMP-9

DETA-NO führt zu einer Reduktion der TPA-induzierten Proteinneusynthese von MMP-9. MCF-7-Zellen wurden für 14h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] stimuliert. Anschließend erfolgte eine 2-stündige Inkubation der Zellen mit denselben Stimuli, jedoch in cystein- und methioninfreiem Medium. Durch Zugabe eines 30µCi ³⁵S-Methionin-/Cystein-haltigem Mediums wurden neu synthetisierte Proteine für 6h markiert. Die Zellen wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Danach erfolgte eine Immunpräzipitation mit einem MMP-9-spezifischen Antikörper. Zur Ladungskontrolle wurde nach dem ersten Waschschritt der Überstand mit einem β-Aktin-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Die Proben wurden anschließend mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele getrocknet und die radioaktiven Signale mit einem Phosphoimager detektiert.

3.2.4. Potenzielle Effekte von exogenem NO auf den Gehalt der polysomalen MMP-9-mRNA

Die Expression der MMP-9 unterliegt in einigen Zellen neben der transkriptionellen auch einer posttranskriptionellen Kontrolle. Wie kürzlich gezeigt werden konnte, kann der Transport des MMP-9-„messenger“-Ribonukleoprotein-Komplexes zu den Polysomen durch Gabe der Hypoxie-imitierenden Substanz 2,2-Dipyridyl, einem Eisen-Chelator, verändert werden. Dieser Effekt wird unter anderem durch eine gesteigerte Expression von Nucleolin und der damit verbundenen verstärkten Bindung an die MMP-9-3'UTR erklärt (Fähling et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass dieser posttranskriptionelle Regulationsmechanismus für die Erhöhung der MMP-9-Expression nach Stimulation mit 2,2-Dipyridyl verantwortlich ist (Fähling et al., 2005).

Um zu untersuchen, ob ein ähnlicher Mechanismus bei der von uns gefundenen NO-abhängigen MMP-9-Hemmung eine Rolle spielt, wurde zunächst der MMP-9-mRNA-Gehalt in Polysomen-Fractionen bestimmt. Nach TPA-Stimulation ist im Vergleich zu unstimulierten Zellen ein stark erhöhter MMP-9-mRNA-Gehalt in der Polysomen-Fraktion zu finden (Abb. 3.14) Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit DETA-NO führt dagegen zu einem reduzierten Gehalt der polysomalen MMP-9-mRNA, der

aber höher ist als unter nicht stimulierten Bedingungen. Diese Ergebnisse lassen allerdings keine Aussage darüber zu, ob der reduzierte Gehalt der MMP-9-mRNA an den Polysomen das Resultat eines reduzierten Transports der MMP-9-mRNA an die Polysomen ist. Sie zeigen aber, dass die Hemmung der MMP-9-Translation die Folge eines verminderten Gehaltes von MMP-9-Transkripten ist.

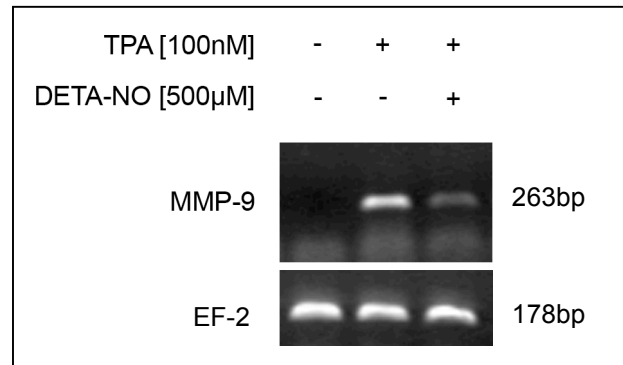


Abb. 3.14 Einfluss von NO auf den MMP-9-mRNA-Gehalt an den Polysomen

Der MMP-9-mRNA-Gehalt in der polysomalen Zell-Fraktion ist nach DETA-NO-Behandlung verringert. MCF-7-Zellen wurden für 24h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] stimuliert. Die Polysomen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, über ein Sucrosekissen [1M] durch Ultrazentrifugation [10.0000xg] isoliert. Nach einem Fällungsschritt mit Lithiumchlorid wurde das RNA-Präzipitat in 10µl DEPC-H₂O aufgenommen. Für die RT-Reaktion wurde die gesamte isolierte RNA eingesetzt. Die PCR-Analysen wurden mit MMP-9- bzw. Elongationsfaktor (EF-2)-spezifischen Primern durchgeführt.

Einen Hinweis darauf, ob NO möglicherweise zusätzlich auch regulatorisch in den Transportvorgang des MMP-9-mRNP-Komplexes eingreift, sollte durch die Untersuchung von Nucleolin und Phospho-eIF4E gebracht werden. In der Literatur ist beschrieben, dass zumindest Nucleolin beim Transport der MMP-9-mRNA eine funktionelle Rolle spielt (Fähling et al., 2005, Jiang und Muschel, 2002; Graff et al., 1995). Wie Abb. 3.15 B zeigt, ist der Gehalt des phosphorylierten eIF4E nach TPA-Stimulation im Zytosol erhöht, während Nucleolin durch TPA unbeeinflusst bleibt (Abb. 3.15 A). Weder die phospho-eIF4E-Spiegel noch der Gesamtgehalt des Nucleolins werden durch die zusätzliche DETA-NO-Stimulation verändert (Abb. 3.15 A,B).

Dies beweist, dass die oben genannten Proteine bei der NO-abhängigen Reduktion von MMP-9-mRNA an den Polysomen in MCF-7-Zellen nicht beteiligt sind.

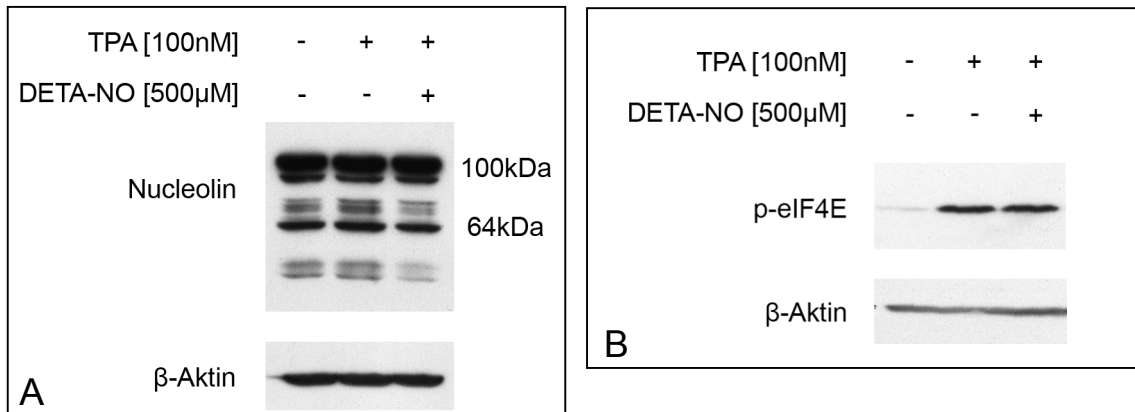


Abb. 3.15 Potenzielle Wirkung von NO auf den MMP-9-mRNA-Transport zu den Polysomen

Die Protein-Spiegel von Nucleolin (**A**) und phospho-eIF4E (**B**) werden durch DETA-NO nicht beeinflusst. MCF-7-Zellen wurden für 24h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] stimuliert. Die zytosolischen Proteine wurden, wie im Methodenteil beschrieben, aufgearbeitet. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Western-Blot-Analysen mittels anti-phospho-eIF4E- oder anti-Nucleolin-spezifischen Antikörpern analysiert. Für die Analysen wurden jeweils 30µg Protein eingesetzt.

3.3. Wirkung von DETA-NO auf die TPA-induzierte MMP-9-mRNA-Expression

3.3.1. Regulation der MMP-9-mRNA-Expression durch NO

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Hemmung der MMP-9-Expression durch NO bereits auf mRNA-Ebene stattfindet. Hierzu wurden semiquantitative Realtime-PCR-Analysen mit Hilfe einer MMP-9-spezifischen cDNA-Sonde durchgeführt. Wie in Abb. 3.16 dargestellt, führt die Behandlung der Zellen mit TPA zu einer durchschnittlich $76,6 \pm 35,8$ -fachen Steigerung der MMP-9-mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Nach Kostimulation mit DETA-NO zeigen die MMP-9-mRNA-Spiegel eine konzentrationsabhängige Abnahme. Die zusätzliche Stimulation mit 100µM DETA-NO lässt den MMP-9-mRNA-Spiegel auf $86,1 \pm 12,6\%$ der mit TPA erzielten Expressionsspiegel sinken. Diese NO-vermittelte Abnahme der TPA-induzierten MMP-9-mRNA-Spiegel kann durch die Steigerung der DETA-NO-Konzentrationen (250µM bzw. 500µM) weiter verstärkt werden (auf $46,9 \pm 24,0\%$ bzw. $19,0 \pm 6,0\%$) (Abb. 3.16). Aufgrund dieser Ergebnisse kann ausgeschlossen werden, dass die Reduktion der polysomalen MMP-9-mRNA auf einen gehemmten RNA-Transport zurückzuführen ist.

Aus diesen Experimenten lässt sich weiterhin folgern, dass die bisher gezeigte Verringerung der extrazellulären und intrazellulären MMP-9-Spiegel nach DETA-NO-Stimulation durch verminderte Expressionsspiegel der MMP-9-mRNA verursacht wird.

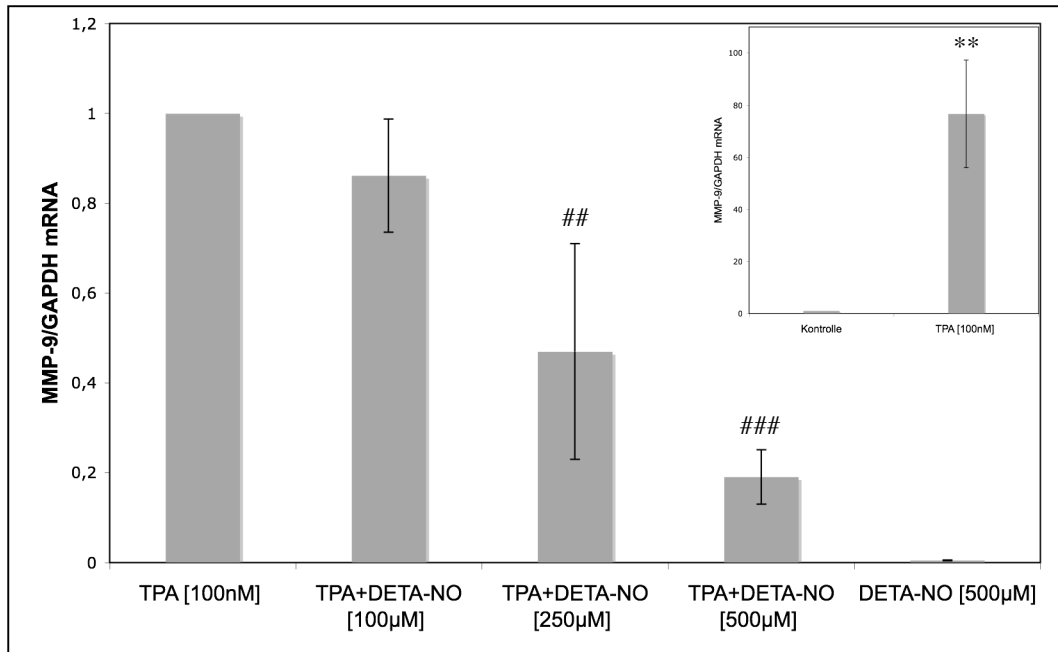


Abb. 3.16 Einfluss von NO auf die MMP-9-mRNA-Expression

DETA-NO hemmt die TPA-induzierte MMP-9-mRNA-Expression konzentrationsabhängig. MCF-7-Zellen wurden für 24h mit TPA [100nM] oder mit TPA [100nM] plus den angegebenen DETA-NO-Konzentrationen inkubiert. Nach Isolierung der RNA wurde eine semiquantitative Realtime-PCR mit einer MMP-9-spezifischen Sonde und genspezifischen Primern durchgeführt. Zum Abgleich wurden GAPDH-mRNA-Spiegel verwendet. Als Maßstab für die MMP-9-Expression (bezogen auf die Expression der GAPDH-mRNA) wurden die $\Delta\Delta Ct$ -Werte verwendet. Die Expressionsdaten sind als x-fache Induktion der TPA-stimulierten Probe angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). **p<0,01 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrolle, ### p<0,005 und ## p<0,01 als statistisch signifikant bezogen auf die TPA-stimulierten Werte angesehen.

3.3.2. Potenzielle Effekte von DETA-NO auf die MMP-9-mRNA-Stabilität

Um zusätzlich Effekte von NO auf die MMP-9-mRNA-Stabilität zu untersuchen, wurden Versuche mit Actinomycin D durchgeführt, welches spezifisch die eukaryotische RNA-Synthese hemmt. Nach Inkubation mit Actinomycin D (10µg/ml) ist sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von DETA-NO ein ähnlicher zeitabhängiger Abbau der MMP-9-mRNA nachweisbar, wobei die MMP-9-mRNA eine relativ lange Halbwertszeit von über 24h zeigt (Abb. 3.17). Experimente mit einer längeren Actinomycin D-Inkubation wurden nicht durchgeführt, da eine längere Behandlung mit Actinomycin D bereits zytotoxisch auf MCF-7-Zellen wirkt (eigene Beobachtung).

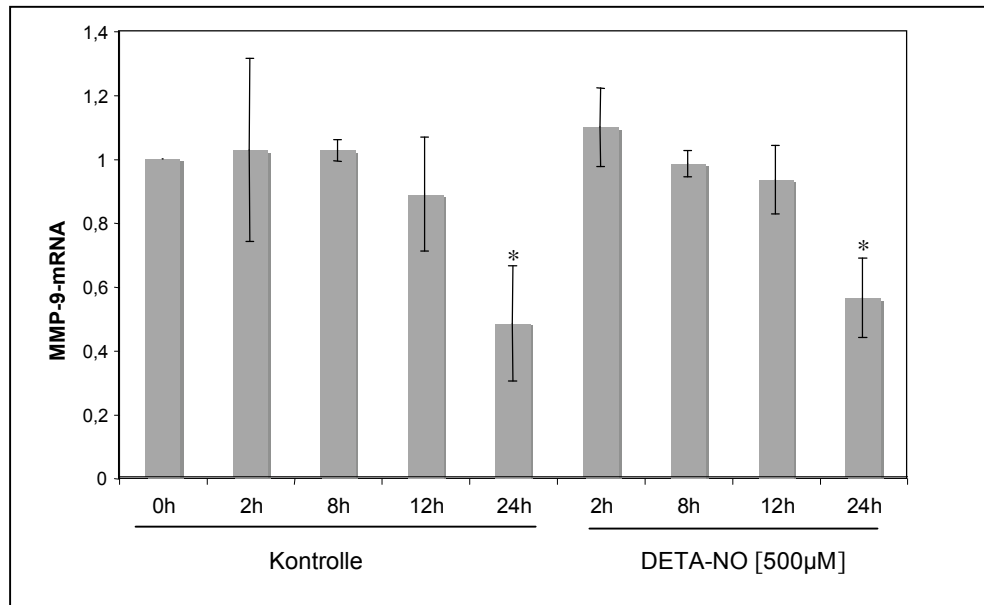


Abb. 3.17 Bestimmung möglicher Effekte des DETA-NO auf die mRNA-Stabilität von MMP-9

DETA-NO hat keinen Einfluss auf die Stabilität der MMP-9-mRNA. MCF-7-Zellen wurden für 24h mit TPA [100nM] stimuliert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Actinomycin D [10µg/ml] für 30min vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine zusätzliche Stimulation mit DETA-NO [500µM] für die angegebenen Zeitpunkte. Als Referenz dienten Zellen, die nicht zusätzlich mit DETA-NO stimuliert wurden. Nach Isolierung der RNA wurde eine semiquantitative Realtime-PCR mit einer MMP-9-spezifischen Sonde und Primern durchgeführt. Als Maßstab für die MMP-9-Expression wurden die $\Delta\Delta C_t$ -Werte verwendet. Die Expressionsdaten sind als x-fache Induktion der TPA-stimulierten Probe (0h) angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). *p<0,05 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die TPA-stimulierte Probe (0h) angesehen.

3.4. Wirkung von NO auf die Promotoraktivität von MMP-9

Im nächsten Abschnitt wurde der Einfluss von NO auf die Promotoraktivität der MMP-9 in MCF-7-Zellen untersucht. Hierzu stand uns ein 670bp langes Promotorfragment des humanen MMP-9-Gens zur Verfügung (Gum et al., 1996) (Abb. 1.3). Dieses Promotorfragment enthält unter anderem zwei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Aktivator-Protein-1 (AP-1) (bei -79 und bei -533) sowie Bindungsstellen für Nuklear-Faktor- κ B (NF κ B) (-600), „Specificity protein 1“ (Sp1) (-558) und „Polyoma enhancer A binding protein 3“ (PEA3) (-540) (Abb. 1.3; Abb. 3.18 A).

Da die 3'untranslatierte Region (3'UTR) der mRNA sowohl an den Transportprozessen der MMP-9-mRNA als auch deren Stabilität beteiligt sein kann, wurde ein Promotor-Konstrukt kloniert, bei dem das Luziferase-Reportergen nicht nur der Kontrolle des 5'Promotorbereichs unterliegt, sondern zusätzlich die MMP-9-spezifische 3'UTR enthält (Abb. 3.18 B). Die transiente Transfektion und Luziferase-Aktivitätsmessung zeigt, dass beide Konstrukte, unabhängig davon, ob sie zusätzlich die 3'UTR der MMP-9 besitzen, eine vergleichbare Regulation durch TPA als auch DETA-NO aufweisen (Abb 3.18 A rechts). Beide

Luziferase-Konstrukte zeigen eine starke Aktivierung nach TPA-Stimulation (Konstrukt ohne 3'UTR von $2,9 \pm 0,2$ auf $25,5 \pm ,1$ bzw. Konstrukt mit 3'UTR von $0,8 \pm 0,05$ auf $19,3 \pm 3,9$). Die Reduktion der TPA-induzierten Luziferase-Aktivität durch NO beträgt ca. 52,2% für Promotorkonstrukt ohne 3'UTR bzw. 51,8% für das Konstrukt, welches zusätzlich unter der Kontrolle der MMP-9-spezifischen 3'UTR steht.

Diese Ergebnisse sind ein zusätzliches Indiz dafür, dass eine posttranskriptionelle Regulation von MMP-9 über eine mRNA-Stabilitätsänderung bei der NO-vermittelten Hemmung der MMP-9 keine Rolle spielt. Daher kann die bislang beobachtete NO-bedingte Verringerung der MMP-9-Expression auf eine transkriptionelle Hemmung der MMP-9-Promotor-Aktivität zurückgeführt werden.

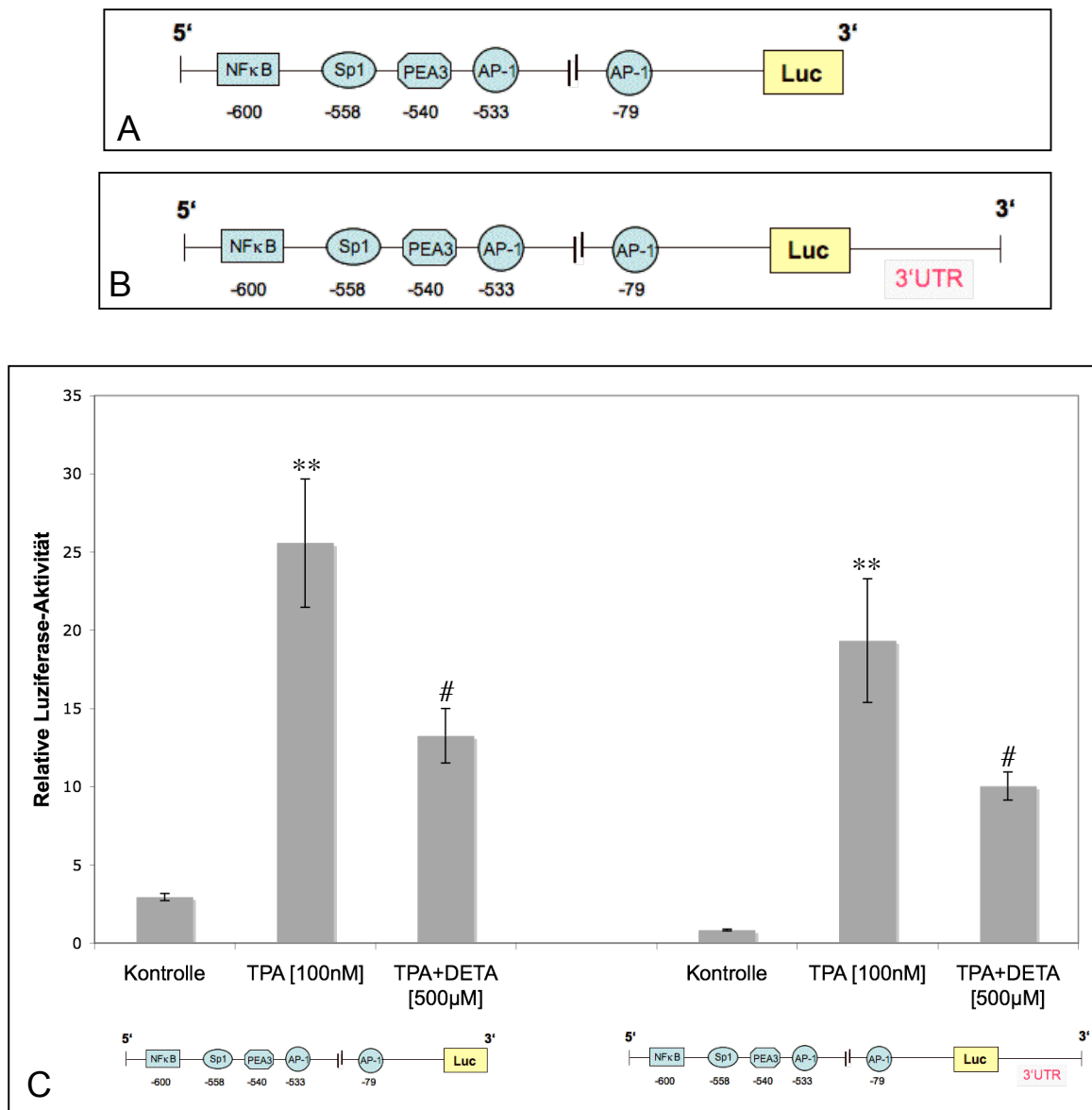


Abb. 3.18 Effekt von NO auf die MMP-9-Promotoraktivität und die potenzielle Rolle der 3'UTR bei der MMP-9-Regulation

(A) Schematische Darstellung eines 670bp-langen humanen MMP-9-Promotorkonstruktes. Gezeigt sind in blau die enthaltenen Transkriptionsfaktorbindestellen deren Position in arabischen Ziffern angegeben sind. In gelb dargestellt ist das Luziferase-Reportergen. (B) Zusätzlich zu dem in A beschriebenen Konstrukt enthält dieses Konstrukt die MMP-9-spezifische 3'UTR. (C) DETA-NO reduziert die MMP-9-Promotoraktivität, während die zusätzliche Anwesenheit der MMP-9-3'UTR keine Auswirkungen auf die NO-abhängige Regulation von MMP-9 zeigt. (**Links**) MCF-7-Zellen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, mit $0,4\mu\text{g}$ pGL-MMP-9 (670bp) und $0,1\mu\text{g}$ RL-CMV kotransfiziert. Die Zellen wurden für 24h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] stimuliert, bevor die Luziferase-Aktivitäten bestimmt wurden. (**Rechts**) MCF-7-Zellen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, mit $0,4\mu\text{g}$ pGL-MMP-9-3'UTR und $0,1\mu\text{g}$ RL-CMV kotransfiziert. Die Zellen wurden für 24h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] stimuliert. Anschließend wurden die verschiedenen Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Die Aktivitätsdaten sind als x-fache Induktion der TPA-stimulierten Probe angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). **p<0,01 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrolle und #p<0,05 als statistisch signifikant bezogen auf die TPA-stimulierten Werte angesehen.

3.5. Wirkung von NO auf für die MMP-9-Expression relevante Transkriptionsfaktoren

Die oben beschriebenen Reporteranalysen haben deutlich gemacht, dass NO-responsive Promotorelemente innerhalb des 670bp langen Promotorbereichs des humanen MMP-9-Gens liegen. Im nächsten Schritt wurde daher versucht, die durch NO regulierten Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die in diesem Promotorbereich binden (Abb. 1.3). Diese sind möglicherweise auch Promotorelemente, die für eine transkriptionelle Induktion des MMP-9-Promotors durch Phorbolester und proinflammatorische Zytokine in MCF-7-Zellen notwendig sind. Wie aus der Literatur bekannt ist, können einige dieser Transkriptionsfaktoren durch NO beeinflusst werden. Zu diesen Transkriptionsfaktoren gehören AP-1, NFκB und Sp1 (Matthews et al., 1996; Tabuchi et al., 1994; Wang et al., 1999).

Der Transkriptionsfaktor NFκB spielt bei der Expression vieler entzündungsrelevanter Gene, so auch bei MMP-9 eine wichtige Rolle (Hah und Lee, 2003). In den meisten Fällen dissoziiert nach Stimulation NFκB-induzierender Signalwege der NFκB-IκB-Komplex, so dass die inhibitorische Wirkung des zytoplasmatischen IκB aufgehoben wird und eine nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NFκB zum Zellkern ermöglicht wird. Um nun mögliche Einflüsse von NO auf die Translokation bzw. DNA-Bindungsaktivität von NFκB zu untersuchen, wurden zunächst Western-Blot-Analysen und Transkriptionsfaktor-ELISAs durchgeführt. Die Experimente beschränkten sich hierbei auf die Untereinheit p65 (RelA), da p65, in Form eines heterodimeren Komplexes mit p50, als eine der am stärksten transaktivierenden (NFκB)-Untereinheiten gilt. Ergänzend hierzu wurde über Zellfraktionierung und Western-Blot-Analyse untersucht, ob die Stimulation von MCF-7-Zellen mit NO zu einer verminderten Translokation der p65-Untereinheit in den Zellkern führt. Wie in Abb. 3.19 zu sehen, steigt der Gehalt an p65 in Kernextrakten nach TPA-Stimulation deutlich an. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit DETA-NO hat hingegen keinen Einfluss auf den nukleären p65-Gehalt nach TPA-Stimulation.

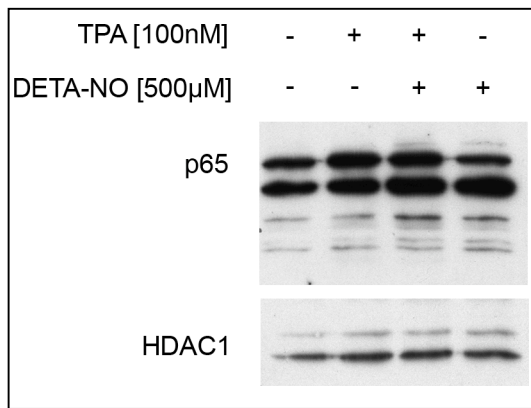


Abb. 3.19 Wirkung von TPA und/oder DETA-NO auf die p65-Spiegel in Kernextrakten von MCF-7-Zellen

Die Translokation der NFκB-Untereinheit p65 wird durch NO-Stimulation nicht beeinflusst. MCF-7-Zellen wurden für 1h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] stimuliert. Die nukleären Proteine wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Die Proben wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und in der Western-Blot-Analyse sukzessive mit einem p65-spezifischen und einem Histondeacetylase-1-Antikörper detektiert. Für die Analysen wurden jeweils 30µg Kernprotein eingesetzt.

In den folgenden Experimenten wurde die DNA-Bindung von p65 mit der Hilfe eines Transkriptionsfaktor-ELISAs untersucht. Dafür wurde die Bindungsaffinität von p65 zu verschiedenen Zeitpunkten (30min, 1h, 2h, 3h, 4h) getestet. Hierbei wurde ersichtlich, dass zu sämtlichen, der in den Experimenten untersuchten, Zeitpunkten ein ähnlicher Verlauf der NFκB-Bindungsaktivität festzustellen war. Abb. 3.20 zeigt repräsentativ das Bindungsverhalten von p65 nach 1h Stimulation. Dabei ist eine moderate, wenngleich signifikante Erhöhung der p65-Aktivität nach TPA-Stimulation zu erkennen ($2,3 \pm 0,7$ -fach) (Abb. 3.20). Anhand der ELISA-Messung wird deutlich, dass die gleichzeitige Stimulation mit DETA-NO zu keiner signifikanten Veränderung der DNA-Bindungsfähigkeit von p65 führt (Abb. 3.20).

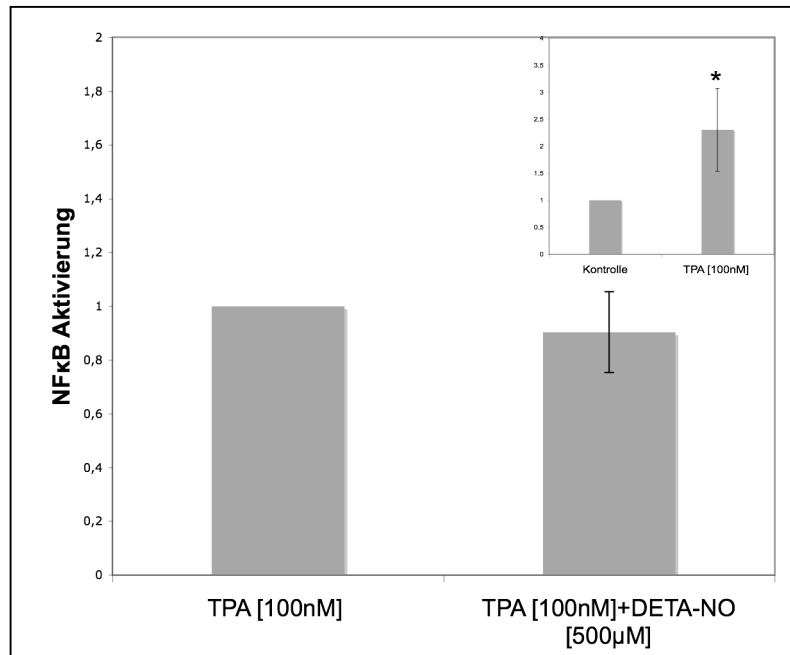


Abb. 3.20 Potenzieller Einfluss von NO auf die p65-Aktivierung

Die Aktivierung von p65 wird durch DETA-NO nicht signifikant verändert. MCF-7-Zellen wurden für 1h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] stimuliert. Die nukleären Proteine wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Die Bindung von p65 wurde mit Hilfe des TransAM (p65) Kits analysiert. Für die Analyse wurde je 5µg Kernextrakt eingesetzt. Die Aktivitätsdaten sind als x-fache Induktion der Kontrolle bzw. TPA-stimulierten Probe angegeben und zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung (n=3). *p<0,05 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die unstimulierte Kontrolle angesehen.

AP-1 ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der für die MMP-9-Expression von funktioneller Bedeutung ist und in nahezu allen Zelltypen durch TPA aktiviert wird (Chakraborti et al., 2003). Um zu überprüfen, ob NO einen modulierenden Effekt auf die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors ausübt, wurden die AP-1-assoziierten Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos untersucht. Wie in Abb. 3.21 A gezeigt, werden die Gesamt-Proteinspiegel des c-Juns durch keinen der im Experiment verwendeten Stimuli verändert. Die Expression von c-Fos wird im Gegensatz dazu erst nach Stimulation mit TPA aktiviert (Abb. 3.21 B). Eine Verminderung der TPA-induzierten c-Fos-Spiegel ist nach DETA-NO-Behandlung der Zellen wiederum nicht erkennbar (Abb. 3.21 B).

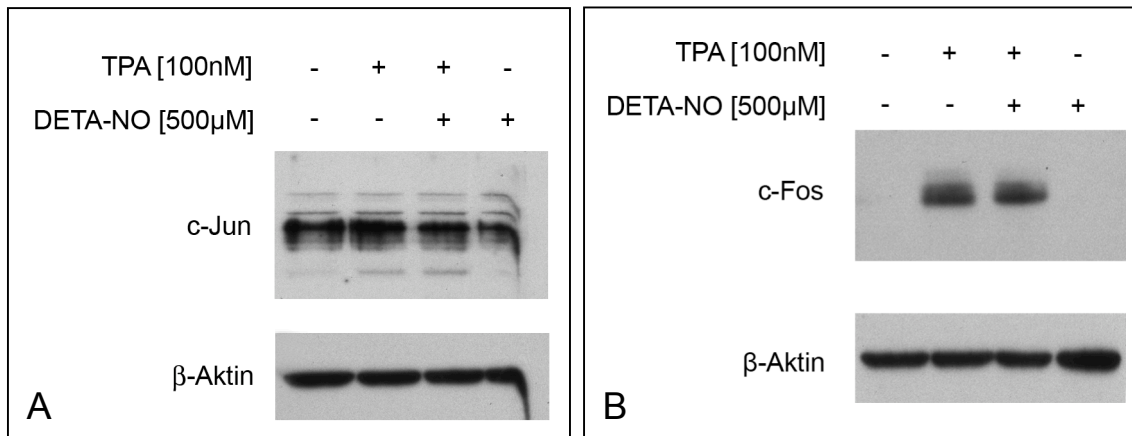


Abb. 3.21 Untersuchung von möglichen Effekten des NOs auf die zellulären c-Jun- bzw. c-Fos-Proteinspiegel

Weder die Expressionsspiegel von c-Jun (**A**) noch von c-Fos (**B**) sind von DETA-NO beeinflusst. MCF-7-Zellen wurden für 1h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500 μ M] stimuliert. Die Gesamtzellextrakte wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western-Blot mit Hilfe eines anti-c-Jun- bzw. anti-c-Fos-Antikörpers analysiert. Für die Analyse wurden jeweils 25 μ g Protein eingesetzt.

Da der alleinige Nachweis der zellulären „steady-state“-Spiegel keine eindeutige Aussage über den Aktivierungszustand der beiden Transkriptionsfaktoren zulässt, wurden mögliche Veränderungen der DNA-Bindungsaktivitäten dieser Faktoren ebenfalls mit Hilfe eines Transkriptionsfaktor-ELISAs analysiert. Abb. 3.22 zeigt die DNA-Bindung von phosphoryliertem c-Jun (phospho-c-Jun) und c-Fos nach 1h Stimulation mit TPA bzw. TPA plus DETA-NO. Ferner wurden die Bindungsaktivitäten nach unterschiedlichen Stimulationszeiten (30min, 2h, 3h und 4h) untersucht. Da die Induktion der DNA-Bindung beider AP-1-Untereinheiten nach TPA-Stimulation nach 1h ein Maximum zeigte, wurde dieser Zeitpunkt auch für alle nachfolgenden EMSA-Untersuchungen gewählt. Die Stimulation mit TPA führt zu signifikanten Steigerungen der DNA-Bindungsaktivitäten von sowohl phospho-c-Jun ($3,9 \pm 1,4$ -fache Induktion) als auch von c-Fos ($12,1 \pm 2,3$ -fache Induktion) (Abb. 3.22 A und Abb. 3.22 B). Für beide AP-1-Untereinheiten konnte außerdem eine Reduktion der DNA-Bindungsaffinität nach der zusätzlichen DETA-NO-Behandlung ermittelt werden (Abb. 3.22 A, auf durchschnittlich $65,2 \pm 20,0\%$ bzw. Abb. 3.22 B, auf $77,5 \pm 13,1\%$).

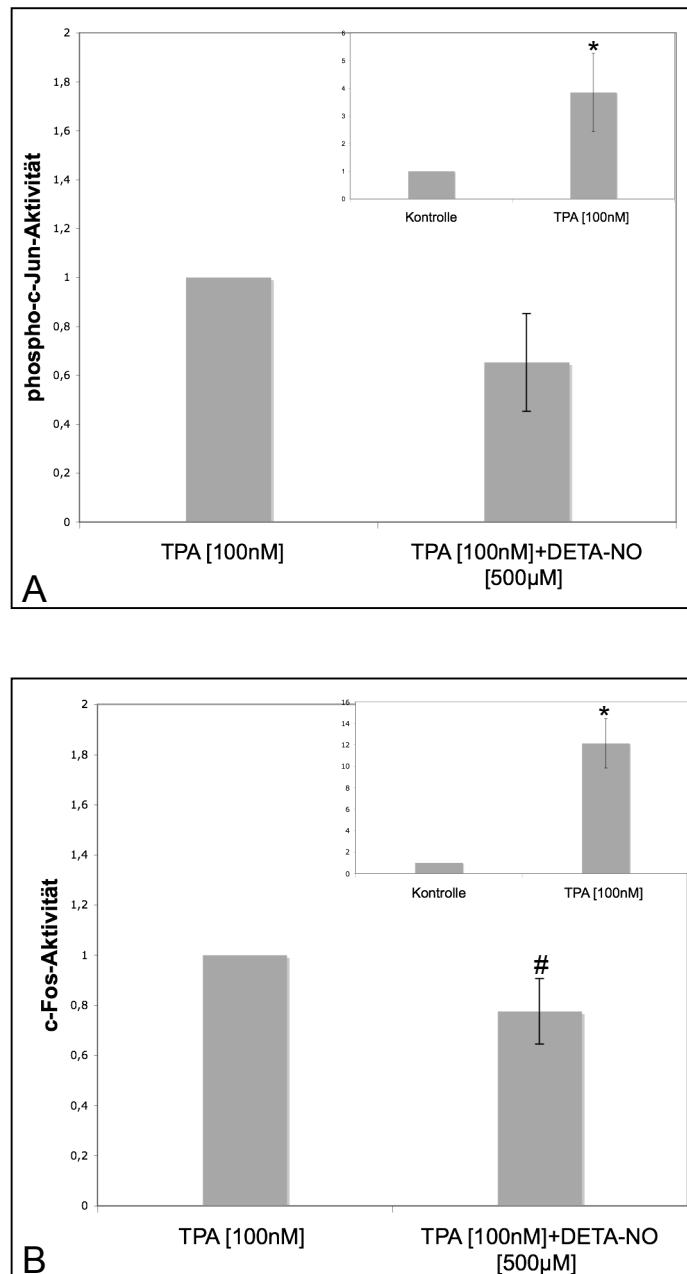


Abb. 3.22 Potenzieller Einfluss von NO auf die Aktivierung von phospho-c-Jun und c-Fos

Die Aktivierung von phospho-c-Jun wird durch DETA-NO leicht reduziert (**A**), während die Aktivierung von c-Fos signifikant verändert wird (**B**). MCF-7-Zellen wurden für 1h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] stimuliert. Die Aufarbeitung der nukleären Proteine erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Die Bindungen von Phospho-c-Jun und c-Fos wurden mit Hilfe des TransAM (AP-1)-Kits analysiert. Für die Analyse wurde jeweils 5µg Kernextrakt eingesetzt. Die Aktivitätsdaten sind als x-fache Induktion der Kontrolle bzw. TPA-stimulierten Probe angegeben und zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung (n=3). *p<0,05 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrolle, #p<0,05 und als statistisch signifikant bezogen auf die TPA-stimulierten Werte angesehen.

Um die mit Hilfe von Transkriptionsfaktor-ELISAs ermittelten Ergebnisse zu bestätigen, wurden zusätzlich radioaktive EMSA-Analysen durchgeführt. Der Vorteil dieser konventionellen Methode besteht darin, dass die Spezifität eines DNA-Protein-Komplexes durch eine „Supershift“-Analyse sichtbar gemacht werden kann. Die „Supershift“-Analyse

konnte die Beteiligung von c-Jun am TPA-induzierten AP-1-Komplex beweisen, während der verwendete anti-c-Fos-Antikörper in der „Supershift“-Analyse die Bindungsaffinitäten des AP-1-Komplexes nicht beeinträchtigt (Abb. 3.23 B).

Wie in Abb. 3.23 A dargestellt, führt die Stimulation von MCF-7-Zellen, wie auch im Transkriptionsfaktor-ELISA, zu einer deutlichen Induktion der AP-1-Bindungsfähigkeit an die DNA. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit DETA-NO bewirkt, ebenfalls wie bereits im Transkriptionsfaktor-ELISA gezeigt, eine deutliche Reduktion der durch TPA induzierten AP-1-DNA-Bindung. Aufgrund dieser Daten kann gefolgert werden, dass AP-1 an der NO-abhängigen Hemmung der MMP-9-Expression beteiligt ist.

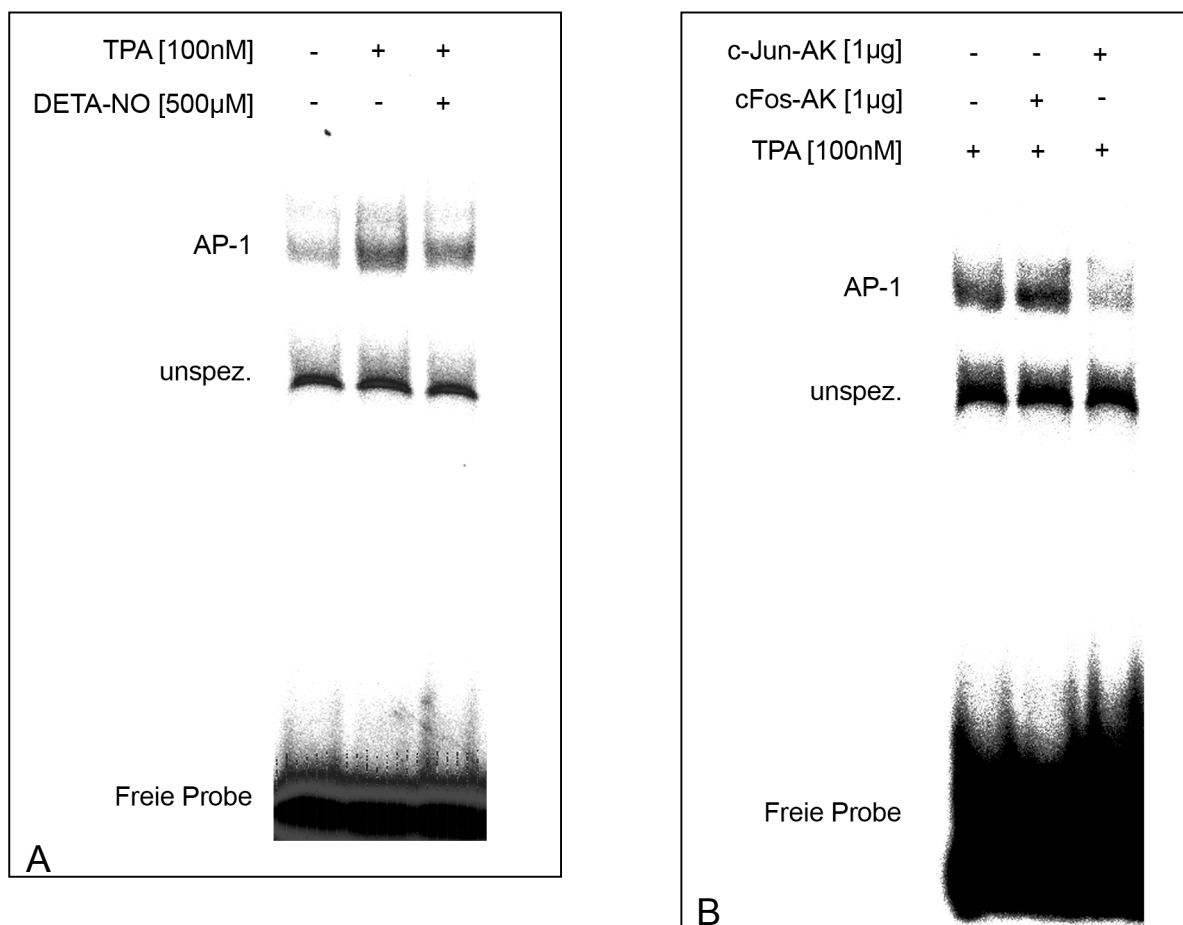


Abb. 3.23 Wirkung von DETA-NO auf die DNA-Bindungsaktivität von AP-1

DETA-NO reduziert die TPA-induzierte DNA-Bindungsaktivität von AP-1. (A) MCF-7-Zellen wurden für 1h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] stimuliert und die DNA-Transkriptionsfaktor-Bindung wie im Methodenteil beschrieben mittels EMSA untersucht. (B) Die Spezifität der Bindung an das AP-1-Oligonukleotid wurde mittels „Supershift“-Analyse unter Verwendung eines c-Jun-spezifischen Antikörpers bestätigt.

In einem nächsten Schritt wurde zusätzlich untersucht, ob neben AP-1 auch der Transkriptionsfaktor Sp1 möglicherweise über exogenes NO in MCF-7-Zellen reguliert

werden kann. In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Sp1 an der Aktivierung der MMP-9-Expression in verschiedenen Zelllinien beteiligt ist (Sato und Seiki, 1993; Farina et al., 1999; Jordà et al., 2005). Um einen möglichen Einfluss von Sp1 auf die MMP-9-Expression in MCF-7-Zellen zu untersuchen, wurde das Antibiotikum Mithramycin verwendet, welches in der Lage ist, die Aktivität von Sp1 zu hemmen (Yuan et al., 2007; Jia et al., 2007). Sollte die durch Mithramycin hervorgerufene Reduktion der TPA-induzierten MMP-9-Aktivität nicht zusätzlich durch DETA-NO reduziert werden können, wäre dies ein indirekter Hinweis darauf, dass Sp1 an der NO-vermittelten Regulation von MMP-9 beteiligt ist.

Wie die zymographische Analyse zeigt, führt die Gabe von Mithramycin zu einer Verminderung der extrazellulären gelatinolytischen Aktivität von MMP-9, was auf eine Beteiligung von Sp1 bei der Induktion von MMP-9 durch TPA schließen lässt (Abb. 3.24). Die zusätzliche Behandlung mit DETA-NO führt allerdings zu einer zusätzlichen Reduktion der Mithramycin-bedingten Hemmung der TPA-induzierten MMP-9-Aktivität, was darauf hinweist, dass die Aktivität von Sp1 nicht durch NO beeinträchtigt wird (Abb. 3.24).

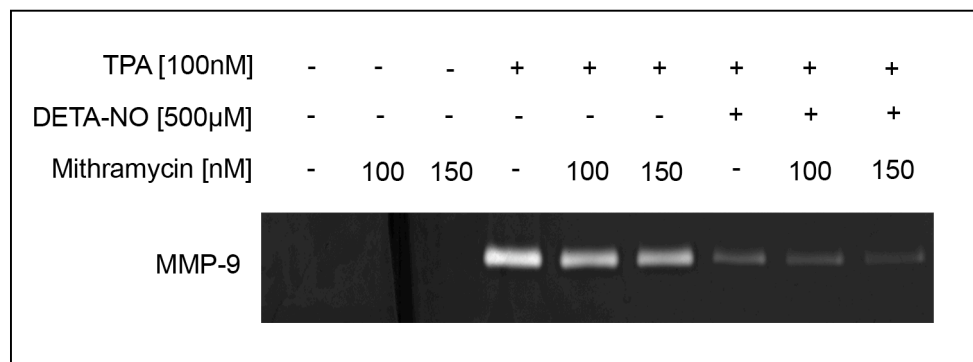


Abb. 3.24 Wirkung des Sp-1-Inhibitors Mithramycin auf die TPA-induzierte gelatinolytische Aktivität von MMP-9

Mithramycin reduziert die TPA-induzierte MMP-9-Expression. MCF-7-Zellen wurden für 30min mit Mithramycin in den angegebenen Konzentrationen präinkubiert. Anschließend wurde TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] zugefügt und die Zellen für 24h stimuliert. Je 1µl des Zellkulturüberstandes wurde unter Verwendung der SDS-PAGE-Zymographie elektrophoretisch aufgetrennt. Die lytische Bande repräsentiert die latente MMP-9-Form (92kDa).

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden auch EMSAs mit Sp1 durchgeführt. Wie in Abb. 3.25 gezeigt, wird die DNA-Bindungsaktivität von Sp1 durch die Stimulation der MCF-7-Zellen mit TPA nur geringfügig erhöht. Die DNA-Bindungs-fähigkeit von Sp1 wird durch die zusätzliche Behandlung der Zellen mit DETA-NO nicht beeinflusst. Dies zeigt, dass Sp1 und andere GC-Box-bindende Transkriptionsfaktoren nicht an der NO-vermittelten Hemmung der MMP-9 beteiligt sind.

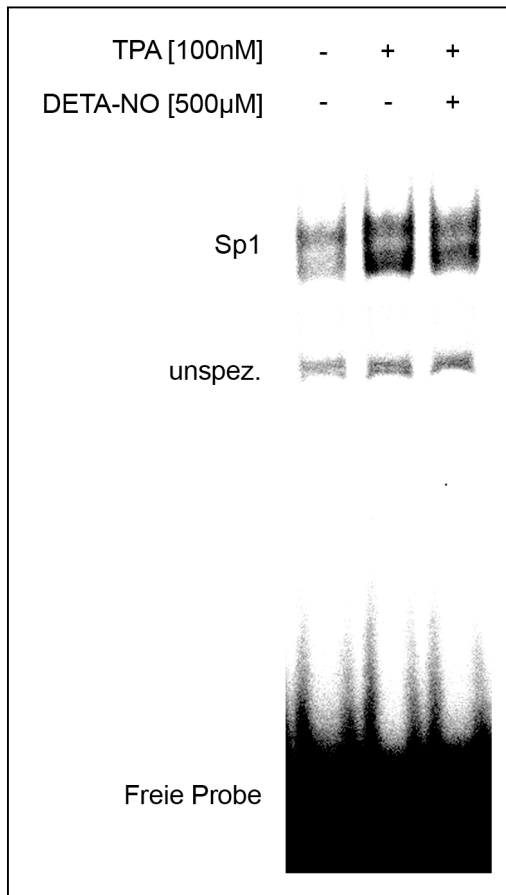


Abb. 3.25 Potenzielle Wirkung von DETA-NO auf die DNA-Bindungsaktivität GC-Box-bindender Transkriptionsfaktoren

DETA-NO beeinflusst nicht die DNA-Bindungsaktivität von GC-Box-bindenden Transkriptionsfaktoren. MCF-7-Zellen wurden für 1h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] stimuliert und die DNA-Transkriptionsfaktor-Bindung, wie im Methodenteil beschrieben, mit Hilfe der EMSA-Technik untersucht.

3.6. Mögliche NO-vermittelte Modulation der Histonacetylierung und deren Einfluss auf die MMP-9-Expression

Die in Kapitel 3.4 bzw. 3.5 verwendeten Versuchsansätze sind nur eingeschränkt aussagekräftig, da sie nicht die Chromatinstruktur in eukaryotischen Zellen berücksichtigen, weil für Reporterstudien nur bakterielle Plasmid-DNA verwendet wird und für EMSAs lediglich synthetisch hergestellte Oligonukleotide eingesetzt werden.

Eine kürzlich erschienene Arbeit von Yan et al. konnte in eleganter Weise zeigen, dass die Expression von MMP-9 auch durch epigenetische Mechanismen, insbesondere durch die Modifizierung verschiedener Histondeacetylasen (HDACs), reguliert wird (Yan et al., 2003, Ma et al., 2004). Daher wurde im folgenden Versuch durch den Einsatz verschiedener HDAC-Inhibitoren zunächst der mögliche Einfluss von Chromatinveränderungen auf die TPA-induzierte MMP-9-Expression untersucht. Hierzu wurde die Wirkung der synthetischen HDAC-Inhibitoren (Trichostatin A (TSA), ein Inhibitor der Klassen HDAC I und HDAC II und M344 (Synonym: HDAC-Inhibitor III), ein Derivat von TSA) auf die TPA-induzierte MMP-9-Expression untersucht.

Wie Abb. 3.26 A zeigt, führt die Stimulation von MCF-7-Zellen mit TPA (100nM) und TSA (100nM) zu einer geringen Reduktion der TPA-induzierten MMP-9-Expression. Interessanterweise wird der hemmende Einfluss von NO auf die TPA-induzierte MMP-9-Sekretion durch Kostimulation mit TSA abgeschwächt (Abb. 3.26 A). Die Kostimulation Zellen mit TPA und M344 (100nM bzw. 150nM) zeigt hingegen keine Veränderung der TPA-induzierten extrazellulären MMP-9-Spiegel (Abb. 3.26 B). Aber auch mit M344 wird der hemmende Effekt von NO auf die TPA-induzierte gelatinolytische Aktivität von MMP-9 geringfügig abgeschwächt (Abb. 3.26 B).

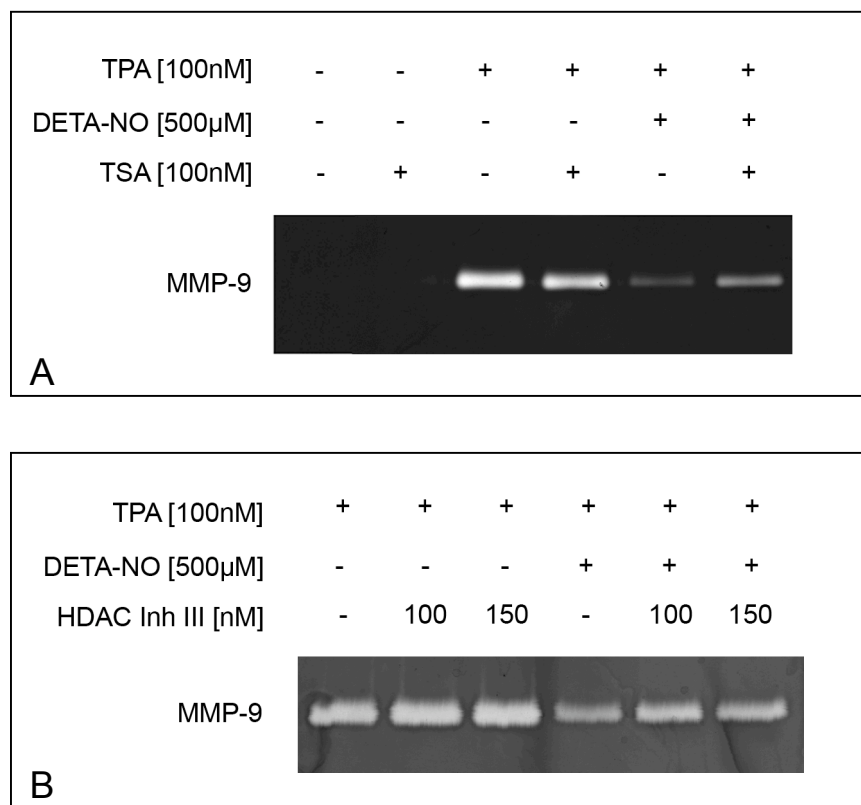


Abb. 3.26 Wirkung verschiedener HDAC-Inhibitoren auf die gelatinolytische Aktivität von MMP-9

Sowohl TSA (**A**) als auch M344 (**B**) können das Ausmaß der NO-vermittelten Hemmung auf die TPA-induzierte MMP-9-Expression reduzieren. MCF-7-Zellen wurden für 30min mit TSA bzw. M344 in den angegebenen Konzentrationen vorinkubiert. Nach der Gabe der HDAC-Inhibitoren wurde TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] zugegeben und die Zellen für weitere 24h inkubiert. Jeweils 1µl des Zellkulturüberstandes wurde für die SDS-Zymographie eingesetzt.

3.7. Untersuchung zu NO-modulierten und für die MMP-9-Expression relevanten Signalwegen

In einer nachfolgenden Versuchsreihe wurde untersucht, mit welchen der die MMP-9-Expression regulierenden Signaltransduktionskaskaden NO interferiert. Dazu wurde zunächst überprüft, ob die Aktivität verschiedener MAPKs für die TPA-induzierte MMP-9-Expression

in MCF-7-Zellen essenziell ist. Hierfür wurde die Wirkung verschiedener pharmakologischer Inhibitoren wie PD98059, ein Inhibitor der MAP-Kinase-ERK-Kinase-1, SB203580 ein Hemmstoff der p38-Kinase und der SP600125, ein spezifischer Inhibitor der JNK, untersucht. Wie Abb. 3.27 zeigt, führen sämtliche dieser im Experiment eingesetzten MAPK-Inhibitoren, am deutlichsten nach Behandlung mit PD98059, zu einer Reduktion der TPA-induzierten gelatinolytischen Aktivität von MMP-9.

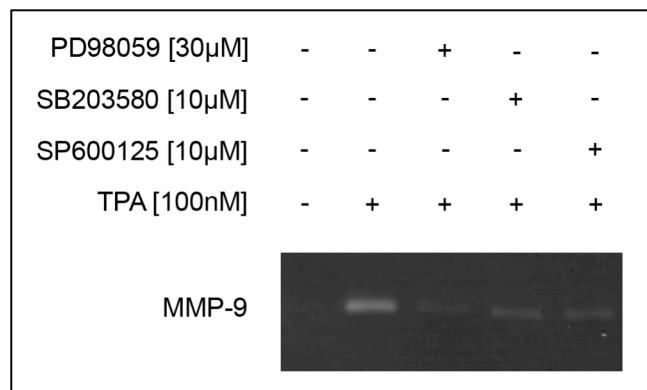


Abb. 3.27 Wirkung verschiedener MAPK-Inhibitoren auf die gelatinolytische Aktivität von MMP-9

Die MAPK-Inhibitoren hemmen spezifisch die TPA-induzierte MMP-9-Aktivität. MCF-7-Zellen wurden mit PD98059 [30 μ M], SB203580 [10 μ M] oder SP600125 [10 μ M] für 30min präinkubiert. Danach wurde TPA [100nM] zugegeben und die Zellen in Anwesenheit der Inhibitoren für weitere 24h inkubiert. Jeweils 1 μ l des Zellkulturüberstandes wurde auf die SDS-PAGE-Zymographie aufgetragen.

Um herauszufinden, ob NO mögliche Effekte auf die oben genannten MAPKs hat, wurde deren Aktivitätsstatus mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper untersucht. Für die Analyse der phosphorylierten Kinasespiegel wurden Gesamtzell-Lysate nach 15, 30, 60 und 120min Stimulation hergestellt und für die Western-Blot-Analyse nach Standardprotokollen (s. Material und Methoden) aufgearbeitet. In Abb. 3.28 und Abb. 3.29 sind stellvertretend die Resultate nach 60-minütiger Stimulation gezeigt, da zu sämtlichen untersuchten Zeitpunkten ähnliche Effekte nachgewiesen werden konnten.

Wie die Abb. 3.28 und 3.29 zeigen, wird die Phosphorylierung der Serin/Threonin-Kinase Akt sowie die der zentralen MAPK (JNK, p38, ERK) durch TPA stark induziert, während die zusätzliche Stimulation der Zellen mit DETA-NO zu keiner Veränderung der TPA-induzierten Phosphorylierungen der untersuchten Kinasen führt (Abb. 3.28 und Abb. 3.29).

Wie die Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen die unphosphorylierten (Gesamt-) Kinasen zeigen, wird der zelluläre Gehalt sämtlicher Kinasen weder durch TPA-Stimulation noch durch die zusätzliche Behandlung der Zellen mit DETA-NO verändert (Abb. 3.28 und Abb. 3.29). Dies beweist, dass die TPA-induzierte Zunahme der phosphorylierten Kinasen nicht auf einen Anstieg der jeweiligen Proteinspiegel der Kinasen zurückzuführen ist.

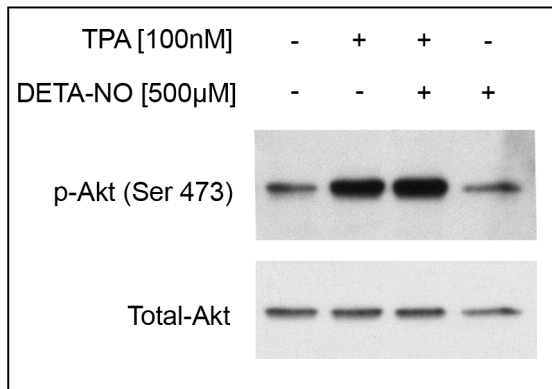


Abb. 3.28 Mögliche Effekte von NO auf phosphoryliertes Akt

Die Behandlung der Zellen mit DETA-NO führt zu keiner Veränderung der TPA-induzierten Phosphorylierung von Akt. MCF-7-Zellen wurden für 1h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] stimuliert. Die Gesamtzellextrakte wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Western-Blot-Analyse sukzessive mit einem phospho-spezifischen Akt- und einem Gesamt-Akt-Antikörper analysiert. Für die Analysen wurden jeweils 25µg Protein eingesetzt.

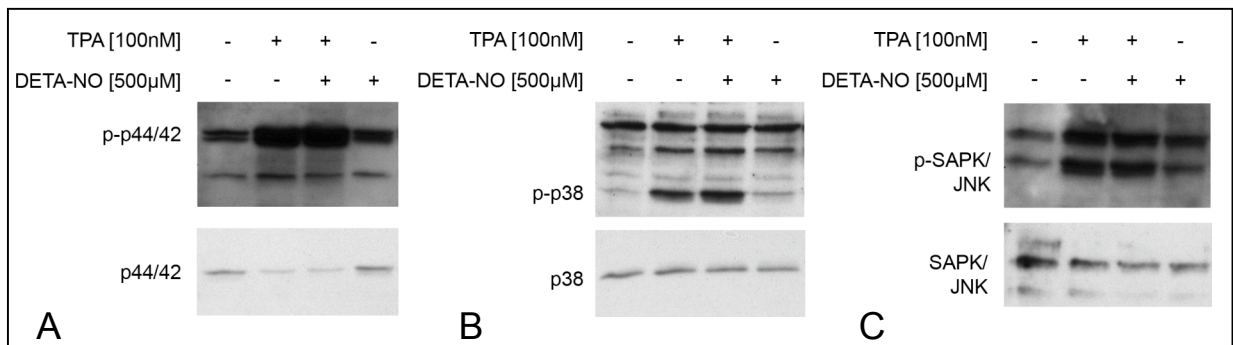


Abb. 3.29 Einfluss von NO auf den Phosphorylierungsgrad verschiedener MAP-Kinasen

DETA-NO hat keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von MAP-Kinasen. MCF-7-Zellen wurden für 1h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] stimuliert. Die Gesamtzellextrakte wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Western-Blots wurden sukzessive mit (A) phospho-spezifischen p44/42- oder Gesamt-p44/42-Antikörper inkubiert. Parallel wurden Blots mit denselben Extrakten sukzessive mit (B) phospho-spezifischen-p38- oder Gesamt-p38-Antikörper oder (C) phospho-spezifischen-SAPK/JNK- oder Gesamt-JNK-Antikörper inkubiert. Für die Analysen wurden jeweils 25µg Protein eingesetzt.

Da TPA als ein klassischer Aktivator der Protein-Kinase-C-Familie gilt, wurde zusätzlich untersucht, ob die Aktivität von Protein-Kinase-C für die TPA-Induktion der MMP-9-Expression notwendig ist. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Wirkung von verschiedenen pharmakologischen PKC-Inhibitoren auf die TPA-induzierte MMP-9-Expression mit Hilfe der Zymographie untersucht. Hierfür wurden die PKC- α und β -Inhibitoren Gö6976 und CGP41251 sowie Rottlerin, welches präferenziell PKC- δ - und θ hemmt, verwendet. Wie Abb. 3.30 zeigt, führt die Behandlung mit Rottlerin (10µM) zu einer nahezu vollständigen Hemmung der TPA-induzierten MMP-9-Expression, während die übrigen der oben erwähnten Inhibitoren keinen modulierenden Einfluss auf die MMP-9-Expression zeigen. Dieses Ergebnis weist auf eine wichtige Rolle von PKC- δ und/oder θ bei der durch TPA induzierten Expression von MMP-9 hin.

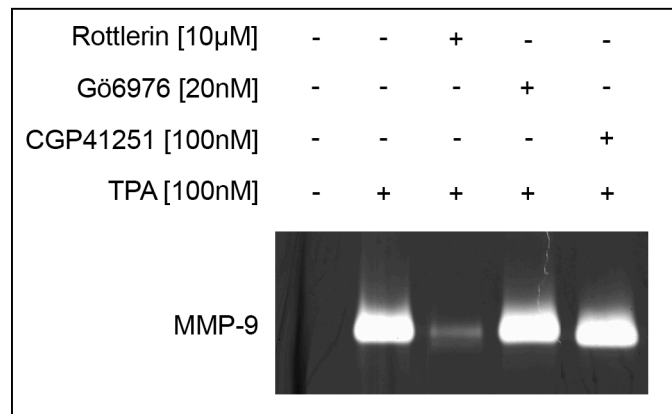


Abb. 3.30 Wirkung verschiedener PKC-Inhibitoren auf die gelatinolytische Aktivität von MMP-9

Der PKC- δ - und θ -selektive Inhibitor Rottlerin hemmt die TPA-induzierte MMP-9-Aktivität. MCF-7-Zellen wurden mit Rottlerin [10 μ M], Gö6976 [20nM] oder CGP41251 [100nM] für 30min präinkubiert. Danach wurde TPA [100nM] zugegeben und die Zellen in Anwesenheit der Inhibitoren für weitere 24h inkubiert. Jeweils 5 μ l des Zellkulturüberstandes wurden auf die SDS-PAGE-Zymographie aufgetragen.

In einem nächsten Versuchsansatz wurde daher überprüft, ob NO auf die Gesamt-Aktivität von PKC in MCF-7-Zellen Einfluss nimmt. Dazu wurde ein kommerziell erhältlicher PKC-Aktivitäts-Assay verwendet, dessen hohe Spezifität für PKC-Enzyme durch die Verwendung des PKC-spezifischen Substrates Neurogranin gewährleistet wird. Die Auswertung des Assays erfolgte durch densitometrische Analyse des umgesetzten radioaktiv markierten Substrates. Die PKC-Aktivität in MCF-7-Zellen wird, wie zu erwarten, nach TPA-Stimulation (100nM) signifikant erhöht (Abb. 3.31). Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit DETA-NO (500 μ M) führt zu einer signifikanten Abnahme der TPA-vermittelten PKC-Aktivitätssteigerung zurück auf das Basalniveau (Abb. 3.31). Dieses Ergebnis bestätigt, dass der hemmende Effekt von DETA-NO auf die MMP-9-Expression durch eine NO-vermittelte Hemmung von PKC-Enzymen zurückzuführen ist.

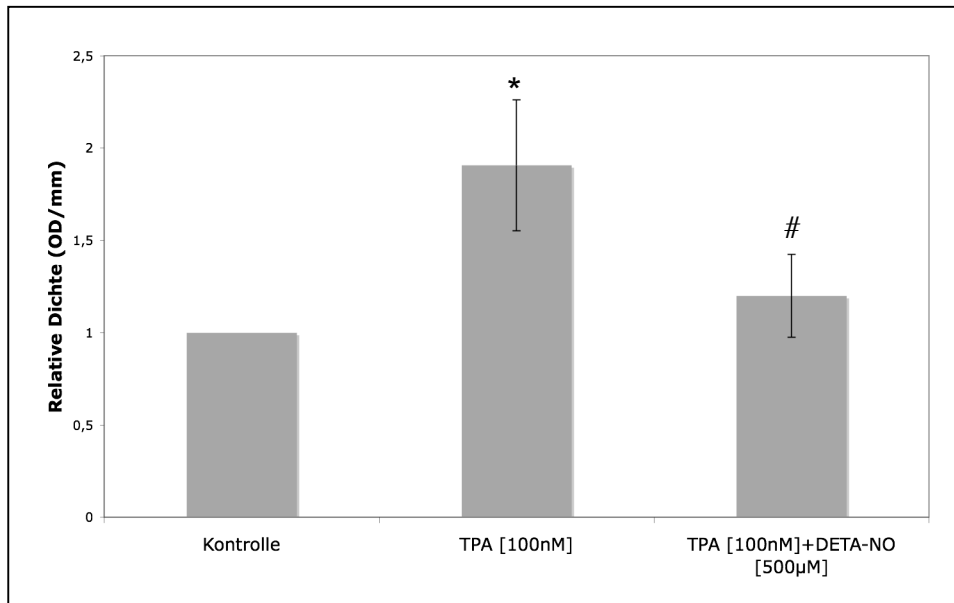


Abb. 3.31 Einfluss von NO auf die PKC-Gesamt-Aktivität in MCF-7-Zellen

Die PKC-Aktivität wird nach DETA-NO-Behandlung signifikant reduziert. MCF-7-Zellen wurden für 15min mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] stimuliert. Der Aktivitäts-Assay wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die aufgearbeiteten Proben wurden unverdünnt eingesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte densitometrisch. Die Expressionsdaten sind als x-fache Induktion der TPA-stimulierten Probe angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). *p<0,05 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrolle und #p<0,05 als statistisch signifikant bezogen auf die TPA-stimulierten Werte angesehen.

3.8. Kokultur-Experimente mit Makrophagen und MCF-7-Zellen

In folgendem Experiment sollte überprüft werden, ob auch endogenes, über NO-Synthasen gebildetes NO die MMP-9-Expression inhibitorisch beeinflussen kann. Hierzu wurde zunächst in einem Vorversuch untersucht, ob MCF-7-Zellen unter TPA-Stimulation nachweislich in der Lage sind, selbst NO zu produzieren. Dazu wurde der NO-Synthaseinhibitor NG-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) verwendet. L-NMMA wirkt als ein L-Arginin-Analogon als kompetitiver Antagonist von sämtlichen NO-Synthasen und hemmt somit die zelluläre NO-Synthese.

Wenn MCF-7-Zellen nach TPA-Stimulation NO synthetisieren und freisetzen könnten, wäre durch die Koinkubation von TPA und L-NMMA eine Erhöhung der MMP-9-Expression zu erwarten, da der inhibitorische Effekt des endogen produzierten NOs auf die MMP-9-Expression ausbleiben würde. Wie Abb. 3.32 zeigt, ist aber keine Veränderung der MMP-9-Expression nach der Zugabe des L-NMMA (1mM) zu beobachten. Hieraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass in MCF-7-Zellen die NO-Synthese durch TPA-Stimulation nicht aktiviert wird. Bestätigend hierzu zeigte sich im Griess-Assay, dass unter

keiner der oben genannten Stimulationsbedingungen NO im Zellkulturüberstand nachzuweisen war.

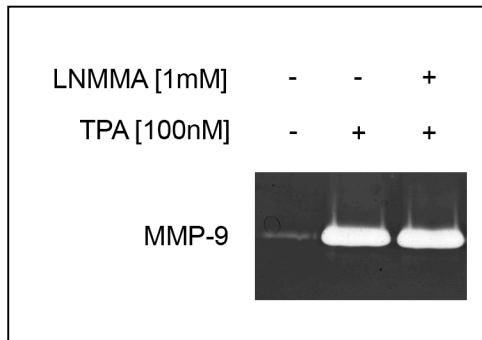


Abb. 3.32 Wirkung des NOS-Hemmstoffes L-NMMA auf die gelatinolytische Aktivität von MMP-9

Der NOS-Inhibitor L-NMMA zeigt keinen Effekt auf die TPA-induzierte MMP-9-Aktivität. MCF-7-Zellen wurden mit L-NMMA [1mM] für 30min präinkubiert. Nach Zugabe von TPA [100nM] wurden die Zellen für weitere 24h kokubiert. Jeweils 10 μ l der Zellkulturüberstände wurden mittels SDS-Zymographie elektrophoretisch aufgetrennt.

3.8.1. Potenzieller Effekt des von Makrophagen produzierten NO auf die TPA-induzierte MMP-9-Expression in MCF-7-Zellen

Da nicht nur Tumorzellen selbst, sondern auch das den Tumor umgebende Gewebe in der Lage ist, größere Mengen von NO über die Aktivierung der induzierbaren NOS (iNOS) bilden zu können (Fukumura et al., 2006), wurden nachfolgend Kokultur-Versuche mit der Maus-Makrophagenlinie RAW 264.7 und MCF-7-Zellen durchgeführt. Für die Experimente konnte keine humane Makrophagenlinie verwendet werden, da humane Zellen weder *in vitro* noch *ex vivo* nennenswerte NO-Mengen synthetisieren können (Cauwels et al., 2007). Indessen gibt es zahlreiche Beispiele die zeigen, dass RAW-264.7-Makrophagen der Maus nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) und inflammatorischen Zytokinen in der Lage sind, größere Mengen von NO zu synthetisieren (Stuehr et al., 1987; Song et al., 2007; Orlicek et al., 1999; Zhou et al., 2003). Aus diesem Grund wurden die folgenden Kokultur-Experimente mit RAW-264.7-Makrophagen durchgeführt. Hierbei wurden die Makrophagen zunächst für 6h mit einem Stimulationsmix aus IFN- γ (100U/ml) und LPS (1 μ g/ml) stimuliert und nach dem Wegwaschen der Stimuli mit MCF-7-Zellen für weitere 24h kokultiviert. In einem alternativen Versuchsansatz wurden die Stimuli vor dem Zusammenführen der beiden Zelllinien nicht entfernt. In Abb. 3.33 A ist der NO-Gehalt im MCF-7-Zellkulturüberstand nach Stimulation der Makrophagen mit LPS und INF- γ nach der Messung mit dem Griess-Reagenz gezeigt. Die Porengröße der Transwell-Einsätze ermöglicht eine ungehinderte Diffusion des von Makrophagen gebildeten NO in die Kulturschalen der MCF-7-Zellen. Daher konnte die NO-Entwicklung auch in den Überständen der MCF-7-Zellen nachgewiesen werden. Wie Abb. 3.33 A zeigt, produzieren die Makrophagen sowohl nach Wegwaschen der Stimuli als auch nach der permanenten Stimulation mit INF- γ und LPS deutliche Mengen von

NO ($50\mu\text{M}$ NO bzw. ca. $16\mu\text{M}$). Unter beiden Versuchsbedingungen führt die Behandlung der Makrophagen mit L-NMMA zur nahezu vollständigen Hemmung der NO-Bildung (um $38\mu\text{M}$ auf $12\mu\text{M}$ bzw. um $13\mu\text{M}$ auf $3\mu\text{M}$). Die von den Makrophagen gebildete NO-Menge ist jedoch deutlich geringer als die mit NO-Donoren wie z.B. DETA-NO herbeigeführte NO-Freisetzung.

Um zu überprüfen, ob sich das von Makrophagen synthetisierte NO negativ auf die Expression von MMP-9 auswirkt, wurden die MMP-9-Aktivitäten in den Überständen der MCF-7-Zellen nach der Kokultivierung mit Hilfe der SDS-Zymographie gemessen. Wenn die Menge an gebildetem NO ausreichen würde um die MMP-9-Expression zu reduzieren, müsste die Kostimulation der Makrophagen mit L-NMMA zu einer Erhöhung der MMP-9-Expression in den benachbarten MCF-7-Zellen führen (Abb. 3.33 B). Die Analyse der MMP-9-Aktivitäten zeigte jedoch, dass der TPA-induzierte MMP-9-Gehalt in MCF-7-Überständen unter keiner der gewählten Versuchsbedingungen verändert war.

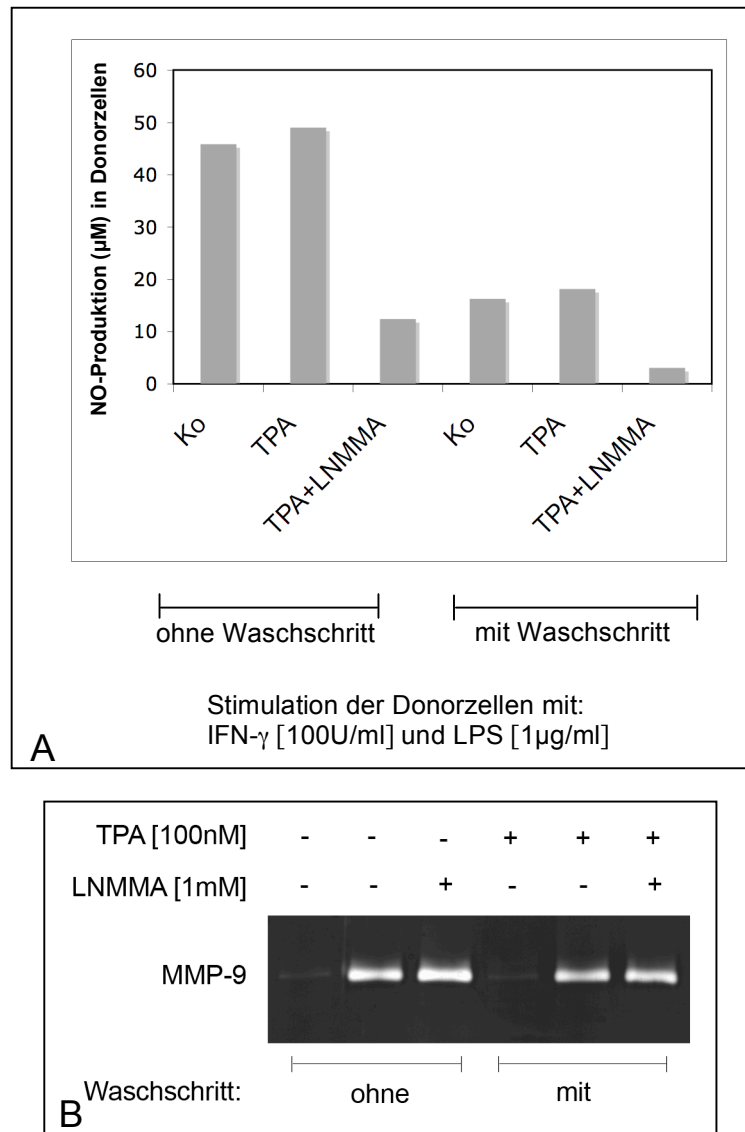


Abb. 3.33 NO-Synthese von Makrophagen nach der Zytokin-Stimulation

Endogenes, von RAW-264.7-Makrophagen produziertes NO zeigt keine Wirkung auf die TPA-induzierte MMP-9-Expression in MCF-7-Zellen. Für sämtliche Kokultur-Experimente wurden RAW-264.7-Makrophagen ($2,9 \times 10^5$ Zellen/Einsatz) in Transwell-Einsätze ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgte eine Stimulation der Makrophagen mit IFN- γ [100U/ml] plus LPS [1 μ g/ml] für 6h. Die MCF-7-Zellen wurden zunächst getrennt kultiviert. Hierzu wurden $3,5 \times 10^5$ Zellen/Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Die MCF-7-Zellen wurden mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus L-NMMA [1mM] stimuliert. Unmittelbar nach Zugabe der Stimuli wurden die Makrophagen-tragenden Zellkultur-Einsätze in die MCF-7-Kulturschalen überführt und für weitere 24h kokultiviert. Ein Teil der überführten Zellkultur-Einsätze wurde zuvor mit PBS gewaschen, um IFN- γ und LPS zu entfernen. (A) Je 100 μ l des Zellkulturüberstandes der MCF-7-Zellen wurden mit Griess-Reagenz versetzt, um über die Bestimmung des Nitritgehaltes die NO-Produktion der Makrophagen zu messen. (B) Jeweils 1 μ l des Zellkulturüberstandes wurde mittels SDS-Zymographie elektrophoretisch aufgetrennt.

3.9. Untersuchung zu möglichen Effekten von NO auf die Migration von MCF-7-Zellen

In der Literatur finden sich zahlreiche Belege dafür, dass MMP-9 bei der Migration von Tumorzellen eine wichtige funktionelle Rolle spielt (z.B. Balduyck et al., 2000; Legrand et al., 1999; Björklund et al., 2004). Aus der Literatur ist außerdem bekannt, dass die Behandlung von MCF-7-Zellen mit TPA zu einer verstärkten Migration der Zellen führt (Ree et al., 1998).

Daher wurde im folgenden Versuchsansatz der mögliche Einfluss von NO auf die Migrationsfähigkeit von MCF-7-Zellen untersucht. Die Migration von MCF-7-Zellen wurde mit Hilfe einer modifizierten Boyden-Kammer (Keely, 2001) untersucht, deren Einsätze zuvor mit Kollagen IV ($20\mu\text{g/ml}$) beschichtet wurden. Die migrierten Zellen wurden durch eine DAPI-Färbung der Zellkerne sichtbar gemacht und konnten dann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes quantifiziert werden. Die in der Literatur beschriebene, erhöhte Migration von MCF-7-Zellen nach TPA-Stimulation konnte in unseren Experimenten bestätigt werden (Abb. 3.34). Die zusätzliche Stimulation von MCF-7-Zellen mit DETA-NO ($500\mu\text{M}$) hatte in unseren Versuchsansätzen jedoch keinen signifikanten Effekt auf die TPA-induzierte Migrationsfähigkeit der MCF-7-Zellen (Abb. 3.34).

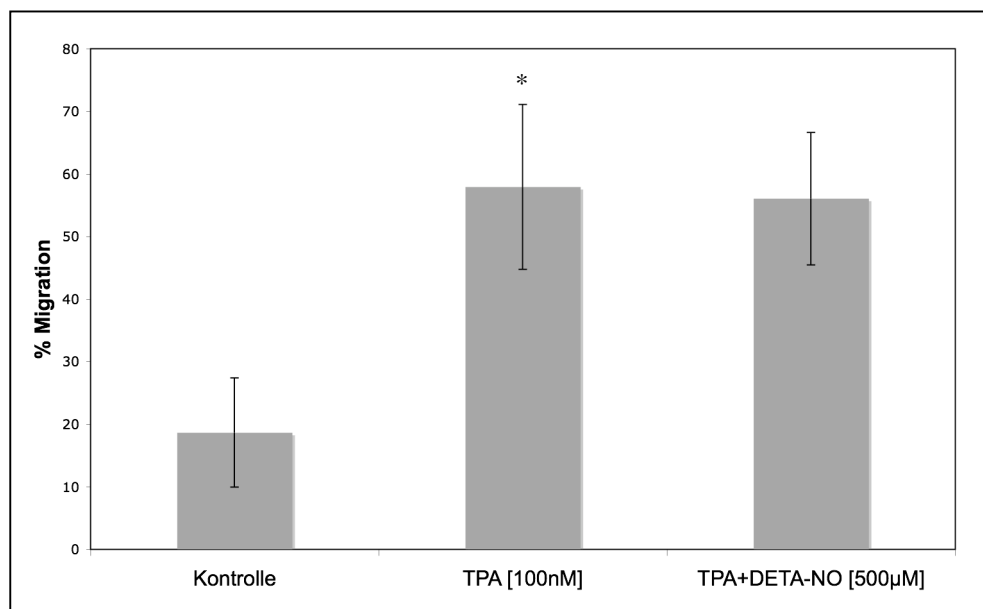


Abb. 3.34 Wirkung von DETA-NO auf die Migration von MCF-7-Zellen

DETA-NO zeigt keinen signifikanten Effekt auf die TPA-induzierte Migration von MCF-7-Zellen. Für den Migrationsassay wurden 1×10^5 Zellen/ $100\mu\text{l}$ je Transwell-Einsatz ausgesät. Die MCF-7-Zellen wurden für 24h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500µM] inkubiert. Danach wurden die Zellen, wie im Methodenteil beschrieben, mit DAPI angefärbt und für die Migrationsanalyse ausgewertet. Veränderungen der Zellmigration sind als % Migration angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=3$). * $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant bezogen auf unbehandelte Kontrollzellen angesehen.

3.10. Effekte von DETA-NO auf MDA-MB-231-Zellen

Aufgrund der bekannten Vielzahl und Varianz von Brustkrebszelllinien sollte abschließend untersucht werden, ob ein inhibitorischer Effekt des exogen gegebenen NOs auf die MMP-9-Expression in ähnlicher Weise auch in anderen Brustkrebszellen nachweisbar ist. Aus diesem Grund wurde die bereits in Kapitel 3.1.2 erwähnte Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 für die nachstehenden Expressionsanalysen verwendet.

3.10.1. Modulation der TPA-induzierten MMP-9-Aktivität in MDA-MB-231-Zellen durch DETA-NO

Zunächst wurde der Einfluss von exogenem NO auf die TPA-induzierte MMP-9-Aktivität in Zellkulturüberständen von MDA-MB-231-Zellen untersucht. Wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, kann die bereits konstitutive Expression der MMP-9 durch eine Stimulation mit TPA (100nM) zusätzlich gesteigert werden (Abb. 3.35).

Eine gleichzeitige Stimulation der Zellen mit DETA-NO führt, ähnlich wie bereits für MCF-7-Zellen beschrieben, zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der TPA-induzierten extrazellulären MMP-9-Gelatinase-Aktivität (Abb. 3.35). Dieses Experiment zeigt, dass in MDA-MB-231-Zellen die MMP-9-Sekretion in gleicher Weise durch NO beeinflusst wird wie in MCF-7-Zellen.

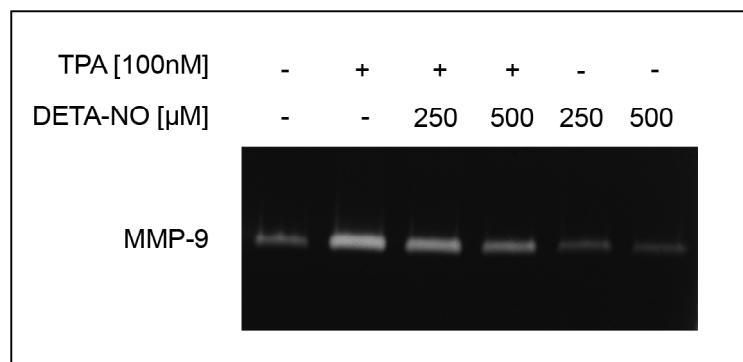


Abb. 3.35 Effekt von DETA-NO auf die TPA-induzierte gelatinolytische Aktivität von MMP-9 in MDA-MB-231-Zellen im Zellkulturüberstand

Konzentrationsabhängige Hemmung der TPA-induzierten MMP-9-Aktivität durch DETA-NO. MDA-MB-231-Zellen wurden für 24h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500 μ M] inkubiert. Jeweils 10 μ l des Zellkulturüberstandes wurde mittels SDS-Zymographie elektrophoretisch aufgetrennt.

3.10.2. Einfluss von NO auf die MMP-9-mRNA-Expression in MDA-MB-231-Zellen

In einem weiteren Experiment sollte getestet werden, ob der in MCF-7 gezeigte inhibitorische Effekt des NO auf die TPA-induzierten MMP-9-mRNA-Spiegel auch in MDA-MB-231-Zellen nachweisbar ist. Wie in Abb. 3.36 zu sehen, führt die Stimulation von MDA-MB-231-Zellen mit TPA zu einem deutlichen Anstieg der MMP-9-mRNA-Spiegel. Die Kostimulation der Zellen mit TPA und DETA-NO (500 μ M) führt zu einer deutlichen Abnahme der MMP-9-mRNA-Spiegel auf durchschnittlich 35% des TPA-vermittelten MMP-9-mRNA-Gehaltes.

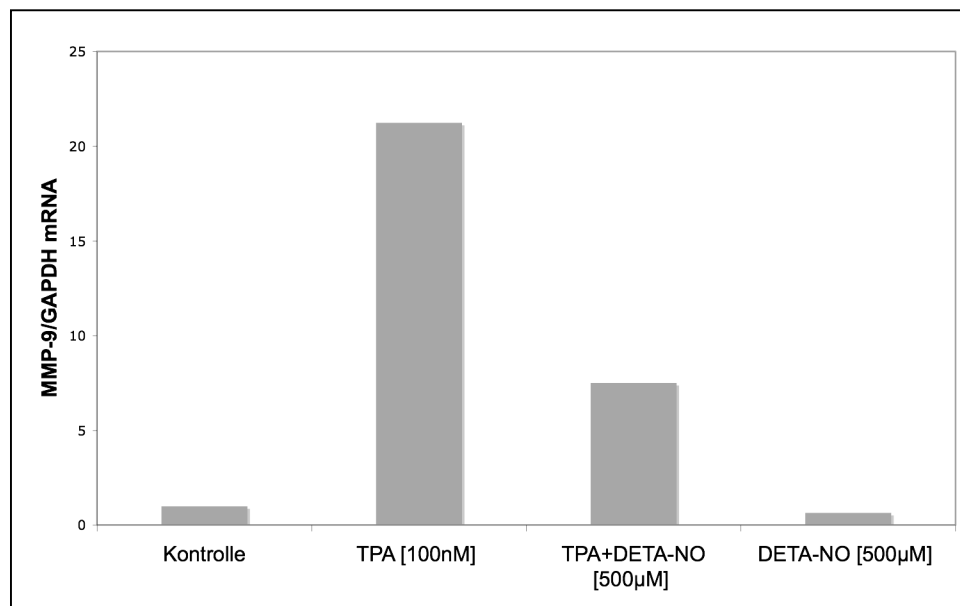


Abb. 3.36 Regulation der MMP-9-mRNA-Expression durch DETA-NO

DETA-NO reduziert die TPA-induzierte MMP-9-mRNA-Expression. MDA-MB-231-Zellen wurden für 24h mit TPA [100nM] oder TPA [100nM] plus DETA-NO [500 μ M] bzw. mit DETA-NO [500 μ M] allein inkubiert. Nach Isolierung der RNA wurde eine semiquantitative Realtime-PCR mit einer MMP-9-spezifischen Sonde und genspezifischen Primern durchgeführt. Zum Abgleich wurden GAPDH-mRNA-Spiegel gemessen. Als Maßstab für die MMP-9-Expression (bezogen auf die Expression der GAPDH-mRNA) wurden die $\Delta\Delta$ Ct-Werte verwendet (n=2).

Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die hier für MCF-7-Zellen beschriebene NO-abhängige MMP-9-Regulation auch in anderen Brustzelllinien auftritt. Daher kann vermutet werden, dass die hier exemplarisch für MDA-MB-231 beschriebene NO-abhängige Modulation der induzierten MMP-9-Expression eine funktionelle Bedeutung für die MMP-9-Regulation bei Brustkrebs hat.

4. Diskussion

Das Hauptziel dieser Arbeit galt der Untersuchung der Wirkung von exogenem NO auf die Aktivität und Expression der Phorbol-ester-induzierten MMP-9 in verschiedenen Brustkrebszellen. In der Literatur sind bereits mehrfach unterschiedliche NO-vermittelte Effekte auf die MMP-9-Aktivierung und Expression beschrieben worden. Dabei wird sowohl über stimulierende als auch über inhibierende Effekte von NO berichtet.

So wurde in vorausgegangenen Arbeiten aus unserer eigenen Arbeitsgruppe aufgezeigt, dass NO die Zytokin-induzierte Expression der MMP-9 in Mesangiumzellen über einen cGMP-abhängigen Mechanismus hemmt (Eberhardt et al., 2000b). Der NO-Donor DETA-NO ist in vaskulären Muskelzellen in der Lage die Expression und Aktivität der MMP-9 zu blockieren (Sinha et al., 2006). Die Arbeitsgruppe um Burrow konnte nachweisen, dass die MMP-8- und MMP-9-Spiegel in Hautfibroblasten aus Patienten mit Diabetes im Vergleich zu Hautfibroblasten aus gesunden Patienten erhöht sind, während diese Zellen aus Diabetespatienten gleichzeitig eine verringerte NO-Produktion zeigen. Die Stimulation dieser Hautfibroblasten mit NO-Donoren führt interessanterweise zu einer verstärkten Zellproliferation und zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der MMP-8- und MMP-9-Expression. Aufgrund dieser Beobachtungen wird vermutet, dass die Hemmung von MMP-8 und -9 durch die exogene NO-Gabe einen effektiven pharmakologischen Ansatz darstellt, um die Wundheilung in diabetischen Wunden nachhaltig verbessern zu können (Burrow et al., 2007).

Im Gegensatz dazu finden sich auch mehrere Studien, die über stimulierende Effekte des NOs auf verschiedene MMPs, u.a. auch MMP-9 berichten. Beispielsweise gibt es Befunde darüber, dass Peroxynitrit in Anwesenheit des Glutathion eine starke Aktivierung der humanen Pro-MMP-1, -8 und -9 verursacht (Okamoto et al., 2001). In einer Studie mit Leberkrebspatienten wurde Gewebe von Tumorpatienten und von Patienten ohne Lebertumor auf die Expression von iNOS und MMP-9 mit immunhistochemischen Analyseverfahren untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Höhe der MMP-9- und der iNOS-Expression, so dass die Autoren dieser Studien vermuten, dass durch iNOS generiertes NO mit der pathologisch erhöhten MMP-9-Produktion in diesen Tumorpatienten in einen funktionellen Zusammenhang gebracht werden kann (Sun et al., 2005).

Ferner wurden auch konzentrationsabhängige Wirkungen von exogen gegebenen NO auf die MMP-9-Spiegel beschrieben. So können hohe NO-Konzentrationen zu einer Hemmung der MMP-9-Aktivierung und Expression in Endothelzellen führen. Andererseits führen leicht erhöhte NO-Konzentrationen an der Grenzfläche zwischen Endothel- und Tumorzellen zu

einer Aktivierung der MMP-9 in den Endothelzellen (Phillips et al., 2004). Daneben konnte die Arbeitsgruppe um Ridnour et al. nachweisen, dass von Makrophagen produziertes NO einen konzentrationsabhängigen, biphasischen Effekt auf die Aktivitäten der MMP-1 und -9 auslöst. Dabei erhöhen niedrige NO-Spiegel die MMP-Aktivität über einen cGMP-abhängigen Weg, während die Gabe von höheren NO-Dosen zu einer cGMP-unabhängigen Inaktivierung der MMP-9 führt (Ridnour et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe verschiedener Analysemethoden gezeigt werden, dass NO in MCF-7-Zellen eine konzentrationsabhängige Reduktion der TPA-induzierten MMP-9-Aktivität im Zellkulturüberstand bewirkt. Diese Befunde stimmen somit mit den anfangs erwähnten Studien überein, welche NO eine eindeutig inhibitorische Wirkung auf die MMP-9-Expression bzw. Aktivität zuschreiben (Eberhardt et al., 2000b; Sinha et al., 2006; Burrow et al., 2007). Die zum Teil widersprüchlichen Befunde der erwähnten Studien spiegeln die komplexe Rolle des NOs in der MMP-9-Regulation wider. Die Diskrepanz zwischen den verschiedenen Studien kann dabei auf zelltyp-spezifische Unterschiede, möglicherweise aber auch auf Unterschiede in den jeweils angewandten NO-Konzentrationen zurückgeführt werden.

4.1. Regulation der TPA-induzierten MMP-9-Expression durch NO

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, molekulare Ursachen für die NO-bedingte Hemmung der MMP-9-Expression zu identifizieren. Dazu wurde systematisch nach potenziellen Einflüssen von exogenem NO auf die verschiedenen Regulationsebenen der MMP-9 gesucht. Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen standen sowohl Effekte auf das schon aktive Enzym, auf die Proteinstabilität und die Proteinneusynthese, als auch die Einflüsse auf die MMP-9-mRNA-Stabilität, die Transkription sowie die für die MMP-9-Induktion verantwortlichen Signaltransduktionskaskaden.

Die posttranslationale NO-vermittelte Modifikation von Proteinen durch Nitrosylierung gilt als ein wichtiger Mechanismus der NO-abhängigen Regulation von zellulären Signalwegen. NO ist in der Lage, direkt mit Thiol-Gruppen tragenden Proteinkomplexen u.a. auch mit Enzymen, welche redox-reaktive Metallionen besitzen, zu reagieren. Die Reaktion von NO mit Metalloproteinen wie Hämoglobin oder Cytochrom P450 kann dabei sowohl zur Aktivierung als auch zu einem Aktivitätsverlust der betreffenden Enzyme führen (Jia et al., 1996). Beispielsweise enthalten Cytochrom P450-Enzyme und auch die lösliche Guanylatzyklase ein redox-reaktives Eisenion innerhalb ihrer prosthetischen Häm-Gruppe (Lancaster und Hibbs, 1990). Die Nitrosylierung dieses Eisenions kann bei den Cytochrom-

P450-Enzymen zum Häm-Verlust und damit zur Inaktivierung der Enzyme führen (Stamler et al., 1992). Im Gegensatz dazu wird die lösliche Guanylatzyklase durch die Nitrosylierung des Eisenions in der Häm-Gruppe des Enzyms und der daraus resultierenden Konformationsänderung aktiviert (Ignarro, 1999). Während Stickstoffmonoxid direkt an Metallionen binden kann, wird die Reaktion mit Thiol-Gruppen nur indirekt über die Bildung von Distickstofftrioxid (N_2O_3) herbeigeführt. So wurde gezeigt, dass N_2O_3 *in vitro* mit Glutathion die Bildung des S-Nitrosoglutathion verursacht (Wink et al., 1994). G-Proteine, wie das zellzyklus-regulierende Zyklin p21, können durch S-Nitrosylierung von Cysteinresten aktiviert werden, während die Aktivität des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors im Gehirn durch S-Nitrosylierung gehemmt wird (Choi et al., 2000). Für MMP-9 wurden bereits stimulatorische Effekte von NO infolge einer Nitrosylierung einzelner Cysteinreste im katalytischen Zentrum des Enzyms beschrieben (Gu et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *In-vitro*-Zymographien durchgeführt, um potenzielle Änderungen des MMP-9-Aktivierungszustandes durch eine NO-abhängige Nitrosylierung zu identifizieren. Unsere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass im Gegensatz zu den oben genannten Befunden die MMP-9-Aktivität in MCF-7-Zellen durch endogenes NO nicht beeinträchtigt wird.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten auch Auswirkungen von exogen appliziertem NO auf die Proteinstabilität der MMP-9 näher untersucht werden. Effekte von NO auf die Stabilität verschiedener Proteine sind bereits mehrfach beschrieben. So wurde nachgewiesen, dass der Proteasominhibitor Lactacystin die NO-induzierte Degradation des Ceramidase-Proteins und die Aktivität der neutralen Ceramidase in Ratten-Mesangiumzellen vollständig revertiert (Franzen et al., 2002). Des Weiteren konnten Kim et al. zeigen, dass die Stimulation von RAW-264.7-Makrophagen mit dem NO-Donor Nitroprussid einen verstärkten Abbau des „iron-regulatory protein 2“ (IRP2) zur Folge hat, welcher durch nachträgliche Behandlung der Zellen mit Inhibitoren des intrazellulären Proteasomkomplexes (MG-132 und Lactacystin) wieder rückgängig gemacht werden kann (Kim et al., 1999). Weiterführende Studien belegen, dass NO *in vitro* und *in vivo* die Nitrosylierung von IRP2 verursacht und diese Modifikation zur Ubiquitinierung und dem nachfolgenden Abbau des Proteins im Proteasom führt. Die Mutation eines Cysteins (C178S) im IRP2-Protein verhindert wiederum dessen NO-vermittelten Abbau (Kim et al., 2004). Im Gegensatz dazu wird der proteasomale Abbau von „B-cell Lymphoma 2“ (Bcl-2) durch eine NO-vermittelte Nitrosylierung dieses Proteins in humanen Lungenepithelzellen unterbunden. Auch hier wurden Cysteinreste identifiziert (Cys158 und Cys229), deren Veränderung durch Punktmutation die Nitrosylierung verhindert

und folglich die Ubiquitinierung und Degradation des mutierten Bcl-2-Proteins verursacht (Azad et al., 2006).

Wie Versuche mit Lactacystin gezeigt haben, ist der inhibitorische Effekt von NO auf die MMP-9-Proteinspiegel jedoch nicht von der Aktivierung des Ubiquitin/Proteasom-Komplexes abhängig. Lactacystin konnte in unseren Studien den hemmenden Effekt von DETA-NO auf den MMP-9-Proteingehalt weder verhindern noch abschwächen. Der Befund, dass die Proteinstabilität von MMP-9 nicht durch DETA-NO beeinflusst wird, wird auch durch die Versuchsergebnisse mit dem Translationshemmer Cycloheximid gestützt. In den mit Cycloheximid behandelten Zellen ist eine Verringerung der Proteinmenge von MMP-9 zu erkennen. Die Degradation der MMP-9 war jedoch durch eine zusätzliche Stimulation mit DETA-NO nicht beeinflusst.

In der Literatur gibt es auch Belege dafür, dass die MMP-9-Expression durch Veränderungen der translationellen Effizienz reguliert werden kann. So wurde in der Arbeit von Jiang und Muschel gezeigt, dass zwei verschiedene Prostatakrebszelllinien, welche aus derselben Maus generiert wurden, eine unterschiedlich starke MMP-9-Sezernierung aufweisen. In der Zelllinie, die mehr MMP-9 sezerniert, konnte ein deutlich höherer MMP-9-Gehalt an den Polysomen und eine wesentlich höhere Neusynthese von MMP-9-Protein festgestellt werden als in der Zelllinie, die nur geringfügig MMP-9 sezerniert. Die MMP-9-mRNA-Spiegel waren dagegen in beiden Zelllinien gleich hoch. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die MMP-9-Regulation in den Zellen hauptsächlich auf der Ebene der translationellen Effizienz der MMP-9-Synthese stattfindet (Jiang und Muschel, 2002). Ein ähnlicher Befund wurde von Fähling et al. beschrieben. Die Behandlung der humanen Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 mit dem Eisenchelator 2,2-Dipyridyl, einer Substanz, die bestimmte Aspekte der Hypoxie imitieren kann, verursacht eine gesteigerte translationelle Effizienz der MMP-9-Expression. Diese wird durch einen erhöhten Transport des translationell inaktiven MMP-9-mRNP-Komplexes zu dem rauen endoplasmatischen Retikulum begleitet. Des Weiteren zeigen Reporterstudien mit der MMP-9-3'UTR, dass die Regulation durch 2,2-Dipyridyl hauptsächlich auf die 3'untranslatierte Region (3'UTR) zurückzuführen ist. Die durch RNA-Protein-Bindungsstudien festgestellte, erhöhte Bindung von Nucleolin an die MMP-9-3'UTR scheint hierbei von funktioneller Bedeutung für die gesteigerte Translationseffizienz zu sein. Die MMP-9-Expression kann somit ebenfalls posttranskriptionell über die Veränderung der Translationseffizienz und die Lokalisation der MMP-9-Transkripte reguliert werden (Fähling et al., 2005). In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass exogenes NO die Bindung des Mikrotubulus-assoziierten Proteins LC-3 an AU-reiche Elemente in der 3'UTR der Fibronectin-mRNA in glatten Muskelzellen erhöht. Dadurch wird die Rekrutierung von

Fibronektin zu den Polysomen erleichtert, was letztlich zu einer Translationserhöhung führt (Mason et al., 1999).

In den hier gezeigten Untersuchungen konnte nach TPA-Stimulation der MCF-7-Zellen ein verstärkter MMP-9-Gehalt an den Polysomen nachgewiesen werden, welcher nach gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit DETA-NO verringert war. Dieser Befund stimmt mit den bereits veröffentlichten Studien überein. Um den gezeigten NO-Effekt auf die MMP-9 auf eine veränderte Translationseffizienz oder einen veränderten Transport zurückführen zu können, müssten die Gesamt-MMP-9-mRNA-Spiegel von DETA-NO unbeeinflusst bleiben. Es stellte sich jedoch heraus, dass DETA-NO nicht nur den MMP-9-mRNA-Gehalt an Polysomen, sondern auch den Gesamt-Gehalt der MMP-9-mRNA reduziert. Der verringerte MMP-9-mRNA-Gehalt in der polysomalen Fraktion nach DETA-NO-Stimulation ist somit sehr wahrscheinlich eine direkte Folge einer verringerten MMP-9-mRNA-Synthese und/oder einer NO-bedingten veränderten Halbwertszeit der MMP-9-mRNA.

In vorangegangenen Studien aus unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die NO-abhängige Destabilisierung der MMP-9-mRNA in Ratten-Mesangiumzellen durch die Hemmung des mRNA-stabilisierenden Faktors HuR und dessen herabgesetzte Bindung an AU-reiche Elemente in der 3'UTR der MMP-9-mRNA zurückgeführt werden kann. Dies hat eine verringerte Expression von MMP-9 zur Folge (Akool et al., 2003). Ein weiterer posttranskriptioneller Mechanismus wurde von Liu et al. beschrieben. Die Reduktion der LPS-induzierten MMP-9-Expression durch NO wird in kultivierten Astrozyten aus Ratten teilweise durch AUF-1 vermittelt, während HuR bei diesem Effekt keine Rolle spielt. Dies beruht auf einer erhöhten Expression des AUF-1 und dessen verstärkte Bindung an die 3'UTR der MMP-9-mRNA (Liu et al., 2006).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Reporterstudien in MCF-7-Zellen geben jedoch keinen Hinweis auf eine Beteiligung der 3'UTR bei der NO-vermittelten Regulation von MMP-9. Dementsprechend finden sich in der 3'UTR der humanen MMP-9-mRNA keine AU-reichen Elemente, so dass zumindest die Beteiligung von AU-bindenden, mRNA-stabilisierenden bzw. destabilisierenden Faktoren bei der Regulation der mRNA-Stabilität von MMP-9 eher unwahrscheinlich ist. Studien mit Actinomycin D konnten darüber hinaus belegen, dass die MMP-9-mRNA-Stabilität in MCF-7-Zellen grundsätzlich nicht durch NO beeinflusst wird. Aufgrund der Befunde können posttranskriptionelle Mechanismen zur Erklärung der verringerten MMP-9-Expression durch NO in MCF-7-Zellen ausgeschlossen werden.

Um den Einfluss von NO auf MMP-9 auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Reporterstudien mit einem 670bp langen MMP-9-

Promotorfragment (Abb. 1.3) durchgeführt. Die Ergebnisse aus den Reporterstudien zeigen eine signifikante Reduktion der TPA-induzierten MMP-9-Promotoraktivität durch DETA-NO. Die reduzierte MMP-9-Aktivität im Zellkulturüberstand nach Stimulation der Zellen mit DETA-NO lässt sich somit auf eine NO-abhängige Hemmung der MMP-9-Promotoraktivität zurückführen. Die im Vergleich zur stark gehemmten MMP-9-Expression aufgezeigte Verminderung der MMP-9-Promotoraktivität durch DETA-NO weist allerdings darauf hin, dass das in dieser Arbeit verwendete 670bp-Promotorfragment nicht vollständig den NO-vermittelten Effekt auf die endogene MMP-9-Transkription widerspiegelt. Obwohl gezeigt werden konnte, dass dieses kurze Promotorfragment für eine Induktion des Promotors durch TPA ausreichend ist, lässt die vergleichsweise geringe Reduktion der Promotoraktivität vermuten, dass außerhalb dieses kurzen Promotorfragmentes zusätzliche NO-responsive Elemente vorhanden sind. Darüber hinaus haben verschiedene Arbeiten gezeigt, dass die in Reporterstudien gemessenen Effekte auf die Promotoraktivität von transient transfizierten Reporterkonstrukten nicht vollständig die Wirkung auf die endogene Expression eines Gens widerspiegeln (Genersch et al., 2000).

Da die NO-vermittelte Reduktion der MMP-9-Expression und Aktivität zum größten Teil auf eine reduzierte Promotoraktivität zurückzuführen ist, war die Identifizierung von NO-regulierten Transkriptionsfaktoren ein weiteres Projektziel der Arbeit. Einige Transkriptionsfaktoren, darunter AP-1 und NF κ B, besitzen reaktive Thiolgruppen in ihrer jeweiligen DNA-bindenden Region. Die Nitrosylierung dieser Thiole kann zu einer Veränderung der DNA-Bindungseigenschaften dieser Transkriptionsfaktoren und damit zur Veränderung der transaktivierenden Aktivität führen (Marshall et al., 2000; Stamler, 1994; Melino et al., 2000).

In der Literatur finden sich zahlreiche Belege über die Wirkung von NO auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B. Dabei unterliegt der Einfluss des NOs auf die NF κ B-Aktivität einer strengen Konzentrationsabhängigkeit. So konnte gezeigt werden, dass niedrige NO-Konzentrationen im nanomolaren Bereich die DNA-Bindung von NF κ B erhöhen können, wohingegen hohe mikromolare Konzentrationen von NO die DNA-Bindung von NF κ B hemmen (Umansky et al., 1998; Xuan et al., 1999; Connelly et al., 2001; Kröncke, 2003). Direkte Effekte des NOs auf NF κ B, wie Nitrosylierungen, können dabei die DNA-Bindung der p50/p65-Heterodimere stark beeinträchtigen (Matthews et al., 1996). Verschiedene Publikationen haben zudem gezeigt, dass zusätzlich auch zelltypabhängige Mechanismen eine entscheidende Rolle in der NO-vermittelten Regulation des NF κ Bs spielen. So führt die Stimulation mit NO in humanen mononuklearen Blutzellen, in Makrophagen, in

Mesangiumzellen und in humanen endothelialen Zellen zu einer Aktivierung einzelner NFκB-Untereinheiten, während in einigen anderen Zelltypen die NFκB-Aktivierung durch NO gehemmt wird (für eine Übersicht s.: Pfeilschifter et al., 2001).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit MCF-7-Zellen ließen keine Beeinflussung der TPA-induzierten Aktivierung von NFκB nach NO-Behandlung erkennen. Transkriptionsfaktor-ELISAs zeigten keine signifikante NO-bedingte Veränderung der Bindungsaktivität von p65, woraus gefolgert werden kann, dass NFκB für die NO-vermittelte Reduktion der MMP-9-Expression in MCF-7-Zellen keine Rolle spielt.

Es ist durch viele Studien belegt, dass NO vorwiegend eine hemmende Wirkung auf den Transkriptionsfaktor AP-1 ausübt (Melino et al., 2000; Park et al., 2006; Rossi et al., 2000). Eine AP-1-Hemmung durch NO kann zum einen auf die Modulation der AP-1-regulierten Signalwege und zum anderen auch auf eine direkte Hemmung der DNA-Bindungsaffinität zurückgeführt werden (Kröncke, 2003; Tabuchi et al., 1994). So konnten Nikitovic et al. durch Mutationsstudien und EMSAs zeigen, dass NO spezifisch über die Bindung an die Cysteinreste Cys272 und Cys154 in der DNA-Bindungsregion von c-Jun und c-Fos die Hemmung von AP-1 verursacht (Nikitovic et al., 1998). Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Stimulation von Mikrogliazellen mit IFN-γ endogen gebildetem NO eine Spaltung der Interaktion zwischen JNK und AP-1 hervorruft und hierdurch die JNK-abhängige Aktivierung von AP-1 gehemmt wird (Park et al., 2006). Eine konzentrationsabhängige Modulation der AP-1-Bindungsaktivität durch NO wurde von Jones et al. berichtet. Die Stimulation von mikrovaskulären Epithelzellen mit dem NO-Donor SNAP (0,5-4 mM) hemmt die PKC-Aktivität und c-Jun-Phosphorylierung und damit die DNA-Bindungsaktivität von AP-1. Geringere Konzentrationen von SNAP (0,1-0,3 mM) konnten hingegen in demselben Zellmodell eine Steigerung der PKC-abhängigen AP-1-Aktivität bewirken. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass NO in konzentrationsabhängiger Weise die PKC-vermittelte Aktivität von AP-1 beeinflussen kann (Jones et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von Western-Blot-Analysen gezeigt werden, dass sich der Gesamtgehalt von c-Jun und c-Fos durch die Stimulation mit DETA-NO nicht verändert. Bindungsstudien mit Hilfe eines p-c-Jun- und c-Fos-Transkriptionsfaktor-ELISAs zeigten eine signifikante Erhöhung der DNA-Bindungsaktivität beider AP-1-Komponenten nach TPA-Behandlung der Zellen. Die zusätzliche Stimulation mit DETA-NO führte bei beiden AP-1-Untereinheiten zu einer Reduktion der Bindungsaktivität. Eine ähnliche NO-bedingte Modulation der AP-1-DNA-Bindung konnte auch im radioaktiven EMSA bestätigt werden. Die NO-vermittelte Reduktion der TPA-induzierten MMP-9-Expression und

Aktivität kann daher u.a. auf eine Hemmung der AP-1-Bindungsaffinität an die MMP-9-spezifische Promotorbindungsstelle zurückgeführt werden (Abb. 4.2). Diese Ergebnisse stimmen mit den meisten bislang bekannten Effekten des NOs auf die AP-1-Aktivität überein. Sämtliche dieser Studien beschreiben ebenfalls einen hemmenden Einfluss von NO auf den Transkriptionsfaktor AP-1 (Melino et al., 2000; Park et al., 2006; Rossi et al., 2000; Kröncke, 2003; Tabuchi et al., 1994; Nikitovic et al., 1998).

Auch für den Transkriptionsfaktor Sp1 wurden bereits Wechselwirkungen mit NO beschrieben. So wurde in der Arbeit von Wang et al. gezeigt, dass eine Sp1-Bindungsstelle innerhalb des TNF- α -Promotors in humanen Leukozyten als ein funktionelles NO-responsives Element wirken kann (Wang et al., 1999). Entsprechend konnte gezeigt werden, dass NO die DNA-Bindungsaktivitäten der beiden Transkriptionsfaktoren Sp1 und „Early growth response-1“ (EGR-1) aufheben kann (Berendji et al., 1999). Die Tatsache, dass der hemmende Effekt des Sp1-Inhibitors Mithramycin auf die MMP-9-Expression in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zusätzlich durch DETA-NO gehemmt werden kann, deutet darauf hin, dass Sp1 in MCF-7-Zellen unter den verwendeten Versuchsbedingungen nicht an der NO-abhängigen Regulation der MMP-9-Expression beteiligt ist. Des Weiteren bestätigen EMSAs, dass Sp1 zwar durch TPA geringfügig induziert wird, aber keine Abschwächung dieser DNA-Bindungsaffinität durch NO zu beobachten war.

Die aufgezeigte Differenz im Ausmaß der beobachteten NO-Effekte zwischen den zellulären MMP-9-mRNA-Spiegel und der ektopischen MMP-9-Promotoraktivität im Luziferase-Assay könnten weiterhin durch epigenetische Effekte erklärt werden. So simulieren Methoden wie EMSA/Transkriptionsfaktor-ELISA und Reporterstudien nicht oder nur begrenzt die tatsächliche „*In-vivo*“-Situation in der Zelle, da bei keiner dieser Methoden chromatinverpackte DNA verwendet wird. Diese experimentellen Ansätze können daher lediglich einen Beitrag zur Aufklärung von transkriptionellen Regulationsmechanismen leisten. Sie repräsentieren allerdings nicht die natürliche Chromatinstruktur, so dass potenzielle epigenetische Effekte bei den oben genannten Techniken nicht berücksichtigt werden.

Befunde zu NO-vermittelten Veränderungen in der Chromatinstruktur finden sich bereits in der Literatur. Beispielsweise ist bekannt, dass die Peroxynitrit-produzierende Substanz 3-Morpholinosydnominine *in vitro* zu einer deutlichen Reduktion der Histondeacetylase (HDAC)-Aktivität in Epithelzellen führt (Ito et al., 2004). Daneben wird vermutet, dass eine Erhöhung von oxidativem Stress über die vermehrte Bildung von Peroxynitrit die Aktivität von HDAC-2 durch eine Nitrierung spezifischer Tyrosinreste dieses Enzyms beeinflussen kann (Barnes et al., 2004). HDAC-Inhibitoren gelten als viel versprechende Medikamente der

modernen Krebstherapie, da sie die Proliferation von Tumorzellen insbesondere durch Induktion eines Zellzyklus-Stillstands, sowie durch terminale Differenzierung und Induktion von Apoptose hemmen können (Mai et al., 2005). Trichostatin A (TSA) und M344 sind Substanzen, welche spezifisch Klasse-I- und -II-HDACs blockieren können. Allerdings können diese Art Agenzien die Transkription nur von weniger als 2% der gesamten Gene verändern. Zu diesen gehören Gene des Zellzyklus, der Apoptoseregulation oder der DNA-Synthese (Di Gennaro et al., 2004). Den ersten Bericht über Veränderungen im Acetylierungsmuster von Histonen bei der induzierten Genexpression von MMPs lieferten Pender et al. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Natriumbutyrat und TSA die IL-1 β - oder TNF- α -vermittelte Induktion der MMP-3-Expression zusätzlich verstärken können. Die IL-1 β - oder TNF- α -induzierte Expression von MMP-1 und MMP-9 wurde hingegen durch beide Substanzen auf mRNA- und Proteinebene gehemmt (Pender et al., 2000; Clark et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die TPA-induzierte MMP-9-Aktivität ebenfalls geringfügig durch Behandlung mit TSA reduziert wird. Die Stimulation der Zellen mit der Substanz M344 führt hingegen zu keinem Effekt auf die TPA-induzierten extrazellulären MMP-9-Spiegel. Diese Befunde stehen in einem gewissen Widerspruch zu bisher veröffentlichten Daten über epigenetische Effekte auf die TPA-induzierte MMP-9-Expression (Ma et al., 2004). In der genannten Arbeit führt die Behandlung von HeLa Zellen mit TSA zu einer Verstärkung der PMA-vermittelten MMP-9-Expression (Ma et al., 2004). Obwohl unsere Untersuchungen lediglich auf Ebene der extrazellulären Aktivitätsmessung durch Zymogramme durchgeführt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass sich diese gegensätzlichen Wirkungen von TSA auf die MMP-9-Expression auf zellspezifische Unterschiede zurückführen lassen.

Da eine verstärkte Acetylierung von Histonen mit einer Öffnung der Chromatinstruktur einhergeht und daher ein Kennzeichen für eine erhöhte transkriptionelle Aktivität eines Gens ist, wäre bei einer Behandlung der Zellen mit einem HDAC-Inhibitor prinzipiell eine Steigerung der transkriptionellen Aktivität zu erwarten. Dass aber in unserem Fall die TPA-induzierte MMP-9-Aktivität durch die Behandlung mit TSA verringert wird, ist möglicherweise damit zu erklären, dass die Expression von MMP-9-reprimierenden Genen durch die TSA-Behandlung verstärkt wird. Die Unterschiede in der Wirkung von TSA und M344 lassen sich durch ihre verschiedenen Substratspezifitäten erklären. Die verschiedenen HDAC-Inhibitoren unterscheiden sich unter anderem durch ihre Selektivität gegenüber einzelnen HDAC-Subtypen (Heltweg et al., 2004). So besitzt M344 z.B. eine höhere

Selektivität gegenüber HDAC6 als gegenüber HDAC1 (Jung et al., 1999). Da HDAC-Subtypen ihrerseits verschiedenartige Substratspezifitäten besitzen (Riester et al., 2004), lässt sich der unterschiedliche Einfluss der beiden Inhibitoren auf die extrazellulären MMP-9-Spiegel möglicherweise durch die Unterschiede in den Substratspezifitäten erklären. Des Weiteren ist anzumerken, dass für Histonacetyltransferasen über 80 Nicht-Histon-Substrate beschrieben sind, die möglicherweise ebenfalls in die Regulation der MMP-9-Expression eingreifen können. Beispiele hierfür sind die Transkriptionsfaktoren NF κ B (Quivy et al., 2004), STAT-3 (Yuan et al., 2005) und c-Jun (Vries et al., 2001).

Erstaunlicherweise kann in MCF-7-Zellen die NO-bedingte Repression der MMP-9-Aktivität durch die Behandlung sowohl mit TSA als auch mit M344 zum Teil wieder aufgehoben werden. Daher ist davon auszugehen, dass in der NO-abhängigen Repression der MMP-9-Expression zusätzlich epigenetische Effekte eine funktionelle Rolle spielen. Da derzeit allerdings weder über die Substratspezifität der verschiedenen HDACs noch über die detaillierte Wirkungsweise der verschiedenen HDAC-Inhibitoren wenig bekannt ist (Riester et al., 2007), bedarf es in Zukunft weiterer Untersuchungen zur Aufklärung der Wirkweise von NO auf HDAC-abhängige Umbauprozesse des Chromatins.

Ein weiterer zentraler Aspekt dieser Arbeit war die Identifizierung solcher Signaltransduktionskaskaden, welche für die TPA-induzierte MMP-9-Expression verantwortlich sind und gleichzeitig durch NO beeinflusst werden. In den in dieser Arbeit durchgeführten Studien mit verschiedenen pharmakologischen MAPK-Inhibitoren (PD98059, SB203580 und SP600125) konnte gezeigt werden, dass die drei MAP-Kinasen p44/42, p38 und JNK an der TPA-vermittelten MMP-9-Induktion essenziell beteiligt sind. Zudem hat die Western-Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern gezeigt, dass die Stimulation der Zellen mit TPA zu einer Aktivierung dieser MAPK führt. Diese Daten stimmen mit zahlreichen Veröffentlichungen überein. So wurde in MCF-7-Zellen bereits gezeigt, dass die MMP-9-Sezernierung nach TPA-Stimulation zum Teil durch den MEK1/2/Erk1/2-Weg vermittelt wird, dabei aber zusätzlich, Ras-abhängige Signalwege eine Rolle spielen (Liu et al., 2002). Daneben kann die TPA-bedingte MMP-9-Sezernierung in der humanen Plattenepithelkrebszelllinie UM-SCC-1 durch die Behandlung mit dem spezifischen p38-Inhibitor SB203580 fast vollständig gehemmt werden (Simon et al., 1998). In humanen Gebärmutterhalskrebszellen hingegen ist der JNK-Signalweg für die MMP-9-Expression durch TPA von essenzieller Bedeutung. In der Literatur finden sich überdies verschiedene Beispiele dafür, dass die MAP-Kinase JNK von NO über eine direkte Nitrosylierung beeinflusst werden kann (Park et al., 2000, 2006). So hemmt durch IFN- γ -Stimulation

gebildetes endogenes NO die Aktivierung von JNK1 in murinen Mikrogliazellen, RAW-264.7-Makrophagen und alveolären Makrophagen der Ratte (Park et al., 2000, 2006). Des Weiteren führt die Behandlung vaskulärer glatter Muskelzellen mit DETA-NO zu einer reduzierten IL-1 β -induzierten MMP-9-Expression (Gurjar et al., 2001a,b). Die durch IL-1 β -verursachte Induktion der MMP-9-Expression wird dabei durch die Bildung von Superoxid und der daraus resultierenden Erhöhung der ERK-Aktivierung vermittelt. NO hemmt die Produktion von Superoxid, wodurch die Aktivierung von ERK und damit die Expression von MMP-9 verhindert werden. Wie wir anhand von Western-Blot-Analysen zeigen konnten, bleibt der TPA-induzierte Phosphorylierungsstatus sämtlicher untersuchter MAPK in MCF-7-Zellen durch eine Stimulation mit DETA-NO unbeeinflusst. Daher kann vermutet werden, dass NO in MCF-7-Zellen keine modulierende Wirkung auf die MAP-Kinasen besitzt.

Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit eine deutliche Reduktion der TPA-induzierten PKC-Aktivität nach DETA-NO-Behandlung der Zellen festgestellt werden. Dieser Befund entspricht den bereits 1993 veröffentlichten Daten von Gopalakrishna et al. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass NO und NO-generierende Verbindungen eine reversible Inaktivierung der PKC hervorrufen können. Die kurzfristige Behandlung mit NO induziert dabei über die Bildung von Disulfidbrücken eine reversible Inaktivierung der PKC. Die chronische Gabe von NO bewirkt dagegen eine irreversible Inaktivierung von PKC (Gopalakrishna et al., 1993). Darüber hinaus führt die Stimulation von MCF-7-Zellen mit TPA zu einer deutlichen Induktion der Invasion der Zellen, welche durch den pharmakologischen PKC-Inhibitor Bryostatin gehemmt werden kann (Johnson et al., 1999).

Da verschiedene PKC-Isoformen in Abhängigkeit des Zelltyps und des verwendeten Stimulus unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen können (Griner und Kazanietz, 2007; Mackay und Twelves, 2007), bleibt die Frage offen, welche der bislang identifizierten PKC-Isoformen in MCF-7-Zellen von NO beeinträchtigt werden. Die dazu durchgeführten Experimente mit verschiedenen PKC-Inhibitoren legen die Vermutung nahe, dass die Ca²⁺-unabhängigen PKC-Isoformen PKC- δ - und/oder - θ beteiligt sind. Diese Vermutung beruht auf der Beobachtung, dass allein der PKC- δ - und θ -Inhibitor Rottlerin in der Lage war, die TPA-induzierte MMP-9-Sekretion fast vollständig zu hemmen. Dieser Befund stimmt mit anderen Arbeiten überein. So wurde bereits berichtet, dass PKC- δ für die MMP-9-Expression in MCF-7-Zellen essenziell ist (Liu et al., 2002). Außerdem wurde nachgewiesen, dass in humanen Endothelzellen die Aktivität von PKC- δ durch Gabe eines exogenen NO-Donors verringert werden kann. Zusätzlich kann eine durch den „Vascular endothelial growth factor“ verursachte Reduktion der PKC- δ -Aktivität durch die gleichzeitige Behandlung der Zellen

mit NOS-Inhibitor L-NMMA verhindert werden. Daher wird von den Autoren vermutet, dass die Regulation der PKC- δ -Aktivität in Endothelzellen über einen NO-Synthase-abhängigen Mechanismus erfolgt (Shizukuda et al., 1999).

Aufgrund dieser übereinstimmenden Beobachtungen zwischen MCF-7-Zellen und Endothelzellen ist wahrscheinlich, dass eine NO-vermittelte Hemmung der PKC-Aktivität, möglicherweise der PKC- δ -Aktivität, Ursache für die NO-abhängige Hemmung der MMP-9-Expression nach NO-Behandlung istm (Abb. 4.2). Um eindeutige Aussagen über die Rolle einzelner PKC-Isoformen bei der TPA-induzierten MMP-9-Expression machen zu können, bedarf es in Zukunft weiterer Untersuchungen, insbesondere Experimente mit spezifischen si-RNAs oder eine ektopische Überexpression einzelner PKC-Isoformen.

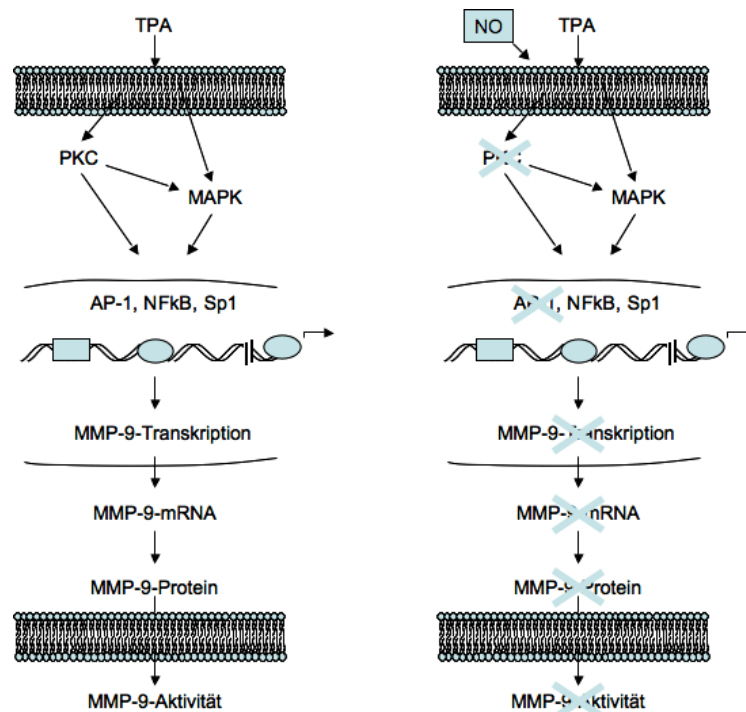


Abb. 4.2 Zusammenfassendes Schema der postulierten Mechanismen, die der NO-bedingten Hemmung der MMP-9-Expression zugrunde liegen.

4.2. Rolle des cGMP und der Radikalbildung für die MMP-9-Expression

Niedrige physiologische NO-Konzentrationen (im nanomolaren Konzentrationsbereich) wie sie durch die eNOS gebildet werden, stimulieren die Aktivität der löslichen Guanylatzyklase, welche zur Bildung des zyklischen GMPs (cGMP) führt. cGMP ist ein wichtiges intrazelluläres Botenmolekül, das in der Zelle viele der bekannten physiologischen Funktionen des NOs vermittelt. Hohe durch die iNOS gebildete NO-Mengen (im

mikromolaren Konzentrationsbereich) sowie große Mengen an reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) werden dagegen bei entzündlichen Prozessen freigesetzt. Die direkte Interaktion des gebildeten NOs mit dem Sauerstoffradikal Superoxid (O_2^-) hat die Bildung von N_2O_3 und Peroxynitrit ($ONOO^-$) zur Folge. Die Interaktion von N_2O_3 mit Thiolgruppen von Proteinen kann zu einer Bildung von S-Nitrosothiolen führen, welche ihrerseits eine Reihe von Proteinkinasen, Phosphatasen, G-Proteinen, redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren und damit zahlreiche intrazelluläre Prozesse modifizieren können (für eine Übersicht s.: Beck et al., 1999).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien mit Dibuturyl-cGMP und dem Guanylatzyklase-Inhibitor ODQ zur Regulation von MMP-9 durch NO schließen einen cGMP-abhängigen Mechanismus aus. Dagegen kann die TPA-induzierte MMP-9-Aktivität durch die gleichzeitige Gabe des Antioxidanz N-Acetylcystein sowie des Flavoprotein/NADPH-Oxidase-Inhibitors Diphenyleneiodonium vollständig gehemmt werden, was eindeutig auf die Beteiligung redox-vermittelter Mechanismen bei der TPA-induzierten MMP-9-Expression hinweist.

In vergangenen Arbeiten aus unserer Gruppe wurde bereits gezeigt, dass in Ratten-Mesangiumzellen durch Superoxid eine Verstärkung der IL-1 β -induzierten MMP-9-Expression hervorgerufen wird (Eberhardt et al., 2000a). In der hier vorliegenden Arbeit konnten weiterführende Studien jedoch nicht eindeutig klären, welche Sauerstoffradikale oder Enzyme im Einzelnen für die Aktivierung der MMP-9-Expression nach TPA-Stimulation verantwortlich sind. In einer weiteren Arbeit mit humanen Keratinozyten wurde nachgewiesen, dass TPA die MMP-9-Sekretion über einen NADPH-Oxidase-abhängigen Mechanismus induziert (Steinbrenner et al., 2005). Damit übereinstimmend konnte von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass TPA über eine Aktivierung von PKC eine NADPH-Oxidase-abhängige Bildung von ROS vermittelt (Wu, 2006). Wie zuvor beschrieben, kann NO die Bildung von Superoxid in glatten Muskelzellen hemmen. Die daraus resultierende, verringerte ERK-Aktivierung führt nachfolgend zu einer reduzierten MMP-9-Expression (Gurjar et al., 2001a,b). Der hemmende Effekt des NOs auf die TPA-induzierte MMP-9-Expression könnte daher möglicherweise auch in MCF-7-Zellen, über eine Hemmung des nach TPA-Stimulation gebildeten Superoxids, erklärt werden.

4.3. Einfluss von NO auf MMP-9-vermittelte Funktionen

Um zu überprüfen, ob eine Reduktion der MMP-9-Expression gleichermaßen auch durch endogen gebildetes NO hervorgerufen werden kann, wurden Kokultur-Versuche durchgeführt. Um die Wirkung von NO auf MCF-7-Zellen zu testen, wurden hierfür RAW-264.7-Makrophagen, verwendet, da diese zu den wenigen Zellen zählen, die unter Zellkulturbedingungen hohe NO-Mengen produzieren können. Unter Verwendung des Kokultur-Systems mit aktivierten Makrophagen konnte bereits gezeigt werden, dass NO an der Stabilisierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1α (HIF- 1α) in LLC-PK(1)-Zellen, porcinen tubulären Nierenepithelzellen, beteiligt ist (Zhou et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit gelang es jedoch nicht, die durch TPA induzierte MMP-9-Expression und Aktivierung durch endogen von RAW-264.7-Makrophagen gebildetes NO zu beeinflussen. Die fehlende Hemmung der MMP-9-Expression durch NO aus Donorzellen ist möglicherweise durch die hohe stimulierende Potenz des TPAs auf die MMP-9-Expression zu erklären.

Als weiterer Aspekt der Arbeit sollte untersucht werden, ob die Stimulation mit DETA-NO MMP-9-abhängige Effekte auf die Migration von MCF-7-Zellen vermittelt. So finden sich in der Literatur Beispiele dafür, dass MMP-9 bei der Migration von Tumorzellen eine wichtige funktionelle Rolle spielen kann (Legrand et al., 1999; Björklund et al., 2004). Zudem wurde bereits beschrieben, dass die Behandlung von MCF-7-Zellen mit TPA zu einer verstärkten Migration der Zellen führt (Ree et al., 1998). Dies konnte in unseren Versuchen bestätigt werden. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit DETA-NO führt jedoch zu keiner signifikanten Veränderung der Migration. Dies kann damit erklärt werden, dass in unseren Versuchen die von MCF-7-Zellen sezernierte MMP-9 nur im inaktiven Zustand vorliegt. Der TPA-bedingte Anstieg der Migration lässt darauf schließen, dass neben MMP-9 durch die TPA-Stimulation auch weitere Migrationsfaktoren gebildet werden.

4.4. Schlussfolgerung

Wie eingangs beschrieben, korrelieren erhöhte iNOS-Spiegel häufig mit einer gesteigerten Aggressivität des Tumors bei Brustkrebspatientinnen. Von MMPs, insbesondere von MMP-9, sind sowohl tumor-fördernde als auch tumor-inhibierende Eigenschaften bekannt (Martin et al., 2007). Diese gegensätzlichen Funktionen der MMPs auf die Tumorgenese bieten eine Erklärungsmöglichkeit, für das bisherige Scheitern von synthetischen MMP-Inhibitoren in klinischen Studien mit Tumorpatienten. Daher wäre denkbar, dass die NO-vermittelte Reduktion der MMP-9-Expression die Aggressivität eines Tumors zusätzlich noch steigert, indem NO die protektiven Eigenschaften der MMP-9, zu denen u.a. die Freisetzung

antiangiogener Faktoren wie z.B. Angiostatin gehört, verhindert. In ähnlicher Weise könnte auch die MMP-9-abhängige Freisetzung von proapoptotisch wirksamen Zelloberflächenmolekülen, wie z.B. des Fas-Liganden, durch NO beeinträchtigt werden. So wurde bereits in verschiedenen Tumormodellen gezeigt, dass die selektive Gabe von iNOS-Inhibitoren die Tumorentstehung in diesen Xenograft-Modellen verhindert (Ahn et al., 2001; Rao et al., 1999, 2002; Inano et al., 2005).

Unter diesem Aspekt wäre eine gezielte pharmakologische Intervention der iNOS bei bestimmten Tumorerkrankungen, oder noch wichtiger, in bestimmten Tumorstadien als eine adjuvante Therapieform der derzeitigen chemotherapeutischen Standardtherapie denkbar.

5. Zusammenfassung

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Identifizierung der Regulationsebenen auf denen die TPA-induzierte Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) durch das nitrose Gas Stickstoffmonoxid (NO) in MCF-7-Zellen verändert wird.

Dabei konnte sowohl mit Hilfe der Zymographie als auch mit einem MMP-9-Aktivitäts-ELISA gezeigt werden, dass die extrazellulären MMP-9-Spiegel durch die Behandlung der Zellen mit NO reduziert werden. Gleichzeitig zeigte sich auch eine durch NO bedingte Abnahme der intrazellulären MMP-9-Spiegel, wie mit Hilfe von Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden konnte. Experimente mit dem Proteasominhibitor Lactacystin und dem Proteinsynthesehemmstoff Cycloheximid ließen darüber hinaus eine NO-bedingte Veränderung der MMP-9-Proteinstabilität ausschließen. Im Gegensatz dazu konnte mittels der metabolischen Markierung mit radioaktiv markiertem Methionin und Cystein gezeigt werden, dass die Proteinneusynthese der MMP-9 durch eine Behandlung der Zellen mit NO stark beeinträchtigt wird. In Übereinstimmung mit diesen Daten finden sich reduzierte MMP-9-mRNA-Spiegel auch in der polysomalen Zellfraktion von MCF-7-Zellen.

Wie mit Hilfe des Transkriptionshemmstoffes Actinomycin D und durch Reporterstudien mit hybriden MMP-9-Promotorkonstrukten gezeigt werden konnte, ist die NO-induzierte Reduktion der MMP-9-mRNA-Spiegel nicht auf eine Verringerung der MMP-9-mRNA-Stabilität zurückzuführen. Reporterstudien mit einem 670bp langen Promotorfragment des 5'flankierenden Bereichs des humanen MMP-9-Gens zeigten jedoch auf, dass der hemmende Effekt des NOs zum Teil auf eine NO-vermittelte Abnahme der TPA-induzierten MMP-9-Promotoraktivität zurückgeführt werden kann.

Demzufolge wurde in den nachfolgenden Experimenten nach den für die MMP-9-Expression notwendigen und von NO modulierten Transkriptionsfaktoren in MCF-7-Zellen gesucht. Anhand von Western-Blot-Analysen und Gelshiftanalysen konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 in MCF-7-Zellen durch NO gehemmt wird, während weder die Expressionspiegel noch die Bindungsaffinität der Transkriptionsfaktoren NF κ B und Sp1 durch die NO-Behandlung verändert sind.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die NO-vermittelte Hemmung der MMP-9-Expression durch die zusätzliche Gabe der Histondeacetylase-Inhibitoren TSA und M344 abgeschwächt wird, was impliziert, dass zusätzlich auch epigenetische Mechanismen an der NO-vermittelten Hemmung der MMP-9-Expression beteiligt sind.

Weiterhin konnte unter Verwendung von pharmakologischen Inhibitoren der MAPK-Signalwege mit Hilfe der Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden, dass MAPK-

vermittelte Signalwege zwar für die Induktion der MMP-9-Expression essenziell sind, diese jedoch nicht von NO beeinflusst sind. Im Unterschied hierzu konnte mit Hilfe eines PKC-Aktivitätsassays gezeigt werden, dass die Gesamtaktivität von PKCs nach Behandlung von MCF-7-Zellen mit NO signifikant gehemmt ist.

In einem weiteren Schritt sollte dann aufgeklärt werden, ob cGMP- oder redoxvermittelte Signalwege bei der NO-abhängigen Hemmung der MMP-9-Expression eine funktionelle Rolle spielen. Unter Zuhilfenahme des zellpermeablen Dibutyryl-cGMP, dem Guanylatzyklase-Inhibitor ODQ und dem N-Acetylcystein sowie dem NADPH-Oxidase-Hemmstoff Diphenyleneiodonium konnte gezeigt werden, dass der beobachtete NO-Effekt auf die MMP-9-Expression unabhängig von cGMP ist, dass aber redoxvermittelte Mechanismen bei der MMP-9-Expression nach TPA-Stimulation eine wichtige Rolle spielen.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass die NO-vermittelte Hemmung der TPA-induzierten MMP-9-Expression in MCF-7-Zellen im Wesentlichen auf eine NO-abhängige Reduktion der Protein-Kinase-C-Aktivität und einer daraus resultierenden Aktivitätshemmung des Transkriptionsfaktors AP-1 zurückgeführt werden kann.

6. Literaturverzeichnis

Ahn B., Ohshima H. (2001). Suppression of intestinal polyposis in Apc(Min/+) mice by inhibiting nitric oxide production. *Cancer Res.* 61(23), 8357-8360.

Akool el-S., Kleinert H., Hamada FM., Abdelwahab MH., Förstermann U., Pfeilschifter J., Eberhardt W. (2003). Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell Biol.* 23(14), 4901-4916.

Albina JE., Cui S., Mateo RB., Reichner JS. (1993). Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol.* 150(11), 5080-5085.

Angel P., Imagawa M., Chiu R., Stein B., Imbra RJ., Rahmsdorf HJ., Jonat C., Herrlich P., Karin M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell.* 49(6), 729-739.

Arnold WP., Mittal CK., Katsuki S., Murad F. (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(8), 3203-3207.

Azad N., Vallyathan V., Wang L., Tantishaiyakul V., Stehlik C., Leonard SS., Rojanasakul Y. (2006). S-nitrosylation of Bcl-2 inhibits its ubiquitin-proteasomal degradation. A novel antiapoptotic mechanism that suppresses apoptosis. *J Biol Chem.* 281(45), 34124-34134.

Azuma H., Ishikawa M., Sekizaki S. (1986). Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol.* 88(2), 411-415.

Balduyck M., Zerimech F., Gouyer V., Lemaire R., Hemon B., Grard G., Thiebaut C., Lemaire V., Dacquembronne E., Duhem T., Lebrun A., Dejonghe MJ., Huet G. (2000). Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells in vitro. *Clin Exp Metastasis.* 18(2), 171-178.

Barnes PJ., Ito K., Adcock IM. (2004). Corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease: inactivation of histone deacetylase. *Lancet.* 363(9410), 731-733.

Beauvais F., Michel L., Dubertret L. (1995). The nitric oxide donors, azide and hydroxylamine, inhibit the programmed cell death of cytokine-deprived human eosinophils. *FEBS Lett.* 361(2-3), 229-232.

Beck KF., Eberhardt W., Frank S., Huwiler A., Messmer UK., Mühl H., Pfeilschifter J. (1999). Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J Exp Biol.* 202(Pt 6), 645-653.

Berendji D., Kolb-Bachofen V., Zipfel PF., Skerka C., Carlberg C., Kröncke KD. (1999). Zinc finger transcription factors as molecular targets for nitric oxide-mediated immunosuppression: inhibition of IL-2 gene expression in murine lymphocytes. *Mol Med.* 5(11), 721-730.

Bergers G., Brekken R., McMahon G., Vu TH., Itoh T., Tamaki K., Tanzawa K., Thorpe P., Itohara S., Werb Z., Hanahan D. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2(10), 737-744.

Binder C., Schulz M., Hiddemann W., Oellerich M. (1999). Induction of inducible nitric oxide synthase is an essential part of tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in MCF-7 and other epithelial tumor cells. *Lab Invest.* 79(12), 1703-1712.

Birnboim HC., und Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 (6), 1513-1523.

Björklund M., Heikkilä P., Koivunen E. (2004). Peptide inhibition of catalytic and noncatalytic activities of matrix metalloproteinase-9 blocks tumor cell migration and invasion. *J Biol Chem.* 279(28), 29589-29597.

Blander G., Guarente L. (2004). The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem.* 73, 417-435.

- Blobe GC.**, Obeid LM., Hannun YA. (1994). Regulation of protein kinase C and role in cancer biology. *Cancer Metastasis Rev.* 13(3-4), 411-431.
- Bond M.**, Baker AH., Newby AC. (1999). Nuclear factor kappaB activity is essential for matrix metalloproteinase-1 and -3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 264(2), 561-567.
- Boulay JL.**, Dennefeld C., Alberga A. (1987). The Drosophila developmental gene snail encodes a protein with nucleic acid binding fingers. *Nature.* 330(6146), 395-398.
- Bradford MM.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.
- Bramhall SR.**, Hallissey MT., Whiting J., Scholefield J., Tierney G., Stuart RC., Hawkins RE., McCulloch P., Maughan T., Brown PD., Baillet M., Fielding JW. (2002). Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial. *Br J Cancer.* 86(12), 1864-1870.
- Bredt DS.**, Hwang PM., Snyder SH. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 47(6295), 768-770.
- Brew K.**, Dinakarpanian D., Nagase H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 1477(1-2), 267-283.
- Bruns CJ.**, Shinohara H., Harbison MT., Davis DW., Nelkin G., Killion JJ., McConkey DJ., Dong Z., Fidler IJ. (2000). Therapy of human pancreatic carcinoma implants by irinotecan and the oral immunomodulator JBT 3002 is associated with enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in tumor-infiltrating macrophages. *Cancer Res.* 60(1), 2-7.
- Bulut AS.**, Erden E., Sak SD., Doruk H., Kursun N., Dincol D. (2005). Significance of inducible nitric oxide synthase expression in benign and malignant breast epithelium: an immunohistochemical study of 151 cases. *Virchows Arch.* 447, 24-30.
- Burdall SE.**, Hanby AM., Lansdown MR., Speirs V. (2003). Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Res.* 5(2), 89-95.
- Burgering BM.**, de Vries-Smits AM., Medema RH., van Weeren P.C, Tertoolen LG., Bos JL. (1993). Epidermal growth factor induces phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 via multiple pathways. *Mol Cell Biol.* 13(12), 7248-7256.
- Burrow JW.**, Koch JA., Chuang HH., Zhong W., Dean DD., Sylvia VL. (2007). Nitric oxide donors selectively reduce the expression of matrix metalloproteinases-8 and -9 by human diabetic skin fibroblasts. *J Surg Res.* 140(1), 90-98.
- Cai H.**, Smola U., Wixler V., Eisenmann-Tappe I., Diaz-Meco MT., Moscat J., Rapp U., Cooper GM. (1997). Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isoforms in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol Cell Biol.* 17(2), 732-741.
- Cailleau R.**, Olivé M., Cruciger QV. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro.* 14(11), 911-915.
- Cantuarria G.**, Magalhaes A., Angioli R., Mendez L., Mirhashemi R., Wang J., Wang P., Penalver M., Averette H., Braunschweiger P. (2000). Antitumor activity of a novel glyco-nitric oxide conjugate in ovarian carcinoma. *Cancer.* 88(2), 381-388.
- Carrère S.**, Verger A., Flourens A., Stehelin D., Duterque-Coquillaud M. (1998). Erg proteins, transcription factors of the Ets family, form homo, heterodimers and ternary complexes via two distinct domains. *Oncogene.* 16(25), 3261-3268.
- Cauwels A.** (2007). Nitric oxide in shock. *Kidney Int.* 72(5), 557-565.

- Cawley S.**, Bekiranov S., Ng HH., Kapranov P., Sekinger EA., Kampa D., Piccolboni A., Sementchenko V., Cheng J., Williams AJ., Wheeler R., Wong B., Drenkow J., Yamanaka M., Patel S., Brubaker S., Tamma H., Helt G., Struhl K., Gingeras TR. (2004). Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell*. 116(4), 499-509.
- Chakraborti S.**, Mandal M., Das S., Mandal A., Chakraborti T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Mol Cell Biol*. 23, 269-285.
- Chen LF.**, Greene WC. (2004). Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5(5), 392-401.
- Choi YB.**, Tenneti L., Le DA., Ortiz J., Bai G., Chen HS., Lipton SA. (2000). Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci*. 3(1), 15-21.
- Chun SY.**, Eisenhauer KM., Kubo M., Hsueh AJ. (1995). Interleukin-1 beta suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Endocrinology*. 136(7), 3120-3127.
- Clark IM.**, Swingler TE., Young DA. (2007). Acetylation in the regulation of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases gene expression. *Front Biosci*. 12, 528-535.
- Connelly L.**, Palacios-Callender M., Ameixa C., Moncada S., Hobbs AJ. (2001). Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J Immunol*. 166(6), 3873-3881.
- Cornelius LA.**, Nehring LC., Harding E., Bolanowski M., Welgus HG., Kobayashi DK., Pierce RA., Shapiro SD. (1998). Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol*. 161(12), 6845-6852.
- Cortez DM.**, Feldman MD., Mummidi S., Valente AJ., Steffensen B., Vincenti M., Barnes JL., Chandrasekar B. (2007). IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK- and ERK1/2-dependent C/EBP-beta, NF-kappaB, and AP-1 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293(6), H3356-3365.
- Coussens LM.**, Tinkle CL., Hanahan D., Werb Z. (2000). MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*. 103(3), 481-490.
- Coussens LM.**, Fingleton B., Matrisian LM. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*. 295(5564), 2387-2392.
- Delany AM.**, Canalis E. (2001). The metastasis-associated metalloproteinase stromelysin-3 is induced by transforming growth factor-beta in osteoblasts and fibroblasts. *Endocrinology*. 142(4), 1561-1566.
- Deryugina EI.**, und Quigley JP. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 25(1), 9-34.
- Dickson RB.**, Bates SE., McManaway ME., Lippman ME. (1986). Characterization of estrogen responsive transforming activity in human breast cancer cell lines. *Cancer Res*. 46(4 Pt 1), 1707-1713.
- Di Gennaro E.**, Bruzzese F., Caraglia M., Abruzzese A., Budillon A. (2004). Acetylation of proteins as novel target for antitumor therapy: review article. *Amino Acids*. 26(4), 435-441.
- Dong Z.**, Kumar R., Yang X., Fidler IJ. (1997). Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell*. 88(6), 801-810.
- Dulak J.**, Józkwicz A., Dembinska-Kiec A., Guevara I., Zdzienicka A., Zmudzinska-Grochot D., Florek I., Wójtowicz A., Szuba A., Cooke JP. (2000). Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20(3), 659-666.
- Eberhardt W.**, Huwiler A., Beck KF., Walpen S., Pfeilschifter J. (2000a). Amplification of IL-1 beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol*. 165(10), 5788-5797.

- Eberhardt W.**, Beeg T., Beck KF., Walpen S., Gauer S., Böhles H., Pfeilschifter J. (2000b). Nitric oxide modulates expression of matrix metalloproteinase-9 in rat mesangial cells. *Kidney Int.* 7(1), 59-69.
- Egeblad M.**, Werb Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer.* 2, 161-174.
- Fähling M.**, Steege A., Perlewitz A., Nafz B., Mrowka R., Persson PB., Thiele BJ. (2005). Role of nucleolin in posttranscriptional control of MMP-9 expression. *Biochim Biophys Acta.* 1731(1), 32-40.
- Fan XC.**, Steitz JA. (1998). Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J.* 17(12), 3448-3460.
- Fan Z.**, Yang H., Bau B., Söder S., Aigner T. (2006). Role of mitogen-activated protein kinases and NFkappaB on IL-1beta-induced effects on collagen type II, MMP-1 and 13 mRNA expression in normal articular human chondrocytes. *Rheumatol Int.* 26(10), 900-903.
- Farina AR.**, Tacconelli A., Vacca A., Maroder M., Gulino A., Mackay AR. (1999). Transcriptional up-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression during spontaneous epithelial to neuroblast phenotype conversion by SK-N-SH neuroblastoma cells, involved in enhanced invasivity, depends upon GT-box and nuclear factor kappaB elements. *Cell Growth Differ.* 10(5), 353-367.
- Feelisch M.**, Stamler JS. (1996). Donors of Nitrogen Oxides, Chapter 7. *Methods in Nitric Oxide Research*, 71, eds. (John Wiley&Sons,Inc.)
- Fields AP.**, Gustafson WC. (2003). Protein kinase C in disease: cancer. *Methods Mol Biol.* 233, 519-537.
- Franklin CC.**, Kraft AS. (1995). Constitutively active MAP kinase kinase (MEK1) stimulates SAP kinase and c-Jun transcriptional activity in U937 human leukemic cells. *Oncogene.* 11(11), 2365-2374.
- Franzen R.**, Pfeilschifter J., Huwiler A. (2002). Nitric oxide induces neutral ceramidase degradation by the ubiquitin/proteasome complex in renal mesangial cell cultures. *FEBS Lett.* 532(3), 441-444.
- Fukumura D.**, Gohongi T., Kadambi A., Izumi Y., Ang J., Yun CO., Buerk DG., Huang PL., Jain RK. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(5), 2604-2609.
- Fukumura D.**, Kashiwagi D., Jain RK. (2006). The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 6, 521-534.
- Furchgott RF.**, Zawadzki JV. (1989). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288(5789), 373-376.
- Gatti G.**, Simsek S., Zurrida S., Kurne A., Giannetti I., Demirer S., Smeets A., Caldarella P., Vento AR., Giraldo A., Luini A. (2004). Possible role of nitric oxide in the biology of breast carcinoma: review of the available literature. *The Breast.* 13, 1-6.
- Genersch E.**, Hayess K., Neuenfeld Y., Haller H. (2000). Sustained ERK phosphorylation is necessary but not sufficient for MMP-9 regulation in endothelial cells: involvement of Ras-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci.* 113 Pt 23, 4319-4330.
- Gopalakrishna R.**, Chen ZH., Gundimeda U. (1993). Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. *J Biol Chem.* 268(36), 27180-27185.
- Gorrin-Rivas MJ.**, Arie S., Furutani M., Mizumoto M., Mori A., Hanaki K., Maeda M., Furuyama H., Kondo Y., Imamura M. (2000). Mouse macrophage metalloelastase gene transfer into a murine melanoma suppresses primary tumor growth by halting angiogenesis. *Clin Cancer Res.* 6(5), 1647-54.
- Gow AJ.**, Farkouh CR., Munson DA., Posencheg MA., Ischiropoulos H. (2004). Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 287(2), 262-268.

- Graff JR.**, Boghaert ER., De Benedetti A., Tudor DL., Zimmer CC., Chan SK., Zimmer SG. (1995). Reduction of translation initiation factor 4E decreases the malignancy of ras-transformed cloned rat embryo fibroblasts. *Int J Cancer*. 60(2), 255-263.
- Griner EM.**, und Kazanietz MG. (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer*. 7(4), 281-294.
- Gross J.**, Lapiere CM. (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 48, 1014-1022.
- Groves MD.**, Pudevalli VK., Hess KR., Jaekle KA., Peterson P., Yung WK., Levin VA. (2002). Phase II trial of temozolomide plus the matrix metalloproteinase inhibitor, marimastat, in recurrent and progressive glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*. 20(5), 1383-1388.
- Gruetter CA.**, Barry BK., McNamara DB., Gruetter DY., Kadowitz PJ., Ignarro L. (1979). Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *J Cyclic Nucleotide Res*. 5(3), 211-224.
- Gu Z.**, Kaul M., Yan B., Kridel SJ., Cui J., Strongin A., Smith JW., Liddington RC., Lipton SA. (2002). S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science*. 297(5584), 1186-1190.
- Gurjar MV.**, DeLeon J., Sharma RV., Bhalla RC. (2001a). Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-9 induction by NO in vascular smooth muscle cells. *J Appl Physiol*. 91(3), 1380-1386.
- Gurjar MV.**, DeLeon J., Sharma RV., Bhalla RC. (2001b). Role of reactive oxygen species in IL-1 beta-stimulated sustained ERK activation and MMP-9 induction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 281(6), H2568-2574.
- Gum R.**, Lengyel E., Juarez J., Chen JH., Sato H., Seiki M., Boyd D. (1996). Stimulation of 92-kDa Gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J Biol Chem*. 271(18), 10672-10680.
- Gururajan R.**, Lahti JM., Grenet J., Easton J., Gruber I., Ambros PF., Kidd VJ. (1998). Duplication of a genomic region containing the Cdc2L1-2 and MMP21-22 genes on human chromosome 1p36.3 and their linkage to D1Z2. *Genome Res*. 8(9), 929-939.
- Haber DA.**, Buckler AJ., Glaser T., Call KM., Pelletier J., Sohn RL., Douglass EC., Housman DE. (1990). An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell*. 61(7), 1257-1269.
- Hah N.**, und Lee ST. (2003). An absolute role of the PKC-dependent NF-kappaB activation for induction of MMP-9 in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 305(2), 428-33.
- Hamano Y.**, Zeisberg M., Sugimoto H., Lively JC., Maeshima Y., Yang C., Hynes RO., Werb Z., Sudhakar A., Kalluri R. (2003). Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell*. 3(6), 589-601.
- Han YP.**, Tuan TL., Wu H., Hughes M., Garner WL. (2001). TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci*. 114(Pt 1), 131-139.
- Harbrecht BG.**, Wu B., Watkins SC., Marshall HP Jr., Peitzman AB., Billiar TR. (1995). Inhibition of nitric oxide synthase during hemorrhagic shock increases hepatic injury. *Shock*. 4(5), 332-337.
- Heltweg B.**, Dequiedt F., Marshall BL., Brauch C., Yoshida M., Nishino N., Verdin E., Jung M. (2004). Subtype selective substrates for histone deacetylases. *J Med Chem*. 47(21), 5235-5243.
- Ignarro LJ.** (1999). Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep*. 19(2), 51-71.
- Ignarro LJ.**, Buga GM., Wood KS., Byrns RE., Chaudhuri G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(24), 9265-9269.

- Inano H.**, Onoda M. (2005). Nitric oxide produced by inducible nitric oxide synthase is associated with mammary tumorigenesis in irradiated rats. *Nitric Oxide*. 12(1), 15-20.
- Ito K.**, Hanazawa T., Tomita K., Barnes PJ., Adcock IM. (2004). Oxidative stress reduces histone deacetylase 2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun*. 315(1), 240-245.
- Jia L.**, Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler JS. (1996). S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*. 380(6571), 221-226.
- Jia Z.**, Zhang J., Wei D., Wang L., Yuan P., Le X., Li Q., Yao J., Xie K. (2007). Molecular basis of the synergistic antiangiogenic activity of bevacizumab and mithramycin A. *Cancer Res*. 67(10), 4878-4885.
- Jiang Y.**, Muschel RJ. (2002). Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by translational efficiency in murine prostate carcinoma cells. *Cancer Res*. 62(6), 1910-1914.
- Jodele S.**, Blavier L., Yoon JM., DeClerck YA. (2006). Modifying the soil to affect the seed: role of stroma-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*. 25, 35-43.
- Johansson N.**, Ala-aho R., Uitto V., Grénman R., Fusenig NE., López-Otín C., Kähäri VM. (2000). Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Cell Sci*. 113, 227-235.
- Johnson MD.**, Torri JA., Lippman ME., Dickson RB. (1999). Regulation of motility and protease expression in PKC-mediated induction of MCF-7 breast cancer cell invasiveness. *Exp Cell Res*. 247(1), 105-13.
- Jones MK.**, Tsugawa K., Tarnawski AS., Baatar D. (2004). Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK, and AP-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 318(2), 520-528.
- Jordà M.**, Olmeda D., Vinyals A., Valero E., Cubillo E., Llorens A., Cano A., Fabra A. (2005). Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J Cell Sci*. 118, 3371-3385.
- Jozkowicz A.**, Cooke JP., Guevara I., Huk I., Funovics P., Pachinger O., Weidinger F., Dulak J. (2001). Genetic augmentation of nitric oxide synthase increases the vascular generation of VEGF. *Cardiovasc Res*. 51(4), 773-783.
- Jung M.**, Brosch G., Kölle D., Scherf H., Gerhäuser C., Loidl P. (1999). Amide analogues of trichostatin A as inhibitors of histone deacetylase and inducers of terminal cell differentiation. *J Med Chem*. 42(22), 4669-4679.
- Kajanne R.**, Miettinen P., Mehlem A., Leivonen SK., Birrer M., Foschi M., Kähäri VM., Leppä S. (2007). EGF-R regulates MMP function in fibroblasts through MAPK and AP-1 pathways. *J Cell Physiol*. 212(2), 489-497.
- Karin M.**, Liu Z., Zandi E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 9(2), 240-246.
- Keefler LK.**, Nims RW., Davies KM., Wink DA. (1996). "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol*. 268, 281-293.
- Keely PJ.** (2001). Ras and Rho protein induction of motility and invasion in T47D breast adenocarcinoma cells. *Methods Enzymol*. 333, 256-266.
- Kheradmand F.**, Werner E., Tremble P., Symons M., Werb Z. (1998). Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science*. 280(5365), 898-902.
- Kim S.**, Ponka P. (1999). Control of transferrin receptor expression via nitric oxide-mediated modulation of iron-regulatory protein 2. *J Biol Chem*. 274(46), 33035-33042.
- Kim S.**, Wing SS., Ponka P. (2004). S-nitrosylation of IRP2 regulates its stability via the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol*. 24(1), 330-337.
- Koivunen J.**, Aaltonen V., Peltonen J. (2006). Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Lett*. 235(1), 1-10.

- Kon K.**, Fujii S., Kosaka H., Fujiwara T. (2003). Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester retards vascular sprouting in angiogenesis. *Microvasc Res.* 65(1), 2-8.
- Kontny E.**, Kvanta A., Fredholm BB. (1992). Activation of protein kinase C and elevation of cAMP interact synergistically to raise c-Fos and AP-1 activity in Jurkat cells. *Eur J Pharmacol.* 227(3), 333-338.
- Kouzarides T.** (1999). Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev.* 9(1), 40-48.
- Kouzarides T.** (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell.* 128(4), 693-705.
- Kröncke KD.** (2003). Nitrosative stress and transcription. *Biol Chem.* 384(10-11), 1365-1377.
- Lacroix M.**, Leclercq G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat.* 83(3), 249-289.
- Laemmli UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- Lancaster JR Jr.**, Hibbs JB Jr. (1990). EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(3), 1223-1227.
- Lechner M.**, Lirk P., Rieder J. (2005). Inducible nitric oxide synthase in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol.* 15, 277-289.
- Lee SO.**, Jeong YJ., Im HG., Kim CH., Chang YC., Lee IS. (2007). Silibinin suppresses PMA-induced MMP-9 expression by blocking the AP-1 activation via MAPK signaling pathways in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 354(1), 165-171.
- Lee W.**, Mitchell P., Tjian R. (1987). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell.* 49(6), 741-752.
- Legrand C.**, Gilles C., Zahm JM., Polette M., Buisson AC., Kaplan H., Birembaut P., Tournier JM. (1999). Airway epithelial cell migration dynamics. MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling. *J Cell Biol.* 146(2), 517-529.
- Leighl NB.**, Paz-Ares L., Douillard JY., Peschel C., Arnold A., Depierre A., Santoro A., Betticher DC., Gatzemeier U., Jassem J., Crawford J., Tu D., Bezjak A., Humphrey JS., Voi M., Galbraith S., Hann K., Seymour L., Shepherd FA. (2005). Randomized phase III study of matrix metalloproteinase inhibitor BMS-275291 in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: National Cancer Institute of Canada-Clinical Trials Group Study BR.18. *J Clin Oncol.* 23(12), 2831-2839.
- Li HC.**, Cao DC., Liu Y., Hou YF., Wu J., Lu JS., Di GH., Liu G., Li FM., Ou ZL., Jie C., Shen ZZ., Shao ZM. (2004). Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 88(1), 75-85.
- Li B.**, Carey M., Workman JL. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell.* 128(4), 707-719.
- Liu JF.**, Crépin M., Liu JM., Barritault D., Ledoux D. (2002). FGF-2 and TPA induce matrix metalloproteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the Ras/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 293(4), 1174-1182.
- Liu S.**, Liang Y., Huang H., Wang L., Li Y., Li J., Li X., Wang H. (2005). ERK-dependent signaling pathway and transcription factor Ets-1 regulate matrix metalloproteinase-9 production in transforming growth factor-beta1 stimulated glomerular podocytes. *Cell Physiol Biochem.* 16(4-6), 207-216.
- Liu W.**, Rosenberg GA., Liu KJ. (2006). AUF-1 mediates inhibition by nitric oxide of lipopolysaccharide-induced matrix metalloproteinase-9 expression in cultured astrocytes. *J Neurosci Res.* 84(2), 360-369.

- Loibl S.**, von Minckwitz G., Weber S., Sinn HP., Schini-Kerth VB., Lobysheva I., Nepveu F., Wolf G., Strebhardt K., Kaufmann M. (2002). Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in benign and malignant lesions of the breast and measurement of nitric oxide using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Cancer*. 95(6), 1191-1198.
- Loibl S.**, Buck A., Strank C., von Minckwitz G., Roller M., Sinn HP., Schini-Kerth V., Solbach C., Strebhardt K., Kaufmann M. (2005). The role of early expression of inducible nitric oxide synthase in human breast cancer. *Eur J Cancer*. 41, 265-271.
- Luo J.**, Nikolaev AY., Imai S., Chen D., Su F., Shiloh A., Guarente L., Gu W. (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*. 107(2), 137-148.
- Lynch CC.**, Crawford HC., Matrisian LM., McDonnell S. (2004). Epidermal growth factor upregulates matrix metalloproteinase-7 expression through activation of PEA3 transcription factors. *Int J Oncol*. 24(6), 1565-1572.
- Ma Z.**, Shah RC., Chang MJ., Benveniste EN. (2004). Coordination of cell signaling, chromatin remodeling, histone modifications, and regulator recruitment in human matrix metalloproteinase 9 gene transcription. *Mol Cell Biol*. 24(12), 5496-5509.
- Ma Z.**, Chang MJ., Shah RC., Benveniste EN. (2005). Interferon-gamma-activated STAT-1alpha suppresses MMP-9 gene transcription by sequestration of the coactivators CBP/p300. *J Leukoc Biol*. 78(2), 515-523.
- MacIntyre I.**, Zaidi M., Alam AS., Datta HK., Moonga BS., Lidbury PS., Hecker M., Vane JR. (1991). Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(7), 2936-2640.
- Mackay HJ.**, Twelves CJ. (2007). Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat Rev Cancer*. 7(7), 554-562.
- Mai A.**, Massa S., Rotili D., Cerbara I., Valente S., Pezzi R., Simeoni S., Ragno R. (2005). Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Med Res Rev*. 25(3), 261-309.
- Mañes S.**, Mira E., Barbacid MM., Ciprés A., Fernández-Resa P., Buesa JM., Mérida I., Aracil M., Márquez G., Martínez-A C. (1997). Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J Biol Chem*. 272(41), 25706-25712.
- Mañes S.**, Llorente M., Lacalle RA., Gómez-Moutón C., Kremer L., Mira E., Martínez-A C. (1999). The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J Biol Chem*. 274(11), 6935-6945.
- Mannick JB.**, Asano K., Izumi K., Kieff E., Stamler JS. (1994). Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell*. 79(7), 1137-1146.
- Marcet-Palacios M.**, Ulanova M., Duta F., Puttagunta L., Munoz S., Gibbings D., Radomski M., Cameron L., Mayers I., Befus AD. (2007). The transcription factor Wilms tumor 1 regulates matrix metalloproteinase-9 through a nitric oxide-mediated pathway. *J Immunol*. 179(1), 256-265.
- Marks PA.**, Miller T., Richon VM. (2003). Histone deacetylases. *Curr Opin Pharmacol*. 3(4), 344-351.
- Marshall HE.**, Merchant K., Stamler JS. (2000). Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J*. 14(13), 1889-1900.
- Martin MD.**, Matrisian LM. (2007). The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 26(3-4), 717-724.
- Martínez-Ruiz A.**, Lamas S. (2007). Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: convergences and divergences. *Cardiovasc Res*. 75(2), 220-228.
- Mason CA.**, Chang P., Fallery C., Rabinovitch M. (1999). Nitric oxide mediates LC-3-dependent regulation of fibronectin in ductus arteriosus intimal cushion formation. *FASEB J*. 13(11), 1423-1434.

- Matsunaga T.**, Weihsrauch DW., Moniz MC., Tessmer J., Warltier DC., Chilian WM. (2002). Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide. *Circulation*. 105(18), 2185-2191.
- Matthews JR.**, Botting CH., Panico M., Morris HR., Hay RT. (1996). Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res*. 24(12), 2236-2242.
- McDonnell S.**, Matrisian LM. (1990). Stromelysin in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 9(4), 305-319.
- Melino G.**, Catani MV., Corazzari M., Guerrieri P., Bernassola F. (2000). Nitric oxide can inhibit apoptosis or switch it into necrosis. *Cell Mol Life Sci*. 57(4), 612-622.
- Mercurio F.**, Manning AM. (1999). Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr Opin Cell Biol*. 11(2), 226-232.
- Messmer UK.**, Brüne B. (1996). Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways. *Biochem J*. 319 (Pt 1), 299-305.
- Minc E.**, de Coppet P., Masson P., Thiery L., Dutertre S., Amor-Gueret M., Jaulin C. (1999). The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites. *J. Biol. Chem*. 274, 503-509.
- Mitsiades N.**, Yu WH., Poulaki V., Tsokos M., Stamenkovic I. (2001). Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res*. 61(2), 577-581.
- Miyoshi A.**, Kitajima Y., Sumi K., Sato K., Hagiwara A., Koga Y., Miyazaki K. (2004). Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer*. 90(6), 1265-1273.
- Moncada S.**, Higgs EA. (1991). Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*. 21(4), 361-374.
- Morbidelli L.**, Chang CH., Douglas JG., Granger HJ., Ledda F., Ziche M. (1996). Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol*. 270(1 Pt 2), H411-415.
- Mullis K.**, Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*. 24, 17-27.
- Nakamura Y.** (2006). Nitric oxide in breast cancer: induction of VEGF-C and correlation with metastasis and poor prognosis. *Clinical Cancer Research*. 12, 1201-1207.
- Nathan C.**, Xie QW. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 78(6), 915-918.
- Newberry EP.**, Willis D., Latifi T., Boudreaux JM., Towler DA. (1997). Fibroblast growth factor receptor signaling activates the human interstitial collagenase promoter via the bipartite Ets-AP1 element. *Mol Endocrinol*. 11(8), 1129-1144.
- Nikitovic D.**, Holmgren A., Spyrou G. (1998). Inhibition of AP-1 DNA binding by nitric oxide involving conserved cysteine residues in Jun and Fos. *Biochem Biophys Res Commun*. 242(1), 109-112.
- Noiri E.**, Lee E., Testa J., Quigley J., Colflesh D., Keese CR., Giaever I., Goligorsky MS. (1998). Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide. *Am J Physiol*. 274(1 Pt 1), C236-244.
- Okamoto T.**, Akaike T., Sawa T., Miyamoto Y., van der Vliet A., Maeda H. (2001). Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *J Biol Chem*. 276(31), 29596-29602.
- Orlicek SL.**, Hanke JH., English BK. (1999). The src family-selective tyrosine kinase inhibitor PP1 blocks LPS and IFN-gamma-mediated TNF and iNOS production in murine macrophages. *Shock*. 12(5), 350-354.
- Overall CM.** und Lopez-Otin C. (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial-era. *Nature Reviews Cancer*. 2, 657-672.

- Palmer RM., Ferrige AG., Moncada S.** (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 327(6122), 524-526.
- Papapetropoulos A., García-Cardeña G., Madri JA., Sessa WC.** (1997). Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*. 100(12), 3131-3139.
- Park HS., Huh SH., Kim MS., Lee SH., Choi EJ.** (2000). Nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase by means of S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(26), 14382-14387.
- Park HS., Mo JS., Choi EJ.** (2006). Nitric oxide inhibits an interaction between JNK1 and c-Jun through nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 351(1), 281-286.
- Paul A., Wilson S., Belham CM., Robinson CJ., Scott PH., Gould GW., Plevin R.** (1997). Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell Signal*. 9(6), 403-410.
- Pei D., Weiss SJ.** (1995). Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*. 375(6528), 244-247.
- Pellikainen JM., Ropponen KM., Kataja VV., Kellokoski JK., Eskelinen MJ., Kosma VM.** (2004). Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res*. 10(22), 7621-7628.
- Pender SL., Quinn JJ., Sanderson IR., MacDonald TT.** (2000). Butyrate upregulates stromelysin-1 production by intestinal mesenchymal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 279(5), G918-924.
- Peng SS., Chen CY., Xu N., Shyu AB.** (1998). RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO J*. 17(12), 3461-3470.
- Peschon JJ., Slack JL., Reddy P., Stocking KL., Sunnarborg SW., Lee DC., Russell WE., Castner BJ., Johnson RS., Fitzner JN., Boyce RW., Nelson N., Kozlosky CJ., Wolfson MF., Rauch CT., Cerretti DP., Paxton RJ., March CJ., Black RA.** (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*. 282(5392), 1281-1284.
- Peunova N., Enikolopov G.** (1995). Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature*. 375(6526), 68-73.
- Pfeilschifter J., Eberhardt W., Beck KF.** (2001). Regulation of gene expression by nitric oxide. *Pflugers Arch*. 442(4), 479-486.
- Phillips PG., Birnby LM.** (2004). Nitric oxide modulates caveolin-1 and matrix metalloproteinase-9 expression and distribution at the endothelial cell/tumor cell interface. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 286(5), L1055-1065.
- Powell WC., Matrisian LM.** (1996). Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression. *Curr Top Microbiol Immunol*. 213, 1-21.
- Powell WC., Fingleton B., Wilson CL., Boothby M., Matrisian LM.** (1999). The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol*. 9(24), 1441-1447.
- Quivy V., Van Lint C.** (2004). Regulation at multiple levels of NF-kappaB-mediated transactivation by protein acetylation. *Biochem Pharmacol*. 68(6), 1221-1229.
- Radomski MW., Jenkins DC., Holmes L., Moncada S.** (1991). Human colorectal adenocarcinoma cells: differential nitric oxide synthesis determines their ability to aggregate platelets. *Cancer Res*. 51(22), 6073-6078.
- Rao CV., Kawamori T., Hamid R., Reddy BS.** (1999). Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci by an inducible nitric oxide synthase-selective inhibitor. *Carcinogenesis*. 20(4), 641-644.
- Rao CV., Indranie C., Simi B., Manning PT., Connor JR., Reddy BS.** (2002). Chemopreventive properties of a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in colon carcinogenesis, administered alone or in combination with celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res*. 62(1), 165-170.

- Ree AH.**, Bjørnland K., Brüner N., Johansen HAT., Pedersen KB., Aasen AO., Fodstad O. (1998). Regulation of tissue-degrading factors and in vitro invasiveness in progression of breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis*. 16(3), 205-215.
- Reunanen N.**, Li SP., Ahonen M., Foschi M., Han J., Kähäri VM. (2002). Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization. *J Biol Chem*. 277(35), 32360-32368.
- Reveneau S.**, Arnould L., Jolimoy G., Hilpert S., Lejeune P., Saint-Giorgio V., Belichard C., Jeannin JF. (1999). Nitric oxide synthase in human breast cancer is associated with tumor grade, proliferation rate, and expression of progesterone receptors. *Lab Invest*. 79(10), 1215-25.
- Ridnour LA.**, Windhausen AN., Isenberg JS., Yeung N., Thomas DD., Vitek MP., Roberts DD., Wink DA. (2007). Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-9 activity by guanylyl-cyclase-dependent and - independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(43), 16898-16903.
- Rieder J.**, Marth C., Totzke G., Smolny M., Seibel M., Hoffmann G. (2000). Different patterns of inducible nitric oxide synthase gene expression in ovarian carcinoma cell lines. *Anticancer Res*. 20(5A), 3251-3258.
- Riester D.**, Wegener D., Hildmann C., Schwienhorst A. (2004). Members of the histone deacetylase superfamily differ in substrate specificity towards small synthetic substrates. *Biochem Biophys Res Commun*. 324(3), 1116-1123.
- Riester D.**, Hildmann C., Grünwald S., Beckers T., Schwienhorst A. (2007). Factors affecting the substrate specificity of histone deacetylases. *Biochem Biophys Res Commun*. 357(2), 439-445.
- Robinson CJ.**, Sloss CM., Plevin R. (1997). Inactivation of JNK activity by mitogen-activated protein kinase phosphatase-2 in EAhy926 endothelial cells is dependent upon agonist-specific JNK translocation to the nucleus. *Cell Signal*. 13(1), 29-41.
- Ron D.**, Kazanietz MG. (1999). New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J*. 13(13), 1658-1676.
- Rossi A.**, Catani MV., Candi E., Bernassola F., Puddu P., Melino G. (2000). Nitric oxide inhibits cornified envelope formation in human keratinocytes by inactivating transglutaminases and activating protein 1. *J Invest Dermatol*. 115(4), 731-739.
- Roth SY.**, Denu JM., Allis CD. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*. 70, 81-120.
- Roy B.** (1994). New thionitrites: Synthesis, stability, and nitric oxide generation. *JOC*. 59, 7019.
- Rydzial S.**, Delany AM., Canalis E. (2004). AU-rich elements in the collagenase 3 mRNA mediate stabilization of the transcript by cortisol in osteoblasts. *J Biol Chem*. 279(7), 5397-5404.
- Sanger F.**, Nicklen S., Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74(12), 5463-5467.
- Santos-Rosa H.**, Caldas C. (2005). Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer*. 41(16), 2381-2402.
- Sarih M.**, Souvannavong V., Adam A. (1993). Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 191(2), 503-508.
- Sato H.**, Seiki M. (1993). Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene*. 8(2), 395-405.
- Sharrocks AD.**, Brown AL., Ling Y., Yates PR. (1997). The ETS-domain transcription factor family. *Int J Biochem Cell Biol*. 29(12), 1371-1387.
- Sheu BC.**, Hsu SM., Ho HN., Lien HC., Huang SC., Lin RH. (2001). A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res*. 61(1), 237-242.

- Shipley JM.**, Doyle GA., Fliszar CJ., Ye QZ., Johnson LL., Shapiro SD., Welgus HG., Senior RM. (1996). The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Role of the fibronectin type II-like repeats. *J Biol Chem.* 271(8), 4335-4341.
- Shirakawa F.**, Mizel SB. (1989). In vitro activation and nuclear translocation of NF-kappa B catalyzed by cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol Cell Biol.* (6), 2424-2430.
- Shizukuda Y.**, Tang S., Yokota R., Ware JA. (1999). Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase Cdelta activity. *Circ Res.* 85(3), 247-256.
- Simon C.**, Goepfert H., Boyd D. (1998). Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced Mr 92,000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion. *Cancer Res.* 58(6), 1135-1139.
- Sinha I.**, Hannawa KK., Ailawadi G., Woodrum DT., Ford JW., Henke PK., Stanley JC., Eagleton MJ., Upchurch GR Jr. (2006). The nitric oxide donor DETA-NONOate decreases matrix metalloproteinase-9 expression and activity in rat aortic smooth muscle and abdominal aortic explants. *Ann Vasc Surg.* 20(1), 92-98.
- Somerville RPT.**, Oblander SA., Apte SS. (2003). Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol.* 4, 216.
- Song JD.**, Lee SK., Kim KM., Kim JW., Kim JM., Yoo YH., Park YC. (2007). Redox factor-1 mediates NF-kappaB nuclear translocation for LPS-induced iNOS expression in murine macrophage cell line RAW 264.7. *Immunology.* Nov 20 [Epub ahead of print].
- Sottrup-Jensen L.**, Birkedal-Hansen H. (1989). Human fibroblast collagenase-alpha-macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian alpha-macroglobulins. *J Biol Chem.* 264(1), 393-401.
- Soule HD.**, Vazquez J., Long A., Albert S., Brennan M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 51(5), 1409-1416.
- Sparano JA.**, Bernardo P., Stephenson P., Gradishar WJ., Ingle JN., Zucker S., Davidson NE. (2004). Randomized phase III trial of marimastat versus placebo in patients with metastatic breast cancer who have responding or stable disease after first-line chemotherapy: Eastern Cooperative Oncology Group trial E2196. *J Clin Oncol.* 22(23), 4683-4690.
- Springman EB.**, Angleton EL., Birkedal-Hansen H., Van Wart HE. (1990). Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(1), 364-368.
- Stamler JS.**, Simon DI., Osborne JA., Mullins ME., Jaraki O., Michel T., Singel DJ., Loscalzo J. (1992). S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(1), 444-448.
- Stamler JS.** (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell.* 78(6), 931-936.
- Steinbrenner H.**, Ramos MC., Stuhlmann D., Mitic D., Sies H., Brenneisen P. (2005). Tumor promoter TPA stimulates MMP-9 secretion from human keratinocytes by activation of superoxide-producing NADPH oxidase. *Free Radic Res.* 39(3), 245-253.
- Sternlicht M.**, Werb Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17, 463-516.
- Sternlicht M.**, Werb Z. (1999). Biology and regulation of the matrix metalloproteinases. In *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor and Adhesion Proteins*, ed. T. Kreis, R. Vale, pp. 503-562. Oxford, UK: Oxford Univ. Press.
- Stuehr DJ.**, Marletta MA. (1987). Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Res.* 47(21), 5590-5594.

- Sun MH.**, Han XC., Jia MK., Jiang WD., Wang M., Zhang H., Han G., Jiang Y. (2005). Expressions of inducible nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-9 and their effects on angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 11(38), 5931-5937.
- Tabuchi A.**, Sano K., Oh E., Tsuchiya T., Tsuda M. (1994). Modulation of AP-1 activity by nitric oxide (NO) in vitro: NO-mediated modulation of AP-1. *FEBS Lett.* 351(1), 123-127.
- Takeha S.**, Fujiyama Y., Bamba T., Sorsa T., Nagura H., Ohtani H. (1997). Stromal expression of MMP-9 and urokinase receptor is inversely associated with liver metastasis and with infiltrating growth in human colorectal cancer: a novel approach from immune/inflammatory aspect. *Jpn J Cancer Res.* 88(1), 72-81.
- Talvensaari-Mattila A.**, Turpeenniemi-Hujanen T. (2005). Preoperative serum MMP-9 immunoreactive protein is a prognostic indicator for relapse-free survival in breast carcinoma. *Cancer Lett.* 217(2), 237-242.
- Thompson EW.**, Paik S., Brünner N., Sommers CL., Zugmaier G., Clarke R., Shima TB., Torri J., Donahue S., Lippman ME. (1992). Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol.* 150(3), 534-544.
- Thomsen LL.**, Miles DW., Happerfield L., Bobrow LG., Knowles RG., Moncada S. (1995). Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br J Cancer.* 72(1), 41-44.
- Tiao G.**, Rafferty J., Ogle C., Fischer JE., Hasselgren PO. (1994). Detrimental effect of nitric oxide synthase inhibition during endotoxemia may be caused by high levels of tumor necrosis factor and interleukin-6. *Surgery.* 116(2), 332-338.
- Tseng CP.**, Kim YJ., Kumar R., Verma AK. (1994). Involvement of protein kinase C in the transcriptional regulation of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-inducible genes modulated by AP-1 or non-AP-1 transacting factors. *Carcinogenesis.* 15(4), 707-711.
- Ueda Y.**, Hirai S., Osada S., Suzuki A., Mizuno K., Ohno S. (1996). Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem.* 271(38), 23512-23519.
- Umansky V.**, Hehner SP., Dumont A., Hofmann TG., Schirmacher V., Dröge W., Schmitz ML. (1998). Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF-kappaB implies a physiological self-amplifying mechanism. *Eur J Immunol.* 28(8), 2276-2282.
- Vakkala M.**, Kahlos K., Lakari E., Pääkkö P., Kinnula V., Soini Y. (2000). Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in in situ and invasive breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 6(6), 2408-2416.
- Vamvakas S.**, Schmidt HH. (1997). Just say NO to cancer? *J Natl Cancer Inst.* 89(6), 406-407.
- Van Wart HE.**, Birkedal-Hansen H. (1990). The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(14), 5578-5582.
- Vaziri H.**, Dessain SK., Ng Eaton E., Imai SI., Frye RA., Pandita TK., Guarente L., Weinberg RA. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell.* 107(2), 149-159.
- Velasco G.**, Pendás AM., Fueyo A., Knäuper V., Murphy G., López-Otín C. (1999). Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J Biol Chem.* 274(8), 4570-4576.
- Verdin E.**, Dequiedt F., Kasler HG. (2003). Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet.* 19(5), 286-293.
- Verdone L.**, Caserta M., Di Mauro E. (2005). Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem Cell Biol.* 83(3), 344-353.
- Vries RG.**, Prudenziati M., Zwartjes C., Verlaan M., Kalkhoven E., Zantema A. (2001). A specific lysine in c-Jun is required for transcriptional repression by E1A and is acetylated by p300. *EMBO J.* 20(21), 6095-6103.

- Wang S.**, Wang W., Wesley RA., Danner RL. (1999). A Sp1 binding site of the tumor necrosis factor alpha promoter functions as a nitric oxide response element. *J Biol Chem.* 274(47), 33190-33193.
- Weng CJ.**, Chau CF., Hsieh YS., Yang SF., Yen GC. (2008). Lucidenic acid inhibits PMA-induced invasion of human hepatoma cells through inactivating MAPK/ERK signal transduction pathway and reducing binding activities of NF-kappaB and AP-1. *Carcinogenesis.* 29(1), 147-156.
- Westermarck J.**, Kähäri VM. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 13(8), 781-792.
- Wetsel WC.**, Khan WA., Merchenthaler I., Rivera H., Halpern AE., Phung HM., Negro-Vilar A., Hannun YA. (1992). Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J Cell Biol.* 117(1), 121-133.
- Wink DA.**, Nims RW., Darbyshire JF., Christodoulou D., Hanbauer I., Cox GW., Laval F., Laval J., Cook JA., Krishna MC. (1994). Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem Res Toxicol.* 7(4), 519-525.
- Woessner JF.** und Nagase H. (2000). *Oxford University Press* pp. 223. ISBN 0-19-850268-0.
- Wu WS.** (2006). The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 25(4), 695-705.
- Xu W.**, Liu LZ., Loizidou M., Ahmed M., Charles IG. (2002). The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res.* 12(5-6), 311-320.
- Xuan YT.**, Tang XL., Banerjee S., Takano H., Li RC., Han H., Qiu Y., Li JJ., Bolli R. (1999). Nuclear factor-kappaB plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Circ Res.* 84(9), 1095-1109.
- Yan C.**, Wang H., Toh Y., Boyd DD. (2003). Repression of 92-kDa type IV collagenase expression by MTA1 is mediated through direct interactions with the promoter via a mechanism, which is both dependent on and independent of histone deacetylation. *J Biol Chem.* 278(4), 2309-2316.
- Yan C.**, Wang H., Aggarwal B., Boyd DD. (2004). A novel homologous recombination system to study 92 kDa type IV collagenase transcription demonstrates that the NF-kappaB motif drives the transition from a repressed to an activated state of gene expression. *FASEB J.* 18(3), 540-541.
- Yang W.**, Arii S., Gorrin-Rivas MJ., Mori A., Onodera H., Imamura M. (2001). Human macrophage gene expression in colocteral carcinoma and its clinicopathologic significance. *Cancer.* 91(7), 1277-1283.
- Yokoyama K.**, Kamata N., Fujimoto R., Tsutsumi S., Tomonari M., Taki M., Hosokawa H., Nagayama M. (2003). Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int J Oncol.* 22(4), 891-898.
- Young DA.**, Lakey RL., Pennington CJ., Jones D., Kevorkian L., Edwards DR., Cawston TE., Clark IM. (2005). Histone deacetylase inhibitors modulate metalloproteinase gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption. *Arthritis Res Ther.* 7(3), R503-512.
- Yu Q.**, Stamenkovic I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14(2), 163-176.
- Yuan P.**, Wang L., Wei D., Zhang J., Jia Z., Li Q., Le X., Wang H., Yao J., Xie K. (2007). Therapeutic inhibition of Sp1 expression in growing tumors by mithramycin a correlates directly with potent antiangiogenic effects on human pancreatic cancer. *Cancer.* 110(12), 2682-2690.
- Yuan ZL.**, Guan YJ., Chatterjee D., Chin YE. (2005). Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science.* 307(5707), 269-273.

Zhou J., Fandrey J., Schümann J., Tiegs G., Brüne B. (2003). NO and TNF-alpha released from activated macrophages stabilize HIF-1alpha in resting tubular LLC-PK1 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284(2), C439-446.

