

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten – Allgemeine Dermatologie und
Venerologie

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. T. A. Luger -

**Die Rolle der Proteinase-aktivierten Rezeptoren bei der
Invasivität von Melanomzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Porowski, Katharina Anna

aus Opoln/Polen

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. V. Arolt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. W. Schneider

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. L. Figgenger

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. T. A. Luger -
Referent: Prof. Dr. med. S. W. Schneider
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. L. Figgner

ZUSAMMENFASSUNG

Die Rolle der Proteinase-aktivierten Rezeptoren bei der Invasivität von Melanomzellen

Porowski, Katharina Anna

Maligne Tumoren zeichnen sich durch ihr invasives Verhalten, d.h. aktives Einwachsen von Tumorzellen in benachbartes Gewebe, aus.

In dieser Arbeit wurde der elektrische transepitheliale Widerstand (TEER) einer gut erforschten Nierenepithelzelllinie, der C7-Klon der Madin-Darby Canine Kidney Zellen (MDCK), als Parameter für die Invasion des epithelialen Monolayers durch verschiedene Melanomzelllinien benutzt. Insbesondere sollte der Einfluss von Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PARs), unter Verwendung von Melanomzellen mit einem Zusatz von PAR-Agonisten, auf die Invasivität untersucht werden.

Die Applikation von Melanomzellen, mit oder ohne einen Zusatz von PAR-Agonisten, auf die apikale Seite des Monolayers, d.h. direkt auf die C7-Zellen, führte zu einem transepithelialen Widerstandsabfall.

Die ersten Ergebnisse wiesen auf einen Zusammenhang zwischen der Zellzahl der Melanomzelllinie A7 und dem zeitlichen Beginn der Invasion hin. Bei einer Zellzahl von einer Million war der TEER-Abfall bereits nach 24 Stunden deutlich sichtbar. Bei 100.000 Zellen erst nach 48 Stunden.

Bei weiteren Experimenten wurden vier Melanomzelllinien (A7, A375, Wm9, Wm35) auf ihre Invasivität untersucht. Alle vier Zellarten führten zu einem Zusammenbruch des TEER, wobei erst nach einem längeren Zeitintervall ein Unterschied zwischen den einzelnen Melanomzelllinien sichtbar wurde.

Bei Untersuchungen mit einem Zusatz von PAR1- oder PAR2-Agonisten, wiesen die Melanomzellen ein invasiveres Verhalten auf als ohne. Bei Kontrollversuchen ohne einen Zusatz von Melanomzellen oder nur mit dem alleinigen Zusatz von PAR-Agonisten blieb der TEER unbeeinträchtigt oder stieg weiter an.

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2008

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Tumoren.....	1
1.2 Tumormetastasierung.....	2
1.3 Ziel der Arbeit.....	4
2 Methoden und Versuche.....	5
2.1 Verwendete Zelltypen.....	5
2.1.1 MDCK-C7-Zellen.....	5
2.1.2 A7-Zellen.....	6
2.1.3 A375-Zellen.....	8
2.1.4 Wm9-Zellen.....	9
2.1.5 Wm35-Zellen.....	10
2.2 Methoden der Zellkultivierung.....	12
2.2.1 Allgemeine Anmerkungen zur Zellkultivierung.....	12
2.2.2 Kulturmedium und Mediumwechsel.....	12
2.2.3 Passagieren von Zellen.....	13
2.2.4 Anlegen und Handhabung der Multiwellplatten mit Mikrofiltern.....	15
2.2.5 Eigenschaften der Mikrofilter.....	17
2.3 Versuchsabläufe.....	18
2.3.1 Transepitheliale Widerstände.....	18
2.3.2 Messgerät.....	21
2.3.3 Durchführung einer Messung mit der STX-Elektrode	23
2.3.4 Applikation von Melanomzellen in das obere Medium	24
2.4 Statistik.....	26

3	Ergebnisse.....	27
3.1	Experimente mit A7-Zellen unterschiedlicher Zelldichte.....	27
3.1.1	C7-Zellen.....	27
3.1.2	C7-Zellen + Melanomzelllinie A7 mit Zelldichte von 100 000..	27
3.1.3	C7-Zellen + Melanomzelllinie A7 mit Zelldichte von 1 Mio.....	27
3.2	Experimente mit unterschiedlichen Melanomzelllinien.....	30
3.2.1	C7-Zellen.....	30
3.2.2	C7-Zellen + Melanomzelllinie A375.....	30
3.2.3	C7-Zellen + Melanomzelllinie Wm9.....	30
3.2.4	C7-Zellen + Melanomzelllinie Wm35.....	30
3.3	Experimente mit dem Zusatz von PAR-Agonisten.....	35
3.3.1	C7-Zellen.....	35
3.3.2	C7-Zellen + Melanomzelllinie A7.....	35
3.3.3	C7-Zellen + Melanomzelllinie A7 + PAR1-Agonisten	35
3.3.4	C7-Zellen + Melanomzelllinie A7 + PAR2-Agonisten	35
3.3.5	C7-Zellen + Melanomzelllinie Wm9.....	35
3.3.6	C7-Zellen + Melanomzelllinie Wm9 + PAR1-Agonisten.....	35
3.3.7	C7-Zellen + Melanomzelllinie Wm9 + PAR2-Agonisten.....	35
3.3.8	C7-Zellen + PAR1-Agonisten.....	35
3.3.9	C7-Zellen + PAR2-Agonisten.....	35
4	Diskussion.....	42
4.1	Invasivität von Melanomzellen.....	42
4.2	Proteinase-aktivierte Rezeptoren.....	45
4.3	Einfluss der PAR-Rezeptoren auf die Invasivität.....	50
5	Anhang.....	55
5.1	Methodischer Anhang.....	55
5.5.1	Medien und Lösungen.....	55
5.5.2	Inhaltsstoffe.....	57
5.2	Literaturverzeichnis.....	58
5.3	Danksagung.....	73
5.4	Curriculum Vitae.....	74

Abbildungsverzeichnis

Methoden und Versuche

- Abb. 1:** C7-Zellen
- Abb. 2:** A7-Zellen
- Abb. 3:** A375-Zellen
- Abb. 4:** Wm9-Zellen
- Abb. 5:** Wm35-Zellen
- Abb. 6:** Vereinfachte Multiwellplatte mit sechs Kavitäten (ohne Deckel)
- Abb. 7:** Schaltbild: Zusammensetzung des TEER aus Einzelwiderständen
- Abb. 8:** Schema der Elektrodenanordnung und Feldlinien am Mikrofiltereinsatz
- Abb. 9:** Versuchsaufbau zur Messung transepithelialer Widerstände

Ergebnisse

- Abb. 1:** TEER-Graph: A7-Zellen unterschiedlicher Zelldichte
- Abb. 2:** TEER-Graph: Wm9-, Wm35- und A375-Zellen
- Abb. 2a:** Zusammenfassung: Änderung der TEER nach 30 h (Kurzeffekt)
- Abb. 2b:** Zusammenfassung: Änderung der TEER nach 47 h (Langeffekt)
- Abb. 3:** TEER-Graph: PAR2
- Abb. 3a:** Zusammenfassung: Änderung der TEER nach 24 h (Kurzeffekt)
- Abb. 3b:** Zusammenfassung: Änderung der TEER nach über 140 h (Langeffekt)

Abkürzungsverzeichnis

A7	Klon 7 der amelanotic melanoma cells
AMM	amelanotisches Melanom
μAmp	Mikroampere
AP	aktivierende Peptide
APC	aktivierendes Protein C
BM	Basalmembran
C7	Klon 7 der MDCK-Zellen
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s Medium
ECA	endotheliale Zellaktivierung
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EM	extrazelluläre Matrix
EVOM	Elektrovoltohmmeter
FCS	fetales Kälberserum „Gold“
g	Gramm
xg	x-faches der Erdbeschleunigung ($g=9,81 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$)
Gges	Gesamtleitfähigkeit
GPCRc	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
h	Stunde
I	elektrischer Strom
K10	Keratin 10
μl	Mikroliter
l	Liter
lat.	lateinisch
μm	Mikrometer
MDCK	Madin-Darby canine Kidney
min	Minuten
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
PAR	protease-activated receptor (Proteinase-aktivierter Rezeptor)
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)

Pen	Penicillin
PET	Polyethylentetraphtalat
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor
R	elektrischer Widerstand
R _a	apikaler Widerstand
R _b	basaler Widerstand
R _c	transzellulärer Widerstand
RGP	radial wachsende Phase
R _i	Widerstand des Interzellulärtraumes
R _p	parazellulärer Widerstand
R _t	Widerstand der tight junctions
SSM	oberflächlich spreitendes Melanom
Str	Streptomycin
TEER	transepithelial electrical resistance (elektrischer transepithelialer Widerstand)
TGF-β1	Transforming Growth Factor-beta 1
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TJs	tight junctions
U	elektrische Spannung
VGP	vertikal wachsende Phase
v/v	volume per volume (Volumenprozent)
vWF	Von Willebrand Faktor

1 Einleitung

1.1 Tumoren

Die Vermehrung und Differenzierung, sowie das Wachstum und der Tod von Zellen sind essentielle physiologische Voraussetzungen des Lebens und Überlebens mehrzelliger Organismen. Treten Störungen in diesem Gleichgewicht auf, die nicht behoben werden, so führen diese nach einer längeren Zeit zum Tode.

Eine abnorme Gewebsmasse, die durch unkontrollierte und fortschreitende Vermehrung von körpereigenen entarteten Zellen entsteht, wird als Tumor (lat.: Schwellung, Geschwulst) bezeichnet. Die Tumorzellen entwickeln sich in der Regel aus somatischen Zellen infolge genetischer Mutationen, die zu transformierten Zellen mit gestörter Wachstumskontrolle und Differenzierung führen. Jeder Tumor besteht aus dem Tumorparenchym, den eigentlichen Tumorzellen, und aus Tumorstroma, einem nicht tumorösen, gefäßhaltigen Bindegewebe. Der Prozess der Tumorentstehung wird als Kanzerogenese bezeichnet.

Nach ihrem biologischen Verhalten in Beziehung zu ihrem Wirtsorganismus werden Tumoren prinzipiell in gutartige (benigne) und bösartige (maligne) Geschwülste eingeteilt. Man spricht in diesem Zusammenhang von der Dignität der Tumoren. Benigne Tumoren sind durch ihr expansiv-verdrängendes, langsames Wachstum und ihre gute Abgrenzbarkeit gegenüber dem intakten Gewebe gekennzeichnet. Sie weisen eine hohe Differenzierung auf und sind nicht befähigt Metastasen zu bilden. Maligne Tumoren zeichnen sich durch schnelleres, sowie infiltrierendes und destruierendes Wachstum in das gesunde Nachbargewebe aus. Sie weisen eine geringe und atypische Differenzierung auf. Außerdem besitzen sie die Fähigkeit, Metastasen zu bilden [49].

1.2 Tumormetastasierung

Entscheidend für den Verlauf maligner Tumorerkrankungen und damit für die Prognose der betroffenen Patienten, ist die Fähigkeit der Tumoren, Metastasen zu bilden [48]. Metastasen treten in vier häufigen klinischen Situationen auf:

- der Primärtumor ist entfernt und nach wenigen Monaten tritt die Metastasierung ein
- der Primärtumor wird entfernt und erst nach 5-10 Jahren tritt eine Metastasierung ein
- zum Zeitpunkt der Primärdiagnose liegen schon Metastasen vor
- Metastasen treten zuerst auf und der Primarius bleibt okkult

Welche Faktoren diese Formen der Metastasierung regulieren ist noch ungeklärt, sowie das Verteilungsmuster an den metastatischen Absiedlungen. Knochen, Nebennieren und Gehirn, die einen relativ geringen Anteil an der Blutzufuhr haben, werden relativ häufig von einer Metastasierung befallen. Bei Herz, Muskeln, Nieren und Darm, die den größten Teil des Herzminutenvolumens benötigen, sind relativ selten metastatische Absiedlungen auffällig [81].

Als Metastasierung wird allgemein die Verschleppung von Tumorzellen in andere Bereiche des Organismus und ein damit verbundenes An- und Weiterwachsen in dieser Lokalisation bezeichnet. Die Metastasierung kann hämatogen, kavitär oder lymphogen erfolgen. Der Prozess der Metastasierung ist ein hochkomplexer und außerordentlich dynamischer Vorgang, der entscheidend von der Interaktion der Tumorzellen mit den unterschiedlichen Komponenten des Wirtsgewebes abhängt [20].

Schematisch lässt sich dieser Prozess in zahlreiche, aufeinanderfolgende Teilschritte untergliedern. Am Anfang dieser Metastasierungskaskade steht die Loslösung einzelner Tumorzellen aus dem Primärtumor, die sogenannte Tumorzelldissoziation. Dieser Dissoziation folgt die Tumordinvasion in das angrenzende Wirtsgewebe. Invasion ist eine aktive Translokation von Tumorzellen über Barrieren von extrazellulären Matrixproteinen. Der Invasion

folgt der Einbruch in Blut- und Lymphgefäße, die sogenannte Intravasation. Im Gefäßsystem angelangt, werden die Tumorzellen über den Blut- und Lymphstrom in verschiedene Zielorgane verteilt und dort arretiert. Dem Tumorzellarrest folgen die Extravasation und schließlich die Sekundärinvasion des Zielorgans [48].

Die Invasivität bzw. Aggressivität eines Tumors hängt unmittelbar von der Fähigkeit der einzelnen Tumorzelle zur Bildung verschiedener, proteolytischer Enzyme ab, die zur Auflösung der extrazellulären Matrix führen und durch die Zerstörung der Basalmembran ein Eindringen in Körperhöhlen, Blut- oder Lymphgefäße ermöglichen [47,58]. Die Proteasen, die in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen, lassen sich im Wesentlichen in vier Gruppen einteilen:

- Matrix-Metalloproteinasen (Zn^{2+} oder Mn^{2+})
- Serin-Proteinasen (Thrombin, Cathepsin G, Trypsin)
- Cysteinyl-Proteinasen (Kathepsin B, Calpaine)
- Aspartyl-Proteinasen (Pepsin, Kathepsin D)

Alle vier Klassen können an einem oder mehreren Schritten des Metastasierungsprozesses beteiligt sein, wobei den Matrix-Metalloproteinasen (MMP's) eine besondere Bedeutung zugesprochen wird. Neben den Proteasen existieren zugleich unspezifische (z.B.: α_2 -Makroglobulin) und spezifische (z.B.: tissue inhibitors of metalloproteinases „TIMPs“) Inhibitoren, die für die Hemmung der Proteasen verantwortlich sind.

Die Mechanismen der Invasion können ebenfalls unter physiologischen Bedingungen bei nicht malignen Zellen, wie z.B. bei der Embryogenese, beobachtet werden. Hierbei wird ein Gleichgewicht zwischen der Produktion proteolytischer Enzyme und ihrer Inhibitoren gehalten. Bei malignen Geschehen kommt es jedoch zu einer Imbalance stimulatorischer und inhibitorischer Faktoren, die zugunsten der Proteasen verschoben wird, und somit zur Degradierung der EM und zum Durchbrechen des Zellverbandes führt [81].

1.3 Ziel der Arbeit

Ziel dieser experimentellen Arbeit war es, die Invasivität von Tumorzellen mit Hilfe eines Invasions-Assays „in vitro“ zu bestimmen. Das Verfahren beruht auf dem hohen elektrischen transepithelialen Widerstand (TEER) einer Nierenepithelzelllinie, der bei Kontakt mit invasiven, proteasessezernierenden Melanomzellen zusammenbricht. Bei den Messungen des elektrischen transepithelialen Widerstandes handelt es sich um eine sehr sensitive Methode. Bereits nach wenigen Stunden können Veränderungen des transepithelialen Widerstandes gemessen werden, obwohl in der polarisationsmikroskopischen Inspektion noch keine morphologischen Defekte im Zellrasen nachgewiesen werden können, selbst wenn der Ausgangswiderstand bereits halbiert ist [94].

Zum einen wurde der Frage nachgegangen, ob die Zellzahl der Melanomzellen einen Einfluss auf die Invasivität ausübt und in welchem Zeitrahmen diese sich vollzieht.

Zum anderen wurden bei den Experimenten verschiedene Melanomzellarten eingesetzt und ihr unterschiedliches Aggressivitätsverhalten untersucht.

Darüber hinaus wurde ein weiteres und zugleich das Hauptziel dieser Versuchsreihe verfolgt. Hierbei sollte durch den zusätzlichen Einsatz von PAR-Agonisten ihr Einfluss auf die Invasivität von Melanomzellen und somit auf den elektrischen transepithelialen Widerstand überprüft werden. PARs sind Proteinase-aktivierte Rezeptoren, die bei der Tumorentwicklung und der Aggressivität von Melanomzellen eine wichtige Rolle spielen [125] und daher bei diesen Experimenten untersucht wurden.

2 Methoden und Versuche

2.1 Verwendete Zelltypen

2.1.1 MDCK-C7-Zellen

Die MDCK-Zellen sind eine gut erforschte Epithelzelllinie, die 1958 von Madin und Darby aus der Niere eines Cockerspaniels isoliert wurde [96]. Sie stammen aus dem renalen Sammelrohr und bestehen aus zwei verschiedenen Subtypen, der C7- und C11-Zelllinie. Die C7-Monolayer zeigen hohe transepitheliale Widerstände und sezernieren Kalium, wohingegen C11-Monolayer einen niedrigen transepithelialen Widerstand aufweisen und Chlorid in das apikale Medium abgeben. Der C7-Subtyp der MDCK-Zellen gleicht den Hauptzellen und der C11-Subtyp den Zwischenzellen (interkalierenden Zellen) des Sammelrohres. Die Hauptzellen stehen im Zusammenhang mit der Kaliumsekretion und der Natriumabsorption, wohingegen Zwischenzellen für den transepithelialen Säure-Basentransport zuständig sind [55].

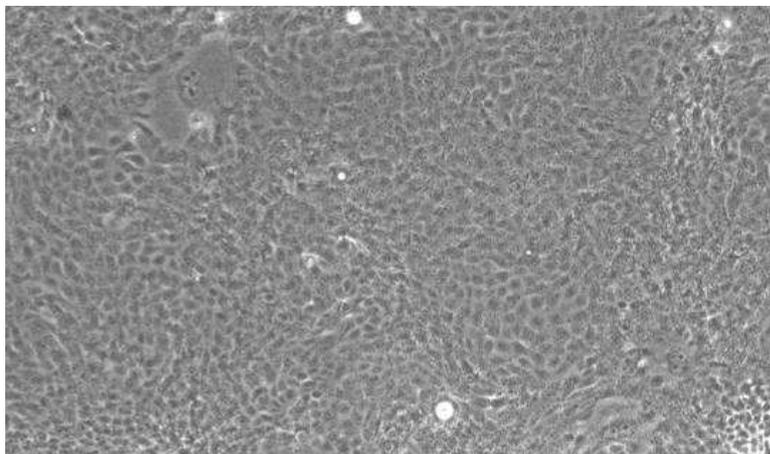


Abb. 1: C7-Zellen

Eine phasenkontrastmikroskopische Aufnahme konfluenter C7-Zellen bei 10facher Vergrößerung.

MDCK-Zellen weisen viele strukturelle und funktionelle Eigenschaften eines transportierenden Epithels auf. In Kulturschalen bilden diese Zellen einen konfluenten Zellrasen mit typischen epithelialen, interzellulären Verbindungen. Es differenziert sich bei den C7-Zellen eine basolaterale Seite zur Unterfläche (Kulturschale) und eine spärlich mit Mikrovilli besetzte, apikal zum Kulturmedium gerichtete Oberseite.

2.1.2 A7-Zellen

Amelanotische Melanomzellen (AMM) sind eine seltene Variation maligner Melanome. Sie zeichnen sich durch ein vollkommenes Fehlen der Melaninbildung aus und sind klinisch schwer zu diagnostizieren. Einwandfrei sind sie häufig erst nach der histologischen Untersuchung von Exzidaten zu identifizieren. AMM verhalten sich biologisch aggressiver als pigmentierte Tumore und haben nicht zuletzt wegen ihrer späten Erkennung eine schlechtere Prognose. Der Grund für die fehlende Melaninbildung ist noch weitgehend ungeklärt [18].

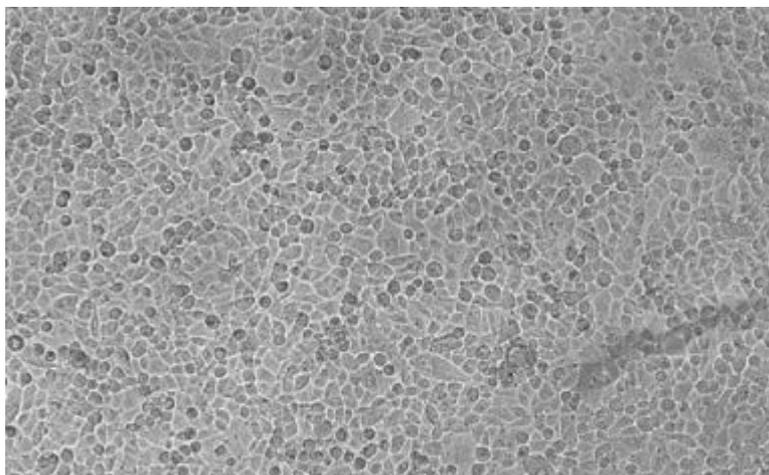


Abb. 2: A7-Zellen

Eine phasenkontrastmikroskopische Aufnahme konfluenter A7-Zellen bei 10facher Vergrößerung.

In der Nomenklatur werden aus Melanozyten hervorgehende Tumoren zu den neuroektodermalen Tumoren gezählt. Der Grund hierfür besteht in dem neuroektodermalen Ursprung der Melanozyten. Innerhalb der ersten drei Entwicklungsmonate wandern Zellen aus der Neuralleiste in die Epidermis ein, die Melanin synthetisieren und über zytoplasmatische Fortsätze an andere Zellen der Epidermis übertragen können [89].

Die vorliegenden A7-Klone wurden mit einem Plasmid transfiziert, das für ein geneticinresistenzvermittelndes Protein und ein „actin-binding protein“ (ABP) codiert. Das ABP vernetzt zum einen die Aktinfilamente untereinander und vermittelt zum anderen die Interaktion zwischen Aktinfilamentsystem, sowie Glykoproteinen der Plasmamembran [38]. Melanomzellen ohne ABP besitzen keine effektive Möglichkeit zur Lokomotion. Offenbar geht die maligne Zelltransformation bei vielen Zellarten mit einer veränderten Expressionsfrequenz von Genen einher, die entweder den Umsatz des Aktinfilamentsystems (z.B. Gelsolin) erhöhen oder die Interaktion zwischen Membran und Aktinfilamenten vermitteln (ABP) [37]. Das Kulturmedium des A7-Klons der amelanotischen Melanomzellen enthält einen Geneticinzusatz. Geneticin ist ein analoges Aminoglykosid zu Gentamycin und wird in der Molekulargenetik als selektierendes Agens verwendet. Geneticin wirkt sowohl auf Prokaryonten als auch auf Eukaryonten toxisch. In diesem Fall übt es einen Selektionsdruck auf A7-Zellen aus, die nicht zu Lokomotion befähigt sind [38].

Zellen mit einem geringeren Energieaufwand bei der Synthese konstitutiv transkribierter Proteine haben einen Selektionsvorteil. Entsprechend hätten Zellen mit ABP-Synthese, d.h. mit erhöhter Lokomotion einen Nachteil gegenüber Zellen ohne das ABP-Gen. Das Geneticin übt jedoch einen Selektionsdruck auf die Zellen ohne ABP aus und sorgt somit für gleichbleibende Eigenschaften der transfizierten A7-Zellen.

Diese Melanomzelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. A. Schwab aus dem Physiologischen Institut der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt [94].

2.1.3 A375-Zellen

Bei diesem Subklon handelt es sich um eine humane Melanomzelllinie. Diese Zelllinie entspricht morphologisch den epithelialen Zellen [33,56,57,117], obwohl Melanomzellen zu Melanozyten gehören, die der Neuralleiste entstammen und sich in der Epidermis befinden [10,80].

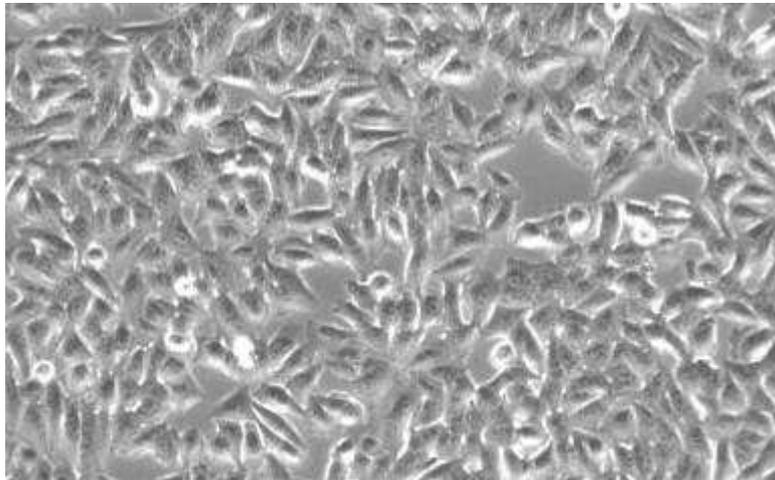


Abb. 3: A375-Zellen

Eine phasenkontrastmikroskopische Aufnahme konfluenter A375-Zellen bei 10facher Vergrößerung.

Die Zell-Adhäsion wird mittels N-Cadherin, einem Calcium-abhängigen Molekül, vermittelt. N-Cadherin ist ein stark glykosiliertes Protein, dessen Kohlenhydratzusammensetzung in den verschiedenen Melanom-Zelltypen variiert. Bei den A375-Zellen enthält das N-Cadherin eine drei- oder vierfach fächerartige, komplexe Glykanform. Außerdem umfasst das Molekül komplexe Ketten mit α 2,3 verknüpfter N-Acetylneuraminsäure [31].

Die A375-Zellen sind in der Haut nachweisbar und können zur Entstehung eines malignen Melanoms führen. Ihre krebserzeugende Wirkung konnte in immunsupprimierten Mäusen nachgewiesen werden. Die zytogenetische Analyse legt dar, dass es sich um ein Hypotriploid handelt mit einer modalen Anzahl von 62 Chromosomen. Es gibt 9 Markerchromosomen, die allgemein in jeder Zelle gefunden werden können, sowie normale Chromosomen N2, N6 und N22, die in einer Kopie pro Zelle vorzufinden sind [33,56,57,117].

2.1.4 Wm9-Zellen

Wm9-Zellen, die auch bei den von mir durchgeführten Versuchen untersucht wurden, werden ebenfalls einer humanen Melanomzelllinie zugeordnet. Die Zellart wurde freundlicherweise von Dr. M. Herlyn (The Wistar Institute, Philadelphia, PA) zur Verfügung gestellt [16].

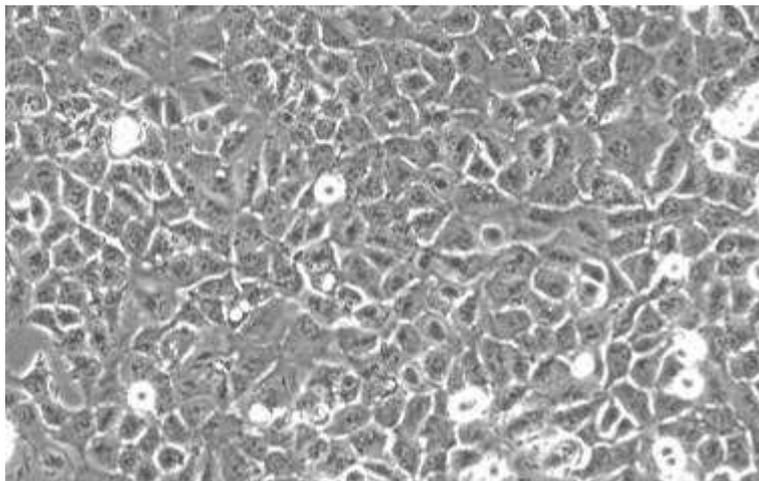


Abb. 4: Wm9-Zellen

Eine phasenkontrastmikroskopische Aufnahme konfluenter Wm9-Zellen bei 10facher Vergrößerung.

Mittels N-Cadherin wird auch bei diesem Subklon die interzelluläre Haftung gewährleistet. Die Kohlenhydratzusammensetzung, sowie deren Verknüpfung stimmt mit der der A375-Melanomzellen überein. Im Vergleich mit den übrigen

Melanomzellen sind Differenzen in der Zusammensetzung und der Verknüpfung erkennbar [31].

Die Wm9 kommen in der menschlichen Haut vor und man unterscheidet hier, sowie bei anderen Melanozytentypen zwei Zellformen: die Früh- und Zwischenzellen [65].

Für das Wachstum dieser Zellen, sowie der Zelltypen Wm35 und A375 wurde das Kulturmedium RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) verwendet, dem zusätzlich eine essentielle Aminosäure, L-Glutamin, beigemischt wurde.

2.1.5 Wm35-Zellen

Diese Zellart gehört ebenfalls zu einer humanen Melanomzelllinie [64,75].

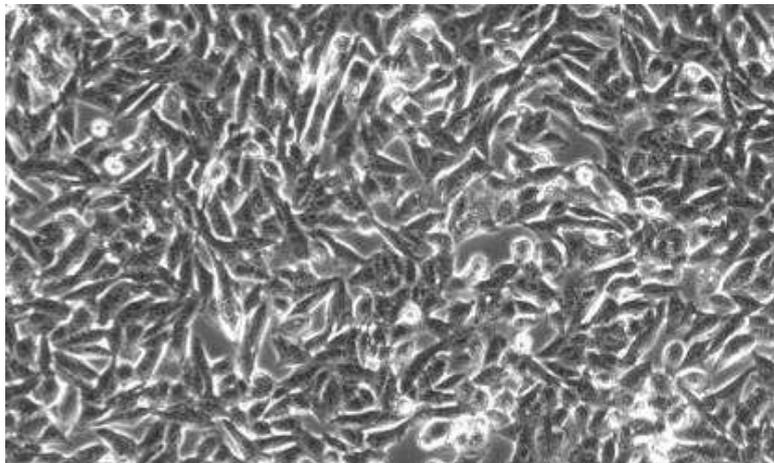


Abb. 5: Wm35-Zellen

Eine phasenkontrastmikroskopische Aufnahme konfluenter Wm35-Zellen bei 10facher Vergrößerung.

Die Zell-Adhäsion wird, wie bereits bei den A375- und den Wm9-Zellen erläutert, mittels N-Cadherin vermittelt. Der Unterschied des N-Cadherins liegt in der Kohlenhydratzusammensetzung, die sich von der Zusammensetzung der

anderen beiden Zellarten unterscheidet. Dieses N-Cadherin enthält Manose und eine zweifach fählerartige, komplexe Glykanform mit einer α 2-6 Verknüpfung mit N-Acetylneuraminsäure [31].

Bei den Wm35-Zellen handelt es sich um sogenannte dysplastische Melanozyten, pigmentbildende Zellen, die in der Haut des menschlichen Körpers vorzufinden sind. Diese Zellen sind für die Bildung von Melanomen verantwortlich, primär für die Bildung von oberflächlich spreitendem Melanom (SSM). Man unterscheidet Wm35-Zellen, die sich aus der radial wachsenden Phase (RGP) oder aus der vertikal wachsenden Phase (VGP) ableiten lassen [64,75].

Diese Zelllinie wurde ebenfalls von Dr. M. Herlyn (The Wistar Institute, Philadelphia, PA) zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden der Zellkultivierung

2.2.1 Allgemeine Anmerkungen zur Zellkultivierung

Sämtliche Arbeiten mit Kulturgefäßen oder Zellen wurden unter einer sterilen Arbeitsbank mit einem laminaren Luftstrom verrichtet, um Kontaminationen mit Bakterien zu vermeiden. Alle verwendeten Lösungen und Medien wurden auf 37°C vortemperierte. Abweichungen von dieser Ausnahme werden im Text explizit vermerkt.

Die Zellen wurden in flachen, unbeschichteten Kunststoffkulturflaschen (TC-behandelt von Falcon T₇₅-Nr.3084 oder T₂₅-Nr.3014) mit einer Oberfläche von 75cm² oder 25cm² inkubiert. Die Kulturflaschen wurden in einem Inkubator bei 37°C, 5% (v/v) CO₂, einem pH-Wert von 7,4 und bei maximal gesättigter Luftfeuchtigkeit bebrütet, um optimale Wachstumsbedingungen herzustellen.

2.2.2 Kulturmedium und Mediumwechsel

Das für die C7-Zellen verwendete Kulturmedium bestand aus DMEM (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), das zusätzlich 10% fetales Kälberserum „GOLD“ (FCS von PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland: A15-649, Chargen bis 2500 Liter verfügbar) und 1% Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) enthielt.

Der in dem Medium enthaltene Indikator besaß die Eigenschaft im sauren nach gelb und im alkalischen Milieu nach violett umzuschlagen. Durch zunehmende Azidifizierung des Mediums war verbrauchtes Medium aus diesem Grund gelb. Beim Mediumwechsel wurde das Medium komplett mit einer Pasteurpipette entfernt und durch ein Neues ersetzt. Bei einer T₇₅ – Flasche waren dieses 20-25ml Medium, bei einer T₂₅ – Flasche 8-10ml.

Bei den C7-Zellen wurde das Medium durchschnittlich alle drei Tage gewechselt. Bei großen Zellzahlen wurde das Medium abhängig von der Dichte abgelöster Zellen im Überstand entsprechend häufiger ersetzt.

2.2.3 Passagieren von Zellen

Bilden Zellen einen konfluenten Zellrasen, besteht die Möglichkeit, einen Teil der Zellen in andere Kulturgefäße oder Versuchsaapparaturen zu überführen. Dieser Vorgang wird als Splitten oder Passagieren bezeichnet. Die folgenden Angaben gelten jeweils für eine T₇₅ – Flasche. Hier wird das Passagieren von C7- und A7-Zellen beschrieben.

Zunächst wurde aus der Kulturflasche das Medium komplett abgesaugt. Dann wurde die gleiche Menge PBS (Ca²⁺- und Mg²⁺-frei) auf die Zellen gegeben, um das komplette Restmedium herauszuspülen. Anschließend wurde die Flasche bei 37°C für ca. 5 min. inkubiert.

Aufgrund ihrer jeweiligen Eigenschaften wurden C7-Zellen und A7-Zellen nach der Inkubation unterschiedlich gehandhabt. Bei den C7-Zellen wurde die PBS-Lösung abgesaugt und erneut durch 20-25ml PBS-Lösung ersetzt. Die Kulturflasche wurde für 10 min. bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden die Zellen im Phasenkontrastmikroskop (Axiovert 25 von Zeiss) kontrolliert. Die einzelnen Zellen ließen sich durch die hell hervortretenden Grenzen deutlich unterscheiden. Es hatten sich zu diesem Zeitpunkt nur wenige Zellen abgelöst und befanden sich im Überstand. Die PBS-Lösung wurde erneut abgesaugt. Auf die C7-Zellen wurden 2ml 4°C kalter Trypsin-EDTA-Lösung gegeben. Die Zellen wurden wiederum bei 37°C für ca. 20 min. inkubiert. Durch leichtes Beklopfen der Kulturflasche ließ sich das Ablösen der Zellen beschleunigen. Der Fortgang der Zellablösung wurde im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert.

Bei den A7-Zellen wurde nach der fünfminütigen Inkubation mit PBS-Lösung der Überstand abgesaugt und direkt 2ml Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben. Die Kulturflasche wurde für 3-5 Minuten inkubiert. Anschließend konnten alle A7-Zellen vollständig durch mehrmaliges kurzes Klopfen an den Flaschenboden von dem Gefäß gelöst werden.

Nach abgeschlossener Trypsinierung wurden sowohl A7-Zellen als auch C7-Zellen wieder gleich behandelt. In der Kulturflasche wurde das Volumen mit dem FCS-haltigem Medium (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) auf 10ml ergänzt. FCS enthält eine Reihe natürlicher Proteaseinhibitoren, die die Wirkung des Trypsins stoppen. Der Inhalt der Kulturflasche wurde mit einer sterilen Glaspipette in ein 10ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 110xg und bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war am Boden des Zentrifugenröhrchens ein weißes Zellpellet zu erkennen. Der Überstand über dem Pellet wurde mit einer Pasteurpipette entfernt. Das Pellet selbst wurde im Zentrifugenröhrchen mit 10ml neuem Medium reperfundiert.

Nach dieser Prozedur konnten die C7-Zellen erneut in Kulturflaschen übertragen oder auf Filtern ausgesät werden. Bei der Kultivierung der C7-Zellen haben sich Verdünnungen von 1:10 bewährt, d.h. 1ml der 10ml aus dem Zentrifugenröhrchen wurde in eine neue Kulturflasche mit Medium gefüllt. Wurden die C7-Zellen zu stark verdünnt, stellten diese unter Umständen nach einiger Zeit in der Kulturflasche ihre Proliferation ein. Bei den A7-Zellen ergab sich bei einer Verdünnung von 1:20 ein konfluentes Wachstum. Aufgrund der Eigenschaften von Krebszellen verkrafteten sie jedoch problemlos Verdünnungen von bis zu 1:50.

Die verwendeten C7-Zellen befanden sich zwischen der 65. und 70. Passage. Die A7-Zellen, sowie die anderen drei Melanomzellarten, wurden in der Regel zwischen der 15. und 20. Passage verwendet.

Bei weiteren Versuchen, bei denen PAR-Agonisten eingesetzt wurden, erfolgte das Passagieren der Melanomzellen vor der zweiten Aussaat auf eine andere Art. Zunächst wurde das Medium wie gewöhnlich komplett abgesaugt. Dann wurden anstelle von PBS 10ml EDTA-Puffer auf die Zellen gegeben, da EDTA ein effektiver Calciumchelator ist und Calcium die „tight junctions“ zwischen den Zellen stabilisiert. Anschließend wurde die Flasche bei 37°C für 10 Minuten

inkubiert [22]. Eine Ausfällung des Calciums führt somit zu einer Verringerung der interzellulären Haftung und einer Auflockerung des Zellverbandes. Außerdem konnte das Ablösen der Melanomzellen durch mehrmaliges kurzes Klopfen an den Flaschenboden beschleunigt werden. Ein weiterer Grund für das Anwenden von EDTA-Puffer, anstelle von PBS bestand darin, dass keine zusätzliche Inkubation mit Trypsin-EDTA erfolgen musste. Es bestand die Gefahr, dass die PAR-Rezeptoren von dem Trypsin aktiviert werden konnten.

Nach dem Inkubieren wurde der Inhalt der Kulturflasche mit einer sterilen Glaspipette in ein 10ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 110xg und bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand über dem Pellet mit einer Pasteurpipette entfernt. Das Pellet selbst wurde im Zentrifugenröhrchen mit neuem, FCS-freiem Medium reperfundiert.

2.2.4 Anlegen und Handhabung der Multiwellplatten mit Mikrofiltern

Wurden C7-Zellen passagiert, um diese auf Mikrofiltern auszusäen, wurden während der Zentrifugation der Zellen die 6-Well-Platten vorbereitet. In jede Kavität wurden 3ml Medium gegeben und die Mikrofilter mit einer sterilen Pinzette bereits eingesetzt.

Nach dem Passagieren wurde das Zellpellet reperfundiert und 10µl aus dem Zentrifugenröhrchen in eine 96-Well-Platte überführt. Zu den 10µl der Zellsuspension wurden 10µl Farbstoff (Trypan Blue Stain 0,4%) zugeführt. Trypanblau ist ein saurer Vitalstoff, der nur in abgestorbene Zellen eindringt und diese blau anfärbt. Er wird zur Unterscheidung lebender und toter Zellen verwendet.

Nach dem Zusammenmischen der Suspension, konnte die Zelldichte in einer Neubauerzählkammer bestimmt werden, indem nur die nicht blau verfärbten Zellen gezählt wurden. Ein entsprechendes Mediumvolumen mit 10^5 oder 10^6

Zellen wurde auf jeden Filter gegeben. Anschließend wurde das Volumen auf jedem Filter auf insgesamt 3ml Medium ergänzt.

Am ersten Tag nach dem Ansetzen der Multiwellplatten wurden weder das Medium gewechselt noch die TEER bestimmt. Am zweiten bis vierten Tag nach dem Passagieren der Zellen wurde mit den Messungen der TEER begonnen und jeweils 1ml des oberen und unteren Mediums gewechselt. An den weiteren Tagen wurden im Wechsel jeweils einen Tag 1ml (selten 2ml) des oberen und 1ml (selten 2ml) des unteren Mediums entnommen und jeweils durch 1ml (2ml) neues Medium ersetzt.

Der Tag des Aussäens der A7-Zellen oder anderer Melanomzellen auf Mikrofiltern (2. Aussaat) wurde als Tag Null geführt. An den darauf folgenden Tagen wurde kein Mediumwechsel durchgeführt, sondern nur die Widerstände bestimmt.

Abwandlungen des oben genannten Passageprotokolls waren erforderlich, wenn A7-Zellen gesplittet wurden, um diese auf Filtern mit C7-Zellen auszusäen. Der Grund hierfür ist der Gehalt des A7-Mediums an Geneticin (von PAA: G418 Sulfate P27-011). Dieses Antibiotikum wirkt auch auf Eukaryonten toxisch und hätte somit vermutlich zu einem Abfall der TEER geführt. Um das Geneticin möglichst vollständig zu entfernen, wurden die A7-Zellen vor dem Splitten mit C7-Medium gespült. Die Aufnahme der Zellen nach dem Trypsinieren und das Reperfundieren nach der Zentrifugation erfolgte ebenfalls mit C7-Medium.

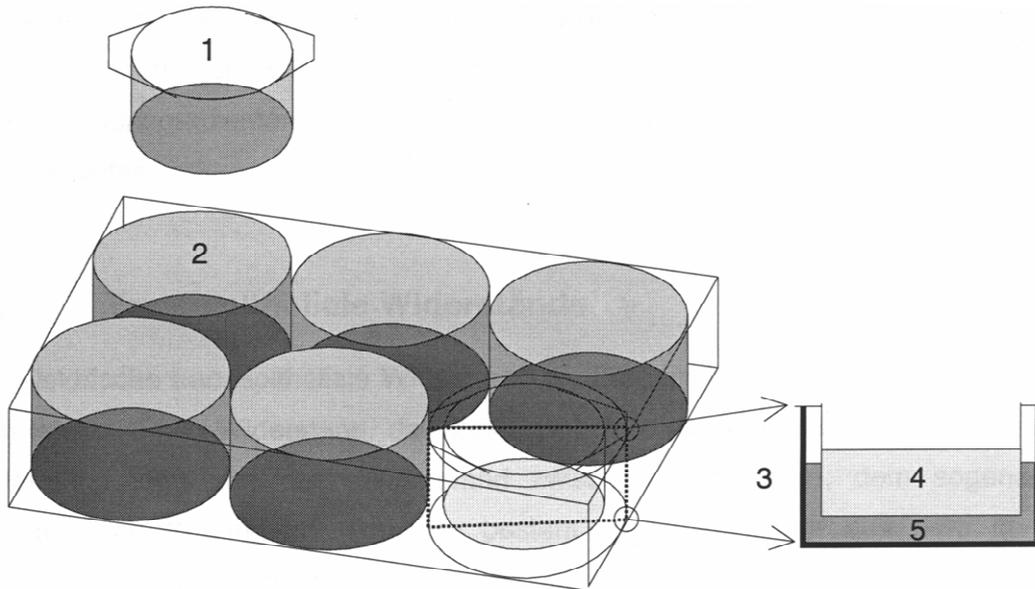


Abb. 6: Vereinfachte Multiwellplatte mit sechs Kavitäten (ohne Deckel)
 1. Membraneinsatz; 2. Kavität in der Platte; 3. Schnitt durch Kavität und Membraneinsatz (Schnittebene links angedeutet); 4. oberes Medium; 5. unteres Medium

2.2.5 Eigenschaften der Mikrofilter

Die verwendeten Mikrofilter (Falcon cell Culture Inserts) besitzen eine transparente Membran aus zellkulturbehandeltem Polyethylen (PET) mit $0,4\mu\text{m}$ durchmessenden Poren. Die Porendichte beträgt $1,6 \cdot 10^6$ Poren/ cm^2 . Die Dicke der Mikrofiltermembran beträgt $20\mu\text{m}$. Der Abstand zwischen der Filtermembran und dem Boden der Kavität beträgt $0,9\text{mm}$.

Die Durchlässigkeit der Filter für A7- und C7-Zellen wurde getestet, indem A7- bzw. C7-Zellen mehrere Tage auf der Oberseite der Filtermembran kultiviert wurden und anschließend der Filter in eine Trypsin-EDTA-Lösung gesetzt wurde. In der Trypsin-EDTA-Lösung konnten auch nach Zentrifugation keine intakten Zellen polarisationsmikroskopisch nachgewiesen werden. Die Filter sind demzufolge weder für A7- noch für C7-Zellen durchlässig.

2.3 Versuchsabläufe

2.3.1 Transepitheliale Widerstände

Der elektrische transepitheliale Widerstand (TEER) eines Zellmonolayers besteht aus dem elektrischen Widerstand der Zelle selbst, dem so genannten transzellulären Widerstand (R_c) und dem Widerstand zwischen den Zellen, dem so genannten parazellulären Widerstand (R_p). R_c besteht im Wesentlichen aus dem in Serie geschalteten Widerstand der apikalen (R_a) und der basolateralen (R_b) Zellmembran. R_p besteht aus den ebenfalls in Serie geschalteten Widerständen der tight junctions (R_t) und dem Widerstand des Interzellulärtraumes (R_i). Hinzu kommt der elektrische Widerstand der BM.

Bei der Parallelschaltung der Widerstände addieren sich nach dem ersten Kirchhoffschen Gesetz deren Leitfähigkeiten, d.h. ihre Kehrwerte. Aus diesen Überlegungen ergibt sich der Gesamtwiderstand R_{ges} :

$$\begin{aligned} R_c &= R_a + R_b \\ R_p &= R_t + R_i \\ \rightarrow \frac{1}{R_{ges}} &= \frac{1}{R_c} + \frac{1}{R_p} \end{aligned}$$

Die mathematischen Beziehungen der oben genannten Widerstände und Leitfähigkeiten am Epithel wurden durch die Analyse einfacher elektrischer Schaltkreise nachvollzogen [15,115].

Die Messung des TEER gehört zu den Standardmethoden der Physiologie. Aus dem Ohmschen Gesetz

$$R = \frac{U}{I}$$

ergibt sich, dass zur Berechnung des Widerstandes zumindest die Größen Spannung (U) und Strom (I) bekannt sein müssen. Aus diesem Grund bestehen die Messelektroden jeweils aus einer konzentrisch angeordneten Spannungs- und Stromelektrode. Die Messung des TEER an Epithelien muss mit alternierenden Strompulsen erfolgen, um Polarisationsphänomene am Epithel zu vermeiden.

Ein auf der Erfassung des elektrischen transepithelialen Widerstandes basierendes Verfahren erfordert „Indikatorzellen“, deren Widerstand sich signifikant von dem TEER von Tumorzellen unterscheidet. Die TEER verschiedener und gleicher Epithelien verschiedener Spezies unterscheiden sich deutlich. Grundsätzlich können „dichte“ von „lecken“ Epithelien unterschieden werden. Zu den lecken Epithelien gehören jene Epithelien, bei denen eines der folgenden Kriterien gilt [109]:

$$\rightarrow R_{ges} < 1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$$

$$\rightarrow \frac{R_c}{R_p} > 1$$

$$\rightarrow 100 \frac{G_s}{G_{ges}} > 50\%$$

Daraus ergibt sich, dass für dichte Epithelien eine geringe parazelluläre Leitfähigkeit (G_s) mit einem geringen Anteil an der Gesamtleitfähigkeit (G_{ges}) ein entscheidendes Merkmal ist. Die parazelluläre Leitfähigkeit hängt im Wesentlichen von der Anzahl der tight junctions (TJs) ab. TJs oder synonym limiting junctions bzw. zonulae occludentes umgeben die Zellen apikal und verbinden sie mit den Nachbarzellen. Sie versiegeln den Interzellulärraum komplett und ermöglichen als passive Diffusionsbarriere den Aufbau osmotischer Gradienten zwischen Lumen und dem Interstitium [109]. Nach ihrer Schädigung können TJs innerhalb von 30 min. von der intakten Zelle ersetzt werden [76]. Zahlreiche Untersuchungen haben die direkte Beziehung zwischen Epithelpermeabilität und TJs belegt [30,52,122]. Claude nahm sogar eine

exponentielle Beziehung zwischen der Anzahl der Reihen von TJ-Strängen und dem TEER an [29]. Ohne an dieser Stelle näher auf die Details eingehen zu wollen, sind die Beziehungen zwischen den TJs und Permeabilität schwer zu korrelieren [23].

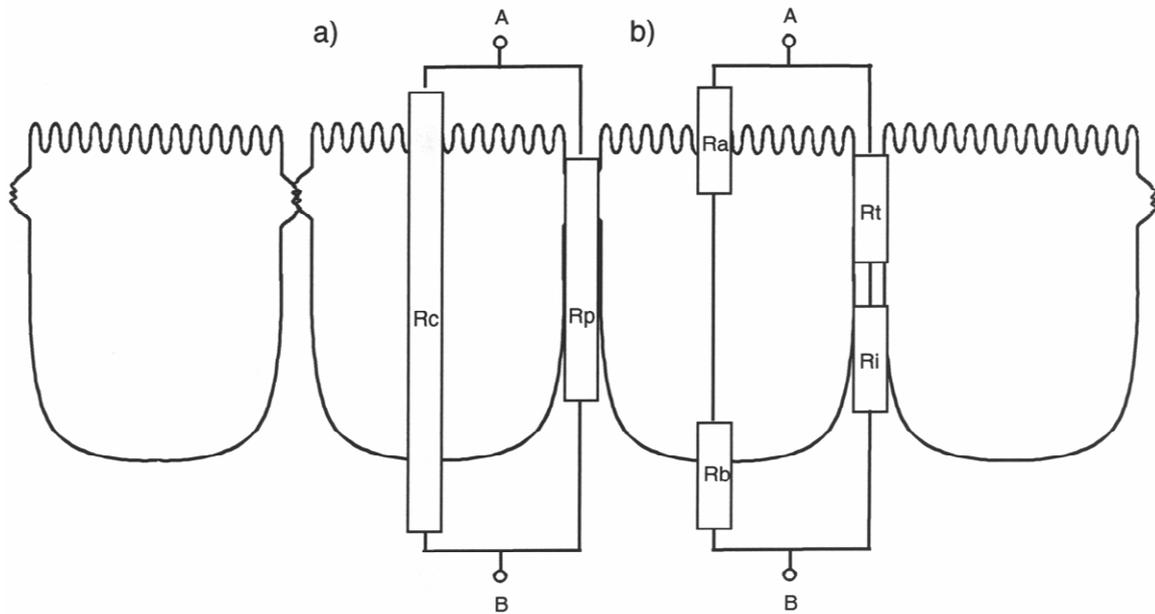


Abb. 7: Schaltbild: Zusammensetzung des TEER aus Einzelwiderständen
Der zelluläre Widerstand (R_c) und der parazelluläre Widerstand (R_p) sind parallelgeschaltet (a). R_c und R_p bestehen jeweils aus zwei in Serie geschalteten Widerständen (b). R_c besteht aus dem Widerstand der apikalen (R_a) und der basolateralen Membran (R_b), R_p ergibt sich aus dem Widerstand der Schlussleisten (R_t) und dem Widerstand des Interzellulärraumes (R_i). Der Widerstand der BM wurde vernachlässigt.

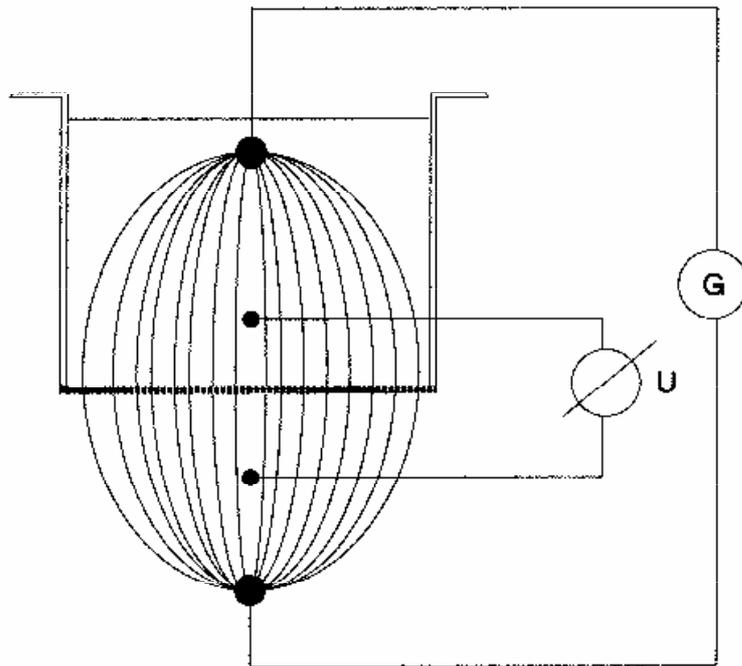


Abb. 8: Schema der Elektrodenanordnung und Feldlinien am Mikrofiltereinsatz
Aus dem Ohmschen Gesetz ergibt sich die Notwendigkeit, vier Elektroden für die Registrierung des TEER zu verwenden. Ein senkrecht zum Mikrofilter stehender Verlauf der Feldlinien gilt als optimal.

(G): Wechselstromgenerator (U): Spannungsmesser

Zum Teil bestehen erhebliche Unterschiede der TEER zwischen einzelnen Zelltypen des Epithels. Der C7-Klon der MDCK-Zellen hat einen ca. 20fach höheren TEER als der C11-Klon [55]. Aufgrund des hohen TEER der C7-Zellen, ihrer unkomplizierten Kultivierung und umfangreichen Informationen über sie, eignen sie sich besonders gut für die Realisierung eines auf dem TEER basierenden in vitro Invasions-Assays.

2.3.2 Messgerät

Die Widerstandsmessungen wurden mit einem epithelialen Voltohmmeter und der beiliegenden STX-2-Elektrode (EVOM, Sarasota, USA) durchgeführt.

Der EVOM ist das erste Instrument, das für das Ausüben von Widerstandsmessungen in der Zellforschung entwickelt wurde. Der batteriebetriebene Voltmeter ist mit einem einfach lesbaren Display ausgestattet. Er ist aber auch mit einem BNC Aufzeichnungsgerät für die Ergebnisse erhältlich.

Der Eingangsscheinwiderstand von EVOM ist größer als 1010 Ohm. Der elektrische Widerstand hat einen Intervall von 0 bis 1999 Ohm und von 0 bis 20.000 Ohm. Das Voltmeter zeichnet sich durch die einzigartige Eigenschaft aus, dass der Messwert des elektrischen Widerstandes weder von der Aufnahmefähigkeit der Membran noch vom Membranpotential beeinflusst wird. Der Messwert des Membranpotentials bewegt sich im Bereich von +/- 200mV.

Der EVOM wird mit dem STX-2 „Chopstick“ Elektroden Set geliefert. An der STX-2-Elektrode sind am Griffende zwei Elektrodenpaare angebracht mit der Breite von 4mm und der Dicke von 1mm. Jeder Zweig der Elektrodenpaare enthält ein Silber-/Silberchloridpellet für die Bestimmung der Spannung und eine Silberelektrode für die Anpassung der Stromstärke. Die kleine Seite jeder Elektrode ist so konstruiert, dass das Platzieren der Elektroden in dem Well der Zellkultur erleichtert wird.

Von dem Messgerät wird ein Gleichstrom von 20µAmp gesendet. Bei der Durchströmung der Zellschicht entsteht eine elektrische Spannungsdifferenz, aus welcher sich nach dem Ohmschen Gesetz der Widerstand berechnen lässt.

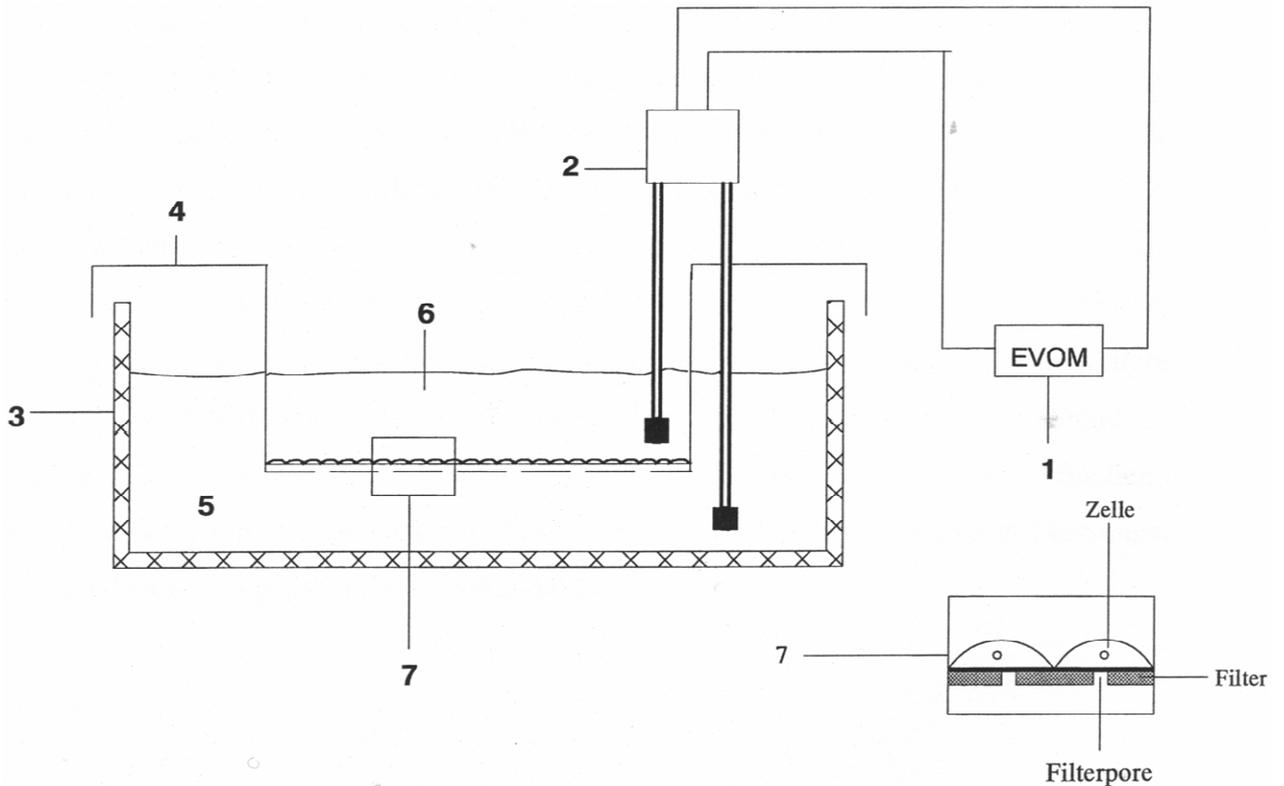


Abb. 9: Versuchsaufbau zur Messung transepithelialer Widerstände

1. EVOM-Messgerät; 2. STX-2-Elektrode; 3. Multiwellplatte; 4. Mikrofilter; 5. basolaterales Medium 3ml; 6. apikales Medium 3ml; 7. Filter mit Zellschicht

2.3.3 Durchführung einer Messung mit der STX-Elektrode

Vor der Messung erfolgte zunächst eine 20minütige Sterilisation der Elektroden mit 70% Ethanol. In der Zwischenzeit wurden zwei Röhrchen (von Falken) mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gefüllt, die in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt werden sollten. Anschließend wurden die Elektroden mindestens zweimal in die physiologische Kochsalzlösung eingetaucht und gespült, um das Ethanol restlos zu entfernen. Dann wurde die Justierung durchgeführt, indem der Leerwert bestimmt wurde. Dieser sollte den Wert 20 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ nicht überschreiten.

Direkt nach der Entnahme der Multiwellplatten aus dem Brutschrank wurden diese unter die sterile Arbeitsbank gelegt und der TEER bestimmt. Für die

Widerstandsmessung der 6-Well-Platte wurden 1-2 Minuten benötigt. Dabei war es von großer Wichtigkeit darauf zu achten, weder die Zellen noch die Wände der Filtereinsätze mit den Elektroden zu berühren. Ebenso musste auf die komplette Eintauchtiefe der Elektroden im Medium geachtet werden, da bei nicht vollständig eingetauchter Elektrode ein wesentlicher Anstieg des gemessenen Widerstandes beobachtet werden konnte. Das Ruhighalten der Elektroden musste ebenfalls gewährleistet werden, um Messungenauigkeiten zu vermeiden. Nach der Messung aller sechs Filtereinsätze wurde die Multiwellplatte direkt zurück in den Brutschrank gestellt. Nach abgeschlossener Messung einer kompletten Platte wurden die Elektroden erneut mit 70% Ethanol und anschließend zweimal mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gespült, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren und die Verschleppung von A7-Zellen in Kavitäten ohne A7-Zellen zu verhindern.

Die Mikrofiltereinsätze haben einen elektrischen Widerstand von 5 Ohm. Dieser Leerwiderstand wurde jeweils von dem bei der Messung erhaltenen Wert subtrahiert. Da der elektrische Widerstand in einem reziproken Verhältnis zur Oberfläche der Filtermembran steht bzw. der Leitwert der Oberfläche proportional ist, wurden die erhaltenen Werte mit der Oberfläche der Filtermembran (4,2cm²) multipliziert, um den TEER in der Einheit $\Omega\cdot\text{cm}^2$ zu erhalten.

Bei dieser Messmethode handelte es sich um ein „offenes System“, da der Filter während des gesamten Messvorganges nach oben nicht geschlossen war.

2.3.4 Applikation von Melanomzellen in das obere Medium

Nach dem Passagieren der A7-Zellen wurde die Zelldichte der durch das Trypsinieren, Zentrifugieren und Resuspendieren erhaltenen Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wurden 10 μ l Zellsuspension aus dem Zentrifugenröhrchen in eine 96-Well-Platte überführt und mit 10 μ l Farbstoff (Trypan Blue Stain 0,4%) ergänzt. Der Farbstoff diente dem Anfärben

nekrotischer Zellen, deren Zellmembran eine Permeabilität für Trypanblau aufwies. Nach dem Zusammenmischen der Suspension, konnte die Zelldichte mittels Zählung unter einem Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer, sowie der Anwendung folgender Formel bestimmt werden.

$$\text{Anzahl der Zellen} : 4 \cdot 2 \cdot 10^4 = \text{Anzahl der Zellen/ml}$$

Das Applizieren der Zellen erfolgte durch den Austausch eines entsprechenden Mediumvolumens der Kulturplatte gegen das gleiche Volumen mit der gewünschten Anzahl A7-Zellen. Aus unterschiedlichen Gründen wurde standardmäßig mit einer Anzahl von $1 \cdot 10^6$ A7-Zellen gearbeitet, die in einem Mediumvolumen von 500-1000 μ l gelöst waren.

Es wurde mit einer Anzahl von $1 \cdot 10^6$ Zellen gearbeitet, weil diese Zellzahl zum einen unter jener Zahl liegt, die im konfluenten Zustand auf einem Filter Platz hätte, zum anderen gewährleistet sie das Erhalten der Ergebnisse in einem angemessenen Zeitraum. Bei geringeren Zellzahlen mussten Messungen über mehrere Tage durchgeführt werden, um das Eintreten oder Ausbleiben eines Effektes abschätzen zu können. Neben dem Aufwand stieg durch die verlängerte Messdauer die Einflussnahme anderer Größen, wie z.B. das Verkeimungsrisiko und mögliche unterschiedliche Zellproliferation.

Bei der Bestimmung der Zelldichte wurde eine relative Standardabweichung vom Mittelwert bei vier Auszählungen in der Neubauerkammer von maximal 10% toleriert. Bei größeren Abweichungen wurde die Prozedur wiederholt.

2.4 Statistik

Alle Messwerte werden als Mittelwert und mit der Standardabweichung (Standard Deviation) angegeben. Signifikante Unterschiede der einzelnen Werte wurden mit Hilfe des ungepaarten Student-t-Tests ermittelt und bei $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Signifikante Unterschiede werden bei den Säulendiagrammen mit einem Stern „*“ markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Experimente mit A7-Zellen unterschiedlicher Zelldichte

3.1.1 C7-Zellen

3.1.2 C7-Zellen + Melanomzelllinie A7 mit Zelldichte von 100 000

3.1.3 C7-Zellen + Melanomzelllinie A7 mit Zelldichte von 1 Mio

Bei dem ersten Versuch sollte untersucht werden, ob die Invasion der A7-Zellen durch die epitheliale C7-Zellschicht von der Anzahl dieser Melanomzellart abhängig ist, um den transepithelialen Widerstand signifikant zu senken. Des Weiteren sollte der Zeitraum ermittelt werden, indem die Invasion eintritt.

Zunächst wurden die MDCK-C7-Zellen auf die apikale Seite der Filter einer 6-Well-Platte ausgesät. In jedem Well und in jedem Filter befanden sich 3ml Medium. Nach dem Tag der Aussaat wurden jeden bzw. jeden zweiten Tag die transepithelialen Widerstände bestimmt. Nach den Widerstandsmessungen wurde jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel vorgenommen. Es wurden jeweils 2ml Medium sowohl apikal als auch basal ausgewechselt. Nach sechs Tagen wurden nun die erwünschten hohen Messwerte erreicht, die zwischen 11500 $\Omega\text{-cm}^2$ und 15000 $\Omega\text{-cm}^2$ lagen, so dass die zweite Aussaat mit den A7-Zellen erfolgen konnte.

In zwei der sechs Filter wurden 10^6 A7-Zellen und in weitere zwei Filter 10^5 A7-Zellen ausgesät. Die gewünschte Zellzahl der A7-Zellen wurde in der Neubauerzählkammer bestimmt. Die beiden übrig gebliebenen Behälter wurden für die Kontrollen genutzt. Diesen Filtern wurden keine Melanomzellen zugeführt. Bei einem der beiden Wells kam es am Tag der zweiten Aussaat zu einem Abfall des Widerstandes von 15000 $\Omega\text{-cm}^2$ auf 6000 $\Omega\text{-cm}^2$. Wahrscheinlich kam es zu einer Anreicherung der Zellen im Überstand und somit zu einer Ablösung des Zellrasens vom Filter. Nach dem Aussäen der

Melanomzellen in die entsprechenden Filter, wurde in einem Abstand von 24 Stunden der TEER ermittelt.

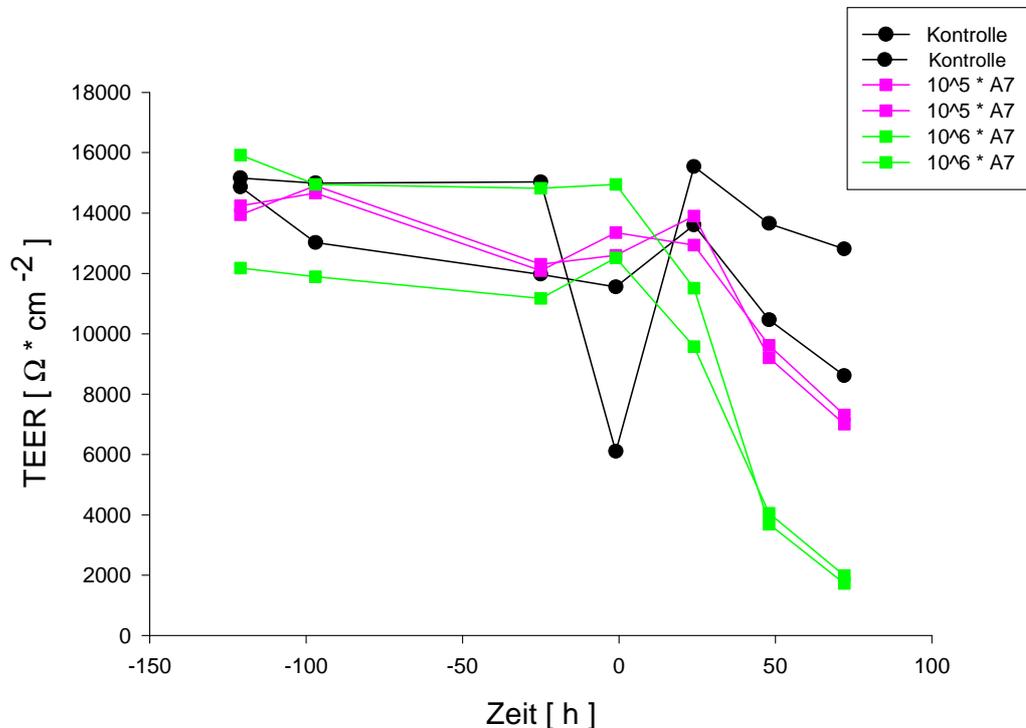


Abb. 1: TEER-Graph: A7-Zellen unterschiedlicher Zelldichte

Der Graph zeigt einen zeitlichen Zusammenhang zwischen der Zelldichte der ausgesäten Melanomzellen und dem Widerstandsabfall. Die Stunde 0 stellt den Zeitpunkt der zweiten Aussaat (Kokultivierung der C7-Zellen mit A7-Zellen) dar.

Bei der hohen Zellzahl (10^6) konnte bereits nach 24 Stunden ein Einbruch des transepithelialen Widerstandes um ca. $3000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ beobachtet werden. Der TEER-Abfall konnte mit den weiteren Messungen untermauert werden.

Bei der niedrigeren Zellzahl (10^5) konnte nach 24 Stunden dagegen kein signifikanter Unterschied zu dem Ausgangswert festgestellt werden. Bei einem der beiden Wells sank der transepitheliale Widerstand geringfügig, und zwar um ca. $400 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Beim zweiten Well stieg er sogar um $1300 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Ein sichtbarer

Widerstandsabfall, der bei ca. 3000 Ω -cm² lag, und somit die Invasion der Melanomzellen, wurde erst nach 48 Stunden erkennbar.

Die Widerstände der Kontrollen stiegen kontinuierlich. 48 Stunden nach der zweiten Aussaat kam es jedoch zu einem langsamen Widerstandsabfall. Wahrscheinlich kam es zu einer Anreicherung der Zellen im Überstand und damit zur Konkurrenz der Zellen um die Nährstoffe aus dem Medium, die sich in Form vom TEER-Abfall geäußert haben.

Wenn auch nur je zwei Experimente mit 100.000, 1.000.000 A7-Zellen und mit den C7-Zellen alleine durchgeführt wurden, wurde gezeigt, dass es bei höheren Melanomzellzahlen zu einem rascheren Widerstandsabfall kommt, als bei geringerer Anzahl von Zellen. Die Invasivität wird also durch die Anzahl der Melanomzellen bestimmt.

Bei den darauf folgenden Versuchen wurde ausschließlich mit Melanomzellzahlen von 10⁶ gearbeitet.

3.2 Experimente mit unterschiedlichen Melanomzelllinien

3.2.1 C7-Zellen

3.2.2 C7-Zellen + Melanomzelllinie A375

3.2.3 C7-Zellen + Melanomzelllinie Wm9

3.2.4 C7-Zellen + Melanomzelllinie Wm35

Bei dieser Versuchsreihe sollten nicht die bereits untersuchten A7-Zellen, sondern drei weitere Melanomzellarten auf ihre Invasivität auf einem C7-Zellrasen geprüft werden. Danach wurden die Zellen sowohl miteinander als auch mit den A7-Zellen aus der ersten Versuchsreihe verglichen und ihr aggressives Verhalten dargelegt.

Zunächst wurden auf mehreren 6-Well-Platten C7-Zellen ausgesät. Wie gewohnt befanden sich 3ml Medium in jedem Well, sowie 2ml Medium in jedem Filter. Die 2ml wurden durch 1ml Zellsuspension auf 3ml ergänzt. In einem Abstand von zwei Tagen wurde das Medium gewechselt. Es wurden jeweils 1ml Medium apikal als auch basal entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Außerdem wurde der Zelllayer auf seine Konfluenz unter einem Mikroskop begutachtet.

Nach acht Tagen wurde mit den transepithelialen Messungen begonnen, die alle zwei Tage durchgeführt wurden. Nach jedem Messvorgang wurde auch ein Mediumwechsel vorgenommen. Nachdem hohe Messwerte, die sich von 12000 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ bis 15000 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ erstreckten, erreicht waren, erfolgte die zweite Aussaat mit den drei Melanomzellarten. Analog zur ersten Versuchsreihe wurden je 10^6 Zellen pro Filter ausgesät. Filter, die für die Kontrollmessungen verwendet wurden, blieben ohne Melanomzusatz. Dann wurde wie gewohnt mit der transepithelialen Widerstandsmessung fortgefahren.

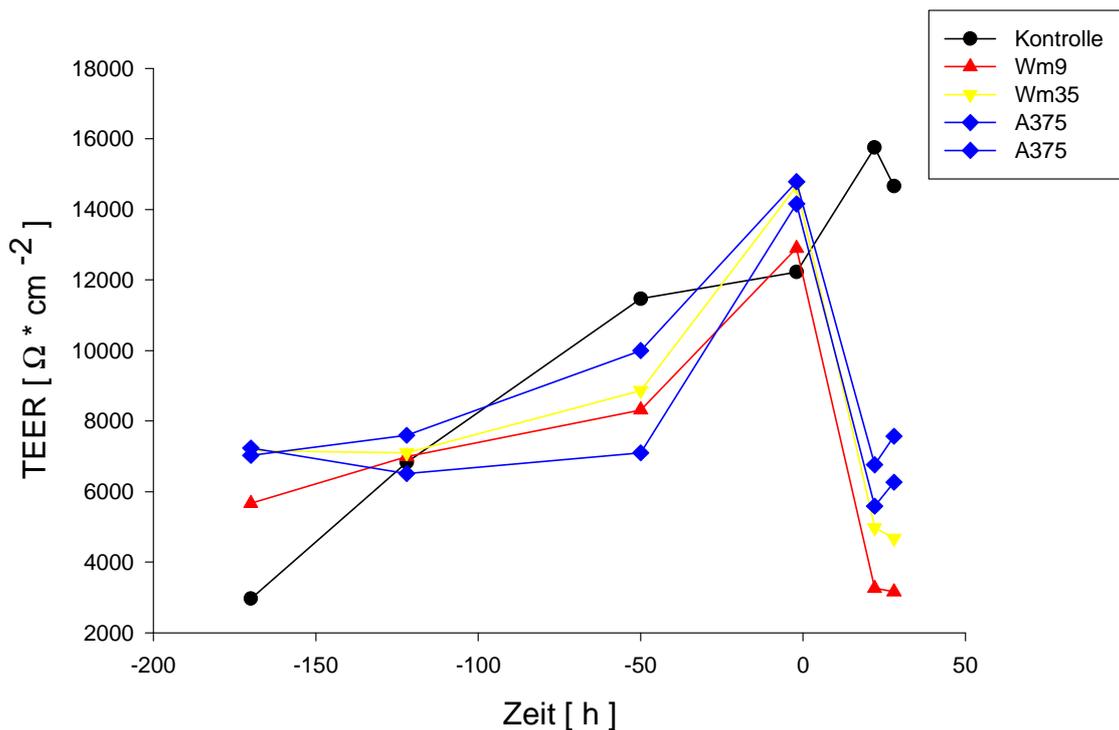


Abb. 2:(Bsp. zu Abb. 2a und 2b): TEER-Graph: Wm9-, Wm35- und A375-Zellen
 Der Graph zeigt das Verhalten der TEER nach Applikation von Wm9-, Wm35- und A375-Melanomzellen auf den C7-Zellmonolayer. Die Stunde 0 stellt den Zeitpunkt der zweiten Aussaat (Kokultivierung der C7-Zellen mit WM9-, Wm35- und A375-Zellen) dar.

Bereits nach 24 Stunden konnte ein starker Zusammenbruch der TEER in allen Wells, in denen jeweils eine der drei Melanomzellarten beigefügt wurde, beobachtet werden. Es wurden Werte zwischen 3200 Ω·cm² und 6800 Ω·cm² gemessen. Die transepithelialen Widerstände sind also in Relation zu den Ausgangswerten vor der zweiten Aussaat um 50% bis 70% gesunken. Die Kontrollen mit den C7-Zellen wiesen jedoch einen weiteren TEER-Anstieg auf.

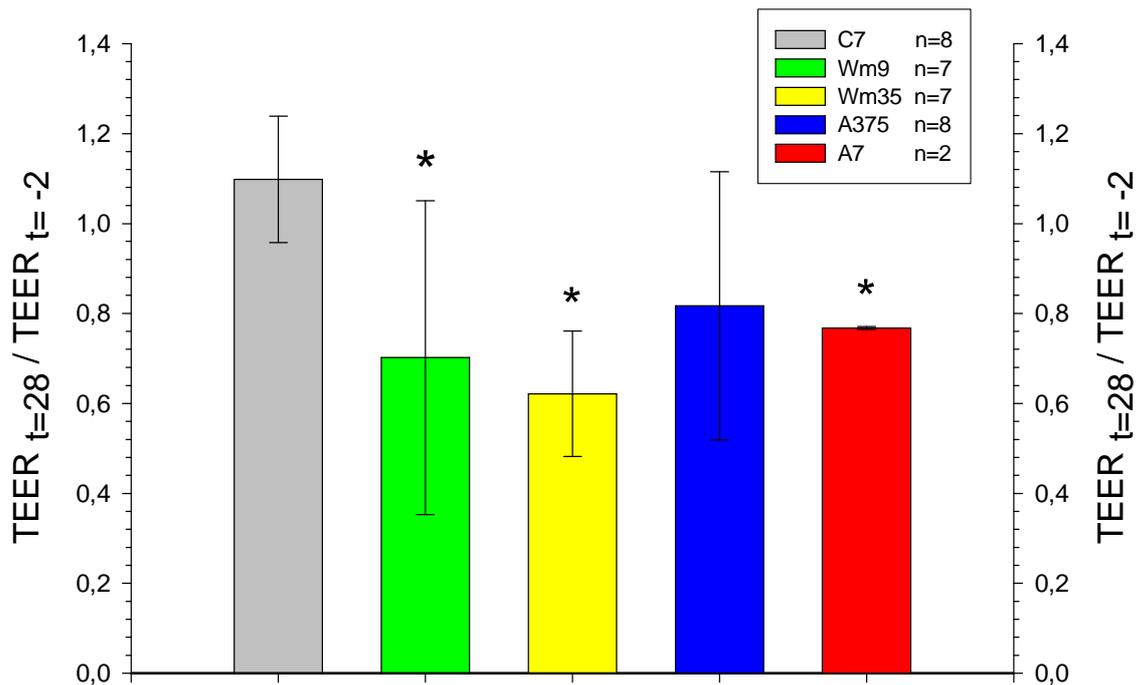


Abb. 2a: Zusammenfassung: Änderung der TEER nach 30 h (Kurzeffekt)

Die Abbildung verdeutlicht die relative Änderung der Widerstände aller vier untersuchten Melanomzellarten (aus dieser und der ersten Versuchsreihe), sowie der Kontrolle gegenüber den Ausgangswerten nach 30 Stunden. Die mit (*) gekennzeichneten Messwerte (Standard Deviation) sind signifikant zur Kontrolle (C7-Zellen).

In der zusammenfassenden Darstellung stellen die Säulen den Mittelwert mit Standardabweichung dar, der aus den relativen Werten jeder Melanomzelllinie und Kontrolle ermittelt wurde. Die relativen Werte wurden aus den Angaben berechnet, die 2 Stunden vor und 28 Stunden nach der zweiten Aussaat gemessen wurden.

Aus der Abbildung 2a ist deutlich zu erkennen, dass alle vier Melanomzellarten bereits nach kurzer Zeit zu einem Widerstandsabfall geführt haben. Bei der Kontrolle dagegen ist ein Anstieg des Widerstandes zu sehen. Die Wm9-, Wm35- und A7-Zellen führen initial zu einem geringfügig schnelleren Abfall der

TEER als die A375-Zellen. Wobei bei den Wm35 der rascheste Abfall beobachtet werden kann. Bei einem initialen Zeitintervall von ≤ 30 Stunden kann also zwischen den einzelnen Melanomzellarten kein großer Unterschied erkannt werden. Nach dem statistischen Vergleich mittels des ungepaarten Student-t-Tests konnte nur bei den A375-Zellen kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle herausgearbeitet werden.

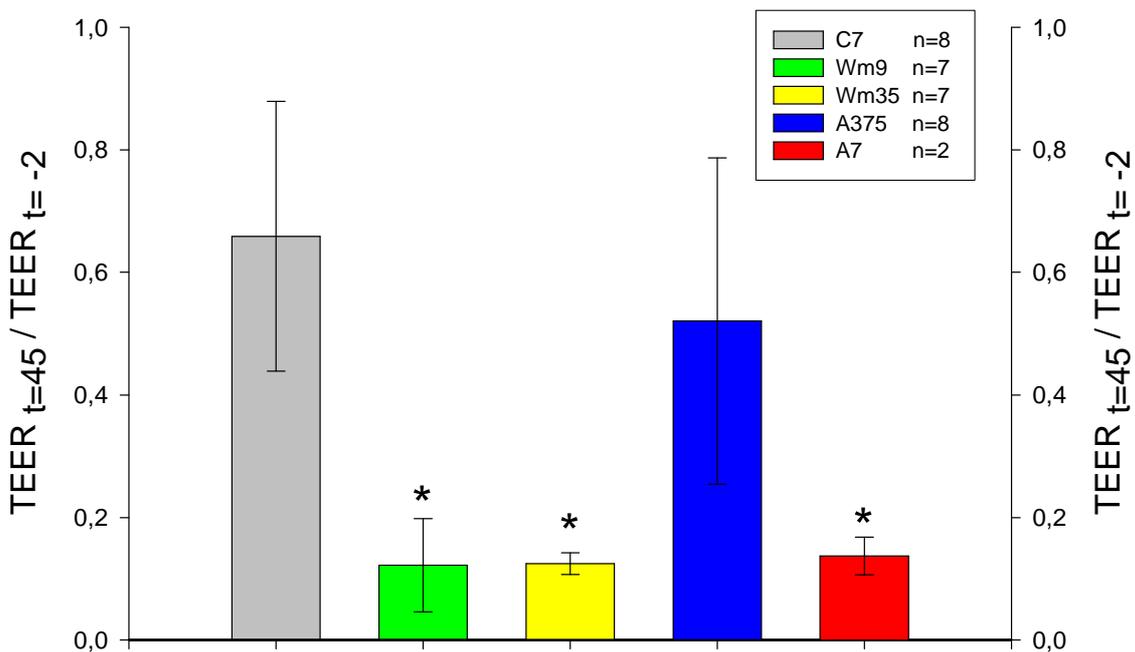


Abb. 2b: Zusammenfassung: Änderung der TEER nach 47 h (Langeffekt)

Die Abbildung verdeutlicht die relative Änderung der Widerstände aller vier untersuchten Melanomzellarten (aus dieser und der ersten Versuchsreihe), sowie der Kontrolle gegenüber den Ausgangswerten nach 47 Stunden. Die mit (*) gekennzeichneten Messwerte (Standard Deviation) sind signifikant zur Kontrolle (C7-Zellen).

Bei dieser Abbildung stellen die Säulen ebenfalls den Mittelwert mit Standardabweichung dar, der aus den relativen Werten jeder Melanomzelllinie und Kontrolle ermittelt wurde. Die relativen Werte wurden jedoch aus den

Werten berechnet, die 2 Stunden vor und 45 Stunden nach der zweiten Aussaat gemessen wurden.

Erst nach einem längeren Zeitintervall von 47 Stunden, wie bei diesem zusammenfassenden Säulendiagramm dargestellt, ist ein erheblicher Unterschied zwischen den einzelnen Melanomzellen sichtbar. Die Wm9-, Wm35- und A7-Zellen zeigen einen sehr starken TEER-Abfall, der bei allen drei Melanomarten kaum einen Unterschied aufweist. Die A375-Zellen dagegen weisen einen deutlich geringeren transepithelialen Widerstandsabfall auf, im Vergleich zu den anderen drei Melanomarten. Somit ist hier deutlich zu erkennen, dass die A7-, Wm9- und Wm35-Zellen ein höheres Aggressivitätsverhalten im Bezug auf die C7-Zellen aufweisen, als die A375-Zellen. Im Gegensatz zu den A375-Zellen weisen alle drei Zellarten einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf.

Bei der Kontrolle ist im Gegensatz zum Kurzeffekt ein transepithelialer Widerstandsabfall zu beobachten. Dieser kann auf eine Anreicherung der Zellen im Überstand zurückzuführen sein, die sich in Form vom TEER-Abfall äußert.

3.3 Experimente mit dem Zusatz von PAR-Agonisten

3.3.1 C7-Zellen

3.3.2 C7-Zellen + Melanomzelllinie A7

3.3.3 C7-Zellen + Melanomzelllinie A7 + PAR1-Agonisten

3.3.4 C7-Zellen + Melanomzelllinie A7 + PAR2-Agonisten

3.3.5 C7-Zellen + Melanomzelllinie Wm9

3.3.6 C7-Zellen + Melanomzelllinie Wm9 + PAR1-Agonisten

3.3.7 C7-Zellen + Melanomzelllinie Wm9 + PAR2-Agonisten

3.3.8 C7-Zellen + PAR1-Agonisten

3.3.9 C7-Zellen + PAR2-Agonisten

Bei dieser Versuchsreihe wurden neben den Melanomzelllinien A7 und Wm9 zusätzlich PAR-Agonisten getestet. Diese wurden entweder zusammen mit den Melanomzellen oder separat dem C7-Zellmonolayer zugefügt. Dadurch sollte ihre Wirkung auf die beiden Melanomzelllinien untersucht werden, inwieweit ihre Invasivität beeinflusst wird. Außerdem sollte gemessen werden, ob die PAR-Agonisten alleine ebenfalls eine Wirkung auf die C7-Zellen ausüben können.

Wie bereits bei den vorher beschriebenen Untersuchungen wurden auch hier einige 6-Well-Platten mit C7-Zellen ausgesät. Jedes Well wurde mit 3ml, sowie jeder Filter mit 2ml des gewohnten Mediums für die MDCK-C7-Zellen aufgefüllt. Die 2ml wurden durch 1ml Zellsuspension auf 3ml ergänzt. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Es wurden jeweils 1ml Medium apikal als auch basal entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Außerdem wurde der Zelllayer auf seine Konfluenz unter einem Mikroskop begutachtet.

Nach bereits zwei Tagen wurde mit den transepithelialen Messungen begonnen. Diese wurden alle zwei Tage durchgeführt. Nachdem die gewünschten TEER-Werte erreicht waren, wurden sowohl die C7-Zellen, als auch die beiden Melanomzellarten 24 Stunden vor der zweiten Aussaat auf Mangelmedium (FCS-freies Medium) gesetzt.

FCS ist fetales Kälberserum, das wachstumsfördernde Eigenschaften besitzt und somit das Wachstum von Zellen stimuliert. Durch den Gebrauch von Mangelmedium wurden die Zellen sensitiver gemacht.

Es wurden neue 6-Well-Platten verwendet. Jedes Well wurde mit 3ml Mangelmedium (DMEM + Pen/Str) aufgefüllt. Das Medium (DMEM + FCS + Pen/Str), welches sich in den Filtern mit den C7-Zellen befand, wurde größtenteils abgesaugt. Die Filter wurden dann in die neuen 6-Well-Platten überführt und mit Mangelmedium auf ca. 3ml aufgefüllt. Bei den A7-Zellen (DMEM + FCS + Pen/Str + G 418), sowie den Wm9-Zellen (RPMI + FCS + Pen/Str + L-Glutamin) wurde das Medium ebenfalls abgesaugt und durch Mangelmedium (DMEM + Pen/Str) bei Wm9-Zellen und (DMEM + Pen/Str + G418) bei A7-Zellen ersetzt.

Nach 24 Stunden erfolgte dann die letzte TEER-Messung vor der zweiten Aussaat. Dann wurden die Melanomzellen gesplittet. Zuerst wurde das Medium aus den T₇₅ – Flaschen abgesaugt. Dann wurden jeweils 10ml EDTA-Puffer hinzugefügt und die Flaschen für ca. 10 min. inkubiert, bis sich die Zellen gelöst haben. Es wurde nicht wie bisher mit PBS-Puffer gespült und die Zellen anschließend mit Trypsin-EDTA behandelt, da das Trypsin die Rezeptoren aktivieren kann. PAR2 reagieren sehr stark sensitiv auf Trypsin, PAR1 dagegen weniger.

Nach der Inkubation wurde wieder wie bekannt fortgeföhren und die Anzahl der Melanomzellen in der Neubauerzählkammer bestimmt. Dann erfolgte die zweite Aussaat. In einige der Filter wurden nur die Melanomzellen, in weitere nur PAR1 und PAR2 und in andere wiederum eine Melanomzellart kombiniert mit einem der beiden PAR-Agonisten ausgesät. Wie gewohnt blieben einige der Filter ohne einen Zusatz und dienten somit der Kontrolle.

In den ersten drei Tagen nach der zweiten Aussaat wurde zweimal am Tag der transepitheliale Widerstand bestimmt. Ab dem vierten Tag nur noch einmal täglich. Die Widerstände wurden bis 147 Stunden nach der zweiten Aussaat gemessen.

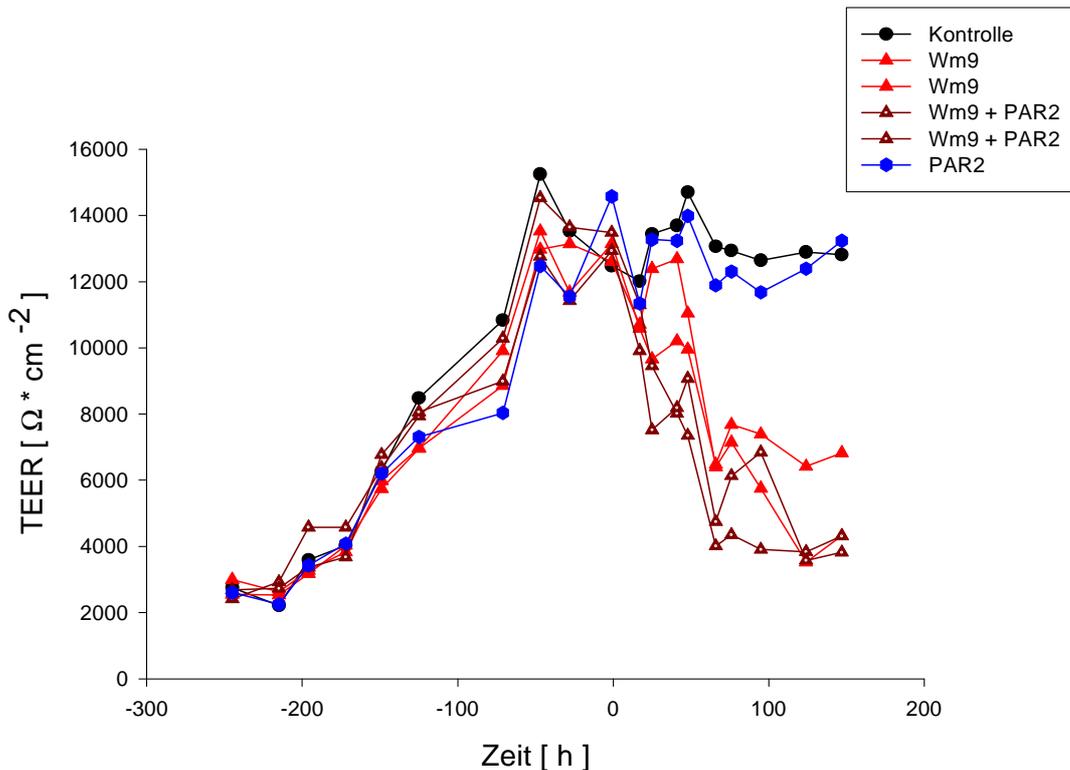


Abb. 3: (Bsp. zu Abb. 3a und 3b): TEER-Graph: PAR2

Diese Abbildung ist ein Beispiel aus der Versuchsreihe mit den PAR1- und PAR2-Agonisten. Der Graph zeigt das TEER-Verhalten nach der Applikation von Wm9-Zellen, von PAR2-Agonisten, sowie von Wm9-Zellen kombiniert mit dem PAR2-Agonisten. Die Stunde 0 stellt den Zeitpunkt der zweiten Aussaat (Kokultivierung der C7-Zellen mit Wm9-Zellen) dar.

Aus dem Graphen ist deutlich zu erkennen, dass es durch die Gabe von Wm9-Zellen, sowie von Wm9-Zellen mit einem Zusatz von PAR2-Agonisten bereits nach 17 Stunden zu einem TEER-Abfall gekommen ist. Die Widerstände fielen kontinuierlich mit der Zeit, wobei zwischenzeitlich zweimal ein leichter Anstieg des transepithelialen Widerstandes zu erkennen ist. Nach 147 Stunden wurden

Widerstände gemessen, die in Relation zu den Ausgangswerten vor der zweiten Aussaat um 50% bis 60% gesunken waren. Bei einem Well mit den Wm9-Zellen, ist vor allem am Ende der Messungen ein deutlich geringerer TEER-Abfall zu beobachten, als bei den Wm9-Zellen + PAR2-Agonisten. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Zusatz von PAR-Agonisten die Proteinase-aktivierten Rezeptoren aktiviert und somit die Invasivität von Melanomzellen verstärkt, die sich in dem Widerstandsabfall widerspiegelt.

Bei der Kontrolle und dem Well mit den PAR2-Agonisten verändern sich die Widerstände während der Messungen nur geringfügig. Sie pendeln um die Ausgangswerte mit leichten Ausschweifungen nach oben und nach unten. Bei der Kontrolle entspricht der Endwert (nach 147 Stunden) bei der TEER-Bestimmung fast dem Ausgangswert, da hier ein Anstieg von 2,7% vorlag. Bei den PAR2-Agonisten ist nach 147 Stunden ein Widerstandsabfall von nur 9% zu beobachten. Somit ist zu vermuten, dass durch die alleinige Gabe von PAR-Agonisten der Widerstand nicht sinkt und somit kein Einfluss auf den C7-Monolayer ausgeübt wird.

Versuche mit PAR1-Agonisten wurden ebenfalls durchgeführt und zeigten ähnliche Widerstandsabfälle, wie bei den PAR2-Agonisten (siehe Abb. 3a und 3b).

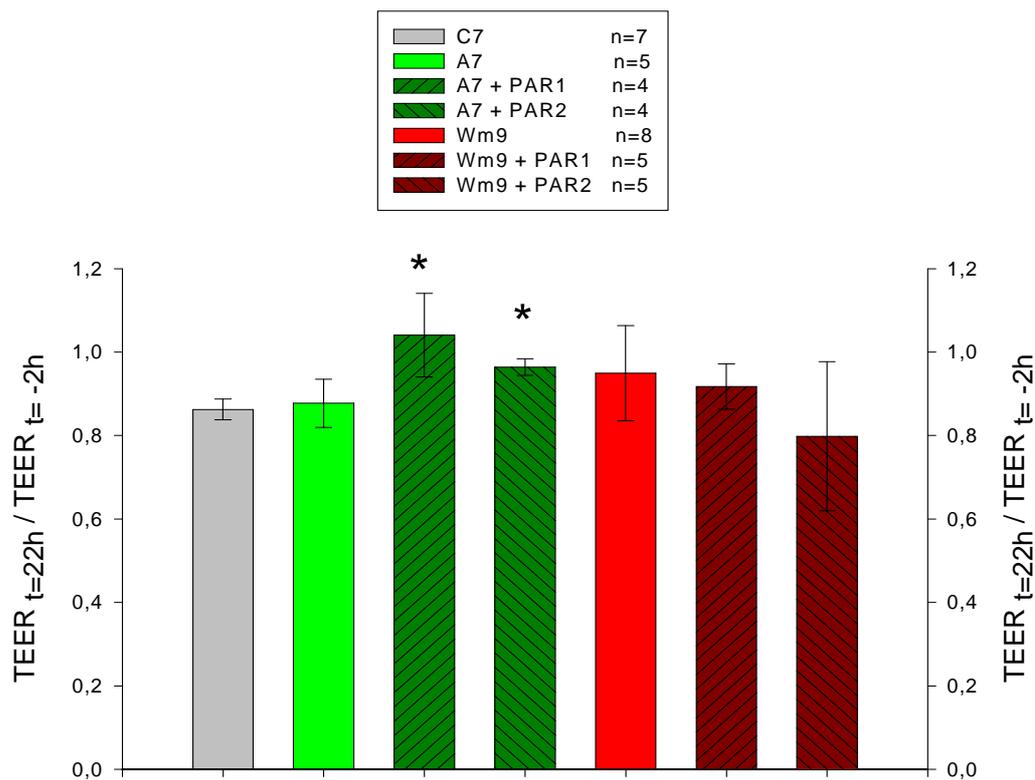


Abb. 3a: Zusammenfassung: Änderung der TEER nach 24 h (Kurzeffekt)
 Die Abbildung verdeutlicht die relative Änderung der Widerstände der beiden Melanomzellarten, sowohl mit als auch ohne einen Zusatz von PAR1- und PAR2-Agonisten, sowie der Kontrolle gegenüber den Ausgangswerten nach 24 Stunden. Die mit (*) gekennzeichneten Messwerte (Standard Deviation) sind signifikant zur Kontrolle (die jeweilige Melanomart ohne PARs).

Wie bereits in der vorherigen Versuchsreihe erläutert, stellen die Säulen in der zusammenfassenden Darstellung den Mittelwert mit Standardabweichung dar, der aus den relativen Werten ermittelt wurde. Die relativen Werte wurden aus den Angaben berechnet, die 2 Stunden vor und 22 Stunden nach der zweiten Aussaat gemessen wurden.

Innerhalb der initialen Zeit, kann noch nicht eindeutig festgestellt werden, was für einen Einfluss Proteinase-aktivierte Rezeptoren auf die Invasivität von Melanomzellen nehmen. Beim Betrachten des Säulendiagramms führen A7-

Zellen tendenziell zu einer größeren Abnahme des TEER, als A7-Zellen mit einem Zusatz von PAR-Agonisten. Dabei liegt der Widerstandabfall bei den Wells mit dem PAR2-Zusatz geringfügig höher als der bei den PAR1-Agonisten. Jedoch wie später gezeigt, kann ein protektiver Effekt von PAR1 nicht belegt werden. Die Wm9-Zellen dagegen führen zu einer geringeren Abnahme des TEER, als Wm9-Zellen mit einem Zusatz von PAR-Agonisten. Im Vergleich zu PAR1-Agonisten führen PAR2-Agonisten bei dieser Melanomzellart ebenfalls zu einem stärkeren Widerstandabfall. Somit kann man annehmen, dass PAR2-Agonisten die Invasivität von beiden Melanomzellarten stärker beeinflussen als PAR1-Agonisten. Nach dem statistischen Vergleich mittels des ungepaarten Student-t-Tests konnte nur bei den A7-Zellen ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (die gleiche Melanomart ohne Zusatz von PARs) herausgearbeitet werden.

Die Kontrolle weist innerhalb des kurzen Zeitintervalls ebenfalls einen TEER-Abfall auf.

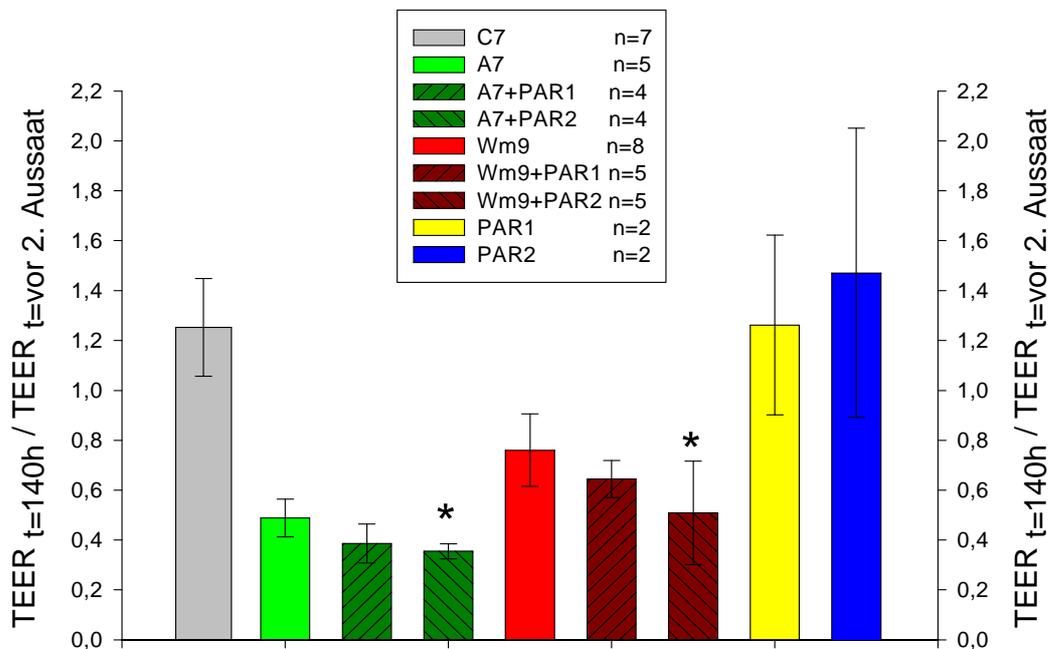


Abb. 3b: Zusammenfassung: Änderung der TEER nach über 140h (Langeffekt)
Die Abbildung verdeutlicht die relative Änderung der Widerstände der beiden Melanomzellarten, sowohl mit als auch ohne einen Zusatz von PAR1- und PAR2-Agonisten, der PAR-Agonisten, sowie der Kontrolle gegenüber des Ausgangswertes nach mehr als 140 Stunden. Die mit () gekennzeichneten Messwerte (Standard Deviation) sind signifikant zur Kontrolle (die jeweilige Melanomart ohne PARs).*

Bei diesem zusammenfassenden Säulendiagramm ist genau zu erkennen, dass die Gabe von Melanomzellen, mit oder ohne eines PAR-Agonisten-Zusatzes, auf die C7-Zellen zu einer signifikanten Abnahme des TEER gegenüber der Kontrolle und der alleinigen Gabe von PAR1- und PAR2-Agonisten führt.

Es ist deutlich zu sehen, dass sowohl die A7-, als auch die Wm9-Zellen ein weniger aggressives Verhalten aufweisen, wenn sie alleine dem C7-Monolayer zugegeben werden. Ihre Invasivität wird durch die Zugabe von PAR-Agonisten erhöht. Diese ist an dem stärkeren TEER-Abfall deutlich zu erkennen. Wie bereits bei dem Kurzeffekt vermutet, ist ebenfalls ein Unterschied zwischen den beiden Rezeptortypen feststellbar. Die Applikation von PAR2-Agonisten verstärkt das invasive Verhalten von Melanomzellen mehr als PAR1-Agonisten. Mittels des Student-t-Tests konnte dieser signifikante Unterschied herausgearbeitet und somit bestätigt werden.

Der Anschein, der beim Kurzeffekt sichtbar ist, die Zugabe von PAR1 zu den A7-Zellen würde zu einem Anstieg des TEER führen, kommt dadurch zustande, dass es unerwarteter Weise zu einem Abfall der Kontrolle gekommen ist. Beim Langeffekt konnte dieses widerlegt werden.

Bei der Kontrolle, sowie bei der alleinigen Zugabe von PAR1- und PAR2-Agonisten ist bei einem langen Zeitintervall eine Zunahme des TEER erkennbar. Dies bedeutet, dass PAR-Agonisten alleine keinen Einfluss auf den C7-Monolayer ausüben.

4 Diskussion

4.1 Invasivität von Melanomzellen

Als Metastasierung wird allgemein die Verschleppung von Tumorzellen in andere Bereiche des Organismus und ein damit verbundenes An- und Weiterwachsen in dieser Lokalisation bezeichnet [20]. Voraussetzung für die Metastasierung ist, dass der Krebs invasiv wächst, d.h. in die angrenzenden Strukturen hinein mit Durchbruch in Blut- oder Lymphgefäße.

Als Invasivität bezeichnet man also die Fähigkeit, körpereigene Barrieren wie die Basalmembran oder die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen, ein Blut- oder Lymphgefäß aktiv aufzusuchen (Chemotaxis), in das Gefäß einzudringen, sich während der Wanderung im Blut gegen das körpereigene Immunsystem zu wehren, andernorts das Gefäß zu verlassen, und sich schließlich zu vermehren. Sie ist eine aktive Leistung maligner Krebszellen, und zwar abhängig von den jeweiligen genetischen Besonderheiten des individuellen Tumors.

Proteinasen, proteolytische Enzyme, die Proteine oder Peptide spalten können, spielen eine wichtige Rolle bei der Invasivität und Metastasierung maligner Tumoren. Für die Entstehung von Metastasen bösartiger solider Tumoren ist es notwendig, dass Tumorzellen die Basalmembran, bestehend aus Kollagen (Typ IV), Laminin und Heparinsulfatproteoglykanen, durchwandern. Für deren Überwindung spielen Proteinasen wie die Serin-Proteinasen, Cystein-Proteinasen, Aspartyl-Proteinasen und insbesondere Matrix-Metalloproteinasen eine essentielle Rolle. Alle vier Klassen von Proteasen können an einem oder mehreren Schritten des Metastasierungsprozesses beteiligt sein [81].

Die verschiedenen Peptidasen, eine weitere Bezeichnungsmöglichkeit dieser proteolytischer Enzyme, werden durch die einzelnen Tumorzellen gebildet und ausgeschieden. Sie sind für alle Organismen lebensnotwendig und ubiquitär, d.h. sie kommen in allen Geweben und Zellen vor.

Proteasen können aufgrund ihrer charakteristischen aktiven Zentren klassifiziert werden. An dem aktiven oder katalytischen Zentrum wird das Substrat in einer für die Reaktion optimalen räumlichen Anordnung fixiert und einzelne funktionelle Gruppen wirken als eigentliche Katalysatoren.

Matrix-Metalloproteinasen sind zinkabhängige Endopeptidasen, die für die Spaltung und für den Abbau von perizellulären Substraten zuständig sind. Es sind über 23 verschiedene Mitglieder von MMPs bekannt, die nicht nur bei den Menschen, sondern auch bei wirbellosen Tieren und Pflanzen identifiziert worden sind [13,132].

Jedes Mitglied der Familie der Matrix-Metalloproteinasen hat charakteristische, oft aber auch überlappende Eigenschaften bezüglich der extrazellulären Substrate wie Kollagen, Elastin, Fibronectin, Laminin und nahezu jede weitere Komponente der extrazellulären Matrix [78]. MMPs haben also jeweils für sie spezifische Substrate. Beispielsweise wird Typ IV Kollagen hauptsächlich von den MMP-2 und -9 abgebaut. MMP-3, -10 und -11 dagegen bauen Proteoglykane, Laminin oder Fibronectin ab.

Viele verschiedene, invasive Zelllinien, die z.B. beim Brust-, Prostata- oder Lungenkrebs vorzufinden sind, exprimieren große Mengen an MMP-2 [136]. Stark aggressive Melanomzellen scheiden nicht nur große Mengen an MMP-2 und MMP-9, auch Gelatinase A und Gelatinase B genannt, aus, sondern auch MMP-1 und das transmembrane Enzym MT1-MMP [67,116].

Für die unterschiedlichen Proteinase-Klassen existieren jeweils unspezifische, wie z.B. α 2-Makroglobulin, oder spezifische Inhibitoren, wie z.B. der „plasminogen activator inhibitor“ (PAI) oder die sogenannte „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMPs), die ebenfalls durch die Tumorzellen sezerniert werden [61]. Die Inhibitoren sind entweder für eine ganze Proteaseklasse spezifisch oder sie verringern nur die Aktivität einzelner Enzyme einer Klasse.

Unter normalen physiologischen Bedingungen wird die Produktion proteolytischer Enzyme, z.B. MMPs, im Gleichgewicht mit ihren Inhibitoren, z.B. TIMPs, gehalten [9]. Bei einer Invasion wird dieses Gleichgewicht gestört und es kommt zu einer Imbalance stimulatorischer und inhibitorischer Faktoren zugunsten der Proteasen [81].

4.2 Proteinase-aktivierte Rezeptoren

Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PARs) stellen eine neue Unterfamilie G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCRs) mit sieben transmembranären Domänen dar. Diese Subfamilie ist durch einen einzigartigen Aktivierungsmechanismus über die proteolytische Spaltung verschiedener Serinproteasen (Thrombin, Trypsin, Tryptase, Cathepsin G, Proteinase-3, Faktor VII, Faktor Xa, bakterielle Proteasen, Hausstaubmilbenallergene), synthetischen aktivierenden Peptiden (APs) [35,46,69,94,95], aber auch durch die bereits erwähnten Matrix-Metalloproteinasen, nämlich die MMP-1 [14,60] gekennzeichnet.

Eine Beteiligung von PARs konnte bei akuten und chronischen Entzündungen wie der Pankreatitis, Kolitis, Entzündungen der Haut, Orchitis und rheumatoider Arthritis gezeigt werden. Sie beeinflussen unter anderem auch Blutgerinnung, Tumorwachstum oder allergische Reaktionen.

Zurzeit umfasst die Familie der Proteinase-aktivierten Rezeptoren vier Mitglieder, die als PAR1 bis PAR4 definiert sind [107].

Die Aktivierung Proteinase-aktivierter Rezeptoren ist durch einen einzigartigen Mechanismus gekennzeichnet: Proteinasen aktivieren PARs mithilfe der proteolytischen Spaltung im Bereich des extrazellulären N-Terminus des Rezeptors. Dadurch entsteht eine neue, unbekanntere Rezeptor-aktivierende N-terminale Sequenz, die innerhalb des Rezeptors an diesen bindet und ihn aktiviert [105,106,133]. Innerhalb dieser angebotenen Ligandendomäne gibt es spezielle Reste (circa sechs Aminosäuren), die mit der zweiten extrazellulären Schlaufe und anderen Domänen des gespaltenen Rezeptors interagieren [131] und somit zur Aktivierung führen. Der Prozess der intramolekularen Aktivierung wird gefolgt von der Anhaftung an G-Proteine und vom Auslösen einer Vielfalt von nachgeschalteten Signaltransduktionsbahnen [46,69,95]. PARs werden daher nicht wie klassische Rezeptoren aktiviert, da der spezifische, Rezeptor-aktivierende Ligand ein Teil des Rezeptors ist [125].

Durch die Aktivierung von PARs werden also Signaltransduktionskaskaden in Gang gesetzt, die zur Beeinflussung von Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Mitogenese, Zellmotilität, Regulation von Zellzyklusproteinen oder Freisetzung von Wachstumsfaktoren führen. Proteasen sind somit Signalmoleküle, die durch Aktivierung spezifischer Rezeptoren und Induktion intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden wichtige Zellfunktionen beeinflussen.

Die Aktivierung von Proteinase-aktivierten Rezeptoren kann auch durch den Gebrauch von synthetischen Peptiden, so genannte PAR-aktivierende Peptide, die mit den Domänen der angebundenen Liganden der humanen PAR1, PAR2 und PAR4 übereinstimmen, reproduziert werden [88]. SFLLRN-NH₂ ist ein PAR1-AP, SLIGRL-NH₂ ein PAR2-AP, TFRGAP ein PAR3-AP und GYPGQV ein PAR4-AP. Einige dieser Agonisten sind in der Lage mehr als einen Proteinase-aktivierten Rezeptor zu aktivieren. Als Beispiel dafür dient SFLLRN-NH₂, ein PAR1 aktivierendes Peptid, der auch PAR2 aktivieren kann. SLIGRL-NH₂ dagegen ist nicht in der Lage andere PARs zu aktivieren [125].

Proteinase-aktivierte Rezeptoren wurden erstmals als „Thrombin-Rezeptoren“ beschrieben (1991) [133]. Der Identifikation des murinen PAR2 [105] folgte die Klonierung des humanen Homologs, des „Trypsin-Rezeptors“ (1996) [17]. Mittlerweile sind die Rezeptoren PAR3 (1997) und PAR4 (1998) bestimmt worden und es ist zu vermuten, dass die Identifikation weiter folgen wird [68].

PAR1, PAR3 und PAR4 dienen für Thrombin, Trypsin oder Cathepsin G als Zielrezeptoren [78,82,133,138]. PAR2 ist der einzige Rezeptor, der gegen Thrombin resistent ist. Er kann jedoch durch Trypsin, Mastzell-Tryptase (ein wichtiges Enzym bei allergischen und entzündlichen Reaktionen in der Haut), Faktor Xa und neuronale Serin-Proteinasen aktiviert werden [21,90,92,100,105,106,121,123].

Thrombin ist ein entscheidendes Enzym der plasmatischen Blutgerinnung, er spielt aber auch eine Rolle bei der Entzündung, bei Allergien, Tumorwachstum, Metastasierung, Gewebeumbau, Thrombose und wahrscheinlich bei der Wundheilung [28,35,36,95]. Es ist bewiesen, dass viele zelluläre Abläufe von Thrombin (z.B. Thrombozytenaggregation, Angiogenese) auf die Aktivierung seiner G-Protein gekoppelter Rezeptoren zurückzuführen sind [26,39,93,102,112,127,128,130].

PAR1, auch als Thrombin-Rezeptor bezeichnet, ist in einer Vielzahl von Geweben vorzufinden, einschließlich auf Thrombozyten, endo- und epithelialen Zellen, glatten Muskelzellen, Gliazellen, Neuronen, Mastzellen, Fibroblasten und auf bestimmten Tumorzelllinien [7,32,62,73,133,135]. Die Aktivierung von PAR1 hat dementsprechend einen wesentlichen Einfluss auf das Gefäßsystem, den gastrointestinalen Trakt (GI), das periphere Nervensystem, die Blutgerinnung oder das Invasionsverhalten von malignen Tumoren [125]. PAR1 wird ebenfalls auf der Oberfläche vieler Zellen (z.B. epitheliale Zellen, glatte Muskelzellen) der Atemwege exprimiert. Es gibt sogar mehrere Studien, die darlegen, PAR1 spiele eine wichtige Rolle bei entzündlichen Lungenerkrankungen, wie bei der Lungenfibrose oder bei Asthma [8,24,25,27,40,93,120,134]. Wie bereits erwähnt, wird der Rezeptor auch von Endothelzellen exprimiert, der physiologischen Barriere zwischen Blut und Gewebe. In diesen Zellen kann PAR1 auch durch aktivierendes Protein C (APC) stimuliert werden. Im Vergleich zu Thrombin, hat APC entzündungshemmende und gefäßschützende Effekte. Da sowohl Thrombin als auch APC unterschiedliche biologische Effekte im Endothelium ausüben können, ist PAR1 in der Lage verschiedene Signaltransduktionsbahnen zu stimulieren.

Antagonisten für PAR1 [2,6,11] sind in der Lage, solche Prozesse effektiv zu inhibieren. PAR1 weisen mehrere extra- und intrazelluläre Stellen auf, die für ihre Funktion wichtig sind und als Targets für Antagonisten fungieren [45]. Bei den Antagonisten handelt es sich zum Teil um Pepducine, Peptide, die aus der

dritten intrazellulären Schlaufe des PAR1 erlangt wurden. Nicht-Peptid Antagonisten sind auch bekannt.

PAR2 wird im Hirn, Auge, Herzen, gastrointestinalen Trakt, in den Atemwegen, Eierstöcken, Hoden, in der Bauchspeicheldrüse, Niere, Leber, Prostata und in der Haut exprimiert [17,53,71,104,105,106,123,124], jedoch nicht von den Thrombozyten [77]. Der Rezeptor ist ebenfalls bei vielen Zelltypen vorzufinden, wie zum Beispiel bei den Epithel- und Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Osteoblasten, Immunzellen, wie T-Zellen, Mastzellen, neutrophilen oder eosinophilen Granulozyten [1,3,17,34,74,77,86,97,99,111,113]. Die Aktivierung von PAR2 nimmt also einen Einfluss auf das Gefäßsystem mit vielen entzündungsfördernden Effekten. Er führt zur Vasodilatation, sowie zur endothelialen Zellproliferation im kardiovaskulären System. PAR2 hat ebenfalls einen Einfluss auf die Atemwege, sowohl mit entzündungshemmender, als auch -fördernder Rolle, auf das Gehirn, das periphere Nervensystem und auf die Haut. Er ist ein Rezeptor für Mastzell-Tryptase, einem wichtigen Enzym bei allergischen und entzündlichen Reaktionen in der Haut. Da der Rezeptor in entzündlicher Haut auf sensorischen Nervenfasern heraufreguliert wird, liegt es nahe, dass Mastzellen über die Aktivierung von PAR2 mit Nervenfasern der Haut kommunizieren. In der Tat führt die Aktivierung von neuronalem PAR2 zur Freisetzung von Neuropeptiden aus sensorischen Nerven und somit zur neurogenen Entzündung [123].

Antagonisten gegen PAR2 sind noch nicht genau bekannt und immer noch in der Erprobung.

PAR3 wird bei Menschen im Knochenmark, Herz, Gehirn, Pankreas, Thymus, Magen, Dünndarm, in der Plazenta, Leber, Luftröhre und in den Lymphknoten exprimiert, wobei die Zelltypen noch identifiziert werden müssen [125]. Untersuchungen zur PAR3-Expression in menschlichen Thrombozyten haben ergeben, dass der Rezeptor gar nicht oder kaum von den Blutplättchen

produziert wird [83]. Er scheint als ein Cofaktor für die Aktivierung von PAR4 zu wirken, anstatt als ein unabhängiger Zellregulator zu fungieren [101].

Über PAR3-Antagonisten ist nichts bekannt.

PAR4 ist der zuletzt bestimmte Rezeptor, der aus dem Gewebe von Menschen, Mäusen und Ratten geklont wurde [70,82,138]. Bei den Menschen ist PAR4 sehr weit verbreitet im Gehirn [126], in den Hoden, in der Plazenta, Lunge, Leber, Bauchspeicheldrüse, Schilddrüse, Skelettmuskulatur und im Dünn- und Leerdarm [138]. Außerdem wird PAR4 auf Blutplättchen und immunkompetenten Zellen exprimiert, was die Rolle dieses Rezeptors während der Entzündung nahe legt. Bei Ratten wird er in der Speiseröhre, im Magen, Zwölffingerdarm, hinteren Dickdarmanteil, Gehirn und in der Milz exprimiert [70,85]. Sowohl beim Menschen als auch bei den Mäusen werden für die Thrombozytenaktivierung zwei Thrombinrezeptoren verwendet, da PAR4 eine geringe Affinität aufweist. Bei Mäusen benutzen Blutplättchen PAR3 und PAR4, anstatt von PAR1 und PAR4, um auf Thrombin zu reagieren [82]. Beim Menschen dagegen wird die Thrombozytenantwort hauptsächlich über PAR1 vermittelt. Nur bei hohen Konzentrationen oder bei unterdrückter PAR1-Aktivierung, ist die Thrombin vermittelte Thrombozytenaktivierung von PAR4 abhängig. Diese Zusammenarbeit von mehreren Rezeptoren wird als „cross-talk“ bezeichnet. Signale, die über PAR4 vermittelt werden, führen zu einer Zufuhr von Kalzium [5,82,91], Thromboxanproduktion [61] und Thrombozytenaggregation [5].

Wie bei PAR1, wurden auch für PAR4 Antagonisten synthetisiert [137].

Alternativen in Bezug auf die Entwicklung von PAR-Antagonisten stellen auch inhibitorische Proteasen dar, die PAR-Rezeptoren C-terminal der Aktivierungsstelle spalten und somit den Rezeptor inaktivieren. Aber auch Protease-Inhibitoren, wie zum Beispiel das Nafomastat-Mesilat, dienen als PAR-Antagonisten.

4.3 Einfluss der PAR-Rezeptoren auf die Invasivität

Das Hauptziel dieser experimentellen Arbeit war es den Einfluss von PAR1 und PAR2 auf die Invasivität von zwei Melanomzelllinien, A7 und Wm9, zu untersuchen.

PARs sind Proteinase-aktivierte Rezeptoren, die eine wichtige Rolle bei der Entzündung und Blutgerinnung spielen. Außerdem werden PARs auf Melanomzellen exprimiert [41] und sie können sowohl durch Serinproteasen, als auch durch synthetische Stoffe, so genannte Agonisten, stimuliert werden.

In der Versuchsreihe wurden Melanomzellen, alleine oder mit einem Zusatz von PAR1- und PAR2-Agonisten, auf eine MDCK-C7-Nierenepithelzelllinie ausgesät und ihr Aggressivitätsverhalten anhand von Widerstandsmessungen ermittelt.

Wie schon durch Even-Ram und Mitarbeiter, sowie Boire und Mitarbeiter bewiesen, spielt PAR1, das am besten charakterisierte Mitglied G-Protein gekoppelter Rezeptoren, eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung und -entwicklung [14,50].

Neben Thrombin, Faktor Xa und Trypsin, den proteolytischen Aktivatoren von PAR1, haben Boire und seine Kollegen zum ersten Mal demonstriert, dass MMP-1, eine Kollagenase der Matrix-Metalloproteinase-Familie, einen zusätzlichen proteolytischen Aktivator von PAR1 darstellt. Diese funktionelle MMP-1/PAR1 Achse begünstigt die Tumorentstehung und Invasion beim Brustkrebs in vitro und in vivo, sowie beim Darm-, Pankreaskrebs und bei malignen Melanomen [14].

MMP-1 sind häufig im malignen Gewebe anzutreffen und ein Markenzeichen beim Brustkrebs. Sie werden durch Stromazellen synthetisiert und an das extrazelluläre Milieu sezerniert, wo sie aktiviert werden. Aktive MMP-1 spalten Kollagen von Typ I in der EM. Außerdem bindet MMP-1 an den extrazellulären N-Terminus des PAR1-Rezeptores und spaltet diesen, um den angebundenen

Liganden freizusetzen. Daraufhin bindet dieser an die zweite extrazelluläre Schlaufe, aktiviert intrazelluläre G-Proteine ($G\alpha/\beta$) entlang der Membran und löst eine Kaskade von Ereignissen aus, die zu einem invasiven Phenotyp für Krebszellen führt [108].

Außerdem haben Goerge und Mitarbeiter aus unserem Labor dargelegt, dass der Tumor-Endothel „cross-talk“ durch die intravaskuläre MMP-1/PAR1 Achse vermittelt wird. Sie unterstellten, dass MMP-1 ein prothrombisches, entzündliches und adhäsives Milieu über die Aktivierung des endothelialen PAR1 hervorrufen kann, die so genannte endotheliale Zellaktivierung (ECA). Außerdem fanden sie heraus, dass MMP-1 in humanen endothelialen Zellen die Ca^{2+} -Konzentration erhöht und zur Exozytose von vWF, einem Marker für ECA, führt. Diese Prozesse können jedoch mittels PAR1-Antagonisten (SCH-79797, RWJ-58259 und ATAP-2) gehemmt werden, was somit beweist, dass die Aktivierung über PAR1 vermittelt wird [60].

Bei der Krebsentwicklung spielen auch Gelatinasen, MMP-2 und MMP-9, die im Wesentlichen durch die Tumorzellen selbst produziert und sezerniert werden, eine große Rolle [94,114]. Eine andere Teilmenge der MMP Großfamilie beinhaltet MMP-1, MMP-8 und MMP-13. Diese so genannten Kollagenasen spalten neben den Elementen der EM etliche andere Matrix- und Nichtmatrixproteine einschließlich der Wachstumsfaktoren, die für die Regulierung des Zellwachstums und –überlebens zuständig sind.

Der Anstieg des invasiven Potentials bei Melanomzellen konnte durch meine Versuchsreihe bestätigt werden. Innerhalb eines kurzen Zeitintervalls (17 Std.) nach der zweiten Aussaat wurden Widerstandsabfälle in den Wells mit Melanomzellzusatz gemessen. Dabei konnte jedoch noch nicht explizit gesagt werden, ob der Zusatz von PAR1-Agonisten den TEER-Abfall beschleunigt. Nach ca. sechs Tagen wurde jedoch deutlich gezeigt, dass die Melanomzellen, bei denen PAR1 durch den entsprechenden Agonisten stimuliert wurde, ein höheres Invasivitätsverhalten aufwiesen.

Es gibt auch weitere Studien, in denen eine positive Korrelation zwischen der PAR1-Expression in Gewebeproben und dem Grad der Tumorausbreitung herausgearbeitet werden konnte [50,84,98]. Außerdem wird über die PAR1-Aktivierung die Tumorentstehung gefördert. Dieses erfolgt über die Stimulierung der Tumorzellproliferation und durch das Hervorrufen der Expression von z.B. endothelialen Wachstumsfaktoren [139] in Melanom- und Darmkrebszellen [42,51]. Nierodzik und Mitarbeiter, sowie Bromberg und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Überexpression von PAR1 in murinen und humanen Melanomzellen zu einer erhöhten Metastasierung bei Mäusen führt [19,103].

In einigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass vor allem PAR1 von metastasenbildenden humanen Melanomzellen in vitro in hohen Mengen exprimiert wird [51,129]. Massi und Mitarbeiter haben zum ersten Mal gezeigt, dass PAR1 nicht nur in metastatischen Melanomen, sondern auch in dysplastischen Muttermalen überexprimiert wird [98].

PAR2, auch Tryptase-Rezeptor genannt, wird in malignen Melanomen unterschiedlich exprimiert [98]. In mehreren Studien wurde bereits gezeigt, dass PAR2 eine wachstumsfördernde Rolle bei Tumoren aus unterschiedlichen Geweben hat [43,54,66,79,118,119]. In der Haut wird PAR2 von humanen Keratinozyten in großen Mengen exprimiert [4,44,72,113,123]. Erst kürzlich wurde durch Rattenhol und Kollegen aus unserem Labor bewiesen, dass PAR2 die Entwicklung von Hauttumoren, die sich aus Keratinozyten ableiten, in vivo inhibiert [110]. Seine antiproliferierende Wirkung gewinnt er durch die Stimulierung der TGF- β 1 Sekretion, durch die Regulierung von K10 Expression und durch die Hemmung der Angiogenese.

Neben den Serinproteasen und synthetischen Stoffen, kann PAR2 auch durch einen gespaltenen PAR1 intrazellulär transaktiviert werden [12]. Shi und Kollegen konnten sogar zeigen, dass PAR2 in Melanom- und Prostatakrebszellen direkt durch PAR1 aktiviert werden kann, was zu einem Anstieg der Zellwanderung und -invasion führte. Dafür war nicht einmal eine

vorausgehende Spaltung des PAR1 durch Thrombin nötig. Bei der Motilität von Tumorzellen konnten Shi u. a. ebenfalls demonstrieren, dass Thrombin nicht nur PAR1, sondern auch PAR2 indirekt spalten und aktivieren kann [118]. Dieses wirft die Möglichkeit auf, dass die PAR2-Aktivierung zur Metastasierung beiträgt.

Auch bei den Melanomzellen, die durch PAR2-Agonisten stimuliert wurden, war nach einem längeren Zeitintervall ein stärkerer TEER-Abfall sichtbar und somit ein höheres Aggressivitätsverhalten bestätigt, als bei den Zellen ohne PAR2-Agonisten.

Das beste Resultat bezüglich der PAR-Expression in Melanomzellen wurde bei Wm9-Zellen erzielt. Fast 40% der Wm9-Zellen weisen auf ihrer Zelloberflächen PAR1 auf. PAR2 dagegen wird in geringen Mengen gebildet ($\leq 5\%$). Außerdem wurde eine hohe MMP-1-Expressionsrate bei der Wm9-Melanomzelllinie demonstriert im Vergleich zu einer niedrigen Rate bei anderen Melanomzelllinien (A7 und A375) [unveröffentlichter Artikel].

In der Versuchsreihe konnte dieses nicht bestätigt werden, da sowohl die WM9, als auch die A7-Zellen mit den PAR2-Agonisten ein höheres Invasivitätsverhalten gezeigt haben, als mit PAR1-Agonisten. Dieses würde darauf deuten, dass beide Melanomzelllinien eine höhere Anzahl von PAR2 exprimieren, die dementsprechend in größerer Menge aktiviert werden kann. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass durch die Aktivierung von PAR2 die A7- und WM9-Melanomzellen invasiver reagieren, als bei der Aktivierung von PAR1.

Mit dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass Melanomzellen sowohl PAR1, als auch PAR2 exprimieren, die durch PAR-Agonisten stimuliert werden können. Bei meinen Versuchen habe ich mit den Melanomzelllinien A7 und Wm9 gearbeitet. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Melanomzelllinien mit einem Zusatz von PAR-Agonisten ein höheres invasives

Verhalten aufweisen, als ohne. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den bisher publizierten in vivo (Tiermodel) Experimenten und eröffnen somit die Möglichkeit diese Rezeptoren oder deren Agonisten als ein neues „Target“ in der Krebstherapie zu definieren.

5 Anhang

5.1 Methodischer Anhang

5.1.1 Medien und Lösungen

Medium für MDCK-C7-Zellen

DMEM	500 ml
FCS	50 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml

Medium für A7-Zellen

DMEM	500 ml
FCS	50 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
Geneticin 418	1 ml

Medium für A375-, Wm9- und Wm35-Zellen

RPMI	500 ml
FCS	50 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
L-Glutamin	5 ml

Serumfreies Medium für MDCK-C7- und Wm9-Zellen

DMEM	500 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml

Serumfreies Medium für A7-Zellen

DMEM	500 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
Geneticin 418	1 ml

PBS-Puffer (pH = 7,0-7,5)

ohne Calcium und Magnesium

KCl	0,20 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
NaCl	8,00 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g

Ad 1 l sterilem Aqua dest

EDTA-Puffer (PBS + EDTA)

EDTA	0,20 g
NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g

ad 1 l sterilem Aqua dest

Trypsin-EDTA-Lösung

EDTA	0,20 g
NaCl	8,00 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
Trypsin*	0,10 g

*13 000 - 20 000 BAEE U/mg

ad 1 l sterilem Aqua dest

Kochsalzlösung (0,9%)

H ₂ O dest.	1000 ml
NaCl	9 g

Trypanblau-Lösung (0,4%)

Wird in 0,85% Kochsalzlösung hergestellt

5.5.2 Inhaltsstoffe

DMEM (pH = 6,8-7,5)

ohne L-Glutamin

Hoher Glukoseanteil	4,5 g/l
Anorganische Salze	10,92 g/l
Aminosäuren	2,53 g/l
Vitamine	31,6 mg/l

RPMI 1640 (pH = 7,0-7,5)

ohne L-Glutamin

mit Phenol Red	5 mg/l
Anorganische Salze	9,35 g/l
Aminosäuren	1,46 g/l
Vitamine	43,66 mg/l

FCS (pH = 7,0-7,5)

Albumin	1,8-2,45 g/dl
IgG	< 100 µg/ml
Hämoglobin	< 20 mg/dl

Penicillin/Streptomycin (pH = 6,0-7,0)

Penicillin	10.000 Units/ml
Streptomycin	10 mg/ml
Lösungsmittel	0,9% NaCl

L-Glutamin (pH = 6,5-7,5)

L-Glutamin	200 mM
Lösungsmittel	0,9% NaCl

Geneticin 418

Aminoglykosid-Antibiotikum

Formel $C_{20}H_{40}N_4O_{10} \times 2H_2SO_4$

5.2 Literaturverzeichnis

- 1 Abraham LA, Chinni C, Jenkins AL, Loubakos A, Ally N, Pike RN, Mackie EJ (2000) Expression of protease-activated receptor-2 by osteoblasts. *Bone* 26:7-14
- 2 Ahn HS, Foster C, Boykow G, Stamford A, Manna M, Graziano M (2000) Inhibition of cellular action of thrombin by N3-cyclopropyl-7-[[4-(1-methylethyl)phenyl]methyl]-7H-pyrrolo[3, 2-]quinazoline-1,3-diamine (SCH 79797), a nonpeptide thrombin receptor antagonist. *Biochem Pharmacol* 60:1425-1434
- 3 Al Ani B, Saifeddine M, Hollenberg MD (1995) Detection of functional receptors for the proteinase-activated-receptor-2-activating polypeptide, SLIGRL-NH₂, in rat vascular and gastric smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 73:1203-1207
- 4 Algermissen B, Sitzmann J, Nürnberg W, Laubscher JC, Henz BM, Bauer F (2000) Distribution and potential biologic function of the thrombin receptor PAR-1 on human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 292:488-495
- 5 Andersen H, Greenberg DL, Fujikawa K, Xu W, Chung DW, Davie EW (1999) Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11189-11193
- 6 Andrade-Gordon P, Maryanoff BE, Derian CK, Zhang HC, Addo MF, Darrow AL, Eckardt AJ, Hoekstra WJ, McComsey DF, Oksenberg D, Reynolds EE, Santulli RJ, Scarborough RM, Smith CE, White KB (1999) Design, synthesis, and biological characterization of a peptide-mimetic antagonist for a tethered-ligand receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12257-12262
- 7 Arena CS, Quirk SM, Zhang YQ, Henrikson KP (1996) Rat uterine stromal cells: thrombin receptor and growth stimulation by thrombin. *Endocrinology* 137:3744-3749
- 8 Asokanathan N, Graham PT, Fink J, Knight DA, Bakker AJ, McWilliam AS, Thompson PJ, Stewart GA (2002) Activation of protease-activated receptor PAR-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and

prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells. *J Immunol* 168:3577-3585

- 9 Bafetti LM, Young TN, Itoh Y, Stack MS (1998) Intact vitronectin induces matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression and enhanced cellular invasion by melanoma cells. *J Biol Chem* 273(1):143-149
- 10 Baumhoer D, Steinbrück I, Götz W (2000) Spezielle Histologie, Haut und Hautanhangsgebilde. In: *Histologie mit Schemazeichnungen*. Urban und Fischer, München Jena, 1. Aufl. S.223-236
- 11 Bernatowicz MS, Klimas CE, Hartl KS, Peluso M, Allegretto NJ, Seiler SM (1996) Development of potent thrombin receptor antagonist peptides. *J Med Chem* 39:4879-4887
- 12 Blackhart BD, Emilsson K, Nguyen D, Teng W, Martelli AJ, Nystedt S, Sundelin J, Scarborough RM (1996) Ligand cross-reactivity within the protease-activated receptor family. *J Biol Chem* 271:16466-16471
- 13 Bode W, Maskos K (2003) Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem* 384:863-872
- 14 Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A (2005) PAR1 is a matrix metalloproteinase-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* 120:303-313
- 15 Boulpaep EL, Sackin H (1979) Equivalent electrical circuit analysis and rheogenic pumps in epithelia. *Fed Proc* 38:2030-2036
- 16 Böhm M, Schulte U, Funk JO, Raghunath M, Behrmann I, Kortylewski M, Heinrich PC, Kues T, Luger TA, Schwarz T (2001) Interleukin-6-Resistant Melanoma Cells Exhibit Reduced Activation of STAT3 and Lack of Inhibition of Cyclin E-Associated Kinase Activity. *The Society for Investigative Dermatology* 01:0022-202X
- 17 Böhm SK, Kong W, Bromme D, Smeekens SP, Anderson DC, Connolly A, Kahn M, Nelken NA, Coughlin SR, Payan DG, Bunnett NW (1996) Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J* 314:1009-1016

- 18 Braun-Falco, Plewig G, Wolff H (1997) Dermatologie und Venerologie. In: Anonymous Dermatologie und Venerologie. 4. Auflage Springer Verlag Berlin Heidelberg New York
- 19 Bromberg ME, Bailly MA, Konigsberg WH (2001) Role of protease activated receptor 1 in tumor cell metastasis promoted by tissue factor. *Thromb Haemost* 86:1210-1214
- 20 Bussemakers MJ, Schalken JA (1996) The role of cell adhesion molecules and proteases in tumor invasion and metastasis. *World J Urol* 14:151-15
- 21 Camerer E, Huang W, Coughlin SR (2000) Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5255-5260
- 22 Cereijido M, Gonzalez-Mariscal L, Contreras RG, Gallardo JM, Garcia-Villegas R, Valdes J (1993) The Making of a tight junction. *J Cell Sci Suppl* 17:127-132
- 23 Cereijido M, Stafari E, Palomo AM (1980) Occluding junctions in a cultured transporting epithelium: structural and functional heterogeneity. *J Membr Biol* 53:19-32
- 24 Chambers RC, Dabbagh K, McAnulty RJ, Gray AJ, Blanc-Brude OP, Laurent GJ (1998) Thrombin stimulates fibroblast procollagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor 1. *Biochem J* 333:121-127
- 25 Chambers RC, Leoni P, Blanc-Brude OP, Wembridge DE, Laurent GJ (2000) Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *J Biol Chem* 275:35584-35591
- 26 Chin AC, Vergnolle N, MacNaughton WK, Wallace JL, Hollenberg MD, Buret AG (2003) Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11104-11109
- 27 Chow JM, Moffatt JD, Cocks TM (2000) Effect of protease-activated receptor (PAR)-1, -2 and -4-activating peptides, thrombin and trypsin in rat isolated airways. *Br J Pharmacol* 131:1584-1591

- 28** Cirino G, Napoli C, Bucci M, Cicala C (2000) Inflammation-coagulation network: are serine protease receptors the knot? *Trends Pharmacol Sci* 21:170-172
- 29** Claude P (1978) Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol* 39:219-232
- 30** Claude P, Goodenough DA (1973) Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol* 58:390-400
- 31** Ciolczyk-Wierzbicka D, Amoresano AG, Casbarra AN, Hoja-Lukowicz D, Litynska A, Laidler P (2004) The structure of the oligosaccharides of N-Cadherin from human melanoma cell lines. *Glycoconjugate Journal* 20:483-492
- 32** Colotta F, Sciacca FL, Sironi M, Luini W, Rabiet MJ, Mantovani A (1994) Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am J Pathol* 144:975-985
- 33** Cormier JN, Hijazi YM, Abati A, Fetsch P, Bettinotti M, Steinberg SM, Rosenberg SA, Marincola FM (1998) Heterogeneous expression of melanoma-associated antigens and HLA-A2 in metastatic melanoma in vivo. *Int. J. Cancer* 75:517-524
- 34** Corvera CU, Déry O, McConalogue K, Böhm SK, Khitin LM, Caughey GH, Payan DG, Bunnett NW (1997) Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. *J Clin Invest* 100:1383-1393
- 35** Coughlin SR (2000) Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407:258-264
- 36** Coughlin SR (2001) Protease-activated receptors in vascular biology. *Thromb Haemost* 86:298-307
- 37** Cunningham CC (1992) Actin structural proteins in cell motility. *Cancer Metastasis Rev.* 11:69-77
- 38** Cunningham CC, Gorlin JB, Kwiatkowski DJ, Hartwig JH, Janmey PA, Byers HR, Stossel TP (1992) Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science* 255:325-327

- 39** Cunningham MA, Rondeau E, Chen X, Coughlin SR, Holdsworth SR, Tipping PG (2000) Protease-activated receptor 1 mediates thrombin dependent, cell-mediated renal inflammation in crescentic glomerulonephritis. *J Exp Med* 191:455-462
- 40** D'Andrea MR, Rogahn CJ, Andrade-Gordon P (2000) Localization of protease-activated receptors-1 and -2 in human mast cells: indications for an amplified mast cell degranulation cascade. *Biotech Histochem* 75:85-90
- 41** D'Andrea MR, Derian CK, Santulli RJ, Andrade-Gordon P (2001) Differential expression of protease-activated receptors-1 and -2 in stromal fibroblasts of normal, benign, and malignant human tissues. *Am J Pathol* 158:2031-2041
- 42** Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Lehy T, Laburthe M (2003) Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induce cell proliferation and motility in human colon cancer cells. *Am J Pathol* 162:1503-1513
- 43** Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Laburthe M (2004) Protease-activated receptor 2 in colon cancer: trypsin induced MAPK phosphorylation and cell proliferation are mediated by epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem* 279:20927-20934
- 44** Derian CK, Eckhardt AJ, Andrade-Gordon P (1997) Differential regulation of human keratinocyte growth and differentiation by a novel family by proteinase-activated receptor. *Cell Growth Differ* 8:743-749
- 45** Derian CK, Damiano BP, Addo MF, Darrow AL, D'Andrea MR, Nedelman M, Zhang HC, Maryanoff BE, Andrade-Gordon P (2003) Blockade of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 with a small-molecule antagonist prevents thrombus formation and vascular occlusion in nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther* 304:855-861
- 46** Dery O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett MW (1998) Proteinase-activated receptors: Novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol* 274:C1429-1452
- 47** Duffy MJ (1987) Do Proteases play a role in cancer invasion and metastasis? *Eur J Cancer Clin Oncol* 23:583-589

- 48** Engers R, Gabbert HE (1998) Basismechanismen der Metastasierung Tumorbilologische Grundlagen und klinische Implikationen. *Onkologie* 4:682-688
- 49** Ehrenfeld M, Prein J, Jundt G, Waldhart E (2002) Tumoren im Mund-Kiefer-Gesichts-Bereich. In: Schwenzer N und Ehrenfeld M (Hrsg) *Spezielle Chirurgie*. Thieme, Stuttgart New York, Bd. 2, 3. Aufl. S.99-101
- 50** Even-Ram S, Uziely B, Cohen P, Grisaru-Granovsky S, Maoz M, Ginzburg Y, Reich R, Vlodaysky I, Bar-Shavit R (1998) Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat Med* 4:909-914
- 51** Fischer EG, Ruf W, Mueller BM (1995) Tissue factor-initiated thrombin generation activates the signaling thrombin receptor on malignant melanoma cells. *Cancer Res* 55:1629-1632
- 52** Friend DS, Gilula NB (1972) Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. *J Cell Biol* 53:758-776
- 53** Frungieri MB, Weidinger S, Meineke V, Kohn FM, Mayerhofer A (2002) Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPAR α : possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15072-15077
- 54** Ge L, Shenoy SK, Lefkowitz RJ, DeFea KA (2004) Constitutive protease-activated-receptor-2 mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both β -arrestin-1 and 2. *J Biol Chem* 279:55419-55424
- 55** Gekle M, Wunsch S, Oberleithner H, Silbernagl S (1994) Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *Pflugers Arch* 428:157-162
- 56** Gershwin ME, Ikeda RM, Kawakami TG, Owens RB (1977) Immunobiology of heterotransplanted human tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst* 58:1455-1463
- 57** Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst* 51:1417-1423

- 58** Goel A, Chauhan SS (1997) Role of proteases in tumor invasion and metastasis. *Indian J Exp Biol* 35:553-564
- 59** Goerge T Funktionelle Untersuchungen zur Regulation von PARs in endothelialen Zellen der Haut: Bedeutung für die Pathophysiologie der Entzündung. Antrag auf ein Forschungsstipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft
- 60** Goerge T, Barg A, Schnaeker EM, Poppelmann B, Shpacovitch V, Rattenholl A, Maaser C, Luger TA, Steinhoff M, Schneider SW (2006) Tumor-Derived Matrix Metalloproteinase-1 Targets Endothelial Proteinase-Activated Receptor 1 Promoting Endothelial Cell Activation. *Cancer Res* 66:7766-7773
- 61** Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE (1996) Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 271:30375-30380
- 62** Grandaliano G, Valente AJ, Abboud HE (1994) A novel biologic activity of thrombin: stimulation of monocyte chemotactic protein production. *J Exp Med* 179:1737-1741
- 63** Henriksen RA, Hanks VK (2002) PAR-4 agonist AYPGKF stimulates thromboxane production by human platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:861-866
- 64** Herlyn M, Clark WH, Mastrangelo MJ, Guerry DP, Elder DE, LaRossa D, Hamilton R, Bondi E, Tuthill R, Steplewski Z, Koprowski H (1980) Specific immunoreactivity of hybridoma-secreted monoclonal antimelanoma antibodies to cultured cells and freshly derived human cells. *Cancer Res*:3602-3609
- 65** Herlyn M (1990) Human Melanoma: Development and progression. *Cancer and Metastasis Reviews* 9:101-112
- 66** Hjortoe GM, Petersen LC, Albrektsen T, Sorensen BB, Norby PL, Mandal SK et al. (2004) Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. *Blood* 103:3029-3037

- 67** Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, Ruiter DJ (2000) Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol* 115:337-344
- 68** Hollenberg MD (1999) Protease-activated receptors: PAR-4 and counting: how long is the course? *Trends Pharmacol Sci* 20:271-273
- 69** Hollenberg MD, Compton SJ (2002) International union of pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 54:203-217
- 70** Hoogerwerf WA, Hellmich HL, Micci M, Winston JH, Zou L, Pasricha PJ (2002) Molecular cloning of the rat proteinase-activated receptor 4 (PAR4). *BMC Mol Biol* 3:2
- 71** Hou L, Howells GL, Kapas S, Macey MG (1998) The protease-activated receptors and their cellular expression and function in blood-related cells. *Br J Haematol* 101:1-9
- 72** Hou L, Kapas S, Cruchley AT, Macey MG, Harriott P, Chinni C et al. (1998) Immunolocalization of protease-activated receptor-2 in skin: receptor activation stimulates interleukin-8 secretion by keratinocytes in vitro. *Immunology* 94:356-362
- 73** Howells GL, Macey M, Curtis MA, Stone SR (1993) Peripheral blood lymphocytes express the platelet-type thrombin receptor. *Br J Haematol* 84:156-160
- 74** Howells GL, Macey MG, Chinni C, Hou L, Fox MT, Harriott P, Stone SR (1997) Proteinase-activated receptor-2: expression by human neutrophils. *J Cell Sci* 110:881-887
- 75** Hsu MY, et al. (1999) Melanoma: The Wistar (WM) melanoma cell lines. In: Masters JRW, Palsson B, editors. *Human Cell Culture*. 1: Great Britain: Kluwer Academic Publishers: 259-274
- 76** Hudspeth AJ (1975) Establishment of tight junctions between epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:2711-2713
- 77** Hwa JJ, Ghibaudi L, Williams P, Chintala M, Zhang R, Chatterjee M, Sybertz E (1996) Evidence for the presence of a proteinase-activated receptor distinct from the thrombin receptor in vascular endothelial cells. *Circ Res* 78:581-588

- 78** Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR (1997) Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 386:502-506
- 79** Jikuhara A, Yoshii M, Iwagaki H, Mori S, Nishibori M, Tanaka N (2004) MAP kinase-mediated proliferation of DLD-1 carcinoma by the stimulation of protease-activated receptor-2. *Life Sci* 73:2817-2829
- 80** Junquiera LCU, Carneiro J (2004) Haut, Epidermis. In: Gratzl M (Hrsg) *Histologie*. Springer Medizin, Heidelberg, 6. Aufl. S.307-312
- 81** Kath R, Höffken K (1998) Mechanismen der Metastasierung und deren Beeinflussung. *Onkologe* 4:560-565
- 82** Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese Jr RV, Tam C, Coughlin SR (1998) A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394:690-694
- 83** Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR (1999) Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest* 103:879-887
- 84** Kamath L, Meydani A, Foss F, Kuliopulos A (2001) Signaling from protease-activated receptor-1 inhibits migration and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res* 61:5933-5940
- 85** Kaufmann R, Patt S, Zieger M, Kraft R, Tausch S, Henklein P, Nowak G (2000) The two-receptor system PAR-1/PAR-4 mediates α -thrombin-induced $[Ca^{2+}]_i$ mobilization in human astrocytoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 126:91-94
- 86** Kong W, McConlogue K, Khitin LM, Hollenberg MD, Payan DG, Böhm SK, Bunnett NW (1997) Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8884-8889
- 87** Koshikawa N, Nagashima Y, Miyagi Y, Mizushima H, Yanoma S, Yasumitsu H, Miyazaki K (1997) Expression of trypsin in vascular endothelial cells. *FEBS Lett* 409:442-448
- 88** Lan RS, Stewart GA, Henry PJ (2000) Modulation of airway smooth muscle tone by protease activated receptor-1, -2, -3 and -4 in trachea isolated from influenza A virus-infected mice. *BrJ Pharmacol* 129:63-70

- 89** Langmann J (1989) Medizinische Embryologie. In: Anonymous Medizinische Embryologie 8., überarbeitete Auflage Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- 90** Loubakos A, Chinni C, Thompson P, Potempa J, Travis J, Mackie EJ, Pike RN (1998) Cleavage and activation of proteinase-activated receptor-2 on human neutrophils by gingipain-R from *Porphyromonas gingivalis*. FEBS Lett 435:45-48
- 91** Loubakos A, Yuan YP, Jenkins AL, Travis J, Andrade-Gordon P, Santulli R, Potempa J, Pike RN (2001) Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity. Blood 97:3790-3797
- 92** Loubakos A, Potempa J, Travis J, D'Andrea MR, Andrade-Gordon P, Santulli R, Mackie EJ, Pike RN (2001) Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. Infect Immun 69:5121-5130
- 93** Ludwicka-Bradley A, Tourkina E, Suzuki S, Tyson E, Bonner M, Fenton JW, Hoffman S, Silver RM (2000) Thrombin upregulates interleukin-8 in lung fibroblasts via cleavage of proteolytically activated receptor-1 and protein kinase C- α activation. Am J Respir Cell Mol Biol 22:235-243
- 94** Ludwig T, Ossig R, Graessel S, Wilhelmi M, Oberleithner H, Schneider S (2002) The electrical resistance breakdown assay determines the role of proteinases in tumor cell invasion. Am J Physiol Renal Physiol 283:F319-F327
- 95** Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R (2001) Proteinase-activated receptors. Pharmacol Rev 53:245-282
- 96** Madin SH, Darby NB (1975) Jr. CCL-34. as catalogued in: American type culture collection catalogue of strains 2:47 Library of Congress, Rockville (1958)
- 97** Mari B, Guerin S, Far DF, Breitmayer JP, Belhacene N, Peyron JF, Rossi B, Auburger P (1996) Thrombin and trypsin-induced Ca²⁺ mobilization in

- human T cell lines through interaction with different protease-activated receptors. *FASEB J* 10:309-316
- 98** Massi D, Naldini A, Ardinghi C, Carraro F, Franchi A, Paglierani M, Tarantini F, Ketabchi S, Cirino G, Hollenberg MD, Geppetti P, Santucci M (2005) Expression of protease-activated receptors 1 and 2 in melanocytic nevi and malignant melanoma. *Hum Pathol* 36:676-685
- 99** Mirza H, Yatsula V, Bahou WF (1996) The proteinase activated receptor-2 (PAR-2) mediates mitogenic responses in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 97:1705-1714
- 100** Molino M, Barnathan ES, Numerof R, Clark J, Dreyer M, Cumashi A, Hoxie JA, Schechter N, Woolkalis M, Brass LF (1997) Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem* 272:4043-4049
- 101** Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR (2000) PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* 404:609-613
- 102** Naldini A, Carney DH (1996) Thrombin modulation of natural killer activity in human peripheral lymphocytes. *Cell Immunol* 172:35-42
- 103** Nierodzik ML, Chen K, Takeshita K, Li JJ, Huang YQ, Feng XS, D'Andrea MR, Andrade-Gordon P, Karparkin S (1998) Protease-activated receptor 1 (PAR-1) is required and rate-limiting for thrombin-enhanced experimental pulmonary metastasis. *Blood* 92:3694-3700
- 104** Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J (1994) Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9208-9212
- 105** Nystedt S, Emilsson K, Larsson AK, Strobeck B, Sundelin J (1995) Molecular cloning of a functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *Eur J Biochem* 232:84-89
- 106** Nystedt S, Larsson AK, Aberg H, Sundelin J (1995) The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene. Molecular cloning and functional expression. *J Biol Chem* 270:5950-5955
- 107** Ossovskaya VS, Bunnett NW (2004) Proteinase-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 84:579-621

- 108** Pei D (2005) Matrix metalloproteinases target protease-activated receptors on the tumor cell surface. *Cancer Cell* 7:207-208.
- 109** Powell DW (1981) Barrier function of epithelia. *Am J Physiol* 241:G275-G288
- 110** Rattenholl A, Seeliger S, Buddenkotte J, Schön M, Schön MP, Ständer S, Vergnolle N, Steinhoff M (2007) Proteinase-Activated Receptor-2 (PAR2): A Tumor Suppressor in Skin Carcinogenesis. *J Invest Dermatol* doi:10.1038/sj.jid.5700847
- 111** Saifeddine M, Al Ani B, Cheng CH, Wang L, Hollenberg MD (1996) Rat proteinase-activated receptor-2 (PAR-2): cDNA sequence and activity of receptor-derived peptides in gastric and vascular tissue. *Br J Pharmacol* 118:521-530
- 112** Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR (2001) Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature* 413:74-78
- 113** Santulli RJ, Derian CK, Darrow AL, Tomko KA, Eckardt AJ, Seiberg M, Scarborough RM, Andrade-Gordon P (1995) Evidence for the presence of a protease-activated receptor distinct from the thrombin receptor in human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9151-9155
- 114** Schnaeker EM, Ossig R, Ludwig T, Dreier R, Oberleithner H, Wilhelmi M, Schneider S (2004) Microtubule-Dependent Matrix Metalloproteinase-2/Matrix Metalloproteinase-9 Exocytosis: Prerequisite in Human Melanoma Cell Invasion. *Cancer Research* 64:8924-8931
- 115** Schultz SG (1979) Application of equivalent electrical circuit models to study of sodium transport across epithelial tissues. *Fed Proc* 38:2024-2029
- 116** Seftor RE, Seftor EA, Koshikawa N, Meltzer PS, Gardner LM, Bilban M, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V, Hendrix MJ (2001) Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res* 61:6322-6327

- 117** Sharma SD, Jiang J, Hadley ME, Bentley DL, Hruby VJ (1996) Melanotropic peptide-conjugated beads for microscopic visualization and characterization of melanoma melanotropin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13715-13720
- 118** Shi X, Gangadharan B, Brass LF, Ruf W, Mueller BM (2004) Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol Cancer Res* 2:395-402
- 119** Shimamoto R, Sawada T, Uchima Y, Inoue, M, Kimura, K, Yamashita, Y et al. (2004) A role for protease-activated receptor-2 in pancreatic cancer cell proliferation. *Int J Oncol* 24:1401-1406
- 120** Shimizu S, Gabazza EC, Hayashi T, Ido M, Adachi Y, Suzuki K (2000) Thrombin stimulates the expression of PDGF in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L503-L510
- 121** Smith R, Jenkins A, Loubakos A, Thompson P, Ramakrishnan V, Tomlinson J, Deshpande U, Johnson DA, Jones R, Mackie EJ, Pike RN (2000) Evidence for the activation of PAR-2 by the sperm protease, acrosin: expression of the receptor on oocytes. *FEBS Lett* 484:285-290
- 122** Staehelin LA (1974) Structure and function of intercellular junctions. *Int Rev Cytol* 39:191-283
- 123** Steinhoff M, Corvera CU, Thoma MS, Kong W, McAlpine BE, Caughey GH, Ansel JC, Bunnett NW (1999) Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Exp Dermatol* 8:282-294
- 124** Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, Trevisani M, Hollenberg MD, Wallace JL, Caughey GH, Mitchell SE, Williams LM, Geppetti P, Mayer EA, Bunnett NW (2000) Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* 6:151-158
- 125** Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, Luger TA, Hollenberg MD (2005) Proteinase-Activated Receptors: Transducers of Proteinase-Mediated Signaling in Inflammation and Immune Response. *Endocrine Reviews* 26 (1):1-43

- 126** Striggow F, Riek-Burchardt M, Kiesel A, Schmidt W, Henrich-Noack P, Breder J, Krug M, Reymann KG, Reiser G (2001) Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia. *Eur J Neurosci* 14:595-608
- 127** Sugama Y, Tirupathi C, Offakidevi K, Andersen TT, Fenton JW, Malik AB (1992) Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intercellular adhesion molecule-1: a mechanism for stabilizing neutrophil adhesion. *J Cell Biol* 119:935-944
- 128** Suk K, Cha S (1999) Thrombin-induced interleukin-8 production and its regulation by interferon- γ and prostaglandin E2 in human monocytic U937 cells. *Immunol Lett* 67:223-227
- 129** Tellez C, Bar-Eli M (2003) Role and regulation of the thrombin receptor (PAR-1) in human melanoma. *Oncogene* 22:3130-3137
- 130** Vergnolle N, Hollenberg MD, Wallace JL (1999) Pro- and anti-inflammatory actions of thrombin: a distinct role for proteinase-activated receptor-1 (PAR1). *Br J Pharmacol* 126:1262-1268
- 131** Verrall S, Ishii M, Chen M, Wang L, Tram T, Coughlin SR (1997) The thrombin receptor second cytoplasmic loop confers coupling to Gq-like G proteins in chimeric receptors. Additional evidence for a common transmembrane signaling and G protein coupling mechanism in G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 272:6898-6902
- 132** Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ Res* 92:827-839
- 133** Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64: 1057-1068
- 134** Walker TR, Moore SM, Lawson MF, Panettieri Jr RA, Chilvers ER (1998) Platelet-derived growth factor-BB and thrombin activate phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B: role in mediating airway smooth muscle proliferation. *Mol Pharmacol* 54:1007-1015

- 135** Weinstein JR, Gold SJ, Cunningham DD, Gall CM (1995) Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat brain: expression by mesencephalic dopaminergic neurons and codistribution with prothrombin mRNA. *J Neurosci* 15:2906-2919
- 136** Westermarck J, Kahari VM (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 13:781-792
- 137** Wu CC, Hwang TL, Liao CH, Kuo SC, Lee FY, Lee CY, Teng CM (2002) Selective inhibition of protease-activated receptor 4-dependent platelet activation by YD-3. *Thromb Haemost* 87:1026-1033
- 138** Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC (1998) Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6642-6646
- 139** Yin Y-J, Salah Z, Maoz M, Cohen Even Ram S, Ochayon S, Neufeld G, Katzav S, Bar-Shavit R (2003) Oncogenic transformation induces tumor angiogenesis: a role for PAR1 activation. *FASEB J* 17:163-174

5.3 Danksagung

Allen Personen, die mich während meiner Arbeit auf ihre unterschiedliche Art und Weise unterstützt haben, möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen.

In erster Linie und ganz besonders Prof. Dr. med. Stefan W. Schneider für das interessante Dissertationsthema und seine ausgezeichnete Betreuung mit zahlreichen Anregungen, Diskussionen und kritischer Durchsicht dieser Arbeit. Einen besseren Betreuer hätte ich mir nicht wünschen können.

Christian Gorzelanny für die Einführung in die experimentelle Laborarbeit, die unentbehrlichen Ratschläge und Hilfe bei der Durchführung der Experimente und bei der Arbeit mit der Software.

Birgit Pöppelmann für die tolle Unterstützung bei der Zellkultivierung und für ihre Hilfe bei der Literaturrecherche nach einigen Zellarten.

Marianne Wilhelmi und Suzanna Pereira für die Bereitstellung der für die Experimente benötigten Zellen.

Felix Kleinerüschkamp für die Hilfe bei der Erstellung der Graphiken.

Allen Mitarbeitern des Dermatologischen Instituts für die freundliche Aufnahme, eine nette Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft.

Meiner Familie für ihre moralische Unterstützung, Geduld und ihren Glauben an mich während des gesamten Studiums.

5.4 Curriculum Vitae

Name:	Porowski
Vorname:	Katharina, Anna
Geburtstag:	25.04.1980
Geburtsort:	Oppeln
Schulbildung:	1987 - 1988 Volksschule, Oppeln 1988 - 1991 Grundschule (Blücherschule), Gütersloh 1991 - 2000 Städt. Gymnasium, Gütersloh 14. Juni 2000 Allgemeine Hochschulreife
Studium:	April 2001 – Juli 2006 Studium der Zahnmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster 20. September 2002 Naturwissenschaftliche Vorprüfung 30. September 2003 Zahnärztliche Vorprüfung 04. Juli 2006 Abschluss der Zahnärztlichen Examensprüfung
Promotion:	Oktober 2004-September 2005 Doktorandin an der Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten
Praktikum:	September 2005 Operationspraktikum am Zahnmedizinischen Zentrum Zürich in der Poliklinik für Orale Chirurgie
Jetzige Tätigkeit:	Ausbildungsassistentin in einer zahnärztlichen Gemeinschaftspraxis Lünen

Münster, den 26.10.2007