

1. Adenovirusvermittelte Überexpression von tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in der Leber: Wirksamer Schutz vor hepatischen Manifestationen eines T-Zell Lymphoms und eines Kolonkarzinoms

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind für die Metastasierung von Tumorzellen unerlässlich. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1), ein natürlicher MMP-Inhibitor besitzt antimetastatische Wirkung in unterschiedlichen Modellsystemen, proliferatorische Eigenschaften sind jedoch unentwirrbar damit verknüpft. Wir untersuchten, ob adenoviraler Gentransfer Lebermetastasen in zwei unabhängigen Tiermodellen zu inhibieren vermag.

TIMP-1 wurde hierzu mit Erstgenerationsadenoviren in die Leber von Balb/c und DBA/2-Mäusen transferiert. Anschließend wurden die Tiere mit experimentellen Metastasen der kolorektalen Karzinomzelllinie CT-26 oder des T-Zell-Lymphoms L-CI.5s konfrontiert.

Eine erhöhte MMP-9-Expression in der Leber wurde durch Metastasen beider Zelllinien induziert. Durch Expression des Reportergens lacZ in etwa 60% der Hepatozyten wurde eine hohe Effizienz des Gentransfers gezeigt. TIMP-1 ein wichtiger Inhibitor von MMP-9 wurde im Vergleich mit der Überexpression durch transgene Tiere in bis zu 10^5 -facher Konzentration nachgewiesen. Kolorektale Metastasen wurden um 73% reduziert, Lymphommanifestationen wurden um 94% reduziert.

Aufgrund des Unvermögens transgener Tiere, experimentellen Metastasen von L-CI.5s zu begegnen haben wir auf eine Konzentrationsabhängigkeit der TIMP-1-Effekte geschlossen. Wir denken, dass TIMP-1 einen adäquaten Schutzmechanismus vor Lebermetastasen ausbilden kann.

1.1. Einleitung:

Bösartiges Wachstum erfordert eine intensive Interaktion von Tumorzellen mit ihrer Wirtsumgebung und ist durch unphysiologischen Um- und Abbau der Extrazellulären Matrix (ECM) gekennzeichnet. Die Bedeutung der Matrixmetalloproteinasen (MMP), einer Familie zinkabhängiger Endopeptidasen, ist dabei hervorzuheben. Neben ihrer Fähigkeit die ECM zu zersetzen greifen MMPs durch Freisetzung von Mediatoren entscheidend in extrazelluläre [1,2] Signalwege ein und wurden neuerdings auch im Zellkern nachgewiesen [3]. Es werden bisher 26 membrangebundene und lösliche MMPs unterschieden [4]. Ihre physiologische Funktion üben Sie, etwa als Kollagenasen, beim Wachstum und der Wundheilung aus. Unter den löslichen MMPs sind MMP-9 und MMP-2, auch Gelatinasen genannt, in besonderer Weise mit frühen und späten Stadien unterschiedlicher Tumorleiden assoziiert worden [5,6,7].

Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) vermitteln eine natürliche Gegenregulation zur MMP-Aktivität. Sie besitzen gut belegte Antitumorwirkung in unterschiedlichen Modellen [8], zunehmend wird jedoch auf MMP-unabhängige, wachstumsfördernde und antiapoptotische Eigenschaften hingewiesen [9,10]. MMPs werden als latente Enzyme sezerniert und anschließend durch Abspaltung einer Pro-Domäne aktiviert. TIMPs binden über ihr N-terminales Ende im Verhältnis 1:1 am aktiven Zentrum latenter und aktiver MMPs und hemmen dadurch deren Aktivierung bzw. Proteaseaktivität. Zusätzlich können TIMPs und MMPs auch über die C-terminalen Enden ihre Verbindung festigen [11].

Trotz enger struktureller Verwandtschaft [12] der vier bekannten Vertreter bestehen zwischen den TIMPs Unterschiede, die den therapeutischen Einsatz in Abhängigkeit vom MMP-Profil der Tumoren nahe legen [8]. So gehen TIMP-2 und MMP-2 sowie TIMP-1 und MMP-9 bevorzugte Bindungen ein [13]. Darüber hinaus ist eine, in diesem Zusammenhang unerwünschte, indirekt aktivierende Wirkung von TIMP-2 auf MMP-2 bekannt welche durch TIMP-1 antagonisiert wird [14]. Es erscheint also gerade bei MMP-9-assoziiierter Metastasierung naheliegend, die Rolle von TIMP-1 zu untersuchen.

In Vorarbeiten haben wir ein Mausmodell zum *in vivo* Gentransfer bei kolorektalen Lebermetastasen entwickelt. Während üblicherweise in der Genthherapie von Tumoren das Ziel in einer Transformation der Tumorzellen besteht, wurde in unserem Konzept das gesunde Leberparenchym mit adenoviralen Vektoren modifiziert und so mit einer Schutzfunktion ausgestattet. Den natürlichen Tropismus von Adenoviren für Leberzellen nutzend wurden in diesem „Imprägnationskonzept“ hohe lokale und systemische TIMP-2-Konzentrationen durch eine einzelne i.v.-Injektion von Ad-TIMP-2 erzielt. Das Neuauftreten von Leberfiliae und das Wachstum etablierter Leberfiliae der kolorektalen Karzinomzelllinie LS174-T wurden hiermit sehr wirkungsvoll inhibiert [15].

Wir übertrugen unser Imprägnationskonzept auf TIMP-1 um aufzuklären ob es experimentelle Lebermetastasen der kolorektalen Karzinomzelllinie CT-26 (Balb/c-Maus) [16] oder des aggressiven T-Zell-Lymphoms L-CI-5s (DBA/2-Maus) [17] inhibiert, welche beide mit hoher MMP-9-Expression *in vivo* einhergehen. In beiden Fällen fanden wir eine effiziente Reduktion von Metastasen durch Überexpression von TIMP-1 in der Leber. Unsere Daten sprechen weiterhin für eine Konzentrationsabhängigkeit des Antitumoreffekts.

1.2. Ergebnisse, Methodik

1.2.1. Metastasierung in der Leber induziert MMP-9 Expression Nachweis von MMP-2 und -9 durch Gelatine-Zymographie

CT-26 und L.CI-5s wurden per Gelatine-Zymographie hinsichtlich ihrer MMP-2 und -9 Aktivität in Zellkulturüberständen und Gewebeproben untersucht. Hierzu wurden die Proben auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt, welches mit 0,1% Gelatine polymerisiert hatte. Nach der Elektrophorese und Inkubation in kalziumhaltigem, leicht alkalischem Puffer wurde die unverdaute Gelatine im Gel mit Coomassie visualisiert. Helle Banden vor blauem Hintergrund zeigen Gelatinase-Aktivität.

MMP-2 und -9 wurden im Zellkulturüberstand von CT-26-Zellen nachgewiesen (Abb. 1a, Bahn 1). Nach Induktion von CT-26-Lebermetastasen zeigt sich ein deutlicher Anstieg der MMP-9-Expression (Abb. 1a, Bahn 3). In ähnlicher Weise ist bei L.CI-5s-Zellen Die MMP-9 ist im Zellkulturüberstand kaum nachweisbar, wird aber in der metastasierten Leber überaus stark sezerniert (Fig. 1a, Bahn 6). Im gesunden Lebergewebe gibt es nur geringe Gelatinase-Aktivität (Abb. 1a, Bahnen 2 und 5).

Die Unterscheidung zwischen latenten und aktiven MMPs erfolgte durch Versetzen der Proben mit 4-Amino-Phenyl-Quecksilberacetat (APMA). APMA verdrängt das latentenzvermittelnde Propeptid der MMPs aus dem aktiven Zentrum und bewirkt damit eine Autoaktivierung der latenten MMP zu aktiven Fragmenten von kleinerem Molekulargewicht. Dadurch verblassen im Zymogramm die Banden höheren Gewichts, also pro-MMP-2 und -9, dies wurde in allen Proben beobachtet (Abb. 1b).

Pro-MMP-9 ist die vorherrschende Form in metastasierten (Abb. 1A und 1B, Bahnen 3 und 6) und gesunden Lebern (Abb. 1A und 1B, Bahnen 2 und 5). Bei L.CI-5s-Metastasen fanden wir auch einiges aktiviertes MMP-9 (Abb. 1A und 1B, Bahn 6). Zellkulturüberstände enthielten vergleichbare Mengen von pro-MMP-9 und aktivem MMP-9 (Abb. 1a und 1B, Bahnen 1 und 3). Aktiviertes MMP-2 ist in den Tumorproben nachweisbar, insbesondere bei CT-26 (Abb. 1a und 1a, Bahnen 3 und 6). Auch die MMP-2 liegt vor allem in der latenten Form vor (Abb. 1a und 1a, Bahnen 1,2,4 und 5).

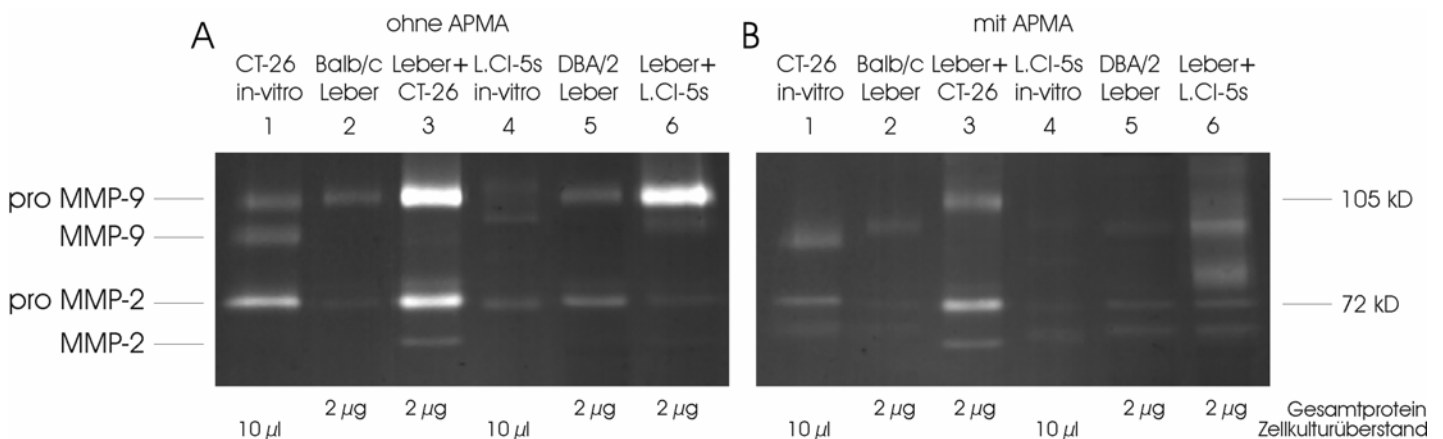


Abb.1: MMP-2 und -9-Aktivität von kolorektalen Karzinomzellen und T-Zell-Lymphomzellen *in vitro* und *in vivo* anhand der Gelatine-Zymographie

1.2.2. Expression von funktionsfähigem TIMP-1 *in vitro*, inverse Zymographie

Die Produktion von funktionsfähigem TIMP-1 durch adenoviral infizierte A2-Zellen wurde mit der inversen Gelatine-Zymographie gezeigt. A2-Zellen wurden mit Ad-TIMP-1 in einer 400-fachen multiplicity of infection (MOI) infiziert. Überstände wurden an den Tagen 2,3,4 und 5 nach Infektion gesammelt. Die Proben wurden unter nichtreduzierenden Bedingungen auf 15%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel ist hier ein Copolymer aus Polyacrylamid, 0,1% Gelatine und 20 ng/ml aktivem, rekombinantem MMP-9. Nach der Elektrophorese wurde das Gel inkubiert und gefärbt wie bei der konventionellen Zymographie. Banden inhibitorischer Aktivität gegen MMP-9 erscheinen bei der inversen Zymographie dunkel auf hellem Hintergrund. Diese entsprachen mit einer Größe von 28kD TIMP-1.

1.2.3. Effizienz der adenoviralen Infektion *in vivo*

Wir untersuchten die Effizienz des adenoviralen Gentransfers nach intravenöser Applikation von $2,5 \times 10^{10}$ pfu Ad- β gal. In Lebern von DBA/2-Mäusen wurde auflichtmikroskopisch eine lacZ-Expression in 60% der Hepatozyten beobachtet. In Balb/c-Mäusen (Abb. 2) wurde ein vergleichbares Expressionsniveau erreicht.

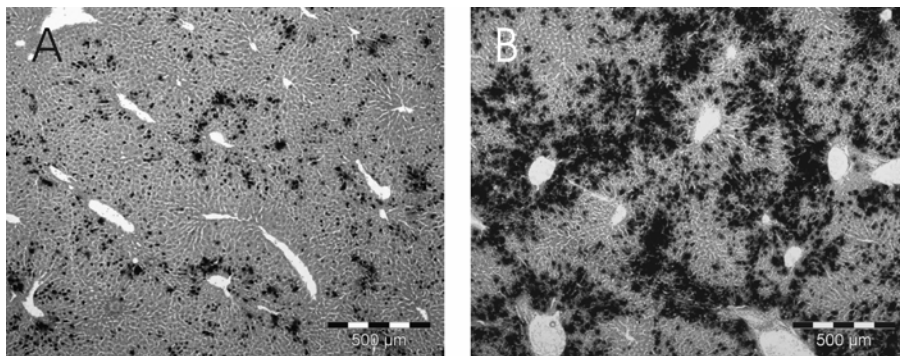


Abb. 2: lacZ-Expression der Leber nach systemischer Applikation von (A) 3×10^{10} oder (B) 6×10^{10} pfu Ad- β gal. 10 μ m Kryostatschnitte, X-Gal-Färbung, Gegenfärbung mit Kernechtrot, Balken = 0,5mm

1.2.4. Adenoviraler TIMP-1-Gentransfer erzielt im Vergleich mit transgenen Tieren ein weitaus höheres Expressionsniveau

Die TIMP-1 Überexpression bei transgenen Mäusen hat keine inhibitorische Wirkung auf experimentelle Metastasen von L-C1.5s [17]. Wir verglichen also die Expression bei transgenen Mäusen mit der Expression nach adenoviraler Infektion mit $2,5 \times 10^{10}$ pfu Ad-TIMP-1. Eine drastisch erhöhte TIMP-1-Expression in der Leber von adenovirusbehandelten Tieren wurde zunächst im Northern-Blot beobachtet, dann auf Proteinebene bestätigt.

Maus-TIMP-1 (Wildtyp und transgene Tiere) wurde mit einem kommerziellen Maus-TIMP-1-ELISA nachgewiesen. Adenovirales TIMP-1 wurde mit einem kommerziellen human-TIMP-1-ELISA nachgewiesen. Sowohl in der Leber als auch im Blutserum infizierter Mäuse war TIMP-1-Protein mehrere Größenordnungen höher konzentriert als bei Wildtyptieren oder transgenen Mäusen. Wir interpretieren daher die nachfolgend dargestellte Antitumorwirkung als konzentrationsabhängigen Effekt von TIMP-1.

1.2.5. Metastasierungsexperimente

Zwei Tage vor der Tumorinduktion wurden Balb/c und DBA/2-Mäusen je $2,5 \times 10^{10}$ pfu (plaque forming units) Ad-TIMP-1 oder Kontrollvirus systemisch verabreicht.

Im **L-CI.5s**-Experiment erhielten die Tiere entweder Ad-TIMP-1 oder Add170-3. Zwei Tage später wurden 5×10^3 der lacZ-markierten L-CI.5s-Zellen in die Schwanzvene injiziert. Sechs Tage nach der Tumorinduktion wurden die Tiere geopfert. Die Leber wurde komplett mit X-Gal gefärbt und am Auflichtmikroskop untersucht. Blaue Foci ($> 0,2$ mm) auf der Leberoberfläche wurden standardisiert ausgezählt. Eine Reduktion der Manifestationen um 94% ($p < 0.0001$) im Vergleich zur Kontrolle mit Leervirus und um 94% ($p < 0,0001$) im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (Abb. 5a) wurde beobachtet.

Im **CT-26**-Experiment erhielten die Tiere entweder Ad-TIMP-1 oder Ad- β gal. Zwei Tage später wurden 1×10^6 CT-26-Zellen über die operativ exponierte Milz verabreicht. Zwei Wochen nach der Tumorinduktion wurden die Tiere geopfert und ihre Lebern gewogen. Um den Tumoranteil der Lebern zu ermitteln, wurde der Quotient aus Tumor und Leber auf gestuften HE-Paraffinschnitten makroskopisch und mikroskopisch geschätzt und ein Mittelwert für jedes Tier berechnet. Der Mittelwert wurde mit dem Gesamtgewicht der Leber multipliziert, um die jeweilige Tumorlast zu errechnen.

Keine Unterschiede bestanden zwischen den Kontrollgruppen Ad- β gal und PBS (Abb. 5b nicht signifikant). Eine bemerkenswerte Reduktion der Tumorlast wurde in der Ad-TIMP-1-Gruppe festgestellt, i.e. um 75% versus PBS ($p = 0,053$ nicht signifikant) und um 73% versus Ad- β gal ($p = 0,01$).

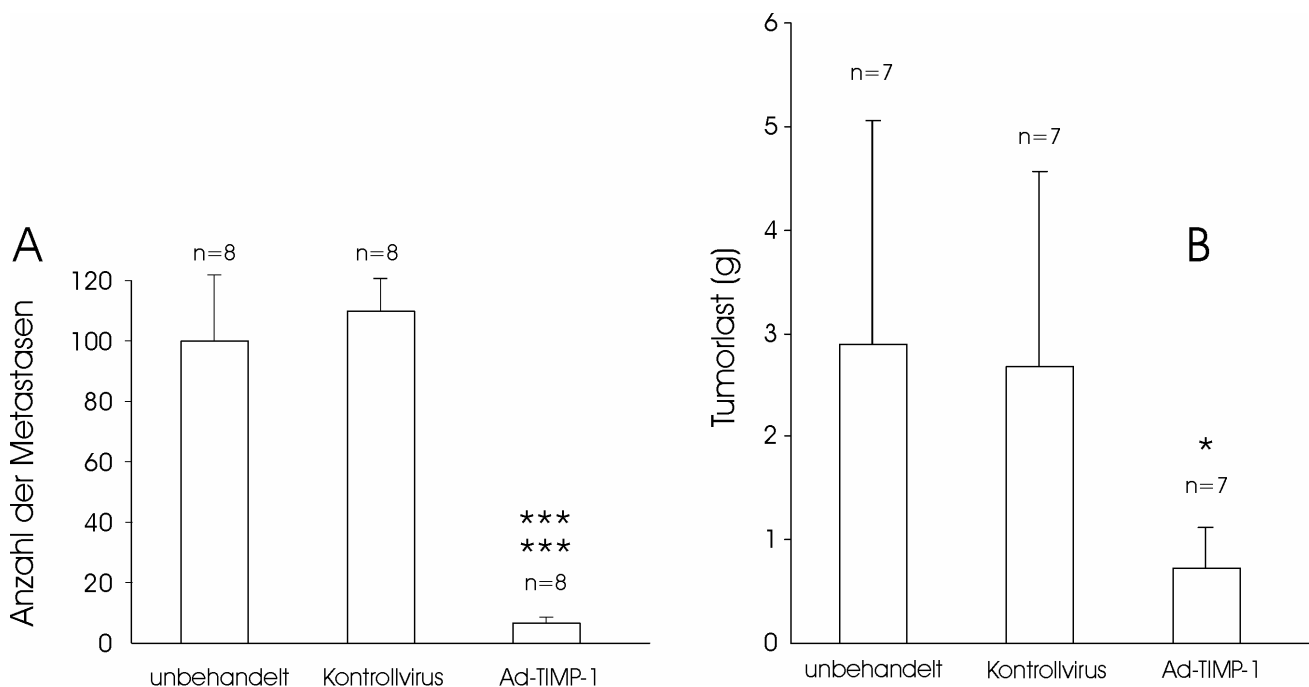


Abb. 3: Prävention von Lebermetastasen durch systemische Anwendung von Ad-TIMP-1 bei Mäusen. (A) L-CI.5s Lymphommodell (B) CT-26 kolorektales Karzinommodell.

1.3. Diskussion

In unserer Studie wurden mit adenoviralem Gentransfer stark erhöhte TIMP-1 Konzentrationen in der Leber erzielt. Die anschließende Konfrontation mit experimentellen kolorektalen Metastasen oder Lymphommanifestationen brachte eine weitestgehende Reduktion der Tumormasse. Den natürlichen Tropismus adenoviraler Vektoren für die Leber nutzend, konnten wir ein neues Konzept in der Gentherapie von Tumorerkrankungen anhand zweier unabhängiger Tiermodelle für Lebermetastasen bestätigen. Indem gesundes Organparenchym zum Angriffspunkt wird, kann es mit einem Resistenzfaktor gegen Metastasenwachstum ausgestattet werden.

Beim metastasierten Leiden ist die Zugänglichkeit des Gewebes über die Blutbahn für eine regionale oder systemische Chemotherapie unerlässlich. Metastasen haben oft einen erhöhten intratumoralen Druck, sind ausgedehnt nekrotisch und ungleichmäßig vaskularisiert. Demgegenüber erscheint das gesunde Organparenchym als vorteilhafterer Angriffspunkt, auch weil es sich besser mit Viren transduzieren lässt. Hierfür ist ein extrazellulär wirksamer Faktor wie TIMP-1 erforderlich.

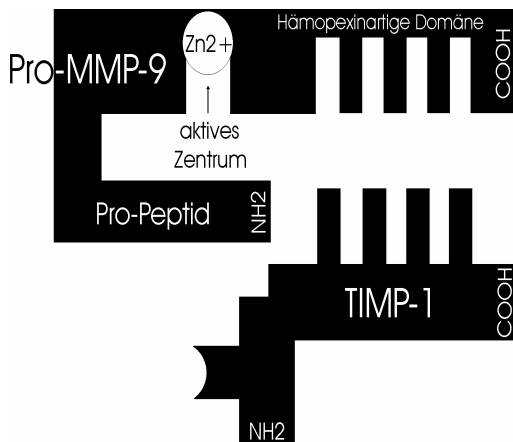
Eine akute, TIMP-1-assoziierte Toxizität ist nicht beschrieben, auch wir haben derartiges nicht beobachten können. Dennoch könnte sich TIMP-1 bei Langzeitexpression als problematisch erweisen. Eine eingehende Untersuchung dieser Frage ist unumgänglich, auch unter Berücksichtigung der negativen Erfahrungen mit kleinmolekularen Metalloproteinaseinhibitoren (MPI). In keiner der zahlreichen Phase-III-Studien konnte bisher ein klarer therapeutischer Nutzen von Bereitspektrum-MPIs bei fortgeschrittenen Krebserkrankungen bestätigt werden. Zudem traten, vor allem im Bereich des Bewegungsapparates, starke Beschwerden auf, so dass Studien abgebrochen werden mussten [25].

Zwischenzeitlich sind neue MPIs mit verbesserter Spezifität (mechanism based inhibitors) entwickelt worden, die der komplizierten Biologie der MMP-Inhibition besser Rechnung tragen sollen [26]. Tierexperimentelle Daten sind ermutigend. Am Beispiel von L-CI.5s ist kürzlich eine 80%ige Metastasenreduktion unter ähnlichen Versuchsbedingungen wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt worden [27]. Allerdings zeigt Ad-TIMP-1 im konkreten Beispiel bessere Wirkung. Inhibitoraktivitäten der hier beobachteten Größenordnung werden bei synthetischen Wirkstoffen auch durch deren Toxizität begrenzt.

Bei TIMP-1-überexprimierenden transgenen Tieren wurde eine gute Wirkung auf Primärtumoren der Haut und spontane Metastasen, jedoch nur geringe Wirkung auf experimentelle Lebermetastasen des L-CI.5s T-Zell-Lymphoms beobachtet [18]. Da mRNA und Proteinkonzentrationen nach Ad-TIMP-1-Applikation weitaus höher sind als bei transgenen Tieren denken wir, dass es die lokale TIMP-1-Konzentration entscheidet ob TIMP-1 antimetastatisch wirkt, oder die wachstumsfördernden Eigenschaften des Moleküls überwiegen.

Biphasische Effekte einer TIMP-1-Überexpression sind beschrieben [23] und vereinbar mit einer Konzentrationsabhängigkeit der TIMP-1-Wirkung. Ferner äußern sich TIMP-Wirkungen tumor- und organbezogen [8], auch das Wachstumsstadium der Tumorherde ist ausschlaggebend [24].

Die hohe lokale Konzentration eines Proteins wie TIMP-1 könnte vielleicht den Vorteil spezifitätsoptimierter MPIs kompensieren. Allerdings wird in neueren Arbeiten zunehmend auf MMP-unabhängige antiapoptotische [12], wachstumsfördernde [9] oder gar onkogene [25] Eigenschaften von TIMPs hingewiesen.



MMP-abhängige, vornehmlich N-terminale und MMP-unabhängige, C-terminale Funktionen sind jedoch miteinander verflochten und eine optimale MMP-Inhibition durch Wildtyp TIMPs erfordert beide Proteindomänen (Abb. 4) [29]. Durch Trunkierung am C-Terminus sollen unerwünschte Wirkungen eliminiert werden, N-terminale Mutationen sollen dabei die Spezifität für relevante MMPs verbessern und versprechen höhere inhibitorische Aktivität als die Wildtypproteine [30].

Abb. 4: Das N-terminale Ende von TIMP-1 bindet am aktiven Zentrum von MMP-9 und vermittelt eine reversible Inhibition. Erst die C-terminalen Enden verriegeln die Bindung. Das C-terminale Ende von TIMP ist jedoch auch Sitz MMP-unabhängiger, proliferativer Aktivität, ein entsprechender Rezeptor konnte noch nicht identifiziert werden. Nach [29].

Aufgrund der eher mangelhaften Spezifität der Wildtyp-TIMPs ist es unwahrscheinlich, dass das gesamte Ausmaß der TIMP-1-Wirkung über eine Hemmung von MMP-9 vermittelt wird, zumindest im CT-26-Modell scheint auch MMP-2 eine Rolle zu spielen (Abb. 1). Die Frage, weshalb im Zymogramm fast ausschließlich die latente MMP sichtbar ist erklärt sich zum Teil aus der lokalen Aktivierung der MMPs. Die latente MMP ist dabei nur ein Pool, der transkriptionell hoch reguliert wird, die Aktivierung erfolgt lokal angepasst an die benötigte Menge proteolytischer Aktivität durch eine andere, oft zellgebundene Protease und wird antagonisiert durch TIMPs und andere inhibitorische Faktoren. Darüber hinaus werden aktivierte MMPs an der ECM gebunden. Durch die komplizierten Regulierungsvorgänge wird die Proteaseaktivität im Zymogramm nur summarisch wiedergegeben [31,32].

Die Daten der vorliegenden Studie weisen auf einen interessanten Aspekt hin. Das Expressionsniveau von TIMP-1 scheint einen Einfluss auf die antimetastatische Wirksamkeit zu haben. Im Hinblick auf mögliche Mechanismen der antimetastatischen Wirksamkeit von TIMP-1 fanden wir eine diskrete aber signifikante Reduktion der Gefäßneubildung in Ad-TIMP-1 behandelten CT-26-Tumoren versus Kontrollvirus. Eine Hemmung der Angiogenese könnte zumindest teilweise den Antitumoreffekt erklären und ist als MMP-abhängige Wirkung von TIMP-1 einzuordnen [33].

Allerdings übt TIMP-1 eine stärkere Wirkung im angiogeneseunabhängigen [27] Lymphommodell aus. L-CI.5s ist, stärker noch als CT-26, mit einer spezifischen Hochregulation der pro-MMP-9 im Tumorkontext bei minimaler Expression in Zellkultur aufgefallen. Im CT-26 Modell ist MMP-2 stärker involviert. Das würde, unter Berücksichtigung des schlechteren outcome bei CT-26-Tumoren, die These stützen, MMP-9 sei in unserem Experiment der Hauptangriffspunkt. Worin liegt aber die Funktion der MMP-9 für die Lymphomzellen, wenn nicht in einer Induktion von Angiogenese? Wie bereits erwähnt führt der Abbau der ECM zu einer Freisetzung gebundener Cytokine und Wachstumsfaktoren, außerdem ist MMP-9 in der Lage,

Faktoren wie pro-TGF β oder pro-TNF α durch Abspaltung eines Propeptids zu aktivieren [12,34]. Die Relevanz dieser Vorgänge für L-CI.5s ist jedoch nicht experimentell belegt.

Die Produktion von MMP-2 und -9 im kolorektalen Tumormodell erfolgt sehr wahrscheinlich durch rekrutierte Wirtszellen. MMP-9 ist schon früh im Zusammenhang hämatologischer Fragestellungen beobachtet worden und wurde ursprünglich aus neutrophilen Granulozyten isoliert [35], kolorektale Karzinomzellen induzieren eine Gelatinaseproduktion in Monozyten [36]. Es wäre interessant, zu klären ob die im kolorektalen oder im Lymphommodell nachgewiesenen MMPs jeweils von Tumor- oder Wirtszellen sezerniert werden. Unsere Mikroarraydaten zur Invasionsfront kolorektaler Lebermetastasen unterstreichen die Bedeutung nichtheptozytärer Leberzellen bei der Metastasierung.

Die Funktion von TIMPs und MMPs ist abhängig von der jeweiligen Mikroumgebung und erscheint daher häufig paradox. In unserem Versuchsaufbau zeigte TIMP-1 eine klare Antitumorwirkung, unser gentherapeutisches Imprägnationskonzept wurde dadurch gestützt. Schwellenkonzentrationen müssen erreicht werden, um Lebermetastasen zu inhibieren. Behandlung und Schutz der für Metastasierung anfälligen Organe wie die Leber ist ein praktikables und für TIMP-1 bisher einzigartiges Konzept.