

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
der Universität zu Köln

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c.Th. Krieg

**Die Rolle des Cathepsin B bei der Ausbreitung und
Metastasierung des Malignen Melanoms**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von:
Julia Katharina Köhle
aus Ulm

Promoviert am: 27.10.2010

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter

1. Berichterstatterin/Berichterstatter: Frau Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Dr. med. C. Mauch
2. Berichterstatterin/Berichterstatter: Frau Universitätsprofessor Dr. med. G. Pfitzer

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Universitätsprofessor Dr. Dr. C. Mauch

Frau Dr. Paola Zigrino

Frau Dr. Anke Klose

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, den 08.04.2010

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Universitätsprofessor Dr. Dr. C. Mauch von mir selbst ausgeführt worden. Technische Unterstützung habe ich von der medizinisch-technischen Assistentin Frau Angelika Arora sowie von Frau Dr. Anke Klose erhalten

Danksagung

Ich danke Herrn Universitätsprofessor Dr. Dr. Th. Krieg für die Möglichkeit, die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente in seiner Klinik durchführen zu dürfen.

Besonders herzlichen Dank an Frau Universitätsprofessor Dr. Dr. C. Mauch für die freundliche, kompetente und geduldige Betreuung meiner Arbeit sowie für die Bereitstellung des Themas.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Mauch für die gute Zusammenarbeit, insbesondere geht mein Dank an Frau Dr. Paola Zigrino, Frau Dr. Anke Klose und Angelika Arora für Ihre große Hilfsbereitschaft.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie für ihre Geduld und „seelische Unterstützung“ bei der Fertigstellung dieser Arbeit

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	3
1. Einleitung und Fragestellung.....	5
1.1 Einleitung.....	5
1.1.1 Das Maligne Melanom.....	5
1.1.2 Tumorinvasion und -metastasierung.....	11
1.1.4 Cathepsin B.....	15
1.1.5 Matrix-Metalloproteinasen.....	19
1.1.6 In Situ Zymographie.....	20
1.2 Fragestellung.....	22
3. Material und Methoden.....	23
3.1 Materialien.....	23
3.1.1. Gewebe.....	23
3.1.2. Zellkulturmaterialien.....	24
3.1.3. Chemikalien.....	25
3.1.4. Kits und weitere Materialien.....	25
3.1.5. Lösungen und Puffer.....	25
3.1.6. Antikörper.....	26
3.2. Methoden.....	27
3.2.1. zellbiologische Methoden.....	27
3.2.2. Proteinbiochemische Methoden.....	30
3.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	32
3.2.3 Bei den Versuchen verwendete Lösungen:.....	34
4. Ergebnisse.....	37
4.1. Immunhistochemischer Nachweis von Cathepsin B in humanen benignen Pigmentnävi und malignen Melanomen.....	37
4.2. Analyse der gelatinolytischen Aktivität von Cathepsin B mittels in situ Zymographien unter sauren Bedingungen an humanen benignen Pigmentnävi und malignen Melanomen.....	41
4.3. Analyse der gelatinolytischen Aktivität von Matrix Metalloproteinasen mittels in situ Zymographien unter neutralen Bedingungen an humanen benignen Pigmentnävi und malignen Melanomen.....	45
4.4 Das Invasionsverhalten von verschiedenen Melanomzelllinien am Skid-Maus-Modell.....	48
4.4.1. Wachstumsverhalten der Melanomzelllinien im Skid Maus Modell.....	49
4.4.2. Charakterisierung der Metastasierung in den entnommenen Organen.....	50
4.4.3 Immunhistochemischer Nachweis von Cathepsin B in den Tumoren des Mausmodells.....	51
4.5. Analyse der gelatinolytischen Aktivität von Cathepsinen bei in vitro gesetzten Tumoren im Mausmodell mittels in situ Zymographien.....	53
4.6. Analyse der gelatinolytischen Aktivität von Metalloproteinasen bei in vitro gesetzten Tumoren im Mausmodell mittels in situ Zymographien.....	56
5. Diskussion.....	61
5.1 Analyse der Konzentration von Cathepsin B in Melanompräparaten mittels Immunhistochemie und der Korrelation mit der Invasivität der Melanome.....	61
5.1.1 Immunhistochemische Analyse von Cathepsin B und Korrelation mit der Invasivität des malignen Melanoms.....	61
5.1.2 Charakterisierung der Cathepsin B Synthese im Mausmodell.....	64

5.2. Analyse der gelatinolytischen Aktivität von Cathepsin B in humanen und murinen Melanomen mittels In situ Zymographie und Korrelation mit der Invasivität der Tumore ..	67
5.3. Analyse der Gelatinaseaktivität von Metalloproteinasen in humanen und murinen Melanomen mittels In situ Zymographie in Bezugnahme auf die Invasivität der Melanome	71
6. Ausblick	75
7. Zusammenfassung und Abstract.....	76
8. Literaturverzeichnis	78

Abkürzungsverzeichnis

1D,2D,3D	Ein-/zwei-/dreidimensional
Abb.	Abbildung
ADAM	A Disintegrin AND Metalloproteinase
Bp,kbp	Basenpaare, Kilobasenpaare
Bzw.	beziehungsweise
Ca.	circa
Cat	Cathepsin
cDNA	DNA-Kopie der mRNA
Da,KDa	Dalton, Kilodalton
DNA	Desoxiribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethlendiamintetraessigsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
Et al.	Et aliter
H	Stunde
h-dc	heavy-chain of the double-chain form
Ig	Immunglobulin
Kap.	Kapitel
I-dc	light-chain of the double-chain form
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LDS-PAGE	LDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
M	mol/l
MBq	Megabequarel
min	Minute
ML	Monolayer
MMP	Matirix-Metalloproteinase
MT-MMP	Membran-Typ-MMP
Mikrogramm	Mikrogramm
Mikroliter	Mikroliter
Mikrometer	Mikrometer
ml	Mililiter
mm	Milimeter

nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
pH	potentium hydrogenii
ProCat	Procathepsin
RNA	Ribonucleinsäure
RNase A	Ribonuclease A
RT-PCR	ReverseTranskriptase-Polymerasekettenreaktion
sc	single chain
sec	Sekunde
SDS	Natriumdeodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TBq	Teberequarel
TIMP	Tissue inhibitor of MMPs
tPa	tissue type plasminogen activator
UV	Ultraviolett
V	Volt
vlg.	Vergleiche
v/v	volume/volume, ml Volumen in 100ml Gesamtvolumen
W	Watt
w/v	weight/volume, g Substanz in 100ml Gesamtvolumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

1.1.1 Das Maligne Melanom

Das Melanom wird als maligner Tumor der Melanozyten definiert. Es ist der bösartigste Tumor der Haut und für 90% der Todesfälle durch Hauttumoren verantwortlich. Die ungünstige klinische Prognose beruht auf seiner frühen lymphogenen und hämatogenen Metastasierung (20% der Fälle). Die Inzidenz des Melanoms steigt weltweit an (Verdoppelung etwa alle 10 Jahre) und beträgt in gemäßigten Breiten bei Weißen derzeit 10-20/100000/Jahr. Meist sind Patienten mit europäischen Wurzeln betroffen, der stärkste Anstieg wurde bei älteren Männern verzeichnet. (Armstrong B et al., 2004) Trotz dieses Anstiegs hat sich die Überlebensrate verbessert. 1960 verstarben 60% der Patienten mit der Diagnose Melanom, während heute nur noch 11% an dieser Erkrankung sterben. Diese Verbesserung der Sterberate wurde v.a. durch eine frühere Diagnosestellung erzielt. (Beddingfield FC et al., 2003) Das Lebenszeitrisiko beträgt derzeit 1:75. (Garbe C et al., 2005)

1.1.1.1 Histologische Charakterisierung des Malignen Melanoms

Es existieren verschiedene klinisch-histologische Einteilungen des Melanoms; die am häufigsten verwendete ist die Einteilung nach Clark, welche auch prognostisch wegweisend ist. Hierbei deuten das Superfiziell spreitende Melanom (SSM) und das Lentigo-maligna-Melanom (LMM) als sich primär radial ausbreitende Melanome auf eine bessere Prognose hin, als die primär vertikal wachsenden Melanome, wie das knotige (noduläres) Melanom (NMM) und das akrolentiginöses Melanom (ALM).



Fig.: 2.1 Klinisch-histologische Subtypen des malignen Melanoms:

a) ALM, b) SSM

Neben den Haupttypen werden noch Schleimhautmelanome und Sonderformen (z.B. amelanotische Melanome) unterschieden. Diese machen ca. 5 % der Melanome aus.

(Giuliano AE et al.,1982)

Das Wachstum der meisten Melanome beginnt an der dermoepidermalen Junctionszone. Solange die Proliferation atypischer Melanozyten auf die Epidermis beschränkt bleibt, spricht man vom „Melanoma in situ“. Das häufigste Melanoma in situ ist die Lentigo maligna, Vorläufer des LMM. Sie ist durch eine besonders langzeitige horizontale Wachstumsphase gekennzeichnet (bis Jahrzehnte) und entspricht klinisch einer braunschwarzen, scheckigen Makula mit unregelmäßiger Begrenzung.

Die Entwicklung vom Melanoma in situ zum Melanom beginnt mit einer Vermehrung von Melanozyten in den basalen Epidermislagen (melanozytäre Hyperplasie). Im weiteren Verlauf breiten sich die Melanozyten teils einzeln, teils in Nestern, entlang der dermoepidermalen Junctionszone und schließlich in allen Epidermislagen, einschließlich der Hornschicht aus. Die Melanozyten zeigen Atypien mit Aberrationen der Zellgröße, hyperchromatischen Kernen, deutlichen Nukleoli, Zunahme des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses und Vermehrung atypischer Mitosen.

Sobald die atypischen Melanozyten von der Epidermis in die Dermis gelangen, liegt ein invasives Melanom mit der Potenz zur Metastasierung vor.

Häufigkeit und Altersverteilung der Melanomtypen:

1. LMM

Das LMM ist ein seltener Melanomtyp (8,8%), der häufig aus einer Lentigo maligna entsteht. Der Inzidenzgipfel liegt bei 68 Jahren.

2. SSM

Hierbei handelt es sich um den häufigsten Melanomtyp (57,4%); der Inzidenzgipfel liegt in der Lebensmitte (51 J).

3. NMM

Das NMM hat eine Häufigkeit von 21,4% und seinen Inzidenzgipfel bei 56 Jahren.

4. ALM

Die Häufigkeit des ALM beträgt 4 % aller Melanome, sein Inzidenzgipfel liegt bei 63 Jahren.

(Brown TJ et al.,1999)

1.1.1.2. Ätiologie und Pathogenese

Verschiedene Faktoren nehmen Einfluss auf die Entwicklung des malignen Melanoms. Ein wichtiger exogener Faktor ist die ultraviolette Sonnenstrahlung.

Es gibt Evidenzen, dass insbesondere eine starke intermittierende Bestrahlung, sowie mehrfache Sonnenbrände im Kindesalter wesentlich zur Entstehung eines malignen Melanoms beitragen, während eine permanente UV-Einstrahlung eher Plattenepithel- oder Basalzellkarzinome hervorruft.

Die ultraviolette Sonnenstrahlung stimuliert vermutlich die Melanomgenerierung durch einen direkten mutagenen Effekt auf die DNA, durch Modulation von Wachstumsfaktoren und durch Inhibition endogener Redoxsysteme und der zellvermittelten Immunität. Diese Effekte fördern die Zellproliferation und verhindern den normalen Weg der Apoptose, der unter physiologischen Bedingungen auf eine DNA- Schädigung folgt. So entstehen vermehrte DNA-Schädigungen die sich in Ihrer Gesamtheit zu einem Melanom entwickeln und zu allen Aspekten maligner Phänotypen führen können. (Meyskens FL et al., 2004, Satyamoorthy et al., 2002)

Aber auch die genetische Prädisposition inklusive des Hauttyps spielt eine große Rolle in der Ätiologie des Malignen Melanoms. So gelten hierbei v.a. ein heller Pigmentierungstyp, rote Haarfarbe und eine hohe Anzahl von Sommersprossen als prädisponierende Bedingungen. Ein weiterer Risikofaktor sind multiple Nävi und aktinische Lentigines.

Sehr selten werden Melanome auch durch stark penetrante, identifizierbare, erblich-

mutierte Gene ausgelöst. Die Inzidenz dieser Melanome ist nicht genau bekannt, wird aber unter 2% geschätzt. Folgende Gene mit dieser Funktion sind bisher bekannt:

CDKN2A und, sehr selten, CDK4. Desweiteren wird ein Locus auf Chromosom 1p22 wird mit dem Melanom in Verbindung gebracht. (Bishop JA et al., 2000;2002) (Goldstein AM et al., 1995)

Einige erbliche Varianten des Melanocortin-1-Rezeptors führen zu einer verstärkten UV-Sensibilität und zu einem zwei- bis vierfach erhöhten Melanomrisiko. Die BRAF- und die NRAS- Gene scheinen nicht mit einem erblichen Melanomrisiko behaftet zu sein. (Lang et al., 2003) (Casula M et al., 2004)

Melanome sind immunogene Tumoren und verursachen daher eine vergleichsweise starke Reaktion des Immunsystems. Dies wird durch die starke entzündliche Reaktion im histologischen Bild, die häufigen Zeichen partieller Regression, die immer wieder beobachtete völlige Rückbildung des Primärtumors bei bestehender Metastasierung und schließlich den aggressiveren Verlauf bei Immundefizienz deutlich. Trotz dieser Abwehrreaktion hat das maligne Melanom durch die Ausbildung einer Reihe von Escape-Mechanismen, die Fähigkeit zur lokalen Invasion und Metastasierung. (Satyamoorthy K et al., 2002)

1.1.1.3 Stadieneinteilung und Prognose

Die Prognose des malignen Melanoms ist von zahlreichen Faktoren abhängig.

Prognosefaktoren des Malignen Melanoms
Vertikale Tumordicke nach Breslow am histologischen Präparat
Histologisch erkennbare Ulzeration
Invasionslevel nach Clark, v.a. die Unterscheidung zwischen Level II/III
Nachweis einer Mikrometastasierung in die regionalen Lymphknoten
Geschlecht (signifikant schlechtere Prognose für Männer)
Tumorlokalisation (ungünstige Prognose für oberen Stamm, Oberarme, Hals und behaarten Kopf)

Tabelle 2.1 Prognosefaktoren des Malignen Melanoms

Die Tumordicke kann nach Clark oder nach Breslow eingeteilt werden, wobei die international anerkannte Einteilung die nach Breslow ist.

Die aktuelle Einteilung nach der AJCC, die 2001 vorgeschlagen und seit April 2003 in Europa angewandt wird, teilt die Größenstufen des malignen Melanoms wie folgt ein.

≤1 mm (T1)	a) ohne Ulzeration, Level II-III b) mit Ulzeration oder Level IV oder V
1-2 mm (T2)	a) ohne Ulzeration b) mit Ulzeration
2-4 mm (T3)	a) ohne Ulzeration b) mit Ulzeration
>4 mm (T4)	a) ohne Ulzeration b) mit Ulzeration

Tabelle 2.2 TNM Klassifikation des Malignen Melanoms nach der AJCC

Das oben erwähnte Clark-Level, das in fünf Stufen unterteilt wird, gibt die Invasions-tiefe des Melanoms wieder und wird heutzutage nur noch für die Unterscheidung zwischen Level II und Level III innerhalb von T1 verwendet. (AJCC, 2002)

Das Melanom metastasiert in der Regel primär lymphogen, doch zu einem nicht unerheblichen Teil (ca. 10 %) auch primär hämatogen. Metastasen treten meist innerhalb von zwei Jahren nach der Entfernung des Primärtumors auf, doch wurden auch Latenzzeiten von weit über 20 Jahren beobachtet. Bevorzugte Organe der Metastasierung sind Haut, Lunge, ZNS und Skelett.

1.1.1.4 Therapie

Wegen der raschen Verschlechterung der Prognose im Laufe der Tumorprogression kommt der Prävention und Früherkennung beim malignen Melanom eine besondere Bedeutung zu. (Friedman RL et al., 1985) Die Daten machen außerdem deutlich, dass es ein zentrales therapeutisches Ziel die Verhinderung der lokalen Ausbreitung und Metastasierung eines Melanoms sein muss.

Bei einer durch Biospsie gesicherten Diagnose eines malignen Melanoms stellt die vollständige chirurgische Exzision mit histopathologischer Kontrolle der Schnittländer die Methode der Wahl dar. Der Sicherheitsabstand richtet sich dabei nach der Tumordicke bzw. der Eindringtiefe des Primärtumors:

In situ	0,5 cm
Bis 2mm	1 cm
>2 mm	2 cm

Tabelle 2.3 Empfehlungen für den Sicherheitsabstand bei chirurgischer Exzision des Malignes Melanom

Bei Melanomen in fazialer, akraler oder anogenitaler Lokalisation kann statt der Einhaltung des lateralen Sicherheitsabstandes die histologisch kontrollierte Chirurgie mit Sicherstellung der vollständigen Exzision aller Tumoranteile empfohlen werden.

Bei Tumoren mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko sollte eine SLND (Sentinel lymph node dissektion) durchgeführt werden (McMasters KM et al., 2001, Thompson JF et al., 1995), je nach Ergebnis kann eine prophylaktische Lymphadenektomie sinnvoll sein. Allerdings zeigten neuere prospektive Studien bei Anwendung dieser Methode lediglich eine Verlängerung der rezidivfreien Zeit und keinen Überlebensvorteil. Die durchschnittliche Überlebenszeit von Patienten mit einer metastasierten Krankheit, die auf die Haut, die Subkutis und die Lymphknoten beschränkt ist, liegt bei 12 Monaten, während die Patienten mit einer viszeralen Beteiligung oder mit einer erhöhten Konzentration von LDH im Serum eine mittlere Überlebensrate von 4-6 Monaten haben. Die Therapie hat hier im Allgemeinen palliativen Charakter.

Es gab in der Vergangenheit viele Versuche der adjuvanten Chemotherapie. (Hersey P et al., 2003) dennoch sprechen auch heute nur ca. 20 % der Patienten auf diese systemische Gabe von Chemotherapeutika an. Verwendete Präparate sind Single Agent Dacarbazine (DTIC) als Standard-Medikament, sowie Nitrosoureas (Fotemustine) bei Vorliegen von ZNS-Metastasen (Atkins BM et al. 1997, Houghton AN et al.,). Die stärker toxische Polychemotherapie verbessert dagegen die Überlebensrate nicht. (Eigentler TK et al., 2003)

Die alleinige Radiotherapie ist als Primärbehandlung beim malignen Melanom nur dann indiziert, wenn ein operativer Eingriff nicht möglich ist. Auch in der Behandlung der Lentigo-Maligna-Melanome kommt ihr eine Bedeutung zu.

Zusammenfassend ist die Therapie im metastasierten Stadium unbefriedigend, so dass der Entwicklung neuer Präparate oder Therapiekonzepte große Bedeutung zukommt. Vielversprechende Ansätze hierzu gibt es aus dem Bereich der Immuntherapie.

Für Interferon Alpha konnte vor allem bei Patienten mit resektablen Melanomen des Stadiums II, aber auch bei Patienten in N1-Stadium, in verschiedenen Studien eine Verlängerung der rezidivfreien Zeit und z.T. auch der Gesamtüberlebenszeit

beschrieben werden (Kirkwood JM et al., 1996, Grob JJ et al., 1998, Kirkwood JM et al., 1998 Pehamberger H et al., 1998). Auch kann beim metastasierten Melanom eine Hoch-Dosis IL-2-therapy angewendet werden, die allerdings eine hohe Toxizität aufweist und daher ausgewählten Patientengruppen vorbehalten bleibt (Dutcher JP et al., 1989, Parkinson DR et al., 1990)

Eine entscheidende Voraussetzung für die weitere Entwicklung von Konzepten ist es, die molekularen Mechanismen der Invasion und Metastasierung des malignen Melanoms verstehen zu lernen, um gezielt in diese Vorgänge eingreifen zu können.

1.1.2 Tumorinvasion und -metastasierung

Eine fundamentale Voraussetzung für die Metastasierung von Tumorzellen ist ihre Fähigkeit, sich aus dem Primärtumor zu lösen und verschiedene strukturelle und zelluläre Barrieren zu überwinden. Hierzu gehören die Basalmembran der dermoepidermalen Junctionszone, welche Epidermis und Dermis voneinander trennt und das interstitielle Bindegewebe der Dermis. Um Anschluss an das Blutgefäßsystem zu erhalten und so Tumorgewebe metastatisch absiedeln zu können muss die subendotheliale Basalmembran des Blutgefäßsystems durchbrochen werden. (Tryggvason K et al., 1987)

Während der Invasion und Metastasierung müssen die malignen Zellen diese natürlichen Barrieren degradieren. (Mignatti P et al., 1993) Dies wird durch die Abgabe von verschiedenen Proteasen durch den Tumor oder die Aktivierung anderer Zellen zur Proteasenausschüttung bewirkt. Hierbei spielen verschiedene Proteasen eine Rolle: Serinproteasen (Plasmin, uPA, tPA), ADAMs, Aspartatproteasen (Cathepsin D), lysosomale Cysteinproteasen (Cathepsin B,H,L) und verschiedene Matrix-Metalloproteasen. (Andreasen PA et al., 2000, Duffy MJ et al., 1996, Duffy MJ et al., 2003, Johansson M et al., 2000, Kos J und Lah TT, 1998, Rochefort H et al., 1999). Das quantitativ am häufigsten vertretene Protein an Basalmembranen ist das Kollagen Typ IV. Andere Komponenten sind Laminin, Proteoglykane, Entactin und Osteonectin.

Während dieser Prozesse ist ein kontrolliertes Zusammenspiel von Proteolyse der Bindegewebskomponenten und der Nutzung der Strukturproteine als Anheftungspunkte (Adhäsionsmoleküle wie z.B. Cadherine, Integrine) für die Migration der Tumorzellen notwendig. Außerdem spielt die Kontrolle der Proteasen durch Inhibitoren eine wichtige Rolle.

Um den nächsten Schritt von der Invasion zur Metastasierung zu vollziehen müssen die Tumorzellen die Basalmembran der Gefäße durchbrechen, um die Blut- und Lymphzirkulation zu erreichen. Eine selektive Anheftung von Tumorzellen an das Endothelium von bestimmten Organen und die Emigration von Tumorzellen vom Blut durch die Basalmembran in das umgebende Gewebe, durch Mediatoren bewirkt, sind essentiell für die Metastasierung in Lymphknoten oder periphere Organe. Diese Prozesse werden u.a. durch aufeinander abgestimmte Aktionen verschiedener Proteaseklassen ermöglicht (Goel A und Chauhan SS, 1997). So findet man erhöhte Konzentrationen verschiedener Proteasen v.a. an der Invasionsfront der Tumoren. In Lewis Lungentumoren konnte man die höchsten Konzentrationen von Plasminogen-Aktivator in den Gebieten invasiven Wachstums finden, während an Stellen, in denen kein Gewebeabbau stattfand auch keine Proteasenaktivität nachgewiesen werden konnte. (Skriver L et al., 1984)

Es gibt aber auch über die Katalysierung von Abbauprozessen hinaus andere Methoden mit denen Proteasen auf die Metastasierungsfähigkeit von Tumoren einwirken können, wie z.B. die Aktivierung von positiven Wachstumsfaktoren, die Anregung der Zellmigration, die Stimulation der Angiogenese, etc.

(Lyons RM et al., 1988, Gilbert CC et al., 1983, Honn KV et al., 1982, Sylven B et al., 1968, Gross JL et al., 1983)

Nur wenige selektive Tumorzellen üben alle Schritte erfolgreich aus und formen Metastasen. Durch den Selektionsvorteil gegenüber den anderen Zellen vermehren sie sich dann aber sehr schnell und führen schließlich häufig zum Tod des Patienten.

Der Abbau von Extrazellulärer Matrix (ECM) durch Proteasen ist kein obligat pathologischer Prozess; eine große Anzahl von Proteasen ist am physiologischen Umbauprozess des Bindegewebes, wie z.B. Embryonalentwicklung und Wundheilung beteiligt. Im Unterschied zum tumorösen Wachstum wird der Bindegewebsabbau aber kontrolliert, während bei der Tumorausbreitung diese physiologischen Kontrollmechanismen weitgehend ausgeschaltet sind.

Obwohl es eine fundamentale Charakteristik von Tumorzellen darstellt, dass die Regulation und im Besonderen die Proliferation unabhängig vom Einfluss der Umwelt verlaufen, gibt es doch vielfältige Interaktionen zwischen Tumorzellen und umgebendem Gewebe, die einen großen Einfluss auf die Tumorentwicklung haben.

Tumorzellen können das umgebende Gewebe modifizieren und den Metabolismus von Fibroblasten erhöhen, so dass diese ein Stroma produzieren, die an die Bedürfnisse der Tumorzellen angepasst ist und nicht mehr an die normale Zusammensetzung der Dermis.

Die Interaktion mit dem umgebenden Gewebe geschieht durch die Abgabe von löslichen Faktoren oder durch Zell-Zell, bzw. Zell-Matrix-Kontakte.

Auf der Oberfläche von Bindegewebszellen befinden sich Rezeptor-Moleküle, welche Zell-Zell- und die Zell-Matrix-Interaktionen vermitteln. Zu diesem gehören sowohl die Cadherine, die die Interaktion von benachbarten Zellen steuern (Yap AS et al., 1997), als auch die Integrine, die für die Bindung der Zellen an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix verantwortlich sind (Hynes RU et al., 1992). Cadherine sind Calcium-abhängige Rezeptor-Moleküle, die in verschiedenen Zelltypen exprimiert werden. In Melanomzellen ist die Expression von Cadherinen verändert. Gleichzeitig mit einer Verringerung von E-Cadherin, welches die Adhäsion zwischen Keratinozyten und Melanozyten vermittelt (Tang et al., 1994), wird die Expression von N-Cadherin hochreguliert, welches die Assoziation von Stromalen Fibroblasten und Endothelzellen mit den Melanozyten fördert. So ergibt sich für die Melanozyten eine erhöhte Mobilität und damit Invasivität.

Auch Integrine spielen eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Invasivität und Metastasierungsfähigkeit beim Malignen Melanom. Neben ihrer Fähigkeit die spezifische Bindung zwischen Zellen zu Komponenten der EZM zu verbessern, vermitteln Integrine auch Signale aus dem extrazellulären Raum in den intrazellulären und regulieren auf diese Weise die Expression verschiedener Gene, z. B. von Matrix-Abbauenden Enzymen. Außerdem sind sie in die Organisation des umgebenden Gewebes involviert und ermöglichen die Zellmigration (Van der Flier A und Sonnenberg A, 2001). Beim malignen Melanom ist die Expression bestimmter Integrine, z.B. $\alpha V\beta III$, in der vertikalen Wachstumsphase des Tumors deutlich erhöht (Felding-Habermann B et al., 1992).

Auf den beschriebenen Zell-Matrix-Interaktion beruhen veränderte Expressionsmuster von Bestandteilen der Extrazellulären Matrix, die an der Regulation von Matrix-degradierenden Proteasen beteiligt zu sein scheinen. So konnten Zigrino P et al (2001) in 3D Kollagen Typ 1 Matrices die Regulation der MT1-MMP-Expression durch aktivierte $\alpha 2\beta 1$ Integrinrezeptoren demonstrieren. Koblinski JE et al (2002) konnten nach

Kultivierung humaner Fibroblasten auf nativem Kollagen Typ I zeigen, dass die Integrine $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ die Sekretion von Procathepsin B induzieren.

1.1.3 Proteasen

Eine Protease kann definiert werden als Enzym, das Peptidbindungen hydrolysiert.

Proteasen spalten Proteine, die Ihre Funktion erfüllt haben, bzw. Nahrungsproteine durch eine Hydrolysereaktion (Addition eines Wassermoleküls an eine Peptidbindung). Diese Reaktion würde ohne einen Katalysator sehr langsam verlaufen. Peptidbindungen haben den Charakter von partiellen Doppelbindungen durch eine Resonanzstruktur, die eine planare Form der Peptidbindung verursacht. Dies wird durch den Doppelbindungscharakter zwischen Kohlenstoff-/ Stickstoffatom verstärkt. Ein Enzym, das die Spaltung einer Peptidbindung bewirken soll, muss einen nukleophilen Angriff auf eine nichtreaktive Carbonylgruppe ermöglichen. Bei allen Enzymklassen gibt es im aktiven Zentrum Merkmale, welche die Aktivität von Wasser oder einer anderen nukleophilen Gruppe sowie die Polarisierung der Peptidcarbonylgruppe und die anschließende Stabilisierung eines tetraedischen Zwischenproduktes ermöglichen. Die Proteasen werden nach ihrem katalytischen Mechanismus in vier Klassen unterschieden.

Der Begriff der Katalytischen Triade lässt sich besonders gut am Beispiel des Chymotrypsins erklären: es handelt sich um eine Anordnung von Aminosäureresten, die zur Verstärkung der Aktivität von Serin 195, welches im Zentrum gelagert ist, führt. Zwei weitere Beispiele für Enzyme dieser Gruppe sind das Trypsin und die Gerinnungsenzyme. Sie alle gehören zu der Gruppe der **Serinproteasen**.

Eine weitere Gruppe sind die **Cysteinproteasen**. Sie wirken ähnlich wie Chymotrypsin, aber ein Cysteinrest, der von einem Histidinrest aktiviert wird übernimmt die Funktion des nukleophilen Zentrums, welches dann die Peptidbindung angreift. Diese Gruppe wird auch Papain-Gruppe genannt, da ein ähnliches Protein zuerst aus der Papaya-Frucht gewonnen wurde; zu dieser Gruppe gehören auch die Cathepsine. (Chapman HA et al., 1997). Noch zu erwähnen ist die Gruppe der Caspasen, die bei der Apoptose eine tragende Rolle spielen; sie haben zwar eine andere Gesamtstruktur, aber ein ähnliches Zentrum wie die Cathepsine.

Eine weitere Gruppe stellen die **Aspartatproteasen** dar, deren aktives Zentrum aus einem Paar von Asparaginsäureresten besteht, die es jeweils einem Wassermolekül

ermöglichen, die Peptidbindung anzugreifen. Zu dieser Gruppe gehören z.B. Renin, Pepsin, Cathepsin D.

Als letzte Gruppe sind die **Matrix-Metalloproteasen (MMPs)** zu nennen, deren aktives Zentrum ein gebundenes Metallion enthält, fast immer ein Zinkion, das seinerseits ein Wassermolekül aktiviert (nukleophile Gruppe). Zu dieser Gruppe zählen das Thermolysin (bakteriell), die Carboxypeptidase A (Verdauung) und als größte Gruppe die Matrix-Metalloproteasen.

Proteasen werden in Exopeptidasen und Endopeptidasen eingeteilt. Während Erstere die Aminosäurereste vom Ende her abspalten und daher weiter in Carboxy- und Amino-peptidasen unterteilt werden können, spalten Endopeptidasen innerhalb der Aminosäureketten und sind oft sehr spezifisch.

Außerdem können Proteasen in intrazelluläre (z.B. Cathepsine) und in extrazelluläre (z.B. MMPs) eingeteilt werden. Cathepsine befinden sich meist in sekundären Lysosomen, d.h. in Lysosomen, die mit dem Abbaumaterial verschmolzen sind.

1.1.4 Cathepsin B

Cathepsin B ist der Hauptrepräsentant der Cysteinproteinasen und ist in Lysosomen aller Zellen von Säugetieren enthalten. Cathepsin B hat eine weite Substratspezifität sowohl bei saurem, als auch bei neutralen pH. Es fungiert als Endo- und als Exopeptidase und kann in Kaskaden andere Proteasen aktivieren.

Cathepsin B unterliegt einer komplexen Regulation, die nicht zuletzt auch die Bildung und den Transport dieses Enzyms mit einschließt.

Das humane Cath B wird von einem single-copy Gen kodiert und ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 8 in einer Region, die als 8p22 bekannt ist, lokalisiert. Von diesem Gen werden zwei Haupt- mRNA's mit identischen Kodierungsregionen von 4.0 und 2.3 Kb Größe abgelesen. (Fong D; 1992)

Auf der Oberfläche des RER wird das Präproenzym produziert und in das RER transportiert. Hier wird die Präsequenz abgeschnitten wodurch Procathepsin B (46 KDa), als inaktives Proenzym, entsteht. Dieses wird an einer oder mehreren Glykosilierungsstellen glykosiliert und zum Golgi-Apparat transportiert. Hier werden die Carbohydrate modifiziert, so dass Procathepsin B nun Phosphomannosyl-Reste enthält. Diese Reste wiederum können an den Mannose-6-Phosphat- Rezeptor binden, der den Transport zu den Endosomen, die dann zu Lysosomen werden, übernimmt.

Der Mannose-6-phosphat-Rezeptor gibt seine Ladung angeregt durch eine Ansäuerung der Endosomen (pH 5.0) ab und kehrt zum Golgi-Komplex zurück. Im endosomalen/lysosomalen Bereich wird Cathepsin B zu einem aktiven Einzelstrangenzym mit 31 kDa oder zu einem aktiven Doppelstrangenzym mit 25/26 +5 kDa prozessiert. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Mechanismen wird vermutet, dass ein lysosomaler Proenzym-Rezeptor existiert, der am Transport von Cath B teilnimmt. Bisher konnte nur nachgewiesen werden, dass dieser Rezeptor auch Cath D und Cathepsin L bindet. Für Cathepsin B liegen diesbezüglich noch keine Daten vor. (Yan S et al., 2003)

Die Hauptaufgabe von Cath B in den Lysosomen in vivo ist der Abbau von Proteinen, die entweder von der Zelle aufgenommen wurden, oder aus anderen Bereichen der Zelle stammen. In gesunden Zellen werden nur ca. 5 % aller lysosomalen Enzyme sekretiert.

Für viele Proteasen ist die Aktivität durch die Balance zwischen der Menge von aktivem Enzym und der Menge der aktiven Inhibitoren geregelt. Eine Dysregulation bedeutet daher meist entweder eine Überproduktion oder ein Defizit von Proteasen gegenüber den Inhibitoren.

Bei Cysteinproteasen ist die Regulation etwas komplizierter organisiert. Verschiedene Faktoren wirken zusätzlich auf die Regulation ein. (Almeida PC et al., 2001)

1. pH-Wert: Die meisten Cysteinproteasen sind instabil und schwach bei neutralem pH und entfalten aus diesem Grund Ihre optimale Funktion im sauren Milieu von Lysosomen. Dies gilt jedoch vor allem für die Cathepsine L,H,D,V,F, während Cathepsin B bei einem pH-Wert von 4,5-5,5 die hauptsächliche Carboxypeptidaseaktivität, bei pH 7-7,4 jedoch eine zusätzliche Endopeptidaseaktivität zeigt (Khoury HE et al., 1991).

2. Redox-Potential: Die aktive Seite des Cysteins wird leicht oxidiert, weshalb diese Enzyme vor allem in reduzierender Umgebung aktiv sind. Um eine solche Umgebung zu schaffen, akkumulieren Endosomen Cystein. (Pisoni RL et al., 1990)

3. Synthese als inaktive Vorläuferformen: Die Enzyme werden als Präproenzyme synthetisiert und benötigen proteolytische Aktivierung. Diese Aktivierung benötigt generell einen sauren pH-Wert, oder die Aktivierung durch andere Enzyme. Dies verhindert normalerweise eine ungesteuerte Aktivierung nach versehentlicher Sekretion.

4. Transport von Enzymen zu Endosomen und Lysosomen: Alle bekannten Enzyme besitzen N-Glykolisierungsbereiche, die später mannosyliert und zur Basis der Phosphomannosyl-Reste dirigiert werden, welche die Bindung an Mannose-6-phosphat-Rezeptoren triggern.

5. Die Anwesenheit von Cystein-Protease-Inhibitoren: Proteaseinhibitoren scheinen v. a. aktive Enzyme zu inhibieren, die die oben genannten Regulationsmechanismen umgangen haben. Aus diesem Grund sind das Zytoplasma und der extrazelluläre Raum mit einer hohen Menge an Inhibitoren ausgestattet. Am weitesten verbreitet ist die Familie der Cystatine. Es existiert ein intrazellulärer Typ (Typ1; Cystatin A und B), der auch Stefins genannt wird und der sekretierte extrazelluläre Inhibitor (Typ2, Cystatin C). Außerdem existieren die im Blut zirkulierenden Kininogene (Typ 3).

Inzwischen wurden zwei neue Cystein-Protease-Inhibitoren entdeckt, die die Ähnlichkeit zwischen Serin- und Cystein-Proteasen betonen. Zwei neue Mitglieder der Serpin-Familie (die sonst als Serin-Protease-Inhibitoren gelten) scheinen inhibitorische Aktivität auf Cystein-Proteasen zu haben.

Verschiedene Gruppen vermuten, dass Änderungen in der Expression von Cystatinen auf mRNA und Protein-Level mit der Malignität von verschiedenen Tumoren korrelieren. (Bjornland K et al., 1996, Boike G et al., 1991)

Cathepsin B baut demnach physiologischerweise Proteine im sauren Milieu des lysosomalen Systems ab. Von den Zellen sekretiert werden v.a. Proenzyme und „truncated forms“, die im Gegensatz zum fertigen Enzym bei neutralem pH stabil sind. Mehrere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die Rolle des Cathepsin B nicht auf den lysosomalen Abbau von Proteinen beschränkt ist. Außerdem scheint dieses Enzym eine Rolle in verschiedenen Krankheiten (Rheumatoide Arthritis und Paradontitis, Osteoarthritis) sowie in der Tumorprogression und -Metastasierung zu spielen. (Teinheckel T et al.,2001)

Mehr und mehr wird deutlich, dass es sich bei Cathepsinen um multifunktionale Enzyme handelt, die auch eine Rolle in Antigen -Processing and -Präsentation spielen, die membrangebundene Proteine spalten, und die v. a. auch extrazelluläre Matrix abbauen und dabei an der Formung und Anpassung von Geweben mitwirken. (Cahng SJ et al.,1986), (Mary E et al., 1999)

1.1.4.1 Cathepsin B und seine Veränderungen in malignen Tumoren

Unter normalen Bedingungen ist Cathepsin B wie oben schon beschrieben in den Lysosomen der Zellen lokalisiert, in denen es als „Housekeeping Enzym“ arbeitet. Unter physiologischen Bedingungen wird nur eine kleine Fraktion des Enzyms (5-10%) sezerniert. In Tumorzellen hingegen konnte eine weit darüber hinaus gehende Sekretion beobachtet werden. Entgegen der früheren Annahme, Lysosomen seien nur „dead-end“-Organellen, werden sie inzwischen vielmehr als Bestandteil dynamischer Prozesse gesehen, die es unter bestimmten Bedingungen erlauben, mit der Plasmamembran zu fusionieren (Andrews 2000).

An folgenden Tumoren konnte bisher eine generelle Erhöhung und/oder veränderte Lokalisation von Cathepsin B nachgewiesen werden: Blasen-Ca., Mamma-Ca., Prostata-Ca., Magen-Ca., Lunge-Ca., Chondrosarkom, Gliom, Melanom, Kolon-Ca. Diese Erhöhung korreliert mit der Malignität von Tumoren. (Krueger S et al., 2005, Kawamura K et al., 2004, Maciewicz EA et al., 1989, Redwood SM et al., 1991, Remple SA et al., 1994, Silverparvarthi M et al., 1995, Shuja S et al., 1991, Sheahan K et al., 1981, Cao L et al., 1994). Dies könnte auf eine (teilweise) Ausschaltung der oben besprochenen Regulationsmechanismen rückschließen lassen und deutet auf die Bedeutung des Cathepsin B bei der Tumorausbreitung hin.

Inzwischen konnte man in malignen Tumoren Veränderungen auf allen Stufen der Produktion und des Transports von Cathepsin B beobachten (Rozhin et al., 1994, Sloane B.F. et al 1986)

So wurde in verschiedenen Studien bereits eine Erhöhung der mRNA von Cathepsin B in malignen Tumoren beobachtet. Auch Veränderungen wie eine Erweiterung des Gens (Gene Amplifikation) und Abweichungen beim Vorgang des Splicings konnten aufgezeigt werden. Man fand eine vermehrte Ausschüttung von Procathepsin B sowie eine Verlagerung von den Cathepsin enthaltenden Vesikeln in die Peripherie der Zellen und eine Ausschüttung von reifem Cathepsin B in die Umgebung der Zellen.

Auf die einzelnen Punkte dieser Veränderungen soll in der Diskussion dieser Arbeit näher eingegangen werden.

Eine erhöhte Sekretion und Membranassoziation von Cath.B könnte die extrazelluläre Proteolyse durch folgende Mechanismen vereinfachen:

1. direkten Abbau von extrazellulären Matrixproteinen und

2. durch die Aktivierung anderer Proteasen und hierdurch die Initiierung von proteolytischen Kaskaden. (Cavallo-Medved D et al., 2003, Hewitt R et al., 1996)

1.1.5 Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) stellen eine calcium-abhängige Protein-Familie dar, die verantwortlich für den Abbau der extrazellulären Matrix ist. Die Familie der humanen MMPs erstreckt sich auf 16 Mitglieder, die durch strukturelle Charakteristika und durch ihre Substratspezifitäten in vier Subgruppen unterteilt werden können. Die Kollagenasen, die Gelatinasen und die Stromelysine sind Enzyme, die sezerniert werden; wohingegen die Membrantypen durch eine transmembranöse Domäne an der Plasmamembran verankert sind.

Seit ihrer Erstbeschreibung 1962 durch Fross und Lapière werden Matrix Metalloproteinasen als Enzyme mit einer Schlüsselrolle bei der Homöostase der ECM gesehen. In den letzten Jahren wurde aber auch vermehrt ihre Rolle bei der Regulation von Tumoren, Entzündungen und Wachstumsprozessen deutlich.

Die MMP's sind für den Abbau der einzelnen Kollagene spezifisch, und werden auf Grund dieser Spezifitäten eingeteilt: so spalten z. B die Kollagenasen, die die Faserkollagene (Typ I, II, III) abbauen (MMP1 und 8) das Typ IV Kollagen nicht, welches nur von MMP2 und 9 hydrolysiert wird. Stromelysine (MMP-3, 7 und 10) bauen Proteoglykane, Laminin oder Fibronectin ab. Metalloproteinasen spalten das Kollagen-Molekül an Gly/Leu- oder Gly/Ile-Bindungen in zwei Fragmente. Die Triple-Helix der entstehenden Fragmente zeigt eine erniedrigte Schmelztemperatur (29-32°C), so dass sie bei Körpertemperatur wahrscheinlich in die einzelnen Peptidketten zerfällt, die von Kollagenasen und anderen proteolytischen Enzymen weiter abgebaut werden können.

Die MMPs werden von Fibroblasten, Endothelzellen und anderen Zellen gebildet, als inaktive Proenzyme in den Extrazellularraum sezerniert und durch Abspaltung des Propeptids aktiviert. Ein Zinkion im aktiven Zentrum der Protease ist notwendig für die katalytische Aktivität des Enzyms. Bei der Aktivierung der MMPs, wird dieses aktive Zentrum freigelegt. (Murphy G et al., 1999)

Da die MMPs als inaktive Proenzyme sezerniert werden, ist die selektive Aktivierung ein sehr wichtiger Regulationsmechanismus. Die Konversion zu den 62- und 9 kDa aktiven Formen erfolgt durch die uPA/uPAR/Plasminogen-Kaskade und durch die Aktivierung durch membrangebundene MMPs (MT-MMPs).

Zusätzlich zur Regulation durch selektive Aktivierung und Steuerung der Expression des Enzyms werden die Matrix-Metalloproteinasen durch spezifische Inhibitoren, die als TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) bezeichnet werden, gehemmt. Dies geschieht, indem sie an das aktive Zentrum der MMPs binden. Normalerweise existiert ein feinreguliertes Gleichgewicht zwischen den MMPs und den TIMPs. Störungen dieses Gleichgewichtes führen zu einem vermehrten Kollagenabbau. Bisher konnten vier verschiedene TIMPs-Typen identifiziert werden.

Aufgrund ihrer Fähigkeit Typ IV Kollagen, eine Hauptkomponente von Basalmembranen zu spalten, wird den Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 eine wichtige Rolle bei der Tumormetastasierung zugeschrieben. Am Beispiel des malignen Melanoms konnte durch Immunhistochemie gezeigt werden, dass MMP-9 v.a. während der horizontalen Wachstumsphase exprimiert wird, während dieses Enzym kaum in dicken Tumoren oder Metastasen entdeckt wurde. Im Gegensatz dazu wurde MMP-2 v.a. in Tumoren mit einer stärkeren Dicke entdeckt, was auf eine Beteiligung an der Metastasierung schließen lassen könnte.

1.1.6 In Situ Zymographie

Die In Situ Zymographie wurde vor einigen Jahrzehnten eingeführt um die Aktivität von MMP's zu lokalisieren. (Pirilä E et al., 2001) Im Gegensatz zur Immunhistochemie, die sämtliche in einem Gewebe vorhandenen Enzyme nachweist, kann mit dieser Methode der funktionelle Status der Enzyme unabhängig von der Hemmung durch spezifische Inhibitoren und von Vorstufen der Enzyme aufgezeigt werden. Die Methode basiert auf einer Zymographie; es werden SDS-Polyacrylamidgele verwendet, die entweder Gelatine, Casein oder Fibrin als Substrat beinhalten. (Frederiks W et al., 2004)

Galis et al. (1995) verwendeten Gelatine, die Fluoreszin oder eine autoradiographische Emulsion enthielt als „substrate layer“ auf kryostatischen Schnitten.

Das Prinzip, das Galis et al. etabliert hatten wurde modifiziert um den Abbau der Gelatine auf anderen Wegen darzustellen. Statt fluoreszierende Gelatine zu verwenden, benutzen einige Autoren reine Gelatine, die dann z. B. mit amido black (Ikeda M et al., 2000) gefärbt wurde. Ein weiterer Ansatz der auf der Zymographie basiert und der auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, wurde von Kurschat et al. 2002 eingeführt. Diese Arbeitsgruppe inkorporierte Gelatine in Polyacrylamidgele von 50 Mikrometer Dicke, die mit unfixierten kryostatischen Schnitten in Kontakt gebracht

wurden. Nach einer Inkubation wurden die Schnitte von den Gelen abgewaschen und die Gele mit Coomassie-Blau angefärbt. Alle diese Ansätze haben die Tatsache gemeinsam, dass eine Abnahme in der Färbungsintensität eine Reflektion der Gelatinase-Aktivität darstellt.

Dieser Ansatz beinhaltet zwei Nachteile. Zum einen ist die Sensitivität der verminderten Anfärbbarkeit geringer als die der immunhistologischen Färbung und zweitens ist noch nicht eindeutig nachgewiesen, ob und wie diese Methode quantitative Ergebnisse liefern kann. (Mungall and Pollit 2001). Aus diesen Gründen wird versucht weitere Verfahren zu entwickeln, in denen ein gefärbtes oder fluoreszierendes Produkt auf der Seite der Gelatinase-Aktivität gebildet wird.

1.2 Fragestellung

In der Tumordinvasion und Metastasierung spielen Zell-Matrix-Interaktion eine wichtige Rolle. Proteasen und ihre Inhibitoren werden über diese Prozesse gesteuert und nehmen so ihre Rolle im Prozess der Tumorentwicklung ein. Cathepsin B als lysosomale Cysteinprotease wird in malignen Zellen neben einer vermehrten Expression und intrazellulären Aktivität vermehrt auch außerhalb der Lysosomen und an der Zelloberfläche gefunden. Hieraus entwickelt sich die Fragestellung an welchen Stellen des Tumors sich die vermehrte extrazelluläre Aktivität findet und ob diese mit der Malignität der jeweiligen Tumorzelllinie korreliert. Wir untersuchten diese Fragestellungen am Beispiel des malignen Melanoms.

Für Metalloproteinasen wurden bereits vielfach Erhöhungen in malignen Tumoren nachgewiesen, weshalb sie im Folgenden als Vergleichsgruppe verwendet wurden.

Eine weitere sich daraus ableitende Frage ist der Zusammenhang der Aktivierungsprofile von Cathepsin B und den Metalloproteinasen. Auch das Gleichgewicht von Inhibitoren und aktivem Enzym scheint hierbei eine wichtige Rolle zu spielen.

Um diese Fragestellungen zu beantworten, etablierten wir zwei Versuchsanordnungen. Zunächst führten wir die Versuche an humanen Präparaten der Tumorbank der dermatologischen Klinik der Universität zu Köln durch und anschließend an gut charakterisierten Zelllinien im Mausmodell.

Innerhalb dieser beiden Versuchsanordnungen führten wir zunächst immunhistochemische Untersuchungen durch, um die Konzentrationen von Cathepsin B innerhalb der Präparate in Beziehung zur Invasivität der jeweiligen Tumoren semiquantitativ zu bestimmen.

Um das Verhältnis zwischen Cathepsin B und seinen spezifischen Inhibitoren zu beurteilen, wurde anschließend die Methode der *in situ* Zymographie angewendet um aktives nicht inhibiertes Enzym nachzuweisen und im Gewebe zu lokalisieren.

Um die Aktivitätsprofile der Cathepsine und der Metalloproteinasen in einen Zusammenhang zu bringen, wurden die *In situ* Zymographien auch an dieser Enzymgruppe durchgeführt.

Desweiteren wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt und Tumor RNA direkt im Tumor und den Metastasen zu detektieren.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1. Gewebe

Es wurden Proben aus Paraffinmaterial von 25 humanen Melanomen und Pigmentnävi aus der Tumorbank der Abteilung für Dermatologie der Universitätsklinik zu Köln verwendet. Diese wurden freundlicherweise von Prof. Dr. C. Mauch zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um 3 Nävuszellnävi sowie um 22 weitere Tumoren, bei denen es sich um NMM's und SSM's handelte. Nähere Informationen zu den Tumoren können der Tabelle entnommen werden.

Nummer	Tumortyp	Tumordicke	m / w	Exzision	Alter bei Ent.	klin. Stadium
56	SSM	0,96 mm	M	Nov 94	58 J	Tod
163	NNM	6,566 mm	W	Jun 98	56 J	Tod
679	SSM	3,05 mm	M	Jun 02	78 J	Tod
652	SSM		M	Feb 02	69 J	Tod
695 (4)	Melanom	36,1 cm	M	Aug 02	62 J	Tod
666	SSM	7,92 mm	W			III b
43	Melanom	0,68 cm	M	Aug 94	30 J	I a
635	SSM	0,703 mm	M	Dez 01	68 J	Ia
627	SSM	0,67 mm	M	Oct 01	45 J	Ia
639	SSM	0,24 mm	M	Jan 02	68 J	Ia
693	SSM	1,75 mm	W	Aug 02	73 J	Ib
694	NNM	1,8 mm	W	Aug 02	57 J	Ib
700	SSM	1,37 mm	W	Sep 02	24 J	Ib

692	SSM	1,05 mm	W	Aug 02	72 J	Ib
702	Melanom	1,9 mm	M	Sep 02	46 J	IIa
687	SSM	1.06 mm	W	Jul 02	74 J	IIa
320	NNM	2,25 mm	W	Nov 99	78 J	IIa
689	SSM	2,84 mm	M	Jul 02	61 J	IIa
207	SSM	4,80 mm	W	Aug 98	62 J	IIb
681	SSM	3,51 mm	M	Jun 02	46 J	IIb
674	Melanom	4,6 mm	W	Mai 02	49 J	IIb
214	Melanom	6,08 mm	M	Jan 99	69 J	IIb
647	NZN		M	Feb 02	26 J	NZN
671	NZN		M	Apr 02	63 J	NZN
657	NZN		W	Feb 02	22 J	NZN

Tabelle 3.1 Kollektiv der verwendeten Melnaom- und Nävi-Proben mit Angabe von Tumorart und -stadium

Desweiteren wurden Tumorproben sowie Proben von Tumormetastasen von 17 Skid-Mäusen verwendet, denen zuvor Tumorzellen der Zelllinien Skmel 28, BLM, MV3, B16-F1 injiziert worden waren.

3.1.2. Zellkulturmaterialien

Für die Zellkultur wurde RPMI-Medium 1640 und fötales Kälberserum der Firma PAA Laboratories GmbH (Paschig, Österreich) verwendet. Das RPMI-Medium enthielt Zusätze von nichtessentiellen Aminosäuren (Firma Biochrom AG (Berlin)) und 10% FCS.

Weitere allgemeine Zellkulturmaterialien wurden über die Firma Greiner (Solingen) bezogen.

3.1.3. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien stammten von folgenden Firmen: SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH (Taufkirchen), Merck Biosciences Ltd. (Schwalbach),

Amersham Biosciences (Braunschweig), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), peA-Lab Biotechnologie GmbH (Erlangen).

3.1.4. Kits und weitere Materialien

DAKO® Faramount

Aqueous Monting Medium DAKO, Hamburg

Tissue-Tek ® O.C.T.™ Sakura, Zoeterwoude, The Netherlands

3.1.5. Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Lösungen und Puffer in bidestilliertem Wasser angesetzt und, wenn möglich, autoklaviert.

10x SDS-Laufpuffer	250mM Tris, 2,5M Glycin, 1% (w/v)SDS; pH 8,3
10x APS-Puffer	0,1 g APS in 1 ml aqua dest
Coomassie R-250 Färbelösung (für in situ Zymogramme)	0,1% (w/v) Coomassie Blue R-250
Entfärbelösung (für in situ Zymogramme)	20% (v/v) MeOH, 10% (v/v) Essigsäure
PBS	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,4mM Na ₂ HPO ₄ 1,4mM KH ₂ HPO ₄ ; pH7,4
TAE	40mM Tris, 2mM EDTA; pH 8,0
TBS	20mM Tris, 137mM NaCl,, pH 7,6
Trypsin/EDTA 0,1% (w/v)	

Mart-1

5'-ATGCCAAGAGAAGATGCTCAG-3'

5'-AGCATGTCTCAGGTGGTGTCTCG-3'

Firma: Thermoscientific

Tyrosinase

5'-GGGCTCTGAAATATGGAGGG-3'

5'-ATGGGATCGTTGGCCGATCC-3'.

Firma: Thermoscientific

Mouse S26

Zigrino P et al., 2009

Firma: Thermoscientific

Human S26

Löffek S et al., 2006

Firma: Thermoscientific

3.2. Methoden

3.2.1. zellbiologische Methoden

Verwendet wurden wie oben bereits beschrieben Zellen der Zellreihen MV3 (hochinvasive humane Zelllinie), Skmel28 (intermediär bzw. niedrig invasive humane Zelllinie), BLM (hochinvasive humane Zelllinie), B16F1 (niedriginvasive murine Zelllinie). Die Zellen wurden bei 37°C und 5%CO² in einer H₂O gesättigten Atmosphäre als Monolayer Kulturen in Plastikpetrischalen kultiviert. Die Zellviabilität wurde mit einer 0,2 % (w/v) Trypan Blau Lösung (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen) nach der Trypan Blau Ausschluss Methode bestimmt.

Die BLM-Zellen wurden alle sieben Tage, ab Passage 64, in der sie von mir übernommen worden waren, passagiert. Hierzu wurde die Zellen mittels Trypsinisierung bei 37°C abgelöst und zweimalig mit PBS gewaschen. Die Reaktionszeit wurde jeweils durch Zugabe von 15 ml RPMI Medium gestoppt. Durch Pipettieren wurden die Zellen vorsichtig separiert. Anschließend wurden je 2 ml dieser Mischung auf eine 15er Platte mit 20 ml Medium gegeben.

Die MV3 und B16F1-Zellen wurden alle 3 Tage passagiert. Dies geschah nach demselben Mechanismus wie bei den BLM-Zellen, mit dem Unterschied, dass am Ende 3 ml der Zellsuspension in 20 ml Medium gegeben wurden. Auch die Skmel 28 –Zellen wurden alle drei Tage passagiert, allerdings wurden hier 4 ½ ml der Zellsuspension in 20 ml Medium gegeben.

3.2.1.1 Injektion der Zellen in die Mäuse

Die so kultivierten Tumor-Zellen wurden schließlich in 18 weibliche Skid-Nacktmäuse injiziert. Diese Mäuse wiesen einen Gendefekt für B- und T-Lymphozyten auf und mussten deshalb unter sterilen Bedingungen gehalten werden. Auch die Injektion fand unter sterilen Bedingungen statt. Für die Injektion wurden je 200 µl Zellsuspension mit 10⁶ Zellen zur subkutanen Injektion vorbereitet.

Gesamtzahl der vorhandenen Zellen zum Zeitpunkt der Injektion:

BLM:	62.000000
Skmel 28:	10.500000
MV3:	47.200000
B16/F1:	42.300000

Dies bedeutete, dass von den BLM-Zellen 12,40 ml; von den Skmel 28-Zellen 2,1 ml, von den MV3-zellen 9,44 ml und von den B16/F1 Zellen 8,46 ml verwendet wurden.

Die Mäuse wurden den Zelllinien folgendermaßen zugeteilt:

B16/F1	3 Tiere
SkMel28	5 Tiere
BLM	7 Tiere
MV3	2 Tiere

Kontrollmaus 1 Tier (keine Injektion)

Ein Versuchstier, dem die Zelllinie Skmel 28 injiziert worden war verstarb einen Tag nach Beginn des Versuches und wurde im weiteren nicht in den Versuch eingeschlossen.

14 Tage und 20 Tage nach der Injektion wurden jeweils Photos von den Tieren und dem Fortschreiten der Tumore gemacht.

20 Tage post injectionem (p.i.) wurden aufgrund der TumorgroÙe die B16/F1 Tiere und zwei BLM-Tiere getötet .

27 Tage p.i. wurden die übrigen BLM- und die MV3-Versuchstiere getötet.

30 Tage p.i. wurden das Skmel 28- und das Kontrolltier getötet.

Die entnommenen Primär-Tumoren und Organe der Mäuse wurden im weiteren Verlauf mit den Methoden der In situ Zymographie der Immunohistochemie und der Polymerase-Kettenreaktion aufbereitet.

Nach der Tötung der Mäuse wurden jeweils der Primärtumor mit umgebendem Gewebe sowie verschiedene Organe entnommen. Die Lymphknoten und der Thymus konnten aus technischen Gründen nur entnommen werden, wenn sie vergrößert waren.

Die Besonderheiten der Organe der einzelnen Mäuse sind hier aufgelistet:

BLM3: vergrößerte Milz

BLM4: ipsilaterale Niere und Milz vergrößert

BLM5: inguinale Lymphknoten direkt am Tumor und axilläre Lymphknoten ipsilateral vergrößert

BLM6: Milz vergrößert; ipsilateral vergrößerte und schwarz verfärbte Lunge

BLM7: Tumor zentral nekrotisch eingeschmolzen; Milz vergrößert; ipsilaterale Lunge knotig verändert

MV3 1:Zwei Tumoren vorhanden (Rücken/Flanke), Probe am Rücken entnommen; vergrößerte Milz; ipsilaterale Lungenmetastasen; vergrößerte Lymphknoten (ipsil.,ing, med., ipsil.axillär)

MV3 2. Großknotiger Primärtumor, Milz vergrößert; ips. Niere vergrößert

3.2.2. Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 In situ Zymographie

Mit dieser Methode kann die Gelatinaseaktivität eines Enzyms sichtbar gemacht werden. Sie wurde in dieser Arbeit mit einigen Modifikationen nach der von Kurschat et al. (2002) beschriebenen Methode durchgeführt. Präparatschnitte werden auf Polyacrylamidgele mit Gelatinezusatz aufgetragen und nach einer definierten Inkubationszeit kann die Gelatinase-Aktivität des Enzyms durch Anfärbung der Gele nachgewiesen werden. Die angedauten Stellen nehmen im Gegensatz zum restlichen Schnitt die Farbe nicht auf und erschienen daher weiß. Im Vergleich mit vorher angefertigten HeFärbungen der Präparatschnitte kann dann eine Aussage über die Lokalisation sowie die Intensität der Gelatinolyse getroffen werden.

Die In situ Zymographie wurde sowohl an humanen Tumorproben, als auch im Mausmodell durchgeführt.

Die 50µm Gele aus 12,5%igem (w/v) Polyacrylamid wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Glasobjektträger (Menzel, Braunschweig) polymerisiert.

500 µl Gelatine wurden bei 60°C gelöst. Hinzugegeben wurden 400 µl Tris-Puffer und 600 µl 30% Acrylamid. Diese Mischung wurde bei -20°C für 1 min. abgekühlt. Dann wurden 2,5 µl TEMED (Tetra-Methyl-Ethylen-Diamin) und 7,5 µl 10% APS hinzugegeben. Die Polymerisationszeit betrug 10 min.

Die Objektträger wurden dann mit den Gelen in bidestilliertem Wasser gewaschen um überschüssige Acrylamidmonomere und Katalysatoren zu entfernen. Danach erfolgte eine Äquilibration der Gele in spezifischen Substratpuffern, je nachdem welche Familie von Proteasen untersucht wurde.

Zum Nachweis der lysosomalen Cysteinproteasen wurden die Gele im sauren pH-Bereich (50mM NaOAc, 100mM NaCl, pH 5,5+5mM Cystein und 5mM EDTA), zum Sichtbarmachender Aktivität der MMPs im neutralen pH-Bereich (50mM Tris, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂; pH7,4) gepuffert.

Die konsekutiven Kryoschnitte sowohl der humanen als auch der murinen Präparate mit einer Dicke von 6-8 µm wurden auf die Polyacrylamidgele aufgebracht und für 12-20 Stunden in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Kryoschnitte mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur Sichtbarmachung der Zellkerne angefärbt und photographiert (Nikon Digital Kamera OXM1200F am Lichtmikroskop Nikon Eclipse E800; Lucia Image Processing Software). Nach genauer Photodokumentation und Erfassung der Koordinaten des photographierten Abschnittes, sowie der Vergrößerung wurden die Schnitte nach Lösen in 5%SDS vorsichtig mechanisch von den Poyacrylamidgelen gelöst.

Anschließend wurden die Gele in Coomassie-G-250 gefärbt und dann mit Entfärbelösung behandelt um die gelatinolytische Aktivität sichtbar zu machen. Sie wurden dann unter exakt denselben Koordinaten wie die HE-Färbungen photographiert .

Die Photographien der Gele mit Schnitten und nach Sichtbarmachen der gelatinolytischen Aktivität wurden im Anschluss von zwei verschiedenen Personen nach der Stärke der Aktivität und der Lokalisation derselben bewertet und die Ergebnisse in Tabellenform zusammengefasst.

3.2.2.2 Immunhistologie der humanen Proben

Die Immunhistologien wurden von denselben humanen und murinen Präparaten wie die In situ Zymographien angefertigt.

Die 6-8 µm dicken KryoSchnitte wurden zunächst in Aceton (-20°C) fixiert, dann in PBS rehydriert und anschließend mit 10% BSA in PBS blockiert. Die Antikörper gegen menschliches Cath B (clone CB 59-4B11; Endkonzentration 2µg/ml) wurden mit 1% BSA in PBS verdünnt und in einer Konzentration von 1:100 mit 40 ml pro Schnitt aufgetragen. Bei der Negativkontrolle wurde nur BSA in TBS aufgetragen. Anschließend wurden die Proben bei 4°C über Nacht inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Schnitte in TBS gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit DAKO-Envision in einer feuchten Kammer inkubiert . Dann erfolgte eine Reinigung in Tris-NaCl und eine anschließende Färbung mit der oben angegebenen Entwicklungslösung für Immunhistologie. Nach einer Reaktionszeit von ca. 20 min. wurde die Entwicklungslösung mit Tris-NaCl abgespült und für 30 sek. mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in Leitungswasser nachgebläut und mit wässrigem Eindeckmittel eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte später nach demselben Prinzip der zwei aufeinander abgestimmten Personen wie bei der in situ Zymographie.

3.2.2.3 Immunhistologie der Mausproben

Hierfür wurden ebenfalls dieselben Präparate wie für die in situ Zymographie verwendet. Die Schnitte wurden nach derselben Vorbehandlung wie die humanen Proben mit einem Brückenantikörper (rabbit anti goat mit Peroxidase konjugiert, 1:200 verdünnt) für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden dann wie oben schon beschrieben in PBS gewaschen und dann mit AEC entwickelt: 7 ml der AEC-Stammlösung wurden in 70 ml vorgewärmten Acetatpuffer gegeben und kurz geschwenkt. Anschließend wurde die Mischung im dunklen Wasserbad mit einem Faltenfilter bei 37°C in eine Küvette filtriert. Diese Mischung wurde mit 32,7 ml H₂O₂ versetzt.

Die Schnitte wurden in dieser Mischung für ca. 3 min. inkubiert, dann wurde die Reaktion mit Leitungswasser gestoppt. Anschließend wurde mit Hämalaun gegengefärbt und mit HCL/Alkohol differenziert. Die Schnitte wurden in Leitungswasser nachgebläut und mit einem wässrigen Eindeckmittel eingedeckt.

Die Auswertung des Versuchs erfolgte auf dieselbe Weise wie bei den humanen Proben.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 RNA-Isolierung und PCR

Voruntersuchungen:

Verschiedene häufig verwendete Primer wurden in diesem Vorversuch für die Zelllinie BLM getestet, da nicht bekannt war, welche zur Detektierung der RNA dieser Zellen verwendet werden können.

Hierfür wurde RNA nach der unten beschriebenen Methode aus BLM Zellen und einem Maustumor isoliert und dann eine PCR mit verschiedenen Primern angesetzt. Die versuchsweise eingesetzten Primer waren: MART 1, Gp100, Tyrosinase, MAGE3.

Es konnte nur bei MAGE3 ein Signal für die BLM-Zellen und den Tumor nachgewiesen werden.

RNA-Isolation

Das aus den Maustumoren und entnommenen Tumoren gewonnene Gewebe wurde aus -80°C heraus auf Trockeneis gelagert.

Die Arbeitsgeräte (Petrischalen, Skalpell, Pinzett, Kanüle, etc.) wurden auf Trockeneis vorgekühlt, bevor sie mit dem Gewebe in Berührung kamen.

Das Zellmaterial wurde mit 1 ml RNAzol versetzt (1ml RNAzol / 50mg Gewebe) und mechanisch homogenisiert. Nach Zusatz von 200 µl Chloroform und 1ml RNAzol wurde die Menge vermischt und die Suspension für 5 min. bei 4°C gekühlt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 13000 rpm wurde die Oberphase mit RNA-Überstand abgenommen und mit 500 µl Isopropanol (-20°C) zur Inkubation über Nacht bei -20°C .versetzt Nach erneuter Zentrifugation, Trocknung und erneutem Lösen der RNA in 20-30µl DEPC-H₂O wurde die RNA Konzentration durch photometrische Messungen der optischen Dicht bei 260nm (OD 260x40=µlg/ml RNA) bestimmt. Die Reinheit und Integrität der RNA wurde mittels Formaldehyd Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

RT-PCR wurde mit der reversen Transkriptase (SuperScript TM™ II RNase –Reverse Transcriotase, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) nach Herstellerangaben durchgeführt. Unter Verwendung von oligo d/t Primern (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurden 2µg der isolierten RNA in einem Gesamtvolumen von 20µl revers transkribiert.

Rezept für die Reverse Transkription:

10 mal PCR-Puffer 2µl, MgCl₂ (25mM) 4µl, dNTPs (10µM) 8µl, Oligo d(t)16 (50µM) 1µl, RNase-Inhibitor (20U/µl) 1µl, Reverse Transkriptase (50U/µl) 1µl, RNA 1µg, DEPC-H₂O ad 20µl

Programm: 10 min 21°C, 15 min 42°C, 5 min 99°C, Pause 4°C

Die bekannten Primer MART 1, human Tyrosinase, Gp100 werden, wie im Vorversuch gezeigt werden konnte nicht in BLM Zellen exprimiert. Da es sich aber um menschliche Tumorzelllinien in Mäusen handelte, konnte humanes S26 verwendet werden. Diese Methode wurde bei den BLM- und den MV3-Mäusen angewandt. Bei den B16 F1-Mäusen wurde als spezifischer Primer mouse Tyrosinase verwendet. Für den Nachweis von Tumorgewebe in Skmel28-Mäusen wurde als Primer MART 1 verwendet, der in dieser Tumorzelllinie exprimiert wird. Diese Primer wurden jeweils mit 2µl der gewonnen cDNA für die PCR-Amplifikation eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde bei jeder PCR ein Ansatz mit mouse S26 Primern verwendet. Als Negativkontrollen fungierten die spezifischen Primer ohne Zusatz von cDNA. Die spezifische Amlifikation der cDNA-Fragmente wurde folgendermaßen durchgeführt: 30 Zyklen

der Denaturierung (Positivkontrolle und B16F1 35x) bei 94°C, 60 sek., Annealing (60°C 60 sek. bei BLM, Skmel 28 ,MV3, 56°C 60 sek. bei Positivkontrolle und B16F1), und Extension 72°C für 60 sek.. Um die Größe der PCR Produkte nachzuweisen verwendeten wir 1,2% (w/v) Agarosegele in TAE mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid.

Rezepte für PCR:

Positivkontrolle: Ready Mix Red Taq PCR, Reaction Mix mit MgCl₂ 25µl, Mou S26 for. (10µM) 5µl, Mou S26 rev. (10µM) 5µl, cDNA 1µl, PCR-H₂O 14µl

PCR bei BLM- und MV3-Mäusen

10 mal PCR-Puffer 2µl, MgCl (25mM) 1µl, Hu S26 for. (1,5µM) 2µl, Hu S26 rev. (1,5µM) 2µl, Ampli Taq Gold (5u/µl) 1,125µl, cDNA 1µl, PCR-H₂O 11,875µl

PCR bei Skmel28-Mäusen.

Der oben beschriebene Ansatz sowie das Programm blieben mit Ausnahme der Primer gleich.

PCR bei B16F1-Mäusen

2mal Ready Mix Red Taq PCR, Reaktion Mix mit MgCl₂ 25µl, Mou Tyr for. (10µM) 5µl, Mou Tyr rev. (10µM) 5µl, cDNA 2µl, PCR-H₂O 13µl

3.2.3 Bei den Versuchen verwendete Lösungen:

Gelatine

Für 50 Eppendorfhütchen à 500 Mykroliter:
1250mg bovine Gelatine
25 ml aqua dest

Diese Mischung wird bei 60°C gelöst und in 50 Eppendorfhütchen à 2ml verteilt. Die gelöste Gelatine wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

10% APS (Ammonium-Peroxid.Sulfat)

0.1g APS wurden in je ein Eppendorfhütchen abgewogen und zum Gebrauch dann frisch mit 1 ml aqua dest aufgefüllt. Diese Mischung kann dann für kurze Zeit bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Tris-HCL-Puffer

7.88 g Tris-HCL werden in 99ml aqua dest gelöst und der pH-Wert wird mit NaOH auf 7.4 eingestellt. Dann werden 0.554 g CaCl₂ hinzugegeben und die Mischung auf 1000 ml mit aqua dest aufgefüllt.

10 mal PBS

80 g NaCl

2g KCl

14,4 g Na₂HPO₄

2,4g KH₂PO₄

Diese Zutaten werden in 800 ml aqua dest unter ständigem Rühren gelöst. Dann wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und anschließend die Mischung auf 1000ml mit aqua dest aufgefüllt.

10 mal SDS

100 g SDS werden in 1000 ml 1mal PBS unter ständigem Rühren gelöst.

Coomassie-Lösung

400 ml aqua dest plus 100 ml Eisessig werden mit einem Gramm Coomassie gemischt, das zuvor in 400ml Methanol und 100ml aqua dest gelöst wurde.

Entfärberlösung

100ml Methanol, 100ml Essigsäure und 800ml aqua dest

Cathepsin-Puffer

50 mM Na Ac pH 5,5

100 mM NaCl

5mM EDTA pH 8

0,5 mM Cystein.

MMP-Puffer

500 mM Tris

1,5 m NaCl

50 mM CaCl , pH 7,4

HE- Färbung

1 min Färbung in Hämatotoxin , Abspülen in Leitungswasser ; Differenzierung in 1% HCL-Alkohol; erneutes Abspülen in Leitungswasser , 5 sek. Färbung in Eosin , Abspülen mit Leitungswasser

Lösung 1 für Immunhistologie Human

0,033g Levamisol

59 ml APAAP-Entwicklungspuffer

21 ml Propandiol

Lösung 2 für Immunhistologie Human

0,042 g Naphtol-AS-Bis-Phosphat in 500 µl Dimethylformamid plus 1% Triton

Lösung 3 Für Immunhistologie Human

0,017 g Natriumnitrit in 420 µl aqua bidest gelöst

4. Ergebnisse

4.1. Immunhistochemischer Nachweis von Cathepsin B in humanen benignen Pigmentnävi und malignen Melanomen

Beim malignen Melanom wurden vermehrte Expressionsraten lysosomaler Cysteinproteasen und ihre sowohl intra- als auch extrazellulär erhöhten proteolytischen Aktivitäten mit Degradation von extrazellulärer Matrix beschrieben. (Frosch BA et al., 1999, Fröhlich E et al., 2001, Moin K et al., 1998)

Da die Degradation von Basalmembrankomponenten und interstitiellem Stroma essentiell für die Invasion und Metastasierung von neoplastischen Zellen ist, wird eine Assoziation von Tumormalignität und Erhöhung der Enzymmenge angenommen (Quian F et al., 1989, Fröhlich E et al., 2001). In diesem Prozess scheint gerade Cathepsin B eine signifikante Rolle zu spielen, da es in erhöhter Menge vor allem an der Tumor-Stroma-Grenze nachgewiesen werden konnte (Buck MR et al., 1994 ; Frosch BA et al., 1999). Zur näheren Charakterisierung der Rolle des Cathepsin B in diesen Abläufen führten wir immunhistochemische Untersuchungen mittels eines spezifischen Antikörpers gegen Cathepsin B an humanen superfiziell spreitenden und nodulären Melanomen sowie benignen Nävuszellnävi durch. Ziel dieses Versuches war es, die Enzymmengen von Cathepsin B in vivo am humanen malignen Melanom und im Vergleich an benignen Pigmentnävi als Kontrollgruppe semiquantitativ darzustellen und zusätzlich die Lokalisation der Enzymverteilung von Cathepsin B innerhalb der Präparate aufzuzeigen.

Die verwendeten Hautproben wurden in drei Gruppen eingeteilt; 1. benigne Nävuszellnävi (n=3); 2. Tumoren der klinischen Stadien Ia-IIb (n=16), und 3. Tumoren, die sich im Stadium IIIb oder Stadium IV (n=6) befanden. Zur Vereinfachung werden diese Gruppen im Folgenden mit den Nummern 1-3 bezeichnet.

	Stadien	Alter (Jahre)	Männlich	Weiblich
Gruppe 1 (n=3)	Nävuszell= nävi	22-63 (Median 37)	2	1
Gruppe 2 (n=16)	Ia-IIb	24-78 (Median 58)	8	8
Gruppe 3 (n=6)	IIb –IV	56-78 (Median 65)	2	4

Tabelle 4.1: Histologische Einteilung der untersuchten Tumoren, Alter und Geschlecht der Patienten

Die semiquantitative Auswertung der Cathepsin B Expression erfolgte über die Auszählung der immunhistochemisch markierten Zellen nach einem vor Versuchsbeginn festgelegten Intensitätsscore mit den Stärken I-III.

Die höchsten Intensitätsscores und somit die höchsten Enzymmengen an Cathepsin B, fanden sich in Gruppe 3, den Melanomen mit der höchsten Invasivität. Sie zeigten durchgehend einen Score von III. In Gruppe 1 war diese Protease mit einem durchgängigen Intensitätsscore von I nur schwach nachweisbar; in der Gruppe 2 waren alle drei Signalstärken vorhanden, wobei die Präparate mit dem Intensitätsscore III mit 56 % überwogen.

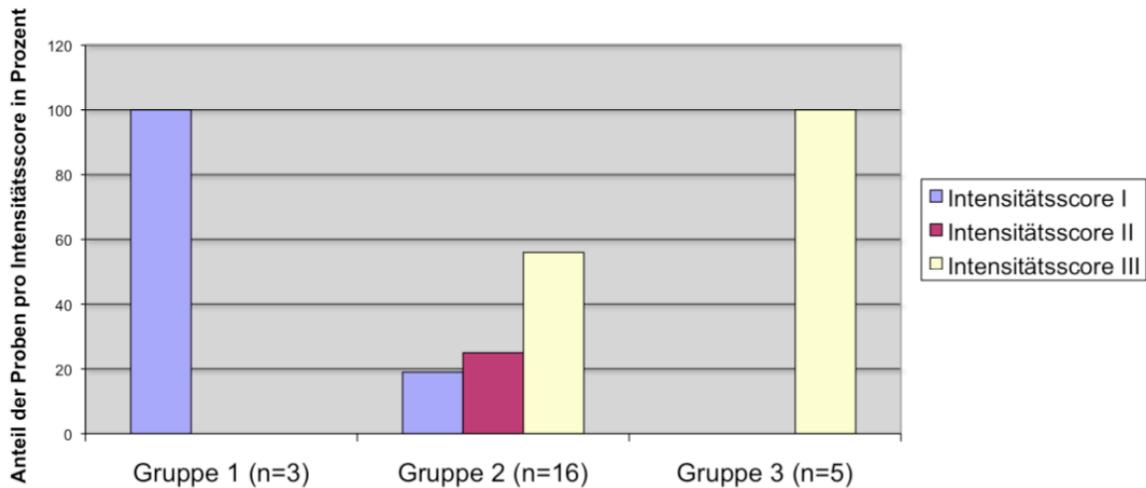


Abbildung 4.1: Quantifizierung der Cathepsin B - Konzentration in humanen Melanomproben mittels Immunhistochemie: Während sich in der Gruppe der NZN durchgängig ein Intensitätsscore von I und damit eine geringe Enzymkonzentration zeigt, finden wir in der Gruppe der hochinvasiven Tumoren der Gruppe 3 durchgehend eine hohe Konzentration von Cathepsin B mit einem Intensitätsscore von III, in der Gruppe 2 findet sich in 56% ein Intensitätsscore von III, in 25% von II und in 19% von I.

Diese Resultate deuten darauf hin, dass Cathepsin B entscheidend am Übergang von benignen zu malignen Wachstumsprozessen und an der Tumorinvasion beteiligt ist. Um diese Hypothese zu prüfen, bestimmten wir die Lokalisation der Cathepsin B-Expression innerhalb der Präparate bezogen auf den Tumor, die Tumor-Stroma-Grenze und das tumornahе Stroma.

Darüber hinaus beurteilten wir die Enzymmenge von Cathepsin B innerhalb der Epidermis. Da die Melanome hier ihren Ursprung nehmen, können so die initiiierenden Schritte der Invasion, wie die Penetration der Basalmembran als erster Barriere auf dem Weg der Melanomausbreitung und die Metastasierung analysiert werden.

Die untersuchten Melanome der Gruppen 2 und 3 wiesen vor allem an der Tumor-Stroma-Grenze hohe Konzentrationen von Cathepsin B auf, auch im tumornahen Stroma wurde in diesen Gruppen Cathepsin B in hoher Konzentration gefunden.

Im Gegensatz hierzu fand sich innerhalb der Tumoren selbst keine oder nur eine sehr geringe Enzymmenge.

Die benignen Pigmentzellnävi zeigten die stärkste Färbungsintensität ebenfalls an der Tumor-Stroma-Grenze. Im tumornahen Stroma konnte bei diesen Präparaten allerdings kein Enzym nachgewiesen werden.

Die Epidermis der Tumoren wies im vom Tumor befallenen Gebiet ebenfalls in den meisten Tumoren eine starke Aktivität auf, während die tumorfremie Epidermis keine erhöhten Cathepsin B-Konzentrationen zeigte.

	Im Tumor	An der Tumor-/Stroma-Grenze	Im tumorperipheren Stroma	In der Epidermis
Gruppe 1 (n=3)	0	3	0	2
Gruppe 2 (n=16)	13	16	14	14
Gruppe 3 (n=6)	3	5	5	4

Tabelle 4.2: Analyse der Verteilung der Cathepsin B-Menge innerhalb der Präparate der humanen Melanomproben mittels Immunhistochemie: In den Gruppen 2 und 3 findet sich die stärkste Konzentration an der Tumor-Stroma - Grenze, sowie im tumorperipheren Stroma. Im Vergleich ist bei den NZN die Hauptaktivität an der Tumor-Stroma-Grenze lokalisiert nicht aber im tumorperipheren Stroma.

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, fand sich bei einer hohen Anzahl der Tumoren auch im Tumor selbst eine Aktivität. Um eine Gewichtung zwischen den verschiedenen Lokalisationen der erhöhten Cathepsin B Mengen vorzunehmen, wurde der Intensitätsscore in die Auswertung miteinbezogen. Hierbei ergaben sich wie bereits erwähnt die höchsten Mengen von Cathepsin B im Bindegewebe an der Tumor-Stroma-Grenze sowie im tumornahen Stroma, während sich in den Tumoren selbst nur eine geringe Menge an Cathepsin B detektieren ließ. Beispielhaft werden in Tabelle 3 die Intensitätsscores innerhalb der Tumoren der Gruppe 2 aufgeführt.

Intensitätsscore im Tumor	Anzahl der Präparate in Gruppe 2
Stärke III	1
Stärke II	1
Stärke I	6
punktueller Signale im Tumor	5
Keine Signale im Tumor	3

Tabelle 4.3: Quantifizierung der Cathepsin B - Konzentration innerhalb der Tumorfläche der humanen Melanomproben mittels Immunhistochemie: Nur in 6 % fand sich ein Signal mit dem Intensitätsscore III, in 6 % mit dem Score II. die restlichen Tumore wiesen nur sehr schwache oder keine Signale des Antikörpers auf.

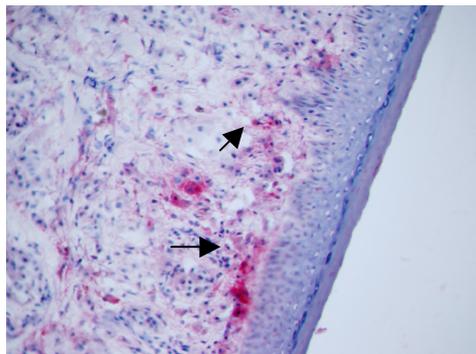


Fig. 4.1. Beispiel für Immunhistologie: Die Pfeile deuten auf die Cathepsin B-spezifische Färbung des die Tumorzellen umgebenden Bindegewebes

4.2. Analyse der gelatinolytischen Aktivität von Cathepsin B mittels in situ Zymographien unter sauren Bedingungen an humanen benignen Pigmentnävus und malignen Melanomen

Der Prozess der Tumorinvasion, der Gefäßarrudierung und der hierdurch ermöglichten Metastasierung von Tumoren ist durch eine Interaktion von Tumorzellen mit den umgebenden Bindegewebszellen und letztendlich der Degradation der verschiedenen Komponenten des Bindegewebes gekennzeichnet.

Der Abbau von Bindegewebskomponenten durch Cathepsin B setzt jedoch eine Störung des Verhältnisses zwischen spezifischen Inhibitoren und Cathepsin B voraus und kann nur stattfinden, wenn dieses ursprünglich intrazelluläre Enzym in seiner aktiven Form vermehrt in den extrazellulären Bereich sezerniert wird. Eine erhöhte extrazelluläre Konzentration von Cathepsin B wurde bereits unter anderem am Magenkarzinom (Moin K et al., 1998) sowie am malignen Melanom (Dennhöfer R et al., 2003) beschrieben. Aufgrund dieser Studien stellte sich die Frage, ob die charakteristischen Invasionseigenschaften der untersuchten Melanome mit einem spezifischen Aktivitätsprofil der Cathepsine korrelieren.

Da der semiquantitative Nachweis von Cathepsin B in den immunhistologischen Untersuchungen noch keine Aussage über die Aktivität des Enzyms und damit auch über eine mögliche Degradation von extrazellulärer Matrix zulässt, wurde im nächsten Schritt die Methode der In situ Zymographie angewendet. Mit dieser von Kurschat P et al (2000) und Dennhofer R et al. (2003) bereits zur Detektierung von Metalloproteinasen und Cathepsin B am malignen Melanom angewandten Methode ist es möglich, am Gewebeschnitt ausschließlich aktives, nichtinhibiertes Enzym zu detektieren.

Aufgrund des pH-Optimums der Cathepsine bei pH 5-6 führten wir die In Situ Zymographien an den humanen Melanomen und Pigmentzellnävus unter sauren Pufferbedingungen (pH 5,5) aus. Ähnlich wie bei den Präparaten der Immunhistologien erfolgte eine semiquantitative Auswertung der Menge der abgebauten Gelatine, also der Gelatinaseaktivität und damit eine indirekte Bestimmung des Enzyms innerhalb der drei oben beschriebenen Gruppen.

Die stärkste Enzymaktivität mit 83% Gelatinaseaktivität der Stärke III zeigte sich in der Gruppe 3, den Tumoren mit der höchsten Invasivität. In der Gruppe 2 fanden wir in 38% eine Gelatinaseaktivität der Stärke III, in 50% der Stärke II und in 13% der Stärke I vor. Bei der Beurteilung der Gelatinaseaktivitäten der Gruppe 1 ergab sich folgendes Ergebnis: Jede der drei Proben konnte einer der drei Gelatinaseaktivitätsstärken zugeordnet werden, so dass man zu diesem Zeitpunkt keine signifikante Aussage über die Stärke der Gelatinaseaktivität dieser Gruppe treffen kann.

Die Ergebnisse in den Gruppen 2 und 3 deuten jedoch auf eine direkte Korrelation zwischen der Expression aktiver extrazellulärer Cysteinproteasen mit malignen Wachstumsprozessen hin.

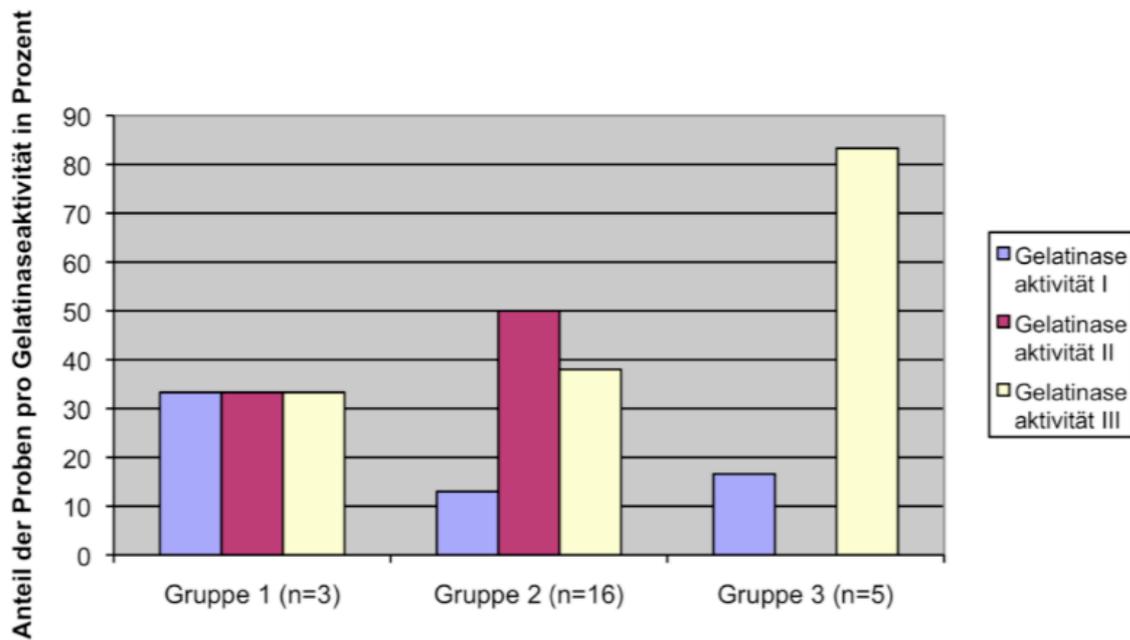


Abbildung 4.2: Quantifizierung der Cathepsin B - Konzentration in humanen Melanomproben mittels In situ Zymographie unter sauren Bedingungen:

Während sich in der Gruppe 3 mit 83% eine Aktivität von III und damit eine hohe Enzymkonzentration zeigt finden wir in der Gruppe 2 in 38 % eine Aktivität von III, in 50% von II und in 13% von I. In der Gruppe der 1 fand sich bei 3 Tumoren jede der drei Gelatinaseaktivitätsstärken einmal.

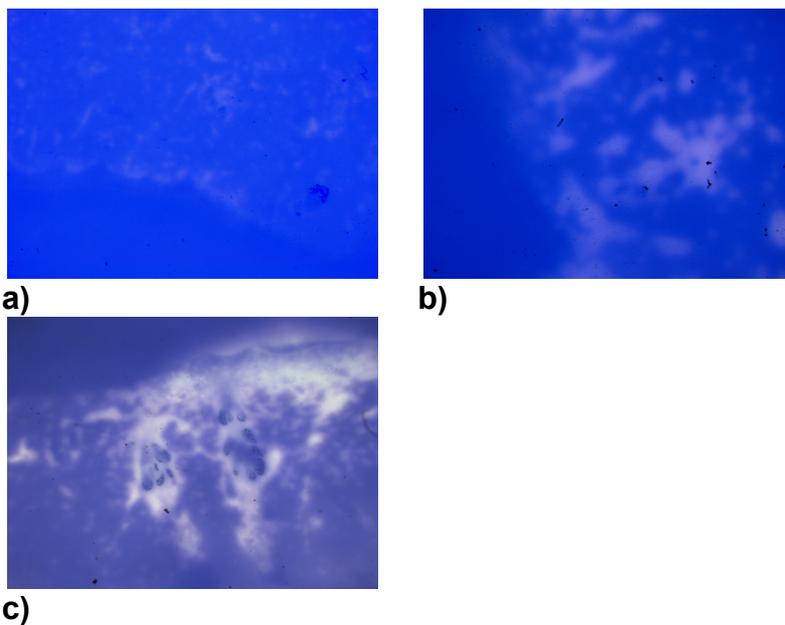


Fig. 4.2.: Repräsentative Beispiele für die Stärke der Gelatinaseaktivität bei humanen Melanomen unter sauren Bedingungen: Bild a zeigt eine Gelatinaseaktivität der Stärke I, Bild b der Stärke II und Bild c der Stärke III

Durch Vergleich der Zymogramme mit den entsprechenden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen wurde die Lokalisation der Gelatinaseaktivität innerhalb der Präparatschnitte beurteilt. Die stärkste gelatinolytische Aktivität fand sich bei den Gruppen 2 und 3 an der Tumor-Stroma-Grenze sowie im tumornahen Stroma, wo bei 63% der Gruppe 2 und bei 83% der Gruppe 3 eine starke gelatinolytische Aktivität festgestellt werden konnte. In 40% der Gruppe 2 und in 50% der Gruppe 3 fand sich zudem eine proteolytische Aktivität im Tumor. Die im Tumor detektierten Aktivitäten entsprachen jedoch nie der maximalen gelatinolytischen Aktivität in einem Präparat.

Des Weiteren wurde die Aktivität von Cathepsin B in der tumorfernen Epidermis bestimmt; hier konnte im Gegensatz zur befallenen Epidermis in keinem Tumorgewebe Aktivität detektiert werden. Gelegentlich konnte gelatinolytische Aktivität in nekrotisch zerfallenen Tumorbereichen beobachtet werden, dies traf vor allem für die Tumoren der Gruppe 3 zu. In der Gruppe der Nävuszellnävi fand sich die Haupt-Gelatinaseaktivität ebenfalls an der Tumor-Stroma-Grenze, jedoch nicht im tumornahen Stroma.

	Gelatinaseaktivität im Tumor	Gelatinaseaktivität an der Tumor-Stroma-Grenze	Gelatinaseaktivität im tumornahen Stroma	Gelatinaseaktivität in der tumorfernen Epidermis
Gruppe 1 (n=3)	0	3 (100%)	0	0
Gruppe 2 (=16)	5	15 (92%)	10	0
Gruppe 3 (n=6)	1	6 (100%)	5	0

Tabelle 4.4: Analyse der Verteilung der Cathepsin B-Konzentration innerhalb der Präparate der humanen Melanomproben mittels In situ Zymographie unter sauren Bedingungen. In allen Gruppen findet sich die stärkste Konzentration gelatinolytischer Aktivität an der Tumor-Stroma Grenze, im Gegensatz zu den Gruppen 2 und 3 konnte an den NZN jedoch keine Aktivität im tumornahen Stroma beobachtet werden.

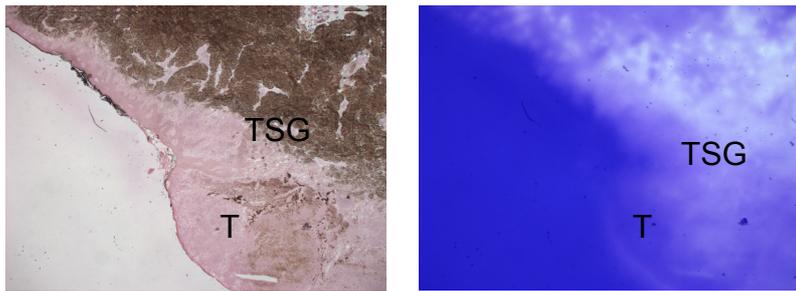


Fig 4.3.: Repräsentatives Beispiel für die Lokalisation der Gelatinaseaktivität in humanen Melanomen unter sauren Bedingungen: Die Hauptaktivität zeigt sich an der Tumor-Stroma-Grenze (TSG) zwischen Tumor (T) und Stroma sowie im tumornahen Stroma

4.3. Analyse der gelatinolytischen Aktivität von Matrix Metalloproteinasen mittels in situ Zymographien unter neutralen Bedingungen an humanen benignen Pigmentnävii und malignen Melanomen

Beim malignen Melanom konnte eine vermehrte Expressionsrate von Metalloproteinasen in früheren Untersuchungen bereits demonstriert werden. (Vaisanen A et al., 1996, Kurschat P. et al. 2000)

Es besteht die Vermutung, dass die spezifischen Aktivitätsprofile der Cathepsine und Metalloproteinasen innerhalb von Tumoren in ihrer Aktivierung im zeitlichen Zusammenhang mit dem Prozess der Tumormetastasierung zu sehen sind.

Um dies näher zu untersuchen, wurde der oben beschriebene Versuchsaufbau für die in situ Zymographien unter neutralen Pufferbedingungen (pH 7.4) in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen für den Nachweis von Metalloproteasen durchgeführt.

In der Gruppe 1 der Nävuszellnävii fand sich in diesem Fall eine mittlere bis hohe Aktivität, mit 67% Gelatinaseaktivität der Stufe III und 33% der Stufe II, wohingegen in der Gruppe der hochinvasiven Tumoren (Gruppe 3) eine niedrige bis mittlere Degradationsaktivität mit jeweils 50% Aktivität der Stärke I und II vorherrschte. In der Gruppe 2, den intermediär invasiven Tumoren ergaben sich folgende Zahlen: 27% der untersuchten Proben zeigten eine Gelatinaseaktivität der Stärke III, 47% der Stärke II und 27% wiesen eine Stärke von I auf.

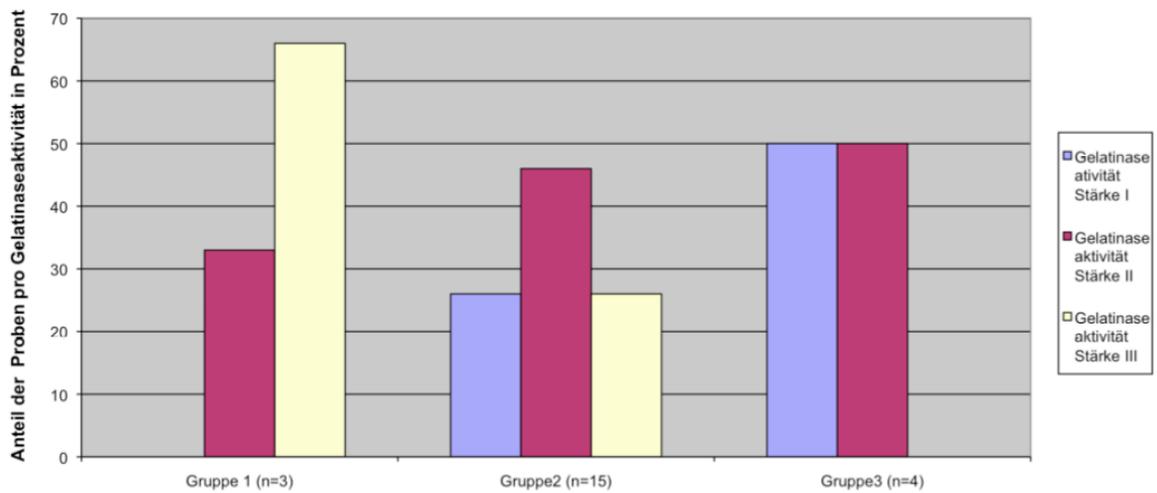


Abbildung 4.3: Quantifizierung der Cathepsin B - Konzentration in humanen Melanomproben mittels In situ Zymographie unter neutralen Bedingungen: In der Gruppe 3 fand sich in 50% eine Aktivität der Stärke II und in 50% der Stärke I, während sich in der Gruppe 1 in 67% eine Gelatinaseaktivität der Stärke III zeigte.

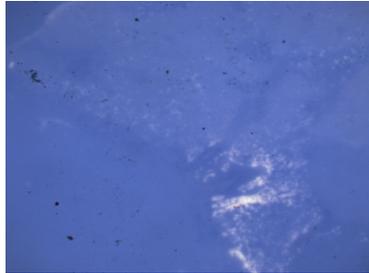
a) saure Bedingungen

b) neutrale Bedingungen

1



2



3



4

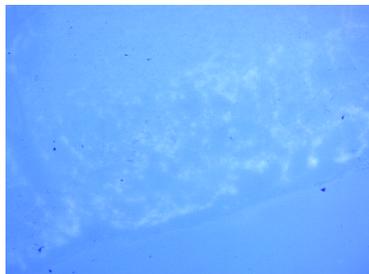


Fig. 4.4: Vergleich der Gelatinaseaktivität der humanen Tumoren unter sauren und neutralen Bedingungen: Bild 1. und 3. zeigen In situ Zymographien unter sauren Bedingungen der Stärke III von Präparaten hochmaligner Tumoren (Gruppe 3). Bild 2. und 4. zeigen in situ Zymographien unter neutralen Bedingungen derselben Präparate mit deutlich schwächeren Gelatinaseaktivitäten der Stärken II und I

Da dieses Ergebnis von den Resultaten unserer vorangegangenen Versuche mit Cathepsinen und auch den Beschreibungen der Literatur abweicht, suchten wir nach weiteren Hinweisen für das spezifische Aktivitätsprofil von Metalloproteinasen in malignen Melanomen und bestimmten aus diesem Grund im Folgenden die Lokalisation der maximalen gelatinolytischen Aktivität innerhalb der Präparate.

Bei den intermediär- und den hochinvasiven Tumoren fand sich die Hauptaktivität an der Tumor-Stroma-Grenze. Auch zeigte sich in diesen beiden Gruppen wieder eine starke Aktivität im tumorperipheren Stroma sowie gelegentlich in nekrotisch zerfallener Tumormasse. In der tumorfreien Epidermis zeigte sich auch bei der Untersuchung der Metalloproteinasen keine gelatinolytische Aktivität, während die an den Tumor angrenzende Epidermis eine hohe Aktivität aufwies.

In den Nävuszellnävi zeigte sich die Hauptaktivität ebenfalls an der Tumor-Stroma-Grenze, jedoch nicht im tumorperipheren Stroma.

	Aktivität im Tumor	Aktivität an der Tumor-Stromagrenze	Aktivität im tumornahen Stroma	Aktivität in der tumorfernen Epidermis
Gruppe 1 (n=3)	0	3	0	0
Gruppe 2 (n=15)	6	11	10	0
Gruppe 3 (n=5)	3	3	4	0

Tabelle 4.5: Analyse der Verteilung der Metalloproteinasen - Konzentration innerhalb der Präparate der humanen Melanomproben mittels In situ Zymographie unter neutralen Bedingungen: In allen drei Gruppen findet sich die stärkste Konzentration an der Tumor-Stroma Grenze, bei den Gruppen 2 und 3 zusätzlich im tumornahen Stroma.

4.4 Das Invasionsverhalten von verschiedenen Melanomzelllinien am Skid-Maus-Modell

Im Prozess der Tumordinvasion und Metastasierung finden vielfältige Interaktionen zwischen Tumorzellen und den Komponenten des umgebenden Bindegewebes statt. Diese lassen sich in vivo an humanen Melanomen nur in bestimmten Grenzen beurteilen. Um diese Interaktionen näher untersuchen zu können, wurden in Scid – Mäusen, durch intradermale Injektion verschiedener gut charakterisierter Melanomzelllinien, Tumore induziert. In den genetisch veränderten Tieren tritt aufgrund der Veränderung vor allem von B- und T-Lymphozyten eine schwere Immunstörung („Severe Combined Immunodeficiency“) ein. Aufgrund des induzierten Gendefektes kommt es zu einer Differenzierungsstörung der B- und T-Lymphozyten, was durch eine schwere Abwehrstörung zu einer besseren Annahme von Fremdgewebe führt. Die untersuchten Tumoren wurden in den Mäusen durch die Injektion von Zellsuspensaten der gut charakterisierten Zelllinien BLM (hochinvasiv, human), MV3 (hochinvasiv, human),

Skmel28 (intermediär invasiv, human) und B16F1(niedriginvasiv, murin) hervorgerufen.

4.4.1.Wachstumsverhalten der Melanomzelllinien im Skid Maus Modell

Nach erfolgter Injektion der Zellen wurde das Wachstum der Tumoren täglich mit Hilfe eines Skalipers gemessen.

Das invasivste und am schnellsten fortschreitende Wachstum zeigte die B16F1-Zelllinie.

Auch die BLM-Zelllinie zeigte ein rasches Wachstum. Zwei der Tiere wurden ebenfalls nach 20 Tagen getötet, die restlichen nach 27 Tagen gemeinsam mit den Mäusen mit Tumoren aus der MV3-Zelllinie. Die Tumoren aus Skmel28-Zellen zeigten gemäß ihrer intermediären Invasivität ein langsames Wachstum. Die Tumoren erreichten auch nach 30 Tagen noch nicht die Größe der Tumoren der anderen Zelllinien, die Tiere wurden gemeinsam mit der Kontrollmaus getötet, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Zeitunterschiede des Verbleibs im Mausorganismus zu vermeiden.

	Skmel28 (n=4)	MV3 (n=3)	BLM (n=7)	B16F1 (n=3)
Tage nach Injektion bis zur Tötung	30d	27d	2 Mäuse nach 20d, 5 Mäuse nach 27d	20d

Tabelle 4.6: Tage bis zur Tötung der Skid Mäuse nach Injektion der Tumorzellen: Die B16F1-Mäuse wurden bereits nach 20 Tagen getötet, gemeinsam mit 2 der BLM-Mäuse, nach 27 Tagen wurden die MV3-Mäuse und nach 30 Tagen die Skmel-Mäuse gemeinsam mit der Kontrollmaus getötet.



Fig. 4.5.: Photographie eines in vivo gesetzten Melanoms an einer Scid-Versuchsmaus vor der Entnahme

4.4.2. Charakterisierung der Metastasierung in den entnommenen Organen

Um die Metastasierungswege der in vivo gesetzten Tumoren identifizieren zu können, wurde von allen entnommenen Primärtumoren, sowie den Organen der Versuchsmäuse, mRNA isoliert und mittels PCR amplifiziert. Spezifische Primer für die Detektierung von Melanomzellen wurden in Voruntersuchungen ermittelt (s. Material und Methoden).

Die Untersuchung der Organe ergab als hauptsächlichen Metastasierungsort die Lunge.

	BLM-Mäuse (n=7)	MV3-Mäuse (n=3)	B16F1-Mäuse (n=3)	Skmel28-Mäuse (n=4)
Metastasierung in die Leber	2/7	1/3	1/3	0/4
Metastasierung in die Niere	2/7	1/3	1/3	1/4
Metastasierung in die Milz	3/7	1/3	0/3	2/4
Metastasierung in die Lunge	6/7	2/3	2/3	2/4

Tabelle 4.7: Organmetastasierung der verschiedenen Tumorzelllinien nach intrakutaner Injektion in Skid Mäuse: den Hauptmetastasierungsort stellte bei allen Tumoren die Lunge dar. Dorthin metastasierten 75% der B16F1- und der Skmel28-Tumoren, 67% der MV3-Tumoren und 86% der BLM-Tumoren. Weitere häufige Metastasierungsorte waren in Leber, Niere und Milz

4.4.3 Immunhistochemischer Nachweis von Cathepsin B in den Tumoren des Mausmodells

Um die Cathepsin B Konzentration in den verschiedenen Tumoren zu vergleichen und zu der jeweiligen Invasivität der Zelllinie in Beziehung zu setzen, führten wir ebenso wie im Versuchsaufbau der humanen Präparate semiquantitative Untersuchungen mittels eines spezifischen Antikörpers durch.

Die höchsten Enzymmengen mit einem durchgängigen Intensitätsscore von III zeigten die Tumore der B16F1-Zelllinie, die als niedrig invasiv gilt und die die einzige murine Zelllinie innerhalb des Versuchsaufbaus darstellt. In den anderen Zelllinien fanden sich ausschließlich Intensitätsscores von I-II; bei den Skmel-28- und den MV3-Zellen mit einer hälftigen Verteilung und in der BLM-Zelllinie in 43% eine Stärke von II und in 57% von I. In den immunhistologischen Färbungen der Präparate der Kontrollmaus war Cathepsin B nur in sehr geringer Konzentration nachweisbar (s.Abb.3.5).

Zusammenfassend lag also bei den in Skid-Mäusen gesetzten Tumoren eine erhöhte Cathepsin B-Expression und – Bildung gegenüber der Normalhaut vor.

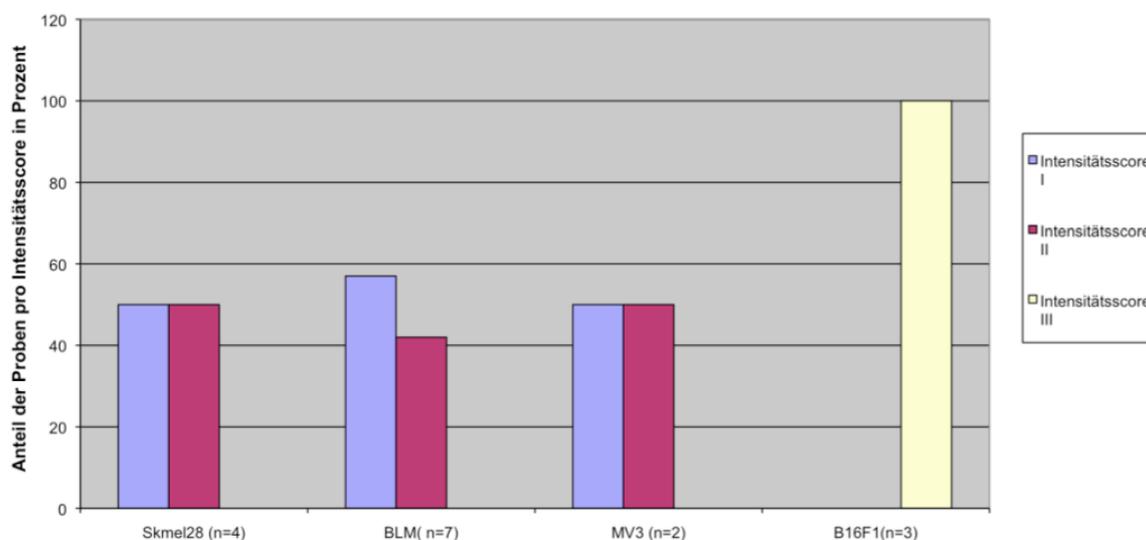


Abbildung 4.5: Quantifizierung der Cathepsin B - Konzentration bei in vitro gesetzten Melanomen im Scid Maus Modell mit den Zelllinien Skmel 28, BLM, MV3, B16F1 mittels Immunhistochemie: Die Tumorzelllinie B16F1 zeigte in 100% einen Intensitätsscore von III; in der MV3-Linie und der Skmel 28 Linie fand sich in jeweils 50% eine Aktivität der Stärke II und I, während die BLM-Zellen nur in 43% eine Signalstärke II zeigten.

Anschließend untersuchten wir die Lokalisation der höchsten Enzymkonzentrationen innerhalb der Präparate.

Während die Tumoren in den humanen Präparaten als Primärtumoren, also ausgehend von der dermoepidermalen Junctionszone in die tieferen Hautschichten hinein gewachsen waren, wurden im Mausmodell die künstlich angezüchteten bereits metastatischen Tumorzellen intrakutan, unter die Epidermis gespritzt. Die so entstandenen Tumoren ließen sich zum umgebenden Bindegewebe deutlich besser abgrenzen als die humanen Tumoren. Da bei der Tumordinvasion keine Penetration der Basalmembran stattfand; konnten wir den Durchbruch dieser nicht mit in die Auswertung mit einbeziehen. Vielmehr fungierte hier die Epidermis als Tumor-Stroma-Grenze.

Mit Ausnahme eines BLM-Tumors fand sich der stärkste Intensitätsscore (III) in allen Tumoren an der Tumor-Stroma-Grenze und zwar sowohl zum tiefer gelegenen Bindegewebe, als auch zur Epidermis hin. Im Tumor selbst konnte jeweils nur ein punktuell oder schwaches Signal detektiert werden.

In der Kontrollmaus war die Färbung des Cathepsin B so schwach, dass das Enzym keiner Lokalisation zugeordnet werden konnte.

	Im Tumor	An der Tumor-Stroma-Grenze	Im tumornahen Stroma	An der tumorfernen Epidermis
BLM (n=7)	3	6	6	7
Skme128 (n=4)	1	4	2	4
B16 (n=3)	1	3	3	3
MV3 (n=2)	1	2	2	2
Kontrolle (n=1)	0	0	0	0

Tabelle 4.8: Analyse der Verteilung der Cathepsin B-Konzentration innerhalb der Präparate der Tumoren am Skid Maus Modell mittels Immunhistochemie: Die hauptsächliche Enzymkonzentration fand sich mit einer Ausnahme bei allen untersuchten Tumoren an der Tumor-Stroma-Grenze, sowie im tumornahen Stroma

4.5. Analyse der gelatinolytischen Aktivität von Cathepsinen bei in vitro gesetzten Tumoren im Mausmodell mittels in situ Zymographien

Ebenso wie an den humanen Tumoren führten wir auch an den Proben aus den im Mausmodell entstandenen Tumoren In situ Zymographien durch, um den Anteil des aktiv sezernierten Enzyms detektieren und in einen Bezug zur Invasivität der jeweiligen Tumorzelllinien setzen zu können.

Die Zelllinie B16 F1 wies mit einer durchgängigen gelatinolytischen Aktivität von III die höchste proteolytische Aktivität innerhalb der Präparate auf. Die Skme128-Zellen zeigten eine gleiche Verteilung von starker und intermediärer Aktivität, während bei den BLM-Zellen mit 71% die starke Aktivität überwog.

In den Hautpräparaten der Kontrollmaus zeigte sich ähnlich wie beim immunhistochemischen Nachweis eine deutlich schwächere Aktivität, die sehr diffus ausgeprägt war und keiner bestimmten Struktur zugeordnet werden konnte.

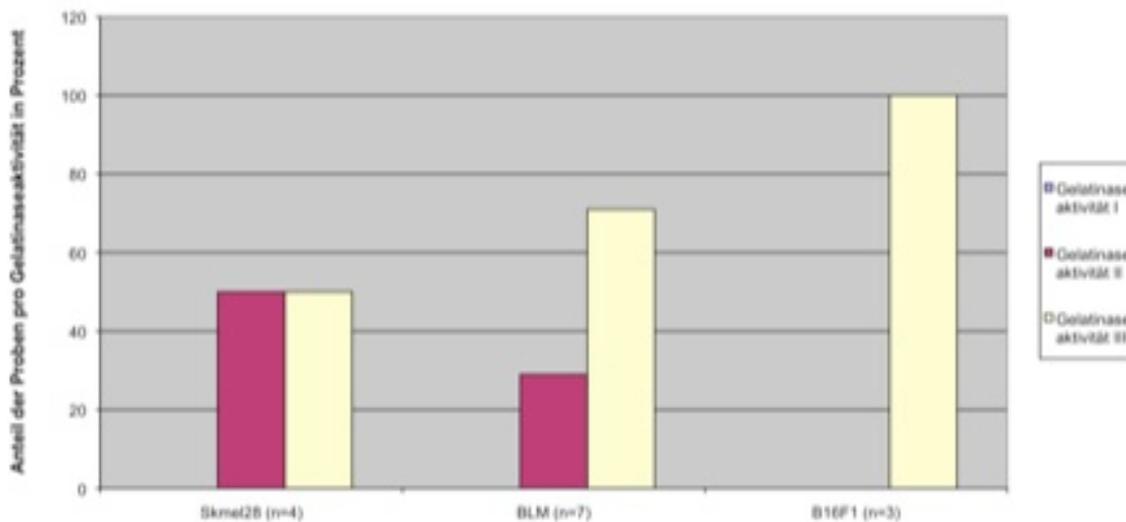


Abbildung 4.6: Quantifizierung der Cathepsin B - Mengen in in vitro gesetzten Melanomen im Scid - Maus Modell mit den Zelllinien Skmel 28, BLM, MV3, B16F1 mittels In situ Zymographie unter sauren Bedingungen: Die B16F1 Zelllinie zeigte in 100% eine Gelatinaseaktivität von III, während sich in der BLM-Linie in 71% eine Aktivität von III und in 29 % eine Aktivität von II. Bei den Skmel28-Zellen fanden wir in jeweils 50% eine Gelatinolyse der Stärken III und II



Fig 4.6.: Beispiele für die Stärken der Intensität der proteolytischen Aktivität bei In situ Zymographien der Maus-Präparate unter sauren Bedingungen: Beispiel 1 zeigt eine Aktivität der Stärke I, Beispiel 2 der Stärke II und Beispiel 3 der Stärke III.

Innerhalb der Präparate befand sich die stärkste Gelatinaseaktivität jeweils an der Tumor/Stroma-Grenze sowie im tumornahen Stroma. An der Epidermis, die in diesem Fall wie oben erläutert zur Tumor-Stroma-Grenze zählt, fand sich ebenfalls eine starke Gelatinaseaktivität. Der Tumor selbst zeigte keine oder nur eine sehr geringe punktuelle Aktivität.

	Gelatinaseaktivität im Tumor	Gelatinaseaktivität Tumor-/Stroma-Grenze	Gelatinaseaktivität im tumornahen Stroma	Gelatinaseaktivität in der Epidermis
BLM (n=7)	5	7	6	7
Skme 128 (n=4)	0	4	4	4
B16 (n=3)	0	3	3	3
Kontrolle (n=1)	0	0	0	1

Tabelle 4.9: Analyse der Verteilung der proteolytischen Aktivität innerhalb der Präparate der Maus- Melanomproben mittels In situ Zymographie unter sauren Bedingungen : Die Hauptaktivität fand sich in allen Tumoren an der Tumor-Stroma-Grenze, die in diesem Fall die Epidermis mit einschließt. In der Kontrolle konnte nur eine leichte Aktivität in der Epidermis festgestellt werden.

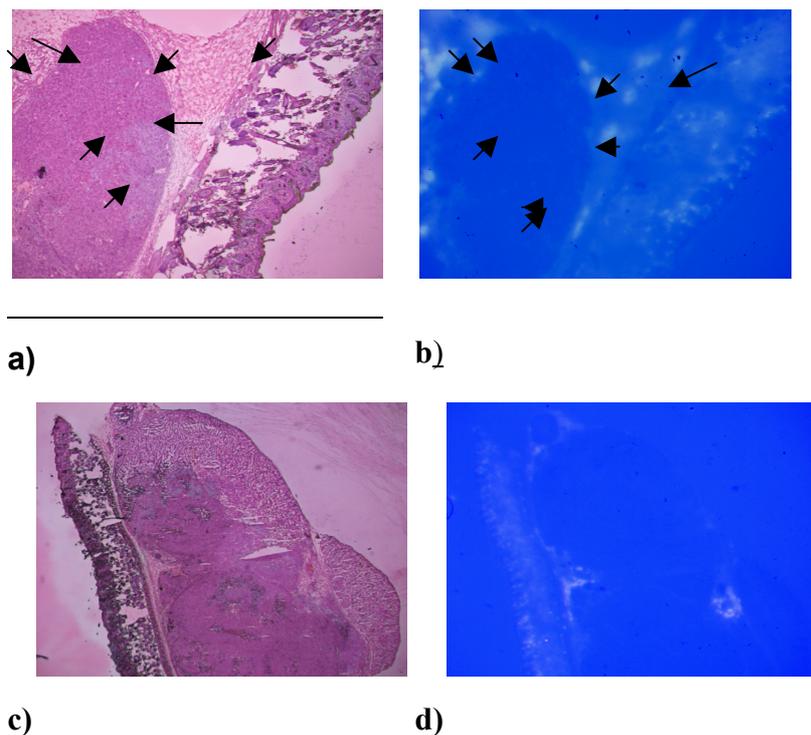


Fig. 4. 7: Beispiele von In Situ Zymographien unter sauren Bedingungen mit der Hauptlokalisation der Gelatinaseaktivität an der Invasionsfront der Tumoren bei Skmel 28-Tumoren

4.6. Analyse der gelatinolytischen Aktivität von Metalloproteinasen bei in vitro gesetzten Tumoren im Mausmodell mittels in situ Zymographien

Um die Aktivitätsprofile und zeitlichen Abläufe in der Aktivierung von Metalloproteinasen und Cathepsinen bei der Tumorausbreitung und Metastasierung vergleichen zu können, führten wir zusätzlich in situ Zymographien unter neutralen Bedingungen durch.

Unter diesen Bedingungen weisen Matrix Metalloproteinasen, nicht aber Cathepsine , ein pH Optimum und somit ihre maximale Enzymaktivität auf.

Hierbei zeigte sich bei den Zelllinien BLM und B16 F1 ein ähnliches Ergebnis wie für die Cathepsine. 71 % der BLM-Tumoren und 67% der B16F1 Tumoren wiesen eine Gelatinaseaktivität von III, die anderen Tumoren dieser Zelllinie eine Gelatinaseaktivität von II auf. Die an sich intermediär invasive Zelllinie Skmel 28 zeigte in allen Tumorproben eine Gelatinaseaktivität von III. Ebenso ergab die Auswertung der Proben

der Kontrollmaus eine Gelatinaseaktivität der Stärke III, die vor allem in der Epidermis lokalisiert war.

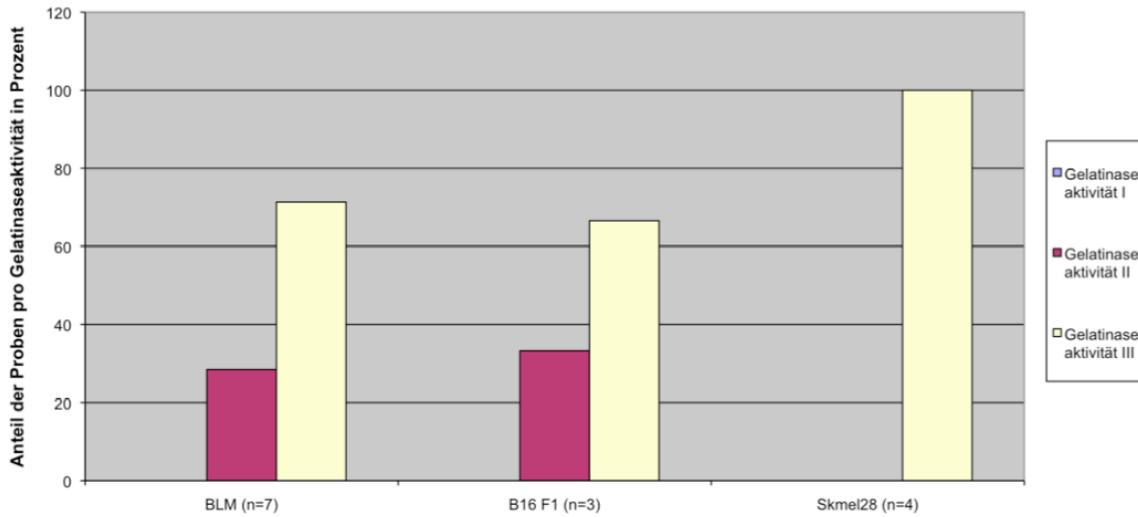
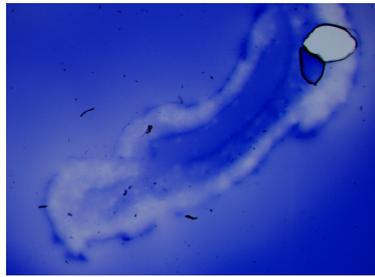
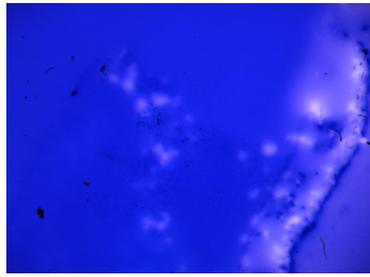


Abbildung 4.7: Quantifizierung der MMP - Konzentration bei in vitro gesetzten Melanomen im Scid Maus Modell mit den Zelllinien Skmel 28, BLM, MV3, B16F1 mittels In situ Zymographie unter neutralen Bedingungen : die Skmel28 Zellen zeigten in 100% eine Stärke von III, die BLM-Zellen in 71% eine Aktivität der Stärke III und in 29% der Stärke II, die B16F1 Zelllinie zeigte in 67% eine Aktivität von III und in 33% von II



a)



b)



c)

Fig.3.8.: Beispiele für In situ Zymographien unter neutralen Bedingungen:

Bild 1 zeigt eine Gelatinaseaktivität von III bei einem Hautpräparat der Kontrollmaus; Bild 2 zeigt ein Präparat der Skmel -Zellen ebenfalls mit der Stärke III und Bild 3 ein Präparat der Zelllinie BLM mit der Stärke II.

Zur Lokalisierung der höchsten Gelatinaseaktivitäten innerhalb der Präparate lassen sich folgende Angaben machen: Drei der Tumore der BLM-Zellen wiesen eine Aktivität im Tumor selbst auf, aber jeweils in einer geringeren Konzentration als an der Tumor-Stroma-

Grenze. Alle Tumoren zeigten starke Gelatinaseaktivitäten an der Tumor-Stroma-Grenze, die die Epidermis mit einschließt. Auch in der Tumorperipherie wurde bei 87% der Tumoren Degradationsaktivität gefunden. Eine Abhängigkeit der Lokalisation von der Invasivität der jeweiligen Tumorzelllinie konnte nicht beobachtet werden. Die Kontrollmaus zeigte ebenso wie unter sauren Bedingungen nur eine Gelatinolyse in der Epidermis.

	Gelatinaseaktivität im Tumor	Gelatinaseaktivität Tumor-/Stromagrenze	Gelatinaseaktivität im tumor nahen Stroma	Gelatinaseaktivität in der Epidermis
BLM (n=7)	3	7	5	7
Skmel28 (n=4)	0	4	4	4
B16 1 (n=3)	0	3	3	3
Kontrolle (n=1)	0	0	0	1

Tabelle 4. 10: Analyse der Verteilung der Metalloproteinasen-Konzentration innerhalb der Präparate der Maus- Melanomproben mittels In situ Zymographie unter neutralen Bedingungen: In allen Tumoren fand sich eine Aktivität an der Tumor-Stroma-Grenze sowie in der Epidermis. In der Tumorperipherie fand sich ebenfalls in 87% der Tumoren eine gelatinolytische Aktivität

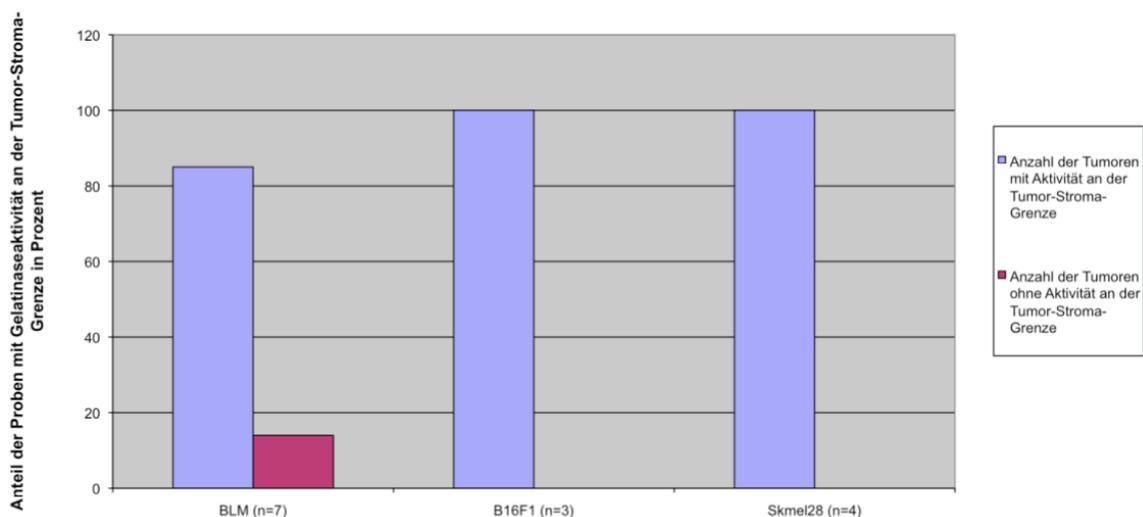
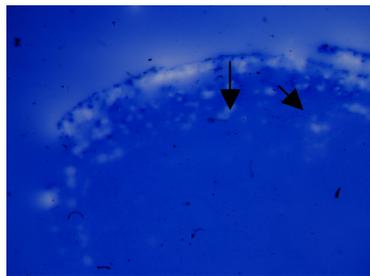
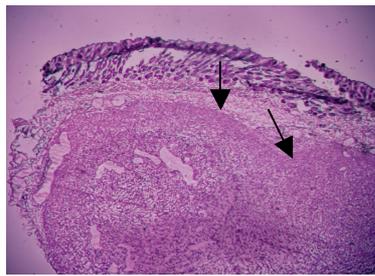
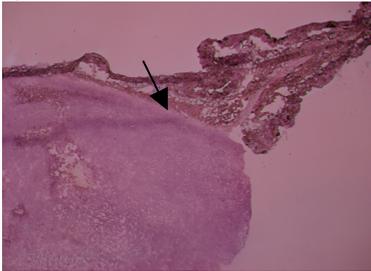


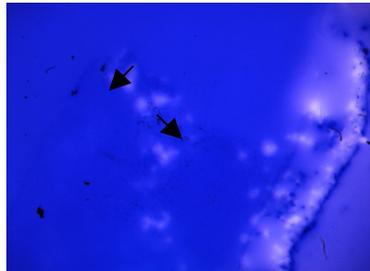
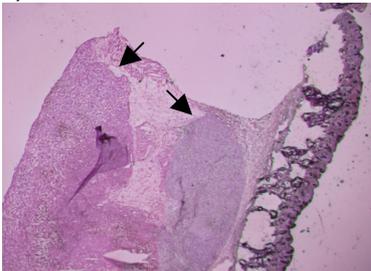
Abbildung 3.8: Quantifizierung der MMP- Konzentration innerhalb der Tumorfläche der humanen Melanomproben mittels In situ Zymographie unter neutralen Bedingungen: Mit Ausnahme eines BLM-Tumors fand sich in allen Tumoren eine Aktivität an der Tumor-Stroma Grenze.



a)



b)



c)

Fig. 3. 9.: Beispiele von In situ Zymographien unter neutralen Bedingungen mit der Hauptlokalisation der Gelatinaseaktivität an der Invasionsfront der Tumoren

5. Diskussion

Cathepsin B ist eine lysosomale Protease, die von Melanomzellen sezerniert werden kann und somit sowohl an intra- als auch an extrazellulären Proteinabbauprozessen beteiligt ist. (Dennhöfer R et al., 2003).

Erhöhte Synthese, Aktivität, extrazelluläre Sekretion und ein verändertes Verhältnis der Cathepsine zu ihren endogenen Inhibitoren können zu unkontrollierter Aktivität dieser Proteasen führen und werden aufgrund experimenteller und klinischer Studien mit pathologischen Vorgängen, wie der Invasion und Metastasierung maligner Tumore in Zusammenhang gebracht. Über die molekularen Regulationsmechanismen der Cathepsine, die zur erhöhten Tumordinvasion führen, ist jedoch bislang nur wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle von Cathepsin B für das invasive Wachstum des malignen Melanoms genauer zu charakterisieren. Wir arbeiteten heraus, in wieweit die Expression von Cathepsin B mit dem jeweiligen Metastasierungspotential verschiedener Melanomtypen, bzw. beim Mausmodell mit verschiedenen Melanomzelllinien korreliert und an welchen Lokalisationen in den Präparaten erhöhte Mengen und Aktivitäten von Cathepsin B nachgewiesen werden können. Hierdurch konnten wir auch zu einigen offenen Fragen die Zell-Matrix-Interaktion betreffend Stellung nehmen.

5.1 Analyse der Konzentration von Cathepsin B in Melanompräparaten mittels Immunhistochemie und der Korrelation mit der Invasivität der Melanome

5.1.1 Immunhistochemische Analyse von Cathepsin B und Korrelation mit der Invasivität des malignen Melanoms

Mit der Methode der Immunhistochemie wurde Cathepsin B in Präparaten von humanen Melanomen mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert und die Mengen dieser Protease mit der jeweiligen Invasivität der Tumoren verglichen.

Unsere Ergebnisse zeigten in benignen Pigmentnävi sehr geringe Cathepsin B-Mengen der Intensitätsstärke I. In malignen superfiziell spreitenden und nodulären Melanomen waren dagegen erhöhte Mengen dieser Protease nachweisbar. Innerhalb der aktuellen Stadieneinteilung nach AJCC der Melanome (seit April 2003 in Europa angewandt),

korrelierte die Höhe der Enzymmenge mit dem Tumorstadium. So fanden wir in der Gruppe der hochinvasiven Tumoren der Gruppe 3 (Klinische Stadien II b-IV) durchgehend eine hohe Konzentration von Cathepsin B mit einem Intensitätsscore von III, in der Gruppe 2 (Stadien I a-II b) fand sich in 56% ein Intensitätsscore von III, in 25% von II und in 19% von I.

Dieses Ergebnis unterstreicht einerseits die Bedeutung von Cathepsin B beim Übergang von benignen zu malignen Tumorformen, gleichzeitig aber auch die Abhängigkeit der Cathepsin B-Menge von der Ausdehnung der Tumoren in Millimeter und einer möglichen Ulzeration.

Bereits Campo E et al. (1994) konnten zeigen, dass sich über die immunhistologische Detektierung von Cathepsin B im kolorektalen Karzinom eine Voraussage für die Patientenüberlebensrate treffen lässt. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch für Gliome und Magenkarzinome (Koblinski JE et al., 2000) sowie für die murine B16 Melanomzelllinie (Sloane BF et al., 1981).

Diese Befunde weisen auf eine Korrelation zwischen dem Anstieg der Cathepsin B Konzentration und der Malignität der untersuchten Tumoren oder Tumorzelllinien hin. Durch Transfektion der Cathepsin B-Expression in der Tumorzelllinie B16 F1 konnten Szpaderska A et al. (2001), die Cathepsin B-Aktivität und gleichzeitig die Fähigkeit der Zellen in die extrazelluläre Matrix zu invadieren, um das 3-5 fache steigern.

Eine Korrelation der Cathepsin B-Expression mit der histologischen Klassifikation konnten verschiedene Autoren hingegen ausschließen (Campo E et al., 1994, Fröhlich E et al., 2001).

In unserer Arbeit zeigte sich ebenfalls keine Korrelation mit der histologischen Unterteilung in SSM und NNM, allerdings lag bei den von uns untersuchten Tumoren auch keine ausgeglichene Verteilung dieser beiden Gruppen vor.

Die beschriebene Erhöhung der Cathepsin B Konzentration in malignen Tumoren, abhängig von ihrer Malignität, lässt auf eine Ausschaltung oder Störung der Regulationsmechanismen für Cathepsin B schließen. Eine Veränderung der ersten Stufe im Produktionszyklus von Cathepsin B ist die Erhöhung der mRNA-Synthese. Sowohl an verschiedenen Tiermodellen, als auch an humanen Melanomen wurde bereits eine solche Erhöhung nachgewiesen (Quian F et al., 1989; Fröhlich E et al., 2001).

Die Regulationswege, die zu dieser Überexpression von Cathepsin B führen, sind noch nicht hinreichend untersucht. Wahrscheinlich spielt die Aktivierung der Cathepsin B – Promotor-Regionen eine wichtige Rolle (Frosch BA et al., 1999).

Weitere Möglichkeiten wären eine selektive Stabilisierung von Cathepsin B mRNA in Tumoren, Gene-Amplifikation und alternatives Splicing.

Buck MR et al. (1992) und Frosch BA et al. (1999) zeigten durch eine enzymatische Analyse von mikrodisszierten Arealen aus Kolon-, Mamma- Karzinomen und Glioblastomen, dass die Cathepsin B- Aktivität selektiv an der invasiven oder infiltrativen Seite dieser Tumoren lokalisiert war. Auch in den von uns untersuchten Präparaten der Immunhistologien maligner Melanome fanden sich die hauptsächlichlichen Enzymmengen des Cathepsin B an der Tumor-Stroma-Grenze der infiltrativen Seite der Tumoren sowie im tumornahen Stroma.

Diese Ergebnisse lassen auf ein Zusammenspiel des den Tumor umgebenden Bindegewebes mit den Tumorzellen hinsichtlich Bildung und Sekretion von Cathepsin B schließen.

Schon Koblinski JE et al. (2002) konnten zeigen, dass in Fibroblasten die Sekretion von Procathepsin B durch die Interaktion mit nativem Kollagen I induziert werden kann. Ebenso konnte in der Arbeitsgruppe von Prof. Mauch bei hochinvasiven MV3-Zellen eine erhöhte Cathepsin B Konzentration nach Kontakt mit Kollagen I nachgewiesen werden, Klose A et al. (2006).

Das Auftreten von hohen Enzymmengen im tumornahen Stroma legt weiterhin nahe, dass Tumorzellen nicht nur das peritumorale Stroma, sondern auch das tumorferne Bindegewebe modulieren können. Es muss davon ausgegangen werden, dass Cathepsin B in diesem Fall nicht von Tumorzellen, sondern von Zellen des EZM sekretiert wurde. In der Immunhistochemie konnte eine deutliche Färbung in Fibroblasten und Makrophagen im tumornahen Stroma detektiert werden. Diese erhöhten Proteasekonzentrationen könnten dadurch zustande kommen, dass Tumorzellen Signalstoffe an das umgebende Bindegewebe abgeben, wie es für die Metalloproteinasen bereits von verschiedenen Autoren gezeigt werden konnte (Zigrino P et al., 2005, Van den Oord JJ et al., 1997).

Die Expression hoher Cathepsin B –Mengen im tumorperipheren Stroma stellt ein zusätzliches Unterscheidungskriterium der malignen Melanome zu den Nävuszellnävus dar, die in diesem Bereich der Präparate keine erhöhten Cathepsin B-Mengen aufweisen. Aus diesem Grunde kann eine erhöhte Cathepsin B-Menge im tumornahen Stroma als Malignitätskriterium gewertet werden.

Ein weiterer von uns untersuchter Bereich war die Epidermis. Hier konnten wir nur in den direkt an den Tumor angrenzenden Bereichen Cathepsin B detektieren.

Cathepsin B scheint daher in den ersten Tumorausbreitungsstadien, dem Durchbruch der Basalmembran, eine Rolle zu spielen und durch Interaktion von Melanomzellen und Keratinozyten induziert zu werden.

5.1.2 Charakterisierung der Cathepsin B Synthese im Mausmodell

Im Gegensatz zu Invasionsmodellen, die auf Basalmembran - ähnlichen Matrices (Hendrix MJ et al., 1987) oder artifiziellen Haut-Äquivalenten (Meier et al., 1998) basieren, bietet das Mausmodell mit Scid Mäusen die Möglichkeit, die komplexen Vorgänge der Tumor-Stroma-Interaktion bei der Invasion und Metastasierung von malignen Melanomzelllinien zu untersuchen. In vorausgegangenen Studien wurde in der AG Mauch die Fähigkeit dieser Zellen, das Bindegewebe normaler Haut *in vitro* zu invadieren, nachgewiesen (Klose A et al., 2006). In diesem System wurden die zellulären Komponenten durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen der präparierten Haut abgetötet, so dass die Invasivität der Melanomzellen beurteilt werden konnte. Auch die Interaktionen des Tumorgewebes mit dem umgebenden Bindegewebe, vor allem an der Invasionsfront konnte in diesem System untersucht werden.

Die Analyse der Wachstumsgeschwindigkeit der Tumore im Mausmodell ergab das schnellste Wachstum und die höchste Eindringtiefe für die murine Zelllinie B16 F1, die von anderen Autoren bei *in vivo* Versuchen als niedrig invasiv eingestuft wurde (Quian F et al., 1989). Diese diskrepanten Befunde können dadurch erklärt werden, dass die Tumorzellen im Mausorganismus bessere Bedingungen zur Invasion und Metastasierung vorfanden. Dies lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass zwar das zelluläre Immunsystem der Mäuse durch genetische Manipulation selektiv ausgeschaltet wurde, jedoch die unspezifische Immunabwehr ausreichte, um menschliche Tumorzellen als Fremdgewebe zu erkennen und einen abgeschwächten Abstoßungsmechanismus zu induzieren. Alternativ könnten durch längere Kulturdauer über viele Passagen die hochinvasiven Melanomzellklone selektioniert worden sein und die bei diesen Untersuchungen verwendeten B16F1 Zellen nicht mehr der ursprünglich charakterisierten Zelllinie entsprechen. Die BLM- sowie die MV3 - Zellen zeigten als hochinvasive Zelllinien (Dennhofer R et al., 2003, Kurschat P et al., 2002) ebenfalls ein rasches Tumorstadium, während die Skmel 28 Zelllinie gemäß ihrer intermediär invasiven Einstufung (Klose A et al., 2004) sehr langsam in das Bindegewebe einwuchs. Bei der Beurteilung der Wachstumsgeschwindigkeit und der Tumorausbreitung im Bindegewebe muss berücksichtigt werden, dass es für die Tumoren keine Basalmembran mehr

zu überwinden galt, da diese aufgrund der intradermalen Injektion der Tumorzellen bereits durchbrochen worden war.

In unseren Untersuchungen der Immunhistochemien der Tumorproben des Mausmodells zeigten sich die stärksten Enzymmengen in den Tumoren der B16F1-Linie, die in allen Fällen einen Intensitätsscore von III aufwiesen. In der MV3- und der Skmel 28 - Linie fand sich in jeweils 50% eine Konzentration der Stärke II und I, während die BLM-Zellen nur in 43% eine Signalstärke II zeigten.

Somit erwiesen sich die BLM- und die MV3-Linie als hochinvasive Zelllinien in ihrer Cathepsin B Konzentration schwächer oder gleich stark im Vergleich mit den niedriginvasiven Zelllinien Skmel 28 und B16 F1.

Die Hautpräparate der Kontrollmaus zeigten im Vergleich mit den malignen Tumoren eine sehr schwache Färbung, so dass anhand der Cathepsin B-Mengen klar zwischen Tumor – und gesundem Gewebe abgegrenzt werden konnte.

Diese Ergebnisse der Immunhistologien im Mausmodell scheinen zunächst im Widerspruch zu unseren Ergebnissen der Immunhistologien der humanen Tumoren und zu den Darstellungen in der Literatur zu stehen.

Die Zelllinie B16F1 wurde von Quian T et al. (1989) als niedrig invasiv charakterisiert, fand aber, wie oben bereits beschrieben, optimale Wachstumsbedingungen vor und zeigte das stärkste und invasivste Wachstum aller eingesetzten Tumorzelllinien. Somit entsprach das Ergebnis ihrer hohen Cathepsin B-Konzentrationen in der Immunhistochemie in diesem Fall ihrem Wachstum und damit ihrer Invasivität.

Im Falle der Skmel 28 Linie befanden sich die niedrig invasiven Tumoren durch ihr langsames Wachstum, zum Zeitpunkt der Tötung der Mäuse in einem früheren Stadium der Tumordinvasion als die hochinvasiven, die ein viel rascheres Wachstum aufwiesen. Während der Tumordinvasion müssen die malignen Zellen verschiedene Barrieren, einschließlich des interstitiellen Bindegewebes überwinden. Klose A et al (2006) konnten zeigen, dass Cathepsin B gerade in diesen ersten Stadien eine wichtige Rolle spielt. Somit werden in diesem Stadium möglicherweise höhere Proteasenkonzentrationen benötigt als in späteren Stadien. Auch in der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass jüngere und damit zu diesem Zeitpunkt evt. schneller wachsende Tumoren eine höhere Cathepsin B - Aktivität aufweisen, als spätere Tumorstufen. So fanden Sloane et al. (1981) bei der Untersuchung von B16 F1- und F10 Melanomzellen die höchste Aktivität in subkutanen Tumoren mit einem Gewicht von weniger als 1g.

Eine weitere interessante Beobachtung wurde diesbezüglich in einer Studie von Murnane MF et al. (1991) gemacht. Sie fanden in kolorektalen Tumoren in den Dukes Stadien A und B gegenüber den späteren Phasen C und D erhöhte RNA-Mengen von Cathepsin B. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die Cathepsin B – Expression in Tumoren nicht nur von der Invasivität einer Zelllinie, sondern auch dem aktuellen lokalen Invasionsstadium abhängig ist.

Zum Vergleich mit den humanen Melanompräparaten bestimmten wir auch in den Mausmelanomen die Hauptlokalisation der Cathepsin B Mengen.

Mit Ausnahme eines BLM-Tumors fand sich der stärkste Intensitätsscore (III) in allen Tumoren an der Tumor-Stroma-Grenze und zwar sowohl zum tiefer gelegenen Bindegewebe, als auch zur Epidermis hin. Im Tumor selbst konnte jeweils nur ein punktuell oder schwaches Signal detektiert werden. Auch zeigte sich in den Präparaten der malignen Tumoren eine erhöhte Cathepsin B-Menge im tumornahen Stroma. In den Präparaten der Kontrollmaus konnte kein Cathepsin B detektiert werden.

Diese Ergebnisse unterstreichen die vielfältigen Interaktionen der Tumoren mit dem umgebenden Bindegewebe und verschiedene Funktionen des Cathepsin B in diesen Prozessen. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Invasion von Tumorzellen in das umgebende Gewebe durch verschiedene intra- und extrazellulär zelltypspezifische Funktionen des Cathepsin B gefördert wird (Premzl A et al., 2003, Sameni M et al., 2000, Szpaderska A and Frankfater A, 2001). Sameni M et al. (2000) konnten zeigen, dass die Brustkrebszelllinie BT549 intrazellulär Kollagen IV abbaut und diese Degradation Cathepsin B abhängig ist, wohingegen in BT20 Zellen das Kollagen IV extrazellulär abgebaut wird und neben extrazellulärem Cathepsin B auch die Anwesenheit aktiver Serin- und Metalloproteinasen erforderlich ist. Extrazelluläres Cathepsin B wird als Aktivator proteolytischer Kaskaden diskutiert, da es sowohl proPA als auch proMMP-3 aktivieren kann (Kobayashi H et al., 1991; Murphy BC et al., 1992). Mehrere Arbeitsgruppen konnten zudem zeigen, dass Tumorzellen Bestandteile der ECM durch Endozytose aufnehmen und intrazellulär abbauen können (Ahram M et al., 2000, Montcourrier P et al., 1990/1994). Extrazelluläres Cathepsin B kann aber auch direkt Basalmembranbestandteile, wie Kollagen IV und Laminin, degradieren (Buck M et al., 1992, Guinec N et al., 1990).

Weiterhin stellte sich die Frage ob es sich bei den von uns in der Immunhistochemie detektierten Cathepsin B um aktives, nicht inhibiertes Cathepsin B handelte.

Zur Klärung diese Fragestellungen wendeten wir nachfolgend die Methode der in situ Zymographie, mit der sich extrazelluläres, aktives Enzym darstellen lässt, an den bereits untersuchten Präparaten von humanen und murinen Melanomen an.

Der direkte Vergleich der Immunhistologie mit den in situ Zymographien ist nur eingeschränkt möglich, da immunhistochemisch lediglich das Enzym lokalisiert werden kann, während in der in situ Zymographie die Aktivität von der Anwesenheit möglicher Inhibitoren abhängt und auch intrazellulär lysosomale Cathepsine detektiert. Daher kann die tatsächliche Menge von aktivem Enzym in den Präparaten nur durch weitere Untersuchungen festgestellt werden.

5.2. Analyse der gelatinolytischen Aktivität von Cathepsin B in humanen und murinen Melanomen mittels In situ Zymographie und Korrelation mit der Invasivität der Tumore

Wenn Cathepsin B an der Tumorausbreitung und Metastasierung beteiligt ist, müssen wir von einem veränderten Verhältnis der Cathepsine zu ihren endogenen Inhibitoren ausgehen, und damit von einer erhöhten Menge an aktivem extrazellulärem Enzym.

Bereits Denhöfer R et al. (2003) konnten zeigen, dass sich bei niedrig invasiven 530 Zellen im Modellversuch mit DDD (dead deepidermized dermis) Cath B nur intrazellulär nachweisen ließ, während bei den hoch invasiven BLM-Zellen Cath B sowohl intra- als auch extrazellulär nachgewiesen werden konnte. In diesen in vitro Analysen korrelierte die Menge des extrazellulären Enzyms mit der Malignität der Melanomzellen.

In den von uns durchgeführten in situ Zymographien fanden sich die höchsten Gelatinaseaktivitäten und somit die höchsten Konzentrationen an aktivem, extrazellulärem Cathepsin in der Gruppe 3, den Melanomen mit der höchsten Invasivität (Stadium IIB-IV). Während sich in der Gruppe 3 mit 83% eine Aktivität von III zeigte fanden wir in der Gruppe der intermediärinvasiven Tumoren (Stadium Ia-IIb) in 38% eine Aktivität von III, in 50% von II und in 13% von I. In der Gruppe der 1 fand sich bei 3 Tumoren jede der drei Stärken der gelatinolytischen Aktivität einmal.

Somit konnten wir im Vergleich mit den immunhistologischen Analysen bestätigen, dass nicht nur die Gesamtmenge von Cathepsin in malignen Tumoren erhöht ist und mit der Malignität korreliert, sondern, dass es sich hierbei auch um aktives,

nicht inhibiertes Enzym handelt, welches sich höchstwahrscheinlich außerhalb der Lysosomen der Zelle im Extrazellulärraum befindet. Wie das Ergebnis der NZN zu beurteilen ist, bleibt aufgrund der geringen Probenzahl derzeit ungeklärt.

Dies führt zu der Frage, wie es zu diesem erhöhten Vorkommen von aktivem Cathepsin außerhalb von Lysosomen kommt, da dieses Enzym, wie in der Einleitung beschrieben, normalerweise erst im sauren Milieu der Lysosomen aktiviert wird. Hier kommen zwei Möglichkeiten in Betracht; entweder verschmelzen die Lysosomen mit der Zelloberfläche und sekretieren das Enzym, oder Cathepsin gelangt über veränderte Transportwege als Enzymvorstufe zur Zelloberfläche und wird erst außerhalb der Zelle aktiviert. Für beide Theorien gibt es Hinweise in der Literatur.

Kepler D and Sloane BF (1996) konnten zeigen, dass Cath.B enthaltende Vesikel in B16 Melanom-Zellen unter sauren Bedingungen zur Zelloberfläche wandern und dort das Enzym freisetzen.

An kolorektalen Karzinomen fand man eine Verlagerung von Cathepsin B enthaltenden Vesikeln in die Zellperipherie, die parallel zu der Malignität des Tumors verlief.

Die Mechanismen, die zu dieser Verlagerung der Lysosomen in die Peripherie führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Eine wichtige Rolle scheint jedoch der pH-Wert zu spielen, der in Tumoren häufig niedriger ist als in normalem Gewebe (Dennhöfer R et al., 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein leicht saurer pH-Wert die Ausschüttung von reifem, aktivem Cath B aus invasiven Zellen triggern kann (Rozhin J et al., 1994).

Die von Heuser et al. beobachtete Bewegung der Lysosomen bei angesäuerten Zellen folgte der Ausrichtung der Mikrotubuli in diesen Zellen und fand nicht statt, wenn die Mikrotubuli vor der Ansäuerung durch Nocodazole depolymerisiert wurden. Nachfolgende Alkalisierung der Zellen durch eine Acetatreduzierung führte zu einer schnellen Rückkehr der Lysosomen zum Zellzentrum (Heuser J et al.; 1998).

Eine weitere Möglichkeit, wie es zu einem Austreten von reifen Cathepsin aus den Lysosomen kommen könnte, ist der schnelle Zellumsatz in Tumoren, der auch zu vermehrten Apoptosen führt. Diese Proteasen könnten dann im Cytoplasma z.B. Caspasen aktivieren die ihrerseits wiederum Apoptose induzieren (Soengas MS et al., 2003).

Interessanterweise wird Cath. B im Gegensatz zu z.B. Cath. D auch von solchen Zellen vermehrt sekretiert, die keinen Anstieg des m RNA Levels zeigen (Moin K et al., 1998). Hieraus kann man den Schluss ziehen, dass nicht nur eine Erhöhung der Enzymkonzentration, sondern auch z. B. ein veränderter Transportweg des Cathepsin B

innerhalb der Zelle für die vermehrte Sekretion von Cath. B verantwortlich sein könnte.

Lorenzo K et al. (2000) konnten aufzeigen, dass der intrazelluläre Transport von Cathepsinen in die Lysosomen von der Präsenz des M6P-Rezeptors (Mannose-6-Phosphat) in der karbohydratischen Hälfte der Proteinase abhängt. Fehlt beispielsweise aufgrund eines hereditären Enzymdefekts bei einer eigentlich lysosomalen Hydrolyse der entsprechende Mannose-6-Phosphatrest, so wird dieses Protein nicht in die Lysosomen aufgenommen, sondern in großem Umfang von den entsprechenden Zellen sezerniert.

Durch eine vermehrte Produktion von Cathepsin, wie sie bei malignen Tumoren und auch beim malignen Melanom vorliegt, setzt zudem durch die Überproduktion der lysosomalen Enzyme eine Überlastung des Mannose-6-phosphat-Weges ein, die zu einer erhöhten Sekretion von Pro-Cathepsin führen kann. Dies konnte für Cathepsin D bereits gezeigt werden.

Berquin IM et al. konnten in malignen Tumoren Transkriptionsvarianten in Exon 3 aufzeigen. Ein auf diese Weise verändertes Protein würde nicht zum RER (rough endoplasmic reticulum) transportiert werden und damit auch nicht zum vesikulären Kompartiment. Dementsprechend könnte eine so geartete Transkriptionsänderung von Cathepsin ebenfalls zu einer erhöhten Konzentration im Cytoplasma führen.

Linebaugh BE et al. (1999) gehen hingegen von einem retrograden Transport und einer calciumregulierten Exozytose aus den Lysosomen aus (Rodriguez A et al. 1997). Calcium-abhängige Exozytose von sekretorischen Lysosomen wurde auch in dendritischen Zellen gefunden und ist dort durch spezifische Bindungen dieser Zellen mit CD 8T⁺-Zellen induziert. Dies führt zu einer polarisierten Sekretion von IL-1 β und aktivem Cathepsin D in Richtung der aktiven T-Lymphozyten (Gardella S et al., 2001).

Durch veränderte Transportmechanismen ausgeschleustes Procathepsin B muss außerhalb der Zelle aktiviert werden. Dies könnte wieder auf die pH-Wert-Änderungen in malignen Tumoren zurückzuführen sein, da vor allem die exopeptische Aktivität von Cathepsin B bei einem sauren pH-Wert unterstützt wird.

Darüberhinaus fand sich eine autokatalytische Aktivierung von Cathepsin (Rozman J et al., 1999, Turk B et al., 2000), sowie eine Aktivierung von extrazellulär sezerniertem Procathepsin B durch Cathepsin D und G, tPA, uPa sowie verschiedene Elastasen (Dalet-Fumeron V et al., 1996/1993; van der Stappen JW et al., 1996). Klose et al. konnten eine Aktivierung von extrazellulärem Cathepsin B durch MMPs nachweisen

(Klose A et al., 2004). Diese Daten legen außerdem nahe, dass MMPs nur bei Zell-Kollagen-Kontakt zur extrazellulären Aktivierung von Cathepsin B führen.

Diese Interaktion zwischen Tumorzellen, Tumor - assoziierten Zellen inklusive Fibroblasten, infiltrierenden Makrophagen, etc. scheinen eine Hauptrolle in der Regulation der Proteasenexpression und-Aktivierung zu spielen.

Gärtner HF et al. (1992) konnten ein erhöhtes Tumorwachstum von Melanomzellen nach Ko-Injektion mit Fibroblasten in Nacktmäuse nachweisen, welches nur bei gleichzeitiger Injektion dieser Zelltypen, nicht aber bei getrennter Injektion an verschiedenen Stellen beobachtet wurde. Diese Beobachtung weist auf die wesentliche Rolle aktivierter Fibroblasten bei der Tumordinvasion hin. Podgorski I et al. (2005) zeigten ebenso wie Klose A et al (2005), dass die Level der Cathepsin B-Konzentration der Tumorzellen durch die Interaktion mit Kollagen 1 anstiegen.

Aufgrund dieser Hinweise auf vielfältige Interaktionen von Tumorzellen und dem Bindegewebe bei der Ausschüttung von aktivem Cathepsin B erwarteten wir, die Lokalisation der gelatinolytischen Aktivität von Cathepsin B innerhalb der Schnitte vor allem an der Invasionsfront der Tumoren zu finden. Ein solches Ergebnis bestätigte sich bei allen untersuchten humanen Tumoren.

Auch im tumorperipheren Stroma konnte bei 63% der Gruppe II und bei 83% der Gruppe III eine starke gelatinolytische Aktivität festgestellt werden. Darüberhinaus wurde die Aktivität von Cathepsin in der tumornahen Epidermis bestimmt; im Gegensatz zu der an den Tumor angrenzenden Epidermis konnte hier keine Cathepsin Aktivität detektiert werden.

In der Gruppe der Nävuszellnävi fand sich die gelatinolytische Aktivität ebenfalls hauptsächlich an der Tumor-Stroma-Grenze, im Gegensatz zu den malignen Tumoren jedoch nicht im tumorperipheren Stroma. Unklar ist derzeit, welches Enzym für die Gelatinolyse verantwortlich ist, da Cathepsin B in nur sehr geringen Mengen histologisch nachweisbar war.

Ebenso wie an den humanen Tumoren führten wir auch an den Proben aus den im Mausmodell entstandenen Tumoren in situ Zymographien durch, um den Anteil des aktiv sezernierten Enzyms detektieren und in Bezug zur Invasivität der jeweiligen Tumorzelllinien beurteilen zu können.

Die am invasivsten gewachsene Tumorzelllinie B16 F1 wies mit einer durchgängigen gelatinolytischen Aktivität von III die höchste Konzentration an aktivem Cathepsin innerhalb der Präparate auf. Die Skmel28-Zellen zeigten eine gleiche Verteilung von

starker und intermediärer Aktivität, während bei den BLM-Zellen mit 71% die starke Aktivität überwog. In den Hautpräparaten der Kontrollmaus zeigte sich eine deutlich schwächere Aktivität, die sehr diffus ausgeprägt war und keiner bestimmten Struktur zugeordnet werden konnte.

Diese Befunde bestätigen die Erwartungen aufgrund der Literatur und lassen eine bessere Interpretation unserer Ergebnisse der Immunhistologien zu. In der *in situ* Zymographie korrelierte im Gegensatz zu den Immunhistochemien die Menge des detektierten Enzyms bei den Skmel 28-Zellen mit der Malignität dieser Tumorzelllinie, da in der Immunhistologie relativ wenig Cathepsin B nachgewiesen werden konnte.

Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass in der Immunhistochemie die Gesamtkonzentration des Enzyms nachgewiesen wird, während bei der *in situ* Zymographie nur das aktive Enzym sichtbar wird. In den Skmel 28-Tumoren läge demnach eine hohe Enzymkonzentration vor, die Enzyme wären aber größtenteils inhibiert, während sie in den höher malignen Tumoren vor allem in ihrer aktiven Form vorlägen.

Ein anderer Ansatz wäre es, die hohe gelatinolytische Aktivität durch den Nachweis anderer, von uns in der Immunhistologie nicht untersuchter Cathepsine zu erklären.

Die Lokalisation der Hauptgelatinaseaktivität zeigte sich wie bei den humanen Tumoren vor allem an der Invasionslinie gegenüber der Extrazellulären Matrix sowie im tumornahen Stroma.

5.3. Analyse der Gelatinaseaktivität von Metalloproteinasen in humanen und murinen Melanomen mittels *In situ* Zymographie in Bezugnahme auf die Invasivität der Melanome

Da die Metalloproteinasen neben der eigenen direkten proteolytischen Funktion, die sie für Tumorausbreitung und -metastasierung haben, auch eine Rolle in der Aktivierung von Cathepsin B spielen (Klose A et al., 2006), untersuchten wir sowohl die Proben der humanen Tumoren, als auch die der Mäuse mittels *in situ* Zymographie unter neutralen Bedingungen, um aktive Metalloproteinasen zu detektieren und diese Ergebnisse zu denen der Cathepsine in Relation zu setzen.

Bei der Lokalisation der Aktivität der Metalloproteinasen zeigte sich eine ähnliche Verteilung wie für die Cathepsine. Die Aktivität war v.a. peritumoral, an der Tumor-/Stroma-Grenze lokalisiert, während im Tumor selbst nur geringe Aktivitäten

beobachtet wurden. Diese Befunde bestätigen frühere Ergebnisse der AG Mauch (Kurschat et al; 2002) und anderer Autoren (Walker RA and Woolley DE, 1999), die die Hauptaktivität der Gelatinolyse durch Matrix Metalloproteinasen in der situ Zymographie an der Invasionsfront des Tumors lokalisierten. In einer weiteren Studie konnte in der AG Mauch gezeigt werden, dass die MMP-2-Sekretion von Melanomzellen durch den Kontakt mit nativem Typ I Kollagen-Fibrillen induziert wurde (Kurschat P et al., 1999). Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung von Tumor-Matrix-Interaktion bei der Regulation der Synthese nicht nur der Cathepsine, sondern auch der Metalloproteinasen.

Bei der Beurteilung der Stärke der Gelatinolyse in Beziehung zur Malignität der Tumore fiel allerdings ein Unterschied zwischen den Metalloproteinasen und den Cathepsinen auf. Während wie oben beschrieben im Falle der Cathepsine die Stärke der Aktivität mit der Malignität korrelierte, zeigten NZNs eine starke Metalloproteinasen-Aktivität im peritumoralen Bindegewebe, die in 2 von 3 Tumoren die Stärke III aufwies, während in der Gruppe 3, den stark invasiven Tumoren in keinem Fall eine Aktivität von III, sondern nur eine mittlere oder schwache Aktivität nachgewiesen wurde. In ähnlicher Weise wurde im Mausmodell in den Tumoren der intermediär invasiven Zelllinie Skmel28 die stärkste Aktivität unter den untersuchten Zelllinien mit 100% der Stärke 3 nachgewiesen, während die BLM-Zellen nur in 71% diese Stärke aufwiesen. Auch in der Haut der Kontrollmaus, die bei der Untersuchung der Cathepsine keine oder nur eine geringe Aktivität gezeigt hatte, wurde eine Aktivitätsstärke von 3 nachgewiesen. Diese Befunde legen nahe, dass Metalloproteinasen eine wichtige Bedeutung im Umbau des Bindegewebes zukommt, während sezernierte Cathepsine bei pathologischen Vorgängen wesentlich sind. Allerdings wurden in dieser Arbeit lediglich drei Nävi, sowie eine Kontrollmaus untersucht, so dass keine definitiven Aussagen getroffen werden können.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten Vaisanen A et al. (1996) durch eine immunhistologische Färbung an Melanomen zeigen, dass die MMP-2-Expression von den benignen NZN über die dysplastischen Nävi zum invasiven Melanom anstieg und die Entwicklung einer metastatischen Erkrankung mit der Intensität der MMP-2-Färbung korreliert werden konnte. Allerdings wurde in dieser Arbeit lediglich ein immunhistologischer Nachweis geführt, der im Gegensatz zur in situ Zymographie keine Aussage über die Aktivität des Enzyms treffen kann.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Fähigkeit von A 2058-Melanomzellen, rekonstruierte Barrieren wie z.B. Matrigel zu invadieren durch Inhibition von MMP-2 mit spezifischen Antikörpern reduziert wurde (Hoyhtya M. et al., 1990). Dies könnte jedoch auch auf die Blockade der Aktivierung der Cathepsine durch MMPs zurückzuführen sein, wie dies von Klose A et al. (2006) postuliert wird. Eine Beobachtung, die unsere Resultate unterstützt, wurde von Kamiya N et al. (2003) publiziert. Diese Gruppe konnte mit der Methode der *In situ* Zymographie eine signifikante Korrelation zwischen der Intensität von MMP-Gelatinase-Aktivität und der Tumorgröße, dem Tumor-Grading und der Gefäßinvasion feststellen, jedoch keine mit dem histologischen Typ, dem Tumor-Staging oder dem metastatischen Status. Kuivanen T et al. (2005) konnten in einer Versuchsreihe mit MMP-21 an Melanomen nachweisen, dass diese Proteasen häufiger in frühen Stadien der Tumoren hochreguliert wurden, die noch keine Metastasierung zeigten, als in metastasierten Melanomen. Diese Befunde stehen in Einklang mit den hier dargestellten Ergebnissen, dass die Intensität der Gelatinolyse nicht nur mit der Malignität eines Tumors, sondern dem aktuellen Wachstumszustand des jeweiligen Tumors korreliert und die Metalloproteasen möglicherweise nur temporär, wie z.B. während der Penetration der Basalmembran exprimiert werden. So wurde auch in der AG Mauch in Melanommetastasen eine MMP2-Aktivierung gefunden, die der von niedriginvasiven Melanomzellen ähnlich ist. Ein Erklärungsansatz hierfür wäre, dass die Zellen ihre proteolytische Aktivität im Laufe der Tumorprogression den jeweils aktuellen Bedürfnissen anpassen, indem die Aktivität bestimmter Enzyme induziert und die anderer Enzyme herabreguliert wird. Auf der anderen Seite müssen auch mögliche Fehlerquellen der Methode der *in situ* Zymographie erwähnt werden, die abweichende Ergebnisse erklären könnten. Mit dieser Methode kann die Lokalisation von aktivem proteolytischem Enzym in einem Präparatschnitt anhand von Gelatinolyse bestimmt werden. Obwohl durch Veränderungen des pH-Wertes unterschiedliche Familien von Proteasen wie Metalloproteinasen und Cathepsine differenziert werden, stellt die hier eingesetzte Gelatine ein Substrat mit geringer Spezifität dar und kann von anderen Mitgliedern dieser Enzymfamilie wie z.B. Cathepsin D oder M degradiert werden, deren Expression in Melanomen bisher nicht untersucht wurde. Durch einen definierten pH-Wert und Verwendung zusätzlicher Substrate könnte die Gruppe der aktiven Enzyme weiter eingegrenzt werden, so dass man schließlich davon ausgehen kann, je ein bestimmtes Enzym zu beobachten. Eine definitive Aussage kann aber erst dann getroffen werden, wenn das jeweilige

Enzym in einem weiteren Schritt mit einem spezifischen Inhibitor blockiert wird, und dann keine weitere Gelatinolyse beobachtet werden kann. Dieser Schritt wurde in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt, so dass man nicht mit letzter Sicherheit bestimmen kann, welches Enzym wirklich dargestellt wurde.

6. Ausblick

Wie in dieser Arbeit anhand der In situ Zymographie und der Immunhistochemie gezeigt werden konnte, weist das Maligne Melanom eine vermehrte Cathepsin B Expression und proteolytische Aktivität auf, die mit dem invasiven Phänotyp der Melanomzellen korreliert und in engem Zusammenhang mit den Reaktionen des umgebenden Bindegewebes zu sehen ist.

Die Bestimmung von Cathepsinen mittels in situ Zymographie könnte zukünftig eine diagnostisch-prognostische und schließlich durch Einsatz spezifischer Inhibitoren auch eine therapeutische Bedeutung erlangen. Allerdings müssen gerade für eine therapeutische Anwendung noch offene Fragen der genauen Interaktion der verschiedenen proteolytischen Enzyme bei der Tumorausbreitung beantwortet werden.

Ein interessanter Ansatz für eine diagnostisch-prognostische Anwendung wurde bereits von Ebert MP et al. (2005). beschrieben. Bei der Untersuchung von Patientenserum von Magenkarzinompatienten auf Cathepsin B zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Serum-Level bei Karzinompatienten gegenüber Gesunden, sowie in Magenkarzinomen vom diffusen Typ gegenüber Magenkarzinomen vom intestinalen Typ.

So weit uns bekannt ist liegt derzeit noch keine vergleichbar Arbeit mit Seren von Patienten mit malignem Melanom vor.

7. Zusammenfassung und Abstract

Eine fundamentale Voraussetzung für die Metastasierung von Tumorzellen ist ihre Fähigkeit, sich aus dem Primärtumor zu lösen und verschiedene strukturelle und zelluläre Barrieren zu überwinden. Dies wird unter anderem durch die Abgabe von verschiedenen Proteasen durch den Tumor oder die Aktivierung anderer Zellen zur Proteasenausschüttung bewirkt. Obwohl es eine Charakteristik von Tumorzellen darstellt, dass die Regulation und im Besonderen die Proliferation unabhängig vom Einfluss der Umwelt verlaufen, gibt es vielfältige Interaktionen zwischen Tumorzellen und umgebendem Gewebe. So findet man erhöhte Konzentrationen verschiedener Proteasen v.a. an der Invasionsfront der Tumoren. Cathepsin B ist eine lysosomale Protease, die von Melanomzellen sezerniert werden kann und sowohl an intra- als auch an extrazellulären Proteinabbauprozessen beteiligt ist. Über die molekularen Regulationsmechanismen der Cathepsine, die zur erhöhten Tumordinvasion führen, ist jedoch bislang nur wenig bekannt. In dieser Dissertation wurde daher der Frage nachgegangen, in wieweit die Expression von Cathepsin B mit dem jeweiligen Metastasierungspotential verschiedener Melanotypen, bzw. beim Mausmodell mit verschiedenen Melanomzelllinien korreliert und an welchen Lokalisationen in den Präparaten erhöhte Mengen und Aktivitäten von Cathepsin B nachgewiesen werden können. Wie in dieser Arbeit anhand der In situ Zymographie und der Immunhistochemie gezeigt werden konnte, weist das Maligne Melanom eine vermehrte Cathepsin B Expression und proteolytische Aktivität auf, die mit dem invasiven Phänotyp der Melanomzellen korreliert und in engem Zusammenhang mit den Reaktionen des umgebenden Bindegewebes zu sehen ist. Im Besonderen mit der Methode der In situ Zymographie konnte aufgezeigt werden, dass sich die Hauptaktivität von Cathepsin B vor allem in hochinvasiven Tumoren am Übergang von Tumor zu Bindegewebe und damit an der Tumordinvasionsfront sowie im tumornahen Stroma findet. In einem weiteren Schritt beschäftigt sich diese Arbeit mit einer möglichen Interaktion von Metalloproteinasen mit Cathepsinen bei der Ausbreitung und Metastasierung von Melanomen. Hier fanden wir Hinweise auf eine zeitlich gestaffelte Hochregulierung der verschiedenen Enzymklassen. Metalloproteinasen scheinen vor allem in den ersten Stadien der Tumorausbreitung eine Rolle zu spielen, während Cathepsine auch in späteren Stadien der Metastasierung bedeutsam zu sein scheinen. Die Bestimmung von Cathepsinen mittels in situ Zymographie könnte zukünftig eine diagnostisch-prognostische und schließlich durch Einsatz spezifischer Inhibitoren auch eine therapeutische Bedeutung erlangen.

8. Literaturverzeichnis

1. Ahram M, Sameni M, Qiu RG, Linebaugh B, Kirn D, Sloane BF. (2000). Rac1-induced endocytosis is associated with intracellular proteolysis during migration through a three-dimensional matrix. *Exp Cell Res.* Nov 1. 260(2):292-303
2. AJCC, American Joint Committee Cancer staging Manual 6th edn New York Springer Verlag, 2002
3. Almeida PC, Nantes IL, Chagas JR, Rizzi CCA, Faljoni-Alario A, Carmona E, Juliano L, Nader HB, Tersariol LS (2001). Cathepsin B activity regulation. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 276. No.2 Issue of January 12. pp 944-951
4. Andreasen PA, Egelund R, and Peterson HH (2000). The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci.* 57:25-40
5. Andrews NW (2000). Regulated secretion of conventional lysosomes. Review. *Trends Cell Biol.* Aug. 10 (8): 316-21
6. Armstrong BK (2004). Epidemiologie of cutaneous melanoma and current trends. In: Thompson JF, Morton DL, Kroon BR (ed). *Textbook of Melanoma.* London : Martin Dunitz 65-80
7. Armstrong BK, Krickler A (2001). The epidemiologie of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B.* 63:8-18
8. Beddingfield FC (2003). The melanoma epidemic: res ipsa loquitur. 3rd. *Oncologist.* 8:459-65
9. Berquin IM and Sloane BF (1996). Cathepsin B expression in human tumors. *Adv Exp Med Biol, Review,* 389:281-94
10. Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, Bergman W, Bishop JN, Bressac-de Pailletres B, Chompret A, Ghiorzo P, Gruis N, Hansson J, Harland M, Hayward N, Holland EA, Mann GJ, Mantelli M, Nancarrow D, Platz A, Tucker MA, Melanoma Genetics Consortium (2002). Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for Melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 94: 894:903
11. Bishop JA, Wachsmuth RC, Harland M, Bataille V, Pinney E, Mac KP, Baglietto L, Cuzick J, Bishop DT (2000). Genotype/ phenotype and penetrance studies in mela-

- noma families with germline CDKN2A mutations. *J Invest Dermatol.* Jan; 114 (1):28-33
12. Bjornland K, Buo L, Kjonniksen, Lersen M, Fodstad , Johansen HAT, Aasen AO (1996). Cysteine proteinase inhibitors reduce malignant melanoma cell invasion in vitro. *Anticancer Research.* 16:1627-1632
 13. Boike G, Lah T, Sloane BF, Rozhin J, Honn K, Guirguis R, Stracke ML, Liotta LA, Schiffmann E (1991). A possible role for Cysteine proteinase and its inhibitors in motility of malignant melanoma and other tumour cells. *Melanoma Research.* 1 pp. 333-340
 14. Brown TJ, Nelson BR (1999). Malignant melanoma : A clinical review. *Cutis.* 63: 275-78, 281-84
 15. Buck MR, Darustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF (1992). Degradation of extracellular-matrix proteins by human Cathepsin B from normal and tumor tissues. *Biochem. J.* 282, 273-278
 16. Chan SJ, San Segundo B, McCormick MB, Steiner DF (1986). Nucleotide and predicted amino acid sequences of cloned human and mouse Preprocathepsin B c DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83:7721-7725
 17. Campo E, Munoz J, Miquel R, Palacin A, Cardesa A, Sloane BF, Emmert- Buck M (1994). Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival. *Amer J Pathol.* 145:1285-90
 18. Cao L, Taggart RT, Berquin IM, Moin K, Fong D, Sloane BF (1994). Human gastric adenocarcinoma cathepsin B; isolation and sequencing of full-length cDNAs and polymorphisms of the gene. *Gene.* 139:163-9
 19. Casula M, Colombino M, Satta MP, Cossu A, Ascierto PA, Bianchi-Scarrà G, Castiglia D, Budroni M, Rozzo C, Manca A, Lissia A, Carboni A, Petretto E, Satriano SM, Botti G, Mantelli M, Ghiorzo P, Stratton MR, Tanda F, Palmieri G, Italian Melanoma Intergroup Study (2004). BRAF gene is somatically mutated but does not make a major contribution to malignant melanoma susceptibility: The Italian Melanoma Intergroup Study. *J Clin Oncol.* 22: 286-9
 20. Cavallo-Medved D and Sloane BF (2003). Cell-surface Cathepsin B: Understanding

- its functional significance. *Current Topics in Developmental Biology*. Vol. 54. 313-341
21. Chapman HA, Riese RJ, Guo-Ping Shi (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* 59:63-88
 22. Cochran AJ, Morton DL (1982). Melanoma from unknown primary site and amelanotic melanoma. *Senin Oncol.* 9: 442-47
 23. Dalet-Fumeron V, Boudjennah L, Pagano M (1996). Competition between plasminogen and Procathepsin B as a probe to demonstrate the in vitro activation of Procathepsin B by the Tissue Plasminogen Activator. *Arch Biochem Biophys.* 335 :351-7
 24. Dalet-Fumeron V, Guinec N, Oagano M (1993). In vitro activation of Procathepsin B by three serine proteinases: Leucocyte elastase, Cathepsin G and the Urokinase-Type Plasminogen Activator. *FEBS Lett.* 332:251-4
 25. Danen EH, De Vries TJ, Morandini R, Ghanem GG, Ruitter DJ, Van Muijen GN (1996). E-cadherin expression in human melanoma. *Melanoma Res.* 6:127-31
 26. Denhöfer R, Kurschat P, Zigrino P, Klose A, Bosserhoff A, Van Muijen G, Krieg T, Mauch C, Hunzelmann N (2003). Invasion of melanoma cells into dermal connective tissue in vitro: Evidence for an important role of cysteine proteases. *Int.J.Cancer:*106, 316-323
 27. Duffy MJ (1996). Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin Cancer Res.* 2 :613-8
 28. Duffy MJ, Lynn DJ, Lloyd AT, and O'Shea CM (2003). The ADAMs family of proteins : From basic studies to potential clinical applications. *Thromb Haemost.* 89 :622-31
 29. Ebert MP, Krüger S, Fogeron ML, Lamer S, Chen J, Pross M, Schulz HU, Lage H, Heim S, Roessner A, Malfertheiner P, Rocken C (2005). Overexpression of Cathepsin B in gastric cancer identified by proteome analysis. *Proteomics.* 5, 1693-1704
 30. Eigentler TK, Caroli UM, Radny P, Garbe C (2003). Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. *Lancet Oncol.* 4:748.59

31. Elwood JM, Jopson J (1997). Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer*. 73:198-203
32. Felding-Habermann B, Mueller BM, Romerdahl CA, and Cheresch DA (1992). Involvement of integrin alpha V gene expression in human melanoma tumorigenicity. *J Clin Invest*. 89:2018-22
33. Fong D, Chan MMY, Hseih WT, Menninger JC, Ward DC (1992). Confirmation of the human Cathepsin B gene (CTBS) assignment to chromosome 8. *Hum Genet*. 89: 10-12
34. Frederiks W, Mook O (2004). Metabolic Mapping of Proteinase Activity with emphasis on In Situ Zymography of gelatinases: Review and Protocols. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. Volume 52(6): 711-722
35. Friedman RL, Rigel DS, Kopf AW (1985). Early detection of malignant melanoma: The role of physical examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin*. 35:130-51
36. Fröhlich E, Schlagenhauff B, Möhrle M, Weber E, Klessen C, Rassner G (2001). Activity, expression and transkription rate of the Cathepsins B,D,H and L in cutaneous malignant melanoma. *American Cancer Society. Cancer Mar*. 1;91 (5):972-82
37. Frosch BA, Berquin I, Emmert-Buck MR, Moin K, Sloane BF (1999). Molecular regulation, membrane association and secretion of tumor Cathepsin B. *APMIS*. 107:28-37
38. Gaertner HF, Rose K, Cotton R, Timms D, Camble R, Offord RE (1992). Construction of protein analogues by site-specific condensation of unprotected fragments. *Bioconjug Chem*. May-June, 3(3):262-8
39. Galis ZS, Sukhova GK, Libby P (1995). Microscopic localization of active Proteinases by in situ zymography: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue. *Faseb J*. Jul; 9 (10):974-80
40. Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R (2005). *Deutsche Leitlinie: Malignes Melanom*. Thieme

41. Gardella S, Andrei C, Lotti LV, Poggi A, Torrisi MR, Zocchi MR, Rubarteli A (2001). CD8(+) T lymphocytes induce polarized exocytosis of secretory lysosomes by dendritic cells with release of interleukin-1beta and Cathepsin D. *Blood*. Oct1;98(7):2152-9
42. Gilbert LC and Gordon SG (1983). Relationship between procoagulant activity and metastatic capacity of B16 Mouse Melanoma variants. *Cancer Research*. 43, 536-540
43. Giuliano AE, Cochran AJ, Mortu DC (1982). Melanoma from unknown primary site and amelanotic melanoma. *Semin. Oncol*. Dec;9(4):442-7
44. Goel A, and Chauhan SS (1997). Role of proteases in tumor invsion and metastasis. *Indian J Exp. Biol*. 35:553-64
45. Goldstein AM, Tucker MA (1995). Genetic epidemiology of familiar melanoma. *Dermatol Clin*. 13:605-12
46. Grob JJ, Dreno B, De La Salmoniere P, Delaunay M, Cupissol D, Guillot B, Souteyrands P, Sassolas B, Cesarini JP, Lionnet S, Lok C, Chastang C, Bonerandi JJ (1998). Randomized trial of interferon alpha-IIa as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases. French Cooperation Group on Melanoma. *Lancet* 351 (9120):1905-10
47. Gross JL, Mosatelli D and Rifkin DB (1983). Increased capillary endothelial protease activity in response to angiogenic stimuli in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences , USA*. 80, 2623-2627
48. Gudewicz PW and Gilboa N (1987). Human urokinase-type-plasminogen activator stimulates chemotaxis of human neutrophils. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*. 147, 1176-1181
49. Guinec N, Pagano M, Dalet-Fumeron V, Engler R (1990). "In vitro" digestion of intact bovine lens capsules by four human lysosomal cystein-proteinases. *Biol Chem Hoppe Seyler*. May; 371 Suppl:239-54
50. Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Fidler IJ (1987). A simple quantitative assay for studying the invasive potential of high and low human metastatic variants. *Cancer Lett*. Dec. 38(1-2):137-47

51. Hersey P (2003). Adjuvant therapy for high-risk primary and resected metastatic melanoma. *Intern Med J.* 33: 33-43
52. Heuser J (1989). Changes in lysosomal shape and distribution correlated with changes in cytoplasmic pH. *J Cell Biol* 1989. 108:855-64
53. Hewitt R, Dano K (1996). Stromal cell expression of components of matrix-degrading protease systems in human cancer. *Enzyme Protein.* 49:163-173
54. Honn KV, Cavanaugh P and Evens C (1982). Tumor cell-platelet aggregation: induced by cathepsin B-like proteinase and inhibited by prostacyclin. *Science*, 217,540-542
55. Hoyhtya M, Hujanen E, Turpeenniemi-Hujanen T, Thorgeirsson U, Liotta LA, Tryggvason K (1990). Modulation of type-IV collagenase activity and invasive behaviour of metastatic human melanoma (A2058) cells in vitro by monoclonal antibodies to type-IV collagenase. *Int J Cancer.* Aug 15; 46(2):282-6
56. Hynes RO (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25
57. Ikeda M, Maekawa R, Tanaka H, Matsumoto M, Takeda Y, Tamura Y, Nemori R, and Yoshioka T (2000). Inhibition of gelatinolytic activity in tumor tissues by synthetic Matrix Metalloproteinase Inhibitor: Application of Film in Situ Zymography. *Clinical Cancer Research.* Vol.6, 3290-3296
58. Johansson M, Ahonen M, and Kahari VM (2000). Matrix metalloproteinase's in tumor invasion. *Cell Mol Life Sci.* 57:5-15
59. Kobayashi H, Schmitt M, Goretzki L, Chucholowski N, Calvete J, Dramer M, Gunzler WA, Janicke F, and Graeff H (1991). Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (Pro-mPA). *J Biol. Chem.* 266:5147-52
60. Kamiya N, Kishimoto T, Suzuki H, Sekita N, Nagai Y, Oosumi N, Kro H, Tochigi N, Shinbo M, Nemort R, Ichikawa T, Igarashi T, Ito H. Ishikura H (2003). Increases in situ gelatinolytic activity in dermal cell tumor tissues correlates with tumor size grade and vessel invasion. *Int. J.Cancer.* 106, 480-485
61. Kawamura K, Damiya N, Suyama T, Shimbo M, Oosumi N, Suzuki H, Ueda T, Ro-

- be T, Igarashi T, Ito H and Ishikura H (2004). In situ gelatinolytic activity correlates with tumor progression and prognosis in patients with bladder cancer. *The Journal of Urology*. Vol. 172, 1480-1484
62. Keppler D, Sloane BF (1996). Cathepsin B: Multiple enzyme forms from a single gene and their relation to cancer. *Enzyme Protein*. 49:94-105
63. Khouri HE, Plouffe C, Hasnain S, Hiramata T, Storer AC, Menard R (1991). A model to explain the pH-dependant specificity of cathepsin B-catalysed hydrolyses. *Biochem J*. 275 (Pt3): 751-7
64. Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH (1996). Interferon alpha adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1648. *J Clin Oncol*. 14 (1):7-17
65. Kirkwood JM (1998) Systematic adjuvant treatment of high risk melanoma: The role of Interferon Alpha-IIb and other immunotherapies. Review. *Eur J Cancer* 34 Suppl 3:12-7
66. Klose A, Zigrino P, Denhofer R, Mauch C, Hunzelmann N (2006). Identification and discrimination of extracellular active cathepsin B and L in high-invasive melanoma cells. *Anal Biochem*. Jun 1; 353 81:57-62; Epub 2006 Feb 9
67. Klose A, Wilbrand-Hennes A, Zigrino P, Weber E, Krieg T, Mauch C, Hunzelmann N (2006) Contact of high-invasive, but not low-invasive, melanoma cells to native collagen I induces the release of mature Cathepsin B. *Int J Cancer*. Jun 1; 118 (119: 2735-43)
68. Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF (2000). Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin. Chim Acta*. Feb 15, 291(2):113-35
69. Koblinski JE, Dosesco J, Sameni M, Moin D, Clark K, and Sloane BF (2002). Interaction of human breast fibroblasts with collagen I increases secretion of procathepsin B. *J Biol Chem*. 277:32220-7
70. Kos J, and Lah TT (1998). Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: Target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). *Oncol Rep*. 5:1349-61
71. Krueger S, Kalinski T, Wolf H, Kellner U, Roessner A (2005). Interactions between

- human colon carcinoma cells, fibroblasts and monocytic cells in coculture-regulation of Cathepsin B expression and invasiveness. *Cancer Letters* 223. 313-322
72. Kuivanen T, Ahokas K, Virolainen S, Jahkola T, Hölttä E, Saksela O, Saarialho-Kere U (2005). MMP-21 is upregulated at early stages of melanoma progression but disappears with more aggressive phenotype. *Virchows Arch.* 447:954-960
73. Kurschat P, Mauch C (2000). Mechanisms of metastasis. *Clin. Exp. Dermatol.* Sep;25(6):482-9. Review
74. Kurschat P, Wickenhauser C, Groth W, Krieg T, and Mauch C (2002). Identification of activated Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in melanoma by In Situ Zymography. *Journal of Pathology.* 197:179-187
75. Kurschat P, Zigrilno P, Nischt R, Breitkopf K, Steurer P, Klein CE, Krieg T, Mauch C (1999). Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2 regulates matrix metalloproteinases-2 activation by modulation of membrane-type 1 metalloproteinases activity in high and low invasive melanoma cell lines. *J Biol Chem.* Jul 23;274(30):21056-62
76. Lang J, Boxer M, MacKie R (2003). Absence of exon 15 BRAF germline mutations in familial melanoma. *Hum Mutat.* 21: 327-30
77. Linebaugh BE, Sameni M, Day NA, Sloane BF, Keppler D (1999). Exocytosis of active cathepsin B enzyme activity at pH 7.0, inhibition and molecular mass. *Eur J Biochem.* Aug; 264(1):100-9
78. Lorenzo K, Ton P, Clark JL, Coulibaly S, Mach L (2000). Invasive properties of Murine Squamous Carcinoma cells : Secretion of matrix-degrading Cathepsins is attributable to a deficiency in the mannose-6-phosphat/Insulin-like Growth Factor II Receptor. *Cancer Research* 60, 4070-4076, August 1
79. Lyons RM, Keski-Oja J and Moses HL (1988). Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast conditioned medium. *Journal of Cell Biology.* 106, 1659-1665
80. Maciewicz RA, Wardale RJ, Etherington DJ, Paraskeva C (1989). Immunodetection of Cathepsins B and L present in and secreted from human pre-malignant and malignant colorectal tumour cell lines. *Int.J.Cancer.* 43, 478-486

81. Mary E, Mc Grath (1999). The lysosomal cysteine proteases. *Annu.Rev.Biophys. Biomol. Struct.* 28:181-204
82. McMasters KM, Reintgen DS, Ross MI, Gershenwald JE, Edwards MJ, Sober A, Fenske N, Glass F, Balch CM, Coit DG (2001). Sentinel lymph node biopsy for melanoma: Controversy despite widespread agreement. *J Clin Oncol.* 19:2851-5
83. Meier F, Satyamoorthy K, Nesbit M, Hsu M Y, Schitteck B, Garbe c, and Herlyn M (1998). Molecular events in melanoma development and progression. *Front Biosci.* 3:D1005-10
84. Meyskens FL, Farmer PJ, Anton-Culver H (2004). Etiologic pathogenesis of melanoma unifying hypothesis for the missing attributable risk. *Clin Cancer Res.* 10:2581-83
85. Mignatti P, and Rifkin DB (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.*73:161-95
86. Moin K, Cao L, Day NA, Koblinski JE, Sloane BF (1998). Tumor cell membrane Cathepsin B. *Biol Chem.*Aug-Sep; 379(8-9):1093-9
87. Montcourrier P, Mangeat PH, Salazar G, Morisset M, Sahuquet A, Rochefort H. (1990). Cathepsin D in breast cancer cells can digest extracellular matrix in large acidic vesicles. *Cancer Res.* Sep 15;50(18):6045-54
88. Montcourrier P, Mangeat PH, Valembois C, Salazar G, Sahuquet A, Duperray C, Rochefort H (1994). Characterization of very acidic phagosomes in breast cancer cells and their association with invasion. *J Cell Sci.* Sep:107(Pt 9):2381-91
89. Mungall BA, Pollit CC (2001). In situ zymography: topographical considerations. *Biochem Biophys Methods.* Feb 26; 47(3):169-76
90. Murnane MF, Sheahan K, Ozdemirli M, Shuja S (1991). Stage-specific increases in Cathepsin B messenger RNA content in human colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 51: 1137-42
91. Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knäuper V, Atkinson S. and Gavrilovic J (1999). Mechanisms for pro Matrix Metalloproteinase activation. *Apmis.* 107: 38-44
92. Murphy BC, Pienta KJ, Coffey DS (1992). Effects of extracellular matrix components and dihydrotestosterone on the structure and fuction of human prostate cancer

- cells. *Prostate*. 20 (1):29-41
93. Ossowski L, Quigley JP and Reich E (1975). Plasminogen-a necessary factor for cell migration in vitro. In: Reich E, Rifkin DB, Shaw W, eds. *Proteases and Biological Control*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory. pp. 901-913
94. Pehamberger H, Soyer HP, Steiner A, Kofler R, Binder M, Misher P, Pacheinger W, Aubock J, Fritsch P, Kerl H, Wolff K (1998). Adjuvant Interferon Alpha-IIa treatment in resected primary stage II cutaneous melanoma. Austrian Malignant Melanoma Cooperative Group. *J Clin Oncol*. 16: 1425-9
95. Pirilä E, Maisi P, Salo T, Koivunen E, Sorsa T (2001). In vivo localization of gelatinases (MMP-2 and -9) by In Situ Zymography with a selective gelatinase inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 287, 766-774
96. Pisoni RL, Acker TL, Lisowski KM, Lemons RM and Thoene JGA (1990). Cysteine-specific lysosomal transport system provides a major route for the delivery of thiol to human fibroblast lysosomes: Possible role in supporting lysosomal proteolysis. *J Cell Biol*. 110:327-35
97. Podgorski I and Sloane BF (2005) Cathepsin B and its role(s) in cancer progression; *Biochem.Soc.Symp*. 70, 263-276
98. Premzl A, Zavasnik-Bergant V, Turk V, Kos J (2003). Intracellular and extracellular Cathpsin B facilitate invasion of MCF-10A neo T cells through reconstituted extracellular matrix in vitro. *Exp Cell Res*. Feb 15;283(2):206-14
99. Redwood SM, Liu BSC, Weiss RE, Hodge DE, Droller MK (1991). Abregation of the invasion of human bladder tumor cells by using protease inhibitors. *Cancer* 69:1212-1219
- 100.Rempel SA, Rosenblum ML, Mikkelsen T, Yan PS, Ellis KD, Gelembieski WA, Sameni M, Rhozhin J, Ziegler G, Sloane BF (1994). Cathepsin B expression and localization in glioma progression and invasion. *Cancer Res* 1994. 54:6027-31
- 101.Rochefort H, and Liaudet-Coopman E (1999). Cathepsin D in cancer metastasis: A protease and a ligand. *Apmis*. 107:86-95
- 102.Rodriguez A, Webster P, Ortego J, Andrews NW (1997). Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol*. Apr 7;

- 137(1):93-104
- 103.Rozhin J, Sameni M, Ziegler G, Sloane BF (1994). Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res.* 54:6517-25
- 104.Rozman J, Stojan J, Kuhelj R, Turk V, Turk B (1999). Autocatalytic processing of Sameni M, Moin K, Sloane BF (2000). Imaging proteolysis by living human breast cancer cells. *Neoplasia Nov-Dez.* 2(6):496-504
- 105.Satyamoorthy K, Herlyn M (2002). Cellular and molecular biology of human melanoma. *Cancer Biol Ther.* 1:14-17
- 106.Sheahan K, Shujfa S , Murnane MJ (1989). Cysteine protease activities and tumor development in human colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 49: 3809-14
- 107.Shuja S, Sheahan K, Murnane MJ (1991). Cysteine endopeptidase activity levels in normal human tissues: colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer.* 49: 341-6
- 108.Silverparvathi M, Sawaya R, Wang SW, Rayfor A, Yamamoro M, Liotta LA, Nicolson GL, Rao JS (1995). Overexpression and localisation of Cathepsin B during the progression of human gliomas. *Clin Exp, Metast.* 13: 49-56
- 109.Skriver L, Larsson L, Kielberg V, Nielsen LS, Andresen PB, Kristensen P and Dano K (1984). Immunocytochemical localisation of urokinase type plasminogen activator in Lewis lung carcinoma. *Journal of Cell Biology.* 99, 753-758
- 110.Sloane BF, Dunn JR, Honn KV (1981). Lysosomal cathepsin B: correlation with metastatic potential. *Science.* Jun 5; 212(4499):1151-3
- 111.Sloane BF, Rozhin J, Hatfield JS, Crissman JD, Honn KV (1987). Plasma membrane-assoziatid cysteine proteinass in human and animal tumors. *Expl Cell Biol.* 55: 209-224
- 112.Sloane BF, Roshin J, Johnson K, Taylor H, Crissman JD, Honn KV (1986). Cathepsin B: assoziation with plasma membrane in metastatic tumors. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 83:2483-2487
- 113.Sloane BF, Dunn JR, Honn KV(1994). Lysosomal Cathepsin B:correlation with metastatic potential.*Science.* Jun 5;212(4499):1151-3
- 114.Soengas MS, Lowe SW (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene May.* 19; 22:3138-51

115. Sylven B (1968). Cellular detachment by purified lysosomal Cathepsin B. *European Journal of Cancer* 4. 559-562
116. Szpaderska A and Frankfater A (2001). An intracellular form of Cathepsin B contributes to invasiveness in Cancer. *Cancer Research*. 61(8): 3493-3500
117. Teinheckel T, Deussing J, Roth W, Peters C (2001). Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: Phenotypes of mice deficient for Cathepsin B or Cathepsin L. *Minireview Biol.Chem.* Vol. 382, pp.735-741
118. Thompson JF, McCarthy WH, Bosch CM, O'Brian CJ, Quinn MJ, Paramasvaran S, Crotty K, McCarthy SW, Uren RF, Howman-Giles R (1995). Sentinel lymph node status as an indicator of the presence of metastatic melanoma in regional lymph nodes. *Melanoma research*. 5:255-60
119. Tryggvaso K, Hoyhtya M and Salo T (1987). Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochemica et Biophysica Acta*. 907.191-207
120. Turk B, Turk D, Turk V (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta*. 1477:98-111
121. Quian F, Bajkowski AS, Steiner DF, Chan SJ, Frankfater A (1989). Expression of five Cathepsins in murine melanomas of varying metastatic potential and normal tissues. *Cancer Res*. 49:4870-4875
122. Vaisanen A, Tuominen H, Kallioinen M, Turpeenniemi-Hujanen T (1996). Matrix Metalloproteinase-2 (72kD type IV collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumour progression and may have prognostic value. *J Pathol.* Nov;180(3):283-9
123. Van den Oord JJ, Paemen L, Opdenakker G, De Wolf-Peeters C (1997). Expression of gelatinases B and the extracellular Matrix Metalloproteinases inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. *Am J. Pathol.* Sep; 151(3):665-70
124. Van der Flier A, and Sonnenberg A (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res*. 305:285-98
125. Van der Stappen JW, Williams AC, Maciewicz RA, Oaraskeva C (1996). Activation of Cathepsin V, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is media-

- tes by Cathepsin D. *Int J Cancer*. 67:547-54
126. Walker RA, Woolley DE (1999). Immunolocalisation studies of Matrix Metalloproteinases-1,-2 and-3 in human melanoma. *Virchows Arch*. Dec;435(6):574-9
127. Werle B, Juülke B, Lah T, Spiess E, Ebert W (1997). Cathepsin B fraction active at physiological pH of 7.5 is of prognostic significance in squamous cell carcinoma of human lung. *British Journal of Cancer*. 75(8), 1137-1143
128. Wollmer AG Mauch
129. Yan S and Sloane BF (2003). Molecular regulation of human Cathepsin B: Implications in Pathologies. Review. *Biol. Chem*. June Vol. 384, pp.845-854
130. Yap AS, Briehner WM and Gumbiner BM (1997). Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 13.119-46
131. Zigrino P, Drescher C, Mauch C (2001). Collagen-induced proMMP-2 activation by MT1-MMP in human dermal fibroblasts and the possible role of $\alpha 2\beta 1$ integrins. *European Journal of Cell Biology*. 80, 68-77
132. Zigrino P, Löffek S, Mauch C (2005). Tumor-stroma interactions: Their role in the control of tumor cell invasion. *Biochemie*. 87 321-328

Lebenslauf

Name	Julia Katharina Köhle
Anschrift	Wilhelm-Backhausstraße 6c 50931 Köln
Geburtsdatum	04.08.1980
Geburtsort	Ulm
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Schulbildung	
1986-1990	Grundschule Bachemerstraße, Köln
1990-1999	Gymnasium Liebfrauenschule, Köln
Abschluss	Allgemeine Hochschulreife
Studium	
April 2000	Studium der Humanmedizin an der privaten Universität Witten/Herdecke
April 2005	2. Staatsexamen
November 2006	3. Staatsexamen
Berufliche Erfahrung	
Oktober 2005- September 2006	Praktisches Jahr im Helios Klinikum , Wupper- tal, Hopital Pierre-Quitmann-Zobda, Martinique, St. Elisabeth-Krankenhaus Hohenlind, Köln
Seit März 2007	Weiterbildung im Fachbereich Pädiatrie am De- partment für Kinder- und Jugendheilkunde der Universitätsklinik Innsbruck

Köln, den 25.03.2010