

**Aus dem
Institut für Chirurgische Forschung
im Walter Brendel Zentrum für
experimentelle Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl**

**Mechanismen der Metastasierung
des B 16 Melanoms
Genexpressionsanalysen
und Untersuchungen zum Einfluss von
Thrombozyten**

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Benedikt Kellermann
aus München
2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Georg Enders

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Christian Kunte
Priv. Doz. Dr. Ulrich Schaller

Dekan: Prof. Dr.med. Dr.h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 19.4.2012

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	6
1.1. Metastasierung: ein relevantes Problem in der Tumorthherapie.....	6
1.2. Ablauf der Metastasierung	6
1.2.1. Invasives Wachstum und Gefäßinfiltration	7
1.2.2. Überleben in der Zirkulation	8
1.2.3. Arrest im Zielorgan und Extravasation	8
1.2.4. Proliferation zur Metastase.....	9
1.3. Ineffizienz der Metastasierung.....	10
1.4. Apoptose und Metastasierung.....	11
1.4.1. Physiologie der Apoptose.....	11
1.4.2. Relevanz für die Metastasierung	12
1.5. Thrombozyten und Metastasierung	13
1.5.1. Tumorinduzierte Thrombozytenaggregation.....	13
1.5.2. Einfluß der Thrombozyten auf Tumorprogression und Metastasierung	13
1.6. Zielsetzung	15
1.7. Fragestellung.....	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1. Materialien	18
2.1.1. Tiere	18
2.1.2. Tumorzellen	18
2.1.3. Medikamente	18
2.2. Methoden.....	19
2.2.1. Versuchsablauf	19
2.2.2. Entnahme und Präparation der Lungen	19
2.2.3. Metastasenzählung	19
2.2.4. Genanalytik	20
2.2.4.1. RNA Isolierung	20
2.2.4.2. c-DNA Synthese.....	21
2.2.4.3. PCR	21
2.2.4.4. c-DNA Array.....	21
2.2.5. Auswertung	26
2.2.5.1. PCR	26
2.2.5.2. c-DNA Array	26
2.2.6. Statistik.....	27
3. ERGEBNISSE	28
3.1. Ineffizienz der Metastasierung.....	28

3.1.1. Überleben der Tumorzellen.....	28
3.1.2. c-DNA-Array Untersuchungen zur Apoptose.....	29
3.1.2.1. TNF-Ligand Familie	29
3.1.2.2. TNF-Rezeptor Familie	30
3.1.2.3. TRAF-Familie	32
3.1.2.4. Death-Domain und Death-Effector-Domain Familie: FADD.....	33
3.1.2.5. BCL-2 Familie.....	34
3.1.2.6. Caspasen: Caspase 9.....	35
3.1.2.7. IAP-Familie	36
3.1.2.8. CARD-Familie: Nop 30like	37
3.1.2.9. p53 und Atm Signalweg.....	37
3.1.3. Immunabwehr.....	39
3.1.3.1. Fas	39
3.1.3.2. Fas-Ligand.....	40
3.1.3.3. TRANCE.....	40
3.2. Die Metastasierung begünstigende Faktoren	41
3.2.1. Invasivität	41
3.2.1.1. Matrix-Metalloproteinase 2.....	41
3.2.1.2. Matrix-Metalloproteinase 9.....	42
3.2.1.3. Semaphorin 3A.....	42
3.2.1.4. Semaphorin 4D.....	43
3.2.2. Proliferation.....	44
3.2.2.1. HGF.....	44
3.2.2.2. c-met.....	44
3.3. Einfluß von Thrombozytenaggregationshemmern auf die Metastasenzahl	45
3.3.1. Therapie mit verschiedenen Thrombozytenaggregationshemmern	45
3.3.2. EMD 122347 Therapie über 5 Tage.....	46
3.3.3. EMD 122347 Therapie über 9 Tage.....	47
3.4. Einfluss von EMD 122347 auf die Genexpression.....	48
3.4.1. Überleben	48
3.4.2. Immunabwehr.....	49
3.4.2.1. Fas	49
3.4.2.2. Fas-Ligand.....	50
3.4.2.3. TRANCE.....	51
3.4.3. Invasivität	52
3.4.3.1. Matrix-Metalloproteinase 2.....	52
3.4.3.2. Matrix-Metalloproteinase 9.....	52
3.4.3.3. Semaphorin 3A.....	53
3.4.3.4. Semaphorin 4D.....	53
3.4.4. Proliferation.....	54
3.4.4.1. HGF.....	54
3.4.4.2. c-met.....	55
4. DISKUSSION	56
4.1. Diskussion der Methoden	56
4.1.1. Modell	56
4.1.2. Quantifizierung der Metastasen	56

4.1.3. Eingesetzte Medikamente	57
4.1.4. Genanalytik	57
4.1.4.1. RT-PCR	57
4.1.4.2. cDNA-Array	59
4.2. Diskussion der Ergebnisse	60
4.2.1. Ineffizienz der Metastasierung	60
4.2.1.1. Überleben der Tumorzellen: P-mel 17	60
4.2.1.2. Apoptose in metastasenträgenden Lungen	61
4.2.1.2.1. TNF-Ligand Familie	61
4.2.1.2.2. TNF-Rezeptor Familie	62
4.2.1.2.3. TRAF-Familie	63
4.2.1.2.4. Death-Domain und Death-Effector-Domain Familie: FADD	63
4.2.1.2.5. BCL-2 Familie	64
4.2.1.2.6. Caspase 9	65
4.2.1.2.7. IAP-Familie	65
4.2.1.2.8. CARD-Familie: Nop 30-like	65
4.2.1.2.9. p53 und Atm Signalweg	66
4.2.1.2.10. Überblick zur Apoptose	67
4.2.1.3. Immunantwort: Fas, FasL und TRANCE	69
4.2.2. Invasivität und Proliferation	70
4.2.2.1. MMP 2 und 9	70
4.2.2.2. Semaphorine 3A und 4D	72
4.2.2.3. HGF und c-met	73
4.2.3. Einfluß von Thrombozytenaggregationshemmern auf die Metastasenzahl	75
4.2.3.1. Therapie mit unterschiedlichen Thrombozytenaggregationshemmern	75
4.2.3.1.1. Metastasenreduktion durch Inhibitoren der Thrombozytenaggregation	75
4.2.3.1.2. Besondere Bedeutung des GP IIb/IIIa	76
4.2.3.2. Therapie mit EMD 122347 über 5 bzw. 10 Tage	77
4.2.4. Einfluß von EMD 122347 auf die Genexpression	77
4.2.4.1. P-mel 17	77
4.2.4.2. Fas, FasL und TRANCE	78
4.2.4.3. MMP 2 und 9	79
4.2.4.4. Semaphorine 3A und 4D	79
4.2.4.5. HGF und c-met	80
5. ZUSAMMENFASSUNG	83
6. DANKSAGUNG	86
7. LEBENS LAUF	87
8. LITERATURVERZEICHNIS	89

1. Einleitung

1.1. Metastasierung: ein relevantes Problem in der Tumorthherapie

Tumorerkrankungen stellen laut Statistik der WHO nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar¹. Trotz großer Fortschritte in der Therapie und Früherkennung der meisten Tumore, konnte die Gesamt-Mortalität nicht signifikant gesenkt werden². Dabei ist die Metastasierung, in höherem Maße als das Wachstum des Primärtumors, für den letalen Verlauf einer Tumorerkrankung verantwortlich³. Mittels chirurgischer oder strahlentherapeutischer Verfahren lassen sich viele Primärtumore effektiv behandeln, während das Auftreten von Metastasen häufig nur noch palliative Therapieansätze zulässt. Neben der Schädigung des befallenen Organs durch das Tumorwachstum, treten im disseminierten Stadium auch systemische Komplikationen wie paraneoplastische Syndrome auf⁴.

Die Prognose verschlechtert sich durch das Vorhandensein von Metastasen drastisch. So verringert sich z.B. die 5-Jahres Überlebensrate des Bronchialkarzinoms von 57-67% in den frühen Stadien IA und IB auf 1% im durch das Auftreten von Fernmetastasen definierten Stadium IV⁵, beim Magenkarzinom von 70-95% (IA/IB) auf weniger als 15% (IV)⁶. Die 5-Jahres Überlebensrate des Kolonkarzinoms wird im Stadium C nach Dukes (bereits lokale Lymphknoten befallen) noch mit 20-50% angegeben, im Stadium D (Fernmetastasen) beträgt sie nur noch 3%⁶. Ähnlich augenfällig wird die fatale prognostische Bedeutung beim Melanom, mit einer 10-Jahres Überlebensrate von 97-43% im lokalisierten (verschiedene Tumorausdehnungen ohne Lymphknotenbefall) und nur 3% im metastasierten Stadium⁷.

Die Metastasierung stellt somit ein Kernproblem in der Therapie maligner Tumore dar. Ein zunächst lokal begrenzter Prozess wird zur systemischen Krankheit, die sich nun auf den ganzen Körper verteilen kann. Metastasierung ist der Grund für die meisten aller Todesfälle bei Patienten mit soliden Tumoren⁸.

1.2. Ablauf der Metastasierung

Metastasierung bedeutet, dass sich Zellen vom Primärtumor ablösen und mit dem Lymph- oder dem Blutstrom in andere Regionen des Körpers wandern, um dort neue Läsionen zu bilden. Primär hämatogen metastasieren Tumoren, wenn sie direkt in tumorversorgende Blutgefäße eindringen. Bei der lymphogenen Metastasierung werden die Tumorzellen zunächst mit dem Lymphstrom in regionäre Lymphknoten transportiert. Sie können nun sekundär Anschluß an den hämatogenen Weg gewinnen, wenn proliferierende Lymphknotenmetastasen in lymphknotenversorgende Blutgefäße infiltrieren oder die Tumorzellen mit dem Lymphstrom weitergetragen werden und schließlich über den Ductus thoracicus am Venenwinkel in die Blutbahn gelangen³.

Metastasierung wird häufig als mehrstufiger Prozess bezeichnet^{3;9;10}. Zunächst müssen die Tumorzellen Anschluß an das Gefäßsystem erlangen, dann in der Zirkulation Scherkräfte und die Abwehrmechanismen des Immunsystems überleben. Ein weiterer Schritt ist der Arrest im Kapillarnetz des Zielorgans und die Extravasation in das umliegende Gewebe. Dort muß die Proliferation erneut in Gang gesetzt werden, und um die Größe einer klinisch sichtbaren Metastase zu erlangen, ist auch die Induktion der Angiogenese notwendig^{4;10}. Zur Formation einer Metastase muss jeder dieser Schritte erfolgreich beendet werden, und das Misslingen eines einzigen Schrittes führt zur Unterbrechung der gesamten Metastasierungskaskade⁹.

Im Folgenden soll näher auf die einzelnen Schritte eingegangen werden.

1.2.1. Invasives Wachstum und Gefäßinfiltration

Um in die Blutbahn zu gelangen, müssen sich Tumorzellen aus ihrem Zellverband lösen und benachbarte Blutgefäße infiltrieren. Wichtig hierfür ist die proteolytische Degradation der extrazellulären Matrix, eine Änderung der Zell-Zell und der Zell-Matrix Kontakte¹¹, und die Steigerung der Zellmotilität¹⁰.

Die extrazelluläre Matrix und insbesondere die Basalmembran, die epitheliales Gewebe vom angrenzenden Stroma trennt, sind wichtige Barrieren für die Ausbreitung metastasierender Zellen. Die Expression proteolytischer Enzyme korreliert bei vielen Tumoren mit der Fähigkeit zu invasivem Wachstum¹². Ein besonderes Augenmerk fällt dabei auf die Familie der Matrix-Metalloproteinasen (MMP). In mehreren experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Invasivität von Tumorzellen bei Hochregulation der MMP-Expression zunimmt, und umgekehrt bei Reduktion der MMP-Expression oder Inhibition der MMP-Funktion abnimmt^{13:14}.

Eine weitere Gruppe von Proteinen, die für die Migration von Zellen im Gewebe eine wichtige Rolle spielen, sind die Semaphorine. Entdeckt wurden diese Moleküle aufgrund ihrer wichtigen Funktion bei der Richtungsbestimmung des Axon-Wachstums und damit der Entwicklung des Nervensystems. Dabei haben Semaphorine einerseits inhibitorische Wirkungen wie z.B. die Repulsion migrierender Zellen, können andererseits aber auch die Chemotaxis und das Längenwachstum von Axonen fördern¹⁵. Der Einfluß der Semaphorine ist allerdings nicht auf neuronale Zellen beschränkt sondern erstreckt sich auch auf die Motilität epithelialer Zellen, die Angiogenese und die Leukozytenmigration^{15:16}. Eine Überexpression von Semaphorinen konnte in verschiedenen metastasierenden Tumoren gefunden werden^{17:18}.

Die Ablösung aus dem Zellverband und Migration im Gewebe erfordert eine Änderung der Kontakte der Zellen untereinander und mit der Umgebung. Diese Änderungen sind Teil eines Mechanismus der als „epithelial-to-mesenchymal transition“ (EMT) bezeichnet wird. Neoplastische Zellen ändern dabei ihre Morphologie vom polaren epithelialen zum invasiven mesenchymalen Phänotyp¹⁹. Kennzeichen dieses Vorgangs sind neben den beschriebenen morphologischen Veränderungen auch in der Expression molekularer Marker, der Organisation des Zytoskeletts, und der Art der Zell-Kontakte zu finden²⁰. Ein wichtiger Vorgang im Rahmen der EMT ist der Verlust von E-Cadherin, das im epithelialen Gewebe über homophile Interaktionen Zell-Zell Kontakte vermittelt⁹, durch Mutation oder Downregulation²¹. Die Expression des mesenchymalen N-Cadherin in Zellen die E-Cadherin verloren haben wird als „cadherin switch“ bezeichnet, und führt zur Steigerung der Zellmotilität²². Wichtige Mechanismen, die zur EMT führen sind die Interaktion verschiedener Wachstumsfaktoren mit ihren Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und deren intrazelluläre Signalkaskaden²⁰. So induziert z.B. HGF (scatter factor) durch Bindung an seinen Rezeptor c-met EMT, Zellmigration und invasives Wachstum²².

Das Wachstum und die Ausbreitung eines Tumors im Gewebe erfordert die Rekrutierung neuer Blutgefäße um die Zellen mit Energiesubstraten und Sauerstoff zu versorgen, ein Prozess der als Angiogenese bezeichnet wird²³. Eine höhere vaskuläre Dichte im Tumorgewebe erhöht gleichzeitig auch die Wahrscheinlichkeit, dass Zellen in die Blutbahn gelangen und metastasieren¹². Angiogenetische Kapillaren in malignen Tumoren weisen häufig ein undichtes Endothel auf, das die Intravasation erleichtert¹⁹. Gleichzeitig können auch Tumorzellen selbst ein primitives vaskuläres System formen¹⁹, oder am Aufbau des Endothels beteiligt sein^{10:24}, was als vaskuläres Mimikry bezeichnet wird. Die Ablösung solcher Zellen führt dann direkt zur Einschwemmung in die Blutbahn.

1.2.2. Überleben in der Zirkulation

Der Blutstrom ist eine überlebensfeindliche Umgebung für zirkulierende Tumorzellen. Der Verlust der Verankerung in der extrazellulären Matrix kann zur Apoptose führen (Anoikis)²⁵. Auch Scherkräfte, die durch die Strömung entstehen oder andere mechanische Einwirkungen wie die Kollision mit der Gefäßwand oder anderen zirkulierenden Zellen können die Tumorzellen schädigen²⁶. Weiterhin geht man davon aus, dass Serum Substanzen enthält die auf die Zellen toxisch wirken²⁷. Besonders gut zugänglich sind die Tumorzellen während der intravaskulären Phase auch für Zellen des Immunsystems⁸. Diese, insbesondere zytotoxische T-Zellen (CTL's) und natürliche Killer-Zellen (NK), bedienen sich zweier Mechanismen zur Elimination von Tumorzellen. Zum einen die Ausschüttung von Perforinen und Granzym aus zytotoxischen Granula, zum anderen die Triggerung der Apoptose in den Tumorzellen durch Expression von Fas-Ligand (CD 95L) auf der lymphozytären Zelloberfläche und Interaktion mit Fas (CD 95) auf den Zielzellen²⁵. Schutz gegen diese Einflüsse können Zell-Zell Interaktionen bieten - zum einen Aggregation von Tumorzellen untereinander, zum anderen die Interaktion mit Thrombozyten (s.u.). Die Fähigkeit zur Bildung homotypischer Aggregate *in vitro* korrelierte in mehreren experimentellen Studien mit einem vergrößerten Metastasierungspotential *in vivo*²⁶. Eine Vorstellung ist, dass die inneren Zellen solcher Aggregate die Phase in der Zirkulation überleben können²⁷. Dem Zugriff des Immunsystems können metastasierende Zellen auch mithilfe anderer Mechanismen entgehen. Viele Tumoren exprimieren z.B. den T-Zell Inhibitor Galectin-1²⁸. Durch die Expression von Fas-Ligand können Tumorzellen in aktivierten Fas-positiven T-Lymphozyten Apoptose induzieren²⁹. Wichtige Funktion in der Resistenz gegenüber Immunzellen kommt auch den MMP's zu. Die Proliferation von T-Lymphozyten wird durch Zytokin-Signale über den Interleukin-2-Rezeptor- α (IL-2R α) reguliert. MMP-9 kann diesen Rezeptor spalten und so die Proliferation von T-Lymphozyten unterdrücken¹³.

1.2.3. Arrest im Zielorgan und Extravasation

Vor dem Verlassen der Blutbahn und der weiteren Proliferation kommt es zum Arrest der Tumorzellen. Dieser Prozess kann zum einen auf rein mechanischem Weg erfolgen. Mit einem Durchmesser von 20 μm und mehr sind die meisten Tumorzellen wesentlich größer als Kapillaren (Durchmesser normalerweise ca. 3-8 μm). In Lebersinusoiden z.B. wurden nach Injektion in die Mesenterialvene Tumorzellen beobachtet, die das gesamte Lumen ausfüllten und in ihrer Form an die Sinusoide angepasst waren³. Durch die Aggregation von Tumorzellen untereinander können Emboli entstehen, die den mechanischen Arrest erleichtern¹². Viele Tumorzellen können auch durch die Aktivierung der Gerinnungskaskade und von Thrombozyten (s.u.) die Entstehung von Emboli begünstigen^{4;30}. Zum anderen geht man davon aus, dass spezifische Interaktionen zwischen Tumorzellen und Endothel oder endothelialer Basalmembran zur Adhärenz unabhängig von Faktoren des Zell- oder Kapillardurchmessers führen. So konnten in präkapillären Gefäßen der Leber mit größerem Durchmesser als Tumorzellen nach Aktivierung des Endothels mit IL-2 adhärenz Tumorzellen gefunden werden³. Andere Experimente liefern Anhaltspunkte, dass rein mechanische Prozesse nicht ausreichend für den Arrest im Zielorgan sind. Die Interaktion zwischen Thomsen-Friedenreich Antigen auf Tumorzellen und endotheliale Galectin-3 ist ein wichtiger Mechanismus für die Adhäsion, durch dessen Blockade der Arrest von Tumorzellen in Lunge und Knochen um mehr als 90% gesenkt werden konnte³¹. Auch Integrine sind am Adhäsionsprozess beteiligt. So bindet z.B. das Integrin $\alpha 3 \beta 1$ an Laminin-5 einen Bestandteil der endothelialen Basalmembran, und kann so zur Adhärenz von

Tumorzellen in der Lunge führen³². Durch die Interaktion mit Thrombozyten kann die Adhärenz der Tumorzellen am Endothel weiter begünstigt werden³³.

Ein anderer Mechanismus, der den Arrest von Tumorzellen unterstützt ist die Bildung einer Prämetastatischen Nische durch hämatopoietische Progenitorzellen aus dem Knochenmark. Tumorzellen des Primärtumors sezernieren dabei Faktoren, die Fibroblasten in den Zielorganen der Metastasierung zu einer vermehrten Fibronectinproduktion stimulieren. Gleichzeitig aus dem Knochenmark ausgewanderte hämatopoietische Progenitorzellen binden mit ihrem Integrin $\alpha 4\beta 1$ an Fibronectin und bilden Zellcluster. Diese Cluster können durch Expression von Chemokinen, Proteasen und Adhäsionsmolekülen die unmittelbare Umgebung so verändern, dass die Adhärenz die Extravasation und die Proliferation von zirkulierenden Tumorzellen begünstigt werden^{27;34}.

Die Extravasation, also das Verlassen des Gefäßlumen und die Einwanderung in das umliegende Gewebe, ist ein Prozeß der kurze Zeit nach dem Arrest der Tumorzellen stattfindet³. Man vermutet, dass ähnliche Mechanismen, wie sie für Zellmotilität und Invasion im Primärtumor benötigt werden, auch bei der Extravasation eine Rolle spielen¹⁰.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist ein potenter Induktor der Angiogenese²³. Im Rahmen der Extravasation erscheint aber vor allem wichtig, dass es durch VEGF abhängige Aktivierung der Src Kinasen zu einem Verlust interzellulärer Verbindungen im Endothel und damit einer Zunahme der Permeabilität des Endothels für extravasierende Tumorzellen kommen kann^{4;8}.

Es gibt aber auch Beobachtungen, die zeigen, dass Tumorzellen die am Endothel der Lunge adhären intravaskulär proliferieren können, und extravasierte Zellen im Interstitium schnell beseitigt werden. Metastasen entstehen durch das intravaskuläre Wachstum, und erst im späteren Verlauf kommt es durch die Größenzunahme zur Zerstörung der Gefäßwand³⁵.

1.2.4. Proliferation zur Metastase

Um zur klinisch bedeutsamen Metastase zu werden, müssen die extravasierten Tumorzellen in der neuen Umgebung des Zielorgans die Proliferation initiieren. Ein wichtiges Kennzeichen von malignen Zellen ist unkontrolliertes Wachstum. Dies kann durch autokrine Stimulation von Wachstumsfaktorrezeptoren oder deren Überexpression und damit erhöhter Empfindlichkeit gegenüber Proliferationssignalen aufrecht erhalten werden. Eine weitere Möglichkeit sind Mutationen in Genen von Wachstumsfaktorrezeptoren oder Proteinen, die an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sind, und zu einer gesteigerten Vermittlung von Proliferationssignalen auch ohne den entsprechenden Stimulus führen¹¹. Trotz dieser Autonomie der Wachstumsregulation ist dieser Schritt der ineffizienteste in der Metastasierungskaskade. Nach intravenöser bzw. intraportalvenöser Injektion von Melanomzellen wurde in Lunge bzw. Leber beobachtet, dass ein großer Anteil der injizierten Zellen extravasierte, während nur ein sehr geringer Prozentsatz zu proliferieren begann^{36;37}. Ein wichtiger Faktor, der die Effizienz der Metastasierung zu diesem Zeitpunkt limitiert ist der apoptotische Zelltod. Nach dem Arrest im Zielorgan werden die meisten Tumorzellen unabhängig davon, ob sie den Schritt der Extravasation vollzogen haben oder nicht, apoptotisch. Man geht davon aus, dass Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli und das Überleben zu diesem Zeitpunkt das gesamte Metastasierungspotential bestimmen¹⁰.

Auch Proteasen spielen eine wichtige Rolle bei der Proliferation, weil die extrazelluläre Matrix die Expansion der Tumormasse behindert. So konnten in einem in vitro Experiment Tumorzellen in einem dreidimensionalen Kollagennetz nur proliferieren wenn sie membrangebundene MMP's exprimierten³⁸. Durch die Aktivität von Proteasen werden aber auch im Gewebe sequestrierte Wachstumsfaktoren zugänglich gemacht, und die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix verändert, was indirekt über Interaktionen von

Molekülen der extrazellulären Matrix mit Integrinen auf den Tumorzellen das Wachstum fördern kann¹³.

Das Wachstum der Tumorzellen hängt auch wesentlich von der Mikroumgebung im Zielorgan ab. Im Gewebe vorhandene Wachstumsfaktoren, Chemokine oder die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix können bei entsprechender Expression von Rezeptoren oder Adhäsionsmolekülen auf den Tumorzellen die Proliferation stimulieren. So kann z.B. die Produktion von HGF durch Kupffer-Zellen der Leber die Metastasierung von Kolon und Pankreastumoren die den HGF-Rezeptor c-met exprimieren begünstigen¹⁹.

In Abbildung 1.1. ist der Ablauf der Metastasierung schematisch dargestellt.

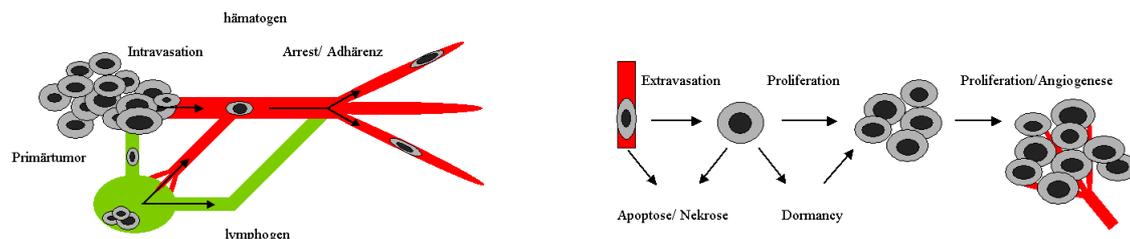


Abbildung 1.1.: Schematische Darstellung der Metastasierungskaskade

Der Vorgang der Metastasierung läuft in mehreren Schritten ab. Zunächst müssen Tumorzellen sich aus dem Zellverband des Primärtumors lösen und Anschluss an das Gefäßsystem erlangen. Man unterscheidet hierbei zwischen hämatogener und lymphogener Metastasierung. Der lymphogene Weg kann jedoch später Anschluss an den hämatogenen gewinnen. Nach der Intravasation werden die Zellen mit dem Blut oder Lymphstrom in die Zielorgane der Metastasierung getragen. Dort müssen die Schritte Adhärenz bzw. Arrest, Extravasation und Initiation der Proliferation vollzogen werden. Zur Versorgung sichtbarer Metastasen ist auch die Rekrutierung neuer Blutgefäße (Angiogenese) nötig.

1.3. Ineffizienz der Metastasierung

Metastasierung ist ein ineffizienter Prozeß. Millionen von Zellen pro Gramm Tumormasse können täglich in die Lymph- oder Blutbahn gelangen¹⁹ oder werden in experimentellen Modellen injiziert, während nur eine vergleichsweise geringe Zahl sichtbarer Metastasen entsteht³. Wie oben beschrieben sind viele Schritte in der Metastasierungskaskade überlebensfeindlich für die Tumorzellen. Der Verlust von adhäsiven Kontakten zur extrazellulären Matrix über Integrine kann zum Zelltod führen, in der Zirkulation sind die Zellen Scherkräften und dem Zugriff des Immunsystems ausgesetzt und die Adhärenz am Endothel kann zur Freisetzung hochreaktiver Sauerstoffverbindungen (NO, O₂⁻, H₂O₂) führen, die zytotoxische Wirkungen auf die Tumorzellen haben³⁹. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass die frühen Schritte der Metastasierung bis einschließlich der Extravasation vergleichsweise effizient ablaufen, während der folgende Beginn der Zellteilung und die von der Angiogenese abhängige Proliferation zur sichtbaren Metastase extrem ineffiziente Prozesse sind³.

In einem experimentellen Ansatz zur Lebermetastasierung wurden B16F1 Melanomzellen in die Mesenterialvene von Mäusen injiziert. Über 87% der injizierten Zellen waren nach 90 Minuten in der Mikrozirkulation der Leber arretiert und 82% hatten nach 3 Tagen den Schritt der Extravasation vollzogen. Aber nur 2% der injizierten Zellen hatten nach 3 Tagen Mikrometastasen gebildet und nur 0,02% gelang es im weiteren Verlauf sichtbare Metastasen

zu bilden³⁷. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Injektion von B16F10 Melanomzellen in die Schwanzvene zur Untersuchung der Lungenmetastasierung erzielt³⁶.

Ein Phänomen das zu dieser Ineffizienz in der Bildung von Metastasen beiträgt ist die sogenannte „Dormancy“. Sie beschreibt einen Zustand, in dem die Tumorzellen entweder als Einzelzellen verharren und weder Proliferation noch Apoptose durchlaufen oder als Mikrometastasen persistieren, in denen sich Proliferation und Apoptose die Waage halten³. Gleichzeitig spielt aber auch der Verlust von Tumorzellen durch nekrotischen oder apoptotischen Zelltod eine wichtige Rolle. Der Arrest in der Mikrozirkulation und die Interaktion mit Endothelzellen, vor allem aber auch das Überleben von einzelnen Tumorzellen, das Initiieren des Wachstums und dessen Aufrechterhaltung in Verbindung mit der Rekrutierung neuer Blutgefäße sind Schritte in der Metastasierungskaskade, die sehr vulnerabel für apoptotischen Verlust von Zellen sind³⁹.

Auch in Experimenten in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Tumorlast in den Lungen, gemessen an der Expression eines Markergenes, in den ersten Tagen nach der intravenösen Injektion von Melanomzellen zunächst sinkt und erst nach einigen Tagen wieder ansteigt.

Ein Mechanismus, der in hohem Maße für die Ineffizienz der Metastasierung mitverantwortlich ist und gleichzeitig einen bedeutenden negativen Regulationsmechanismus in der Tumorprogression darstellt, ist der apoptotische Zelltod²⁵.

1.4. Apoptose und Metastasierung

1.4.1. Physiologie der Apoptose

Die Erhaltung der Homöostase in den verschiedensten Geweben multizellulärer Organismen erfordert neben der Proliferation auch eine regulierbare Form des Zelltodes. Der programmierte Zelltod (Apoptose) erlaubt es dem Organismus kranke, nutzlose oder schädliche Zellen zu eliminieren⁴⁰. Morphologisch ist die Apoptose durch eine Chromatinverklumpung, Schrumpfung des Zellkerns und der Zelle, Blasenbildung an der Zelloberfläche und später den Zerfall von Zellkern (Karyorrhexis) und Zelle (Apoptosekörperbildung) charakterisiert. Im Gegensatz zur Nekrose ist sie nicht von einer demarkierenden Entzündung begleitet. Die apoptotischen Zellen werden von Makrophagen oder Nachbarzellen phagozytiert⁴¹.

Die Apoptose kann durch zwei Signalwege aktiviert werden, die beide mit der Aktivierung der Caspasen in einer gemeinsamen Endstrecke münden. Der extrinsische Weg wird durch die Interaktion von Todesrezeptoren mit ihren zugehörigen Liganden aktiviert, die der TNF Familie angehören. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind Fas-Ligand, TNF- α (tumor necrosis factor- α), TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) und die Lymphotoxine α und β ⁴².

Ausschlaggebend für die Aktivierung des intrinsischen Weges ist die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran. Kontrolliert wird dieser Vorgang durch die Familie der BCL-2 Proteine, deren Mitglieder teils pro- und teils anti-apoptotische Funktionen besitzen. Der intrinsische Weg kann durch eine große Zahl verschiedener Initiatorschädigungen aktiviert werden; hierzu zählen DNA-Schädigung, der Entzug von Wachstumsfaktoren, die Aktivierung von Onkogenen, die Störung intrazellulärer Signalwege oder die Zerstörung von Mikrotubuli⁴⁰.

Der extrinsische Weg mündet in der Aktivierung von Caspase-8 und -10 der intrinsische in der Aktivierung von Caspase-9. Diese drei Caspasen werden als Initiator Caspasen bezeichnet und aktivieren ihrerseits eine Reihe nachgeschalteter Caspasen die als „executioner“ Caspasen bezeichnet werden. Die proteolytische Aktivität dieser Enzyme führt zu den für die Apoptose typischen morphologischen und biochemischen Veränderungen⁴².

Durch die Aktivierung einer als CAD (caspase-activated DNase) bezeichneten Nuklease initiieren Caspasen die Fragmentierung der DNA. Caspasen sind in der Lage Intermediärfilamente, die am Aufbau der nukleären Lamina beteiligt sind, die Lamine, zu spalten, was zur Schrumpfung des Zellkerns führt. Die Spaltung von Proteinen des Zytoskeletts wie z.B. Aktin, Plektin, Fodrin oder Gelsolin hat die Schrumpfung der Zelle und die Apoptosekörperbildung zur Folge. Die Aktivierung des Enzyms PAK2 (p21-activated kinase) durch die Caspase-vermittelte Abspaltung einer regulatorischen Untereinheit ist für die Blasenbildung an der Zelloberfläche in apoptotischen Zellen verantwortlich⁴³.

1.4.2. Relevanz für die Metastasierung

Die Bedeutung der Apoptose als Barriere in der Tumor-Entstehung und -Progression wurde 1972 zum erstenmal aufgrund der Beobachtung von Apoptose in hormonabhängigen Tumoren nach dem Entzug der Hormone vermutet⁴⁴. Die Entdeckung des anti-apoptotischen Proteins bcl-2 als durch chromosomale Translokation hochreguliertem Onkogen in folliculären Lymphomen zeigt auf molekularer Ebene eine Verbindung zwischen Apoptose und Tumorentstehung. Das Tumorsuppressorgen p53 codiert für ein wichtiges pro-apoptotisches Protein, dessen funktionelle Inaktivierung durch Mutation in mehr als der Hälfte aller humanen Tumore gefunden werden kann¹¹.

Apoptose bzw. die Resistenz der Tumorzellen gegenüber apoptotischen Stimuli spielt eine bedeutende Rolle bei der Metastasierung, da viele Ereignisse, die im Rahmen der Metastasierungskaskade auftreten Apoptose induzieren können. Hierzu zählen hypoxische Zustände, der Verlust von Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakten und von Wachstumsfaktoren der lokalen Mikroumgebung und die Exposition gegenüber Scherkräften, Immunzellen und Sauerstoffradikalen während der Phase der Zirkulation und Extravasation³⁹.

Genetische Untersuchungen metastasierender humaner Tumore zeigen, dass die Tumorprogression mit einem Funktionsverlust pro-apoptotischer Gene und einer Funktionssteigerung anti-apoptotischer Gene korreliert. Bei den verschiedensten Zelllinien besteht ein umgekehrter Zusammenhang zwischen Apoptoseempfindlichkeit und Metastasierungspotential nach experimenteller Injektion²⁵. Nach intravenöser Injektion zeigten Melanomzellen, die aus primären Läsionen gewonnen waren, nach dem Arrest in der pulmonalen Strombahn eine deutlich höhere Apoptoserate als Melanomzelllinien mit hohem Metastasierungspotential, wobei sich kein Unterschied für die initiale Adhärenz feststellen ließ⁴⁵.

Einige wichtige Moleküle, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind, haben gleichzeitig auch Einfluß auf die Metastasierung. So besitzen z.B. Tumorzellen, die BCL2 überexprimieren, ein gesteigertes Metastasierungspotential, was sich an der schnelleren Entwicklung und höheren Anzahl von Metastasen in experimentellen Modellen zeigt³⁹. In einem experimentellen Modell zur Lungenmetastasierung zeigten transfizierte, BCL2 überexprimierende Melanomzellen einen Tag nach der Injektion eine 9-11 fach geringere Apoptoserate als nicht transfizierte Zellen⁴⁶. IAP's (inhibitor of apoptosis proteins) sind ebenfalls in vielen Tumoren überexprimiert. Survivin, ein Protein aus dieser Familie, gilt als Indikator für eine schlechte Prognose bei Patienten mit Ösophagus- oder Mamma-Karzinomen³⁹ und XIAP (x-linked inhibitor of apoptosis) trägt zur Anoikis-Resistenz beim Prostatakarzinom bei²⁵. Die Induktion der Apoptose in Tumorzellen durch natürliche Killerzellen erfolgt über den intrinsischen Aktivierungsweg besonders über die Rezeptoren Fas und TRAIL-R. Die Inhibition von TRAIL durch neutralisierende Antikörper oder die Verwendung von TRAIL knock-out Tieren begünstigt die Entstehung von Metastasen in spontanen und experimentellen Modellen^{25;47}. FasL sensitive, Fas positive Melanomzellen zeigen in Wildtyp-tieren und in FasL knock-out Tieren ähnliches Primärtumorwachstum, während die spontane Lungenmetastasierung in den Wildtyp-tieren stark reduziert ist⁴⁸.

Der apoptotische Zelltod und an der Apoptose beteiligte Regulatorgene haben also einen entscheidenden Einfluss auf die Metastasierung von Tumorzellen. Ein möglicher Schutzmechanismus der metastasierenden Tumorzellen gegenüber apoptotischen Stimuli könnte die Abschirmung durch an der Tumorzelloberfläche adhärierende Thrombozyten sein. Zusätzlich scheinen Thrombozyten und von Ihnen freigesetzte Mediatoren auch andere wichtige Funktionen in der Metastasierung zu besitzen.

1.5. Thrombozyten und Metastasierung

1.5.1. Tumorinduzierte Thrombozytenaggregation

Viele Tumorzellen sind in der Lage die Thrombozytenaggregation zu fördern, und diese Fähigkeit korreliert in experimentellen Modellen mit ihrem metastatischen Potential⁴⁹. Das Auftreten von thrombozytären Adhäsionsmolekülen und Aktivierungsmarkern (z.B. P-Selektin oder β -Thromboglobulin) im Blut ist ein Indikator dafür, dass sich auch bei vielen Tumorpatienten die Thrombozyten in einem aktivierten Zustand befinden⁵⁰.

Einer der Mechanismen, mit deren Hilfe Tumorzellen Thrombozyten aktivieren und die Aggregation fördern, ist die Aktivierung der Gerinnungskaskade durch die Expression und Freisetzung von tissue factor (TF = Gewebsthromboplastin)³³. TF kann gemeinsam mit Faktor VII den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade aktivieren und so die Spaltung von Prothrombin zu Thrombin induzieren. Thrombin ist einer der wichtigsten Thrombozytenaktivatoren und kann durch Stimulation des thrombozytären Thrombinrezeptors zur Affinitätssteigerung des GP IIb/IIIa beitragen⁵¹. Thrombin steigert die Adhäsion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten, wobei dieser Vorgang durch die Blockade von GP IIb/IIIa inhibierbar ist⁵². Man nimmt an, dass Integrine auf Tumorzellen Proteine wie Fibronectin oder vWF binden können, die wiederum über GP IIb/IIIa an der Thrombozytenoberfläche verankert sind⁵³. An aktiviertes GP IIb/IIIa auf Thrombozyten gebundenes Fibrinogen könnte aber auch mit dem auf sehr vielen Tumorzellen exprimierten Integrin $\alpha_v\beta_3$ in Kontakt treten und so die Aggregation zwischen Tumorzellen und Thrombozyten fördern⁴⁹. Das GP IIb/IIIa spielt also eine wichtige Rolle in der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaggregation. Weitere Mechanismen der Aktivierung sind die Sezernierung von ADP durch manche Tumore sowie der direkte Kontakt mit Molekülen der Tumorzelloberfläche³³.

1.5.2. Einfluß der Thrombozyten auf Tumorprogression und Metastasierung

Schon 1865 erkannte Trousseau den Zusammenhang zwischen Blutgerinnung und Tumorerkrankungen, indem er das Auftreten migratorischer Thrombophlebitiden als Warnzeichen für eine okkulte maligne Erkrankung interpretierte⁵⁴. Abweichungen von der normalen Thrombozytenzahl im Blut sind bei Tumorpatienten häufig zu beobachten. Sowohl Thrombozytosen mit thrombembolischen Komplikationen als auch Thrombozytopenien können auftreten. Während Faktoren wie Thrombopoietin, für das bei Tumorpatienten mit reaktiver Thrombozytose erhöhte Plasmaspiegel beobachtet wurden, oder GM-CSF und Interleukine eine erhöhte Thrombozytenzahl bedingen können⁵⁰, ist für die Thrombozytopenie hauptsächlich der Verbrauch im Rahmen einer disseminierten intravaskulären Gerinnung nach tumorzellinduzierter Thrombozytenaggregation oder immunologische Vorgänge (autoimmune thrombozytopenische Purpura) verantwortlich.

Die Thrombozytenzahl hat bei vielen Tumoren auch prognostischen Wert. Während z.B. beim Magen-, Kolon-, Lungen-, Nieren- und Prostata- Karzinom und bei einigen gynäkologischen Tumoren eine Thrombozytose mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, gilt das gleiche beim Pankreaskarzinom für eine niedrige Thrombozytenzahl³³.

Anhaltspunkte für den Zusammenhang zwischen Thrombozyten und Metastasierung erbrachten Experimente, deren Ergebnis eine verminderte Metastasenzahl nach Tumorzellinjektion in Mäuse mit medikamentös induzierter Thrombozytopenie war⁵⁵. In vielen weiteren Experimenten konnten mithilfe antithrombotischer Medikamente die Tumormetastasierung reduziert werden³³.

Antikoagulantien wie Heparin oder Hirudin, deren Wirkung vor allem auf die Inhibition von Thrombin abzielt, inhibieren die Metastasierung⁵⁶, indem sie der thrombininduzierten Tumorzell-Thrombozyten Adhäsion entgegenwirken⁵⁰. Hirudin reduziert gleichzeitig die Freisetzung von VEGF aus aktivierten Thrombozyten³³.

Viele Medikamente aus der Klasse der nichtsteroidalen Antirheumatika, die thrombozytenaggregationshemmende Wirkungen aufweisen, besitzen ebenfalls Einfluß auf die Metastasierung. So konnte z.B. Flurbiprofen, ein Inhibitor der Prostaglandin Synthetase, das Auftreten spontaner Metastasen in tumortragenden Mäusen verringern. Auch Postacyclin oder Hemmstoffe der Thromboxan A₂ Synthetase sind in der Lage in experimentellen Modellen die Formation von Metastasen zu verringern. Für Acetylsalicylsäure ergaben sich in verschiedenen Experimenten widersprüchliche Ergebnisse⁵⁰.

Auch für Medikamente aus der Substanzklasse der Glykoprotein IIb/IIIa Inhibitoren konnte ein inhibitorischer Effekt auf die tumorzellinduzierte Thrombozytenaggregation und die Metastasierung nachgewiesen werden⁵⁰. Die Therapie mit XV454, einem oralen GP IIb/IIIa Antagonist aus der Gruppe der RGD-Peptid Mimetika, konnte die Tumorlast in den Lungen 18 Tage nach intravenöser Tumorzellinjektion um 90% senken⁵⁷. Schon in Integrin β_3 knock-out Tieren (IIIa-Untereinheit des GP IIb/IIIa) konnte die wichtige Rolle dieses Integrins für die Metastasierung gezeigt werden⁵⁸.

Klinische Studien zur Wirkung antithrombotischer Medikation auf die Metastasierung existieren vor allem für Substanzen, die die plasmatische Gerinnung modulieren. Zunächst erbrachten Studien mit Vitamin-K Antagonisten vielversprechende Ergebnisse, die allerdings in späteren Untersuchungen nicht bestätigt werden konnten. Die Behandlung von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom mit niedermolekularem Heparin und Chemotherapie führt im Vergleich zur Chemotherapie alleine zu einer Verlängerung sowohl der medianen progressionsfreien Überlebenszeit als auch der Gesamtüberlebenszeit⁵⁹. Auch die routinemäßige Antikoagulation mit Heparin im Rahmen onkologischer Operationen scheint die Prognose zu verbessern³³. In einer Metaanalyse großangelegter Studien zur Untersuchung der Prävention kardiovaskulärer Ereignisse bei täglicher Einnahme von Aspirin konnte eine deutlich reduzierte Metastasierungsinzidenz bei Adenokarzinomen in den Therapiegruppen gefunden werden⁶⁰.



Abbildung 1.2.: Thrombozyten und Metastasierung

Schematische Darstellung möglicher metastasierungsförderlicher Einflüsse von Thrombozyten. Thrombozyten können die Adhärenz am Endothel vermitteln, oder durch die Vernetzung der Tumorzellen untereinander zur Bildung von Thrombozyten-Tumorzellemboli beitragen, die aufgrund ihrer Größe in kleineren Gefäßen hängen bleiben. Durch Bindung an die Oberfläche der Tumorzellen ist ein Schutz vor Immunzellen möglich. Aus aktivierten Thrombozyten freigesetzte Mediatoren wie z.B. PDGF oder VEGF können die Extravasation und das Wachstum der Tumorzellen begünstigen.

Mehrere Gründe für den metastasierungsfördernden Effekt der Thrombozyten-Aktivierung und -Aggregation sind denkbar. Thrombozyten können den Tumorzellarrest und die Adhärenz am Endothel fördern oder durch ihre Akkumulation auf Tumorzellen protektive Wirkung gegen Angriffe von Immunzellen besitzen. Verschiedene aus den Granula aktivierter Thrombozyten sezernierte Faktoren tragen zum Tumorwachstum, zur Angiogenese und zur Extravasation bei³³.

In Abbildung 1.2. sind mögliche metastasierungsfördernde Funktionen der Thrombozyten schematisch zusammengefasst.

1.6. Zielsetzung

Metastasierung kann also als ineffizienter Prozess beschrieben werden in dessen Verlauf sowohl der apoptotische Zelltod als auch Thrombozyten eine wichtige Funktion einnehmen. Trotz einer Vielzahl experimenteller und klinischer Untersuchungen sind viele Fragen zum Ablauf der Metastasierung offen. Ziel dieser Arbeit ist es deshalb den Ablauf der Metastasierung in einem Modell näher zu charakterisieren. Vor dem Hintergrund möglicher metastasierungsförderlicher Funktionen von Thrombozyten soll hierbei insbesondere auch der Effekt einer antithrombozytären Therapie auf die Metastasierung untersucht werden.

Zur experimentellen Untersuchung der Metastasierung benötigt man Modelle. Die komplexen biologischen Vorgänge und Veränderungen der Interaktion zwischen Tumorzellen und umgebendem Gewebe während der verschiedenen Schritte der Metastasierungskaskade können als Ganzes nur in in vivo Experimenten untersucht werden. Dieser Arbeit liegt ein syngenes experimentelles Metastasierungsmodell zugrunde, in dem B16 D5 Melanomzellen in die Schwanzvene von C57/BL6 Mäusen injiziert werden. Im Abstand von ca. 8 Tagen nach der Injektion entwickeln die Mäuse Lungenmetastasen, die aufgrund ihrer Melaninpigmentierung gut sichtbar sind.

Durch die Ermittlung der Metastasenzahl an der Lungenoberfläche steht somit ein Parameter zur Verfügung, mit Hilfe dessen die Metastasierung in diesem Modell beurteilt werden kann. Zusätzlich sollen durch die Isolierung von mRNA aus den Lungen und nachfolgende Genexpressionsanalyse die Vorgänge in der Lunge nach der Injektion der Tumorzellen untersucht werden.

Da Metastasierung als ineffizienter Prozess beschrieben wird, kann man vermuten dass es initial zu einem Verlust von Tumorzellen kommt. Das initiale Überleben der Tumorzellen in den Lungen nach i.v. Injektion bzw. der zeitliche Verlauf der lokalen Tumorlast soll anhand der Expressionsanalyse des Melanozytenmarkergens P-mel 17 untersucht werden.

Mögliche Gründe für einen initialen Verlust von Tumorzellen könnte die Induktion von Apoptose oder die gegen die Tumorzellen gerichtete Immunabwehr sein. Deshalb soll in dieser Arbeit die Expression einer Vielzahl apoptoserelevanter Gene mithilfe eines c-DNA Arrays analysiert werden. Zur Beurteilung der gegen die Tumorzellen gerichteten Immunabwehr soll die Expression von Fas und Fas-Ligand untersucht werden - beides Gene die eine wichtige Funktion bei der Elimination von Tumorzellen durch zytotoxische T-Zellen (CTL's) und natürliche Killerzellen (NK's) besitzen²⁵.

Die Entwicklung von deutlich sichtbaren Metastasen an der Lungenoberfläche in dem Metastasierungsmodell dieser Arbeit zeigt, dass zu späteren Zeitpunkten das Überleben und das Wachstum der Tumorzellen einen initialen Zellverlust überwiegen muss. Daran beteiligt sein könnten Gene, die die Invasivität der Tumorzellen steigern oder den Tumorzellen lokale Wachstumsvorteile verschaffen.

Deshalb soll in dieser Arbeit die Expression der Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 sowie der Semaphorine 3A und 4D untersucht werden. Diese Gene besitzen eine wichtige Funktion für die Invasivität und Motilität von vielen unterschiedlichen Zellarten inkl. Tumorzellen besitzen^{13;15;16}.

Kandidaten-Gene, durch deren Expressionsanalyse lokale Wachstumsvorteile charakterisiert werden sollen, sind HGF (hepatocte growth factor/scatter factor) und der zugehörige Wachstumsfaktorrezeptor c-met (HGF-Rezeptor). HGF hat wichtige Funktionen als Mitogen für Leberzellen (HGF) und Zellmotilitätsfaktor (SF)⁶¹. Neben Hepatozyten hat das HGF/c-met Signal aber auch einen stark mitogenen Effekt auf Melanozyten und Prostata-Zellen¹². Die Aktivierung des c-met Rezeptors durch HGF Bindung führt zu einer Vielzahl zellulärer Reaktionen wie z.B. Proliferation, gesteigertem Überleben, Angiogenese und invasivem Wachstum²².

Ein möglicher Mechanismus, mit Hilfe dessen die Tumorzellen vor im Gefäßsystem auftretenden Scherkräften oder der Immunabwehr geschützt werden, ist die Bindung von Thrombozyten an der Oberfläche der Tumorzellen. Darüber hinaus nimmt man an, dass aktivierte Thrombozyten durch Interaktion mit Tumorzellen in der Zirkulation deren Adhärenz am Endothel steigern und durch die Sezernierung verschiedener Cytokine die Extravasation und Proliferation der metastasierenden Zellen begünstigen können (siehe 1.5.2.). Durch Reduktion der Thrombozytenaggregationsfähigkeit könnte also das initiale Überleben der Tumorzellen in der Lunge weiter gesenkt und so die Ineffizienz der Metastasierung gesteigert werden. Deshalb soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine medikamentöse Intervention durch Hemmung der Thrombozytenaggregation die Metastasierung reduzieren kann, und ob eine antithrombozytäre Therapie Einfluss auf die Genexpression in den Lungen nach der Tumorzellinjektion besitzt.

1.7. Fragestellung

An einem Maus-Modell zur Metastasierung des B16 Melanoms sollen in dieser Arbeit die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Wie sieht der Verlauf der Tumorlast im primären Metastasierungsorgan Lunge nach der Injektion der Tumorzellen gemessen anhand der Expression eines Markergens aus?
2. Lassen sich anhand der Genexpressionsanalyse mithilfe eines cDNA-Arrays Indikatoren für einen apoptotischen Zelltod der Tumorzellen in den Lungen finden?
3. Lassen sich anhand der Genexpressionsanalyse mithilfe der RT-PCR Indikatoren für eine Elimination von Tumorzellen durch Zellen des Immunsystems in der Lunge finden?
4. Verändert sich die Expression von Genen in den Lungen, die die Invasivität der Tumorzellen charakterisieren (MMP 2, MMP 9, Semaphorin 3A und 4D) im Verlauf nach der Tumorzellinjektion?
5. Wie gestaltet sich die Expression von Kandidaten-Genen, die die lokale Proliferation fördern können (HGF, c-met) im Verlauf nach der Tumorzellinjektion?
6. Kann eine medikamentöse antithrombozytäre Therapie die Metastasierung in diesem Experiment reduzieren?
7. Hat eine antithrombozytäre Therapie Einfluss auf das initiale Überleben der Tumorzellen in den Lungen?
8. Kommt es unter einer antithrombozytären Therapie zu einer Änderung der Expression von Genen in den Lungen, die die gegen den Tumor gerichtete Immunantwort, die Invasivität oder das lokale Wachstum charakterisieren?

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Tiere

Als Versuchstiere kamen weibliche C57/BL6 Mäuse mit einem Gewicht von 20-30g zum Einsatz. Diese Tiere entstammten zum Teil der Zucht am Institut für Chirurgische Forschung (ICF) oder wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen. Die Haltung erfolgte in Gruppen von 2-5 Tieren im Tierstall des ICF. Die Versuche waren durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.1.2. Tumorzellen

Den Tieren wurden intravenös Melanomzellen der Zelllinie B16/D5 injiziert. Es handelt sich hierbei um eine Untergruppe der Linie B16/BL6, die sich durch eine sehr hohe metastatische Aktivität auszeichnet⁶². Die Tumorzellen wurden in Komplet-Medium kultiviert (RPMI 1640-Medium; enthält 0,1 mM nichtessentielle Aminosäuren, 1mM Natrium-Pyruvat, 2mM L-Glutamin und 50 µg/ml Gentamycin-Sulfat; hinzugegeben wurde 50 µM 2-ME und 10% FCS). Die Zellen wurden mittels Zugabe von Trypsin vom Boden der Kulturgefäße gelöst und für die Injektion auf eine Konzentration von 2×10^6 /ml eingestellt.

Die Injektion erfolgte über die Schwanzvene. Es wurden pro Tier ein Volumen von 100µl injiziert, um eine sichere intravenöse Injektion zu garantieren. Zur Vermeidung embolischer Komplikationen wurden die Zellen unmittelbar vor der Injektion durch mehrfaches Pipettieren erneut in Suspension gebracht.

2.1.3. Medikamente

Zur Hemmung der Thrombozytenaggregationsfähigkeit wurden mehrere Medikamente verabreicht.

Als Hemmstoffe der Cyclooxygenase wurden Aspirin bzw. Aspisol eingesetzt. Aspirin wurde in einer Konzentration von 3mg/100ml dem Trinkwasser beigegeben. Aspisol wurde mit einer Dosierung von 0,3 mg/d intraperitoneal injiziert.

Clopidogrel (Handelsname Plavix; Firma Sanofi-Aventis) hemmt die ADP abhängige Aktivierung der Thrombozyten, und wurde in einer Dosierung von 1mg/d gegeben.

EMD 122347 (Handelsname Gantofiban; Firma Merck, Darmstadt) ist eine dem klinisch eingesetzten Medikament Tirofiban ähnliche Substanz, die allerdings oral verabreicht werden kann und erst im Körper zur aktiven Wirksubstanz metabolisiert wird. Diese blockiert das Glykoprotein IIb/IIIa und verhindert somit die Vernetzung der Thrombozyten über Fibrinogen. EMD 122347 wurde in einer Dosierung von 2mg/d gegeben, was bei einem Gewicht der Tiere von ca. 20g einer Dosierung von 100mg/kg entspricht. Diese Dosierung führt zu einer Konzentration von 3µg/ml im Blut und liegt somit weit unter der toxischen Dosis von 1000mg/kg gleichzeitig aber auch 10-fach über der IC50 für die Blockade der TRAP-induzierten Thrombozytenaggregation⁶³.

Clopidogrel und EMD 122347 wurden den Tieren oral über eine Magensonde verabreicht. Als Träger diente eine Gummi Arabicum 1% Lösung, in der die Medikamente so konzentriert waren, dass die zu verabreichende Dosis jeweils in einem Volumen von 100µl appliziert werden konnte. Für das Einbringen der Magensonde wurden die Tiere in eine leichte Äthernarkose versetzt. Die Sonde wurde dann sehr vorsichtig eingeführt, ohne dass ein

Widerstand überwunden werden musste. Dazu musste die Narkose so flach sein, dass der Schluckreflex erhalten war, um eine tracheale Applikation zu vermeiden.

Die medikamentöse Therapie begann bei EMD und Clopidogrel einen Tag und bei Aspisol und Aspirin eine Stunde vor der Tumorzellinjektion.

2.2. Methoden

2.2.1. Versuchsablauf

Der Tag der Tumorzellinjektion wurde als Tag 0 definiert. Zur Untersuchung der Genexpression im Verlauf wurden die Lungen am Tag 0,1,2,4,6, und 8 entnommen. Tag 0 entspricht hier einer Lungenpräparation zwei Stunden nach der Injektion der Tumorzellen.

Zur Untersuchung der Expression apoptoserelevanter Gene mithilfe des c-DNA Arrays wurden Lungen an den Tagen 1,2,3 und 4 entnommen. Zusätzlich wurde hier auch die Expression dieser Gene in Lungen ohne vorherige Tumorzellinjektion analysiert.

Zur Beurteilung der Rolle von Thrombozyten wurde die Thrombozytenaggregation medikamentös gehemmt und am Versuchsende die Metastasenzahl bestimmt. Hierzu wurden die Lungen am Tag 9 entnommen. Es wurden zunächst die Medikamente Aspirin, Aspisol, Clopidogrel und EMD 122347 bis einschließlich Tag 4 verabreicht. In zwei weiteren Experimenten wurde die Therapie nur mit EMD 122347 - einmal bis Tag 4 und einmal bis zum Versuchsende - durchgeführt.

Zur Untersuchung der Genexpression im Verlauf unter der antithrombozytären Therapie wurden die Lungen am Tag 0,1,2,4,6, und 8 entnommen. Die medikamentöse Therapie wurde nur mit EMD 122347 durchgeführt und immer bis zum Zeitpunkt der Entnahme weitergeführt.

2.2.2. Entnahme und Präparation der Lungen

Zum Zeitpunkt der Entnahme der Lungen wurden die Tiere mit Diäthyläther tief betäubt und durch Überstreckung der Halswirbelsäule getötet. Dann wurde mit zwei Schnitten, von der Mitte des Abdomens beidseitig zu den Achseln verlaufend, das Abdomen und der Thorax eröffnet. Die Lungen wurden am Hilus abgesetzt und zur Reinigung in PBS geschwenkt. Die Zählung der Metastasen erfolgte am intakten Organ, während die Lungen für die Isolierung von RNA in 3-4 Stücke zerteilt und in einer RNA-Stabilisator-Lösung (RNAlater, Firma Ambion) bei +4°C gelagert wurden.

2.2.3. Metastasenzählung

Um die Anzahl der Metastasen an der Lungenoberfläche zu quantifizieren, wurden die Lungen unbehandelt mit einer Digitalkamera fotografiert. Dazu war es nötig die gesamte Oberfläche einer Lungenseite in eine Ebene zu bringen, weil nur so Probleme bei der Fokussierung vermieden und alle Bereiche der Lungenoberfläche scharf abgebildet werden konnten. Der Boden einer Petrischale, die auf ihren Rand mit dem Boden nach oben aufgestellt wurde, diente hierbei als Träger. Die Lungen konnten dann von unten an den Boden gegeben werden und blieben dort haften. In Abbildung 2.1. ist eine Skizze dieser Anordnung wiedergegeben. Die Fotografie erfolgte dann durch die Petrischale hindurch. Es wurde immer Vorder- und Rückseite der linken Lunge aufgenommen und die Bilddateien auf den Computer übertragen.

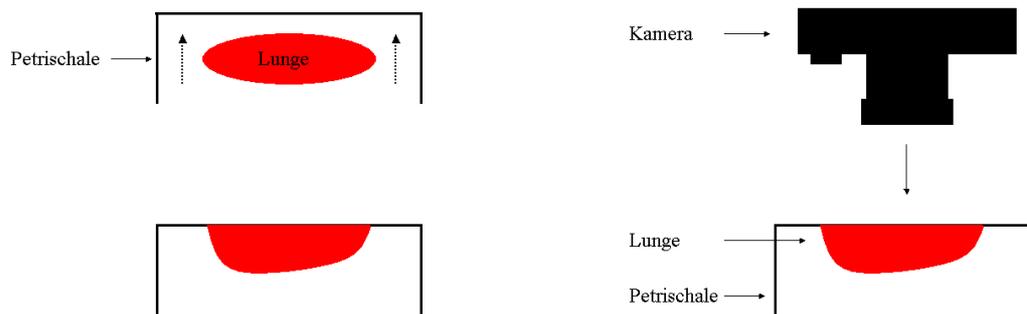


Abbildung 2.1.: Skizze der Photographie der Lungen. Die Lungen bleiben am Boden der Petrischale haften. Dadurch befindet sich die gesamte Lungenoberfläche einer Seite in einer Ebene. Dies ermöglicht eine scharfe Photographie ohne Fokussierungsprobleme.

Die durch die Melaninpigmentierung deutlich sichtbaren Metastasen an der Lungenoberfläche wurden dann auf dem Computerbildschirm ausgezählt. Hierzu wurde um Mehrfachzählungen zu vermeiden ein Gitternetz über das Bild gelegt. Die Summe der Zählung der Vorder- und Rückseite ergab die Metastasenzahl.

Die Auszählung wurde verblindet.

2.2.4. Genanalytik

2.2.4.1. RNA Isolierung

Die in RNA-later gelagerten Lungenstücke wurden mithilfe eines Homogenisators (Omni 2000) zerkleinert, und anschließend die RNA isoliert (RNA-Isolierungs-Kit NucleoSpin RNA II der Firma Macherey Nagel). Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde photometrisch bestimmt (BioPhothometer, Firma Eppendorf), wobei bei einer Länge des Strahlengangs durch die Probe von 1cm eine Extinktion von 1 bei 260nm ($E_{260}=1$) einer Konzentration von 40 μ g/ml entspricht. Gleichzeitig wurde der Quotient der Extinktion bei 260 nm (Absorptionsmaximum der RNA und DNA) und der Extinktion bei 280 nm (Absorptionsmaximum der Proteine) als Gradmesser für die Verunreinigung der Probe mit Proteinen bestimmt. Es wurden nur Proben mit einem Quotienten $> 1,7$ verwendet.

Zur weiteren Qualitätssicherung wurde die isolierte RNA gelelektrophoretisch untersucht (Agarosegel mit 1% Agarose; Laufzeit 30min bei 120V, 90mA). Gefordert war hierbei das charakteristische Doppelbandenmuster der 23 S und der 18 S Untereinheiten der ribosomalen RNA. Abbildung 2.2. zeigt die Gelelektrophorese intakter RNA.

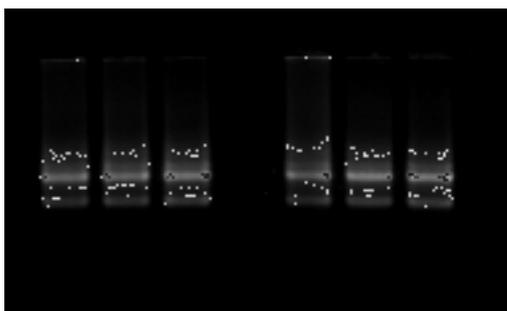


Abbildung 2.2.:

Gelelektrophorese intakter RNA. Zu erkennen ist das charakteristische Doppelbandenmuster. Dies kommt durch die gelelektrophoretische Trennung der ribosomalen RNA in ihre 23 S und 18 S Untereinheiten zustande.

2.2.4.2. c-DNA Synthese

In einem weiteren Schritt wurde zur RNA komplementäre c-DNA hergestellt. Hierzu wurden die Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP) Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) und Desoxythymidintriphosphat (dTTP) zur RNA gegeben (dNTP-Mix, Firma Boehringer). Zur Katalyse der c-DNA Synthese wurde M-MLV Reverse Transkriptase eingesetzt (Firma Gibco BRL). Durch die Verwendung eines Poly-T-Primers (Oligo p(dT)₁₅ – Primer, Firma Boehringer) konnte selektiv zur mRNA komplementäre c-DNA gewonnen werden, da diese ein Poly-A-Ende aufweist.

2.2.4.3. PCR

Aus der c-DNA wurden im weiteren Verlauf mithilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verschiedene Gene amplifiziert. Zur c-DNA wurden DNA-Polymerase (PAN-DNA-Polymerase, Firma PAN-Systems), die DNA-Bausteine dATP, dCTP, dGTP und dTTP (dNTP-Mix, Firma Boehringer), sowie für die zu amplifizierenden Gene spezifische Oligonukleotid-Primer gegeben.

In mehreren Zyklen wurde der Ansatz zunächst zur Denaturierung der c-DNA auf 94°C erhitzt, dann auf eine primerspezifische Annealingtemperatur gebracht, und zuletzt auf 72°C, die optimale Arbeitstemperatur für die DNA-Polymerase, eingestellt. Die Zykluszahl war empirisch festgelegt. Außerdem wurde jedes Gen mit zwei unterschiedlichen Zykluszahlen amplifiziert, und so über die Zunahme der Intensität bei der späteren Gelelektrophorese ausgeschlossen, dass sich die Reaktion bereits im Sättigungsbereich befand.

Die Reaktionsprodukte der PCR wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und eine Elektrophorese durchgeführt. Gefärbt wurde die DNA mit Ethidiumbromid. Durch das gleichzeitige Auftragen eines Molekulargewichtsmarkers konnte sichergestellt werden, dass die PCR Produkte in ihrer Anzahl an Basenpaaren dem zu erwartenden Produkt entsprachen, und somit kein Reaktionsfehler wie z.B. eine unspezifische Bindung aufgetreten war.

Die Gele wurden unter UV-Belichtung fotografiert und die Bilddateien zur weiteren Auswertung auf dem Computer gespeichert. Dabei diente die Leuchtintensität der Ethidiumbromid gefärbten Banden als Grundlage der weiteren Auswertung. Die Intensität korreliert mit der eingesetzten Menge an c-DNA für ein bestimmtes Gen und somit mit der mRNA-Expression des Gens im untersuchten Gewebe.

2.2.4.4. c-DNA Array

Die Array-Untersuchungen wurden mithilfe des GEMatrix Q Series Mouse Apoptosis Gene Array der Firma Superarray/ Bioscience Corporation durchgeführt. Dieser Array ermöglicht die gleichzeitige Expressionsanalyse von 96 Genen, die im Rahmen des apoptotischen Zelluntergangs eine wichtige Rolle spielen.

Zunächst wurde eine zur isolierten RNA komplementäre und Biotin markierte DNA hergestellt. Diese wurde nun mit dem Array inkubiert um eine Hybridisierung der markierten cDNA mit den auf der Nylonmembran des Array immobilisierten spezifischen Nukleinsäuresequenzen zu erzielen. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Detektion der gebundenen cDNA. Hierzu wurde an Streptavidin gebundene Peroxidase zugegeben. Nach der Bindung von Streptavidin an Biotin wurde erneut gewaschen und zuletzt ein Chromogen zugegeben, dessen Chemilumineszenz nach der Umsetzung durch die Peroxidase als Grundlage der weiteren Auswertung diente. Zur Aufzeichnung des Chemilumineszenzsignals wurde der Array auf einen Röntgenfilm gelegt. Diese Prozedur wurde für jeden Array mit

Belichtungszeiten von 5, 10 und 40 Minuten durchgeführt. Nach der Entwicklung wurden die Röntgenfilme zur weiteren Auswertung eingescannt und im .tif Format gespeichert.

Die auf dem Array immobilisierten Nukleinsäuresequenzen sind jeweils viermal vertreten und so angeordnet, dass ein identisches Gen jeweils von einer Gruppe von vier quadratisch angeordneten Punkten repräsentiert wird. Als positives Ergebnis wurde nur ein Signal aller vier Punkte gewertet. Abbildung 2.3. zeigt das Bild eines Arrays. In Tabelle 2.1. findet sich eine Liste der mit dem Array untersuchten Gene.

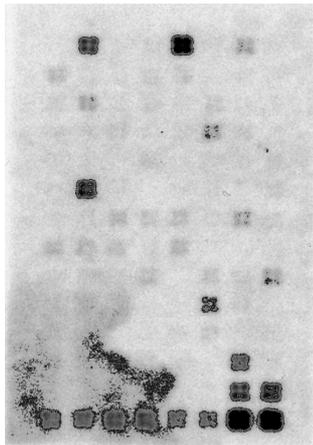


Abbildung 2.3.:

Bild eines Array; Nylonmembran mit der sequenzspezifisch gebundenen Biotin-markierten c-DNA, Bindung einer Streptavidin-gebundenen Peroxidase an Biotin, Umsetzung eines Chromogens durch die Peroxidase, Aufzeichnung der Chemilumineszenz durch Belichtung eines Röntgenfilms. Die Abbildung zeigt das eingescannte Bild eines entwickelten Films. Gut zu erkennen ist, dass jedes Gen viermal in einer Gruppe quadratisch angeordneter Punkte auf der Membran immobilisiert ist.

Zum Ausgleich der unterschiedlichen Hintergrundbelichtung wurde für jedes Gen die Belichtung in der unmittelbaren Umgebung gemessen und subtrahiert.

Tabelle 2.1.: Liste der Gene auf dem c-DNA Array

GEM-Array Q Series Mouse Apoptosis Gene Array					
MM-002 Gene Table					
Position	UniGene	GenBank	Symbol	Description	Gene Name
1	Mm.220289	NM_009684	Apaf1	Apoptotic protease activating factor 1	Apaf-1
2	Mm.8983	NM_023517	Tnfsf13	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	APRIL
3	Mm.25405	NM_018790	Arc	Activity regulated cytoskeletal-associated protein	Arc
4	Mm.24163	NM_023258	Asc	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	ASC
5	Mm.5088	NM_007499	Atm	Ataxia telangiectasia mutated homolog (human)	ATM
6	Mm.4387	NM_007522	Bad	Bcl-associated death promoter	Bad
7	Mm.2443	NM_007523	Bak1	BCL2-antagonist/killer 1	bak
8	Mm.223689	NM_025976	Bfar	Bifunctional apoptosis regulator	Bar
9	Mm.19904	NM_007527	Bax	Bcl2-associated X protein	Bax
10	Mm.239141	NM_009740	Bcl10	B-cell leukemia/lymphoma 10	CARD
11	Mm.347397	NM_009741	Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2	Bcl-2
12	Mm.87857	NM_007536	Bcl2a1d	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1d	Bfl-1
13	Mm.238213	NM_009743	Bcl2l	Bcl2-like	Bcl-x
14	Mm.25988	NM_013479	Bcl2l10	Bcl2-like 10	Bcl-10/HuE10
15	Mm.6967	NM_007537	Bcl2l2	Bcl2-like 2	Bcl-w
16	Mm.235081	NM_007544	Bid	BH3 interacting domain death agonist	Bid
17	Mm.21912	NM_007545	Bid3	BH3 interacting (with BCL2 family) domain, apoptosis agonist	hrk
18	Mm.267006	NM_007546	Bikl	Bcl2-interacting killer-like	bik
19	Mm.141083	NM_009754	Bcl2l11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	bim
20	Mm.8898	NM_008670	Birc1a	Baculoviral IAP repeat-containing 1a	NAIP1
21	Mm.89961	NM_010872	Birc1b	Baculoviral IAP repeat-containing 1b	NAIP2
22	Mm.290476	NM_010870	Birc1e	Baculoviral IAP repeat-containing 1e	NAIP5
23	Mm.2026	NM_007464	Birc2	Baculoviral IAP repeat-containing 2	IAP1
24	Mm.335659	NM_007465	Birc3	Baculoviral IAP repeat-containing 3	IAP2
25	Mm.259879	NM_009688	Birc4	Baculoviral IAP repeat-containing 4	IAP3
26	Mm.8552	NM_009689	Birc5	Baculoviral IAP repeat-containing 5	Api4
27	Mm.290908	NM_007566	Birc6	Baculoviral IAP repeat-containing 6	Bruce
28	Mm.3962	NM_007549	Blk	B lymphoid kinase	blk
29	Mm.2159	NM_009760	Bnip3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 1, NIP3	Nip3
30	Mm.3295	NM_016778	Bok	Bcl-2-related ovarian killer protein	bok/mtd
31	Mm.268165	NM_009805	Cflar	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	Casper
32	Mm.1051	NM_009807	Casp1	Caspase 1	Caspase-1
33	Mm.1569	NM_007609	Casp4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	Caspase 11
34	Mm.42183	NM_009808	Casp12	Caspase 12	Caspase-12
35	Mm.20940	NM_009809	Casp14	Caspase 14	Caspase14
36	Mm.3921	NM_007610	Casp2	Caspase 2	Caspase-2
37	Mm.34405	NM_009810	Casp3	Caspase 3, apoptosis related cysteine protease	Caspase-3
38	Mm.281379	NM_009811	Casp6	Caspase 6	Caspase-6
39	Mm.35687	NM_007611	Casp7	Caspase 7	Caspase-7
40	Mm.131130	NM_009812	Casp8	Caspase 8	Caspase-8
41	Mm.22279	NM_011997	Casp8ap2	Caspase 8 associated protein 2	Flash
42	Mm.88829	NM_015733	Casp9	Caspase 9	Caspase 9/Mch6
43	Mm.195663	NM_007669	Cdkn1a	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	p21Waf1/p21cip

GEArray Q Series Mouse Apoptosis Gene Array

Position	UniGene	GenBank	Symbol	Description	Gene Name
44	Mm.16753	NM_007691	Chek1	Checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe)	chk1
45	Mm.449	NM_007702	Cidea	Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A	CIDE-A
46	Mm.10737	NM_009894	Cideb	Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector B	CIDE-B
47	Mm.17493	NM_009950	Cradd	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	CRADD
48	Mm.335252	NM_010019	Dapk2	Death-associated kinase 2	DAPkinase
49	Mm.41433	NM_010044	Dffa	DNA fragmentation factor, alpha subunit	DFFA
50	Mm.86386	NM_007859	Dffb	DNA fragmentation factor, beta subunit	DFF40/CAD
51	Mm.200792	NM_178589	Tnfrsf21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	DR6
52	Mm.5126	NM_010175	Fadd	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	FADD
53	Mm.1236	NM_007836	Gadd45a	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	Gadd45
54	Mm.42201	NM_008316	Hus1	Hus1 homolog (S. pombe)	Hus1
55	Mm.87767	NM_010735	Lta	Lymphotoxin A	TNFB
56	Mm.1715	NM_008518	Ltb	Lymphotoxin B	LT-b
57	Mm.3122	NM_010736	Ltbr	Lymphotoxin B receptor	Ltbr
58	Mm.1639	NM_008562	Mcl1	Myeloid cell leukemia sequence 1	Mcl-1
59	Mm.22670	NM_010786	Mdm2	Transformed mouse 3T3 cell double minute 2	Mdm2
60	Mm.213003	NM_010851	Myd88	Myeloid differentiation primary response gene 88	Myd88
61	Mm.204876	NM_030152	Nol3	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)	Nop30-like
62	Mm.279308	NM_016681	Chek2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	RAD53/Chk2
63	Mm.314528	NM_009068	Ripk1	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	RIP
64	Mm.29073	NM_026632	Rpa3	Replication protein A3	Rpa3
65	Mm.244393	NM_011529	Tank	TRAF family member-associated Nf-kappa B activator	I-TRAF
66	Mm.1293	NM_013693	Tnf	Tumor necrosis factor	TNFA
67	Mm.193430	NM_020275	Tnfrsf10b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	TRAIL-R/DR5
68	Mm.6251	NM_009399	Tnfrsf11a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a	TNFRSF11A
69	Mm.15383	NM_008764	Tnfrsf11b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	OPG
70	Mm.101198	NM_033042	Tnfrsf25	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25	WSL-1/ DR3/ Apo3/ Tnfrsf12
71	Mm.1258	NM_011609	Tnfrsf1a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	TNFR2
72	Mm.235328	NM_011610	Tnfrsf1b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	TNFR1
73	Mm.13885	NM_011659	Tnfrsf4	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4	OX40
74	Mm.271833	NM_011611	Tnfrsf5	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	Cd40
75	Mm.1626	NM_007987	Tnfrsf6	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	Fas
76	Mm.121	XM_284241	Tnfrsf7	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7	CD27
77	Mm.12810	NM_009401	Tnfrsf8	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8	CD30
78	Mm.244187	NM_011612	Tnfrsf9	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	4-1BB
79	Mm.1062	NM_009425	Tnfsf10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	Trail
80	Mm.249221	NM_011613	Tnfsf11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	TNFSF11
81	Mm.344820	NM_011614	Tnfsf12	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	APO3L
82	Mm.307668	NM_019418	Tnfsf14	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14	HVEM-L
83	Mm.4994	NM_009452	Tnfsf4	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4	OX40L
84	Mm.4861	NM_011616	Tnfsf5	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 5	CD40L
85	Mm.3355	NM_010177	Tnfsf6	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6	FasL

GEMArray Q Series Mouse Apoptosis Gene Array

Position	UniGene	GenBank	Symbol	Description	Gene Name
86	Mm.42228	NM_011617	Tnfsf7	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7	CD27L/CD70
87	Mm.4664	NM_009403	Tnfsf8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8	CD30L
88	Mm.41171	NM_009404	Tnfsf9	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	4-1BBL
89	Mm.239514	NM_009421	Traf1	Tnf receptor-associated factor 1	TRAF1
90	Mm.3399	NM_009422	Traf2	Tnf receptor-associated factor 2	TRAF2
91	Mm.27431	NM_011632	Traf3	Tnf receptor-associated factor 3	CRAF1
92	Mm.4521	NM_009423	Traf4	Tnf receptor-associated factor 4	TRAF4
93	Mm.196445	NM_011633	Traf5	Tnf receptor-associated factor 5	TRAF5
94	Mm.292729	NM_009424	Traf6	Tnf receptor-associated factor 6	TRAF6
95	Mm.297870	NM_011634	Traip	TRAF-interacting protein	TRIP
96	Mm.222	NM_011640	Trp53	Transformation related protein 53	p53
97	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
98	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
99	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
100	Blank	Blank	Blank	Blank	0
101	Blank	Blank	Blank	Blank	0
102	Blank	Blank	Blank	Blank	0
103	Mm.5289	NM_008084	Gapd	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
104	Mm.5289	NM_008084	Gapd	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
105	Mm.5246	NM_008907	Ppia	Peptidylprolyl isomerase A	CyclophilinA
106	Mm.5246	NM_008907	Ppia	Peptidylprolyl isomerase A	CyclophilinA
107	Mm.5246	NM_008907	Ppia	Peptidylprolyl isomerase A	CyclophilinA
108	Mm.5246	NM_008907	Ppia	Peptidylprolyl isomerase A	CyclophilinA
109	Mm.180458	NM_009438	Rpl13a	Ribosomal protein L13a	RPL13A
110	Mm.180458	NM_009438	Rpl13a	Ribosomal protein L13a	RPL13A
111	Mm.297	NM_007393	Actb	Actin, beta, cytoplasmic	Beta-actin
112	Mm.297	NM_007393	Actb	Actin, beta, cytoplasmic	Beta-actin

2.2.5. Auswertung

2.2.5.1. PCR

Mithilfe des Computerprogramms Biocapt3D wurde die Intensität der Banden auf den Agarosegelen ausgewertet. Hierzu wurde um die zu untersuchende Bande ein Rahmen gezogen, und dann durch das Programm die optische Dichte (optical density, OD) im markierten Bereich errechnet.

Jedes Gel wurde mit einer kurzen und einer langen Belichtungszeit aufgenommen. Es wurde jeweils die Belichtung für die Auswertung gewählt, bei der der Messbereich für die OD nicht überschritten wurde. In Abbildung 2.4. ist die Messung der OD für eine lange und eine kurze Belichtungszeit wiedergegeben.

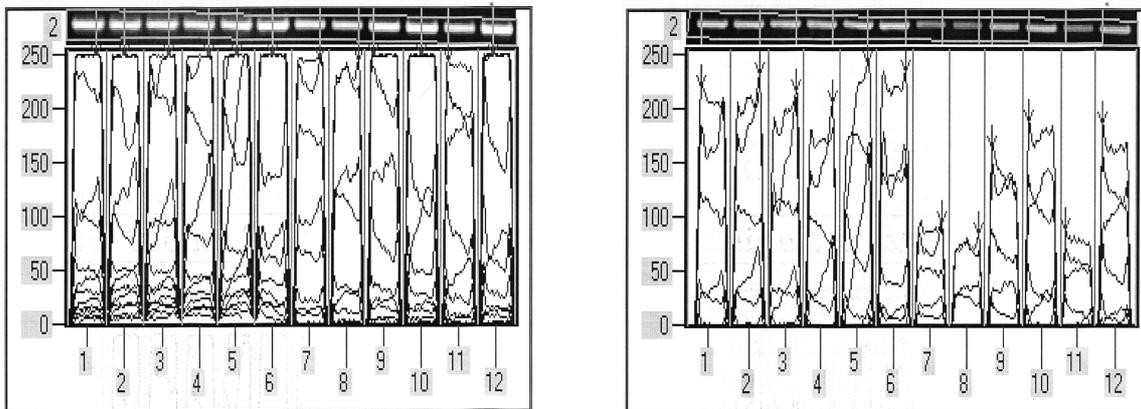


Abbildung 2.4.:

Messung der OD der ethidiumbromid-gefärbten DNA-Banden auf einem Agarosegel; Im oberen Bereich ist jeweils der Ausschnitt des Gels darunter die durch das Computerprogramm Biocapt 3D gemessene OD dargestellt; linke Seite: lange Belichtungszeit; rechte Seite: kurze Belichtungszeit

Man kann erkennen, dass bei langer Belichtungszeit der Messbereich für die OD z.T. überschritten wurde und Unterschiede nicht mehr deutlich werden. Zur Auswertung wurde daher die Aufnahme mit kurzer Belichtungszeit (rechte Seite) verwendet.

Die OD-Werte der untersuchten Gene mussten zur Expression eines konstitutiv exprimierten Gens (Housekeeping-Gen) in Bezug gesetzt werden. Als Housekeeping-Gen wurde Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ein Enzym der Glycolyse verwendet. Die Normalisierung erfolgte, indem der Quotient aus dem OD-Wert des zu untersuchenden Gens und dem OD-Wert der GAPDH gebildet wurde.

Die so errechneten Zahlenwerte erlaubten es Aussagen zum Expressionsniveau der untersuchten Gene in Relation zur GAPDH zu treffen. Ebenso ermöglichten sie eine Beurteilung der Genexpression im Verlauf des Experiments durch den Vergleich der OD-Werte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion.

2.2.5.2. c-DNA Array

Für die Auswertung der eingescannten Array's wurde die Software GEArray Analyser der Firma Superarray/ Bioscience Corporation verwendet. In Analogie zur PCR-Auswertung wurde auch hier für jede Punktegruppe die auf dem Film belichtet war die Intensität gemessen. Hierzu wurden die .tif-Dateien der eingescannten Röntgenfilme mit der Auswertungssoftware geöffnet und mithilfe eines Gitters jede Punktegruppe, die einem Gen entspricht, markiert. Abbildung 2.5. zeigt die Platzierung dieses Gitters über einem Array. Die Lichtintensität innerhalb der markierten Bereiche wurde dann gemessen.

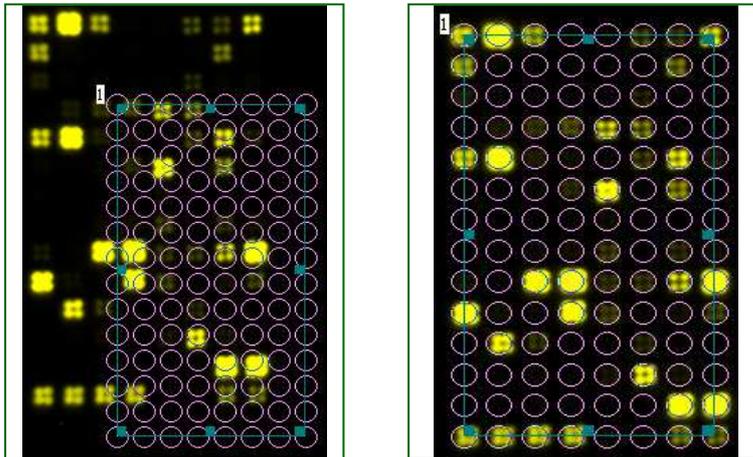


Abbildung 2.5.:
Platzierung eines Gitters über einem Array mit der Software GE Array Analyser. Die Kreise müssen jeweils über einer Gruppe von 4 Punkten, die ein Gen repräsentiert, platziert werden. Dann kann die Lichtintensität in den so markierten Bereichen gemessen werden.

Zur Messung der Hintergrundbelichtung wurde ein zweites Gitter so platziert, dass jedem Gen in der unmittelbaren Umgebung ein Bereich zugeordnet wurde. Die Intensität dieses Bereichs wurde dann als Hintergrund von der Intensität des jeweiligen zugehörigen Gens subtrahiert. Zusätzlich zu den Genen, die in der Apoptose eine wichtige Rolle spielen, befinden sich auf dem Array auch zwei Hybridisierungsstellen für GAPDH. Als Grundlage der Normalisierung für ein Housekeeping-Gen diente daher der Mittelwert der für GAPDH gemessenen Intensitäten. Durch die Bildung eines Quotienten aus den Intensitäten des jeweiligen Gens und der GAPDH ist es wie bei den PCR-Untersuchungen möglich Aussagen zum Expressionsniveau der untersuchten Gene in Relation zur GAPDH zu treffen. Ebenso erlauben sie den Vergleich der gemessenen Intensitäten auf verschiedenen Arrays und damit eine Beurteilung des Verlaufs der Expression apoptoserelevanter Gene in den Lungen nach der intravenösen Injektion von Tumorzellen.

2.2.6. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Statistikprogrammes R. (freier Download unter www.R-project.org) Als Testverfahren wurde der Wilcoxon Rang-Summen Test gewählt. Unterschiede wurden bei $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Ineffizienz der Metastasierung

Metastasierung gilt als ineffizienter Prozeß. Um dies in dem Modell dieser Arbeit genauer zu untersuchen, soll zunächst anhand der Quantifizierung der Tumorlast in den Lungen nach der Injektion das Überleben der Tumorzellen charakterisiert werden.

3.1.1. Überleben der Tumorzellen

Im Abstand von ca. 6 Tagen nach der intravenösen Injektion der Melanomzellen sind auf der Lungenoberfläche Metastasen erkennbar. Aufgrund ihrer Melaninpigmentierung sind sie sehr gut sichtbar und durch die Zählung der Metastasen ist eine Quantifizierung der Tumorlast möglich. Abbildung 3.1.1. zeigt eine metastasenbefallene Lunge am 10. Tag nach der Tumorzellinjektion. Da jedoch frühestens nach 5 Tagen makroskopisch kleine Metastasen erkennbar sind, ist diese Methode für die Quantifizierung zu früheren Zeitpunkten nicht ausreichend. Eine Möglichkeit hierfür bietet die Untersuchung eines Markergenes. Das Gen P-mel 17 wird nur in Melanozyten exprimiert, weshalb sein Expressionsniveau mit der Tumorzellzahl in der Lunge nach der intravenösen Injektion von Melanomzellen korreliert. Die vorliegenden Experimente geben Aufschluß über die mRNA-Expression von P-mel 17 in Relation zur mRNA-Expression von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die als Enzym der Glykolyse in allen Körperzellen konstitutiv exprimiert wird. Die gemessene Lichtintensität korreliert mit dem Niveau der mRNA Expression. Zu jedem Zeitpunkt wurden jeweils drei Tiere untersucht.



Abbildung 3.1.1.:
Bild einer metastasenbefallenen Lunge 10 Tage nach der Injektion von 2×10^5 B16/D5 Melanomzellen

Unmittelbar nach der Injektion der Tumorzellen (Entnahme der Lungen ca. 2 Stunden nach Injektion) findet sich ein Expressionsniveau von P-mel 17 in der Lunge, das ca. dem 0,7-fachen dessen der GAPDH entspricht. Das Expressionsniveau fällt in den ersten Tagen nach der Tumorzellinjektion und erreicht erst nach 6 Tagen wieder den Ausgangswert, um dann noch weiter anzusteigen. Der tiefste Wert findet sich am zweiten Tag und am Tag 4 ist bereits wieder ein Anstieg zu verzeichnen, sodass davon auszugehen ist, dass sich das minimale Expressionsniveau für P-mel 17 zwischen Tag 2 und Tag 4 befindet. Der Rückgang des Expressionsniveaus am Tag 2 sowie der Anstieg des Expressionsniveaus am Tag 8 gegenüber dem Ausgangswert am Tag 0 sind statistisch signifikant ($p=0,05$). Abbildung 3.1.2. zeigt den Verlauf der Expression von P-mel 17. Für die Tumorzellzahl in den Lungen ergibt sich somit ein initiales Absinken bis auf ein Minimum zwischen dem zweiten und vierten Tag. Ab Tag 4

nimmt die Zellzahl wieder zu und überschreitet ab Tag 6 die Menge der initial in der Lunge befindlichen Tumorzellen.

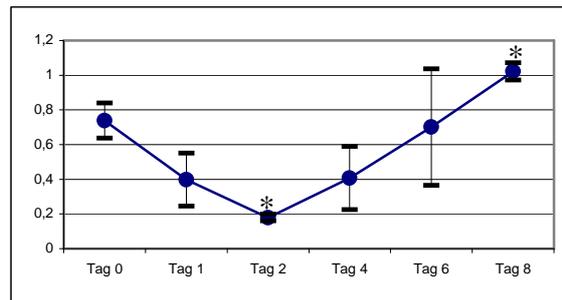


Abbildung 3.1.2.: Expressionsverlauf von P-mel 17

Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion; RT-PCR; Agarosegelelektrophorese; Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Detektion.

Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) von P-mel 17 und Gapdh.

(Mittelwerte der Einzelergebnisse und Standardabweichung; n=3; Anzahl der PCR-Zyklen: 30)

Statistische Signifikanz bei $p \leq 0,05$; Tag 2 und Tag 8 gegenüber dem Ausgangswert an Tag 0 (*)

3.1.2. c-DNA-Array Untersuchungen zur Apoptose

Die Ergebnisse des Zeitverlaufs der P-mel 17 Expression in den Lungen nach der intravenösen Tumorzellinjektion geben Anhalt dafür, dass die Zahl der B16/D5 Zellen initial absinkt und zwischen dem zweiten und vierten Tag ein Minimum erreicht. Da sich im weiteren Verlauf des Experiments in anderen Organen keine Metastasen bilden, müssen die Zellen vor Ort geschädigt werden. Ein möglicher Auslöser für diesen Zellverlust ist der apoptotische Zelltod. Deshalb wurde die Expression apoptoserelevanter Gene mithilfe eines c-DNA-Arrays untersucht. Für die Analyse der Lunge allein und des ersten Tages wurde jeweils nur ein Array an den Tagen 2,3 und 4 wurden jeweils zwei Arrays durchgeführt. Im folgenden sind immer die Einzelwerte für die jeweiligen Gene und die Mittelwerte an den Tagen 2,3 und 4 dargestellt. Aufgeführt sind nur Gene, für die sich zu einem der Untersuchungszeitpunkte eine eindeutige Expression fand.

Für die Untersuchung der Lunge allein bzw. des ersten Tages nach Tumorzellinjektion wurde die RNA aus sieben bzw. sechs unterschiedlichen Lungen an den Tagen 2,3 und 4 aus jeweils zwei Lungen gepoolt. Die untersuchten Gene lassen sich zu Genfamilien zusammenfassen. Nach diesen Genfamilien geordnet sollen im folgenden jeweils der Expressionsverlauf der Gene besprochen werden, für die sich eine Expression zu einem der untersuchten Zeitpunkte nachweisen ließ.

3.1.2.1. TNF-Ligand Familie

Die TNF-Familie besitzt eine Vielzahl von Mitgliedern, die mit TNF strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten besitzt. Die Proteine der TNF-Familie sind an der Regulation des Immunsystems und der Differenzierung, Proliferation und Apoptose verschiedener Zellen beteiligt⁶⁴. Drei Mitglieder der TNF-Liganden Familie wurden im Verlauf des Experimentes exprimiert, APRIL (A proliferation-inducing ligand, Tnfsf 13), LT- α (Lymphotoxin- α , TNF- β) und TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand, Tnfsf 10). LT- α und TRAIL sind an der Immunabwehr gegen Tumorzellen beteiligt^{65;66}, während APRIL die Proliferation vieler Tumorzellen stimulieren kann⁶⁷.

APRIL wird in den Lungen vor der Tumorzellinjektion exprimiert und das Expressionsniveau fällt an den Tagen 1 und 2 auf ca. die Hälfte des Ausgangswertes. Am Tag 3 wird ein

Expressionsmaximum erreicht, das das Ausgangsniveau geringfügig übersteigt. Am Tag 4 sinkt das Signal wieder auf ca. die Hälfte des Maximums an Tag 3.

LT- α wird in den Lungen auf einem Niveau exprimiert, das ca. dem 0,3-fachen dessen der Gapdh entspricht. Die Expression fällt am Tag 1 auf weniger als die Hälfte und ist am Tag 2 nicht mehr nachweisbar. An den Tagen 3 und 4 steigt sie wieder und erreicht am Tag 4 das 0,2-fache Niveau der Gapdh.

Die Expression von TRAIL konnte nur am Tag 2 auf einem Niveau nachgewiesen werden, das dem 0,3 fachen dessen der Gapdh entspricht. Die Expressionsverläufe der TNF-Liganden sind in Abbildung 3.1.3. wiedergegeben.

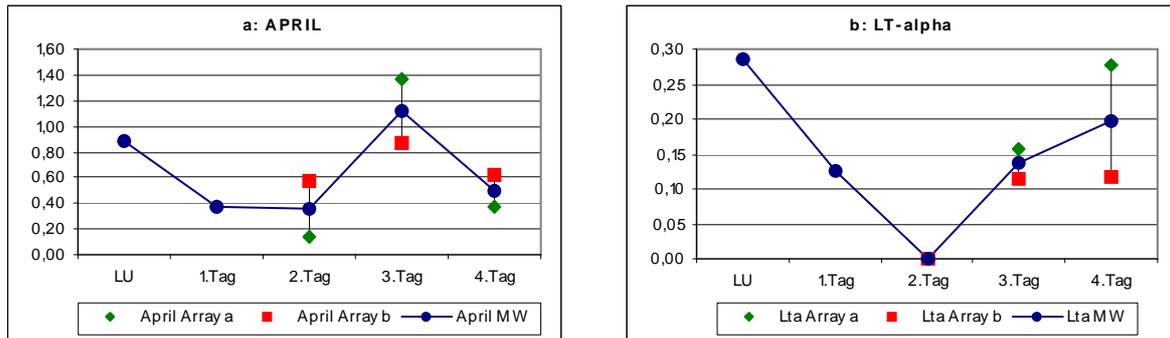


Abbildung 3.1.3.: TNF-Ligand Familie

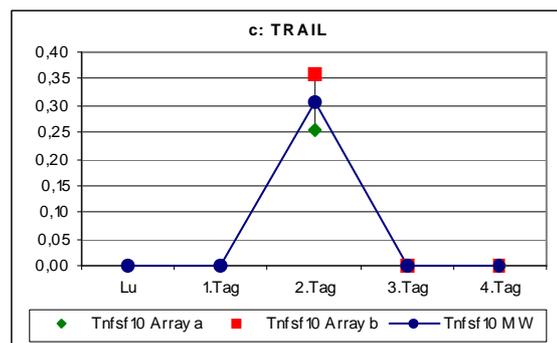
Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten (LU=Lunge ohne Tumorzellen); Expressionsanalyse apoptoserelevanter Gene mit c-DNA-Array.

Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) des jeweiligen Gens und Gapdh.

Je 1 Array zu LU (n=7, gepoolt) und am Tag 1 (n=6, gepoolt), je 2 Arrays am Tag 2,3 und 4 (je n=2, gepoolt).

Am Tag 2,3 und 4 sind die Einzelwerte (rot bzw. grün) und der Mittelwert (blau) angegeben.

a: APRIL, b: LT- α , c: TRAIL



3.1.2.2. TNF-Rezeptor Familie

Die Familie der TNF-Rezeptoren setzt sich aus Proteinen zusammen, die von einem oder mehreren der TNF-Liganden aktiviert werden können und durch ihre Homologie in einer cysteinreichen extrazellulären Sequenz charakterisiert sind⁶⁴. Im Verlauf dieses Experimentes konnte die Expression von 6 Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Familie nachgewiesen werden: Lymphotoxin- β -Rezeptor (LT- β R), TNF-Rezeptor 2 (Tnfrsf 1b), Tnfrsf 9, RANK (TRANSE-Rezeptor, Tnfrsf 11a), Death-receptor 3 (DR-3, Tnfrsf 12) und Death-receptor 6 (DR-6, Tnfrsf 21). Die Aktivierung von LT- β R und TNFR 2 kann die Apoptose induzieren^{64;68}. Tnfrsf 9 ist identisch mit CD 137 und den humanen bzw. murinen Homologen ILA (induced by lymphocyte activation) und 4-1BB. Es ein wichtiges kostimulatorisches Molekül in der T-Zell-Aktivierung⁶⁹ hat aber gleichzeitig auch pro-apoptotische Funktion für Granulozyten⁷⁰. RANK besitzt in dendritischen Zellen anti-apoptotische Funktion⁷¹ und kann in endothelialen Zellen pro-angiogenetisch wirken⁷². Die Rezeptoren DR-3 und DR-6 sind beide Induktoren der Apoptose und Aktivatoren von NF- κ B^{73;74}.

LT- β R wird in den Lungen auf sehr niedrigem Niveau exprimiert und ist am ersten Tag nach der Tumorzellinjektion nicht mehr nachweisbar. Am Tag 2 erfolgt ein Expressionsanstieg auf ein Maximum, dessen Niveau das 0,2-fache dessen der Gapdh beträgt. Die Expression von

LT- β R sinkt an den Tagen 3 und 4 wieder auf die Ausgangswerte in der Lunge vor der Tumorzellinjektion.

Die Expression von TNFR 2 befindet sich in den Lungen vor der Injektion der Tumorzellen auf dem 0,3 fachen Expressionsniveau der Gapdh. Sie sinkt am Tag 1 leicht ab steigt am Tag 2 wieder fällt am Tag 3 wieder leicht und erreicht am Tag 4 ihr Maximum. Über den gesamten Zeitraum ergibt sich ein von Phasen leichten Absinkens unterbrochener kontinuierlicher Anstieg vom Ausgangswert auf das Maximum an Tag 4, das die Hälfte des Expressionsniveaus der Gapdh erreicht.

Tnfrsf 9 wird in den Lungen auf der Hälfte des Niveaus der Gapdh exprimiert und ist auch am Tag 1 auf dem gleichen Niveau nachweisbar. An den Tagen 2,3 und 4 fällt die Expression und beträgt am Tag 4 weniger als die Hälfte des Ausgangswertes. Die beiden Arrays, die am Tag 2 durchgeführt wurden, liefern sehr unterschiedliche Ergebnisse, so dass sich das hier beschriebene Absinken an Tag 2 nur aus dem Mittelwert ergibt. In einem der Arrays ergab sich eine höheres Expressionsniveau als der Ausgangswert, während sich in dem anderen Array keine Expression von Tnfrsf 9 nachweisen ließ.

Die Expression von RANK in den Lungen konnte auf niedrigem Niveau, das ca. das 0,1-fache dessen der Gapdh beträgt, nachgewiesen werden. Am Tag 1 wird RANK nicht exprimiert. Am Tag 2 steigt das Expressionsniveau wieder auf fast das Doppelte des Ausgangswertes, während an Tag 3 ein erneutes Absinken zu verzeichnen ist. Am Tag 4 zeigte sich in einem Array ein starker Anstieg des Expressionsniveaus auf etwas weniger als die Hälfte dessen der Gapdh, während die RANK-Expression in dem anderen Array nicht nachweisbar war. Aus dem Mittelwert ergibt sich ein Anstieg auf ein Niveau wie an Tag 2.

DR-3 wird in den Lungen auf niedrigem Niveau exprimiert und ist an den Tagen 1,2 und 3 nicht nachweisbar. Am Tag 4 konnte in einem Array eine Expression auf dem 0,3-fachen Expressionsniveau der Gapdh detektiert werden, während in dem anderen Array keine Expression gefunden werden konnte.

DR-6 wird in den Lungen vor der Injektion von Tumorzellen auf einem Niveau exprimiert, das knapp unter dem 0,2-fachen dessen der Gapdh liegt. Am Tag 1 erfolgt ein leichter Anstieg und am Tag 2 ein starker Anstieg auf fast das 3-fache des Ausgangswertes. Am Tag 3 fällt die Expression sehr stark ab auf ein Niveau, das weniger als das 0,1-fache dessen der Gapdh beträgt. Am Tag 4 steigt die Expression von DR-6 in Relation zu Tag 3 erneut um das 3-fache an. Abbildung 3.1.4. fasst den Verlauf der Expression der TNF-Rezeptor Familie zusammen.

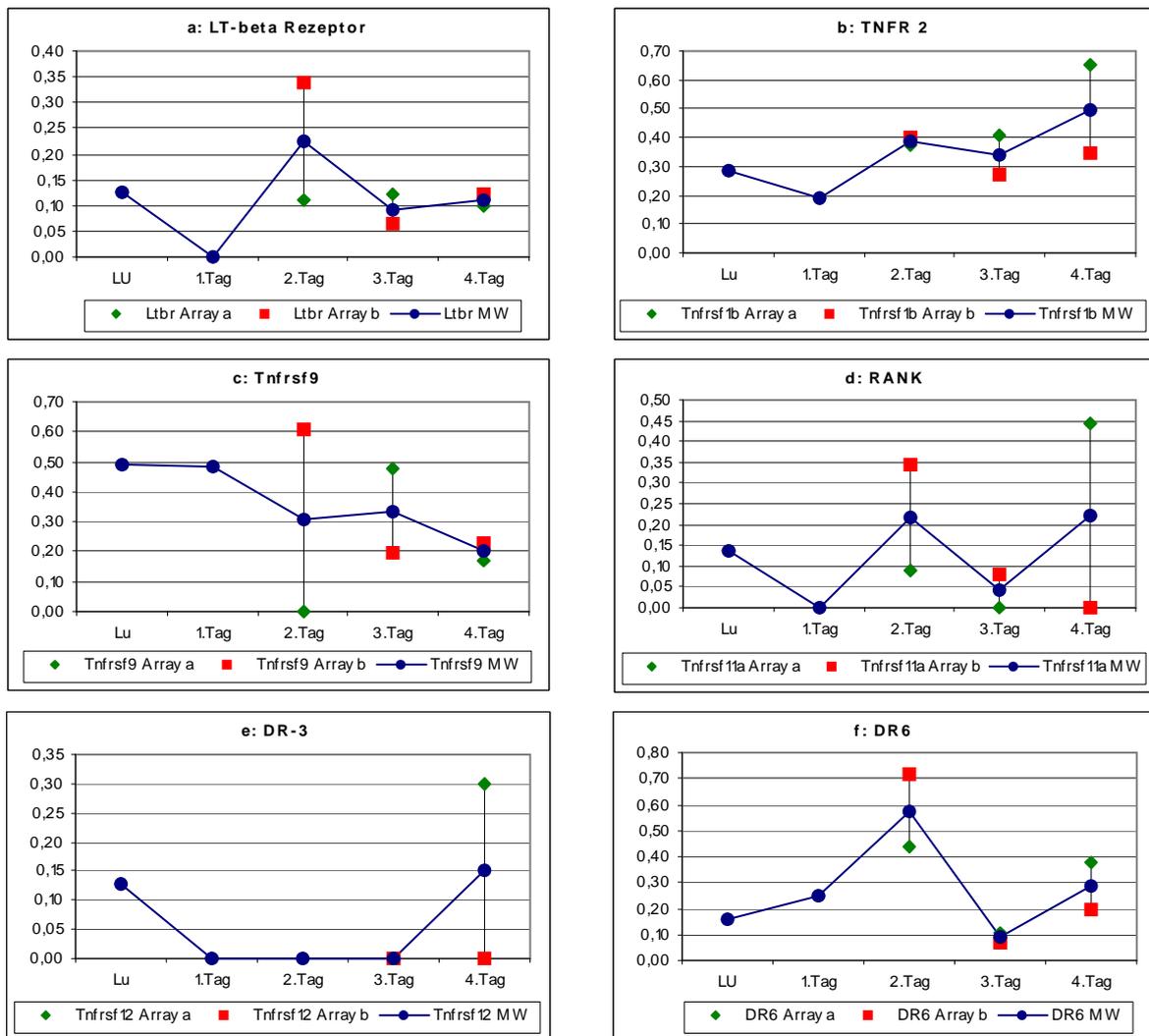


Abbildung 3.1.4.: TNF-Rezeptor Familie

Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten (LU=Lunge ohne Tumorzellen); Expressionsanalyse apoptoserelevanter Gene mit c-DNA-Array.

Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) des jeweiligen Gens und Gapdh.

Je 1 Array zu LU (n=7, gepoolt) und am Tag 1 (n=6, gepoolt), je 2 Arrays am Tag 2,3 und 4 (je n=2, gepoolt).

Am Tag 2,3 und 4 sind die Einzelwerte (rot bzw. grün) und der Mittelwert (blau) angegeben.

A: LT- β Rezeptor, b: TNFR 2, c: Tnfrsf 9, d: RANK, e: DR-3, f: DR-6

3.1.2.3. TRAF-Familie

Die Mitglieder der TRAF-Familie (TNF receptor-associated factor) sind Adapterproteine der TNF-Rezeptoren. Ursprünglich entdeckt wurden sie aufgrund ihrer Interaktion mit TNFR2 könne aber auch mit vielen anderen Rezeptoren, die in der Apoptose eine Rolle spielen, interagieren⁷⁵. In diesem Experiment wurden die TRAF-Proteine TRAF 1 (TNF receptor-associated factor 1) und TRIP (TRAF-interacting protein, Traip) exprimiert. TRAF 1 kann über TRAF 2 mit TNFR 2 interagieren und auf direktem Weg unter anderen auch mit den in diesem Experiment exprimierten TNF-Rezeptor-Proteinen Tnfrsf 9 (4-1BB) und RANK. TRAF 1 ist ein Substrat der Caspasen und das durch die Caspasenaktivität abgespaltene C-terminale Fragment kann die Aktivierung von NF- κ B durch TNF-Rezeptor 1 supprimieren und dadurch das durch diesen Rezeptor ebenfalls vermittelte Apoptosesignal verstärken. Gleichzeitig kann TRAF 1 in ungespaltener Form aber auch die NF- κ B Aktivierung durch

TNF oder IL-1 erhöhen⁷⁵. TRIP inhibiert die TRAF 2 vermittelte NF- κ B Aktivierung⁷⁶ und besitzt die Funktion einer Ubiquitin-Ligase⁷⁷.

TRAF 1 wird nicht in der Lunge vor der Tumorzellinjektion und an keinem der Tage 1,2 oder 3 exprimiert. Erst am Tag 4 findet sich eine Expression von TRAF 1, deren Niveau das 0,1-fache dessen der Gapdh beträgt.

TRIP wird in der Lunge und am Tag 1 auf nahezu gleichem Niveau, dem ca. 0,7-fachen Expressionsniveau der Gapdh, exprimiert. Am Tag 2 findet sich ein deutliches Absinken auf ein Fünftel des Niveaus der Gapdh, während die Expression am Tag 3 ihr Maximum auf einem Niveau erreicht, das dem der Gapdh entspricht. Am Tag 4 zeigt sich erneut ein Absinken auf das Niveau am Tag 2. Abbildung 3.1.5. zeigt die Expression der Gene der TRAF-Familie.

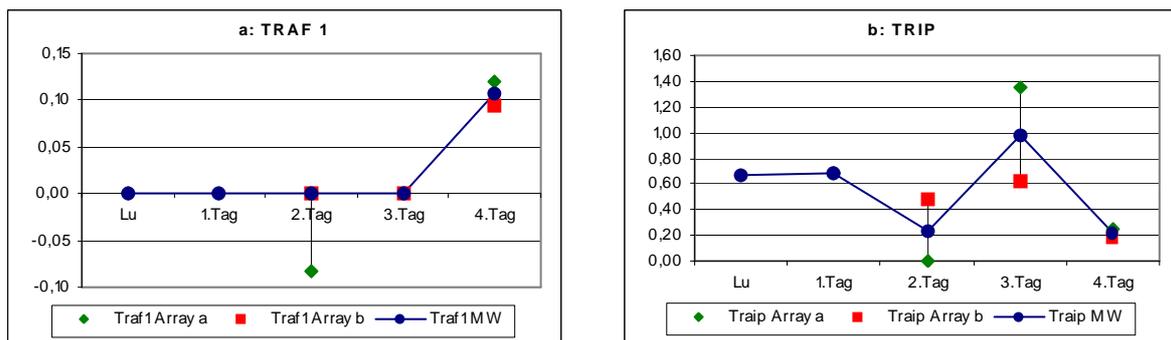


Abbildung 3.1.5.: TRAF Familie

Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten (LU=Lunge ohne Tumorzellen); Expressionsanalyse apoptoserelevanter Gene mit c-DNA-Array.

Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) des jeweiligen Gens und Gapdh.

Je 1 Array zu LU (n=7, gepoolt) und am Tag 1 (n=6, gepoolt), je 2 Arrays am Tag 2,3 und 4 (je n=2, gepoolt).

Am Tag 2,3 und 4 sind die Einzelwerte (rot bzw. grün) und der Mittelwert (blau) angegeben.

A: TRAF 1, b: TRIP

3.1.2.4. Death-Domain und Death-Effector-Domain Familie: FADD

Die Death-Domain (DD) und die Death-Effector-Domain (DED) sind Proteinsequenzen, mithilfe derer an der Apoptose beteiligte Proteine miteinander interagieren können. Sie stellen eine wichtige Verbindung zwischen stimulierten Rezeptoren und an der Apoptoseregulation beteiligten Proteinen im Zytoplasma dar. FADD (Fas-associated death domain protein) kann über eine DD-DD Interaktion an den zytoplasmatischen Teil des ligandenbesetzten Fas-Rezeptors gebunden werden und rekrutiert über eine DED-DED Interaktion Caspase 8⁷⁸. FADD wurde in diesem Experiment als einziges der untersuchten Gene, die Mitglieder der DD- oder DED-Familie sind, exprimiert.

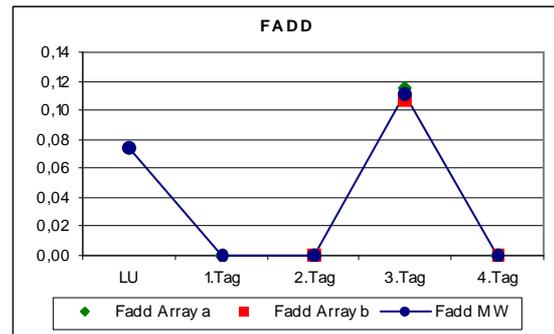
Dabei zeigte sich eine FADD Expression auch nur in der Lunge vor der Tumorzellinjektion und am Tag 3. Zu beiden Zeitpunkten ist das Expressionsniveau niedrig, in der Lunge ca. das 0,7-fache und am Tag 3 das 0,11-fache in Relation zur Expression des Housekeeping-Gens. Abbildung 3.1.6. gibt die Expression von FADD wieder.

Abbildung 3.1.6.: DD und DED Familie: FADD
Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten (LU=Lunge ohne Tumorzellen); Expressionsanalyse apoptoserelevanter Gene mit c-DNA-Array.

Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) des jeweiligen Gens und Gapdh.

Je 1 Array zu LU (n=7, gepoolt) und am Tag 1 (n=6, gepoolt), je 2 Arrays am Tag 2,3 und 4 (je n=2, gepoolt).

Am Tag 2,3 und 4 sind die Einzelwerte (rot bzw. grün) und der Mittelwert (blau) angegeben.



3.1.2.5. BCL-2 Familie

Die Familie der BCL-2 Proteine kontrolliert den mitochondrialen Aktivierungsweg der Apoptose. Sie lässt sich unterteilen in die pro-apoptotischen Proteine der BAX-Subfamilie, die direkt an der Permeabilisation der äußeren Mitochondrienmembran beteiligt sind, und die anti-apoptotischen Proteine der BCL-2 Subfamilie, die in der Lage sind, die BAX-Proteine zu binden und dadurch zu inaktivieren. Eine dritte Gruppe, die BH-3 only Proteine üben pro-apoptotische Wirkung aus, indem sie entweder BAX-Proteine aktivieren oder durch Bindung von BCL-2 Proteinen diese sequestrieren und damit die Inaktivierung der BAX-Proteine verhindern⁴⁰. Durch die Array-Untersuchungen konnte die Expression von 6 Genen der Bcl-2 Familie nachgewiesen werden: BAK (BCL-2 antagonist/killer), BAX (BCL-2 associated x protein), BIK (BCL-interacting killer-like, Biklk), BOK (BCL-2-related ovarian killer, Bokl-pending), BCL-X (BCL-2-like) und MCL 1 (myeloid cell leukemia sequence 1). BAK, BAX und BOK sind Mitglieder der proapoptotischen BAX-Familie und BIK ist ein ebenfalls proapoptotisches BH-3 only Protein. Anti-apoptotische Funktion haben die Proteine der BCL-2 Subfamilie BCL-X und MCL-1⁷⁹.

Die Expression von BAK beginnt in der Lunge auf einem Niveau, das einem Viertel dessen der Gapdh entspricht, und fällt bis sie am Tag 2 nicht mehr nachweisbar ist. In einem Anstieg am Tag 3 erreicht sie fast das Ausgangsniveau und sinkt am Tag 4 wieder in etwa auf ein Fünftel des Anfangsniveaus ab.

Die Expression von BAX bewegt sich über das gesamte Experiment hinweg auf einem niedrigen Niveau zwischen dem 0,1- und dem 0,2-fachen dessen der Gapdh. An Tag 3 und 4 werden die niedrigsten und an Tag 1 und 2 die höchsten Werte erreicht, wobei das Niveau der Expression in der Lunge in der Mitte liegt. Somit ergibt sich ein diskretes Absinken der Expression ab Tag 3. Am Tag 2 fällt die große Abweichung zwischen den beiden durchgeführten Arrays auf. BAX konnte nur in einem Array nachgewiesen werden, dies allerdings auf dem vergleichsweise hohen 0,4-fachen Niveau der Gapdh.

BIK wird in der Lunge auf einem Niveau exprimiert das ca. einem Viertel dessen der Gapdh entspricht. Die Expression sinkt und beträgt am Tag 1 nur mehr ein Fünftel des Expressionsniveaus der Gapdh und am Tag 3 nur die Hälfte der BIK-Expression am Tag 1. An den Tagen 2 und 4 liegen die Ergebnisse der jeweils zwei Arrays sehr weit auseinander. Je einer zeigt Werte die das 0,6 (Tag 2) - 0,65 (Tag4) -fache des Expressionsniveaus des Housekeeping-Gens anzeigen, während die Werte der jeweils anderen Arrays mit der Expression an Tag 3 vergleichbar sind.

Für BOK ergibt sich ein Expressionsverlauf, der dem von BAK sehr ähnelt, mit dem Unterschied, dass die Expression an den Tagen 2 und 4 nicht so weit absinkt sondern an beiden Tagen auf dem ca. 0,1-fachen Niveau in Relation zur Gapdh erhalten bleibt.

Die Expression von BCL-X konnte nur am dritten Tag des Experiments nachgewiesen werden und erreichte dort ein Niveau, das einem Zehntel dessen der Gapdh entspricht.

MCL-1 wird in der Lunge auf niedrigem ca. 0,1-fachen Niveau in der Relation zum Housekeeping-Gen exprimiert. Ähnliche Werte ergeben sich auch für die Tage 3 und 4, während am Tag 1 keine Expression nachweisbar ist. Umso auffälliger ist das Expressionsmaximum am Tag 2, das das 0,6-fache Niveau der Gapdh erreicht. Die Graphen für die Mitglieder der BCL-2 Familie sind in Abbildung 3.1.7. dargestellt.

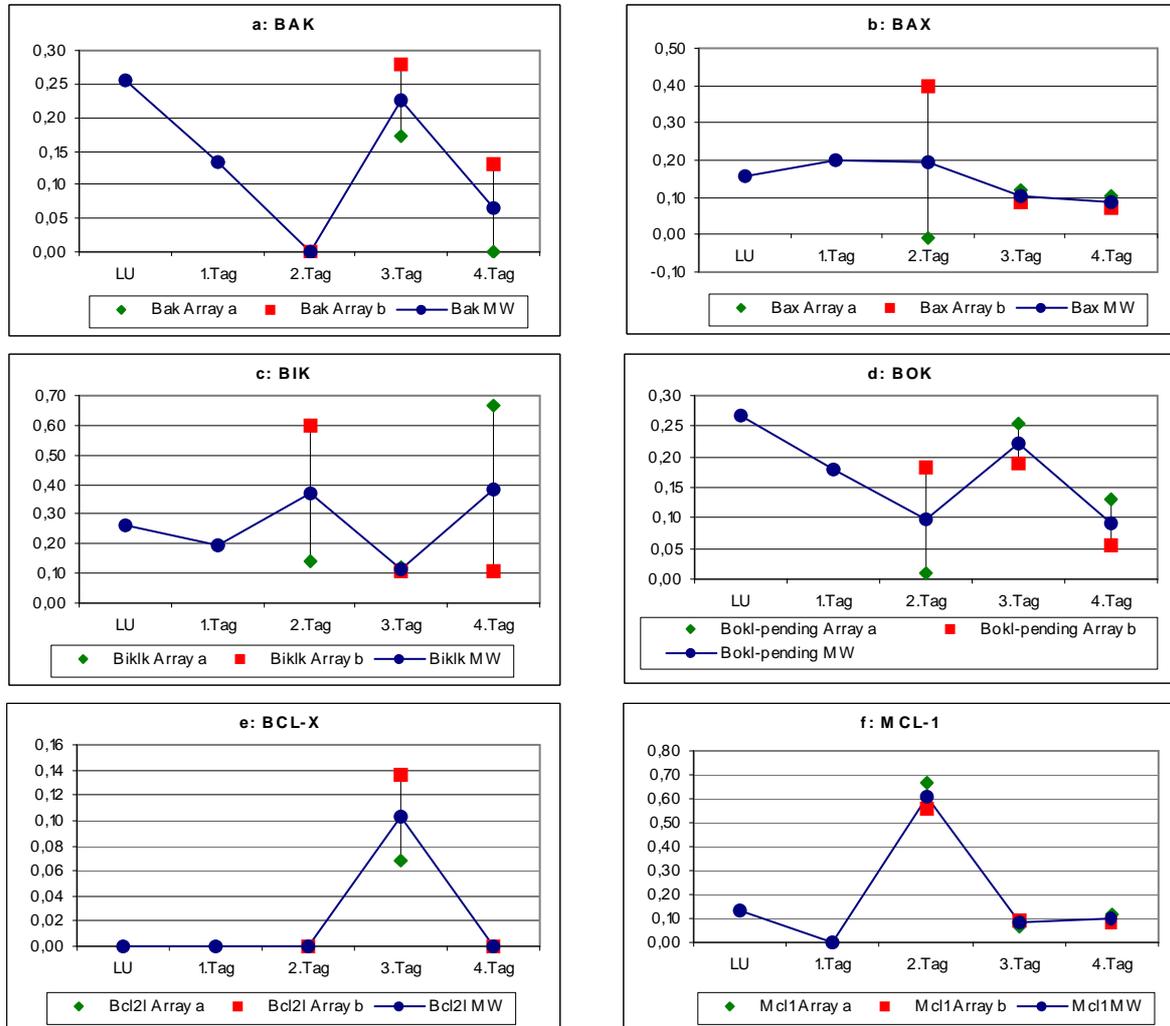


Abbildung 3.1.7.: BCL-2 Familie

Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten (LU=Lunge ohne Tumorzellen); Expressionsanalyse apoptoserelevanter Gene mit c-DNA-Array.

Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) des jeweiligen Gens und Gapdh.

Je 1 Array zu LU (n=7, gepoolt) und am Tag 1 (n=6, gepoolt), je 2 Arrays am Tag 2,3 und 4 (je n=2, gepoolt).

Am Tag 2,3 und 4 sind die Einzelwerte (rot bzw. grün) und der Mittelwert (blau) angegeben.

a: BAK, b: BAX, c: BIK, d: BOK, e: BCL-X, f: MCL-1

3.1.2.6. Caspasen: Caspase 9

Die meisten der morphologischen Veränderungen in apoptotischen Zellen werden durch die Aktivität einer Gruppe von Cysteinproteasen, der Caspasen, hervorgerufen. Sie sind in der Lage verschiedene Substrate an einer Asparaginsäure-Xxx Bindung proteolytisch zu spalten. Die Aktivierung der Caspasen erfolgt durch proteolytische Spaltung des Zymogens durch die Initiatorcaspasen, wobei nachgeschaltete Caspasen ebenfalls in der Lage sind weitere Caspasen zu aktivieren, sodass eine Kaskade entsteht und die Caspasenaktivierung amplifiziert wird.

Durch die Aktivierung einer als CAD (caspase-activated DNase) bezeichneten Nuklease initiieren Caspasen die Fragmentierung der DNA. CAD bildet in nicht apoptotischen Zellen einen Komplex mit einer inhibitorischen Untereinheit, ICAD, die durch Caspase-3 abgespalten und dadurch die aktive katalytische Untereinheit CAD freigesetzt werden kann. Caspasen sind in der Lage Intermediärfilamente, die am Aufbau der nukleären Lamina beteiligt sind, die Lamina, zu spalten, was zur Schrumpfung des Zellkerns führt. Die Spaltung von Proteinen des Zytoskeletts wie z.B. Aktin, Plektin, Fodrin oder Gelsolin hat die Schrumpfung der Zelle und die Apoptosekörperbildung zur Folge. Die Aktivierung des Enzyms PAK2 (p21-activated kinase) durch die Caspase-vermittelte Abspaltung einer regulatorischen Untereinheit ist für die Blasenbildung an der Zelloberfläche in apoptotischen Zellen verantwortlich⁴³. Caspase-9 kann als Initiator-Caspase eine Reihe anderer Caspasen durch proteolytische Spaltung aktivieren⁴³.

Caspase 9 wird in der Lunge bereits auf einem hohen Niveau exprimiert, das in etwa dem der Gapdh entspricht. Die Expression steigt am Tag 1 noch etwas an fällt dann aber ab und erreicht am Tag 4 ein Minimum, das nur noch ein Drittel der Expression in der Lunge ausmacht. Am Tag 3 liegen die Ergebnisse der beiden Arrays weit auseinander, wobei ein Wert den Ergebnissen am Tag 4 entspricht der andere aber den höchsten Wert im Verlauf darstellt und eine Expression auf dem 1.3-fachen Niveau in Relation zur Gapdh anzeigt. Abbildung 3.1.8. zeigt den Expressionsverlauf von Caspase 9.

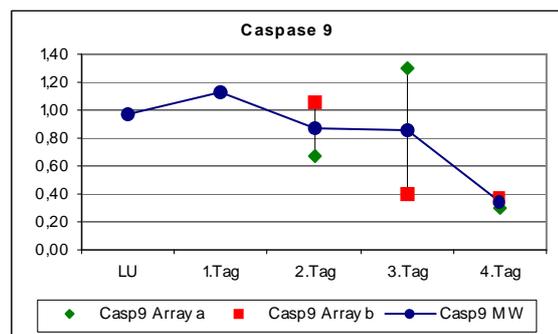
Abbildung 3.1.8.: Caspase 9

Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten (LU=Lunge ohne Tumorzellen); Expressionsanalyse apoptoserelevanter Gene mit c-DNA-Array.

Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) des jeweiligen Gens und Gapdh.

Je 1 Array zu LU (n=7, gepoolt) und am Tag 1 (n=6, gepoolt), je 2 Arrays am Tag 2,3 und 4 (je n=2, gepoolt).

Am Tag 2,3 und 4 sind die Einzelwerte (rot bzw. grün) und der Mittelwert (blau) angegeben.



3.1.2.7. IAP-Familie

Die Familie der IAP-(inhibitors of apoptosis) Proteine sind in der Lage Caspasen zu inhibieren und in Signaltransduktionswege einzugreifen, die das zelluläre Überleben fördern. NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein, Birc1) wurde auf der Suche nach dem für die spinale Muskelatrophie - eine erblich bedingte neurodegenerative Erkrankung - verantwortlichen Gendefekt entdeckt. Mutationen in diesem Gen verschlimmern den Verlauf der Erkrankung⁸⁰. NAIP kann die MAP-(mitogen activated protein) Kinase JNK1 aktivieren und vermittelt über diesen Signalweg seine anti-apoptotischen Wirkungen⁸¹. Es wurden 6 murine Homologe zu humanem NAIP entdeckt⁸², von denen zwei in diesem Experiment nachgewiesen werden konnten: NAIP 1 (Birc1a) und NAIP 5 (Birc1e).

Eine Expression von NAIP 1 und 5 konnte nur am Tag 3 auf einem niedrigen Niveau, dem 0,07- bzw. 0,06- fachen Expressionsniveau der Gapdh entsprechend, nachgewiesen werden. NAIP 5 wird auch in den Lungen vor der Tumorzellinjektion auf einem Niveau exprimiert, das ein Zehntel dessen der Gapdh ausmacht. Die Expression von NAIP 1 und 5 ist in Abbildung 3.1.9. wiedergegeben.

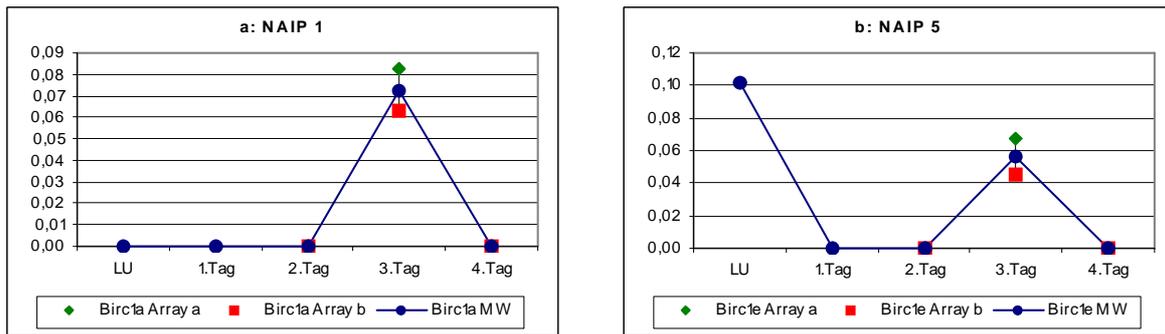


Abbildung 3.1.9.: IAP Familie

Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten (LU=Lunge ohne Tumorzellen); Expressionsanalyse apoptoserelevanter Gene mit c-DNA-Array.

Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) des jeweiligen Gens und Gapdh.

Je 1 Array zu LU (n=7, gepoolt) und am Tag 1 (n=6, gepoolt), je 2 Arrays am Tag 2,3 und 4 (je n=2, gepoolt). Am Tag 2,3 und 4 sind die Einzelwerte (rot bzw. grün) und der Mittelwert (blau) angegeben.

a: NAIP 1, b: NAIP 5

3.1.2.8. CARD-Familie: Nop 30like

Zur CARD-Familie zählen Proteine, die eine „caspase recruitment domain“ (CARD) aufweisen. Proteinkontakte, die über eine CARD-CARD Interaktion vermittelt werden, haben eine wichtige Funktion für die Regulation der Aktivität von Caspasen. Als einziges Gen dieser Familie wurde in diesem Experiment Nop 30-like (Nucleolar Protein of 30 kDa) exprimiert. Nop 30-like wird auch als ARC (Apoptosis repressor with CARD) bezeichnet. ARC kann durch direkte Interaktion mit den Caspasen-2 und -8 die Apoptose inhibieren⁷⁸.

Nop 30-like wird in den Lungen auf einem Niveau exprimiert, das ein Fünftel von dem des Housekeeping-Gens beträgt. Die Expression sinkt am Tag 1 leicht und am Tag 2 so stark, dass sie nicht mehr nachweisbar ist. Am Tag 3 erfolgt ein Expressionsanstieg auf Werte, die das Ausgangsniveau übertreffen und in etwa einem Viertel des Expressionsniveaus der Gapdh entsprechen. Am Tag 4 findet sich ein minimales Absinken der Expression. Der Verlauf der Expression ist in Abbildung 3.1.10. dargestellt.

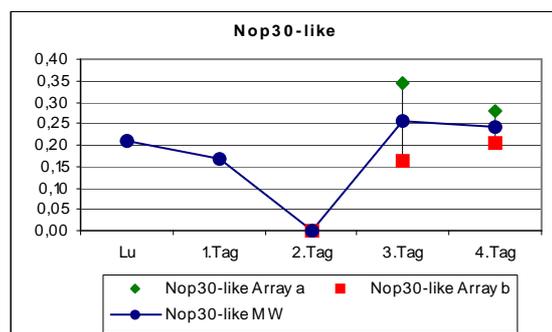
Abbildung 3.1.10.: CARD Familie: Nop 30-like

Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten (LU=Lunge ohne Tumorzellen); Expressionsanalyse apoptoserelevanter Gene mit c-DNA-Array.

Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) des jeweiligen Gens und Gapdh.

Je 1 Array zu LU (n=7, gepoolt) und am Tag 1 (n=6, gepoolt), je 2 Arrays am Tag 2,3 und 4 (je n=2, gepoolt).

Am Tag 2,3 und 4 sind die Einzelwerte (rot bzw. grün) und der Mittelwert (blau) angegeben.



3.1.2.9. p53 und Atm Signalweg

Der p53 Signalweg ist ein wichtiger Mechanismus in der zellulären Reaktion auf Schädigungen der DNA. p53 kann die Transkription vieler Gene aktivieren, die an DNA-Reparatur Mechanismen, der Steuerung des Zellzyklus und der Regulation der Apoptose beteiligt sind. Somit spielt der p53 Signalweg eine wichtige Rolle für die Überwachung der

Zellteilung und die Stabilität des Genoms. Eine Vielzahl humaner Tumore weist eine Mutation im Tumorsupressorgen p53 auf, die einen Verlust oder Defekt der Funktion nach sich ziehen⁸³.

Gene des p53 Signalweges, die in diesem Experiment exprimiert wurden, sind Atm (ataxia-teleangiectasia mutated), Mdm2 und Gadd45a (growth arrest and DNA damage induced-45). Die Protein-Kinase Atm wird als Reaktion auf Doppelstrangbrüche der DNA autophosphoryliert und ist dann in der Lage p53 zu phosphorylieren und damit seine Aktivität als Transkriptionsfaktor zu steigern. Atm stabilisiert auch das p53 Protein, das unter normalen Bedingungen nur eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt. Mdm2 inhibiert die Funktionen von p53 durch die Bindung dieses Proteins und fungiert gleichzeitig als Ubiquitin-Ligase, die p53 für die Degradation in Proteasomen markiert. Atm kann Mdm2 inaktivieren⁸⁴. Gadd45a kann durch Interaktion mit Regulatoren des Zellzyklus die Zellteilung hemmen und durch Aktivierung anti-proliferativer MAP-Kinasen die Apoptose fördern. Die Transkription von Gadd45a wird unter dem Einfluss von p53 gesteigert⁸⁵.

Atm wird in der Lunge auf einem hohen Niveau – das 1,4-fache des Expressionsniveaus der Gapdh – exprimiert. Es findet sich ein leichtes Absinken der Expression bis zum Tag 2, an dem das Niveau nur noch das 0,8 fache von dem des Housekeeping-Gens beträgt. Am Tag 3 zeigt sich ein Anstieg auf Werte knapp unter dem Ausgangsniveau, während die Expression am Tag 4 stark abfällt auf ein Niveau, das nur mehr der Hälfte dessen der Gapdh entspricht.

Die Expression von Mdm 2 in den Lungen vor der Tumorzellinjektion macht das 0,15-fache in Relation zum Expressionsniveau des Housekeeping-Gens aus. Die Expression fällt und ist am Tag 1 nicht nachweisbar steigt aber am Tag 2 wieder an und erreicht hier das doppelte Expressionsniveau des Ausgangswertes. Am Tag 3 erfolgt ein Absinken auf Werte, die knapp unter einem Zehntel des Expressionsniveaus der Gapdh liegen. Mit einem Anstieg am Tag 4 wird das Ausgangsniveau wieder erreicht.

Gadd45a wird in den Lungen auf einem Niveau exprimiert, das ca. einem Zehntel dessen der Gapdh entspricht. An den Tagen 1,2 und 3 ist keine Gadd45a Expression nachweisbar. Am Tag 4 divergieren die Ergebnisse der beiden Arrays, wobei der eine eine dem Ausgangsniveau vergleichbare Expression anzeigt, während bei dem anderen die Expression mit einem Niveau nur knapp unter dem des Housekeeping-Gens vergleichsweise hoch angegeben wird. In Abbildung 3.1.11. sind die zugehörigen Graphen zusammengefasst.

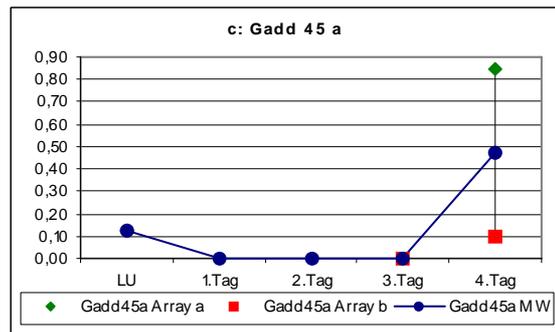
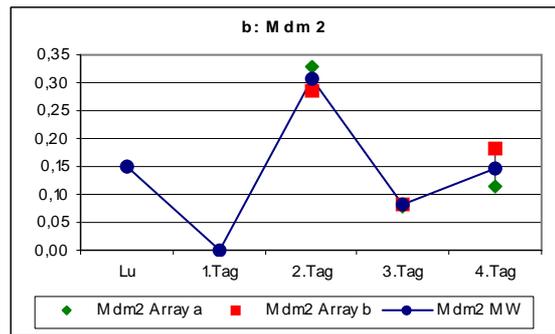
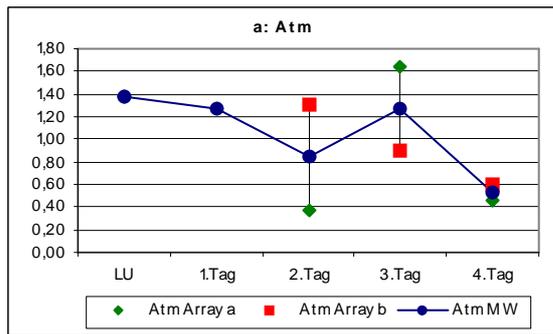


Abbildung 3.1.11.: p53 und Atm Signalweg
Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten (LU=Lunge ohne Tumorzellen); Expressionsanalyse apoptoserelevanter Gene mit c-DNA-Array. Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) des jeweiligen Gens und Gapdh.

Je 1 Array zu LU (n=7, gepoolt) und am Tag 1 (n=6, gepoolt), je 2 Arrays am Tag 2,3 und 4 (je n=2, gepoolt).

Am Tag 2,3 und 4 sind die Einzelwerte (rot bzw. grün) und der Mittelwert (blau) angegeben.

a: Atm, b: Mdm 2, c: Gadd 45 a

Die Untersuchungen zur Apoptose zeigen die Regulation einer Vielzahl von Genen im Verlauf der Metastasierung. Eine zusammenfassende Betrachtung findet sich weiter unten im Kapitel 4.2.1.2.10. der Diskussion.

3.1.3. Immunabwehr

Neben der Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus der zum initialen Verlust von Tumorzellen in der Lunge beitragen kann die Aktivierung der gegen den Tumor gerichteten Immunabwehr. Dabei ist dieser Weg eng mit der Apoptose verbunden, da Zellen des Immunsystems in der Lage sind in Tumorzellen Apoptose zu induzieren. Zur Charakterisierung von Vorgängen der gegen den Tumor gerichteten Immunabwehr wurde die Expression von Fas, Fas-Ligand und TRANCE mithilfe der RT-PCR untersucht. Die vorliegenden Experimente geben Aufschluß über die mRNA-Expression der untersuchten Gene in Relation zur mRNA-Expression von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die als Enzym der Glykolyse in allen Körperzellen konstitutiv exprimiert wird. Die gemessene Lichtintensität korreliert mit dem Niveau der mRNA Expression. Zu jedem Zeitpunkt wurden jeweils drei Tiere untersucht.

3.1.3.1. Fas

Die Expression von Fas nimmt über den gesamten Verlauf des Experimentes kontinuierlich ab. Dabei ist die Spannweite der Veränderung groß. Am Tag 2 beträgt das Expressionsniveau das 1,2-fache dessen der GAPDH, während sich am Tag 8 in keiner der untersuchten Lungen Fas-mRNA nachweisen ließ. Auch am Tag 6 wurde Fas nur in einer der drei untersuchten Lungen exprimiert, wodurch sich ein statistisch signifikanter Rückgang der Expression ergibt ($p=0,05$). Abbildung 3.1.12. zeigt den Verlauf der Fas-Expression.

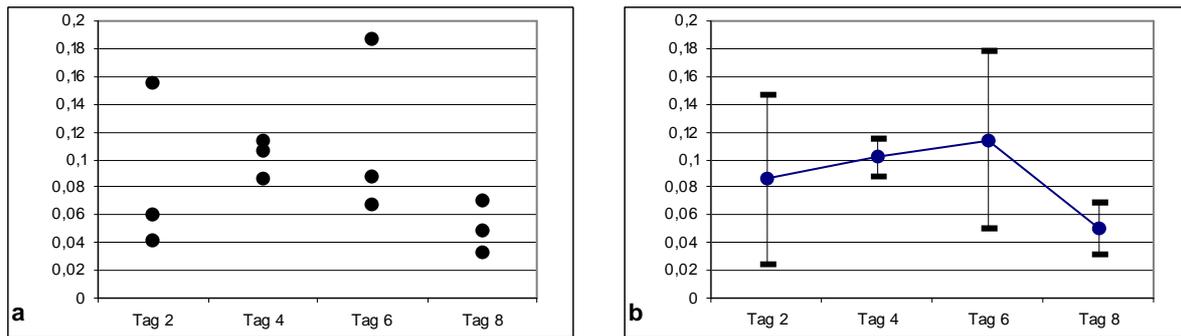


Abbildung 3.1.14.: Expressionsverlauf von TRANCE

Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion; RT-PCR; Agarosegelelektrophorese; Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Detektion.

Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) von TRANCE und Gapdh. (a: Einzelwerte; b: Mittelwerte der Einzelergebnisse und Standardabweichung; n=3; Anzahl der PCR-Zyklen: 30)

3.2. Die Metastasierung begünstigende Faktoren

Das Entstehen sichtbarer Metastasen an der Lungenoberfläche und der Anstieg der P-mel 17 Expression ab dem 4. Tag nach der Tumorzellinjektion zeigen, dass zu späteren Zeitpunkten die Proliferation der Tumorzellen den initialen Zellverlust überwiegen muss. Aus diesem Grund wurde zur weiteren Charakterisierung der Metastasierung in dem Modell dieser Arbeit die Expression von Genen untersucht, die einen begünstigenden Einfluss auf die Metastasierung haben können. Die Invasivität, die Migration, die Proliferation und das Überleben der Melanomzellen sind Vorgänge, die in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen. Aus diesem Grund wurde die Expression von Genen untersucht werden, die diese Prozesse regulieren.

Die vorliegenden Experimente geben Aufschluß über die mRNA-Expression der untersuchten Gene in Relation zur mRNA-Expression von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die als Enzym der Glykolyse in allen Körperzellen konstitutiv exprimiert wird. Die gemessene Lichtintensität korreliert mit dem Niveau der mRNA Expression. Zu jedem Zeitpunkt wurden jeweils drei Tiere untersucht.

3.2.1. Invasivität

Zur Untersuchung der Invasivität der Tumorzellen wurde die Expression der Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 sowie der Semaphorine 3A und 4D analysiert.

3.2.1.1. Matrix-Metalloproteinase 2

Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2) wird in den Lungen an den Tagen 2,4, und 6 nach der Tumorzellinjektion auf einem nahezu gleichbleibendem Niveau exprimiert, das in etwa dem halben Expressionsniveau des Housekeeping-Gens entspricht. Dabei erschwert die große Streubreite der Ergebnisse an den Tagen 2 und 6 die Beurteilung. Eindeutig erkennbar ist jedoch das starke, statistisch signifikante ($p=0,05$) Absinken der MMP2-Expression am Tag 8. Das Expressionsniveau fällt hier in Relation zu Tag 6 auf weniger als ein Zehntel. Abbildung 3.2.1. gibt den Verlauf der MMP2-Expression wieder.

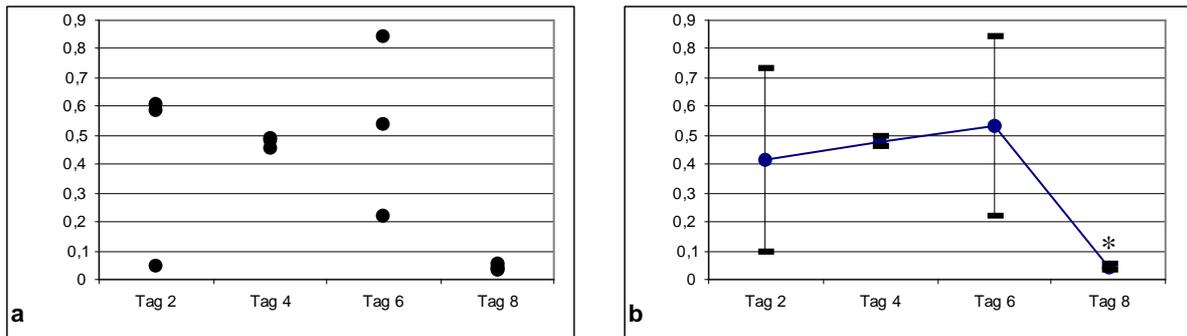


Abbildung 3.2.1.: Expressionsverlauf von MMP 2

Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion; RT-PCR; Agarosegelelektrophorese; Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Detektion.

Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) von MMP 2 und Gapdh.

(a: Einzelwerte; b: Mittelwerte der Einzelergebnisse und Standardabweichung; n=3; Anzahl der PCR-Zyklen: 35)

Statistische Signifikanz bei $p \leq 0,05$; Tag 8 gegenüber Tag 6 (*)

3.2.1.2. Matrix-Metalloproteinase 9

Eine mRNA-Expression von Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9) konnte zu keinem der Untersuchungszeitpunkte in den Lungen nachgewiesen werden. Lediglich am Tag 6 konnte eine Bande auf dem Agarosegel detektiert werden, allerdings nur bei einer der drei untersuchten Lungen. Auf eine systematische Auswertung wurde daher verzichtet. Abbildung 3.2.2. zeigt das entsprechende Agarosegel.

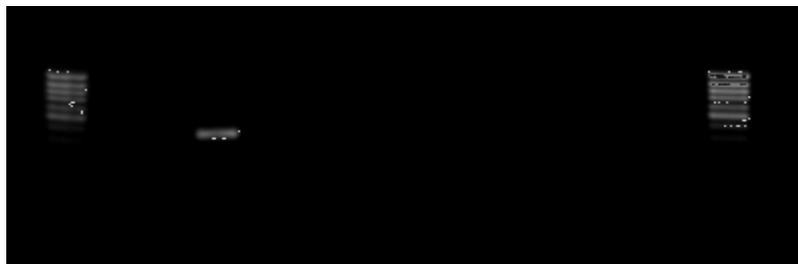


Abbildung 3.2.2.: Agarosegel der PCR für MMP 9

Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion; RT-PCR; Agarosegelelektrophorese; Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Detektion. (Anzahl der PCR-Zyklen: 35).

Es ist nur 1 Bande bei einem Tier am Tag 6 erkennbar.

3.2.1.3. Semaphorin 3A

Semaphorin 3A wird an den Tagen 2 und 4 auf nahezu gleichem und hohem Niveau exprimiert, das dem doppelten Expressionsniveau des Housekeeping-Gens entspricht und an den Tagen 6 und 8 minimal abfällt. Am Tag 8 findet sich in einer der untersuchten Lungen ein sehr starkes Signal, dessen Intensität fast ein 3-faches der GAPDH beträgt. Aufgrund dieses Einzelwertes, der auch die größere Streuung der Ergebnisse bedingt, bleibt das Expressionsniveau zwischen Tag 6 und 8 im Mittel konstant. Bezieht man diesen Wert in die Betrachtungen nicht mit ein, ergibt sich ein Absinken der Semaphorin 3A-Expression zwischen Tag 6 und 8 und damit ein kontinuierliches Absinken ab Tag 4. Der Verlauf der Expression ist in Abbildung 3.2.3. dargestellt.

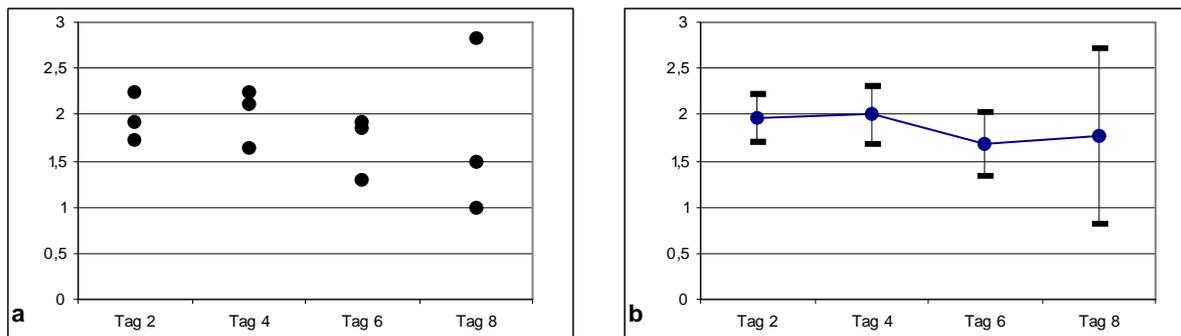


Abbildung 3.2.3.: Expressionsverlauf von Semaphorin 3A
 Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion; RT-PCR; Agarosegelelektrophorese; Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Detektion.
 Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) von Semaphorin 3A und Gapdh. (a: Einzelwerte; b: Mittelwerte der Einzelergebnisse und Standardabweichung; n=3; Anzahl der PCR-Zyklen: 30)

3.2.1.4. Semaphorin 4D

Die Expression von Semaphorin 4D nimmt im Verlauf des Experimentes leicht zu und erreicht am Tag 6 ihren Höhepunkt. Das Expressionsniveau befindet sich am Tag 2 knapp unter und am Tag 6 knapp über dem der GAPDH. Am Tag 6 ist die Streubreite aufgrund einer Lunge mit sehr niedriger Semaphorin 4D-Expression hoch. Deutlich erscheint das Absinken der Expression am Tag 8 auf nur mehr das 0,4-fache des Expressionsniveaus der GAPDH. In einer der am Tag 8 entnommenen Lungen konnte keine Semaphorin 4D-mRNA nachgewiesen werden. Aufgrund der hohen Streubreite am Tag 6 und der sich hieraus ergebenden Werte-Überschneidung konnte für dieses Absinken der Expression am Tag 8 keine statistische Signifikanz gezeigt werden. Abbildung 3.2.4. gibt die Semaphorin 4D-Expression wieder.

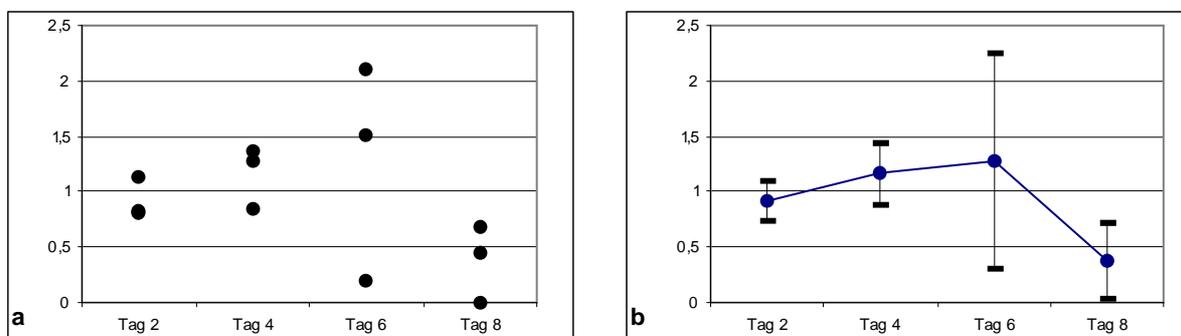


Abbildung 3.2.4.: Expressionsverlauf von Semaphorin 4D
 Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion; RT-PCR; Agarosegelelektrophorese; Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Detektion.
 Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) von Semaphorin 4D und Gapdh. (a: Einzelwerte; b: Mittelwerte der Einzelergebnisse und Standardabweichung; n=3; Anzahl der PCR-Zyklen: 30)

3.2.2. Proliferation

Zur Beurteilung lokaler Wachstumsvorteile in den Lungen wurde die Expression von HGF und seinem Rezeptor c-met untersucht.

3.2.2.1. HGF

Hepatocyte growth factor (HGF)-mRNA konnte nur an den Tagen 2 und 8 nach der Tumorzellinjektion nachgewiesen werden. Zu beiden Zeitpunkten fand sich unter den jeweils drei untersuchten Lungen eine ohne und zwei mit niedriger HGF-Expression, deren Expressionsniveau lediglich das 0,15-0,4 fache dessen der GAPDH beträgt. An den Tagen 4 und 6 konnte keine Expression von HGF-mRNA gefunden werden. Abbildung 3.2.5. zeigt die HGF-Expression zu den verschiedenen Zeitpunkten.

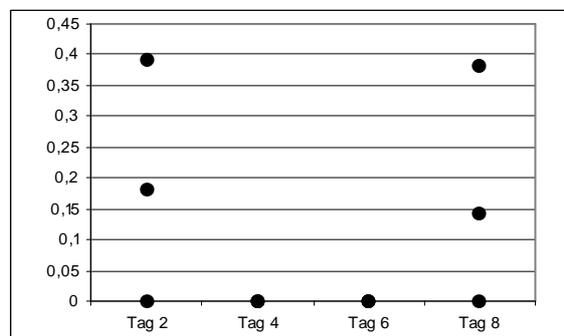


Abbildung 3.2.5.: Expressionsverlauf von HGF

Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion; RT-PCR; Agarosegelelektrophorese; Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Detektion.

Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) von HGF und Gapdh. (Einzelergebnisse; n=3; Anzahl der PCR-Zyklen: 35)

3.2.2.2. c-met

Der HGF-Rezeptor c-met wird in den metastasenträgenden Lungen über den gesamten untersuchten Zeitraum auf nahezu konstantem Niveau exprimiert. Unter Berücksichtigung der größeren Streuung an den Tagen 6 und 8 lässt sich eine leichte Abnahme der Expression zum Ende des beobachteten Zeitraumes erkennen. Das Expressionsniveau bewegt sich zwischen dem 1,2- und 1,5- fachen Niveau der GAPDH-Expression. Die zugehörigen Graphen sind in Abbildung 3.2.6. dargestellt.

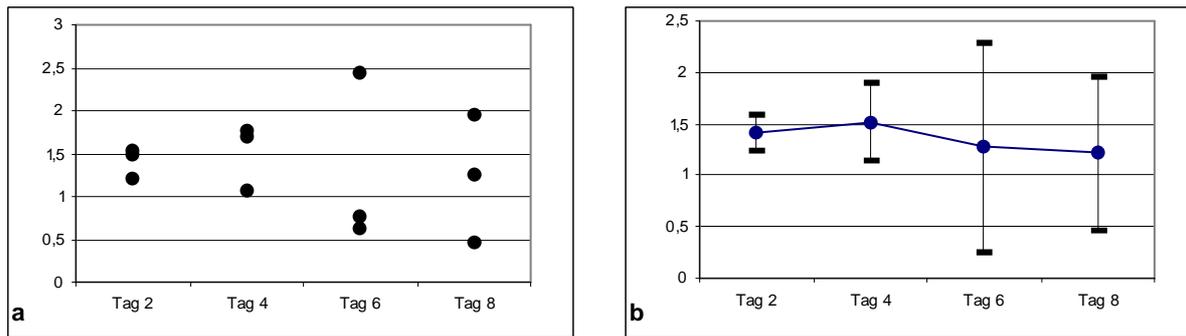


Abbildung 3.2.6.: Expressionsverlauf von c-met
Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion; RT-PCR; Agarosegelelektrophorese; Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Detektion.
Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) von c-met und Gapdh.
(a: Einzelwerte; b: Mittelwerte der Einzelergebnisse und Standardabweichung; n=3; Anzahl der PCR-Zyklen: 30)

3.3. Einfluß von Thrombozytenaggregationshemmern auf die Metastasenzahl

Zu den Ursachen des initialen Tumorzellverlustes in den Lungen zählen vermutlich Defizite in der Adhäsion am Endothel, die Schädigung durch Scherkräfte und Angriffe des Immunsystems. Thrombozyten können gegen diese Einflüsse eine protektive Funktion ausüben. Aus diesem Grund kann man vermuten, dass das initiale Überleben der Tumorzellen weiter reduziert wird, wenn die Protektion durch Thrombozyten wegfällt oder vermindert ist. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Effekt einer antithrombozytären Therapie auf die Effizienz der Metastasierung untersucht. Hierzu wurden die Metastasen an der Lungenoberfläche am Tag 9 nach der Tumorzellinjektion gezählt und die Metastasenzahl von therapierten Tieren mit derjenigen von nichttherapierten Kontrolltieren verglichen.

3.3.1. Therapie mit verschiedenen Thrombozytenaggregationshemmern

Zunächst wurde an Gruppen von je 3 Tieren die Wirkung verschiedener Thrombozytenaggregationshemmer untersucht. Als Hemmstoffe der Cyclooxygenase wurde Aspirin oral mit dem Trinkwasser verabreicht und Aspisol intraperitoneal injiziert. Clopidogrel inhibiert die ADP vermittelte Thrombozytenaktivierung und wurde wie EMD 122347, das die Fibrinogenvernetzung der Thrombozyten über GP IIb/IIIa blockiert, über eine Magensonde gegeben. Alle Medikamente wurden bis einschließlich Tag 4 nach der Tumorzellinjektion verabreicht.

Die Anzahl der Metastasen an der Lungenoberfläche betrug in der nichttherapierten Kontrollgruppe im Mittel 156. Durch die Therapie mit Aspirin konnte eine Reduktion der Metastasenzahl um mehr als die Hälfte auf einen Mittelwert von 72 erreicht werden. Die Streubreite der Ergebnisse ist in der Aspirin-Gruppe allerdings sehr hoch und reicht von einer Metastasenzahl von 31 bis 128. Somit ergab sich bei $p=0,1$ keine statistisch signifikante Reduktion der Metastasenzahl. Unter der Therapie mit Aspisol, das sich von Aspirin lediglich in der Applikationsform und nicht im Wirkmechanismus unterscheidet, konnte eine vergleichbare Reduktion auf eine Anzahl von 70 Metastasen pro Lunge im Mittel erreicht werden. Hier war die Streubreite mit einer Metastasenzahl von 51 bis 90 deutlich geringer als

in der Gruppe der Aspirin-therapierten Tiere. Die Reduktion der Metastasenzahl war mit $p=0,05$ statistisch signifikant.

Unter der Therapie mit Clopidogrel erreicht die Metastasenzahl am Tag 9 einen Mittelwert von 63. Dies entspricht einer statistisch signifikanten Reduktion auf ca. 40% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Einzelergebnisse bewegen sich dabei zwischen 48 und 72 Metastasen je Lunge. ($p=0,05$)

Die deutlichste Metastasenreduktion konnte unter der Therapie mit EMD 122347 erreicht werden. Die hier beobachtete Metastasenzahl von 23 im Mittel beträgt weniger als ein Sechstel der Metastasenzahl der Kontrollgruppe. Die Einzelergebnisse liegen zwischen 18 und 25 Metastasen pro Lunge. ($p=0,04$)

Im statistischen Vergleich zeigte die Therapie mit EMD eine signifikante Reduktion im Verhältnis zu jedem der anderen getesteten Thrombozytenaggregationshemmer (Aspirin: $p=0,04$, Aspirinol: $p=0,04$, Clopidogrel: $p=0,04$).

In Abbildung 3.3.1. sind die Auswirkungen der unterschiedlichen antithrombozytären Medikamente auf die Metastasenzahl graphisch dargestellt.

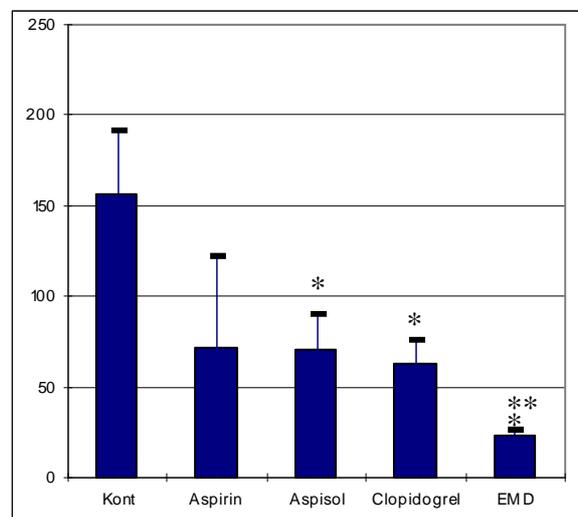


Abbildung 3.3.1.: Einfluß verschiedener Thrombozytenaggregationshemmer auf die Metastasenzahl i.v. Injektion von 2×10^5 B16/D5 Melanomzellen; antithrombozytäre Therapie bis Tag 4; Entnahme der Lungen und Zählung der Metastasen am Tag 9; angegeben ist die Metastasenzahl. (Mittelwerte und Standardabweichung; $n=3$)

Statistische Signifikanz bei $p \leq 0,05$; Aspirinol, Clopidogrel und EMD gegenüber der Kontrollgruppe (*); EMD gegenüber Aspirin, Aspirinol, Clopidogrel (**)

3.3.2. EMD 122347 Therapie über 5 Tage

EMD 122347 wurde wegen der größeren Effektivität in der Metastasenreduktion im Vergleich zu den anderen Thrombozytenaggregationshemmern als Medikament für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. In diesem Experiment wurde die Auswirkung der antithrombozytären Therapie mit EMD 122347 auf die Metastasenzahl anhand einer größeren Stichprobe mit 5 Tieren überprüft. Die Therapie erfolgte bis einschließlich Tag 4.

Die Metastasenzahl in der Kontrollgruppe war hier im Vergleich zu den Kontrolltieren des ersten Experimentes wesentlich höher. Es wurden im Mittel 381 Metastasen pro Lunge bei den nichttherapierten Tieren gefunden. Die Einzelwerte der Zählung befanden sich zwischen 327 und 461 Metastasen. Unter der Therapie mit EMD 122347 konnte die Metastasenzahl auf 258 im Mittel gesenkt werden, was einer Reduktion auf 68% in Relation zur Anzahl der Metastasen in der Kontrollgruppe entspricht. Die Einzelergebnisse der Therapie-Gruppe weisen dabei eine relativ hohe Streubreite auf. Die niedrigste ermittelte Metastasenzahl beträgt 109 die höchste 415. Insgesamt fand sich nur bei einem therapierten Tier eine höhere

Metastasenzahl im Vergleich zur niedrigsten Metastasenzahl der Kontrollgruppe. Statistisch war die Reduktion mit $p=0,06$ knapp nicht signifikant. Abbildung 3.3.2. gibt die Ergebnisse der Therapie mit EMD 122347 wieder.

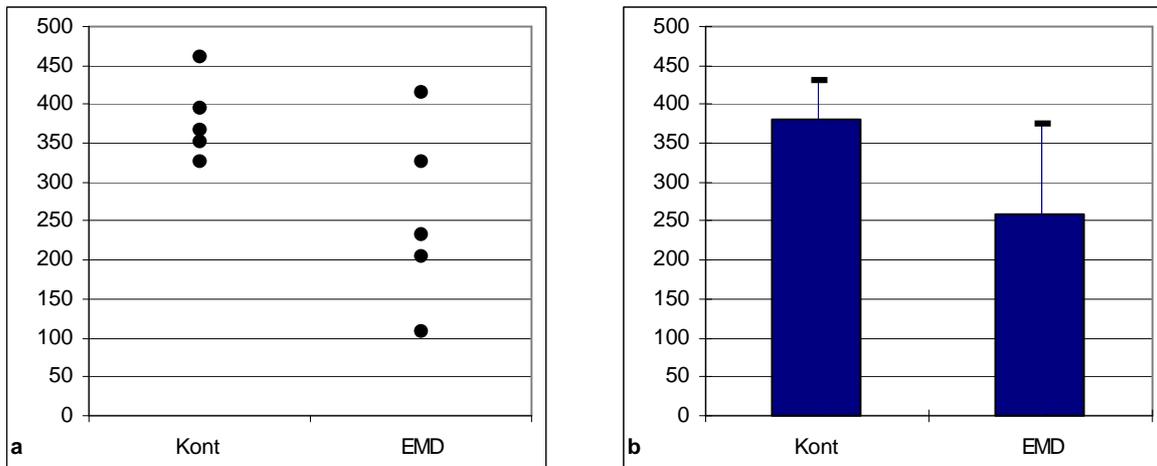


Abbildung 3.3.2.: Einfluß einer Therapie mit EMD 122347 über 5 Tage auf die Metastasenzahl i.v. Injektion von 2×10^5 B16/D5 Melanomzellen; EMD 122347 Therapie bis Tag 4; Entnahme der Lungen und Zählung der Metastasen am Tag 9; angegeben ist die Metastasenzahl. (a: Einzelwerte; b: Mittelwerte und Standardabweichung; $n=5$)

3.3.3. EMD 122347 Therapie über 9 Tage

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob eine längere antithrombozytäre Therapie eine deutlichere Reduktion der Metastasenzahl bewirken kann. Dazu erfolgte die Gabe von EMD 122347 bei ansonsten gleichen Bedingungen wie im vorherigen Experiment bis einschließlich Tag 8. Da die Lungen am Tag 9 entnommen wurden, bestand also über den gesamten Zeitraum des Experiments eine Inhibition der Thrombozytenfunktion.

Die Metastasenzahl der nichttherapierten Tiere betrug im Mittel 330. Die Streubreite der Einzelwerte reicht dabei von 169 bis 412, wobei sich in drei der untersuchten Lungen Zahlen ergaben, die bei ca. 400 Metastasen pro Lunge sehr nahe zusammenliegen. Die Zählung bei den therapierten Tieren ergab mit im Mittel 159 Metastasen eine Reduktion auf weniger als die Hälfte der Metastasenzahl in der Kontrollgruppe. Auch hier liegen die Einzelwerte relativ weit auseinander, wobei 46 die niedrigste 264 die höchste ermittelte Metastasenzahl ist. Es konnte mit $p=0,028$ eine statistisch signifikante Metastasenreduktion erreicht werden. In Abbildung 3.3.3. sind die zugehörigen Graphen wiedergegeben.

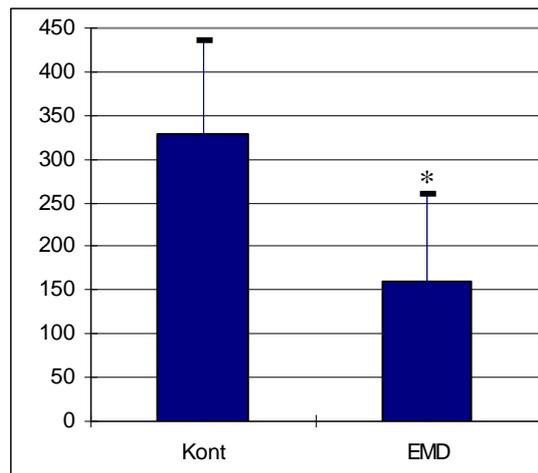


Abbildung 3.3.3.: Einfluß einer Therapie mit EMD 122347 über 9 Tage auf die Metastasenzahl i.v. Injektion von 2×10^5 B16/D5 Melanomzellen; EMD 122347 Therapie bis Tag 8; Entnahme der Lungen und Zählung der Metastasen am Tag 9; angegeben ist die Metastasenzahl. (Mittelwerte und Standardabweichung; n=5)

Statistische Signifikanz bei $p \leq 0,05$; EMD gegenüber der Kontrollgruppe (*)

3.4. Einfluss von EMD 122347 auf die Genexpression

Da durch eine Inhibition der Thrombozytenaggregation die Metastasenzahl in den Lungen nach intravenöser Injektion von Tumorzellen effektiv gesenkt werden konnte, wurde im folgenden untersucht, ob unter der antithrombozytären Therapie mit EMD 122347 auch Veränderungen der Genexpression gefunden werden können, und die Therapie somit auch Einfluss auf die durch jeweiligen Gene charakterisierten Mechanismen besitzt. Hierzu wurde die Expression von Genen mit wichtiger Funktion in der gegen den Tumor gerichteten Immunantwort (Fas, Fas-L, TRANCE), für die Invasivität von Tumorzellen (MMP 2, MMP 9, Semaphorin 3A, Semaphorin 4D) und für die lokale Proliferation (HGF, c-met) untersucht, deren Expressionsverlauf bereits in den Lungen nichttherapierter Tiere analysiert worden war. Abschließend wurden die Verlaufskurven von nichttherapierten Tieren mit denen der EMD 122347 behandelten Tiere verglichen.

Hierdurch ist auf der Ebene der Genexpression eine Beurteilung der Wirkung einer antithrombozytären Therapie auf das Überleben, die Immunantwort, die Invasivität und die Expression von Wachstums und Überlebensfaktoren möglich.

3.4.1. Überleben

Das Überleben der Tumorzellen wurde auch unter der Therapie mit EMD 122347 anhand der Expression des Melanozytenmarkergens P-mel 17 untersucht. P-mel 17 wird in den Lungen ca. eine Stunde nach der Tumorzellinjektion auf einem Niveau exprimiert, das dem 0,7-fachen dessen der Gapdh entspricht. Die Expression bleibt am Tag 1 zunächst konstant – wobei hier die größere Streubreite der Ergebnisse zu beachten ist – um am Tag 2 auf den niedrigsten Wert des gesamten Verlaufes abzufallen. Am Tag 4 findet sich ein leichter Anstieg des Expressionsniveaus, das am Tag 6 wieder die Ausgangswerte erreicht und am Tag 8 noch weiter ansteigt. Damit ist davon auszugehen, dass sich das minimale Expressionsniveau und damit die niedrigste Anzahl von Melanomzellen in der Lunge zwischen Tag 2 und Tag 4 findet.

Die Expression von P-mel 17 nimmt in Kontrolltieren und unter der Therapie mit EMD 122347 einen sehr ähnlichen Verlauf. Die Expression befindet sich am Tag 0 auf in etwa gleichem Niveau, während sie am Tag 1 in den Lungen der Kontrolltiere bereits stark abfällt

in den Lungen der therapierten Tiere aber konstant bleibt, sodass sich in der EMD-Gruppe ein höheres Expressionsniveau ergibt. In beiden Gruppen sinkt die Expression am Tag 2 stark ab und erreicht je den niedrigsten Wert im Gesamtverlauf, wobei das Niveau der EMD-Gruppe in etwa die Hälfte im Vergleich zum Niveau der Kontroll-Gruppe beträgt. Am Tag 2 ergibt sich ein statistisch signifikant niedrigeres Expressionsniveau im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,05$). Am Tag 4 steigt die Expression in beiden Gruppen wieder an, sodass das Minimum der P-mel 17 Expression in beiden Gruppen zwischen Tag 2 und Tag 4 anzusiedeln ist. Da dieser Expressionsanstieg in der EMD Gruppe weniger stark ausgeprägt ist, findet sich am Tag 4 in den Lungen der Kontrolltiere wie am Tag 2 ein Expressionsniveau, das in etwa dem doppelten Expressionsniveau in den Lungen der EMD therapierten Tiere entspricht. An den Tagen 6 und 8 ist kein Unterschied in der Expression von P-mel 17 feststellbar. In Abbildung 3.4.1. ist der Expressionsverlauf von P-mel 17 dargestellt.

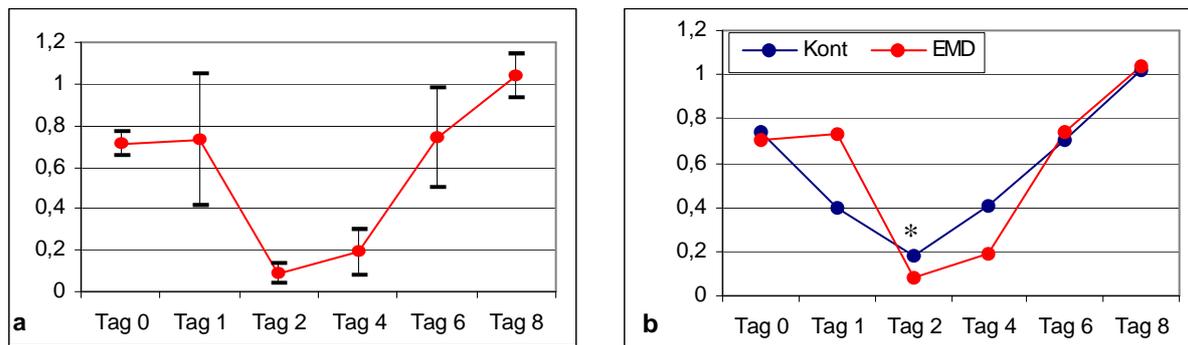


Abbildung 3.4.1.: Expressionsverlauf von P-mel 17 unter Therapie mit EMD 122347

Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion; RT-PCR; Agarosegelelektrophorese; Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Detektion.

Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) von P-mel 17 und Gapdh.

(a: Mittelwerte der Einzelergebnisse und Standardabweichung, b: Vergleich mit der P-mel 17 Expression in den Lungen nichttherapierter Tiere; $n=3$; Anzahl der PCR-Zyklen: 30)

Statistische Signifikanz bei $p \leq 0,05$; Am Tag 2, Therapiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe(*)

3.4.2. Immunabwehr

Die Expression der Gene Fas, Fas-Ligand und TRANCE wurde analysiert um den Einfluss einer antithrombozytären Therapie auf Vorgänge der gegen den Tumor gerichteten Immunabwehr zu untersuchen.

3.4.2.1. Fas

Die Expression von Fas in den Lungen der EMD-Gruppe befindet sich am Tag 2 auf einem Niveau, das ca. 90% des Expressionsniveaus der Gapdh beträgt. Bereits am Tag 4 fällt die Expression sehr stark und ist nur noch in einer der untersuchten Lungen auf einem Niveau nachweisbar, das dem 0,4-fachen dessen der Gapdh entspricht. In den anderen beiden zu diesem Zeitpunkt untersuchten Lungen findet sich entweder keine Fas-Expression oder sie befindet sich auf einem Niveau, das nur 7 Tausendstel des Niveaus der Gapdh ausmacht. An den Tagen 6 und 8 konnte in keiner der untersuchten Lungen der EMD therapierten Tiere Fas-mRNA nachgewiesen werden.

Die Fas-Expression verläuft in den Lungen der therapierten und der nichttherapierten Tiere im wesentlichen parallel. Dabei befindet sie sich aber in der EMD-Gruppe schon am Tag 2 auf einem deutlich niedrigeren Niveau und sinkt schneller ab, sodass am Tag 4 bereits Werte erreicht werden, die denen der Kontroll-Gruppe am Tag 6 vergleichbar sind. Es ergibt sich somit ein statistisch signifikanter Rückgang der Fas Expression in der EMD-Gruppe bereits

am Tag 4 ($p=0,05$), sowie eine signifikant niedrigere Fas Expression im Vergleich zur Gruppe nicht therapierter Tiere am Tag 4 ($p=0,05$). Der Verlauf der Fas-Expression ist in Abbildung 3.4.2. wiedergegeben.

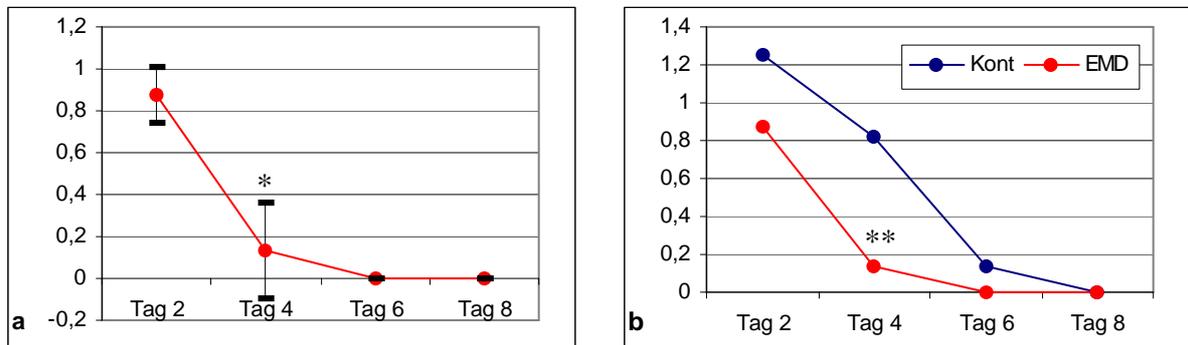


Abbildung 3.4.2.: Expressionsverlauf von Fas unter Therapie mit EMD 122347

Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion; RT-PCR; Agarosegelelektrophorese; Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Detektion.

Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) von Fas und Gapdh.

(a: Mittelwerte der Einzelergebnisse und Standardabweichung, b: Vergleich mit der Fas Expression in den Lungen nichttherapierter Tiere; $n=3$; Anzahl der PCR-Zyklen: 40)

Statistische Signifikanz bei $p \leq 0,05$; Tag 4 gegenüber dem Ausgangswert an Tag 2 (*); Therapiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe am Tag 4 (**)

3.4.2.2. Fas-Ligand

Fas-Ligand wird an den Tagen 2, 6 und 8 in den Lungen der EMD-Gruppe auf einem sehr niedrigen Niveau exprimiert, das sich zwischen dem 0,2- und 0,3-fachen Expressionsniveau der Gapdh befindet. Zu jedem dieser Zeitpunkte existieren auch Lungen, in denen keine Fas-Ligand-Expression nachgewiesen werden konnte. Am Tag 4 steigt die Expression von Fas-Ligand allerdings deutlich an und erreicht ein Niveau, das mehr als das 4-fache in Relation zu den übrigen Zeitpunkten beträgt. Dieser Expressionsanstieg an Tag 4 erreicht auch statistische Signifikanz im Vergleich zum Expressionsniveau der Tage 2 und 6 (je $p=0,05$).

Dieses Expressionsmaximum am Tag 4 unterscheidet auch die Verläufe in der Kontroll- und EMD-Gruppe am deutlichsten. Die Expression von Fas-Ligand befindet sich an den Tagen 2 und 6 in beiden Gruppen auf vergleichbar niedrigem Niveau. Der Expressionsanstieg am Tag 2 findet sich allerdings nur in der EMD-Gruppe, sodass das Niveau hier Werte erreicht, die mehr als das 4-fache im Vergleich zu denjenigen der Kontroll-Gruppe zu diesem Zeitpunkt betragen. Dieser Unterschied zeigte sich mit $p=0,1$ jedoch nicht statistisch signifikant. Die Expression von Fas-Ligand zu den verschiedenen Zeitpunkten ist in Abbildung 3.4.3. dargestellt.

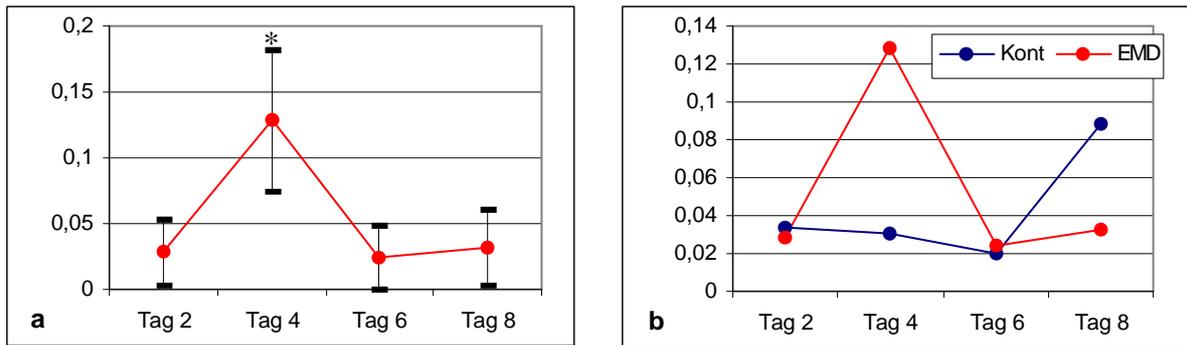


Abbildung 3.4.3.: Expressionsverlauf von Fas-Ligand unter Therapie mit EMD 122347

Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion; RT-PCR; Agarosegelelektrophorese; Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Detektion.

Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) von Fas-Ligand und Gapdh.

(a: Mittelwerte der Einzelergebnisse und Standardabweichung, b: Vergleich mit der Fas-Ligand Expression in den Lungen nichttherapierter Tiere; n=3; Anzahl der PCR-Zyklen: 40)

Statistische Signifikanz bei $p \leq 0,05$; Tag 4 gegenüber dem Ausgangswert an Tag 2 und gegenüber Tag 6 (*)

3.4.2.3. TRANCE

Die Expression von TRANCE bewegt sich im Verlauf des Experimentes in den Lungen der antithrombozytär behandelten Tiere auf einem relativ niedrigem Niveau zwischen dem 0,08- und 0,1-fachen dessen der Gapdh. Am Tag 4 findet sich ein leichter Anstieg auf den höchsten Wert im Verlauf, während das Absinken der Expression am Tag 8 wieder zu den Ausgangswerten zurückführt.

Die TRANCE-Expression in der EMD-Gruppe ist derjenigen der Kontroll-Gruppe sowohl was den Verlauf als auch was das Expressionsniveau betrifft sehr ähnlich. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede weder innerhalb des Expressionsverlaufs noch zwischen Kontroll- und Therapie-Gruppe ermittelt werden. Abbildung 3.4.4. gibt den Verlauf der TRANCE Expression wieder

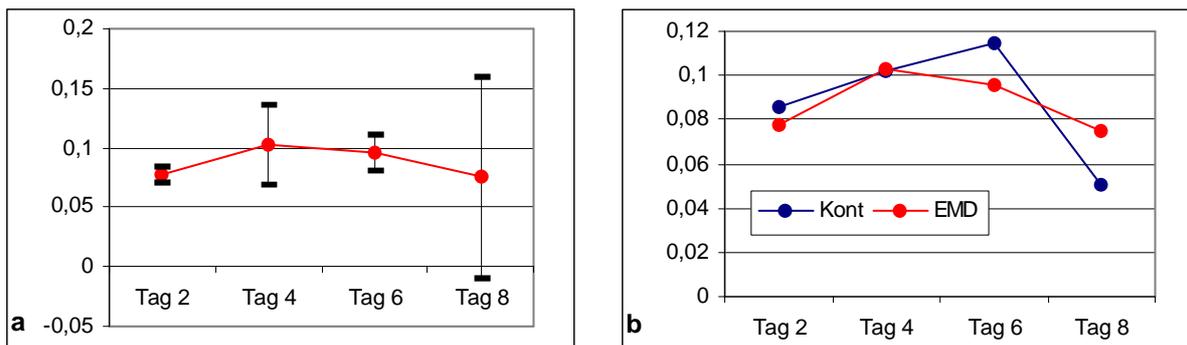


Abbildung 3.4.4.: Expressionsverlauf von TRANCE unter Therapie mit EMD 122347

Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion; RT-PCR; Agarosegelelektrophorese; Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Detektion.

Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) von TRANCE und Gapdh.

(a: Mittelwerte der Einzelergebnisse und Standardabweichung, b: Vergleich mit der TRANCE Expression in den Lungen nichttherapierter Tiere; n=3; Anzahl der PCR-Zyklen: 30)

3.4.3. Invasivität

Zur Untersuchung der Invasivität der Tumorzellen unter einer antithrombozytären Therapie wurde die Expression der Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 sowie der Semaphorine 3A und 4D analysiert.

3.4.3.1. Matrix-Metalloproteinase 2

MMP 2 wird in den Lungen der therapierten Tiere an den Tagen 2 und 4 auf nahezu gleichbleibendem Niveau exprimiert, das etwas über dem halben Expressionsniveau des Housekeeping-Gens liegt. Am Tag 6 fällt die Expression stark auf ein Niveau, das nur wenig mehr als das 0,1-fache des Niveaus der Gapdh beträgt. Dieses Absinken ist mit $p=0,05$ statistisch signifikant. Am Tag 8 sinkt die MMP 2 Expression noch einmal minimal ab.

Im Vergleich zu den nichttherapierten Tieren ist die MMP 2 Expression bei den Tieren der EMD-Gruppe zunächst etwas höher und steigt in beiden Gruppen zwischen Tag 2 und Tag 4 leicht an. Ein wesentlicher Unterschied findet sich am Tag 6, weil hier die MMP 2 Expression in den Lungen der EMD-therapierten Tiere bereits sehr stark absinkt, während in den Lungen der nichttherapierten Tiere ein erneuter leichter Anstieg zu verzeichnen ist. Dadurch beträgt das Expressionsniveau von MMP 2 in der Kontrollgruppe ca. das 4-fache dessen der EMD-Gruppe. Am Tag 8 findet sich auch in den Lungen der nichttherapierten Tiere ein starkes Absinken der MMP 2 Expression die dabei noch unter das Niveau der EMD-Gruppe fällt. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht also darin, dass die MMP 2 Expression in der Kontroll-Gruppe am Tag 8 stark abfällt, während unter der Therapie mit EMD dieses Absinken bereits am Tag 6 zu beobachten ist. In Abbildung 3.4.5. sind die Verläufe zusammengefasst.

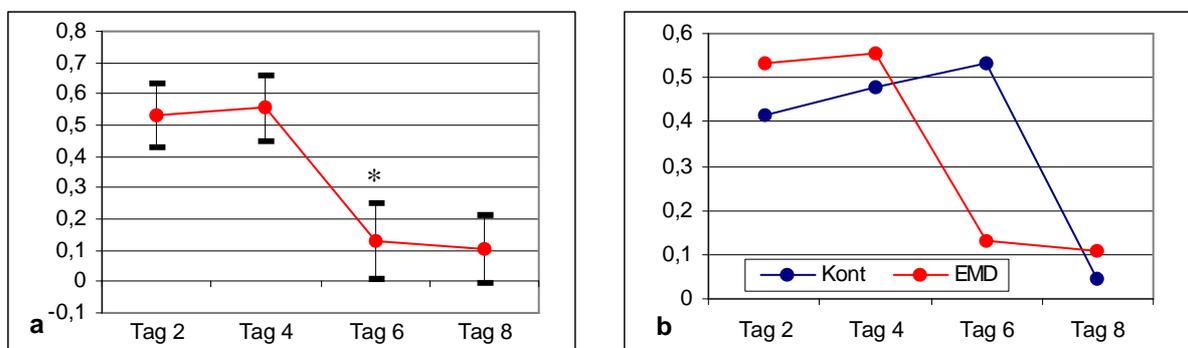


Abbildung 3.4.5.: Expressionsverlauf von MMP 2 unter Therapie mit EMD 122347

Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion; RT-PCR; Agarosegelelektrophorese; Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Detektion.

Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) von MMP 2 und Gapdh.

(a: Mittelwerte der Einzelergebnisse und Standardabweichung, b: Vergleich mit der MMP 2 Expression in den Lungen nichttherapierter Tiere; $n=3$; Anzahl der PCR-Zyklen: 35)

Statistische Signifikanz bei $p \leq 0,05$; Tag 6 gegenüber Tag 4 (*)

3.4.3.2. Matrix-Metalloproteinase 9

Unter der Therapie mit EMD konnte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Expression von MMP 9 nachgewiesen werden.

3.4.3.3. Semaphorin 3A

Die Expression von Semaphorin 3A bleibt an den Tagen 2, 4 und 6 auf einem konstant hohen Niveau, das sich zwischen dem 1,5- und dem 1,7-fachen dessen der Gapdh bewegt. Am Tag 8 zeigt sich ein deutliches Absinken der Expression auf ca. die Hälfte des Niveaus der vorherigen Tage. Dieser Rückgang des Expressionsniveaus ist mit $p=0,05$ statistisch signifikant.

Die Semaphorin 3A-Expression befindet sich auch in den Lungen der Kontrolltiere auf konstant hohem Niveau, das noch über dem der EMD-Gruppe liegt. Am Tag 6 fällt die Expression in der Kontroll-Gruppe leicht, sodass zu diesem Zeitpunkt, bei konstanter Expression in der EMD-Gruppe, in beiden Gruppen das gleiche Expressionsniveau besteht. Das Absinken der Expression in den Lungen der therapierten Tiere am Tag 8 hat zur Folge, dass das Expressionsniveau in der EMD-Gruppe nur noch 43% dessen der Kontroll-Gruppe beträgt, in der die Expression zu diesem Zeitpunkt konstant bleibt. Unter Punkt 3.2.1.3 wurde bereits der Expressionsverlauf der Kontroll-Gruppe bei Nichtberücksichtigung eines sehr hohen Einzelwertes am Tag 8 besprochen. Die sich so ergebende Verlaufskurve wäre dem Verlauf in der EMD-Gruppe ähnlicher und befände sich auf einem geringfügig höheren Expressionsniveau. Auch unter diesen Voraussetzungen ergäbe sich jedoch ein deutlicheres Absinken der Semaphorin 3A-Expression am Tag 8 in der EMD-Gruppe. Auch statistisch ergibt sich ein signifikant niedrigeres Expressionsniveau am Tag 8 im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,05$). Der Verlauf der Semaphorin 3A-Expression ist in Abbildung 3.4.6. dargestellt.

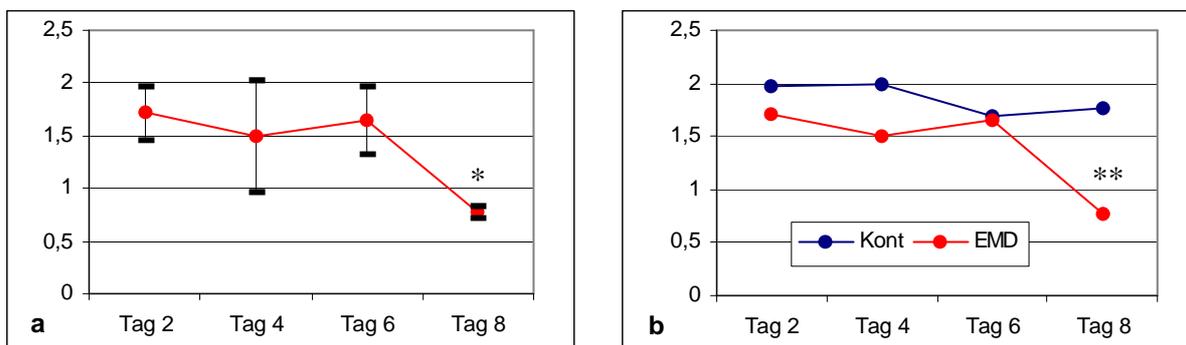


Abbildung 3.4.6.: Expressionsverlauf von Semaphorin 3A unter Therapie mit EMD 122347

Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion; RT-PCR; Agarosegelelektrophorese; Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Detektion.

Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) von Semaphorin 3A und Gapdh.

(a: Mittelwerte der Einzelergebnisse und Standardabweichung, b: Vergleich mit der Semaphorin 3A Expression in den Lungen nichttherapierter Tiere; $n=3$; Anzahl der PCR-Zyklen: 30)

Statistische Signifikanz bei $p \leq 0,05$; Tag 8 gegenüber Tag 6 (*); Therapiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe am Tag 8 (**)

3.4.3.4. Semaphorin 4D

Semaphorin 4D wird in den Lungen der therapierten Tiere am Tag 2 auf einem Niveau exprimiert, das dem der Gapdh entspricht. Die Expression nimmt über den Zeitraum des Experimentes kontinuierlich ab und ist am Tag 8 nur noch in einer der untersuchten Lungen nachweisbar – und auch hier auf einem minimalen Niveau, das nur noch 3 Tausendstel des Expressionsniveaus der Gapdh beträgt. Am Tag 6 ist die Streubreite aufgrund einer Lunge mit vergleichsweise hoher Expression hoch.

In den Lungen der nichttherapierten Tiere beginnt die Semaphorin 4D-Expression auf einem etwas niedrigeren Niveau als in der EMD-Gruppe, steigt aber an den Tagen 4 und 6 und erreicht so am Tag 6 ein Niveau, das ca. 65% über dem der EMD-Gruppe liegt. In beiden Gruppen ist die Streubreite der Ergebnisse am Tag 6 sehr hoch (siehe Punkt 3.2.1.4.), wobei in dies in der Kontroll-Gruppe durch einen vergleichsweise sehr niedrigen und in der EMD-Gruppe durch einen vergleichsweise sehr hohen Einzelwert bedingt ist, sodass sich bei Nichtberücksichtigung dieser Extremwerte eine noch deutlichere Diskrepanz der Semaphorin 4D-Expression am Tag 6 ergäbe. In beiden Gruppen sinkt die Expression am Tag 8 stark ab, wobei dieses Absinken in der EMD-Gruppe noch deutlich stärker ausgeprägt ist. In der EMD-Gruppe zeigte sich dieser Expressionsrückgang im Unterschied zur Kontroll-Gruppe statistisch signifikant ($p=0,05$). Abbildung 3.4.7. zeigt den Verlauf der Semaphorin 4D-Expression.

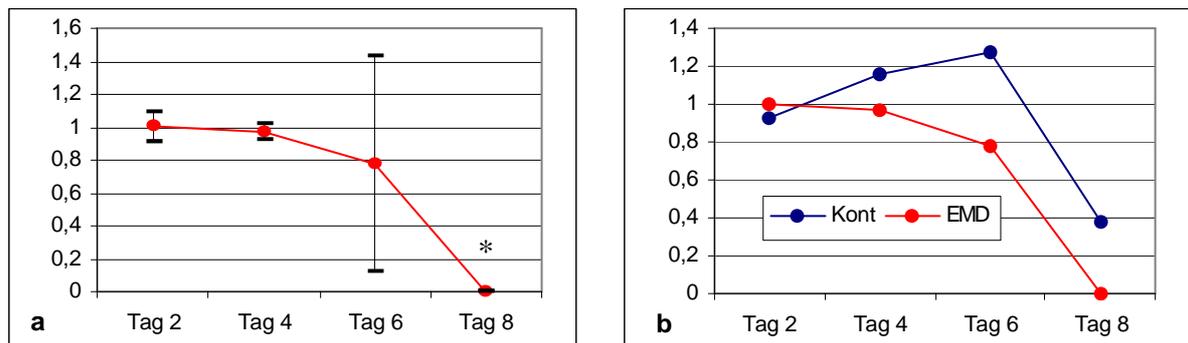


Abbildung 3.4.7.: Expressionsverlauf von Semaphorin 4D unter Therapie mit EMD 122347
Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion; RT-PCR; Agarosegelelektrophorese; Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Detektion.
Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) von Semaphorin 4D und Gapdh.
(a: Mittelwerte der Einzelergebnisse und Standardabweichung, b: Vergleich mit der Semaphorin 4D Expression in den Lungen nichttherapierter Tiere; $n=3$; Anzahl der PCR-Zyklen: 30)
Statistische Signifikanz bei $p \leq 0,05$; Tag 8 gegenüber Tag 6 (*)

3.4.4. Proliferation

Zur Beurteilung der Wirkung einer Therapie mit EMD 122347 auf lokale Wachstumsvorteile in den Lungen wurde die Expression von HGF und seinem Rezeptor c-met untersucht.

3.4.4.1. HGF

Eine m-RNA-Expression von Hepatocyte growth factor (HGF) konnte unter der Therapie mit EMD nur am Tag 6 und hier nur in einer der untersuchten Lungen nachgewiesen werden. Die Expression in dieser Lunge befand sich allerdings auf einem hohen Niveau, das dem 1,3-achen Expressionsniveau des Housekeeping-Gens entspricht.

Die Unterschiede zu den nichttherapierten Tieren sind damit sehr deutlich, da dort eine Expression von HGF nur an den Tagen 2 und 8 nachgewiesen werden konnte, an denen HGF in der EMD-Gruppe nicht exprimiert wird. Am Tag 6 hingegen fand sich in keiner der Lungen der nichttherapierten Tiere HGF-mRNA, während zu diesem Zeitpunkt zumindest in einer der Lungen der EMD-Gruppe eine relativ hohe HGF-Expression anzutreffen ist. Abbildung 3.4.8. zeigt die HGF-Expression zu den verschiedenen Zeitpunkten.

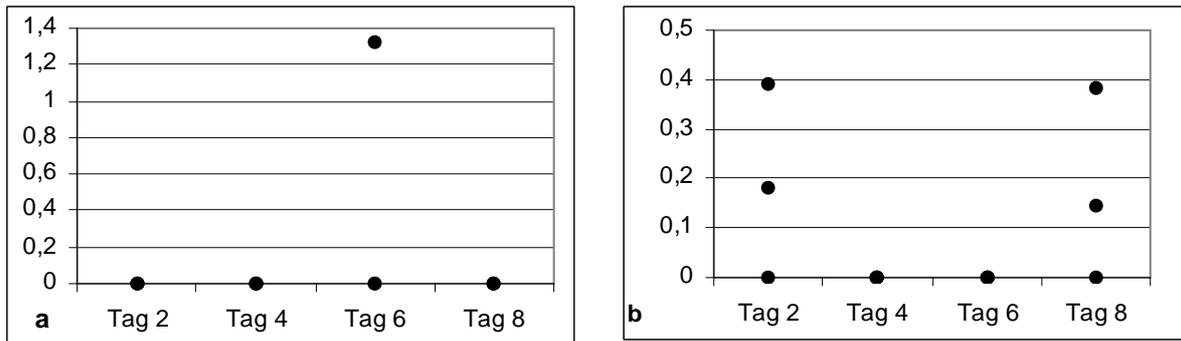


Abbildung 3.4.8.: Expressionsverlauf von HGF unter Therapie mit EMD 122347
Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion; RT-PCR; Agarosegelelektrophorese; Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Detektion.
Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) von HGF und Gapdh.
(a: Einzelergebnisse; b: zum Vergleich die Einzelergebnisse in den Lungen nichttherapierter Tiere; n=3; Anzahl der PCR-Zyklen: 35)

3.4.4.2. c-met

Die Expression des HGF-Rezeptors c-met fällt in den Lungen der antithrombozytär behandelten Tiere über den gesamten Untersuchungszeitraum kontinuierlich ab. Sie befindet sich am Tag 2 auf einem Niveau, das dem 1,4-fachen dessen der Gapdh entspricht, und erreicht am Tag 8 das ca. 0,3-fache Expressionsniveau der Gapdh, was etwas mehr als einem Fünftel des Ausgangsniveaus entspricht. Das Absinken der Expression am Tag 8 gegenüber Tag 2 ist statistisch signifikant ($p=0,05$).

Dieser Expressionsverlauf unterscheidet sich von dem der Kontroll-Gruppe stark. Die Expression befindet sich in beiden Gruppen am Tag 2 auf dem gleichen Niveau. Während jedoch in der EMD-Gruppe ein kontinuierliches Absinken zu beobachten ist, findet sich in den Lungen der Kontrolltiere eine nahezu konstante Expression von c-met. Dadurch beträgt das Expressionsniveau in den Lungen der EMD-Gruppe am Tag 8 lediglich noch ein Viertel dessen der Kontroll-Gruppe. Abbildung 3.4.9. gibt den Verlauf der c-met Expression wieder.

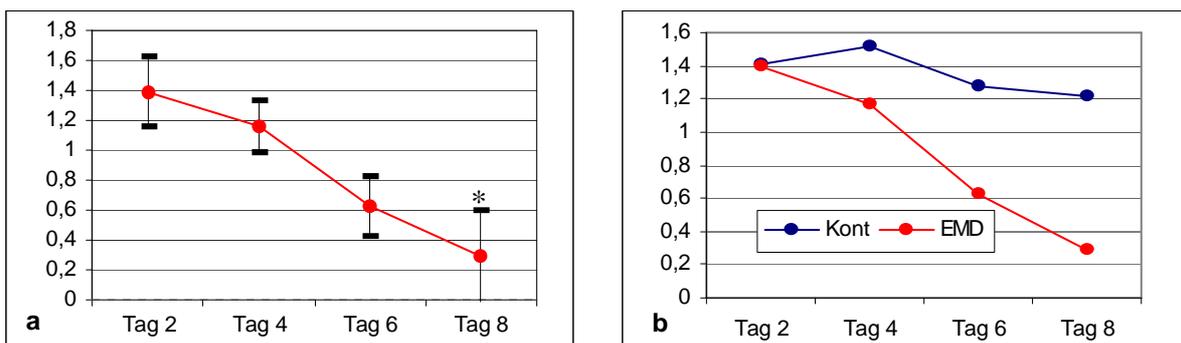


Abbildung 3.4.9.: Expressionsverlauf von c-met unter Therapie mit EMD 122347
Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion; RT-PCR; Agarosegelelektrophorese; Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Detektion.
Angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density, OD) von c-met und Gapdh.
(a: Mittelwerte der Einzelergebnisse und Standardabweichung, b: Vergleich mit der c-met Expression in den Lungen nichttherapierter Tiere; n=3; Anzahl der PCR-Zyklen: 30)
Statistische Signifikanz bei $p \leq 0,05$; Tag 8 gegenüber dem Ausgangswert an Tag 2 (*)

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Methoden

4.1.1. Modell

In dieser Arbeit wurde der Expressionsverlauf metastasierungs- und apoptose-relevanter Gene sowie der Einfluss einer antithrombozytären Therapie auf Metastasenzahl und Genexpression bei der pulmonalen Melanommetastasierung untersucht.

Die Metastasierung stellt einen komplexen Prozess dar, in dem die Tumorzellen in mehreren Schritten (Invasion, Intravasation, Transport in der Blutbahn, Adhärenz, Extravasation, Proliferation) mit einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren (umgebendes Stroma, Immunzellen, Endothel, Gerinnung) interagieren. Aus diesem Grund können die Vorgänge und Veränderungen im Rahmen der Metastasierung idealerweise anhand eines Tiermodells untersucht werden.

In dem dieser Arbeit zugrundeliegenden Modell führt die Injektion von B16/D5 Melanomzellen in die Schwanzvene von C57/BL6 Mäusen zum Wachstum pulmonaler Metastasen. Dieses Modell wurde 1970 von Isaiah Fidler erstmals charakterisiert⁸⁶ und hat sich seitdem international etabliert und zum detaillierteren Verständnis vieler Aspekte der Metastasierung beigetragen⁸⁷.

Die B16 Melanomzellen leiten sich von einem in einer C57/BL6 Maus spontan entstandenen Tumor ab⁸⁷. Durch wiederholte intravenöse Injektion und Kultivierung der aus Lungenmetastasen isolierten Melanomzellen konnte die Zelllinie B16/F10 gewonnen werden, die sich durch ein besonders hohes Metastasierungspotential bei Injektion in die Schwanzvene auszeichnet⁸⁸. Zur weiteren Selektion einer Zelllinie mit gesteigerter Invasivität wurden B16/F10 Melanomzellen in isolierte Blasen von C57/BL6 Mäusen eingebracht und die Zellen, die die Blasenwand durchwandert hatten, kultiviert. Die so gewonnene Zelllinie wurde als B16/F10/BL6 bezeichnet⁸⁹. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie B16/D5 handelt es sich um einen Subklon der B16/F10/BL6.

Die Injektion von Tumorzellen in die Blutbahn mit dem Ziel der Bildung von Metastasen in nachfolgenden Kapillargebieten wird als experimentelles Metastasierungsmodell bezeichnet. Von Nachteil hierbei ist, dass frühe Phasen der Metastasierung wie z.B. Gewebeinvasion und Intravasation nicht berücksichtigt sind. Der Vorteil besteht darin, dass der genaue Zeitpunkt der Injektion bekannt ist und damit der zeitliche Abstand der Untersuchungen zur Intravasation angegeben werden kann⁹⁰. Im Hinblick auf die Zielsetzung, die Genexpression in einem zeitlichen Verlauf zu analysieren, erscheint dies besonders wichtig.

Da die B16/D5 Tumorzellen sich von einem Melanom ableiten, das in einer C57/BL6 Maus entstanden ist, handelt es sich bei der Injektion dieser Zellen in C57/BL6 Mäuse um ein syngenes Modell, bei dem Tumorzellen und Versuchstiere der gleichen Spezies angehören. Im Gegensatz zu xenogenen Modellen, deren Ziel die Untersuchung humaner Tumore in Tiermodellen ist, müssen die Versuchstiere in syngenem Modellen nicht immunsuppressiv behandelt werden. Hierdurch wird auch der weitreichende Einfluss, den das Immunsystem auf die Prozesse der Tumorprogression und Metastasierung besitzt, nicht verzerrt⁹⁰. Da in dieser Arbeit auch die gegen den Tumor gerichtete Immunantwort untersucht wurde, erscheint die Wahl eines Modells, in dem keine immunsuppressive Therapie benötigt wird, sinnvoll.

4.1.2. Quantifizierung der Metastasen

Ein weiterer Vorteil dieses Modells liegt in der Melaninpigmentierung der Tumorzellen und damit der guten Sichtbarkeit der Metastasen an der Lungenoberfläche. Dies ermöglicht eine

einfache Methode zur Beurteilung der Metastasierung in diesem Modell. Durch die Zählung der oberflächlichen Metastasen der Vorder- und Rückseite der linken Lunge lässt sich das Ausmaß der Metastasierung quantifizieren. Ein Vergleich dieser Methode mit anderen Indikatoren für die Metastasierungsintensität wie z.B. Blutbildveränderungen, Gewicht und Melaningehalt der Lunge zeigte, dass die Zählung der Metastasen für einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen nach der Tumorzellinjektion eine gute Quantifizierungsmethode darstellt. Zu späteren Zeitpunkten verliert sie an Genauigkeit, wenn durch die größere Ausdehnung einzelne Metastasen fusionieren⁹¹. Da die Zählungen in dieser Arbeit am Tag 10 erfolgten, stellte die Fusion von Metastasen kein Problem dar. Als Nachteil bleibt zu erwähnen, dass die Größe der einzelnen Metastasen so nicht in die Bewertung eingeht.

4.1.3. Eingesetzte Medikamente

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer antithrombozytären Therapie auf die Metastasierung und die Genexpression in metastasenträgenden Lungen untersucht. Als Medikamente zur Hemmung der Thrombozytenaggregation stehen in erster Linie drei Substanzklassen - Cyclooxygenaseinhibitoren, ADP-Rezeptor Antagonisten und GP IIb/IIIa Antagonisten - zur Verfügung.

Acetylsalicylsäure inaktiviert das Enzym Cyclooxygenase-1 irreversibel durch Acetylierung der Hydroxylgruppe der Aminosäure Serin 529, und hemmt so die Entstehung des Thrombozytenaktivators Thromboxan A₂ aus Arachidonsäure⁹².

Der ADP-Rezeptor PY₁₂ inhibiert über die Koppelung an inhibitorische G-Proteine die Adenylatcyclase und so die Bildung von cAMP, einem wichtigen intrazellulären Hemmstoff der Thrombozytenaktivierung. Die Stimulation von PY₁₂ ist entscheidend für die volle Aktivierung des GP IIb/IIIa. Clopidogrel bindet irreversibel an PY₁₂ und verhindert so die ADP induzierte Aktivierung des GP IIb/IIIa, die Fibrinogenbindung und die Thrombozytenaggregation⁹³.

Die Bindung von Fibrinogen an aktiviertes GP IIb/IIIa ist unabhängig vom auslösenden Stimulus der letzte Schritt der zur Thrombozytenaggregation führt. Die Blockade dieses Rezeptors stellt damit eine sehr effiziente Möglichkeit zur Thrombozytenaggregationshemmung dar⁹². Man unterscheidet bei den GP IIb/IIIa Antagonisten zwischen monoklonalen Antikörpern, synthetischen Peptiden, die RGD-Sequenzen enthalten, und Nicht-Peptid-Substanzen, die die Struktur der RGD-Sequenz imitieren. Der in dieser Arbeit verwendete GP IIb/IIIa Antagonist EMD 122347 gehört zur letzteren Gruppe. Ein Problem der GP IIb/IIIa Antagonisten ist, dass viele dieser Substanzen bei ihrer Bindung an den Rezeptor wie Fibrinogen eine Konformationsänderung auslösen und die Freilegung ligandeninduzierter Bindungsstellen (LIBS) bewirken können. Die Induktion von LIBS hat zur Folge, dass GP IIb/IIIa sich nach der Dissoziation des Antagonisten in einem aktivierten Zustand befindet, sodass sich ein proaggregatorischer Teileffekt ergibt. EMD 122347 induziert am GP IIb/IIIa keine LIBS⁶³.

4.1.4. Genanalytik

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression verschiedener Gene in den Lungen nach der Injektion der Tumorzellen zu analysieren. Die Untersuchungen zur Genexpression wurden mithilfe der RT-PCR und cDNA Arrays durchgeführt.

4.1.4.1. RT-PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt und erstmals beschrieben und hat sich seitdem als eine der wichtigsten

Methoden in der Molekularbiologie etabliert. Mullis wurde 1993 der Nobelpreis für Chemie für diese Entdeckung verliehen⁹⁴.

Die PCR ist ein Verfahren mit dessen Hilfe durch enzymatische in vitro Synthese Millionen von Kopien eines spezifischen DNA Segments gewonnen werden können. Die Reaktion basiert darauf, dass zwei sequenzspezifische Primer, die die Zielregion flankieren, an DNA binden (Annealing) und so die Synthese komplementärer DNA initiieren. Man unterscheidet den Forward-Primer, der den Beginn der Zielsequenz im Hauptstrang erkennt, und den Reverse-Primer, der an das Ende der Zielsequenz im komplementären Strang binden kann. Durch Zugabe des Enzyms DNA-Polymerase und von Nukleotidbausteinen wird am jeweiligen 3'-Ende der Primer zur Ursprungs-DNA komplementäre DNA synthetisiert (Elongation). Um das Annealing der Primer zu ermöglichen muss im ersten Schritt die DNA durch Erhitzen denaturiert werden, so dass sie in einzelsträngiger Form vorliegt. Die Reaktionsfolge aus Denaturation, Annealing und Elongation repräsentiert einen Zyklus der Kettenreaktion. Da die in einem Zyklus synthetisierten DNA-Stränge im nächsten Zyklus erneut als Vorlage für die DNA-Synthese dienen, ergibt sich eine exponentielle Amplifikation des DNA-Abschnitts in der Ursprungs-DNA, der zwischen den beiden Primern liegt⁹⁵. In Abbildung 4.1. ist die Reaktionsfolge der PCR schematisch dargestellt.

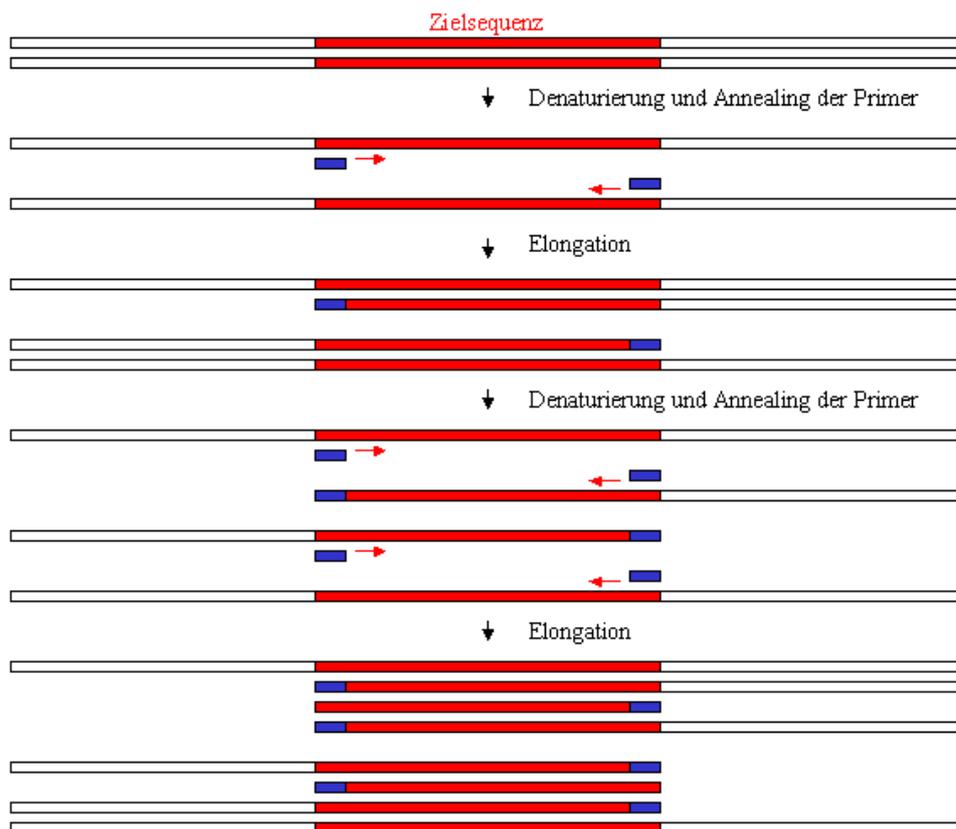


Abbildung 4.1.: Schematische Darstellung der Reaktionsfolge der PCR:

Durch Erhitzen wird die DNA denaturiert und so das Annealing der Primer ermöglicht. Nach Zugabe von DNA-Polymerase erfolgt die Synthese zur Zielsequenz komplementärer DNA (Elongation). In jedem Zyklus erfolgt eine Verdopplung der Zielsequenz (im exponentiellen Bereich der Reaktion; siehe Text). Dargestellt sind zwei komplette Zyklen. Zielsequenz: rot; Primer: blau

Die Expression eines Gens beginnt mit der Synthese eines zur DNA des Gens komplementären RNA-Stranges. Dieser Vorgang wird als Transkription bezeichnet. Das primäre Transkript wird durch posttranskriptionale Modifikation in die biologisch aktive

Form überführt. Durch Anheftung einer Cap-Gruppe am 5'-Ende und eines Poly-A-Endes am 3'-Ende sowie der Entfernung der Introns entsteht Messenger-RNA (mRNA), die in Form von Basentriplets die Aminosäuresequenz der Proteine codiert⁹⁶. Die Expression dieser mRNA wurde in dieser Arbeit untersucht.

Für die Analyse von RNA mithilfe der PCR muss die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt werden, da nur DNA-Moleküle in der PCR amplifiziert werden können. Dieser Vorgang wird als reverse Transkription (RT) bezeichnet und durch das Enzym reverse Transkriptase katalysiert. Zur Synthese der zur RNA komplementären cDNA wurde in dieser Arbeit ein Poly-T-Primer verwendet. Hierdurch erhält man cDNA, die zur mRNA komplementär ist, da diese im Unterschied zu anderen RNA-Formen nach der posttranskriptionalen Modifikation ein Poly-A-Ende aufweist. Die Synthese von cDNA in der RT-Reaktion und nachfolgende Untersuchung mittels der PCR wird als RT-PCR bezeichnet.

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren ist eine der vielen Möglichkeiten, die der Einsatz von PCR-Untersuchungen bietet. Die PCR hat sich dabei gegenüber einer Reihe anderer Verfahren vor allem im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität als überlegen erwiesen⁹⁷. Entscheidend für die quantitative Aussagekraft der PCR ist, die Berücksichtigung ihrer Reaktionskinetik. Zu Beginn wird in jedem Zyklus die DNA der Zielsequenz verdoppelt. Diese exponentielle Vermehrung der amplifizierten DNA erfolgt allerdings nur für eine begrenzte Anzahl von Zyklen. Aufgrund verschiedener Faktoren wie z.B. Substratsättigung der DNA-Polymerase, inkompletter Denaturierung der DNA-Stränge oder dem Reannealing neu synthetisierter DNA an die Ursprungs-DNA nimmt die Effektivität der Amplifikation ab und die Reaktion erreicht ein Plateau. Dadurch geht die Proportionalität der Menge der amplifizierten DNA zur Menge der Zielsequenz zu Beginn der Reaktion verloren⁹⁸. Die Anzahl der PCR-Zyklen, nach der dieses Plateau erreicht wird, ist abhängig von der Menge der Zielsequenz in der Ursprungs-DNA⁹⁹. Bei der Quantifizierung von DNA mithilfe der PCR ist daher sehr genau darauf zu achten, dass die Messungen während des exponentiellen Bereichs der Reaktion erfolgen. Hierzu wurde in dieser Arbeit für jede Probe Messungen nach zwei unterschiedlichen Zykluszahlen durchgeführt. Durch die Zunahme der Menge amplifizierter DNA konnte sichergestellt werden, dass sich die Reaktion noch im exponentiellen Bereich befand.

Für die Variabilität, die bei der RT-PCR Quantifizierung von mRNA auftreten kann, ist hauptsächlich der Schritt der reversen Transkription verantwortlich¹⁰⁰. Daher wurde als Standard, um Abweichungen in der Effektivität der reversen Transkription zu normalisieren, aus jeder der cDNA-Proben neben den zu untersuchenden Genen auch ein Housekeeping-Gen amplifiziert. Gene, die für metabolische Enzyme oder Strukturproteine codieren, werden häufig als Housekeeping-Gen eingesetzt, da sie in allen Zellen des Organismus exprimiert werden. Das in dieser Arbeit verwendete Housekeeping-Gen Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein Enzym der Glykolyse und katalysiert die Umsetzung von 3-Phosphoglycerinaldehyd zu 1,3-Bisphosphoglycerat⁹⁶. GAPDH kommt als Standard zur Normalisierung von Genexpressionsuntersuchungen in sehr vielen Studien zum Einsatz. Ein Problem stellt jedoch dar, dass auch die Expression von Housekeeping-Genen Regulationsmechanismen unterliegt und somit das Expressionsniveau unter unterschiedlichen biologischen Voraussetzungen variieren kann^{97;101}. Für GAPDH konnte gezeigt werden, dass sich die Expression in verschiedenen Tumorzelllinien unter Hypoxie nicht verändert¹⁰². Allerdings existieren auch eine Reihe von Bedingungen, die die Expression der GAPDH aktivieren oder herunterregulieren können¹⁰³.

4.1.4.2. cDNA-Array

Zur Beurteilung der Apoptose in metastasenträgenden Lungen sollte ein Überblick über die Expression von Genen gewonnen werden, die im Rahmen des apoptotischen Zelltodes eine

wichtige Funktion einnehmen. Der Einsatz von cDNA Microarrays ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung einer Vielzahl unterschiedlicher Gene. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten GEArray Q Series Mouse Apoptosis Gene Array der Firma Superarray/Bioscience Corporation konnte die Expression von 96 apoptoserelevanten Genen analysiert werden. Hierfür war in Analogie zur RT-PCR zunächst eine Umwandlung der untersuchten mRNA in cDNA nötig. Zur späteren Detektion der cDNA erfolgte im selben Schritt die Markierung mit Biotin. Auf der Nylonmembran des Arrays sind für die zu untersuchenden Gene spezifische Nukleinsäuresequenzen immobilisiert, mit denen die cDNA der Probe bei übereinstimmender Sequenz hybridisiert. Die so gebundene cDNA konnte dann mittels Chemilumineszenz nachgewiesen werden. Die Durchführung der Array Untersuchungen erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers.

Gemäß den Angaben des Herstellers erreichen die Experimente eine hohe Sensitivität, Spezifität, Reliabilität und Reproduzierbarkeit. Die hohe Sensitivität wird durch eine Amplifikation zu untersuchender Sequenzen während der Synthese der cDNA erreicht. Die auf dem Array immobilisierten Nukleinsäuresequenzen weisen eine Länge von 60 Basen auf, was die Spezifität der Hybridisierungsreaktion im Vergleich zu Arrays mit kürzeren Bindungsstellen erhöht. Die Reliabilität wird aufgrund der geringen Differenz zwischen Array- und PCR-Untersuchungen hoch eingeschätzt und die Reproduzierbarkeit ergibt sich aus der geringen Abweichung von verschiedenen Array-Untersuchungen der gleichen Probe¹⁰⁴.

Jedes Gen ist auf dem Array an vier quadratisch angeordneten Punkten immobilisiert. Daher wurden die Arrays vor der computergestützten Auswertung zunächst optisch beurteilt und nur Gene in die weitere Analyse mit einbezogen, für die so eine eindeutige Hybridisierung aller vier Punkte nachgewiesen werden konnte.

Es wurde jeweils RNA aus verschiedenen Lungen vor der cDNA Synthese gepoolt, um Fehler aufgrund zufälliger starker Abweichungen bei einem einzelnen Tier zu vermeiden und gleichzeitig den Verbrauch an Arrays gering zu halten.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Ineffizienz der Metastasierung

4.2.1.1. Überleben der Tumorzellen: P-mel 17

Pmel-17 ist ein Melanozyten spezifisches Gen und ist bei der Maus auf Chromosom 10 in einer Region lokalisiert, die als silver locus bezeichnet wird¹⁰⁵. Mutationen in diesem Bereich führen zu einem progressiven Ergrauen des Fells aufgrund des Verlusts funktionsfähiger folliculärer Melanozyten. Das Genprodukt wird als P-mel 17 Protein oder auch gp100 bezeichnet und ist am Aufbau der Melanosomen beteiligt¹⁰⁶. P-mel 17 kann als Marker-Gen für Melanozyten eingesetzt werden und wird auch klinisch zur Detektion von Mikrometastasen in regionären Lymphknoten¹⁰⁷ oder von zirkulierenden Tumorzellen¹⁰⁸ bei Melanompatienten eingesetzt.

Die Expression von P-mel 17 in den Untersuchungen dieser Arbeit zeigt, dass die Anzahl der Tumorzellen in den Lungen nach der Injektion zunächst stark abfällt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Studien, die die Ineffizienz der Metastasierung betonen und diese vor allem mit den späten Schritten der Metastasierung wie z.B. dem Überleben im Zielorgan in Verbindung bringen³. Das initial - zwei Stunden nach der Injektion - noch hohe P-mel 17 Signal in den Lungen lässt vermuten, dass eine Vielzahl der injizierten Zellen in der Lunge verbleibt - es also entweder zur Adhärenz am Endothel der Lungenstrombahn oder zum Arrest in Lungenkapillaren aufgrund der Größendifferenz kommt.

In einem Experiment, das die pulmonale Metastasierung intravenös injizierter Melanomzellen anhand histologischer Untersuchungen quantifiziert, zeigte sich, dass das Auftreten kleiner Metastasen und damit der Beginn der Proliferation frühestens am Tag 4 beobachtet werden konnte³⁶. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen ähnliche Rückschlüsse zu. Die Expression von P-mel 17 nimmt bis einschließlich Tag 2 ab und steigt erst am Tag 4 wieder an. Das bedeutet, dass in der frühen Phase der Verlust von Tumorzellen im Vordergrund steht, während ab Tag 4 die Proliferation der Melanomzellen den Verlust überwiegt. Die minimale Tumormast in den Lungen wird demnach zwischen den Tagen 2 und 4 erreicht.

4.2.1.2. Apoptose in metastasenträgenden Lungen

Durch die Untersuchung des Melanozytenmarkergens P-mel 17 konnte gezeigt werden, dass die Tumormast in den Lungen nach der Injektion zunächst absinkt. Eine mögliche Ursache für den Verlust von Tumorzellen könnte der apoptotische Zelltod sein. Um dies zu untersuchen wurde die Expression apoptoserelevanter Gene in den Lungen der Versuchstiere mithilfe eines c-DNA Array analysiert.

4.2.1.2.1. TNF-Ligand Familie

Mitglieder der TNF-Ligand Familie, deren Expression im c-DNA Array nachgewiesen werden konnte, sind APRIL, Lymphotoxin- α (LT- α) und TRAIL.

APRIL besitzt proliferationsfördernde Effekte für eine Vielzahl von Tumorzellen und kann die Apoptose inhibieren¹⁰⁹. In B-Zellen in non-Hodgkin-Lymphomen konnte z.B. gezeigt werden, dass APRIL die Expression der anti-apoptotischen Gene BCL2 und BCL-X hochreguliert, und die des pro-apoptotischen Gens BAX herunterreguliert¹¹⁰. Die Expression von APRIL erreicht in den Experimenten dieser Arbeit ein Maximum am Tag 3, was auf eine Aktivierung anti-apoptotischer Mechanismen zu diesem Zeitpunkt schließen lassen kann. Interessanterweise findet sich in dieser Arbeit auch nur zu diesem Zeitpunkt eine Expression von BCL-X, was die Möglichkeit der Regulation von BCL-X durch APRIL bestätigen könnte. LT- α spielt eine wichtige Rolle für die gegen Tumore gerichtete Immunabwehr. So entwickeln z.B. LT- α defiziente Tiere deutlich mehr experimentelle pulmonale Metastasen nach der Injektion von Melanomzellen¹¹¹, und der Erfolg eines adoptiven T-Zell Transfers zur Behandlung von Lungenmetastasen ist abhängig von der LT- α Expression in den Effektorzellen¹¹². In dieser Arbeit fällt die Expression von LT- α jedoch zunächst ab und kann am Tag 2 nicht mehr nachgewiesen werden. Da zu diesem Zeitpunkt allerdings bereits ein deutlicher Verlust von Tumorzellen aufgrund des P-mel 17 Expressionsverlaufs vermutet werden muss, scheint LT- α keine entscheidende Funktion für die Elimination der Melanomzellen in den Experimenten dieser Arbeit zu besitzen.

TRAIL ist ein potenter Induktor der Apoptose und vermittelt diese Funktion über die Rezeptoren DR4 und DR5 (death receptor 4 bzw. 5)¹¹³. Vor allem maligne Zellen sind gegenüber der Apoptoseinduktion durch TRAIL empfindlich, während gesundes Gewebe häufig nicht auf eine TRAIL-Stimulation reagiert. Dies macht TRAIL zu einem vielversprechenden Ansatzpunkt für die Tumorthherapie. In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass rekombinantes TRAIL oder agonistische Antikörper gegen TRAIL-Rezeptoren in sehr vielen Tumorzellen Apoptose induzieren und die Tumormast inhibieren können¹¹⁴. Die Expression von TRAIL konnte in dieser Arbeit nur am Tag 2 nachgewiesen werden, sodass die Aktivierung der Apoptose durch TRAIL zu diesem Zeitpunkt eine Rolle spielen könnte. Gleichzeitig konnte allerdings während des gesamten untersuchten Zeitraumes keine Expression des TRAIL-Rezeptors gefunden werden, was gegen eine entscheidende Bedeutung der TRAIL-induzierten Apoptose für den Tumorzellverlust in den Experimenten dieser Arbeit spricht. Eine Herunterregulation oder

Mutation des TRAIL-Rezeptors und damit einhergehende Unempfindlichkeit gegenüber TRAIL ist bei Mammakarzinomen und Melanomen mit Tumorprogression und Metastasierung assoziiert^{115;116}.

4.2.1.2.2. TNF-Rezeptor Familie

In den Array-Untersuchungen zur Apoptose konnte die Expression von 6 Mitgliedern der TNF-Rezeptor Familie nachgewiesen werden: Lymphotoxin- β -Rezeptor (LT- β R), TNF-Rezeptor 2 (Tnfrsf 1b), Tnfrsf 9, RANK (TRANCE-Rezeptor, Tnfrsf 11a), Death-receptor 3 (DR-3, Tnfrsf 12) und Death-receptor 6 (DR-6, Tnfrsf 21).

LT- β R besitzt unterschiedliche Einflüsse auf die Regulation der Apoptose. So kann z.B. in syngenem und xenogenem Modellen zur Untersuchung des Kolonkarzioms die Therapie mit einem agonistischen Antikörper gegen LT- β R das Tumorwachstum hemmen¹¹⁷. Bei Melanomen hingegen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von LT- β R zur Aktivierung von NF- κ B und gesteigertem Wachstum führt, während die Inhibition von LT- β R mittels shRNA eine Abnahme von Wachstum und Invasivität zur Folge hat¹¹⁸. LT- β R spielt aber auch eine Rolle in der gegen den Tumor gerichteten Immunabwehr. So können z.B. tumorspezifische T-Zellen Melanomzellen über den LT- β R zur Sekretion von Chemokinen stimulieren, die dann ihrerseits Tumor-infiltrierende Makrophagen anlocken¹¹⁹. Die Expression von LT- β R in den Experimenten dieser Arbeit weist ein Maximum am Tag 2 auf. Die ambivalente Funktion dieses Rezeptors erschwert jedoch eine funktionelle Beurteilung dieses Ergebnisses. Das Expressionsmaximum am Tag 2 - einem Zeitpunkt, zu dem der Zellverlust in den Lungen die Proliferation überwiegt - lässt jedoch eher proapoptische Effekte in dem dieser Arbeit zugrundeliegenden Modell vermuten.

TNFR 2 hat wie LT- β R sowohl pro- als auch antiapoptische Funktionen. Die Bindung von TNF kann sowohl Signalwege, die das Überleben fördern, als auch solche, die die Apoptose induzieren, aktivieren. Der letztendlich erreichte biologische Effekt hängt von einem komplizierten Zusammenspiel mehrerer Adapter- und Regulator-Proteine ab¹²⁰. In einem Modell zur Tumorentstehung in der Haut konnte z.B. auch ein tumorfördernder Effekt beobachtet werden. TNFR 2 defiziente Tiere entwickeln in diesem Modell weniger Tumore¹²¹. Über den gesamten beobachteten Zeitraum in dieser Arbeit konnte ein diskontinuierlicher Anstieg der TNFR 2 Expression ermittelt werden, was ein Hinweis auf anti-apoptische Funktionen in diesem Modell sein könnte, da zu dem späten Zeitpunkt, an dem die TNFR 2 Expression ihr Maximum erreicht, die Proliferation den Tumorzellverlust bereits wieder überwiegt.

Tnfrsf 9 ist identisch mit 4-1BB und hat vor allem eine wichtige Funktion als kostimulatorisches Molekül in der gegen Tumore gerichteten Immunantwort. Die Stimulation mit agonistischen Antikörpern gegen 4-1BB führt in einem B16 Melanommodell zur Zunahme der Anzahl tumorinfiltrierender Leukozyten¹²². Als kostimulatorisches Molekül in der Tumormimmuntherapie eingesetzt kann 4-1BB deren Effektivität steigern¹²³. Die Expression von Tnfrsf 9/4-1BB nimmt über den Zeitraum des Experiments kontinuierlich ab, was mit einer Abnahme der gegen den Tumor gerichteten Immunabwehr bei gleichzeitiger erfolgreicher Initiation der Proliferation von Melanomzellen korrelieren könnte.

RANK besitzt in der Tumorbiologie vor allem in der ossären Metastasierung eine entscheidende Bedeutung, weil durch Aktivierung von RANK durch RANK Ligand die Entwicklung von Osteoklastenvorläuferzellen zu reifen Osteoklasten stimuliert werden kann¹²⁴. In dendritischen Zellen kann RANK ein anti-apoptisches Signal vermitteln⁷¹. Eine die Tumorprogression und Metastasierung fördernde Wirkung konnte in Prostatakarzinomzellen gezeigt werden. In diesen Zellen führt die Ligandenbindung an RANK zu einer Aktivierung von I κ B Kinase α (IKK α). Dadurch kommt es zur Inhibition der Expression von Maspin, einem Metastasierungs-Suppressor Gen¹²⁵. Die Expression von

RANK zeigt in den Experimenten dieser Arbeit einen stark schwankenden Verlauf mit sehr niedriger bzw. nicht nachweisbarer Expression an den Tagen 1 und 3 und moderater Expression zu den übrigen Zeitpunkten. Rückschlüsse auf eine Bedeutung von RANK für die Metastasierung in diesem Experiment erscheinen daher schwierig.

DR-3 und DR-6 sind beide in der Lage über ihre intrazelluläre death-domain die Apoptose zu induzieren^{73;74}. Der Expressionsverlauf von DR-6 weist ein deutliches Maximum am Tag 2 auf. Das DR-6 vermittelte Signal könnte somit zu dem zu diesem Zeitpunkt angenommenen Verlust von Melanomzellen in den Lungen beitragen. Im Gegensatz hierzu konnte die Expression von DR-3 nur in den Lungen vor der Tumorzellinjektion und am Tag 4 nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang erscheint interessant, dass für DR-3 auch die Tumorprogression begünstigende Funktionen gezeigt wurden. DR-3 auf Kolonkarzinomzellen kann als Rezeptor für endotheliales E-Selektin fungieren und so im Rahmen der Metastasierung die Adhärenz, transendotheliale Migration und das Überleben der Tumorzellen fördern¹²⁶.

4.2.1.2.3. TRAF-Familie

Die durch die TNF-Rezeptor-Familie vermittelten intrazellulären Signale werden durch zytoplasmatische Adapter-Proteine reguliert, zu denen die Familie der TRAF-Proteine (TNF receptor-associated factors) zählt¹²⁷. Mitglieder der TRAF-Familie, deren Expression in den Arrayuntersuchungen belegt werden konnte, sind TRAF 1 (TNF receptor associated factor 1) und TRIP (TRAF-interacting protein, Traip).

Für TRAF 1 konnten sowohl pro- als auch anti-apoptotische Wirkungen beobachtet werden. Eine Erklärung hierfür gibt der Umstand, dass TRAF 1 ein Substrat der Caspasen ist und in ungespaltener Form anti-apoptotische Effekte besitzt, während das durch Caspasenaktivität abgespaltene C-terminale Fragment eine pro-apoptotische Funktion einnimmt⁷⁵. In dieser Arbeit konnte die Expression von TRAF 1 nur am Tag 4 nachgewiesen werden. Das erstmalige Auftreten der Expression zu einem Zeitpunkt, zu dem bereits eine überwiegende Proliferation der Melanomzellen in den Lungen wahrscheinlich ist, lässt eine anti-apoptotische Funktion vermuten. In Lymphomzellen konnte gezeigt werden, dass die durch p80HT, einer mutierten Form von NF- κ B, induzierte Apoptoseresistenz von der TRAF 1-Expression in diesen Zellen abhängig ist¹²⁸.

TRAF 2 kann durch Aktivierung von NF- κ B anti-apoptotische Wirkungen erzielen. TRIP inhibiert diesen Mechanismus⁷⁶ und kann so TNF-Rezeptor vermittelte Signale zugunsten der Apoptose modulieren. In dieser Arbeit weist der Expressionsverlauf von TRIP ein Maximum am Tag 3 auf, was ein Hinweis auf pro-apoptotische Effekte der Stimulation von Rezeptoren der TNF-R Familie zu diesem Zeitpunkt sein könnte.

4.2.1.2.4. Death-Domain und Death-Effector-Domain Familie: FADD

Ebenfalls für pro-apoptotische Regulationsmechanismen zu diesem Zeitpunkt spricht das Expressionsmaximum des Proteins FADD (Fas-associated death domain protein) am Tag 3. FADD besitzt eine death-domain (DD) und eine death-effector-domain (DED). Über diese Proteinsequenzen kann FADD mit der zytoplasmatischen DD von Todesrezeptoren und der DED von Caspase 8 interagieren¹²⁹. Durch Aktivierung von Caspase 8 kommt es zur Aktivierung einer Reihe weiterer Caspasen und letztendlich zur Apoptose. Der Komplex aus Todesrezeptor, Ligand, FADD, und Caspase wird als DISC (death-inducing signalling complex) bezeichnet⁴².

4.2.1.2.5. BCL-2 Familie

Neben der extrinsischen Aktivierung durch Todesrezeptoren der TNF-R Familie kann die Apoptose auch durch einen intrinsischen Weg induziert werden. Dieser Aktivierungsweg kann durch eine große Zahl verschiedener Initialschädigungen in Gang gebracht werden; hierzu zählen DNA-Schädigung, der Entzug von Wachstumsfaktoren, die Aktivierung von Onkogenen, die Störung intrazellulärer Signalwege oder die Zerstörung von Mikrotubuli. Ausschlaggebend für die Aktivierung des intrinsischen Weges ist die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran. Kontrolliert wird dieser Vorgang durch die Familie der BCL-2 Proteine.

In dieser Arbeit konnte die Expression von 6 Genen der BCL-2 Familie nachgewiesen werden. BAK, BAX und BOK weisen mit BCL-2 je drei homologe Sequenzen auf und fördern die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und damit die Apoptose. BIK besitzt ebenfalls pro-apoptotische Funktionen und zählt zu einer Gruppe von Proteinen, die nur in einer Region (BH3, bcl homology 3) Homologie zu BCL-2 besitzen, und deshalb als BH3-only Proteine bezeichnet werden. BCL-X und MCL-1 besitzen homologe Sequenzen zu BCL-2 in vier α -helicalen Bereichen und haben wie BCL-2 anti-apoptotische Funktion⁴⁰. Die Expression von BAK erreicht am Tag 3 nach vorherigem Absinken den höchsten Wert im Verlauf nach der Injektion der Melanomzellen. Dies könnte für eine Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalwegs zu diesem Zeitpunkt sprechen. Am Tag 4 findet sich jedoch ein starker Rückgang der BAK-Expression, der möglicherweise mit der dann bereits initiierten Proliferation der Metastasen korrelieren kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation von BAK und BAX bei Melanompatienten mit einer schlechten Prognose assoziiert ist¹³⁰.

Auch die Expression von BAX fällt am Tag 4 ab, wobei hier das Absinken bereits am Tag 3 beginnt und deutlich weniger stark ausgeprägt ist. An den Tagen 1 und 2 findet sich ein ebenfalls nur sehr diskreter Anstieg der Expression gegenüber dem Ausgangswert in der Lunge. Dies könnte mit dem initialen Tumorzellverlust in Verbindung stehen. In unterschiedlichen Tumorzellen konnte bereits eine wichtige Funktion von BAX für die Apoptoseinduktion und die Hemmung der Tumorprogression gezeigt werden. So wird z.B. eine erhöhte Apoptoseempfindlichkeit in Mamma- und Prostatakarzinomzellen durch endogene Expression von Maspin und der daraus resultierenden Hochregulation von BAX erreicht¹³¹. Die Apoptoseinduktion in Zervixkarzinomzellen mittels Wasserstoffperoxid führt ebenfalls zur Hochregulation von BAX¹³². Im Rahmen der Progression der Metastasierung in dem Modell dieser Arbeit erscheint auch der Rückgang der BAX-Expression an den Tagen 3 und 4 erklärbar. In einem transgenen Hirntumormodell konnte gezeigt werden, dass das Tumorwachstum in BAX defizienten Tieren stark beschleunigt ist¹³³.

Das BH3-only Protein BIK kann mit anti-apoptotischen Proteinen der BCL-2 Familie interagieren und so deren Funktion inhibieren. In einem Mammakarzinommodell konnte eine systemische Gentherapie mit BIK-Plasmiden in kationischen Liposomen das Tumorwachstum und die Metastasierung hemmen¹³⁴. In den Experimenten dieser Arbeit fand sich eine stark schwankende Expression von BIK, sodass Rückschlüsse auf eine Bedeutung von BIK im Verlauf der Metastasierung in diesem Modell schwierig erscheinen.

Für BOK konnte eine essentielle Bedeutung in der durch DNA-Schädigung ausgelösten und durch p53 vermittelten Apoptose nachgewiesen werden¹³⁵. Der Expressionsverlauf von BOK ist dem von BAK sehr ähnlich. Somit könnte hier ebenfalls die hohe Expression am Tag 3 mit dem Verlust an Tumorzellen durch Aktivierung des intrinsischen Signalwegs und das Absinken der Expression am Tag 4 mit der Initiierung der Proliferation und gleichzeitiger Reduktion der Apoptose in den Metastasen korrelieren.

Die anti-apoptotischen Proteine der BCL-2 Familie können BAK und BAX besonders in ihrer aktivierten Form binden und so deren Einbau in die Mitochondrienmembran und die damit

verbundene Permeabilisierung verhindern. In dieser Arbeit konnte die Expression der anti-apoptotischen BCL-2 Proteine BCL-X und MCL-1 nachgewiesen werden. Für beide Gene ergab sich im Verlauf der Metastasierung ein Expressionsmaximum bei ansonsten nicht nachweisbarer (BCL-X) oder vergleichsweise sehr niedriger (MCL-1) Expression. Das Expressionsmaximum von BCL-X befindet sich am Tag 3 dasjenige von MCL-1 am Tag 2. Dies spricht für eine Inhibition des intrinsischen Apoptosesignalwegs zu den genannten Zeitpunkten und damit eine mögliche Förderung des Metastasenwachstums. Bei Brustkrebszellen z.B. kann die Expression von BCL-X das Metastasierungspotential erhöhen¹³⁶. Verwunderlich ist dann allerdings der starke Rückgang der Expression beider Gene am Tag 4 vor allem auch vor dem Hintergrund, dass eine Assoziation zwischen der gesteigerten Expression von BCL-X und MCL-1 und der Progression des Melanoms gezeigt werden konnte¹³⁷.

4.2.1.2.6. Caspase 9

Die durch BAX und BAK induzierte Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran führt zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem intermembranären Raum der Mitochondrien. Cytochrom c bildet im Zytosol einen Komplex mit APAF1 (apoptotic protease activating factor 1), ATP und der inaktiven Initiatorcaspase Procaspase-9, der als Apoptosom bezeichnet wird. In diesem Komplex wird Procaspase-9 aktiviert⁴². Caspase 9 ist die Initiatorcaspase des intrinsischen Aktivierungswegs der Apoptose. Ihre Aktivierung im Apoptosom führt zur Aktivierung einer Reihe nachgeschalteter Caspasen und letztendlich zur Apoptose.

Die Expression von Caspase 9 nimmt nach einem leichten Anstieg am Tag 1 im weiteren Verlauf des Experiments kontinuierlich ab und erreicht ihr Minimum am Tag 4. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalwegs in den Lungen im Verlauf der Metastasierung herunterreguliert wird.

4.2.1.2.7. IAP-Familie

IAP's (inhibitor of apoptosis proteins) können durch die Hemmung der Caspasen regulativ in die Apoptose eingreifen. NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein) vermittelt seine anti-apoptotische Wirkung aber auch durch Aktivierung der MAP-Kinase JNK1⁸¹. Von den 6 murinen Homologen, die zu humanem NAIP entdeckt wurden, konnte in dieser Arbeit die Expression der beiden Gene NAIP 1 und NAIP 5 nachgewiesen werden. Beide Expressionsverläufe weisen ein Maximum am Tag 3 auf. Die Hochregulation anti-apoptotischer Gene zu diesem Zeitpunkt könnte die Metastasierung der B16 Zellen begünstigen und dazu beitragen, dass ab Tag 4 die Proliferation der Metastasen den Tumorzellverlust überwiegt. Hinweise für die Bedeutung von NAIP in der Tumorbologie konnten bereits gezeigt werden. In Mammakarzinomen mit ungünstigen Prognosemarkern wie z.B. hoher Tumorgöße oder wenig differenziertem histologischem Grading konnte eine deutlich höhere NAIP-Expression als in Tumoren mit günstigeren prognostischen Parametern gefunden werden¹³⁸. Auch für Ösophaguskarzinome wurde eine Tendenz zur höheren Expression von NAIP in den Tumoren als in der umgebenden Mucosa entdeckt¹³⁹.

4.2.1.2.8. CARD-Familie: Nop 30-like

Nop 30-like (nucleolar protein of 30 kDa) wird auch als ARC (apoptosis repressor with CARD) bezeichnet und vermittelt seine anti-apoptotische Funktion durch Inhibition der Caspasen 2 und 8⁷⁸ sowie durch Interaktion mit BAX¹⁴⁰. Der Expressionsverlauf von Nop 30-like in dieser Arbeit zeigt ein starkes Absinken der Expression am Tag 2 unter die Nachweisgrenze. Die verminderte Expression dieses anti-apoptotischen Gens könnte zum

Tumorzellverlust in den Lungen beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass der zelluläre Gehalt an Nop 30-like Protein als Reaktion auf apoptotische Stimuli herunterreguliert wird. Als Mechanismus dieser Regulation wurde allerdings nicht eine Verminderung der Transkription sondern eine gesteigerte Degradation des Proteins in Proteasomen gefunden¹⁴¹.

4.2.1.2.9. p53 und Atm Signalweg

p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression vieler Gene, die an DNA-Reparaturmechanismen, der Steuerung des Zellzyklus und der Kontrolle der Apoptose beteiligt sind, aktiviert. Die Bedeutung des p53 Signalwegs für die Tumorbiologie wird durch die extreme Häufigkeit von Mutationen oder Verlust dieses Gens in den verschiedensten Tumoren offensichtlich³⁹. In den Arrayuntersuchungen konnte die Expression dreier Gene des p53 Signalwegs nachgewiesen werden: Atm (ataxia teleangiectasia mutated), Mdm2 und Gadd45a (growth arrest and DNA damage induced-45).

Eine Mutation im Atm-Gen ist die Ursache einer autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung, die durch eine progressive zerebelläre Ataxie und okulokutane Teleangiektasien gekennzeichnet ist. Darüber hinaus weisen die Patienten eine deutlich erhöhte Inzidenz von Tumoren vor allem von Lymphomen auf¹⁴². Atm aktiviert und stabilisiert p53 als Reaktion auf DNA-Schädigungen und trägt so zur gesteigerten Transkription von Genen bei, deren Expression unter der Kontrolle von p53 steht. Auf die Apoptose ergibt sich hierdurch eine förderliche Funktion⁸⁴. In dieser Arbeit zeigt sich ein langsames Absinken der Atm-Expression an den Tagen 1 und 2 nach anfänglich hoher Expression in den Lungen und ein erneuter starker Rückgang am Tag 4 nach einem leichten Expressionanstieg an Tag 3. Die Atm-Expression in den Lungen nimmt also im Verlauf der fortschreitenden Metastasierung deutlich ab, was an eine Bedeutung des Verlusts seiner pro-apoptotischen Funktion für die Proliferation der Melanomzellen denken lässt. Eine reduzierte Expression von Atm konnte bereits für andere Tumore nachgewiesen werden. So war z.B. bei einer vergleichenden Untersuchung in verschiedenen Stadien der Mammakarzinomentstehung in gesundem Brustgewebe die Atm-Expression am höchsten und in den Karzinomen am niedrigsten¹⁴³. Auch in Pankreaskarzinomen fand sich eine deutlich niedrigere Expressionsrate von Atm als in angrenzendem gesunden Gewebe¹⁴⁴.

Mdm2 markiert als Ubiquitin-Ligase das p53 Protein für die Degradation in Proteasomen, ein Mechanismus, der wesentlich zur kurzen Halbwertszeit von p53 beiträgt⁸³. Aus dieser Inhibition lässt sich eine anti-apoptotische Funktion von Mdm2 ableiten. In dieser Arbeit weist die Expression von Mdm2 ein deutliches Maximum am Tag 2 auf, was ein Hinweis auf die Aktivierung anti-apoptotischer Regulationsmechanismen in den Lungen zu diesem Zeitpunkt sein könnte. Für das Metastasenwachstum fördernde Funktionen spricht auch, dass die Expression von Mdm2 nach einem deutlichen Rückgang am Tag 3 am Tag 4 wieder zu steigen beginnt. Interessanterweise findet sich parallel zum Expressionsmaximum am Tag 2 das Expressionsminimum des Nop30-like (ARC) Gens. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge an Nop30-like Protein durch Mdm2 vermindert werden kann. Dies erfolgt allerdings nicht auf Ebene der Genexpression sondern aufgrund der Ubiquitinierung von Nop30-like durch Mdm2¹⁴⁵. Atm ist in der Lage Mdm2 zu phosphorylieren, was zu einer verminderten Stabilität und Aktivität des Proteins führt⁸⁴. In diesem Zusammenhang fällt auf, dass dem Expressionsmaximum von Mdm2 am Tag 2 ein Rückgang der Expression von Atm zu diesem Zeitpunkt gegenübersteht.

Gadd45a kann durch Interaktion mit Regulatoren des Zellzyklus die Zellteilung hemmen und durch Aktivierung anti-proliferativer MAP-Kinasen die Apoptose fördern⁸⁵. In Einklang mit dieser pro-apoptotischen Funktion konnte gezeigt werden, dass eine Steigerung der Gadd45a-Expression mithilfe eines adenoviralen Vektors in Pankreaskarzinomzellen Apoptose induzieren kann und zum Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase führt¹⁴⁶. Im Widerspruch hierzu

stehen allerdings Studien, deren Ergebnisse einen tumorförderlichen Effekt der Expression von Gadd45a vermuten lassen. In Mausmodellen zu Prostata- und Plexus-choroideus-Karzinomen wurde gezeigt, dass Gadd45a defiziente Tiere nach Bestrahlung in den Tumoren eine höhere Apoptoserate aufweisen und die Gadd45a Defizienz zu einem verlängerten Überleben beiträgt¹⁴⁷. Bei Patienten mit Magenkarzinomen ist die Expression von Gadd45a ein prädikativer Faktor für das Nichtansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie und für eine kürzere Überlebenszeit¹⁴⁸. In den Experimenten dieser Arbeit fand sich ein Ansteigen der Gadd45a-Expression am Tag 4, nachdem diese zuvor zu keinem Zeitpunkt nach der Injektion der Melanomzellen nachweisbar war. Da am Tag 4 bereits von einer überwiegenden Proliferation und verminderten Apoptose in den Lungenmetastasen ausgegangen werden kann, spricht dies für anti-apoptotische Funktionen von Gadd45a in dem dieser Arbeit zugrundeliegenden Modell.

4.2.1.2.10. Überblick zur Apoptose

Um einen zusammenfassenden Überblick über die Ergebnisse der Array-Untersuchungen zu erhalten, erscheint es zunächst sinnvoll die exprimierten Gene nach ihrer Funktion im Rahmen des programmierten Zelltodes in pro-apoptotische und anti-apoptotische Gene zu unterteilen. Für eine Reihe der exprimierten Gene ist diese Einteilung allerdings nicht möglich. Dies gilt vor allem für Mitglieder der TNF-R Familie, deren Signaltransduktion durch ein kompliziertes Netzwerk von Adapter und Regulator-Proteinen beeinflusst wird und somit sowohl pro- als auch anti-apoptotische Effekte nach sich ziehen kann. Auch für TRAF 1 und Gadd45a liegen Hinweise auf eine mögliche Funktion in beide Richtungen vor. Eine Einteilung der Gene ist in Tabelle 4.1. wiedergegeben.

Tabelle 4.1.: Einteilung der Gene auf dem Array

Gene mit pro-apoptotischer Funktion	Gene mit anti-apoptotischer Funktion	Gene ohne eindeutige Zuordnung
LT- α	APRIL	LT- β Rezeptor
TRAIL (Tnfsf 10)	BCL-X (BCL 2-like)	TNFR 2 (Tnfrsf 1b)
DR-6 (Tnfrsf 21)	MCL-1	Tnfrsf 9
TRIP (Traip)	NAIP 1 (Birc 1a)	RANK (Tnfrsf 11a)
FADD	NAIP 5 (Birc 1e)	DR-3 (Tnfrsf 12)
BAK	Nop 30-like (ARC)	TRAF 1
BAX	Mdm 2	Gadd 45 a
BOK (Bokl-pending)		
BIK		
Caspase 9		
Atm		

In Abbildung 4.2. ist ein Überblick über die Expression der eindeutig pro- bzw. anti-apoptotischen Gene dargestellt. Es fällt auf, dass zu allen Zeitpunkten die Expression pro-apoptotischer Gene überwiegt sowohl im Bezug auf das Expressionsniveau als auch auf die Anzahl der exprimierten Gene. Summiert man das Expressionsniveau pro- bzw. anti-apoptotischer Gene oder die Anzahl der exprimierten Gene zu den untersuchten Zeitpunkten ergibt sich die in Abbildung 4.3. wiedergegebene Zusammenfassung. Hierbei zeigt sich, dass die Differenz zwischen der Expression pro- und anti-apoptotischer Gene am Tag 1 am größten ist und im weiteren Verlauf abnimmt. Dies gilt sowohl für die Summe des Expressionsniveaus als auch für die Anzahl der Gene, die exprimiert werden, wobei für letzteres Kriterium wieder ein leichter Anstieg der Differenz am Tag 4 zu beobachten ist. Im Gesamtüberblick ist also davon auszugehen, dass die Expression apoptoserelevanter Gene in den Lungen nach der

Injektion der Melanomzellen am ehesten am Tag 1 zugunsten der Apoptose reguliert wird. Dieser Tag ist auch der einzige Zeitpunkt, zu dem sich eine höhere Differenz zwischen den pro- und anti-apoptotischen Genen findet als dies zu Beginn in der Lunge der Fall ist. Im Vergleich zu den Ausgangsverhältnissen in der Lunge vor der Tumorzellinjektion kann also nur am Tag 1 von einer Steigerung der Aktivierung apoptotischer Mechanismen auf Grundlage der Gentranskription geschlossen werden.

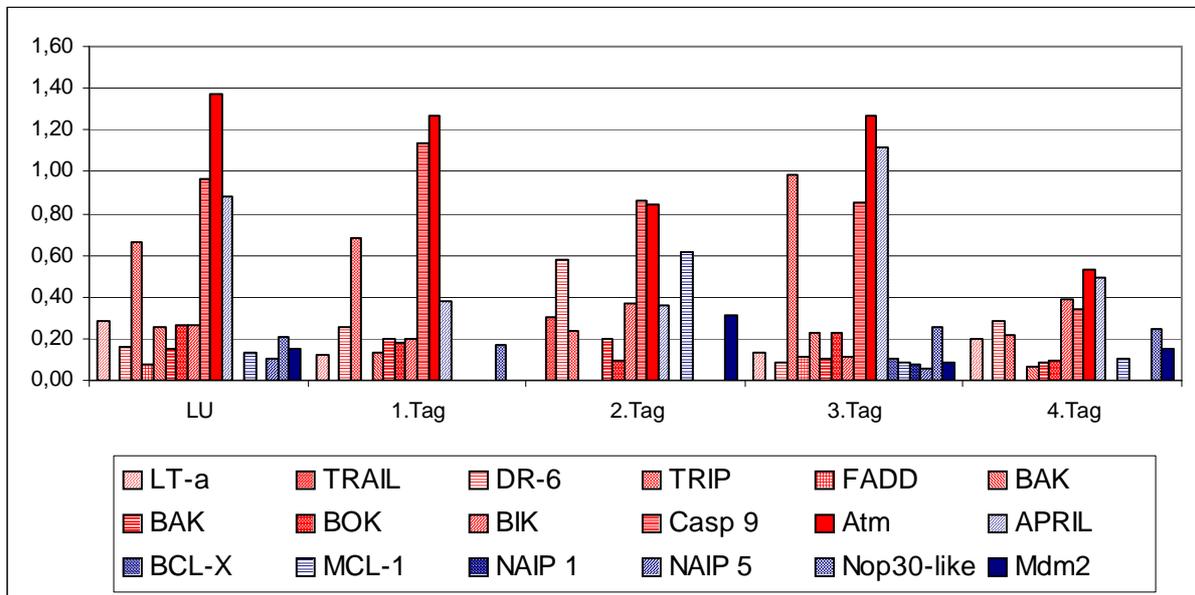


Abbildung 4.2.: Übersicht über die Expression der eindeutig pro- bzw. anti- apoptotischen Gene: i.v. Injektion von 2×10^5 B16/D5 Melanomzellen; Entnahme der Lungen zu den angegebenen Zeitpunkten; Expressionsanalyse apoptoserelevanter Gene mit c-DNA Array; angegeben ist der Quotient aus der gemessenen Lichtintensität (optical density OD) des jeweiligen Gens und Gapdh. Proapoptotische Gene sind rot antiapoptotische blau dargestellt.

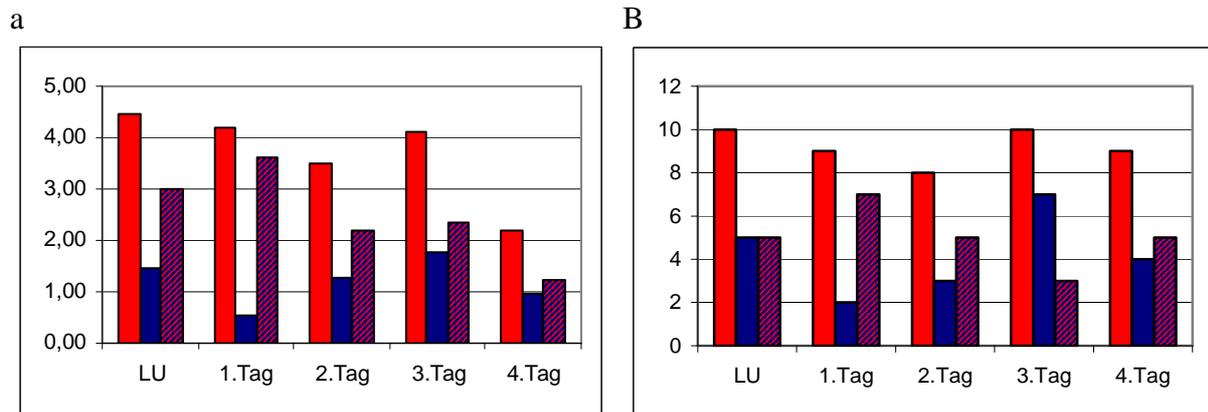


Abbildung 4.3.: Zusammenfassung der Expression der eindeutig pro-bzw. anti- apoptotischen Gene: proapoptotische Gene sind rot antiapoptotische blau die Differenz zwischen beiden schraffiert dargestellt. a: Summe der OD-Quotienten der einzelnen Gene; b: Anzahl exprimierter unterschiedlicher Gene

Am Tag 3 fällt auf, dass die Expression beider Gengruppen sowohl im Hinblick auf das Expressionsniveau als auch auf die Anzahl der Gene zunimmt. Letzteres ist in der Gruppe der anti-apoptotischen Gene besonders deutlich ausgeprägt und liegt darin begründet, dass ein Großteil der exprimierten anti-apoptotischen Gene (APRIL, BCL-X, NAIP 1 und 5, Nop30-like) zu diesem Zeitpunkt sein Expressionsmaximum erreicht. Aufgrund der gleichzeitigen Hochregulation pro-apoptotischer Gene ergibt sich allerdings die Differenz der

Expressionsniveaus betreffend keine deutliche Veränderung im Vergleich zu Tag 2. Man könnte zu diesem Zeitpunkt also eine Apoptoseinduktion aufgrund gesteigerter Expression pro-apoptotischer Gene in den Lungen vermuten, die durch die vermehrte Transkription anti-apoptotischer Gene eine Gegenregulation erfährt.

Auf der Ebene der Transkription findet sich im Gesamtüberblick nur am Tag 1 ein Hinweis auf eine gesteigerte Aktivierung der Apoptose. Der Expressionsverlauf von P-mel 17 legt jedoch nahe, dass bis einschließlich Tag 2 der Tumorzellverlust in den Lungen die Proliferation überwiegt. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu beachten, dass die Regulation der Genexpression nur ein Mechanismus unter vielen ist, der zur Aktivierung der Apoptose beiträgt. So haben z.B. auch der Aktivierungszustand verschiedener Proteine, der durch Interaktion mit anderen Proteinen beeinflusst wird, oder die Elimination von Proteinen durch Degradation in Proteasomen einen bedeutenden Einfluss auf die Apoptose - beides Regulationsmechanismen, die aufgrund der Genexpressionsanalysen nicht beurteilt werden können.

Die Ursache der morphologischen Veränderungen, die den apoptotischen Zelltod charakterisieren, ist die enzymatische Aktivität der Caspasen. Ihre Funktion nimmt deshalb in der Ausführung der Apoptose eine zentrale Bedeutung ein⁴³. In den Arrayuntersuchungen konnte nur die Expression von Caspase 9, die als Initiator-Caspase die Aktivierung nachgeschalteter Caspasen initiiert, nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass für keine der anderen Caspasen eine Expression fand und nur am Tag 1 eine Gesamttendenz in Richtung gesteigerter Apoptose abgeleitet werden kann, lässt vermuten, dass neben dem apoptotischen Zelltod auch andere Mechanismen wie z.B. eine nekrotische Schädigung zu dem initialen Tumorzellverlust in den Lungen beitragen.

4.2.1.3. Immunantwort: Fas, FasL und TRANCE

Die Interaktion von Fas-Ligand (FasL) auf der Zelloberfläche von Zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL's) und natürlichen Killer-Zellen (NK's) mit Fas auf Tumorzellen ist ein wichtiger Mechanismus der gegen Tumore gerichteten Immunabwehr. Auf diesem Weg können CTL's und NK's in den Tumorzellen Apoptose auslösen und so zur Elimination maligner Zellen beitragen²⁵. Umgekehrt können aber auch Tumorzellen FasL exprimieren und so Fas exprimierende CTL's in die Apoptose treiben^{29;149}. Ein weiterer Schutzmechanismus von Tumoren gegen ihre FasL abhängige Elimination ist die Expression und Sezernierung von nicht membrangebundenem löslichen Fas, das dann als Abfangrezeptor für FasL fungiert⁴². Hohe Serum-Spiegel solcher löslicher Fas-Rezeptoren sind bei Melanompatienten mit einer schlechten Prognose assoziiert¹⁵⁰.

Die Fas/FasL Interaktion hat auch einen bedeutenden Einfluss auf die Metastasierung. So bilden z.B. Fas-positive K1735 Melanomzellen nach subkutaner Injektion zwar lokale Tumore können aber keine oder nur sehr wenige Metastasen bilden. In FasL defizienten Tieren hingegen ist die Metastasierung dieser Zellen stark erhöht⁴⁸. In experimentellen Lungenmetastasen nach der i.v. Injektion von K7 Osteosarkomzellen finden sich nur Fas-negative Tumorzellen. Die Tatsache, dass nach der Injektion von Zellen, in denen der Fas-Signalweg gentechnisch inhibiert wurde, auch Fas-positive Zellen in den Metastasen nachgewiesen werden konnten¹⁵¹, macht deutlich, dass die Triggerung der Apoptose in Tumorzellen durch die Fas/FasL Interaktion einen wichtigen Einfluss auf die Metastasierung besitzt.

In den Experimenten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von Fas über den gesamten Beobachtungszeitraum sehr stark abfällt. Am Tag 2 findet sich noch eine sehr hohe Expression über dem Niveau des Housekeeping-Gens, während am Tag 8 in keiner der untersuchten Lungen Fas mRNA nachgewiesen werden konnte. Gleichzeitig steigt die Expression von FasL - an den Tagen 2,4 und 6 nur auf minimalem Niveau exprimiert - am

Tag 8 leicht an. (Dieser Anstieg zeigte jedoch keine statistische Signifikanz) Im Verlauf der Progression der Metastasierung in diesem Experiment konnte also ein deutlicher Rückgang der Fas Expression in den Lungen bei gleichzeitigem tendenziellem Anstieg der Expression von FasL nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis lässt sich gut vereinbaren mit Studien die zeigen, dass die Fas Expression in Melanomzellen aus Primärtumoren deutlich höher ist als in solchen aus metastatischen Läsionen, und dass für die Expression von FasL das Umgekehrte gilt¹⁵². Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen der Fas-Ligand Expression und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen sowie der Fas Expression und negativem Lymphknotenstatus bei Mammakarzinomen besteht¹⁵³. Eine Korrelation zwischen der Expression von FasL und der Inzidenz von Lymphknoten- und Fernmetastasen konnte auch beim kolorektalen Karzinom beobachtet werden¹⁵⁴.

Als Ursache für das starke Absinken der Fas Expression kommt zum einen eine Downregulation von Fas in den Lungen zum anderen ein Verlust Fas exprimierender Zellen in Frage. Unterstützung für die letztere Theorie liefert die weiter oben bereits zitierte Studie die zeigt, dass in experimentellen Lungenmetastasen nach der i.v. Injektion von K7 Osteosarkomzellen nur Fas-negative Tumorzellen gefunden werden konnten¹⁵¹. Allerdings wird auch die Downregulation von Fas auf Transkriptionsebene als häufiges Ereignis bei Melanomen beschrieben¹⁵⁵.

TRANCE (TNF related activation induced cytokine) ist ein Cytokin der TNF-Familie, das vor allem von T-Zellen exprimiert wird und das Überleben dendritischer Zellen durch Hochregulation des Apoptosessuppressors bcl-xl steigern kann. Gleichzeitig induziert TRANCE die Expression verschiedener Zytokine in dendritischen Zellen und kann so deren T-Zell stimulierende Wirkung verstärken⁷¹.

TRANCE ist identisch mit RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand) und fördert durch Bindung an den TRANCE-Rezeptor (RANK) auf Osteoklasten-Vorläuferzellen deren Entwicklung zu reifen Osteoklasten. Diese Funktion macht TRANCE zu einem wichtigen Cytokin bei der Bildung osteolytischer Metastasen von Mammakarzinomen und Plasmozytomen¹²⁴. Intrazellulär führt das TRANCE-Signal zu einer Aktivierung von NF- κ B (nuclear factor- κ B)¹⁵⁶, ein Transkriptionsfaktor, der auch in der Lungenmetastasierung eine wichtige Rolle spielt; Inhibitoren von NF- κ B können Lungenmetastasierung reduzieren¹⁵⁷. Zusätzlich kann durch TRANCE auch die Angiogenese stimuliert werden⁷².

Somit sind für TRANCE sowohl pro- als auch anti-metastatische Effekte in den Experimenten dieser Arbeit denkbar. Die relativ konstante Expression auf sehr niedrigem Niveau an den Tagen 2,4 und 6 erschwert dabei die Interpretation. Das - statistisch allerdings nicht signifikante - Absinken am Tag 8, einem Zeitpunkt zu dem die Proliferation den initialen Verlust an Tumorzellen bereits wieder überwiegt, lässt jedoch eher an eine die Metastasierung inhibierende Wirkung in diesem Experiment denken.

4.2.2. Invasivität und Proliferation

4.2.2.1. MMP 2 und 9

Für Tumorzellen, die invasiv wachsen und benachbarte Strukturen infiltrieren, stellt die extrazelluläre Matrix (ECM) eine Barriere dar. Daher ist die Proteolyse von ECM-Komponenten eine wichtige Voraussetzung für die Invasivität der Tumorzellen. Die Hochregulation proteolytischer Enzyme insbesondere der Matrix-Metalloproteinasen kann deshalb bei einer Vielzahl maligner Tumore gefunden werden und besitzt auch eine wichtige Funktion innerhalb der Progression des Melanoms¹⁵⁸. Neben der Erleichterung des invasiven Wachstums haben MMP's aber durch proteolytische Spaltung von Signalmolekülen oder Rezeptoren auch Einfluss auf Apoptose, Angiogenese, Immunsystem, und direkt auf die Tumorpheriferation¹⁵⁹.

Die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme MMP 2 und MMP 9 werden auch als Gelatinasen bezeichnet und sind in der Lage Typ IV Kollagen, einen wichtigen Bestandteil der Basalmembranen, zu spalten¹⁶⁰. Wichtige Hinweise für die Bedeutung dieser Enzyme für die Metastasierung sind Experimente mit MMP2 bzw. MMP9 knock-out Tieren, in denen die Kolonisation der Lungen nach i.v. Injektion von Tumorzellen weniger effektiv war¹³.

Die Expression von MMP 2 in den Untersuchungen dieser Arbeit ist vor allem durch ein deutliches Absinken am Tag 8 nach der i.v. Injektion von Melanomzellen gekennzeichnet. An den zuvor untersuchten Tagen 2, 4 und 6 fand sich eine konstante Expression. Viele Studien betonen die Bedeutung von MMP 2 für die Invasivität und Metastasierung von Tumoren. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Überexpression von MMP 2 in Melanomen mit einer schlechten Prognose assoziiert ist¹⁶¹, die Inhibition von MMP 2 durch Chitosan, einem Derivat von Chitin, die Invasivität von Melanomzellen reduziert¹⁶² und aufgrund der Downregulation von MMP 2 durch die Expression des Gens NRAGE die Metastasierung von Melanomen und Pankreastumoren supprimiert werden kann¹⁶³. Durch Hochregulation von MMP 2 kann IL 17A die Metastasierung hepatozellulärer Karzinome fördern¹⁶⁴.

Das starke Absinken der Expression am Tag 8 legt die Vermutung nahe, dass die Expression von MMP 2 vor allem in den frühen Phasen der Metastasierung in diesem Experiment eine wichtige Funktion hat. Versuche mit MMP-Inhibitoren in Modellen zur Metastasierung kolorektaler Karzinome haben gezeigt, dass nur der frühzeitige Einsatz dieser Medikamente zur Reduktion der Metastasierung führt und der Einfluss auf bereits etablierte Metastasen sehr gering ist¹⁶⁰. Dies wird von vielen Autoren auch als Ursache für die enttäuschenden Ergebnisse der MMP-Inhibitoren in klinischen Studien gesehen, da sie hier zumeist bei Patienten mit weit fortgeschrittenem Tumorstadium eingesetzt wurden¹⁶⁵.

Aufgrund ihrer proteolytischen Aktivität erscheint es zunächst sinnvoll, dass MMP's vor allem die Invasivität metastasierender Zellen fördern können. Im Gegensatz hierzu stehen Experimente die zeigen, dass Melanomzellen, die TIMP 1 (tissue inhibitor of MMP) - einen endogenen Inhibitor vieler MMP's - überexprimieren, den Schritt der Extravasation mit der gleichen Effektivität vollziehen können, wie Zellen, die diese Überexpression nicht aufweisen, allerdings in der nachfolgenden Initiation des Wachstums Defekte aufweisen¹⁶⁶. Ein wichtiger Mechanismus, durch dessen Regulation MMP's Einfluss auf das Tumorstadium gewinnen können, ist die Angiogenese. MMP 2 kann z.B. durch proteolytische Spaltung von Kollagen IV eine kryptische $\alpha\beta 3$ Integrin Bindungsstelle freilegen, deren Blockade die Angiogenese in vitro und das Tumorstadium in vivo hemmt¹⁶⁷. In einem in vivo Modell zur Untersuchung der Progression des Chondrosarkoms konnte durch Downregulation von MMP 2 die Angiogenese inhibiert werden¹⁶⁸. Vor diesem Hintergrund erscheint das Absinken der Expression von MMP 2 am Tag 8 - einem Zeitpunkt, zu dem die Metastasen in unserem Modell eine makroskopisch sichtbare Größe erreicht haben, die Angiogenese also bereits initiiert wurde - erstaunlich. Andererseits konnte in einem transgenen Modell zur Untersuchung der Karzinogenese von Inselzelltumoren des Pankreas gezeigt werden, dass die Angiogenese in MMP 2 defizienten Tieren nicht beeinträchtigt ist¹⁶⁹. Neben den pro-angiogenen Wirkungen besitzt MMP 2 auch anti-angiogene Effekte. So ist MMP 2 z.B. in der Lage, durch Proteolyse Angiostatin aus Plasminogen zu generieren¹³. Das Absinken der MMP 2 Expression in den Experimenten dieser Arbeit zu einem Zeitpunkt, zu dem eine erfolgreiche Rekrutierung neuer Blutgefäße in den Melanommetastasen angenommen werden muss, lässt den Rückschluss zu, dass MMP 2 in diesem Modell für die Angiogenese nicht essentiell ist und zu früheren Zeitpunkten der Metastasierung wichtigere Funktionen besitzt.

Die Expression von MMP 9 ist in vielen Studien mit einer Zunahme der Invasivität und Metastasierung assoziiert. So korrelieren z.B. bei Melanompatienten und in einem Modell zur Metastasierung des Mammakarzinoms hohe Serum-MMP 9 Spiegel mit einer verminderten Überlebensrate, rapidem Tumorstadium und Metastasierung¹⁴. MMP 9 besitzt auch eine

wichtige Funktion in der Konditionierung von Zielorganen metastasierender Zellen. Das Konzept einer prämetastatischen Nische geht davon aus, dass Zellen des Primärtumors Faktoren sezernieren, die Fibroblasten in potentiellen Metastasierungsorganen dazu anregen, vermehrt Fibronectin zu bilden, an das hämatopoietische Progenitorzellen binden können und dort Zellcluster bilden, die die Extravasation und Proliferation metastasierender Tumorzellen begünstigen³⁴. Diese Zellcluster exprimieren MMP 9 und die Bedeutung von MMP 9 für diese prämetastatische Konditionierung zeigt sich dadurch, dass in MMP 9 defizienten Tieren die Metastasierung reduziert ist¹⁴. MMP 9 hat auch pro-angiogene Wirkungen in der tumorinduzierten Angiogenese. Ein wichtiger Mechanismus hierfür ist die Freisetzung von in der extrazellulären Matrix sequestriertem VEGF durch Proteolyse¹⁶⁵.

Zu keinem der in dieser Arbeit untersuchten Zeitpunkte konnte eine Expression von MMP 9 nachgewiesen werden. Dies verwundert zunächst aufgrund der dargestellten großen Bedeutung für die Metastasierung, lässt dann aber Beobachtungen in den Focus rücken, die andere Funktionen von MMP 9 betonen. MMP 9 besitzt z.B. auch anti-angiogene Wirkungen, die durch Generierung von Endostatin oder Tumstatin aus Typ IV Kollagen zustande kommen¹⁶⁵. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die niedrigeren Konzentrationen von zirkulierendem Tumstatin bei MMP 9 knock-out Tieren zu einer gesteigerten Angiogenese und beschleunigtem Tumorwachstum subkutan implantierter Tumore führen¹⁷⁰. Auch unabhängig von der Angiogenese wurden gegen die Tumorprogression gerichtete Effekte von MMP 9 gezeigt. Durch die spezifische Downregulation von MMP 9 mithilfe von siRNA in hochinvasiven Fibrosarkomzellen konnte eine Zunahme der Intravasation und Metastasierung beobachtet werden¹⁷¹. MMP 9 defiziente Tumorzellen führen in einem Modell zur K14-HPV16 Karzinogenese zum Wachstum aggressiverer Karzinome mit einem weniger differenzierten Phänotyp¹⁵⁹.

Bei humanen Melanomen wurde eine hohe Expression von MMP 9 nur in frühen Tumorstadien und während der radialen Wachstumsphase gefunden, während in späteren Stadien und während der vertikalen Wachstumsphase keine MMP 9-Expression nachgewiesen werden konnte¹⁷². In Tierexperimenten mit B16 Melanomzellen wurde MMP 9 in spontan aufgetretenen Lymphknoten und Lungenmetastasen exprimiert, während die Tumorzellen in experimentellen Metastasen der Lunge MMP 9 nicht exprimierten¹⁷³. Dies lässt vermuten, dass MMP 9 vor allem frühe Schritte in der Metastasierungskaskade wie z.B. invasives Wachstum und Intravasation fördern kann, während spätere Schritte wie Extravasation und Initiation der Proliferation nicht von der Expression von MMP 9 abhängig sind. Dass in experimentellen Metastasierungsmodellen wie dem dieser Arbeit zugrundeliegenden diese späteren Schritte untersucht werden, kann eine Erklärung dafür sein, dass in den Experimenten dieser Arbeit keine Expression von MMP 9 gefunden werden konnte.

4.2.2.2. Semaphorine 3A und 4D

Semaphorine sind Moleküle die eine wichtige Funktion in der Embryonalentwicklung des Nervensystems besitzen und hierbei das Längenwachstum von Axonen regulieren¹⁵. Aufgrund dieser Bedeutung in der Steuerung von invasivem Wachstum wurde auch ein Einfluss der Semaphorine auf Tumorprogression und Metastasierung vermutet. In dieser Arbeit wurde die Expression der Semaphorine 3A und 4D untersucht.

Semaphorin 3A kann das Längenwachstum von Axonen hemmen und besitzt auch inhibitorische Funktion in der Migration endothelialer Zellen¹⁵. Die Untersuchung der Wirkungen von Semaphorin 3A auf die Tumorbiologie in unterschiedlichen Studien zeigt, dass Semaphorin 3A für das Tumorwachstum und die Metastasierung teils förderliche und teils hinderliche Funktionen besitzt. So ist Semaphorin 3A z.B. Teil eines negativen Feedback-Mechanismus, der die proliferationsfördernden Wirkungen von VEGF in mesothelialen Zellen reguliert und dessen Dysfunktion zum unkontrollierten Wachstum in

malignen mesothelialen Zellen führt¹⁷⁴. Die Invasivität von Semaphorin 3A transfizierten Prostatakarzinomzellen ist im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen vermindert¹⁷⁵. Ein weiterer potentiell tumorprotektiver Mechanismus von Semaphorin 3A ist die Suppression der VEGF-induzierten Angiogenese¹⁷⁶.

Dem gegenüber stehen Untersuchungen, die eine die Tumorprogression begünstigende Wirkung von Semaphorin 3A beschreiben. So kann z.B. die Expression von Semaphorin 3A durch Tumorzellen zur Dysfunktion von T-Zellen in der Mikroumgebung des Tumors beitragen, und so die Elimination von Tumorzellen durch die T-Zellen behindern¹⁷⁷. Ausserdem kann durch Semaphorin 3A erhöhte vaskuläre Permeabilität induziert werden und so die Intra- und Extravasation metastasierender Zellen erleichtert werden¹⁷⁶. Eine erhöhte Expression von Semaphorin 3A in humanen Pankreastumoren ist mit einem ungünstigen Verlauf assoziiert¹⁷⁸.

In dieser Arbeit konnte eine hohe Expression von Semaphorin 3A über den gesamten Zeitraum des Experimentes gezeigt werden. Die Höhe dieser Expression lässt eine Bedeutung von Semaphorin 3A für die Metastasierung in den Experimenten dieser Arbeit vermuten, wobei jedoch die Konstanz die Interpretation erschwert.

Semaphorin 4D lässt sich eindeutiger als ein das Tumorwachstum begünstigendes Molekül beschreiben. Ein Hauptaugenmerk liegt hierbei auf seinen pro-angiogenetischen Effekten. Bei einer Vielzahl von Tumoren geht man davon aus, dass die Expression von Semaphorin 4D die Angiogenese fördern kann¹⁷⁹. In einem Experiment, in dem Brustkrebszellen subkutan in syngene Tiere injiziert wurden, zeigte sich, dass die Fähigkeit der Tumorzellen zur Proliferation und Metastasierung in Semaphorin 4D knock-out Tieren im Vergleich zu Wildtyptieren aufgrund von Defekten in der Vaskularisierung des Tumors reduziert ist¹⁸⁰. Die pro-angiogenetische Wirkung erreicht Semaphorin 4D durch Bindung an seinen Rezeptor Plexin B1. Der HGF-Rezeptor c-met kann mit Plexin B1 in einem Komplex assoziiert sein, was zur Folge hat, dass die Bindung von Semaphorin 4D an Plexin B1 auch die Tyrosinkinaseaktivität von assoziiertem c-met stimuliert¹⁸¹. Über diesen Mechanismus kann Semaphorin 4D neben der Angiogenese auch das invasive Wachstum und die Zellmotilität fördern¹⁸². Nach einem diskreten Anstieg der Semaphorin 4D-Expression über die Tage 2,4 und 6 konnte in dieser Arbeit ein zwar statistisch nicht signifikantes, jedoch anhand der Einzelwerte deutlich nachvollziehbares Absinken der Expression am Tag 8 gezeigt werden. Zu einem Zeitpunkt zu dem die Angiogenese in den Melanommetastasen mit großer Wahrscheinlichkeit eine wichtige Rolle spielt verwundert die Downregulation eines pro-angiogenetischen Moleküls wie Semaphorin 4D. Die ansteigende Expression an den Tagen zuvor lässt vermuten, dass Semaphorin 4D zu diesen Zeitpunkten wichtigere Funktionen besitzt. Zum einen ist davon auszugehen, dass die Angiogenese bereits zu früheren Zeitpunkten initiiert wird, da die ersten makroskopisch sichtbaren Metastasen bereits am Tag 5 auftreten und die Rekrutierung neuer Blutgefäße als Bedingung hierfür gesehen wird³. Zum anderen lässt dies eine Bedeutung der Wirkung von Semaphorin 4D auf Invasivität und Motilität der Melanomzellen in diesem Experiment vermuten.

4.2.2.3. HGF und c-met

HGF und c-met besitzen eine herausragende Bedeutung in der Biologie maligner Tumore. Zum einen lässt sich bei nahezu allen Formen solider Tumore eine Überaktivierung des HGF/c-met Signalweges finden, zum anderen können durch diesen Signalweg mehrere Stadien der Tumorentwicklung gefördert werden¹⁸³. So hat die Aktivierung von c-met durch HGF einen proliferationsfördernden Effekt⁶¹ und kann das Überleben und die Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli steigern¹⁸⁴. Weiterhin ist HGF ein pro-angiogenetisches Molekül¹⁸⁵ und in der Lage, die VEGF induzierte Angiogenese zu verstärken¹⁸⁶. Durch Destabilisierung Cadherin-vermittelter Zell-Zell Kontakte, Modulation der Integrin-

Expression und Verteilung an der Zelloberfläche¹⁷ sowie Stimulation der MMP-Expression und Aktivierung¹⁸⁷ führt das HGF/c-met Signal außerdem zu einer Steigerung der Invasivität. In vitro bilden z.B. renale Epithelzellen in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix kugelförmige Zysten, während sich nach Stimulation mit HGF verzweigte Strukturen ergeben und sich ein Einwachsen der Zellen in die umgebende Matrix beobachten lässt¹⁸⁸.

Eine vermehrte Aktivierung des HGF/c-met Signalweges kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Durch Überexpression von HGF in Tumorzellen oder dem umgebenden Gewebe kann es zu einer para- oder auto-krinen Stimulation c-met exprimierender Tumore kommen. Des Weiteren wurden auch Mutationen des c-met Gens entdeckt, die zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führen. Der häufigste Mechanismus ist jedoch eine Überexpression von c-met auf der Transkriptionsebene oder aufgrund einer Genamplifikation. Diese quantitative Hochregulation führt zur Oligomerisierung mehrerer Rezeptoren, wobei diese Oligomere auch in Abwesenheit eines Liganden aktiviert sein können. Viele Onkogene können die Hochregulation von c-met auf Ebene der Transkription bewirken¹⁸⁹. Auch hypoxische Bedingungen, wie sie in Tumoren häufig anzutreffen sind, steigern die Expression von c-met durch die Bindung des Transkriptionsfaktors HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1) an die Promoterregion des c-met Gens¹⁹⁰.

In vielen Studien konnte die Bedeutung des HGF/c-met Signalweges für die Tumorprogression und Metastasierung gezeigt werden. So resultiert z.B. die Überexpression von c-met in einem transgenen Tiermodell in der Entstehung hepatozellulärer Karzinome¹⁹¹. Bei humanen kolorektalen Karzinomen konnte eine Assoziation zwischen der Amplifikation des c-met Gens und dem Auftreten von Lebermetastasen gezeigt werden¹⁹². Eine gentechnische Inhibition von c-met mithilfe von shRNA (short hairpin RNA) vermindert die Proliferation, das Überleben und die Invasivität von Rhabdomyosarkomzellen¹⁹³, führt zur Wachstumshemmung und Apoptoseinduktion in Lungenkarzinomzellen, die c-met überexprimieren¹⁹⁴, und reduziert das Auftreten experimenteller Metastasen nach intravenöser Injektion von Magenkarzinomzellen¹⁹⁵.

In experimentellen Ansätzen konnte bereits der Erfolg einer medikamentösen Unterbrechung des HGF/c-met Signalwegs gezeigt werden. NK-4 weist strukturelle Ähnlichkeiten mit HGF auf und bindet an c-met ohne eine biologische Reaktion auszulösen, und antagonisiert so die HGF induzierte Tyrosinphosphorylierung von c-met. NK-4 konnte die HGF induzierte Invasivität und Motilität einer humanen Kolonkarzinom Zelllinie antagonisieren und bei Mäusen mit Pankreastumoren das Wachstum die Invasivität und die Metastasierung inhibieren und das Überleben verlängern^{61;196}. Auch in der klinischen Anwendung konnten bereits Erfolge durch c-met Inhibitoren (NSCLC, HCC, Pankreaskarzinom, Magenkarzinom) erzielt werden¹⁹⁷.

In dieser Arbeit konnte eine konstante Expression des HGF-Rezeptors über den gesamten untersuchten Zeitraum nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass das HGF/c-met Signal im Rahmen der in diesem Modell untersuchten experimentellen Metastasierung eine wichtige Rolle spielt. Gleichzeitig konnte eine Expression des c-met Liganden HGF nur an den Tagen 2 und 8 und auch hier nur auf relativ geringem Niveau und nicht in allen Tieren gefunden werden. Hieraus kann man ableiten, dass für die Aktivierung des c-met Rezeptors in diesem Modell auch andere Mechanismen als die Liganden-Bindung verantwortlich sein können. Durch Oligomerisierung von c-met kann es wie oben bereits erwähnt zur Aktivierung des Rezeptors auch in Abwesenheit des Liganden HGF kommen, was aufgrund der konstanten hohen Expression von c-met ein möglicher Mechanismus ist. Unter Punkt 4.2.1.3. wurde beschrieben, dass nach Bindung von Semaphorin 4D an seinen Rezeptor Plexin B1 dieser mit c-met assoziieren kann und Semaphorin 4D so in der Lage ist, c-met indirekt zu aktivieren^{181;182}. Die hohe Expression von Semaphorin 4D an den Tagen 2,4 und 6 zeigt, dass dieser Mechanismus in dem Modell dieser Arbeit ebenfalls eine wichtige Funktion besitzen kann.

4.2.3. Einfluß von Thrombozytenaggregationshemmern auf die Metastasenzahl

4.2.3.1. Therapie mit unterschiedlichen Thrombozytenaggregationshemmern

4.2.3.1.1. Metastasenreduktion durch Inhibitoren der Thrombozytenaggregation

Die Bedeutung der Thrombozyten und der Hämostase für die Metastasierung konnte bereits in vielen Studien dargestellt werden. Vor allem in experimentellen Untersuchungen in Tiermodellen konnte durch Inhibition der Thrombozytenaggregation die Metastasierung reduziert werden^{33;57;198}. In klinischen Studien ergaben sich Hinweise auf eine verlängerte Überlebenszeit von Tumorpatienten unter der Therapie mit niedermolekularem Heparin^{59;199}. Auch in dieser Arbeit zeigte sich ein deutlicher Einfluss einer Therapie mit unterschiedlichen Thrombozytenaggregationshemmern auf die Metastasierung. Die Metastasenzahl an der Lungenoberfläche am Tag 9 nach der intravenösen Injektion der B16/D5 Melanomzellen konnte durch die medikamentöse Behandlung mit Aspirin (Reduktion um 53,8%, p=0,1), Aspisol (55,1%, p=0,05), Clopidogrel (59,6%, p=0,05) und EMD 122347 (85,3%, p=0,04) gesenkt werden. Hierbei zeigte sich, dass als einziges Medikament Aspirin keine signifikante Reduktion der Metastasenzahl erreichen konnte. Die Gründe hierfür liegen in der größeren Streubreite der Ergebnisse in der Aspirin-Gruppe. Bei Wirkstoffgleichheit mit Aspisol sind die Ursachen für die geringere Effektivität wohl eher in der schlechter kontrollierbaren Applikationsform (im Trinkwasser gelöst vs. tägliche kontrollierte i.p. Injektion) zu sehen. Die erfolgreiche Metastasenreduktion durch alle anderen eingesetzten Hemmstoffe der Thrombozytenaggregation zeigt eine wichtige Bedeutung der Thrombozyten für die Metastasierung auch in dem dieser Arbeit zugrundeliegenden Modell. Mehrere Gründe für Bedeutung der Thrombozyten sind denkbar.

Die Adhärenz am Endothel ist ein wichtiger Schritt in der Metastasierungskaskade. Thrombozyten können diesen Schritt begünstigen³³. Durch Bindung aktivierter Thrombozyten vergrößert die Tumorzelle ihr Repertoire an adhäsiven Proteinen und damit ihre Fähigkeit zur Adhäsion an Endothel und subendothelialer Matrix. Besonders in Gefäßbereichen mit kleinen Endothelschäden kann es durch die Interaktion von Thrombozyten, die am beschädigten Endothel adhäreren, und tumorassoziierten Thrombozyten zum Arrest kommen¹². Ein weiterer Mechanismus ist die direkte Bindung von mit dem Blutstrom wandernden Tumorzellen an adhärente Thrombozyten. Für diese Form der Adhärenz konnte eine wichtige Funktion für GP IIb/IIIa und β_3 Integrine gezeigt werden^{200;201}. Durch die Thrombozytenaggregation und Koagulationsaktivierung kann auch die Formation von Tumorzell-Thrombozytenemboli begünstigt werden, die aufgrund ihrer Größe leichter auf rein mechanischem Weg im Kapillarbett eines Zielorgans der Metastasierung hängen bleiben¹². Somit ist es denkbar, dass durch die Hemmung der Thrombozytenaggregation der initiale Arrest der Melanomzellen in den Lungen beeinträchtigt wird.

Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die Erleichterung der gegen die Melanomzellen gerichteten Immunabwehr durch die antithrombozytäre Therapie. Tumorzellen sind den Abwehrmechanismen des Immunsystems, insbesondere dem Angriff von zytotoxischen T-Zellen (CTL's) und natürlichen Killerzellen (NK), in der Zirkulation in höherem Maße ausgesetzt als im Zellverband des Primärtumors. An Tumorzellen gebundene Thrombozyten können, indem sie die Zelloberfläche bedecken, wie ein Schutzschild wirken und die Lyse von Tumorzellen durch NK's verhindern²⁰². Der metastasierungsreduzierende Effekt antithrombozytärer Interventionen war in verschiedenen Experimenten an die Präsenz von NK's²⁰³ oder die NK-Sensitivität der verwendeten Tumorzellen²⁰² gebunden.

Ein weiterer Mechanismus wie Thrombozyten die Tumorzellen vor der Elimination durch NK's schützen können, ist die Übertragung thombozytärer MHC-Klasse I Moleküle auf

Tumorzellen durch Thrombozyten-Tumorzell Interaktionen. Die Zytotoxizität der NK's richtet sich vor allem gegen Zellen mit fehlender oder geringer Expression von MHC-Klasse I Molekülen (z.B. Tumorzellen). Durch die thrombozytären MHC-Klasse I Moleküle können die Tumorzellen einer Elimination durch NK's entgehen²⁰⁴.

Aktivierete Thrombozyten setzen aus ihren Granula eine Reihe von Faktoren frei, die Einfluß auf Tumorwachstum und Metastasierung haben können. Sezernierte Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF (platelet-derived growth factor) haben stark mitogene Wirkung auf eine Vielzahl von Zellen. Aus Thrombozyten freigesetzte Faktoren zeigten außerdem einen wachstumsfördernden Effekt auf sehr viele Tumorzelllinien in der Zellkultur³⁰. VEGF zählt ebenfalls zu den sezernierten Proteinen. Neben der Angiogenese kann dieses Zytokin auch die Extravasation und Adhärenz der Tumorzellen begünstigen, weil VEGF-Stimulation eine Retraktion der Endothelzellen und damit die Freilegung adhäsiver Proteine der subendothelialen Matrix und der Basalmembran zur Folge hat und die Permeabilität des Endothels steigert³³. Eine ischämische Schädigung des Endothels durch Embolisierung größerer Thrombozyten-Tumorzell-Aggregate könnte ebenfalls für die Extravasation der Tumorzellen förderlich sein²⁰⁵. Von aktivierten Thrombozyten freigesetzte Mikrovesikel können die mRNA Expression von MMP-9, VEGF und HGF in verschiedenen Lungentumorzelllinien stimulieren und dadurch deren Proliferation und Invasivität steigern²⁰⁶. Eine Steigerung der Invasivität konnte auch bei Brustkrebszellen beobachtet werden²⁰⁷. Lysophosphatidylsäure wird ebenfalls von aktivierten Thrombozyten sezerniert und wirkt in der ossären Metastasierung von Brust- und Ovarial-Tumoren als Mitogen und Promoter der Osteolyse²⁰⁸. Die Sekretion von TGF- β aus aktivierten Thrombozyten führt bei Kolon- und Mammakarzinomzellen zu einer Änderung der Morphologie hin zu einem invasiven mesenchymalen Phänotyp (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) und gesteigerter Metastasierung^{209;210}. Die verminderte Sekretion solcher metastasierungsfördernder Faktoren durch Thrombozyten infolge der medikamentösen Hemmung der Thrombozytenaggregation und damit auch ihrer Aktivierung ist also ein weiterer möglicher Grund für die Reduktion der Metastasierung in den antithrombozytär behandelten Tieren.

Die Embolisierung kleiner Gefäße und Kapillaren durch Tumorzell-Thrombozyten-Aggregate kann in den Versorgungsgebieten der embolisierten Gefäße zu hypoxischen Bedingungen führen. HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) ist ein Transkriptionsfaktor der unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert wird und die Expression einer Vielzahl von Genen fördert, die zu Tumorwachstum und Metastasierung beitragen können. Hypoxie in Tumoren ist mit der Resistenz gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie assoziiert²¹¹. Die Hemmung der Thrombozytenaggregation könnte also auch das Auftreten solch tumorförderlicher hypoxischer Areale vermindern.

4.2.3.1.2. Besondere Bedeutung des GP IIb/IIIa

Die Therapie mit dem GP IIb/IIIa Antagonisten EMD 122347 konnte im Vergleich zu den anderen eingesetzten Thrombozytenaggregationshemmern die deutlichste Reduktion der Metastasenzahl erzielen. Die Bindung von Fibrinogen an aktiviertes GP IIb/IIIa ist unabhängig vom auslösenden Stimulus der letzte Schritt, der zur Thrombozytenaggregation führt. Die Blockade dieses Rezeptors stellt damit eine sehr effiziente Möglichkeit zur therapeutischen Beeinflussung der Thrombozytenaggregationshemmung dar⁹². Dies stellt aber nur eine mögliche Erklärung für die Überlegenheit von EMD 122347 gegenüber den anderen untersuchten Therapieformen dar.

Die besondere Bedeutung des GP IIb/IIIa wird dadurch ersichtlich, dass dieses Integrin direkt an der Interaktion zwischen Thrombozyten und Tumorzellen beteiligt ist. So können z.B. Thrombozyten, die an ihrem GP IIb/IIIa Rezeptor Fibrinogen gebunden haben, über das auf vielen Tumorzellen exprimierte Integrin $\alpha_v\beta_3$ an der Tumorzelloberfläche fixiert werden⁴⁹.

Für die Interaktion von Melanomzellen mit Thrombozyten konnte eine entscheidende Bedeutung der Integrine GP IIb/IIIa und $\alpha_v\beta_3$ gezeigt werden²¹². Auch über die Proteine von Willebrand Faktor (vWF) und Fibronectin ist eine Verbindung zwischen thrombozytärem GPIIb/IIIa und Integrinen auf Tumorzellen möglich²⁰⁵. Die besondere Effektivität von EMD 122347 in der Reduktion der Metastasen ist also wahrscheinlich auch dadurch bedingt, dass nicht nur die Aggregation und Aktivierung der Thrombozyten und damit ihre metastasierungsfördernden Funktionen gehemmt werden sondern auch direkt die Interaktion zwischen den Melanomzellen und Thrombozyten inhibiert wird.

Interessant erscheint in diesem Zusammenhang, dass auch auf Tumorzellen eine Expression des GP IIb/IIIa Rezeptors gezeigt werden konnte. In humanen metastasierten Melanomen nicht jedoch auf gesunden Melanozyten konnte mit monoklonalen Antikörpern gegen GP IIb/IIIa dieser Rezeptor nachgewiesen werden²¹³. Eine Reaktion mit Antikörpern gegen die IIb Untereinheit des Rezeptors fand sich nur auf Zellen metastasierter Melanome und nicht auf nicht-metastasierten Melanomen²¹⁴. Dies lässt eine Bedeutung der Expression von GP IIb/IIIa auf den Tumorzellen für die Metastasierung des Melanoms vermuten. Die Interaktion von Tumorzellen mit Proteinen der extrazellulären Matrix über ihre Integrine besitzt eine wichtige Funktion für Tumorprogression und Metastasierung. Die Blockade des GP IIb/IIIa Integrins könnte also auch unabhängig von Thrombozyten durch die Beeinträchtigung dieser Interaktion zur Metastasierungsreduktion beitragen.

4.2.3.2. Therapie mit EMD 122347 über 5 bzw. 10 Tage

Eine Reduktion der Metastasenzahl durch die Therapie mit EMD 122347 konnte auch in den folgenden Experimenten mit größeren Stichproben erreicht werden. Allerdings war in diesen Experimenten der Effekt nicht so deutlich ausgeprägt. Insgesamt fiel auf, dass sich bereits in den Kontrollgruppen die Metastasenzahl auf einem außerordentlich hohen Niveau befand, was auf eine vergleichsweise hohe Effektivität der Melanomzellen in der Initiation des Metastasenwachstums in diesen Experimenten schließen lässt. Hierdurch könnte man auch die im Vergleich zu den Vorexperimenten geringere Effektivität der Therapie mit EMD 122347 erklären.

Interessanterweise konnte allerdings durch eine Verlängerung der EMD 122347 Therapie auf den gesamten Zeitraum des Experiments eine deutlichere Reduktion der Metastasenzahl erreicht werden. (Therapie über 5 bzw. 9 Tage, Metastasenreduktion um 32,2% bzw. 51,8%). Dies lässt eine Bedeutung der Blockade des GP IIb/IIIa Rezeptors auch während späterer Phasen der Metastasierung vermuten. Eine ähnliche Beobachtung konnte in einer Studie zur Inhibition der experimentellen Lungenmetastasierung von Lewis-lung-carcinoma (LL2) Zellen gemacht werden. Durch die Therapie mit einer Einzeldosis des oralen GP IIb/IIIa Antagonisten XV454 konnte die Tumorlast um 50% gesenkt werden, während durch Ausdehnung der Therapie auf einen längeren Zeitraum eine Reduktion um 91% erreicht werden konnte⁵⁷.

4.2.4. Einfluß von EMD 122347 auf die Genexpression

4.2.4.1. P-mel 17

Die Expression des Melanozytenmarkergens P-mel 17 zeigt in den Lungen der mit EMD 122347 therapierten Tiere einen zu derjenigen in nichttherapierten Tieren ähnlichen Verlauf. Es ist sowohl ein deutliches Absinken der Expression am Tag 2 als auch der Anstieg ab Tag 4 zu beobachten. Für die Anzahl der Tumorzellen in den Lungen kann also auch unter der Therapie mit EMD 122347 ein Minimum zwischen den Tagen 2 und 4 angenommen werden. Im Unterschied zu den nicht therapierten Tieren ist hier allerdings ein Rückgang der

Expression und damit der Verlust von Tumorzellen erst am Tag 2 nachweisbar. Am Tag 1 bleibt die Expression auf dem Ausgangsniveau wodurch sich ein höheres Expressionsniveau als in den Lungen nichttherapierter Tiere ergibt. Es ist verwunderlich, dass unter einer Therapie, die letztendlich zu einer Reduktion der Metastasen führen kann, zunächst das Überleben der Tumorzellen gesteigert zu sein scheint. Der Rückgang der Expression am Tag 2 ist allerdings in der Gruppe der therapierten Tiere wesentlich stärker ausgeprägt und führt auf ein Niveau, das deutlich unter dem der nicht therapierten Tiere liegt. Im Vergleich zu den nichttherapierten Tieren kann also unter der Therapie mit EMD 122347 nach initialen Überlebensvorteilen ein verstärkter Verlust von Melanomzellen angenommen werden.

Unter antithrombozytärer Therapie wären sowohl eventuell die Extravasation begünstigende Funktionen der Thrombozyten als auch die Bildung von Tumorzell-Emboli, in denen die Tumorzellen durch aktivierte Thrombozyten miteinander vernetzt sind, beeinträchtigt. Eine mögliche Erklärung für den Verlauf der P-mel Expression könnte sein, dass die Tumorzellen zwar eventuell als Einzelzellen initial überleben können, im weiteren Verlauf aber den Schritt der Extravasation nicht vollenden können. Als intravaskuläre Einzelzellen ist jedoch, wie eine aktuelle Arbeit anhand intravitalmikroskopischer Beobachtungen der Hirnmetastasierung von Melanomzellen zeigen konnte²¹⁵, ein Überleben der Tumorzellen extrem unwahrscheinlich.

Ab Tag 4 ist in beiden Gruppen ein Anstieg der Expression von P-mel 17 zu verzeichnen, sodass ab diesem Zeitpunkt auch unter der antithrombozytären Therapie ein Überwiegen der Proliferation vermutet werden muss. Die Reduktion der sichtbaren Metastasen durch EMD 122347 lässt sich anhand des Expressionsverlaufs von P-mel 17 nicht nachvollziehen, da zu den späteren Zeitpunkten kein Unterschied zwischen Therapie und Kontrollgruppe mehr festgestellt werden kann.

4.2.4.2. Fas, FasL und TRANCE

Der deutliche Rückgang der Fas-Expression in den Lungen nichttherapierter Tiere kann als Verlust Fas-positiver Tumorzellen durch FasL induzierte Apoptose aufgrund der Immunabwehr durch Zytotoxische T-Zellen (CTL's) und natürliche Killerzellen (NK's) interpretiert werden. In den Lungen therapierter Tiere konnte gezeigt werden, dass das Absinken der Fas-Expression noch stärker ausgeprägt ist. Hieraus könnte man schließen, dass die Elimination von Melanomzellen durch CTL's und NK's unter einer Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern erleichtert ist. Der protektive Effekt von an Tumorzellen gebundenen Thrombozyten gegenüber der Lyse durch NK's wurde bereits in Kapitel 4.2.3.1.1. beschrieben²⁰².

Der tendenzielle Expressionsanstieg von FasL am Tag 8 in den Lungen nichttherapierter Tiere kann mit dem Fortschreiten der Metastasierung in Verbindung gebracht werden, da in vielen Studien ein Korrelation zwischen der Expression von FasL und der Metastasierung gezeigt werden konnte (siehe Kap. 4.2.1.4.). Somit erscheint es nachvollziehbar, dass unter der metastasenreduzierenden Therapie mit EMD 122347 dieser Expressionsanstieg weniger stark ausgeprägt ist.

Am Tag 4 lässt sich in den Lungen therapierter Tiere ein statistisch signifikantes Maximum der Expression von FasL feststellen, das in den Lungen nichttherapierter Tiere nicht nachweisbar ist. Dieses Maximum korreliert zeitlich mit dem besonders starken Rückgang der Fas-Expression in der Gruppe therapierter Tiere, der als Verlust Fas-positiver Tumorzellen unter der Einwirkung von FasL-positiven CTL's und NK's interpretiert werden kann. Somit könnte das Maximum der FasL Expression auch Hinweis auf eine stärkere Präsenz dieser Zellen in den Lungen sein und für eine Erleichterung der gegen den Tumor gerichteten Immunantwort unter der Therapie mit einem Thrombozytenaggregationshemmer sprechen.

In der Expression von TRANCE konnte kein eindeutiger Unterschied zwischen der Gruppe nichttherapierter und derjenigen therapierter Tiere festgestellt werden.

4.2.4.3. MMP 2 und 9

Der Expressionsverlauf von MMP 2 in nichttherapierten Tieren zeigt ein deutliches Absinken am Tag 8. Unter der Therapie mit EMD 122347 konnte dieser Expressionsrückgang bereits am Tag 6 beobachtet werden. MMP 2 besitzt viele Funktionen, die die Metastasierung begünstigen können wie z.B. die Förderung der Invasivität und der Angiogenese (siehe Kap. 4.2.1.2.). Ein frühzeitigeres Absinken der Expression von MMP 2 könnte somit für die Reduktion der Metastasierung unter der Therapie mit EMD 122347 mitverantwortlich sein.

Im Rahmen der Aktivierung von Thrombozyten kommt es zur Abschnürung prothrombotischer Membranvesikel⁵¹. Die verminderte Generierung solcher Vesikel unter der Therapie mit EMD 122347 könnte eine Ursache für den früheren Rückgang der MMP 2 Expression darstellen. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass thrombozytäre Membranvesikel die Invasivität einer Prostatazelllinie durch Hochregulation der Expression von MMP 2 erhöhen können²¹⁶. EMMPRIN (extracellular matrix metallo proteinase inducer) ist ein Protein das durch homophile Interaktion die Expression von MMP 2 und anderer Mitglieder der MMP-Familie induzieren kann. Es wird häufig auf Tumorzellen exprimiert und kann deren Invasivität steigern²¹⁷. Es konnte gezeigt werden, dass EMMPRIN auch im offenen kanalikulären System ruhender Thrombozyten zu finden ist und in Folge der Thrombozytenaktivierung an die Oberfläche transferiert wird²¹⁸. Dies wäre eine weitere mögliche Erklärung für die Reduktion der MMP 2 Expression unter einer antithrombozytären Therapie.

In den Lungen nichttherapierter Tiere konnte keine Expression von MMP 9 nachgewiesen werden. Aktivierte Thrombozyten sind in der Lage Tumorzellen zur Sekretion von MMP 9 zu stimulieren^{219;220}. Vor diesem Hintergrund verwundert es nicht, dass sich unter der Therapie mit einem Thrombozytenaggregationshemmer ebenfalls keine MMP 9 Expression fand.

4.2.4.4. Semaphorine 3A und 4D

Die Expression von Semaphorin 3A unter der Therapie mit EMD 122347 unterscheidet sich von derjenigen in nichttherapierten Tieren nur durch das Absinken am Tag 8. Die Ambivalenz der Wirkung von Semaphorin 3A auf die Tumorprogression und Metastasierung mit teils förderlichen und teils hemmenden Funktionen wurde im Kapitel 4.2.2.2. beschrieben. Der Rückgang der Expression unter einer Therapie, die die Metastasierung reduzieren kann, könnte für tumorförderliche Funktionen von Semaphorin 3A zu diesem Zeitpunkt sprechen.

Wesentliche Unterschiede in der Semaphorin 4D Expression zwischen den Lungen therapierter und nichttherapierter Tiere lassen sich nur an den Tagen 6 und 8 beobachten. Am Tag 6 steigt die Expression in der Kontroll-Gruppe noch an, während in der Therapie-Gruppe bereits hier ein Rückgang zu finden ist. Am Tag 8 sinkt die Expression in beiden Gruppen stark ab, in den Lungen der therapierten Tiere jedoch auf ein deutlich niedrigeres Niveau (Nachweis nur noch bei einem Tier). Der früher einsetzende und deutlicher ausgeprägte Expressionsrückgang eines Gens, das Invasivität, Zellmotilität und Angiogenese fördern kann (siehe Kap. 4.2.2.2.), erscheint im Rahmen einer Therapie, die in der Lage ist die Metastasierung zu reduzieren, gut nachvollziehbar.

Eine interessante Beobachtung in diesem Zusammenhang ist, dass Semaphorin 4D auch auf Thrombozyten gefunden werden kann, und die Menge von in der Thrombozytenmembran verankertem Semaphorin 4D nach der Thrombozytenaktivierung zunimmt. Im weiteren Verlauf kommt es zur Abspaltung von Semaphorin 4D von der Thrombozytenoberfläche, das dann in löslicher Form vorliegt und mit entsprechenden Rezeptoren z.B. auf Endothelzellen interagieren kann²²¹. Da Thrombozyten anukläre Zellen sind, die nicht zur Transkription von Genen in der Lage sind, kann dieser Mechanismus zwar nicht die verminderte Expression von

Semaphorin 4D unter der Therapie mit EMD 12237 erklären, zeigt aber eine Möglichkeit, wie eine Hemmung der Thrombozytenaktivierung die Menge an verfügbarem Semaphorin 4D-Protein reduzieren könnte.

4.2.4.5. HGF und c-met

In den Lungen nichttherapierter Tiere konnte an den Tagen 2 und 8 die Expression von HGF, wenn auch nur in jeweils zwei der drei untersuchten Tiere und mit großer Streubreite, gezeigt werden. Im Gegensatz hierzu war unter der Therapie mit EMD 122347 die HGF-Expression nur am Tag 6 nachweisbar, und hier auch nur in einer der drei untersuchten Lungen. Eine Beurteilung dieser Ergebnisse im Rahmen der Metastasierung wird durch die große Inhomogenität innerhalb der Gruppen erschwert.

Die Expression des HGF Rezeptors c-met zeigt unter der Therapie mit EMD 122347 einen Verlauf, der sich von dem in den Lungen nichttherapierter Tiere deutlich unterscheidet. Unter der Therapie findet sich ein konstantes Absinken der Expression über den gesamten Zeitraum des Experiments, während die Expression in den Lungen nichttherapierter Tiere auf einem konstant hohen Niveau verweilt. In Kapitel 4.2.2.3. wurde die wichtige Bedeutung von c-met als Onkogen und für die Metastasierung beschrieben. Der konstante Rückgang der Expression von c-met unter der Therapie mit EMD 122347 lässt sich also gut mit dem metastasierungsrezierenden Effekt der Therapie in Einklang bringen.

Durch die Embolisierung kleinerer Gefäße und Kapillaren durch Aggregate aus Tumorzellen und Thrombozyten können im Versorgungsbereich dieser Gefäße hypoxische Areale entstehen. Die Hemmung der Thrombozytenaggregation kann die Entstehung von Tumorzell-Thrombozyten-Aggregaten beeinträchtigen und wirkt somit dem Entstehen solcher hypoxischer Bereiche entgegen. Hierin ist auch ein möglicher Grund für die Reduktion der Expression von c-met unter der Therapie mit EMD 122347 zu sehen, da unter dem Einfluss des unter Hypoxiebedingungen hochregulierten Transkriptionsfaktors HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) die Expression des c-met Gens gesteigert wird¹⁹⁰.

Im Zusammenhang mit der Reduktion der c-met Expression durch die Therapie mit einem Thrombozytenaggregationshemmer erscheint interessant, dass c-met in der Lage ist Mechanismen der Blutgerinnung zu aktivieren. In einem Mausmodell, in dem durch lentiviralen Gentransfer von aktiviertem c-met in Hepatozyten maligne Transformation induziert wird, zeigten sich zunächst thrombotische Komplikationen gefolgt von Hämorrhagien. Als Ursache dieser Gerinnungsstörungen konnte die Hochregulation von PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) und COX-2 (Cyklooxygenase-2) in Reaktion auf die Transformation mit dem Onkogen c-met identifiziert werden²²². Die Aktivierung der Gerinnung durch die Hochregulation dieser Gene kann zur Ablagerung von Fibrinpolymeren in der Umgebung der Tumorzellen führen. Diese Veränderung in der unmittelbaren Umgebung der Tumorzellen trägt möglicherweise zu gesteigerter Angiogenese und Invasivität bei²²³.

Zusammenfassend lassen sich deutliche Unterschiede der Genexpression zwischen therapierten und nichttherapierten Tieren vor allem für die Gene P-mel 17, Fas, MMP 2 und c-met finden. Unter EMD-Therapie kommt es zu einem verzögerten Absinken des P-mel Signals in den Lungen nach der Zelinjektion. Dies erscheint zunächst verwunderlich, da durch die antithrombozytäre Therapie ja eine Metastasenreduktion erreicht werden kann. Erst am zweiten Tag nach der Tumorzellinjektion kommt es unter antithrombozytärer Therapie zu einem deutlichen Absinken der Tumorlast in den Lungen. Dies kann Hinweis dafür sein, dass es unter der EMD-Therapie zu einem vermehrten Absterben der Zellen in der Lunge kommt, zumal es unwahrscheinlich erscheint, dass viele Tumorzellen mit dem Blutstrom durch das Kapillarnetz der Lunge weitertransportiert werden – eine Metastasierung in anderen Organen

konnte während des Beobachtungszeitraumes der Experimente dieser Arbeit nicht gefunden werden.

Ein Faktor, der für den gesteigerten initialen Zellverlust verantwortlich sein kann, ist der fehlende Schutz der Tumorzellen vor dem Zugriff der Zellen des Immunsystems durch die Hemmung der Bindung von Thrombozyten an der Tumorzelloberfläche. Die Induktion von Apoptose in Fas-exprimierenden Zellen durch Bindung von Fas-Ligand ist ein wichtiger Mechanismus der gegen den Tumor gerichteten Immunantwort. Das Absinken der Expression von Fas in den Lungen kann Hinweis auf den Verlust Fas-positiver Zellen sein. Dass dieses Absinken unter der Therapie mit EMD beschleunigt ist könnte für eine effektivere Tumorummunantwort über diesen Signalweg unter einer antithrombozytären Therapie sprechen.

Trotz deutlicher Unterschiede in der Anzahl der Metastasen an der Lungenoberfläche ist zu späteren Zeitpunkten keine Differenz in der Expression des Markergens zwischen Kontroll- und Therapie- Gruppe festzustellen. Auch der zeitliche Verlauf der Expressionskurve von P-mel 17 ist in Kontroll- und Therapie-Gruppe sehr ähnlich, sodass für beide Gruppen ein ähnlicher Ablauf der Metastasierung mit initialem Absinken der Zellzahl und späterem Überwiegen der Proliferation vermutet werden muss. Ein deutlicher Unterschied ergibt sich vor allem aus dem stärkeren initialen Absinken des P-mel 17 Signals unter der Therapie mit EMD, sodass sich für die antithrombozytäre Therapie ein vermuteter Wirkmechanismus vor allem durch die Begünstigung des initialen Absterbens der injizierten Tumorzellen ergibt.

Im Widerspruch hierzu stehen die Ergebnisse der Genexpression von MMP 2 und c-met, beides Gene, die wichtige metastasierungsfördernde Funktionen besitzen. Bei beiden Genen kommt es unter EMD Therapie zu einem früheren (MMP 2) bzw. überhaupt einem Absinken der Expression (c-met) im Verlauf. Die größte Differenz zwischen Kontroll- und Therapie-Gruppe findet sich dabei zu den späten Zeitpunkten Tag 6 (MMP 2) bzw. Tag 8 (c-met). Diese Differenz in der Expression für die Metastasierung wichtiger Gene könnte einen Hinweis darauf geben, dass eine antithrombozytäre Therapie neben der Reduktion des initialen Überlebens auch zu späteren Zeitpunkten der Metastasierungskaskade Einfluss auf die Effizienz der Metastasierung besitzt. In diesem Zusammenhang erscheint auch interessant, dass durch die Gabe von EMD über den gesamten Zeitraum des Experiments eine deutlichere Metastasenreduktion erreicht werden konnte als bei Gabe nur über 5 Tage.

Der anhand der Expression des Markergens messbare Einfluss der antithrombozytären Therapie auf die Metastasierung kommt jedoch zu Beginn der Metastasierungskaskade zum Tragen. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Therapie mit dem GP IIb/IIIa Antagonisten EMD 122347 das initiale Überleben injizierter Tumorzellen in der Lunge reduziert und die Metastasierung reduzieren kann. Dieser frühe Ansatzpunkt der antithrombozytären Behandlung lässt einen klinischen Einsatz einer solchen Therapie zunächst schwierig erscheinen, da der Zeitpunkt der Intravasation metastasierender Tumorzellen bei Tumorpatienten nicht wie bei einem experimentellen Modell bekannt ist. Dennoch könnten Situationen, in denen eine gesteigerte Aussaat von Tumorzellen vermutet werden kann - wie zum Beispiel die Manipulation am Tumor im Rahmen von Operationen - ein interessanter Ansatzpunkt für eine antithrombozytäre Therapie sein. Demgegenüber steht natürlich ein erhöhtes Blutungsrisiko, das vor allem im Rahmen größerer Tumoroperationen problematisch zu sehen ist. Ein wichtiges Ziel wäre also durch ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Pathomechanismen, Medikamente entwickeln zu können, die - bei gleichzeitiger Reduktion solch unerwünschter Nebenwirkungen - gezielt nur die tumorförderlichen Funktionen der Thrombozyten inhibieren²²⁴. Für oberflächliche Eingriffe an Primärtumoren, wie sie z.B. auch gerade beim Melanom möglich sind, könnte eine periinterventionelle antithrombozytäre Therapie diskutiert werden. Ein möglicher interessanter Ansatzpunkt wäre ein systematischer Vergleich der Metastasierungsinzidenz nach Entfernung des Primärtumors

zwischen Patienten, die Aufgrund anderer Vorerkrankungen einer antithrombozytären Therapie unterworfen sind, und nichttherapierten Patienten in einer klinischen Studie.

5. Zusammenfassung

Metastasierung ist ein zentrales Problem in der Therapie maligner Tumore. In einem schrittweisen Prozess, der sogenannten Metastasierungskaskade, lösen sich hierbei einzelne Zellen oder Zellverbände vom Primärtumor ab und wandern mit dem Blut oder Lymphstrom in definierte Regionen des Körpers, um dort nach Verlassen des Gefäßsystems die Proliferation neuer Tumoren zu initiieren.

Ziel dieser Arbeit war es anhand eines Tiermodells, in dem B16 Melanomzellen in die Schwanzvene syngener Mäuse injiziert werden und dann Lungenmetastasen bilden, den Ablauf der hämatogenen Metastasierung näher zu charakterisieren.

Hierbei wurden folgende Aspekte untersucht:

- die Entwicklung der Tumorlast im primären Metastasierungsorgan Lunge im zeitlichen Verlauf
- die Bedeutung der Apoptose für das initiale Absterben der Tumorzellen
- die Expression von Genen der Zytotoxizität, der Invasivität und der Proliferation im zeitlichen Verlauf
- die Effektivität einer antithrombozytären Therapie zur Reduktion der Metastasierung
- Änderungen der Expression von Genen der Zytotoxizität, der Invasivität und der Proliferation unter einer antithrombozytären Therapie.

Hierzu wurde in dieser Arbeit die Expression unterschiedlicher Gene in den Lungen im zeitlichen Verlauf nach der Tumorzellinjektion analysiert (c-DNA Array und RT-PCR Untersuchungen). Zur Beurteilung des Erfolges einer therapeutischen Intervention konnte die Anzahl der aufgrund ihrer Melaninpigmentierung gut sichtbaren Metastasen an der Lungenoberfläche am Ende des Experiments herangezogen werden.

Untersuchungen der Expression des Melanozytenmarkergens P-mel 17 konnten zeigen, dass es nach der Tumorzellinjektion zunächst zu einem starken Absinken der Tumorzellzahl in den Lungen kommt. Erst im späteren Verlauf ab Tag 4 konnte ein Anstieg beobachtet werden. Da während des Zeitraums der Experimente keine Metastasierung in anderen Organen nachgewiesen werden konnte, muss initial ein lokales Absterben der Melanomzellen in den Lungen vermutet werden. Ein möglicher Grund hierfür wäre apoptotischer Zelltod.

Um dies zu untersuchen wurde mithilfe eines c-DNA Arrays die Expression einer Vielzahl von Genen analysiert, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind.

Es konnte die Expression von Genen mit eindeutig pro-apoptotischer Funktion (LT- α , TRAIL, DR-6, TRIP, FADD, BAK, BAX, BOK, BIK, Caspase 9 und Atm) und eindeutig anti-apoptotischer Funktion (APRIL, BCL-X, MCL-1, NAIP 1 und 5, Nop 30-like und Mdm 2) nachgewiesen werden. Gleichzeitig fanden sich auch Gene, denen sich keine eindeutige pro- oder anti-apoptotische Funktion zuschreiben lässt. (LT- β Rezeptor, TNFR 2, Tnfrsf 9, RANK, DR-3, TRAF 1 und Gadd 45a)

Betrachtet man die Expressionsverläufe aller in den Array-Untersuchungen analysierten Gene im Überblick so fällt auf, dass die Expression proapoptotischer Gene zu allen Zeitpunkten, sowohl was das Expressionsniveau als auch die Anzahl der exprimierten Gene betrifft, diejenige der antiapoptotischen überwiegt. Vor allem durch den Rückgang der Expression anti-apoptotischer Gene bedingt, stellte sich diese Differenz am Tag 1 nach Tumorzellinjektion besonders deutlich dar, was für eine wirksame Apoptose zu diesem Zeitpunkt spricht.

Dies ändert sich bis zum Tag 3 nach Tumorzellinjektion mit einer Zunahme der insgesamt exprimierten Gene - sowohl der pro- als auch der anti-apoptotischen. Die Expressionsverläufe einiger anti-apoptotischer Gene besaßen zu diesem Zeitpunkt ein Maximum (APRIL, BCL-X,

NAIP 1/5, Nop 30 like), was man als Hinweis auf eine Apoptoseinduktion, die durch die gesteigerte Expression anti-apoptotischer Gene eine Gegenregulation erfährt interpretieren kann.

Da insgesamt nur am Tag 1 ein Hinweis auf gesteigerte Aktivierung der Apoptose auf Genexpressionsebene gefunden werden konnte, anhand der P-mel 17 Verlaufskurve allerdings bis einschließlich Tag 2 von einem gesteigerten Tumorzellverlust in den Lungen ausgegangen werden muss, und diese am Tag 1 beobachtete Regulation nur relativ schwach ausgeprägt ist, lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass auch andere Mechanismen, wie z.B. eine nekrotische Schädigung der Tumorzellen zum initialen Zellverlust beitragen.

Zur Beurteilung der lokalen Zytotoxizität wurde mittels PCR-Analyse der Expressionsverlauf von Fas in den Lungen nach der Tumorzellinjektion untersucht. Es ergab sich ein kontinuierlicher Rückgang der Fas-Expression. Bei gleichzeitigem Anstieg der Expression von Fas-L ist dies ein Hinweis auf die Elimination Fas-positiver Tumorzellen durch Zellen des Immunsystems.

Im weiteren Verlauf kommt es jedoch, wie der Expressionsverlauf des Markergens P-mel 17 und letztendlich die Bildung sichtbarer Metastasen an der Lungenoberfläche zeigt, zu einer Proliferation der initial überlebenden Zellen. Hier muss also zu späteren Zeitpunkten ein Überwiegen von Faktoren, die die Metastasierung begünstigen, vorliegen. Hierzu zählt die Expression von Genen, die wie MMP's, Semaphorine oder Wachstumsfaktoren die Invasivität, die Angiogenese und die Proliferation der Tumorzellen begünstigen können.

In den PCR-Untersuchungen der Expression von MMP 2, Semaphorin 3A, Semaphorin 4D und c-met (HGF-Rezeptor) konnte eine kontinuierlich hohe Expression über die Tage 2-6 nach Tumorzellinjektion gezeigt werden. Dies weist auf eine wichtige Bedeutung dieser Gene für die Metastasierung in diesem Modell hin. Interessanterweise konnte eine Expression von MMP 9, einem Gen, für das bereits viele wichtige Funktionen in der Metastasierung beschrieben wurden, nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu der über den gesamten Verlauf der Experimente hohen Expression von c-met, konnte keine nennenswerte Expression des zugehörigen Liganden HGF gefunden werden. Hieraus kann geschlossen werden, dass auch andere Wege der Aktivierung von c-met wie z.B. Oligomerisierung oder Aktivierung über Semaphorin 4D und Plexin B1 für die Metastasierung in den Experimenten dieser Arbeit eine Rolle spielen.

Der Verlauf der Expression von P-mel 17 zeigt, dass das initiale Überleben der Tumorzellen im Zielorgan der Metastasierung eine Schwachstelle der Metastasierungskaskade darstellt, und deshalb eine Intervention, die das initiale Überleben der Tumorzellen weiter reduziert, zu einer erfolgreichen Metastasenreduktion führen kann.

Thrombozyten können die Adhäsion von Tumorzellen am Gefäßendothel erleichtern und mit dem Blutstrom wandernde metastasierende Tumorzellen gegen auf sie einwirkende Scherkräfte und die Elimination durch Zellen des Immunsystems schützen. In den folgenden Experimenten wurde deshalb untersucht, ob eine antithrombozytäre Therapie die Metastasierung in diesem Modell erfolgreich reduzieren kann.

In einem ersten Versuch konnte die Metastasenanzahl an der Lungenoberfläche nach 9 Tagen durch verschiedene Thrombozytenaggregationshemmer gesenkt werden. Hierbei zeigte sich die Metastasenreduktion durch die Medikamente Aspirin, Clopidogrel und den GP IIb/IIIa Antagonisten EMD 122347 statistisch signifikant. Die deutlichste Reduktion wurde hierbei durch Antagonisierung des GP IIb/IIIa erreicht. Hieraus lässt sich eine Bedeutung der thrombozytären Funktionen für die Metastasierung ableiten. Die besonders effektive Metastasierungsreduktion unter Blockade des GP IIb/IIIa spricht für eine wichtige Funktion dieses Integrins im Rahmen der Metastasierung.

Hinweise für eine Bedeutung des GP IIb/IIIa auch zu späteren Zeitpunkten der Metastasierung konnten in weiteren Versuchen gewonnen werden. So ergab sich bei Gabe

von EMD 122347 über 5 Tage eine Metastasenreduktion um 32,2%, bei Therapie über 9 Tage dagegen um 51,8%. Statistisch signifikant war die Reduktion jedoch nur bei Therapie über 9 Tage.

Anhand der Expression wichtiger metastasierungsrelevanter Gene wurde im Weiteren untersucht, ob die Blockade des GP IIb/IIIa einen Einfluss auf das initiale Überleben, die gegen den Tumor gerichtete Immunabwehr, die Invasivität und das Wachstum besitzt. Dazu wurde die Expression der Gene P-mel 17, Fas, Fas-L, TRANCE, Semaphorine 3A und 4D, MMP 2 und MMP 9, HGF und c-met (HGF-Rezeptor) analysiert. Deutliche Unterschiede in der Expression unter Blockade des GP IIb/IIIa ergaben sich für die Gene P-mel 17, Fas, MMP 2 und c-met.

Im Vergleich zu nicht therapierten Tieren zeigte sich am Tag 2 ein deutlich niedrigeres Expressionsniveau für P-mel 17. Daraus kann man schließen, dass eine antithrombozytäre Therapie zu einer Reduktion des initialen Überlebens der Tumorzellen in den Lungen führt.

Ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus könnte die bessere Zugänglichkeit der Tumorzellen für Zellen des Immunsystems durch die Reduktion der Bindung von Thrombozyten auf der Tumorzelloberfläche sein. Dies wird unterstützt durch die Beobachtung, dass die Expression von Fas unter antithrombozytärer Therapie deutlich schneller abnahm, was auf eine effektivere Elimination Fas positiver Tumorzellen durch Immunzellen hinweist.

Gleichzeitig konnte aber auch unter GP IIb/IIIa Blockade eine frühere Reduktion der MMP 2 Expression gezeigt werden. Diese Verringerung der Invasivität unter der antithrombozytären Therapie kann ebenfalls ein Grund für die Reduktion des initialen Überlebens sein, da Tumorzellen intravasal den Scherkräften des Blutstroms und den Angriffen des Immunsystems vermehrt ausgesetzt sind.

Die Reduktion des initialen Überlebens und die Verringerung der Invasivität lassen auf eine Bedeutung der Blockade des GP IIb/IIIa vor allem in der frühen Phase der Metastasierung schließen. Aber auch zu späteren Zeitpunkten scheint die GP IIb/IIIa Blockade einen Einfluss auf die Metastasierung zu besitzen, da eine Verlängerung der antithrombozytären Therapie zu einer effektiveren Metastasierungsreduktion führt. Einen möglichen zugrundeliegenden Mechanismus zeigt die Analyse der Expression des HGF-Rezeptors c-met. Im Gegensatz zu dem nahezu gleichbleibend hohen Expressionsverlauf in der Kontrollgruppe ergab sich unter GP IIb/IIIa Blockade ein kontinuierliches Absinken dieses wichtigen Wachstumsfaktor-Rezeptors. Somit kann ein Einfluss der Therapie auch auf die Proliferation der Tumorzellen vermutet werden.

Klinische Bedeutung könnte die durch antithrombozytäre Therapie erreichte Reduktion des initialen Überlebens metastasierender Zellen im Zielorgan vor allem in Situationen mit potentieller Tumorzellaussaat wie z.B. Tumoroperationen besitzen. Der Vergleich der Metastasierungsraten von Patienten, die aufgrund anderer Vorerkrankungen einer antithrombozytären Therapie unterworfen sind, mit derjenigen nichttherapierter Patienten wäre hierzu ein interessanter Ansatz für klinische Studien.

6. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Georg Enders danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und für seine ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Alexander Baethmann danke ich für die Aufnahme an das Institut für Chirurgische Forschung. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl bedanken, unter dessen Leitung ich die vorliegende Arbeit abschliessen durfte.

Mein Dank gilt auch den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe Frau Birgit Lieske und Frau Costanza Chiapponi für ihre Unterstützung und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Ebenso danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern sowie Doktoranden im Hause.

Mein Dank gebührt auch Frau Claudia Fahney und Frau Bärbel Lorenz für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten.

Den Tierpflegern im Institut, insbesondere Frau Brigitte Blount, danke ich für die Pflege der Versuchstiere.

Herrn Ludwig Bothmann danke ich für die Hilfe und Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Meinen Eltern, Martha, meinem Bruder und meinen Freunden möchte ich für Ihre Unterstützung und Ermutigung danken.

7. Lebenslauf

Persönliche Daten

Benedikt Wolfgang Josef Kellermann
geboren am 24.06.1980 in München
Eltern: Prof. Dr. med. Wolfgang Kellermann
Dr. med. Ilse Kellermann, geb.Kleindienst

Schulische Ausbildung

1986-1990 Grundschule an der Grandlstraße München
1990-1999 Karls gymnasium München, humanistischer Zweig
Leistungskurse: Griechisch, Musik
1999 Abitur

Zivildienst

August 1999-Juni 2000
Krankenhaus Dritter Orden, anästhesiologische Pflege im OP

Universitäre Ausbildung

Wintersemester 2000/01 - Sommersemester 2007
Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
17.09.2002 Ärztliche Vorprüfung
28.08.2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06.04.2006 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
18.04.2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktika und Famulaturen

Mai-Juli 2002 Krankenhaus Dritter Orden, Endoskopie

Februar-März 2003 Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Chirurgie
Chefarzt Dr. med. Clemens Reuter

Juli-August 2004 Pathologisches Institut der LMU München
Direktor Prof. Dr. med. Udo Löhrs

August-September 2004 Krankenhaus München Schwabing
Anästhesiologische Intensivstation
Chefarzt: Prof. Dr. med. Wolfgang Kellermann

Juli 2005-2007 Klinikum Starnberg , Urologie Operationsassistentz
Dr. med Michael Pretorius

Praktisches Jahr

- 17.04.2006-06.08.2006 Medizinische Klinik Innenstadt der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med Martin Reincke
Abteilung für Hämatologie und Onkologie
- 07.08.2006-26.11.2006 Chirurgische Klinik und Poliklinik
Klinikum Großhadern der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med K.W. Jauch
Abteilungen für Viszeral und Thoraxchirurgie
- 27.11.2006-18.03.2007 Klinik für Anästhesiologie
Klinikum Großhadern der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr.h.c. Klaus Peter
Herzchirurgischer OP und Intensivstation am Augustinum

Weiterbildung

- Seit 08.06.2009 Assistenzarzt an der chirurgischen Klinik
Krankenhaus Martha Maria
Chefarzt: Prof. Dr. med. Heinrich Fürst

8. Literaturverzeichnis

1. Mathers C., Loncar D. WHO Global InfoBase; The impact of cancer in your country. [PLoS Medicine]. 2006;3. Available at:
<http://www.who.int/infobase/report.aspx?iso=DEU&rid=119&goButton>.
2. Sporn MB. The war on cancer. *Lancet* 1996;347:1377-81.
3. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat.Rev.Cancer* 2002;2:563-72.
4. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat.Med.* 2006;12:895-904.
5. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997;111:1710-7.
6. Berchtold R, Bruch H-P, Trenz O. *Chirurgie. 5., vollständig aktualisierte und überarbeitete Auflage* ed. München: Elsevier, Urban & Fischer, 2006.
7. Jung EG, Moll I. *Dermatologie. 5., komplett überarbeitete Auflage* ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2003.
8. Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 2006;127:679-95.
9. Stetler-Stevenson WG. Invasion and Metastases. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer principles & practice of oncology. 7th ed.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

10. Sahai E. Illuminating the metastatic process. *Nat.Rev.Cancer* 2007;7:737-49.
11. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
12. Fidler IJ. Biology of cancer metastasis. In: Abeloff MD, ed. *Clinical Oncology*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone, 2004.
13. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat.Rev.Cancer* 2002;2:161-74.
14. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25:9-34.
15. Tamagnone L, Comoglio PM. To move or not to move? Semaphorin signalling in cell migration. *EMBO Rep.* 2004;5:356-61.
16. Comoglio PM, Trusolino L. Invasive growth: from development to metastasis. *J.Clin.Invest* 2002;109:857-62.
17. Trusolino L, Comoglio PM. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat.Rev.Cancer* 2002;2:289-300.
18. Christensen CR, Klingelhofer J, Tarabykina S et al. Transcription of a novel mouse semaphorin gene, M-semaH, correlates with the metastatic ability of mouse tumor cell lines. *Cancer Res.* 1998;58:1238-44.
19. Eccles SA, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* 2007;369:1742-57.
20. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res.* 2006;66:8319-26.

21. Tse JC, Kalluri R. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J.Cell Biochem.* 2007;101:816-29.
22. Christofori G. Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. *EMBO J.* 2003;22:2318-23.
23. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64.
24. Chang YS, di TE, McDonald DM et al. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000;97:14608-13.
25. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat.Rev.Cancer* 2006;6:449-58.
26. Glinsky VV. Intravascular cell-to-cell adhesive interactions and bone metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25:531-40.
27. Oppenheimer SB. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. *Acta Histochem.* 2006;108:327-34.
28. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW et al. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 2004;5:241-51.
29. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C et al. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J.Exp.Med.* 2002;195:1303-16.
30. Mehta P. Potential role of platelets in the pathogenesis of tumor metastasis. *Blood* 1984;63:55-63.

31. Glinskii OV, Huxley VH, Glinsky GV et al. Mechanical entrapment is insufficient and intercellular adhesion is essential for metastatic cell arrest in distant organs. *Neoplasia*. 2005;7:522-7.
32. Wang H, Fu W, Im JH et al. Tumor cell alpha3beta1 integrin and vascular laminin-5 mediate pulmonary arrest and metastasis. *J.Cell Biol.* 2004;164:935-41.
33. Nash GF, Turner LF, Scully MF et al. Platelets and cancer. *Lancet Oncol.* 2002;3:425-30.
34. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005;438:820-7.
35. Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB et al. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat.Med.* 2000;6:100-2.
36. Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N et al. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res.* 2000;60:2541-6.
37. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am.J.Pathol.* 1998;153:865-73.
38. Yamada KM. Cell biology: tumour jailbreak. *Nature* 2003;424:889-90.
39. Townson JL, Naumov GN, Chambers AF. The role of apoptosis in tumor progression and metastasis. *Curr.Mol.Med.* 2003;3:631-42.

40. Letai AG. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat.Rev.Cancer* 2008;8:121-32.
41. Riede UN, Schaefer HE. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 4., aktualisierte Auflage ed. Stuttgart; New York: Thieme, 1999.
42. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat.Rev.Cancer* 2002;2:277-88.
43. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-6.
44. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 1972;26:239-57.
45. Kim JW, Wong CW, Goldsmith JD et al. Rapid apoptosis in the pulmonary vasculature distinguishes non-metastatic from metastatic melanoma cells. *Cancer Lett.* 2004;213:203-12.
46. Wong CW, Lee A, Shientag L et al. Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res.* 2001;61:333-8.
47. Cretney E, Takeda K, Yagita H et al. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J.Immunol.* 2002;168:1356-61.
48. Owen-Schaub LB, van Golen KL, Hill LL et al. Fas and Fas ligand interactions suppress melanoma lung metastasis. *J.Exp.Med.* 1998;188:1717-23.
49. Jurasz P, Alonso-Escolano D, Radomski MW. Platelet--cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. *Br.J.Pharmacol.* 2004;143:819-26.

50. Sierko E, Wojtukiewicz MZ. Inhibition of platelet function: does it offer a chance of better cancer progression control? *Semin.Thromb.Hemost.* 2007;33:712-21.
51. Gawaz MP. *Das Blutplättchen*
Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Stuttgart: Thieme, 1999.
52. Nierodzik ML, Plotkin A, Kajumo F et al. Thrombin stimulates tumor-platelet adhesion in vitro and metastasis in vivo. *J.Clin.Invest* 1991;87:229-36.
53. Nierodzik ML, Klepfish A, Karpatkin S. Role of platelets, thrombin, integrin IIb-IIIa, fibronectin and von Willebrand factor on tumor adhesion in vitro and metastasis in vivo. *Thromb.Haemost.* 1995;74:282-90.
54. Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* 2007;110:1723-9.
55. Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1968;61:46-52.
56. Hejna M, Raderer M, Zielinski CC. Inhibition of metastases by anticoagulants. *J.Natl.Cancer Inst.* 1999;91:22-36.
57. Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M et al. Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation and lung metastasis by the oral GpIIb/IIIa antagonist XV454. *Thromb.Haemost.* 2003;90:549-54.
58. Bakewell SJ, Nestor P, Prasad S et al. Platelet and osteoclast beta3 integrins are critical for bone metastasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003;100:14205-10.

59. Falanga A. The effect of anticoagulant drugs on cancer. *J.Thromb.Haemost.* 2004;2:1263-5.
60. Rothwell PM, Wilson M, Price JF et al. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. *Lancet* 2012.
61. Ma PC, Maulik G, Christensen J et al. c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev.* 2003;22:309-25.
62. Hart IR. The selection and characterization of an invasive variant of the B16 melanoma. *Am.J.Pathol.* 1979;97:587-600.
63. Dickfeld T, Ruf A, Pogatsa-Murray G et al. Differential antiplatelet effects of various glycoprotein IIb-IIIa antagonists. *Thromb.Res.* 2001;101:53-64.
64. MacEwan DJ. TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *Br.J.Pharmacol.* 2002;135:855-75.
65. Clarke N, Nebbioso A, Altucci L et al. TRAIL: at the center of drugable anti-tumor pathways. *Cell Cycle* 2005;4:914-8.
66. Paul NL, Ruddle NH. Lymphotoxin. *Annu.Rev.Immunol.* 1988;6:407-38.
67. Hahne M, Kataoka T, Schroter M et al. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J.Exp.Med.* 1998;188:1185-90.
68. Norris PS, Ware CF. The LT beta R signaling pathway. *Adv.Exp.Med.Biol.* 2007;597:160-72.
69. Schwarz H. Biological activities of reverse signal transduction through CD137 ligand. *J.Leukoc.Biol.* 2005;77:281-6.

70. Simon HU. Evidence for a pro-apoptotic function of CD137 in granulocytes. *Swiss.Med.Wkly.* 2001;131:455-8.
71. Wong BR, Josien R, Choi Y. TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *J.Leukoc.Biol.* 1999;65:715-24.
72. Kim YM, Kim YM, Lee YM et al. TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE) induces angiogenesis through the activation of Src and phospholipase C (PLC) in human endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 2002;277:6799-805.
73. Marsters SA, Sheridan JP, Donahue CJ et al. Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B. *Curr.Biol.* 1996;6:1669-76.
74. Pan G, Bauer JH, Haridas V et al. Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett.* 1998;431:351-6.
75. Bradley JR, Pober JS. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 2001;20:6482-91.
76. Lee SY, Lee SY, Choi Y. TRAF-interacting protein (TRIP): a novel component of the tumor necrosis factor receptor (TNFR)- and CD30-TRAF signaling complexes that inhibits TRAF2-mediated NF-kappaB activation. *J.Exp.Med.* 1997;185:1275-85.
77. Besse A, Campos AD, Webster WK et al. TRAF-interacting protein (TRIP) is a RING-dependent ubiquitin ligase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2007;359:660-4.
78. Bouchier-Hayes L, Martin SJ. CARD games in apoptosis and immunity. *EMBO Rep.* 2002;3:616-21.

79. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-6.
80. Liston P, Fong WG, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* 2003;22:8568-80.
81. Sanna MG, da Silva CJ, Ducrey O et al. IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. *Mol. Cell Biol.* 2002;22:1754-66.
82. Yaraghi Z, Korneluk RG, MacKenzie A. Cloning and characterization of the multiple murine homologues of NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein). *Genomics* 1998;51:107-13.
83. Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death.Differ.* 2006;13:1027-36.
84. Meulmeester E, Pereg Y, Shiloh Y et al. ATM-mediated phosphorylations inhibit Mdmx/Mdm2 stabilization by HAUSP in favor of p53 activation. *Cell Cycle* 2005;4:1166-70.
85. Hildesheim J, Fornace AJ, Jr. Gadd45a: an elusive yet attractive candidate gene in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 2002;8:2475-9.
86. Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J.Natl.Cancer Inst.* 1970;45:773-82.
87. Alvarez E. B16 murine melanoma: historical perspective on the development of a solid tumor model. In: Teicher BA, ed. *Tumor models in cancer research*. Totowa, N.J: Humana Press, 2002:73-89.

88. Fidler IJ. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat.New Biol.* 1973;242:148-9.
89. Poste G, Doll J, Hart IR et al. In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. *Cancer Res.* 1980;40:1636-44.
90. Khanna C, Hunter K. Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* 2005;26:513-23.
91. Yoshikawa N, Nakamura K, Yamaguchi Y et al. Suitable indices for evaluating the intensity of tumor metastasis in a mouse experimental metastatic model. *In Vivo* 2001;15:485-8.
92. Dogne JM, de L, X, Benoit P et al. Recent advances in antiplatelet agents. *Curr.Med.Chem.* 2002;9:577-89.
93. McNicol A, Israels SJ. Platelets and anti-platelet therapy. *J.Pharmacol.Sci.* 2003;93:381-96.
94. Bartlett JMS, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. In: Bartlett JMS, Stirling D, eds. *PCR protocols*. 2nd ed ed. Totowa, N.J: Humana Press, 2003:3-6.
95. Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991;252:1643-51.
96. Löffler G. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 4., korr. Aufl ed. Berlin: Springer, 2001.
97. Foley KP, Leonard MW, Engel JD. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Trends Genet.* 1993;9:380-5.

98. Ferre F. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Appl.* 1992;2:1-9.
99. Nakayama H, Yokoi H, Fujita J. Quantification of mRNA by non-radioactive RT-PCR and CCD imaging system. *Nucleic Acids Res.* 1992;20:4939.
100. Stahlberg A, Hakansson J, Xian X et al. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin.Chem.* 2004;50:509-15.
101. Jung R, Soondrum K, Neumaier M. Quantitative PCR. *Clin.Chem.Lab Med.* 2000;38:833-6.
102. Said HM, Polat B, Hagemann C et al. Absence of GAPDH regulation in tumor-cells of different origin under hypoxic conditions in - vitro. *BMC.Res.Notes* 2009;2:8.
103. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.* 2000;25:169-93.
104. Fox-Brashears H, Quellhorst G, Blanchard R et al. Oligo GEArrays: The pathway-focused DNA microarray system for every laboratory. [www.SABiosciences.com]. 2009; Available at: <http://www.sabiosciences.com/manuals/DNAMicroarrays.pdf>.
105. Kwon BS, Chintamaneni C, Kozak CA et al. A melanocyte-specific gene, Pmel 17, maps near the silver coat color locus on mouse chromosome 10 and is in a syntenic region on human chromosome 12. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991;88:9228-32.
106. Kobayashi T, Urabe K, Orlow SJ et al. The Pmel 17/silver locus protein. Characterization and investigation of its melanogenic function. *J.Biol.Chem.* 1994;269:29198-205.

107. Davids V, Kidson SH, Hanekom GS. Accurate molecular detection of melanoma nodal metastases: an assessment of multimarker assay specificity, sensitivity, and detection rate. *Mol.Pathol.* 2003;56:43-51.
108. Reynolds SR, Albrecht J, Shapiro RL et al. Changes in the presence of multiple markers of circulating melanoma cells correlate with clinical outcome in patients with melanoma. *Clin.Cancer Res.* 2003;9:1497-502.
109. Dillon SR, Gross JA, Ansell SM et al. An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2006;5:235-46.
110. He B, Chadburn A, Jou E et al. Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL. *J.Immunol.* 2004;172:3268-79.
111. Ito D, Back TC, Shakhov AN et al. Mice with a targeted mutation in lymphotoxin-alpha exhibit enhanced tumor growth and metastasis: impaired NK cell development and recruitment. *J.Immunol.* 1999;163:2809-15.
112. Dobrzanski MJ, Reome JB, Hollenbaugh JA et al. Effector cell-derived lymphotoxin alpha and Fas ligand, but not perforin, promote Tc1 and Tc2 effector cell-mediated tumor therapy in established pulmonary metastases. *Cancer Res.* 2004;64:406-14.
113. Wang S, El-Deiry WS. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 2003;22:8628-33.
114. Wang S. The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway. *Oncogene* 2008;27:6207-15.

115. Shin MS, Kim HS, Lee SH et al. Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res.* 2001;61:4942-6.
116. Zhuang L, Lee CS, Scolyer RA et al. Progression in melanoma is associated with decreased expression of death receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Hum.Pathol.* 2006;37:1286-94.
117. Lukashev M, LePage D, Wilson C et al. Targeting the lymphotoxin-beta receptor with agonist antibodies as a potential cancer therapy. *Cancer Res.* 2006;66:9617-24.
118. Dhawan P, Su Y, Thu YM et al. The lymphotoxin-beta receptor is an upstream activator of NF-kappaB-mediated transcription in melanoma cells. *J.Biol.Chem.* 2008;283:15399-408.
119. Winter H, van den Engel NK, Poehlein CH et al. Tumor-specific T cells signal tumor destruction via the lymphotoxin beta receptor. *J.Transl.Med.* 2007;5:14.
120. Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem.Pharmacol.* 2003;66:1403-8.
121. Arnott CH, Scott KA, Moore RJ et al. Expression of both TNF-alpha receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development. *Oncogene* 2004;23:1902-10.
122. Ju SA, Lee SC, Kwon TH et al. Immunity to melanoma mediated by 4-1BB is associated with enhanced activity of tumour-infiltrating lymphocytes. *Immunol.Cell Biol.* 2005;83:344-51.

123. Cheuk AT, Mufti GJ, Guinn BA. Role of 4-1BB:4-1BB ligand in cancer immunotherapy. *Cancer Gene Ther.* 2004;11:215-26.
124. Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N.Engl.J.Med.* 2004;350:1655-64.
125. Luo JL, Tan W, Ricono JM et al. Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. *Nature* 2007;446:690-4.
126. Gout S, Morin C, Houle F et al. Death receptor-3, a new E-Selectin counter-receptor that confers migration and survival advantages to colon carcinoma cells by triggering p38 and ERK MAPK activation. *Cancer Res.* 2006;66:9117-24.
127. Arron JR, Walsh MC, Choi Y. TRAF-mediated TNFR-family signaling. *Curr.Protoc.Immunol.* 2002;Chapter 11:Unit.
128. Zhang B, Wang Z, Li T et al. NF-kappaB2 mutation targets TRAF1 to induce lymphomagenesis. *Blood* 2007;110:743-51.
129. Fesik SW. Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 2000;103:273-82.
130. Tchernev G, Orfanos CE. Downregulation of cell cycle modulators p21, p27, p53, Rb and proapoptotic Bcl-2-related proteins Bax and Bak in cutaneous melanoma is associated with worse patient prognosis: preliminary findings. *J.Cutan.Pathol.* 2007;34:247-56.
131. Liu J, Yin S, Reddy N et al. Bax mediates the apoptosis-sensitizing effect of maspin. *Cancer Res.* 2004;64:1703-11.

132. Singh M, Singh N. Induction of apoptosis by hydrogen peroxide in HPV 16 positive human cervical cancer cells: involvement of mitochondrial pathway. *Mol.Cell Biochem.* 2008;310:57-65.
133. Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ et al. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 1997;385:637-40.
134. Zou Y, Peng H, Zhou B et al. Systemic tumor suppression by the proapoptotic gene bik. *Cancer Res.* 2002;62:8-12.
135. Yakovlev AG, Di GS, Wang G et al. BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *J.Biol.Chem.* 2004;279:28367-74.
136. Fernandez Y, Espana L, Manas S et al. Bcl-xL promotes metastasis of breast cancer cells by induction of cytokines resistance. *Cell Death.Differ.* 2000;7:350-9.
137. Zhuang L, Lee CS, Scolyer RA et al. Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma. *Mod.Pathol.* 2007;20:416-26.
138. Choi J, Hwang YK, Choi YJ et al. Neuronal apoptosis inhibitory protein is overexpressed in patients with unfavorable prognostic factors in breast cancer. *J.Korean Med.Sci.* 2007;22 Suppl:S17-S23.
139. Nemoto T, Kitagawa M, Hasegawa M et al. Expression of IAP family proteins in esophageal cancer. *Exp.Mol.Pathol.* 2004;76:253-9.
140. Gustafsson AB, Tsai JG, Logue SE et al. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain protects against cell death by interfering with Bax activation. *J.Biol.Chem.* 2004;279:21233-8.

141. Nam YJ, Mani K, Wu L et al. The apoptosis inhibitor ARC undergoes ubiquitin-proteasomal-mediated degradation in response to death stimuli: identification of a degradation-resistant mutant. *J.Biol.Chem.* 2007;282:5522-8.
142. Lavin MF. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2008;9:759-69.
143. Waha A, Sturme C, Kessler A et al. Expression of the ATM gene is significantly reduced in sporadic breast carcinomas. *Int.J.Cancer* 1998;78:306-9.
144. Yu G, Zhu MH, Zhu Z et al. Expression of ATM protein and its relationship with p53 in pancreatic carcinoma with tissue array. *Pancreas* 2004;28:421-6.
145. Foo RS, Chan LK, Kitsis RN et al. Ubiquitination and degradation of the anti-apoptotic protein ARC by MDM2. *J.Biol.Chem.* 2007;282:5529-35.
146. Li Y, Qian H, Li X et al. Adenoviral-mediated gene transfer of Gadd45a results in suppression by inducing apoptosis and cell cycle arrest in pancreatic cancer cell. *J.Gene Med.* 2009;11:3-13.
147. Lu X, Yang C, Hill R et al. Inactivation of gadd45a sensitizes epithelial cancer cells to ionizing radiation in vivo resulting in prolonged survival. *Cancer Res.* 2008;68:3579-83.
148. Napieralski R, Ott K, Kremer M et al. Combined GADD45A and thymidine phosphorylase expression levels predict response and survival of neoadjuvant-treated gastric cancer patients. *Clin.Cancer Res.* 2005;11:3025-31.
149. O'Connell J. Fas ligand and the fate of antitumour cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 2002;105:263-6.

150. Ugurel S, Rappl G, Tilgen W et al. Increased soluble CD95 (sFas/CD95) serum level correlates with poor prognosis in melanoma patients. *Clin.Cancer Res.* 2001;7:1282-6.
151. Koshkina NV, Khanna C, Mendoza A et al. Fas-negative osteosarcoma tumor cells are selected during metastasis to the lungs: the role of the Fas pathway in the metastatic process of osteosarcoma. *Mol.Cancer Res.* 2007;5:991-9.
152. Soubrane C, Mouawad R, Antoine EC et al. A comparative study of Fas and Fas-ligand expression during melanoma progression. *Br.J.Dermatol.* 2000;143:307-12.
153. Mottolese M, Buglioni S, Bracalenti C et al. Prognostic relevance of altered Fas (CD95)-system in human breast cancer. *Int.J.Cancer* 2000;89:127-32.
154. Nozoe T, Yasuda M, Honda M et al. Fas ligand expression is correlated with metastasis in colorectal carcinoma. *Oncology* 2003;65:83-8.
155. Ivanov VN, Bhoumik A, Ronai Z. Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene* 2003;22:3152-61.
156. Wong BR, Josien R, Lee SY et al. The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *J.Biol.Chem.* 1998;273:28355-9.
157. Lu X, Kang Y. Organotropism of breast cancer metastasis. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 2007;12:153-62.
158. Gaggioli C, Sahai E. Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res.* 2007;20:161-72.
159. Overall CM, Kleinfeld O. Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat.Rev.Cancer* 2006;6:227-39.

160. Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim.Biophys.Acta* 2004;1705:69-89.
161. Vaisanen AH, Kallioinen M, Turpeenniemi-Hujanen T. Comparison of the prognostic value of matrix metalloproteinases 2 and 9 in cutaneous melanoma. *Hum.Pathol.* 2008;39:377-85.
162. Gorzelanny C, Poppelmann B, Strozyk E et al. Specific interaction between chitosan and matrix metalloprotease 2 decreases the invasive activity of human melanoma cells. *Biomacromolecules.* 2007;8:3035-40.
163. Chu CS, Xue B, Tu C et al. NRAGE suppresses metastasis of melanoma and pancreatic cancer in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* 2007;250:268-75.
164. Li J, Lau GK, Chen L et al. Interleukin 17A promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF-kB induced matrix metalloproteinases 2 and 9 expression. *PLoS.One.* 2011;6:e21816.
165. Bjorklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim.Biophys.Acta* 2005;1755:37-69.
166. Koop S, Khokha R, Schmidt EE et al. Overexpression of metalloproteinase inhibitor in B16F10 cells does not affect extravasation but reduces tumor growth. *Cancer Res.* 1994;54:4791-7.
167. Xu J, Rodriguez D, Petitclerc E et al. Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *J.Cell Biol.* 2001;154:1069-79.

168. Fang J, Shing Y, Wiederschain D et al. Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000;97:3884-9.
169. Bergers G, Brekken R, McMahon G et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat.Cell Biol.* 2000;2:737-44.
170. Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H et al. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell* 2003;3:589-601.
171. Deryugina EI, Zijlstra A, Partridge JJ et al. Unexpected effect of matrix metalloproteinase down-regulation on vascular intravasation and metastasis of human fibrosarcoma cells selected in vivo for high rates of dissemination. *Cancer Res.* 2005;65:10959-69.
172. van den Oord JJ, Paemen L, Opdenakker G et al. Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. *Am.J.Pathol.* 1997;151:665-70.
173. Hofmann UB, Eggert AA, Blass K et al. Expression of matrix metalloproteinases in the microenvironment of spontaneous and experimental melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation. *Cancer Res.* 2003;63:8221-5.
174. Catalano A, Caprari P, Rodilossi S et al. Cross-talk between vascular endothelial growth factor and semaphorin-3A pathway in the regulation of normal and malignant mesothelial cell proliferation. *FASEB J.* 2004;18:358-60.
175. Herman JG, Meadows GG. Increased class 3 semaphorin expression modulates the invasive and adhesive properties of prostate cancer cells. *Int.J.Oncol.* 2007;30:1231-8.

176. Acevedo LM, Barillas S, Weis SM et al. Semaphorin 3A suppresses VEGF-mediated angiogenesis yet acts as a vascular permeability factor. *Blood* 2008;111:2674-80.
177. Catalano A, Caprari P, Moretti S et al. Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T-cell signal transduction and function. *Blood* 2006;107:3321-9.
178. Muller MW, Giese NA, Swiercz JM et al. Association of axon guidance factor semaphorin 3A with poor outcome in pancreatic cancer. *Int.J.Cancer* 2007;121:2421-33.
179. Basile JR, Castilho RM, Williams VP et al. Semaphorin 4D provides a link between axon guidance processes and tumor-induced angiogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2006;103:9017-22.
180. Sierra JR, Corso S, Caione L et al. Tumor angiogenesis and progression are enhanced by Sema4D produced by tumor-associated macrophages. *J.Exp.Med.* 2008;205:1673-85.
181. Conrotto P, Valdembri D, Corso S et al. Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1. *Blood* 2005;105:4321-9.
182. Giordano S, Corso S, Conrotto P et al. The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nat.Cell Biol.* 2002;4:720-4.
183. Knudsen BS, Vande WG. Showering c-MET-dependent cancers with drugs. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2008;18:87-96.
184. Xiao GH, Jeffers M, Bellacosa A et al. Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001;98:247-52.

185. Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M et al. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J.Cell Biol.* 1992;119:629-41.
186. Xin X, Yang S, Ingle G et al. Hepatocyte growth factor enhances vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo. *Am.J.Pathol.* 2001;158:1111-20.
187. Rosenthal EL, Johnson TM, Allen ED et al. Role of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in epidermal growth factor- and scatter factor-stimulated invasion of carcinoma cells. *Cancer Res.* 1998;58:5221-30.
188. Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T et al. Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* 1991;67:901-8.
189. Gentile A, Trusolino L, Comoglio PM. The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2008;27:85-94.
190. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M et al. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 2003;3:347-61.
191. Wang R, Ferrell LD, Faouzi S et al. Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *J.Cell Biol.* 2001;153:1023-34.
192. Zeng ZS, Weiser MR, Kuntz E et al. c-Met gene amplification is associated with advanced stage colorectal cancer and liver metastases. *Cancer Lett.* 2008;265:258-69.
193. Taulli R, Scuoppo C, Bersani F et al. Validation of met as a therapeutic target in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* 2006;66:4742-9.

194. Lutterbach B, Zeng Q, Davis LJ et al. Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival. *Cancer Res.* 2007;67:2081-8.
195. Corso S, Migliore C, Ghiso E et al. Silencing the MET oncogene leads to regression of experimental tumors and metastases. *Oncogene* 2008;27:684-93.
196. Eccles SA. Targeting key steps in metastatic tumour progression. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2005;15:77-86.
197. Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C et al. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat.Rev.Cancer* 2012;12:89-103.
198. Trikha M, Zhou Z, Timar J et al. Multiple roles for platelet GPIIb/IIIa and alphavbeta3 integrins in tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res.* 2002;62:2824-33.
199. Lemoine NR. Antithrombotic therapy in cancer. *J.Clin.Oncol.* 2005;23:2119-20.
200. McCarty OJ, Mousa SA, Bray PF et al. Immobilized platelets support human colon carcinoma cell tethering, rolling, and firm adhesion under dynamic flow conditions. *Blood* 2000;96:1789-97.
201. Felding-Habermann B, Habermann R, Saldivar E et al. Role of beta3 integrins in melanoma cell adhesion to activated platelets under flow. *J.Biol.Chem.* 1996;271:5892-900.
202. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B et al. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.* 1999;59:1295-300.

203. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 2005;105:178-85.
204. Placke T, Orgel M, Schaller M et al. Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res.* 2012;72:440-8.
205. Nierodzik ML, Karpatkin S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell* 2006;10:355-62.
206. Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int.J.Cancer* 2005;113:752-60.
207. Janowska-Wieczorek A, Marquez-Curtis LA, Wysoczynski M et al. Enhancing effect of platelet-derived microvesicles on the invasive potential of breast cancer cells. *Transfusion* 2006;46:1199-209.
208. Gupta GP, Massague J. Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link. *J.Clin.Invest* 2004;114:1691-3.
209. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* 2011;20:576-90.
210. Gay LJ, Felding-Habermann B. Platelets alter tumor cell attributes to propel metastasis: programming in transit. *Cancer Cell* 2011;20:553-4.

211. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat.Rev.Cancer* 2002;2:38-47.
212. Lonsdorf AS, Kramer BF, Fahrleitner M et al. Engagement of alphaIIb beta3 (GPIIb/IIIa) with alpha v beta3 integrin mediates interaction of melanoma cells with platelets: a connection to hematogenous metastasis. *J.Biol.Chem.* 2012;287:2168-78.
213. McGregor BC, McGregor JL, Weiss LM et al. Presence of cytoadhesins (IIb-IIIa-like glycoproteins) on human metastatic melanomas but not on benign melanocytes. *Am.J.Clin.Pathol.* 1989;92:495-9.
214. Puerschel WC, Gawaz M, Worret WI et al. Immunoreactivity of glycoprotein IIb is present in metastasized but not in non-metastasized primary malignant melanoma. *Br.J.Dermatol.* 1996;135:883-7.
215. Kienast Y, von BL, Fuhrmann M et al. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat.Med.* 2010;16:116-22.
216. Dashevsky O, Varon D, Brill A. Platelet-derived microparticles promote invasiveness of prostate cancer cells via upregulation of MMP-2 production. *Int.J.Cancer* 2009;124:1773-7.
217. Sun J, Hemler ME. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res.* 2001;61:2276-81.
218. Schmidt R, Bultmann A, Fischel S et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor kappaB-dependent inflammation in monocytes. *Circ.Res.* 2008;102:302-9.

219. Lindenmeyer F, Legrand Y, Menashi S. Upregulation of MMP-9 expression in MDA-MB231 tumor cells by platelet granular membrane. *FEBS Lett.* 1997;418:19-22.
220. Suzuki K, Aiura K, Ueda M et al. The influence of platelets on the promotion of invasion by tumor cells and inhibition by antiplatelet agents. *Pancreas* 2004;29:132-40.
221. Zhu L, Bergmeier W, Wu J et al. Regulated surface expression and shedding support a dual role for semaphorin 4D in platelet responses to vascular injury. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2007;104:1621-6.
222. Boccaccio C, Sabatino G, Medico E et al. The MET oncogene drives a genetic programme linking cancer to haemostasis. *Nature* 2005;434:396-400.
223. Boccaccio C, Comoglio PM. A functional role for hemostasis in early cancer development. *Cancer Res.* 2005;65:8579-82.
224. Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat.Rev.Cancer* 2011;11:123-34.