

**Veränderte Wachstumsfaktorexpression in der Tumorprogression humaner
Plattenepithelkarzinome der Haut: Einfluss auf Tumor-Stroma Interaktion,
Invasion und Angiogenese**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik der
Johann Wolfgang Goethe-Universität in
Frankfurt am Main

von

Eva Obermüller

aus

Frankfurt am Main

Frankfurt 2004

vom Fachbereich Biologie und Informatik der Johann Wolfgang Goethe-Universität als
Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Heinz D. Osiewacz
Gutachter: Prof. Dr. Annegret Starzinski-Powitz
Prof. Dr. Norbert E. Fusenig

Datum der Disputation:

**It has recently been discovered that
research causes cancer in laboratory mice.**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Die Haut	9
1.2	Mehrstuufenprozess der epithelialen Hautkarzinogenese	10
1.2.1	<i>In vitro</i> Modelle der epithelialen Hautkarzinogenese	11
1.2.1.1	Genetische Merkmale des HaCaT-Systems	11
1.2.1.2	Einführung des <i>ras</i> -Onkogens in das HaCaT-System.....	12
1.2.1.3	Wachstumsverhalten benigner und maligner HaCaT- <i>ras</i> Klone	14
1.3	Neu-Expression von G-CSF und GM-CSF in Tumoren	15
1.3.1	G-CSF („Granulozyten Kolonie-Stimulierender Faktor“) und GM-CSF („Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor“)	16
1.3.2	Wirkung von G-CSF und GM-CSF	16
1.4	Tumor-Stroma Interaktionen in der Tumorentwicklung	18
1.5	Angiogenese	20
1.6	Die Rolle der inflammatorischen Zellen in der Tumorumgebung	21
1.7	Matrix Metalloproteinasen	22
1.7.1	Regulation der Matrix Metalloproteinasen	25
1.7.2	Proteolyse in Tumoren	25
2	Zielsetzung	27
3	Materialien und Methoden	29
3.1	Verwendete Zelllinien	29
3.2	Zellkultur	30
3.2.1	Zellen und Kulturbedingungen.....	31
3.2.2	Einfrieren von Zellen	33
3.2.3	Test auf Mykoplasmenkontamination	34
3.3	Proliferationstests	35
3.3.1	BrdU-ELISA	35
3.3.2	Proliferationsnachweis mit SYBR ^R Green	35
3.3.3	Wachstumskurven	36
3.3.3.1	Proliferations-Wachstumskurven	36
3.4	Migrationstest	36
3.5	<i>In vitro</i> Tumorigenitätstest: Organotypische Kulturen	38
3.5.1	Isolierung von Kollagen	38
3.6	<i>In vivo</i> Tumorigenitätstest	39
3.6.1	Subkutane Injektion.....	39
3.6.1.1	Rekultivierung von Tumorgewebe.....	39
3.6.2	Versuche zur Metastasierung	39
3.6.3	Oberflächentransplantation	40
3.6.3.1	Herstellung der Kollagengele.....	40
3.6.3.2	Herstellung der Transplantationskammern und Transplantation	41
3.6.4	Gewebeaufbereitung.....	42
3.6.5	Histologie	42
3.6.6	Gefrierschnitte	42

3.7	Indirekte Immunfluoreszenz	43
3.7.1	Standardprotokoll der indirekten Immunfluoreszenz.....	43
3.7.1.1	Primärantikörper.....	45
3.7.1.2	Sekundärantikörper	46
3.8	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung	46
3.8.1	Fixierung der Präparate	47
3.8.2	Synthese von Dig-markierten RNA-Sonden (<i>in vitro</i> Transkription).....	47
3.8.3	Dot Blot	48
3.8.4	Vorbehandlung der Präparate.....	48
3.8.4.1	Behandlung mit Proteinase K.....	48
3.8.4.2	Acetylierung	48
3.8.5	Hybridisierung.....	48
3.8.6	Protokoll für AP-Reaktion mit normalem Substrat.....	49
3.8.7	Protokoll für Dig-Nachweis ohne Substrat	49
3.8.8	Protokoll für AP-Reaktion mit fluoreszierendem Substrat	49
3.9	Präparation und Analyse von RNA	52
3.9.1	Isolation von RNA aus Gewebekulturzellen.....	52
3.9.2	RT-PCR.....	52
3.9.3	PCR-Bedingungen.....	55
3.9.4	Agarose-Gel-Elektrophorese.....	55
3.10	ELISA	56
3.10.1	Herstellung konditionierter Medien	56
3.11	Zusätzliche Materialien	57
3.11.1	Geräte	57
3.11.2	Software zur Morphometrischen Quantifizierung.....	57
4	Ergebnisse	58
4.1	Rolle von G-CSF und GM-CSF in der Entstehung epithelialer Tumore	58
4.1.1	Charakterisierung der Genexpression von HaCaT- <i>ras</i> A-5 Zellen und mit G-CSF oder GM-CSF transfizierter Zellen	60
4.2	Bedeutung des G-CSF/G-CSF-Rezeptor und GM-CSF/GM-CSF-Rezeptor-Systems für Proliferation und Migration <i>in vitro</i>	61
4.2.1	Wachstum der transfizierten Zellen in 2-D-Gewebekulturen	61
4.2.2	Stimulation der Proliferation der benignen HaCaT- <i>ras</i> A-5 Zellen durch Gabe von G-CSF und GM-CSF in 2-D-Gewebekulturen.....	62
4.2.3	Stimulation der Proliferation transfizierter A-5 Zellen durch zusätzliche Gabe von G-CSF und GM-CSF in 2-D-Gewebekulturen.....	63
4.2.4	Wachstum der transfizierten Zellen in 3-D organotypischen Kulturen	65
4.2.5	Blockierung der Proliferation der transfizierten Zellen durch neutralisierende Antikörper in 2-D-Gewebekulturen.....	65
4.2.6	Stimulation der Migration durch Gabe von G-CSF oder GM-CSF	66
4.2.7	Blockierung der Migration Wachstumsfaktor bildender Zellen durch neutralisierende Antikörper	67
4.3	Bedeutung von G-CSF und GM-CSF für Tumorwachstum und Angiogenese in Subkutantumoren	67
4.3.1	Konstitutive Expression von G-CSF oder GM-CSF resultiert in verändertem Tumorwachstum	68
4.3.2	<i>In vivo</i> Progression der mit G-CSF transfizierten Zellen resultiert in hochgradig malignen Zellen	70

4.3.2.1	Veränderte Genexpression nach <i>in vivo</i> Progression	72
4.3.2.2	Analyse des Metastasierungspotentials	74
4.3.3	Charakterisierung des Wachstumspotentials der transfizierten Zellen <i>in vivo</i>	74
4.3.4	Vaskularisierung der Subkutantumore	75
4.3.5	Verstärkte epitheliale Proliferation der G-CSF und GM-CSF exprimierenden Zellen	76
4.4	Untersuchung der Tumor-Stroma Interaktionen in Subkutantumoren und Oberflächentransplantationen	77
4.4.1	Oberflächentransplantation als Modell zur Analyse der Stroma-Aktivierung	77
4.4.2	Entwicklung des Epithels aus G-CSF oder GM-CSF transfizierten Zellen bzw. Kontrollzellen in Oberflächentransplantaten <i>in vivo</i>	79
4.4.3	Durch G-CSF und GM-CSF induzierte Aktivierung des Tumor-Stromas und Angiogenese	80
4.4.3.1	Dynamik der durch G-CSF und GM-CSF induzierten Angiogenese.....	81
4.4.3.2	Durch G-CSF und GM-CSF induzierte zelluläre Veränderungen im Stroma	84
4.4.3.2.1	Neutrophile Granulozyten	85
4.4.3.2.2	Makrophagen.....	87
4.4.4	Induktion von Matrix Metalloproteinasen durch G-CSF und GM-CSF	90
4.4.4.1	Expression von MMPs <i>in vitro</i>	91
4.4.4.2	Expression von MMPs <i>in vivo</i>	92
4.5	Mechanismen des Effekts von GM-CSF auf Tumor und Stroma	102
4.5.1	Expression von IL-6 induziert durch GM-CSF?	102
5	Diskussion.....	106
5.1	Effekte von G-CSF und GM-CSF auf Tumorzellen <i>in vitro</i>	106
5.2	Einfluss von G-CSF und GM-CSF auf Tumorwachstum und –Progression <i>in vivo</i>...	107
5.3	Durch G-CSF und GM-CSF induzierte stromale Veränderungen	109
5.3.1	Angiogenese	109
5.3.2	Inflammatorische Zellen	112
5.3.2.1	Granulozyten	112
5.3.2.2	Makrophagen.....	113
5.3.3	Induktion von IL-6 durch GM-CSF	115
5.3.4	Matrix Metalloproteinasen	116
5.3.4.1	Expression von Matrix Metalloproteinasen	118
5.3.4.2	Matrix Metalloproteinasen und die Invasion	122
5.3.4.3	Matrix Metalloproteinasen und die Angiogenese	123
5.4	Klinische Relevanz von G-CSF und GM-CSF	124
6	Zusammenfassung.....	125
7	Literatur.....	127
8	Abkürzungen	140
9	Danksagung.....	144
10	CURRICULUM VITAE.....	- 145 -

Abbildungen

Abb. 1: Schematische Darstellung der menschlichen Haut mit den wichtigsten Zelltypen.....	10
Abb. 2: <i>In vitro</i> Modell der humanen Hautkarzinogenese	14
Abb. 3: Schematische Darstellung einer Transplantationskammer	14
Abb. 4: Schema der aus HaCaT- <i>ras</i> A-5 durch <i>in vivo</i> Progression entstandenen Zellen	16
Abb. 5: Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Tumor und inflammatorischen Zellen.	22
Abb. 6: Struktur der Matrix Metalloproteinasen.....	24
Abb. 7: Durch Transfektion von HaCaT entstandene Zelllinien.....	29
Abb. 8: Durch <i>in vivo</i> Passage entstandene Zelllinien.	30
Abb. 9: Schematische Darstellung eines Migrationsversuchs.....	37
Abb. 10: Schematische Darstellung einer organotypischen Kultur.	38
Abb. 11: Schematische Darstellung einer Transplantationskammer.	40
Abb. 12: Schema der aus HaCaT- <i>ras</i> A-5 durch <i>in vivo</i> Progression entstandenen Zellen	59
Abb. 13: Schema der aus HaCaT durch Transfektion entstandenen Zellen	59
Abb. 14: Nachweis der mRNA von G-CSF, GM-CSF, G-CSF Rezeptor und GM-CSF Rezeptor α und β in Kulturen der Zelllinien.....	60
Abb. 15: Vergleich des Wachstums der transfizierten und der parentalen Zellen durch Zellzahlbestimmung in 2-D-Zellkulturen <i>in vitro</i>	62
Abb. 16: Nachweis der Proliferation von A-5 Zellen nach Zugabe von G-CSF oder GM-CSF...	63
Abb. 17: Nachweis der Proliferation über BrdU-Inkorporation nach Zugabe von G-CSF oder GM-CSF	64
Abb. 18: Vergleich der epithelialen Proliferation in organotypischen Kulturen	65
Abb. 19: Stimulation der Migration durch Zugabe von G-CSF oder GM-CSF	66
Abb. 20: Inhibition der Migration durch Zugabe neutralisierender Antikörper gegen G-CSF oder GM-CSF	67
Abb. 21: Tumorwachstum der parentalen und der transfizierten Zelllinien nach Subkutaninjektion in Nacktmäuse.	68
Abb. 22: Anzahl der Tiere mit Tumorbildung nach Subkutaninjektion in Abhängigkeit von der Zeit.	70
Abb. 23: Rekultivierung der Tumor-Keratinozyten aus Tumorstücken von Subkutantumoren der Zelllinie A-5G12b.	71
Abb. 24: Schema der durch wiederholte <i>in vivo</i> Progression von A-5G12b entstandenen Zelllinien.	71
Abb. 25: Tumorwachstum nach Subkutaninjektion in Nacktmäuse.	72
Abb. 26: Nachweis der mRNA von G-CSF, GM-CSF, G-CSF Rezeptor und GM-CSF Rezeptor α und β in Kulturen der durch <i>in vivo</i> Passage entstandenen Zelllinien.	73
Abb. 27: Vergleich der Vaskularisierung in Subkutantumoren	75
Abb. 28: Vergleich der Proliferation der Tumorzellen in Subkutantumoren.....	76
Abb. 29: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs von Angiogenese und Aktivierung des Tumor-Stromas bei benignen und malignen Transplantaten.	78
Abb. 30: Vergleich der Epithelbildung in organotypischen Kulturen.....	79
Abb. 31: Zeitverlauf der Vaskularisierung in Transplantationen	83
Abb. 32: Quantifizierung der Infiltration von Tumorgewebe und Tumor-Stroma durch Blutgefäße.....	84
Abb. 33: Vergleich der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in Subkutantumoren.	85
Abb. 34: Zeitverlauf der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in Transplantationen	86
Abb. 35: Quantifizierung der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in Oberflächentransplantaten.....	87

Abb. 36: Vergleich der Rekrutierung von Makrophagen in Subkutantumoren	88
Abb. 37: Zeitverlauf der Rekrutierung von Makrophagen in Transplantationen	89
Abb. 38: Quantifizierung der Rekrutierung von Makrophagen in Oberflächentransplantaten.....	90
Abb. 39: Nachweis der mRNA von Matrix Metalloproteinasen in Zellkulturen	92
Abb. 40: <i>In Situ</i> -Hybridisierung: hMMP-1 an Subkutantumoren	93
Abb. 41: Nachweis von hMMP-2 mit indirekter Immunfluoreszenz an Subkutantumoren	93
Abb. 42: Nachweis von hMMP-13 mit indirekter Immunfluoreszenz an Subkutantumoren	94
Abb. 43: Nachweis von mMMP-3.....	95
Abb. 44: Nachweis von mMMP-9 in Subkutantumoren.....	96
Abb. 45: Zeitverlauf der Expression von mMMP-9 Protein in Transplantationen	98
Abb. 46: Darstellung von mMMP-9 Protein mit Gegenfärbung für Makrophagen (A) oder Granulozyten (B).	99
Abb. 47: Nachweis von mMMP-13 in Subkutantumoren.....	100
Abb. 48: Zeitverlauf der Expression von mMMP-13 Protein in Transplantationen	101
Abb. 49: Darstellung von mMMP-13 Protein mit Gegenfärbung für Makrophagen (A) oder Granulozyten (B).....	101
Abb. 50: Nachweis der RNA von Interleukin-6 in Zellkulturen.....	103
Abb. 51: Nachweis der Proteinexpression von IL-6 in Zellkulturüberständen mittels ELISA....	103

Tabellen

Tabelle 1: Unterteilung der Matrix Metalloproteinasen nach der Substratspezifität in Gruppen. .	24
Tabelle 2: eingesetzte Primärantikörper.....	45
Tabelle 3: eingesetzte Sekundärantikörper	46
Tabelle 4: PCR-Bedingungen.....	55
Tabelle 5: verwendete ELISA-Kits.....	56
Tabelle 6: Nachweis der G-CSF und GM-CSF Proteine im ELISA.....	61
Tabelle 7: Nachweis des GM-CSF Proteins im ELISA.....	73

1 Einleitung

1.1 Die Haut

Die Hautdecke (Integumentum commune) eines erwachsenen Menschen bedeckt die gesamte äußere Körperoberfläche von bis zu 1,7 m² und setzt sich aus der Haut (Cutis) und der Unterhaut (Subcutis) zusammen. Die Haut besteht aus der Oberhaut (Epidermis) mit einem mehrschichtigen, verhornten Plattenepithel und der Lederhaut (Dermis), in der sich ein dichtes Geflecht aus elastischen und kollagenen Fasern befindet. Die Unterhaut ist fest mit der Lederhaut verbunden (Abb. 1).

Die Epidermis bildet mit ihrem Epithel die oberste Schicht der Körperoberfläche. Das mehrschichtige verhornte Plattenepithel erreicht eine Dicke von 0,1 - 0,2 mm, unter der Fußsohle sogar bis zu 1,8 mm. Die unterste Zellschicht der Epidermis (Stratum basale) stellt die Regenerationsschicht dar. Innerhalb des Epithelverbandes kommen neben den Keratinozyten drei weitere wichtige Zelltypen vor: Merkel-Zellen sind Mechanorezeptoren, die vorwiegend an empfindlichen Hautstellen wie den Fingerspitzen vorkommen. Melanozyten sind große pigmenthaltige Zellen mit langen Ausläufern, deren Pigmentbildung durch Sonneneinstrahlung induziert wird. Ein weiterer in der Epidermis vorkommender Zelltyp sind die Langerhans-Zellen. Diese sind Zellen der spezifischen Immunantwort, deren Aufgabe die Aufnahme von Antigenen und deren Präsentation für T-Helfer Zellen ist. Die Keratinozyten in der Epidermis sind in einem permanenten Prozess von Proliferation und Abstoßung. Die Proliferation der Keratinozyten findet in der Basalschicht statt, wobei bei jeder Zellteilung eine Zelle in die oberen Schichten wandert, während die andere Zelle in der Basalschicht verbleibt und sich erneut teilen kann. Die Migration der Zellen in höher gelegene Hautschichten wird von der so genannten terminalen Differenzierung der Zellen begleitet. Diese beginnt mit einer starken Synthese von Differenzierungs-spezifischen Keratinen im Stratum spinosum, gefolgt von dem Abbau von Zellkernen und Zellorganellen im Stratum granulosum. Die terminal differenzierten Zellen bilden eine Schutzbarriere gegen die Umwelt und werden letztendlich abgestoßen.

Die unter der Epidermis liegende und von dieser durch eine Basalmembran getrennte Lederhaut (Dermis oder Corium) vermittelt die Reißfestigkeit und Geschmeidigkeit der Haut. Sie besteht aus einem dichten Geflecht kollagener und elastischer Fasern und enthält Blut- und Lymphgefäße, Nervenfasern sowie Immunzellen. Zudem befinden sich in der Lederhaut Bindegewebszellen wie Fibroblasten, die einen wichtigen Beitrag zu der Synthese der Bindegewebsfasern leisten. Aufgrund der Faseranordnung in der Dermis wird zwischen der Papillarschicht (Stratum papillare) und der Geflechschicht (Stratum reticulare) unterschieden.

Die Papillarschicht liegt direkt unterhalb der Epidermis und ist mit dieser durch sogenannte Bindegewebspapillen verzahnt, wobei Höhe und Anzahl dieser Papillen von der mechanischen Belastung der Hautstelle abhängig sind. Die elastischen Fasergeflechte der Geflechschicht sind dagegen für die Dehnbarkeit der Haut verantwortlich. Die Unterhaut (Subcutis) ist aus lockerem Bindegewebe aufgebaut und ermöglicht die Verschiebbarkeit der Haut. Das hierin vorkommende Unterhautfettgewebe ist unterschiedlich stark ausgeprägt und dient als Fettspeicher.

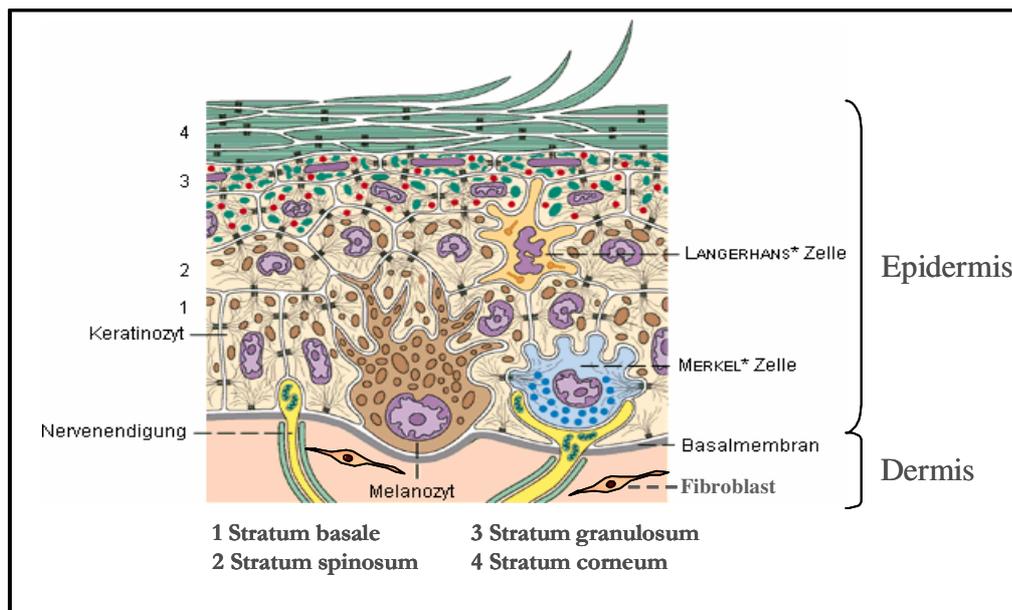


Abb. 1: Schematische Darstellung der menschlichen Haut mit den wichtigsten Zelltypen (verändert, nach Sobotta 1997).

Die Haut eines Organismus hat vielfältige Aufgaben. Neben der Barrierefunktion zum Schutz vor mechanischen, thermischen und chemischen Schäden dient sie zur Regulation von Temperatur und Wasserhaushalt, zur Sinneswahrnehmung, und sie hat zudem durch ihren hohen Anteil an Immunzellen auch eine Immunfunktion (Faller 1999).

1.2 Mehrstufenprozess der epithelialen Hautkarzinogenese

Etwa 15% der weltweit auftretenden Tumore sind Plattenepithelkarzinome (SCCs) und Basalzellkarzinome (BCCs). Seit 1970 ist die Anzahl dieser nicht-Melanom Hauttumore deutlich angestiegen, was einer verstärkten Exposition der Haut mit ultravioletter (UV) Strahlung aufgrund der erhöhten Sonneneinstrahlung und auch der abnehmenden Ozonschicht zugeschrieben wird. Neben den durch UV-Strahlung ausgelösten präneoplastischen Veränderungen entstehen solche Tumore auch häufig im Bereich von Narben, chronischen Geschwüren und in Hautbereichen, die durch radioaktive Strahlen geschädigt wurden. Ein weiterer Risikofaktor ist die langfristige Unterdrückung des Immunsystems durch Immunsuppressiva, durch deren fortdauernde Einnahme, z.B. in Folge einer

Organtransplantation, das Risiko für Basaliome und Plattenepithelkarzinome stark erhöht wird. Die so entstandenen Plattenepithelkarzinome sind durch die oft sehr lange Latenzzeit zwischen der ersten Schädigung und dem Entstehen eines malignen Tumors, verstärkte Malignität und hohe Metastasierungsinzidenz charakterisiert. Während dieser Latenzzeit zwischen der Initiierung und der Manifestation eines Tumors entstehen prä-maligne Vorstufen, von denen sich einige progressiv weiterentwickeln. Somit ist die Tumorentstehung in BCCs und SCCs durch die langsame Veränderung anfänglich normaler Zellen über mehrere Progressionsstufen bis hin zu malignen Tumoren gekennzeichnet. Zur Entwicklung wirksamer Therapien ist ein genaues Verständnis dieses Mehrstufenprozesses der Tumorprogression und der daran beteiligten Mechanismen unerlässlich.

1.2.1 *In vitro* Modelle der epithelialen Hautkarzinogenese

In dem nach seinem Entdecker benannten „Vogelstein-Schema“ für den Mehrstufenprozess der Karzinogenese humaner kolorektaler Tumore wurden die mit den verschiedenen Progressionsstufen assoziierten genetischen Veränderungen im Detail analysiert (Fearon & Vogelstein 1990). Jedoch fehlt bisher eine ähnlich detaillierte Evaluation des Mehrstufenprozesses der Tumorprogression und der damit zusammenhängenden genetischen Veränderungen in der humanen Hautkarzinogenese. Die bisher vorliegenden Erkenntnisse basieren auf Studien, die an der Mauhaut durchgeführt wurden (zur Übersicht siehe Yuspa 1994), wobei unklar ist, ob diese auf die humane Hautkarzinogenese übertragbar sind. Zum einen unterscheiden sich humane und murine Haut deutlich in ihrer Anatomie und Physiologie, und zum anderen beruht das Modell der murinen Hautkarzinogenese auf der Induktion von Mutationen durch chemische Karzinogene, die nicht zu den wichtigen Induktoren der humanen Hautkarzinogenese gehören. Zudem ergaben frühere Arbeiten in unserer Abteilung, dass humane und murine Zellen *in vitro* und *in vivo* eine sehr unterschiedliche Sensitivität gegenüber der Transformation aufweisen (Fusenig & Boukamp 1994). Diese mangelhafte Übertragbarkeit von Ergebnissen aus der Forschung an murinen Modellsystemen verdeutlicht die Notwendigkeit, ein humanes Modell der Hautkarzinogenese zu entwickeln.

1.2.1.1 Genetische Merkmale des HaCaT-Systems

Das in unserem Labor entwickelte *in vitro* Modell der humanen Hautkarzinogenese basiert auf der durch spontane Immortalisierung adulter Hautepithelzellen *in vitro* entstandenen humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT (Humane adulte Keratinozyten/ niedrige Calcium-Konzentration/ erhöhte Temperatur). Diese immortale Zelllinie entstand durch Kultivierung von Zellen aus der Peripherie eines Melanoms der Rückenhaut eines 62 Jahre alten Patienten bei erhöhter Temperatur (38,5 °C) und niedriger Ca²⁺-Konzentration (0,2 mM). Trotz des

veränderten und unlimitierten Wachstumspotentials der HaCaT-Zellen (über 320 Passagen *in vitro*) blieben HaCaT-Zellen nicht tumorigen, und ihre Fähigkeit zur Ausbildung eines strukturierten und differenzierten epidermalen Gewebes nach Transplantation auf die Nacktmaus war weitgehend vergleichbar mit dem normaler Keratinozyten (Boukamp *et al.* 1988). Die Identität der HaCaT-Zellen mit dem Ausgangsgewebe konnte durch DNA-Finger-Prints eindeutig nachgewiesen werden, und eine Kontamination der Zellen mit anderen Zelllinien wie z.B. HeLa-Zellen wurde so ausgeschlossen.

Im Zuge der Immortalisierung entstanden für die epitheliale Karzinogenese relevante genetische Veränderungen (zur Übersicht siehe Fusenig *et al.* 1992; Boukamp *et al.* 1994). Die UV bedingte Mutation des Tumorsuppressorgens p53 im Patienten ermöglichte die Immortalisierung der Zellen, begleitet von weiteren zytogenetischen Aberrationen wie der Deletion einer Kopie der Chromosomen 3p, 4p und 9p (Fusenig & Boukamp 1998). Die Mutations bedingte Inaktivierung von p53 wird als frühes Ereignis in der Entwicklung von Hautkarzinomen betrachtet (Ziegler *et al.* 1994; Boukamp *et al.* 1995; Fusenig & Boukamp 1998); so wurde diese Mutation in vielen prämaligen Stadien sowie in BCCs und SCCs gefunden. Zur tumorigenen Konversion der immortalen HaCaT-Zellen zu benignen tumorigenen Klonen wurden verschiedene Methoden wie Kulturstress, wie z.B. erhöhte Temperatur (40°C), Kultivierung in Medium ohne Serum oder Wachstumsfaktoren und Einzelzell-Klonierung, aber auch die Transfektion mit dem *ras*-Onkogen erfolgreich eingesetzt (Boukamp *et al.* 1994; Fusenig & Boukamp 1998; Mueller *et al.* 2001).

1.2.1.2 Einführung des *ras*-Onkogens in das HaCaT-System

Die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 wird in vielen Tumoren gefunden (in 58% der humanen SCCs), während die dauerhafte Aktivierung des *ras*-Onkogens weniger häufig auftritt; jedoch weisen einige Hautkarzinome wie z.B. die benignen Keratoakanthome und die malignen BCCs und SCCs diese Mutation auf (Corominas *et al.* 1989; Boukamp *et al.* 1994). Die tumorigene Konversion der HaCaT-Zellen wurde u.a. durch Transfektion mit dem c-Ha-*ras* Onkogen erreicht. Die so entstandenen Zellklone bildeten nach Subkutaninjektion in die Nacktmaus sowohl benigne als auch maligne Tumore aus, wobei die Menge des mutierten *ras*-Proteins nicht mit der Tumorigenität der Zellen korrelierte (Boukamp *et al.* 1990). Weiterführende Versuche zeigten, dass der Phänotyp des Tumors nicht nur durch das mutierte *ras*-Onkogen, sondern auch durch zusätzliche genetische Veränderungen bestimmt wurde. Durch Übertragung des Chromosoms mit dem integrierten *ras*-Onkogen in HaCaT Zellen verschiedener Passagen wurde festgestellt, dass nicht der Integrationsort des *ras*-Onkogens, sondern der genetische Status der Empfängerzelle für die Tumorigenität der Zellen verantwortlich ist (Boukamp *et al.* 1995). Dabei zeigte sich, dass nur HaCaT-Zellen höherer Passagen (>30), die bereits weitere genetische

Veränderungen wie z.B. den Verlust des Chromosoms 15 aufwiesen, nach Einbringen des *ras*-Onkogens maligne Tumore bildeten, während ansonsten benigne Tumorzelllinien entstanden.

Weitere Untersuchungen in unserem Labor zeigten Verluste im Chromosom 15 in verschiedenen malignen humanen Keratinozyten-Zelllinien, wie z.B. *ras*-transfizierten HaCaT-Zellen sowie Zelllinien, die aus der Haut von SCC-Tumoren isoliert worden waren (Boukamp *et al.* 1995). Diese Befunde deuten auf die Existenz eines Tumorsuppressorgens auf Chromosom 15 hin, was durch Versuche bestätigt werden konnte, in denen in eine maligne SCC-Zelllinie, der eine Kopie von Chromosom 15 fehlte, eine neue Kopie eingefügt und damit das Tumorstadium in der Nacktmaus verhindert wurde (Bleuel *et al.* 1999). Spätere Versuche konnten das an Adhäsion, Migration und dem Wachstum von Zellen beteiligte extrazelluläre Matrixprotein Thrombospondin-1 (zur Übersicht siehe Bornstein 1992; Lahav 1993; Bornstein 1995) als das Tumorsuppressorgen auf Chromosom 15q15 identifizieren. *In vivo* wurde für Thrombospondin-1 eine anti-angiogene und Tumorstadiums hemmende Wirkung beschrieben (Rastinejad *et al.* 1989; Good *et al.* 1990), was auch durch Transfektion einer SCC-Linie mit Thrombospondin-1 (TSP-1) bestätigt werden konnte. Oberflächentransplantationen der mit TSP-1 transfizierten Zellen ergaben eine Barrierefunktion des unterhalb des Tumors abgelagerten Thrombospondins gegen einwandernde Gefäße sowie eine verzögerte Invasion der Tumorzellen.

Hochgradig maligne und metastasierende Zelllinien dagegen entstanden durch *in vivo* Passage der HaCaT-*ras* Klone (Fusenig & Boukamp 1998). Durch die erste *in vivo* Passage benigner tumorigener Zellen mittels Injektion in die Nacktmaus und Rekultivierung des Tumorgewebes entstand ein maligner, jedoch differenzierungsfähiger Zellklon. Aus zwei weiteren *in vivo* Passagen dieser Zellen resultierte eine hochgradig maligne und kaum differenzierte Zelllinie, die spontanes Metastasierungspotential aufwies (Fusenig & Boukamp 1998; Mueller *et al.* 2001). Diese Zellen wiesen Verluste der Chromosomen 2, 11, 15 und 16 auf (Fusenig & Boukamp 1998).

Somit lässt sich ein Mehrstufenmodell der humanen Hautkarzinogenese am Beispiel des HaCaT-Systems aufstellen, in welchem die frühen Stadien der Transformation von Keratinozyten durch die Inaktivierung des p53 Tumorsuppressorgens sowie die Aktivierung des *ras*-Onkogens charakterisiert sind, während Verluste im Chromosom 15 bei der Progression vom benignen zum malignen Tumorphänotyp eine wichtige Rolle spielen und somit an späteren Ereignissen im Mehrstufenprozess der humanen Hautkarzinogenese beteiligt sind (Boukamp *et al.* 1994; Boukamp *et al.* 1995). Die kritische Rolle der Tumor-Mikroumgebung *in vivo* in der Etablierung eines malignen Phänotyps wurde in weiterführenden Versuchen sehr deutlich, in denen ausschließlich durch *in vivo* Passage der Zellen invasiv wachsende, stark vaskularisierte und

metastasierende Tumore entstanden (Boukamp *et al.* 1994; Fusenig & Boukamp 1998; Mueller *et al.* 2001). Das HaCaT-Modell der humanen Hautkarzinogenese ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

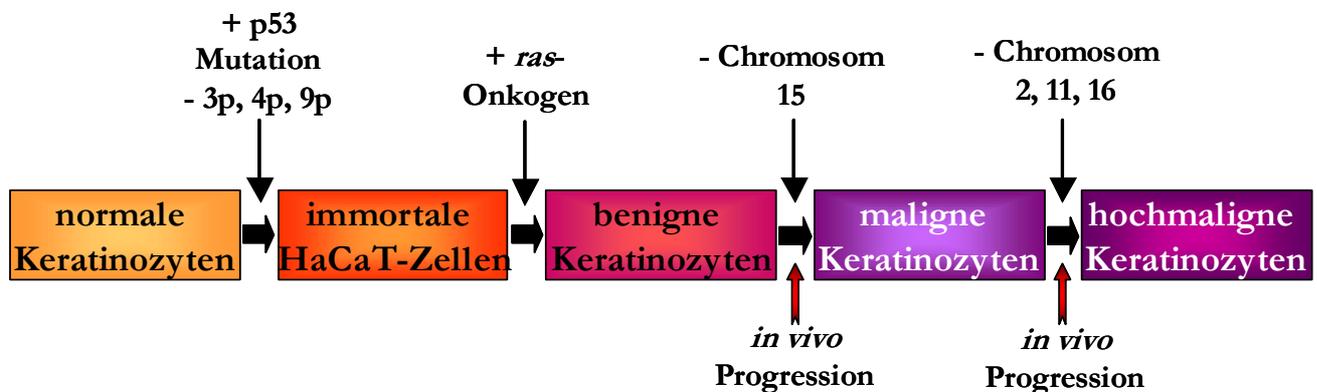


Abb. 2: *In vitro* Modell der humanen Hautkarzinogenese. Korrelation der genetischen Aberrationen mit verschiedenen Tumorstadien im HaCaT-Modell für Hautkarzinogenese *in vitro*.

1.2.1.3 Wachstumsverhalten benigner und maligner HaCaT-*ras* Klone

Das Wachstum der *ras*-transfizierten HaCaT-Klone *in vitro* ergab eine im Vergleich zu den Ausgangszellen verminderte Abhängigkeit der Zellen von exogenen Wachstumsfaktoren (Fusenig *et al.* 1990); dabei zeigen benigne sowie maligne HaCaT-*ras* Klone *in vitro* ein vergleichbares Differenzierungspotential, so dass eine eindeutige Unterscheidung dieser Zelllinien *in vitro* nicht möglich ist. *In vivo* hingegen ist eine eindeutige Unterscheidung des Tumorphänotyps der benignen und malignen Zellen mittels subkutaner Injektion und des in unserem Labor entwickelten Oberflächen-Transplantationsmodells möglich. Dieses Oberflächen-Transplantationsmodell basiert auf der Transplantation eines *in vitro* auf einem Kollagengel präformierten Epithels auf die dorsale Rückenmuskelfaszie der Nacktmaus (Abb. 3).

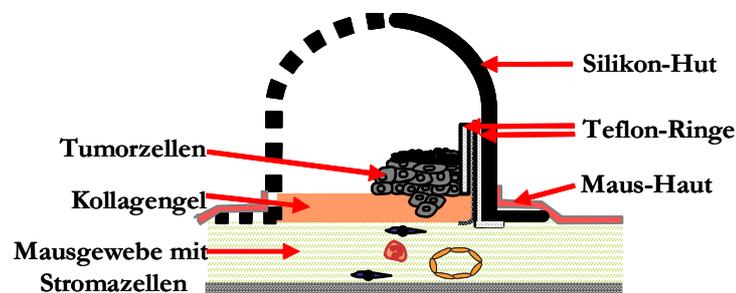


Abb. 3: Schematische Darstellung einer Transplantationskammer (Schema Dr. M. Müller, verändert).

Da das Epithel anfänglich durch das Kollagengel vom Wirtsgewebe getrennt ist, erlaubt dieses Transplantationsmodell die Analyse der Mechanismen von Tumorinvasion und Aktivierung des Tumor-Stromas. Dabei ermöglicht es insbesondere die Untersuchung der initialen Interaktionen

zwischen Tumorzellen und Stroma über die Diffusion parakriner Faktoren im zeitlichen Ablauf mit einer definierten Geometrie und einer anfänglich klaren Trennung von Tumor und Stroma schon während des präinvasiven Stadiums der Tumorentwicklung. Die verschiedenen Stadien der Interaktion von Tumor und Stroma sowie der Aktivierung des Tumorstromas wurden in unserem Labor mit mehreren tumorigenen Zelllinien analysiert (Skobe *et al.* 1997; Vosseler 2001; Mueller & Fusenig 2002; Lederle 2003). Bei Transplantation der Tumorzellen in diesem Modell kann eindeutig zwischen benignen und malignen Keratinozyten unterschieden werden. Benigne Tumorzellen bilden ein der menschlichen Haut ähnliches, gut differenziertes Oberflächenepithel aus und weisen keine Invasion in das umliegende Gewebe bzw. Kollagengel auf. Auch maligne Tumorzellen bilden ein mehrschichtiges Epithel aus, hingegen kann bei diesen Zellen 2-3 Wochen nach der Transplantation eine invasive Infiltration des umliegenden Granulationsgewebes durch die Tumorzellen festgestellt werden.

Auch die Kinetiken der Formation des Granulationsgewebes sowie der Angiogenese unterscheiden Transplantate benigner und maligner Tumorzellen: die Induktion des Granulationsgewebes und der Vaskularisation setzt bei Transplantation maligner Tumorzellen deutlich früher ein und ist zudem permanent, während benigne Zellen nur eine transiente stromale Aktivierung und Angiogenese induzieren (Fusenig & Boukamp 1998; Mueller & Fusenig 2002). Im Anschluss an die Stroma-Aktivierung, nach Kontakt des stark vaskularisierten Granulationsgewebes mit den malignen Tumorzellen, erfolgt die Invasion der epithelialen Tumorzellen in das umliegende Gewebe. Daraus lässt sich schließen, dass die Aktivierung des Tumorstromas und die Bildung des Granulationsgewebes die Voraussetzung für eine Invasion der Tumorzellen sind (Hanahan & Folkman 1996).

1.3 Neu-Expression von G-CSF und GM-CSF in Tumoren

Während der Tumorprogression treten Veränderungen im Wachstumsverhalten des Tumors sowie in den Interaktionen zwischen Tumor und Stroma auf, die häufig mit einer veränderten Expression von Wachstumsfaktoren und/oder Wachstumsfaktor-Rezeptoren korreliert sind. So können Tumorzellen die Entwicklung eines „Tumor-Stromas“ z.B. über die veränderte Expression von Wachstumsfaktoren oder die Induktion von Wachstumsfaktor-Rezeptoren im stromalen Kompartiment regulieren und so der durch die Mikroumgebung ausgeübten Wachstumskontrolle entgehen bzw. eine Tumor fördernde Umgebung induzieren. In diesem Zusammenhang konnten wir nachweisen, dass im HaCaT-Modell für humane Plattenepithelkarzinome der Haut eine *de novo* Expression von PDGF (Blutplättchen Wachstumsfaktor) und TGF- α (Transformierender Wachstumsfaktor- α) bereits in benignen Keratinozyten vorlag (Fusenig & Boukamp 1998; Mueller & Fusenig 1999). Nach Progression

der benignen HaCaT-*ras* A-5 Zellen zu den hochgradig malignen Tumorzelllinien HaCaT-*ras* A-5RT1 und HaCaT-*ras* A-5RT3 durch wiederholte *in vivo* Passage konnte zudem neben einer reduzierten Sensitivität gegenüber der durch TGF- β (Transformierender Wachstumsfaktor- β) vermittelten Wachstumsinhibition eine konstitutive *de novo* Expression der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren Granulozyten Kolonie-Stimulierender Faktor (G-CSF) und Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor (GM-CSF) bei gleichzeitiger Ko-Expression der entsprechender Rezeptoren in allen Zellen des HaCaT-Systems beobachtet werden (Abb. 4) (Boukamp *et al.* 1994; Fusenig & Boukamp 1998; Mueller & Fusenig 1999).



Abb. 4: Schema der aus HaCaT-*ras* A-5 durch *in vivo* Progression entstandenen Zellen

1.3.1 G-CSF („Granulozyten Kolonie-Stimulierender Faktor“) und GM-CSF („Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor“)

Die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF wurden ursprünglich für ihre Funktion in der Kontrolle von Proliferation, Migration und funktioneller Aktivität von Granulozyten und Makrophagen beschrieben (Metcalf 1985; Aglietta *et al.* 1990). G-CSF und GM-CSF sind stark glykosylierte Proteine mit einem Molekulargewicht von 30kD bzw. 22kD (Shannon *et al.* 1988; Nishizawa *et al.* 1990; Mueller & Fusenig 1999). Von humanem G-CSF sind zwei funktionell aktive Spleiß-Formen beschrieben worden, die sich durch eine Deletion von 3 Aminosäuren in der 5'-Region des zweiten Introns unterscheiden (Nagata *et al.* 1986a; Nagata *et al.* 1986b), und vom G-CSF Rezeptor sind bisher 5 Isoformen bekannt, die sich durch Variationen in der zytoplasmatischen Domäne unterscheiden (Noda *et al.* 1999). Der Rezeptor für humanes GM-CSF besteht aus einer liganden-spezifischen α -Untereinheit und einer β -Untereinheit, die auch in den Rezeptoren für IL-3 und IL-5 vorkommt (Mueller *et al.* 1999; Mann *et al.* 2001b).

1.3.2 Wirkung von G-CSF und GM-CSF

Neben der Funktion von G-CSF und GM-CSF in der Wachstums- und Differenzierungs-Kontrolle im hämatopoetischen System wurde auch eine Expression dieser Faktoren durch Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten in der Wundheilung beschrieben (Mueller *et al.* 1999; Mueller & Fusenig 1999; Szabowski *et al.* 2000; Mueller *et al.* 2001). Für beide Faktoren wurde die Induktion der Proliferation und Migration von Endothelzellen *in vitro* sowie die

Stimulation der Angiogenese *in vivo* nachgewiesen (Bussolino *et al.* 1993; Mann *et al.* 2001a). Zudem spielt GM-CSF eine wichtige Rolle in Wachstum und Differenzierung normaler Haut. So konnte in unserem Labor ein doppelt parakriner Mechanismus beschrieben werden, bei dem nach Induktion durch von Keratinozyten sekretiertem Interleukin-1 α (IL-1 α) dermale Fibroblasten zur Sekretion von GM-CSF angeregt werden, welches seinerseits Wachstum und Differenzierung der Keratinozyten fördert (Szabowski *et al.* 2000). Darüber hinaus konnte eine Sekretion von GM-CSF durch Keratinozyten in Wunden nach Induktion durch spezifische Stimuli wie z.B. IL-1 α , Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) oder Lipopolysaccharide gezeigt werden (Ansel *et al.* 1990).

Während der letzten Jahre hat die aberrante Expression von G-CSF und/oder GM-CSF in soliden Tumoren zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen. So wurde die konstitutive Neu-Expression von G-CSF in Plattenepithelkarzinomen der Haut (Hirai *et al.* 2001), von Ösophagus (Ichiishi *et al.* 2000) und Zunge (Horii *et al.* 1997), Karzinosarkomen (Ota *et al.* 1998), ovarialen Karzinomen (Savarese *et al.* 2001) und Kopf-Hals Karzinomen (Tsukuda *et al.* 1993) nachgewiesen. Eine *de novo* Ko-Expression von G-CSF und GM-CSF wurde in Plattenepithelkarzinomen (Mann *et al.* 1992; Mueller & Fusenig 1999; Mueller *et al.* 2001), Osteosarkomen (Rochet *et al.* 1999), Gliomen (Mueller *et al.* 1999; Mueller *et al.* 2003), Meningiomen (Braun *et al.* 2004) und pulmonaren Adenokarzinomen (Wislez *et al.* 2001) beschrieben.

Die Expression von G-CSF und GM-CSF ist häufig mit einer Ko-Expression der entsprechenden Rezeptoren assoziiert, und es gibt erste Hinweise, dass diese Ko-Expression von Faktoren und Rezeptoren in Tumoren in einer autokrinen Stimulation von Proliferation, Migration, Invasion und Metastasierung der Tumorzellen resultiert. So konnte z.B. eine Stimulation von Proliferation und Migration von Plattenepithelkarzinomen der Haut und Gliomen durch G-CSF und GM-CSF (Mueller *et al.* 1999; Mueller & Fusenig 1999; Mueller *et al.* 2001) und verstärkte Proliferation von Nierenkarzinomen durch GM-CSF (Tachibana *et al.* 2000) gezeigt werden. Zudem wurde ein mit der Expression von G-CSF assoziiertes aggressiveres Tumorwachstum in Cervixkarzinomen und verstärkte Invasion und Metastasierung in Kopf-Hals Tumoren beobachtet (Nishino *et al.* 1998; Noda *et al.* 1999 und Gutschalk *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

Neben diesem autokrinen Effekt auf den Faktor produzierenden Tumor selbst können G-CSF und GM-CSF auch parakrine Effekte auf das Tumor-Stroma ausüben, wie z.B. die Induktion einer verstärkten Neubildung von Blutgefäßen (Bussolino *et al.* 1993; Bikfalvi & Han 1994; Mann *et al.* 2001a; Lathers *et al.* 2001). Darüber hinaus konnte eine Korrelation zwischen der konstitutiven Expression von G-CSF und Leukozytose (Tsukuda *et al.* 1993; Horii *et al.* 1997; Ota

et al. 1998; Ichiishi *et al.* 2000) sowie einer Verlängerung der Lebensdauer von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Wislez *et al.* 2001). Diese können sowohl Tumor fördernd wirken (Pekarek *et al.* 1995; Coussens *et al.* 2000; Coussens & Werb 2001) als auch eine Anti-Tumor-Immunität ausüben (Di Carlo *et al.* 2001; Dranoff 2003). Interessanterweise wurde die Rekrutierung inflammatorischer Zellen in die Tumorumgebung mit einer Verstärkung der neoplastischen Progression über die Produktion parakriner Faktoren durch diese Zellen in Zusammenhang gebracht und könnte somit eine Schlüsselrolle in der Tumorprogression spielen (Coussens & Werb 2001). Weitere Berichte über die Rekrutierung CD34 positiver Zellen durch Expression von GM-CSF in Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals und eine daraus resultierende Immunsuppression (Lathers *et al.* 2001) machen eindringlich klar, dass die Wirkung der durch G-CSF und GM-CSF rekrutierten Zellen des hämatopoetischen Systems sehr ambivalent ist und dringend weiterer Aufklärung bedarf.

Aus diesen Daten lässt sich die Hypothese erstellen, dass der von uns und auch von anderen beobachtete Beitrag von G-CSF und GM-CSF zur Tumorprogression nicht nur über ihre Wirkung auf den Tumor selbst, sondern auch über aktivierende und/oder modulierende Effekte auf das Tumor-Stroma und/oder den gesamten Organismus stattfindet. Auch wenn die mechanistische Basis dieser Effekte noch weitgehend unbekannt ist, wird die klinische Relevanz dieser durch G-CSF und GM-CSF vermittelten Effekte für die Prognose des Patienten zunehmend offenbar. So wurde in Studien mit oralen und nasopharyngealen Karzinomen sowie ovarialen Karzinomen eine Korrelation zwischen der Expression des G-CSF Rezeptors im Tumor und einer schlechten Prognose sowie einer erhöhten Rezidiv-Wahrscheinlichkeit gefunden (Tsuzuki *et al.* 1998; Savarese *et al.* 2001), und in Tierversuchen an Mäusen konnte eine wachstumsfördernde Wirkung von intraperitoneal injiziertem G-CSF auf Subkutantumore nachgewiesen werden (Segawa *et al.* 1991). Da G-CSF und GM-CSF neben der autokrinen Wirkung auf den Faktor produzierenden Tumor selbst auch parakrine Effekte auf das Tumor-Stroma haben können, ist der Beitrag dieser Faktoren zu der Bildung eines aktivierten Tumor-Stromas ein wichtiger Aspekt in Tumorwachstum und -Progression.

1.4 Tumor-Stroma Interaktionen in der Tumorentwicklung

Es wird zunehmend deutlich, dass Veränderungen in der Stromalen Mikroumgebung wichtige regulatorische Elemente in der Steuerung der funktionellen Integrität des Gewebes und damit auch in Wachstum, Invasion und Metastasierung eines Tumors sind (Bissell *et al.* 2002). Dazu gehören der funktionelle Zustand mesenchymaler Zellen, Neovaskularisierung, eine veränderte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (ECM), die Rekrutierung inflammatorischer Zellen wie Makrophagen, Granulozyten und Leukozyten sowie eine veränderte Expression von

Proteasen (Fusenig 1992; Mueller & Fusenig 2002). Diese vom Tumor induzierte aktivierte Umgebung, bestehend aus Fibroblasten, inflammatorischen Zellen und Immunzellen ist vergleichbar dem Granulationsgewebe einer Wunde (Tremblay 1979), wobei die durch den Tumor aktivierten Stromazellen ihrerseits das Wachstum des Tumors positiv oder negativ regulieren können. Das Tumorstromawachstum fördern z.B. die Sekretion von Wachstumsfaktoren und Proteasen, die dadurch vermittelte Angiogenese sowie die Produktion und Regulation von Komponenten der extrazellulären Matrix durch Stromazellen, während eine negative Regulation des Tumorstromawachstums z.B. über die so genannte Anti-Tumor Immunität erfolgen kann.

Viele Tumore entstehen an Stellen von Infektionen, chronischen Irritationen und Entzündungen. Bereits 1863 postulierte Virchow, dass Tumore ihren Ursprung in chronischen Irritationen und einer damit einhergehenden erhöhten Zellproliferation haben. Auch wenn heute klar ist, dass durch verstärkte Zellproliferation allein kein Krebs verursacht wird, erhöht die fortgesetzte Proliferation von Zellen in einem an inflammatorischen Zellen, Wachstumsfaktoren, und an DNA-schädigenden Substanzen reichen aktivierten Umfeld das Risiko einer neoplastischen Veränderung. Die logische Weiterentwicklung dieser Beobachtung und damit einen sehr interessanten Ansatzpunkt zum Verständnis der Tumor-Stroma Interaktionen beschrieb Dvorak 1986 mit seiner Hypothese, ein Tumor verhalte sich wie eine niemals heilende Wunde (Dvorak 1986). Nach dieser Hypothese werden in einem Tumor normale Wundheilungsmechanismen zur Rekrutierung und Aktivierung Stromazellen eingesetzt, nur dass im Gegensatz zur Wundheilung das Granulationsgewebe nicht wieder abgebaut wird, sondern permanent bestehen bleibt. Untersuchungen in unserer Abteilung zeigten deutliche Parallelen zwischen der Bildung des Wundgranulationsgewebes und der Aktivierung des Tumorstromas in der Tumorentstehung (Mueller & Fusenig 2002). Der Beitrag des aktivierten Tumorstromas zur Tumorentstehung wird in den oben beschriebenen und anderen Untersuchungen zunehmend klar. Dies wird durch Untersuchungen untermauert in denen nachgewiesen wurde, dass sich Tumore aus ehemaligen Wundbereichen, also Bereichen mit einem aktivierten Granulationsgewebe, ausbilden und dass das Tumorstromawachstum durch Unterdrückung der Entzündungsreaktion gehemmt werden kann (Martins-Green *et al.* 1994). Verschiedene Gruppen konnten zudem zeigen, dass die Invasion der Tumorzellen durch aktivierte Stromazellen des neu gebildeten Granulationsgewebes induziert oder verstärkt wird (Gabbert 1985; Pauli & Knudson 1988; Dingemans *et al.* 1993; van Kempen *et al.* 2003).

In den letzten Jahren findet die Bedeutung des Tumorstromas für die Tumorentwicklung zunehmend Beachtung. Die oben beschriebenen Untersuchungen zeigen die Wichtigkeit des Stromas und insbesondere der Angiogenese und der inflammatorischen Zellen für die

Tumorentwicklung auf und machen deutlich, dass im Sinne einer spezifischen Tumorthherapie eine genauere Analyse des Tumor-Stromas und besonders der inflammatorischen Zellen, unerlässlich ist (zur Übersicht siehe Dvorak *et al.* 1991).

1.5 Angiogenese

Ein wichtiger Schritt in der Bildung eines malignen, invasiv wachsenden Tumors ist die Neubildung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen (Angiogenese). Seit der Erkenntnis von Folkman 1971 (Folkman 1971), dass das Tumorwachstum über die Größe von wenigen Millimetern hinaus von der Etablierung einer Mikrozirkulation zur Gewährleistung der Versorgung der Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen abhängt, hat sich das Verständnis der Vorgänge in der Tumor-Angiogenese vertieft. Zudem erlaubt erst die Vaskularisierung eines Tumors die Metastasierung der Tumorzellen, wobei das Wachstum dieser Metastasen wiederum von einer Neovaskularisierung abhängig ist (Dvorak 1986; Folkman 1995; Harris & Thorgeirsson 1998). Versuche in unserem Labor zur Blockierung der Angiogenese über spezifische Antikörper zeigten, dass die Bildung neuer Blutgefäße Voraussetzung für die Invasion humaner Plattenepithelkarzinome der Haut ist (Skobe *et al.* 1997; Fusenig & Boukamp 1998; Vosseler 2001). Eine Vielzahl von Studien an Tumoren von Brust, Cervix, Prostata und malignem Melanom ergab eine Korrelation der Tumolvaskularisation mit verschiedenen Parametern der Tumoraggressivität wie Rückfallrate, Metastasierung und Überlebensdauer des Patienten (Bochner *et al.* 1995; Weidner 1995). Daher ist ein genaues Verständnis der in der Tumor-Angiogenese involvierten Regulationsmechanismen unerlässlich zur Etablierung wirksamer anti-angiogener Tumorthérapien. Verschiedene anti-angiogene Substanzen unterbinden die Neovaskularisierung durch direkte Inhibition der Proliferation von Endothelzellen und können damit das Tumorwachstum hemmen und den Tumor „aushungern“. Daneben werden auch indirekte Angiogenese-Inhibitoren eingesetzt, die die Expression oder Aktivität vom Tumor abgegebener Angiogenese induzierender Substanzen inhibieren (Kerbel & Folkman 2002). Dies hat gegenüber der gegen den Tumor selbst gerichteten Therapie den Vorteil, dass Tumor-Blutgefäße von normalen Zellen gebildet werden, die im Gegensatz zu Tumorzellen keine erhöhte genetische Variabilität aufweisen, welche eine Adaptation an die Therapie ermöglichen würde. Zudem findet eine Neovaskularisierung im adulten Organismus hauptsächlich in der Wundheilung und im Menstruationszyklus statt, weshalb im Vergleich zur konventionellen Tumorthherapie deutlich geringere Nebenwirkungen zu erwarten sind (zur Übersicht über antiangiogene Therapien siehe: Brower 1999; Kerbel & Folkman 2002; Bergers & Benjamin 2003).

1.6 Die Rolle der inflammatorischen Zellen in der Tumorumgebung

Neben der Angiogenese wird die Bedeutung inflammatorischer Zellen als fördernde Faktoren in der Entwicklung und Progression eines Tumors in letzter Zeit zunehmend deutlich (Coussens & Werb 2001; Baskic *et al.* 2001; Coussens & Werb 2002; Pollard 2004). Inflammatorische Zellen können zur Tumorprogression durch die Ausschüttung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen, deren eigentliches Ziel die Bekämpfung von Infektionen ist, beitragen, da diese Substanzen DNA-Schädigungen in proliferierenden Zellen hervorrufen können. So kann die wiederholte und dauerhafte Exposition mit diesen Substanzen in zuvor normalen Zellen permanente genomische Veränderungen hervorrufen, deren Akkumulation die maligne Konversion der Zellen initiiert und fördert (Yuan & Glazer 1998). Darüber hinaus produzieren Tumor assoziierte inflammatorische Zellen eine Vielzahl von Cytokinen wie TNF- α , Interleukine, Interferone und angiogene Wachstumsfaktoren wie Vaskulärer Endothel Wachstumsfaktor (VEGF) und basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF) (Pollard 2004). Neutrophile Granulozyten können ihre Mikroumgebung durch die Sekretion löslicher chemotaktischer Faktoren und Proteasen modulieren (Coussens & Werb 2001); so wurde z.B. eine durch G-CSF induzierte Expression von Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) in Granulozyten beschrieben, wodurch die Degradation des Tumor-Stromas und somit Tumorinvasion und Angiogenese ermöglicht werden (Pugin *et al.* 1999).

Die Rolle der Makrophagen in Wachstum und Progression von Tumoren wird sehr kontrovers diskutiert. Obwohl Makrophagen Zytotoxizität vermitteln können und auch in der Anti-Tumor-Immunität impliziert werden (Bernasconi *et al.* 1995; Bretscher *et al.* 2000), können Tumorzellen Mechanismen entwickeln, um diesen zu entkommen und sogar von den Aktivitäten der Tumor assoziierten Makrophagen (TAMs) zu profitieren (Wahl & Kleinman 1998; Baskic *et al.* 2001; Pollard 2004). So können viele von Tumoren gebildete Faktoren die zytotoxische Aktivität der TAMs reduzieren (Baskic *et al.* 2001; Pollard 2004).

Darüber hinaus können Makrophagen Tumorstromawachstum und Angiogenese durch die Sekretion von Cytokinen und angiogenen Faktoren fördern, während ebenfalls von den Makrophagen produzierte Proteasen das umgebende Gewebe degradieren und somit die Expansion und Invasion von Tumoren sowie die zum Tumor hin gerichtete Angiogenese ermöglichen (Wahl *et al.* 1997; Joseph & Isaacs 1998; Baskic *et al.* 2001; Pollard 2004). So wurde kürzlich für Kopf-Hals Plattenepithelkarzinome beschrieben, dass Makrophagen über vom Tumor gebildetes Monozyten Chemotaktisches Protein-1 (MCP-1) und Transformierender Wachstumsfaktor- β 1 (TGF- β 1) rekrutiert und zur Sekretion angiogener Faktoren wie bFGF und VEGF sowie von Cytokinen wie TNF- α und IL-1 α angeregt werden. Diese Cytokine können dann in einer doppelt

parakrinen Schleife in Tumorzellen die Produktion von IL-8 und VEGF induzieren, welche wiederum die Neovaskularisierung des Tumors fördern (Liss *et al.* 2001).

Somit können Tumor assoziierte Granulozyten und Makrophagen jede Phase von Tumorwachstum und Angiogenese wie die Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) sowie Proliferation und Migration von Endothelzellen (Joseph & Isaacs 1998) beeinflussen und somit direkt oder indirekt Invasion, Progression und Metastasierung von Tumoren fördern (Abb. 5).

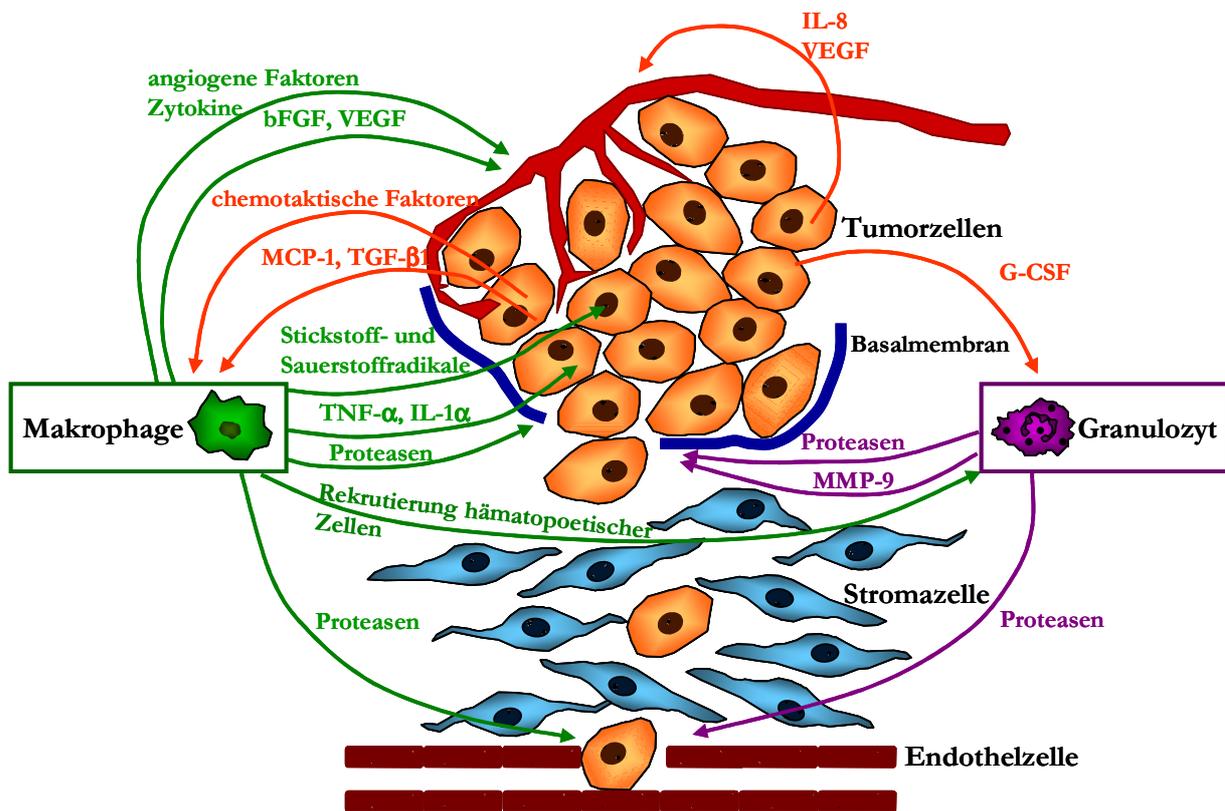


Abb. 5: Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Tumor und inflammatorischen Zellen. Makrophagen und Granulozyten werden über chemotaktische Faktoren zum Tumor rekrutiert und fördern dort Tumorprogression, Invasion, Angiogenese und Metastasierung durch die Expression verschiedener Cytokine und Proteasen.

1.7 Matrix Metalloproteinasen

In vielen biologischen Prozessen wie der Reproduktion, Embryonalentwicklung, Wundheilung und Angiogenese spielt die kontrollierte Degradation von Makromolekülen der extrazellulären Matrix (ECM) eine wichtige Rolle. Eine unregelmäßige Degradation der extrazellulären Matrix wird häufig in pathologischen Prozessen wie Arteriosklerose, rheumatoider Arthritis und Krebs beobachtet. Die Degradation von Makromolekülen der extrazellulären Matrix sowie diverser anderer Proteine erfolgt durch die Kooperation verschiedener proteolytischer Enzyme, die anhand ihrer Aminosäuregruppen oder Ko-Faktoren für die katalytische Aktivität in 4 Hauptgruppen unterteilt werden: Cystein-Proteasen, Aspartat-Proteasen, Serin-Proteasen und Metalloproteinasen, wobei letztere ein Metallion im katalytischen Zentrum enthalten. Die

Metalloproteinasen können in verschiedene Superfamilien unterteilt werden. Mitglieder der Superfamilie der Metzincine haben eine konservierte strukturelle Topologie, binden ein Zink-Ion an ihrer katalytischen Domäne und weisen ein konserviertes „Met-turn“ Motiv auf. Die Superfamilie der Metzincine wird weiter in die Familien der Serralsine, der Astazine, der Matrixine (Matrix Metalloproteinasen) und der Adamalsine unterteilt.

Die Genfamilie der Matrix Metalloproteinasen (MMPs) besteht gegenwärtig aus 28 bekannten humanen Mitgliedern. Die für die Matrix Metalloproteinasen codierenden Gene sind im gesamten Genom verteilt, wobei ein MMP-Gencluster auf Chromosom 11 beschrieben wurde. Matrix Metalloproteinasen sind Zink-abhängige Endopeptidasen, die aus einer Prä-Domäne, einer Pro-Domäne mit einem hochkonservierten Cysteinrest, einer katalytischen Domäne mit einem ebenfalls stark konservierten aktiven Zentrum und einer C-terminalen Hämapexin-Vitronektin ähnlichen Domäne bestehen. Diese C-terminale Domäne ist mit der katalytischen Domäne über eine variable, für die Substratspezifität verantwortliche Gelenkregion verbunden (Coussens & Werb 1996; Lynch & Matrisian 2002). Im aktiven Zentrum sind drei Histidine enthalten, die der für die MMP-Aktivität notwendigen Bindung der Zink-Ionen dienen. Matrix Metalloproteinasen können sekretiert werden (MMP-1-13, MMP-18-23, MMP-26-28) oder Membran gebunden vorliegen (membrane type MMPs = MT-MMPs, das sind MMP-14-16 und MMP-24-25). Eine C-terminale Transmembrandomäne verankert Zell-Oberflächen gebundene Matrix Metalloproteinasen an der Zellmembran (Pugin *et al.* 1999; Kerkela & Saarialho-Kere 2003; Polette *et al.* 2004). Die Sekretion der Matrix Metalloproteinasen erfolgt nach Abtrennung der Prä-Domäne. Mit Ausnahme der Membran gebundenen MT-MMPs erfolgt die Sekretion der Matrix Metalloproteinasen als inaktives Proenzym, und erst durch die später erfolgende Abtrennung der Pro-Domäne durch MMPs oder andere Proteasen wird das aktive Enzym freigesetzt. Das hochkonservierte Cystein der Pro-Domäne bindet kovalent an das Zink-Ion der katalytischen Domäne, und erst durch Abtrennung der Pro-Domäne und die darauf folgende Veränderung in der Raumstruktur wird die funktionelle Aktivität des Enzyms freigesetzt. Im Gegensatz zu sekretierten MMPs werden MT-MMPs bereits intrazellulär durch Golgi-assoziierte Furin-ähnliche Proteinase aktiviert (Polette *et al.* 2004). Die verschiedenen Matrix Metalloproteinasen unterscheiden sich in ihrer Struktur, so dass jede Matrix Metalloprotease eine bestimmte Substratspezifität aufweist.

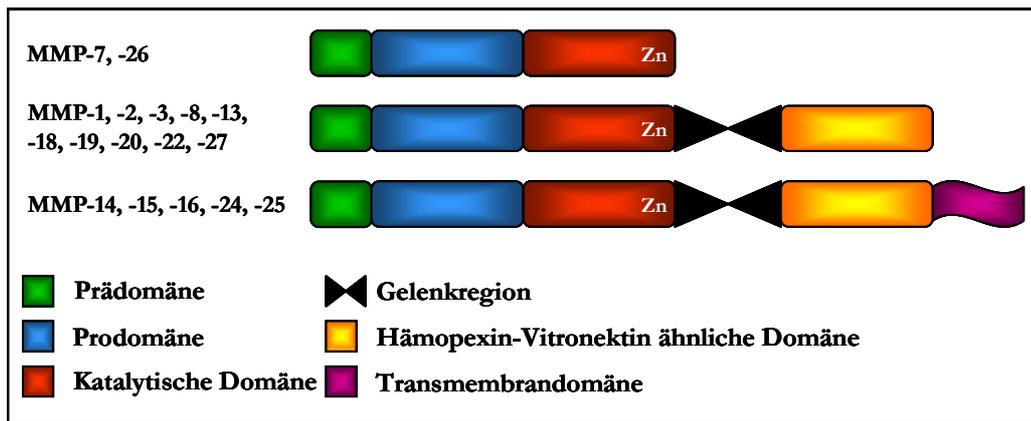


Abb. 6: Struktur der Matrix Metalloproteinasen.

Die Familie der Matrix Metalloproteinasen kann nach strukturellen und funktionalen Aspekten wie der Substratspezifität in mehrere Gruppen unterteilt werden: es gibt Kollagenasen, die fibrilläres Kollagen I-III und VII schneiden, Gelatinasen, die das dabei entstehende Gelatin sowie Typ IV Kollagen und Laminin degradieren, Stromelysine, die ein breites Spektrum von Substraten wie Kollagene, Fibronektin, Laminin, Elastin, Gelatin und Proteoglykane degradieren, MT-MMPs, die neben pro-MMP-2 auch Kollagen I-III, Fibronektin, Laminin, Fibrin, Gelatin, Nidogen und Proteoglykane prozessieren, und so genannte „andere MMPs“, die verschiedene Komponenten von ECM und Basalmembran abbauen (Tabelle 1). Durch Kooperation der Matrix Metalloproteinasen und Kombination der verschiedenen Substratspezifitäten können somit alle Komponenten von ECM und Basalmembran degradiert werden.

Tabelle 1: Unterteilung der Matrix Metalloproteinasen nach der Substratspezifität in Gruppen.

Gruppe	Substrate	MMPs
Kollagenasen	fibrilläres Kollagen I-III, VII	MMP-1, -8, -13
Gelatinasen	Gelatin, Kollagen IV, Laminin	MMP-2, -9
Stromelysine	Kollagen IV, V, IX, X Fibronektin, Laminin, Elastin, Gelatin	MMP-3, -10, -11 und Matrilysine MMP-7, -26
MT-MMPs	pro-MMP-2, Kollagen I-III, Fibronektin, Laminin, Fibrin, Gelatin, Nidogen, Proteoglykane	MMP-14-16, MMP-24-25
andere MMPs	viele Komponenten von ECM und Basalmembran	MMP-19, -20, -28

1.7.1 Regulation der Matrix Metalloproteinasen

Sowohl die Sekretion als auch die Aktivität der Matrix Metalloproteinasen sind abhängig von Gewebe und Aktivierungszustand der Zellen unterschiedlich reguliert. In normalem Gewebe erfolgt nur eine schwache Expression von Matrix Metalloproteinasen, jedoch können zum aktiven Umbau des Gewebes die Produktion und Aktivierung der Matrix Metalloproteinasen schnell induziert werden. Die nicht Membran gebundenen Matrix Metalloproteinasen werden normalerweise bei Bedarf produziert und direkt sezerniert, mit Ausnahme von Makrophagen und Granulozyten, in denen eine Speicherung und gezielte Freisetzung von z.B. MMP-8 und -9 erfolgt (Kerkela & Saarialho-Kere 2003). Die Aktivität der Matrix Metallproteinasen wird auf mehreren Ebenen reguliert: Transkription, Modulation der mRNA-Stabilität, Sekretion, proteolytische Aktivierung des Zymogens und Inhibition des aktiven Enzyms. Matrix Metalloproteinasen haben natürliche Inhibitoren, die „Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen“ (TIMPs), und zudem gibt es verschiedene unspezifische Proteinase-Inhibitoren wie α 2-Makroglobulin und Serin-Proteinase Inhibitoren wie α 1-Antitrypsin und die Plasminogen-Aktivator Inhibitoren -1 und -2, die generell die proteolytische Aktivität inhibieren. Die Transkription von Matrix Metalloproteinasen kann durch verschiedene Cytokine und Wachstumsfaktoren wie z.B. G-CSF, TNF- α , Epidermis-Wachstumsfaktor (EGF), bFGF, IL-1, IL-6, Blutplättchen-Wachstumsfaktor (PDGF) und TGF- β reguliert werden. Auch Onkogene, Hormone und verschiedene Chemikalien wie Phorbolster sowie Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen können die Expression von Matrix Metalloproteinasen induzieren oder unterdrücken (Coussens & Werb 1996; Lynch & Matrisian 2002; Kerkela & Saarialho-Kere 2003).

1.7.2 Proteolyse in Tumoren

In einem sich entwickelnden Tumor findet eine ständige Kommunikation zwischen den Tumorzellen und dem aus Matrixkomponenten, Fibroblasten, Endothelzellen und inflammatorischen Zellen bestehenden umliegenden Stroma statt. Der erste Hinweis auf die Bedeutung der Matrix Metalloproteinasen in der Tumorbiologie war die Beobachtung, dass die Fähigkeit der Tumorzellen, in das umliegende Gewebe einzudringen, mit einer erhöhten Expression von Matrix Metalloproteinasen korreliert war (Bachmeier *et al.* 2000b). Matrix Metalloproteinasen spielen durch die Zerstörung der lokalen Gewebestruktur sowie von Basalmembranen eine wichtige Rolle in allen Stadien der Tumorprogression wie der Tumor induzierten Angiogenese, Invasion und Metastasierung (Coussens & Werb 1996). Die gezielte Degradation von Basalmembran und extrazellulärer Matrix in der Umgebung eines Tumors wird durch das Zusammenspiel zwischen Tumorzellen, Stromazellen und inflammatorischen Zellen,

die alle verschiedene Matrix Metalloproteinasen exprimieren, vermittelt. Neben der klassischen Rolle der Matrix Metalloproteinasen in der Degradation der extrazellulären Matrix können Matrix Metalloproteinasen auch indirekt auf die Tumor-Mikroumgebung Einfluss nehmen. Dies kann über die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und angiogenen Faktoren aus der extrazellulären Matrix erfolgen (Hernandez-Barrantes *et al.* 2002; Heissig *et al.* 2003), und zugleich können Fragmente von Makromolekülen der extrazellulären Matrix modulierend auf die Proliferation (Coussens *et al.* 2002) und Migration (Lynch & Matrisian 2002) von Tumorzellen und auf die Angiogenese (Polette *et al.* 2004; Hagemann *et al.* 2004) wirken. So werden durch die über Matrix Metalloproteinasen vermittelte Degradation von Makromolekülen der extrazellulären Matrix Inhibitoren von Angiogenese und Zellwachstum generiert (Bergers & Coussens 2000; Heissig *et al.* 2003). Eine Förderung der Angiogenese erreichen Matrix Metalloproteinasen zum einen, indem sie Endothelzellen die Migration durch die Basalmembran ermöglichen, um neue Blutgefäße zu bilden (Bergers & Coussens 2000; Polette *et al.* 2004). Darüber hinaus können sie die Anheftung, Proliferation, Migration und das Wachstum von Endothelzellen entweder direkt oder indirekt regulieren, indem sie Cytokine, Wachstumsfaktorrezeptoren, Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsionsmoleküle proteolytisch freigegeben oder aktivieren (Bergers & Coussens 2000; Lynch & Matrisian 2002; Hernandez-Barrantes *et al.* 2002; Heissig *et al.* 2003).

Während bisher angenommen wurde, dass Tumor-Zellen die wesentlichen Produzenten von an der Tumorprogression beteiligten Matrix Metalloproteinasen sind, wurde mit der zunehmenden Aufklärung der Bedeutung des Stromas für Tumorwachstum und -Progression die Rolle der stromalen MMPs neu definiert. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass ein großer Teil der in einem epithelialen Tumor vorhandenen Matrix Metalloproteinasen von stromalen Zellen in Kooperation mit dem Tumor selbst produziert wird (Coussens & Werb 1996; Tomita *et al.* 2000; Coussens *et al.* 2002; Polette *et al.* 2004). Tumorzellen können die Expression von Matrix Metalloproteinasen entweder direkt oder indirekt über die Sekretion löslicher Faktoren wie z.B. im Falle von Fibroblasten den so genannten Extrazellulären MMP Induktoren (EMMPRINs) aus der Immunglobulin-Superfamilie oder auch durch verschiedene Cytokine wie G-CSF, TNF- α , EGF, bFGF, IL-1, IL-6, PDGF und TGF- β induzieren. Zudem können Tumore durch die Expression verschiedener Cytokine MMP-speichernde Zellen wie z.B. Granulozyten und Makrophagen rekrutieren.

2 Zielsetzung

Der Einfluss der Tumorumgebung auf Wachstum und Progression eines Tumors wurde in den letzten Jahren zunehmend deutlich. Eine große Rolle spielt dabei die veränderte Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren im Tumor selbst oder im Tumor-Stroma und somit eine veränderte Interaktion zwischen Tumor- und Stroma-Zellen, insbesondere im Hinblick auf für die Tumorprogression kritische Prozesse wie die Angiogenese, die Rekrutierung inflammatorischer Zellen und die Degradierung der Extrazellulären Matrix. In der Tumorprogression humaner Plattenepithelkarzinome der Haut konnte eine *de novo* Expression der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF ausschließlich im Tumorgewebe hochgradig maligner, schnell und invasiv wachsender und metastasierender Tumore mit einer ausgeprägten Vaskularisierung nachgewiesen werden (Mueller & Fusenig 1999), wobei G-CSF und GM-CSF *in vitro* die Proliferation und Migration der Tumorzellen autokrin stimulierten (Mueller & Fusenig 1999). Um einen funktionellen Beitrag der Faktoren zur Tumorprogression *in vivo* zu belegen, wurden benigne Tumor-Zellen des HaCaT-Modells für humane Plattenepithelkarzinome der Haut, die die Rezeptoren für G-CSF und GM-CSF, aber nicht die Faktoren selbst exprimieren, mit eukaryotischen Expressionsvektoren transfiziert, die die cDNA für G-CSF oder GM-CSF enthielten.

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von G-CSF und GM-CSF auf die Tumorprogression durch Analyse der Faktor induzierten Veränderungen im Wachstumsverhalten des Tumors und in der Tumor-Stroma Interaktion zu untersuchen.

Dazu sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Trägt die Expression von G-CSF und GM-CSF zur Malignisierung der ursprünglich benignen Tumorzellen bei? Das heißt, beeinflussen beide Faktoren Proliferation, Migration und Invasion der Tumorzellen sowie die Expression weiterer Wachstumsfaktoren?
2. Welchen Einfluss hat die *in vivo* Umgebung auf die Expression von G-CSF und GM-CSF in Tumorzellen?
3. Welche Wirkung hat die Expression von G-CSF und GM-CSF auf die Aktivierung des Tumorstromas und die Angiogenese?
4. Lässt sich die Expression spezifischer Matrix Metalloproteinasen durch G-CSF und GM-CSF in den Tumorzellen bzw. Stromazellen induzieren und ist diese Induktion kausal an der verstärkten Invasion der Tumorzellen beteiligt?

Diese Fragestellungen sollten mittels *in vitro* Untersuchungen an Zellkulturen sowie *in vivo* in Subkutantumoren und Oberflächentransplantationen beantwortet werden. Dabei sollte

insbesondere die Konsequenz der Transfektion benigner HaCaT-*ras* A-5 Zellen mit G-CSF und GM-CSF analysiert werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Verwendete Zelllinien

Folgende HaCaT-Zelllinien wurden für die Untersuchungen verwendet:

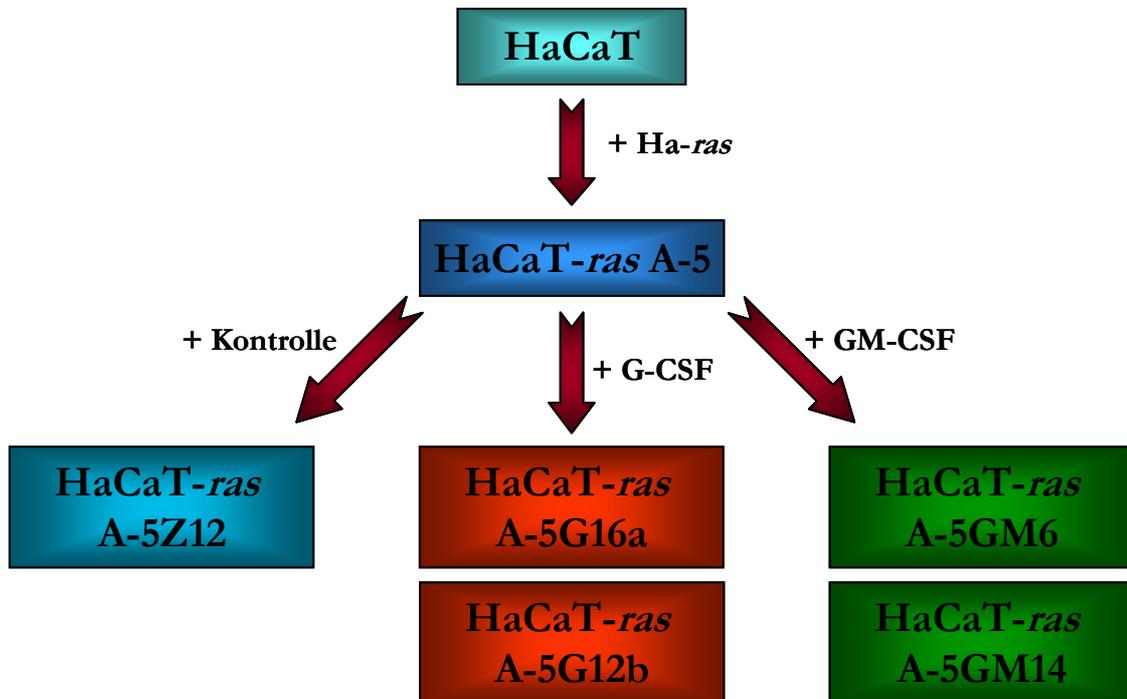


Abb. 7: Durch Transfektion von HaCaT entstandene Zelllinien.

Durch spontane *in vitro* Transformation humaner Hautkeratinozyten wurde die immortale, nicht-tumorigene Zelllinie HaCaT hergestellt (Boukamp *et al.* 1988). Um HaCaT-*ras*-Transfektanten zu gewinnen, wurden HaCaT-Zellen (Passage 30) mit dem Ha-*ras* Onkogen transfiziert und die Transfektanten über ihre Geneticin-Resistenz selektiert (Abb. 7). Die Ha-*ras* transfizierten Klone zeigten nach s.c. Injektion in Nacktmäuse ein verändertes Wachstumsverhalten im Vergleich zu den parentalen HaCaT-Zellen (Boukamp *et al.* 1990; Breitkreutz *et al.* 1991 Skobe *et al.* 1997 und Fusenig, 1998). HaCaT-*ras* A-5 Zellen entwickelten sich nach s.c. Injektion zu langsam wachsenden, nicht invasiven benignen Zysten. Durch stabile Transfektion parentaler HaCaT-*ras* A-5 Zellen (Passage 31 bzw. 36) mit einem eukaryotischen Expressionsplasmid, das die cDNA für G-CSF oder GM-CSF enthielt, entstanden die mit G-CSF transfizierten Zelllinien HaCaT-*ras* A-5G12b und HaCaT-*ras* A-5G16a und die mit GM-CSF transfizierten Zelllinien HaCaT-*ras* A-5GM6 und HaCaT-*ras* A-5GM14. Für die Kontrolle A-5Z12 wurden HaCaT-*ras* A-5 Zellen mit dem Vektor ohne cDNA transfiziert (Abb. 7). Selektion der transfizierten Zellen erfolgte über ihre Zeozin-Resistenz (Obermueller *et al.* 2004).

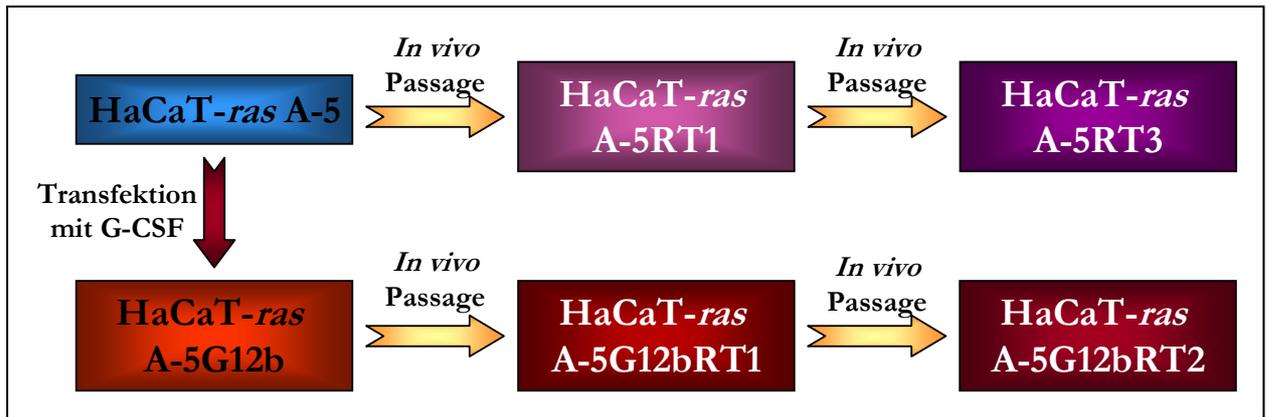


Abb. 8: Durch *in vivo* Passage entstandene Zelllinien.

HaCaT-*ras* A-5RT1 Zellen wurden durch *in vitro* Reaktivierung eines Tumors gewonnen, der nach subkutaner Injektion von HaCaT-*ras* A-5 Zellen der Passage 16 in die Nacktmaus entstanden war (Abb. 8). Die daraus resultierenden A-5RT1 Zellen bildeten nach Injektion in die Nacktmaus differenzierte, invasive Plattenepithelkarzinome aus. Tumore aus HaCaT-*ras* A-5RT1 wurden weiter *in vivo* passagiert, wobei die hoch maligne Zelllinie HaCaT-*ras* A-5RT3 entstand (Mueller *et al.* 2001).

Durch *in vivo* Wachstum der mit G-CSF transfizierten Zellen HaCaT-*ras* A-5G12b als Subkutantumore in der Nacktmaus und darauf folgende *in vitro* Reaktivierung (siehe 3.6.1.1) entstanden die schnell und invasiv wachsenden Zellen HaCaT-*ras* A-5G12bRT1A, HaCaT-*ras* A-5G12bRT1B, HaCaT-*ras* A-5G12bRT1C und HaCaT-*ras* A-5G12bRT1D (Obermueller *et al.* 2004). Durch erneute *in vivo* Passage der HaCaT-*ras* A-5G12bRT1A Zellen entstanden die Zelllinien HaCaT-*ras* A-5G12bRT2AA und HaCaT-*ras* A-5G12bRT2AB, und durch *in vivo* Passage von HaCaT-*ras* A-5G12bRT1D entstanden die Zelllinien HaCaT-*ras* A-5G12bRT2DA und HaCaT-*ras* A-5G12bRT2DB (Abb. 8). Diese Zelllinien zeichneten sich durch ein gegenüber den parentalen Zellen erheblich schnelleres und aggressiveres Wachstum aus.

3.2 Zellkultur

Die Kultivierung der oben genannten Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Dazu wurden die verwendeten Geräte und Medien vor dem Gebrauch sterilisiert. Zusätzlich erfolgten alle Arbeiten in einer Sterilbank, wobei alle Gefäße nur in dieser Bank geöffnet und vor dem Hineinstellen gründlich mit Alkohol abgewischt wurden.

Die verschiedenen Zelllinien wurden in definierten Standardmedien kultiviert, um das für die *in vitro* Versuche optimale Kulturmedium zu identifizieren. Die Standard-Kultivierung der Zellen wurde in 15 cm Zellkulturschalen durchgeführt; Medienwechsel erfolgten dreimal wöchentlich. Das Wachstum der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 91% Luftfeuchtigkeit.

3.2.1 Zellen und Kulturbedingungen

Für alle c-Ha-*ras*-transfizierten Klone der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT wurde 4x MEM/10% FCS und 400 µg/ml Geneticin verwendet; mit weiteren Zielgenen transfizierte HaCaT-Klone wurden in 4x MEM/10% FCS, 400 µg/ml Geneticin und 200 µg/ml Zeozin kultiviert.

Für die Passagierung konfluenter HaCaT-Keratinozyten wurden die Zellen 10 bis 30 min in EDTA (0,1%) inkubiert, bis die Interzellularräume durch Lockerung der Kalzium abhängigen Zellkontakte vergrößert waren. Dies war im Phasenkontrast-Mikroskop als optisch weniger dichte und damit hellere Zone um die Zellen erkennbar. Durch anschließende Trypsin/EDTA-Behandlung (im Verhältnis 1:1) wurden die Zellen nach kurzer Inkubation und leichtem Klopfen der Kulturschale von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst, durch vorsichtiges Pipettieren in Einzelzellsuspension überführt und im Standardmedium aufgenommen. Die passagierten Zellen wurden im Verhältnis 1:10 oder in einer Dichte von 9000-10000 Zellen/cm² ausgesät. Die quantitative Analyse der Zellzahl erfolgte im CASY-Zellzählgerät.

Medien:

4x MEM: „Modified Eagles Minimal Essential Medium“ (Fusenig und Worst, 1975) enthält eine vierfache Konzentration an Aminosäuren und Vitaminen sowie 2 mM Glutamin. Angaben in mg/l.

D-Glucose	813,01	Phenolrot	8,13
Streptomycinsulfat	50	Na-Penicillin	10 ⁵ U/l
L-Alanin	28,96	L-Arginin	409,76
L-Asparagin	48,8	L-Asparaginsäure	43,24
L-Cystein	78,04	L-Glutaminsäure	47,8
L-Glutamin	1187,78	Glycin	24,4
L-Histidin	136,6	L-Isoleucin	169,12
L-Leucin	169,12	L-Lysin	237,4
L-Methionin	48,8	L-Phenylalanin	104,08
L-Prolin	37,4	L-Serin	34,6
L-Threonin	156,08	L-Tryptophan	32,52
L-Tyrosin	117,08	L-Valin	73,13
D-Ca Panththenat	3,24	Cholinchlorid	3,24
Folsäure	3,24	i-Inosit	6,25
Nicotinsäureamid	3,24	Pyridoxal	3,24
Riboflavin	0,32	Thiamin	3,24
CaCl ₂	113,82	KCL	325,2
KH ₂ PO ₄	48,78	MgSO ₄	162,6
NaCl	6504,07	NaH ₂ PO ₄	48,78

NaHCO_3 3089,43

DMEM: *Dulbeccos MEM (Biochrom)*

NaHCO_3	44 mM
D-Glucose	22,7 mM
N-Acetyl-N-Alanyl-L-Glutamin	1,028g/l
Penicillin/Streptomycin	1% v/v (Stammlösung 10.000U = 10mg/ml)
Natriumpyruvat (100mM)	1% v/v

KBM: *Keratinocyte Basal Medium (Clonetics)*. Die Zusammensetzung ist Geheimmis des Herstellers.

RPMI: *RPMI 1640 Medium, Bestandteile in mg/l (Biochrom)*

Glycin	0.133	L-Isoleucin	0.382
L-Arginin	1.15	L-Hydroxyprolin	0.153
L-Asparagin	0.379	L-Histidin	0.0968
L-Asparaginsäure	0.150	L-Glutamin	2.05
L-Cystein	0.208	L-Glutaminsäure	0.136
L-Lysin Hydrochlorid	0.274	L-Leucin	0.382
L-Methionin	0.101	L-Phenylalanin	0.0909
L-Prolin	0.174	L-Serin	0.286
L-Threonin	0.168	L-Tryptophan	0.0245
L-Tyrosin	0.111	L-Valin	0.171
Biotin	0.000820	Cholinchlorid	0.0214
D-Calcium Pantththenat	0.000524	Folsäure	0.00227
Niacinamid	0.00820	i-Inositol	0.194
Para-Aminobenzolsäure	0.00730	Pyridoxin Hydrochlorid	0.00485
Riboflavin	0.000532	Thiamin Hydrochlorid	0.00297
Vitamin B12	0.0000037	Calciumnitrat	0.424
Magnesiumsulfat (anhyd.)	0.407	KCl	5.33
Natriumbikarbonat	23.81	NaCl	103.45
D-Glucose	11.11	Glutathion	0.00326
Phenolrot	0.0133		
Na_2HPO_4	5.63		

Alle Medien wurden zusätzlich mit 100 U/ml Penicillin (Biochrom), 50 mg/ml Streptomycin (Biochrom) und FCS versetzt. Zur dauerhaften Selektion der Ha-ras transfizierten Zellen wurde 400µg/ml Geneticin (PAA) und zur Selektion der mit G-CSF oder GM-CSF transfizierten Zellen wurde zusätzlich 200µg/ml Zeozin (Invitrogen) zugegeben.

Reagenzien für die Zellkultur:

EDTA	Gerbu, 0,05% in PBS- + 1 µl/ml Phenolrot (Merck)
FCS (fetal calf serum)	Biochrom
Geneticin	100 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert (PAA)
Zeozin	100 mg/ml in sterilem H ₂ O (Invitrogen)
PBS-	Phosphate buffered Saline (Serva)
	KCl 4,2mM
	KH ₂ PO ₄ 1,4mM
	NaCl 136,8mM
	Na ₂ HPO ₄ 8,3mM
PBS+	+ mit 0,89mM Ca ²⁺ und 0,49mM Mg ²⁺ (Serva)
Phenolrot	0,5% in PBS (Merck)
Trypsin	0,1% in PBS- + 1 µl/ml Phenolrot (Roche Diagnostics)
Casy [®] ton	Isotonische Lösung für die Zellzählung (Schärfe-System, Reutlingen)

Materialien für die Zellkultur:

6cm, 10cm und 15cm Kulturschalen	Falcon
6, 12, 24, 48 und 96 Well Platten	Falcon

3.2.2 Einfrieren von Zellen

Die Langzeitlagerung von Zelllinien erfolgte durch Kryokonservierung und Lagerung in der Gasphase von flüssigem Stickstoff. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen trypsinisiert und gezählt, das Medium wurde durch Zentrifugieren abgetrennt (5-10 min, 1100 rpm/ 200x g; Kendro, Labofuge 400) und entfernt. Die Zellen wurden in Einfriermedium in einer Endkonzentration von 2x 10⁶ Zellen/ml aufgenommen. Das Einfriermedium bestand aus dem jeweiligen Grundmedium mit Zusatz von 10% Glycerin und in 20% FCS; jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde in Einfriereröhrchen mit Schraubdeckel abgefüllt. Zum Einfrieren der Zellen gibt es zwei Möglichkeiten: das für die Zellen schonendste Verfahren ist die Kryokonservierung, die im DKFZ von der Tumorbank durchgeführt wird. Hierbei wurden die Zellen um 1°C pro Minute abgekühlt. Alternativ kann ein mit Isopropanol gefülltes Cryo-Einfriergerät verwendet werden, das zuvor für 10min im Kühlschrank vorgekühlt wurde. Bei beiden Verfahren mussten die Zellen vor dem Einfrieren 30 Minuten im Einfriermedium stehen,

um das Glycerin gut aufzunehmen. Nach diesen 30 Minuten wurden die Röhrchen in die Einfrier-Dose überführt und über Nacht bei -80°C eingefroren; dabei sollte ebenfalls eine Temperaturenniedrigung von 1°C pro Minute erzielt werden. Bei beiden Methoden erfolgte die endgültige Lagerung der Zellen in der Gasphase über flüssigem Stickstoff. Die Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank aufgetaut und sofort in einer 10 cm-Schale mit vorgewärmtem Medium ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt.

Material zur Cryokonservierung:

Einfrierröhrchen

Nunc

Cryo-Einfriergerät

Nalgene Nunc International

Glycerin

Roth

3.2.3 Test auf Mykoplasmenkontamination

Dieser Test dient der Überprüfung der Zellkulturen auf Infektion mit Mykoplasmen. Diese intrazellulären Parasiten können Einfluss auf die Genexpression und das Verhalten der Zellen nehmen. Die verwendeten Zelllinien wurden standardmäßig auf die Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Die Zellen wurden für 2 Passagen in Antibiotikafreiem Medium kultiviert und nachfolgend auf Objektträgern ausgesät. Nachdem die Zellen 70 bis 80% Konfluenz erreicht hatten wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS- gewaschen und für 15 Minuten in frischer Carnoy-Lösung fixiert (Methanol und Essigsäure im Verhältnis 3:1). Die luftgetrockneten Zellen wurden mit $0,5\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst/Bisbenzimid in PBS- für 30 Minuten im Dunkeln angefärbt. Dabei handelt es sich um einen Farbstoff, der zwischen die Basen der DNA interkaliert. Nach dreimaligem Waschen in destilliertem Wasser wurden die gefärbten Zellen in Mowiol eingebettet und im UV-Epifluoreszenzmikroskop auf positive Signale im Zytoplasma analysiert, da DNA Signale im Cytoplasma der Zellen ein Indikator für eine Infektion durch Mykoplasmen sind.

Material:

<i>PBS-</i>	<i>Serva</i>
<i>Methanol</i>	<i>Merck</i>
<i>Essigsäure (Eisessig)</i>	<i>Riedel-de Haen</i>
<i>Höchst/Bisbenzimid</i>	<i>Sigma</i>
<i>Mowiol</i>	<i>Calbiochem</i>
<i>Adhäsionsobjekträger</i>	<i>Neolab</i>

3.3 Proliferationstests**3.3.1 BrdU-ELISA**

Bei einem BrdU-ELISA handelt es sich um einen Test, der die Zellproliferation mittels Nachweis des während der DNA-Neusynthese als Basenanalogs für Thymidin eingebauten Bromdesoxyuridins (BrdU) misst. Diese Detektion erfolgt mittels eines für BrdU spezifischen Peroxidasegekoppelten Antikörpers. Gemessen wird dabei die Umsetzung eines farbigen Substrates (Tetramethylbenzidin) durch die Peroxidase. Die Menge an farbigem Substrat und damit die Farbintensität ist proportional der Menge des eingebauten BrdUs und damit proportional der Zellproliferation.

Für BrdU-ELISAs wurden parentale HaCaT-*ras* A-5 Zellen und -Transfektanten in 4x MEM/ 10% FCS in 200µl Volumen pro Well in 96-Well-Platten ausgesät. Die für jede Zelllinie optimale Zellzahl wurde in Vorversuchen ermittelt (A-5: 2000 Zellen/Well, A-5G12b: 4000 Zellen/Well, A-5GM6, A-5GM14 und A-5Z12: 3000 Zellen/Well). Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen und durch 100µl/Well serumfreies 4xMEM mit Wachstumsfaktoren (2-250ng/ml G-CSF oder GM-CSF) oder mit den Wachstumsfaktor neutralisierenden Antikörpern (1-2µg/ml anti-G-CSF oder anti-GM-CSF) ersetzt. Nach weiteren 4 Tagen wurde die BrdU-ELISA-Reaktion nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.3.2 Proliferationsnachweis mit SYBR^R Green

Ein weiterer Nachweis der Zellproliferation erfolgte über die Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellkulturen. Hierbei wurde die Floreszenzintensität der in die DNA interkalierenden Substanz SYBR^R Green ermittelt. Diese ist proportional der Anzahl der in der Kultur befindlichen Zellen. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte im Fluoro-Skan Ascent.

Für diesen Versuch wurden in 24-Well Platten verschiedene Zellzahlen (10.000-200.000 Zellen/Well) ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium durch Medium mit verschiedenen Konzentrationen der Wachstumsfaktoren (20-200ng/ml G-CSF oder GM-CSF) bzw. der neutralisierenden Antikörper (1-2µg/ml anti-G-CSF oder anti-GM-CSF) oder ein

irrelevanter Antikörper als Kontrolle) ersetzt. Die Wachstumsfaktoren und Antikörper wurden mit dem Kulturmedium ohne FCS verdünnt.

Zusätzlich wurden verschiedene Zellkulturmedien (4xMEM, DMEM, RPMI, KBM) mit 0-2% FCS und verschiedene Verdünnungen des SYBR-Green Farbstoffes im SYBR^R-Puffer (1:500-1:5000) getestet. Die Messung erfolgte nach 3, 5 und 7 Tagen.

3.3.3 Wachstumskurven

Mit Hilfe von Wachstumskurven wird die Modulation des Wachstumsverhaltens z.B. infolge von Transfektion überprüft. Es wurden 8000 Zellen pro Well der parentalen HaCaT-*ras* A-5 Zellen sowie der Transfektanten in 4x MEM/ 10% FCS in 12-Well Platten ausgesät und für 10 Tage in Standardmedium kultiviert. Um die Anwachsrate zu ermitteln, wurden die Zellen am Abend nach der Aussaat trypsiniert und gezählt. Die Zellzahlen wurden täglich in drei Replikaten ermittelt und in einer Wachstumskurve dargestellt.

3.3.3.1 Proliferations-Wachstumskurven

Wachstumskurven wurden außerdem als weiterer Nachweis der Zellproliferation nach Zugabe von Wachstumsfaktoren oder aber einer erniedrigten Zellzahl nach Zugabe von neutralisierenden Antikörpern verwendet. Dazu wurde das Medium 24 Stunden nach der Aussaat der Zellen durch 4xMEM ohne FCS ersetzt, dem Wachstumsfaktoren (2-200ng/ml G-CSF oder GM-CSF) oder Antikörper (1-2µg/ml anti-G-CSF oder anti-GM-CSF oder als Kontrolle ein irrelevanter Antikörper) zugesetzt wurden. Um die Anwachsrate zu ermitteln, wurden die Zellen am Abend nach der Aussaat trypsiniert und gezählt. Die Zellzahlen wurden nach 3, 5 und 7 Tagen in drei Replikaten ermittelt und in einer Wachstumskurve dargestellt.

Nachweis von Zellproliferation

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)

Roche

SYBR^R Green I nucleic acid gel stain

Molecular Probes

SYBR^R -Puffer

Molecular Probes

3.4 Migrationstest

Mit Migrationstests wird die Modulation des Migrationsverhaltens in Folge von Transfektion bzw. nach Zugabe von Wachstumsfaktoren oder Wachstumsfaktor neutralisierenden Antikörpern bestimmt.

Parentale HaCaT-*ras* A-5 Zellen und -Transfektanten wurden in 4x MEM/ 10% FCS in 6-Well Platten ausgesät und in Standardmedium kultiviert. 1 Tag nach Erreichen der Konfluenz wurde der Zellrasen mittels eines Zellschabers unterbrochen und die Ränder des entstandenen zellfreien Streifens unter der Kulturschale mit Edding markiert. An diesen Rändern wurden drei Querstreifen eingezeichnet, die der Orientierung bei der darauf folgenden fotografischen Dokumentation dienen (Abb. 9).

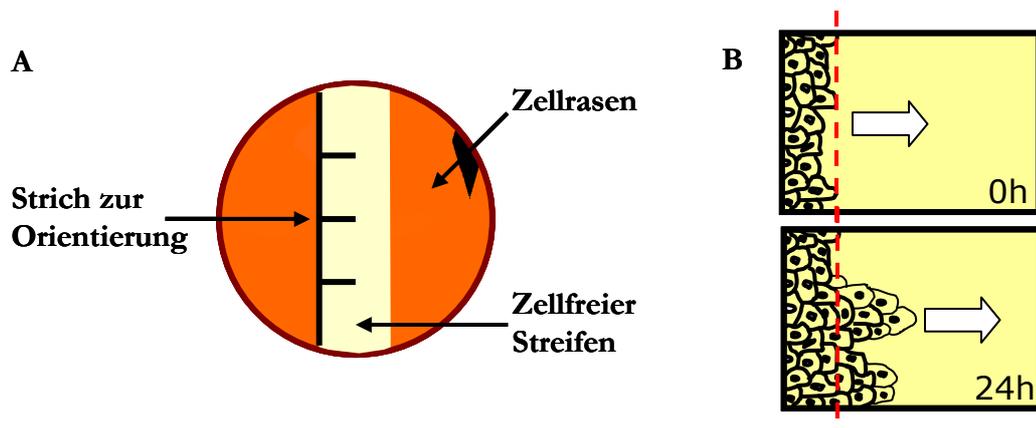


Abb. 9: Schematische Darstellung eines Migrationsversuchs. Aufsicht auf den zellfreien Streifen in der Kulturschale mit Markierung des Zellrandes (A); Schema der Zellmigration über die markierte Linie (B, Schema von C. Gutschalk und M. Oehme).

Das Kulturmedium wurde sorgfältig abgesaugt und durch 2ml Medium ohne FCS ersetzt, dem bei Bedarf 50 bzw. 100ng/ml G-CSF oder GM-CSF oder auch 1 bzw. 2 μ g/ml neutralisierende Antikörper zugegeben wurden.

Die fotografische Dokumentation erfolgte an jeweils drei Stellen pro Well direkt nach der Behandlung und wurde nach 24 und 48 Stunden wiederholt. Die Migration der Zellen an diesen Stellen wurde ausgemessen und die Migrationsdistanz in μ m errechnet.

Material:

Zellschaber

Costar

Wachstumsfaktoren und Antikörper für die Zellkultur

rekombinantes humanes G-CSF

Re&D Systems

rekombinantes humanes GM-CSF

Re&D Systems

anti-hG-CSF-Antikörper: Klon G61.8.1

Calbiochem

anti-hGM-CSF-Antikörper: Klon GM4.1.9

Calbiochem

irrelevanter Antikörper: Maus IgG1 Kappa

Sigma

3.5 *In vitro* Tumorigenitätstest: Organotypische Kulturen

Die Zellen wurden in 3-Dimensionalen Haut-Äquivalentkulturen (den „organotypischen Kulturen“) aus einer extrazellulären Matrix aus Kollagen analysiert. Teilweise wurden in diese extrazelluläre Matrix bestrahlte und damit teilungsunfähige Fibroblasten („Feeder-Zellen“) eingebettet, und oben auf dem Kollagengel wurden die Keratinozyten luftexponiert kultiviert (Abb. 10). Die in dieser Arbeit gezeigten organotypischen Kulturen wurden von Dr. M. Müller und A. Krämer hergestellt.

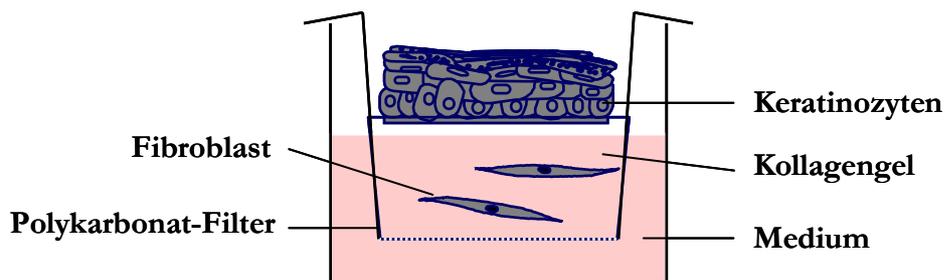


Abb. 10: Schematische Darstellung einer organotypischen Kultur. Schema von Dr. M. Mueller.

3.5.1 Isolierung von Kollagen

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung des Kollagens wurden Rattenschwänze von Kontrolltieren verwendet, die vom Tierlabor des DKFZ zur Verfügung gestellt wurden. Die bei -20°C konservierten Rattenschwänze wurden nach dem Auftauen in 70% Ethanol desinfiziert. Nach mehrmaligem Spülen in destilliertem Wasser wurde die Haut der Rattenschwänze eingeschnitten und abgezogen. Die gehäuteten Schwänze wurden mit Hilfe von zwei Klammern in kleinere Segmente gebrochen; die überwiegend aus Kollagen Typ I bestehenden Sehnen wurden freipräpariert und in einem mit sterilem PBS gefüllten Gefäß gesammelt. Die restlichen Bindegewebsanteile wie Blutgefäße und Nervenscheiden wurden vorsichtig entfernt. Danach wurden die Sehnenstränge auf Filterpapier getrocknet. Die getrockneten Kollagenfasern wurden gewogen, in 100-facher Menge steriler Essigsäure (0,1%) aufgenommen und bei 4°C bis zur Auflösung des Kollagens gerührt. Die unlöslichen Bestandteile fielen nach 30 min Zentrifugation bei $10000\times g$ als Pellet aus. Der Überstand aus gelöstem Kollagen wurde in sterilen Gefäßen lyophilisiert (Refrig). Zur Herstellung der Gebrauchslösung von Kollagen wurde das Trockengewicht des Lyophilisates mit 0,1% Essigsäure in einer Endkonzentration von 4 mg/ml gelöst. Die Lagerung der Kollagenlösung erfolgt bei 4°C .

Das Kollagen wurde für organotypische Hautäquivalentkulturen *in vitro* (3,2mg/ml) und für Transplantate des Oberflächen-Transplantationsmodells *in vivo* (2,4mg/ml) verwendet.

Material:

<i>Ethanol</i>	<i>Riedel-de Haen</i>
<i>PBS</i>	<i>Serva</i>
<i>Essigsäure</i>	<i>Riedel-de Haen</i>
<i>Refrig-Gefäße</i>	<i>Fa. Schrader, Friedland</i>

3.6 *In vivo* Tumorigenitätstest

Die Bestimmung der Tumorigenität verschiedener Zelltypen erfolgte zum einen durch subkutane Injektion, zum anderen mittels Oberflächentransplantation auf athymische Nacktmäuse.

3.6.1 Subkutane Injektion

Um die Tumorigenität von Zellen zu bestimmen, wurden 5×10^6 Zellen pro 100 μ l Kulturmedium subkutan in den Nackenbereich 7-9 Wochen alter Nacktmäuse injiziert. Die Tumorgroße wurde mit einem Mess-Schieber wöchentlich in zwei Achsen ermittelt und das Tumolvolumen nach einer Formel ($\text{Breite} \times \text{Breite} \times \text{Länge} \times 0,52$) berechnet. Tumore größer als 1 cm^3 wurden entfernt und zur weiteren Analyse für Histologie und Gefrierschnitte präpariert. Die Tiere wurden zur Beobachtung bis zu 6 Monate gehalten.

3.6.1.1 Reaktivierung von Tumorgewebe

Die *in vivo* Umgebung eines Tumors übt auf diesen einen starken Selektionsdruck aus, der eine weitere Tumorprogression zur Folge haben kann.

Zur Reaktivierung wurde ein Teil des durch subkutane Injektion der Zelllinie HaCaT-*ras* A-5G12b entstandenen Tumors mit Skalpell und Schere stark zerkleinert und auf einer mit FCS vorbeschichteten Zellkulturschale verteilt. Vor der mechanischen Zerkleinerung wurde teilweise eine Vorinkubation in Trypsin/EDTA (0,1/ 0,05%, im Verhältnis 1:1) vorgenommen. Die Reaktivierung erfolgte in 4x MEM/10% FCS. Nach Auswachsen der Keratinozyten aus den Gewebestücken wurde das Medium durch 4x MEM/10% FCS, 400 μ g/ml Geneticin und 200 μ g/ml Zeozin ersetzt, um eine Selektion der mit G-CSF transfizierten HaCaT-*ras* Klone zu erhalten und zugleich mesenchymale Maus-Zellen (z.B. Fibroblasten) zu entfernen.

3.6.2 Versuche zur Metastasierung

Um das Metastasierungspotential der durch wiederholte *in vivo* Progression entstandenen malignen Zelllinien A-5G12bRT2AA und A-5G12bRT2DB zu ermitteln, wurden diese jeweils 5 Mäusen subkutan injiziert (siehe: 3.6.1), der resultierende Tumor nach Erreichen einer Größe von 1 cm^3 unter sterilen Bedingungen entnommen und die Wunde mit Wundklammern verschlossen.

Nach 6 Monaten wurden die Tiere getötet und auf Metastasen insbesondere in stark durchbluteten Organen wie Lunge, Milz und Leber untersucht.

3.6.3 Oberflächentransplantation

In diesem Versuch wurden ein Gel aus Kollagen Typ I der Ratte hergestellt und zwischen zwei konzentrische Teflon-Ringe gespannt. Auf diesem Gel wurden die Zellen ausgesät, einen Tag *in vitro* vorkultiviert und die Transplantationskammer anschließend auf die Muskelfaszie von Nacktmäusen transplantiert (zur Übersicht siehe Fusenig 1992). Zum Schutz der Zellen wurde vor der Transplantation ein Silikonhut auf die Teflonringe aufgezogen.

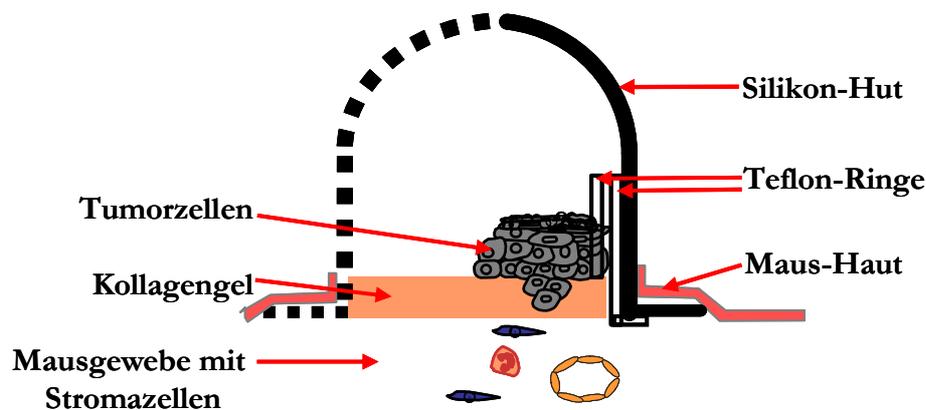


Abb. 11: Schematische Darstellung einer Transplantationskammer. Schema verändert nach Dr. M. Mueller.

3.6.3.1 Herstellung der Kollagengele

Das in 0,1% Essigsäure gelöste lyophilisierte Kollagen wurde in Hanks-Lösung und FCS gelöst und durch Zugabe von Ca^{2+} , Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 sowie Erwärmen auf 37°C in einer Endkonzentration des Kollagens von 2,4 mg/ml geliert.

Kollagengel-Mischung:

Kollagen-Lösung (3 mg/ml, in 0,1% Essigsäure)	80%
Hank's Lösung (10x konzentriert)	10%
FCS	10%

NaOH (5 M) bis zum Umschlagspunkt des Farbindikators Phenolrot (einige Tropfen)

Alle Zusätze wurden auf Eis zur Kollagenlösung zugefügt; die Lösung wurde nach jeder Zugabe gründlich und blasenfrei mit einer Pipette gemischt. Die Kollagengel-Mischung wurde in Volumina von jeweils 500 µl in 24-Wellplatten gegossen. Das Gelieren erfolgte für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank. Danach wurden die Gele mit Kulturmedium bedeckt.

Material:

<i>Hank's Lösung (10x konzentriert)</i>	<i>Biochrom</i>
<i>FCS</i>	<i>PAA</i>
<i>Natronlauge</i>	<i>Baker</i>
<i>Essigsäure</i>	<i>Riedel-de Haen</i>

Hank's Lösung, 10x konzentriert, Angaben in mg/l (Biochrom)

<i>NaCl</i>	<i>8000</i>	<i>NaHCO₃</i>	<i>350</i>
<i>KCl</i>	<i>400</i>	<i>Phenolrot</i>	<i>10</i>
<i>Na₂HPO₄</i>	<i>48</i>	<i>Glucose</i>	<i>1000</i>
<i>KH₂PO₄</i>	<i>60</i>	<i>CaCl₂</i>	<i>140</i>
<i>MgSO₄•7H₂O</i>	<i>200</i>		

3.6.3.2 Herstellung der Transplantationskammern und Transplantation

Das Kollagengel wurde zwischen zwei konzentrische Teflonringe gespannt (für Details siehe Noser & Limat 1987). Auf der Oberfläche des Geles wurden 2×10^5 Zellen in 100 μ l Kulturmedium ausgesät. Um das Anwachsen der Zellen auf dem Kollagengel zu ermöglichen, wurden die Kammern in Stanzschalen gesetzt, so dass das Medium nur von unten ins Kollagengel eindringen konnte; das Anwachsen der Tumorzellen erfolgte durch Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ für 24 Stunden. Nicht angewachsene Zellen wurden durch Spülen mit Medium entfernt. Nachfolgend wurde das Medium aus dem System entfernt, um den Luftkontakt der Zellen zu ermöglichen. Die Kammern wurden zum Schutz mit Silikonhütchen abgedeckt, welche die Teflonringe eng umschließen. Zur Transplantation der Kammern auf die dorsale Muskelfaszie wurden 7-9 Wochen alte Nacktmäuse mit Rompun (1%) und Ketavet (10mg/ml) mit je 0,1ml pro 10g Körpergewicht (intraperitoneal) betäubt, die Rückenhaut der Maus sagittal auf ca. 2cm Länge eingeschnitten, die Kammer eingesetzt und die Haut mit Wundklammern fixiert. Die Wunde wurde mit Sprühverband geschützt. Während der Betäubung lagen die Tiere auf Heizkissen, um eine Unterkühlung zu vermeiden. Die Transplantate wurden zu definierten Zeitpunkten *in toto* ausgeschnitten und anschließend für Gefrierschnitte präpariert. Etwa 90 Minuten vor der Tötung wurden der Maus 100 μ l BrdU/BrdC (65,1mM) in die Schwanzvene injiziert.

Mit Hilfe dieser Methode können die frühen Interaktionen zwischen Epithel und Maus-Mesenchym im Detail untersucht werden. Durch das Kollagengel bleiben die Keratinozyten für ein bis zwei Wochen vom Mausgewebe getrennt; das Kollagengel ermöglicht jedoch einen reziproken Austausch löslicher Wachstumsfaktoren. Insbesondere benigne und maligne Zellen

können bereits zu sehr frühen Zeitpunkten aufgrund der verschiedenen Interaktionen mit mesenchymalen Zellen unterschieden werden (Boukamp *et al.* 1990).

Material für Transplantationskammern:

<i>Kombi-Teflonringe und Silikon-Transplantationskammern</i>	<i>Renner</i>
<i>Mäuse: Swiss nu/nu, weiblich</i>	<i>Iffa Credo</i>
<i>Stanzgen-Petrischalen</i>	<i>Falcon</i>
<i>Tissue-Tek Einbettmedium für Gefrierpräparate</i>	<i>Takira</i>
<i>Ethidiumbromid-Lösung</i>	<i>Sigma</i>
<i>Rompun</i>	<i>Bayer</i>
<i>Ketavet</i>	<i>Pharmacia</i>
<i>Flint Sprühverband</i>	<i>Togal-Werk München</i>
<i>BrdU/BrdC</i>	<i>MP Biomedicals</i>

3.6.4 Gewebeaufbereitung

Zur Analyse der Tumorigenitätsversuche wurden die *in vivo* Präparate für histologische Färbungen, indirekte Immunfluoreszenz bzw. *in situ* Hybridisierung aufgearbeitet.

3.6.5 Histologie

In vivo-Präparate wurden in 3,7% Formalin/ PBS über Nacht vorfixiert; die Nachfixierung in Formalin erfolgte nach Einbettung in 2% Agar. Die eingebetteten Präparate wurden in 5 µm Schichtdicke an einem Schlittenmikrotom geschnitten, in 40°C warmem Wasser gestreckt, auf Objektträger aufgezogen und bei 50°C getrocknet. Entparaffinierung und Rehydratisierung erfolgten automatisiert.

Material

<i>Formaldehyd</i>	<i>Merck</i>
<i>Adhäsionsobjektträger</i>	<i>Neolab</i>
<i>Agar</i>	<i>Fluka</i>

3.6.6 Gefrierschnitte

In vivo-Proben wurden in Tissue Tec-Einbettmedium langsam in der Gasphase über flüssigem Stickstoff eingefroren und nachfolgend bei -80°C gelagert. Die Präparate wurden an einem Kryomikrotom in 6 µm Schnittdicke geschnitten, auf beschichtete Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet und bei -80°C aufbewahrt.

Material für Gefrierschnitte:*Adhäsionsobjektträger (Superfrost)*

Neolab

Tissue-Tek Einbettmedium für Gefrierpräparate

Takira

3.7 Indirekte Immunfluoreszenz

Der Nachweis von Proteinen *in situ* mittels indirekter Immunfluoreszenz erfolgte an Gefrierschnitten bzw. Paraffinschnitten.

3.7.1 Standardprotokoll der indirekten Immunfluoreszenz

Die Objektträger mit Paraffinschnitten wurden durch Inkubation in einer Xylol/Alkoholreihe rehydriert. Dazu wurden die Schnitte zunächst 2 x 10 min in Xylol inkubiert, anschließend 2 x 2 min in 96% Ethanol, dann 2 x 2 min in 80% Ethanol und zuletzt 2 x 2 min in 60% Ethanol. Bei Paraffinschnitten muss vor der Inkubation mit Antikörpern zunächst das Epitop freigelegt werden. Dies erfolgte je nach Antikörper durch 2 Methoden:

- a) Target Retrieval Solution: Dieses Verfahren wurde bei Markierungen mit G-CSF, GM-CSF und Mib eingesetzt. Dazu wurde die TRS 1:10 verdünnt, auf 95°C erhitzt und die Objektträger für 20 min darin inkubiert.
- b) Proteinase E: Dieses Verfahren wurde bei den meisten Antikörpern eingesetzt. Hierbei wurde Proteinase E (1mg/ml) in PBS+ im Verhältnis 1:20 verdünnt und die Schnitte darin für 10 Minuten inkubiert.

Objektträger mit Gefrierschnitten wurden für 10 Minuten in Aceton bei -20°C fixiert und vor Zugabe der Primärantikörper kurz in PBS+ rehydriert.

Bei Cryo- wie Paraffinpräparaten wurden anschließend die Schnitte mit Pap-Pen umrandet um ein Auslaufen der Antikörper-Lösung zu vermeiden, 30 Minuten mit 35 µl 12%BSA (Serva) in PBS+ vorinkubiert, danach mit 35µl der Primärantikörper-Mischung versehen und in einer feuchten Kammer inkubiert. Als Inkubationsbedingungen wurden entweder 90 Minuten Raumtemperatur oder 4°C über Nacht gewählt.

Nach der Inkubation mit den Primärantikörpern wurden die Objektträger für 3x 7 min mit PBS+ gewaschen. Fluorochrom-gekoppelte sekundäre Antikörper wurden für 30 bis maximal 45 min im Dunkeln zugegeben. Die Färbung der Zellkerne erfolgte gleichzeitig zur Sekundärantikörper-Inkubation mit Hoechst/Bisbenzimid (20 µg/µl). Nach erneutem Waschen in PBS (4x5 min) wurden die Schnitte in Permafluor eingebettet und nach dem Trocknen bei 4°C gelagert. Ein gleichzeitiger Proteinnachweis verschiedener Epitope war durch jeweiliges Mischen der Primär- und Sekundärantikörper vor der Inkubation möglich.

Material:

<i>Xylol</i>	<i>Fluka</i>
<i>Ethanol</i>	<i>Riedel-de Haen</i>
<i>Target Retrieval Solution</i>	<i>Dako</i>
<i>Proteinase E</i>	<i>Merck</i>
<i>Aceton</i>	<i>Baker</i>
<i>PBS</i>	<i>Serva</i>
<i>Hoechst/ Bisbenzimid</i>	<i>Sigma</i>
<i>Permafluor</i>	<i>Immunotec</i>
<i>BSA (Rinderserumalbumin, Fraktion V)</i>	<i>Serva</i>

3.7.1.1 Primärantikörper

Tabelle 2: eingesetzte Primärantikörper

Bezeichnung	Spezifität	Typ	Verdünnung	Firma
Ki-76/ Mib-1	Proliferierende Zellen	Maus; monoklonal	1:20	Dianova
CD31 (PECAM-1)	Endothelzellen	Ratte; monoklonal	1:100	PharMingen
ERMP-23	Maus; Makrophagen	Ratte, monoklonal	1:75	DPC Biermann
BM8	Maus; Pan-Makrophagen	Ratte; monoklonal	1:50	Dianova
Neutrophile Klon 7/4	Maus; Neutrophile Granulozyten	Ratte; monoklonal	1:50	Serotec
Pan-Keratin	Keratin, pan-spezifisch	Meerschwein; polyklonal	1:100	Progen
Keratin	human; Keratin	Kaninchen; polyklonal	1:1000	Dako
Kollagen IV	humanes Kollagen Typ IV; Basalmembran-Komponente;	Kaninchen; polyklonal	1:100	Novotec
G-CSF	rekombinantes humanes G-CSF	Maus; monoklonal	1:20	Calbiochem
GM-CSF	rekombinantes humanes GM-CSF	Maus; monoklonal	1:2,5	Calbiochem
mMMP-3	Maus; MMP-3	Ziege; polyklonal	1:200	G. Murphy
mMMP-9	Maus; MMP-9	Ziege; polyklonal	1:500	G. Murphy
mMMP-13	Maus; MMP-13	Ziege; polyklonal	1:100	G. Murphy
hMMP-2	humanes MMP-2	Ziege; polyklonal	1:150	G. Murphy
hMMP-13	humanes MMP-13	Ziege; polyklonal	1:500	G. Murphy

3.7.1.2 Sekundärantikörper

Tabelle 3: eingesetzte Sekundärantikörper

Gerichtet gegen	Fluorochrom	Produziert in	Verdünnung	Firma
Meerschwein	Texasrot	Esel	1:200	Dianova
Meerschwein	DTAF	Esel	1:100	Dianova
Meerschwein	AMKA	Esel	1:200	Dianova
Kaninchen	Alexagrün	Ziege	1:800	Molecular Probes
Kaninchen	Texasrot	Ziege	1:200	Dianova
Maus	Cy2	Ziege	1:800	Dianova
Maus	Texasrot	Ziege	1:200	Dianova
Ratte	Texasrot	Esel	1:200	Dianova
Ratte	Cy2	Esel	1:50	Dianova
Schaf	FITC	Esel	1:50	Dianova
Schaf	Alexarot	Esel	1:1000	Molecular Probes
Schaf	Texasrot	Esel	1:200	Dianova
Ziege	Alexagrün	Esel	1:800	Molecular Probes

3.8 RNA *in situ* Hybridisierung

Der Nachweis von Expression und Lokalisierung von RNA in Geweben *in situ* erfolgte durch *in situ* Hybridisierung. Dafür wurden „Sonden“, d.h. zur Ziel-RNA komplementäre RNA-Fragmente verwendet, bei denen während der Synthese als Basen-Analog Digoxigenin markiertes UTP eingebaut wurde. Dieses Dig-markierte Nukleotid wird über einen Enzym-gekoppelten Antikörper detektiert und in einer Enzym-Substrat Reaktion nachgewiesen.

3.8.1 Fixierung der Präparate

Da RNA-Moleküle extrem leicht hydrolysiert werden können, wurde während der Probenvorbereitung (Gefrierschneiden) sowie der ersten Behandlungsschritte bis einschließlich der Hybridisierung strikt auf die Vermeidung einer Kontamination durch RNAsen geachtet (siehe Ausubel *et al.* 1994).

Die 6 µm dicken, getrockneten Gefrierschnitte auf beschichteten Objektträgern wurden in 4% Paraformaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte getrocknet.

3.8.2 Synthese von Dig-markierten RNA-Sonden (*in vitro* Transkription)

Die Einzelstrang-(Dig)-markierten Sonden wurden durch *in vitro* Transkription über eine Plasmid-DNA synthetisiert. Die für die RNA-Sonde kodierende DNA-Sequenz war in den Klonierungsabschnitt eines Plasmides mit SP6, T3 bzw. T7 Bakteriophagen-Promotor kloniert. Zur Herstellung der Einzelstrang-Sonden wurde das Plasmid mit einer spezifischen Restriktions-Endonuklease am jeweiligen Ende des Genes linearisiert. Die Synthese der Gegenstrang-Sonde wurde durch Restriktionsspaltung an der nächsten 5' der Matrizen-DNA gelegenen Stelle vorbereitet. Die Synthese der Strang-Sonde wurde entsprechend durch Restriktionsspaltung der auf der 3' der codierenden Sequenz gelegenen Stelle vorbereitet.

Für die nachfolgende RNA-Synthese wurden 1-2 µg des linearisierten aufkonzentrierten Plasmides verwendet. Die RNA-Synthese über *in vitro* Transkription erfolgte für 2 Stunden bei 37°C.

Reaktionsansatz

2µl Dig-RNA-Mix (Boehringer Mannheim)

2µl cDNA (0,5-1µg/µl) (geschnittenes Plasmid)

2µl Transkriptionspuffer

1µl Ribonuklease-Inhibitor

11µl DEPC-H₂O

1+1µl RNA-Polymerase (T3 (MMP-3), T7 (MMP-9) oder SP6 (MMP-1))

Um die Inkorporationsrate zu steigern, wurde nach 1 Stunde erneut RNA-Polymerase zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2µl 0,2M EDTA, pH 8 gestoppt. Der Abbau der Matrizen-DNA erfolgte durch Zugabe von 1,7 µl tRNA, 0,3 µl RNase-Inhibitor und 1 µl RNase freie DNase I bei 37°C für 10 min.

Die RNA-Sonden wurden mit 1/10 Volumen 4 M Lithiumchlorid und 2,5-fachem Volumen 100% Ethanol (-20°C) in der Gegenwart von tRNA mehrere Stunden lang bei -80°C gefällt. Nach Fällung wurden die tRNA und nicht inkorporierte Nukleotide durch 30 min Zentrifugation

bei 20000x g für 10-15 min abgetrennt und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde mit 80% Ethanol (-20°C) gewaschen, abzentrifugiert (4°C, 20000x g, 30 min), getrocknet und in DEPC-Wasser aufgenommen. Die Inkorporation der Dig-markierten Nukleotide wurde im Dot-Blot überprüft. Die Sonden wurden entweder sofort für die Hybridisierung eingesetzt oder bei -80°C eingefroren.

3.8.3 Dot Blot

Der Dot Blot dient der Überprüfung der Effizienz der vorangegangenen Inkorporations-Reaktion während der *in vitro* Transkription in Gegenwart Dig-markierter Nukleotide.

Hierzu wurden die markierten Sonden in verschiedenen Verdünnungen auf ein Nitrozellulose-Papier (Hybond N⁺) aufgetropft und durch 30 Minuten backen bei 80°C immobilisiert.

Digoxigenin-markierte Sonden wurden durch Inkubation mit Anti-Digoxigenin-AP-Lösung (0,2µl/ml) detektiert und durch Zugabe des Substrates der Alkalischen Phosphatase (BCIP/NBT) sichtbar gemacht.

3.8.4 Vorbehandlung der Präparate

3.8.4.1 Behandlung mit Proteinase K

Zur Vorbereitung der Gefrierschnitte für die *in situ* Hybridisierung wurden die Schnitte mit 2x SSC/ 0,1% SDS bei 37°C unter leichtem Schütteln für 5 min bei 37°C mit 0,5 µg/ml Proteinase K behandelt. Die Proteolyse wurde durch Waschen der Schnitte in 0,1 M Glycin/ 2x SSC für 2 min bei Raumtemperatur gestoppt. Anschließend wurden die Schnitte in 4% Paraformaldehyd nachfixiert und in 50% Formamid/ 2x SSC gewaschen.

3.8.4.2 Acetylierung

Die Acetylierung der Schnitte erfolgte mit 1:333 verdünntem Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin für 3x 5 min. Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert, staubfrei getrocknet und sofort zur Hybridisierung weiter verwendet.

3.8.5 Hybridisierung

Die markierte RNA-Sonde wurde in Hybridisierungspuffer auf eine Konzentration von ca. 10ng/µl verdünnt, für 10 min auf 80°C erhitzt und unmittelbar danach auf Eis abgekühlt. Die Schnitte wurden nach trockener Prähybridisierung (30 Minuten bei Hybridisierungstemperatur) je nach Größe mit 5-10 µl Hybridisierungslösung in einer feuchten Kammer (50% Formamid/ 2x SSC) bei definierter Hybridisierungstemperatur (in der Regel 52°C) über Nacht inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurden mehrere Waschschriffe durchgeführt. Der erste Waschschriff erfolgte für 1 Stunde in 2x SSC/ 50% Formamid (deionisiert)/ 10 mM DTT bei 52°C, der zweite

Schritt für 1 Stunde bei 37°C in 2x SSC/ 50% Formamid (nicht deionisiert)/ 10 mM DTT. Durch Waschen der Schnitte in 2x SSC/ 0,1% SDS für 10 min wurde das Formamid entfernt. Danach wurden die Schnitte mit RNase (10 µg/ml RNase A in 2x SSC/ 0,1% SDS) für 30 min bei 37°C behandelt. Anschließend wurden die Schnitte in 0,5%SSC für 30 min und danach 10 min in Puffer AP-1 gewaschen.

3.8.6 Protokoll für AP-Reaktion mit normalem Substrat

Hierfür wurden die Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur mit einer Blockierungslösung vorinkubiert (Block-Stock, 10% in Maleinsäure) und anschließend für 2 Stunden mit einem Antikörper gegen Digoxigenin behandelt (Sheep anti-Dig Fab Fragment, 1:200). Nach der Antikörperreaktion wurde 1 min in Puffer AP-1 und danach 10 min in Puffer AP-3 gewaschen. Die eigentliche Farbreaktion erfolgte über Nacht durch Inkubation der Schnitte bei Raumtemperatur in Dunkelheit mit dem Substrat für die Alkalische Phosphatase (BCIP/NBT mit 1mM Levamisol). Nach 5 min waschen in 20mM Tris pH8 und 5mM EDTA erfolgte eine Färbung mit Hoechst/Bisbenzimid (20 µg/µl) für 10 min, gefolgt von einem weiteren Wasch-Schritt. Die Schnitte wurden nach dem Trocknen in Permafluor eingebettet und bei 4°C gelagert.

3.8.7 Protokoll für Dig-Nachweis ohne Substrat

Alternativ wurden statt des Antikörpers gegen Digoxigenin Primärantikörper gegen Strukturproteine wie Keratin oder Kollagen IV zugegeben. Statt der Substratreaktion erfolgte eine Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern gegen die oben genannten Proteine in Kombination mit einem für Digoxigenin spezifischen Rhodamin-gekoppelten Antikörper (Sheep anti-Dig Rhodamin, 1:100). Die Schnitte wurden 20 min in PBS+ gewaschen, getrocknet und in Permafluor eingebettet.

3.8.8 Protokoll für AP-Reaktion mit fluoreszierendem Substrat

Der Nachweis von Digoxigenin mittels eines fluoreszierenden Substrates für die Alkalische Phosphatase wurde für die Doppelmarkierung der exprimierten RNA mit Strukturproteinen und/oder Zellkernen verwendet.

Hierbei wurde nach 30 min Inkubation mit Blockierungslösung (Block-Stock, 10% in Maleinsäure, Roche) eine Inkubation mit einem Antikörper gegen Digoxigenin (Sheep anti-Dig Fab Fragment, 1:200) in Kombination mit Primärantikörpern gegen Strukturproteine wie Keratin oder Kollagen IV vorgenommen. Nach 30 min Wäsche in Puffer HNPP-3 und 20 min Wäsche in Puffer HNPP-4 wurden die Schnitte 3x 30 min mit der Substratlösung inkubiert. Zwischen den Inkubationen wurde kurz mit Puffer HNPP-3 gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte 10 min in Wasser gewaschen, getrocknet und in Permafluor eingebettet.

Lösungen für die in situ-Hybridisierung:20x SSC; pH 7,4

NaCl	3 M
Na-Citrat	0,3 M
pH mit 10 M NaOH einstellen	

DEPC-H₂O

0,1% DEPC; über Nacht autoklavieren

Puffer AP-1; pH 7,5

Tris/HCL (pH 7,5)	0,1M
NaCl	0,1M
MgCl ₂	2mM
Triton-X-100	0,05%

Puffer AP-3; pH 9,5

Tris/HCL (pH 9,5)	0,1M
NaCl	0,1M
MgCl ₂	50mM

Tris/EDTA; pH 8

Tris	20mM
EDTA	5mM

Puffer HNPP-1; pH 7,5

Tris/HCL	0,1M
NaCl	0,15M

Puffer HNPP-3

0,05% Tween-20 in Puffer HNPP-1

Puffer HNPP-4

Tris/HCL	0,1M
NaCl	0,1M
MgCl ₂	10mM

Deionisiertes Formamid

1 l Formamid werden mit 50 g Ionenaustauscher versetzt und 30 min bei RT gerührt. Der Ionenaustauscher wird durch Filtrieren (Faltenfilter) entfernt; das deionisierte Formamid wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.

4% Paraformaldehyd (PFA)-Lösung zur Fixierung

20 g PFA werden in 450 ml 2x SSC bei 70°C erhitzt und unter wiederholtem Schütteln in Lösung gebracht. Nach dem Abkühlen werden 2,5 ml 1 M MgCl₂ (Endkonzentration 5 mM) zugegeben, die Lösung auf 500 ml aufgefüllt und filtriert. Die PFA-Lösung wurde jedes Mal frisch angesetzt.

Hybridisierungs-Puffer (pH < 7,5)

deionisiertes Formamid	50%
SSPE	2x
SDS	0,1%
Dextransulfat	10%
Denhardt's Lösung	1x

<i>Glycin</i>	<i>0,1 M</i>
<i>Tris</i>	<i>20 mM</i>
<i>DTT</i>	<i>50 mM</i>
<i>Lachsspermi DNA</i>	<i>200 µg/ml</i>
<i>tRNA</i>	<i>500 µg/ml</i>

Substratlösung bei HNPP-Reaktion

10µl HNPP-Lösung

10µl Fast Red^{TR}-Lösung

980µl HNPP-Puffer 4

Mit Spritze durch 0,2µm Filter filtrieren. Sofort verwenden.

Fast Red^{TR} Lösung

5mg Fast Red^{TR} in 200µl H₂O lösen, maximal 4 Wochen lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahren.

Materialien zur in situ-Hybridisierung:

<i>Anti-Digoxigenin Alkalische Phosphatase Fab Antikörper</i>	<i>Roche</i>
<i>Anti-Digoxigenin Rhodamin Fab Antikörper</i>	<i>Roche</i>
<i>BCIP/NBT Combo</i>	<i>Gibco BRL</i>
<i>Block Stock</i>	<i>Roche</i>
<i>Diethylpyrocarbonat (DEPC)</i>	<i>Sigma</i>
<i>DNAse I, RNAse frei</i>	<i>Roche</i>
<i>DTT</i>	<i>Sigma</i>
<i>EDTA</i>	<i>Gerbu</i>
<i>Essigsäureanhydrid</i>	<i>Sigma</i>
<i>Ethanol</i>	<i>Riedel-de Haen</i>
<i>Formamid</i>	<i>Fluka</i>
<i>Glycin</i>	<i>Roth</i>
<i>HNPP Fluorescent Detection Kit</i>	<i>Roche</i>
<i>Hoechst/ Bisbenzimid</i>	<i>Sigma</i>
<i>Ionenaustauscher V</i>	<i>Merck</i>
<i>Levamisol</i>	<i>Roche</i>
<i>Lithiumchlorid</i>	<i>Merck</i>
<i>Magnesiumchlorid</i>	<i>Merck</i>
<i>Natriumchlorid</i>	<i>Fluka</i>

<i>Natriumcitrat</i>	<i>Merck</i>
<i>Nitrozellulose-Papier (Hybond N⁺)</i>	<i>Schleicher&Schnell</i>
<i>Permafluor</i>	<i>Immunotec</i>
<i>Proteinase K</i>	<i>Roche</i>
<i>RNase A</i>	<i>Roche</i>
<i>RNase Inhibitor</i>	<i>Roche</i>
<i>SDS</i>	<i>Gerbu</i>
<i>Triethanolamin</i>	<i>Merck</i>
<i>Tris</i>	<i>Sigma</i>
<i>Tween 20</i>	<i>Merck</i>

3.9 Präparation und Analyse von RNA

3.9.1 Isolation von RNA aus Gewebekulturzellen

Die Isolation der RNA aus Gewebekultur-Zellen erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Dabei handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Guanidin-Thiocyanat-Methode in Kombination mit einer spezifischen RNA-bindenden Säule. Bei dieser Methode werden RNA-Moleküle größer als 200 Nukleotide isoliert. Dadurch werden vor allem mRNA-Moleküle angereichert, da die kleineren Moleküle (tRNAs, 5,8S rRNA, 5S rRNA) abgetrennt werden.

Zellen in Monokultur, die in verschiedenen Medien (DMEM, 4xMEM, KBM, RPMI) mit oder ohne FCS kultiviert worden waren, wurden bei 80-90% Konfluenz bzw. nach Konfluenz nach Angaben des Herstellers direkt in der Zellkulturschale lysiert. Die weiteren Schritte erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers („RNeasy Miniprep Kit“, Qiagen).

Material zur Isolierung von RNA

<i>RNeasy Miniprep Kit</i>	<i>Qiagen</i>
<i>β-Mercaptoethanol</i>	<i>Serva</i>

3.9.2 RT-PCR

Die aus Zelllysaten isolierte RNA wurde mit dem „OmniscryptTM Reverse Transcriptase Kit“ von Qiagen in cDNA umgeschrieben.

Gemäß dem Protokoll wurden 10 µg RNA in 1x RT-Puffer mit 0,5 mM Nukleotid-Mix (dNTP-Mix), 10 Units Omniscrypt Reverse Transcriptase, 1 µM Oligo dT Primern bzw. Random Hexameren und RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 100 µl eingestellt. Die reverse Transkription erfolgte bei 42°C für 100 Minuten. Danach wurden die Produkte 5 min bei 95°C denaturiert, auf 4°C abgekühlt und bei -20°C eingefroren oder in der PCR eingesetzt.

Zur Durchführung der PCR wurden 9µl der RT-Produkte mit 0,2 mM dNTPs, 2,5 U Taq-Polymerase (Qiagen), 1x PCR-Puffer (in der Regel wurden 1,5-2,5 mM MgCl₂ eingesetzt), und jeweils 0,2 µM 5' und 3' Primer mit H₂O auf 100 µl eingestellt. Die Bedingungen für die PCR wurden Primer-abhängig optimiert. In der Regel erfolgte eine Denaturierung der DNA bei 95°C für 5 min, dann ein erneuter Denaturierungsschritt bei 95°C für 1 min; die Anlagerung der Primer fand bei definierter Temperatur (zwischen 58 und 71°C) für 1,5 min statt, danach erfolgte die DNA-Synthese für 1 min bei 72°C. Die Denaturierung, Anlagerung und Synthesephase wurden 21-35 x wiederholt. Zum Abschluss erfolgte eine Endsynthese für 10 min bei 72°C. Die PCR-Produkte konnten für einige Stunden bei 4°C oder langfristig bei -20°C gelagert werden. Die PCR-Produkte wurden mittels DNA-Gelelektrophorese analysiert.

Material:

Omniscript™ Reverse Transcriptase Kit	Quiagen
dNTP-Mix	Quiagen
Taq-Polymerase	Quiagen

Verwendete Primer (von 5' nach 3')

G-CSF

5'Primer

cacagtgcactctggacagtgcagg

3'Primer

tagaccgtgggtctaccttcttgacccttac

GM-CSF

5'Primer

tggcctgcagcatctctgca

3'Primer

acacgttgggtctgatagtg

G-CSF Rezeptor

5'Primer

cctggagctgagaactaccg

3'Primer

gccaccagaagagtctttcg

GM-CSF Rezeptor α

5'Primer

cttctcttgaccagca

3'Primer

acatgggttctctgagtc

GM-CSF Rezeptor β

5'Primer

aatacatcgtctctgttcag

3'Primer

tcactccactcgctccagat

IL-6

5'Primer

atgaactccttctccagcgc

3'Primer

gaagagccctcaggctggactg

GAP DH

5'Primer

ggatgaaggtcggagtcaacgga

3'Primer

gagggatctcgtcctggaaga

hMMP-1

5'Primer

ctccactgctgctgctgctgt

3'Primer

ctgggctgcttcatcacctt

hMMP-2

5'Primer

cgcagtgacggaaagatgtgggt

3'Primer

tgggattggaggggggaagg

hMMP-3

5'Primer

acaagagatacaacaggaccaat

3'Primer

acaggcaggagaaaacgaacat

hMMP-9

5'Primer

tgctgggctgctgctttgct

3'Primer

cggctcgtcgggtgctgtagttgg

hMMP-13

5'Primer

gaagaccccaaccctaaacatcca

3'Primer

gacgcgaacaatacggttactcca

hMMP-14

5'Primer

ataaaccccaaaaacccaccta

3'Primer

cctcctcgtccaccta

Alle Oligonukleotid-Primer wurden so konstruiert, dass sie Intron-Exon Splice-Stellen überbrücken um zu gewährleisten, dass eventuelle DNA-Kontaminationen in der RNA deutlich in der RT-PCR unterschieden werden können. Die Identität der amplifizierten PCR-Produkte wurde anhand der Größe und mittels Restriktionsverdau bzw. Sequenzierung (G-CSF) verifiziert.

3.9.3 PCR-Bedingungen

Tabelle 4: PCR-Bedingungen

Primer	Amplifizierungs-Temperatur (C°)	MgCl-Konzentration (mM)	Zyklenzahl	Produktgröße (Bp)
G-CSF	70	2	30	417
GM-CSF	60,5	1,7	25	322
G-CSF Rezeptor	61	2	35	310
GM-CSF Rezeptor α	58	2	35	548
GM-CSF Rezeptor β	58	1,7	35	337
IL-6	64	1,5	28	628
GAP DH	62	1,5	20	240
hMMP-1	71	1,5	35	262
hMMP-2	65	2	28	1112
hMMP-3	60	2	35	924
hMMP-9	66,5	1,5	35	763
hMMP-13	67	1,5	30	576
hMMP-14	63	1,5	35	678

3.9.4 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese ist eine Standardmethode zur Aufreinigung, Trennung und Identifizierung von Nukleinsäuren.

Die DNA-Proben wurden in 1-2% Agarose-Gelen analysiert. Zur Anfärbung der DNA wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ins Gel zugegeben. Die DNA-Proben wurden mit Probenpuffer (Endkonzentration 1x) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Kontrolle wurde ein DNA-Marker mit DNA-Fragmenten genau definierter Größen mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE-Laufpuffer bei 60-90 V für 20-50 Minuten. Das Gel wurde anschließend im UV-Licht analysiert.

Material für die Gelelektrophorese:

Agarose

Biozym

Ethidiumbromid

Sigma

Probenpuffer, 6x

Quiagen

DNA-Molekulargewichtsstandard Phi X 174

Peqlab

DNA-Molekulargewichtsstandard 100bp Ladder

Novagen

50x TAE, pH 7,5-8

Trizma Base 2 M

Eisessig 0,95 mM

EDTA 50 mM

3.10 ELISA

Der Nachweis von Proteinen geringer Konzentration in konditionierten Medien von Zellen erfolgte mit spezifischen ELISAs. Diese Form des Proteinnachweises erfolgt über Bindung des nachzuweisenden Proteins an einen immobilisierten, monoklonalen Antikörper und die nachfolgende Bindung eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers. Die Quantifizierung des nachzuweisenden Proteins erfolgt durch Zugabe und Umsetzung des chromogenen Substrates (Tetramethylbenzidin, TMB) und spektralphotometrische Messung der Farbentwicklung.

3.10.1 Herstellung konditionierter Medien

Für die Probenvorbereitung wurden $2,5 \times 10^3$ Zellen/cm² auf 6cm Kulturschalen ausgesät und das Kulturmedium nach 24 Stunden durch 2 ml Medium ohne FCS ersetzt. Als Medien wurden 4xMEM, KBM, RPMI und DMEM getestet. Für Stimulationsversuche wurden dem Medium hierbei 50 bzw. 100ng/ml G-CSF oder GM-CSF zugesetzt.

Nach 96 Stunden wurden die Überstände entnommen, bei 1500x g (Kendro, Labofuge 400) abzentrifugiert, um zelluläre Reste zu entfernen und in 0,5ml Aliquots bei -80°C eingefroren. Der spezifische Nachweis erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

ELISA Kits zur Proteinbestimmung:

Tabelle 5: verwendete ELISA-Kits

Bezeichnung	Spezifität	Firma
G-CSF ELISA	humanes G-CSF	R&D Systems
G-CSF ELISA	humanes G-CSF, hoch-sensitiv	IBL-Hamburg
G-CSF ELISA HS	humanes G-CSF, hoch-sensitiv	R&D Systems
GM-CSF-ELISA	humanes GM-CSF	R&D Systems
IL-6 ELISA	humanes IL-6	R&D Systems
MMP-9	humanes MMP-9	R&D Systems

3.11 Zusätzliche Materialien

3.11.1 Geräte

Brutschrank mit CO ₂ -Begasung	Kendro
CASY Zellzähler und Analysesystem (Modell TTC)	Schärfe System GmbH
Fluoroskan Ascent	Labsystems
Cryotom Frigocut 2700	Reichert und Jung
Fluoreszenz- und Lichtmikroskop DM RBE	Leica
Fluoreszenz- und Lichtmikroskop AX-70	Olympus
Gelanalyse-System Multimager™ 4.400	Alpha Innotec Corp.
PCR-Gerät	MJ Research
Sorvall RC-2-B (GSA, SS-34)	DuPont
Tisch- und Zellkultur-Zentrifugen	Kendro
Speed-Vac	Bachofer
Spektralphotometer	Eppendorf
Sterilbank	Baker Company Inc.

3.11.2 Software zur Morphometrischen Quantifizierung

Quantifizierungs-Software	AnalySIS
---------------------------	----------

4 Ergebnisse

4.1 Rolle von G-CSF und GM-CSF in der Entstehung epithelialer Tumore

Ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Rolle von G-CSF und GM-CSF in der Entstehung und Progression epithelialer Tumore ist das HaCaT-Modell zur mehrstufigen Karzinogenese humaner Plattenepithelkarzinome der Haut. Dieses Modell wurde ausgehend von der spontan immortalisierten Keratinozyten-Zelllinie HaCaT (Boukamp *et al.* 1988) durch Transfektion und *in vivo* Progression der Zellen, d.h. durch Wachstum der Zellen als Subkutantumore in der Nacktmaus und darauf folgende Reaktivierung der Tumorzellen aus den Tumoren entwickelt. So erfolgte durch Transfektion der nicht tumorigenen HaCaT-Zellen mit dem c-Ha-*ras* Onkogen die tumorigene Konversion der Zellen (Boukamp *et al.* 1990). Ein Teil der entstandenen HaCaT-*ras* Klone zeigte nach subkutaner Injektion in die Nacktmaus ein langsames Wachstum zu benignen, gut abgegrenzten und fast zystischen Tumoren mit einem stark keratinisiertem Zentrum, während andere Klone niedrig gradig maligne und lokal invasive Plattenepithelkarzinome ausbildeten. Für die weiteren Untersuchungen wurde der benigne Klon HaCaT-*ras* A-5 eingesetzt.

Wiederholte *in vivo* Progression dieser benignen HaCaT-*ras* A-5 Klone durch subkutane Injektion in die Nacktmaus und Reaktivierung des Tumorgewebes resultierte in den hochgradig malignen, schnell und invasiv wachsenden Zelllinien HaCaT-*ras* A-5RT1 und HaCaT-*ras* A-5RT3 (Mueller *et al.* 2001) (Abb. 12).

Eine Untersuchung des Wachstumsfaktor-Expressionsprofils der Tumore zeigte, dass diese Tumorphorprogression von einer *de novo* Expression der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF in den malignen Zellklonen begleitet wurde, während keine Expression dieser Faktoren in den parentalen HaCaT und HaCaT-*ras* A-5 Zellen detektiert wurde (Mueller & Fusenig 1999)(Abb. 12). Diese *de novo* Expression trat stets nach *in vivo* Progression der HaCaT-Tumorzellen auf, unabhängig von der Art der vorangegangenen tumorigenen Konversion, wie z.B. der Transfektion mit dem *ras*-Onkogen oder auch Kulturstress wie wiederholte Einzelzell-Klonierung oder erhöhte Temperaturen (Mueller *et al.* 2001).

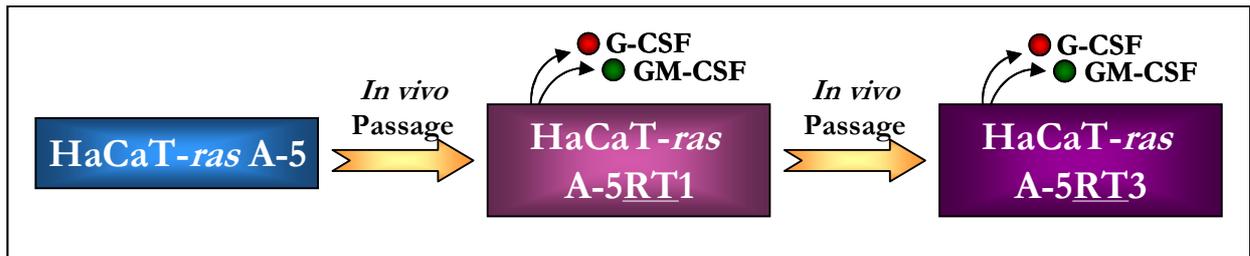


Abb. 12: Schema der aus HaCaT-ras A-5 durch *in vivo* Progression entstandenen Zellen

Um die Rolle von G-CSF und GM-CSF in der humanen Haut-Karzinogenese unabhängig von einander im Detail zu analysieren, wurden benigne HaCaT-ras A-5 Zellen stabil mit der cDNA für G-CSF oder GM-CSF transfiziert (Transfektion durch Dr. M. Mueller). Dabei wurden je 2 Klone näher untersucht, deren Expression des jeweiligen Faktors ähnlich stark war, wie es bereits bei den malignen Zelllinien HaCaT-ras A-5RT1 und HaCaT-ras A-5RT3 beobachtet wurde: dies waren für G-CSF die Klone HaCaT-ras A-5G12b und HaCaT-ras A-5G16a und für GM-CSF die Klone HaCaT-ras A-5GM6 und HaCaT-ras A-5GM14. Als Kontrolle diente ein Klon (HaCaT-ras A-5Z12), der den Transfektionsvektor ohne cDNA für G-CSF oder GM-CSF enthielt (Obermueller *et al.* 2004) (siehe Abb. 13).

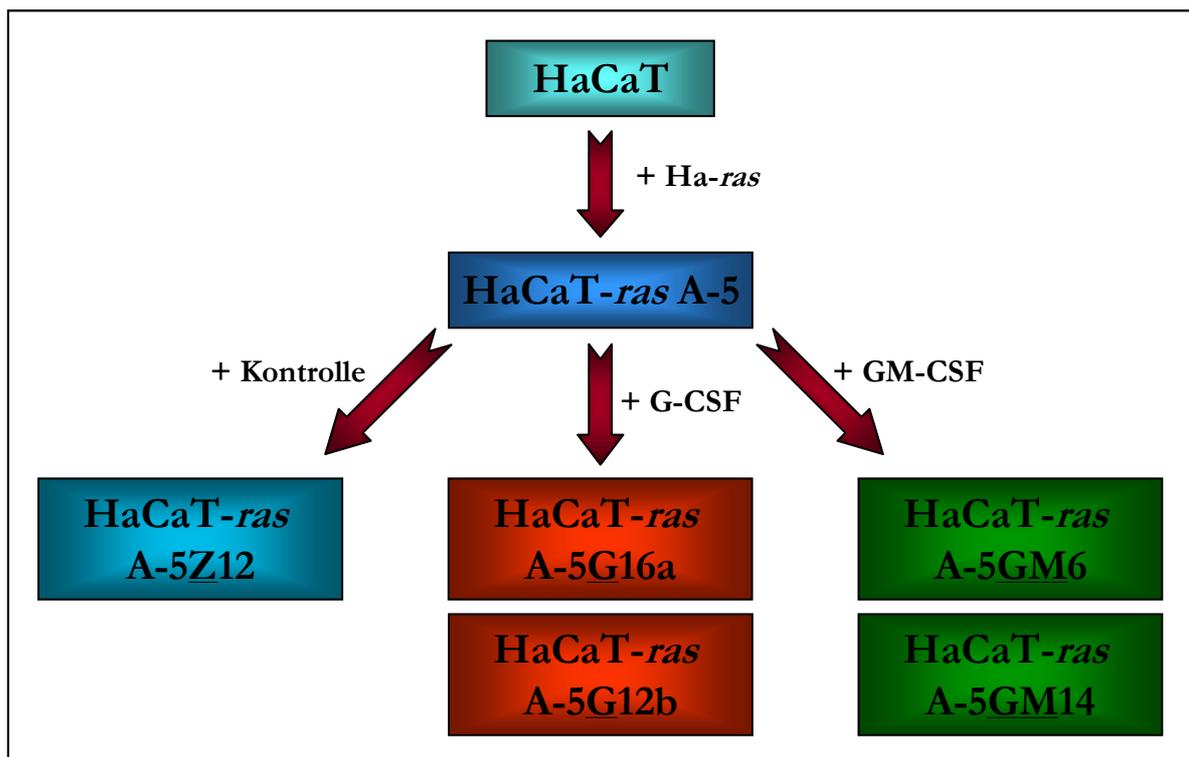


Abb. 13: Schema der aus HaCaT durch Transfektion entstandenen Zellen: Transfektion von HaCaT mit Ha-ras ergab HaCaT-ras A-5, und mit diesen Zellen wurde eine weitere Transfektion mit G-CSF, GM-CSF oder Vektor-Kontrolle durchgeführt.

4.1.1 Charakterisierung der Genexpression von HaCaT-*ras* A-5 Zellen und mit G-CSF oder GM-CSF transfizierter Zellen

Um die Expression von G-CSF, GM-CSF und den zugehörigen Rezeptoren in den oben beschriebenen Zelllinien *in vitro* zu untersuchen, wurden PCR-Analysen der Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren mit mRNA aus subkonfluenten Zellkulturen durchgeführt. Dabei konnte eine Expression von G-CSF in den mit G-CSF transfizierten Zelllinien A-5G12b und A-5G16a sowie von GM-CSF in den mit GM-CSF transfizierten Zelllinien A-5GM6 und A-5GM14 nachgewiesen werden (Abb. 14). Die PCR für G-CSF ergab eine Doppelbande von 417 und 406 Bp, wobei das kleinere Fragment eine funktionell aktive Spleiß-Form von G-CSF mit einer Deletion von 9 Nukleotiden darstellt (Nagata *et al.* 1986b). Ein drittes Fragment mit einer Größe von 258 Bp konnte durch Sequenzierung als eine Variante von G-CSF mit einer Deletion von 159 Bp identifiziert werden; Studien zur Funktionalität dieses Fragments wurden nicht durchgeführt.

Die Expression von G-CSF Rezeptor, GM-CSF Rezeptor α und GM-CSF Rezeptor β konnte in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 14). Diese Ko-Expression von Faktor und Rezeptor lässt vermuten, dass hier eine autokrine Wirkung der Faktoren auf die produzierenden Zellen vorliegt.

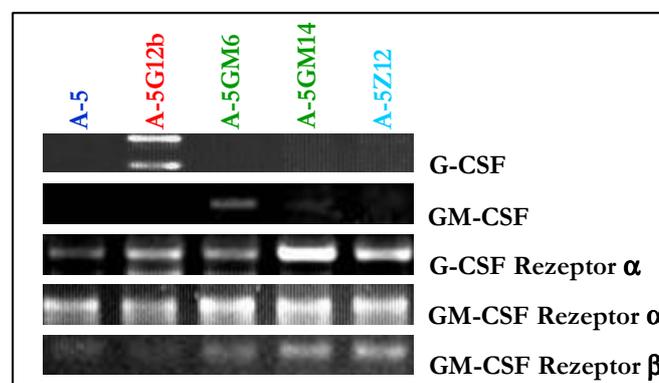


Abb. 14: Nachweis der mRNA von G-CSF, GM-CSF, G-CSF Rezeptor und GM-CSF Rezeptor α und β in Kulturen der Zelllinien.

Die Expression der Cytokine G-CSF und GM-CSF wurde auf Proteinebene mittels Enzyme-Linked Immuno-Adsorbent Assay (ELISA) an konditionierten Medien untersucht.

Die Proteinexpression von **G-CSF** wurde in verschiedenen Zellkulturmedien und mit ELISAs mehrerer Firmen getestet, jedoch war dieser Test generell unzuverlässig. Prinzipiell lässt sich sagen, dass sich in den mit G-CSF transfizierten Zelllinien bei A-5G12b eine Sekretion von 100pg/ml G-CSF und bei A-5G16a von 162pg/ml G-CSF feststellen ließ; diese Mengen liegen in einem ähnlichen Bereich wie die Produktionsmenge der durch *in vivo* Progression von A-5 Zellen

entstandenen Zelllinie A-5RT1 von 95pg/ml. In der parentalen Zelllinie A-5 sowie der kontroll-transfizierten Zelllinie A-5Z12 dagegen ließ sich keine Sekretion von G-CSF beobachten (Tabelle 6).

Die Expression von **GM-CSF** wurde ebenfalls auf Proteinebene mittels eines GM-CSF ELISAs an Zellkulturüberständen ermittelt. Der ELISA zeigte in den mit GM-CSF transfizierten Zelllinien eine Sekretion von 290pg/ml GM-CSF in A-5GM6 Zellen und von 120pg/ml in der Zelllinie A-5GM14, während die mit G-CSF transfizierten Zelllinien A-5G12b und A-5G16a sowie die Faktor negativen Zellen keine Sekretion von GM-CSF zeigten (Tabelle 6).

Tabelle 6: Nachweis der G-CSF und GM-CSF Proteine im ELISA.

	A-5	A-5RT1	A-5RT3	A-5G12b	A-5G16a	A-5GM6	A-5GM14	A-5Z12
hG-CSF (pg/ml)	∅	94,5 ± 3,5	25 ± 7,07	101 ± 6,5	162 ± 18	∅	∅	∅
hGM-CSF (pg/ml)	∅	927 ± 155	300 ± 60	∅	∅	288 ± 23	113 ± 23	∅

4.2 Bedeutung des G-CSF/G-CSF-Rezeptor und GM-CSF/GM-CSF-Rezeptor-Systems für Proliferation und Migration *in vitro*

Die Neu-Expression von G-CSF und/oder GM-CSF in Zellen, welche die respektiven Rezeptoren konstitutiv exprimieren, lässt eine autokrine Stimulation dieser Zellen postulieren. Die Expression der Faktoren in Tumoren *in vivo* korrelierte mit beschleunigtem Tumorwachstum, und eine Ko-Expression ließ sich nur in hochgradig malignen Tumoren feststellen (Mueller *et al.* 1999; Mueller & Fusenig 1999; Kyo *et al.* 2000; Tachibana *et al.* 2000; Mueller *et al.* 2001; Obermueller *et al.* 2004).

Neben autokrinen Effekten spielen *in vivo* jedoch auch parakrine Wechselwirkungen des Tumors mit den Zellen des Wirtsmesenchyms eine große Rolle, so dass es kaum möglich ist, einen Effekt nur einem bestimmten Wachstumsfaktor zuzuordnen. Daher empfiehlt es sich zunächst, die Analyse einzelner Faktoren unter kontrollierten Bedingungen *in vitro* vorzunehmen. *In vitro* können z.B. Proliferation und Migration der Tumorzellen in Reaktion auf die Zugabe von Wachstumsfaktoren oder von Wachstumsfaktor neutralisierenden Antikörpern gut untersucht werden. Diese Analysen können in zweidimensionalen Zellkulturen oder auch in einer dreidimensionalen Umgebung in den Haut organotypischen Ko-Kulturen vorgenommen werden.

4.2.1 Wachstum der transfizierten Zellen in 2-D-Gewebekulturen

In diesem Versuch wurde das Wachstumsverhalten der mit G-CSF oder GM-CSF transfizierten Zelllinien unter Standard-Kulturbedingungen *in vitro* untersucht. Hierbei wurde durch tägliche Zellzählung über einen Zeitraum von 10 Tagen die Vermehrung einer definierten Anfangszahl

von Zellen überwacht. Unter normalen Kulturbedingungen auf Plastik Kulturschalen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wachstumsfaktor negativen, den mit GM-CSF transfizierten Zelllinien A-5GM6 und A-5GM14 sowie den mit G-CSF transfizierten A-5G12b Zellen (Abb. 15). Allerdings zeigten alle transfizierten Zelllinien (mit G-CSF, GM-CSF oder Kontrolle) ein etwas schnelleres Wachstum als die parentalen Zellen. Diese Unterschiede ließen sich nicht auf eine veränderte Genexpression von G-CSF und GM-CSF zurückführen.

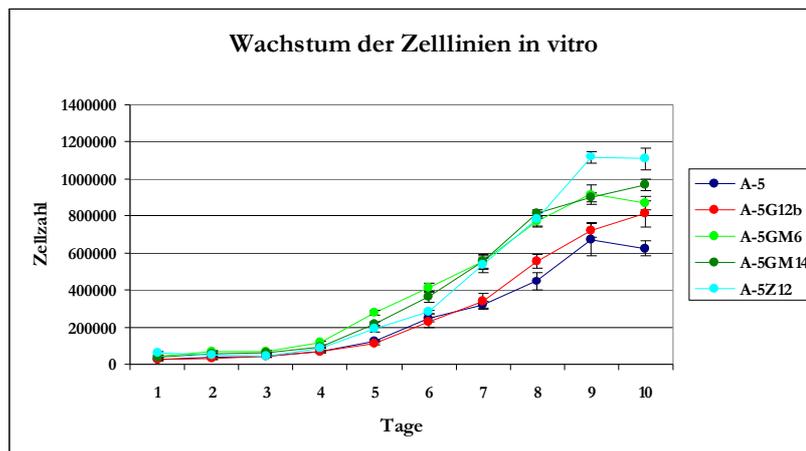


Abb. 15: Vergleich des Wachstums der transfizierten und der parentalen Zellen durch Zellzahlbestimmung in 2-D-Zellkulturen *in vitro*. Gezeigt sind Mittelwerte aus je 3 unabhängigen Wachstumskurven.

4.2.2 Stimulation der Proliferation der benignen HaCaT-*ras* A-5 Zellen durch Gabe von G-CSF und GM-CSF in 2-D-Gewebekulturen

Da alle HaCaT-Zellen die Rezeptoren für G-CSF und GM-CSF bilden, ist eine Reaktion der Zellen auf die Zugabe dieser Cytokine zu erwarten. Aus der Literatur kann man Anhaltspunkte gewinnen, welche Mengen von Faktor unter *in vitro* Kulturbedingungen nötig sind, um eine physiologische Stimulation der Zellen zu erhalten; jedoch sollten diese für jedes *in vitro* Kulturmodell individuell optimiert werden. Daher wurden in den *in vitro* Proliferationsversuchen Wachstumsfaktorkonzentrationen von 2ng/ml bis 250ng/ml in verschiedenen Kulturmedien ausgetestet. Der Nachweis der Zellproliferation erfolgte im BrdU-ELISA über die Inkorporation von BrdU in die neu synthetisierte DNA, in der Proliferations-Wachstumskurve über Zellzählung und im Proliferationsnachweis mit SYBR^R Green über die Interkalation dieser Substanz in die DNA der Zellen, die damit ein Maß für die DNA-Menge und somit für die Zellzahl ist.

Stimulation der parentalen A-5 Zellen mit 50, 150 bzw. 200ng/ml GM-CSF oder G-CSF ergab in den verschiedenen Testsystemen eine Konzentrations abhängige Zunahme der Proliferation auf 132-164% bei Zugabe von GM-CSF und auf 158-180% bei G-CSF (Abb. 16).

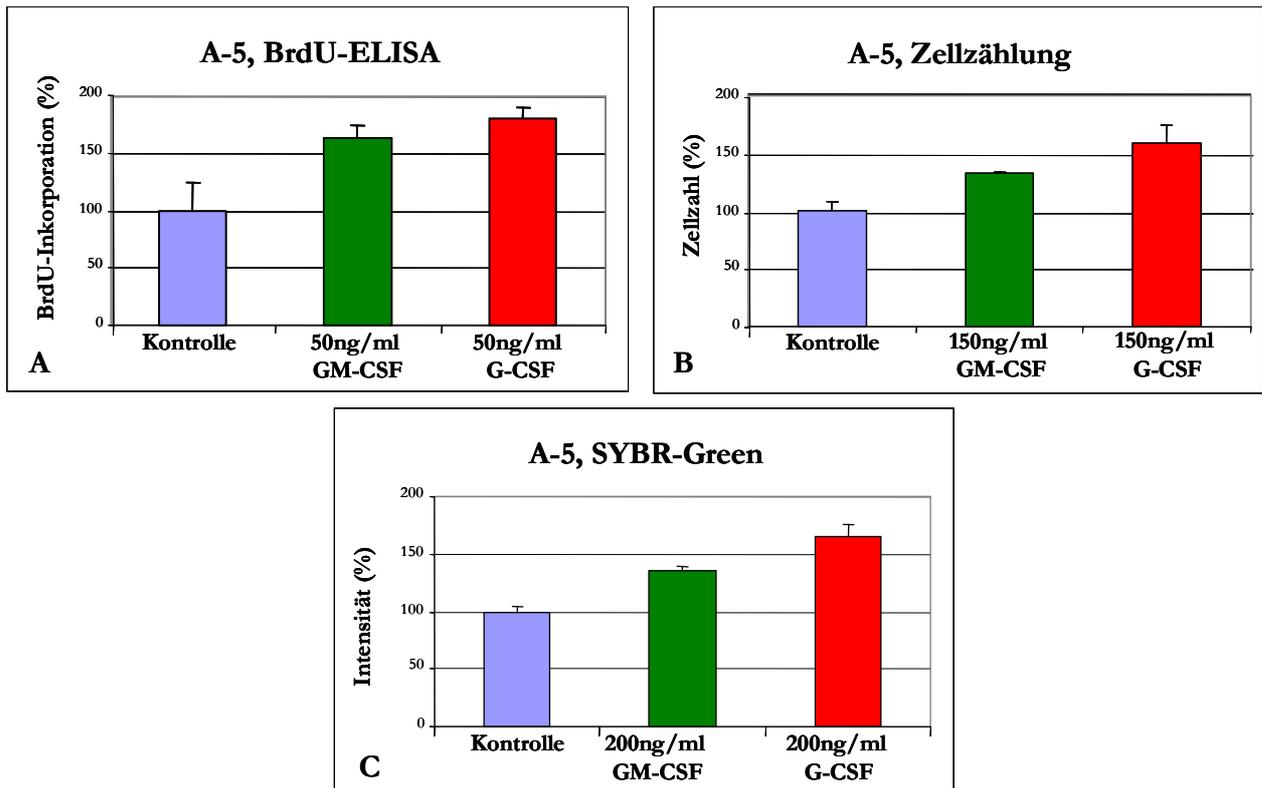


Abb. 16: Nachweis der Proliferation von A-5 Zellen nach Zugabe von G-CSF oder GM-CSF über BrdU-Inkorporation (A), Zellzahlbestimmung (B) und DNA-Färbung mit SYBR-Green (C).

4.2.3 Stimulation der Proliferation transfizierter A-5 Zellen durch zusätzliche Gabe von G-CSF und GM-CSF in 2-D-Gewebekulturen

Da die zur Stimulation der A-5 Zellen in Zellkultur nötigen Wachstumsfaktormengen von 50-200ng/ml deutlich über den von den transfizierten Zellen sekretierten Mengen an Faktor lagen, sollte die Frage untersucht werden, ob die transfizierten Zellen durch zusätzliche Gabe von G-CSF oder GM-CSF weiter in ihrer Proliferation angeregt werden können. Dabei konnte bei der mit G-CSF transfizierten Zelllinie A-5G12b durch Zugabe von 100ng/ml GM-CSF eine Steigerung der Proliferation auf 132% und durch Zugabe von 100ng/ml G-CSF eine Steigerung auf 148% erzielt werden. Stimulation der mit GM-CSF transfizierten Zelllinie A-5GM6 mit 50ng/ml GM-CSF ergab eine Proliferation von 128% und mit G-CSF von 131%, während in der Zelllinie A-5GM14, deren autokrine Produktion von GM-CSF niedriger liegt als bei A-5GM6 Zellen, eine Stimulation der Proliferation durch 50ng/ml GM-CSF von 146% und mit G-CSF von 147% erzielt wurde (Abb. 17).

Durch diese Versuche wurde klar, dass Faktormengen, die *in vivo* in hoch malignen Tumorzellen bereits einen ausgeprägten Effekt hervorrufen, unter 2-D Kulturbedingungen *in vitro* nicht ausreichend sind, um die Proliferation dieser Zellen zu modulieren.

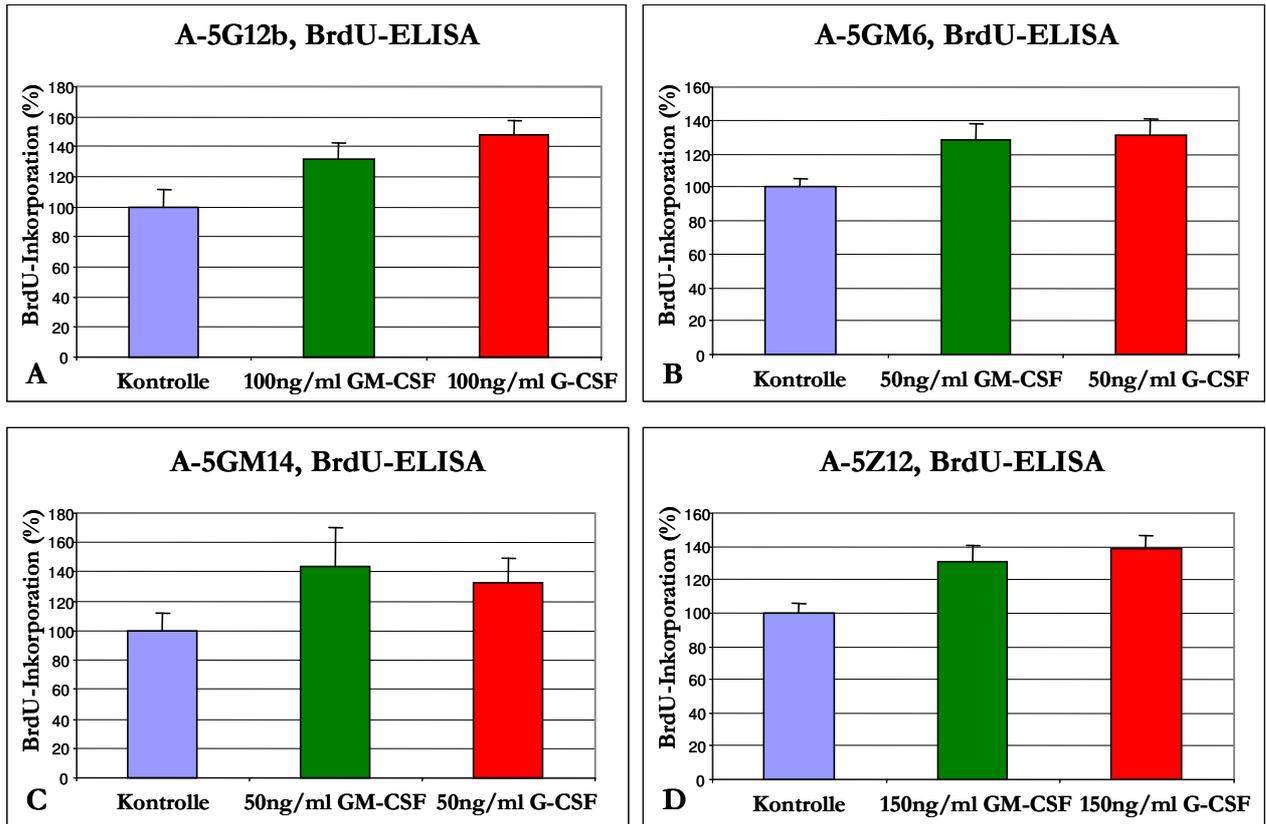


Abb. 17: Nachweis der Proliferation über BrdU-Inkorporation nach Zugabe von G-CSF oder GM-CSF zu A-5G12b (A), A-5GM6 (B), A-5GM14 (C) und A-5Z12 (D). Dargestellt ist die relative Proliferation bezogen auf die Werte der Kontrollkulturen.

4.2.4 Wachstum der transfizierten Zellen in 3-D organotypischen Kulturen

In diesem vereinfachten Modell der menschlichen Haut werden epitheliale Tumorzellen auf einem Gel aus Typ I Kollagen mit oder ohne Fibroblasten luftexponiert kultiviert. Proliferierende Zellen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz für das proliferations-assoziierte Protein Ki-67 (Mib) dargestellt. *In vitro* Untersuchungen an dreidimensionalen organotypischen Hautäquivalent-Kulturen (Dr. M. Müller und A. Krämer) zeigten eine im Vergleich zu den parentalen untransfizierten A-5 Zellen deutlich erhöhte Proliferation der transfizierten Zelllinien A-5G12b und A-5GM6, verbunden mit infiltrativem Wachstum in das Kollagengel (Abb. 18). Diese Ergebnisse stehen in deutlichem Kontrast zu den in 2-D Gewebekulturen erzielten Resultaten, wo keine erhöhte Proliferation der transfizierten Zellen durch die autokrin produzierten Faktoren nachgewiesen werden konnte. Dies zeigt deutlich, wie sehr sich normale 2-D Gewebekulturen von der *in vivo* Situation und dem der *in vivo* Situation bereits sehr angenäherten Modell der organotypischen Kultur unterscheiden, das damit eine ausgezeichnete Alternative zu diesen 2-D Experimenten darstellt.

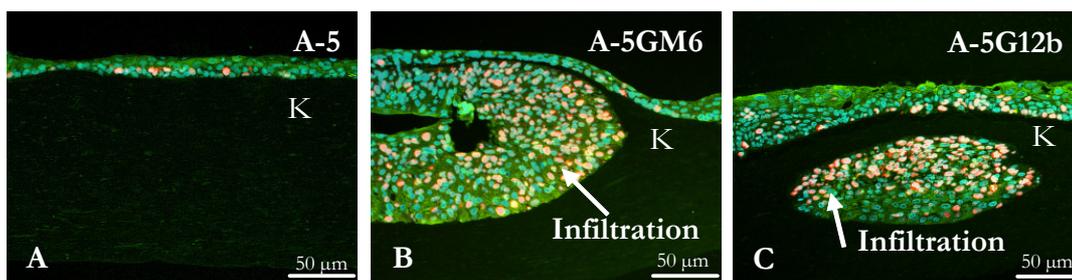


Abb. 18: Vergleich der epithelialen Proliferation in organotypischen Kulturen mit A-5 Zellen (A), A-5GM6 (B) und A-5G12b (C). Keratinozyten sind mit einem pan-spezifischen Keratin-Antikörper grün markiert, proliferierende Tumorzellen sind mit einem Antikörper gegen Ki-67 (Mib) rot angefärbt und Zellkerne sind mit dem DNA-Farbstoff Höchst blau gefärbt. K = Kollagengel, der Pfeil markiert infiltrierende Tumorzellen.

4.2.5 Blockierung der Proliferation der transfizierten Zellen durch neutralisierende Antikörper in 2-D-Gewebekulturen

Ein Nachweis einer autokrinen Stimulation der Proliferation in den Wachstumsfaktor produzierenden Zellen ist die Blockierung der sekretierten Faktoren über neutralisierende Antikörper. Dazu wurden 1 bzw. 2 µg/ml Antikörper gegen G-CSF oder GM-CSF in den oben beschriebenen Proliferationstests eingesetzt; als Kontrolle wurde ein irrelevanter Antikörper gegen Mouse IgG1 Kappa eingesetzt. Mit keiner der Versuchsmethoden und in keinem der getesteten Kulturmedien (4xMEM, KBM und RPMI mit verschiedenen Konzentrationen von FCS bzw. ohne FCS) konnte eine Veränderung in der Zellproliferation festgestellt werden. Da die 2-D Wachstumskurven keinen Wachstumsvorteil der transfizierten Zellen gegenüber den parentalen, faktor-negativen Zellen offenbart hatten, war dieses Ergebnis nicht unerwartet. Eine

Untersuchung der Effekte neutralisierender Antikörper in organotypischen Kulturen wäre daher sehr sinnvoll.

4.2.6 Stimulation der Migration durch Gabe von G-CSF oder GM-CSF

In diesem Versuch wurde die Modulation der Migration der Zellen nach Zugabe von G-CSF oder GM-CSF analysiert. Dazu wurde der konfluente Zellrasen mit einem Zellschaber unterbrochen und das Einwandern der Zellen in diesen zellfreien Streifen in einem Zeitraum von 48 Stunden an je 3 Stellen dokumentiert.

Wie auch bereits in den Proliferationsversuchen festgestellt wurde, unterschied sich die Migration der parentalen A-5 und der kontroll-transfizierten A-5Z12 Zellen in serumfreiem Medium (Kontrolle) nicht von der Migration der mit G-CSF (A-5G12b) oder GM-CSF (A-5GM6, A-5GM14) transfizierten Zelllinien. Durch Zugabe von 50ng/ml bzw. 100ng/ml G-CSF oder GM-CSF konnte jedoch bei den Faktor negativen wie auch bei den transfizierten Zellen eine deutliche Stimulation der Migration auf 130-200% beobachtet werden (Abb. 19).

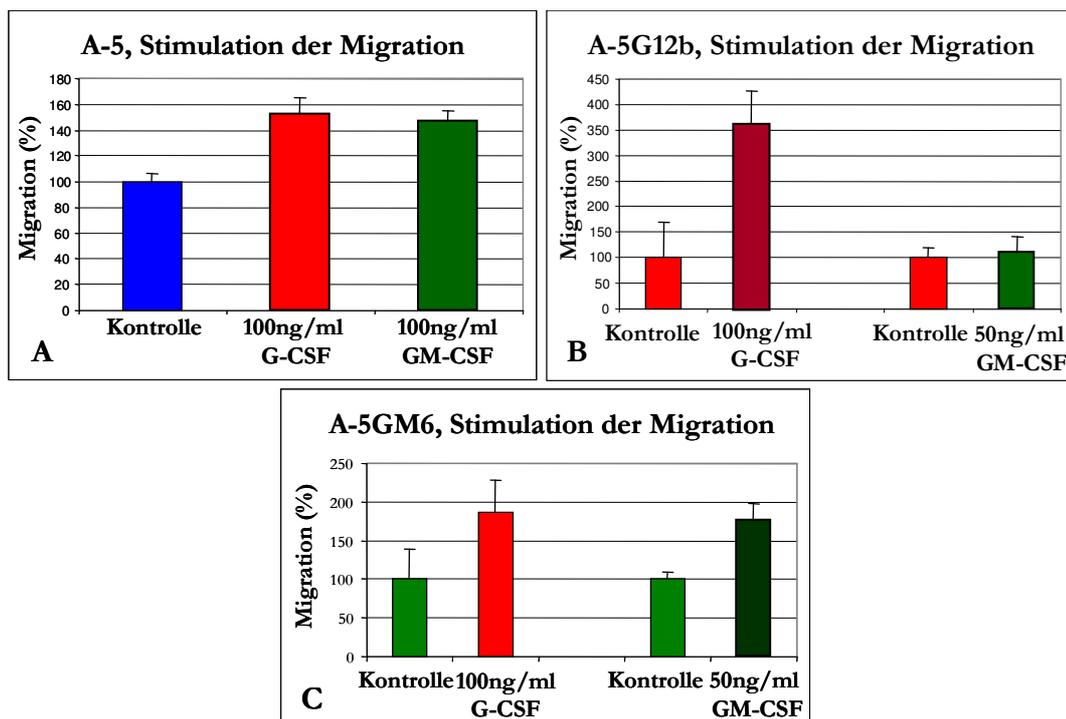


Abb. 19: Stimulation der Migration durch Zugabe von G-CSF oder GM-CSF zu A-5 (A), A-5G12b (B) und A-5GM6 (C). Dargestellt sind relative Migrations-Distanzen bezogen auf die Migration der Kontrollkulturen.

4.2.7 Blockierung der Migration Wachstumsfaktor bildender Zellen durch neutralisierende Antikörper

Zugabe von 1 µg/ml bzw. 2 µg/ml neutralisierender Antikörper gegen G-CSF oder GM-CSF zu den transfizierten Zelllinien resultierte in einer signifikanten Reduktion der Migration dieser Zellen. So wurde die Migration der mit G-CSF transfizierten Zelllinie A-5G12b durch Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers um 52% verringert, und der Effekt des Antikörpers gegen GM-CSF war bei den mit GM-CSF transfizierten Zelllinien A-5GM6 und A-5GM14 sogar noch ausgeprägter: hier erfolgte eine Reduktion der Migration um 65% bzw. 78% (Abb. 20). Zugabe des Antikörpers gegen GM-CSF zu den mit G-CSF transfizierten Zellen bzw. gegen G-CSF zu den mit GM-CSF transfizierten Zellen ergab keine Inhibition der Migration dieser Zellen; somit konnte ein unspezifischer Effekt ausgeschlossen werden.

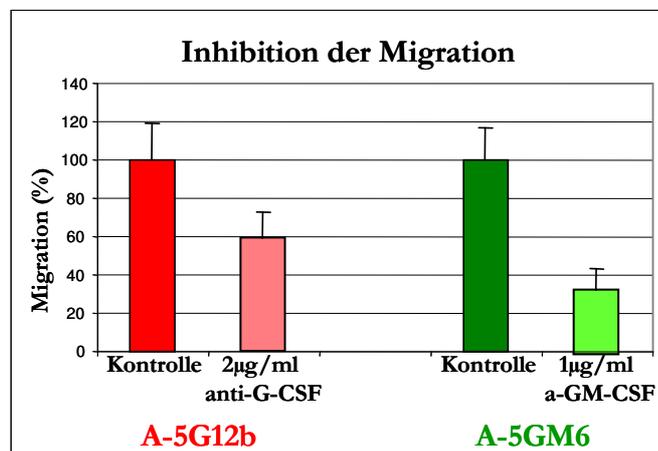


Abb. 20: Inhibition der Migration durch Zugabe neutralisierender Antikörper gegen G-CSF oder GM-CSF zu A-5G12b und A-5GM6. Dargestellt sind relative Migrations-Distanzen bezogen auf die Migration der Kontrollkulturen.

4.3 Bedeutung von G-CSF und GM-CSF für Tumorwachstum und Angiogenese in Subkutantumoren

Da die Expression der Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF in den Tumorzellen in 3-D Organotypischen Kulturen *in vitro* einen deutlichen Wachstumsvorteil verbunden mit Infiltration der Zellen in das Kollagengel gezeigt hatte, sollte die Wirkung der Faktorexpression auf das Tumorwachstum und die Vaskularisierung von Subkutantumoren *in vivo* untersucht werden.

4.3.1 Konstitutive Expression von G-CSF oder GM-CSF resultiert in verändertem Tumorwachstum

Um das Tumorwachstum der transfizierten Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurden 5×10^6 Zellen der mit G-CSF, GM-CSF oder kontroll-transfizierten Zellen subkutan unter die Rückenhaut der Nacktmaus injiziert.

Subkutane Injektion der parentalen HaCaT-*ras* A-5 Zellen resultierte in 2 von 6 Injektionen und bei Injektion der kontroll-transfizierten HaCaT-*ras* A-5Z12 Zellen in 2 von 10 Injektionen in benignem Tumorwachstum nach einer Latenzzeit von 4 Monaten; bei den übrigen Injektionen konnte kein Tumorwachstum beobachtet werden. Nach subkutaner Injektion der mit GM-CSF transfizierten Zellen wurde ein transientes Tumorwachstum in einem Zeitraum von 6 Wochen beobachtet, danach ging der Tumor wieder zurück; in 1 von 8 Injektionen erfolgte nach 6 Monaten ein erneutes Tumorwachstum. Subkutane Injektion der mit G-CSF transfizierten Zellen dagegen verursachte in 5 von 10 Injektionen ein schnelles Tumorwachstum nach einer Latenzzeit von 50-70 Tagen (siehe Abb. 21).

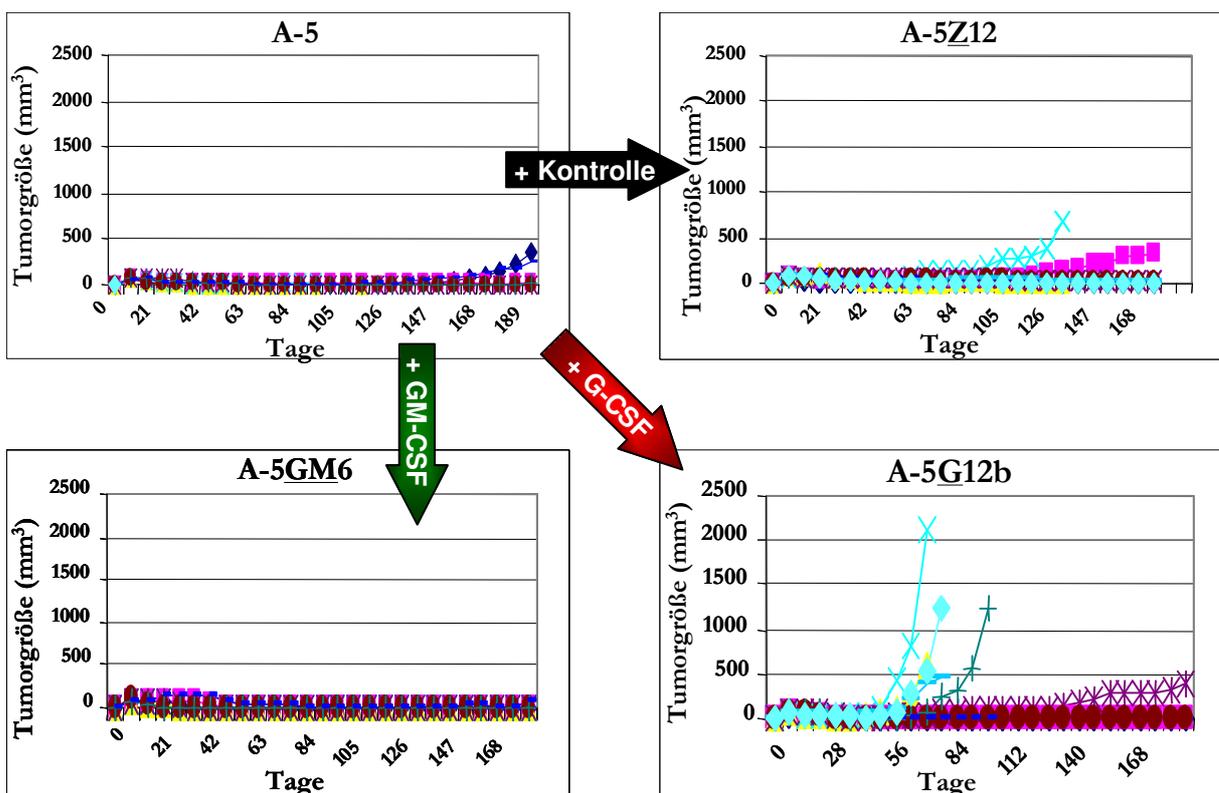


Abb. 21: Tumorwachstum der parentalen und der transfizierten Zelllinien nach Subkutaninjektion in Nacktmäuse. Parentale Zellen: A-5, Kontrolle: A-5Z12, GM-CSF transfiziert: A-5GM6, G-CSF transfiziert: A-5G12b.

Um die Kooperation der Faktoren G-CSF und GM-CSF in der Tumorentstehung genauer zu untersuchen, wurden Mischinjektionen mit den verschiedenen Zelllinien vorgenommen.

Zu diesem Zweck wurden Zellgemische aus der mit G-CSF transfizierten Zelllinie A-5G12b und den mit GM-CSF transfizierten Zelllinien A-5GM6 oder A-5GM14 injiziert. Als Kontrolle wurden Gemische aus A-5G12b mit den parentalen A-5 Zellen oder den kontroll-transfizierten A-5Z12 Zellen gespritzt.

Die Injektion der Zellgemische resultierte in maximalem Tumorwachstum zwischen Tag 60-80 und entsprach somit ungefähr dem Wachstumsverhalten der Zelllinie A-5G12b, die in diesen Gemischen stets enthalten war. Eine Analyse der Häufigkeit der Tumorentstehung zu verschiedenen Zeitpunkten zeigte jedoch gewisse Unterschiede im Wachstumsverhalten der Mischinjektionen (siehe Abb. 22). Bei Ko-Injektion der Zelllinien A-5G12b und A-5GM6 begann die Tumorentstehung früher, nach bereits 20 Tagen. Dagegen fand bei gemeinsamer Injektion der Zelllinien A-5G12b und A-5GM14 eine Tumorbildung erst nach 50 Tagen statt, also später als bei der Zelllinie A-5G12b.

Bei Mischinjektion der Zelllinie A-5G12b mit den parentalen A-5 Zellen oder den kontroll-transfizierten A-5Z12 Zellen war eine der Einzel-Injektion von A-5G12b vergleichbare Kinetik der Tumorbildung zu beobachten.

Somit scheint bei Mischinjektionen mit den mit GM-CSF transfizierten Zellen die Höhe der GM-CSF Expression der im Gemisch eingesetzten Zellen von Bedeutung zu sein: die Expression von GM-CSF in der Zelllinie A-5GM6 mit 290pg/ml ist stärker als in der Zelllinie A-5GM14 mit 120pg/ml, und eine beschleunigte Tumorbildung findet sich nur bei gemeinsamer Injektion der hoch-exprimierenden Zelllinie A-5GM6 in Kombination mit A-5G12b. Aus den weiteren Untersuchungen in dieser Doktorarbeit wird deutlich werden, dass hierbei das Tumor-Stroma und dessen Reaktion auf die Expression von G-CSF und GM-CSF eine sehr wichtige Rolle spielt.

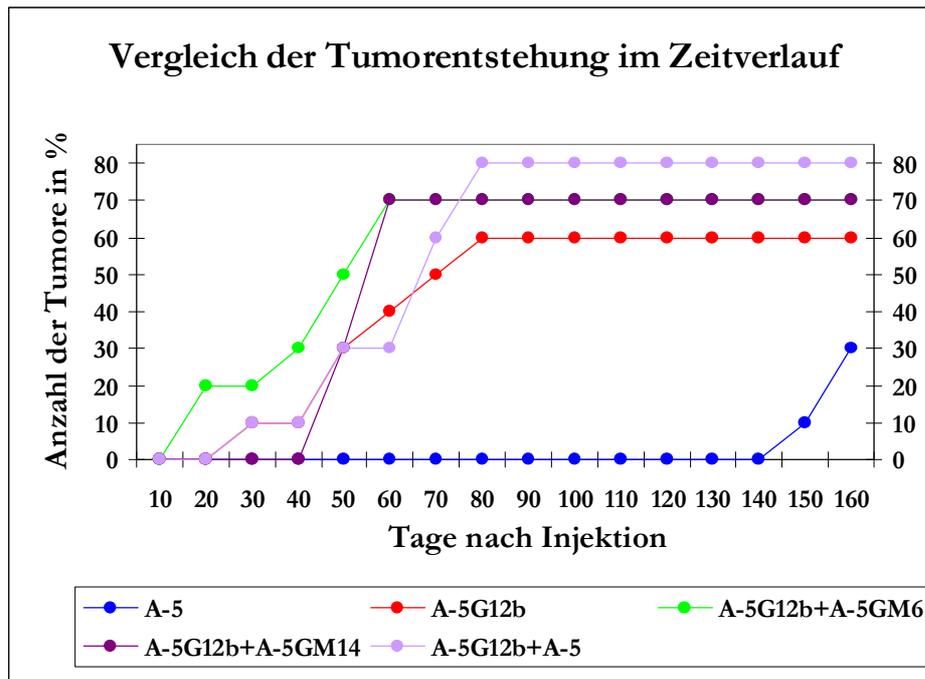


Abb. 22: Anzahl der Tiere mit Tumorbildung nach Subkutaninjektion in Abhängigkeit von der Zeit. Dargestellt ist der Prozentsatz der aus allen Injektionen der jeweiligen Zelllinie entstandenen Tumore an einem Zeitpunkt.

4.3.2 *In vivo* Progression der mit G-CSF transfizierten Zellen resultiert in hochgradig malignen Zellen

Die Mikroumgebung eines Tumors *in vivo* kann einen starken Selektionsdruck auf diesen ausüben, wobei Faktoren wie Hypoxie und die Aktivität von Immunzellen dabei in der Progression der Tumore zu einem verstärkt malignen Tumor-Phänotyp eine große Rolle spielen. Dieser Prozess wird von einer *de novo* Expression der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren G-CSF und/oder GM-CSF begleitet (Mueller & Fusenig 1999; Mueller *et al.* 2001). Um zu untersuchen, ob mit der *in vivo* Progression G-CSF exprimierender Tumore ebenfalls eine *de novo* Expression von GM-CSF assoziiert ist, und um den Tumor fördernden Einfluss der Tumor-Mikroumgebung genauer zu analysieren, wurden Tumore aus subkutaner Injektion der mit G-CSF transfizierten Zelllinie A-5G12b unter sterilen Bedingungen entnommen und das Tumorgewebe rekultiviert. Bereits nach 7 Tagen wuchsen die ersten Keratinozyten aus den Gewebestücken aus und bildeten langsam wachsende, von Fibroblasten umgebene Inseln. Mit zunehmender Kulturzeit konnte ein Zurückweichen der Fibroblasten von den Keratinozyten-Inseln beobachtet werden (Abb. 23).

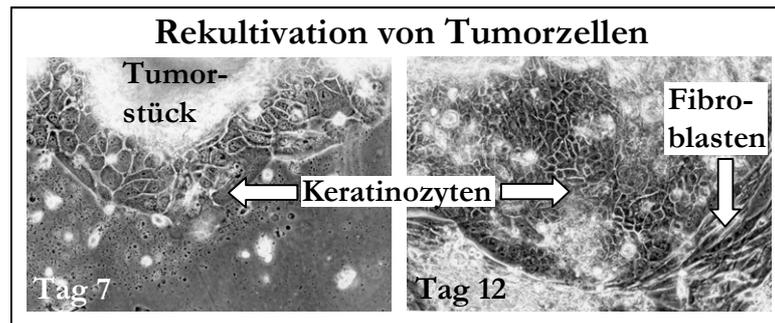


Abb. 23: Rekultivierung der Tumor-Keratinocyten aus Tumorstücken von Subkutantumoren der Zelllinie A-5G12b.

Durch Zugabe von Selektionsantibiotika nach Adaptation der Zellen an die *in vitro* Umgebung erfolgte eine Selektion der mit G-CSF transfizierten Tumorzellen, wodurch die im Rekultivat vorhandenen Mauszellen, insbesondere die Fibroblasten, eliminiert wurden. Es wurden aus zwei unabhängigen Tumoren jeweils zwei neue Zelllinien rekultiviert: aus einem Tumor entstanden die Zelllinien A-5G12bRT1A und A-5G12bRT1B, aus dem anderen Tumor entstanden die Zelllinien A-5G12bRT1C und A-5G12bRT1D (Abb. 24).

Erneute subkutane Injektion dieser Zellen ergab ein gegenüber der parentalen Zelllinie A-5G12b verändertes Wachstumsverhalten: die Zellen zeigten ein schnelleres und aggressiveres Tumorstadium nach einer Latenzzeit von 7 Tagen (A-5G12bRT1B) bzw. 14 Tagen (A-5G12bRT1D) an sämtlichen Injektionsstellen, während die parentalen A-5G12b Zellen eine Latenzzeit von 50-70 Tagen aufwiesen (Abb. 25). Die entstandenen Tumore wurden erneut rekultiviert, wobei aus zwei unabhängigen Tumoren aus Injektion von A-5G12bRT1B die Zelllinien A-5G12bRT2AA und A-5G12bRT2AB entstanden; und aus Tumoren von A-5G12bRT1D entstanden die Zelllinien A-5G12bRT2DA und A-5G12bRT2DB (Abb. 24). Dabei steht „RT“ für Rekultivierte Tumore, die Ziffern „1“ und „2“ für die Anzahl der *in vivo* Passagen, und „A“, „B“, „C“, „D“ bezeichnen die einzelnen Zelllinien.

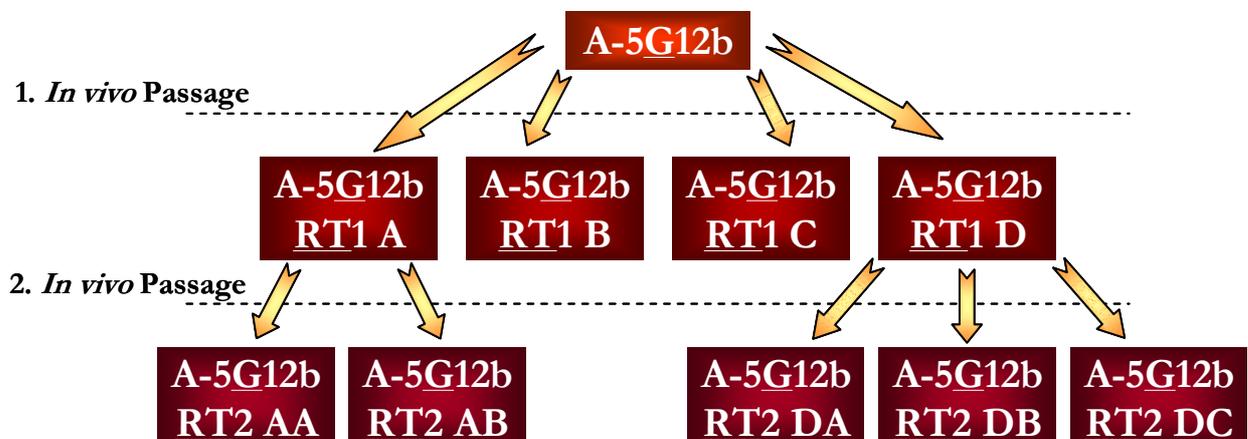


Abb. 24: Schema der durch wiederholte *in vivo* Progression von A-5G12b entstandenen Zelllinien.

Nach subkutaner Injektion von zweien der neu entstandenen Zelllinien zeigten diese ein den parental Zellen sehr ähnliches Wachstumsverhalten: subkutane Injektion der aus A-5G12bRT1B entstandenen Zelllinie A-5G12bRT2AA resultierte in rapidem Tumorwachstum ohne Latenzzeit, das entspricht der Wachstumsgeschwindigkeit der ebenfalls durch mehrfache Rekultivierung von A-5 Zellen entstandenen Zelllinie A-5RT3 (Mueller *et al.* 2001). Die aus Injektion von A-5G12bRT1D entstandene Zelllinie A-5G12bRT2DB wies ein langsames Wachstum, jedoch ebenfalls ohne Latenz, auf (Abb. 25).

Somit lässt sich nach *in vivo* Progression der G-CSF exprimierenden Zelllinie A-5G12b ein schnelles Tumorwachstum nach einer deutlich verkürzten Latenzzeit beobachten.

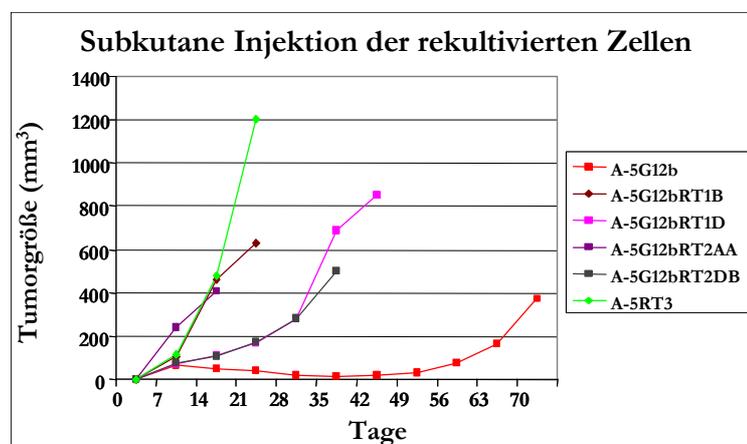


Abb. 25: Tumorwachstum nach Subkutaninjektion in Nacktmäuse; gezeigt ist für jede Zelllinie der Mittelwert des Tumorwachstums an 10 Injektionsstellen.

4.3.2.1 Veränderte Genexpression nach *in vivo* Progression

Da die mit G-CSF transfizierten Tumorzellen nach *in vivo* Progression ein verstärkt malignes Tumorwachstum aufwiesen und im Fall der benignen A-5 Zellen die *in vivo* Progression mit malignem Tumorwachstum und der Neo-Expression von G-CSF und GM-CSF assoziiert war, sollte die Expression dieser Faktoren in den neu entstandenen Zelllinien untersucht werden. Insbesondere war hierbei von Interesse, ob auch hier eine *de novo* Expression von GM-CSF nach der *in vivo* Progression der Zellen gefunden werden konnte, und ob das in die Zellen transfizierte G-CSF noch exprimiert wurde.

Um die Expression von G-CSF, GM-CSF und den zugehörigen Rezeptoren in den oben beschriebenen Zelllinien nach *in vivo* Progression der Zellen zu untersuchen, wurden PCR-Analysen der Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren mit mRNA aus subkonfluenten Zellkulturen durchgeführt. Die PCR für G-CSF ergab eine Doppelbande von 417 und 406 Bp, wobei das kleinere Fragment eine funktionell aktive Spleiß-Form von G-CSF mit einer Deletion von 9 Nukleotiden darstellt (Nagata *et al.* 1986b) und ein drittes Fragment mit einer Größe von 258 Bp wurde mittels Sequenzierung als eine Variante von G-CSF mit einer Deletion von 159 Bp

identifiziert. Bei den aus *in vivo* Progression der mit G-CSF transfizierten Zelllinie A-5G12b entstandenen Zelllinien A-5G12bRT1A, B, C, D konnte neben der Expression des transfizierten G-CSF eine Neo-Expression von GM-CSF beobachtet werden (Abb. 26). Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass der Selektionsdruck der *in vivo* Mikroumgebung, wie schon zuvor in den Zelllinien A-5RT1 und A-5RT3 beobachtet wurde, eine gemeinsame Expression von G-CSF und GM-CSF fördert.

Die Expression von G-CSF Rezeptor, GM-CSF Rezeptor α und GM-CSF Rezeptor β konnte in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden, wenn auch teilweise sehr schwach (Abb. 26).

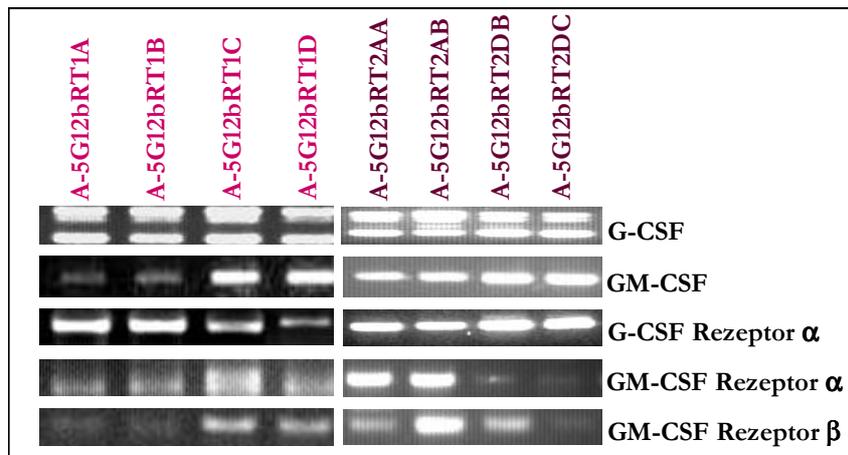


Abb. 26: Nachweis der mRNA von G-CSF, GM-CSF, G-CSF Rezeptor und GM-CSF Rezeptor α und β in Kulturen der durch *in vivo* Passage entstandenen Zelllinien.

Um festzustellen, ob die Expression der RNA für GM-CSF auch mit einer entsprechenden Proteinexpression einhergeht, wurde die Expression des GM-CSF Proteins mittels eines GM-CSF ELISAs an Zellkulturüberständen ermittelt. Bei den *in vivo* passagierten Zelllinien A-5G12bRT1A, B, C, und D sowie den durch erneute *in vivo* Passage entstandenen Zelllinien A-5G12bRT2AA, AB, DA, DB und DC ließ sich die auf RNA-Ebene gefundene Neo-Expression von GM-CSF auf Proteinebene bestätigen: bei diesen Zellen konnte eine GM-CSF Sekretion von 31-134pg/ml festgestellt werden (Tabelle 7). Da in den *in vivo* passagierten A-5G12b-Zellen eine Neo-Expression von GM-CSF beobachtet werden konnte, wurde zusätzlich der Einfluss einer Stimulation mit G-CSF auf die Expression von GM-CSF untersucht. Durch Stimulation der mit GM-CSF transfizierten Zellen mit 50 bzw. 100ng/ml G-CSF wurde die Sekretion von GM-CSF geringfügig um maximal 7% erhöht, und in den parentalen A-5 Zellen sowie den kontroll-transfizierten A-5Z12 Zellen war nach Stimulation mit G-CSF keine Expression von GM-CSF festzustellen (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 7: Nachweis des GM-CSF Proteins im ELISA.

	A-5G12b RT1A	A-5G12b RT1B	A-5G12b RT1C	A-5G12b RT1D	A-5G12b RT2AA	A-5G12b RT2AB	A-5G12b RT2DA	A-5G12b RT2DB	A-5G12b RT2DC
hGM-CSF (pg/ml)	37 ± 11	103 ± 0	120 ± 44	31 ± 6	113 ± 12	37 ± 0	63 ± 11	108 ± 44	134 ± 3

Folglich ist die Neo-Expression von GM-CSF nach *in vivo* Progression nicht direkt durch G-CSF induziert. Die Ursachen hierfür müssen in einer parakrinen Wechselwirkung mit der Tumor-Mikroumgebung zu finden sein, eventuell über die Induktion anderer Faktoren durch G-CSF, die wiederum in einer doppelt parakrinen Schleife die Expression von GM-CSF induzieren könnten. Um dies zu klären, sollten die Stromalen Einflüsse des Wirtsgewebes auf die Tumorzellen genauer untersucht werden. Die Methode der subkutanen Injektion ist dafür nur bedingt geeignet, da hierbei nur der bereits entwickelte Tumor untersucht werden kann, nicht jedoch die initialen Schritte der Tumorentstehung sowie der Tumor-Stroma Interaktionen. Die Analyse der zeitlichen Abläufe der Tumor-Stroma Wechselwirkungen kann jedoch sehr gut im Oberflächen-Transplantationsmodell vorgenommen und mit den Beobachtungen an Tumoren aus subkutaner Injektion kombiniert werden.

4.3.2.2 Analyse des Metastasierungspotentials

Da die ebenfalls durch *in vivo* Progression entstandene, hochgradig maligne Zelllinie A-5RT3 metastasiert, sollte das Metastasierungspotential der durch zweifache *in vivo* Progression entstandenen malignen Zelllinien A-5G12bRT2AA und A-5G12bRT2DB durch subkutane Injektion dieser Zelllinien und darauf folgende Entfernung des Primärtumors unter sterilen Bedingungen ermittelt werden. Nach einer Beobachtungszeit von 6 Monaten wurden die Tiere auf Metastasen untersucht. Bei der Zelllinie A-5G12bRT2AA fanden sich bei 2 der 5 Tiere ca. 1mm^3 große Lungenknötchen, die übrigen Tiere waren ohne Befund. Bei der Zelllinie A-5G12bRT2DB wurden an 3 Tieren insgesamt 3 Lungenknötchen, 2 Leberknötchen und 1 Milzknötchen mit einer Größe von jeweils 1mm^3 festgestellt, und bei 2 Tieren konnten keine Veränderungen gefunden werden. Die Abstammung der Metastasen von den humanen Tumoren wurde mittels Immunfluoreszenz-Färbung des proliferations-assoziierten humanen Proteins Ki-67 bestätigt.

4.3.3 Charakterisierung des Wachstumspotentials der transfizierten Zellen *in vivo*

Subkutane Injektion der benignen parentalen Zelllinie A-5 sowie der kontroll-transfizierten Zelllinie A-5Z12 ergab Zysten mit einem keratinisiertem Zentrum und einem gut differenzierten, mehrschichtigen Tumorrind. Subkutane Injektion der mit GM-CSF transfizierten Zelllinien A-5GM6 und A-5GM14 resultierte in kurzzeitigem Wachstum eines Tumors, der sich jedoch nach ca. 6 Wochen zurückbildete, während die Injektion der mit G-CSF transfizierten A-5G12b Zellen sowie der durch *in vivo* Passage dieser Zellen entstandenen Zelllinien A-5G12bRT1A-D

(gezeigt für A-5G12bRT1D) schnell und invasiv wachsende Tumore mit einer starken Vermischung von Tumor und Stroma ergab (Abb. 27).

4.3.4 Vaskularisierung der Subkutantumore

Eine Korrelation zwischen Angiogenese und der Invasion von Tumoren konnte bereits in früheren Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (Skobe *et al.* 1997; Vosseler 2001). Dabei wurden qualitative sowie quantitative Unterschiede in der Angiogenese der benignen HaCaT-*ras* A-5 Zellen und der malignen HaCaT-Klone HaCaT-*ras* II-4 und HaCaT-*ras* A-5RT3 gezeigt. Ob auch mit der gezielten Expression von G-CSF und/oder GM-CSF in den transfizierten Zelllinien eine verstärkte Angiogenese einhergeht, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Die zystischen Tumore die nach subkutaner Injektion der benignen Zelllinie A-5 und der kontroll-transfizierten A-5Z12 Zellen entstanden, waren von großen Blutgefäßen umgeben, welche jedoch nicht in das Tumorgewebe eindringen (Abb. 27). Im Gegensatz hierzu zeigten die invasiven subkutanen Tumore der G-CSF exprimierenden A-5G12b Zellen eine ausgeprägte gegenseitige Infiltration von Tumorgewebe und stromalen Strängen, und diese Tumore waren mit zahlreichen Blutgefäßen durchsetzt (Abb. 27).

Subkutane Tumore der *in vivo* passagierten Zelllinien A-5G12bRT1 und A-5G12bRT2 zeigten ebenfalls ein stark invasives Tumorstadium und eine ausgeprägte Vaskularisierung im Tumor und um ihn herum, wiesen jedoch zentrale Nekrosen auf, wie es bei sehr rasch wachsenden Tumoren häufig beobachtet wird (Abb. 27).

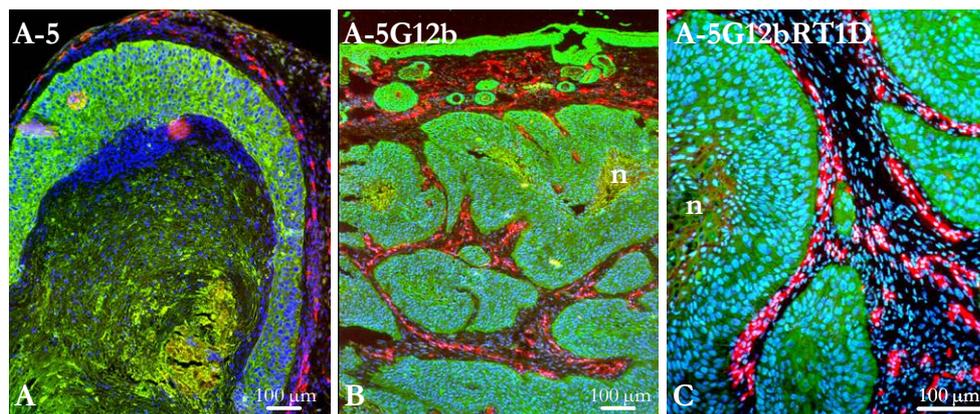


Abb. 27: Vergleich der Vaskularisierung in Subkutantumoren aus A-5 (A), A-5G12b (B) und A-5G12bRT1D (C). Blutgefäße (CD31): rot dargestellt, Keratinozyten sind mit einem pan-spezifischen Keratin-Antikörper grün markiert und die Zellkerne sind mit dem DNA-Farbstoff Höchst blau gefärbt.

4.3.5 Verstärkte epitheliale Proliferation der G-CSF und GM-CSF exprimierenden Zellen

Da nach subkutaner Injektion der mit G-CSF transfizierten Zelllinie A-5G12b sowie den *in vivo* passagierten Zelllinien, die G-CSF und GM-CSF ko-exprimieren, ein schnelles und invasives Tumorstadium mit ausgeprägter Vaskularisierung beobachtet wurde, sollte die Proliferation der epithelialen Tumorzellen untersucht werden. Zur Quantifizierung der Proliferation wurde das Verhältnis zwischen proliferierenden Epithelzellen und lebenden Zellen im Tumor mit der AnalySIS Software ermittelt. Proliferierende humane Zellen wurden dabei über indirekte Immunfluoreszenz für das proliferations-assoziierte Protein Ki-67 (Mib) dargestellt.

Die Quantifizierung proliferierender Zellen in Tumoren aus subkutaner Injektion der Zelllinie A-5 ergab dabei eine Proliferationsrate von 22% der im Bildausschnitt vorhandenen Tumorzellen. In Tumoren aus der mit G-CSF transfizierten Zelllinie A-5G12b war die Proliferation auf 36% erhöht, und in Tumoren der Zelllinien A-5G12bRT, die durch *in vivo* Progression der Zelllinie A-5G12b entstanden und G-CSF und GM-CSF ko-exprimieren (gezeigt am Beispiel von A-5G12bRT1B), war eine Erhöhung der Proliferation auf 45% zu beobachten. Auffallend dabei war die Anhäufung proliferierender Zellen besonders im Randbereich des Tumorparenchyms, also in unmittelbarer Nähe zu stromalen Strängen mit Blutgefäßen, wo die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen für die Zellen am günstigsten ist (Abb. 28).

Die Wirkung der Expression von GM-CSF auf die Proliferation der Tumorzellen in Subkutantumoren *in vivo* konnte nicht untersucht werden, da diese sich nach initialem Wachstum wieder zurückbildeten.

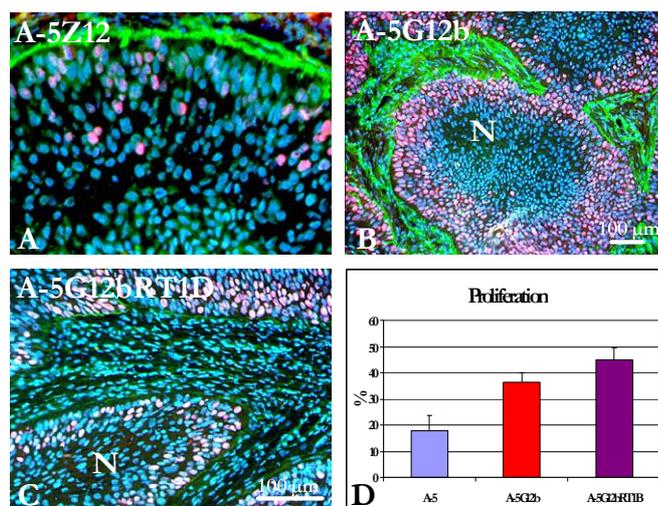


Abb. 28: Vergleich der Proliferation der Tumorzellen in Subkutantumoren von A-5 (A), A-5G12b (B) und A-5G12bRT1D (C). Proliferierende Tumorzellen sind mit einem Antikörper gegen Ki-67 (Mib) rot angefärbt, Kollagen IV in der Extrazellulären Matrix ist grün dargestellt und Zellkerne sind mit dem DNA-Farbstoff Hoechst blau gefärbt. N = Nekrose im Tumor. D: Quantifizierung des Anteils proliferierender Tumorzellen.

In vitro Untersuchungen an organotypischen Kulturen zeigten jedoch eine im Vergleich zu den parentalen untransfizierten A-5 Zellen deutlich erhöhte Proliferation der mit GM-CSF transfizierten Zelllinie A-5GM6 ähnlich der Proliferation der mit G-CSF transfizierten Zelllinie A-5G12b (siehe Abb. 18, S. 65).

Um das so unterschiedliche Wachstumsverhalten der Zellen in der organotypischen Kultur *in vitro* und unter *in vivo* Bedingungen zu verstehen und dessen Ursachen zu finden, muss die Wirtsreaktion auf die Tumorzellen genauer untersucht werden. Da GM-CSF besonders für seine Wirkung auf inflammatorische Zellen wie Granulozyten und Makrophagen bekannt ist und zudem auch als wichtiger Faktor in der Anti-Tumor-Immunität beschrieben wird (Dranoff *et al.* 1993; Bernasconi *et al.* 1995; Ragnhammar 1996; Mann *et al.* 2001b), waren diese Zelltypen hierbei von besonderem Interesse.

4.4 Untersuchung der Tumor-Stroma Interaktionen in Subkutantumoren und Oberflächentransplantationen

4.4.1 Oberflächentransplantation als Modell zur Analyse der Stroma-Aktivierung

Das in unserem Labor entwickelte Modell zur Oberflächentransplantation erlaubt eine sehr sensitive *in vivo* Untersuchung des Invasionspotentials der dafür verwendeten Hautkarzinom-Zelllinien sowie der Wechselwirkungen zwischen Tumor und Stroma (Fusenig *et al.* 1983; Boukamp *et al.* 1985; Hornung *et al.* 1987; Breitzkreutz *et al.* 1991; Mueller & Fusenig 2002). In diesem Test werden die Keratinozyten-Zelllinien auf einem Kollagengel für einen Tag vorkultiviert und das präformierte Epithel anschließend *in toto* auf die dorsale Rückenmuskelfaszie unter die Haut von Nacktmäusen transplantiert (siehe Methoden). Nach der Transplantation bilden nicht tumorigene HaCaT-Zellen ein geschichtetes, keratinisiertes Epithel ähnlich der menschlichen Epidermis aus (Breitzkreutz *et al.* 1998). Auch die benignen tumorigenen HaCaT-*ras* A-5 Zellen bilden ein gut differenziertes Epithel aus, das jedoch weniger organisiert ist. Diese benignen Tumorzellen zeigen keine Anzeichen von invasivem Wachstum in das Kollagengel, sondern bleiben durch eine intakte Basalmembran vom Tumor-Stroma getrennt (Tomakidi *et al.* 1999; Tomakidi *et al.* 2003). Die Aktivierung des Wirtsgewebes, also ein Einwandern stromaler Zellen in das Kollagengel zur Bildung eines Granulationsgewebes ähnlich wie in einer Wundsituation in Kombination mit einer Neubildung von Blutgefäßen erfolgt in diesen benignen tumorigenen HaCaT-*ras* A-5 Zellen früher als in den nicht tumorigenen HaCaT Zellen (Skobe & Fusenig 1998; Vosseler 2001). Maligne tumorigene Zellen (z.B. HaCaT-*ras* A-5RT3) weisen dagegen ein weniger strukturiertes Epithel auf und zeigen eine weiter beschleunigte

und stärkere Aktivierung des Stromas, die in einem rapiden Austausch des Kollagengels durch das Granulationsgewebe resultiert. Innerhalb von zwei Wochen beginnt die Infiltration von Blutgefäßen in das Tumorepithel, welches seinerseits Invasion in das Kollagengel aufweist. Damit ist die zum Epithel hin gerichtete Angiogenese deutlich stärker, schneller und zudem persistierend, im Gegensatz zu den benignen tumorigenen Zellen, in denen nur eine transiente Angiogenese erfolgt (schematisch dargestellt in Abb. 29, siehe auch Vosseler 2001).

Somit kann in diesem Oberflächen-Transplantationsmodell schon zu frühen Zeitpunkten anhand der Kinetik der Stroma-Aktivierung, der Angiogenese sowie der Invasion der Tumorzellen in das Kollagengel zwischen benignen und malignen Tumorzellen unterschieden werden.

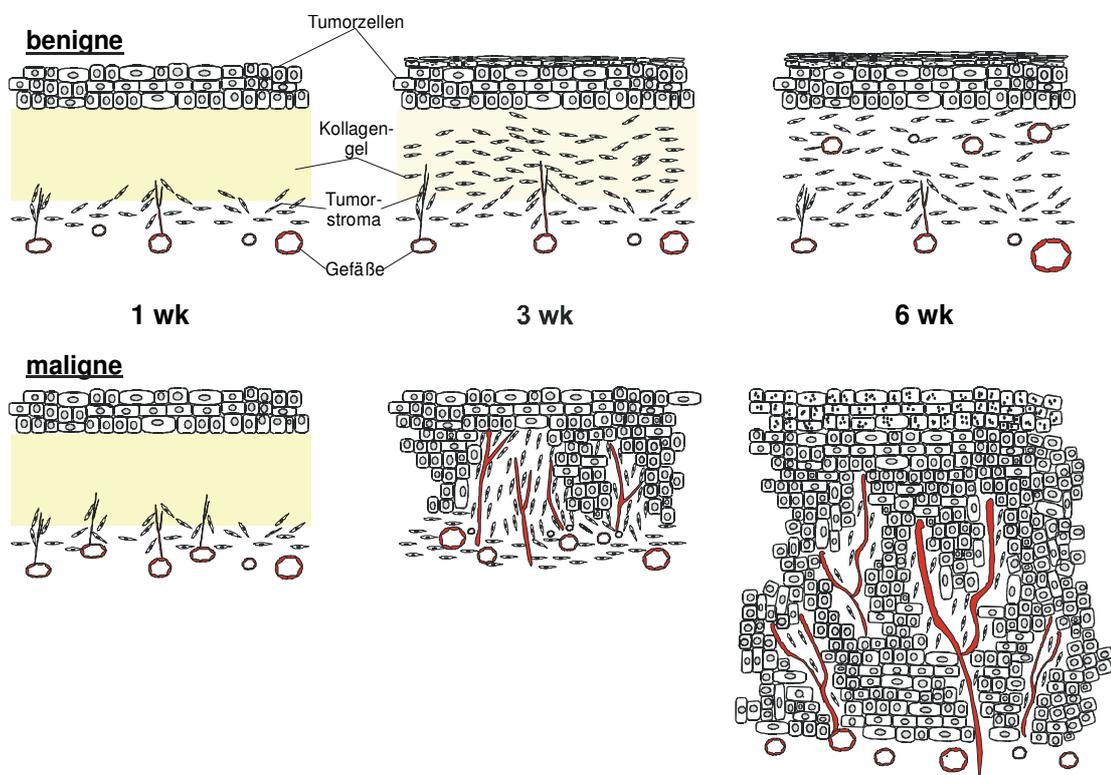


Abb. 29: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs (1, 3 und 6 Wochen nach Transplantation) von Angiogenese und Aktivierung des Tumor-Stromas bei benignen und malignen Transplantaten. Benigne und maligne Tumorzellen induzieren innerhalb der ersten Woche eine verstärkte Angiogenese unterhalb des Kollagengels, wobei diese bei malignen Transplantaten stärker und zum Epithel hin ausgerichtet ist. Während Angiogenese und Aktivierung des Tumor-Stromas bei benignen Transplantaten transient sind, sind beide Prozesse bei malignen Transplantaten permanenter Art, so dass eine Infiltration des Tumorgewebes mit Blutgefäßen und Stroma-Strängen stattfindet (aus Dissertation Silvia Vosseler, 2001).

Da das Epithel anfänglich durch das Kollagengel vom Wirtsgewebe getrennt ist, erlaubt dieses System die Untersuchung der initialen Interaktionen zwischen Tumorzellen und Stroma über die Diffusion parakriner Faktoren schon während des präinvasiven Stadiums der Tumorentwicklung. Damit ermöglicht das Transplantationsmodell die Analyse der Mechanismen von Tumordinvasion

und Aktivierung des Tumor-Stromas im zeitlichen Ablauf mit einer definierten Geometrie von Tumor und Stroma.

4.4.2 Entwicklung des Epithels aus G-CSF oder GM-CSF transfizierten Zellen bzw. Kontrollzellen in Oberflächentransplantaten *in vivo*

Nach der Transplantation bildeten alle Zelllinien mehrschichtige verhornte Epithelien aus, deren Dicke während des Beobachtungszeitraumes stetig zunahm. Transplantation der benignen parentalen Zelllinie A-5 sowie der kontroll-transfizierten Zelllinie A-5Z12 resultierte in einem gut differenzierten, mehrschichtigen Epithel (siehe Abb. 31). Dagegen zeigten Transplantate der mit G-CSF transfizierten Zelllinie A-5G12b ein rasches Wachstum des wenig strukturierten Epithels in Kombination mit Invasion der Zellen in das Kollagengel nach 3-4 Wochen bis hin zur völligen Vermischung von Tumorparenchym und stromalen Septen nach 6 Wochen, so dass die Transplantate in späten Stadien nicht mehr von Subkutantumoren aus dieser Zelllinie zu unterscheiden waren. Dieser Effekt zeigte sich in den *in vivo* passagierten Zelllinien A-5G12bRT1A-D bzw. A-5G12bRT2AA-DC noch schneller und deutlicher, beginnend in der zweiten Woche (siehe Abb. 31).

Überraschend war die Entwicklung der mit GM-CSF transfizierten Zelllinien A-5GM6 und A-5GM14 in Transplantationen, wie auch in den oben beschriebenen Subkutantumoren (4.3.3). Transplantationen der mit GM-CSF transfizierten Zelllinien A-5GM6 und A-5GM14 ergaben ein dünnes, unorganisiertes und löchriges Epithel, das zwar nach 3 Wochen eine geringfügige Invasion in das Kollagengel aufwies, jedoch weitgehend vom Maus-Mesenchym getrennt blieb (siehe auch Abb. 31).

Zuvor erfolgte *in vitro* Untersuchungen derselben Zelllinien in der organotypischen Kultur ergaben ein anderes Bild (durchgeführt von Dr. M. Mueller und A. Kraemer). Hier bildeten die parentalen A-5 Zellen, wie auch *in vivo*, ein gleichmäßiges, mehrschichtiges Epithel aus. Die mit GM-CSF transfizierten Zellen jedoch bildeten im Gegensatz zum Transplantat ein vielschichtiges, regelmäßiges Epithel mit starker Infiltration des Kollagengels aus, ähnlich wie auch die mit G-CSF transfizierten Zellen (Abb. 30).

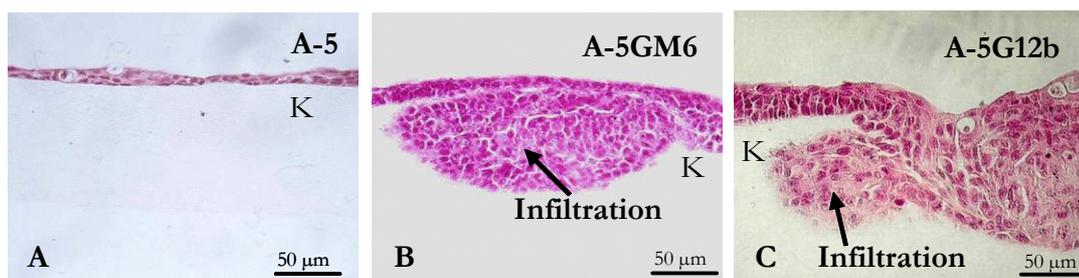


Abb. 30: Vergleich der Epithelbildung in organotypischen Kulturen mit A-5 Zellen (A), A-5GM6 (B) und A-5Z12 (C). K = Kollagengel.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich folgern, dass die *in vivo* Umgebung ursächlich ist an dem beeinträchtigten Wachstum der mit GM-CSF transfizierten Zelllinien, die bei subkutaner Injektion nur vorübergehend tumorbildend waren und im Transplantat ein langsam wachsendes, sehr unregelmäßiges Epithel bildeten.

4.4.3 Durch G-CSF und GM-CSF induzierte Aktivierung des Tumor-Stromas und Angiogenese

Die Bedeutung von G-CSF und GM-CSF als Faktoren für Proliferation, Reifung und funktionelle Aktivität inflammatorischer Zellen wie Granulozyten und Makrophagen ist bereits seit längerem bekannt (Takeda *et al.* 1991). Für beide Faktoren wurde darüber hinaus eine Induktion von Proliferation und Migration endothelialer Zellen *in vitro* sowie die Induktion von Angiogenese *in vivo* beschrieben (Bussolino *et al.* 1993; Mann *et al.* 2001a). Daher war es von besonderem Interesse, die Bildung des Granulationsgewebes, das u.a. aus inflammatorischen Zellen besteht, sowie die Vaskularisierung in Tumoren zu analysieren, welche G-CSF oder GM-CSF oder beide Faktoren zusammen exprimieren. Insbesondere lag der Fokus dabei auf dem zeitlichen Ablauf dieser Prozesse, der sich mit unserem Oberflächen-Transplantationssystem besonders gut darstellen lässt.

Die Bildung des Granulationsgewebes im Transplantat kann in drei Stufen unterteilt werden: in der ersten Stufe erfolgt unterhalb des Kollagengels eine starke stromale Reaktion mit erhöhter Zelldichte und verstärkter Angiogenese. In der zweiten Stufe infiltrieren Zellen und Gefäße das Kollagengel in Richtung des Tumorepithels, wobei das Gel von unten her durch Granulationsgewebe ersetzt wird. Die letzte Stufe wird nur bei malignen Zelllinien nach völligem Austausch des Kollagengels durch Granulationsgewebe erreicht. In diesem Schritt findet eine Invasion der Tumorzellen in das Kollagengel bei zeitgleicher Infiltration des Tumorgewebes durch stromalen Stränge mit Blutgefäßen statt.

Untersuchungen zeigten, dass in den benignen, tumorigenen A-5 Zellen und den kontroll-transfizierten A-5Z12 Zellen bereits nach zwei Wochen eine Granulationsgewebe-Bildung und vollständige Durchsetzung des Gels nach 4 Wochen erfolgte, jedoch konnte keine Invasion von Tumorzellen in das Mausgewebe oder der stromalen Zellen in das Tumorparenchym beobachtet werden (schematische Darstellung: Abb. 29 und Abb. 31, siehe auch: Vosseler 2001).

Eine Analyse der mit GM-CSF transfizierten Zelllinien A-5GM6 und A-5GM14 zeigte eine sehr frühe Infiltration des Gels mit stromalen Zellen nach bereits einer Woche, jedoch wurde keine Invasion der Tumorzellen in das Gel oder der stromalen Zellen in das Tumorgewebe festgestellt (siehe Abb. 31).

Somit war in den mit GM-CSF transfizierten Zellen zwar eine im Vergleich zu den parentalen A-5 Zellen beschleunigte Bildung des Granulationsgewebes festzustellen, die dritte Stufe der Invasion, die nur von malignen Keratinozyten vollzogen wird, wurde jedoch nicht erreicht.

Anders verhielt es sich bei Transplantaten der mit G-CSF transfizierten Zelllinie A-5G12b. Hier war das Kollagengel bereits nach zwei Wochen mit stromalen Zellen durchsetzt, und es fand nach 4-5 Wochen eine gegenseitige Invasion von Tumorgewebe und stromalen Zellen statt (siehe Abb. 31). Folglich erreichten diese Keratinozyten durch die Transfektion mit G-CSF die nächste Stufe der Malignität, wenn auch die eigentliche Vermischung von Tumorgewebe und stromalen Zellen langsamer stattfindet als in der hoch malignen Zelllinie A-5RT3, die G-CSF und GM-CSF ko-exprimiert und bereits nach 3-4 Wochen im Transplantat invasive Tumore bildete.

Somit stellen Zellen, die nur GM-CSF oder nur G-CSF exprimieren, Zwischenstufen im Prozess der Transformation bis hin zu hochgradig malignen, schnell und invasiv wachsenden Zellen wie z.B. A-5RT3 dar.

Dieser hochmaligne Tumor-Phänotyp konnte erst durch *in vivo* Progression der mit G-CSF transfizierten Zelllinie A-5G12b erreicht werden: in den resultierenden, G-CSF und GM-CSF ko-exprimierenden A-5G12bRT1 Zellen fand die Bildung des Granulationsgewebes innerhalb der ersten Woche statt, und nach 3 Wochen war eine gegenseitige Invasion von Tumorzellen und stromalen Septen zu beobachten (siehe Abb. 31).

Anhand dieser Daten lässt sich ein kausaler Zusammenhang zwischen einer starken und frühen Aktivierung des Tumor-Stromas durch maligne Keratinozyten-Zelllinien und dem invasiven Wachstum dieser Zellen postulieren; wobei in der beschleunigten Aktivierung des Tumor-Stromas die Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF eine wesentliche Rolle spielen.

4.4.3.1 Dynamik der durch G-CSF und GM-CSF induzierten Angiogenese

Aus der Analyse der subkutanen Tumore ergab sich bereits ein stimulierender Einfluss von G-CSF und GM-CSF auf die Tumor-Angiogenese. Dieser sollte nun in Oberflächentransplantaten in seiner Kinetik und seinem Beitrag zur Tumor-Invasion im Detail analysiert werden. An Cryoschnitten von Oberflächentransplantaten der Tumorzellen wurden an drei Tieren pro Woche für einen Zeitraum von 6 Wochen die Blutgefäße durch indirekte Immunfluoreszenz-Färbung über den Endothelzell-Marker CD31 (PECAM-1) dargestellt und digitale Bilder von repräsentativen Bildausschnitten angefertigt.

Durch die Quantifizierung der Blutgefäße in Oberflächentransplantaten mit der AnalySIS Software zur morphometrischen Quantifizierung wurde der unterschiedliche Verlauf der Vaskularisierung noch offensichtlicher. Hierzu wurde die Fläche der dargestellten Blutgefäße in Relation zur Gesamtfläche eines repräsentativen Bildausschnittes an drei Stellen pro Präparat und

jeweils 2-3 Präparaten pro Zeitpunkt ermittelt und als Gefäßdichte in Flächenprozent angegeben. Da die Infiltration von Blutgefäßen in das Tumorgewebe ein Indikator der Malignität der Tumorzellen ist, wurden einerseits die das Kollagengel infiltrierenden Blutgefäße und andererseits die Blutgefäße unterschieden, die tatsächlich im Tumorgewebe selber zu finden waren (Quantifizierungen: Abb. 32).

In Oberflächentransplantaten von A-5 und A-5Z12 Zellen begann die Vaskularisierung nach 2-3 Wochen. Nachdem die Blutgefäße die Tumor-Stroma Grenze nach 4 Wochen erreicht hatten, begann ihre Reifung in großlumige Gefäße; eine Infiltration des Tumorgewebes konnte nicht beobachtet werden (Abb. 31, zur Quantifizierung siehe Abb. 32).

Auch in den mit GM-CSF transfizierten Zelllinien A-5GM6 und A-5GM14 konnte nach 2-3 Wochen der Beginn einer transienten Angiogenese mit einem Maximum nach 4 Wochen beobachtet werden (Abb. 31). Blutgefäße erreichten das Tumorepithel, jedoch konnten wie in den parentalen A-5 Zellen auch hier keine Blutgefäße im Tumorgewebe gefunden werden (zur Quantifizierung siehe Abb. 32).

Im Gegensatz zu den parentalen bzw. mit GM-CSF transfizierten Zellen begann die Angiogenese in den mit G-CSF transfizierten A-5G12b Zellen bereits nach 1-2 Wochen; und in diesen Transplantaten konnte eine persistierende Angiogenese während des gesamten Beobachtungszeitraums von 6-8 Wochen gefunden werden. Sobald der Kontakt zwischen den Blutgefäßen und dem Tumorparenchym nach 3 Wochen hergestellt war, begann die Invasion der Blutgefäße in das Tumorgewebe, zeitgleich mit der Invasion der Tumorzellen in das Kollagengel (Abb. 31, zur Quantifizierung siehe Abb. 32).

In Oberflächentransplantaten der *in vivo* passagierten, G-CSF und GM-CSF positiven Zelllinien A-5G12bRT1 konnte eine starke Beschleunigung des Vaskularisierungs-Vorgangs beobachtet werden: bereits 2 Wochen nach der Transplantation war der Kontakt zwischen Blutgefäßen und Tumorgewebe hergestellt, und ab diesem Zeitpunkt begann die gegenseitige Invasion von Tumor und Stroma. Wie in den parentalen A-5G12b Zellen war auch hier die Angiogenese persistierend (Abb. 31).

Somit ist die Expression von G-CSF in diesen Keratinozyten die Voraussetzung für eine schnelle und persistierende Angiogenese, und durch Ko-Expression von GM-CSF wird dieser Prozess nochmals beschleunigt.

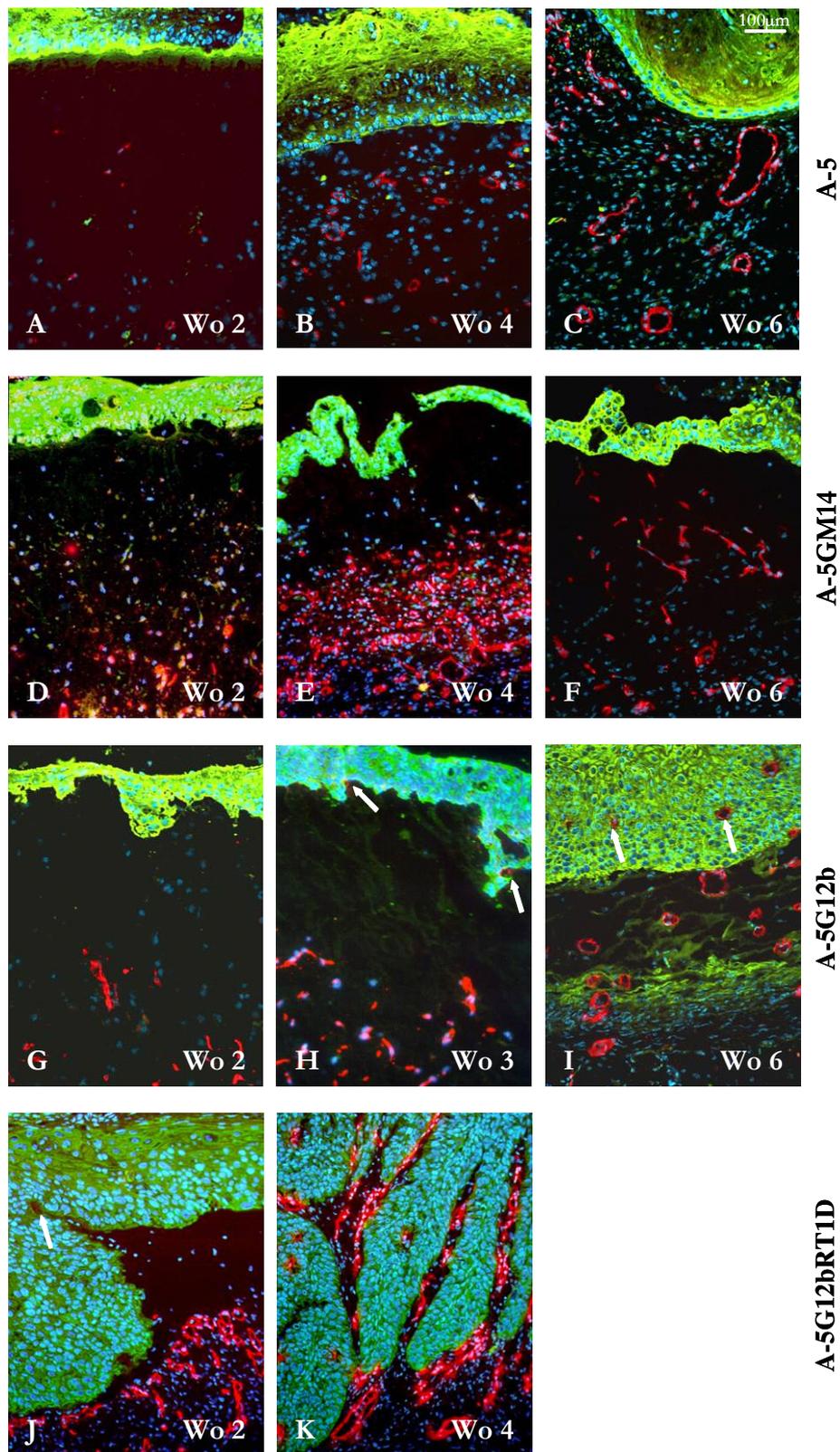


Abb. 31: Zeitverlauf der Vaskularisierung in Transplantationen von A-5 (A-C), A-5GM6 (D-F), A-5G12b (G-I) und A-5G12bRT1D (J-K). Blutgefäße sind mit einem Antikörper gegen CD31 rot dargestellt, Tumor-Keratinocyten sind mit einem pan-spezifischen Keratin-Antikörper grün markiert und die Zellkerne sind mit dem DNA-Farbstoff Höchst blau gefärbt.

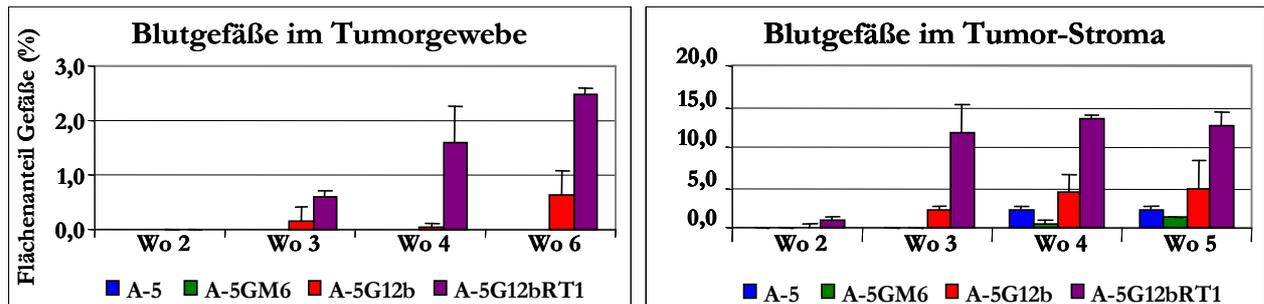


Abb. 32: Quantifizierung der Infiltration von Tumorgewebe und Tumor-Stroma durch Blutgefäße. Dargestellt sind infiltrierende Blutgefäße im Tumorgewebe und Blutgefäße im Tumorstroma in Nähe des Tumorgewebes in Oberflächentransplantaten zu verschiedenen Zeitpunkten. Blutgefäße wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung markiert und mit der AnalySIS Software zur morphometrischen Analyse quantifiziert.

4.4.3.2 Durch G-CSF und GM-CSF induzierte zelluläre Veränderungen im Stroma

Das Wachstum der epithelialen Tumorzellen beeinflussen neben den neu gebildeten Blutgefäßen auch stromale Zellen aus dem Mesenchym der Maus. Einen großen Anteil des Granulationsgewebes machen hämatopoetische Entzündungszellen aus. Da die mitogene und chemotaktische Wirkung von G-CSF und GM-CSF insbesondere auf Granulozyten, Makrophagen und ihre Vorläufer schon seit längerem bekannt ist (Takeda *et al.* 1991), wurde dem Anteil dieser Zelltypen am Granulationsgewebe in dieser Arbeit besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Diese beiden phagozytischen Zelltypen entwickeln sich aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle und spielen eine Schlüsselrolle in allen Phasen der Immunabwehr, nicht nur über Phagozytose von Pathogenen, sondern auch durch die Sekretion von Cytokinen und bakteriziden Substanzen. Durch die Sekretion angiogener Faktoren und die Degradation der extrazellulären Matrix durch Matrix Metalloproteinasen können Makrophagen und Granulozyten erheblich zu Tumorinvasion und Angiogenese beitragen (Coussens & Werb 2001).

Zur Detektion neutrophiler Granulozyten sowie von Makrophagen/Monozyten wurden Oberflächentransplantate über den Beobachtungszeitraum von 6 Wochen in Bezug auf infiltrierende inflammatorische Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert.

Der Verlauf der Infiltration des Kollagengels mit Granulozyten und Makrophagen wurde mittels der AnalySIS Software zur morphometrischen Quantifizierung an digitalen Bildern der Präparate untersucht. Hierzu wurde die Fläche der dargestellten Zellen in Relation zur Gesamtfläche eines repräsentativen Bildausschnittes an drei Stellen pro Präparat und jeweils 2-3 Präparaten pro Zeitpunkt ermittelt und in Flächenprozent angegeben.

4.4.3.2.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten spielen eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Wundheilung. Nach der Entstehung kreisen die Granulozyten nur wenige Stunden lang im Blut, um dann aus den Kapillaren ins Bindegewebe und insbesondere zu Wunden hin auszuwandern. Dort haben sie eine Lebensdauer von nur wenigen Tagen, während der sie eine aktive Funktion in der Wundheilung ausüben, bevor sie schließlich von Makrophagen phagozytiert werden (Janeway & Travers 1997). Darüber hinaus wurde für neutrophile Granulozyten auch eine fördernde bzw. inhibitorische Rolle in der Tumorentwicklung diskutiert (Pekarek *et al.* 1995; Coussens *et al.* 2000; Coussens & Werb 2001; Di Carlo *et al.* 2001; Dranoff 2003).

In Tumoren aus subkutaner Injektion der parentalen A-5 und der kontroll-transfizierten A-5Z12 Zellen konnte eine geringe Zahl an neutrophilen Granulozyten in Tumornähe beobachtet werden. In Subkutantumoren aus den mit G-CSF transfizierten A-5G12b Zellen und den durch *in vivo* Progression entstandenen A-5G12bRT1 Zellen dagegen konnte eine deutlich stärkere Rekrutierung von Granulozyten festgestellt werden (Abb. 33).

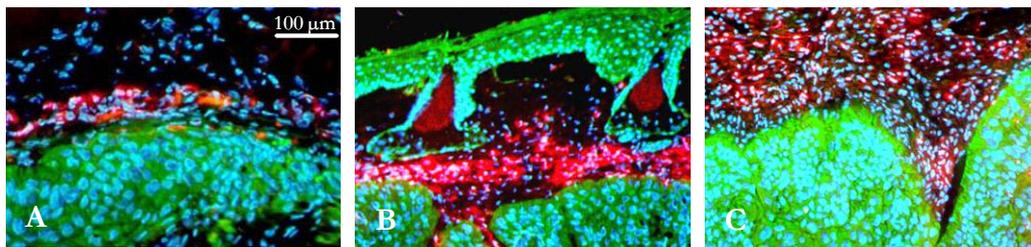


Abb. 33: Vergleich der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in Subkutantumoren aus A-5 (A), A-5G12b (B) und A-5G12bRT1B (C). Granulozyten sind rot dargestellt, Keratinozyten sind mit einem pan-spezifischen Keratin-Antikörper grün markiert und die Zellkerne sind mit dem DNA-Farbstoff Höchst blau gefärbt.

Analysen des Zeitverlaufs der Granulozyten-Rekrutierung in Transplantaten verdeutlichten diese Beobachtung noch: während in A-5 und A-5Z12 Zellen eine transiente Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten von Woche 2 bis Woche 4-5 zu beobachten war und ihre Zahl anschließend wieder abnahm, wurden Granulozyten in Transplantaten der mit GM-CSF transfizierten Zelllinien zwar früher nach bereits 1 Woche rekrutiert, die Rekrutierung blieb jedoch ebenfalls transient. Im Gegensatz dazu konnte bei den mit G-CSF transfizierten A-5G12b Zellen beginnend nach 2 Wochen und bei den *in vivo* passagierten A-5G12bRT1 Zellen, die G-CSF und GM-CSF ko-exprimieren, bereits nach 1 Woche eine massive und permanente Rekrutierung von Granulozyten zum Tumorepithel hin festgestellt werden, die über den gesamten Beobachtungszeitraum bestehen blieb (Abb. 34). Dies manifestierte sich in s.c. Tumoren in einer deutlich erhöhten Anzahl von Granulozyten im Stroma der Tumore dieser Zelllinien (Abb. 33).

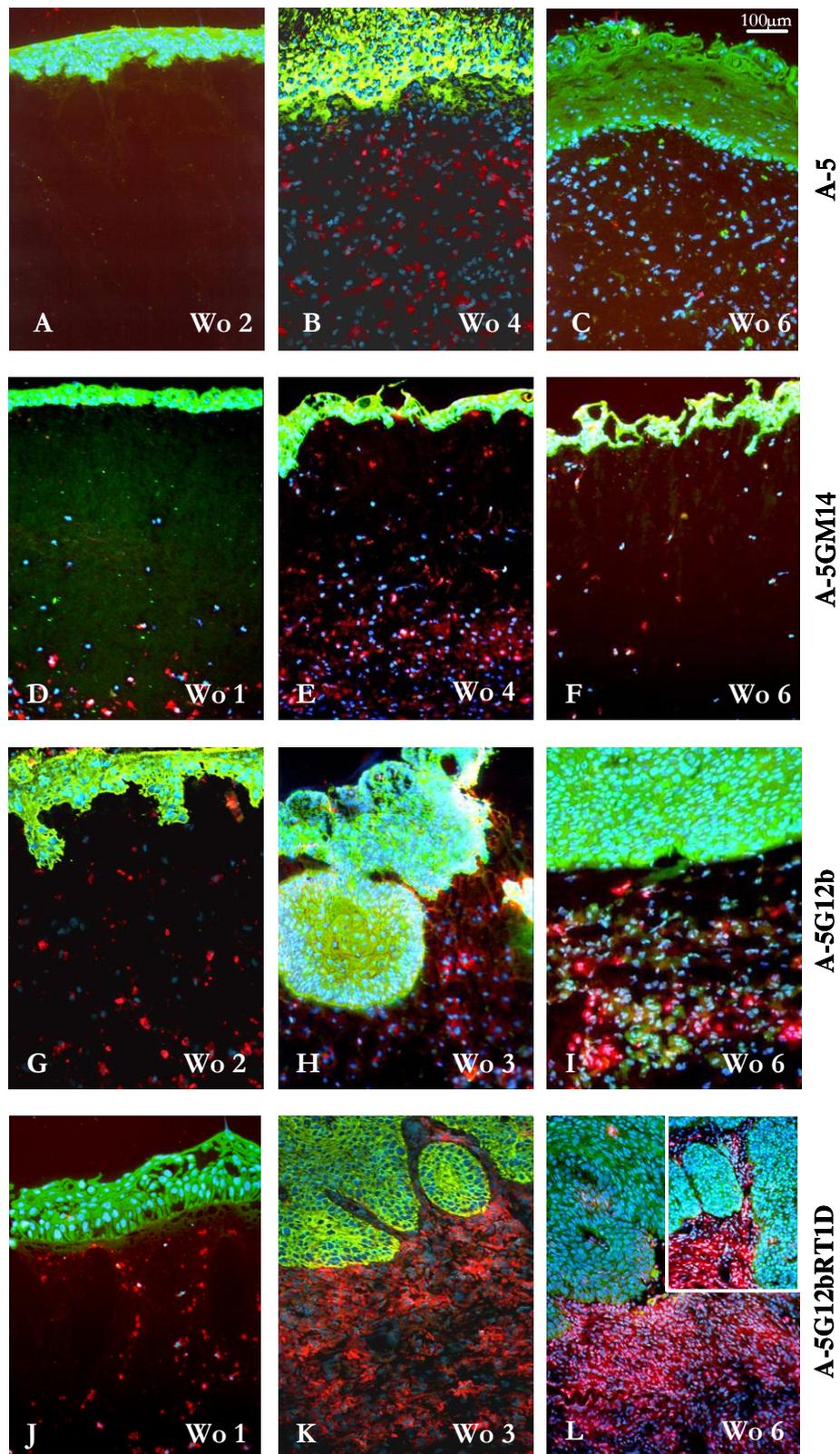


Abb. 34: Zeitverlauf der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in Transplantationen von A-5 (A-C), A-5GM6 (D-F), A-5G12b (G-I) und A-5G12bRT1D (J-L). Granulozyten sind rot dargestellt, Keratinozyten sind mit einem pan-spezifischen Keratin-Antikörper grün markiert und die Zellkerne sind mit dem DNA-Farbstoff Höchst blau gefärbt.

Die Kinetik dieser Vorgänge wurde auch durch die Quantifizierung nochmals verdeutlicht (Abb. 35).

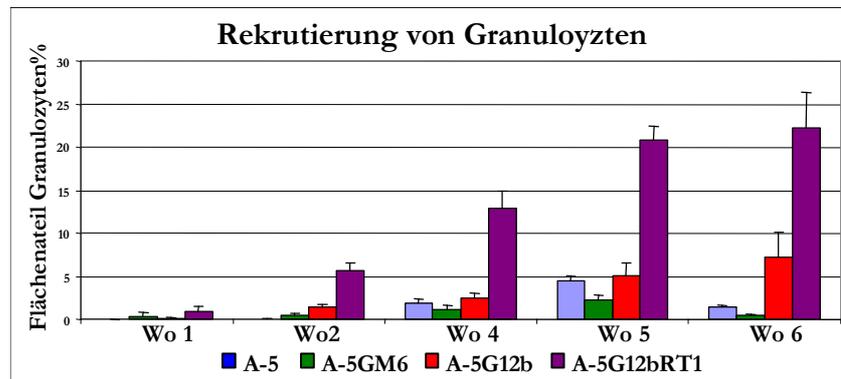


Abb. 35: Quantifizierung der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in Oberflächen-transplantaten.

Somit ist nur in G-CSF exprimierenden Tumoren eine permanente Rekrutierung von Granulozyten zu beobachten, während die Expression von GM-CSF den Beginn dieses Vorganges beschleunigt.

4.4.3.2.2 Makrophagen

Makrophagen reifen kontinuierlich aus zirkulierenden Monozyten heran, verlassen das Gefäßsystem und können monatelang außerhalb des Blutstroms überleben, bis sie durch lokale Signale, z.B. Kolonie stimulierende Faktoren (CSFs) dazu angeregt werden, die Proliferation wieder aufzunehmen. In der Frühphase der Wundheilung werden Makrophagen im Gewebe aktiviert und zudem Monozyten aus dem Blutstrom rekrutiert, um ebenfalls zu Makrophagen heranzureifen. Ebenso wie die neutrophilen Granulozyten nimmt auch die Zahl der Makrophagen in der Spätphase der Wundheilung wieder ab (Janeway & Travers 1997). Neben den phagozytischen Eigenschaften der Makrophagen können diese auch eine Reihe von Cytokinen und DNA-schädigenden Substanzen sekretieren. Die Rolle der Makrophagen in der Tumorprogression wird kontrovers diskutiert; ihnen werden sowohl Tumor fördernde Eigenschaften als auch eine Rolle in der Anti-Tumor-Immunität zugeschrieben (siehe Diskussion).

Analysen der Rekrutierung von Makrophagen in Tumoren aus subkutaner Injektion zeigten eine große Menge von Makrophagen in Tumornähe bei allen untersuchten Zelllinien (Abb. 36).

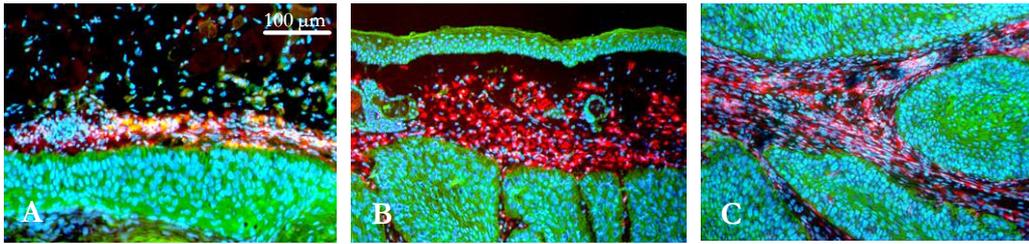


Abb. 36: Vergleich der Rekrutierung von Makrophagen in Subkutantumoren aus A-5 (A), A-5G12b (B) und A-5G12bRT1D (C). Makrophagen sind rot dargestellt, Keratinozyten sind mit einem pan-spezifischen Keratin-Antikörper grün markiert und die Zellkerne sind mit dem DNA-Farbstoff Höchst blau gefärbt.

Obwohl kein Unterschied in der endgültigen Anzahl der rekrutierten Makrophagen in den Subkutantumoren gefunden wurde, konnte mit Hilfe des Transplantationssystems eine völlig unterschiedliche Kinetik der Infiltration festgestellt werden. Hier zeigte sich eine deutlich frühere Rekrutierung von Makrophagen zu den mit GM-CSF transfizierten Zellen nach nur einer Woche, während diese bei den parentalen A-5 und den kontroll-transfizierten A-5Z12 Zellen erst nach zwei Wochen einsetzte. Die Rekrutierung von Makrophagen zu den mit GM-CSF transfizierten A-5GM6 und A-5GM14 Zellen erreichte nach 2 Wochen ein stabiles Plateau. Die Rekrutierung von Makrophagen zu Epithelien aus den mit G-CSF transfizierten A-5G12b Zellen setzte nach 2 Wochen massiv ein und erreichte nach 3-4 Wochen ein Plateau, das über dem der Kontrollen bzw. der GM-CSF Transfektanten lag; zudem konnte nur in Transplantationen von G-CSF exprimierenden Zellen eine Infiltration des Tumorgewebes durch Makrophagen beobachtet werden. In den G-CSF und GM-CSF ko-exprimierenden A-5G12bRT1 Zellen begann die Rekrutierung der Makrophagen bereits nach einer Woche und erreichte ein Plateau nach drei Wochen, und auch hier konnte eine massive Infiltration des Tumorgewebes durch Makrophagen beobachtet werden (siehe Pfeil in Abb. 37).

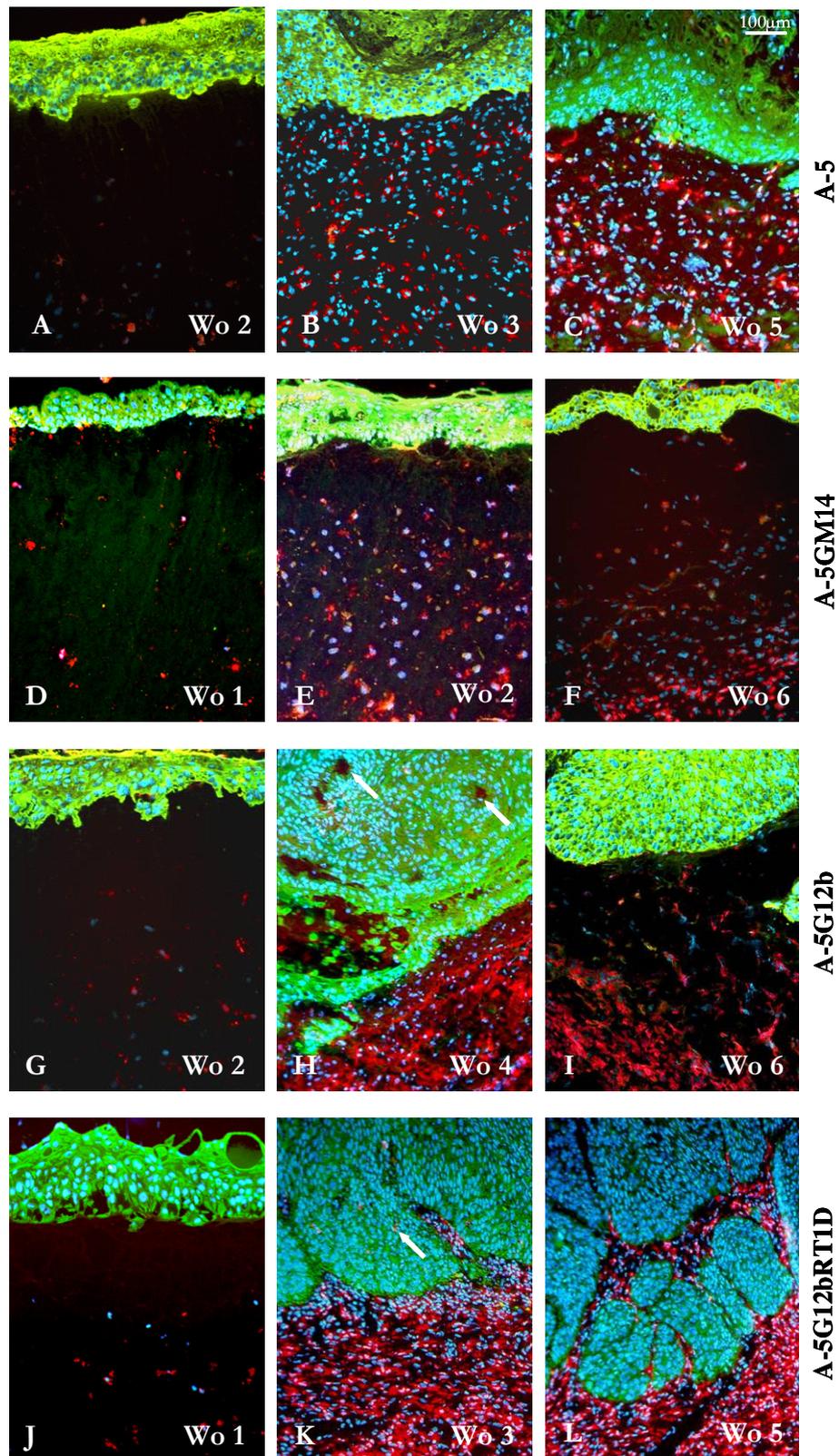


Abb. 37: Zeitverlauf der Rekrutierung von Makrophagen in Transplantationen von A-5 (A-C), A-5GM6 (D-F), A-5G12b (G-I) und A-5G12bRT1D (J-L). Makrophagen sind rot dargestellt, Keratinozyten sind mit einem pan-spezifischen Keratin-Antikörper grün markiert und die Zellkerne sind mit dem DNA-Farbstoff Höchst blau gefärbt.

Sehr deutlich wurde die Kinetik dieser Vorgänge auch durch die Quantifizierung repräsentativer Bildausschnitte an drei Stellen pro Präparat und jeweils 2-3 Präparaten pro Zeitpunkt (Abb. 38).

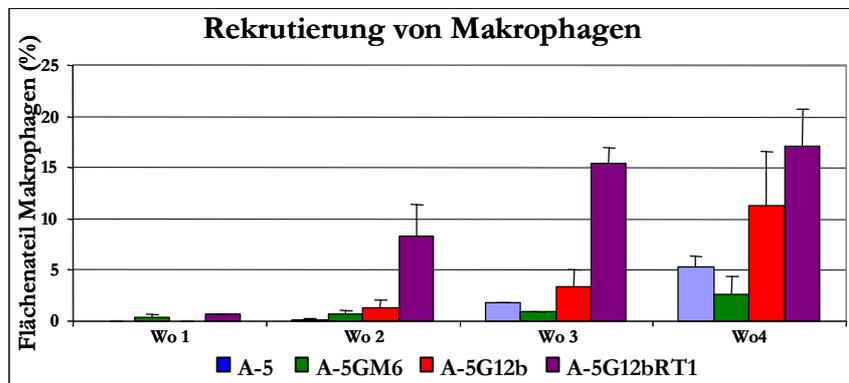


Abb. 38: Quantifizierung der Rekrutierung von Makrophagen in Oberflächentransplantaten.

Diese Daten zeigen, dass die Expression von GM-CSF in Tumorzellen zu einer beschleunigten Rekrutierung von Makrophagen zum Tumor führt, während die Sekretion von G-CSF eine verstärkte Rekrutierung und eine Infiltration des Tumors mit Makrophagen zur Folge hat.

4.4.4 Induktion von Matrix Metalloproteinasen durch G-CSF und GM-CSF

Die Bedeutung von Matrix-Metalloproteinasen in der Invasion und Metastasierung von Tumoren wird zunehmend offenbar.

Die Sekretion proteolytischer Enzyme nach Stimulation durch G-CSF und/oder GM-CSF konnte in ersten Studien mit Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten sowie Kopf-Hals Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen werden (Bussolino *et al.* 1993; Pugin *et al.* 1999; Tomita *et al.* 2000). Zudem konnte in Kopf-Hals Plattenepithelkarzinomen eine erhöhte gelatinolytische Aktivität sowie verstärkte Invasion im Matrigel-Test durch Regulation des Expressionslevels von z.B. MMP-2 und MT1-MMP durch G-CSF bzw. GM-CSF gezeigt werden (Noda *et al.* 1999; Tomita *et al.* 2000; Sugimoto *et al.* 2001).

Da *in vivo* Versuche eine ausgeprägte Invasion der G-CSF exprimierenden oder G-CSF und GM-CSF ko-exprimierenden Tumorzellen in das umgebende Stroma gezeigt hatten, sollte die Expression und Lokalisation verschiedener Matrix Metalloproteinasen untersucht werden, wobei nicht nur die vom Tumor selbst produzierten Matrix Metalloproteinasen berücksichtigt wurden, sondern auch die durch das Tumor-Stroma synthetisierten MMPs.

4.4.4.1 Expression von MMPs *in vitro*

Die Expression humaner Matrix-Metalloproteinasen *in vitro* wurde mittels RT-PCR an RNA der Zelllinien untersucht. Um einen möglichen Effekt des Zell-Zell-Kontaktes auf die Expression der MMPs zu untersuchen, wurde RNA aus Zellkulturen in verschiedenen Stadien der Konfluenz isoliert. Der Einfluss des Kulturmediums auf die Expression von MMPs *in vitro* wurde durch Einsatz verschiedener Medien (KBM, DMEM, RPMI) mit und ohne FCS untersucht. Dabei konnte keine Abhängigkeit der MMP-Expression von der Zugabe von FCS zum Kulturmedium festgestellt werden. Es werden hier nur ausgewählte Ergebnisse gezeigt (siehe: Abb. 39).

In PCR-Analysen für hMMP-1 konnte in allen untersuchten Zelllinien eine Expression nachgewiesen werden, jedoch war das Signal in den Kontroll-Transfektanten und der mit GM-CSF transfizierten Zelllinie A-5GM6 sowie zum Teil in der zweiten mit GM-CSF transfizierten Zelllinie A-5GM14 schwächer ausgeprägt.

Untersuchungen der Expression von hMMP-3 zeigten eine Expression dieser Proteinase nur in RNA-Isolaten aus postkonfluenten Zellkulturen, die mit KBM kultiviert worden waren; in den mit GM-CSF transfizierten Zelllinien konnte keine Expression von hMMP-3 festgestellt werden.

Analysen von hMMP-9 zeigten eine Expression in allen untersuchten Zelllinien, jedoch war das Signal in RNA-Isolaten subkonfluenter, in DMEM kultivierter Zellen stärker ausgeprägt.

PCR-Reaktionen für hMMP-2, hMMP-13 und hMMP-14 ergaben eine konstitutive gleichmäßige Expression dieser Proteinase bei allen untersuchten Zelllinien und Bedingungen.

Somit konnte unter 2-D Kulturbedingungen *in vitro* kein konsistenter Effekt der Expression von G-CSF und GM-CSF auf die Expression von Matrix Metalloproteinasen festgestellt werden. Auch die Effekte der verschiedenen Medien und Konfluenzstadien variierten zwischen den verschiedenen Zelllinien und Medien.

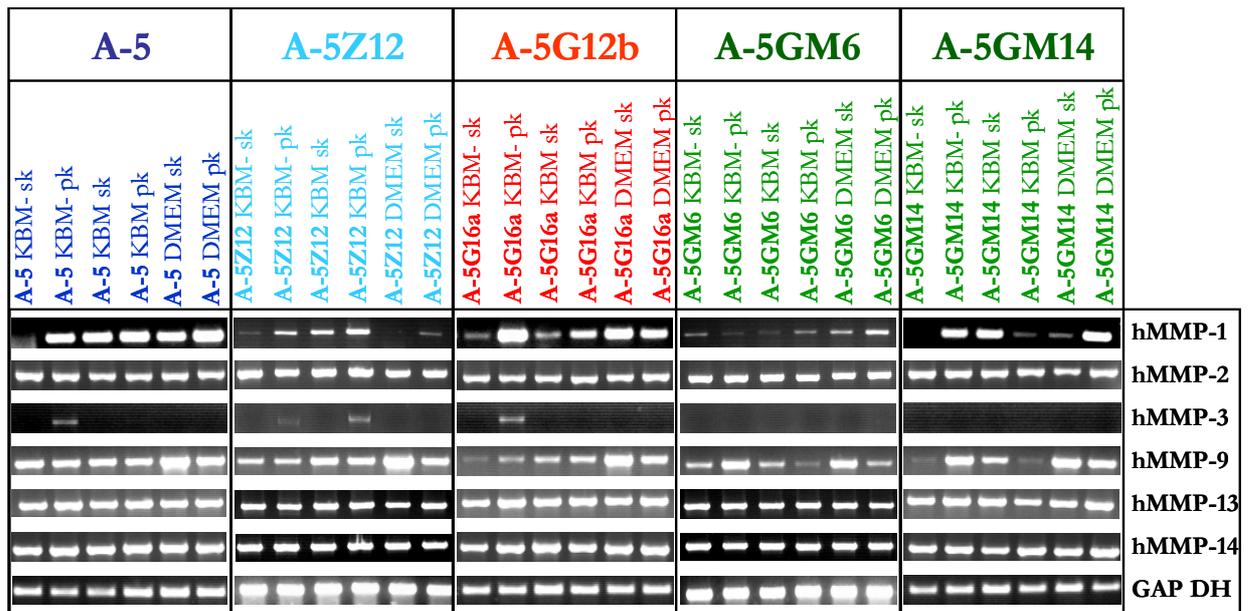


Abb. 39: Nachweis der mRNA von Matrix Metalloproteinasen in Zellkulturen von A-5, A-5Z12, A-5G12b, A-5GM6 und A-5GM14. sk = RNA aus subkonfluenten Kulturen, pk= RNA aus postkonfluenten Kulturen.

Die Sekretion des Proteins von hMMP-9 wurde mittels ELISA an Zellkulturüberständen untersucht, jedoch konnte kein lösliches Protein nachgewiesen werden, möglicherweise aufgrund einer Assoziation mit Komponenten der extrazellulären Matrix. Zur näheren Untersuchung wären Western Blots sowie Zymogramme von Zellysaten sinnvoll, die in unserer Abteilung bereits erfolgreich zum Nachweis einer verstärkten Produktion von hMMP-2, -3, -7, -9 und -10 mit zunehmender Malignität der untersuchten Zelllinien eingesetzt wurden (Bachmeier *et al.* 2000a).

4.4.4.2 Expression von MMPs *in vivo*

Die Expression und Lokalisation verschiedener Matrix-Metalloproteinasen in Subkutantumoren und Oberflächentransplantaten wurde auf RNA-Ebene mittels *in situ*-Hybridisierung und auf Proteinebene mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht (Antikörper: G. Murphy). In der *In situ* Hybridisierung wurde als Substrat der Alkalischen Phosphatase entweder BCIP/NBT (brauner Niederschlag) oder HNPP/Fast Red^{TR} (rote Fluoreszenz) eingesetzt. Die Äquivalenz dieser Substrate wurde in Parallelansätzen mit einer Sonde für Keratin-5 getestet. Bei den gezeigten Färbungen handelt es sich um Vorversuche, weiterführende Versuche wurden aus Zeitgründen nur mit mMMP-9 und mMMP-13 durchgeführt. Daher sind meist nur ausgewählte Zelllinien untersucht worden.

hMMP-1

In Situ-Hybridisierungen zum Nachweis von hMMP-1 an Tumoren aus subkutaner Injektion von A-5G12b zeigten eine Expression der RNA dieser Proteinase in Tumorzellen, die in direktem Kontakt zum Tumor-Stroma standen, während innerhalb des Tumors nur wenig Expression dieser RNA festgestellt werden konnte (Abb. 40).

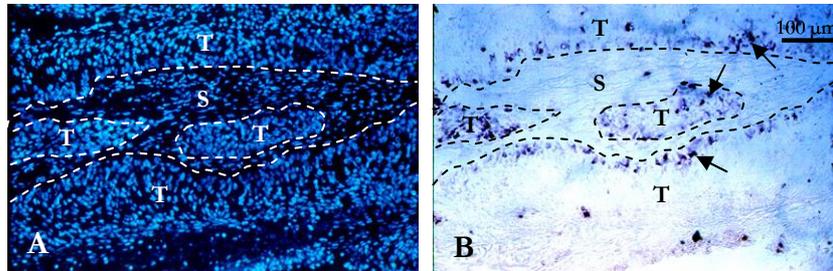


Abb. 40: *In Situ*-Hybridisierung: hMMP-1 an Subkutantumoren von A-5G12b, Färbung der Zellkerne: Höchst (A), Phasenkontrast (B). T = Tumor, S = Stroma, Pfeile: hMMP-1 positive Zellen

hMMP-2

Immunfluoreszenz-Färbungen an Tumoren aus subkutaner Injektion von A-5 und A-5G12bRT1D zeigten eine starke Expression des Enzyms (rot) in den Tumorzellen (grün gefärbt für Keratin). In der Umgebung des Tumors konnte sekretiertes, an die extrazelluläre Matrix gebundenes hMMP-2 nachgewiesen werden, und auch weiter vom Tumor entfernt konnten Ablagerungen von hMMP-2 beobachtet werden. Dabei war ein verstärktes Signal für hMMP-2 im Tumor-Stroma der malignen A-6G12b Tumore und der hochgradig malignen A-5G12bRT1D Tumore im Vergleich zu den benignen A-5 Tumoren zu beobachten (Abb. 41). Eine Tumorzell assoziierte Markierung von hMMP-2 konnte in den Tumoren beobachtet werden, wie sich aus der gelben Überlagerungsfarbe aus dem grün gefärbten Keratin und dem rot markierten hMMP-2 ergibt.

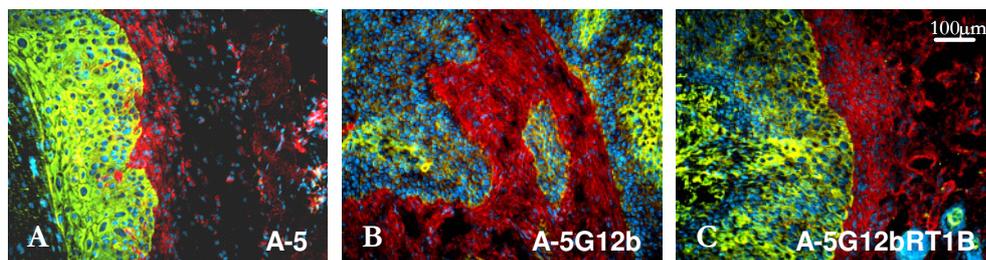


Abb. 41: Nachweis von hMMP-2 mit indirekter Immunfluoreszenz an Subkutantumoren von A-5 (A), A-5G12b (B) und A-5G12bRT1B (C). hMMP-2 ist rot dargestellt, Keratinozyten sind mit einem pan-spezifischen Keratin-Antikörper grün angefärbt und Zellkerne sind blau markiert.

hMMP-13

Mit Immunfluoreszenz-Färbungen an Subkutantumoren von A-5 und A-5G12bRT1 konnte eine starke Expression des Proteins von hMMP-13 (rot) in den Tumorzellen (grün gefärbt für Keratin) und sezerniertes, nicht Zell lokalisiertes Protein in Tumornähe gezeigt werden (Abb. 42). Dabei konnte in den Tumoren von A-5 nur im Randbereich des Tumors eine Expression von hMMP-13 beobachtet werden, während diese in Tumoren von A-5G12bRT1D im gesamten Tumor zu finden war (deutlich sichtbar als gelbe Überlagerungsfarbe aus rotem hMMP-13 und grünem Keratin).

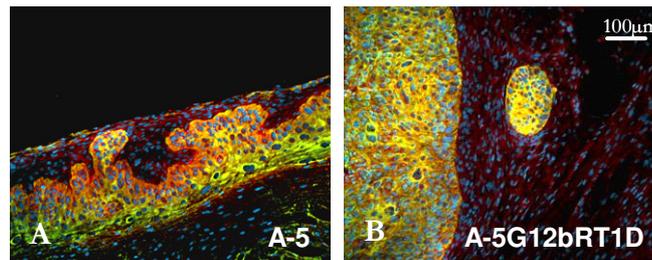


Abb. 42: Nachweis von hMMP-13 mit indirekter Immunfluoreszenz an Subkutantumoren von A-5 (A) und A-5G12bRT1D (B). hMMP-13 ist rot dargestellt, Keratinozyten sind mit einem pan-spezifischen Keratin-Antikörper grün angefärbt und Zellkerne sind blau markiert.

Neben den Tumorzellen können verschiedene Stromazellen wie inflammatorische Zellen und Fibroblasten diverse MMPs überexprimieren und diese wechselseitig mit dem Tumor induzieren (Lynch & Matrisian 2002; Heissig *et al.* 2003). Da neuere Erkenntnisse darauf hindeuten, dass ein großer Teil der in einem epithelialen Tumor vorhandenen MMPs von stromalen Zellen in Kooperation mit dem Tumor selbst produziert wird (Coussens & Werb 1996; Tomita *et al.* 2000; Coussens *et al.* 2002; Polette *et al.* 2004), ist die Untersuchung der Expression stromaler (in diesem Fall: muriner) MMPs in diesem Mehrstufenmodell der humanen Hautkarzinogenese in der Nacktmaus unerlässlich.

mMMP-3

Eine Analyse der Expression der RNA für stromales mMMP-3 mittels *In Situ* Hybridisierung in Tumoren aus subkutaner Injektion der Zelllinie A-5G12b zeigte die Expression der RNA in stromalen Zellen in unmittelbarer Nähe zum Rand des Tumors (Abb. 43, I, Pfeile).

Der Nachweis des Proteins mittels Indirekter Immunfluoreszenz an Subkutantumoren zeigte mMMP-3 im Tumor-Stroma in zunehmender Menge von benignen A-5 Zellen zu hochgradig malignen A-5G12bRT1 Zellen, teils in zellulärer Lokalisation und teils als diffuse Färbung im Stroma. Auffallend war die starke Konzentration von mMMP-3 um invasive Tumorzellgruppen herum (Abb. 43, II).

Eine Untersuchung des zeitlichen Ablaufs der mMMP-3 Produktion an Oberflächen-Transplantaten der mit G-CSF transfizierten Zelllinie A-5G12b zeigte eine starke Deposition von mMMP-3 am unteren Rand des Kollagengels in der ersten Woche (E), gefolgt von einer Infiltration mMMP-3 positiver stromaler Zellen in das Gel ab der zweiten Woche (F). Mit Kontakt dieser Zellen mit dem Tumorepithel in der vierten Woche ging eine ausgeprägte Deposition von mMMP-3 am Tumorrand einher, möglicherweise durch Degranulation der mMMP-3 produzierenden Zellen, die damit das invasive Tumorstadium unterstützen würden (Abb. 43, III). Auch im Tumor selbst konnte mMMP-3 Protein an wenigen Stellen nachgewiesen werden.

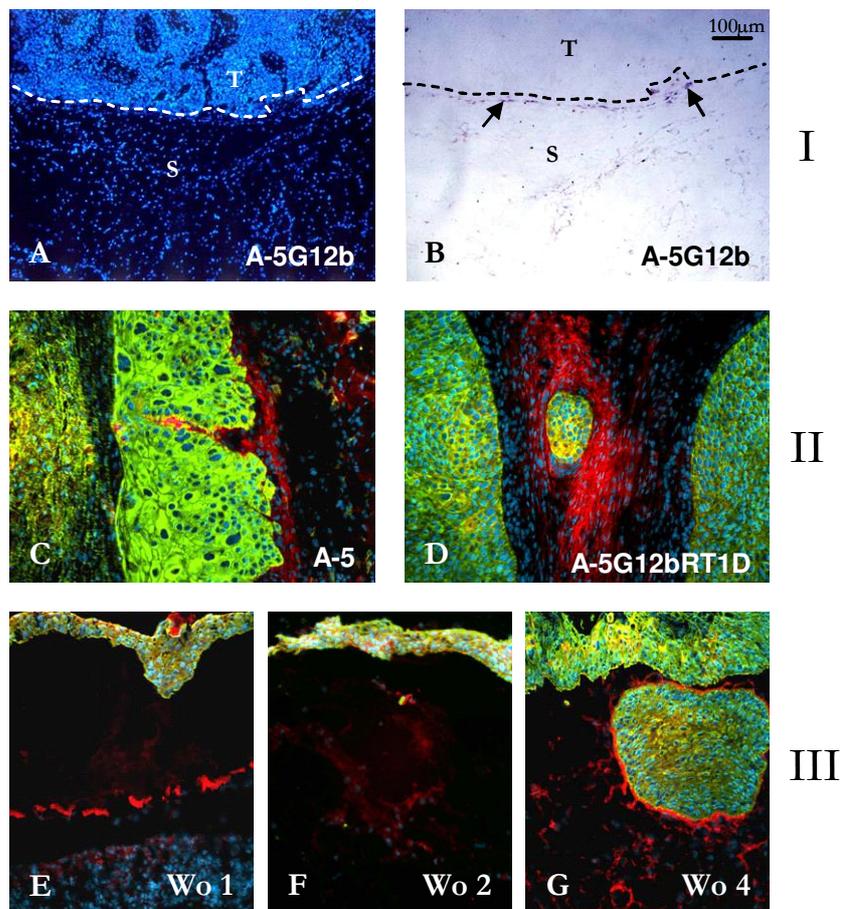


Abb. 43: Nachweis von mMMP-3: I. *In Situ*-Hybridisierung an Subkutantumoren von A-5G12b: (A) Hoechst-Färbung der Zellkerne, (B) RNA-Nachweis; II. Nachweis von mMMP-3 Protein mit indirekter Immunfluoreszenz an Subkutantumoren von A-5 (C) und A-5G12bRT1D (D); III. Nachweis von mMMP-3 Protein mit indirekter Immunfluoreszenz an Transplantaten von A-5G12b (E-G). mMMP-3 ist rot dargestellt, Keratinozyten sind mit einem pan-spezifischen Keratin-Antikörper grün angefärbt und Zellkerne sind blau markiert. T = Tumor, S = Stroma, Pfeile: Signal für mMMP-3.

mMMP-9

In Situ-Hybridisierungen zum Nachweis von stromaler mMMP-9 RNA an Tumoren aus subkutaner Injektion von A-5, A-5G12b und den durch *in vivo* Passage entstandenen A-5G12bRT1 und A-5G12bRT2 Zellen (gezeigt für A-5G12bRT1B) zeigten eine Expression der RNA dieser Proteinase im Tumor-Stroma in direkter Nähe zum Tumorrand (Pfeile). Dabei nahm die Stärke der mMMP-9 Expression im Stroma mit zunehmender Malignität des Tumors von den benignen A-5 Zellen über A-5G12b bis hin zu den hochgradig malignen A-5G12bRT1 und A-5G12bRT2 Zellen zu (Abb. 44, I und II).

Mittels indirekter Immunfluoreszenz an Subkutantumoren wurde das Vorhandensein des mMMP-9 Proteins in zellulärer Lokalisation und ebenfalls in Tumornähe bestätigt. Auch hier war eine Zunahme der Menge an mMMP-9 von benignen A-5 Zellen zu hochgradig malignen A-5G12bRT1 Zellen zu beobachten (Abb. 44, III).

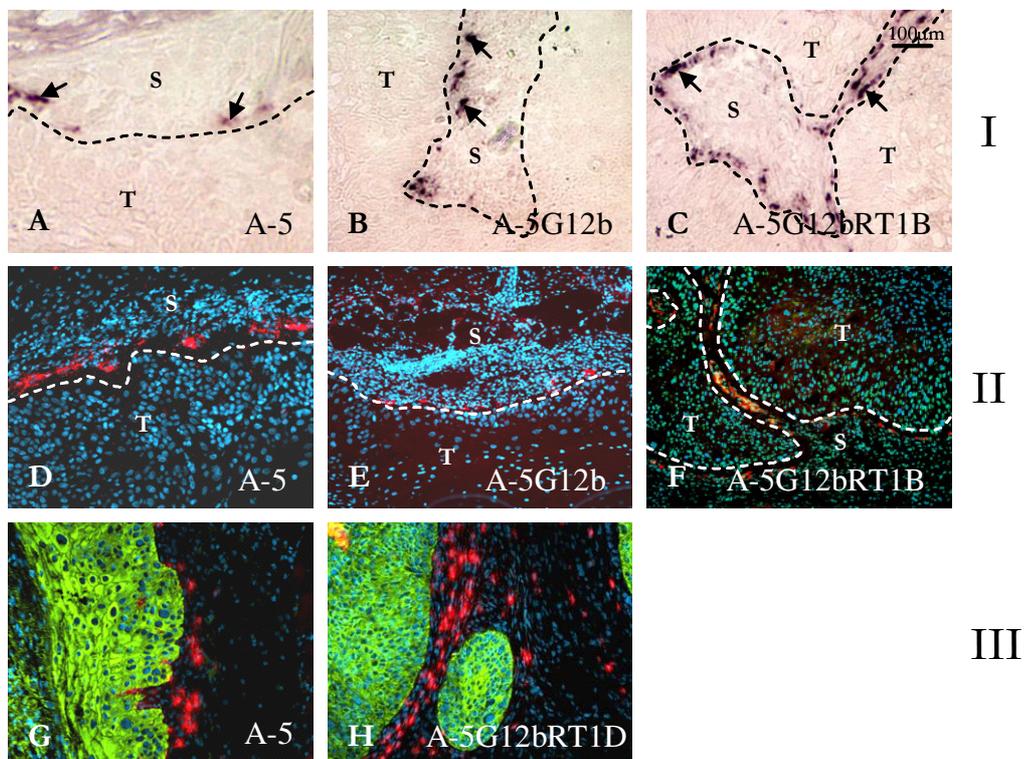


Abb. 44: Nachweis von mMMP-9 in Subkutantumoren: I. *In Situ*-Hybridisierung an A-5 (A), A-5G12b (B) und A-5G12bRT1B (C); II. *In Situ*-Hybridisierung mit rot fluoreszierendem Substrat an A-5 (D), A-5G12b (E) und A-5G12bRT1B (F); III. Nachweis von mMMP-9 Protein mit indirekter Immunfluoreszenz an A-5 (G) und A-5G12bRT1D (H); mMMP-9 ist rot dargestellt, Keratinozyten sind mit einem pan-spezifischen Keratin-Antikörper grün angefärbt und Zellkerne sind blau markiert. T = Tumor, S = Stroma, Pfeile: Signal für mMMP-9.

Die Kinetik der Expression bzw. Sekretion von mMMP-9 wurde an Oberflächen-Transplantationen der verschiedenen Zelllinien über einen Zeitraum von 6 Wochen untersucht (Abb. 45).

Dabei war in Transplantaten der benignen A-5 Zellen, der mit G-CSF transfizierten A-5G12b Zellen und der mit GM-CSF transfizierten A-5GM6 Zellen nach 1 Woche eine starke Deposition von mMMP-9 am unteren Rand des Kollagengels zu beobachten; bei den durch *in vivo* Passage entstandenen A-5G12bRT1 Zellen wurden kürzere Intervalle untersucht, so dass hier bereits nach 4 Tagen die Ablagerung von mMMP-9 festgestellt werden konnte. Die Infiltration des Kollagengels durch mMMP-9 positive Zellen setzte in Transplantaten der benignen A-5 Zellen in Woche 2-3 ein und erreichte ein Plateau in Woche 5.

In Transplantaten der Zelllinie A-5G12b setzte die Infiltration des Gels durch mMMP-9 positive Zellen beschleunigt bereits nach nur 1-2 Wochen ein und war von einer starken Ablagerung von mMMP-9 am unteren Rand des Tumorepithels begleitet. Diese ging der Invasion der Tumorzellen in das Kollagengel unmittelbar voraus. Transplantate der A-5GM6 Zellen zeigten eine ähnliche Kinetik wie die A-5G12b Zellen, jedoch war die Infiltration mMMP-9 positiver Zellen deutlich schwächer ausgeprägt. In Transplantaten der A-5G12bRT1 Zellen fanden sich nach bereits 11 Tagen mMMP-9 positive Zellen unterhalb des Tumorepithels, an dessen Rand eine Zone verstärkter mMMP-9 Ablagerung zu sehen war. Nach 18 Tagen erreichte die Infiltration des Kollagengels und auch der Stromalen Septen in den Tumoren durch mMMP-9 positive Zellen ein Plateau (Abb. 45). In mehreren Transplantaten der G-CSF transfizierten Zellen sowie der hochmalignen, G-CSF und GM-CSF ko-exprimierenden A-5G12bRT Zellen konnte eine Anlagerung von MMP-9 an die extrazelluläre Matrix unterhalb des Epithels beobachtet werden, die nach Invasion der Tumorzellen in das Kollagen nicht mehr nachweisbar war.

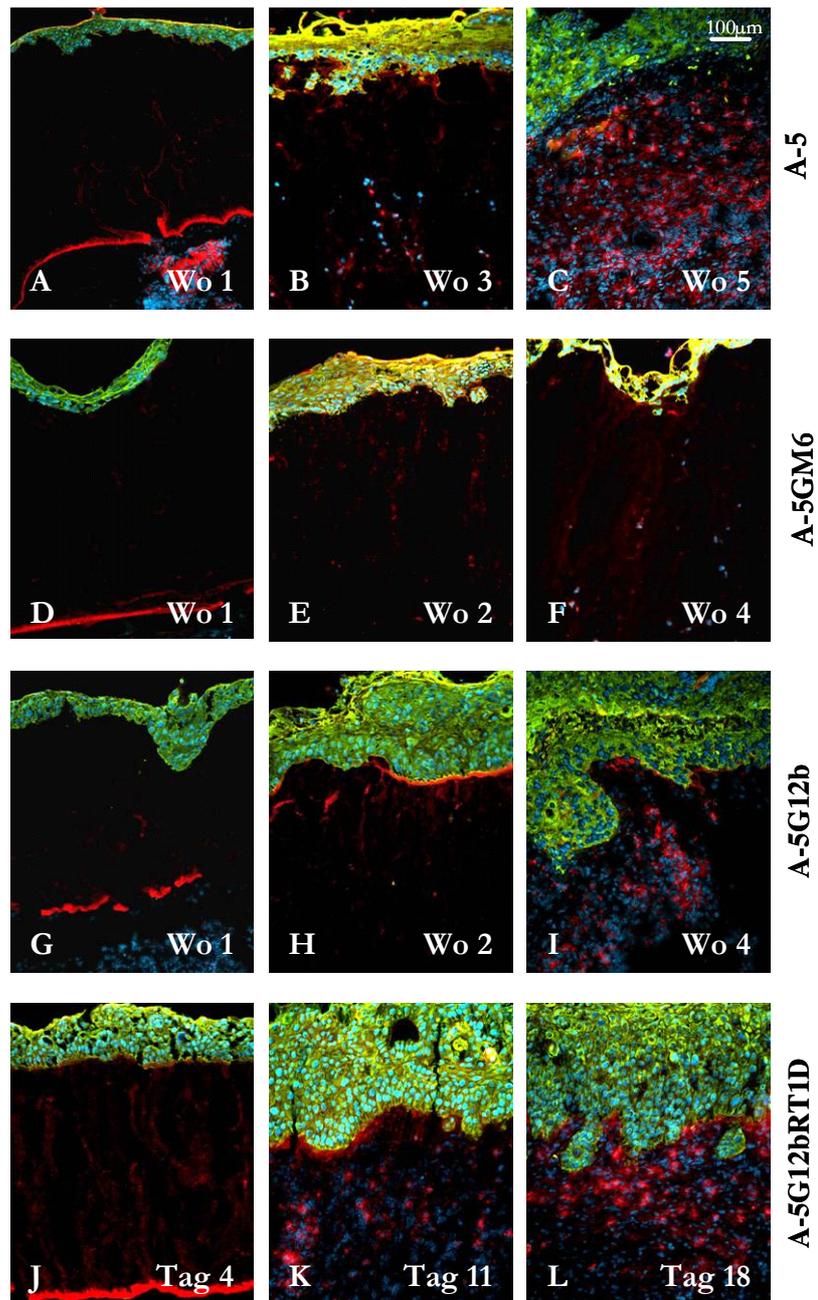


Abb. 45: Zeitverlauf der Expression von mMMP-9 Protein in Transplantationen von A-5 (A-C), A-5GM6 (D-F), A-5G12b (G-I) und A-5G12bRT1D (J-L). mMMP-9 ist rot dargestellt, Keratinozyten sind mit einem pan-spezifischen Keratin-Antikörper grün markiert und die Zellkerne sind mit dem DNA-Farbstoff Höchst blau gefärbt.

Durch Doppelfärbungen an diesen Oberflächen-Transplantaten konnte ein großer Teil der mMMP-9 positiven Zellen (rot gefärbt) als neutrophile Granulozyten (grün gefärbt) durch die entstehende gelbe Überlagerungsfarbe identifiziert werden; eine Ko-Lokalisation von mMMP-9 mit Makrophagen konnte nicht beobachtet werden (Abb. 46).

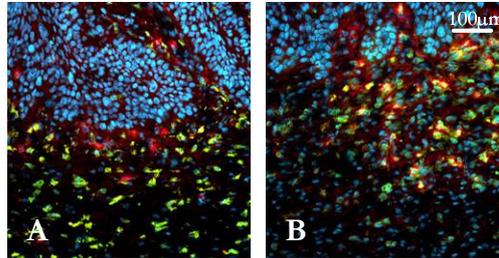


Abb. 46: Darstellung von mMMP-9 Protein mit Gegenfärbung für Makrophagen (A) oder Granulozyten (B), gezeigt an einer Transplantation von A-5G12bRT1D, Tag 18. mMMP-9 ist rot markiert, Makrophagen oder Granulozyten sind grün und Zellkerne blau gefärbt.

mMMP-13

In Situ-Hybridisierungen zum Nachweis von mMMP-13 an Tumoren aus subkutaner Injektion von A-5 und A-5G12bRT1 zeigten die Expression der RNA im Tumorstroma in dichter Assoziation zum Tumor. Wie auch bei mMMP-9 beobachtet, nahm die Expression der RNA von mMMP-13 mit zunehmender Malignität des Tumors von A-5 zu A-5G12bRT1 hin zu (Abb. 47, I und II).

Der Nachweis des Proteins mittels indirekter Immunfluoreszenz zeigte mMMP-13 teils in zellulärer Lokalisation, teils nach Sezernierung des Enzyms durch die produzierende Zelle an die extrazelluläre Matrix gebunden vorliegend. Wie es sich bereits auf RNA-Ebene angedeutet hatte, war auch hier ein stärkeres Signal im Stroma der hochgradig malignen, invasiven A-5G12bRT1 Zellen zu finden. In Immunfluoreszenzen für mMMP-13 wurde auch das (humane) Tumorgewebe angefärbt, und zwar in ähnlicher Intensität, wie es für hMMP-13 gezeigt werden konnte (Abb. 42). Dabei war unklar, ob es sich um eine unspezifische Reaktion handelt, oder ob der Antikörper gegen murines MMP-13 auch das humane Homolog erkennt (Abb. 47, III). Um diese Frage zu klären, müssen weitere Versuche zur Spezifität des Antikörpers durchgeführt werden, wie z.B. eine Immunfluoreszenz-Färbung an Gefrierpräparaten humaner Haut.

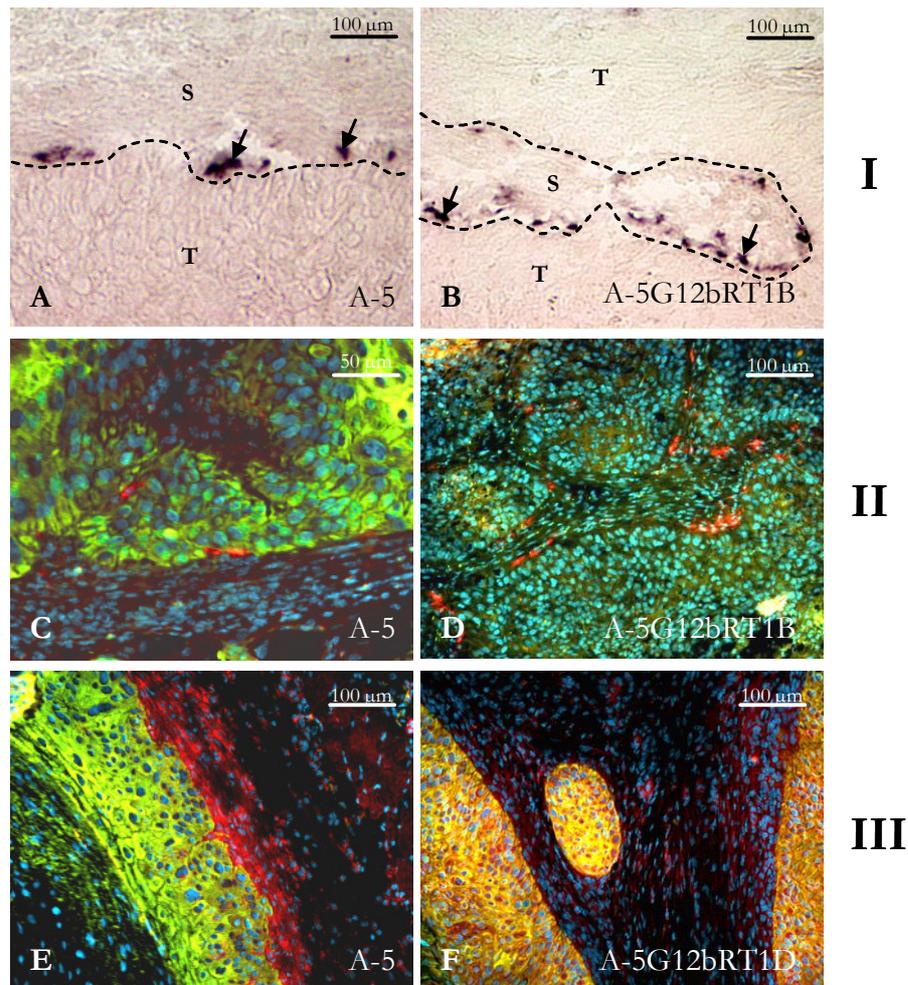


Abb. 47: Nachweis von mMMP-13 in Subkutantumoren: I. *In Situ* Hybridisierung an A-5 (A) und A-5G12bRT1B (B); II. *In Situ*-Hybridisierung mit rot fluoreszierendem Substrat und Keratin-Gegenfärbung (grün) an A-5 (C) und A-5G12bRT1B (D); III. Nachweis von mMMP-13 Protein mit indirekter Immunfluoreszenz an A-5 (E) und A-5G12bRT1D (F). mMMP-13 ist rot dargestellt, Keratinozyten sind mit einem pan-spezifischen Keratin-Antikörper grün angefärbt und Zellkerne sind blau markiert. Pfeile: Signal für mMMP-13 mRNA.

Die Kinetik der Expression bzw. Sekretion von mMMP-13 wurde an Oberflächen-Transplantationen der verschiedenen Zelllinien über einen Zeitraum von 6 Wochen untersucht. In allen Transplantationen wurde, wie auch schon in den Subkutantumoren beobachtet, das Tumorepithel durch den Antikörper für mMMP-13 stark angefärbt.

In Transplantationen der benignen A-5 Zellen konnte ab der dritten Woche eine zunehmende Infiltration des Gels von mMMP-13 positiven Zellen beobachtet werden, und auch diffus verteiltes mMMP-13 ohne zelluläre Lokalisation war vermehrt zu sehen. Bei den Zelllinien A-5G12b und A-5GM6 konnte bereits ab der 2. Woche eine zunehmende Infiltration des Gels von mMMP-13 positiven Zellen nachgewiesen werden, wobei das Signal bei der Zelllinie A-5GM6 deutlich schwächer war. Nach 3 Wochen konnte eine Ablagerung von MMP-13 unterhalb des Tumorepithels der A-5GM6 Zellen, jedoch nicht unterhalb des Epithels der G-CSF exprimierenden Zellen, festgestellt werden. In Transplantaten der hochmalignen A-5G12bRT1D Zellen begann bereits nach 4 Tagen eine der Invasion der Tumorzellen

vorangehende Deposition von mMMP-13 an den invasiven Rändern des Tumors, und nach 14 Tagen war das Gel vollständig mit zahlreichen mMMP-13 positiven Zellen durchsetzt (Abb. 48).

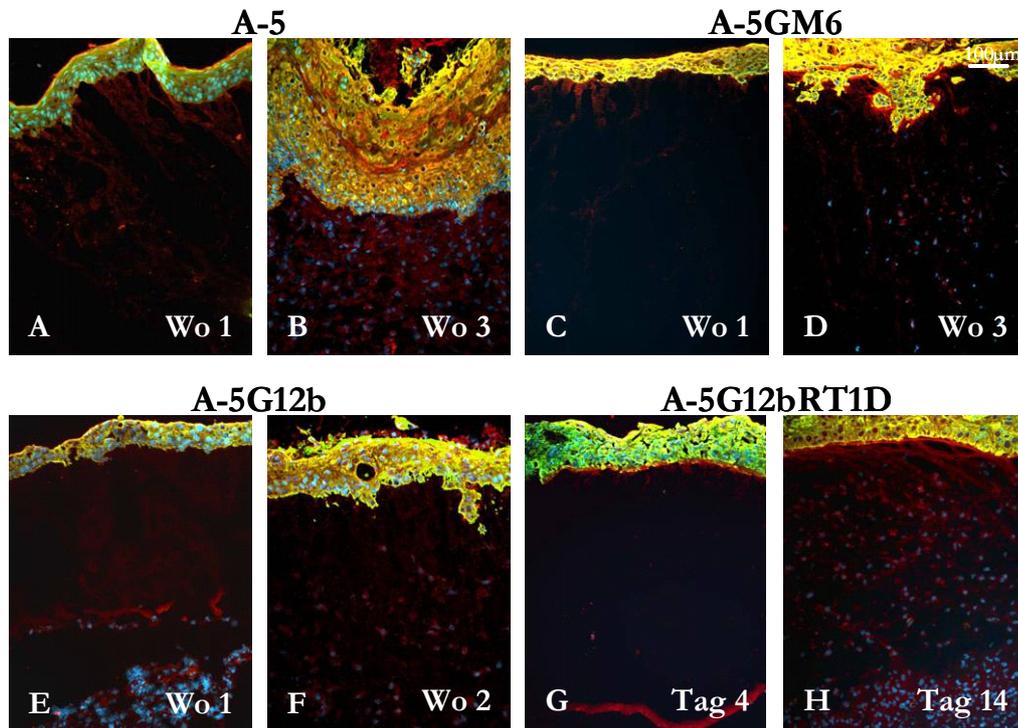


Abb. 48: Zeitverlauf der Expression von mMMP-13 Protein in Transplantationen von A-5 (A, B), A-5GM6 (C, D), A-5G12b (E, F) und A-5G12bRT1D (G, H). mMMP-13 ist rot dargestellt, Keratinozyten sind mit einem pan-spezifischen Antikörper grün markiert und die Zellkerne sind mit dem DNA-Farbstoff Höchst blau gefärbt.

Eine Ko-Lokalisation von mMMP-13 mit Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten konnte nicht festgestellt werden (Abb. 49). Da die Sekretion von mMMP-13 durch Fibroblasten beschrieben wurde (Polette *et al.* 2004), wäre eine Untersuchung dieser Zellen sinnvoll; jedoch ist es aufgrund des Mangels an geeigneten Antikörpern sehr schwierig, diesen Zelltyp eindeutig zu identifizieren.

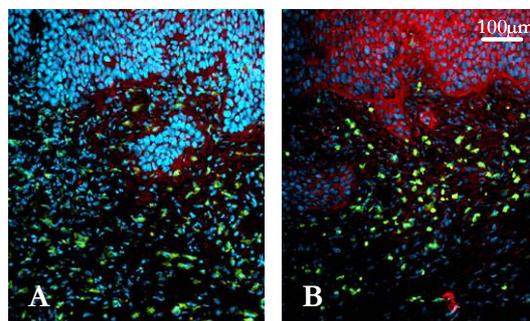


Abb. 49: Darstellung von mMMP-13 Protein mit Gegenfärbung für Makrophagen (A) oder Granulozyten (B), gezeigt an einer Transplantation von A-5G12bRT1D, Tag 18. mMMP-13 ist rot markiert, Makrophagen oder Granulozyten sind grün und Zellkerne blau gefärbt.

Ein Vergleich der Kinetiken in der Expression der stromalen Matrix Metalloproteinasen in den verschiedenen Zelllinien ergab ein anfänglich starkes Signal der Proteinasen am unteren Rand des Kollagengels, gefolgt von der Infiltration MMP-positiver Zellen in das Kollagengel und in mehreren Präparaten eine der Tumordinvasion vorangehende Anlagerung der Matrix Metalloproteinasen an die extrazelluläre Matrix unterhalb des Epithels. Diese Vorgänge waren in den mit G-CSF oder GM-CSF transfizierten Zellen im Vergleich zu den A-5 Zellen beschleunigt und traten in den *in vivo* passagierten Zellen sogar noch früher auf.

4.5 Mechanismen des Effekts von GM-CSF auf Tumor und Stroma

Die Wirkung von G-CSF und GM-CSF auf Tumor und Stroma kann entweder direkt oder auch indirekt über die Induktion anderer Faktoren erfolgen, die dann ihrerseits auf Tumor und/oder Stroma wirken. Dabei kann es sich sowohl um Matrix Metalloproteinasen als auch um andere Cytokine handeln.

4.5.1 Expression von IL-6 induziert durch GM-CSF?

Eine Überexpression von GM-CSF und IL-6 durch konstitutive Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B in Plattenepithelkarzinomen *in vitro* und *in vivo* wurde bereits in früheren Veröffentlichungen beschrieben. Auch in Zelllinien sowie Primärkulturen und histologischen Präparaten von Plattenepithelkarzinomen wurde eine Ko-Expression von GM-CSF und IL-6 gezeigt (Ondrey *et al.* 1999; Chen *et al.* 1999). Darüber hinaus konnte eine Korrelation zwischen der Expression von IL-6 in ösophagealen Plattenepithelkarzinomen und der Invasion der Tumore sowie einem erhöhten Metastasierungspotential nachgewiesen werden. *In vitro* Versuche zur Stimulation von Plattenepithelkarzinomen mit IL-6 demonstrierten eine verstärkte Infiltration der Zellen in einem Modell für extrazelluläre Matrix *in vitro* (Nishino *et al.* 1998).

Daher stellte sich die Frage, ob in Tumoren, die nach *in vivo* Progression eine *de novo* Expression von GM-CSF aufweisen, ebenfalls eine Neu-Expression von IL-6 nachzuweisen ist.

PCR-Analysen zeigten eine schwache Expression von IL-6 in den parentalen A-5 Zellen sowie den kontroll-transfizierten A-5Z12 Zellen und den mit G-CSF oder GM-CSF transfizierten Zelllinien. In den durch *in vivo* Passage von A-5G12b bzw. A-5 Zellen entstandenen Zelllinien (A-5G12bRT1 und A-5G12bRT2 bzw. A-5RT1 und A-5RT3) jedoch konnte ein deutlich stärkeres Signal nachgewiesen werden, mit Ausnahme der Zelllinie A-5G12bRT1D, in der das RNA-Signal sehr schwach war (Abb. 50).

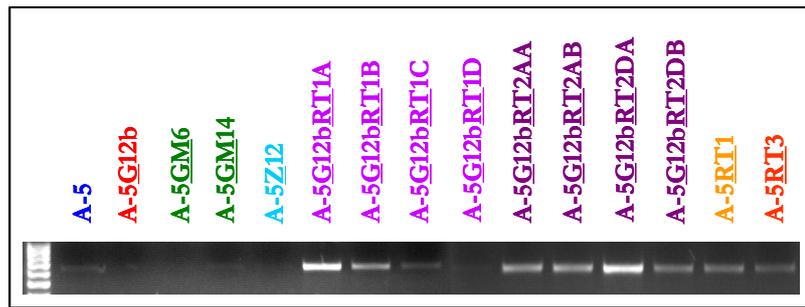


Abb. 50: Nachweis der RNA von Interleukin-6 in Zellkulturen.

Vorläufige Untersuchungen der Zellkulturüberstände im ELISA ergaben eine Grundexpression von IL-6 in allen Zellen von bis zu 10pg/ml. In der mit GM-CSF transfizierten Zelllinie A-5GM14 wurde eine Sekretion von 17pg/ml IL-6 nachgewiesen. In den durch *in vivo* Passage entstandenen Zellen konnte eine sehr starke Sekretion von IL-6 von 20-50pg/ml bei G12bRT1, von 60-170pg/ml bei G12bRT2 und 60pg/ml bzw. 100pg/ml bei A-5RT1 oder A-5RT3 nachgewiesen werden. Zudem konnte in den kontroll-transfizierten A-5Z12 Zellen nach Stimulation mit 50ng/ml bzw. 100ng/ml GM-CSF eine vermehrte Sekretion von IL-6 von 40-60pg/ml gezeigt werden (Abb. 51).

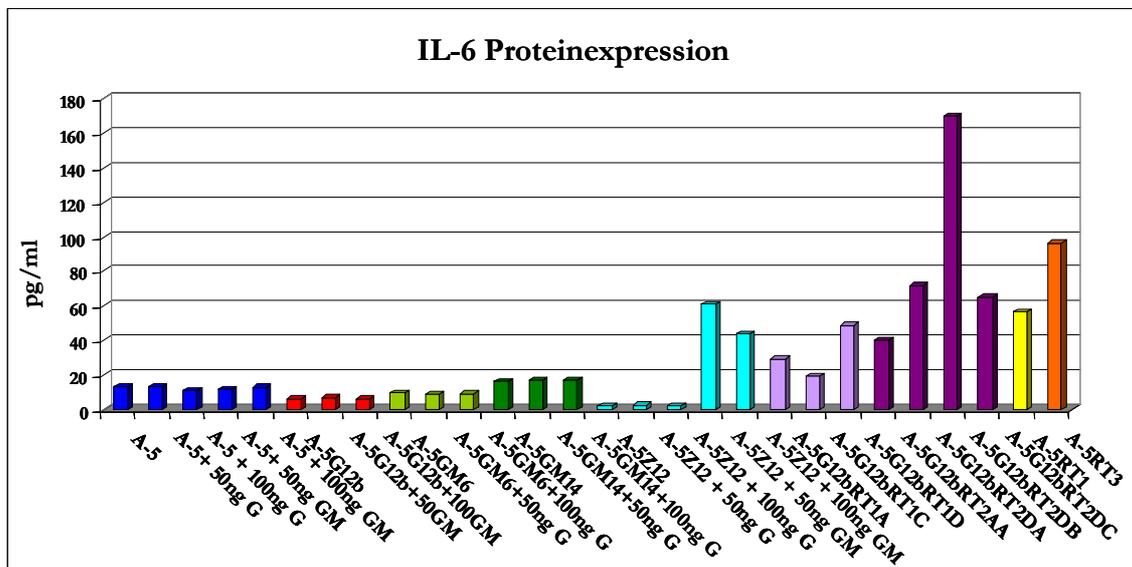


Abb. 51: Nachweis der Proteinexpression von IL-6 in Zellkulturüberständen mittels ELISA.

Diese vorläufigen Daten gaben Anlass, den Zusammenhang zwischen der *de novo* Expression von GM-CSF und der *de novo* Expression von IL-6 näher zu untersuchen. Insbesondere war hierbei zu klären, ob eine Induktion der IL-6 Expression durch GM-CSF initiiert wird, oder aber ob beide Faktoren zusammen über einen anderen Weg reguliert werden. Dieser Ansatz wurde in der Bachelor-Arbeit von S. Schnur weiterverfolgt (Schnur 2004). Dabei wurde die in der vorliegenden Dissertation nachgewiesene verstärkte Expression von IL-6 nach *in vivo* Progression der Tumorzellen bestätigt. Zur weiteren Untersuchung wurden benigne HaCaT-*ras* A-5 Zellen mit

der cDNA von IL-6 transfiziert, was in einer verstärkten Tumorzell-Proliferation und Invasion in einem 3-D organotypischen Hautkulturmodell *in vitro* und in verstärkt malignem Tumorwachstum in Subkutantumoren *in vivo* resultierte (Schnur 2004). Weiterführende Untersuchungen zur Auswirkung der Expression von IL-6 im Tumor auf die Tumor-Stroma Interaktionen stehen noch aus.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass G-CSF und GM-CSF neben der autokrinen Stimulation von Proliferation und Migration der Tumorzellen auch einen deutlichen parakrinen Effekt auf das Tumor-Stroma ausüben. So resultierte die Expression von G-CSF in schnellem und invasivem Tumorwachstum, welches in den hochmalignen G-CSF und GM-CSF ko-exprimierenden Tumoren noch beschleunigt war. Dagegen wiesen GM-CSF exprimierende Zellen nur ein transientes Tumorwachstum auf. Die Injektion von Gemischen aus G-CSF und GM-CSF exprimierenden Zellen zeigten eine frühere Häufung der Tumorbildung in Abhängigkeit von der Höhe der GM-CSF Produktion der eingesetzten Zelllinie.

Analysen der Kinetik der Tumor-Stroma Interaktionen ergaben eine permanente und deutlich stärkere und schnellere Angiogenese in Folge der Expression von G-CSF in den Tumoren, während GM-CSF exprimierende Tumore sowie Faktor negative Zellen nur eine transiente Angiogenese zeigten.

Alle transfizierten Zelllinien wiesen eine beschleunigte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Tumorumgebung auf. Diese war bei GM-CSF exprimierenden Zellen transient, während G-CSF exprimierende und G-CSF und GM-CSF ko-exprimierende Zellen eine permanente Rekrutierung zeigten.

GM-CSF exprimierende und G-CSF und GM-CSF ko-exprimierende Zellen zeigten eine deutlich beschleunigte Kinetik der Makrophagen-Rekrutierung. Die frühe Gegenwart von Makrophagen ohne die Präsenz von Granulozyten in Transplantaten der GM-CSF positiven Zellen zu diesem Zeitpunkt deutet im Zusammenhang mit der sehr unregelmäßigen und blasigen Epithelbildung und dem nur transienten Tumorwachstum dieser Zellen nach subkutaner Injektion auf eine durch Makrophagen ausgeübte frühe Anti-Tumor Immunität hin.

Darüber hinaus konnte eine mit zunehmender Malignität der untersuchten Zellen ansteigende Expression von MMP-2 in Tumoren, von MMP-13 in Tumor und Stroma und von MMP-3 und MMP-9 im Tumor-Stroma in direkter Nähe zum Tumor festgestellt werden. Dabei zeigten die Proteasen eine der Tumor-Invasion vorangehende Deposition am Rand invasiver Bereiche des Tumors. Ein Teil der stromalen (murinen) MMP-9 positiven Zellen konnte als neutrophile Granulozyten identifiziert werden.

Weiterführende Untersuchungen ergaben die Induktion von IL-6 in Tumorzellen durch GM-CSF, dessen Expression wiederum durch IL-6 verstärkt wird.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Ko-Expression von G-CSF, GM-CSF und ihren Rezeptoren in humanen Plattenepithelkarzinomen der Haut über autokrine und parakrine Mechanismen wesentlich zur Tumorprogression zu einem hochmalignen Tumor-Phänotyp beiträgt.

5 Diskussion

Die Entstehung vieler Tumore ist durch die langsame Veränderung anfänglich normaler Zellen über mehrere Progressionsstufen bis hin zu malignen Tumoren charakterisiert. Während der Tumorprogression treten Veränderungen im Wachstumsverhalten des Tumors und auch in den Interaktionen zwischen Tumor und Stroma auf, die häufig mit einer veränderten Expression von Wachstumsfaktoren und/oder deren Rezeptoren korreliert sind. Im HaCaT-Modell für den Mehrstufenprozess der Karzinogenese humaner Haut konnte in unserem Labor unabhängig von der Art der vorangegangenen tumorigenen Konversion eine mit der Tumorprogression zu einem verstärkt malignen Tumorphänotyp assoziierte *de novo* Expression der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF bei gleichzeitiger Expression der entsprechenden Rezeptoren nachgewiesen werden. Diese resultierte in einer autokrinen Stimulation von Proliferation und Migration der Zellen *in vitro* sowie aggressivem Tumorwachstum *in vivo* (Mueller & Fusenig 1999; Mueller *et al.* 2001). Auch in einer Vielzahl anderer Tumore wie z.B. Plattenepithelkarzinomen von Ovar und Zunge, Gliomen, Meningiomen, Osteosarkomen und Kopf-Hals-Tumoren konnte eine solche *de novo* Expression von G-CSF und GM-CSF bei gleichzeitiger Expression der Rezeptoren gezeigt werden (Horii *et al.* 1997; Mueller *et al.* 1999; Rochet *et al.* 1999; Wislez *et al.* 2001; Savarese *et al.* 2001, Gutschalk *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

Um den funktionalen Beitrag der einzelnen Faktoren zur Tumorprogression aufzuklären, wurden benigne HaCaT-*ras* A-5 Zellen, die zwar die Rezeptoren für G-CSF und GM-CSF exprimieren, nicht jedoch die Faktoren selbst, mit G-CSF oder GM-CSF transfiziert. Das Wachstumsverhalten dieser transfizierten Tumorzellen und ihre Interaktion mit dem Tumor-Stroma wurden *in vitro* und *in vivo* untersucht.

5.1 Effekte von G-CSF und GM-CSF auf Tumorzellen *in vitro*

In früheren Versuchen mit Zellen, die nach *in vivo* Progression G-CSF und GM-CSF neu exprimierten, konnte eine autokrine Regulation von Proliferation und Migration der Zellen durch beide Faktoren *in vitro* nachgewiesen werden. Eine vergleichbare autokrine Regulation der Proliferation und Migration ließ sich auch bei der Analyse der mit G-CSF (A-5G12b, A-5G16a) oder mit GM-CSF (A-5GM6, A-5GM14) transfizierten Zellen *in vitro* zeigen. In organotypischen 3-D-Haut-Äquivalentkulturen wiesen diese transfizierten Zellen eine erhöhte Proliferation und verstärkte Infiltration in das Kollagengel auf. Interessanterweise konnte im Gegensatz zu den *in vitro* Versuchen im 3-D-System in 2-D-Zellkulturen kein Unterschied im Wachstums- und Migrationsverhalten zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen festgestellt werden. Erst

nach Zugabe von exogenem G-CSF oder GM-CSF erfolgte eine Stimulation von Proliferation und Migration sowohl der transfizierten als auch der untransfizierten Zellen, wobei sich die Migration der Transfektanten auch durch entsprechende blockierende Antikörper hemmen ließ. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass die dreidimensionalen organotypischen Kulturen der *in vivo* Situation näher kommen als zweidimensionale Zellkulturen und daher in der organotypischen Kultur Umgebungs spezifische Einflüsse wie Matrix-Adhäsion oder das Wachstum als dreidimensional geschichtetes Epithel die Wirkung der Faktoren erst deutlich werden lassen. Die Eigenproduktion von G-CSF und GM-CSF in den durch *in vivo* Progression von A-5 Zellen entstandenen Zelllinien sowie den transfizierten Zelllinien liegt bei 100-300pg/ml, während für eine sichtbare Stimulation in Zellkulturen 50-200ng/ml Faktor notwendig waren. Offenbar sind die Bedingungen in 2-D Zellkulturen den Bedingungen *in vivo* sehr unähnlich, so dass eigentlich unphysiologische Mengen an Wachstumsfaktoren zum Erreichen einer Stimulation notwendig sind, während in 3-D organotypischen Kulturen mit und ohne Fibroblasten die von den Zellen selber produzierten Faktormengen ausreichend sind, um einen deutlichen Effekt zu erzielen.

Diese autokrine Stimulation der Zellen könnte auch *in vivo* eine Rolle spielen, und zwar durch die Förderung der Tumorprogression über eine verstärkte Proliferation und Migration der Zellen und somit die Förderung von Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung (Takeda *et al.* 1991; Young *et al.* 1997; Mann *et al.* 2001a; Mann *et al.* 2001b).

5.2 Einfluss von G-CSF und GM-CSF auf Tumorwachstum und – Progression in vivo

Durch Transfektion der benignen A-5 Zellen mit G-CSF oder GM-CSF gelang es, den funktionellen Beitrag der einzelnen Faktoren zur Tumorprogression *in vivo* zu demonstrieren. Dies erfolgte über die Untersuchung von Parametern wie Tumorwachstum und Invasion, Stimulation der Angiogenese, Rekrutierung inflammatorischer Zellen und Expression von Matrix degradierenden Enzymen durch Tumor und Stroma sowohl in Subkutantumoren als auch in Oberflächentransplantaten. Subkutane Injektion der verschiedenen Zelllinien zeigte ein sehr unterschiedliches Wachstumsverhalten der Tumore in Abhängigkeit von der Faktorexpression der injizierten Zellen. Injektion der parentalen, Faktor negativen Zellen, der kontroll-transfizierten Zellen sowie der mit GM-CSF transfizierten Zellen resultierte in einem Zeitraum von 4 Monaten in langsam wachsenden, benignen Zysten, die bei Tumoren der mit GM-CSF transfizierten Zellen initial verstärkt wuchsen und sich dann wieder zurückbildeten. In Subkutantumoren der Faktor negativen Zellen konnte nur eine geringe Proliferation der Tumorzellen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu bildeten die mit G-CSF transfizierten Zellen

gut vaskularisierte, invasive Tumore mit einer ausgeprägten Proliferation in der Peripherie des Tumors nach einer Latenzzeit von 50-70 Tagen. Diese durch G-CSF induzierte Stimulation des Tumorwachstums stimmt überein mit Studien, die ein verstärktes Wachstum von Subkutantumoren nach intraperitonealer Applikation von G-CSF beschrieben (Segawa *et al.* 1991) sowie klinischen Studien, die eine höhere Rückfallrate und schlechtere Prognose für den Patienten bei Ko-Expression des G-CSF Rezeptors und des GM-CSF Rezeptors in oralen, mesopharyngealen und Haut-Plattenepithelkarzinomen nachwiesen (Tsuzuki *et al.* 1998; Hirai *et al.* 2001). Mischinjektionen der G-CSF transfizierten Zellen zusammen mit Faktor negativen parentalen Zellen oder mit GM-CSF transfizierten Zellen zeigten eine vergleichbare Latenzzeit wie Tumore aus der Zelllinie A-5G12b allein. Dagegen ergab die Ko-Injektion der G-CSF transfizierten Zellen A-5G12b zusammen mit der stark GM-CSF exprimierenden Zelllinie A-5GM6 eine frühere Häufung der Tumorzinzidenz. Diese Resultate lassen auf eine dosisabhängige Kooperation von G-CSF und GM-CSF im Tumorwachstum schließen, und diese Schlussfolgerung wurde durch die nachfolgenden Versuche an den durch *in vivo* Passage der G-CSF exprimierenden Zellen entstandenen Zelllinien konsolidiert. Nach *in vivo* Passage der G-CSF transfizierten Zellen konnte nämlich ein stark beschleunigtes und invasives Tumorwachstum beobachtet werden, welches mit einer konstitutiven *de novo* Expression von GM-CSF einherging. Die Befunde zeigen deutlich, dass ein additiver oder synergistischer Beitrag beider Faktoren zur Etablierung eines malignen Tumorphänotyps notwendig ist. Diese Vermutung wird durch Studien unterstützt, in denen eine *de novo* Expression beider Faktoren in hochgradig malignen Gliomen, Meningiomen, Kopf-Hals Tumoren und Plattenepithelkarzinomen der Haut nachgewiesen wurde (Mann *et al.* 1992; Tsukuda *et al.* 1993; Horii *et al.* 1997; Tsuzuki *et al.* 1998; Mueller *et al.* 1999; Ichiishi *et al.* 2000). Ein wichtiges Element in der Entwicklung und Progression eines Tumors sind die Interaktionen zwischen Tumor und Stromazellen. So können Tumorzellen die Bildung eines „Tumorstromas“ z.B. durch die veränderte Expression von Wachstumsfaktoren oder die Induktion von Wachstumsfaktor-Rezeptoren im stromalen Kompartiment beeinflussen. Die Veränderungen in der Bildung eines aktivierten Tumor-Stromas beinhalten eine verstärkte Angiogenese, eine veränderte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, die Rekrutierung inflammatorischer Zellen sowie eine veränderte Protease-Aktivität und spielen eine wichtige Rolle in Tumorwachstum und Invasion (Mueller & Fusenig 2002).

Zur Induktion eines aktivierten Tumorstromas durch Tumorzellen und dessen zellulärer Zusammensetzung wurden aufgrund des Mangels an geeigneten experimentellen Modellen bisher nur wenige Studien durchgeführt. Das in unserem Labor entwickelte Oberflächen-Transplantationsmodell jedoch erlaubt die Untersuchung des zeitlichen Ablaufs der

Veränderungen des Tumorstromas bereits in sehr frühen Stadien der Tumorentwicklung. Aufgrund der durch ein Kollagengel vermittelten initialen Trennung der Tumorzellen vom Wirtsgewebe erlaubt dieses Modell die Beobachtung früher Interaktionen und insbesondere den Vergleich der Stroma-Induktion in Reaktion auf die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren im Tumorepithel. In diesem Oberflächen-Transplantationsmodell bildeten benigne Keratinozyten ein gut differenziertes Oberflächenepithel ohne Anzeichen invasiven Wachstums, während mit G-CSF transfizierte oder durch *in vivo* Passage der G-CSF Transfektanten entstandene Zellen schnell wachsende, wenig strukturierte Epithelien ausbildeten und invasiv in das neu gebildete Stroma einwuchsen. Die mit GM-CSF transfizierten Zellen dagegen zeigten ein anderes Wachstumsverhalten: in Oberflächentransplantaten bildeten sie unregelmäßige, löchrige Epithelien, und in Subkutantumoren zeigten sie nur ein transientes Tumorstadium. Eine mögliche Erklärung für dieses Wachstumsverhalten liegt in der sehr frühen Rekrutierung von Makrophagen zu diesen Tumoren (siehe: 5.3.2.2). Weitere Untersuchungen der mit G-CSF oder GM-CSF transfizierten Keratinozyten bzw. der durch *in vivo* Passage der G-CSF transfizierten Zellen entstandenen Zelllinien ergaben neben einem sehr unterschiedlichen epithelialen Wachstumsverhalten der Zellen zudem auch unterschiedliche Einflüsse der verschiedenen Tumorzellen in der Aktivierung des Tumor-Stromas.

5.3 Durch G-CSF und GM-CSF induzierte stromale Veränderungen

Interessanterweise ist es die Tumorumgebung *in vivo*, die einen Selektionsdruck hin zu einem vermehrt malignen Tumorphänotyp mit Ko-Expression von G-CSF und GM-CSF ausübt (Mueller *et al.* 2001; Obermueller *et al.* 2004 und diese Dissertation). Diese Selektion verstärkt tumorigener Zellen erfolgt vermutlich durch die Exposition der Zellen mit zellschädigenden Bedingungen, wie z.B. Hypoxie, niedrigem pH-Wert und Nährstoffmangel. In diesem Zusammenhang könnte die durch Hypoxie induzierte Expression von IL-1 α und IL-6 der ursprüngliche Auslöser der Expression von G-CSF und GM-CSF in den Tumorzellen gewesen sein (Liu *et al.* 2000), und diese Aktivierung könnte durch die mutagenen Einflüsse eines hypoxischen Tumorstromas mit erniedrigtem pH letztendlich konstitutiv geworden sein (Yuan & Glazer 1998; Harris & Thorgeirsson 1998; Yuan *et al.* 2000).

5.3.1 Angiogenese

Ein sehr wichtiger Beitrag des Tumorstromas zum schnellen Tumorstadium ist die Ausbildung neuer Blutgefäße, um die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen und den Abtransport von Stoffwechselmetaboliten zu gewährleisten (Harris & Thorgeirsson 1998). Im normalen adulten Organismus ist die Angiogenese auf wenige Prozesse wie den Menstruationszyklus und die Wundheilung beschränkt, während bei zahlreichen pathologischen

Veränderungen wie diabetischer Retinopathie, rheumatoider Arthritis, Psoriasis, Hämangiomen und der Entwicklung von Tumoren eine verstärkte Angiogenese beobachtet wird. Der Prozess der Ausbildung neuer Blutgefäße aus der bestehenden Vaskulatur beinhaltet die Migration, Proliferation und Differenzierung vaskulärer Endothelzellen, gefolgt von der Bildung einer neuen Basalmembran, der Rekrutierung akzessorischer Zellen und der Deposition einer extrazellulären Matrix zur morphologischen und phänotypischen Stabilisierung des neuen Blutgefäßes. Dabei finden in der Tumor-Angiogenese und der Wundheilung sehr ähnliche Ereignisse statt, weshalb Dvorak 1986 postulierte, ein Tumor verhalte sich wie eine Wunde, die niemals heilt (Dvorak 1986); eine Theorie, die mittlerweile durch verschiedene Studien zu diesem Thema konsolidiert wurde (Yeo *et al.* 1991; Mueller & Fusenig 2002). In der Wundheilung dient die Angiogenese der Wiederherstellung der vaskulären Perfusion im beschädigten Gewebe und begünstigt die Einwanderung inflammatorischer Leukozyten wie Makrophagen und Granulozyten, die in der Wundheilung eine wichtige Rolle spielen. In pathologischen Veränderungen dagegen ist die Angiogenese oft ein zentrales Ereignis im Fortschreiten der Erkrankung, wie zum Beispiel in der Ausbildung maligner Tumore. Die Tumor-Angiogenese wird induziert durch eine erhöhte Sekretion angiogener Faktoren. Vor allem in hypoxischen Arealen des Tumorzentrums ist die Expression angiogener Faktoren zur Verbesserung der Versorgungslage sehr stark (Coussens *et al.* 1999; Pollard 2004). Daneben spielen auch die Sekretion angiogener Faktoren durch Endothel- und stromale Zellen und insbesondere durch Makrophagen (Ono *et al.* 1999; Crowther *et al.* 2001; Pollard 2004) sowie die Generation angiogen und auch anti-angiogen wirkender Fragmente der extrazellulären Matrix durch von Tumor und Stroma gebildete Matrix Metalloproteinasen eine wichtige Rolle in der Regulation der Tumor-Angiogenese (Bergers & Coussens 2000; Lynch & Matrisian 2002; Heissig *et al.* 2003; Polette *et al.* 2004). Die Blutgefäße sind jedoch in Tumoren häufig unorganisiert, unvollständig und von atypischer Struktur, so dass sie leicht durch austretende Leukozyten blockiert oder vom Tumor komprimiert werden, wodurch erneut Hypoxie auftreten kann (Yuan & Glazer 1998; Burke *et al.* 2002).

Der Wechsel vom avaskulären Tumor zu einem angiogenen Tumorphänotyp („angiogenic switch“) erfolgt während des Übergangs von der Hyperplasie zur Neoplasie (Folkman *et al.* 1989; Hanahan & Folkman 1996; Strieth *et al.* 2000) und geht einer Invasion der Tumorzellen in das umliegende Gewebe voraus. Damit ist die Etablierung eines angiogenen Phänotyps ein Schlüsselereignis in der Tumorprogression zum malignen Tumor. Erst die Vaskularisierung eines Tumors erlaubt die Metastasierung der Tumorzellen, wobei das Wachstum der Metastasen wiederum von einer Neovaskularisierung abhängig ist (Dvorak 1986; Folkman 1995; Harris & Thorgeirsson 1998, zur Übersicht siehe Fidler & Ellis 1994). Zudem ist die Transportfunktion der Blutgefäße wichtig für Überleben und Proliferation der Tumorzellen (Monschke *et al.* 1991;

Porschen *et al.* 1994; O'Reilly *et al.* 1994). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass in Subkutantumoren der transfizierten und der parentalen Zellen eine verstärkte Proliferation der Tumorzellen in den Randbereichen der Tumorinseln in dichter Assoziation mit Kollagen IV, das unter anderem Bestandteil der Basalmembran von Blutgefäßen ist, beobachtet werden konnte. Die entscheidende Rolle der Angiogenese in Tumorentwicklung und Progression geht auch aus verschiedenen anderen Studien hervor, in denen eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Neovaskularisierung und einer schlechteren klinischen Prognose bei vielen soliden Tumoren wie Karzinomen von Brust (Weidner *et al.* 1992; Bosari *et al.* 1992; Weidner 1998; Massi *et al.* 2002; Ribatti *et al.* 2003), Cervix (Bremer *et al.* 1996; Obermair *et al.* 1998), Tumoren des Endometriums (Kirschner *et al.* 1996), astroglialen Hirntumoren (Leon *et al.* 1996), Tumoren von Darm (Takebayashi *et al.* 1996), Prostata (Weidner *et al.* 1993), Niere (Yoshino *et al.* 1995), Kopf und Hals (Dray *et al.* 1995), Zunge (Shpitzer *et al.* 1996) und Melanomen (Massi *et al.* 2002; Ribatti *et al.* 2003) nachgewiesen wurde. Auch in unserem Modell korrelierte die verstärkte Vaskularisierung der G-CSF und GM-CSF exprimierenden Tumore mit einem aggressiveren Tumor-Phänotyp.

Die parentalen sowie die GM-CSF transfizierten Zellen zeigten in Oberflächentransplantaten eine transiente Angiogenese nach 2-3 Wochen, während Transplantate der G-CSF transfizierten Zellen eine früher einsetzende (nach 1-2 Wochen) und zudem persistierende Angiogenese aufwiesen. Die Ko-Expression von G-CSF und GM-CSF nach *in vivo* Progression der Zellen resultierte bereits innerhalb einer Woche in einer noch stärkeren und ebenfalls permanenten Angiogenese. Dieser Befund stimmt überein mit Studien, in denen G-CSF und GM-CSF die Proliferation und Migration von Endothelzellen *in vitro* (Bussolino *et al.* 1993; Mueller & Fusenig 1999) sowie die Angiogenese *in vivo* (Sunderkotter *et al.* 1991; Bikfalvi & Han 1994; Ondrey *et al.* 1999; Mann *et al.* 2001a) induzierten. Interessanterweise ist die persistierende Angiogenese die Voraussetzung für die Etablierung eines invasiven Tumorphänotyps in den G-CSF transfizierten und den durch *in vivo* Passage der G-CSF transfizierten Zellen entstandenen G-CSF und GM-CSF ko-exprimierenden Zellen. Die Abhängigkeit zwischen Angiogenese und Tumordinvasion wurde bereits in früheren Arbeiten in unserem Labor u.a. bei den malignen HaCaT-ras A-5RT3 Tumorzellen beschrieben (Skobe *et al.* 1997; Vajkoczy *et al.* 2000; Mueller *et al.* 2001). Demnach tragen G-CSF und GM-CSF über die Stimulation der Angiogenese zur Vaskularisierung des wachsenden Tumors bei und fördern damit ein verstärktes Tumorstadium und Invasion und sowie Angiogenese *in vivo*.

Die Schlüsselrolle der Angiogenese und der Gefäßdichte in der Entwicklung eines malignen Tumorphänotyps ist mittlerweile etabliert, während deutlich weniger über den Beitrag des von

den Tumorzellen induzierten Stromas mit seinen inflammatorischen Zellen zur Tumorprogression bekannt ist.

5.3.2 Inflammatorische Zellen

Ein weiterer Beitrag von G-CSF und GM-CSF zur Etablierung eines aktivierten und permissiven Tumorstromas ist die verstärkte Rekrutierung von Leukozyten in die Tumorumgebung und der Einfluss dieser Faktoren auf die Proliferation, Reifung und funktionelle Aktivität von Granulozyten und Makrophagen. Die grundlegende Bedeutung inflammatorischer Zellen als treibende Kräfte in der Entwicklung und Progression von Tumoren wurde erst kürzlich erkannt (Coussens & Werb 2001; Baskic *et al.* 2001; Pollard 2004). Inflammatorische Zellen potenzieren die neoplastische Progression über parakrine Faktoren, die für die Tumorentwicklung ebenso wichtig sind wie Onkogene und Tumorsuppressorgene. Inflammatorische Zellen können zur Tumorprogression durch die Ausschüttung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Verbindungen, deren eigentliches Ziel die Bekämpfung von Infektionen ist beitragen, da diese Substanzen DNA-Schädigungen in proliferierenden Zellen hervorrufen können. So kann die wiederholte und dauerhafte Exposition mit diesen Substanzen permanente genomische Veränderungen in zuvor normalen Zellen hervorrufen, deren Akkumulation die maligne Konversion der Zellen initiiert und fördert (Yuan & Glazer 1998). Darüber hinaus produzieren Tumor assoziierte inflammatorische Zellen eine Vielzahl von Cytokinen wie TNF- α (Tumor Nekrose Faktor- α), Interleukine, Interferone und angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF (Vaskulärer Endothel Wachstumsfaktor) und bFGF (basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor) (Pollard 2004). Zwei sehr wichtige Tumor assoziierte inflammatorische Zelltypen sind Makrophagen und Granulozyten, die ihre Rekrutierung zum Tumor wechselseitig induzieren können (Pekarek *et al.* 1995; Chen *et al.* 2002; von Stebut *et al.* 2003).

5.3.2.1 Granulozyten

Die Rolle der Granulozyten in der Entwicklung und Progression von Tumoren wird kontrovers diskutiert. Granulozyten spielen eine Schlüsselrolle in der Cytokin induzierten Tumorabstoßung, oft in Kooperation mit cytotoxischen T-Zellen, und in klinischen Studien war eine starke Granulozyten-Infiltration zum Teil mit einer positiveren Prognose für die Patienten korreliert (Di Carlo *et al.* 2001; Dranoff 2003). Die zum Tumor rekrutierten Granulozyten produzieren verschiedene cytotoxische Mediatoren, reaktive Sauerstoffverbindungen, Proteasen, membran-perforierende Substanzen und lösliche Faktoren zur Tötung der Zellen wie TNF- α , IL-1 β und Interferone (Di Carlo *et al.* 2001; Dranoff 2003). Andererseits jedoch weisen im Blutstrom zirkulierende Granulozyten in Tumorpatienten häufig eine erniedrigte cytotoxische Aktivität auf.

Zudem können neutrophile Granulozyten ihre Mikroumgebung durch die Sekretion löslicher chemotaktischer Faktoren und Proteasen modulieren und so eine Tumor fördernde Wirkung ausüben (Pekarek *et al.* 1995; Coussens *et al.* 2000; Coussens & Werb 2001); so wurde z.B. eine durch G-CSF induzierte Expression von Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) in Granulozyten beschrieben, wodurch die Degradation der extrazellulären Matrix des Tumor-Stromas und somit Tumorinvasion und Angiogenese ermöglicht wird (Pugin *et al.* 1999). G-CSF und GM-CSF verstärken beide die Rekrutierung von Granulozyten in die Tumorumgebung. In dieser Arbeit konnte eine transiente Rekrutierung von Granulozyten bei faktornegativen Zellen nach 2 Wochen und bei GM-CSF exprimierenden Zellen bereits nach 1 Woche gezeigt werden, während die G-CSF exprimierenden Zellen eine permanente Granulozyten-Rekrutierung beginnend nach 2 Wochen aufwiesen. Durch *in vivo* Passage der G-CSF transfizierten Zellen war diese permanente Granulozyten-Rekrutierung nach Transplantation der nun G-CSF und GM-CSF ko-exprimierenden Zellen sogar noch ausgeprägter und fand innerhalb der ersten Woche statt. Die Ergebnisse aus unseren Studien an Subkutantumoren und in Oberflächentransplantaten weisen deutlich auf eine Tumor fördernde Rolle der Granulozyten hin, da keinerlei Anzeichen einer Anti-Tumor Reaktion zu beobachten waren. Im Gegenteil war die permanente und massive Rekrutierung von Granulozyten mit besonders aggressiven und schnell wachsenden Tumoren korreliert, was deutlich für eine Tumor fördernde Funktion der Granulozyten in diesem System spricht. Diese Beobachtung wird durch eine Studie untermauert, in der das Tumorstadium durch Eliminierung der Granulozyten unterdrückt werden konnte (Pekarek *et al.* 1995).

5.3.2.2 Makrophagen

Auch die Rolle der Makrophagen in Wachstum und Progression von Tumoren wird widersprüchlich diskutiert. Obwohl Makrophagen Zytotoxizität vermitteln können und in der Anti-Tumor-Immunität impliziert wurden (Bernasconi *et al.* 1995; Bretscher *et al.* 2000; Balkwill & Mantovani 2001; Coussens & Werb 2002), können Tumorzellen Mechanismen entwickeln, diesen Aktivitäten der Tumor assoziierten Makrophagen zu entkommen und sogar davon zu profitieren (Wahl & Kleinman 1998; Baskic *et al.* 2001; Coussens & Werb 2002; Pollard 2004). Zudem konnte eine Korrelation zwischen der Infiltration des Tumors durch Makrophagen und der Tumorinvasion in Karzinomen der Brust, von Kopf und Hals, Prostata und in Melanomen nachgewiesen werden (Ono *et al.* 1999; Hagemann *et al.* 2004, zur Übersicht siehe Pollard 2004). Darüber hinaus ließ sich auch zwischen der Makrophageninfiltration und der Neovaskularisation und Gefäßdichte von Tumoren eine Korrelation feststellen (Ono *et al.* 1999; Torisu *et al.* 2000), wobei die Stärke der Infiltration wiederum mit der Expression von Chemokinen und Makrophagen-Wachstumsfaktoren durch den Tumor assoziiert war (Pollard 2004). In unseren

Untersuchungen modulierten G-CSF und GM-CSF die Tumor-Mikroumgebung durch eine verstärkte und frühere Rekrutierung von Makrophagen zum Tumor, wobei die Makrophagen-Rekrutierung bei GM-CSF exprimierenden Tumoren bereits innerhalb der ersten Woche stattfand, während diese bei den parentalen Zellen sowie den mit G-CSF transfizierten Zellen erst nach 2 Wochen zusammen mit der Rekrutierung der Granulozyten einsetzte. Unter Berücksichtigung der dualen Rolle der Makrophagen in der Etablierung eines Tumors lässt sich schlussfolgern, dass die frühe Rekrutierung von Makrophagen (nach nur einer Woche) zu den GM-CSF exprimierenden Tumorepithelien, die somit vor der Rekrutierung der Granulozyten stattfindet, einen zytotoxischen Anti-Tumor Effekt in diesem frühen Stadium des Tumorwachstums vermitteln könnte. Dies würde die im Vergleich zu den organotypischen Kulturen *in vitro* reduzierte Infiltration der Tumorzellen in den Oberflächentransplantationen sowie die Ausbildung eines dünnen, blasigen Epithels und das regressive Tumorwachstum bei Subkutantumoren erklären, denn nur *in vivo* sind Makrophagen vorhanden. Für viele von Tumoren sekretierte Faktoren wurde eine Reduktion der zytotoxischen Aktivität von Makrophagen beschrieben (Baskic *et al.* 2001; Pollard 2004). Darüber hinaus wirken Makrophagen stimulierend auf Tumorwachstum und Angiogenese, indem sie diese durch die Sekretion von Cytokinen und angiogenen Faktoren fördern, während ebenfalls von den Makrophagen produzierte Proteasen das umgebende Gewebe degradieren und somit die Expansion und Invasion von Tumoren sowie die zum Tumor hin gerichtete Angiogenese ermöglichen (Wahl *et al.* 1997; Joseph & Isaacs 1998; Baskic *et al.* 2001; Balkwill & Mantovani 2001; Crowther *et al.* 2001; Pollard 2004). So wurde kürzlich für Kopf-Hals Plattenepithelkarzinome beschrieben, dass Makrophagen über vom Tumor gebildetes MCP-1 (Monozyten Chemotaktisches Protein-1) und TGF- β 1 (Transformierender Wachstumsfaktor- β 1) rekrutiert und zur Sekretion angiogener Faktoren wie bFGF und VEGF sowie von Cytokinen wie TNF- α und IL-1 α angeregt werden. Diese Cytokine können in einer doppelt parakrinen Schleife in Tumorzellen die Produktion von IL-8 und VEGF induzieren, welche wiederum die Neovaskularisierung des Tumors fördern (Liss *et al.* 2001). Zudem sammeln sich Makrophagen in avaskulären Arealen von Tumoren (den so genannten „Hot-Spots“), wo Stressfaktoren wie Hypoxie und ein hoher Lactat-Spiegel die Makrophagen zur Ausübung ähnlicher pro-angiogener Funktionen wie in Wunden aktivieren (Crowther *et al.* 2001; Pollard 2004). Eine weitere wichtige Funktion inflammatorischer Zellen wie Granulozyten und Makrophagen ist die Sekretion von Matrix Metalloproteinasen, welche zudem auch von Tumorzellen sowie verschiedenen anderen Stromazellen gebildet werden können. Matrix Metalloproteinasen spielen eine wichtige Rolle in allen Stadien der Tumorprogression wie der Tumor induzierten Angiogenese, Invasion und Metastasierung durch die Zerstörung der lokalen Gewebestruktur, von Basalmembranen und

Zell-Zell Verbindungen und die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der extrazellulären Matrix (Coussens & Werb 1996).

In diesem Zusammenhang wäre die Einbindung von Makrophagen und anderen inflammatorischen Zellen in das *in vitro* System der haut-organotypischen Kulturen zur Untersuchung der genauen Rolle dieser Zellen im Tumorwachstum sehr interessant. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Granulozyten und Makrophagen in der Tumorumgebung die Möglichkeit haben, jede Phase des angiogenen Prozesses zu beeinflussen, einschließlich der Proliferation und Migration von Endothelzellen und der Degradation der extrazellulären Matrix (Joseph & Isaacs 1998), und daher die Tumordinvasion, Progression und Metastasierung direkt oder indirekt fördern können.

Die Ko-Expression von GM-CSF mit G-CSF oder einem anderen Wachstumsfaktor könnte notwendig sein, um die frühe Anti-Tumor-Immunität der Makrophagen zu überwinden, eine persistierende Angiogenese und Rekrutierung von Granulozyten zu induzieren und so die Etablierung eines hoch malignen Tumorphänotyps zu vermitteln. Ein möglicher Kandidat für die synergistische Kooperation mit G-CSF und GM-CSF ist Interleukin-6.

5.3.3 Induktion von IL-6 durch GM-CSF

Interleukin-6 ist ein wichtiger Mediator der Immunreaktion in der akuten Phase sowie der Regulation der Immunantwort und ist involviert in der Stimulation von B- und T-Lymphozyten und der Hämatopoese (Hemmann *et al.* 1996; Ozbek *et al.* 2001). Die Untersuchung der IL-6 Expression im Zusammenhang mit G-CSF und GM-CSF ergab eine durch GM-CSF induzierbare Expression von Interleukin-6 in den benignen Zellen und eine erhöhte IL-6 Expression in den GM-CSF transfizierten Zellen. In den durch *in vivo* Passage entstandenen, G-CSF und GM-CSF ko-exprimierenden Zellen konnte zudem eine sehr starke Expression von Interleukin-6 beobachtet werden. Inzwischen konnte S. Schnur in ihrer Bachelor-Arbeit zeigen, dass auch IL-6 die Expression von GM-CSF induzieren kann und hier somit ein reziproker Mechanismus vorliegt (Schnur 2004). Die Transfektion benigner tumorigener A-5 Zellen mit IL-6 resultierte in beschleunigtem Tumorwachstum, ähnlich wie es nach der Transfektion mit G-CSF beobachtet werden konnte. Die Tumore der IL-6 Transfektanten zeigten eine ausgeprägte, zum Tumor hin gerichtete Angiogenese und beschleunigte Rekrutierung von Granulozyten und Makrophagen (Schnur 2004 und persönliche Mitteilung T. Wöhrle). IL-6 stimuliert die Expression von GM-CSF, welches eine initiale, über Makrophagen vermittelte Anti-Tumor Wirkung induziert. Somit scheint IL-6 in der Lage zu sein, diese initiale Anti-Tumor Wirkung zu überwinden, wie es in dieser Dissertation auch bereits für G-CSF beschrieben wurde. Eine Ko-Expression der Cytokine Interleukin-6 und GM-CSF konnte in oralen Plattenepithelkarzinomen, Cervixkarzinomen sowie in Tumor-Homogenaten und Zelllinien von

Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals nachgewiesen werden (Kyo *et al.* 2000; Thomas *et al.* 2004).

IL-6 wird vorwiegend von Monozyten, Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Mastzellen und testikulären somatischen Zellen sekretiert (Grossman *et al.* 1989; Asgeirsson *et al.* 1998; Royuela *et al.* 2004). Die Expression von IL-6 ist häufig mit der Tumorprogression korreliert, wie z.B. der Tumordinvasion und Metastasierung in ösophagealen Plattenepithelkarzinomen (Asgeirsson *et al.* 1998; Royuela *et al.* 2004), und die Expression dieses Cytokins in neoplastischen Zellen ist mit verschiedenen Tumor fördernden Effekten wie einer verstärkten Proliferation und Inflammation sowie einer verringerten Immunantwort assoziiert (Thomas *et al.* 2004). Zudem reduziert die Expression von IL-6 in Tumoren die E-Cadherin vermittelte Zelladhäsion und fördert so die Ablösung der Tumorzellen aus dem Gewebeverband und damit die Invasion und Metastasierung des Tumors (Asgeirsson *et al.* 1998).

Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass die gleichzeitige Expression von G-CSF, GM-CSF und IL-6 in den durch *in vivo* Progression entstandenen hochmalignen Tumorzellen einen synergistischen Effekt hat. Wie auch G-CSF und GM-CSF vermag IL-6 das Tumorstadium über die autokrine Stimulation von Tumorzell-Proliferation (Thomas *et al.* 2004 und N. Catone, persönliche Mitteilung) und Inflammation (Grossman *et al.* 1989; Thomas *et al.* 2004) zu fördern sowie die Tumordinvasion durch die Induktion von Matrix Metalloproteinasen wie z.B. MMP-1, MMP-2, MMP-9 und MMP-12 in Tumorzellen und auch in stromalen Fibroblasten (Hemmann *et al.* 1996; Dasu *et al.* 2003 und unveröffentlichte Beobachtungen T. Wöhrle) zu ermöglichen.

5.3.4 Matrix Metalloproteinasen

Matrix Metalloproteinasen sind Schlüsselenzyme der Tumordinvasion und Angiogenese, deren Expression in Tumorzellen und vor allem in Stromazellen eine wesentliche Rolle in der Tumorprogression der Tumore aus HaCaT-Keratinozyten zu spielen scheint. Frühere Untersuchungen zum Expressionsprofil der Matrix Metalloproteinasen im HaCaT-System in unserem Labor zeigten eine vermehrte Sekretion von MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9 und -10 in Zellkulturüberständen *in vitro* mit steigender Malignität der untersuchten Zelllinien, während die Sekretion von MMP-11 in allen untersuchten Zelllinien konstant war (Bachmeier *et al.* 2000a; Bachmeier *et al.* 2000b). Die in dieser Doktorarbeit durchgeführten Analysen der mRNA-Expression verschiedener humaner Matrix Metalloproteinasen in Monolayer-Zellkulturen *in vitro* zeigten eine gleichmäßige Expression von MMP-2, MMP-13 und MMP-14 in allen untersuchten Zelllinien. Dagegen wurde in den GM-CSF transfizierten Zellen eine erniedrigte Expression von MMP-1 und eine fehlende Expression von MMP-3 *in vitro* beobachtet, wobei MMP-3 nur in Isolaten postkonfluenter Zellen der übrigen Zelllinien nachweisbar war. MMP-9 konnte in allen

untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden, jedoch war das Signal in subkonfluenten Kulturen stärker. Diese Beobachtungen an kultivierten Zellen *in vitro*, die keinerlei konsistenten Effekt der Wachstumsfaktorexpression auf die MMP-Expression zeigten, entsprechen nicht dem *in vivo* beobachteten Expressionsprofil der MMPs in denselben Zelllinien. *In vivo* konnte mit zunehmender Malignität und damit in Abhängigkeit von der G-CSF und GM-CSF Expression eine ansteigende Deposition von vom Tumor abgegebenem MMP-2 an der extrazellulären Matrix in der Umgebung der Tumore, von MMP-13 in Tumor und Stroma und von MMP-3 und MMP-9 im Tumor-Stroma in direkter Nähe zum Tumor festgestellt werden. Dabei zeigten mMMP-9 und mMMP-13 in mehreren Präparaten eine der Tumor-Invasion vorangehende Deposition des Proteins an der extrazellulären Matrix am Rand invasiver Bereiche des Tumors. Ein Teil des stromalen (murinen) MMP-9 konnte neutrophilen Granulozyten zugeordnet werden. Diese klare Diskrepanz zwischen einer Progressions assoziierten verstärkten MMP-Expression *in vivo*, die damit mit der Expression von G-CSF und GM-CSF korreliert und möglicherweise durch diese Faktoren mit gesteuert wird, und der fehlenden Korrelation zwischen der Expression von Matrix Metalloproteinasen und der Tumorzell-Malignität/Faktorexpression *in vitro* bestätigt auch Studien anderer Forscher (Coussens & Werb 1996) und lässt die Schlussfolgerung zu, dass das Expressionsprofil der Matrix Metalloproteinasen in Zellkulturen häufig nicht repräsentativ ist für die Situation *in vivo*.

Die koordinierte Degradation, Synthese und Remodellierung von Makromolekülen der extrazellulären Matrix (ECM) durch Matrix Metalloproteinasen sind Schlüsselereignisse in vielen biologischen Prozessen wie der Reproduktion, der Embryonalentwicklung, der Wundheilung und der Angiogenese. Andererseits wird eine exzessive Degradation der extrazellulären Matrix sowie diverser anderer Proteine durch Matrix Metalloproteinasen in verschiedenen pathologischen Veränderungen wie chronischen Wunden, Arteriosklerose, rheumatoider Arthritis und der Invasion und Metastasierung von Tumoren beobachtet. Dabei zeigte sich insbesondere in vielen Biopsien humaner Tumore eine Korrelation zwischen der Expression von Matrix Metalloproteinasen und dem Tumorstadium sowie der Invasivität des Tumors. Im adulten Organismus sind Sekretion und Aktivität von Matrix Metalloproteinasen sehr stark reguliert und erfolgen zumeist bei Prozessen, die die Migration von Zellen und die Remodellierung des Gewebes erfordern (Kerkela & Saarialho-Kere 2003; Polette *et al.* 2004). Die normalerweise nur schwache Expression und Sekretion von Matrix Metalloproteinasen wird dann bei Bedarf schnell induziert, wobei Makrophagen und Granulozyten eine Ausnahme bilden, denn sie erlauben eine Speicherung und gezielte Freisetzung von z.B. MMP-8 und -9. Auf einer zweiten Ebene sind Matrix Metalloproteinasen durch das Gleichgewicht zwischen der Expression der endogenen Inhibitoren der Matrix Metalloproteinasen („Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen“ =

TIMPs) und den verschiedenen Matrix Metalloproteinasen reguliert. Die Deregulation dieses Gleichgewichts spielt eine wichtige Rolle im Prozess der Tumorbildung und Invasion; so konnte z.B. die Invasion von Endothel- und Tumorzellen durch die Überexpression dieser TIMPs unterdrückt werden (Stetler-Stevenson & Yu 2001). Transfektion benigner, nicht invasiver Tumorzelllinien mit Matrix Metalloproteinasen resultierte in der Etablierung eines invasiven Phänotyps, und zudem konnte die Invasion von Tumorzellen in verschiedenen Systemen *in vitro* und *in vivo* durch die Zugabe oder Überexpression der endogenen Inhibitoren von Matrix Metalloproteinasen verhindert werden („Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen“ = TIMPs) (Borchers *et al.* 1997). Weitere Beweise der kritischen Rolle der Matrix Metalloproteinasen in der Tumorigenese wurden in Experimenten zur Expression von Matrix Metalloproteinasen in transgenen Mäusen und der Deletion von Matrix Metalloproteinasen in „knock-out“ (k.o.) Mäusen erzielt. So konnte in MMP-2 bzw. MMP-7 „knock-out“ Mäusen eine geringere Tumorprogression festgestellt werden, und die Angiogenese, Tumorbildung und Metastasierung waren in den MMP-2 k.o. Mäusen deutlich reduziert (Heissig *et al.* 2003; Kerkela & Saarialho-Kere 2003). In der Hautkarzinogenese von MMP-9 „knock-out“ Mäusen war eine deutlich reduzierte Hyperproliferation der Keratinozyten, beeinträchtigte Angiogenese sowie eine niedrigere Inzidenz invasiver Tumore zu beobachten (Werb *et al.* 1999; Coussens *et al.* 2000; Kerkela & Saarialho-Kere 2003). Dagegen resultierte die Überexpression von MMP-3 oder MMP-7 in einem Brustkrebs-Modell mit transgenen Mäusen in einer deutlich verstärkten Tumorigenese (Lynch & Matrisian 2002; Kerkela & Saarialho-Kere 2003). Auch die Überexpression von MMP-1 oder MMP-19 resultierte in einer beschleunigten und verstärkten Tumorbildung in Modellen für chemisch induzierte Hautkarzinogenese (Lynch & Matrisian 2002; Kerkela & Saarialho-Kere 2003; Pendas *et al.* 2004), und MMP-3 oder MMP-14 transgene Mäuse zeigten die Bildung aggressiver Adenokarzinome (Okada *et al.* 1997).

5.3.4.1 Expression von Matrix Metalloproteinasen

Die Induktion von Matrix Metalloproteinasen erfolgt durch Cytokine, Wachstumsfaktoren, Modifikationen der Zell-Mikroumgebung und Zell-Zell Interaktionen (Polette *et al.* 2004). Auch Komponenten der extrazellulären Matrix sowie deren Fragmente können die Expression von MMPs induzieren (Wahl *et al.* 1997). Die Expression verschiedener MMPs in Tumorzellen und auch in Stromazellen wie inflammatorischen Zellen und Fibroblasten sowie die gegenseitige Induktion dieser Zellen zur Expression von MMPs ist ein bekanntes Phänomen in der Tumorentwicklung (Lynch & Matrisian 2002; Heissig *et al.* 2003). In letzter Zeit wird zunehmend deutlich, dass ein großer Teil der in einem epithelialen Tumor vorhandenen MMPs von Stromazellen in Kooperation mit dem Tumor selbst produziert wird (Coussens & Werb

1996; Tomita *et al.* 2000; Coussens *et al.* 2002; Polette *et al.* 2004). Dabei kann die Expression von Matrix Metalloproteinasen in stromalen Zellen durch Tumorzellen entweder direkt oder indirekt induziert werden. Ein Beispiel ist im Falle von Fibroblasten die Expression der so genannten EMMPRINs (Extracellular MMP Inducer) aus der Immunglobulin-Superfamilie im Tumor (Lynch & Matrisian 2002; Polette *et al.* 2004). Bei den EMMPRINs handelt es sich um extrazelluläre Glykoproteine, die häufig auf Tumorzellen lokalisiert sind und die Produktion von Matrix Metalloproteinasen sowohl im Tumor als auch im Stroma induzieren (Lynch & Matrisian 2002; Polette *et al.* 2004).

Die Expression von **MMP-2** wurde bisher in einer Vielzahl von normalen und transformierten Zellen beschrieben, und in vielen für das Fortschreiten einer Krebserkrankung essentiellen Prozessen wie der Angiogenese (Heissig *et al.* 2003), Invasion (Meade-Tollin *et al.* 1998; Tomita *et al.* 2000; Sugimoto *et al.* 2001) und Metastasierung (Tomita *et al.* 2000; Sugimoto *et al.* 2001) von Tumoren. MMP-2 wird in verschiedenen Tumoren wie Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals (Tomita *et al.* 2000; Sugimoto *et al.* 2001), Lungenkarzinomen (Pei *et al.* 1999) und Ovarialkarzinomen (Schmalfeldt *et al.* 2001) und im Tumor-Stroma in Monozyten (Wu *et al.* 2001), Makrophagen (Wu *et al.* 2001; Hagemann *et al.* 2004), CD34 positiven Vorläuferzellen (Janowska-Wieczorek *et al.* 1999), Endothelzellen (Kerkela & Saarialho-Kere 2003) und Fibroblasten exprimiert (Borchers *et al.* 1997; Boyd & Balkwill 1999; Stetler-Stevenson & Yu 2001; van Kempen *et al.* 2002; Kerkela & Saarialho-Kere 2003; Polette *et al.* 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte in Übereinstimmung mit Untersuchungen aus unserem Labor und den Arbeiten anderer Gruppen (Meade-Tollin *et al.* 1998; Bachmeier *et al.* 2000b; Schmalfeldt *et al.* 2001; Lederle 2003) eine mit zunehmender Malignität ansteigende Expression von humanem MMP-2 Protein im Tumor und als Ablagerung um den Tumor herum nachgewiesen werden, wobei die Ablagerung von MMP-2 um den Tumor herum von benignen zu malignen Zellen hin abnahm. Es ist bekannt, dass die Induktion von MMP-2 durch verschiedene in hochgradig malignen Tumoren exprimierte Cytokine wie G-CSF (Janowska-Wieczorek *et al.* 1999; Pei *et al.* 1999), GM-CSF (Janowska-Wieczorek *et al.* 1999; Pei *et al.* 1999; Tomita *et al.* 2000) und IL-6 (Janowska-Wieczorek *et al.* 1999) erfolgen kann. Daher ist es möglich, dass die Induktion der Expression von MMP-2 in unserem Tumorsystem durch eines oder mehrere dieser Cytokine erfolgt.

Eine zunehmende Expression von aktivem **MMP-3** wurde in verschiedenen Studien mit steigender Malignität des Tumors beschrieben, während in Hyperplasien lediglich das Pro-Enzym detektiert werden konnte (Bachmeier *et al.* 2000b; Coussens *et al.* 2000). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine deutliche und mit zunehmender Malignität des Tumors von den benignen

A-5 Zellen zu den hochgradig malignen A-5G12bRT1 Zellen hin ansteigende Expression von RNA und Protein von murinem (stromalem) MMP-3 im Tumor-Stroma in direkter Nähe zum Tumor beobachtet werden. Diese war begleitet von der Ablagerung von MMP-3 Protein am Rand invasiver Bereiche des Tumors. MMP-3 kann als natürlicher Tumor-Promotor agieren und die Initiierung von Brusttumoren beeinflussen (Kerkela & Saarialho-Kere 2003) sowie das Verhalten von Tumor und Stroma durch Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- β (transformierender Wachstumsfaktor- β), TNF- α (Tumor Nekrose Faktor- α) und IL-1 β (Interleukin-1 β) modulieren. Neben Fibroblasten (Coussens & Werb 1996; Borchers *et al.* 1997; van Kempen *et al.* 2002; Kerkela & Saarialho-Kere 2003; Polette *et al.* 2004) produzieren auch andere stromale Zellen wie Monozyten (Wu *et al.* 2001) und Makrophagen (Wu *et al.* 2001; Hagemann *et al.* 2004) MMP-3 in der Umgebung des Tumors.

Die Matrix Metalloproteinase-9 ist eine der bekanntesten und am besten untersuchten Proteinasen. **MMP-9** spielt eine wichtige Rolle in einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse wie der Remodellierung der extrazellulären Matrix (Coussens *et al.* 1999), der Hyperproliferation von Keratinozyten (Coussens *et al.* 2000), der Angiogenese (Coussens *et al.* 1999; Lynch & Matrisian 2002; Heissig *et al.* 2003) sowie der Progression (Coussens *et al.* 2000), Invasion (Meade-Tollin *et al.* 1998; Hagemann *et al.* 2004) und Metastasierung (van Kempen & Coussens 2002) von Tumoren. Untersuchungen zeigten die Expression von MMP-9 in Lungenkarzinomen (Pei *et al.* 1999), Ovarialkarzinomen (Schmalfeldt *et al.* 2001), an der invasiven Front von Plattenepithelkarzinomen (Borchers *et al.* 1997; Coussens *et al.* 2000) und im Stroma invasiver Tumorbereiche (Kerkela & Saarialho-Kere 2003), wie z.B. in Monozyten (Wahl *et al.* 1997; Zhang *et al.* 1998; Pugin *et al.* 1999; Wu *et al.* 2001), Makrophagen (Coussens *et al.* 2000; Stetler-Stevenson & Yu 2001; Hagemann *et al.* 2004), neutrophilen Granulozyten (Pugin *et al.* 1999; Coussens *et al.* 2000; Daniel *et al.* 2003), Mastzellen (Coussens *et al.* 2000; Daniel *et al.* 2003), CD34 positiven Vorläuferzellen (Janowska-Wieczorek *et al.* 1999) und Tumor assoziierten Fibroblasten an Kapillaren (van Kempen *et al.* 2002). In der vorliegenden Doktorarbeit konnte in Übereinstimmung mit Informationen aus der Literatur (Meade-Tollin *et al.* 1998; Bachmeier *et al.* 2000b; Coussens *et al.* 2000; Schmalfeldt *et al.* 2001) eine mit zunehmender Malignität des Tumors ansteigende Expression von RNA und Protein von murinem (stromalem) MMP-9 im Tumor-Stroma in direkter Nähe zum Tumorgewebe festgestellt werden, wobei ein Teil des stromalen (murinen) MMP-9 Proteins neutrophilen Granulozyten zugeordnet werden konnte, während keine Ko-Lokalisation mit Makrophagen vorlag. Wie auch bereits für MMP-2 beschrieben, kann die Induktion von MMP-9 durch G-CSF (Pugin *et al.* 1999; Janowska-Wieczorek *et al.* 1999; Pei *et al.* 1999), GM-CSF (Zhang *et al.* 1998; Janowska-Wieczorek *et al.* 1999; Pei *et al.* 1999) und

Interleukin-6 (Janowska-Wieczorek *et al.* 1999) erfolgen. In Oberflächentransplantaten G-CSF oder GM-CSF transfizierter Zellen zeigte sich eine beschleunigte Infiltration des Kollagengels durch MMP-9 exprimierende Zellen, und bei G-CSF, GM-CSF und IL-6 ko-exprimierenden Zellen konnte eine noch schnellere und stärkere Infiltration MMP-9 produzierender Zellen beobachtet werden. Unterhalb der G-CSF exprimierenden Epithelien konnte eine starke, der Tumorinvasion vorangehende Deposition von MMP-9 beobachtet werden; möglicherweise fördert G-CSF die Degranulation MMP-9 produzierender Zellen, wie z.B. der Granulozyten. Interessanterweise bildeten gerade diese G-CSF exprimierenden Tumorzellen stark invasive, gut vaskularisierte Tumore, an deren Ausbildung also möglicherweise die verstärkte Expression von MMP-9 beteiligt ist.

Die **Matrix Metalloproteinase-13** degradiert ein ausgesprochen weites Spektrum an Substraten. Eine wichtige Funktion von MMP-13 ist neben der Knochenentwicklung und Wundheilung die proteolytische Aktivierung von MMP-2 und MMP-9 (Kerkela & Saarialho-Kere 2003; Polette *et al.* 2004). Dabei ist zu beachten, dass murines MMP-13 die Funktion der humanen interstitiellen Kollagenase-1 (MMP-1) übernimmt (Balbin *et al.* 2001). Die Analyse der Expression von humanem MMP-13 Protein in Tumoren sowie von RNA und Protein stromalem (murinem) MMP-13 in dieser Doktorarbeit ergab eine mit steigender Malignität des Tumors zunehmende Expression von MMP-13 sowohl im Tumor als auch im Stroma; eine Korrelation, die auch für die durch MMP-13 aktivierbare murine (stromale) Proteinase MMP-9 nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zu der durchgängigen Expression von humanem MMP-13 in malignen Tumoren zeigten benigne Tumore eine Expression nur im Randbereich des Tumors. Auch in der Literatur wurde die Expression von MMP-13 sowohl in neoplastischen Keratinozyten in Karzinomen, besonders an der invasiven Front des Tumors (Johansson *et al.* 2000; van Kempen *et al.* 2002; Kerkela & Saarialho-Kere 2003), als auch in Stromazellen wie Fibroblasten und inflammatorischen Zellen (Kerkela & Saarialho-Kere 2003; Polette *et al.* 2004) beschrieben. In den Oberflächentransplantationen erfolgte eine der Tumor-Invasion vorangehende Deposition von MMP-13 Protein unterhalb des Epithels GM-CSF exprimierender Zellen. Bei diesen Färbungen war die Reaktion des Antikörpers mit dem Tumorepithel auffallend, wobei es sich möglicherweise um eine Kreuzreaktion mit dem humanen Homolog von MMP-13 handelt. In Oberflächentransplantationen G-CSF und/oder GM-CSF exprimierender Zellen konnte eine beschleunigte Infiltration des Kollagengels mit für murines MMP-13 Protein positiven Zellen beobachtet werden, die jedoch weder als Granulozyten noch als Makrophagen zu identifizieren waren, es muss sich hierbei folglich um einen anderen Zelltyp handeln. Vermutlich handelt es

sich hierbei um Fibroblasten, deren Identifikation aufgrund des Fehlens eines Maus-Fibroblasten spezifischen Antikörpers allerdings schwierig ist.

Studien zu der Expression von MMP-13 *in vitro* demonstrierten eindringlich den Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Expression von Matrix Metalloproteinasen: Bei Kultivierung der Zellen auf einem Typ I Kollagengel in der Organotypischen Kultur konnte eine verstärkte Induktion der mRNA von MMP-13 nur in den benignen Zellen (HaCaT-*ras* A-5) festgestellt werden, nicht jedoch in den malignen tumorigenen Zellen (HaCaT-*ras* A-5RT3) und den nicht tumorigenen parentalen HaCaT-Zellen (Airola & Fusenig 2001).

Nachdem die Expression von Matrix Metalloproteinasen deutlich mit verstärkter Tumormalignität korrelierte, stellte sich die Frage nach der Rolle der MMPs in der Tumورprogression.

5.3.4.2 Matrix Metalloproteinasen und die Invasion

Ein wichtiger Hinweis auf die Funktion der Matrix Metalloproteinasen in der Entwicklung von Tumoren war die Beobachtung, dass die Fähigkeit der Tumorzellen, in das umliegende Gewebe einzudringen und zu metastasieren mit einer erhöhten Expression von MMPs korreliert war (Bachmeier *et al.* 2000b). Matrix Metalloproteinasen spielen durch die Zerstörung der lokalen Gewebestruktur, von Basalmembranen sowie von Zell-Zell Verbindungen eine wichtige Rolle in allen Stadien der Tumورprogression wie der Tumor induzierten Angiogenese, Invasion und Metastasierung (Coussens & Werb 1996). Dabei findet sich die Expression der Proteasen sowohl in Tumorzellen als auch in Stromazellen in der Umgebung der Tumore, so dass in Tumoren häufig erhöhte MMP-Level an der Tumor-Stroma Grenze gefunden werden (Lynch & Matrisian 2002). Neben der Basalmembran verhindern auch Zell-Zell Kontakte die Migration der Tumorzellen in das umliegende Gewebe. Durch die Degradation des E-Cadherin/ β -Catenin Komplexes durch MMP-3 und MMP-7 wird diese Inhibition aufgehoben, und das freie β -Catenin induziert wiederum die Expression von MMPs (Bergers & Coussens 2000; Lynch & Matrisian 2002; Polette *et al.* 2004). Zudem verhindert das dabei ebenfalls freigewordene E-Cadherin die E-Cadherin abhängige Zell-Aggregation und induziert ebenfalls die Expression verschiedener MMPs (MMP-2, -9, -14) (Polette *et al.* 2004). Damit erlauben MMPs die Migration von Tumorzellen aus dem Zellverband hinaus und durch dichte Areale der ECM (Lynch & Matrisian 2002). Interessanterweise konnte eine über Matrix Metalloproteinasen vermittelte Invasivität von Plattenepithelkarzinomen der Lunge nach Gabe von GM-CSF *in vitro* nachgewiesen werden (Tsuruta *et al.* 1998).

Neben ihrer Rolle in der Degradation der Basalmembran, der extrazellulären Matrix und von Zell-Zell Kontakten fördern Matrix Metalloproteinasen die Proliferation, Angiogenese und Metastasierung von Tumoren auch durch die Modulation biologisch aktiver Signalmoleküle wie

Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren, die Freisetzung biologisch aktiver Moleküle wie TNF- α von der Zelloberfläche („Sheddase-Aktivität“, siehe Lynch & Matrisian 2002; Egeblad & Werb 2002) und von Wachstumsfaktoren aus der extrazellulären Matrix sowie die Bildung angiogener Fragmente der ECM (Hernandez-Barrantes *et al.* 2002; Heissig *et al.* 2003). Demnach ist die Degradation der ECM nicht nur mit der Beseitigung einer physikalischen Barriere gleichzusetzen, um das Einwachsen neuer Blutgefäße und die Ausdehnung des Tumors zu ermöglichen, sondern dient auch der Freisetzung daran gebundener Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF (Egeblad & Werb 2002) und der Freilegung so genannter „kryptischer Aktivität“ (Polette *et al.* 2004; Hagemann *et al.* 2004).

5.3.4.3 Matrix Metalloproteinasen und die Angiogenese

Die Bildung neuer Blutgefäße setzt eine lokal begrenzte extrazelluläre Proteolyse voraus, die durch die sensible Balance zwischen Matrix Metalloproteinasen und den Gewebe Inhibitoren der Matrix Metalloproteinasen (TIMPs) sowie die Rekrutierung der Komponenten verschiedener Protease-Systeme zur Zellmembran reguliert wird. MMPs vermitteln die Tumor-Angiogenese, indem sie Endothelzellen die Migration durch die Basalmembran ermöglichen, und darüber hinaus können sie die Anheftung, Proliferation, Migration und das Wachstum von Endothelzellen entweder direkt oder indirekt regulieren. Die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und angiogenen Faktoren für epitheliales und/oder endotheliales Wachstum wie z.B. bFGF (basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor) und VEGF (Vaskulärer Endothel Wachstumsfaktor) aus der extrazellulären Matrix ist eine wichtige pro-angiogene Funktion der Matrix Metalloproteinasen (van Kempen *et al.* 2002; Egeblad & Werb 2002; Polette *et al.* 2004). Von Makrophagen und glattmuskulären Zellen ausgeschüttete MMPs können neben der Freisetzung kryptischer Aktivität aus der ECM auch eine direktere Rolle in der Angiogenese übernehmen: sie „graben“ Kanäle durch die ECM, die dann von Endothelzellen zur Bildung neuer Kapillaren genutzt werden (Wahl *et al.* 1997; Crowther *et al.* 2001). Die durch Degradation der extrazellulären Matrix entstehenden Fragmente können pro- und anti-angiogen wirken. So induzieren Matrikine die Tumor-Angiogenese (Polette *et al.* 2004), während z.B. Angiostatin (aus Plasminogen), Tumstatin (aus Typ IV Kollagen) und Endostatin (aus Kollagen XVIII) über die Blockierung der Proliferation von Endothelzellen anti-angiogen wirken (Bergers & Coussens 2000; Heissig *et al.* 2003).

Andererseits jedoch vermögen Inhibitoren der Matrix Metalloproteinasen die Tumor-Angiogenese und damit das Tumorwachstum zu unterdrücken (Heissig *et al.* 2003). Aus solchen Beobachtungen wird deutlich, dass die Funktion der Gewebe Inhibitoren der Matrix

Metalloproteinasen (TIMPs), wie auch die der Matrix Metalloproteinasen selber, sehr ambivalent ist und diese keineswegs nur pro-tumorigen oder nur anti-tumorigen wirken.

5.4 Klinische Relevanz von G-CSF und GM-CSF

Der von uns gezeigte kritische Beitrag von G-CSF und GM-CSF in der Regulation von Wachstum und Progression epithelialer Tumore ist auch von klinischer Relevanz, da diese Faktoren zunehmend in der adjuvanten Tumorthherapie eingesetzt werden, um die Nebenwirkungen der Chemo- bzw. Strahlentherapie, insbesondere die dadurch ausgelöste Neutropenie, zu mildern. Dieser therapeutische Einsatz von G-CSF und GM-CSF basiert auf Studien, die im Hinblick auf eine Stimulierung der Tumore keine negativen Auswirkungen der Faktoren für den Patienten beschrieben (The American Society of Clinical Oncology 1994). Die hier vorliegenden Daten und verschiedene andere Studien zeigen jedoch eine Assoziation der Expression von G-CSF und/oder GM-CSF mit verstärkter Invasion und Metastasierung (Tsukuda *et al.* 1993; Mueller *et al.* 1999; Obermueller *et al.* 2004). Daher empfiehlt sich eine genaue Re-Evaluierung der Rolle von G-CSF und GM-CSF im Wachstum von Tumoren *in vivo* und ihres Einsatzes in der adjuvanten Tumorthherapie.

6 Zusammenfassung

Durch die Forschung der letzten Jahre wurde zunehmend deutlich, dass die Tumorumgebung einen starken Einfluss auf Wachstum und Progression eines Tumors ausübt. Ein Schlüsselereignis ist dabei die veränderte Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren im Tumor selbst oder im Tumor-Stroma und somit eine Veränderung in der Interaktion zwischen Tumor- und Stroma-Zellen. Eine solche *de novo* Expression der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF konnte in der Tumورprogression humaner Plattenepithelkarzinome der Haut ausschließlich im Tumorgewebe hochgradig maligner, schnell und invasiv wachsender und metastasierender Tumore mit einer ausgeprägten Vaskularisierung nachgewiesen werden (Mueller & Fusenig 1999). Um die Wirkung von G-CSF und GM-CSF getrennt analysieren zu können, wurde eine benigne Keratinozyten-Zelllinie, die die Rezeptoren für G-CSF und GM-CSF exprimiert, nicht jedoch die Faktoren selbst, mit G-CSF oder GM-CSF transfiziert. Die Konsequenz der Faktorexpression wurde in je 2 transfizierten Zelllinien *in vitro* und *in vivo* analysiert. Beide Faktoren wirkten autokrin stimulierend auf die Tumorzell-Proliferation und Migration *in vitro*. Darüber hinaus induzierte GM-CSF die Expression von IL-6 in Tumorzellen, welches dann wiederum die Expression von GM-CSF verstärkte.

Untersuchungen der transfizierten Zelllinien *in vivo* demonstrierten einen deutlichen Beitrag von G-CSF und GM-CSF zur Tumormalignisierung. So ergab die subkutane Injektion der G-CSF exprimierenden Zellen in die Nacktmaus nach einer Latenzzeit von 50 Tagen schnell und invasiv wachsende Tumore mit ausgeprägter Vaskularisierung, während GM-CSF exprimierende Zellen nur ein transientes Tumorstadium zeigten. Subkutane Injektion von Gemischen der G-CSF mit den GM-CSF transfizierten Zellen demonstrierten eine frühere Häufung der Tumorbildung in Abhängigkeit von der Höhe der GM-CSF Produktion durch die eingesetzte Zelllinie. Die *in vivo* Progression mittels Reinkultivierung von Tumorgewebe der mit G-CSF transfizierten Zellen resultierte in Zellen, die ein sehr schnelles und aggressives Tumorstadium ohne Latenz zeigten. Diese Progression war assoziiert mit einer *de novo* Expression von GM-CSF, was auf einen synergistischen Effekt beider Faktoren hinweist.

Für die Progressions fördernde Wirkung von G-CSF und GM-CSF spielt neben der autokrinen Stimulation der Tumorzellen vor allem die parakrine Beeinflussung des Tumor-Stromas eine Rolle. Die Analyse der Kinetik der Tumor-Stroma Interaktionen im Oberflächentransplantat ergab eine deutlich schnellere und stärkere, zum Tumor hin gerichtete permanente Angiogenese in den G-CSF exprimierenden Zellen. Diese setzte in den durch *in vivo* Passage entstandenen, G-CSF und GM-CSF positiven Zellen deutlich früher ein. Die Faktor negativen parentalen

Zellen und die mit GM-CSF transfizierten Zellen wiesen dagegen nur eine transiente Angiogenese auf. Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Tumorumgebung war bei allen transfizierten Zelllinien beschleunigt, blieb jedoch bei GM-CSF exprimierenden Zellen wie auch bei den parentalen und Kontroll transfizierten Zellen transient, während G-CSF exprimierende und G-CSF und GM-CSF ko-exprimierende Zellen eine anhaltende Rekrutierung zeigten. Die Analyse der Kinetik der Makrophagen-Rekrutierung ergab eine deutliche Beschleunigung nur in den GM-CSF exprimierenden und den G-CSF und GM-CSF ko-exprimierenden Zellen. Die sehr frühe Gegenwart von Makrophagen in Transplantaten der GM-CSF positiven Zellen ohne die Präsenz von Granulozyten deutet im Zusammenhang mit der sehr unregelmäßigen und blasigen Epithelbildung und dem nur transienten Tumorwachstum dieser Zellen nach subkutaner Injektion auf eine durch Makrophagen ausgeübte frühe Anti-Tumor Immunität hin.

Als Schlüsselenzyme der Tumordinvasion und Angiogenese wurde weiterhin die Expression Matrix degradierender Enzyme, der Matrix Metalloproteinasen, in Tumor und Stroma untersucht. Dabei konnte mit zunehmender Tumordiversion eine ansteigende Expression von MMP-2 in Tumoren, von MMP-13 in Tumor und Stroma und von MMP-3 und MMP-9 im Tumor-Stroma in direkter Nähe zum Tumor festgestellt werden, wobei die Proteasen eine der Tumor-Invasion vorangehende Deposition am Rand invasiver Bereiche des Tumors zeigten. Ein Teil der stromalen (murinen) MMP-9 positiven Zellen konnte über Immunfluoreszenz-Färbungen als neutrophile Granulozyten identifiziert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ko-Expression von G-CSF, GM-CSF und ihren Rezeptoren in humanen Plattenepithelkarzinomen der Haut einen wesentlichen Beitrag zur Tumordiversion zu einem hochmalignen Tumor-Phänotyp leistet. Dies geschieht zum einen durch eine autokrine Stimulation von Proliferation und Migration der Tumorzellen. Zum anderen stimulieren diese Faktoren parakrin die Induktion einer Tumor fördernden stromalen Umgebung und tragen so zu verstärktem Tumorwachstum und Invasion bei.

7 Literatur

- Aglietta, M., Bussolino, F., Piacibello, W., Apra, F., Sanavio, F., Stacchini, A., Monzeglio, C., Carnino, F. & Gavosto, F.** (1990) *Human GM-CSF in vivo: identification of the target cells and of their kinetics of response.* Int.J.Cell Cloning, 8 Suppl 1, 283-290.
- Airola, K. & Fusenig, N. E.** (2001) *Differential stromal regulation of MMP-1 expression in benign and malignant keratinocytes.* J.Invest Dermatol., 116, 85-92.
- Ansel, J., Perry, P., Brown, J., Damm, D., Phan, T., Hart, C., Luger, T. & Hefeneider, S.** (1990) *Cytokine modulation of keratinocyte cytokines.* J.Invest Dermatol., 94, 101S-107S.
- Asgeirsson, K. S., Olafsdottir, K., Jonasson, J. G. & Ogmundsdottir, H. M.** (1998) *The effects of IL-6 on cell adhesion and e-cadherin expression in breast cancer.* Cytokine, 10, 720-728.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, R. E., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K.** *Current Protocols in Molecular Biology.* Wiley Interscience . 1994.
- Bachmeier, B. E., Boukamp, P., Lichtinghagen, R., Fusenig, N. E. & Fink, E.** (2000a) *Matrix metalloproteinases-2,-3,-7,-9 and-10, but not MMP-11, are differentially expressed in normal, benign tumorigenic and malignant human keratinocyte cell lines.* Biol.Chem., 381, 497-507.
- Bachmeier, B. E., Nerlich, A. G., Boukamp, P., Lichtinghagen, R., Tschesche, H., Fritz, H. & Fink, E.** (2000b) *Human keratinocyte cell lines differ in the expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases-1,-8, and -13 and of TIMP-1.* Biol.Chem., 381, 509-516.
- Balbin, M., Fueyo, A., Knauper, V., Lopez, J. M., Alvarez, J., Sanchez, L. M., Quesada, V., Bordallo, J., Murphy, G. & Lopez-Otin, C.** (2001) *Identification and enzymatic characterization of two diverging murine counterparts of human interstitial collagenase (MMP-1) expressed at sites of embryo implantation.* J.Biol.Chem., 276, 10253-10262.
- Balkwill, F. & Mantovani, A.** (2001) *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet, 357, 539-545.
- Baskic, D., Acimovic, L., Samardzic, G., Vujanovic, N. L. & Arsenijevic, N. N.** (2001) *Blood monocytes and tumor-associated macrophages in human cancer: differences in activation levels.* Neoplasma, 48, 169-174.
- Bergers, G. & Benjamin, L. E.** (2003) *Tumorigenesis and the angiogenic switch.* Nat.Rev.Cancer, 3, 401-410.
- Bergers, G. & Coussens, L. M.** (2000) *Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases.* Curr.Opin.Genet.Dev., 10, 120-127.
- Bernasconi, S., Matteucci, C., Sironi, M., Conni, M., Colotta, F., Mosca, M., Colombo, N., Bonazzi, C., Landoni, F., Corbetta, G. & .** (1995) *Effects of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) on expression of adhesion molecules and production of cytokines in blood monocytes and ovarian cancer-associated macrophages.* Int.J.Cancer, 60, 300-307.
- Bikfalvi, A. & Han, Z. C.** (1994) *Angiogenic factors are hematopoietic growth factors and vice versa.* Leukemia, 8, 523-529.

- Bissell, M. J., Radisky, D. C., Rizki, A., Weaver, V. M. & Petersen, O. W.** (2002) *The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast*. *Differentiation*, 70, 537-546.
- Bleuel, K., Popp, S., Fusenig, N. E., Stanbridge, E. J. & Boukamp, P.** (1999) *Tumor suppression in human skin carcinoma cells by chromosome 15 transfer or thrombospondin-1 overexpression through halted tumor vascularization*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96, 2065-2070.
- Bochner, B. H., Cote, R. J., Weidner, N., Groshen, S., Chen, S. C., Skinner, D. G. & Nichols, P. W.** (1995) *Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis*. *J.Natl.Cancer Inst.*, 87, 1603-1612.
- Borchers, A. H., Steinbauer, H., Schafer, B. S., Kramer, M., Bowden, G. T. & Fusenig, N. E.** (1997) *Fibroblast-directed expression and localization of 92-kDa type IV collagenase along the tumor-stroma interface in an in vitro three-dimensional model of human squamous cell carcinoma*. *Mol.Carcinog.*, 19, 258-266.
- Bornstein, P.** (1992) *Thrombospondins: structure and regulation of expression*. *FASEB J.*, 6, 3290-3299.
- Bornstein, P.** (1995) *Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1*. *J.Cell Biol.*, 130, 503-506.
- Bosari, S., Lee, A. K., DeLellis, R. A., Wiley, B. D., Heatley, G. J. & Silverman, M. L.** (1992) *Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma*. *Hum.Pathol.*, 23, 755-761.
- Boukamp, P., Breitkreutz, D., Huelsen, A., Tomakidi, P. & Fusenig, N.** (1994) *In vitro transformation and tumor progression: a multistep model for skin carcinogenesis*. In: *The keratinocyte handbook*. (eds I. M. Leigh, B. E. Lane & F. M. Watt), pp. 485-499. Cambridge University Press, Cambridge University Press.
- Boukamp, P., Peter, W., Pascheberg, U., Altmeier, S., Fasching, C., Stanbridge, E. J. & Fusenig, N. E.** (1995) *Step-wise progression in human skin carcinogenesis in vitro involves mutational inactivation of p53, rasH oncogene activation and additional chromosome loss*. *Oncogene*, 11, 961-969.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. & Fusenig, N. E.** (1988) *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line*. *J.Cell Biol.*, 106, 761-771.
- Boukamp, P., Rupniak, H. T. & Fusenig, N. E.** (1985) *Environmental modulation of the expression of differentiation and malignancy in six human squamous cell carcinoma cell lines*. *Cancer Res.*, 45, 5582-5592.
- Boukamp, P., Stanbridge, E. J., Foo, D. Y., Cerutti, P. A. & Fusenig, N. E.** (1990) *c-Ha-ras oncogene expression in immortalized human keratinocytes (HaCaT) alters growth potential in vivo but lacks correlation with malignancy*. *Cancer Res.*, 50, 2840-2847.
- Boyd, R. S. & Balkwill, F. R.** (1999) *MMP-2 release and activation in ovarian carcinoma: the role of fibroblasts*. *Br.J.Cancer*, 80, 315-321.
- Braun, B., Lange, M., Oeckler, R. & Mueller, M. M.** (2004) *Expression of G-CSF and GM-CSF in human meningiomas correlates with increased tumor proliferation and vascularization*. *J.Neurooncol.*, 68, 131-140.

- Breitkreutz, D., Boukamp, P., Ryle, C. M., Stark, H. J., Roop, D. R. & Fusenig, N. E.** (1991) *Epidermal morphogenesis and keratin expression in c-Ha-ras-transfected tumorigenic clones of the human HaCaT cell line.* Cancer Res., 51, 4402-4409.
- Breitkreutz, D., Schoop, V. M., Mirancea, N., Baur, M., Stark, H. J. & Fusenig, N. E.** (1998) *Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants.* Eur.J.Cell Biol., 75, 273-286.
- Bremer, G. L., Tiebosch, A. T., van der Putten, H. W., Schouten, H. J., de Haan, J. & Arends, J. W.** (1996) *Tumor angiogenesis: an independent prognostic parameter in cervical cancer.* Am.J.Obstet.Gynecol., 174, 126-131.
- Bretscher, V., Andreutti, D., Neuville, P., Martin, M., Martin, F., Lefebvre, O., Gilles, C., Benzonana, G. & Gabbiani, G.** (2000) *GM-CSF expression by tumor cells correlates with aggressivity and with stroma reaction formation.* J.Submicrosc.Cytol.Pathol., 32, 525-533.
- Brower, V.** (1999) *Tumor angiogenesis--new drugs on the block.* Nat.Biotechnol., 17, 963-968.
- Burke, B., Tang, N., Corke, K. P., Tazzyman, D., Ameri, K., Wells, M. & Lewis, C. E.** (2002) *Expression of HIF-1 alpha by human macrophages: implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy.* J.Pathol., 196, 204-212.
- Bussolino, F., Colotta, F., Bocchietto, E., Guglielmetti, A. & Mantovani, A.** (1993) *Recent developments in the cell biology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor: activities on endothelial cells.* Int.J.Clin.Lab Res., 23, 8-12.
- Chen, R., Fairley, J. A., Zhao, M. L., Giudice, G. J., Zillikens, D., Diaz, L. A. & Liu, Z.** (2002) *Macrophages, but not T and B lymphocytes, are critical for subepidermal blister formation in experimental bullous pemphigoid: macrophage-mediated neutrophil infiltration depends on mast cell activation.* J.Immunol., 169, 3987-3992.
- Chen, Z., Malhotra, P. S., Thomas, G. R., Ondrey, F. G., Duffey, D. C., Smith, C. W., Enamorado, I., Yeh, N. T., Kroog, G. S., Rudy, S., McCullagh, L., Mousa, S., Quezado, M., Herscher, L. L. & Van Waes, C.** (1999) *Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer.* Clin.Cancer Res., 5, 1369-1379.
- Corominas, M., Kamino, H., Leon, J. & Pellicer, A.** (1989) *Oncogene activation in human benign tumors of the skin (keratoacanthomas): is HRAS involved in differentiation as well as proliferation?* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 86, 6372-6376.
- Coussens, L. M., Fingleton, B. & Matrisian, L. M.** (2002) *Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations.* Science, 295, 2387-2392.
- Coussens, L. M., Raymond, W. W., Bergers, G., Laig-Webster, M., Behrendtsen, O., Werb, Z., Caughey, G. H. & Hanahan, D.** (1999) *Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis.* Genes Dev., 13, 1382-1397.
- Coussens, L. M., Tinkle, C. L., Hanahan, D. & Werb, Z.** (2000) *MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis.* Cell, 103, 481-490.
- Coussens, L. M. & Werb, Z.** (1996) *Matrix metalloproteinases and the development of cancer.* Chem.Biol., 3, 895-904.

- Coussens, L. M. & Werb, Z.** (2001) *Inflammatory cells and cancer: think different!* J.Exp.Med., 193, F23-F26.
- Coussens, L. M. & Werb, Z.** (2002) *Inflammation and cancer.* Nature, 420, 860-867.
- Crowther, M., Brown, N. J., Bishop, E. T. & Lewis, C. E.** (2001) *Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors.* J.Leukoc.Biol., 70, 478-490.
- Daniel, D., Meyer-Morse, N., Bergsland, E. K., Dehne, K., Coussens, L. M. & Hanahan, D.** (2003) *Immune enhancement of skin carcinogenesis by CD4+ T cells.* J.Exp.Med., 197, 1017-1028.
- Dasu, M. R., Barrow, R. E., Spies, M. & Herndon, D. N.** (2003) *Matrix metalloproteinase expression in cytokine stimulated human dermal fibroblasts.* Burns, 29, 527-531.
- Di Carlo, E., Forni, G., Lollini, P., Colombo, M. P., Modesti, A. & Musiani, P.** (2001) *The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions.* Blood, 97, 339-345.
- Dingemans, K. P., Zeeman-Boeschoten, I. M., Keep, R. F. & Das, P. K.** (1993) *Transplantation of colon carcinoma into granulation tissue induces an invasive morphotype.* Int.J.Cancer, 54, 1010-1016.
- Dranoff, G.** (2003) *Coordinated tumor immunity.* J.Clin.Invest, 111, 1116-1118.
- Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D. & Mulligan, R. C.** (1993) *Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 90, 3539-3543.
- Dray, T. G., Hardin, N. J. & Sofferan, R. A.** (1995) *Angiogenesis as a prognostic marker in early head and neck cancer.* Ann.Otol.Rhinol.Laryngol., 104, 724-729.
- Dvorak, H. F.** (1986) *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing.* N.Engl.J.Med., 315, 1650-1659.
- Dvorak, H. F., Nagy, J. A. & Dvorak, A. M.** (1991) *Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies.* Cancer Cells, 3, 77-85.
- Egeblad, M. & Werb, Z.** (2002) *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.* Nat.Rev.Cancer, 2, 161-174.
- Faller, A.** (1999) *Der Körper des Menschen.* Georg Thieme Verlag, Georg Thieme Verlag.
- Fearon, E. R. & Vogelstein, B.** (1990) *A genetic model for colorectal tumorigenesis.* Cell, 61, 759-767.
- Fidler, I. J. & Ellis, L. M.** (1994) *The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis.* Cell, 79, 185-188.
- Folkman, J.** (1971) *Tumor angiogenesis: therapeutic implications.* N.Engl.J.Med., 285, 1182-1186.
- Folkman, J.** (1995) *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease.* Nat.Med., 1, 27-31.
- Folkman, J., Watson, K., Ingber, D. & Hanahan, D.** (1989) *Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia.* Nature, 339, 58-61.

- Fusenig, N. & Boukamp, P.** (1994) Carcinogenesis studies of human cells: reliable in vitro models. In: *Cell culture in pharmaceutical research* (eds N. Fusenig & H. Graf), pp. 79-102. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Fusenig, N., Boukamp, P. & Breitkreutz, D.** (1990) *In vitro* transformation of human skin epithelial cells: role of ras oncogene in malignant progression. *In vitro*, 4, 627-634.
- Fusenig, N., Boukamp, P., Huelsen, A. & Breitkreutz, D.** *Carcinogenesis of human keratinocytes in vitro: models and mechanisms*. Burgdorf, W. and Katz, S. *Dermatology: progress and perspectives*. 3-7. 1992. New York, The proceedings of the 18th world congress of Dermatology, New York.
- Fusenig, N. E.** *Cell interaction and epithelial differentiation*. Wiley-Liss, Inc, New York, 26-57. 1992.
- Fusenig, N. E. & Boukamp, P.** (1998) *Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes*. *Mol.Carcinog.*, 23, 144-158.
- Fusenig, N. E., Breitkreutz, D., Dzarlieva, R. T., Boukamp, P., Bohnert, A. & Tilgen, W.** (1983) *Growth and differentiation characteristics of transformed keratinocytes from mouse and human skin in vitro and in vivo*. *J.Invest Dermatol.*, 81, 168s-175s.
- Gabbert, H.** (1985) *Mechanisms of tumor invasion: evidence from in vivo observations*. *Cancer Metastasis Rev.*, 4, 293-309.
- Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Frazier, W. A. & Bouck, N. P.** (1990) *A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 87, 6624-6628.
- Grossman, R. M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D. P., May, L. T., Kupper, T. S., Sehgal, P. B. & Gottlieb, A. B.** (1989) *Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 86, 6367-6371.
- Hagemann, T., Robinson, S. C., Schulz, M., Trumper, L., Balkwill, F. R. & Binder, C.** (2004) *Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-(R) dependent upregulation of matrix metalloproteinases*. *Carcinogenesis*.
- Hanahan, D. & Folkman, J.** (1996) *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. *Cell*, 86, 353-364.
- Harris, S. R. & Thorgeirsson, U. P.** (1998) *Tumor angiogenesis: biology and therapeutic prospects*. *In Vivo*, 12, 563-570.
- Heissig, B., Hattori, K., Friedrich, M., Rafii, S. & Werb, Z.** (2003) *Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases*. *Curr.Opin.Hematol.*, 10, 136-141.
- Hemann, U., Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Kurapkat, G., Grotzinger, J., Wollmer, A., Zhong, Z., Darnell, J. E., Jr., Graeve, L., Heinrich, P. C. & Horn, F.** (1996) *Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation*. *J.Biol.Chem.*, 271, 12999-13007.

- Hernandez-Barrantes, S., Bernardo, M., Toth, M. & Fridman, R.** (2002) *Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases*. *Semin.Cancer Biol.*, 12, 131-138.
- Hirai, K., Kumakiri, M., Fujieda, S., Sunaga, H., Lao, L. M., Imamura, Y., Ueda, K. & Fukuda, M.** (2001) *Expression of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in epithelial skin tumors*. *J.Dermatol.Sci.*, 25, 179-188.
- Horii, A., Shimamura, K., Honjo, Y., Mitani, K., Miki, T., Takashima, S. & Yoshida, J.** (1997) *Granulocyte colony stimulating factor-producing tongue carcinoma*. *Head Neck*, 19, 351-356.
- Hornung, J., Bohnert, A., Phan-Tham, L., Krieg, T. & Fusenig, N. E.** (1987) *Basement membrane formation by malignant mouse keratinocyte cell lines in organotypic culture and transplants: correlation with degree of morphologic differentiation*. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, 113, 325-341.
- Ichiishi, E., Yoshikawa, T., Kogawa, T., Yoshida, N. & Kondo, M.** (2000) *Possible paracrine growth of adenocarcinoma of the stomach induced by granulocyte colony stimulating factor produced by squamous cell carcinoma of the oesophagus*. *Gut*, 46, 432-434.
- Janeway, C. & Travers, P.** (1997) *Immunologie*.
- Janowska-Wieczorek, A., Marquez, L. A., Nabholz, J. M., Cabuhat, M. L., Montano, J., Chang, H., Rozmus, J., Russell, J. A., Edwards, D. R. & Turner, A. R.** (1999) *Growth factors and cytokines upregulate gelatinase expression in bone marrow CD34(+) cells and their transmigration through reconstituted basement membrane*. *Blood*, 93, 3379-3390.
- Johansson, N., Ala-aho, R., Uitto, V., Grenman, R., Fusenig, N. E., Lopez-Otin, C. & Kahari, V. M.** (2000) *Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase*. *J.Cell Sci.*, 113 Pt 2, 227-235.
- Joseph, I. B. & Isaacs, J. T.** (1998) *Macrophage role in the anti-prostate cancer response to one class of antiangiogenic agents*. *J.Natl.Cancer Inst.*, 90, 1648-1653.
- Kerbel, R. & Folkman, J.** (2002) *Clinical translation of angiogenesis inhibitors*. *Nat.Rev.Cancer*, 2, 727-739.
- Kerkela, E. & Saarialho-Kere, U.** (2003) *Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer*. *Exp.Dermatol.*, 12, 109-125.
- Kirschner, C. V., Alanis-Amezcu, J. M., Martin, V. G., Luna, N., Morgan, E., Yang, J. J. & Yordan, E. L.** (1996) *Angiogenesis factor in endometrial carcinoma: a new prognostic indicator?* *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 174, 1879-1882.
- Kyo, S., Kanaya, T., Takakura, M. & Inoue, M.** (2000) *A case of cervical cancer with aggressive tumor growth: possible autocrine growth stimulation by G-CSF and Il-6*. *Gynecol.Oncol.*, 78, 383-387.
- Lahav, J.** (1993) *The functions of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology*. *Biochim.Biophys.Acta*, 1182, 1-14.
- Lathers, D. M., Achille, N., Kolesiak, K., Hulett, K., Sparano, A., Petruzzelli, G. J. & Young, M. R.** (2001) *Increased levels of immune inhibitory CD34+ progenitor cells in the peripheral blood of patients with node positive head and neck squamous cell carcinomas and the ability of these CD34+ cells to differentiate into immune stimulatory dendritic cells*. *Otolaryngol.Head Neck Surg.*, 125, 205-212.

- Lederle, W. *Zur Bedeutung von Tumor-Stroma-Interaktionen: Mechanismen der PDGF-induzierten Stroma-Aktivierung und Angiogenese.* Dissertation 2003.
- Leon, S. P., Folkerth, R. D. & Black, P. M. (1996) *Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors.* Cancer, 77, 362-372.
- Liss, C., Fekete, M. J., Hasina, R., Lam, C. D. & Lingen, M. W. (2001) *Paracrine angiogenic loop between head-and-neck squamous-cell carcinomas and macrophages.* Int.J.Cancer, 93, 781-785.
- Liu, M. T., Huang, H. M., Jeng, K. C., Ou, S. C. & Kuo, J. S. (2000) *Induction of cytokine genes and IL-1alpha by chemical hypoxia in PC12 cells.* Life Sci., 67, 2147-2157.
- Lynch, C. C. & Matrisian, L. M. (2002) *Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication.* Differentiation, 70, 561-573.
- Mann, A., Breuhahn, K., Schirmacher, P. & Blessing, M. (2001a) *Keratinocyte-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: Stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation, and vascularization.* J.Invest Dermatol., 117, 1382-1390.
- Mann, A., Breuhahn, K., Schirmacher, P., Wilhelmi, A., Beyer, C., Rosenau, A., Ozbek, S., Rose-John, S. & Blessing, M. (2001b) *Up- and down-regulation of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor activity in murine skin increase susceptibility to skin carcinogenesis by independent mechanisms.* Cancer Res., 61, 2311-2319.
- Mann, E. A., Spiro, J. D., Chen, L. L. & Kreutzer, D. L. (1992) *Cytokine expression by head and neck squamous cell carcinomas.* Am.J.Surg., 164, 567-573.
- Martins-Green, M., Boudreau, N. & Bissell, M. J. (1994) *Inflammation is responsible for the development of wound-induced tumors in chickens infected with Rous sarcoma virus.* Cancer Res., 54, 4334-4341.
- Massi, D., Franchi, A., Borgognoni, L., Paglierani, M., Reali, U. M. & Santucci, M. (2002) *Tumor angiogenesis as a prognostic factor in thick cutaneous malignant melanoma. A quantitative morphologic analysis.* Virchows Arch., 440, 22-28.
- Meade-Tollin, L. C., Boukamp, P., Fusenig, N. E., Bowen, C. P., Tsang, T. C. & Bowden, G. T. (1998) *Differential expression of matrix metalloproteinases in activated c-ras-Ha-transfected immortalized human keratinocytes.* Br.J.Cancer, 77, 724-730.
- Metcalf, D. (1985) *The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors.* Science, 229, 16-22.
- Monschke, F., Muller, W. U., Winkler, U. & Streffer, C. (1991) *Cell proliferation and vascularization in human breast carcinomas.* Int.J.Cancer, 49, 812-815.
- Mueller, M. M. & Fusenig, N. E. (1999) *Constitutive expression of G-CSF and GM-CSF in human skin carcinoma cells with functional consequence for tumor progression.* Int.J.Cancer, 83, 780-789.
- Mueller, M. M. & Fusenig, N. E. (2002) *Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells.* Differentiation, 70, 486-497.
- Mueller, M. M., Herold-Mende, C. C., Riede, D., Lange, M., Steiner, H. H. & Fusenig, N. E. (1999) *Autocrine growth regulation by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human gliomas with tumor progression.* Am.J.Pathol., 155, 1557-1567.

- Mueller, M. M., Peter, W., Mappes, M., Huelsen, A., Steinbauer, H., Boukamp, P., Vaccariello, M., Garlick, J. & Fusenig, N. E.** (2001) *Tumor progression of skin carcinoma cells in vivo promoted by clonal selection, mutagenesis, and autocrine growth regulation by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.* Am.J.Pathol., 159, 1567-1579.
- Mueller, M. M., Werbowetski, T. & Del Maestro, R. F.** *Soluble factors involved in glioma invasion.* Acta Neurochirurgica [online first]. 3-11-2003.
- Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziro, Y., Yamazaki, T., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, M., Nomura, H. & .** (1986a) *Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor.* Nature, 319, 415-418.
- Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, M., Nomura, H. & Yamazaki, T.** (1986b) *The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony-stimulating factor.* EMBO J., 5, 575-581.
- Nishino, H., Miyata, M. & Kitamura, K.** (1998) *The effect of interleukin-6 on enhancing the invasiveness of head and neck cancer cells in vitro.* Eur.Arch.Otorhinolaryngol., 255, 468-472.
- Nishizawa, M., Tsuchiya, M., Watanabe-Fukunaga, R. & Nagata, S.** (1990) *Multiple elements in the promoter of granulocyte colony-stimulating factor gene regulate its constitutive expression in human carcinoma cells.* J.Biol.Chem., 265, 5897-5902.
- Noda, I., Fujieda, S., Ohtsubo, T., Tsuzuki, H., Tanaka, N., Sunaga, H. & Saito, H.** (1999) *Granulocyte-colony-stimulating factor enhances invasive potential of human head-and-neck-carcinoma cell lines.* Int.J.Cancer, 80, 78-84.
- Noser, F. K. & Limat, A.** (1987) *Organotypic culture of outer root sheath cells from human hair follicles using a new culture device.* In Vitro Cell Dev.Biol., 23, 541-545.
- O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H. & Folkman, J.** (1994) *Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma.* Cell, 79, 315-328.
- Obermair, A., Wanner, C., Bilgi, S., Speiser, P., Kaider, A., Reinthaller, A., Leodolter, S. & Gitsch, G.** (1998) *Tumor angiogenesis in stage IB cervical cancer: correlation of microvessel density with survival.* Am.J.Obstet.Gynecol., 178, 314-319.
- Obermueller, E., Vosseler, S., Fusenig, N. E. & Mueller, M. M.** (akzeptiert Sept. 2004) *Cooperative auto- and paracrine functions of G-CSF and GM-CSF in the progression of skin carcinoma cells.* Cancer Res.
- Okada, A., Tomasetto, C., Lutz, Y., Bellocq, J. P., Rio, M. C. & Basset, P.** (1997) *Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing: evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of pro-gelatinase A.* J.Cell Biol., 137, 67-77.
- Ondrey, F. G., Dong, G., Sunwoo, J., Chen, Z., Wolf, J. S., Crowl-Bancroft, C. V., Mukaida, N. & Van Waes, C.** (1999) *Constitutive activation of transcription factors NF-(kappa)B, AP-1, and NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines.* Mol.Carcinog., 26, 119-129.
- Ono, M., Torisu, H., Fukushi, J., Nishie, A. & Kuwano, M.** (1999) *Biological implications of macrophage infiltration in human tumor angiogenesis.* Cancer Chemother.Pharmacol., 43 Suppl, S69-S71.

- Ota, S., Kato, A., Kobayashi, H., Yonezumi, M., Yamaguchi, J., Musashi, M., Imamura, M. & Asaka, M. (1998) *Monoclonal origin of an esophageal carcinosarcoma producing granulocyte-colony stimulating factor: a case report*. *Cancer*, 82, 2102-2111.
- Ozbek, S., Peters, M., Breuhahn, K., Mann, A., Blessing, M., Fischer, M., Schirmacher, P., Mackiewicz, A. & Rose-John, S. (2001) *The designer cytokine hyper-IL-6 mediates growth inhibition and GM-CSF-dependent rejection of B16 melanoma cells*. *Oncogene*, 20, 972-979.
- Pauli, B. U. & Knudson, W. (1988) *Tumor invasion: a consequence of destructive and compositional matrix alterations*. *Hum.Pathol.*, 19, 628-639.
- Pei, X. H., Nakanishi, Y., Takayama, K., Bai, F. & Hara, N. (1999) *Granulocyte, granulocyte-macrophage, and macrophage colony-stimulating factors can stimulate the invasive capacity of human lung cancer cells*. *Br.J.Cancer*, 79, 40-46.
- Pekarek, L. A., Starr, B. A., Toledano, A. Y. & Schreiber, H. (1995) *Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes*. *J.Exp.Med.*, 181, 435-440.
- Pendas, A. M., Folgueras, A. R., Llano, E., Caterina, J., Frerard, F., Rodriguez, F., Astudillo, A., Noel, A., Birkedal-Hansen, H. & Lopez-Otin, C. (2004) *Diet-induced obesity and reduced skin cancer susceptibility in matrix metalloproteinase 19-deficient mice*. *Mol.Cell Biol.*, 24, 5304-5313.
- Polette, M., Nawrocki-Raby, B., Gilles, C., Clavel, C. & Birembaut, P. (2004) *Tumour invasion and matrix metalloproteinases*. *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, 49, 179-186.
- Pollard, J. W. (2004) *Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis*. *Nat.Rev.Cancer*, 4, 71-78.
- Porschen, R., Classen, S., Piontek, M. & Borchard, F. (1994) *Vascularization of carcinomas of the esophagus and its correlation with tumor proliferation*. *Cancer Res.*, 54, 587-591.
- Pugin, J., Widmer, M. C., Kossodo, S., Liang, C. M., Preas, H. L. & Suffredini, A. F. (1999) *Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators*. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, 20, 458-464.
- Ragnhammar, P. (1996) *Anti-tumoral effect of GM-CSF with or without cytokines and monoclonal antibodies in solid tumors*. *Med.Oncol.*, 13, 167-176.
- Rastinejad, F., Polverini, P. J. & Bouck, N. P. (1989) *Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene*. *Cell*, 56, 345-355.
- Ribatti, D., Ennas, M. G., Vacca, A., Ferreli, F., Nico, B., Orru, S. & Sirigu, P. (2003) *Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlate with a poor prognosis in melanoma*. *Eur.J.Clin.Invest*, 33, 420-425.
- Rochet, N., Dubouset, J., Mazeau, C., Zanghellini, E., Farges, M. F., de Novion, H. S., Chompret, A., Delpech, B., Cattani, N., Frenay, M. & Gioanni, J. (1999) *Establishment, characterisation and partial cytokine expression profile of a new human osteosarcoma cell line (CAL 72)*. *Int.J.Cancer*, 82, 282-285.
- Royuela, M., Ricote, M., Parsons, M. S., Garcia-Tunon, I., Paniagua, R. & de Miguel, M. P. (2004) *Immunohistochemical analysis of the IL-6 family of cytokines and their receptors in benign, hyperplastic, and malignant human prostate*. *J.Pathol.*, 202, 41-49.

- Savarese, T. M., Mitchell, K., McQuain, C., Campbell, C. L., Guardiani, R., Wu, J., Ollari, C., Reale, F., Nelson, B. E., Chen, A. & Quesenberry, P. J. (2001) *Coexpression of granulocyte colony stimulating factor and its receptor in primary ovarian carcinomas*. *Cancer Lett.*, 162, 105-115.
- Schmalfeldt, B., Prechtel, D., Harting, K., Spathe, K., Rutke, S., Konik, E., Fridman, R., Berger, U., Schmitt, M., Kuhn, W. & Lengyel, E. (2001) *Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer*. *Clin.Cancer Res.*, 7, 2396-2404.
- Schnur, S. *Interleukin-6 vermittelte Wachstumsveränderungen in der Tumorprogression von Plattenepithelkarzinomen der Haut*. 28-1-2004. Thesis.
- Segawa, K., Ueno, Y. & Kataoka, T. (1991) *In vivo tumor growth enhancement by granulocyte colony-stimulating factor*. *Jpn.J.Cancer Res.*, 82, 440-447.
- Shannon, M. F., Gamble, J. R. & Vadas, M. A. (1988) *Nuclear proteins interacting with the promoter region of the human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor gene*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 85, 674-678.
- Shpitzer, T., Chaimoff, M., Gal, R., Stern, Y., Feinmesser, R. & Segal, K. (1996) *Tumor angiogenesis as a prognostic factor in early oral tongue cancer*. *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.*, 122, 865-868.
- Skobe, M. & Fusenig, N. E. (1998) *Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95, 1050-1055.
- Skobe, M., Rockwell, P., Goldstein, N., Vosseler, S. & Fusenig, N. E. (1997) *Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion*. *Nat.Med.*, 3, 1222-1227.
- Stetler-Stevenson, W. G. & Yu, A. E. (2001) *Proteases in invasion: matrix metalloproteinases*. *Semin.Cancer Biol.*, 11, 143-152.
- Strieth, S., Hartschuh, W., Pilz, L. & Fusenig, N. E. (2000) *Angiogenic switch occurs late in squamous cell carcinomas of human skin*. *Br.J.Cancer*, 82, 591-600.
- Sugimoto, C., Fujieda, S., Sunaga, H., Noda, I., Tanaka, N., Kimura, Y., Saito, H. & Matsukawa, S. (2001) *Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-mediated signaling regulates type IV collagenase activity in head and neck cancer cells*. *Int.J.Cancer*, 93, 42-46.
- Sunderkotter, C., Goebeler, M., Schulze-Osthoff, K., Bhardwaj, R. & Sorg, C. (1991) *Macrophage-derived angiogenesis factors*. *Pharmacol.Ther.*, 51, 195-216.
- Szabowski, A., Maas-Szabowski, N., Andrecht, S., Kolbus, A., Schorpp-Kistner, M., Fusenig, N. E. & Angel, P. (2000) *c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin*. *Cell*, 103, 745-755.
- Tachibana, M., Miyakawa, A., Nakashima, J., Murai, M., Nakamura, K., Kubo, A. & Hata, J. (2000) *Autocrine growth promotion by multiple hematopoietic growth factors in the established renal cell carcinoma line KU-19-20*. *Cell Tissue Res.*, 301, 353-367.
- Takebayashi, Y., Aklyama, S., Yamada, K., Akiba, S. & Aikou, T. (1996) *Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma*. *Cancer*, 78, 226-231.

- Takeda, K., Hatakeyama, K., Tsuchiya, Y., Rikiishi, H. & Kumagai, K.** (1991) *A correlation between GM-CSF gene expression and metastases in murine tumors.* Int.J.Cancer, 47, 413-420.
- The American Society of Clinical Oncology** (1994) *American Society of Clinical Oncology, recommendations for the use of hematopoietic colony stimulating factors: evidence based clinical practice guidelines.* J.Clin.Oncol., 12, 2471-2508.
- Thomas, G. R., Chen, Z., Leukinova, E., Van Waes, C. & Wen, J.** (2004) *Cytokines IL-1 alpha, IL-6, and GM-CSF constitutively secreted by oral squamous carcinoma induce down-regulation of CD80 costimulatory molecule expression: restoration by interferon gamma.* Cancer Immunol.Immunother., 53, 33-40.
- Tomakidi, P., Mirancea, N., Fusenig, N. E., Herold-Mende, C., Bosch, F. X. & Breitkreutz, D.** (1999) *Defects of basement membrane and hemidesmosome structure correlate with malignant phenotype and stromal interactions in HaCaT-Ras xenografts.* Differentiation, 64, 263-275.
- Tomakidi, P., Stark, H. J., Herold-Mende, C., Bosch, F. X., Steinbauer, H., Fusenig, N. E. & Breitkreutz, D.** (2003) *Discriminating expression of differentiation markers evolves in transplants of benign and malignant human skin keratinocytes through stromal interactions.* J.Pathol., 200, 298-307.
- Tomita, T., Fujii, M., Tokumaru, Y., Imanishi, Y., Kanke, M., Yamashita, T., Ishiguro, R., Kanzaki, J., Kameyama, K. & Otani, Y.** (2000) *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor upregulates matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and membrane type-1 MMP (MT1-MMP) in human head and neck cancer cells.* Cancer Lett., 156, 83-91.
- Torisu, H., Ono, M., Kiryu, H., Furue, M., Ohmoto, Y., Nakayama, J., Nishioka, Y., Sone, S. & Kuwano, M.** (2000) *Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha.* Int.J.Cancer, 85, 182-188.
- Tremblay, G.** (1979) *Stromal aspects of breast carcinoma.* Exp.Mol.Pathol., 31, 248-260.
- Tsukuda, M., Nagahara, T., Yago, T., Matsuda, H. & Yanoma, S.** (1993) *Production of granulocyte colony-stimulating factor by head and neck carcinomas.* Biotherapy, 6, 183-187.
- Tsuruta, N., Yatsunami, J., Takayama, K., Nakanishi, Y., Ichinose, Y. & Hara, N.** (1998) *Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor stimulates tumor invasiveness in squamous cell lung carcinoma.* Cancer, 82, 2173-2183.
- Tsuzuki, H., Fujieda, S., Sunaga, H., Noda, I. & Saito, H.** (1998) *Expression of granulocyte colony-stimulating factor receptor correlates with prognosis in oral and mesopharyngeal carcinoma.* Cancer Res., 58, 794-800.
- Vajkoczy, P., Menger, M. D., Goldbrunner, R., Ge, S., Fong, T. A., Vollmar, B., Schilling, L., Ullrich, A., Hirth, K. P., Tonn, J. C., Schmiedek, P. & Rempel, S. A.** (2000) *Targeting angiogenesis inhibits tumor infiltration and expression of the pro-invasive protein SPARC.* Int.J.Cancer, 87, 261-268.
- van Kempen, L. C. & Coussens, L. M.** (2002) *MMP9 potentiates pulmonary metastasis formation.* Cancer Cell, 2, 251-252.
- van Kempen, L. C., Rhee, J. S., Dehne, K., Lee, J., Edwards, D. R. & Coussens, L. M.** (2002) *Epithelial carcinogenesis: dynamic interplay between neoplastic cells and their microenvironment.* Differentiation, 70, 610-623.

- van Kempen, L. C., Ruiter, D. J., van Muijen, G. N. & Coussens, L. M. (2003) *The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution*. Eur.J.Cell Biol., 82, 539-548.
- von Stebut, E., Metz, M., Milon, G., Knop, J. & Maurer, M. (2003) *Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1alpha / beta released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNFalpha*. Blood, 101, 210-215.
- Vosseler, S. *Tumorigenese, Vaskularisierung und Invasion: Tumor-Stroma Interaktionen während der malignen Tumor-Progression*. Dissertation. 2001.
- Wahl, L. M. & Kleinman, H. K. (1998) *Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy*. J.Natl.Cancer Inst., 90, 1583-1584.
- Wahl, L. M., Shankavaram, U. & Zhang, Y. (1997) *Role of macrophages in vascular tissue remodelling*. Transpl.Immunol., 5, 173-176.
- Weidner, N. (1995) *Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer*. Am.J.Pathol., 147, 9-19.
- Weidner, N. (1998) *Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow*. J.Pathol., 184, 119-122.
- Weidner, N., Carroll, P. R., Flax, J., Blumenfeld, W. & Folkman, J. (1993) *Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma*. Am.J.Pathol., 143, 401-409.
- Weidner, N., Folkman, J., Pozza, F., Bevilacqua, P., Allred, E. N., Moore, D. H., Meli, S. & Gasparini, G. (1992) *Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma*. J.Natl.Cancer Inst., 84, 1875-1887.
- Werb, Z., Vu, T. H., Rinkenberger, J. L. & Coussens, L. M. (1999) *Matrix-degrading proteases and angiogenesis during development and tumor formation*. APMIS, 107, 11-18.
- Wislez, M., Fleury-Feith, J., Rabbe, N., Moreau, J., Cesari, D., Milleron, B., Mayaud, C., Antoine, M., Soler, P. & Cadranel, J. (2001) *Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor prolong the survival of neutrophils infiltrating bronchoalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma*. Am.J.Pathol., 159, 1423-1433.
- Wu, L., Tanimoto, A., Murata, Y., Fan, J., Sasaguri, Y. & Watanabe, T. (2001) *Induction of human matrix metalloproteinase-12 gene transcriptional activity by GM-CSF requires the AP-1 binding site in human U937 monocytic cells*. Biochem.Biophys.Res.Comm., 285, 300-307.
- Yeo, T. K., Brown, L. & Dvorak, H. F. (1991) *Alterations in proteoglycan synthesis common to healing wounds and tumors*. Am.J.Pathol., 138, 1437-1450.
- Yoshino, S., Kato, M. & Okada, K. (1995) *Prognostic significance of microvessel count in low stage renal cell carcinoma*. Int.J.Urol., 2, 156-160.
- Young, M. R., Wright, M. A., Lozano, Y., Prechel, M. M., Benefield, J., Leonetti, J. P., Collins, S. L. & Petruzzelli, G. J. (1997) *Increased recurrence and metastasis in patients whose primary head and neck squamous cell carcinomas secreted granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and contained CD34+ natural suppressor cells*. Int.J.Cancer, 74, 69-74.
- Yuan, J. & Glazer, P. M. (1998) *Mutagenesis induced by the tumor microenvironment*. Mutat.Res., 400, 439-446.

Yuan, J., Narayanan, L., Rockwell, S. & Glazer, P. M. (2000) *Diminished DNA repair and elevated mutagenesis in mammalian cells exposed to hypoxia and low pH*. *Cancer Res.*, 60, 4372-4376.

Yuspa, S. H. (1994) *The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis--thirty-third G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture*. *Cancer Res.*, 54, 1178-1189.

Zhang, Y., McCluskey, K., Fujii, K. & Wahl, L. M. (1998) *Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TNF-alpha, granulocyte-macrophage CSF, and IL-1 beta through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms*. *J.Immunol.*, 161, 3071-3076.

Ziegler, A., Jonason, A. S., Leffell, D. J., Simon, J. A., Sharma, H. W., Kimmelman, J., Remington, L., Jacks, T. & Brash, D. E. (1994) *Sunburn and p53 in the onset of skin cancer*. *Nature*, 372, 773-776.

8 Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
2-D	zweidimensional
3-D	dreidimensional
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Genregulationsprotein, bestehend aus Proto-Onkogenen fos und jun
BCC	Basalzellkarzinom
bFGF	basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor
Bp	Basenpaare
BrdC	Bromdesoxycytosin
BrdU	Bromdesoxyuridin
ca.	Zirka (ungefähr)
Ca ²⁺	zweiwertige Calciumionen
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
cm ³	Kubikzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
d.h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxygenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Minimum Essential Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
ECM	extrazelluläre Matrix

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermis-Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme-Linked Immuno-Assay
EMMPRIN	Extrazellulärer MMP Induktor
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm bzw. Gravitationskonstante
GAP-DH	Glycerin-aldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten Kolonie-Stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor
h	Stunde
HaCaT	<u>H</u> umane <u>a</u> dulte Keratinozyten/ wenig <u>C</u> alcium/ erhöhte <u>T</u> emperatur
HeLa	Helen Lane (Spenderin der Zellen)
IF	Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
ISH	In Situ Hybridisierung
k.o.	„knock-out“
KBM	Keratocyte Basal Medium
KCL	Kaliumchlorid
kD	Kilo Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
m ²	Quadratmeter
MCP-1	Monozyten Chemotaktisches Protein-1
MEM	Modified Eagle´s Minimum Essential Medium
Mg ²⁺	zweiwertige Magnesiumionen
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mM	Millimolar
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
MT-MMP	Membrane Type Matrix Metalloproteinase
N ₂	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid

NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	nukleärer Faktor κB
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Blutplättchen-Wachstumsfaktor
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
pH	Potential der Wasserstoffionen
ras	Proto-Onkogen, GTP-bindendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Rotationen pro Minute
RPMI	Medium, entwickelt im <u>R</u> osweli <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
s.c.	Subkutan
SCC	Plattenepithelkarzinom
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM-Aktin	Glattmuskuläres (Smooth muscle) Aktin
SSC	Sodium Sodiumcitrat
TAM	Tumor assoziierter Makrophage
TGF-β1	Transformierender Wachstumsfaktor-β1
TIMP	Gewebe Inhibitor der Matrix Metalloproteinasen
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Triton X-100	Octylphenoethylenglycolether
tRNA	Transfer RNA
TSP-1	Thrombospondin-1

Tween-20	Polyoxyethylensorbitmonolaurat
U	Unit (Maß für biologische Aktivität)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
VEGF	Vaskulärer Endothel Wachstumsfaktor
z.B.	zum Beispiel
α	Alpha
β	Beta
κ	Kappa

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Norbert E. Fusenig möchte ich für die Aufnahme in seine Abteilung danken, für sein Engagement für seine Doktoranden, die Bereitstellung eines gut ausgestatteten Arbeitsplatzes und für sein großes Interesse an dem Fortschreiten dieser Arbeit.

Meiner „Doktormutter“ Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz danke ich für die Betreuung dieser im DKFZ durchgeführten Doktorarbeit und für ihre konstruktiven Beiträge zum Projekt.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Margareta M. Müller für das interessante Thema zur Dissertation, konstruktive Diskussionen und Beiträge, „mütterliche Betreuung“ und natürlich für den nie versiegenden Vorrat an Schokolade und anderer Nervennahrung!

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Hans-Jürgen Stark für fachliche Kompetenz, kreative Lösungsansätze bei unlösbaren Problemen und Diskussionen über fliegende Schnecken bedanken. Hans-Jürgen, was würden wir nur ohne Dich tun?

Bei Nicole möchte ich mich für viele leckere Abende im Thai oder bei Selbstgekochem zu Hause, für schöne und erholsame Urlaube und für gelegentliches von-der-Palme-holen bedanken! Willi und Maren danke ich für die schnelle und kompetente Einweisung in die Geheimnisse und Methoden des Fusenig-Labors. Silvia danke ich für ihre Unterstützung bei der Durchführung des MMP-Projekts und ihr offenes Ohr bei allen dabei auftretenden Fragen und Problemen. Der ganzen übrigen Mensa- und Botanik-Clique, sprich Martina, Karsten, Sonja, Cathrine, Michael, Joachim, Sabine, Ana, Martina und Claudia danke ich für unzählige lustige, lehrreiche, absurde und auch nachdenkliche Mittagspausen!

Herzlich danken möchte ich auch Heinrich Steinbauer für die zuverlässige und kompetente Betreuung der Tierversuche und Alexandra Krämer für ihre Hilfe, wenn die Woche mal wieder nicht genug Stunden hatte!

Zum Schluss möchte ich meiner Familie sehr herzlich für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen in mich danken!

10 CURRICULUM VITAE

Eva Obermüller

Persönliche Daten

Geboren 10.05.1975 in Frankfurt/Main

Familienstand ledig

Schule

1980-1984 Burg-Schule, Eppstein

1984-1986 Freiherr-von-Stein Schule, Eppstein

1986-1992 Leibniz-Gymnasium, Höchst

1992-1995 Friedrich-Dessauer-Gymnasium, Höchst

21.6.1995 Abitur

Studium

1995-2000 **Biologie Studium**, Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt.

22.9.1997 **Vordiplom**

18.10.-01.11.1999 **Diplomprüfungen**
Hauptfach: Zoologie
Nebenfächer: Anthropologie und Humangenetik, Toxikologie

Dez 1999-Jun 2000 **Diplomarbeit**, Arbeitskreis Neurochemie, Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt. Thema: „Analyse der Expression synaptischer Proteine in astrozytären Zellen“.

Dissertation

Dez 2000-Okt 2004 **Thema: „Veränderte Wachstumsfaktorexpression in der Tumorprogression humaner Plattenepithelkarzinome der Haut: Einfluss auf Tumor-Stroma Interaktion, Invasion und Angiogenese“.**
Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Abteilung Differenzierung und Karzinogenese, Prof. Dr. Norbert E. Fusenig, Arbeitsgruppe Tumor- und Mikroumgebung, Dr. Margareta Müller.