

**Die Regulation und Aktivierung von  
Matrix Metalloproteinasen  
durch Interaktionen von humanen Melanomzellen mit  
dermalen Fibroblasten und mikrovaskulären Endothelzellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Stefanie Löffek  
aus Essen

Köln 2005

**Berichterstatter:** Prof. Dr. T. Krieg

Prof. Dr. T. Langer

**Tag der mündlichen Prüfung:** 15.02.2005

*Für meine Eltern*

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>1.1</b>	<b>Das maligne Melanom: Invasion und Metastasierung</b>	<b>5</b>
1.1.1	Die extrazelluläre Matrix	7
1.1.2	Tumor-Stroma-Interaktionen	8
1.1.2.1	Zell-Matrix-Interaktionen	8
1.1.2.2	Zell-Zell-Interaktionen	9
1.1.3	Angiogenese	10
1.1.4	Tumorangiogenese	12
<b>1.2</b>	<b>Matrix Metalloproteinasen (MMPs)</b>	<b>14</b>
1.2.1	Struktur der MMPs	14
1.2.2	Regulation der MMP-Synthese und -Aktivität	16
1.2.3	Regulationsmechanismen der Transkription	17
1.2.4	Regulation durch Proenzym-Aktivierung	18
1.2.5	Inhibition der MMP-Aktivität	19
<b>1.3</b>	<b>Ziel dieser Arbeit</b>	<b>21</b>
<b>1.4</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien, Materialien und Puffer</b>	<b>25</b>
2.1.1	Chemikalien	25
2.1.2	Zellkulturmaterialien	25
2.1.3	Häufig verwendete Puffer	25
2.1.4	Enzyme, Kits und weitere Materialien	25
2.1.5	Antikörper	26
<b>2.2</b>	<b>Zellbiologie</b>	<b>29</b>
2.2.1	Zelllinien	29
2.2.2	Kulturbedingungen	29
2.2.3	Isolierung primärer Zellen aus humaner Haut	30
2.2.3.1	Isolierung primärer dermaler Fibroblasten durch Auswachsen	30
2.2.3.2	Isolierung von Zellen nach enzymatischem Abbau des Bindegewebes	30
2.2.3.3	Isolierung der humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMECs)	30
2.2.4	Herstellung von konditionierten Medien	31
2.2.5	Kokultur-Systeme von Melanomzellen mit Fibroblasten bzw. Endothelzellen (HDMECs)	31
2.2.6	Herstellung dreidimensionaler Gelsysteme	32
2.2.6.1	Kollagengele	32
2.2.6.2	Fibringele	32
2.2.6.3	Beschichtung der Objektträger mit einer Fibrin- bzw. Kollagenmatrix	33
2.2.7	Inhibition von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren	33

---

<b>2.3</b>	<b>Nukleinsäure Analysen</b>	<b>34</b>
2.3.1	RNS-Präparation mittels RNAzol	34
2.3.2	RNS Transfer	34
2.3.3	Northern Blot Analyse	34
2.3.4	Reverse Transkription und Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR)	35
<b>2.4</b>	<b>Methoden der Proteinbestimmung</b>	<b>36</b>
2.4.1	Konzentrierung von Proteinen durch TCA-Fällung	36
2.4.2	Bestimmung der Proteinmenge	36
2.4.3	Spezifischer Nachweis von Proteinen durch Immunoblot	36
2.4.4	Analyse der Gelatinasen durch Substrat-Zymographie	37
<b>2.5</b>	<b>Immunhistologie und -zytologie</b>	<b>38</b>
2.5.1	Herstellung und Fixierung der Gewebeschnitte und Zellkulturen	38
2.5.2	Hämalaun und Eosinfärbung (H&E)	38
2.5.3	Alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase (APAAP)	38
2.5.4	Immunfluoreszenz	39
<b>2.6</b>	<b>Analyse der Invasion und Metastasierung von humanen Melanomzellen im Mausmodell</b>	<b>40</b>
<b>2.7</b>	<b>IL-1 Inhibitionstudie im Mausmodell</b>	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Interaktion von Melanomzellen und Fibroblasten</b>	<b>41</b>
3.1.1	Charakterisierung der Melanomzelllinien im Mausmodell	41
3.1.2	Einfluss der Melanom-Fibroblasten-Interaktionen auf die Synthese von Matrix Metalloproteinasen	45
3.1.3	Lösliche Faktoren in der Regulation von Matrix Metalloproteinasen	47
3.1.4	Einfluss von wenig invasiven Melanomzellen auf stromale Zellen	49
3.1.5	Einfluss von Melanomzellen aus primären Melanomen und Metastasen auf stromale Zellen	50
<b>3.2</b>	<b>Quantifizierung von MMP- induzierenden Faktoren</b>	<b>52</b>
<b>3.3</b>	<b>Inhibitionsstudien</b>	<b>54</b>
3.3.1	Inhibition der IL-1- und bFGF-Signaltransduktion in Kokulturen von Melanomzellen mit Fibroblasten	54
3.3.2	Inhibition der IL-6- und EGF-Signaltransduktion in Kokulturen von Melanomzellen mit Fibroblasten	56
<b>3.4</b>	<b>Immunhistochemische Analyse von humanen Melanom Gewebeschnitten</b>	<b>60</b>
<b>3.5</b>	<b>IL-1-Inhibition im Mausmodell</b>	<b>62</b>
<b>3.6</b>	<b>Veränderte Genexpression in Fibroblasten nach Stimulation mit durch Melanomzellen-konditionierten Medien</b>	<b>65</b>
<b>3.7</b>	<b>Analyse der Interaktionen von humanen Melanomzellen mit humanen dermalen</b>	

---

<b>mikrovaskulären Endothelzellen (HDMECs)</b>	<b>68</b>
3.7.1  Präparation primärer dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen	68
3.7.2  Analyse der Interaktionen von Melanomzellen und Endothelzellen im zweidimensionalen Zellkultursystem	70
3.7.3  Analyse der Interaktion von Melanomzellen mit Endothelzellen in komplexen, dreidimensionalen Systemen	73
3.7.4  Identifizierung pro- und anti-angiogener Faktoren in hoch und wenig invasiven Melanomzellen	76
<b>3.8  Charakterisierung der löslichen Faktoren bei der Induktion tubulärer Strukturen in Endothelzellen</b>	<b>78</b>
<b>3.9  Modifizierung des Gelsystems zur Analyse von Zelloberflächenproteinen</b>	<b>80</b>
3.9.1  Bedeutung von Matrix Metalloproteinasen bei der Invasion der Fibringele	82
<b>4  Diskussion</b>	<b>87</b>
4.1  Charakterisierung hoch und wenig invasiver Melanomzellen im Mausmodell	87
4.2  Interaktionen zwischen Melanomzellen und dermalen Fibroblasten: Mechanismen für die Regulation von MMPs	88
4.3  Inhibition der IL-1-Signaltransduktion im murinen Modell	93
4.4  Das Stroma als Quelle für Chemokine und Zytokine	94
4.5  In-vitro-Modell der Melanomzell-induzierten Angiogenese	95
<b>5  Zusammenfassung und Abstract</b>	<b>101</b>
5.1  Zusammenfassung	101
5.2  Abstract	103

# 1 Einleitung

## 1.1 Das maligne Melanom: Invasion und Metastasierung

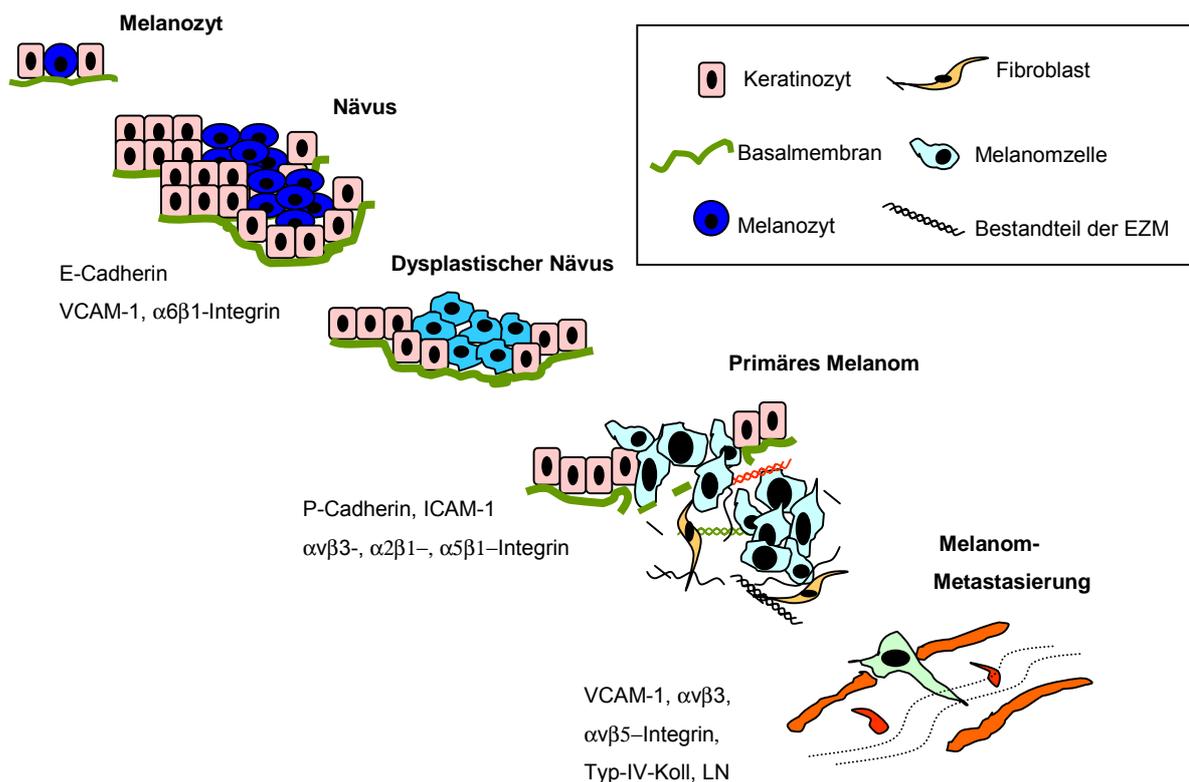
Die Entwicklung von Tumoren, deren Invasion und Metastasierung ist auf viele genetische Veränderungen zurück zu führen. Oftmals sind diese Veränderungen mit Mutationen in Genen assoziiert, die für Proteine der Zellzykluskontrolle kodieren, z.B. p53, die dann zur unkontrollierten Zellproliferation führen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine somatische „missense“-Mutation im *bRaf* Gen in 66% der untersuchten malignen Melanome, weniger häufig jedoch auch in anderen Tumoren auftritt (Davies *et al.*, 2002). Hierbei wurden insgesamt drei verschiedene Punktmutationen gefunden, die alle in der Kinase-Domäne der Serin/Threonin Kinase bRAF lagen. Alle drei Mutationen führten zu einer erhöhten Kinaseaktivität. Die hohe Frequenz dieser Mutation im Melanom scheint hierbei von der Melanozytenbiologie abhängig zu sein:  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon bindet den Melanocortin Rezeptor I, was zu einer cAMP-vermittelten Induktion der Zellproliferation und Melanogenese als Antwort auf UVB-Bestrahlung führt (Halaban, 2000). Diese Kaskade aktiviert in Folge bRAF und letztendlich die mitogenaktivierte Proteinkinase ERK (Busca *et al.*, 2000). Da diese Proliferations- und Differenzierungskontrolle spezifisch für Melanozyten ist, werden Mutationen in bRAF besonders im Melanom mit einer deutlich erhöhten Häufigkeit gefunden.

Eine Vielzahl wissenschaftlicher Veröffentlichungen der letzten Jahre zeigt jedoch ganz deutlich, dass neben der Tumorzelle auch das umgebende Stroma in der Tumorentwicklung eine bedeutende Rolle spielt (Labrousse *et al.*, 2004; Liotta *et al.*, 1983). Erste Ansätze in der Tumorthherapie, in denen das Stroma als Ansatzpunkt dient, zeigten bereits viel versprechende Erfolge (Ferrara *et al.*, 2004).

Die Invasion und Metastasierung des malignen Melanoms stellt einen komplexen Vorgang dar, der mit der Ablösung einzelner Tumorzellen vom Primärtumor eingeleitet wird (Abbildung 1). Diese Tumorzellen müssen im weiteren Verlauf in der Lage sein, verschiedene zelluläre und strukturelle Barrieren zu durchdringen, bevor sie an Gefäße des Lymph- und Blutsystems Anschluss erhalten und letztlich in tumorferne Organe metastasieren können. Zu diesen Barrieren zählt die Basalmembran der epidermo-dermalen Verbindungszone sowie das interstitielle Bindegewebe der Dermis. Während des invasiven Wachstums des Tumors spielen zwei Prozesse eine entscheidende Rolle. Die kontrollierte lokale Proteolyse der extrazellulären Matrix und die Interaktion

von Tumorzellen mit strukturellen und zellulären Dermis-Komponenten. Diese Interaktionen werden hauptsächlich über Integrine vermittelt (Fidler, 1983; Hart *et al.*, 1983; Liotta *et al.*, 1983; Nicolson und Rosenberg, 1987).

Neben Serin-, Aspartat- und Cysteinproteasen wird besonders Mitgliedern der Matrix Metalloproteinasen (MMPs) eine bedeutende Rolle bei der Degradation des Bindegewebes zugeschrieben (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993; Chen, 1996). Es werden jedoch nicht alle Proteasen von allen Tumorzellen synthetisiert. Eine wesentliche Eigenschaft der Melanomzellen ist deshalb ihre Fähigkeit, die Synthese dieser Proteasen in ortsständigen, stromalen Zellen zu induzieren. So konnte mittels *in situ* Zymographie am humanen Melanom gelatinolytische Aktivität in Zellen an der Tumor-Stroma-Grenze nachgewiesen werden (Kurschat *et al.*, 2002). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Interaktion von Tumorzellen und stromalen Zellen an der Regulation und Synthese von Matrix Metalloproteinasen beteiligt ist.

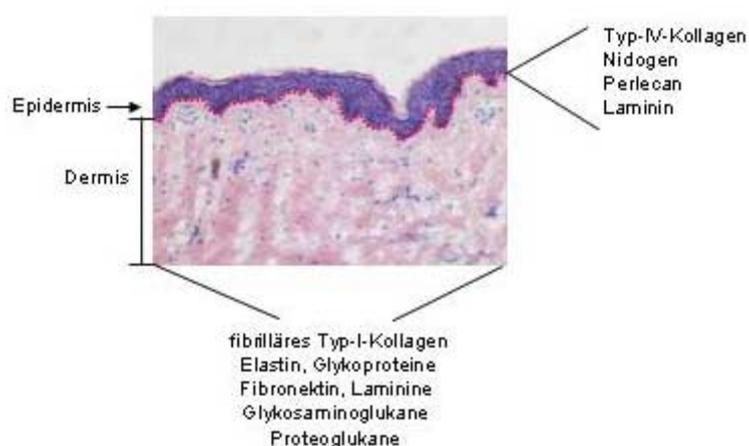


**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Melanomprogression und der exprimierten Adhäsionsmoleküle.** Die pathologische Veränderung von Melanozyten bis hin zum malignen Melanom korreliert mit der veränderten Expression von Adhäsionsmolekülen. VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule 1; ICAM-1 = intercellular adhesion molecule 1; EZM = extrazelluläre Matrix; Typ-IV-Koll I = Typ-IV-Kollagen; LN = Laminin.

### 1.1.1 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) besteht aus einer Vielzahl von Proteinen und Glykosaminoglukanen, die die interzellulären Zwischenräume des Bindegewebes ausfüllen oder die Basalmembran bilden (Aumailley und Gayraud, 1998; Timpl, 1996). Neben ihrer strukturellen Funktion dient die extrazelluläre Matrix auch als Reservoir für Zytokine und Wachstumsfaktoren.

Während die Basalmembran der Haut hauptsächlich aus nicht fibrillärem Typ-IV-Kollagen, Laminin, Perlecan und Nidogen besteht, setzt sich die Dermis aus einem breiten Spektrum an Proteinen zusammen (Abbildung 2). Hierzu gehören neben dem fibrillärem Typ-I-Kollagen, das den Hauptproteinbestandteil ausmacht, weitere Kollagene sowie Elastin, Glykoproteine und Strukturproteine wie Fibronectin, Laminine und Proteoglukane. Zelluläre Bestandteile der Dermis, vorwiegend Fibroblasten und mikrovaskuläre Endothelzellen, sind für die Produktion dieser Proteine verantwortlich. Insgesamt befinden sich in der extrazellulären Matrix weit über 100 verschiedene Typen von Makromolekülen, die eine sehr große funktionelle Varianz ermöglichen, wozu neben der strukturgebenden Aufgabe, auch Funktionen in der Signaltransduktion gehören. Die Bindung von Tumorzellen an die Komponenten der extrazellulären Matrix, hauptsächlich Integrin-vermittelt, aktiviert intrazelluläre Signaltransduktionsketten, welche dann einen direkten Einfluss auf die Expression proteolytischer Enzyme haben (Zigrino *et al.*, 2001).



**Abbildung 2: Histologischer Schnitt der Haut (H&E-Färbung).** Die Abbildung zeigt die Struktur gesunder Haut. Die rotgestrichelte Linie zeigt schematisch die Lokalisation der Basalmembran, welche die Epidermis von der Dermis trennt.

## 1.1.2 Tumor-Stroma-Interaktionen

Die Zell-Zell- und die Zell-Matrix-Adhäsion spielt während der Migration von Zellen, insbesondere während der Invasion von Tumorzellen eine zentrale Rolle. Während Integrine die Zell-Matrix-Interaktion vermitteln (Hynes, 1992), spielen Cadherine bei der Zell-Zell-Interaktion eine entscheidende Rolle (Yap *et al.*, 1997). Zwei weitere Mitglieder der Zelladhäsionsrezeptorfamilie stellen die Immunglobuline (Walsh und Doherty, 1997) und die Selektine dar (Krause und Turner, 1999).

### 1.1.2.1 Zell-Matrix-Interaktionen

Integrine sind Heterodimere, die aus zwei nicht kovalent assoziierten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten bestehen. Zurzeit sind 24 verschiedene Integrinrezeptoren bekannt, die durch Kombination von 18 unterschiedlichen  $\alpha$ -Untereinheiten und 8  $\beta$ -Untereinheiten entstehen (Hynes, 2002; Plow *et al.*, 2000). Die meisten Integrine sind vorwiegend Rezeptoren für Proteine der extrazellulären Matrix, vermitteln aber auch zum Teil die Bildung von Zell-Zell-Kontakten (Smith *et al.*, 1994).

Die Kombinationen der Untereinheiten bestimmen die Substratspezifität der Integrine (Plow *et al.*, 2000; van der Flier und Sonnenberg, 2001). Das häufigste Integrinbindemotiv ist die Tripeptidsequenz Arg-Gly-Asp (RGD) die auf extrazellulären Liganden wie Fibronectin, Vitronectin und denaturiertem Kollagen präsent ist (Ruoslahti und Pierschbacher, 1987). Synthetische Peptide, die diese RGD-Sequenz enthalten, inhibieren kompetitiv die Adhäsion von Zellen an Bestandteile der extrazellulären Matrix (Liaw *et al.*, 2001). Die Spezifität der RGD-Integrin-Wechselwirkung ist zum einen durch Variationen der RGD-Konformation in verschiedenen Proteinen, zum anderen durch Wechselwirkungen der Integrine mit Nachbarsequenzen der RGD-Bindungsstelle gewährleistet. Die Bindungsstelle für die Kollagenrezeptoren  $\alpha 1\beta 1$  und  $\alpha 2\beta 1$ , beide nicht RGD-abhängig, befindet sich im tripelhelikalen Bereichen des Kollagenmoleküles, was eine native Konformation des Kollagens für die Integrinbindung voraussetzt (Gullberg *et al.*, 1992; Kuhn und Eble, 1994).

In Folge der Ligandenbindung werden Mitglieder der src-Proteinkinasefamilie aktiviert und phosphorylieren Proteine, die mit der zytoplasmatischen Domäne der Integrine assoziiert sind. Weitere Signalwege schließen die Rho-ähnlichen GTPasen, Phospholipase Cy und die MAPK-Kaskade ein, die letztlich zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und zur veränderten Genexpression führen. Der Kontakt mit einer dreidimensionalen Matrix, bestehend aus fibrillären Typ-I-Kollagen, führt in

dermalen Fibroblasten zur  $\alpha 2\beta 1$ -vermittelten Induktion von MMP-1 (Langholz *et al.*, 1995) und MT1-MMP (Zigrino *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurde im gleichen System eine MT1-MMP vermittelte Aktivierung von proMMP-2 beobachtet (Zigrino *et al.*, 2001). Für die tumorinduzierte Angiogenese sind neben dem  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin besonders das  $\alpha v\beta 3$ - und  $\alpha v\beta 5$ -Integrin von großer Bedeutung. Beide Integrine,  $\alpha v\beta 3$  und  $\alpha v\beta 5$ , induzieren nach Ligandenbindung die Ras-ERK Signaltransduktion (Renshaw *et al.*, 1997), wodurch während der Angiogenese die Genexpression, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Migration der Endothelzellen reguliert wird. Durch Studien mit neutralisierenden Antikörpern konnte gezeigt werden, dass die bFGF-induzierte Angiogenese die Ras-ERK-Signaltransduktion über  $\alpha v\beta 3$  induziert, während die VEGF induzierte Angiogenese über das  $\alpha v\beta 5$ -Integrin ausgelöst wird (Friedlander *et al.*, 1995). Untersuchungen von Brooks *et al.* (1996) ergaben, dass  $\alpha v\beta 3$  mit MMP-2 interagiert. Dabei bindet MMP-2 in seiner proteolytisch aktiven Form an das Integrin und induziert somit die perizelluläre Proteolyse der migrierenden Endothelzellen. Immunhistochemische Studien am humanen Melanom zeigen eine differentielle Expression verschiedener Integrine ( $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  und  $\alpha v\beta 5$ ) während der malignen Progression (Danen *et al.*, 1994; Natali *et al.*, 1997; Natali *et al.*, 1995; Si und Hersey, 1994; ten Berge *et al.*, 1993). Diese Ergebnisse weisen auf eine zentrale Rolle in der Interaktion von Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix während der Invasion von Melanomzellen hin.

### 1.1.2.2 Zell-Zell-Interaktionen

Cadherine sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Adhäsionsmoleküle, die die Bindungen benachbarter Zellen miteinander vermitteln. Während der extrazelluläre Bereich der Cadherine die Zell-Zell-Adhäsion vermittelt, ist der intrazelluläre Teil über Catenine mit dem Aktinzytoskelett der Zelle verbunden. Die Nomenklatur der Cadherine orientiert sich an dem Gewebe, aus dem es zum ersten Mal isoliert wurde. Daher unterscheidet man E-(epithelial), N-(neural) und P-(placental) Cadherine.

Für Cadherine konnte ebenfalls eine Veränderung in der Expression während der Melanomprogression gezeigt werden. Während Melanozyten und Nävuszellen E-Cadherin exprimieren, um den Zell-Zell-Kontakt mit Zellen der Epidermis aufrecht zu erhalten, kommt es während der malignen Transformation zu einer reduzierten E-Cadherin-Expression, die durch eine starke Expression von N-Cadherin abgelöst wird (Hsu *et al.*, 2000; Sanders *et al.*, 1999). Dieser Prozess führt zu einem verminderten

Kontakt zu epidermalen Zellen und fördert den Kontakt zu mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten und Endothelzellen. Eine ähnliche Veränderung in der Cadherin-Expression konnte sowohl im Plattenepithelkarzinom als auch für Prostatakrebs beschrieben werden (Islam *et al.*, 1996; Tomita *et al.*, 2000).

Da die N-Cadherin vermittelte Interaktion zwischen Tumorzellen und stromalen Zellen, z.B. Fibroblasten zur vermehrten proMMP-Synthese und -Aktivierung führt, postulierten Gruss und Herlyn (2001) eine potentielle Rolle von Cadherinen in der Regulation proteolytischer Enzyme während der Tumordinvasion.

Der Transmembranrezeptor EMMPRIN vermittelt homophile und heterophile Zell-Zell-Adhäsion, die auf noch unbekannte Weise zur Induktion der Synthese von MMPs führen (siehe 1.2.3). Arbeiten der letzten Jahre weisen darauf hin, dass es neben dem membrangebundenen EMMPRIN auch eine lösliche Form des Proteins gibt. Die genauen Mechanismen, die zur Freisetzung von membrangebundenem EMMPRIN führen, werden derzeit kontrovers diskutiert. Während Tang *et al.* (2004) von einer MMP-vermittelten Abspaltung des extrazellulären Bereichs von EMMPRIN sprechen, postulieren Sidhu *et al.* (2004) eine Freisetzung des gesamten EMMPRIN-Moleküls über eine Mikrovesikelabspaltung. Für letztere Annahme spricht, dass im konditionierten Medium von NCI-H460 Zellen sowohl der C- als auch der N-terminale Bereich des Proteins nachgewiesen werden konnte. Weiterhin konnte im Lungenkarzinom gezeigt werden, dass MMP-1 an EMMPRIN bindet und somit eine perizelluläre Proteolyse von Kollagen einleitet.

### 1.1.3 Angiogenese

Das Gefäßsystem hat seinen ontogenetischen Ursprung in der Vaskulogenese. Während der Embryonalentwicklung differenzieren hämatopoetische Stammzellen mesodermaler Herkunft über Angioblasten zu Endothelzellen, die die als vaskuläre Lakunen bezeichneten Blutinseln umschließen. Durch Fusionierung bildet sich ein primitives Netzwerk aus, der so genannte primäre vaskuläre Plexus (Risau und Flamme, 1995). Dieser Prozess ist ausschließlich auf die Embryonalentwicklung beschränkt und wird im adulten Organismus von der Angiogenese abgelöst.

Als Angiogenese bezeichnet man die Bildung neuer Blutgefäße ausgehend von bereits existierenden Gefäßen. Man unterscheidet dabei zwischen einer sprossenden und nicht sprossenden Variante (Carmeliet, 2000). Die längsseitige Teilung einer Kapillare durch Einschnürung über intrakapillar einwachsende Endothelzellbrücken führt zur Gefäßvermehrung nach nicht-sprossendem Muster. Dem Vorkommen nach wichtiger

scheint jedoch die Neovaskularisation durch Sprossung und die daraus resultierende Verzweigung bestehender Blutgefäße. Im adulten Organismus kommt dieser Prozess im physiologischen Kontext beinahe vollständig zum Erliegen, lediglich im weiblichen ovariellen Zyklus findet noch regelhaft angiogene Gefäßbildung statt. Davon abgesehen ist die Angiogenese ausschließlich mit physiologischen und pathologischen Vorgängen, wie der Wundheilung, Entzündungen und der Tumorvaskularisierung, assoziiert.

Im Allgemeinen handelt es sich bei der Angiogenese um einen ausgewogenen Prozess, in dem induzierende und inhibierende Faktoren streng kontrolliert interagieren. Zu den angiogenen Faktoren gehören in erster Linie Wachstumsfaktoren wie VEGF, bFGF, TNF- $\alpha$ , IL-8, HGF und TGF, aber auch Hormone wie Angiopoietine 1 und 2. Durch Bindung der Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren (meist Tyrosinkinase-Rezeptoren) induzieren sie Signaltransduktionskaskaden, die meist zu einer induzierten Transkription von proteolytischen Enzymen oder Matrix-Adhäsionsrezeptoren führen (Tabelle 1). Die Familie der „vascular endothelial growth factors“ setzt sich aus mehreren Mitgliedern zusammen. Während VEGF-A und VEGF-B die Ausbildung von Blutgefäßen induzieren, nehmen die Faktoren VEGF-C und VEGF-D eine bedeutende Rolle in der Bildung lymphatischer Gefäße ein. PlGF, ein VEGF-Homolog induziert angiogene Prozesse ausschließlich unter pathologischen Prozessen.

Als erster endogener Angiogeneseinhibitor wurde Thrombospondin-1 entdeckt, welcher von gesunden Zellen produziert wird, während der malignen Progression jedoch verloren geht. Im Verlauf der letzten Jahre konnten eine ganze Reihe weitere Angiogeneseinhibitoren identifiziert werden. Neben Angiostatin und Endostatin, beides Fragmente, die bei der proteolytischen Spaltung von Matrixproteinen (Plasminogen und Typ-XVII-Kollagen) entstehen, spielen auch die endogenen Inhibitoren der MMPs, die TIMPs, eine bedeutende Rolle in der Inhibition der Angiogenese (Fernandez *et al.*, 2003; Moses, 1997).

Promotoren	Inhibitoren
VEGF	Angiostatin
bFGF	Endostatin
IL-8	Tumstatin
FGF	Platelet Faktor-4
Endothelin	IL-12
Angiogenin	IFN $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$
Angiopoitin-1	Thrombospondin 1, 2

**Tabelle 1: Regulation der Tumorangiogenese durch Angiogenese- Promotoren und -Inhibitoren.**

#### 1.1.4 Tumorangiogenese

Tumorstadium und -entwicklung sind von der ausreichenden Versorgung mit Nährstoffen abhängig. Ohne ausreichende Vaskularisation ist die Tumorstadiumgröße auf 2-3 mm begrenzt, da der Bedarf an Sauerstoff und Glukose durch die Diffusion in das Gewebe nicht gedeckt werden kann. Viele Tumore induzieren durch die Stimulierung benachbarter Endothelzellen eine Aussprossung bestehender Gefäße auf den Tumor zu (Abbildung 3). Bei diesem Prozess werden zunächst die Zell-Zell-Kontakte zwischen den Endothelzellen durch das von Melanomzellen sezernierte VEGF gelöst. Weiterhin sorgt die Bindung von Angiopoitin-2 and den Tie-2-Rezeptor zu einer Ablösung der Perizyten, die die Endothelien umgeben. Lösliche, von Tumorzellen sezernierte Faktoren, zu denen VEGF, bFGF, TNF- $\alpha$  und Angiopoitin-1 gehören aktivierten die Endothelzellen, wodurch diese verstärkt proliferieren und chemotaktisch in Richtung des angiogenen Reizes migrieren, wodurch sie neue Kapillaren ausbilden und verlängern. Damit tragen sie zu einer Vaskularisierung des Tumors bei. Während  $\alpha v \beta 3$ - $\alpha v \beta 5$ - und  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrinrezeptoren Zell-Matrix-Kontakte vermitteln, stabilisieren insbesondere VE-Cadherin und PECAM bereits gebildete Gefäße.

Die Sekretion angiogener Faktoren erfolgt zum einen durch die Tumorzellen selbst, kann jedoch auch durch infiltrierte Entzündungszellen induziert werden.

Anhand von migrierenden Endothelzellen konnten Montesano und Orci (1985) zeigen, dass MT1-MMP bei der perizellulären Proteolyse von Kollagen eine führende Rolle spielt. Diese Ergebnisse konnten von anderen Autoren auch für Fibrinmatrizes verifiziert werden (Hiraoka *et al.*, 1998).

Während sich konventionelle Therapien weiterhin auf die Bekämpfung der Tumorzellen selber zielen, richten sich neuere Ansätze, meist durch den Einsatz inhibierender Antikörper, nur gegen proliferierenden Endothelzellen.

Aufgrund der bedeutenden Rolle von VEGF in der tumorinduzierten Angiogenese befinden sich derzeit mehrere Inhibitoren in klinischen Studien. Darunter befinden sich alleine vier verschiedene Tyrosinasekinase-Inhibitoren die sich gegen die VEGF-Rezeptoren-1 und -2 richten (Sivakumar *et al.*, 2004). Dennoch zeigten klinischen Studien einiger VEGF-Antagonisten der ersten Generation, zu denen unter anderem der VEGF-Antikörper Avastin (Genentech) zählt, ernüchternde Resultate.

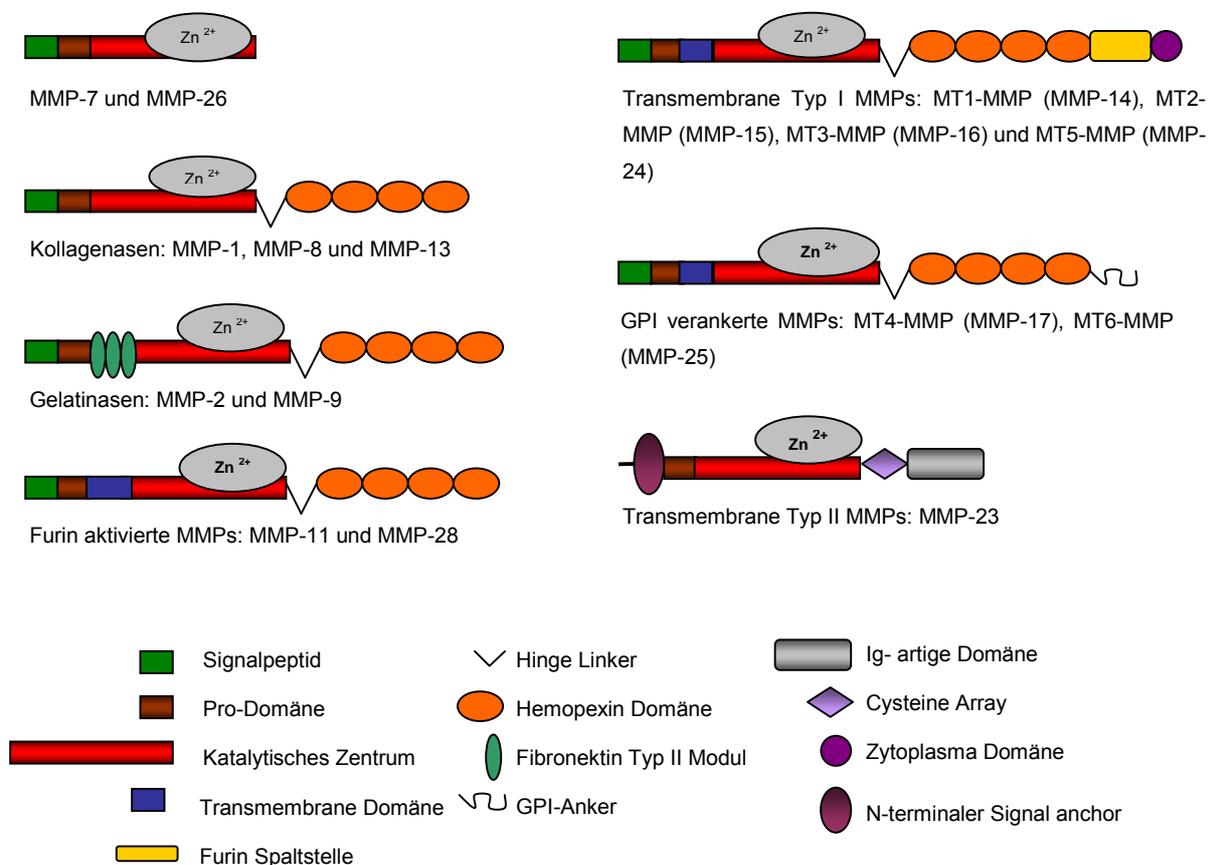


**Abbildung. 3: Tumorinduzierte Angiogenese.**  
12 Tage nach intradermaler Injektion von humanen Melanomzellen in Nacktmäuse ist eine starke Vaskularisierung des kutanen Tumors sichtbar.

## 1.2 Matrix Metalloproteinasen (MMPs)

### 1.2.1 Struktur der MMPs

MMPs gehören zu einer Familie von  $Zn^{2+}$ -abhängigen Endopeptidasen, die an der proteolytischen Spaltung aller bislang beschriebenen Proteine der extrazellulären Matrix beteiligt sind. Diese Familie umfasst derzeit 25 Mitglieder, die aufgrund ihrer strukturellen Merkmale sowie ihrer Substratspezifität in vier größere Untergruppen unterteilt werden: Kollagenasen, Stromelysine, Gelatinasen und die membranständigen MMPs, die so genannten MT-MMPs (membrane type MMPs) (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Die Familie der Matrix Metalloproteinasen.** Die Abbildung zeigt die Domänenstruktur innerhalb der MMP-Familie (modifiziert nach Somerville *et al.*, 2003).

Allen extrazellulären MMPs ist ein ca. 20 Aminosäuren langes Signalpeptid gemeinsam, welches während der Sezernierung abgespalten wird. Mit Ausnahme der MMPs, die intrazellulär durch Furin aktiviert werden können (MT-MMP, MMP-11, MMP-23 und MMP-28) (Kang *et al.*, 2002; Pei und Weiss, 1995; Sato *et al.*, 1996), werden alle MMPs als inaktive Zymogene in den Extrazellularraum sezerniert. Verantwortlich für die enzymatische Latenz ist das 80 Aminosäuren umfassende Propeptid am N-Terminus der katalytischen Domäne. Die katalytische Domäne komplexiert ein Zinkion im aktiven Zentrum, in dem drei Histidine der hochkonservierten Sequenz „HExxHxxGxxHS/T“ Liganden für dieses Zinkion darstellen. Ein vierter Ligand wird durch ein im Propeptid lokalisiertes, reduziertes Cystein vermittelt. Dieses Cystein befindet sich ca. 100 bis 150 Aminosäuren N-terminal in der konservierten PRCGVDP-Sequenz. Die Cystein-Zink Bindung bewirkt eine Verdrängung des katalytisch notwendigen H<sub>2</sub>O-Moleküls und führt außerdem zu einer Rückfaltung des Propeptids über die katalytische Domäne und somit zur Blockade des Substratzugangs in das aktive Zentrum. Dieses von Springmann *et al.* (1990) und van Wart und Birkedal-Hansen (1990) vorgeschlagene „Cystein-switch“ Modell konnte durch Strukturanalysen von proMMP-1 und proMMP-3 bestätigt werden (Becker *et al.*, 1995; Morgunova *et al.*, 1999); (siehe dazu Abbildung 5).

Bei den meisten MMPs wird die katalytische Domäne über eine prolinreiche Region mit der Hemopexin-C Domäne verbunden. Diese Domäne dient den Kollagenasen und MMP-3 als Bindedomäne an natives Kollagen. Weiterhin spielt dieser Sequenzabschnitt bei der Bindung von Inhibitoren eine entscheidende Rolle. Die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 besitzen am N-Terminus zusätzliche Fibronectin-Typ-II-Module, die der Bindung an Gelatine (denaturiertes Kollagen) dienen.

Membranständige MMPs zeichnen sich weiterhin durch eine transmembrane und eine zytoplasmatische Domäne aus. Zwei membranständige MMPs (MT4- und MT6-MMP) sind hingegen C-terminal über Glykosylphosphatidylinositol Moleküle (GPI) an der Zellmembran verankert.

Im Gegensatz zu allen anderen MMPs sind die Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18 und MT1-MMP) in der Lage, fibrilläres Kollagen an spezifischen Stellen in zwei Fragmente zu spalten. Dabei entstehen ein N-terminales  $\frac{3}{4}$  TC<sup>A</sup> und ein C-terminales  $\frac{1}{4}$  TC<sup>B</sup> Fragment (Krane *et al.*, 1996). Bei Körpertemperatur denaturieren diese Fragmente zu Gelatine und werden dadurch den Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9), die lediglich nicht-tripel-helikale Bereiche von Kollagenen spalten können,

zugänglich und schließlich degradiert (Kahari und Saarialho-Kere, 1999). Die Untergruppe der Stromelysine kann, neben einem breiten Spektrum verschiedener Kollagene (Typ-II-, -IV-, -IX- und -X-Kollagen), auch Laminin und Fibronectin degradieren.

Neben der proteolytischen Degradation von Proteinen der extrazellulären Matrix konnte von einzelnen MMPs gezeigt werden, dass sie auch Komponenten degradieren, die nicht stromaler Herkunft sind. So konnte für eine Reihe von MMPs gezeigt werden, dass sie die bioaktive Funktion von Matrix-gebundenen Wachstumsfaktoren erhöhen können, indem sie diese von der Matrix freisetzen. Whitelock *et al.* (1996) konnten unter Verwendung von domänenspezifischen Antikörpern gegen Endothelzellen sezerniertes Perlecan eine Bindedomäne für bFGF identifizieren, was darauf schließen lässt, dass Perlecan als Reservoir für Wachstumsfaktoren im Endothel dient. Insbesondere humanes Stromelysin (MMP-3) und die Ratten Kollagenase sind an der proteolytischen Freisetzung von Perlecan-gebundenem bFGF beteiligt.

Dekarin, ein Proteoglykan, nimmt eine zentrale Funktion bei der Bindung von TGF- $\beta$ 1 ein. MMP-2, MMP-3 und MMP-7 sind in der Lage Dekarin in mehrere Fragmente zu spalten, was eine Freisetzung von aktivem TGF- $\beta$ 1 zur Folge hat (Imai *et al.*, 1997).

Weiterhin konnte für MMP-3 und MMP-7 eine zentrale Rolle in der Zell-Invasion gezeigt werden: Indem sie E-Cadherin aus den Desmosomen spalten, verursachen sie den Verlust der Zell-Zell-Aggregation (Noe *et al.*, 2001; Steinhilber *et al.*, 2001).

### **1.2.2 Regulation der MMP-Synthese und -Aktivität**

Während in der gesunden Haut MMPs nicht oder nur in sehr geringen Mengen produziert werden, kommt es durch bestimmte Stimuli (z.B. Verletzung, UV-Bestrahlung) oder in pathologischen Prozessen (z.B. Tumoren) zur Neusynthese dieser Proteasen (Benbow *et al.*, 1999; Wlaschek *et al.*, 1995). Die Synthese und Aktivierung der inaktiven proMMPs wird auf unterschiedlichen Ebenen reguliert. Dazu zählt die Regulation der Transkription, z.B. durch Zytokine und Wachstumsfaktoren (Karin *et al.*, 1997; Reitamo *et al.*, 1994) oder die post-transkriptionale Regulation, durch Erhöhung der mRNA-Stabilität (Overall *et al.*, 1991; Vincenti *et al.*, 1996). Die Neusynthese von inaktiven Proenzymen und die Aktivierung der latenten Vorläuferproteine durch Serinproteasen und anderen MMPs stellen weitere Regulationsmechanismen dar (Overall, 1994; Stetler-Stevenson *et al.*, 1989). Extrazelluläre aktive MMPs können durch MMP-spezifische Inhibitoren, die TIMPs, inhibiert werden (Apte *et al.*, 1995).

### 1.2.3 Regulationsmechanismen der Transkription

Die transkriptionale Regulation der MMPs kann zum einen durch lösliche Faktoren, z.B. IL-1, IL-6, IL-8, bFGF, EGF und VEGF, zum anderen aber auch durch Veränderungen in der Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktion moduliert werden.

Zytokine und Wachstumsfaktoren, die von Melanomzellen oder inflammatorischen Zellen sezerniert werden, können somit eine zentrale Rolle in der Kommunikation zwischen Zellen und der daraus resultierenden perizellulären Proteolyse von Matrixkomponenten einnehmen. So sind beispielsweise Melanomzellen in der Lage, durch die Abgabe löslicher Faktoren eine erhöhte Transkription von MMPs in benachbarten stromalen Zellen zu induzieren. Zu den Proteinen, die über direkte Zell-Zell-Kontakte die Transkription verschiedener MMPs regulieren, gehört EMMPRIN (Caudroy *et al.*, 2002; Kanekura *et al.*, 2002). Bei diesem Protein, das erstmals von Biswas *et al.* (1995) aus den humanen Lungenkarzinomzellen LX-1 isoliert und charakterisiert wurde, handelt es sich um ein Transmembranprotein, welches sowohl im normalen Epithel als auch in stark erhöhten Mengen im Tumorepithel nachgewiesen wurde.

Die Stimulation von Fibroblasten und Endothelzellen mit EMMPRIN, das von Melanomzellen isoliert wurde, führte zu einer gesteigerten Synthese von MMP-1, MMP-2 und MMP-3 (Caudroy *et al.*, 2002; Kataoka *et al.*, 1993). Zusätzlich konnten Sameshima *et al.* (2000) eine erhöhte Synthese der membranständigen MMPs, MT1- und MT2-MMP, in Kokulturen von humanen Glioblastomzellen mit Fibroblasten zeigen. Die an diesen Interaktionen beteiligten Rezeptoren sind jedoch bislang unbekannt.

Die detaillierte Analyse von MMP-Promotorregionen zeigte, dass induzierbare MMPs an konservierten Positionen im Promoterbereich PEA-3 cis- und AP-1 Elemente aufweisen, welche spezifisch von Ets-Proteinen bzw. Mitgliedern der Jun- und Fos-Proteinfamilie gebunden werden (Benbow und Brinckerhoff, 1997).

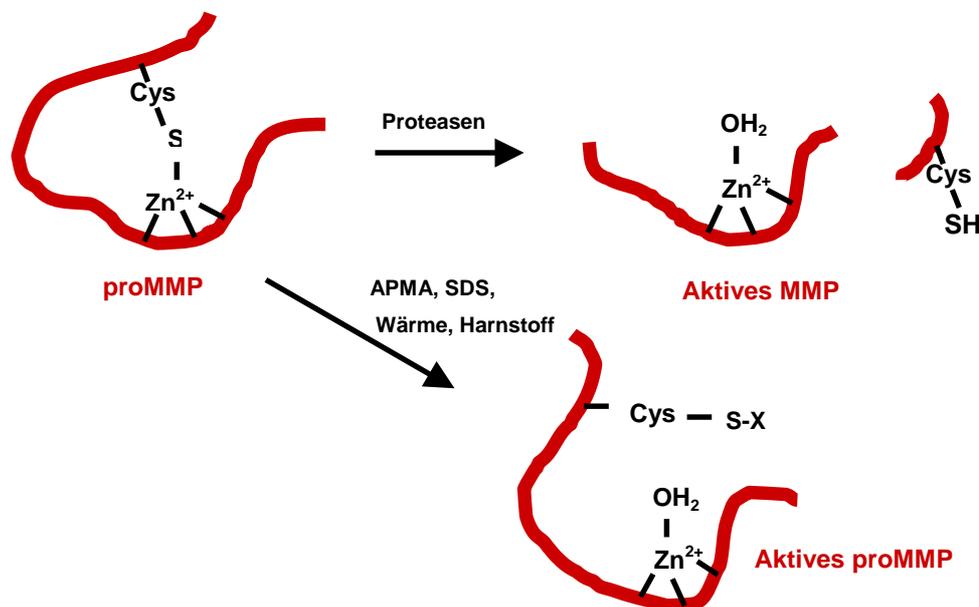
Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren ist das Resultat der Phosphorylierung von mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK). Hierzu gehören die „extracellular stimulus regulated kinases“ (ERKs), die „c-Jun N-terminal kinases“ (JNKs) und die p38 Kinasen (Kahari und Saarialho-Kere, 1997). Die JNKs und ERKs erhöhen zum einen die Transkription von c-Jun, zum anderen stabilisieren sie jedoch auch die DNS-Bindung von c-Jun an die Promotoren. Die p38 Kinasen hingegen aktivieren die Transkriptionsfaktoren ATF-1, Elk-1 und SAP-1, was dann zu einer erhöhten

Transkription von c-jun und c-fos führt.

### 1.2.4 Regulation durch Proenzym-Aktivierung

Die Aktivierung von MMPs erfolgt über drei unterschiedliche Mechanismen (Nagase, 1997): die schrittweise Aktivierung, die Aktivierung an der Zelloberfläche und die intrazelluläre Aktivierung.

Bei der schrittweisen Aktivierung wird das Propeptid zunächst durch Serinproteasen z.B. Plasmin, uPA oder Cathepsinen gespalten. Die Spaltung erfolgt in der „bait“-Region die in der Mitte des Propeptides lokalisiert ist. Wie schematisch im „Cystein-switch“-Modell in Abbildung 5 dargestellt, wird dadurch die Interaktion zwischen dem komplexierten Cystein des Propeptids und dem Zinkion zunehmend destabilisiert. Der nächste Schritt führt zur meist autokatalytischen, kompletten Entfernung des Propeptids. *In vitro* können MMPs auch durch Harnstoff, SDS, APMA und Wärme aktiviert werden. Hierbei kommt es im ersten Schritt zur Bildung eines MMP-Zwischenprodukts. Die vollständige Aktivierung erfolgt schließlich über eine proteolytische Spaltung durch andere MMPs.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des „Cystein-switch“-Modells der MMP-Aktivierung (modifiziert nach (Nagase, 1997)).** Im inaktiven MMP-Molekül ist das  $Zn^{2+}$ -bindende Zentrum durch die Interaktion mit einem Cysteinrest des Propeptides verdeckt. Nach proteolytischer Spaltung des Propeptides oder Konformationsänderungen, induziert zum Beispiel durch APMA, SDS, Harnstoff und Wärme kommt das  $Zn^{2+}$ -Ion in Kontakt mit Wasser und wird so aktiviert.

Bei der Aktivierung von MMPs an der Zelloberfläche kommt es zu einer Interaktion mehrerer MMPs und deren Inhibitoren, den TIMPs. Die am besten beschriebene Aktivierung dieser Art ist die Aktivierung von proMMP-2 (Sato *et al.*, 1994). Hierbei bildet sich ein trimolekularer Komplex, bestehend aus MT1-MMP und TIMP-2, die eine Art „Rezeptor“ für proMMP-2 bilden. Die proteolytische Abspaltung eines Teils des Propeptids erfolgt durch eine benachbarte, freie MT1-MMP. Das so entstandene 62 kDa schwere, partiell aktivierte MMP-2-Intermediat geht dann durch Autokatalyse in den voll aktiven, 59 kDa schweren Zustand über (Hofmann *et al.*, 2000). Cowell *et al.* (1998) konnten weiterhin zeigen, dass *in vitro* proMMP-13 ebenfalls durch MT1-MMP aktiviert werden kann.

Die MT-MMPs, MMP-11, MMP-23 und MMP-28 besitzen zusätzlich eine Furin-Erkennungssequenz (RXKR) am Übergang vom Propeptid zur katalytischen Domäne (Pei *et al.*, 2000; Pei und Weiss, 1995; Seiki, 1999). Dies ermöglicht die Aktivierung der MMP bereits während des Sekretionsprozesses. *In-vitro*-Daten zeigen, dass Furin auch an der extrazellulären MT1-MMP-Aktivierung an der Zelloberfläche beteiligt ist (Pei *et al.*, 2000).

### 1.2.5 Inhibition der MMP-Aktivität

Die spezifische Inhibition der MMPs erfolgt in Gegenwart der endogenen Inhibitoren, der TIMPs (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases). Die TIMPs stellen eine Familie von vier verwandten Proteinen dar, die je nach Glykosylierung ein Molekulargewicht von 20 bis 30 kDa besitzen. TIMPs werden von einer Großzahl von Zelltypen synthetisiert, zu denen unter anderem Fibroblasten und Keratinozyten gehören (Kahari und Saarialho-Kere, 1999) In der Regel werden sie jedoch spezifisch von den Zellen synthetisiert, die auch MMPs sezernieren (Overall, 1994).

Ihre inhibitorische Wirkung entfalten sie über einen dem „Cystein-switch“ analogen Mechanismus: Die Carbonyl- und Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure der TIMPs komplexiert das Zinkion im aktiven Zentrum der MMPs und verhindert damit die Bindung des für die Katalyse wichtigen Wassermoleküls (Tschesche, 1998). Der C-terminale Abschnitt der TIMPs geht gleichzeitig eine Bindung mit der Hämopexin-Domäne der MMPs ein (Kleiner *et al.*, 1993). Viele Arbeiten weisen darauf hin, dass sich die einzelnen TIMPs in der Affinität der Bindung an die verschiedenen MMPs unterscheiden (Henriet *et al.*, 1999; Olson *et al.*, 1997). TIMP-2, ein nicht-glykosyliertes, 21 kDa großes Protein, bindet nicht nur an proMMP-2 und bewirkt so dessen Rekrutierung zur Plasmamembran. Es bindet auch direkt an das katalytische Zentrum

der MT1-MMP und verhindert so deren Aktivität (Bode *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 2003). Während TIMP-2, primär die Inhibition von MMP-2 und MT1-MMP vermittelt, kann TIMP-1, ein 28 kDa großes glykosyliertes Protein, ein breites Spektrum von MMPs, zu denen MMP-1 und MMP-3 gehören, mit unterschiedlicher Affinität inhibieren.

Viele Arbeiten der letzten Jahre weisen darauf hin, dass die Expression von TIMPs durch Tumorzellen mit deren Invasivität korreliert. So ist z.B. die Synthese von TIMP-1 und TIMP-2 in wenig invasiven Melanomzellen im Vergleich zu hoch invasiven Melanomzellen um das zehnfache erhöht (Kurschat *et al.*, 1999). Diese Daten zeigen, dass Änderungen des Verhältnisses von MMP zu deren Inhibitoren den Abbau extrazellulärer Matrix bei der Tumorinvasion modulieren können.

### **1.3 Ziel dieser Arbeit**

Die proteolytische Aktivität von Melanomgewebe ist hauptsächlich an der Invasionsfront des Tumors und an Orten von Tumor-Stroma-Interaktionen lokalisiert. Dies konnten Kurschat *et al.* (2002) durch *in-situ*-Zymographie zeigen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung der aus diesen Ergebnissen abgeleiteten Hypothese, dass die Interaktion von Melanomzellen mit stromalen strukturellen und zellulären Komponenten von großer Bedeutung ist für die Regulation des Bindegewebsabbaus, der während der Invasion und Metastasierung der Tumorzellen stattfindet. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten dann Mechanismen der tumorinduzierten Angiogenese analysiert werden.

In einem ersten Schritt sollten daher verschiedene Melanomzelllinien in einem Mausmodell *in vivo* hinsichtlich ihres invasiven Verhaltens charakterisiert werden. Zelllinien mit hohem und niedrigem Invasionspotential sollten dann *in vitro* in unterschiedlichen Kokultur-Systemen auf die molekularen Mechanismen der Interaktion zwischen Melanom- und Stromazellen hin analysiert werden. Bei dieser Untersuchung sollte sowohl die Beteiligung direkter Zell-Zell-Kontakte als auch der Einfluss löslicher Faktoren bei der Regulation von MMP-Synthese und -Aktivierung in dermalen Fibroblasten analysiert werden. Besonderes Augenmerk sollte auf die Bedeutung der interstitiellen Kollagenase MMP-1 gelegt werden. Ergänzend zu den Zelllinien sollten Zellen aus primären Melanomen und Organmetastasen von Patienten isoliert und in den unterschiedlichen Kokultur-Systemen mit stromalen Fibroblasten kultiviert werden. Durch den Einsatz neutralisierende Antikörper die spezifisch Zytokine oder Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren inhibieren sollte anschließend die Frage beantwortet werden, ob die induzierte MMP-Synthese durch Inhibition der Tumor-Stroma-Interaktion moduliert werden kann.

Die *in vivo* Relevanz der Tumor-Stroma-Interaktion in der Regulation der MMP-Synthese und -Aktivierung sollte anschließend in einem Mausmodell überprüft werden. Dabei sollte zum einen ein besonderes Augenmerk auf Tumor-Stroma-Interaktionen während der Invasion der Tumorzellen gelegt werden. Weiterhin sollte die Metastasierung in verschiedene Organe mittels PCR detektiert werden.

Die gerichtete Einwanderung von Gefäßen in das Bindegewebe, das den Tumor

umgibt, erfordert eine erhöhte proteolytische Aktivität. Es lässt sich daher vermuten, dass Melanomzellen mikrovaskuläre Endothelzellen zur Sezernierung proteolytischer Enzyme stimulieren können. Um dies zu untersuchen sollte ein dreidimensionales Kultursystem etabliert werden, welches es ermöglicht die molekularen Mechanismen der tumorinduzierten Angiogenese zu analysieren. Mit Hilfe dieses „Angiogenese-Assays“, neutralisierenden Antikörpern gegen Wachstumsfaktoren und Proteasen-Inhibitoren sollten die Faktoren identifiziert werden, die die Elongation und Migration von Endothelzellen in einer dreidimensionalen Matrix bewirken.

## 1.4 Abkürzungen

APMA	p-Amino phenylmercuric acetate
AP-1	Activator Protein-1
aFGF	Fibroblast growth factor, acidic
bFGF	Fibroblast growth factor, basic
bp	Basenpaar
BSA	Bovin Serum Albumin
cDNS	Komplementäre DNS
CD31	Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindol
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylen diamino tetracetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EMMPRIN	Extracellular matrix metalloproteinase inducer, CD147
ERK	Extracellular stimulus regulated kinase
FKS	Fötales Kälber Serum
GPI	Glykosylphosphatidyl-inositol
HDMEC	Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
HGF	Hepatocyte growth factor
HRP	Horseradish Peroxidase
HMB-45	Monoclonal Antibody to Melanoma, Clone HMB
IEP	Isoelektrischer Punkt
IgG	Imunglobulin
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
ITS	Insulin/Transferin/Sodium Selenite
JNK	Jun N-terminal kinase
kb	Kilobasenpaare

---

kDa	Kilodalton
LCA	Leukocyte Common Antigen
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MMPs	Matrix Metalloproteinasen
MOPS	M-Morpholin propan sulphonic acid
MT-MMP	Membrane Type Matrix Metalloproteinase
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEA-3	Polyoma enhancer activator
PECAM	Platelet-endothelial cell-adhesion molecule
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol myristate acetate
RANTES	Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
SDS	Natriumdodecyl-Sulphate
SSC	Standard saline citrate puffer
TBE	Tris borate EDTA buffer
TBS	Tris buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
TdT	Recombinante Terminale deoxynucleotidyl Transferase
TGF- $\beta$ 1	Transforming growth factor beta 1
TIMsP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tris	Tris(hydroxymethyl) aminoethan
tPA	Tissue type Plasminogen aktivator
TSP-1	Thrombospondin-1
UEA	Ulex europaeus
uPA	Urokinase Plasminogen aktivator
uPAR	Urokinase-type plasminogen activator receptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
w/v	Gewicht pro Volumen
v/v	Volumen pro Volumen

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Materialien und Puffer

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalien und Materialien stammten, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Amersham Pharmacia (Freiburg), Biozym (Oldendorf), Roche (Mannheim), Life Technologies (Karlsruhe), Merk (Darmstadt), Promega (Mannheim) und Sigma (Taufkirchen) und wurden im analytischen Reinheitsgrad eingesetzt.

#### 2.1.2 Zellkulturmaterialien

Die allgemeinen Zellkulturmaterialien stammten von der Firma Greiner (Solingen). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) und die nicht-essentiellen Aminosäuren von der Firma Gibco BRL (Eggenstein), RPMI1640 Medium und fötales Kälberserum von der Firma PAA (Cölbe) und das Endothelial Cell Medium MV von der Firma Promocell (Heidelberg). Die Zusätze L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin stammten von der Firma Biochrom AG (Berlin).

#### 2.1.3 Häufig verwendete Puffer

PBS	(137 mM NaCl; 2,7 mM KCL; 8,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,4 mM KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,4)
TBS	(20 mM Tris; 137 mM NaCl, pH 7,6)
20x SSC	(3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0)
100x Denhards	(2% Ficoll; 2% Polyvinylpyrrolidon; 2% BSA)
Trypsin/EDTA	(0,1% Trypsin; 0,02% EDTA)
Hybridisierungspuffer	(5x Denhards; 0,1% SDS; 50% Formamid; 5x SSC; 0,1 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNS; 10% Dextransulfat; 5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
18S Hybridisierungspuffer	(5x Denhards; 0,5% SDS; 35% Formamid; 6x SSC)

#### 2.1.4 Enzyme, Kits und weitere Materialien

Kollagenase Typ I	Worthington
Fibrin Gel <i>in vitro</i> Angiogenese Assay Kit	Chemicon International

Fibrinogen, Plasminogen-depleted	Calbiochem
Thrombin	Sigma
Kollagen	Vitrogen
Random Primed DNA Labeling Kit	Boehringer Mannheim
Klenow Enzyme	Boehringer Mannheim
Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT)	GibcoBRL®
RNA-Marker	Fermentas
RNase Inhibitor	Roche
Reverse Transkriptase	Roche
REDtaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix	Sigma
Mark 12	Invitrogen
Seebblue	Invitrogen
BCA Protein Assay	Pierce
DAKO® Faramount Aqueous Mounting Medium	Dako
Tissue-Tek® O.C.T.™	Sakura

## ELISA

Quantikine® human IL-1 $\alpha$	R&D Systems
Quantikine® human bFGF	R&D Systems

## Proteinanalyse

RayBio® human Angiogenesis Antibody Array	RayBiotech, Inc.
---	------------------

## 2.1.5 Antikörper

### Primäre Antikörper

Monoclonal Anti-human basic FGF	
Clone bFM-1	Biozol
Monoclonal Anti-human CD31 (PECAM)	
Clone JC70A	Dako
Monoclonal Antibody to CD45 (Leukocyte Common Antigen)	
Clone 2B11&PD7/26/16	BioGenex

---

Monoclonal Anti-human EGF Clone 10825	R&D Systems
Monoclonal Fibroblast-specific Anitbody,Thy-1 Clone AS02	Dianova
Rabbit Anti-human MMP-1	Prof. P. Angel, Heidelberg
Rabbit Anti-human Collagenase-1	Neo Markers
Monoclonal Anti-human MMP-3	Calbiochem
Monoclonal Anti-human TIMP-1	Calbiochem
Monoclonal Antibody to Melanoma, Clone HMB-45, Mouse IgG <sub>1</sub>	BioGenex
Monoclonal Anti-human IL-1 $\alpha$ Antibody, Clone 4414.141	R&D Systems
Monoclonal Anti-human Interleukin 6 Clone 17506.11	R&D Systems
Monoclonal Anti-human VEGF Clone 26503	R&D Systems
Monoclonal Anti-human IL-6 R Antibody, Clone 17506.11	R&D Systems
Goat Anti-mouse MMP-13	Chemicon
Rabbit Anti-human MT1-MMP, Clone MTK3	Dr. Nagase, Imperial College, London, UK

**Rezeptorantagonisten**

Rekombinant human IL-1RA	R&D Systems
--------------------------	-------------

**Sekundäre Antikörper**

Horseradish Peroxidase Rabbit Anti-Mouse IgG, IgG Fraction of Antiserum	Dako
--	------

Horseradish Peroxidase Porc Anti-Rabbit IgG, IgG Fraction of Antiserum	Dako
---	------

Dako EnVision™ Labelled Polymer, Alkaline Phosphatase	Dako
--	------

Goat Anti-Maus (Alexa 488)	Alexa
----------------------------	-------

Goat Anti-Rabbit (Alexa 494)	Alexa
------------------------------	-------

**Zellisolation**

Anti-Fibroblast MicroBeads	Miltenyi Biotec
----------------------------	-----------------

Dynabeads® M-280 <i>Ulex europaeus 1</i>	Dynal
---	-------

(UEA, Lectin, Biotin labeled from <i>Ulex europaeus</i> )	Sigma
---	-------

**Rekombinante Proteine**

Die verwendeten rekombinanten Proteine stammten von den Firmen Tebu (Offenbach) und R&D Systems (Wiesbaden).

## 2.2 Zellbiologie

### 2.2.1 Zelllinien

Bei den untersuchten Zellen handelte es sich um primäre humane dermale Fibroblasten und primäre dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMECs). Die Kokultivierung dieser Zellen erfolgte mit der hoch invasiven Melanomzelllinie BLM (van Muijen *et al.*, 1991), sowie der wenig invasiven Melanomzelllinie WM164 (Herlyn *et al.*, 1990). Weitere Analysen erfolgten mit Zellen aus primären Melanomen bzw. Hautmetastasen.

### 2.2.2 Kulturbedingungen

Humane Fibroblasten wurden auf Zellkulturplatten in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kultiviert, dem Medium zusätzlich 10% FKS, 2% Glutamin, Penicillin und Streptomycin [100 U/ml] und 0,28 mM Ascorbinsäure zugesetzt wurde.

Die Kultivierung der humanen mikrovaskulären Endothelzellen erfolgte in Endothelial Cell Medium MV in Kombination mit dem Supplement Mix (0,4% ECGS/H; 5% FKS; 10 ng/ml EGF; 1 µg/ml Hydrocortison; 50 ng/ml Amphotericin B; 50 µg/ml Gentamicin).

Die Melanomzelllinien wurden in RPMI 1640 Medium mit dem Zusatz von 10% FKS, 2% Glutamin, Penicillin und Streptomycin [100 U/ml] und nicht-essentiellen Aminosäuren (AS) kultiviert.

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank der Firma Heraeus.

Konfluente Kulturen wurden je nach Proliferationsrate alle drei bis vier Tage im Verhältnis 1:3 bis 1:5 subkultiviert. Hierzu wurde der Zellrasen zunächst mit PBS gewaschen und nach Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA (1% Trypsin; 2,5% EDTA) mit dem jeweiligen Medium resuspendiert und verdünnt auf die Zellkulturschalen ausgesät.

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Für alle Versuche, bei denen eine definierte Zellzahl erforderlich war, wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm<sup>2</sup>) bestimmt.

Für die Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu wurde das Trypsinat der Zellen bei 2000xg und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert, das Zellsediment in 10% DMSO/FKS resuspendiert und anschließend in Kryo-Röhrchen der Firma Sarstedt aliquotiert. Diese wurden über Nacht bei -80°C inkubiert und dann für mehrere Monate bei -180°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

## 2.2.3 Isolierung primärer Zellen aus humaner Haut

### 2.2.3.1 Isolierung primärer dermaler Fibroblasten durch Auswachsen

Normalhaut-Biopsien wurden mit Hilfe eines Skalpells in ca. 2 cm<sup>2</sup> Stücke geschnitten und auf den Boden von Zellkulturschalen gelegt. Nach ca. 2 h wurden die Zellkulturschalen mit Medium geflutet. Das Auswachsen der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2.3.2 Isolierung von Zellen nach enzymatischem Abbau des Bindegewebes

Hautbiopsien gesunder Spender bzw. Melanome wurden mit Hilfe eines Skalpells in ca. 2 cm<sup>2</sup> Stücke geschnitten und 1 bis 2 h bei 37°C in Kollagenasepuffer (130 mM NaCl; 10 mM Calcium-Acetat; 20 mM Hepesbuffer pH 7,2; 0,5% BSA; 400 U/ml Kollagenase Typ I) inkubiert. Diese Zellsuspension wurde über einen Nylonfilter mit der Porengröße 70 µm (Falcon/BectonDickenson) gegeben, das Filtrat für 5 min bei 2000xg zentrifugiert und als Einzellsuspension auf Zellkulturschalen ausgesät. Die Auswahl des Kulturmediums erfolgte je nach kultiviertem Zelltyp.

Die Depletion der Fibroblasten erfolgte mit Hilfe von MS Trennsäulen (Miltenyi Biotec) und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die hierbei verwendeten „beads“ richteten sich spezifisch gegen ein 112 kDa großes IgG2a Epitop, welches von Fibroblasten exprimiert wird (Fearn und Dowdle, 1992).

### 2.2.3.3 Isolierung der humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMECs)

HDMECs wurden mit Hilfe von *Ulex europaeus 1* (UEA, Lectin, Biotin labeled from *Ulex europaeus*) isoliert, welches spezifisch an α-L-Fucosyl Reste von Glykoproteinen bindet, die von Endothelzellen exprimiert werden.

50 µg UEA wurden an 10x 10<sup>7</sup> Dynabeads<sup>®</sup> M-280 Streptavidin in einem Arbeitsvolumen von 500 µl 1% BSA/PBS über Nacht bei 4°C gebunden.

Der Zellrasen einer Kulturplatte (Ø 10 cm) wurde mit 2,5 ml 1% BSA/PBS überschichtet und mit den an UEA gekoppelten Dynabeads inkubiert. Sobald eine spezifische Bindung der Dynabeads an die Endothelzellen erreicht worden war, wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen, die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und die Endothelzellen mit Hilfe des Magnetsystems der Firma Dynal isoliert. Zur Kontrolle der Reinheit der Zellpopulation wurden 2x 10<sup>4</sup> Zellen/Kammer auf 8-Kammer-Objektträger

(Falcon/BectonDickenson) ausgesät und für 48 h in Endothelzellmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem Aceton fixiert und die Reinheit der erhaltenen Zellpopulation durch Nachweis der Expression des platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM) und des Fibroblasten-spezifischen Proteins (Thy-1) überprüft. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines AP-konjugiertem anti-mouse/anti-rabbit Polymer (siehe 2.5.4).

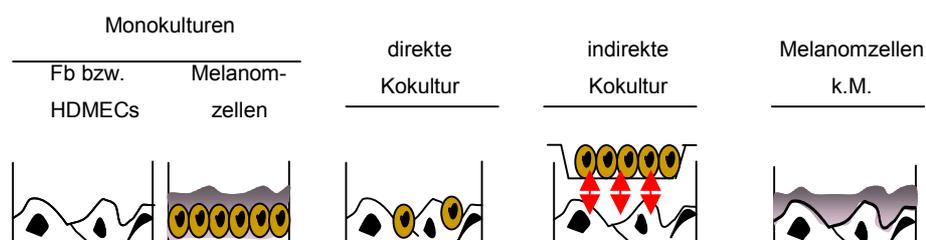
Alle gezeigten Ergebnisse an den in unserem Labor isolierten Endothelzellen wurden an kommerziell erworbenen, humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen der Firma Promocell verifiziert.

## 2.2.4 Herstellung von konditionierten Medien

Zur Gewinnung konditionierter Medien wurden 50.000 Zellen/cm<sup>2</sup> als Monokulturen in Kulturplatten ausgesät und für 48 h in RPMI Komplettmedium (RPMI, 10% FKS; 2% Glutamin; Penicillin und Streptomycin [100 U/ml] und AS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für weitere 24 h unter FKS- und Phenolrot-freien Bedingungen inkubiert. Konditionierte Medien für die Stimulation stromaler Zellen, wurden auch diese 24 h in RPMI Komplettmedium bzw. Endothelzellmedium kultiviert. Zur Entfernung von Zellfragmenten wurden die Medien zentrifugiert (5 min, 2000xg), der Überstand in ein neues Gefäß überführt und bei 4°C aufbewahrt.

## 2.2.5 Kokultur-Systeme von Melanomzellen mit Fibroblasten bzw. Endothelzellen (HDMECs)

Melanomzellen wurden mit Fibroblasten bzw. mikrovaskuläre Endothelzellen in drei verschiedenen Systemen kokultiviert (Abbildung 6). Als Kontrollen dienten Monokulturen der entsprechenden Zelltypen.



**Abbildung 6: Verwendete Kokultur Systeme.** Fb = Fibroblasten; HDMECs = humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen; k.M. = konditioniertes Medium.

Um den Einfluss von direkten Zell-Zell-Kontakten auf die Regulation der Synthese von MMPs zu analysieren, wurden gleiche Zellzahlen von Melanomzellen und Fibroblasten bzw. Melanomzellen und Endothelzellen miteinander gemischt und in einer Zelldichte von  $5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Die Beteiligung von löslichen Faktoren bei der Interaktion stromaler Zellen mit Melanomzellen wurde durch eine indirekte Kokultivierung analysiert. Unter Verwendung eines Transwelleinsatzes (0,4 µm Porengröße, Falcon/BectonDickenson) wurden die verschiedenen Zelltypen durch eine semipermeable Membran, die den Durchtritt löslicher Faktoren erlaubt, voneinander getrennt. Fibroblasten wurden im unteren Kompartiment, Melanomzellen im Transwelleinsatz ausgesät. Um den Einfluss löslicher Faktoren, die von Melanomzellen produziert werden, in der Interaktion zu überprüfen, wurden Fibroblasten bzw. Endothelzellen zusätzlich in Medium kultiviert, welches zuvor durch Melanomzellen konditioniert wurde (siehe 2.2.4 Herstellung konditionierter Medien). Die Kultivierung aller Systeme erfolgte für 48 h in RPMI Komplettmedium bzw. in Endothelzellmedium und für weitere 24 h in Serum- und Phenolrot-freiem Medium bzw. Endothelzell Basis Medium. Zur Entfernung von Zellfragmenten wurden die Medien zentrifugiert (5 min, 2000xg), der Überstand in ein neues Gefäß überführt und bei 4°C aufbewahrt.

## 2.2.6 Herstellung dreidimensionaler Gelsysteme

### 2.2.6.1 Kollagengele

Die Kollagengele wurden wie in Mauch *et al.* (1988) beschrieben hergestellt. Typ-I-Kollagen (finale Kollagenkonzentration im Gel war 1 mg/ml) wurde mit 5x DMEM und FKS vermischt und durch Zugabe von NaOH neutralisiert. Die Polymerisation der Kollagengele erfolgte in 48-Lochplatten (500 µl pro Loch) über Nacht im Brutschrank. Anschließend wurden  $5 \times 10^4$  Zellen pro ml Medium in einem Gesamtvolumen von 500 µl Endothelzellmedium pro Loch ausgesät.

### 2.2.6.2 Fibringele

Zur Analyse der tumorinduzierten Angiogenese wurde das „Fibringel *in-vitro*-Angiogenesis Assay Kit“ der Firma Chemicon verwendet. Da es sich hierbei um ein FKS-freies System handelt, konnte eine Kontamination durch MMPs aus dem FKS ausgeschlossen werden. Fibrinogen und Thrombin wurden nach Herstellerangaben miteinander gemischt, in 4-Kammer-Objektträger ausgesät und für 30 min im Brutschrank inkubiert. HDMECs wurden in einer Zelldichte von  $5 \times 10^4$  Zellen pro ml

Medium in einem Gesamtvolumen von 500 µl Endothelzellmedium pro Kammer ausgesät. Zur Induktion tubulärer Strukturen wurden die Endothelzellen mit PMA (50 nM) und ITS (Insulin, Transferrin, Natrium-Selenit, einfach konzentriert) stimuliert. Für die Inhibitionsstudien wurde den Endothelzellen durch eine zweistündige Inkubation im Brutschrank die Adhäsion an die Fibrinmatrix erlaubt und das Medium dann gegen ein von Melanomzellen konditioniertes Medium ausgetauscht, welches den Inhibitor Phenanthrolin (5 µM), den Serinproteaseninhibitor Aprotinin (5 µM) bzw. neutralisierende VEGF- (0,24 µg/ml) und bFGF- (50 µg/ml) Antikörper beinhaltet. Nach 24 h erfolgte die mikroskopische Auswertung. Zur weiteren Analyse wurden die Zellen für weitere 24 h in Endothelial Cell Medium MV ohne Zugabe des Supplement Mix inkubiert. Die serumfreien Überstände wurden abgenommen und die Fibringele unter Verwendung eines Dismembrators (Retsch) lysiert (Lafleur *et al.*, 2002). Die Überstände und Fibringellysate wurden für die weitere Analyse von MMPs verwendet.

### **2.2.6.3 Beschichtung der Objektträger mit einer Fibrin- bzw. Kollagenmatrix**

Das Fibringel für die Beschichtung von Objektträgern mit einer Fibrinmatrix setzte sich wie folgt zusammen: 450 µl Fibrinogen (10 mg/ml; Calbiochem), 500 µl FKS, 3,05 ml H<sub>2</sub>O und 1 ml 5x DMEM wurden miteinander gemischt und je 500 µl davon pro Kammer in 4-Kammer-Objektträger gegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von je 0,7 µl Thrombin (10 mg/ml; Sigma). Im Anschluss wurde so viel des Gels abgenommen, dass nur noch eine dünne Beschichtung zurück blieb.

Das Gel zur Beschichtung der Objektträger mit Typ-I-Kollagen setzte sich wie folgt zusammen: 600 µl Kollagen (3 mg/ml), 400 µl 5x DMEM, 200 µl FKS, 700 µl H<sub>2</sub>O und 100 µl NaOH. Die Objektträger wurden für 30 min bei 4°C inkubiert und im Anschluss das ungebundene Gel abgenommen.

HDMECs wurden anschließend in einer Zelldichte von  $5 \times 10^4$  Zellen pro ml Medium in einem Gesamtvolumen von 500 µl Endothelzellmedium pro Kammer ausgesät und für 24 h inkubiert.

### **2.2.7 Inhibition von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren**

Fibroblasten wurden in einer Zelldichte von 50.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in 100 µl RPMI Kompletmedium bzw. 25% des Melanomzellen konditionierten Mediums in 48-Lochplatten ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in Gegenwart steigender Konzentrationen der neutralisierenden Antikörper (anti-bFGF: 10, 50, 100 µg/ml; anti-IL-

1 $\alpha$ : 5, 30, 50 ng/ml; anti-EGF: 0,5, 1  $\mu$ g/ml; anti-IL-6: 5, 30,50 ng/ml; anti-IL-6R: 10, 50 ng/ml) und des rekombinanten IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1RA: 2, 10, 100 ng/ml). Nach 48 h wurde der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen und die Fibroblasten für weitere 24 h in 100  $\mu$ l FKS und Phenolrot-freiem RPMI kultiviert. Als Kontrollen dienten zum einen unbehandelte Fibroblasten und zum anderen Fibroblasten in 25% des durch Melanomzellen konditionierten Mediums ohne Zugabe neutralisierender Antikörper.

## **2.3 Nukleinsäure Analysen**

Für die RNS-Präparation wurden 50.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in Zellkulturplatten ( $\varnothing$ 10 cm) in 10 ml RPMI (10% FKS; 2% Glutamin; Penicillin und Streptomycin [100 U/ml] und AS) für 48 h kultiviert. Anschließend wurde der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen in 3 ml FKS- und Phenolrot-freiem Medium für weitere 24 h kultiviert.

### **2.3.1 RNS-Präparation mittels RNAzol**

Die Präparation der RNS erfolgte mit RNAzol nach Angaben des Herstellers. Das luftgetrocknete RNS-Präzipitat wurde in 20 bis 50  $\mu$ l DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert und die Konzentration und Reinheit mittels UV-Spektroskopie ( $\lambda$  = 260/280 nm) bestimmt. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten. Der Reinheitsgrad der RNS wurde durch den Quotienten der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm ermittelt und lag zwischen 1,8 und 2,0.

### **2.3.2 RNS Transfer**

Zur elektrophoretischen Trennung der RNS wurden 5 bis 10  $\mu$ g der RNS-Proben mit Denaturierungspuffer (0,02 M MOPS; 6 M Formaldehyd; 50% Formamid; 50  $\mu$ g/ $\mu$ l Ethidiumbromid; 0,04% Bromphenolblau; 0,04% Xylene Cyanol) in einem Verhältnis von mindestens 1:4 versetzt und für 10 min bei 68°C denaturiert. In einem Agarosegel mit 1% (w/v) Formaldehyd wurde die RNS in 1 $\times$  MOPS-Puffer bei 50 V elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend wurde das Gel 10 min in 2 $\times$  SSC gewaschen und die RNS dann mittels Kapillar-Transfer auf eine Hybond-N<sup>+</sup>™ Nylonmembran (Amersham) transferiert. Der Transfer erfolgte über Nacht. Als Transferpuffer wurde 20 $\times$  SSC eingesetzt. Durch eine 5-minütige Inkubation der Membran in 0,05 N NaOH wurde die RNS fixiert.

### **2.3.3 Northern Blot Analyse**

Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Nylonmembran erfolgte

bei 42°C für mehrere Stunden im Hybridisierungspuffer. Zur Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde wurden je 25 bis 50 ng der cDNS-Fragmente für 10 min bei 100°C denaturiert. Die Herstellung der Sonde erfolgte nach Angaben des Herstellers unter Verwendung des „Random Prime DNS Labeling Kit“ (Boehringer Mannheim). Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch eine Ethanol-fällung entfernt und das Präzipitat in 100 µl TE aufgenommen.

1 µl dieser Sonde wurde zur Bestimmung des Einbaus der radioaktiven Nukleotide im Szintillationszähler abgenommen, der Rest der Sonde 10 min bei 95°C denaturiert.

Die so hergestellte radioaktive Sonde wurde in den Hybridisierungspuffer zur Membran gegeben und über Nacht bei 42°C inkubiert.

Gen	Größe (bp)	Schnittstellen	Referenz
MMP-1	1800	XbaI/NotI	(Angel <i>et al.</i> , 1987)
MT1-MMP	1100	EcoR1	(Okada <i>et al.</i> , 1995)

**Tabelle 2: Liste der verwendeten cDNS-Fragmente.**

Anschließend wurde die Membran unter stringenten Bedingungen in 2x SSC/0,1% SDS und 0,1x SSC/0,1% SDS gewaschen.

Da es sich bei der 18S-Sonde um ein 24-mer Oligonukleotid handelt (Carlson *et al.*, 1993), wurde das Protokoll modifiziert. Die Membran wurde zunächst bei 45°C in 18S-Hybridisierungspuffer prähybridisiert, die 18S-Sonde unter Verwendung der Terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase (GibcoBRL) hergestellt und anschließend mit der Membran über Nacht bei 45°C inkubiert. Die Exposition des Hyperfilms MP (Amersham) erfolgte unter Lichtabschluss bei -80°C.

Im Falle einer erneuten Hybridisierung der Membran wurde diese zum Entfernen der vorherigen Sonde 10 min bei 95°C in 0,1x SSC/0,1% SDS gewaschen.

### **2.3.4 Reverse Transkription und Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR)**

1 µg der RNS wurden unter Verwendung von Oligo d(T)-Primern und der Reversen Transkriptase in cDNS umgeschrieben. Die Herstellung der PCR-Sonden erfolgte mit Hilfe des REDtaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma). Pro PCR-Sonde wurden 2 µl cDNS und je 5 µl Primer [10 µM] eingesetzt. Die PCR-Reaktion umfasste jeweils 30 Zyklen (lineare Amplifikation), bestehend aus Denaturierung (94°C, 1 min), Anlagerung der Primer (1 min) und Elongation (72°C, 1 min).

Gen	Primer (forward/reverse)	Anlagerungs- temperatur	Amplikon (bp)
Humanes S26	5'-GTCCGTGCCTCCAAGATGA-3' 5'-TCCTTGCGGGCTTCACGA-3'	60°C	296
Murines S26	5'-AATGTGCAGCCCATTTCGCTG-3' 5'-CTCCGTCCTTACAAAACGG-3'	56°C	324

**Tabelle 3:** Liste der verwendeten PCR-Primer.

## 2.4 Methoden der Proteinbestimmung

### 2.4.1 Konzentrierung von Proteinen durch TCA-Fällung

50 bis 100 µg serumfreier Zellkulturüberstände, 1%iges Triton-X 100 und 55%ige Trichloressigsäure (TCA) wurden miteinander gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 9.300xg und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Proteinpräzipitat mit -20°C kaltem Aceton gewaschen. Das Präzipitat wurde bei 37°C getrocknet und anschließend in 1x Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95°C erhitzt und dann elektrophoretisch aufgetrennt.

Für die Vorbereitung der konditionierten Medien für die 2D-Gelelektrophorese wurden die Überstände auf eine Endkonzentration von 10% TCA gebracht, 30 min auf Eis inkubiert und 20 min bei 20.000xg und 4°C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit -20°C kaltem Aceton gewaschen, anschließend mit 80%igem Aceton überschichtet und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

### 2.4.2 Bestimmung der Proteinmenge

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Phenolrot- und FKS-freien Überständen erfolgte in einer 96-Lochplatte mit Hilfe des „BCA Proteinassays“ der Firma Pierce nach den Angaben des Herstellers.

Anhand der jeweils angefertigten Eichgeraden, bei der die Extinktion bei 578 nm gegen einen definierten BSA-Proteingehalt aufgetragen wurde, wurde die Konzentration des Proteins bestimmt.

### 2.4.3 Spezifischer Nachweis von Proteinen durch Immunoblot

10 bis 20 µg des Gesamtproteins wurden mit Laemmli-Puffer (60 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 0,1% Bromphenolblau; 25% Glycerol; 14,4 mM 2-Mercaptoethanol)

versetzt und unter reduzierenden Bedingungen, je nach Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins, auf einem 10% bzw. 15%igem SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Als Größenstandard diente der Proteinmarker „Mark 12“ (Invitrogen).

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nach dem Semi-Dry-Verfahren in einer Blotkammer der Firma Sigma-Aldrich gemäß den Angaben des Herstellers auf eine Hybond-C Super™ Nitrozellulose-Membran (Amersham) transferiert. Die Transferzeit betrug bei einer Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> ca. 1 h. Die Effizienz des Proteintransfers wurde durch eine 5-minütige Färbung der Membran mit „Ponceau red“ (0,1% Ponceau S (w/v) in 5% Essigsäure (v/v); Sigma) überprüft.

Zur Reduktion unspezifischer Bindestellen wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer (5% Magermilchpulver in 0,5% Tween/PBS) inkubiert. Der Nachweis der Proteinbanden erfolgte durch Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper in 5% Milchpulver/0,5% Tween/PBS über Nacht bei 4°C. Die jeweiligen Konzentrationen der primären Antikörper sind in der folgenden Tabelle gelistet:

Primäre Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper
Rabbit Anti-human MMP-1	1:2000	HRP Porc Anti-Rabbit IgG, 1:2000
Monoclonal Anti-human MMP-3	1:100	HRP Rabbit Anti-Mouse IgG, 1:2000
Monoclonal Anti-human TIMP-1	1:1000	HRP Rabbit Anti-Mouse IgG, 1:2000

**Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper und deren Verdünnung.**

Nach dreimaligem Waschen in 0,5% Tween/PBS wurde die Membran mit einem sekundären, Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelten Antikörper inkubiert.

Nach erneutem Waschen mit 0,5% Tween/PBS folgte die Detektion des HRP gekoppelten Antikörpers mit Hilfe des „ECL Systems“ (Amersham) auf Röntgenfilmen nach den Angaben des Herstellers.

Die densitometrischen Analysen erfolgten mittels ImageQuant Software (Molecular Dynamics).

#### **2.4.4 Analyse der Gelatinasen durch Substrat-Zymographie**

Um die gelatinolytische Aktivität von konditionierten Medien zu analysieren, wurden diese mit Laemmli- Probenpuffer ohne Mercaptoethanol versetzt und auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel, welches 1 mg/ml Gelatine enthielt (bovine skin, Sigma), unter nicht-reduzierenden Bedingungen getrennt.

Die Zugabe von SDS ermöglicht eine Auffaltung der Gelatinasen, so dass auch die inaktiven Vorläuferformen detektiert werden können. Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine wurde das SDS durch 30-minütiges waschen des Gels in 2,5% Triton-X 100 entfernt. Anschließend wurde das Gel über Nacht bei 37°C in einem Metalloproteinase-Substratpuffer (50 mM Tris; 5 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 8) inkubiert. Die Färbung der Gele erfolgte mittels Coomassie Blue R250. Nach Inkubation der Gele in Entfärberlösung (45% Methanol; 10% Essigsäure) stellen sich die lytischen Banden der latenten und aktivierten MMP-2 und MMP-9 als weiße Banden gegen den blauen Hintergrund dar. Zur Aufbewahrung wurden die Gele mit einem „Gel-Dry-System“ (Invitrogen) getrocknet.

## **2.5 Immunhistologie und -zytologie**

### **2.5.1 Herstellung und Fixierung der Gewebeschnitte und Zellkulturen**

Die Kryoschnitte (8 µm) wurden aus in „TissueTek O.C.T“ eingebetteten Gewebeproben angefertigt und bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte 15 min in 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert und dreimal je 5 min in TBS gewaschen. Für die Detektion von Zytokinen wurden die Gewebeschnitte permeabilisiert, indem sie 3x 5 min in 0,5% Saponin/TBS inkubiert wurden.

Alternativ wurden Gewebeproben in Paraffin eingebettet.

Zellen (wie unter 2.2.3.3 beschrieben) und beschichtete Objektträger (wie unter 2.2.6.3 beschrieben) wurden für 5 min mit eiskaltem Aceton fixiert und bei -20°C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurden die Zellen mit TBS für 5 min rehydriert.

### **2.5.2 Hämalaun und Eosinfärbung (H&E)**

Die Paraffinschnitte wurden zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Anschließend wurden die Zellkerne mit Hämalaunlösung nach Mayer (gebrauchsfertige Lösung der Firma Merk) und das Zytoplasma mit Eosin (0,5%ige wässrige Lösung der Firma Shandon) gefärbt.

### **2.5.3 Alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase (APAAP)**

Unspezifische Bindestellen wurden durch Zugabe von 20% FKS/TBS geblockt. Die primären Antikörper wurden in 10% FKS/TBS verdünnt. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C.

Primärer Antikörper	Verdünnung
Monoclonal Antibody to Melanoma, HMB-45	unverdünnt
Monoclonal Antibody to CD45, LCA	1:100
Monoclonal Anti-human IL-1 $\alpha$ Antibody	10 $\mu$ g/ $\mu$ l
Monoclonal Fibroblast-specific Anitbody, Thy-1	1:50
Monoclonal Anti-human CD31, PECAM	1:30
Rabbit Anti-human Collagenase-1	1:50

**Tabelle 5: Liste der verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen.**

Nach dreimaligen Waschen der Gewebeschnitte mit TBS folgte die Inkubation des sekundären, AP-konjugierten Antikörpers (DAKO Envision Polymer; gebrauchsfertige Verdünnung) für 1 h bei Raumtemperatur.

Nachdem die Gewebe dreimal mit TBS gewaschen wurden, folgte die Inkubation mit dem Alkalischen Phosphatase Chromogen-Substrat für max. 10 min.

Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte, sowohl bei der Pox- als auch bei der APAAP-Färbung, mit Hämalaunlösung nach Mayer. Anschließend wurden die Schnitte in wässriges Eindeckmedium (Dako) eingebettet. Alle Inkubationsschritte erfolgten in einer Kammer mit gesättigter Luftfeuchtigkeit.

## 2.5.4 Immunfluoreszenz

Die primären Antikörper wurden im jeweiligen Blockierungspuffer (siehe Tabelle 6) verdünnt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C.

Primärer Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper
Monoclonal Anti-human CD31, PECAM	1:30 in 1% FKS/TBS	Goat Anti-Mouse 488, 1:800
Rabbit Anti-human MT1-MMP MTK3	1:600 in 1% FKS/TBS	Goat Anti-Rabbit 494, 1:800

**Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper und deren Verdünnung.**

Nach dreimaligem Waschen der Objektträger mit TBS folgte die Inkubation des sekundären, Fluoreszenz-konjugierten Antikörpers für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte durch DAPI- Färbung (1:800). Die Objektträger wurden zweimal 5 min in TBS gewaschen und anschließend in Gelvatol eingebettet. Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Zeiss-Axiophot-

Mikroskop.

## ***2.6 Analyse der Invasion und Metastasierung von humanen Melanomzellen im Mausmodell***

Zur Überprüfung des invasiven Potentials der humanen Melanomzelllinien BLM und WM164 wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l PBS intradermal in weibliche, immundefiziente Mäuse der Linie BALB/cA-nu (Taconic M&B) injiziert (26G Kanüle, 0,45 x 12 mm). Die Bildung des kutanen Tumors wurde über einen Zeitraum von 12 Tagen zum einen photographisch dokumentiert, zum anderen wurde mit Hilfe einer Schublehre die TumorgroÙe bestimmt. Anschließend wurden die Tiere schmerzfrei getötet und der kutane Tumor mit angrenzendem stromalen Gewebe und Organe (Lunge, Niere, Leber, Milz, Herz und Gehirn) entnommen. Eine Hälfte des Tumors wurde für die anschließende histologische Untersuchung in Paraffin eingebettet. Aus den inneren Organen wurde die RNS isoliert und die Tumorzellen mittels PCR für das humane S26-Gen auf Metastasen untersucht. Die kutanen Tumore dienten dabei als Positivkontrolle. Zur Normalisierung wurde murines S26 bei allen PCR-Ansätzen als interner Standard verwendet. Die Durchführung dieses Tierversuchs wurde aufgrund des Tierantrages mit dem Aktenzeichen 23.203.2- K37a, 12/00 genehmigt.

## ***2.7 IL-1 Inhibitionstudie im Mausmodell***

Die Wirkung des rekombinanten humanen IL-1Rezeptorantagonisten (hIL-1RA; R&D Systems) auf das Tumorwachstum und die Metastasierung der humanen Melanomzelllinie BLM wurde in einem Tiermodell überprüft. Hierzu wurden fünf weiblichen, immundefizienten BALB/cA-nu Mäusen (Taconic M&B) 1  $\mu$ g hIL-1RA in 0,02% BSA/PBS intradermal injiziert (26G Kanüle, 0,45 x 12 mm). 6 h später wurden  $1 \times 10^5$  BLM Zellen in 100  $\mu$ l PBS intradermal nahe der hIL-1RA-Injektionsstelle injiziert. Weitere fünf Tiere erhielten zum gleichen Zeitpunkt lediglich die Injektion der Melanomzellen. Die Behandlung mit hIL-1RA (1  $\mu$ g) erfolgte jeden zweiten Tag bis zum Ende des Experimentes. Als Kontrollen dienten eine unbehandelte Maus und eine Maus, die nur 1  $\mu$ g hIL-1RA in 0,02% BSA/PBS injiziert bekam. Die Dokumentation erfolgte wie bereits in Punkt 2.6 beschrieben.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Interaktion von Melanomzellen und Fibroblasten

Die Interaktionen von Tumorzellen mit strukturellen und zellulären Bestandteilen des peritumoralen Bindegewebes spielen während der Tumordinvasion eine bedeutende Rolle. Die Penetration der Basalmembran und des interstitiellen Bindegewebes verlangt die proteolytische Aktivität unterschiedlicher Proteasen, wie den MMPs und Serinproteasen. Da nicht alle Proteasen von Melanomzellen produziert werden, stellte sich die Frage, ob Tumorzellen ortständige stromale Zellen, z.B. Fibroblasten, stimulieren können, solche Proteasen zu sezernieren. So ein Mechanismus könnte die fehlende Produktion von Schlüsselproteasen, z.B. der MMP-1, ausgleichen. Dadurch würde der Abbau der Matrix deutlich effektiver gestaltet werden.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, konnten wir am nativen Tumorgewebe mit Hilfe der *in-situ*-Zymographie zeigen, dass vor allem im Bereich der Tumor-Stroma Grenze gelatinolytischer Aktivitäten erhöht sind. Tumorerne Bereiche der Dermis sind hingegen frei von gelatinolytischer Aktivität (Kurschat *et al.*, 2002). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass Interaktionen von Tumorzellen mit stromalen Zellen oder Komponenten der extrazellulären Matrix an der Regulation der Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen beteiligt sind. Während die Bedeutung von Tumor-Kollagen-Interaktionen bereits *in vitro* charakterisiert wurde (Kurschat *et al.*, 1999), sind die molekularen Mechanismen der wechselseitigen Beeinflussungen von Melanomzellen mit Fibroblasten derzeit noch unzureichend beschrieben.

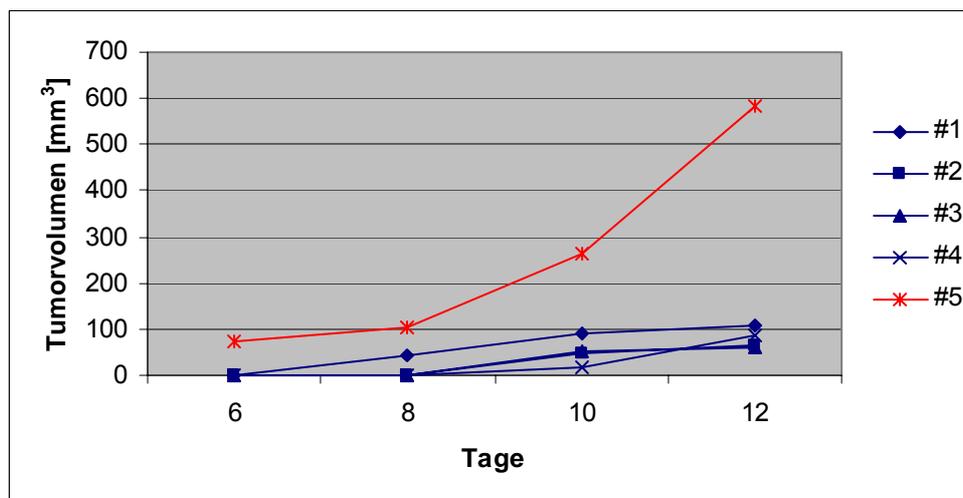
#### 3.1.1 Charakterisierung der Melanomzelllinien im Mausmodell

Da es Melanomzellen mit unterschiedlich hohem Invasionspotential gibt, wurde der Frage nachgegangen, ob verschiedene Melanomzelllinien unterschiedlich mit dermalen Fibroblasten interagieren. Da die Melanomzellen der Linie BLM (van Muijen *et al.*, 1991) und WM164 (Herlyn *et al.*, 1990) bereits über einen langen Zeitraum *in vitro* kultiviert worden waren, wurde deren Wachstum und Metastasierung in einem Mausmodell überprüft. Zu diesem Zweck wurden je  $1 \times 10^6$  Melanomzellen der Linie WM164 und BLM intradermal in Nacktmäuse (BALB/cA-nu) injiziert und das Wachstum der Tumore dokumentiert. Um einen direkten Vergleich im Tumorstadium zwischen wenig und hoch invasiven Melanomzellen zu sehen, wurde einer Nacktmaus  $1 \times 10^6$  Melanomzellen der in der Arbeitsgruppe bereits etablierten Linie BLM injiziert. Nach

zwölf Tagen wurden die Tiere schmerzfrei getötet und der Tumor mit dem umgebenden Stroma sowie verschiedene Organe entnommen. Von einer Hälfte der Tumoren wurden Gewebeschnitte angefertigt, aus der anderen Hälfte sowie aus allen Organen wurde RNS präpariert und in cDNS umgeschrieben. Mittels PCR mit Primern für das humane S26-Gen wurde dann das Vorhandensein von humanen Melanomzellen bestimmt.

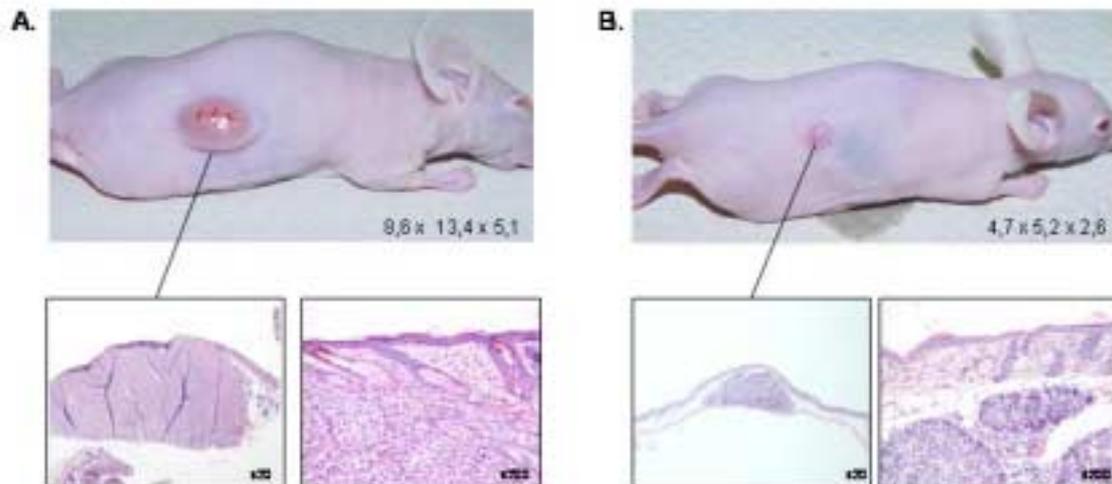
Bereits zwei Tage nach Injektion der hoch invasiven BLM Melanomzellen konnte die Bildung eines kutanen Tumors beobachtet werden. Das Tumolvolumen zeigt eine kontinuierliche Zunahme als Funktion der Zeit (Abbildung 7). Während hoch invasive BLM Melanomzellen bereits nach sechs Tagen ein Tumolvolumen von  $72 \text{ mm}^3$  aufweisen, konnte zu diesem Zeitpunkt in keinem der anderen Tiere ein kutaner Tumor beobachtet werden.

Zehn Tage nach Injektion der Melanomzellen wiesen alle Tiere einen Tumor auf, welche in den Tieren #1-4 (WM164) im Durchschnitt ein Tumolvolumen von  $52 \text{ mm}^3$  zeigten. Dem gegenüber war das Tumolvolumen zu diesem Zeitpunkt im Tier #5 (BLM) mit  $262 \text{ mm}^3$  deutlich höher.



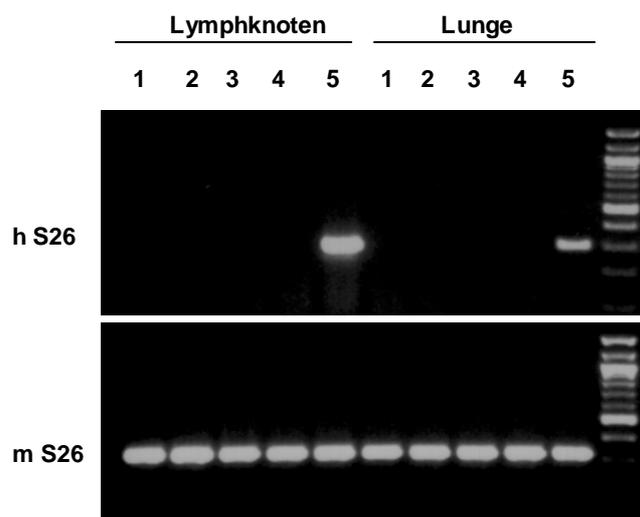
**Abbildung 7: Bestimmung des Tumolvolumens in Abhängigkeit der Zeit.** Den Tiere #1-4 wurden WM164 Zellen, dem Tier #5 BLM Zellen injiziert.

Die photographische und histologische Dokumentation demonstriert die unterschiedliche Größe der kutanen Tumore (Abbildung 8). Bereits sechs Tage nach Injektion der BLM Zellen ist der Tumor stark vaskularisiert.



**Abbildung 8: Charakterisierung der Melanomzellen im Maussystem.** Die Abbildung zeigt die photographische Dokumentation des kutanen Tumors zum Zeitpunkt der Sektion mit Größenangabe (Höhe x Breite x Tiefe). Der untere Teil zeigt die H&E-Färbungen der Gewebeschnitte exemplarisch für zwei Tiere (20- und 200-fache Vergrößerung). **(A.)** Injektion von  $1 \times 10^6$  BLM Zellen; **(B.)** Injektion von  $1 \times 10^6$  WM164 Zellen

Die Detektion von Organmetastasen erfolgte mittels PCR-Analyse. Die Verwendung von Primer für das humane S26-Gen diente zur Identifikation humaner Zellen in der Maus, der kutane Tumor als Positivkontrolle und die Organe einer nicht behandelten Kontrollmaus als Negativkontrolle. Abbildung 9 zeigt ein repräsentatives Agarosegel der PCR-Produkte für die Lunge und die Lymphknoten aller fünf Tiere für humanes S26. Als Ladekontrolle wurde murines S26 bei allen PCR-Ansätzen als interner Standard verwendet. Einen positiven Nachweis für das humane S26 zeigt nur Tier #5 (BLM) während die Tiere #1-4 (WM164) negativ sind.



**Abbildung 9: Repräsentatives Agarosegel der PCR-Produkte des humanen und murinen S26-Gen.** Proben eins bis vier stammen von den Tieren #1-4, denen wenig invasive WM164 Zellen injiziert worden waren. Bei Probe fünf handelt es sich um Tier #5, dem hoch invasive BLM Zellen injiziert worden waren. Die Abbildung zeigt die PCR-Analyse von Lymphknoten und Lunge für das humane S26-Gen. Das murine S26-Gen diente als Ladekontrolle. Als Größenstandard wurde eine 100 bp-Leiter verwendet.

In Tabelle 7 ist das Auftreten von Metastasen in den verschiedenen Organen zusammengefasst. Während der Tumor für alle fünf Tiere positiv für das humane S26-Gen ist, konnten in den Tieren #1- 4 (WM164) keine Organmetastasen detektiert werden. Die Injektion von BLM Melanomzellen führte zur Bildung von Metastasen in Lunge, Lymphknoten, Leber und Milz.

Tier	Tumor	Lunge	Lymphknoten	Leber	Niere	Milz	Herz	Gehirn
#1	+++	-	-	-	-	-	-	-
#2	+++	-	-	-	-	-	-	-
#3	+++	-	-	-	-	-	-	-
#4	+++	-	-	-	-	-	-	-
#5	+++	++	++	++	-	++	-	-

**Tabelle 7: Nachweis von humanen Melanomzellen mittels PCR mit Primern für das humane S26-Gen.** +++, ++, + und - steht für sehr stark, stark, schwach und nicht positiv für das S26-Transkript.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass Melanomzellen der Linie BLM im Vergleich zu WM164 Zellen ein starkes invasives Potential besitzen. Daraus ergab sich für Melanomzellen der Linie BLM die Bezeichnung hoch invasiv und für Zellen der Linie WM164 wenig invasiv.

### **3.1.2 Einfluss der Melanom-Fibroblasten-Interaktionen auf die Synthese von Matrix Metalloproteinasen**

Die Kollagenasen MMP-1 und die membranständige MT1-MMP sind Schlüsselenzyme beim Abbau von tripelhelikalem Typ-I-Kollagen und spielen daher beim Abbau des interstitiellen Bindegewebes und somit bei der Invasion von Melanomzellen eine zentrale Rolle. Weder Melanomzellen der Linie BLM noch WM164 Melanomzellen produzieren MMP-1. Zur Beantwortung der Frage, ob diese Melanomzellen in der Lage sind, die MMP-1-Synthese in Fibroblasten zu induzieren, wurden unterschiedliche *in-vitro*-Kokultur-Systeme verwendet. Zum einen wurden die Zellen im direkten Zell-Zell-Kontakt als Monolayer ausgesät, zum anderen in einer Transwell-Kammer indirekt miteinander kokultiviert. In diesem System sind die verschiedenen Zelltypen durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt, die den Austausch löslicher Faktoren ermöglicht.

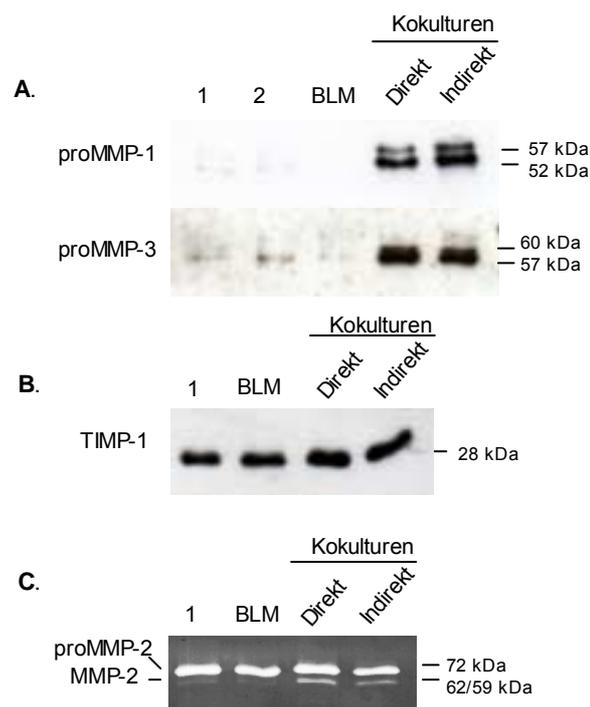
Die serumfreien, konditionierten Medien der Mono- und Kokulturen wurden nach einer 72-stündigen Kulturdauer mittels Immunoblot und Gelatine-Zymographie hinsichtlich der MMP-Regulation analysiert. Während BLM Melanomzellen keine MMP-1 produzieren, zeigen Fibroblasten nur eine basale proMMP-1-Synthese, die sich im Immunoblot als 57 und 52 kDa große Banden darstellen und damit den zwei Glykosylierungsformen der proMMP-1 entsprechen (Abbildung 10 A.). Die Fibroblasten wurden als Kontrolle für die direkte Kokultur in einer Dichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  und als Kontrolle für das Transwell-System in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausgesät. Unabhängig von der Zellzahl bleibt die Expression der basalen proMMP-1 gleich (Abbildung 10 A., Spur 1 und 2). Im Gegensatz dazu ist eine deutliche Induktion der proMMP-1-Synthese in Fibroblasten, sowohl im direkten Zell-Zell-Kontakt von Melanomzellen und Fibroblasten, als auch der indirekten Kokultur zu sehen. Eine Aktivierung von proMMP-1, die sich als Banden der Größe 42/47 kDa darstellen würde, blieb jedoch aus.

Da die Aktivierung von proMMP-1 im extrazellulären Raum durch MMP-3 erfolgt, wurde im Immunoblot die Synthese dieser Matrix Metalloproteinasen analysiert. Wie bereits für

proMMP-1 gezeigt, synthetisieren Kontrollfibroblasten nur basale Level der 60 und 57 kDa großen MMP-3-Proform. Diese Synthese ist ebenfalls im direkten Zell-Zell-Kontakt und im Transwell-System signifikant induziert.

Die Synthese von TIMP-1, dem 28 kDa großem endogenen Inhibitor von MMP-1 und MMP-3, ist sowohl in Fibroblasten als auch in BLM Melanomzellen sehr hoch und wird in diesem System nicht reguliert (Abbildung 10 B.).

Die proteolytische Spaltung von tripelhelikalem Typ-I-Kollagen durch MMP-1 resultiert in Spaltprodukten, die den Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 zugänglich sind. Mittels Gelatine-Zymographie kann die Aktivität der Gelatinasen analysiert werden. Durch Zugabe von SDS, welches eine Auffaltung der Proenzyme bewirkt (siehe dazu Abbildung 5), kann auch die Aktivität der Proenzyme detektiert werden. Sowohl Fibroblasten als auch BLM Melanomzellen synthetisieren große Mengen der 72 kDa großen Proform von MMP-2 (Abbildung 10 C.). Die Kokultivierung beider Zelltypen führt zu einer Aktivierung von proMMP-2, erkennbar an den 62/59 kDa großen Banden.



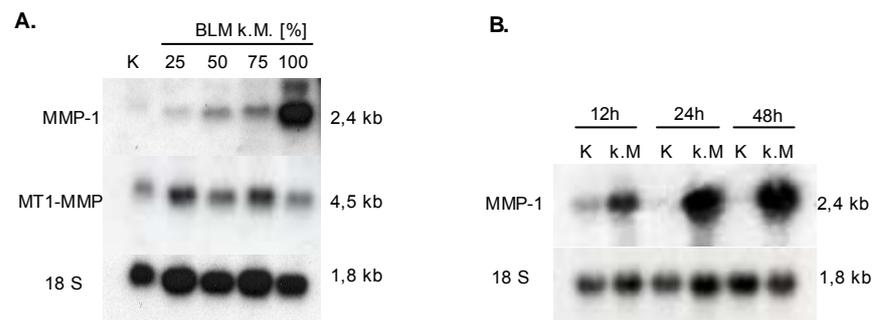
**Abbildung 10: Analyse der proMMP-1-, proMMP-3- und TIMP-1-Regulation und der gelatinolytischen Aktivität bei der Kokultivierung von BLM Melanomzellen mit Fibroblasten.**

$5 \times 10^4$  Fibroblasten/cm<sup>2</sup> (1) bzw.  $2,5 \times 10^4$  Fibroblasten/cm<sup>2</sup> (2) und  $5 \times 10^4$  BLM Zellen/cm<sup>2</sup> (BLM) wurden als Monolayer ausgesät. Weiterhin wurden  $5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> im direkten Zell-Zell-Kontakt (direkte Kokultur, im Verhältnis 1:1) und in einem Transwell-System (indirekte Kokultur) für 48 h in RPMI/FKS Medium kultiviert, mit PBS serumfrei gewaschen und weitere 24 h kultiviert. **(A.)** Immunoblot für MMP-1 und MMP-3, **(B.)** Immunoblot für TIMP-1, **(C.)** Gelatine-Zymogramm.

### 3.1.3 Lösliche Faktoren in der Regulation von Matrix Metalloproteinasen

Anhand der MMP-Induktion in Fibroblasten die im Transwell-System mit BLM Zellen kokultiviert wurden, konnte die Beteiligung löslicher Faktoren in dieser Interaktion gezeigt werden. Um zu überprüfen, ob diese löslichen Faktoren von Melanomzellen sezerniert werden, wurden Fibroblasten in Medien kultiviert, die zuvor von Melanomzellen konditioniert worden waren.

Analysen der spezifischen Transkripte für die Kollagenasen MMP-1 und MT1-MMP zeigen eine dosisabhängige MMP-1-Expression in Fibroblasten nach Stimulation mit Medium das durch BLM Zellen konditioniert war. Die spezifischen MT1-MMP-Transkripte sind unverändert (Abbildung 11 A.). Neben der konzentrationsabhängigen MMP-1-Induktion kann auch eine zeitabhängige Induktion der MMP-1-Transkripte in Fibroblasten gezeigt werden, die nach 48-stündiger Stimulation mit dem konditionierten Medium deutlich erhöht ist (B.).



**Abbildung 11: Dosis- und zeitabhängige Induktion der spezifischen MMP-1-Transkripte in Fibroblasten nach Behandlung mit BLM-konditioniertem Medium.**

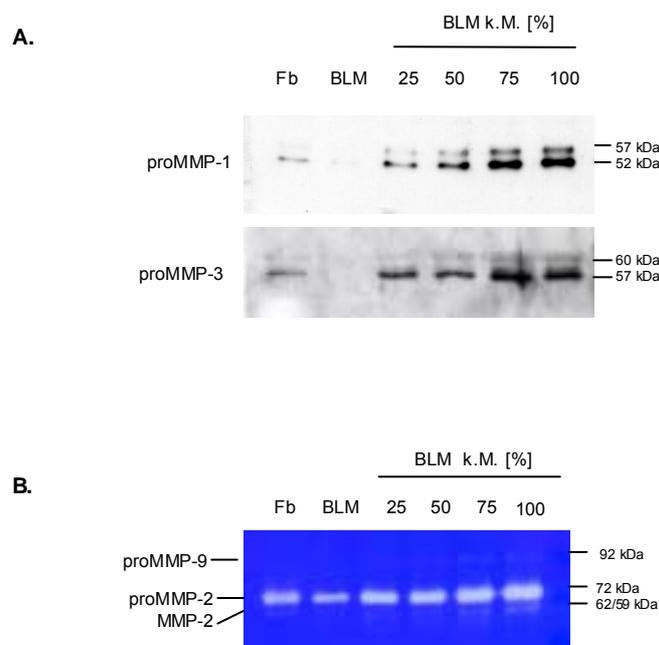
**(A.)** Fibroblasten wurden 48 h in RPMI/FKS (K) bzw. in steigenden Konzentrationen (0, 25, 50, 75 und 100%) des BLM-konditioniertem Medium (k.M.) kultiviert, serumfrei gewaschen und weitere 24 h in RPMI bzw. konditioniertem Medium kultiviert. **(B.)** Fibroblasten wurden zeitabhängig (12, 24, 48 h) in RPMI/FKS (K) bzw. BLM-konditioniertem Medium (k.M.) kultiviert.

Mittels Immunoblot konnte eine dosis-abhängige Induktion der Proteinsynthese von proMMP-1 und proMMP-3 in Fibroblasten nachgewiesen werden, die in steigenden Verdünnungen des BLM-konditionierten Mediums kultiviert wurden. Die densitometrische Analyse des MMP-1-Immunoblots zeigte eine 4-fache Induktion der proMMP-1-Synthese in Fibroblasten nach Stimulation mit 25% und eine 20-fache Induktion nach Stimulation mit unverdünntem BLM-konditionierten Medium (Abbildung

12 A.). Auch für die proMMP-3-Synthese konnte eine konzentrationsabhängige Induktion gezeigt werden.

Das Gelatine-Zymogramm zeigt eine basale proMMP-2-Synthese in Fibroblasten und BLM Monokulturen (B.). Die Stimulation von Fibroblasten mit BLM-konditioniertem Medium führt in geringen Konzentrationen zu einer erhöhten proMMP-2-Synthese und nach Stimulation mit unverdünntem konditionierten Medium zu einer Aktivierung von proMMP-2, erkennbar an den 62/59 kDa großen lytischen Banden. Auch die Induktion von proMMP-9 in Fibroblasten war erst nach Stimulation mit hohen Konzentrationen des Melanomzellen konditioniertem Mediums erkennbar.

Insgesamt zeigen diese Befunde, dass lösliche Faktoren, die von hoch invasiven Melanomzellen sezerniert werden, die MMP-Induktion in Fibroblasten induzieren.

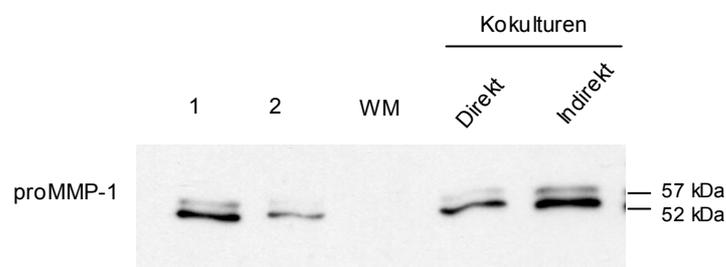


**Abbildung 12: Analyse der proMMP-1-, proMMP-3- und Gelatinasen-Synthese in Fibroblasten nach Behandlung mit BLM-konditioniertem Medium.**

Fibroblasten (Fb) wurden 48 h in Gegenwart aufsteigender Konzentrationen (0, 25, 50, 75 und 100%) des BLM-konditionierten Mediums (k.M.) kultiviert, mit PBS serumfrei gewaschen und weitere 24 h in RPMI bzw. BLM-konditioniertem Medium inkubiert. **(A.)** Immunoblot für MMP-1 und MMP-3, **(B.)** Gelatine-Zymogramm.

### 3.1.4 Einfluss von wenig invasiven Melanomzellen auf stromale Zellen

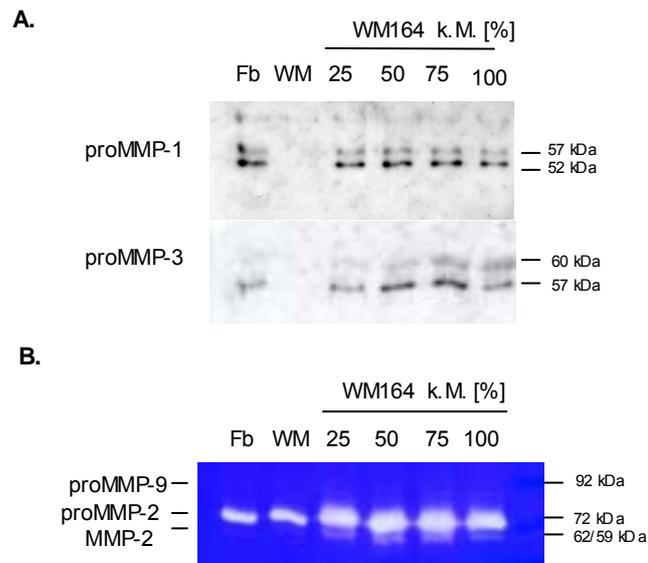
Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob sich wenig invasive WM 164 Melanomzellen in ihrer Fähigkeit, stromale Fibroblasten zur MMP-Synthese zu stimulieren, von hoch invasiven BLM Melanomzellen unterscheiden. Wie bereits für BLM Zellen gezeigt werden konnte, sezernierten auch WM164 Melanomzellen keine basalen MMP-1 bzw. MMP-3. Weder der direkte Zell-Zell-Kontakt zwischen wenig invasiven WM164 Zellen und dermalen Fibroblasten, noch die indirekte Kokultivierung im Transwell-System führt zur Induktion der proMMP-1-Synthese in Fibroblasten (Abbildung 13).



**Abb. 13: Analyse der proMMP-1-Regulation bei der Kokultivierung von WM164 Melanomzellen mit Fibroblasten.**

$5 \times 10^4$  Fibroblasten/cm<sup>2</sup> (1) bzw.  $2,5 \times 10^4$  Fibroblasten/cm<sup>2</sup> (2) und  $5 \times 10^4$  WM164 Zellen/cm<sup>2</sup> (WM) wurden als Monolayer ausgesät. Weiterhin wurden  $5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> im direkten Zell-Zell-Kontakt (direkte Kokultur, in einem 1:1 Verhältnis) oder in einem Transwell-System (indirekte Kokultur) für 48 h in RPMI/FKS Medium kultiviert, mit PBS serumfrei gewaschen und weitere 24 h kultiviert.

Weiterhin zeigt WM164-konditioniertes Medium, im Gegensatz zu konditioniertem Medium von hoch invasiven Melanomzellen, keinen stimulatorischen Effekt auf die proMMP-1- und proMMP-3-Synthese in Fibroblasten (Abbildung 14 A.). Dem gegenüber führt jedoch die Stimulation der Fibroblasten mit 25% des WM164-konditionierten Mediums zu einer leichten Aktivierung von proMMP-2 (B.).



**Abbildung 14: Analyse der proMMP-1-, proMMP-3- und Gelatinasen-Synthese/-Aktivierung in Fibroblasten nach Behandlung mit WM164-konditioniertem Medium.**

Fibroblasten wurden 48 h in RPMI/FKS (Fb) bzw. in Gegenwart steigender Konzentrationen (0, 25, 50, 75 und 100%) des WM164-konditionierten Mediums (k.M.) kultiviert, mit PBS serumfrei gewaschen und weitere 24 h in RPMI bzw. WM164-konditioniertem Medium inkubiert. **(A.)** Immunoblot für MMP-1 und MMP-3, **(B.)** Gelatine-Zymogramm

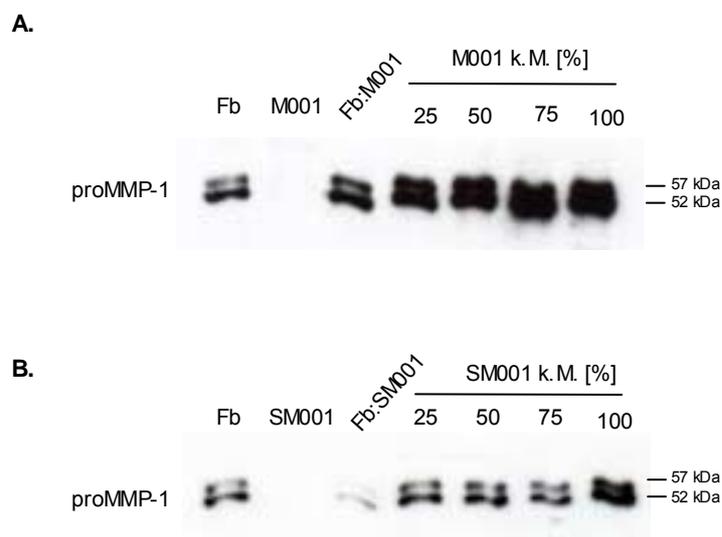
### 3.1.5 Einfluss von Melanomzellen aus primären Melanomen und Metastasen auf stromale Zellen

Von Melanomzelllinien, die sich über mehrere Passagen in Kultur befinden, ist bekannt, dass sie genetisch instabil sind und mit zunehmender Zahl an Zellzyklen „entdifferenzieren“. Somit unterscheiden sie sich immer mehr von primären Melanomzellen. Zu diesen Veränderungen gehört unter anderem der Verlust von Melanomzellmarkern, z.B. S100 oder HMB-45, die bei der hoch invasiven BLM Linie nicht mehr nachweisbar sind. Um die *in-vitro*-Daten, die mit den zwei Melanomzelllinien durchgeführt wurden, zu verifizieren, wurden Zellen aus humanen primären Melanomen und aus Satellitenmetastasen isoliert. Somit konnte neben der Analyse von Melanomzelllinien der Einfluss primärer Melanomzellen auf dermale Fibroblasten untersucht werden.

Primäre dermale Fibroblasten wurden im direkten Zell-Zell-Kontakt mit Zellen aus einem primären Melanom (M001) und aus einer Satellitenmetastase (SM001) desselben Patienten, oder mit konditionierten Medien dieser zwei Zelltypen kultiviert. Diese Zellen

produzieren, wie auch die Zelllinien BLM und WM164, keine MMP-1 (Abbildung 15). Während die, aus Primärtumoren isolierten Zellen in Fibroblasten eine starke proMMP-1-Induktion bereits bei 1:4 verdünnten Medien aufweisen, führt die Behandlung mit Medium, das durch Zellen aus der Satellitenmetastase konditioniert worden war nur unverdünnt zur proMMP-1-Induktion in Fibroblasten. Der direkte Zell-Zell-Kontakt zwischen Melanomzellen des Primärtumors und Fibroblasten führt zur leichten Induktion von proMMP-1. Die direkte Kokultur von Zellen der Satellitenmetastase und Fibroblasten bewirkt hingegen eine Reduktion der proMMP-1-Synthese.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass lösliche Faktoren auch *in vivo* bei der Interaktion von Melanomzellen mit Fibroblasten beteiligt sind. Die Ausprägung der interstitiellen Kollagenase in stromalen Zellen ist offenbar unterschiedlich.



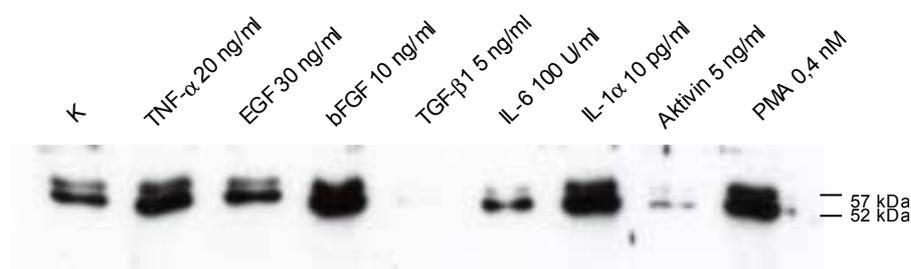
**Abbildung 15: Regulation von proMMP-1 in Fibroblasten bei Kokultur mit Zellen aus primären Melanomen und Zellen aus Satellitenmetastasen.**

Fibroblasten (Fb) wurden im direkten Zell-Zell-Kontakt mit Zellen aus einem primären Melanom (M001) bzw. Zellen aus einer Satellitenmetastase (SM001) in einem 1:1 Verhältnis kokultiviert. Weiterhin wurden Fibroblasten in Gegenwart steigender Konzentrationen (25, 50, 75 und 100%) M001- bzw. SM001-konditionierter Medien (k.M.) kultiviert. Als Kontrollen dienten Monokulturen dermalen Fb, M001 und SM001. Nach 48 h wurden die Zellen mit PBS serumfrei gewaschen und weiter 24 h in RPMI bzw. in, durch Melanomzellen konditionierte Medien inkubiert. **(A.)** Kokultur zwischen Zellen des primären Melanoms mit Fibroblasten, **(B.)** Kokultur zwischen Zellen der Metastase mit Fibroblasten

### 3.2 Quantifizierung von MMP- induzierenden Faktoren

Um die Stimulierbarkeit der Synthese von proMMP-1 durch unterschiedliche Zytokine und Wachstumsfaktoren *in vitro* zu überprüfen, wurden Fibroblasten mit verschiedenen rekombinanten Zytokinen und Wachstumsfaktoren über einen Zeitraum von 48 h kultiviert und die Mengen an sezernierter MMP-1 in den Überständen analysiert.

Unbehandelte Kontrollfibroblasten zeigen erwartungsgemäß lediglich eine basale proMMP-1-Synthese. Durch PMA (0,4 nM) stimulierte Fibroblasten, die als Positivkontrolle verwendet wurden, zeigen eine deutliche Induktion der proMMP-1-Synthese (Abbildung 16). Wie die densitometrische Analyse ergab, führt die Stimulation mit TNF- $\alpha$  (1,7-fach), bFGF (2-fach) und IL-1 $\alpha$  (2-fach) zur Induktion der proMMP-1-Synthese. Während EGF und IL-6 keine regulatorische Wirkung zeigen, führt die Behandlung der Fibroblasten mit TGF $\beta$ 1 und Aktivin zu einer deutlichen Reduktion der proMMP-1-Synthese.



**Abb. 16: Regulation der proMMP-1-Synthese nach Stimulation mit rekombinanten Zytokinen und Wachstumsfaktoren.**

Fibroblasten wurden 48 h in RPMI/FKS (K) bzw. in Gegenwart verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren (TNF- $\alpha$ , 20 ng/ml; EGF, 30 ng/ml; bFGF, 10 ng/ml; TGF- $\beta$ 1, 5 ng/ml; IL-6, 100 U/ml; IL-1 $\alpha$ , 10 pg/ml; Aktivin, 5 ng/ml; PMA, 0,4 nM) in RPMI/FKS kultiviert, mit PBS serumfrei gewaschen und weitere 24 h in Gegenwart der gleichen Faktoren kultiviert. Die Abbildung zeigt den Immunoblot für MMP-1.

Die bislang beschriebenen Ergebnisse verdeutlichen, dass hoch invasive Melanomzellen der Linie BLM, aber nicht wenig invasive WM164 Zellen in der Lage sind, mittels löslicher Faktoren die proMMP-1- und proMMP-3-Synthese in Fibroblasten zu induzieren. Unter den untersuchten Zytokinen und Wachstumsfaktoren zeigen IL-1 $\alpha$ ,

bFGF und TNF- $\alpha$  eine massive Induktion der proMMP-1-Synthese in Fibroblasten und stellen daher potentielle Faktoren für die Melanom-induzierte Aktivierung von Fibroblasten dar.

Die Quantifizierung der IL-1 $\alpha$ - und bFGF-Konzentrationen, die von den Melanomzellen der Linien BLM und WM164, aber auch von Fibroblasten sezerniert wurden, sollten weitere Hinweise auf die Rolle dieser Faktoren in der Interaktion der verschiedenen Zelltypen geben.

Weder Fibroblasten noch WM164 Zellen sezernierten messbare Konzentrationen des Zytokines IL-1 $\alpha$  (Tabelle 8). In den Überständen der hoch invasiven Melanomzellen dagegen konnten Konzentrationen dieses Zytokines von ca. 8 pg/ml nachgewiesen werden. Diese Konzentration liegt etwas niedriger als die, die für die Stimulation der Fibroblasten verwendet wurde und bei der eine deutliche Induktion der proMMP-1-Synthese beobachtet wurde.

Deutliche Unterschiede zwischen den Melanomzellen wurden auch für bFGF in den konditionierten Medien nachgewiesen. Die Konzentrationen von bFGF in BLM Melanomzellen waren etwa fünfmal so hoch wie in WM164 konditionierten Medien und dreimal höher als in Fibroblasten. Die in der Stimulation der Fibroblasten verwendete Konzentration des rekombinanten bFGF (10 ng/ml) lag somit um den Faktor 25 höher als die in BLM Zellen gemessene bFGF-Konzentration (ca. 390 pg/ml). Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Konzentrationen der sezernierten Faktoren in den Überständen der Melanomzellen variieren können. WM164 Zellen sezernierten hingegen kaum messbare Konzentrationen dieses Wachstumsfaktors.

	<b>bFGF pg/ml</b>	<b>IL-1<math>\alpha</math> pg/ml</b>
Fb	77,7 $\pm$ 8,2	0
BLM	392,6 $\pm$ 55,1	7,8 $\pm$ 0,3
WM164	5,9 $\pm$ 8,3	0

**Tabelle 8: Quantifizierung der IL-1 $\alpha$ - und bFGF-Konzentrationen in durch Melanomzellen und Fibroblasten konditionierten Medien mittels ELISA.**

Serumfreie konditionierte Medien von Fibroblasten (Fb) und Melanomzellen wurden nach Angaben des Herstellers mittels ELISA für die Faktoren IL-1 $\alpha$  und bFGF analysiert.

### **3.3 Inhibitionsstudien**

Um den Einfluss von IL-1 $\alpha$  und bFGF in der beschriebenen Interaktion zwischen Melanomzellen und Fibroblasten bezüglich der MMP-1-Synthese zu analysieren, wurde untersucht, ob diese Induktion mit blockierenden Antikörpern inhibiert werden kann. Hierzu wurden auf der einen Seite IL-1 $\alpha$ - und bFGF-neutralisierende Antikörper verwendet, die an freies IL-1 $\alpha$  bzw. bFGF im konditionierten Medium binden. Damit lässt sich die IL-1- und bFGF-Signaltransduktion inhibieren. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob der rekombinante IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1RA) die proMMP-1-Induktion inhibiert. Hierbei handelt es sich um den endogenen Rezeptorantagonist, der durch Bindung an den IL-1R, ohne Induktion der Signaltransduktion, die Bindung von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  verhindert (Arend, 1990).

EGF und IL-6, die in der Literatur als Induktoren der MMP-1 beschrieben werden, wurden mittels neutralisierender Antikörper inhibiert, obwohl mit diesen Faktoren keine Stimulation der proMMP-1-Synthese in Fibroblasten gezeigt worden war (Abbildung 16). Zusätzlich wurde die Bindung von IL-6 an dessen Rezeptor durch IL-6-blockierende Antikörper verhindert.

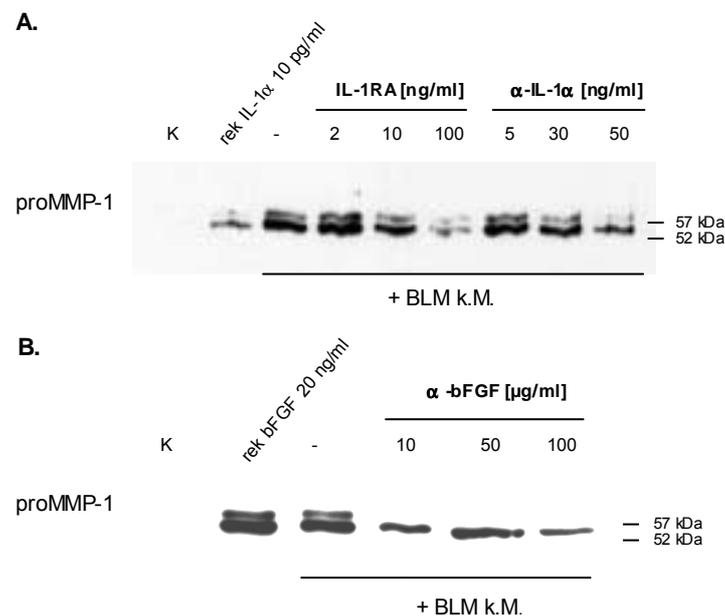
#### **3.3.1 Inhibition der IL-1- und bFGF-Signaltransduktion in Kokulturen von Melanomzellen mit Fibroblasten**

Für die Inhibitionsstudien wurden Fibroblasten entweder als Kontrolle in RPMI oder im BLM-konditionierten Medium kultiviert. Da bereits 25% des BLM-konditionierten Mediums zur 4-fachen Induktion von proMMP-1 in Fibroblasten führt (Abbildung 12), wurden Fibroblasten in allen durchgeführten Inhibitionsstudien mit 25% dieses Mediums kultiviert. Die Inhibition erfolgte in Gegenwart steigender Konzentrationen der neutralisierenden Antikörper bzw. des rekombinanten IL-1RA.

Wie in vorausgegangenen Untersuchungen weisen Kontrollfibroblasten keine proMMP-1-Synthese auf. Die Stimulation mit rekombinanten IL-1 $\alpha$  und bFGF führt, wie bereits in Abbildung 16 gezeigt, zur Induktion der proMMP-1-Synthese (Abbildung 17 A. und B.). Die Kultivierung der Fibroblasten in Gegenwart von 25% des durch Melanomzellen konditionierten Mediums führt zur deutlichen Induktion der proMMP-1-Synthese. Die Zugabe der höchsten Konzentration des neutralisierenden IL-1 $\alpha$ -Antikörpers bewirkt eine 50%ige Reduktion der proMMP-1-Synthese im Vergleich zu Fibroblasten, die mit BLM-konditioniertem Medium stimuliert wurden. Nach Zugabe von rekombinatem IL-1RA kann ebenfalls eine dosisabhängige Reduktion der proMMP-1-Synthese von 70%

beobachtet werden. Die Behandlung mit neutralisierenden bFGF-Antikörpern bewirkt eine maximale Inhibition von 73%.

Allerdings kann auch bei hohen Konzentrationen der Inhibitoren keine vollständige Reduktion der proMMP-1-Synthese erzielt werden. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass IL-1 $\alpha$  und bFGF eine wesentliche Rolle in der Interaktion zwischen Fibroblasten und Melanomzellen spielen, weiterhin jedoch noch andere Faktoren involviert sein müssen.



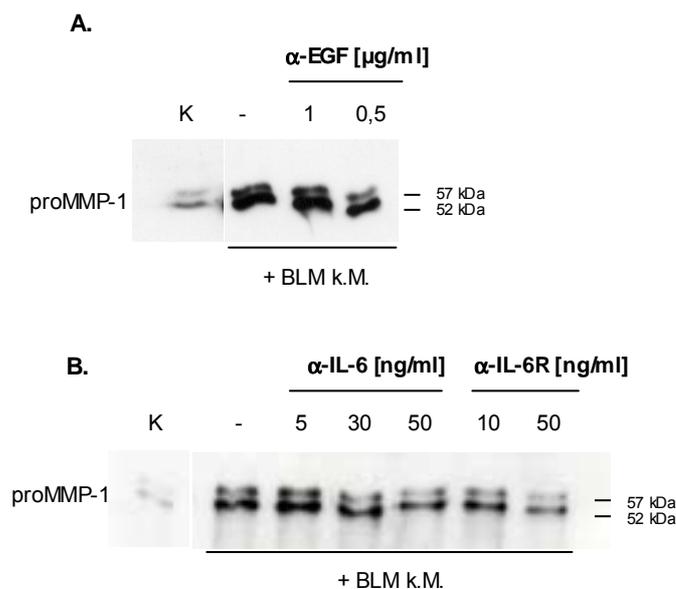
**Abbildung 17: Inhibition der proMMP-1-Synthese in Fibroblasten nach Behandlung mit neutralisierenden Antikörpern gegen IL-1 $\alpha$ , bFGF und rekombinanten IL-1RA.**

Fibroblasten wurden 48 h in RPMI/FKS (K) bzw. in RPMI/FKS und rekombinantem IL-1 $\alpha$  (10 pg/ml) oder rekombinantem bFGF (20 ng/ml) kultiviert. Weiterhin wurden Fibroblasten in 25% des BLM-konditionierten Mediums (k.M.) kultiviert und mit steigenden Konzentrationen **(A.)** neutralisierender IL-1 $\alpha$ -Antikörper ( $\alpha$ -IL-1 $\alpha$ ; 5, 30, 50 ng/ml), rekombinantem IL-1RA (2, 10, 100 ng/ml) und **(B.)** neutralisierender bFGF-Antikörper ( $\alpha$ -bFGF; 10, 50, 100 ng/ml) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für weitere 24 h in RPMI bzw. RPMI mit 25% BLM-konditioniertem Medium kultiviert und mit den gleichen Konzentrationen an neutralisierenden Antikörpern bzw. IL-1RA behandelt. Die serumfreien Überstände wurden mittels Immunoblot auf das Vorhandensein von MMP-1 analysiert.

### 3.3.2 Inhibition der IL-6- und EGF-Signaltransduktion in Kokulturen von Melanomzellen mit Fibroblasten

Um den Einfluss von IL-6 und EGF zu testen, wurden Fibroblasten in Gegenwart von 25% des BLM-konditionierten Mediums mit steigenden Konzentrationen des neutralisierenden IL-6-Antikörpers und mit steigenden Konzentrationen des IL-6R-blockierenden Antikörpers behandelt. Für beide Inhibitionen kann lediglich eine geringe Reduktion der proMMP-1-Synthese, im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden (Abbildung 18 B.). Neutralisierende EGF-Antikörper hingegen zeigen in dieser Interaktion keinen inhibitorischen Effekt (A.).

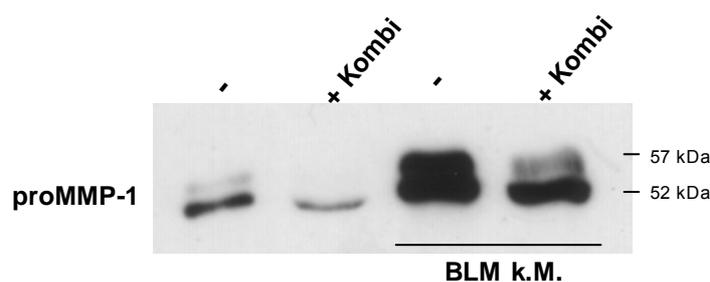
Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass IL-6 und EGF in dem direkten parakrinen Mechanismus zur Induktion der proMMP-1-Synthese in Fibroblasten durch von Melanomzellen sezernierte Faktoren nicht maßgeblich involviert sind.



**Abbildung 18: Analyse der proMMP-1-Synthese in Fibroblasten nach Behandlung mit neutralisierenden Antikörpern gegen IL-6 und EGF und IL-6R-blockierende Antikörper.**

Fibroblasten wurden 48 h in RPMI/FKS (K) bzw. in 25% BLM-konditioniertem Medium (k.M.) kultiviert und mit steigenden Konzentrationen **(A.)** neutralisierender EGF-Antikörper ( $\alpha$ -EGF; 1 und 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) und **(B.)** neutralisierender IL-6-Antikörper ( $\alpha$ -IL-6; 5, 30 und 50  $\text{ng/ml}$ ) bzw. IL-6R ( $\alpha$ -IL-6R; 10 und 50  $\text{ng/ml}$ ) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für weitere 24 h in RPMI bzw. RPMI mit 25% BLM-konditioniertem Medium kultiviert und mit den gleichen Konzentrationen an neutralisierenden Antikörpern behandelt. Die serumfreien Überstände wurden mittels Immunoblot auf das Vorhandensein von MMP-1 analysiert.

Daraus ergab sich die Frage, ob durch die gleichzeitige Inhibition der IL-1- und bFGF-Signaltransduktion eine vollständige Inhibition erzielt werden kann. Dazu wurde zunächst der Einfluss der Inhibitoren auf Kontrollfibroblasten untersucht. Die basale proMMP-1-Synthese in Kontrollfibroblasten wird nach Zugabe der Kombination der neutralisierenden Antikörper (anti-IL-1 $\alpha$  und anti-bFGF) und des Rezeptorantagonisten (IL-1RA) inhibiert (Abbildung 19). Die Stimulation der Kontrollfibroblasten mit BLM-konditioniertem Medium führt zur deutlichen Induktion der basalen proMMP-1-Synthese und wird in Gegenwart der Kombination aller Inhibitoren deutlich inhibiert. Dabei ist jedoch zu beachten, dass selbst die kombinierte Inhibition der IL-1- und bFGF-Signaltransduktion nicht zu einer kompletten Inhibition der proMMP-1-Synthese zurück auf Kontrollfibroblasten-Niveau führt. Diese Daten weisen darauf hin, dass neben IL-1 $\alpha$  und bFGF noch weitere Faktoren bei der Interaktion zwischen stromalen Zellen und Melanomzellen beteiligt sind.



**Abb. 19: Analyse der proMMP-1-Synthese in Fibroblasten nach Behandlung mit einer Kombination von Inhibitoren.** Fibroblasten wurden 48 h in RPMI/FKS (-) bzw. mit einer Kombination neutralisierender Antikörper und IL-1RA behandelt (+ Kombi): Neutralisierende IL-1 $\alpha$ -Antikörper (100 ng/ml); IL-1RA (100 ng/ml); neutralisierende bFGF-Antikörper (50 ng/ml). Zusätzlich wurden die Fibroblasten in 25% BLM-konditioniertem Medium (BLM k.M.) kultiviert und mit der gleichen Kombination an neutralisierenden Antikörpern bzw. IL-1RA wie oben beschrieben behandelt (+ Kombi). Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für weitere 24 h in RPMI bzw. RPMI mit 25% BLM-konditioniertem Medium kultiviert und mit den gleichen Konzentrationen an neutralisierenden Antikörpern behandelt. Die serumfreien Überstände wurden mittels Immunoblot für MMP-1 analysiert.

Die Identifikation weiterer Faktoren, die in der Interaktion zwischen Melanomzellen und Fibroblasten involviert sind erfolgte durch zwei verschiedene Methoden.

Zunächst wurde die RNS der beiden Melanomzelllinien isoliert und in Zusammenarbeit mit Prof. J.W. Fox (Universität in Virginia, USA) mittels eines Affymetrix GeneChip™ analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Affymetrix Microarray

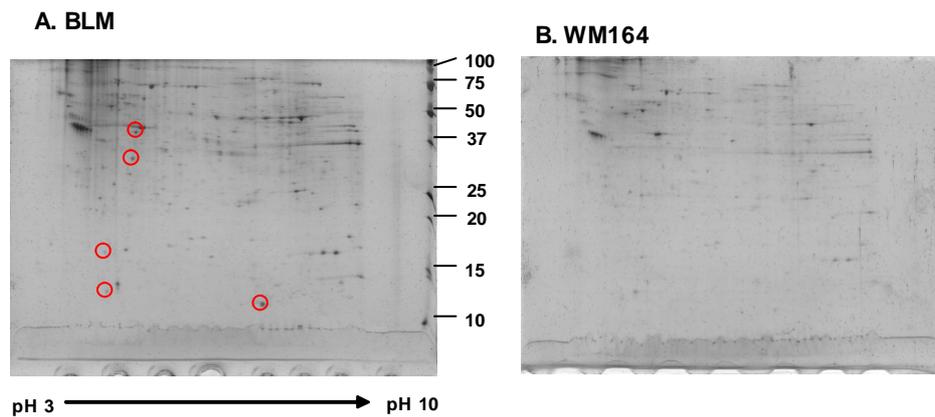
Analysis Suite 5.0 (MAS 5.0, Affimetrix Santa Clara) und der Dchip Software Ver. 1.1. Bei der Zusammenstellung der exemplarisch gezeigten Transkripte (Tabelle 9) wurde ein besonderes Augenmerk auf die Transkripte von löslichen Faktoren gelegt, die in BLM Zellen im Vergleich zu WM164 Zellen um ein Vielfaches höher vorhanden sind. Für IL-1 $\alpha$  und bFGF konnte ja bereits zuvor gezeigt werden (Tabelle 8), dass BLM Zellen höhere Konzentrationen dieser Faktoren im Vergleich zu WM164 Zellen sezernieren. Diese Tendenz spiegelt sich auch auf in der Analyse der Transkripte wider. Die spezifischen Transkripte für IL-1 $\alpha$  liegen in BLM Zellen um das 675-fache, für bFGF um das 21-fache höher als in WM164 Zellen. Die Transkripte weiterer Faktoren, von denen bekannt ist, dass sie die MMP-1-Synthese induzieren, z.B. IL-1 $\beta$  und MCP-1, sind ebenfalls in BLM Zellen im Vergleich zu WM164 Zellen deutlich erhöht.

<b>Faktoren</b>	<b>x-fache Induktion</b>
IL-1 $\alpha$	675,59
IL-6	126,0
RANTES (CCL5)	103,97
IL-1 $\beta$	111,43
MIP-2b (Gro- $\gamma$ ; CXCL3)	59,71
ENA-78 (CXCL5)	48,50
bFGF	21,11
MCP-1 (CCL-2)	18,38
aFGF	17,15
VEGF-C	14,92
VEGF	6,95
TGF $\beta$	5,28

**Tabelle 9: Erhöhte Expression spezifischer Transkripte in hoch invasiven BLM Melanomzellen im Vergleich zu wenig invasiven WM164 Melanomzellen.** Die Tabelle zeigt die x-fache Induktion spezifischer Transkripte (exemplarisch für Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren) in BLM Melanomzellen im Vergleich zu WM164 Melanomzellen.

Die Identifikation der sezernierten Proteine in den von Melanomzellen konditionierten Medien erfolgte mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese. Hierzu wurden die konditionierten Medien dieser zwei Zelllinien mittels TCA-Fällung konzentriert und in Zusammenarbeit mit dem ZMMK-ServiceLabor der Universität Köln in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt. In der ersten Dimension wurden die Proben nach ihrem isoelektrischen Punkt (nicht-linearer pH-Gradient, pH 3 bis 10), in der zweiten Dimension bezogen auf ihr Molekulargewicht auf einem 15%-igen SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele mit Silber gefärbt. Abbildung 20 zeigt exemplarisch je ein Gel für BLM- (A.) und ein Gel für WM164- (B.) konditioniertes Medium. Im direkten Vergleich zeigt sich, dass die aufgetragene Proteinmenge des WM164-konditionierten Mediums geringer ist als die Proteinmenge der BLM-Zellüberstände. Aus diesem Grund wurden die Proteine markiert, die in Bereichen lagen die auf beiden Gelen ähnlich waren. Zwei der detektierten Proteine besitzen ein Molekulargewicht von ca. 30 bis 50 kDa, die anderen drei waren mit ca. 10 bis 15 kDa deutlich kleiner. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass es sich hierbei um Zytokine oder Wachstumsfaktoren handeln könnte, da diese überwiegend niedrige Molekulargewichte besitzen.

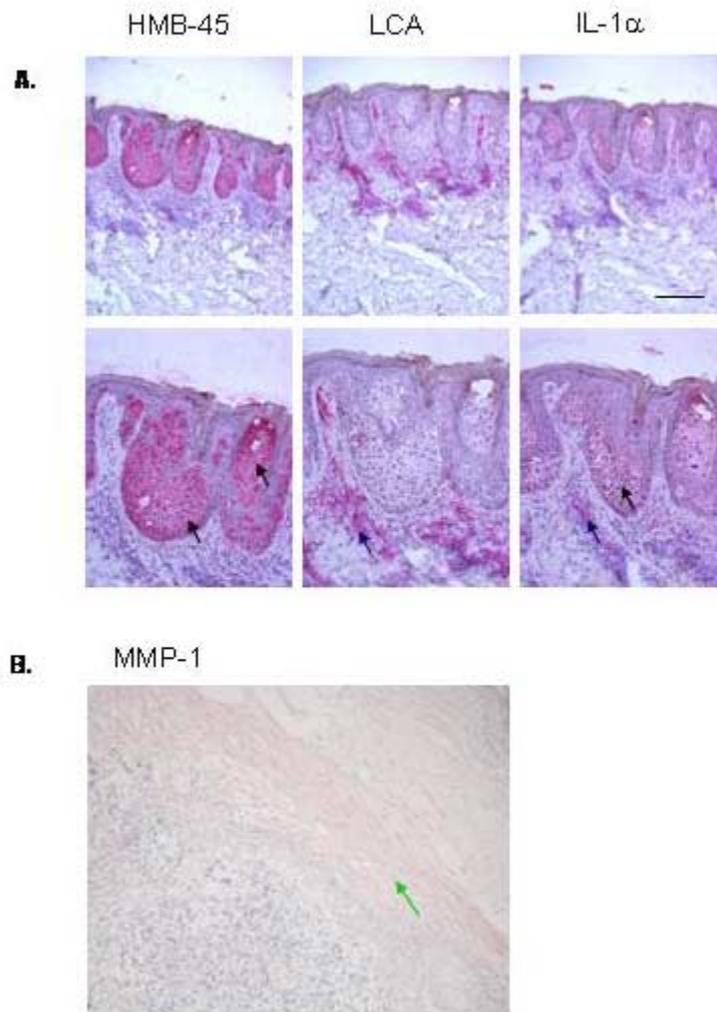
Zur weiteren Analyse der differentiell exprimierten Proteine mittels Maldi muss die Methode der Proteinfällung optimiert werden, um eine bessere Gel-Qualität zu erhalten. Gegenstand derzeitiger Untersuchungen ist die Anwendung der Phenol- und Azetonfällung und die Verwendung eines Kopräzipitators um eine größere Proteinausbeute zu ermöglichen.



**Abbildung 20: Differentiell exprimierte Proteine in BLM- und WM164-konditionierten Medien.** Die Abbildung zeigt exemplarisch eine zweidimensionale Gelelektrophorese von (A.) BLM und (B.) WM164 konditionierten Medien. Konditionierte Medien der zwei Melanomzelllinien wurden mittels TCA-Fällung konzentriert und im ZMMK-Service Labor geelektrophoretisch aufgetrennt. Rechts: Molekulargewichtsstandard in [kDa]

### 3.4 Immunhistochemische Analyse von humanen Melanom Gewebeschnitten

Zusammengefasst zeigten die Daten des *in-vitro*-Kokultur-Systems eine deutliche Beteiligung von IL-1 $\alpha$  und bFGF in der Interaktion von Melanomzellen und dermalen Fibroblasten. In den folgenden Untersuchungen wurde die Relevanz dieser Ergebnisse *in vivo* überprüft. Dazu wurden Gewebeschnitte von Melanomen immunhistochemisch gefärbt. Abbildung 21 zeigt exemplarisch die Immunhistochemie für HMB-45, LCA, IL-1 $\alpha$  und MMP-1 eines superfiziell spreizenden Melanoms (SSM). Während die Tumornester durch die Färbung mit HMB-45, einem charakteristischen Tumorantigen, identifiziert wurden (schwarze Pfeile), wurde das inflammatorische Infiltrat (weiße Pfeile) anhand der LCA-Färbung (leucocyte common antigen) dargestellt. Neben dem inflammatorischen Infiltrat wiesen auch Melanomzellen in den Tumornestern eine deutliche IL-1 $\alpha$ -Expression auf. Einzelne, für MMP-1 positive Zellen sind vor allem im angrenzenden, peritumorale Stroma lokalisiert (grüne Pfeile).



**Abbildung 21: Histologische Schnitte eines humanen superfiziell spreizenden Melanoms (SSM).**

**(A.)** Gewebeschnitte (8  $\mu\text{m}$ ) eines humanen Melanoms wurden mit 4% PFA/PBS fixiert und für HMB-45, LCA und IL-1 $\alpha$  gefärbt. **(B.)** Paraffinschnitte des primären Melanoms wurden entparaffiniert, mit Hilfe eines Zitratpuffers demaskiert und mit Antikörpern gegen HMB-45 und MMP-1 gefärbt.

Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines AP-konjugierten anti-mouse/anti-rabbit-Polymer mit Neofuchsin als Substrat. Die schwarzen Pfeile zeigen die Melanomnester, die blauen Pfeile zeigen das inflammatorische Infiltrat, und die grünen Pfeile zeigen die Lokalisation von MMP-1. Balken = 50  $\mu\text{m}$

### 3.5 IL-1-Inhibition im Mausmodell

Die bislang gezeigten *in-vitro*-Daten deuten darauf hin, dass die von Melanomzellen sezernierten löslichen Faktoren IL-1 $\alpha$  und bFGF stromale Fibroblasten zur vermehrten MMP-1-Synthese stimulieren können. Dabei ist jedoch zu beachten, dass es sich bei diesem Kokultur-System um ein vereinfachtes System handelt. In Arbeiten der Gruppe von Prof. Mauch (Dissertation J. Köhle) wurde mittels *in-situ*-Zymographie bereits gezeigt, dass in den Tumoren immundefizienter Mäuse, denen intradermal BLM Melanomzellen injiziert wurden, erhöhte gelatinolytische Aktivität an der Tumor-Stroma-Grenze nachzuweisen ist. Darüber hinaus konnte eine Induktion der MMP-13 in stromalen Zellen detektiert werden, was darauf hindeutet, dass humane Melanomzellen auch im murinen System die Synthese und Aktivität der Matrix Metalloproteinasen modulieren können. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Relevanz von IL-1 $\alpha$  im murinen System durch die Blockierung der IL-1-Signaltransduktion analysiert.

Hierzu wurden zehn Mäusen je  $1 \times 10^5$  hoch invasive humane BLM Melanomzellen injiziert. Fünf der Tiere erhielten jeden zweiten Tag eine Injektion des rekombinanten IL-1RA (1  $\mu$ g pro Tier). Ein Tier, dem keine Melanomzellen injiziert wurden, wurde ebenfalls jeden zweiten Tag mit dem IL-1RA behandelt.

In den unbehandelten Tieren #8-12 (Abbildung 22; - IL-1RA), waren nach 16 Tagen die ersten Tumore sichtbar. Insgesamt war das Wachstum der kutanen Tumore jedoch sehr heterogen. Während Tier #9 aufgrund eines nekrotischen Tumors bereits an Tag 22 getötet wurde, konnte in Tier #12 erst nach einer Versuchsdauer von 26 Tagen ein kleiner kutaner Tumor beobachtet werden.

Ein ähnlich heterogenes Tumorstadium zeigt sich in den IL-1RA behandelten Tieren #3-7 (Abbildung 22; +IL-1RA). Erste messbare Tumore wurden ebenfalls nach sechzehn Tagen Versuchsdauer beobachtet. Während Tier #6 über die gesamte Versuchsdauer keinen kutanen Tumor ausbildete, musste Tier #7 ebenfalls aufgrund eines nekrotischen Tumors frühzeitig getötet werden. Das Kontrolltier #2, welches lediglich Injektionen des Rezeptorantagonisten erhielt, zeigte über die gesamte Versuchsdauer keine Beeinträchtigung an der Injektionsstelle.

Insgesamt wurde also kein vermindertes Wachstum der kutanen Tumore in IL-1RA-behandelten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Tieren beobachtet.

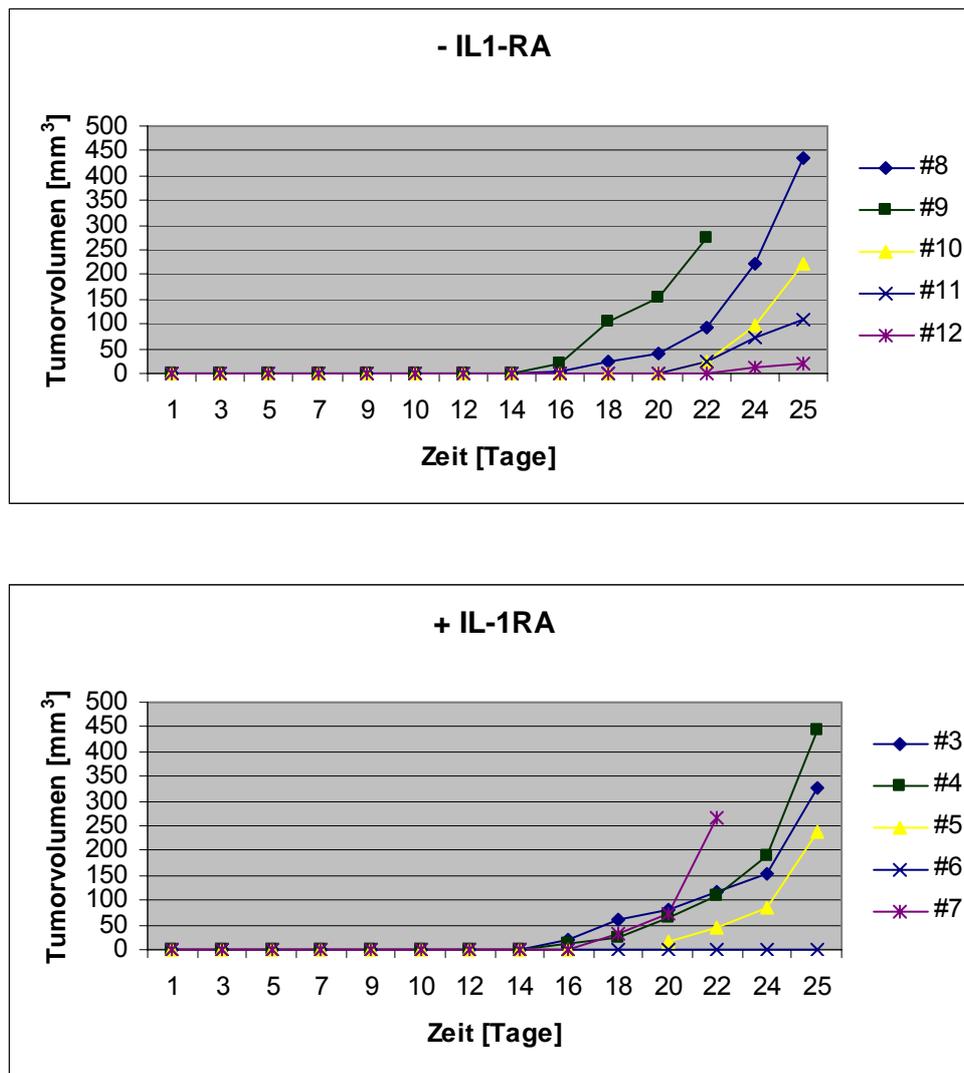
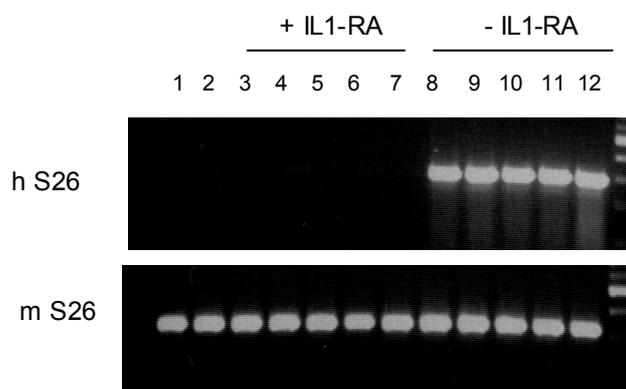


Abbildung 22: Wachstum der BLM Tumoren ohne (- IL-1RA) und mit (+ IL-1RA) Behandlung mit IL-1RA als Funktion der Zeit.

Die Detektion von Organmetastasen erfolgte mittels PCR-Analyse, unter Verwendung von Primern für das humane S26-Gen (siehe Punkt 3.1.1).

Hierbei fällt auf, dass in Tier #6, welches bis zum Versuche keine kutanen Tumore aufwies, im Lymphknoten und in der Leber Metastasen vorhanden sind. Auch in Tier #12, welches mit  $20,4 \text{ mm}^3$  nur einen kleinen Tumor hatte, finden sich Metastasen im Lymphknoten, in der Lunge, der Leber und der Milz. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Injektion der Melanomzellen nicht intradermal erfolgte, sondern in tieferen Bereichen der Dermis oder Blut- und Lymphbahnen. In Nieren, Herzen und Gehirnen der unbehandelten und behandelten Tiere waren keine Metastasen nachweisbar. Die auffallendste Beobachtung ist jedoch der Befund der Lungen (Abbildung 23). Während alle unbehandelten Tiere (Tier #8-12) eine deutliche

Metastasierung der Lunge aufwies, konnten in den IL-1RA-behandelten Tieren (Tier #3-7) keine Lungenmetastasen detektiert werden. Diese Daten legen nahe, dass, *in vivo*, die Blockierung der IL-1-Signaltransduktion durch den humanen rekombinanten IL-1RA eine verminderte Invasion der Melanomzellen durch die Dermis bewirkt.



**Abb. 23:** Repräsentatives Agarosegel der PCR-Produkte des humanen und murinen S26-Gens in der Lunge von behandelten (+ IL-1RA, #3-7) und unbehandelten (- IL-1RA, #8-12) Tieren. Tiere #1 und 2 dienten als Negativkontrollen (keine Injektion von Melanomzellen). Das murine S26-Gen diente als Ladekontrolle. Als Größenstandard wurde eine 100 bp-Leiter verwendet.

Tier	Tumor	Lunge	Lymphknoten	Leber	Niere	Milz	Herz	Gehirn
#1. Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-
#2. IL-1RA	-	-	-	-	-	-	-	-
#3. BLM + IL-1RA	+++	-	-	-	-	-	-	-
#4. BLM + IL-1RA	+++	-	-	-	-	-	-	-
#5. BLM + IL-1RA	+++	-	-	-	-	-	-	-
#6. BLM + IL-1RA	-	-	++	++	-	-	-	-
#7. BLM + IL-1RA	+++	-	++	-	-	-	-	-
#8. BLM	+++	++	-	-	-	-	-	-
#9. BLM	+++	++	+++	-	-	-	-	-
#10. BLM	+++	++	+	++	-	++	-	-
#11. BLM	+++	++	-	-	-	-	-	-
#12. BLM	n.a.	++	+	++	-	++	-	-

**Tabelle 10:** Nachweis humaner BLM Melanomzellen mittels PCR mit Primern für das humane S26-Gen. +++, ++, + und - steht für sehr stark, stark, schwach und nicht positiv für S26 Transkript. n.a. = nicht analysiert. Weil der Tumor zu klein war, wurde bei Tier #12 kein Material für die RNS-Analyse entnommen. Murines S26 diente bei allen PCR-Ansätzen als interner Standard.

### **3.6 Veränderte Genexpression in Fibroblasten nach Stimulation mit durch Melanomzellen-konditionierten Medien**

Im nächsten Schritt sollte die Frage geklärt werden, ob die Synthese von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in Fibroblasten, die mit Melanomzellen konditionierten Medien stimuliert wurden, moduliert ist. So eine Induktion könnte zu einer vermehrten Rekrutierung von Immunzellen oder zu einer induzierten Neovaskularisation im peritumoralen Stroma führen.

Hierzu wurden dermale Fibroblasten 72 h in durch Melanomzellen-konditionierten Medien (BLM und WM164 Zellen) kultiviert und die RNS von den Fibroblasten mittels eines Affymetrix GeneChip™ analysiert (Professor. J.W. Fox; Universität in Virginia, USA).

Bei der Auswertung der Genanalyse wurde ein besonderes Augenmerk auf Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren gelegt (Tabelle 11). Zu den Transkripten die unterschiedlich stark reguliert wurden, gehören RANTES, MIP-3A, IL-1 $\beta$  und VEGF.

RANTES (CCL5) unterlag hierbei einer sehr starken Induktion. Die Stimulation mit BLM-konditioniertem Medium führte zu einer 190-fachen Induktion in Fibroblasten, die Stimulation durch WM164-konditioniertes Medium lag im Bereich einer 80-fachen Induktion. Zusätzlich unterlag MIP-3A (CCL20) einer Induktion, wobei die Medien von hoch invasiven BLM Zellen zu einer 48-fachen Induktion, Medien von wenig invasiven WM164 Zellen zu einer 111-fachen Induktion führten. Das Transkript für MCP-1 (CCL2) wurde durch die Stimulation beider konditionierter Medien induziert. Die Gene, die für Chemokine des CXC-Motivs kodieren, wurden durch die Medien hoch und wenig invasiver Melanomzellen induziert, wobei die Unterschiede sehr gering waren. Das Transkript für den CXCR1 (Rezeptor für IL-8 und GCP-2) wurde durch die Medien beider Melanomzellen induziert, der CXCR4 (Rezeptor für SDF-1 $\alpha/\beta$ ) nur durch das Medium hoch invasiver Melanomzellen.

Das Transkript für den IL-1-Rezeptor wurde ebenfalls nach Stimulation der Fibroblasten mit konditionierten Medien von BLM und WM164 Zellen induziert. Die Transkription des bFGF-Rezeptors war hingegen nur durch Medium hoch invasiver Melanomzellen induziert. Das Aktivin-Rezeptor-Transkript wurde durch die Behandlung mit durch Melanomzellen konditionierten Medien reprimiert. Von Aktivin konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass es die MMP-1-Synthese in dermalen Fibroblasten inhibiert (Abbildung 16). In Tabelle 9 sind eine Reihe weiterer Gene aufgelistet, die für

Zytokine und Wachstumsfaktoren kodieren, deren Transkripte jedoch durch die Stimulation mit Medien hoch bzw. wenig invasiver Melanomzellen nicht reguliert wurden.

Die Transkripte der Proteasen Cathepsin B und uPA wurden durch die Behandlung mit konditionierten Medien von hoch und wenig invasiven Melanomzellen reprimiert. Die Transkription von tPA war in beiden Fällen induziert. ADAMTS-9, ein Mitglied der Disintegrin-like und Metalloprotease Familie mit Thrombospondin-Typ-1-Motiv, wurde durch die Behandlung der Fibroblasten mit BLM-konditionierten Medium induziert.

Die Transkripte für Matrix Metalloproteinasen, insbesondere MMP-1, lagen unterhalb einer 1,5-fachen Induktion und wurden deshalb in dieser Auswertung diskriminiert.

---

**x-fache Änderung der Genexpression in Fibroblasten**


---

		durch BLM k.M	durch WM164 k.M.
Liganden mit CC-Motiv	RANTES (CCL5)	94,01	84,45
	MCP-1 (CCL2)	4,92	6,5
	MIP-3A (CCL20)	48,5	111,43
Liganden mit CXC-Motiv	GCP-2	68,59	90,51
	MIP-2b, Gro- $\gamma$	55,72	68,59
	MIP-2a, Gro- $\beta$	22,63	34,3
	MGSA- $\alpha$	42,22	51,98
Rezeptoren mit CXC-Motiv	CXCR4	4,29	-
	CXCR1	4	4
Zytokine und Rezeptoren	IL-24	8,57	17,15
	IL-1 $\beta$	5,66	27,86
	IL-6	9,85	13
	IL-11	6,5	-
	IL-15	4	4,59
	IL-1R1	18,38	18,38
	IL-4R, CD 124	2,64	-
	IL-1RA	16	5,66
Wachstumsfaktoren und Rezeptoren	bFGF 2	3,48	3,48
	bFGF 5	-3,03	-2,14
	bFGF 7	2,83	4,29
	VEGF	2,46	-
	bFGF-R1	2,46	-
	Aktivin-R Typ II	-2	-1,87
	Interferon-R1	-2,14	-8
Proteasen	Cathepsin D	-2,14	-6,06
	ADAMTS-9	4,29	-
	tPA	4	3,48
	uPA	-2,14	-1,74

**Tabelle 11: Veränderte Genexpression in dermalen Fibroblasten nach Stimulation mit konditionierten Medien von hoch invasiven BLM (BLM k.M) und wenig invasiven WM164 (WM164 k.M.) Melanomzellen.** Die Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der x-fachen Änderung der spezifischen Transkripte (exemplarisch für Chemokine, Chemokin-Rezeptoren, Zytokine, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, sowie Proteasen) in Fibroblasten nach Stimulation mit BLM und WM164 konditioniertem Medium im Vergleich zu nicht stimulierten Fibroblasten.

### **3.7 Analyse der Interaktionen von humanen Melanomzellen mit humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMECs)**

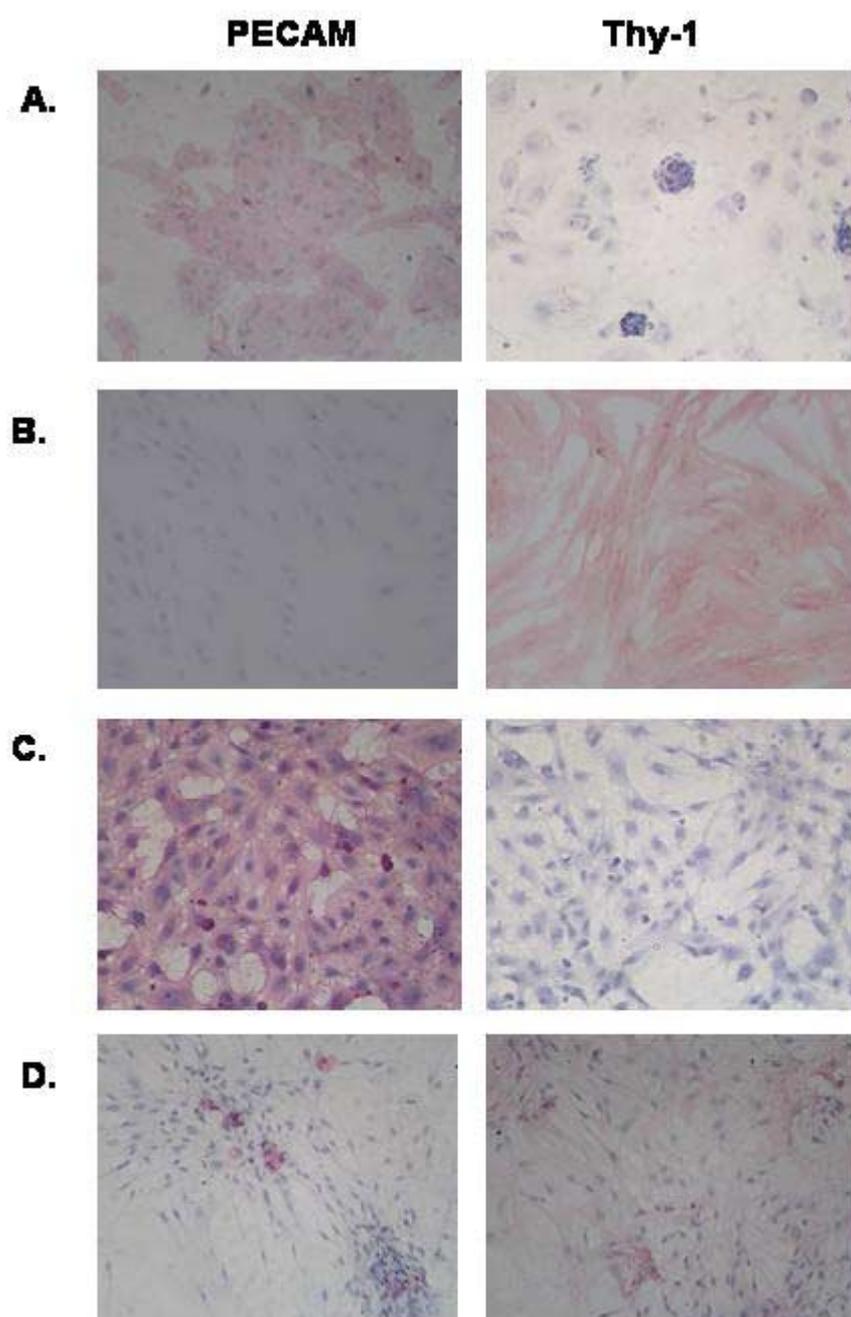
Das Wachstum von Tumoren über eine Größe von 1 bis 2 mm<sup>3</sup> setzt, zur Bereitstellung von Nährstoffen, eine Vaskularisierung des Tumors voraus. Die gerichtete Ausbildung der Gefäße auf den Tumor zu wird durch die Tumorzellen induziert. Sie erfordert proteolytische Aktivität zur Degradation der bereits vorhandenen Endothelien und zur Degradation des interstitiellen Bindegewebes.

Hieraus ergab sich die Fragestellung, ob Melanomzellen in der Lage sind, dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMECs) zu aktivieren und auf welchen molekularen Mechanismen diese mögliche Interaktion beruht.

#### **3.7.1 Präparation primärer dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen**

Bei der Isolation dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen aus humaner Haut stellte sich heraus, dass die in der Literatur verwendeten Standardprotokolle keine reinen Endothelzellpopulationen ergeben. In Vorversuchen, bei denen Hautbiopsien gesunder Spender zwischen 1 und 12 h bei 37°C in Kollagenaselösung inkubiert wurden, zeigte sich, dass Kontaminationen anderer Zelltypen, insbesondere Fibroblasten, nach einer 1- bis 2-stündigen Inkubation am geringsten waren. Die so gewonnenen heterogenen Zellsuspensionen wurden zunächst in Zellkulturplatten ausgesät. Nach dem Anhaften der adhärent wachsenden Zellen wurden die Zellen im Überstand, z.B. Erythrozyten und Leukozyten, durch mehrfaches Waschen mit PBS entfernt. Um die Reinheit der Endothelzellpopulation zu optimieren, wurden die Fibroblasten aus dieser gemischten Zellpopulation mittels magnetischer Zellsortierung MACS selektiv depletiert. Etwa 3 Tage später erfolgte die Isolierung der HDMECs. Die Reinheit der so gewonnenen Zellen wurde schließlich immunzytochemisch durch den Nachweis des „platelet/endothelial cell adhesion molecule-1“ (PECAM) bzw. des Fibroblasten-spezifischen Proteins (Thy-1) überprüft. Als Kontrollen dienten zusätzlich Fibroblasten und kommerziell erworbene HDMECs.

Fibroblasten zeigen eine stark positive Färbung für Thy-1, sind jedoch komplett negativ für PECAM (Abbildung 24). Kommerziell erworbene HDMECs hingegen zeigen eine positive PECAM- und eine negative Thy-1-Färbung. Die exemplarisch dargestellten Präparationen von Endothelzellen zeigen keine (in C.) bzw. deutliche Kontaminationen (in D.) mit Fibroblasten. Letztere wurden erneut mit Hilfe der MACS-Depletion aufgereinigt.



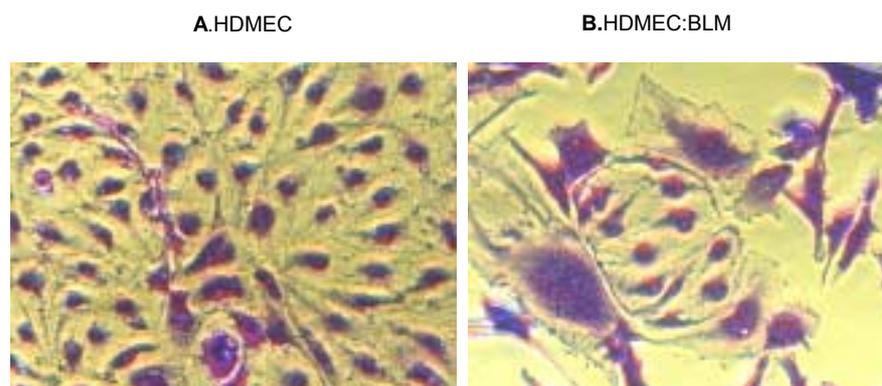
**Abbildung 24: Immunzytochemische Färbung zur Bestimmung der Reinheit der isolierten Zellpopulationen.** Fibroblasten, kommerziell erworbene HDMECs und eigenständig isolierte Zellpopulationen wurden wie in „Material und Methoden“ (2.2.3.3) beschrieben kultiviert und gegen Thy-1 und PECAM gefärbt. **(A.)** kommerziell erworbene HDMECs; **(B.)** primäre Fibroblasten; **(C. und D.)** zwei unterschiedliche HDMEC-Präparationen aus Haut gesunder Spender; 100-fache Vergrößerung

### 3.7.2 Analyse der Interaktionen von Melanomzellen und Endothelzellen im zweidimensionalen Zellkultursystem

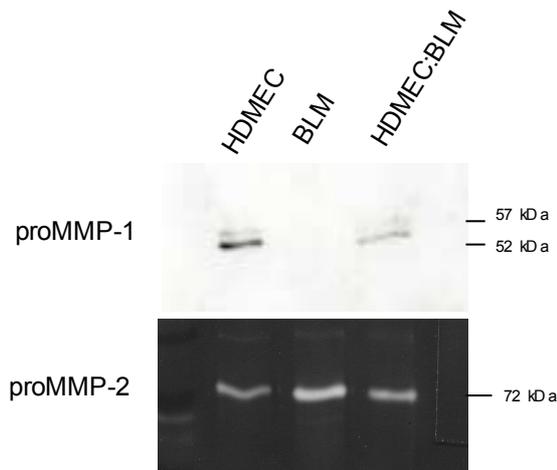
Anschließend sollte untersucht werden, ob die Synthese verschiedener MMPs durch den direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen Melanomzellen und HDMECs beeinflusst wird. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Kollagen degradierende MMP-1, deren Aktivator MMP-3 und auf die Gelatinasen, die denaturiertes Kollagen degradieren, gelegt.

Die mikroskopische Analyse der Endothelzellen zeigt die typisch runde, „Zwiebelschalen“ ähnliche Morphologie (Abbildung 25 A.). Zwischen den Melanomzellen, die zum teil große polymorphe Zellkerne aufweisen, befinden sich im direkten Kontakt einzelne Kolonien der Endothelzellen (B.).

Immunoblot-Analysen zeigten, dass Endothelzellen basale Mengen an proMMP-1 synthetisieren, während, wie schon in vorherigen Analysen gezeigt, BLM Melanomzellen keine MMP-1 synthetisieren (Abbildung 26). Weder Endothelzellen noch BLM Zellen besitzen detektierbare Mengen der MMP-3 (nicht gezeigt). Das Zymogramm zeigte sowohl in HDMECs als auch in BLM Monokulturen, eine basale proMMP-2-Synthese. MMP-9 ist dagegen in diesem Kokultur-System nicht nachweisbar. Die direkte Kokultur der beiden Zelltypen zeigt keine Veränderung in der Synthese von proMMP-1 und proMMP-2.



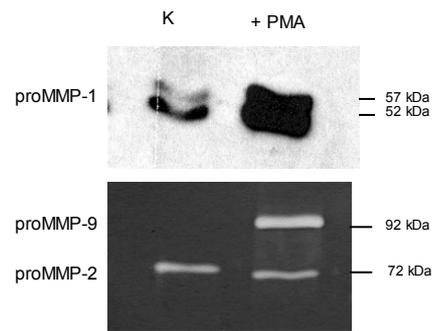
**Abbildung 25: Zellmorphologie der HDMECs im direkten Zell-Zell-Kontakt mit BLM Melanomzellen.** HDMECs wurden als Monokultur (A.) und im direkten Zell-Zell-Kontakt mit BLM Melanomzellen (B.) für 72 h kultiviert und anschließend mit Kristall-Violett gefärbt.



**Abbildung 26: Analyse der proMMP-1-Regulation und der gelatinolytischen Aktivität bei der Kokultivierung von BLM Melanomzellen mit HDMECs.** HDMECs und BLM Melanomzellen wurden als Monokulturen und im direkten Zell-Zell-Kontakt für 48 h kultiviert. Die serumfreien Überstände wurden mittels Immunoblot für MMP-1 und mittels Gelatine-Zymogramm analysiert.

Ausgehend von Beobachtungen an anderen Tumorzellen, z.B. Kolon- oder Mammakarzinomen (Hewett, 2001; Ogawa *et al.*, 2000), die via Sekretion angiogener Faktoren Endothelzellen aktivieren können, wurde auch der Einfluss von durch Melanomzellen konditioniertem Medium auf Endothelzellen untersucht. Hierzu wurden HDMECs in Gegenwart aufsteigender Konzentrationen des konditionierten Mediums kultiviert. Die Analyse der serumfreien Überstände der stimulierten Endothelzellen zeigt weder eine Regulation der MMP-1-Synthese noch eine Aktivierung der Gelatinasen (Daten nicht gezeigt).

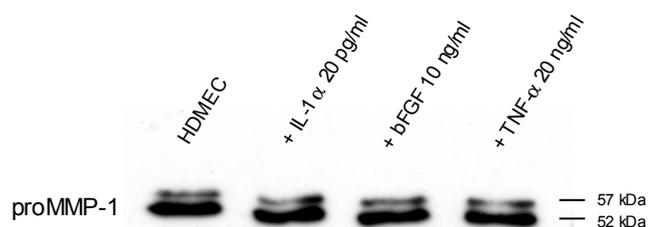
Die Aktivierung von Endothelzellen mit Phorbolestern ist in der Literatur bereits eingehend beschrieben (Montesano und Orci, 1985). In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass PMA an der Differenzierung von Endothelzellen beteiligt ist. Während sich die Morphologie der Endothelzellen nach Stimulation mit PMA (50 nM) nicht veränderte (Daten nicht gezeigt), konnte nach der Analyse der serumfreien Überstände eine Induktion der proMMP-1- und der MMP-9-Synthese beobachtet werden (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Induktion der MMP-1- und MMP-9-Synthese in humanen mikrovaskulären Endothelzellen durch PMA.** Unbehandelte (K) und PMA-stimulierte (+PMA; 50 nM) HDMECs wurden 48 h kultiviert. Anschließend wurden die serumfreien Überstände mittels Immunoblot auf das Vorhandensein von MMP-1 und mittels Gelatine-Zymographie analysiert.

Von den angiogenen Faktoren, VEGF, bFGF, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$ , konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an der Induktion einer tubulären Endothelzellmorphologie und an der Vaskularisierung von Tumoren beteiligt sind (Collen *et al.*, 2003; Graeven *et al.*, 2001).

Um den Einfluss dieser Faktoren auf HDMECs zu analysieren, wurden die Endothelzellen mit rekombinanten bFGF, IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  stimuliert und anschließend die Synthese von MMP-1 untersucht. Keiner der rekombinanten Induktoren hatte, in den gewählten Konzentrationen, einen Einfluss auf die proMMP-1-Synthese (Abbildung 28). Auch die Zellmorphologie war nicht verändert, und insbesondere die Ausbildung tubulärer Strukturen konnte nicht beobachtet werden.



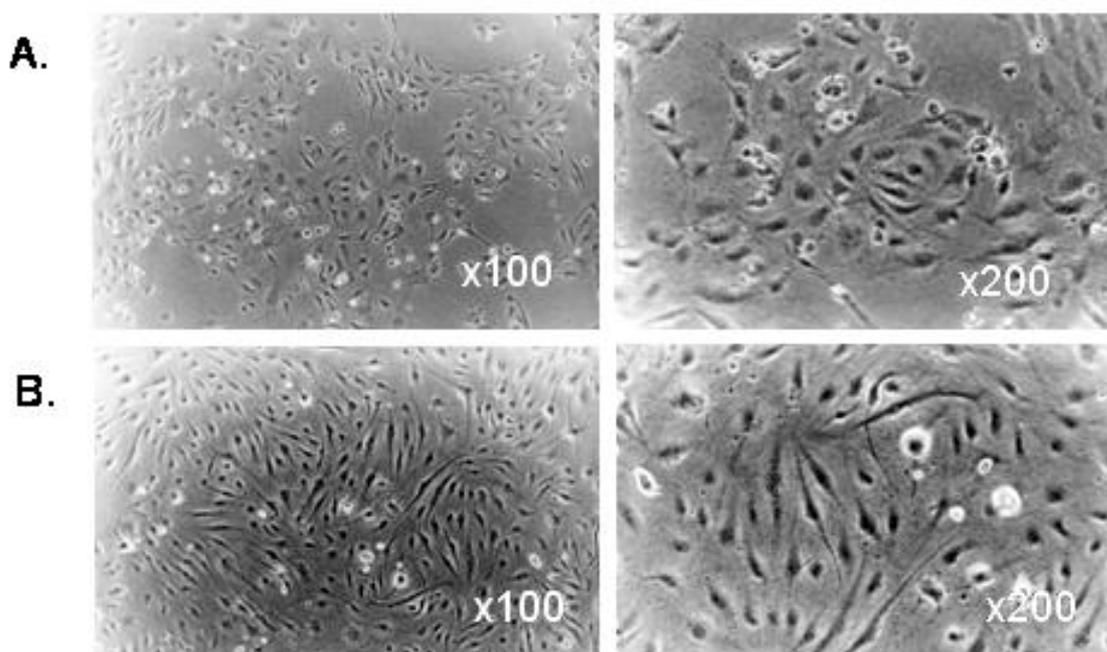
**Abbildung 28: Stimulation von HDMECs mit rekombinanten Zytokinen und Wachstumsfaktoren.** HDMECs wurden 48 h in Gegenwart verschiedener rekombinanter Proteine kultiviert (IL-1 $\alpha$ , 20 pg/ml; TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml und bFGF, 20 ng/ml), mit PBS serumfrei gewaschen und weitere 24 h in Gegenwart dieser Faktoren kultiviert. Die Analyse der serumfreien Überstände erfolgte mittels Immunoblot für MMP-1.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass Melanomzellen der Linie BLM die Synthese der von uns analysierten sezernierten MMPs in HDMECs nicht verändern, wenn diese als Monolayer in Abwesenheit von Matrix kultiviert wurden.

### **3.7.3 Analyse der Interaktion von Melanomzellen mit Endothelzellen in komplexen, dreidimensionalen Systemen**

In weiteren Studien wurde daher untersucht, ob ein dreidimensionales System, bestehend aus einer Fibrin- bzw. Kollagenmatrix, die *in-vivo*-Situation der tumorinduzierten Angiogenese besser entspricht. Eine Reihe von Daten weist darauf hin, dass Endothelzellen nach Stimulation durch bFGF/TNF- $\alpha$  oder VEGF/TNF- $\alpha$  Fibringele invadieren können (Collen *et al.*, 2003; Collen *et al.*, 1998). Diese Stimulation der Endothelzellen bewirkt eine Elongation der Zellen und die Migration in die dreidimensionale Fibrinmatrix. Die für diesen Prozess erforderliche proteolytische Aktivität wird zum einen von verschiedenen MMPs, einschließlich der membranständigen MMPs, und zum anderen durch Serinproteasen, z.B. uPA, induziert (Collen *et al.*, 2003).

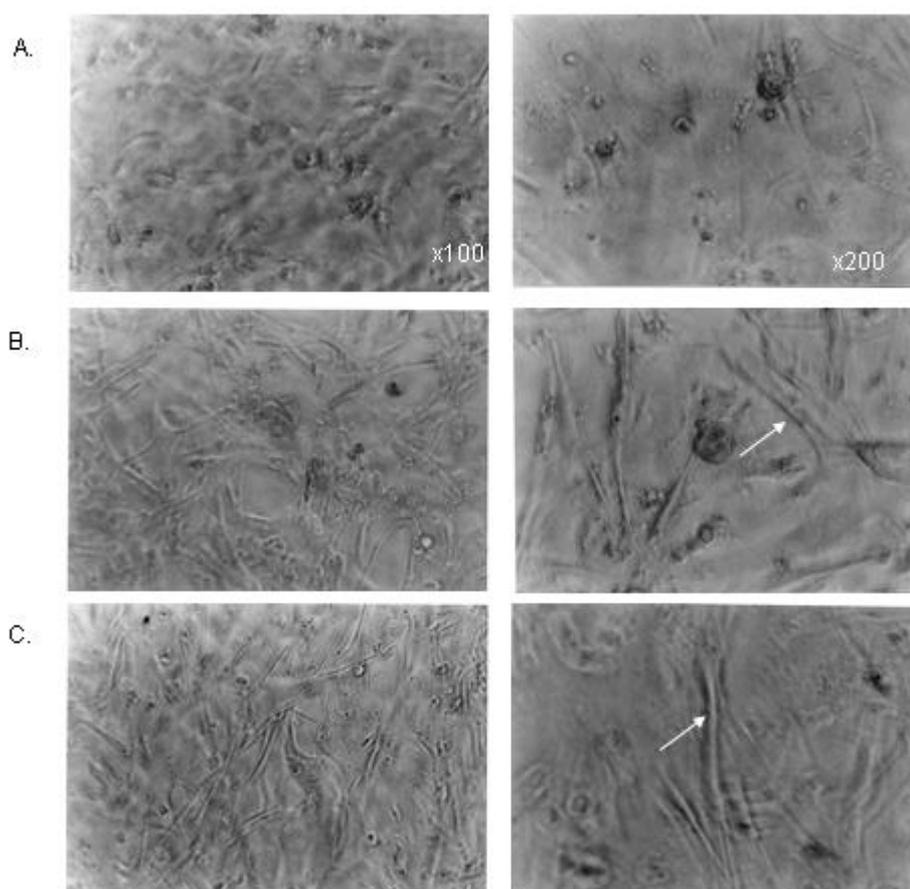
Die Induktion tubulärer Strukturen aus Endothelzellen durch die Stimulation mit PMA in komplexen Gelsystemen, z.B. Fibrin- und Kollagengelen, ist in der Literatur eingehend beschrieben (Montesano und Orci, 1985). Um die Stimulierbarkeit der primären mikrovaskulären Endothelzellen zu überprüfen, wurden diese in einer Dichte von  $5 \times 10^4$  HDMECs/ml Medium für 24 h in Endothelzellmedium auf Fibrin- bzw. Kollagengelen kultiviert. Dabei wurde je eine Gruppe mit PMA/ITS (50 nM PMA + einfach konzentriertes Insulin, Transferrin und Natrium-Selenit) stimuliert. Endothelzellen, die auf der Oberfläche eines Kollagengels ausgesät werden, adhären an der Oberfläche des Gels und bilden die für Endothelzellen typischen „Zwiebelschalen“ ähnlichen Zellkolonien. Die Stimulation mit PMA/ITS führt zur Elongation der Endothelzellen (Abbildung 29 B.). Eine vermehrte Migration in die Kollagenmatrix ist jedoch nicht zu beobachten.



**Abbildung 29: Etablierung des Angiogenese Assays auf einer Kollagenmatrix.**

**(A.)** HDMECs auf einem Kollagengel; **(B.)** Stimulation mit PMA/IST; 100- und 200-fache Vergrößerung

Weiterhin wurden Endothelzellen unter gleichen Bedingungen auf Fibringelen kultiviert. Ähnlich wie für das Kollagengel gezeigt, adhären die Endothelzellen an der Fibrinmatrix, können diese jedoch im Gegensatz zum Kollagengel auch invadieren (Abbildung 30 A.) und bilden dreidimensional orientierte, tubuläre Strukturen aus. Die Stimulation mit PMA/ITS führt zu einer noch stärkeren Veränderung der Endothelzellen-Morphologie. Die Zellen weisen neben einer Elongation und der Fusion einzelner Endothelzellen zu tubulären Strukturen eine vermehrte Invasion ins Fibringel auf (B.). Es stellte sich nun die Frage, ob Überstände von hoch invasiven Melanomzellen ebenfalls in der Lage sind, diese beobachteten morphologischen Änderungen der Endothelzellen zu induzieren. Die 100-fache Vergrößerung (C.) zeigt, dass die Stimulation mit BLM-konditioniertem Medium im vergleichbaren Ausmaß (wie die PMA/ITS-Stimulation) die Ausbildung tubulärer Strukturen induziert. Die typische tubuläre Lumenbildung ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

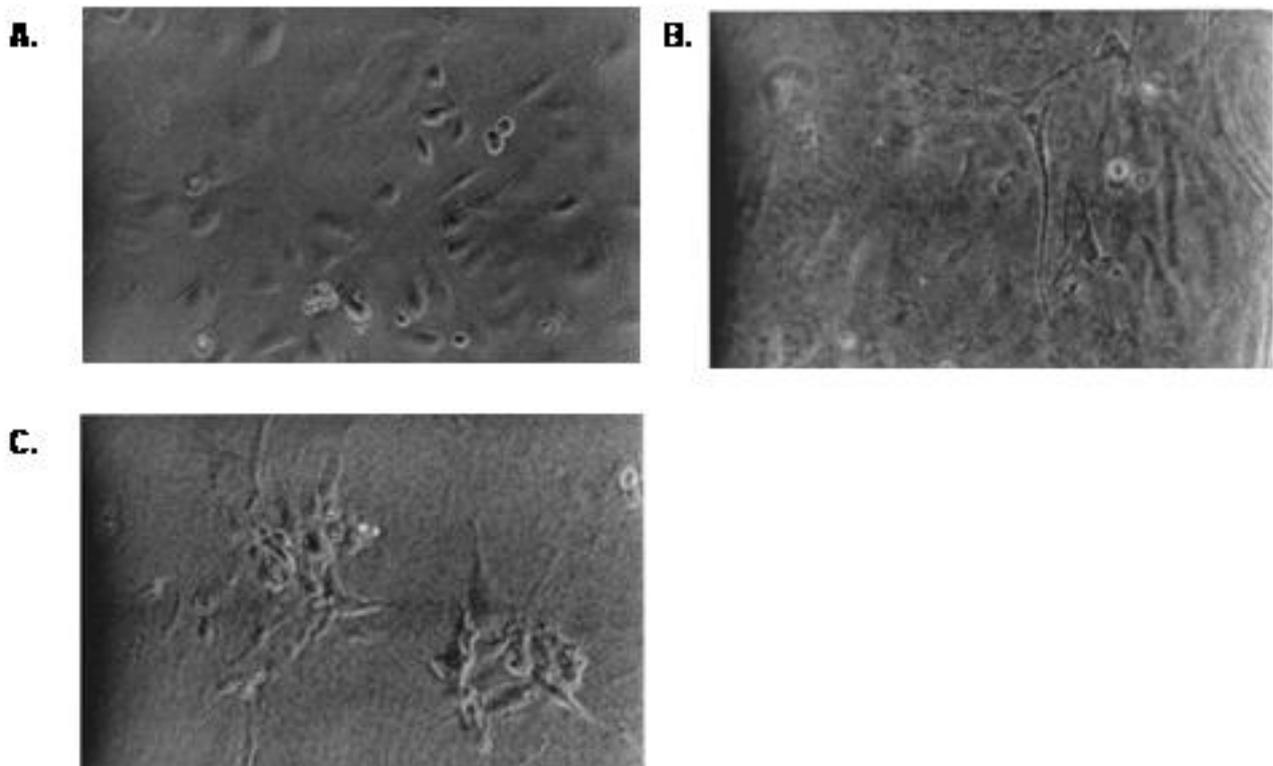


**Abbildung 30: Angiogenese Assay mit konditioniertem Medium hoch invasiver Melanomzellen.** (A.) HDMECs auf einem Fibringel; (B.) Stimulation mit PMA/ITS; (C.) Stimulation mit BLM Zellen konditioniertem Medium; 100- und 200-fache Vergrößerung

Die Kokultur von wenig invasiven WM164 Melanomzellen mit Fibroblasten zeigt, dass diese Melanomzellen im Gegensatz zu hoch invasiven BLM Zellen nicht in der Lage sind, die MMP-1-Synthese in Fibroblasten zu induzieren. Diese Beobachtung könnte ein Aspekt sein, warum wenig invasive Melanomzellen ein langsames Wachstum im Mausmodell zeigten. Weiterhin kann auch eine verminderte tumorinduzierte Angiogenese für das langsame Wachstum der wenig invasiven WM164 Melanomzellen im Mausmodell verantwortlich sein.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden die HDMECs für 24 h in Endothelzellmedium bzw. BLM- und WM164-konditionierten Medium auf Fibringelen kultiviert. In Gegenwart von WM164-konditioniertem Medium bilden Endothelzellen keine tubulären Strukturen aus (Abbildung 31 C.). Darüber hinaus ist deutlich zu erkennen, dass die Endothelzellen

nicht in die Fibrinmatrix hinein migrieren. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass sich die analysierten hoch und wenig invasiven Melanomzellen qualitativ und quantitativ in der Synthese löslicher Faktoren unterscheiden.

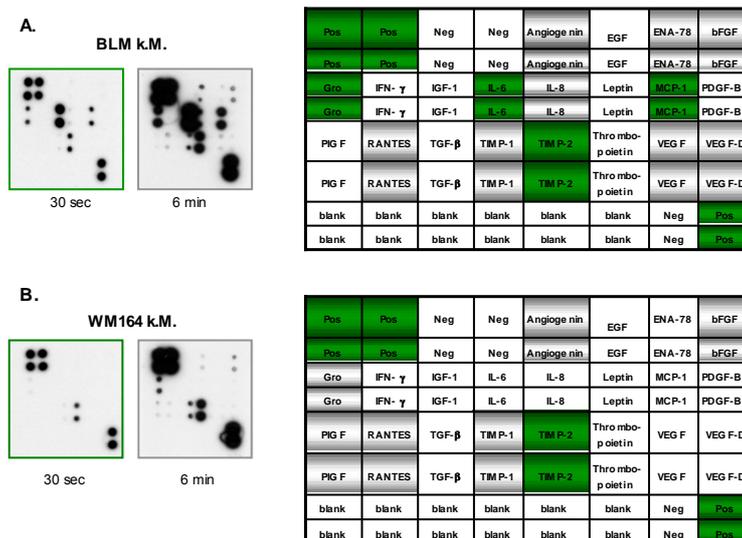


**Abbildung 31: Ausbildung tubulärer Strukturen durch Endothelzellen in Anwesenheit von durch Melanomzellen konditionierter Medien. (A.) HDMECs auf einem Fibrinigel; (B.) Stimulation mit BLM-konditioniertem Medium; (C.) Stimulation mit WM164-konditioniertem Medium; 200-fache Vergrößerung**

### **3.7.4 Identifizierung pro- und anti-angiogener Faktoren in hoch und wenig invasiven Melanomzellen**

Um genauere Informationen über die Identität und die Menge der löslichen Faktoren zu erhalten, wurden die Überstände der Melanomzellen mit Hilfe des RayBio<sup>®</sup> humanen „Angiogenese Arrays“ analysiert. Diese Membran ermöglicht die Identifizierung von 20 pro- und anti-angiogenen Faktoren. Hierzu wurden die Membranen mit konditionierten Medien der BLM und WM164 Melanomzellen hybridisiert und die gebundenen Faktoren durch Zugabe eines biotinylierten Antikörpermixes markiert. Die Detektion dieser Antikörper erfolgte durch Zugabe von

HRP-konjugiertem Streptavidin. Abbildung 32 zeigt exemplarisch zwei verschiedene Expositionen eines Röntgenfilms der Membranen, die mit BLM- (A.) und mit WM164-konditioniertem Medium (B.) hybridisiert worden waren. Bereits nach 30-sekündiger Belichtung lassen sich deutliche Unterschiede in der Menge der löslichen Faktoren feststellen. Beide Zelllinien sezernieren große Mengen des MMP-Inhibitors TIMP-2, welches bereits nach 30-sekündiger Exposition zu detektieren war. Während geringerer Mengen an Gro- $\alpha$  bei längerer Exposition auch in den wenig invasiven Melanomzellen detektiert wurden, konnten IL-6 und MCP-1, aber auch IL-8, VEGF, VEGF-D und ENA-78 in den wenig invasiven Melanomzellen nicht nachgewiesen werden. Die Faktoren TIMP-1, RANTES, Angiogenin und bFGF werden von beiden Zelllinien in geringeren Mengen sezerniert und waren somit erst nach längerer Exposition des Röntgenfilms sichtbar. Der einzige Wachstumsfaktor, der nur von wenig invasiven WM164 Melanomzellen sezerniert wird, ist PlGF. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass hoch invasive BLM Melanomzellen im Vergleich zu wenig invasiven WM164 Zellen ein größeres Spektrum an löslichen Faktoren sezernieren. Die hier analysierten Faktoren sind jedoch nicht nur in angiogenen Prozessen involviert, sondern können auch in der Interaktion zwischen Melanomzellen und Fibroblasten eine bedeutende Rolle spielen.

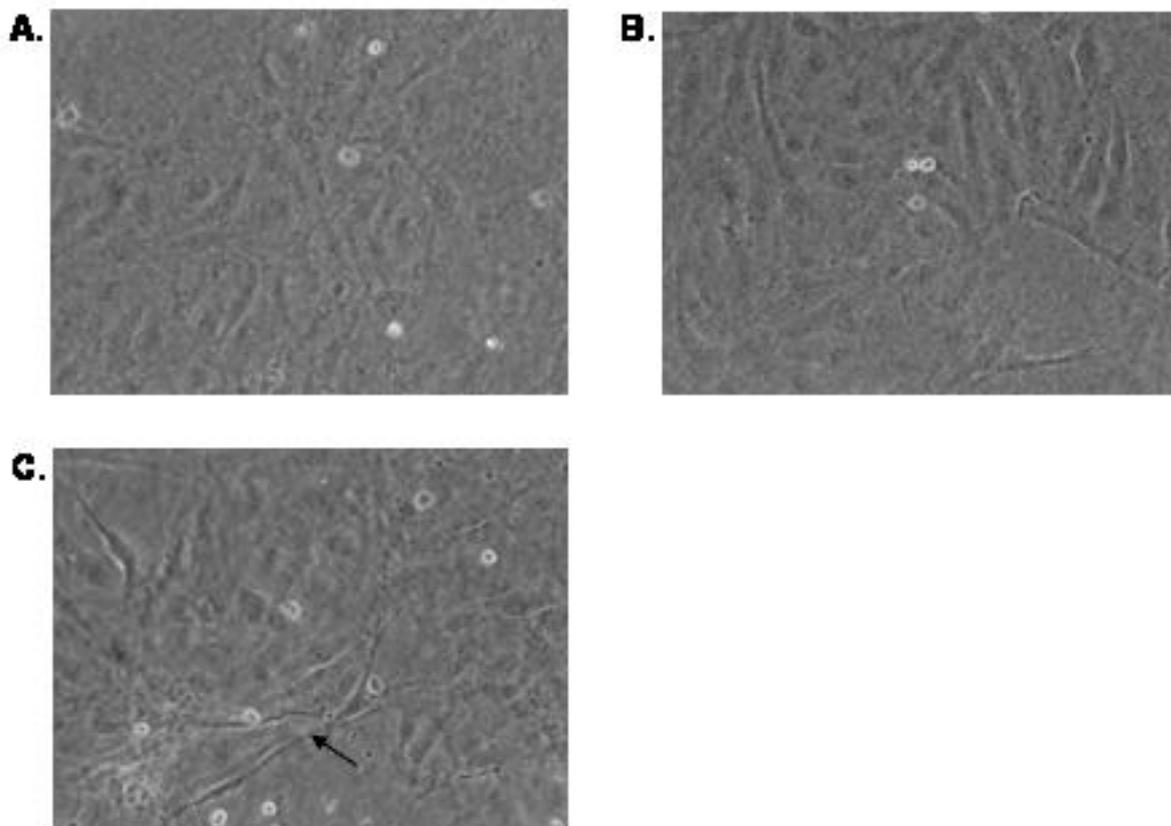


**Abbildung 32: Nachweis von pro- und anti-angiogenen Faktoren in Überständen von (A.) BLM und (B.) WM164 Zellen.** Die Exposition der Röntgenfilme betrug 30 sec und 6 min. Die Tabelle zeigt schematisch die Anordnung der Faktoren auf der Membran. Die grün unterlegten Felder repräsentieren die 30-sekündige, grau unterlegte Felder die 6-minütige Exposition der Membran.

### **3.8 Charakterisierung der löslichen Faktoren bei der Induktion tubulärer Strukturen in Endothelzellen**

Aus der Literatur ist bekannt, dass insbesondere VEGF und bFGF in der tumorinduzierten Angiogenese involviert sind und somit die Ausbildung tubulärer Strukturen induzieren. Die Analyse des BLM-konditionierten Mediums mittels des „Angiogenese Arrays“ (Abbildung 32 A.) machte deutlich, dass BLM Melanomzellen die zwei Isoformen VEGF und VEGF-D sezernieren. Weiterhin zeigten sowohl die ELISA-Daten (Tabelle 8) und der „Angiogenese Array“ Unterschiede in der bFGF-Konzentration in hoch und wenig invasiven Melanomzellen. Deshalb sollte die Frage beantwortet werden, ob neutralisierende anti-bFGF- bzw. anti-VEGF-Antikörper die Ausbildung tubulärer Strukturen inhibieren können.

Die Inhibition von bFGF in BLM-konditionierten Medien mittels neutralisierender anti-bFGF-Antikörper konnte bereits in Abbildung 17 gezeigt werden. In diesem Versuch führte die Applikation des neutralisierenden anti-bFGF-Antikörpers in Konzentrationen von 10 und 50 µg/ml bereits zu einer effektiven Inhibition der proMMP-1-Synthese als Folge der bFGF-Neutralisierung. Um eine maximale Neutralisation des Melanomzellen sezernierten bFGF zu erhalten, wurde das BLM-konditionierte Medium mit dem neutralisierenden Antikörper 30 min bei Raumtemperatur prä-inkubiert. Erst danach erfolgte die Stimulation der Endothelzellen mit dem BLM-konditionierten Medium. Die Endothelzellen weisen auch nach Inhibition von bFGF eine elongierte Morphologie auf (Abbildung 33 C.), die vergleichbar zur Kontrollstimulation mit BLM-konditioniertem Medium ist (B.). Diese Daten deuten darauf hin, dass von Melanomzellen sezerniertes bFGF nicht maßgeblich an der Ausbildung tubulärer Strukturen durch Endothelzellen beteiligt ist.

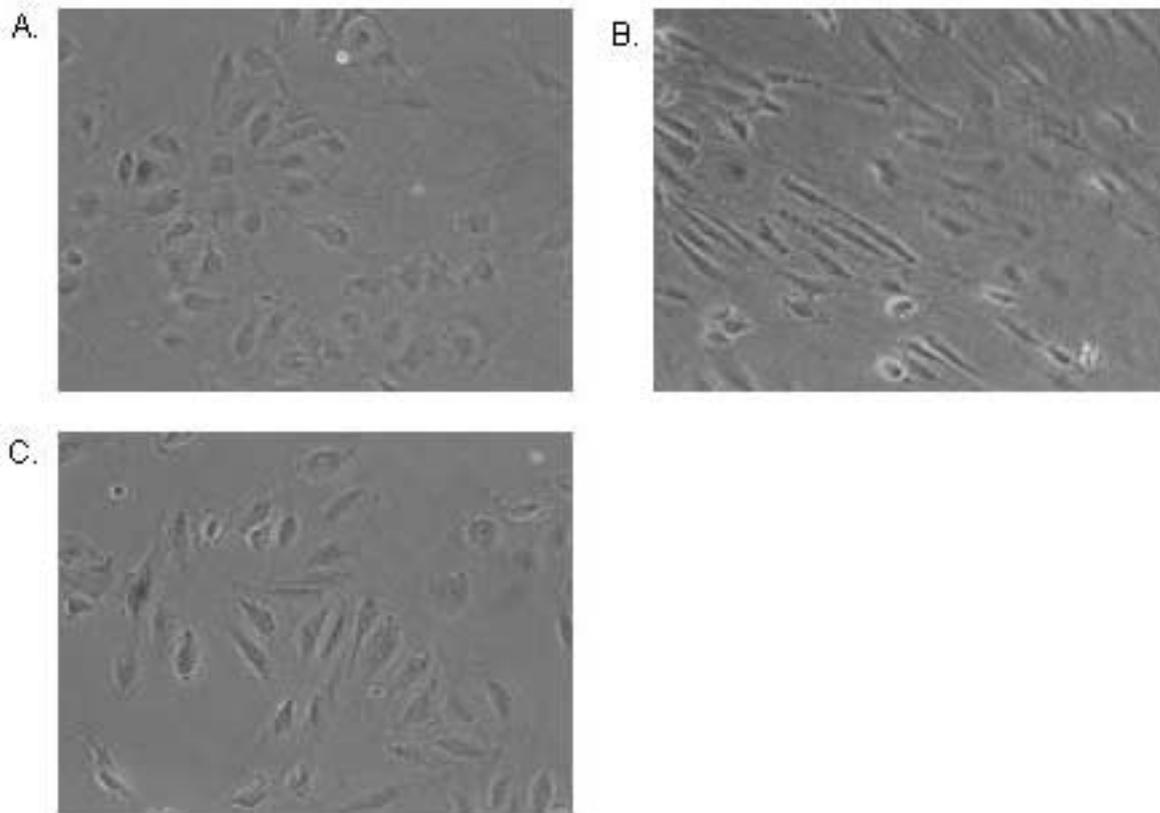


**Abbildung 33: Inhibition von bFGF mittels neutralisierender bFGF-Antikörper.**

**(A.)** HDMECs auf einem Fibrinigel; **(B.)** Stimulation mit BLM-konditioniertem Medium; **(C.)** Stimulation mit BLM-konditioniertem Medium + neutralisierende bFGF-Antikörper (50 µg/ml); 200-fache Vergrößerung

Die Neutralisation von VEGF in BLM-konditionierten Medien führt hingegen bei Konzentrationen von 0,24 µg/ml (NC 50: 0,04 – 0,08 µg/ml neutralisiert 50% der Bioaktivität von 10 ng/ml des rekombinanten VEGF) zu einer signifikanten Änderung der Endothelzell-Morphologie. Während die Stimulation mit durch Melanomzellen konditioniertem Medium zur typischen Elongation der Endothelzellen führt (Abbildung 34 B.), zeigen Endothelzellen nach Behandlung mit neutralisierenden anti-VEGF-Antikörpern eine abgerundete Form. Eine vollständige Abrundung der Zellkolonien, entsprechend der unbehandelten Kontrolle, wurde jedoch bei der verwendeten Konzentration des neutralisierenden VEGF-Antikörpers nicht erreicht.

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass von Melanomzellen sezerniertes VEGF im komplexen Gelsystem an der Ausbildung tubulärerer Strukturen in mikrovaskulären Endothelzellen beteiligt ist.



**Abbildung 34: Inhibition von VEGF mittels neutralisierender VEGF-Antikörper.**

**(A.)** HDMECs auf einem Fibringel; **(B.)** Stimulation mit BLM-konditioniertem Medium; **(C.)** Stimulation mit BLM-konditioniertem Medium + neutralisierende VEGF-Antikörper (0,24 µg/ml); 200-fache Vergrößerung

Obwohl einige Veröffentlichungen eindeutig die Beteiligung von Mitgliedern des Plasminogen Aktivator Systems, Plasminogen, uPA und tPA beschreiben führte die Behandlung des BLM-konditionierten Mediums mit Aprotinin, einem Serinproteasen-Inhibitor, in einer Konzentration von 5 µM nicht zu einer verminderten Ausbildung der tubulären Strukturen oder zu einer verminderten Migration der Endothelzellen in die Fibrinmatrix.

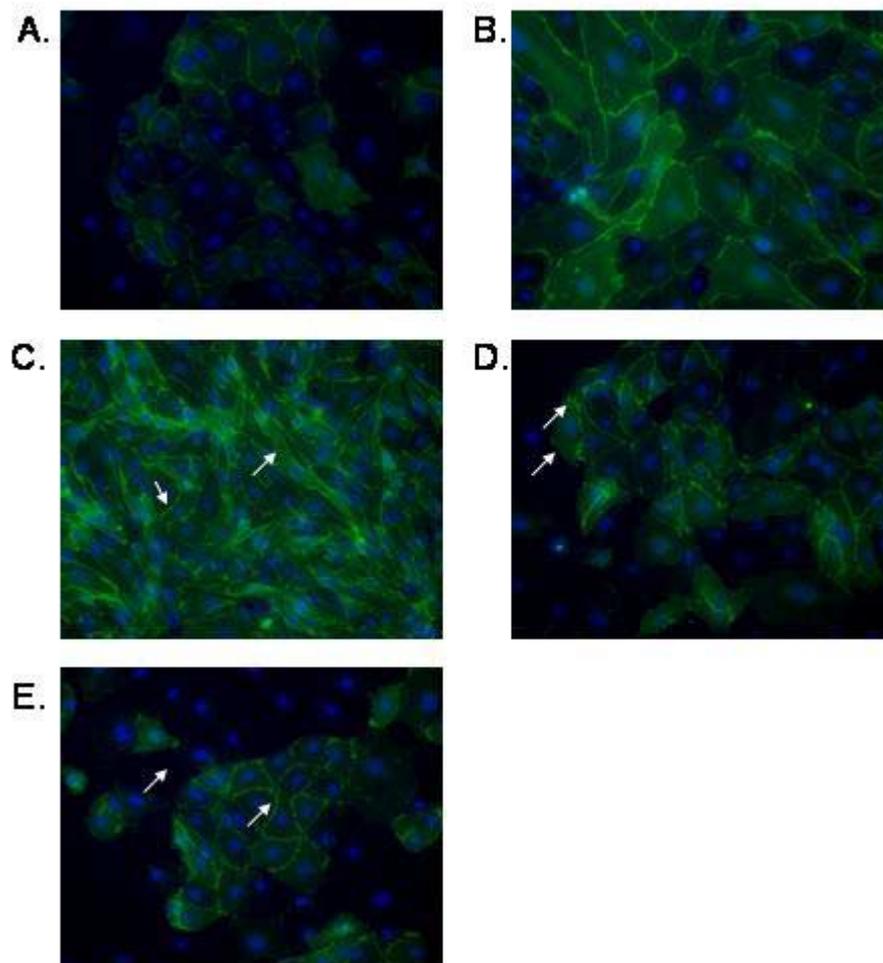
### **3.9 Modifizierung des Gelsystems zur Analyse von Zelloberflächenproteinen**

In weiteren Analysen sollte überprüft werden, ob die Expression oder die Lokalisation von Zelloberflächenrezeptoren, z.B. membranständigen MMPs oder Adhäsionsrezeptoren, in Endothelzellen durch die Behandlung mit durch Melanomzellen konditionierten Medien moduliert ist. Da Immunoblot-Analysen aufgrund der hohen Fibrinmengen und immunhistochemische Untersuchungen von

Gefrierschnitten der Fibringele wegen des hohen Wassergehaltes häufig schwer interpretierbare Ergebnisse lieferten, wurde die Fibrinmenge stark reduziert, so dass die Objektträger nur noch mit Fibrin beschichtet waren. Unter diesen Bedingungen konnte die Ausbildung der tubulären Strukturen in einem zweidimensionalen System induziert und eine Analyse von Zelloberflächenproteinen mit Immunfluoreszenz durchgeführt werden.

Um die Morphologie der Endothelzellen besser beurteilen zu können, wurde zunächst die Expression des membranständigen PECAM analysiert (Abbildung 35), welches in nicht stimulierten HDMECs besonders in den interzellulären Verbindungen exprimiert wird (A.). Die Behandlung der Endothelzellen mit rekombinatem VEGF (10 ng/ml) führt zu einer deutlichen Erhöhung von PECAM und damit verbunden zu einer elongierten Zellform (B.). Eine Ausbildung tubulärer Strukturen, ähnlich denen, die durch lösliche Faktoren der hoch invasiven BLM Zellen induziert worden waren, wurde mit denen hier eingesetzten Konzentration an rekombinanten VEGF nicht erreicht.

Unter dem Einfluss von BLM-konditioniertem Medium bilden die Endothelzellen tubuläre Strukturen aus. Auffallend zeigte sich eine deutlich vermehrte Lokalisation von PECAM über die gesamte Zellmembran. Außerdem können vereinzelt Zell-Verschmelzungen beobachtet werden (C., weiße Pfeile). Durch Neutralisation von VEGF in BLM-konditioniertem Medium wurde ein ähnliches Verteilungsmuster für PECAM beobachtet wie in den nicht stimulierten Kontrollzellen (D.). Die Färbung der interzellulären Verbindungen zeigte eine unregelmäßige, „gezackte“ Expression in den Endothelzellen. Im Gegensatz zu BLM-konditioniertem Medium ist der Einfluss von WM164-konditioniertem Medium auf die Verteilung von PECAM sehr gering. Hier lässt sich lediglich in einigen Zellkolonien eine Lokalisation von PECAM an den Zell-Zell-Kontakten beobachten (E., weiße Pfeile).

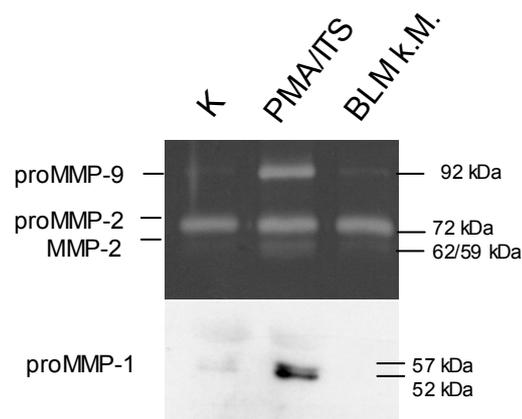


**Abbildung 35: PECAM-Immunfluoreszenz von Endothelzellen auf Fibrin-beschichteten Objektträgern.** HDMECs wurden 24 h auf Fibrin-beschichteten Objektträgern kultiviert und die Expression von PECAM mittels Immunfluoreszenz detektiert. **(A.)** HDMECs; **(B.)** HDMECs + rekombinantes VEGF (10 ng/ml); **(C.)** HDMECs in BLM-konditioniertem Medium; **(D.)** HDMECs in BLM-konditioniertem Medium + neutralisierende VEGF-Antikörper (0,24 µg/ml); **(E.)** HDMECs in WM164-konditioniertem Medium; 200-fache Vergrößerung

### 3.9.1 Bedeutung von Matrix Metalloproteinasen bei der Invasion der Fibringle

Um die Bedeutung von MMPs bei der Invasion der Endothelzellen in die Fibringle ermessen zu können wurden zunächst die serumfreien Überstände der Fibringle analysiert. Hierbei zeigte sich, dass nicht stimulierte Endothelzellen, die auf einem Fibringel kultiviert werden, geringe Mengen an proMMP-1 und proMMP-2 synthetisieren (Abbildung 37). Nach Stimulation mit PMA/ITS, was zur Ausbildung der tubulären Strukturen führt, kann eine Induktion der proMMP-1-Synthese in

Endothelzellen beobachtet werden. Weiterhin zeigt das Gelatine-Zymogramm eine geringe Aktivierung von proMMP-2 und eine Induktion von proMMP-9. Endothelzellen, die mit Medium von hoch invasiven BLM Melanomzellen stimuliert werden, zeigen im Vergleich zu nicht stimulierten Endothelzellen keine Veränderung der MMP-1- und MMP-2-Synthese und -Aktivierung. Diese Daten weisen darauf hin, dass die sezernierten MMPs, MMP-1, -2 und -9, nicht an der Induktion der tubulären Strukturen beteiligt sind.



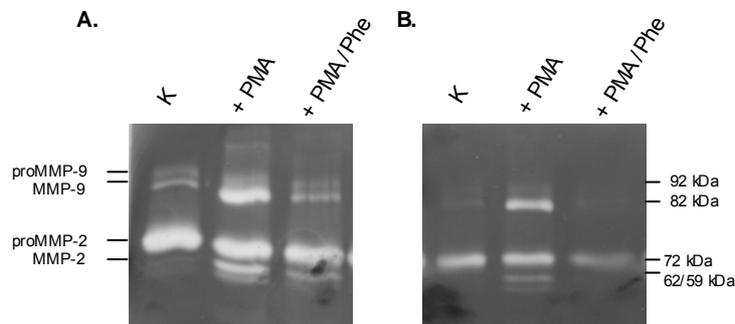
**Abbildung 36: Analyse von sezernierten MMPs in Überständen von Endothelzellen.**

HDMECs wurden 24 h auf Fibringelen kultiviert (K), mit PMA/ITS stimuliert (PMA/ITS) und mit BLM-konditioniertem Medium stimuliert (BLM k.M.). Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und weitere 24 h in Basis-Endothelzellmedium kultiviert. Die serumfreien Überstände wurden mittels Immunoblot auf das Vorhandensein von MMP-1 und mittels Gelatine-Zymographie analysiert.

Um in einem anderen Ansatz die Bedeutung von MMPs bei der Ausbildung tubulärer Strukturen zu überprüfen, wurde der reversible MMP-Inhibitor Phenanthrolin verwendet. Phenanthrolin inhibiert ein breites Spektrum an MMPs indem es in seiner Funktion als Chelator das im katalytischen Zentrum lokalisierte Zinkion komplexiert.

Wie bereits zuvor gezeigt (Abbildung 36), führt die Stimulation mit PMA/ITS zur vermehrten Aktivierung von proMMP-2 und zur erhöhten Synthese und Aktivierung von proMMP-9. Dabei ist zu erkennen, dass deutlich mehr MMP-9 im Gellysat zu detektieren ist, da aktives MMP-9 am Fibringel binden kann. In Gegenwart von Phenanthrolin (5  $\mu$ M) kommt es zu einer deutlichen Reduktion der MMP-9-Synthese. Im Vergleich zu PMA/ITS stimulierten Endothelzellen ist nur noch eine geringere Aktivierung von proMMP-2 zu beobachten. Deutliche Unterschiede sind durch die

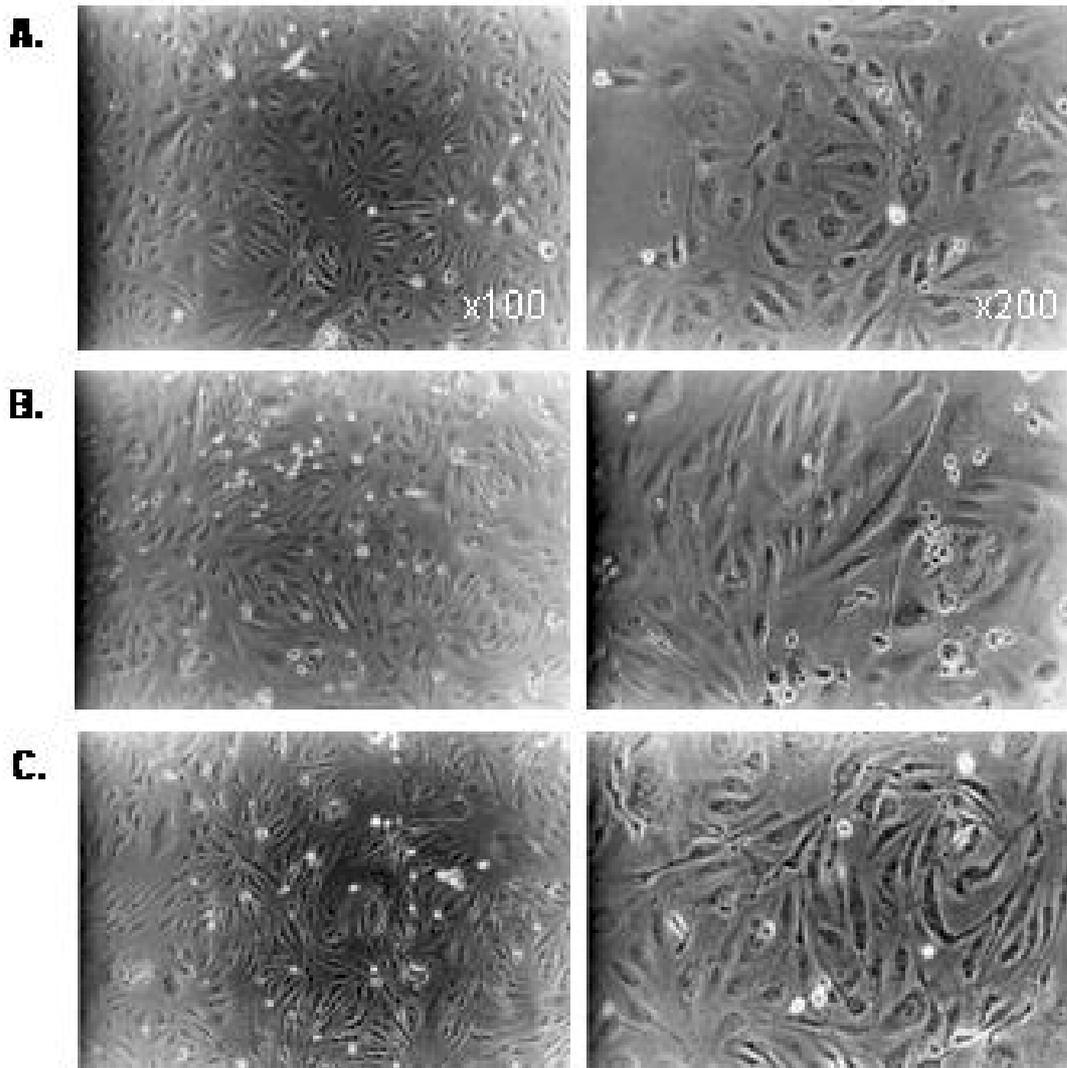
Zugabe von Phenanthrolin in der Verteilung zwischen Überstand und Lysat zu sehen. Eine komplette Inhibition der proMMP-9-Synthese und der proMMP-2-Aktivierung kann lediglich im Überstand beobachtet werden.



**Abbildung 37: Inhibition der MMP-2- und MMP-9-Aktivität durch Behandlung mit Phenanthrolin.**

HDMECs wurden auf einem Fibringel kultiviert (K), mit PMA/ITS stimuliert (+ PMA) und mit PMA/ITS stimuliert und gleichzeitig mit 5 μM Phenanthrolin behandelt (+ PMA/Phe). Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS serumfrei gewaschen und weitere 24 h in Endothelzell-Basismedium kultiviert. Die serumfreien Überstände wurden abgenommen und die Fibringele lysiert. 20 μl der **(A.)** Überstände bzw. **(B.)** der Fibringellysate wurden mittels Gelatine-Zymographie analysiert.

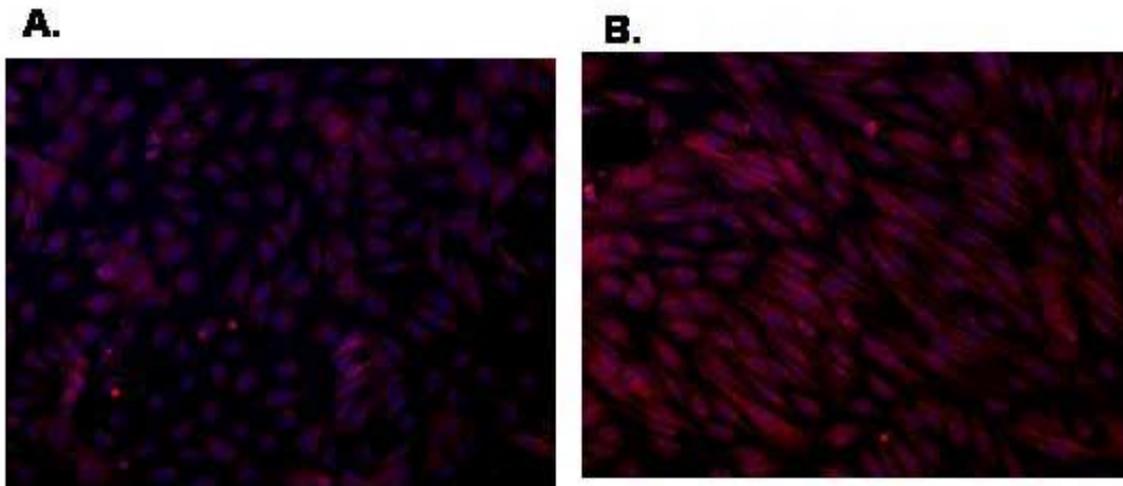
Die Zugabe von Phenanthrolin zu Endothelzellen, die mit BLM-konditioniertem Medium stimuliert wurden, zeigt zwar eine Elongation der Endothelzellen, eine Migration der Zellen in die Fibrinmatrix bleibt jedoch aus (Abbildung 38 C.). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass Matrix Metalloproteinasen bei der Migration der Endothelzellen in das Fibringel beteiligt sind.



**Abbildung 38: Inhibition der Matrix Metalloproteinasen durch Phenanthrolin.**

(A.) HDMECs auf einem Fibringel; (B.) Stimulation mit BLM-konditioniertem Medium; (C.) Stimulation mit BLM-konditioniertem Medium + 5 µM Phenanthrolin; 100- und 200-fache Vergrößerung

Im nächsten Schritt wurde die Lokalisation der MT1-MMP auf den Endothelzellen untersucht. Endothelzellen wurden auf Fibrin-beschichteten Objektträgern ausgesät, mit BLM-konditioniertem Medium stimuliert und die Verteilung von MT1-MMP mittels Immunfluoreszenz lokalisiert. In den unbehandelten Zellen ist eine schwache, vor allem intrazelluläre Färbung der MT1-MMP zu sehen (Abbildung 39 A.). Nach Behandlung mit BLM-konditioniertem Medium wird MT1-MMP vermehrt über der gesamten Membran der elongierten Zellen exprimiert (B.). Die vermehrte Lokalisation von MT1-MMP auf der Zelloberfläche kann darauf hin deuten, dass diese Protease an der perizellulären Degradation der Fibrinmatrix und somit an der Migration der Endothelzellen ins Gel beteiligt ist.



**Abbildung 39: Expression von MT1-MMP in Endothelzellen nach Stimulation mit BLM konditioniertem Medium. (A.) HDMECs auf Fibrinbeschichtung; (B.) Stimulation mit BLM-konditioniertem Medium; 200-fache Vergrößerung**

Zusammenfassend weisen die Daten darauf hin, dass die Oberflächenrezeptoren PECAM und MT1-MMP in dem hier dargestellten „Angiogenese Assay“ involviert sind. Die Verwendung von Fibrin- und Kollagen-beschichteten Objektträgern und die anschließende Färbung mittels Immunfluoreszenz kann in zukünftigen Untersuchungen die Beteiligung weiterer Oberflächenrezeptoren, z.B. anderen MT-MMPs oder Integrinen, analysieren.

## 4 Diskussion

Ein charakteristisches Merkmal maligner Zellen ist ihre Eigenschaft, angrenzende Gewebe zu invadieren und über das Blut- und Lymphgefäßsystem in Organe zu metastasieren. Zahlreiche Studien der letzten Jahre haben deutlich gemacht, dass sowohl die Tumorzelladhäsion und -migration an und durch die umgebende Matrix, als auch der proteolytische Abbau der Matrix während der Tumordinvasion eine zentrale Rolle spielen. Damit verbunden ist die Fähigkeit der Tumorzellen, die Expression von Adhäsionsmolekülen während der Invasion zu modulieren und mit den Zellen in der Umgebung zu kommunizieren. Diese Mechanismen spielen auch während der Embryonalentwicklung und Wundheilungsprozessen eine bedeutende Rolle und sind nicht auf Krebszellen beschränkt.

Viele Autoren schreiben neben den Serin-, Aspartat- und Cysteinproteasen besonders den Matrix Metalloproteinasen (MMPs) eine bedeutende Rolle bei der Degradation des Bindegewebes zu (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993; Chen, 1996). Dem gegenüber ist jedoch bekannt, dass Tumorzellen nur ein begrenztes Repertoire an Proteasen synthetisieren und sie deshalb die Synthese der Proteasen, die sie selbst nicht produzieren, in ortständigen, stromalen Zellen induzieren. Die aktive Beteiligung stromaler Zellen am invasiven Prozess von Tumorzellen, z.B. durch vermehrte Synthese und Aktivierung proteolytischer Enzyme, wurde bereits beschrieben (Segain *et al.*, 1996; Wandel *et al.*, 2002). Die molekularen Mechanismen dieser Tumor-Stroma-Interaktion sind jedoch bislang nur wenig bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zugrunde liegenden Mechanismen der Tumor-Stroma-Interaktionen am Beispiel des malignen Melanoms in einem *in-vitro*-Kokultursystem analysiert. Dabei wurden vor allem Unterschiede zwischen Melanomzellen mit hohem und niedrigem Invasionspotential herausgearbeitet.

### **4.1 Charakterisierung hoch und wenig invasiver Melanomzellen im Mausmodell**

Melanome werden bezüglich ihrer Prognose und der damit verbundenen Fähigkeit invasiv zu wachsen und Metastasen zu bilden in so genannte Hochrisiko- („high risk“) und Niedrigrisiko- („low risk“) Melanome unterteilt. Zur Charakterisierung des invasiven Potentials von Melanomzellen *in vitro* werden üblicherweise Mausmodelle verwendet, in denen immundefizienten Mäusen intradermal Melanomzellen injiziert werden. In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich, dass die Injektion von WM164 Zellen zur

Ausbildung eines kleinen kutanen Tumors führte, der ca. 20% des Tumolvolumens der Tumore ausmacht, die nach Injektion der hoch invasiven BLM Melanomzellen entstehen. Eine Metastasierung in Lunge, Lymphknoten, Leber und Milz wurde nur nach Injektion von BLM Melanomzellen nachgewiesen. Darüber hinaus zeigten BLM Melanomzellen in einem humanen *in-vitro*-Hautäquivalent-System eine Invasion der de-epidermalisierten Haut (Dennhofer *et al.*, 2003), während WM164 Zellen auch nach 14-tägiger Kulturdauer keine Invasion der Dermis aufwiesen (A. Klose, Dermatologie, persönliche Mitteilung). Die in diesen Systemen charakterisierten Melanomzelllinien wurden für die *in-vitro*-Analysen verwendet.

#### **4.2 Interaktionen zwischen Melanomzellen und dermalen Fibroblasten: Mechanismen für die Regulation von MMPs**

Tumorzellen synthetisieren *in vivo* verschiedene Proteasen, insbesondere MMPs, um Bindegewebsbarrieren zu penetrieren. Tryggvason *et al.* (1993) zeigten anhand von immunhistochemischen Färbungen am Beispiel von Mamma-, Kolon-, Magen-, Lungen- und Prostata-Karzinomen eine Lokalisation beträchtlicher Mengen an MMP-2 in den Tumorzellen. Dagegen lokalisierten Kurschat *et al.* (1999) im Melanom eine vermehrte Gelatinase-Aktivität insbesondere im Bereich der Tumor-Stroma-Grenze. Diese Beobachtungen wurden durch Veröffentlichungen bestätigt, in denen spezifische Transkripte und Proteine verschiedener MMPs, insbesondere der Kollagenasen MMP-1 und MT1-MMP, ebenfalls im peritumoralen Stroma nachgewiesen werden konnten (Airola *et al.*, 1999; Woolley und Grafton, 1980). Durch RNS-Präparation und anschließender RT-PCR konnten Wandel *et al.* (2000) eine Induktion der MMP-1-Synthese in tumornahen Gewebebiopsien, im Vergleich zu tumorfernen Bindegewebe demonstrieren. Diese Daten legen nahe, dass Melanomzellen die Fähigkeit besitzen, peritumorale Fibroblasten zur vermehrten Synthese und Aktivierung von Matrix-degradierenden Enzymen zu stimulieren. Die klinische Relevanz der MMP-Expression während der Melanomprogression wurde zudem durch Untersuchungen unterstützt, die zeigten, dass Melanopatienten mit MMP-1 und MMP-3 positiven Metastasen kürzere krankheitsfreie Phasen durchlaufen als Patienten mit MMP-1 und MMP-3 negativen Metastasen (Nikkola *et al.*, 2002).

### In vitro Kokultur-Systeme

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl der direkte als auch der indirekte Kontakt zwischen Fibroblasten und hoch invasiven Melanomzellen der Linie BLM, die selbst MMP-1 nicht synthetisieren, zu einer massiven Induktion von proMMP-1 und proMMP-3 führt (Abbildung 10 und 12). Dagegen wurde in der Kokultur von Fibroblasten mit wenig invasiven WM164 Melanomzellen keine Induktion dieser MMPs in Fibroblasten gefunden. Diese Beobachtung stehen im Einklang mit Untersuchungen von Wandel *et al.* (2002) die zeigten, dass Fibroblasten die mit konditionierten Medien von primären Melanomzellen stimuliert wurden, eine Induktion der spezifischen MMP-1-Transkripte zeigten. Die Stimulation der Fibroblasten mit von Melanozyten konditioniertem Medium hatte dagegen keinen Effekt auf die Transkription von MMP-1.

Trotz der erhöhten Menge an MMP-3 wurde MMP-1 nur in seiner inaktiven Proform nachgewiesen. Die Anwesenheit hoher Konzentration des endogenen Inhibitors von MMP-1 und MMP-3, TIMP-1, könnte erklären, warum in diesem System keine Aktivierung der proMMP-1 nachgewiesen werden konnte (Abbildung 10); (Kurschat *et al.*, 1999; Zigrino *et al.*, 2001).

Die Stimulation von Fibroblasten mit konditioniertem Medium hoch invasiver Melanomzellen zeigt eine deutliche Korrelation zwischen der Konzentration des konditioniertem Mediums und der Induktion der MMP-1-Synthese, was auf eine dominante Rolle von löslichen Mediatoren und weniger auf direkte Zell-Zell-Kontakte in der Interaktion zwischen stromalen Fibroblasten und Melanomzellen hindeutet.

Der Einfluss von Zell-Zell-Interaktionen in der Regulation der MMP-Synthese stromaler Zellen wurde von einigen Gruppen auch in anderen Tumorarten untersucht. So konnte für das Kolorektale Karzinom demonstriert werden, dass die Induktion der MMP-9-Synthese in stromalen Zellen nach Kontakt mit den Tumorzellen ausschließlich auf direkten Zell-Zell-Kontakt basiert (Segain *et al.*, 1996). Für das Mammakarzinom wurden dagegen, in ähnlicher Weise wie in den vorliegenden Daten, lösliche Faktoren für die Induktion der MMP-1-, 2- und 3-Synthese in Fibroblasten verantwortlich gemacht (Ito *et al.*, 1995). Die Kultivierung von Fibroblasten in Membranfraktionen von MCF-7 Brustkrebszellen führt ebenfalls zur Induktion von proMMP-1 und proMMP-3, nicht aber von proMMP-2. Dies ist ein Hinweis darauf, dass bei diesen Zellen neben den löslichen auch membrangebundene Faktoren in der Regulation der MMP-Synthese involviert sind.

### Die Rolle löslicher Faktoren in der Interaktion von Melanomzellen und Fibroblasten

Die Inhibition der bFGF- und IL-1-Signaltransduktion durch neutralisierende Antikörper und dem rekombinanten IL-1RA, der die Bindung von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  an den Rezeptor verhindert, machte deutlich, dass diese Faktoren wichtige Mediatoren der Interaktion von Melanomzellen und Fibroblasten sind. Weiterhin konnten bFGF und IL-1 $\alpha$  in den Überständen hoch invasiver Melanomzellen und auch in den Überständen der eigenständig isolierten Melanomzellen nachgewiesen werden.

Die gleichzeitige Neutralisation von IL-1 und bFGF in BLM konditioniertem Medium zeigte zwar einen synergistischen Effekt dieser Mediatoren, aber keine komplette Inhibition der MMP-1-Synthese in Fibroblasten. Daraus kann geschlossen werden, dass zusätzliche Faktoren an der Interaktion zwischen Melanomzellen und Fibroblasten beteiligt sind.

bFGF wurde auch von Wandel *et al.* (2002) als Hauptmediator für die Induktion von proMMP-1 identifiziert. Diese Arbeitsgruppe zeigte mittels Echtzeit-PCR, dass die MMP-1-Transkription in Fibroblasten, die in Gegenwart von Melanomzellen konditioniertem Medium kultiviert werden, durch Behandlung mit neutralisierenden bFGF-Antikörpern inhibiert werden kann. Im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit diskutierten auch diese Autoren die Beteiligung weiterer Faktoren in der Interaktion zwischen Melanomzellen und Fibroblasten, da die Neutralisierung von bFGF nicht zur vollständigen Inhibition der MMP-1-Transkription führt.

Die Identifikation weiterer Faktoren die in der Interaktion zwischen Melanomzellen und Fibroblasten involviert sind, erfolgte mit zwei unterschiedlichen Methoden. Auf der einen Seite wurde die RNS der Melanomzellen mittels eines „GeneChip™“ analysiert, auf der anderen Seite wurden die konditionierten Medien der Melanomzellen untersucht. Dabei konnten bereits einige der Faktoren, deren Transkripte in BLM Zellen im Vergleich zu WM164 Zellen um ein Vielfaches erhöht waren (Tabelle 9), mit Hilfe eines „Angiogenese Protein-Arrays“ (Abbildung 32) verifiziert werden. Diese Faktoren, zu denen unter anderem IL-6, ENA-78 (CXCL5), MCP-1 (CCL2) und VEGF gehören, werden nur von BLM Melanomzellen in hohen Mengen synthetisiert und sind somit weitere putative Mediatoren in der Interaktion zwischen Melanomzellen und Fibroblasten. Besonders die Stimulation primärer humaner dermaler Fibroblasten mit rekombinanten MCP-1 führt zu einer Induktion der MMP-1-Transkripte und -Proteine (Yamamoto *et al.*, 2000).

Erste Analysen der BLM und WM164 konditionierten Medien mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese zeigten bereits ein unterschiedliches Expressionsmuster löslicher Faktoren im niedermolekularen Bereich. Die weitere Identifizierung dieser Proteine mittels Maldi ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen.

Die Etablierung dieses *in-vitro*-Kokultur-Systems erlaubte die Analyse von molekularen Mechanismen, die bei der Interaktion von Melanomzellen der Linie BLM und WM164 mit dermalen Fibroblasten beteiligt sind. Um die Wertigkeit dieser Daten zu unterstreichen, wurden neben den Melanomzelllinien auch Melanomzellen verwendet, die direkt aus Primärtumoren und Metastasen isoliert worden waren. Konditionierte Medien der primären Melanomzellen zeigen ebenfalls eine Induktion der proMMP-1-Synthese in stromalen Fibroblasten. Diese Befunde legen nahe, dass lösliche Faktoren auch *in vivo* an der Interaktion von Melanomzellen und stromalen Zellen involviert sind. Interessanterweise bewirkte das konditionierte Medium von Zellen einer Satellitenmetastase desselben Patienten in dermalen Fibroblasten eine weitaus geringere proMMP-1-Induktion, was auf Unterschiede zwischen primären Melanomen und Metastasen in der Induktion mit dem umgebenen Stroma hinweist. Im Gegensatz dazu zeigten Wandel *et al.* (2000), dass sowohl konditionierte Medien von primären Melanomzellen als auch konditionierte Medien von Hautmetastasen und Lymphknotenmetastasen die Synthese der interstitiellen Kollagenase in dermalen Fibroblasten gleichermaßen stark induzieren. Die in dieser Untersuchung verwendeten Zellen stammten jedoch von verschiedenen Patienten in unterschiedlich weit fortgeschrittenen Krankheitsstadien, so dass ein direkter Vergleich zwischen den verschiedenen Tumorzellen schwierig einzustufen ist.

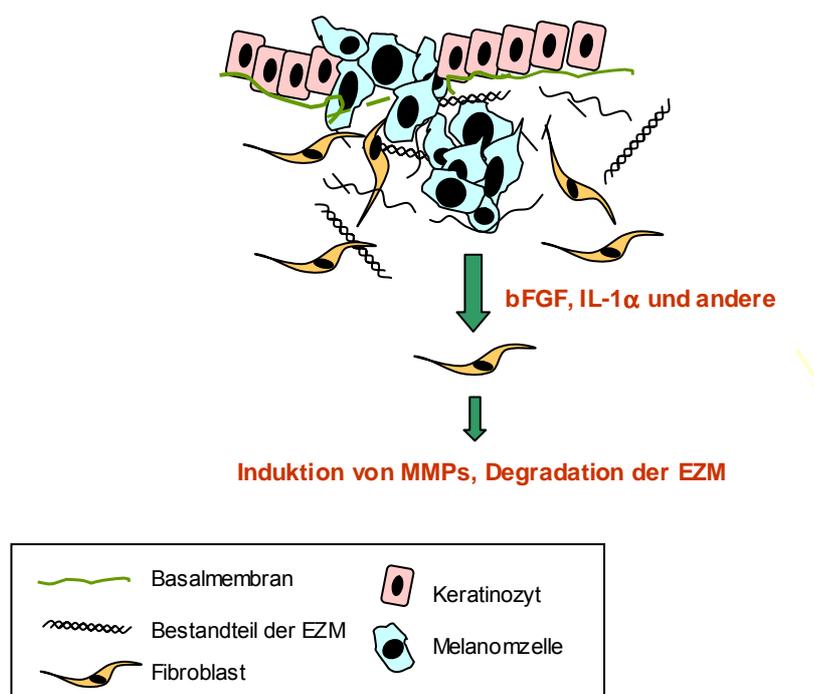
#### Interaktion von Melanomzellen mit dem peritumoralen Stroma *in vivo*

Im Gegensatz zu dem hier vorgestellten *in-vitro*-Kokultur-System interagieren Melanomzellen *in vivo* nicht nur mit stromalen Fibroblasten, sondern auch mit anderen Zelltypen, z.B. Entzündungszellen und mit der peritumoralen Bindegewebematrix.

Deshalb wurde die Bedeutung der erhaltenen *in-vitro*-Ergebnisse auch am humanen Melanomgewebe überprüft. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten bereits mittels *in-situ*-Hybridisierung und immunhistochemischen Färbungen zeigen, dass benigne Melanozyten und Melanoma *in situ* im Gegensatz zu primären malignen Melanomen keine bFGF-Expression aufweisen (Kubo *et al.*, 1998; Reed *et al.*, 1994).

Diese Befunde legen nahe, dass bFGF nicht an der malignen Transformation von Melanozyten, sondern an der Invasion der Melanomzellen beteiligt ist. Weiterhin zeigten diese Analysen auch, dass Melanomzellen *in vivo* bFGF sezernieren. Die Quantifizierung von bFGF in Zellen, die aus einem primären Melanom ( $\approx 768$  pg/ml) und der Metastase ( $\approx 79,24$  pg/ml) desselben Patienten isoliert wurden, steht in Einklang mit diesen Daten. Die immunhistochemische Färbung des malignen Melanoms (Abbildung 21 A.) demonstriert, dass IL-1 $\alpha$  zum einen vom inflammatorischen Infiltrat, zum anderen aber auch von Zellen im soliden Melanomnestern exprimiert wird. Die Färbung des humanen Melanomgewebes (Abbildung 21 B.) zeigte, im Einklang mit Untersuchungen anderer Gruppen (Airola *et al.*, 1999; Woolley und Grafton, 1980), eine überwiegende Lokalisation von MMP-1 im peritumoralen Bindegewebe.

Anhand der bislang gezeigten Ergebnisse kann die folgende Arbeitshypothese postuliert werden (Abbildung 40): Hoch invasive Melanomzellen, die selbst kein MMP-1 sezernieren, können die MMP-Synthese in Fibroblasten induzieren. Dies geschieht über die Sekretion der löslichen Faktoren IL-1 $\alpha$ , bFGF sowie durch, bislang noch nicht identifizierte Mediatoren. Durch die vermehrte Produktion der interstitiellen Kollagenase MMP-1, dem Schlüsselenzym im Abbau von Typ-I-Kollagen, wird den Tumorzellen die Invasion des peritumoralen Bindegewebes erleichtert.



**Abbildung 40: Arbeitshypothese für die Interaktion zwischen Melanomzellen und dermalen Fibroblasten.**

### **4.3 Inhibition der IL-1-Signaltransduktion im murinen Modell**

Die Rolle von IL-1 wurde im Rahmen dieser Arbeit auch im Tiermodell untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Injektion der hoch invasiven humanen BLM Melanomzellen zur Ausbildung eines kutanen Tumors und zur Metastasierung in verschiedene Organe in immundefizienten Mäusen führt. Die lokale Injektion des IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1RA) hatte keinen Effekt auf das Wachstum der intradermalen Tumore, was darauf hindeutet, dass die Proliferation dieser Zellen durch den Rezeptorantagonisten nicht beeinflusst wurde. Die Analyse der Organe machte jedoch deutlich, dass die mit IL-1RA behandelten Tiere keine Metastasen in den Lungen, Lebern und Milzen ausbildeten (Tabelle 10). Diese Daten legen nahe, dass die Inhibition der IL-1-Signaltransduktion durch die Behandlung mit dem rekombinanten IL-1RA im Mausmodell die Metastasierung in verschiedene Organe verhindert.

Unklar ist derzeit, ob der applizierte IL-1RA die Synthese der interstitiellen Kollagenase MMP-13, welche die Aufgabe der MMP-1 im murinen System übernimmt, in den Stromalen Fibroblasten direkt hemmt, oder ob möglicherweise andere, bei der Invasion und Metastasierung bedeutenden Vorgänge, wie die Regulation von Chemokinen und ihren Rezeptoren oder die tumorinduzierte Angiogenese durch den IL-1RA beeinflusst werden.

Der Einsatz des IL-1RA zur Therapie des malignen Melanoms wird zudem durch Untersuchungen von Voronov *et al.* (2003) unterstützt. Diese Gruppe zeigte, dass die Injektion von B16 Zellen in 128SvJ Wildtyp-Mäusen zur Bildung eines Tumors und zur Metastasierung der Lungen führt. Die Injektion dieser Zellen in Mäusen mit kompletter Inaktivierung der Gene IL-1 $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  verhinderte dagegen die Metastasenbildung in innere Organe. Die Autoren untersuchten jedoch in diesem Tiermodell weder die Interaktion von Melanomzellen mit Stromalen Fibroblasten, noch die Expression proteolytischer Enzyme.

Der therapeutische Einsatz des rekombinanten IL-1RA wurde bereits von anderen Autoren beschrieben (McKenzie *et al.*, 1996). In diesen Mausmodellen wurden murine B16 Melanomzellen in immunkompetente C57BL/6 Mäuse injiziert und die Tiere dann mit dem rekombinanten IL-1RA behandelt. Diese Autoren konnten ein vermindertes Wachstum der Tumore nach 18 bis 33 Tagen Behandlungszeit beobachten, was mit einer verminderten tumorinduzierten Angiogenese korrelierte. Ob die Metastasierung der B16 Zellen in diesem Tiermodell nach der Applikation des IL-1RA vermindert war, wurde jedoch von den Autoren nicht analysiert.

### Die Rolle von Chemokin-Rezeptoren während der Metastasierung von Tumorzellen

Neben den Proteasen, die durch die Degradation der EZM die Invasion der Melanomzellen erleichtern, sind auch Chemokine und deren Rezeptoren an diesem Prozess beteiligt (siehe dazu auch 4.4). Müller *et al.* (2001) konnten beispielsweise am Mammakarzinom zeigen, dass die Blockierung der CXCR4-CXCL12-Interaktion zu einer Reduktion von Lungen- und Lymphknoten-metastasen führt. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Metastasierung in bestimmte Organe mit der Expression von Chemokin-Rezeptoren korreliert. Die Synthese des CXCR4, der auch von Melanomzellen exprimiert wird, wird durch IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1 und TNF- $\alpha$  induziert (Oh *et al.*, 2001). Ob die Inhibition dieser Faktoren durch die Applikation von IL-1RA in dem hier dargestellten Mausmodell zur verminderten Expression von Chemokin-Rezeptoren führt, wird Bestandteil weiterer Untersuchungen sein.

Die Blockierung der lymphogenen und hämatogenen Metastasierung des malignen Melanoms im Mausmodell eröffnet neue therapeutische Behandlungskonzepte. So ist es vorstellbar, den rekombinanten IL-1RA, der bereits zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis und der Psoriasis-Arthropathie erfolgreich eingesetzt wird, auch in der Therapie des malignen Melanoms zu testen. Angriffspunkt der IL-1RA-Behandlung bei diesen Krankheiten ist die vermehrte Synthese von MMP-1 in synovialen Fibroblasten als Folge der Entzündung, die letztlich zur Zerstörung des Gelenkknorpels führt.

### **4.4 Das Stroma als Quelle für Chemokine und Zytokine**

Lange Zeit wurde angenommen, dass nur Immunzellen inflammatorische Chemokine sezernieren, die für die Bekämpfung der Tumorzellen und der damit verbundenen Regression der Tumore verantwortlich sind. Übersichtsartikel der Autoren Coussens und Werb (2002) und Payne und Cornelius (2002) zeigten jedoch eindrucksvoll, dass diese Chemokine auch von Melanomzellen sezerniert werden und sie durchaus eine unterstützende Funktion in der Tumorprogression einnehmen können. Besonders am Beispiel des malignen Melanoms konnte gezeigt werden, dass Chemokine wie Gro- $\alpha$  (CXCL1), Gro- $\beta$ , Gro- $\gamma$  und IL-8 (CXCL8) die Zellproliferation neoplastischer Zellen stimulieren (Varney *et al.*, 2003).

Weiterhin zeigen Arbeiten der letzten Jahre, dass stromale Fibroblasten aktiv am Prozess der Tumorformation- und Metastasierung beteiligt sind, indem sie zum einen

mitogene Faktoren sezernierten, die die Proliferation der Melanomzellen induzieren, zum anderen aber auch durch die Sezernierung von Chemokinen an der Rekrutierung von Immunzellen beteiligt sind (Bhowmick *et al.*, 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass hoch invasive Melanomzellen auf der einen Seite die Fähigkeit besitzen, diese und andere Chemokine selbst zu sezernieren (Tabelle 9), dass sie aber auf der anderen Seite zusätzlich die Synthese dieser Faktoren in dermalen Fibroblasten induzieren können (Tabelle 11). Dies bedeutet, dass Melanomzellen nicht alleine für die Rekrutierung von Entzündungszellen verantwortlich sind, sondern dass sie über die Induktion von Chemokinen und Wachstumsfaktoren in peritumoralen Fibroblasten eine zusätzliche „Kontrollstelle“ für die Regulation von Entzündungsreaktionen darstellen. Diese interessante Hypothese muss durch weiterführende Experimente am Melanomgewebe und im Mausmodell überprüft werden. Therapeutische Ansätze, die gezielt die Interaktion von Chemokinen und deren Rezeptoren inhibieren, können jedoch einen alternativen Ansatz zur reduzierten Metastasierung maligner Zellen darstellen.

Neben den Chemokinen wurden auch Transkripte von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie z.B. IL-1 $\beta$ , bFGF und VEGF in Fibroblasten durch die Stimulation mit Melanomzellen konditionierten Medien moduliert. Von diesen Faktoren ist bekannt, dass sie eine induzierende Wirkung auf die Transkription von MMPs haben und somit auch in autokrinen Mechanismen die Synthese Matrix-degradierender Enzyme bewirken (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). Durch die Abgabe von Faktoren wie VEGF und bFGF ist das Stroma außerdem aktiv an der Einleitung angiogener Prozesse beteiligt (Collen *et al.*, 2003).

#### **4.5 *In-vitro*-Modell der Melanomzell-induzierten Angiogenese**

Eine weitere wesentliche Eigenschaft maligner Tumore ist ihre Fähigkeit, die Neubildung von Gefäßen (Neoangiogenese) des Tumorgewebes zu sichern. Da die Progression von soliden Tumoren von einer Versorgung durch Blutgefäße abhängt, stellt der gezielte Einsatz von Angiogeneseinhibitoren eine geeignete Therapieform dar. Bereits 1975 postulierte Folkman, dass die Inhibition der tumorinduzierten Angiogenese eine neue Strategie in der Behandlung von Tumoren darstellt (Folkman, 1975). Derzeit befinden sich ca. 40 Substanzen in verschiedenen Phasen klinischer Prüfungen. Zu den

Substanzen, die einen Ansatz anti-angiogener Therapien ermöglichen, gehören in erster Linie VEGF-Inhibitoren und VEGF-Rezeptorantagonisten (Augustin, 2003). Weiterhin sind jedoch auch endogene Angiogenese-Inhibitoren bekannt, zu denen unter anderem Endostatin und Tumorstatin gehören, proteolytische Fragmente von Kollagen-XVIII und -IV.

Die Verwendung von dreidimensionalen Fibrin- und Kollagengelen als *in-vitro*-Modell zur Untersuchung von Angiogenese ist bereits in der Literatur beschrieben (Davis *et al.*, 2002). Vailhe *et al.* postulierten 1997, dass Fibrin einen „nicht-löslichen“ angiogenen Faktor darstellt, der die Ausbildung kapillarer Strukturen in Endothelzellen induzieren kann (Vailhe *et al.*, 1997). Im Einklang mit diesen Befunden weisen andere Gruppen darauf hin, dass die drei-dimensionale Einbettung der Endothelzellen in eine Fibrinmatrix zur Ausbildung kapillarer Strukturen notwendig ist. Endothelzellen, die auf der Oberfläche eines Fibringehäuses sitzen, benötigen zusätzlich die Stimulation durch angiogene Faktoren wie bFGF/TNF $\alpha$  oder VEGF/TNF $\alpha$  (Collen *et al.*, 2003). Allgemein geht man derzeit von dem Modell aus, dass Endothelzellen auf einer dreidimensionalen Matrix (Fibrin oder auch Kollagen) nach bestimmten Stimuli, wie PMA oder VEGF/TNF $\alpha$ , eine Elongation der Zellstruktur zeigen (Montesano und Orci, 1985). Davis *et al.* (2002) postulieren, dass dieser initiale Prozess mit der Aktivierung von cdc 42 und Rac 1 assoziiert ist. Im weiteren Verlauf (ca. 24 Stunden) wandern die Zellen in die Matrix hinein und bilden Lumen aus. Dieser Prozess benötigt die *de-novo*-Synthese verschiedener Proteine, die an der Migration und Proliferation von Endothelzellen beteiligt sind.

#### Relevanz löslicher Faktoren in der Melanom-induzierten Angiogenese

In dieser Arbeit konnte erstmalig demonstriert werden, dass Endothelzellen nach Stimulation mit konditionierten Medien von hoch invasiven BLM Melanomzellen innerhalb von 24 Stunden tubuläre Strukturen ausbilden, während konditionierte Medien von wenig invasiven WM164 Zellen diesen Effekt nicht zeigten (Abbildung 31).

Lafleur *et al.* (2002) zeigten ebenfalls die Ausbildung tubulärer Strukturen durch Endothelzellen nach Stimulation mit durch U87 Glioma Zellen konditioniertem Medium. Diese und eigene Untersuchungen zeigen eindeutig, dass lösliche, von den Tumorzellen sezernierte Faktoren die Differenzierung der Endothelzellen zu gefäßähnlichen Strukturen induzieren. Die Beobachtung, dass Melanomzellen das Wachstum von „neuen“ Blutgefäßen durch die Abgabe löslicher Faktoren induzieren

können, wurde bereits 1966 von Warren und Shubik postuliert (1966). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass hauptsächlich VEGF, sezerniert von BLM Melanomzellen, an diesem Prozess beteiligt ist. Die Expression von VEGF ist im malignen Melanom im Vergleich zu Melanozyten deutlich induziert (Gitay-Goren *et al.*, 1993). Weiterhin konnte in Xenograft-Modellen eine Korrelation zwischen der Sekretion von VEGF und der Metastasenbildung gezeigt werden (Potgens *et al.*, 1995). Die Bedeutung der VEGF-Expression als prognostischer Faktor für das maligne Melanom wird jedoch derzeit kontrovers diskutiert.

Obwohl einige Untersuchungen zeigen, dass auch bFGF maßgeblich an der tumorinduzierten Angiogenese beteiligt ist, konnte in dieser Arbeit die Beteiligung von Melanomzellen sezerniertem bFGF an der Differenzierung der Endothelzellen ausgeschlossen werden (Abbildung 33). Graeven *et al.* (2001) zeigten z.B., dass die Überexpression von bFGF in wenig invasiven WM164 Zellen *in vivo* ein stärkeres Tumorstadium und eine vermehrte Tumorangiogenese induziert. Andere Untersuchungen weisen darauf hin, dass Melanomzellen bFGF in einem autokrinen Mechanismus zur Zellproliferation benötigen. Weiterhin führt die Transfektion von bFGF „antisense“-Konstrukten zur kompletten Inhibition der Tumorbildung (Graeven *et al.*, 2001). Diese Befunde unterstreichen die wesentliche Rolle von bFGF bei der Tumorzellenproliferation.

#### Die Rolle von Serinproteasen und Matrix Metalloproteinasen in der Angiogenese

Den Mitgliedern des Plasminogen-Aktivator-Systems, Plasminogen, uPA, tPA, und den Inhibitoren PAI-1 und -2 wird ebenfalls eine bedeutende Rolle in der tumorinduzierten Angiogenese zugesagt, da sie selbst an der Degradation von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, z.B. Fibrin, beteiligt sind (van Hinsbergh *et al.*, 1997). Die prä-Inkubation der BLM konditionierten Medien mit Aprotinin, einem Inhibitor für Serinproteasen, hatte jedoch keine inhibitorische Wirkung auf die Ausbildung tubulärer Strukturen in Endothelzellen (nicht gezeigte Daten), was darauf hindeutet, dass die Faktoren in diesem System keine bedeutende Rolle spielen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Lafleur *et al.* (2002) überein, die zeigten, dass die Inhibition von Serinproteasen in konditionierten Medien von U87 Glioma Zellen keinen Effekt auf die Tubulogenese der Endothelzellen hatte.

Neben den Serinproteasen wird besonders den MMPs eine besondere Rolle in angiogenen Prozessen zugeschrieben, da sie Bestandteile der vaskulären Basalmembran und des interstitiellen Bindegewebes degradieren können. Durch den Einsatz von Phenanthrolin, einem reversiblen MMP-Inhibitor, konnte nachgewiesen werden, dass die Migration der Endothelzellen in die Fibrinmatrix reduziert war (Abbildung 38). Sowohl Collen *et al.* (2003) als auch Lafleur *et al.* (2002) zeigten, dass MMPs, insbesondere MT-MMPs, an der Induktion tubulärer Strukturen von Endothelzellen beteiligt sind. Die Migration von Endothelzellen in Plasminogen-freien Fibringelen wird durch die MT1-MMP vermittelte, perizelluläre Degradation der extrazellulären Matrix eingeleitet (Hiraoka *et al.*, 1998).

Während Mäuse mit kompletter Inaktivierung der MT1-MMP lediglich eine verminderte Ausbildung der Blutgefäße im Bereich der Knorpelphysisen zeigten (Zhou *et al.*, 2000), sind Mäuse mit kompletter Inaktivierung für VEGF oder für den VEGFR bereits embryonal lethal (Carmeliet, 2000). Diese Daten weisen darauf hin, dass andere MT-MMPs die Aufgabe von MT1-MMP in angiogenen Prozessen kompensieren können. Neueste Untersuchungen zeigen eine Beteiligung der MT3-MMP in der Formation kapillarer Strukturen von Endometrialen Endothelzellen nach Stimulation mit VEGF (Plaisier *et al.*, 2004). Welche MMPs an der Melanomzell-induzierten Migration der Endothelzellen involviert sind, konnte bislang jedoch nicht geklärt werden. Der Einsatz von Substanzen oder rekombinanten Inhibitoren, die spezifisch einzelne MMPs inhibieren, wird daher Gegenstand zukünftiger Analysen sein.

#### Bedeutung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen in angiogenen Prozessen

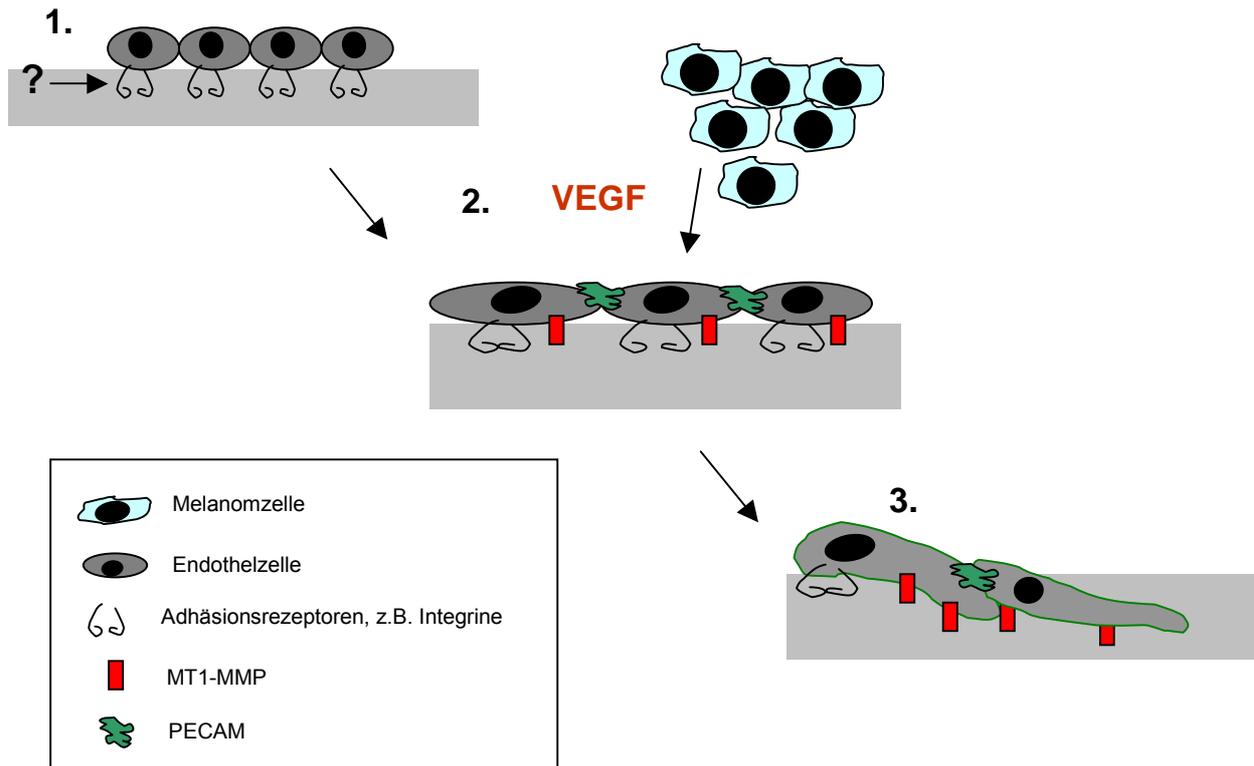
Neben der Inhibition löslicher angiogener Faktoren stellt die Manipulation von Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen ebenfalls einen potentiellen Ansatz zur Therapie pathologischer Angiogeneseprozesse dar (Sanz und Alvarez-Vallina, 2003). Da es sich bei der tumorinduzierten Angiogenese um einen dynamischen Prozess handelt, sind Adhäsionsrezeptoren wie  $\alpha 5\beta 1$ -,  $\alpha v\beta 3$ - und  $\alpha v\beta 5$ -Integrin, die den Zell-Matrix-Kontakt vermitteln, in diesem Prozess involviert. Untersuchungen, in denen anti- $\alpha v\beta 3$  Antikörper (LM609) eingesetzt wurden, zeigten eine reduzierte Neovaskularisation der Tumore *in vivo* (Brooks *et al.*, 1994). Friedlander *et al.* (1995) konnten mittels neutralisierender Antikörper beobachten, dass die bFGF induzierte Angiogenese die Signaltransduktion über  $\alpha v\beta 3$ , die VEGF induzierte Angiogenese die Signaltransduktion über  $\alpha v\beta 5$  induziert. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Adhäsionsrezeptoren, die den Kontakt

zwischen Endothelzellen und der Fibrinmatrix herstellen, nicht identifiziert werden. Erste Immunfluoreszenz-Analysen für die  $\alpha_v$ -Kette zeigten bereits eine vermehrte Lokalisation an den Ausläufern der Endothelzellen nach Behandlung mit BLM-konditioniertem Medium (Daten nicht gezeigt). Die weitere Analyse der Expression von Integrinen mittels Immunhistochemie und der Einsatz von neutralisierenden Antikörpern gegen die verschiedenen Integrinketten könnte dann in weiterführenden Experimenten die Rolle von Integrinen bei der Migration von Endothelzellen in die Fibrin- oder Kollagenmatrix aufklären.

Die Blockierung von PECAM, welches Zell-Zell-Kontakte vermittelt, führte sowohl in immundefizienten SCID Mäusen als auch in C57BL/6 Mäusen zur verminderten Neovaskularisation nach intradermaler Injektion von humanen A549 und murinen B16 Zellen (Zhou *et al.*, 1999). Diese Daten weisen darauf hin, dass PECAM nicht nur die Zell-Zell-Adhäsion zwischen den Endothelzellen stabilisiert, sondern auch Signaltransduktionen induziert, die zur Differenzierung der Endothelzellen führen.

Im humanen System konnte außerdem gezeigt werden, dass PECAM die Migration von Endothelzellen erhöht, wobei die Mechanismen dieses Prozesses bislang nicht bekannt sind (Cao *et al.*, 2002; Gratzinger *et al.*, 2003). Die Stimulation von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen mit durch Melanomzellen konditioniertem Medium bewirkte eine veränderte Verteilung und Anhäufung von PECAM über die gesamte Zellmembran (Abbildung 35 C.). Diese Daten weisen darauf hin, dass die melanominduzierte Angiogenese mit einer Modulation der PECAM-Expression korreliert.

Aus den in dieser Arbeit vorgestellten Daten ergibt sich das in Abbildung 41 dargestellte Modell: Die Adhäsion der Endothelzellen an die Fibrinmatrix ist notwendig um Änderungen in der Zellmorphologie einzuleiten. Welche Rezeptoren daran beteiligt sind kann anhand der vorliegenden Daten nicht gesagt werden. Erst nach Kontakt zur Matrix kann das von Melanomzellen sezernierte VEGF die Elongation der Endothelzellen einleiten. Dieser Prozess ist begleitet von einer vermehrten Lokalisation von MT1-MMP und PECAM auf der Zellmembran. Die erhöhte Synthese und Aktivität von Adhäsionsmolekülen und Proteasen führt zur Fibrinolyse und die Zellen können in die dreidimensionale Matrix einwandern.



**Abbildung 41: Schematische Zusammenfassung der Interaktion von hoch invasiven Melanomzellen der Linie BLM mit humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMECs).**

Viele der bekannten Oberflächenmoleküle der Endothelzellen, zu denen unter anderem PECAM gehört, sind jedoch sowohl auf „normalen“ Blutgefäßen als auch auf „Tumor“-Gefäßen exprimiert, was den Einsatz von blockierenden Antikörpern als Therapieansatz erschwert. Daher scheint der Einsatz von Monotherapien nicht geeignet zu sein. Die gezielte Kombination von mehreren Therapieansätzen stellt jedoch eine Perspektive zur Behandlung von Tumorpatienten dar.

## 5 Zusammenfassung und Abstract

### 5.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe eines *in-vitro*-Kokultur-Systems gezeigt werden, dass hoch invasive Melanomzellen der Linie BLM hauptsächlich über die Abgabe löslicher Faktoren die proMMP-1- und proMMP-3-Synthese in primären dermalen Fibroblasten induzieren können. Wenig invasive Melanomzellen der Linie WM164 hingegen zeigen keinen Effekt auf die Synthese dieser Proteasen in Fibroblasten. Der Einsatz neutralisierender Antikörper gegen Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie des rekombinanten IL-1RA zeigten, dass IL-1 $\alpha$  und bFGF maßgeblich an der Interaktion zwischen BLM Melanomzellen und Fibroblasten und der damit verbundenen Induktion der MMP-1-Synthese beteiligt waren. Die gleichzeitige Inhibition der IL-1- und bFGF-Signaltransduktion zeigte allerdings, dass neben IL-1 $\alpha$  und bFGF weitere Faktoren als Mediatoren in dieser Interaktion involviert sind.

Aus diesen Ergebnissen ergab sich die folgende Arbeitshypothese für die Kommunikation der Zellen *in vivo*: hoch invasive Melanomzellen induzieren über die Abgabe löslicher Faktoren, IL-1 $\alpha$ , bFGF und anderer noch nicht identifizierter Faktoren, die Synthese von MMPs, insbesondere der humanen Kollagenase MMP-1, in stromalen Fibroblasten. Dadurch wird die perizelluläre Proteolyse des interstitiellen Bindegewebes eingeleitet, welches die Invasion von Melanomzellen in die Dermis erleichtert.

Weiterhin wurde ein Mausmodell etabliert, in dem die Ausbildung von Tumoren und das Vorhandensein von Organmetastasen nach intradermaler Injektion von hoch invasiven humanen BLM Melanomzellen gezeigt werden konnte. Die Behandlung dieser Tiere mit dem rekombinanten humanen IL-1RA hatte keinen Effekt auf die Bildung des Tumors, verhinderte jedoch die Metastasierung in innere Organe. Dies deutet darauf hin, dass IL-1 eine bedeutende Rolle in der Metastasierung über das Lymph- und Blutssystem spielt. Unklar ist derzeit, ob die Inhibition der Metastasierung direkt auf die Blockade der Synthese von interstitiellen Kollagenasen zurückzuführen ist, oder ob die IL-1RA-Applikation andere Kommunikationswege wie z.B. die Expression von Chemokinen bzw. ihrer Rezeptoren beeinflusst.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit den molekularen Mechanismen die der Interaktion zwischen Melanomzellen und Endothelzellen zugrunde liegen.

Die Kokultivierung der Melanom- und mikrovaskulären Endothelzellen unter den

Bedingungen der Monolayerkultur zeigte keine Veränderungen in der Zellmorphologie und der Synthese von MMPs in Endothelzellen. Endothelzellen, die auf einer dreidimensionalen Fibrinmatrix kultiviert wurden bildeten dagegen in Gegenwart von BLM-konditioniertem Medium tubuläre Strukturen aus und zeigten eine vermehrte Migration in diese Matrix.

Konditioniertes Medium der wenig invasiven WM164 Melanomzellen hatte dagegen keinen Einfluss auf Morphologie und Migration der Endothelzellen. Diese Befunde weisen darauf hin, dass Endothelzellen zum einen den Kontakt zu einer dreidimensionalen Matrix, z.B. Fibrin oder Kollagen, benötigen und zum anderen, dass die Expression von Proteasen für die Invasion wesentlich ist. Inhibitionsstudien mit VEGF neutralisierender Antikörpern und dem MMP-Inhibitor Phenanthrolin machten deutlich, dass sowohl VEGF als auch MMPs bei der Induktion tubulärer Strukturen involviert sind. Die erhöhte Proliferation und Differenzierung der Endothelzellen ist abhängig von VEGF, welches in erhöhten Mengen von Melanomzellen sezerniert wird. Dieser Wachstumsfaktor induziert die Synthese von MT1-MMP und könnte somit zur vermehrten Degradation der Fibrinmatrix führen.

Das Verständnis der hier analysierten molekularen Mechanismen stellt eine grundlegende Basis zur Entwicklung neuer Therapien zur Behandlung maligner Melanome dar, die nicht nur die Tumorzellen selbst, sondern auch das peritumorale Stroma als Ansatzpunkt für ein gezieltes Eingreifen in die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen einbeziehen.

## 5.2 Abstract

By using an *in vitro* co-culture system we could show that soluble factors, derived from high invasive BLM melanoma cell can induce proMMP-1 and proMMP-3 synthesis by dermal fibroblasts. In contrast, the low invasive WM164 melanoma cells had no effect on protease synthesis by fibroblasts.

Using neutralising antibodies against cytokines and growth factors, as well as recombinant IL-1RA we could identify IL-1 $\alpha$  and bFGF as the main mediators in the communication between melanoma cells and fibroblasts. However, while proMMP-1 synthesis was strongly inhibited the inhibition of both factors, IL-1 $\alpha$  and bFGF failed to completely abolish proMMP-1 synthesis in dermal fibroblasts, indicating that additional factors are involved in this cross-talk.

Therefore we would suggest, that *in vivo* soluble factors derived by melanoma cells induce stromal production of proteases leading to pericellular degradation of the connective tissue and invasion of melanoma cells into the underlying tissue.

Using a mouse model we could demonstrate the formation of a tumour and the appearance of lung metastasis, after intracutaneous injection of high invasive melanoma cells. Animals treated with the recombinant IL-1RA after inoculation of invasive melanoma cells, failed to develop lymphnode or organ metastasis.

In the second part of the work, we provide data on the analysis of the molecular mechanisms of tumour-induced angiogenesis. While we observed no obvious differences in cell morphology in dermal microvascular endothelial cells (HDMECs) upon direct co-culture with high invasive BLM melanoma cells, HDMECs grown on a three dimensional fibrin matrix formed vessel-like structures when treated with medium conditioned by high invasive melanoma cells.

In addition, we could observe induced migration of endothelial cells into the underlying matrix and formation tubular structures. In contrast medium conditioned by low invasive WM164 cells failed to induce these cellular alterations. Treatment with neutralising antibodies against VEGF and with the MMP inhibitor phenanthroline suggested that VEGF and MT1-MMP are involved in the induction of tube formation. In summary, we could show that HDMECs need firstly the contact to a three-dimensional matrix, e.g. fibrin or collagen, and, secondly, expression of proteases for tube formation. The proliferation and the differentiation of HDMECs is dependent on VEGF produced at increased amounts by high invasive melanoma cells. This growth

factor may regulate proteases expression, namely MT1-MMP, necessary for degradation the fibrin matrix and the migration of the endothelial cells into this matrix. In support of this hypothesis, treatment with recombinant VEGF of HDMECs monoculture, in absence of specific matrix interactions, induces up-regulation of MT1-MMP transcripts.

These studies provide insights into the basic mechanisms of tumour-stroma interactions. This knowlege might help to developpe new straragies in the treatment of malignant melanoma by using the stroma as an alternative target for therapy.

## Literatur

- Airola, K., T. Karonen, M. Vaalamo, K. Lehti, J. Lohi, A.L. Kariniemi, J. Keski-Oja, and U.K. Saarialho-Kere. 1999. Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. *Br J Cancer*. 80:733-43.
- Angel, P., I. Baumann, B. Stein, H. Delius, H.J. Rahmsdorf, and P. Herrlich. 1987. 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol Cell Biol*. 7:2256-66.
- Apte, S.S., B.R. Olsen, and G. Murphy. 1995. The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem*. 270:14313-8.
- Arend, W.P. 1990. Interleukin-1 receptor antagonist: discovery, structure and properties. *Prog Growth Factor Res*. 2:193-205.
- Augustin, H.G. 2003. [Angiogenesis research--quo vadis?]. *Ophthalmologe*. 100:104-10.
- Aumailley, M., and B. Gayraud. 1998. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med*. 76:253-65.
- Becker, J.W., A.I. Marcy, L.L. Rokosz, M.G. Axel, J.J. Burbaum, P.M. Fitzgerald, P.M. Cameron, C.K. Esser, W.K. Hagmann, J.D. Hermes, and et al. 1995. Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme. *Protein Sci*. 4:1966-76.
- Benbow, U., and C.E. Brinckerhoff. 1997. The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix Biol*. 15:519-26.
- Benbow, U., J.L. Rutter, C.H. Lowrey, and C.E. Brinckerhoff. 1999. Transcriptional repression of the human collagenase-1 (MMP-1) gene in MDA231 breast cancer cells by all-trans-retinoic acid requires distal regions of the promoter. *Br J Cancer*. 79:221-8.
- Bhowmick, N.A., E.G. Neilson, and H.L. Moses. 2004. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 432:332-7.
- Birkedal-Hansen, H., W.G. Moore, M.K. Bodden, L.J. Windsor, B. Birkedal-Hansen, A. DeCarlo, and J.A. Engler. 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 4:197-250.
- Biswas, C., Y. Zhang, R. DeCastro, H. Guo, T. Nakamura, H. Kataoka, and K. Nabeshima. 1995. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res*. 55:434-9.
- Bode, W., C. Fernandez-Catalan, F. Grams, F.X. Gomis-Ruth, H. Nagase, H. Tschesche, and K. Maskos. 1999. Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann N Y Acad Sci*. 878:73-91.
- Brooks, P.C., A.M. Montgomery, M. Rosenfeld, R.A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier, and D.A. Cheresh. 1994. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*. 79:1157-64.
- Brooks, P.C., S. Stromblad, L.C. Sanders, T.L. von Schalscha, R.T. Aimes, W.G. Stetler-Stevenson, J.P. Quigley, and D.A. Cheresh. 1996. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell*. 85:683-93.
- Busca, R., P. Abbe, F. Mantoux, E. Aberdam, C. Peyssonnaud, A. Eychene, J.P. Ortonne, and R. Ballotti. 2000. Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *Embo J*.

19:2900-10.

- Cao, G., C.D. O'Brien, Z. Zhou, S.M. Sanders, J.N. Greenbaum, A. Makrigiannakis, and H.M. DeLisser. 2002. Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282:C1181-90.
- Carlson, R.O., D.M. Martin, E.L. Feldman, and B.W. Agranoff. 1993. PKC activity and PKC-alpha mRNA content are reduced in serum-derived human neuroblastoma cells without concomitant induction of differentiation. *Exp Cell Res.* 207:340-7.
- Carmeliet, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 6:389-95.
- Caudroy, S., M. Polette, B. Nawrocki-Raby, J. Cao, B.P. Toole, S. Zucker, and P. Birembaut. 2002. EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells. *Clin Exp Metastasis.* 19:697-702.
- Chen, W.T. 1996. Proteases associated with invadopodia, and their role in degradation of extracellular matrix. *Enzyme Protein.* 49:59-71.
- Collen, A., R. Hanemaaijer, F. Lupu, P.H. Quax, N. van Lent, J. Grimbergen, E. Peters, P. Koolwijk, and V.W. van Hinsbergh. 2003. Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood.* 101:1810-7.
- Collen, A., P. Koolwijk, M. Kroon, and V.W. van Hinsbergh. 1998. Influence of fibrin structure on the formation and maintenance of capillary-like tubules by human microvascular endothelial cells. *Angiogenesis.* 2:153-65.
- Coussens, L.M., and Z. Werb. 2002. Inflammation and cancer. *Nature.* 420:860-7.
- Cowell, S., V. Knauper, M.L. Stewart, M.P. D'Ortho, H. Stanton, R.M. Hembry, C. Lopez-Otin, J.J. Reynolds, and G. Murphy. 1998. Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase: associated activation of gelatinase A, gelatinase B and collagenase 3. *Biochem J.* 331 ( Pt 2):453-8.
- Danen, E.H., P.J. Ten Berge, G.N. Van Muijen, A.E. Van 't Hof-Grootenboer, E.B. Brocker, and D.J. Ruiter. 1994. Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin- and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression. *Histopathology.* 24:249-56.
- Davies, H., G.R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M.J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B.A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G.J. Riggins, D.D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J.W. Ho, S.Y. Leung, S.T. Yuen, B.L. Weber, H.F. Seigler, T.L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C.J. Marshall, R. Wooster, M.R. Stratton, and P.A. Futreal. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 417:949-54.
- Davis, G.E., K.J. Bayless, and A. Mavila. 2002. Molecular basis of endothelial cell morphogenesis in three-dimensional extracellular matrices. *Anat Rec.* 268:252-75.
- Dennhofer, R., P. Kurschat, P. Zigrino, A. Klose, A. Bosserhoff, G. van Muijen, T. Krieg, C. Mauch, and N. Hunzelmann. 2003. Invasion of melanoma cells into dermal connective tissue in vitro: evidence for an important role of cysteine proteases. *Int J Cancer.* 106:316-23.
- Fearns, C., and E.B. Dowdle. 1992. The desmoplastic response: induction of

- collagen synthesis by melanoma cells in vitro. *Int J Cancer*. 50:621-7.
- Fernandez, C.A., C. Butterfield, G. Jackson, and M.A. Moses. 2003. Structural and functional uncoupling of the enzymatic and angiogenic inhibitory activities of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2): loop 6 is a novel angiogenesis inhibitor. *J Biol Chem*. 278:40989-95.
- Ferrara, N., K.J. Hillan, H.P. Gerber, and W. Novotny. 2004. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 3:391-400.
- Fidler, I.J. 1983. The Ernst W. Bertner Memorial Award lecture: the evolution of biological heterogeneity in metastatic neoplasms. *Symp Fundam Cancer Res*. 36:5-26.
- Folkman, J. 1975. Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. *Ann Intern Med*. 82:96-100.
- Friedlander, M., P.C. Brooks, R.W. Shaffer, C.M. Kincaid, J.A. Varner, and D.A. Cheresh. 1995. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science*. 270:1500-2.
- Gitay-Goren, H., R. Halaban, and G. Neufeld. 1993. Human melanoma cells but not normal melanocytes express vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 190:702-8.
- Graeven, U., U. Rodeck, S. Karpinski, M. Jost, S. Philippou, and W. Schmiegel. 2001. Modulation of angiogenesis and tumorigenicity of human melanocytic cells by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Cancer Res*. 61:7282-90.
- Gratzinger, D., S. Canosa, B. Engelhardt, and J.A. Madri. 2003. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 modulates endothelial cell motility through the small G-protein Rho. *Faseb J*. 17:1458-69.
- Gruss, C., and M. Herlyn. 2001. Role of cadherins and matrixins in melanoma. *Curr Opin Oncol*. 13:117-23.
- Gullberg, D., K.R. Gehlsen, D.C. Turner, K. Ahlen, L.S. Zijenah, M.J. Barnes, and K. Rubin. 1992. Analysis of alpha 1 beta 1, alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 integrins in cell-collagen interactions: identification of conformation dependent alpha 1 beta 1 binding sites in collagen type I. *Embo J*. 11:3865-73.
- Halaban, R. 2000. The regulation of normal melanocyte proliferation. *Pigment Cell Res*. 13:4-14.
- Hart, I.R., J.E. Talmadge, and I.J. Fidler. 1983. Comparative studies on the quantitative analysis of experimental metastatic capacity. *Cancer Res*. 43:400-2.
- Henriet, P., L. Blavier, and Y.A. Declerck. 1999. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *Apmis*. 107:111-9.
- Herlyn, D., D. Iliopoulos, P.J. Jensen, A. Parmiter, J. Baird, H. Hotta, K. Adachi, A.H. Ross, J. Jambrosic, H. Koprowski, and et al. 1990. In vitro properties of human melanoma cells metastatic in nude mice. *Cancer Res*. 50:2296-302.
- Hewett, P.W. 2001. Identification of tumour-induced changes in endothelial cell surface protein expression: an in vitro model. *Int J Biochem Cell Biol*. 33:325-35.
- Hiraoka, N., E. Allen, I.J. Apel, M.R. Gyetko, and S.J. Weiss. 1998. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell*. 95:365-77.
- Hofmann, U.B., J.R. Westphal, A.J. Zendman, J.C. Becker, D.J. Ruiter, and G.N. van Muijen. 2000. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase

- (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. *J Pathol.* 191:245-56.
- Hsu, M., T. Andl, G. Li, J.L. Meinkoth, and M. Herlyn. 2000. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci.* 113 ( Pt 9):1535-42.
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673-87.
- Imai, K., A. Hiramatsu, D. Fukushima, M.D. Pierschbacher, and Y. Okada. 1997. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J.* 322 ( Pt 3):809-14.
- Islam, S., T.E. Carey, G.T. Wolf, M.J. Wheelock, and K.R. Johnson. 1996. Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* 135:1643-54.
- Ito, A., S. Nakajima, Y. Sasaguri, H. Nagase, and Y. Mori. 1995. Co-culture of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells and human dermal fibroblasts enhances the production of matrix metalloproteinases 1, 2 and 3 in fibroblasts. *Br J Cancer.* 71:1039-45.
- Kahari, V.M., and U. Saarialho-Kere. 1997. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol.* 6:199-213.
- Kahari, V.M., and U. Saarialho-Kere. 1999. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med.* 31:34-45.
- Kanekura, T., X. Chen, and T. Kanzaki. 2002. Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int J Cancer.* 99:520-8.
- Kang, T., H. Nagase, and D. Pei. 2002. Activation of membrane-type matrix metalloproteinase 3 zymogen by the proprotein convertase furin in the trans-Golgi network. *Cancer Res.* 62:675-81.
- Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 9:240-6.
- Kataoka, H., R. DeCastro, S. Zucker, and C. Biswas. 1993. Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase. *Cancer Res.* 53:3154-8.
- Kleiner, D.E., Jr., A. Tuuttila, K. Tryggvason, and W.G. Stetler-Stevenson. 1993. Stability analysis of latent and active 72-kDa type IV collagenase: the role of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *Biochemistry.* 32:1583-92.
- Krane, S.M., M.H. Byrne, V. Lemaitre, P. Henriot, J.J. Jeffrey, J.P. Witter, X. Liu, H. Wu, R. Jaenisch, and Y. Eeckhout. 1996. Different collagenase gene products have different roles in degradation of type I collagen. *J Biol Chem.* 271:28509-15.
- Krause, T., and G.A. Turner. 1999. Are selectins involved in metastasis? *Clin Exp Metastasis.* 17:183-92.
- Kubo, M., K. Kikuchi, K. Nashiro, T. Kakinuma, N. Hayashi, H. Nanko, and K. Tamaki. 1998. Expression of fibrogenic cytokines in desmoplastic malignant melanoma. *Br J Dermatol.* 139:192-7.
- Kuhn, K., and J. Eble. 1994. The structural bases of integrin-ligand interactions. *Trends Cell Biol.* 4:256-61.
- Kurschat, P., C. Wickenhauser, W. Groth, T. Krieg, and C. Mauch. 2002. Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main

- gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by in situ zymography. *J Pathol.* 197:179-87.
- Kurschat, P., P. Zigrino, R. Nischt, K. Breitkopf, P. Steurer, C.E. Klein, T. Krieg, and C. Mauch. 1999. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 regulates matrix metalloproteinase-2 activation by modulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity in high and low invasive melanoma cell lines. *J Biol Chem.* 274:21056-62.
- Labrousse, A.L., C. Ntayi, W. Hornebeck, and P. Bernard. 2004. Stromal reaction in cutaneous melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 49:269-75.
- Lafleur, M.A., M.M. Handsley, V. Knauper, G. Murphy, and D.R. Edwards. 2002. Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs). *J Cell Sci.* 115:3427-38.
- Langholz, O., D. Rockel, C. Mauch, E. Kozłowska, I. Bank, T. Krieg, and B. Eckes. 1995. Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins. *J Cell Biol.* 131:1903-15.
- Liaw, Y.S., C.J. Yu, C.T. Shun, Y.C. Lee, S.H. Kuo, K.T. Luh, and P.C. Yang. 2001. Expression of integrins in human cultured mesothelial cells: the roles in cell-to-extracellular matrix adhesion and inhibition by RGD-containing peptide. *Respir Med.* 95:221-6.
- Liotta, L.A., C.N. Rao, and S.H. Barsky. 1983. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest.* 49:636-49.
- Mauch, C., A. Hatamochi, K. Scharffetter, and T. Krieg. 1988. Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three-dimensional collagen gel. *Exp Cell Res.* 178:493-503.
- McKenzie, R.C., A. Oran, C.A. Dinarello, and D.N. Sauder. 1996. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits subcutaneous B16 melanoma growth in vivo. *Anticancer Res.* 16:437-41.
- Montesano, R., and L. Orci. 1985. Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis in vitro. *Cell.* 42:469-77.
- Morgunova, E., A. Tuuttila, U. Bergmann, M. Isupov, Y. Lindqvist, G. Schneider, and K. Tryggvason. 1999. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science.* 284:1667-70.
- Moses, M.A. 1997. The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells.* 15:180-9.
- Muller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M.E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S.N. Wagner, J.L. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui, and A. Zlotnik. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 410:50-6.
- Murphy, G., V. Knauper, M.H. Lee, A. Amour, J.R. Worley, M. Hutton, S. Atkinson, M. Rapti, and R. Williamson. 2003. Role of TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) in pericellular proteolysis: the specificity is in the detail. *Biochem Soc Symp:*65-80.
- Nagase, H. 1997. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem.* 378:151-60.
- Natali, P.G., C.V. Hamby, B. Felding-Habermann, B. Liang, M.R. Nicotra, F. Di Filippo, D. Giannarelli, M. Temponi, and S. Ferrone. 1997. Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res.* 57:1554-60.
- Natali, P.G., M.R. Nicotra, F. Di Filippo, and A. Bigotti. 1995. Expression of

- fibronectin, fibronectin isoforms and integrin receptors in melanocytic lesions. *Br J Cancer*. 71:1243-7.
- Nicolson, G.L., and N.L. Rosenberg. 1987. Diversification and progression of malignant tumors. *Bioessays*. 6:204-8.
- Nikkola, J., P. Vihinen, T. Vlaykova, M. Hahka-Kemppinen, V.M. Kahari, and S. Pyrhonen. 2002. High expression levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma. *Int J Cancer*. 97:432-8.
- Noe, V., B. Fingleton, K. Jacobs, H.C. Crawford, S. Vermeulen, W. Steelant, E. Bruyneel, L.M. Matrisian, and M. Mareel. 2001. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci*. 114:111-118.
- Ogawa, K., R. Pasqualini, R.A. Lindberg, R. Kain, A.L. Freeman, and E.B. Pasquale. 2000. The ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization. *Oncogene*. 19:6043-52.
- Oh, J.W., K. Drabik, O. Kutsch, C. Choi, A. Tousson, and E.N. Benveniste. 2001. CXC chemokine receptor 4 expression and function in human astrogloma cells. *J Immunol*. 166:2695-704.
- Okada, A., J.P. Bellocq, N. Rouyer, M.P. Chenard, M.C. Rio, P. Chambon, and P. Basset. 1995. Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:2730-4.
- Olson, M.W., D.C. Gervasi, S. Mobashery, and R. Fridman. 1997. Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem*. 272:29975-83.
- Overall, C.M. 1994. Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression. *Ann N Y Acad Sci*. 732:51-64.
- Overall, C.M., J.L. Wrana, and J. Sodek. 1991. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem*. 266:14064-71.
- Payne, A.S., and L.A. Cornelius. 2002. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *J Invest Dermatol*. 118:915-22.
- Pei, D., T. Kang, and H. Qi. 2000. Cysteine array matrix metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. *J Biol Chem*. 275:33988-97.
- Pei, D., and S.J. Weiss. 1995. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*. 375:244-7.
- Plaisier, M., K. Kapiteijn, P. Koolwijk, C. Fijten, R. Hanemaaijer, J.M. Grimbergen, A. Mulder-Stapel, P.H. Quax, F.M. Helmerhorst, and V.W. van Hinsbergh. 2004. Involvement of membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in capillary tube formation by human endometrial microvascular endothelial cells: role of MT3-MMP. *J Clin Endocrinol Metab*. 89:5828-36.
- Plow, E.F., T.A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, and J.W. Smith. 2000. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem*. 275:21785-8.
- Potgens, A.J., N.H. Lubsen, M.C. van Altena, J.G. Schoenmakers, D.J. Ruiter, and R.M. de Waal. 1995. Vascular permeability factor expression influences tumor angiogenesis in human melanoma lines xenografted to nude mice. *Am J Pathol*. 146:197-209.

- Reed, J.A., N.S. McNutt, and A.P. Albino. 1994. Differential expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in melanocytic lesions demonstrated by in situ hybridization. Implications for tumor progression. *Am J Pathol.* 144:329-36.
- Reitamo, S., A. Remitz, K. Tamai, and J. Uitto. 1994. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J Clin Invest.* 94:2489-92.
- Renshaw, M.W., X.D. Ren, and M.A. Schwartz. 1997. Growth factor activation of MAP kinase requires cell adhesion. *Embo J.* 16:5592-9.
- Risau, W., and I. Flamme. 1995. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:73-91.
- Ruoslahti, E., and M.D. Pierschbacher. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 238:491-7.
- Sameshima, T., K. Nabeshima, B.P. Toole, K. Yokogami, Y. Okada, T. Goya, M. Koono, and S. Wakisaka. 2000. Glioma cell extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) (CD147) stimulates production of membrane-type matrix metalloproteinases and activated gelatinase A in co-cultures with brain-derived fibroblasts. *Cancer Lett.* 157:177-84.
- Sanders, D.S., K. Blessing, G.A. Hassan, R. Bruton, J.R. Marsden, and J. Jankowski. 1999. Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours. *Mol Pathol.* 52:151-7.
- Sanz, L., and L. Alvarez-Vallina. 2003. The extracellular matrix: a new turn-of-the-screw for anti-angiogenic strategies. *Trends Mol Med.* 9:256-62.
- Sato, H., T. Kinoshita, T. Takino, K. Nakayama, and M. Seiki. 1996. Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett.* 393:101-4.
- Sato, H., T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto, and M. Seiki. 1994. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature.* 370:61-5.
- Segain, J.P., J. Harb, M. Gregoire, K. Meflah, and J. Menanteau. 1996. Induction of fibroblast gelatinase B expression by direct contact with cell lines derived from primary tumor but not from metastases. *Cancer Res.* 56:5506-12.
- Seiki, M. 1999. Membrane-type matrix metalloproteinases. *Apmis.* 107:137-43.
- Si, Z., and P. Hersey. 1994. Immunohistological examination of the relationship between metastatic potential and expression of adhesion molecules and 'selectins' on melanoma cells. *Pathology.* 26:6-15.
- Sidhu, S.S., A.T. Mengistab, A.N. Tauscher, J. LaVail, and C. Basbaum. 2004. The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions. *Oncogene.* 23:956-63.
- Sivakumar, B., L.E. Harry, and E.M. Paleolog. 2004. Modulating angiogenesis: more vs less. *Jama.* 292:972-7.
- Smith, J.W., R.S. Piotrowicz, and D. Mathis. 1994. A mechanism for divalent cation regulation of beta 3-integrins. *J Biol Chem.* 269:960-7.
- Somerville, R.P., S.A. Oblander, and S.S. Apte. 2003. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol.* 4:216.
- Springman, E.B., E.L. Angleton, H. Birkedal-Hansen, and H.E. Van Wart. 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.* 87:364-8.
- Steinhausen, U., J. Weiske, V. Badock, R. Tauber, K. Bommert, and O. Huber. 2001. Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J Biol Chem.* 276:4972-80.

- Stetler-Stevenson, W.G., H.C. Krutzsch, M.P. Wacher, I.M. Margulies, and L.A. Liotta. 1989. The activation of human type IV collagenase proenzyme. Sequence identification of the major conversion product following organomercurial activation. *J Biol Chem.* 264:1353-6.
- Tang, Y., P. Kesavan, M.T. Nakada, and L. Yan. 2004. Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN. *Mol Cancer Res.* 2:73-80.
- ten Berge, P.J., E.H. Danen, G.N. van Muijen, M.J. Jager, and D.J. Ruiter. 1993. Integrin expression in uveal melanoma differs from cutaneous melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 34:3635-40.
- Timpl, R. 1996. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol.* 8:618-24.
- Tomita, K., A. van Bokhoven, G.J. van Leenders, E.T. Ruijter, C.F. Jansen, M.J. Bussemakers, and J.A. Schalken. 2000. Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res.* 60:3650-4.
- Tryggvason, K., M. Hoyhtya, and C. Pyke. 1993. Type IV collagenases in invasive tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 24:209-18.
- Tschesche, H. 1998. Bimolecular interaction of matrix metalloproteinases and their inhibitors TIMPs. *J Protein Chem.* 17:549-51.
- Vailhe, B., X. Ronot, P. Tracqui, Y. Usson, and L. Tranqui. 1997. In vitro angiogenesis is modulated by the mechanical properties of fibrin gels and is related to alpha(v)beta3 integrin localization. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 33:763-73.
- van der Flier, A., and A. Sonnenberg. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305:285-98.
- van Hinsbergh, V.W., P. Koolwijk, and R. Hanemaaijer. 1997. Role of fibrin and plasminogen activators in repair-associated angiogenesis: in vitro studies with human endothelial cells. *Exs.* 79:391-411.
- van Muijen, G.N., K.F. Jansen, I.M. Cornelissen, D.F. Smeets, J.L. Beck, and D.J. Ruiter. 1991. Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int J Cancer.* 48:85-91.
- Van Wart, H.E., and H. Birkedal-Hansen. 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.* 87:5578-82.
- Varney, M.L., A. Li, B.J. Dave, C.D. Bucana, S.L. Johansson, and R.K. Singh. 2003. Expression of CXCR1 and CXCR2 receptors in malignant melanoma with different metastatic potential and their role in interleukin-8 (CXCL-8)-mediated modulation of metastatic phenotype. *Clin Exp Metastasis.* 20:723-31.
- Vincenti, M.P., L.A. White, D.J. Schroen, U. Benbow, and C.E. Brinckerhoff. 1996. Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 6:391-411.
- Voronov, E., D.S. Shouval, Y. Krelin, E. Cagnano, D. Benharroch, Y. Iwakura, C.A. Dinarello, and R.N. Apte. 2003. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:2645-50.
- Walsh, F.S., and P. Doherty. 1997. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:425-56.
- Wandel, E., A. Grasshoff, M. Mittag, U.F. Haustein, and A. Saalbach. 2000. Fibroblasts surrounding melanoma express elevated levels of matrix

- metalloproteinase-1 (MMP-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vitro. *Exp Dermatol.* 9:34-41.
- Wandel, E., A. Raschke, G. Hildebrandt, J. Eberle, R. Dummer, U. Anderegg, and A. Saalbach. 2002. Fibroblasts enhance the invasive capacity of melanoma cells in vitro. *Arch Dermatol Res.* 293:601-8.
- Warren, B.A., and P. Shubik. 1966. The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch. *Lab Invest.* 15:464-78.
- Whitelock, J.M., A.D. Murdoch, R.V. Iozzo, and P.A. Underwood. 1996. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem.* 271:10079-86.
- Wlaschek, M., K. Briviba, G.P. Stricklin, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek. 1995. Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase. *J Invest Dermatol.* 104:194-8.
- Woolley, D.E., and C.A. Grafton. 1980. Collagenase immunolocalization studies of cutaneous secondary melanomas. *Br J Cancer.* 42:260-5.
- Yamamoto, T., B. Eckes, C. Mauch, K. Hartmann, and T. Krieg. 2000. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop. *J Immunol.* 164:6174-9.
- Yap, A.S., W.M. Brieher, and B.M. Gumbiner. 1997. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:119-46.
- Zhou, Z., S.S. Apte, R. Soininen, R. Cao, G.Y. Baaklini, R.W. Rauser, J. Wang, Y. Cao, and K. Tryggvason. 2000. Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:4052-7.
- Zhou, Z., M. Christofidou-Solomidou, C. Garlanda, and H.M. DeLisser. 1999. Antibody against murine PECAM-1 inhibits tumor angiogenesis in mice. *Angiogenesis.* 3:181-8.
- Zigrino, P., C. Drescher, and C. Mauch. 2001. Collagen-induced proMMP-2 activation by MT1-MMP in human dermal fibroblasts and the possible role of alpha2beta1 integrins. *Eur J Cell Biol.* 80:68-77.

## Danksagung

Herrn Professor T. Krieg und Frau Professor C. Mauch danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln, für die Themenstellung sowie für ihr stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit und die kritische Diskussion dieser Arbeit.

Herrn Professor T. Langer danke ich für die Betreuung dieser Arbeit seitens der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Professor H. Klein danke ich herzlich für die spontane Übernahme des Drittgutachtens.

Frau Dr. B. Eckes danke ich dafür, dass sie mir in vielen Situationen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bei Frau Susanne Neumann, Frau Claudia Ochsmann, Frau Julia Steiger und Herrn Jan Zamek bedanke ich mich für die Unterstützung bei experimentellen Arbeiten, die gute Zusammenarbeit und das nette Arbeitsklima. Ein weiterer Dank gilt Frau Angelika Arora, die mir durch die Bereitstellung von Gewebeschnitten eine sehr große Hilfe war.

Für viele allgemein-wissenschaftliche aber vor allem auch nicht wissenschaftliche Diskussionen danke ich Anke Klose und Alexander Schild.

Vorrei ringraziare molto Dott.ssa Paola Zigrino che ha contribuito molto alla riuscita di questa tesi. Mi ha introdotto nei metodi della biologia molecolare, mi é sempre stata un'interlocutrice costruttiva ed impegnata. Grazie alle sue consigli di gran valore sono riuscita ad ottenere un contenuto completo fatto di tanti risultati singoli. Vorrei ringraziare Paola Zigrino soprattutto del fatto di essere diventata un'amica molto vicina in questo periodo. Grazie!

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, Heinrich und meiner Patentante, die mir durch Ihre jahrelange Unterstützung die Möglichkeit zu meinem Studium eröffnet haben.

**Erklärung:**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen - , die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Thomas Krieg betreut worden.

Köln, den 02.12.04

Stefanie Löffek

**Teilpublikationen:**

Stefanie Löffek, Paola Zigrino, Peter Angel, Birgit Anwald, Thomas Krieg, Cornelia Mauch: High invasive melanoma cells induce MMP-1 synthesis in fibroblasts by IL-1 $\alpha$  and bFGF -mediated mechanisms. JID (in press)

**Abstracts:**

Löffek, S., Anwald, B., Zigrino, P., von Muijen, G., Mauch, C.:

High invasive melanoma cells induce MMP-1 synthesis and activation in fibroblasts by a cytokine-mediated mechanism.

Arch Dermatol Res 294, number 1/2: S 9 (2002)

(XXIX. Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Berlin 2002)

Löffek, S., Zigrino, P., von Muijen, G., Mauch, C.:

Basic FGF and IL-1 alpha mediate the induction of proMMP-1 synthesis in fibroblasts co-cultured with high invasive BLM melanoma cells *in vitro*.

Arch Dermatol Res 294, number 10-11: S 506 (2003)

(XXIX. Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Frankfurt 2003)

Löffek, S., Zigrino, P., Mauch, C.:

Soluble factors derived from high invasive melanoma cells activate stromal fibroblasts and microvascular endothelial cells.

Arch Dermatol Res 295, number 8-9: S 375 (2004)

(XXIX. Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Dresden 2004)

## Lebenslauf

### **Stefanie Löffek**

Geburtsdatum: 02.05.1973

Geburtsort: Essen/NRW

Staatsangehörigkeit: Deutsch

### **Schulbildung:**

1979-1981 Grundschule in Essen

1981-1982 Grundschule in Adenau

1983-1985 Hauptschule in Adenau

1985-1989 Realschule in Adenau

1989 -1992 St. Michael Gymnasium in Bad Münstereifel  
Abschluss Abitur

1992-1994 Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin an der  
Rheinischen Akademie zu Köln

### **Studium:**

1994-1998 Studium Diplom Biologie an der Universität zu Köln  
Abschluss Diplom

1998-1999 Diplomarbeit mit dem Thema „Analyse der Interaktion  
zwischen Signaltransduktionswegen der FasL-induzierten  
Apoptose und Antiestrogenen in der Brustkrebszelllinie  
MCF-7 “

1999-2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Morphologie  
und Tumorforschung an der Deutschen Sporthochschule  
zu Köln

seit 08/2001 Promotion für das Fach Genetik in der Arbeitsgruppe von  
Frau Prof. C. Mauch unter der Anleitung von Herrn Prof. T.  
Krieg, Klinik für Dermatologie und Venerologie der  
Universität zu Köln