

**Determinanten der Tumorzellmigration: Hyaluronsäure
stimuliert die ungerichtete, endotheliale Faktoren die ge-
richtete dreidimensionale Migration von Tumorzellen**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Wiebke Hayen

aus

Oldenburg

Würzburg 2001

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender:

Gutachter Prof. Dr. Ulrich Walter

Gutachter Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Danksagung

Diese Arbeit wurde im Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Walter angefertigt, bei dem ich mich sehr herzlich für die Unterstützung bedanke.

Herrn Prof. Dr. Georg Krohne aus dem Fachbereich Biologie danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Volker Nehls für die Betreuung meiner Arbeit. Durch seine ständige Diskussionsbereitschaft und wissenschaftlichen Anregungen hat er mir die notwendige Unterstützung gegeben.

Bei Dr. Winfried Ness und Dr. Detlev Drenckhahn aus dem Anatomischen Institut der Universität Würzburg bedanke ich mich für die Hilfe bei der konfokalen Mikroskopie.

Für die massenspektrometrischen Analysen möchte ich mich bei Dr. Katrin Marcus von der Ruhr Universität Bochum bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Mirja Hühnken und Gabriele Riehl für die freundschaftliche und hilfreiche Unterstützung im Labor bedanken. Auch allen anderen Mitarbeitern aus Bau 4 danke ich für die Hilfsbereitschaft und die gute Atmosphäre.

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Hayen, W., Goebeler, M., Kumar, S., Riessen, R., and Nehls, V. (1999). Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture. *J.Cell Sci.* *112*, 2241-2251.

Nehls, V. and Hayen, W. (2000). Are hyaluronan receptors involved in three-dimensional cell migration? *Histol.Histopathol.*2000.Apr.;15.(2.):629.-36. *15*, 629-636.

von Bülow, C., Hayen, W., Hartmann, A., Mueller-Klieser, W., Allolio, B., and Nehls, V. (2001). Endothelial capillaries chemotactically attract tumour cells. *J.Pathol.* *193*, 367-376.

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNGEN	1
1.1 Zusammenfassung - Deutsch	1
1.2 Summary - English.....	2
2 EINLEITUNG.....	4
2.1 Teil I: Hyaluronsäure-bedingte Migration von Tumorzellen.....	4
2.1.1 Extrazellulärmatrix und Hyaluronsäure	4
2.1.2 Fibrin	5
2.1.3 HS und Zellmigration.....	7
2.1.4 Intrazelluläre HS	8
2.2 Teil II: Direktionale Migration in der Tumorangiogenese.....	9
2.3 Aufgabenstellung	12
3 MATERIAL UND METHODEN	13
3.1 Materialien	13
3.1.1 Kulturzellen.....	13
3.1.1.1 Medien und Puffer für die Zellkultur	13
3.1.2 Fibringele	14
3.1.3 Antikörper und Peptide	14
3.1.4 Chemikalien	15
3.1.5 Verbrauchsmaterialien	15
3.1.6 Geräte	15
3.2 Zellbiologische Methoden.....	16
3.2.1 Zellkultivierung.....	16
3.2.1.1 Präparation von Schweineaorten-Endothelzellen (PAEC).....	16
3.2.1.2 Zellpflege	17
3.2.2 Immunfluoreszenz.....	17
3.2.2.1 Färbung von HS	18
3.2.3 Migrationsversuche	19
3.2.3.1 Zweidimensional: Tumorzellmigration in der Boydenkammer.....	19
3.2.3.2 Checkerboard-Analyse der direktionalen Tumor- bzw. Endothelzellmigration.....	20
3.2.3.3 Dreidimensionales Monokultursystem für die Migration in Fibringelen.....	21
3.2.3.4 Dreidimensionales Kokultursystem in Fibringelen.....	23
3.2.4 Spektrometrische Bestimmung der Fibrinstruktur	24
3.2.5 Konfokale Lasermikroskopie	25
3.2.6 Bestimmung der Porengröße durch Flüssigkeitspermeation.....	25
3.2.6.1 Durchführung der Permeationsmessungen.....	25
3.2.6.2 Berechnung des Massen-Längenverhältnisses von Fibrinfasern und des durchschnittlichen Porendurchmessers.....	26
3.2.7 Kompaktion der Fibringele	28
3.2.8 Fluoreszenzmarkierung von HS	28
3.2.9 Subzelluläre Fraktionierung für Zytosol- und Membranextrakte	28
3.2.9.1 Zytosolmarker: Lactat-Dehydrogenase.....	29
3.2.9.2 Lysosomenmarker: β -Galaktosidase	29
3.2.10 Spektrometrische Methode zur Bestimmung von HS	30

3.2.11 Aktin-Reinigung.....	30
3.2.12 Markierung von Aktin mit N-(1-Pyren) Iodoacetamid	31
3.2.13 Messung der Aktinpolymerisation mit fluoreszenzmarkiertem Aktin.....	32
3.3 Proteinbiochemische Methoden.....	32
3.3.1 Denaturierende Gel-Elektrophorese nach Lämmli (1970).....	32
3.3.2 Western Blot.....	34
3.3.3 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie Blau.....	35
3.3.4 Fraktionierung von konditioniertem Medium	35
3.3.4.1 Eingrenzung des Molekulargewichts von chemotaktisch aktiven Molekülen.....	36
3.3.4.2 Reduktion des pH-Wertes	36
3.3.4.3 Hitzeinaktivierung von konditioniertem Medium.....	36
3.3.4.4 Weitere Aufreinigung durch DEAE.....	37
3.3.4.5 Proteinidentifikation durch Massenspektrometrie	37
4 ERGEBNISSE.....	39
TEIL I: Einfluß von HS auf die Tumorzellmigration	
4.1 Charakterisierung der Glioblastomzellen.....	39
4.2 Charakterisierung der verschiedenen Fibrinstrukturen.....	40
4.2.1 Spektrometrische Bestimmung	40
4.2.2 Visualisierung durch Konfokale Lasermikroskopie.....	40
4.2.3 Bestimmung der Porengöße durch Flüssigkeitspermeation.....	42
4.2.4 Kompaktion der Fibringele	42
4.3 Der Einfluß der Fibrinstruktur auf die Migration von Glioblastomzellen.....	43
4.3.1 Modulation der Fibrinstruktur durch Variation des pH-Werts.....	43
4.3.2 Modulation der Fibrinstruktur durch HS	45
4.3.3 Einfluß funktionsblockierender Antikörper auf die HS-induzierte dreidimensionale Migration	47
4.3.4 Vergleich der zweidimensionalen Oberflächenmigration und der dreidimensionalen Migration	48
4.4 Zweidimensionale Zellmigration in Boydenkammern.....	50
4.5 Modulation der Fibrinstruktur durch Dextran.....	51
4.6 Bestimmung der intrazellulären HS	52
4.6.1 Färbung der HS unter variablen Bedingungen.....	52
4.6.2 Spektrometrische Bestimmung und Lokalisation der intrazellulären HS	54
4.7 Einfluß der endogenen HS auf die Aktinpolymerisation.....	57
TEIL II: Direktionale Migration von Tumorzellen zu Endothelzellen	
4.8 <i>Checkerboard</i> Migrationsversuche	59
4.9 Direktionale Migration von Tumorzellen in Fibringelen.....	62
4.10 Auftrennung des konditionierten EZ-Mediums und Nachweis der noch vorhandenen chemotaktischen Aktivität	64
4.10.1 Eingrenzung der Größe des chemotaktisch aktiven Moleküls	65
4.10.1.1 <i>Checkerboard</i> -Versuche	65
4.10.1.2 Migrationsverhalten in Fibringelen.....	66
4.10.2 Hitzebehandlung von konditioniertem PAEC-Medium.....	67
4.10.3 Aufreinigung durch DEAE.....	68
4.10.3.1 Elektrophoretische Auftrennung der verschiedenen DEAE-Eluate und massenspektrometrische Untersuchungen einiger Proteinbanden.....	69
4.10.3.2 <i>Checkerboard</i> -Versuche	70

4.10.4	<i>Checkerboard</i> -Versuche mit massenspektrometrisch nachgewiesenen Proteinen aus der chemotaktisch aktiven Fraktion.....	72
4.10.5	Immunologischer Nachweis von TSP	73
5	DISKUSSION	75
5.1	HS moduliert die Fibrinstruktur und stimuliert die Zellmigration.....	75
5.2	Differenzierung direkter und indirekter HS-Effekte	77
5.3	Die Bedeutung von HS-modulierten Fibrin-Matrizes	78
5.4	Intrazelluläre HS	79
5.5	Direktionale Migration von Tumorzellen zu Endothelzellen.....	81
5.5.1	Potentielle endotheliale Chemotaxine	82
6	LITERATURVERZEICHNIS	87
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	103

1 Zusammenfassungen

1.1 Zusammenfassung - Deutsch

Hyaluronsäure (HS) ist ein weit verbreitetes Glykosaminoglykan in der Extrazellulärmatrix vieler Gewebe und tritt in erhöhten Konzentrationen in der Umgebung solider Tumore auf. Es handelt sich dabei um ein hydrophiles Makromolekül, welches durch seine hygroskopischen und osmotischen Eigenschaften stark an den physikalischen Gegebenheiten der Matrix beteiligt ist.

Es ist bekannt, daß HS die Zellmigration vieler Zellarten stimuliert. Dies wurde bisher hauptsächlich in zweidimensionalen *in vitro* -Systemen nachgewiesen und als Ursache der Stimulation wurden in den letzten Jahren vorwiegend Ligand-Rezeptor-Interaktionen verantwortlich gemacht. Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, die Rolle der HS in der Tumorzellmigration auf der Basis eines dreidimensionalen Fibringel-Systems, in welches Tumorzell-bedeckte *Microcarrier* eingebettet wurden, zu untersuchen.

Ein Vergleich zwischen zwei- und dreidimensionaler Migration unter verschiedenen Bedingungen ergab, daß die dreidimensionale Migration nicht von HS-spezifischen Oberflächenrezeptoren abhängt, sondern hauptsächlich von der Porosität der Matrix. Zur Bestimmung der strukturellen Eigenschaften der Fibringele wurden spektrometrische Messungen, konfokale Mikroskopie, Kompaktionsmessungen herangezogen; die Berechnung der Porengröße erfolgte durch Flüssigkeitspermeation. HS bindet spezifisch an Fibrinogen und erhöht dadurch den Porendurchmesser der polymerisierenden Fibrinmatrix. Mit steigender HS-Konzentration nahm die Migration zu, die in zweidimensionalen Systemen durch Antikörper gegen den HS-Rezeptor CD44 gehemmt werden konnte, im dreidimensionalen Modell allerdings nicht. Hier war die Inhibierung der Migration hingegen mit Antikörpern, die die Integrinbindung zur Fibrinmatrix hemmen, möglich.

Ein Einfluß von möglicherweise intrazellulär vorhandener HS auf die Zellmigration wurde bisher nicht überprüft. Bei Färbungen von HS und spektrometrischen HS-Messungen in verschiedenen Zellfraktionen von Tumorzellen stellte sich heraus, daß sich eine große Menge HS auch intrazellulär befindet. Eine genauere Lokalisation der endogen vorhandene HS ergab, daß dieses Makromolekül intrazellulär vorwiegend perinukleär mit dem Zytoskelett assoziiert vorliegt. Ein direkter mechanischer Einfluß, wie ihn die HS auf Fibrinogen bzw. die Fibrinpo-

1 Zusammenfassungen

lymerisation ausübt, konnte zwischen endogener HS und Aktinpolymerisation nicht hergestellt werden.

Der Schwerpunkt des zweiten Teils der Arbeit lag in der direktionalen Migration von Tumorzellen. In Kokulturen von Tumorzellen und Endothelzellen in dreidimensionalen Fibringelen stellte sich heraus, daß die Tumorzellen ein Chemotaxisverhalten in Richtung der Endothelzellen aufwiesen. Dieses Verhalten konnte in einem zweidimensionalen Boydenkammer-System bestätigt werden: Tumorzellen wurden in den oberen Kammern dieses Systems ausgesät und anschließend die chemotaktische Migration in Richtung des konditionierten Mediums von Endothelzellen in den unteren Kammern ausgewertet. Der für diese Chemotaxis verantwortliche Faktor sollte aus dem konditionierten Medium der Endothelzellen möglichst weit eingeeengt werden.

Die Anreicherung der potentiell chemotaktischen Proteine erfolgte durch verschiedene Ausschlußverfahren aufgrund des Molekulargewichtes sowie durch Anionenaustauscher-Fraktionierung des konditionierten Mediums.

Die chemotaktisch aktive Fraktion konnte auf ein Molekulargewicht von mindestens 100 kDa eingeeengt werden. Das Protein war mit einer NaCl-Konzentration von 200 bis 500 mM von einer DEAE-Säule eluierbar. Als mögliche Chemokin-Kandidaten konnten Thrombospondin, Fibronectin, Tenascin, α -Actinin-1 und -4 und das Hitze-Schock-Protein 90 durch massenspektrometrische Analysen identifiziert werden.

1.2 Summary - English

Hyaluronic acid (HA) is a glycosaminoglycan which is ubiquitously present in the extracellular matrix of many tissues and increased concentrations are found in the environment of solid tumors. HA is a hydrophilic macromolecule and contributes to the matrix conditions due to its hygroscopic and osmotic property.

During the last years HA-stimulated cell migration was mainly demonstrated by two-dimensional *in vitro* -systems and the effects were partially explained by ligand-receptor interactions. The aim of this work was to investigate the role of HA in tumor cell migration based on a three-dimensional fibrin gel-system, in which microcarriers covered with tumor cells were embedded.

1 Zusammenfassungen

The comparison of two- and three-dimensional migration resulted in the conclusion that three-dimensional migration mainly depends on the porosity of the matrix and not on specific HA-receptors. The structural properties of the fibrin gels were analyzed by turbidity measurement, confocal microscopy, compaction assay, and calculation of pore size by liquid permeation. HA specifically binds fibrinogen and increases the pore diameter of the polymerizing fibrin matrix. With increasing HA- concentration the cell migration was stimulated. This effect could be inhibited under two-dimensional conditions by antibodies to the HA-receptor CD44 while in three-dimensional systems the migration was unaffected by these antibodies. Molecules disturbing integrin-matrix-contacts, however, were shown to inhibit HA-induced cell migration under three-dimensional conditions.

HA-staining and spectrometric HA-measurements in subcellular fractions of tumor cells demonstrated that there are large amounts of endogenous HA. Further experiments resulted in a perinuclear localization of this macromolecule. A direct mechanical influence of HA on actin polymerization, like the HA interaction with fibrin polymerization, could not be detected.

The second part of this work concentrated on the directional migration of tumor cells. In three-dimensional cocultures of tumor cells and endothelial cells it was found that the tumor cells were chemotactically attracted by the endothelial cells. This effect could be verified by analyzing the migration of tumor cells to conditioned medium of endothelial cells in two-dimensional Boyden chamber assays. To concentrate possible chemotaxins from the endothelial-conditioned medium both centrifugation with molecular weight exclusion and anion exchange chromatography were performed. The fraction with chemotactical active proteins could be restricted to a molecular weight of at least 100 kDa. Furthermore the active protein was eluted with 200 – 500 mM NaCl from a DEAE-column. The following candidates for chemotaxis-induction were identified by mass spectrometry: thrombospondin, fibronectin, tenascin, α -actinin-1 and -4, and heat shock protein 90.

2 Einleitung

2.1 Teil I: Hyaluronsäure-bedingte Migration von Tumorzellen

2.1.1 Extrazellulärmatrix und Hyaluronsäure

Die Extrazellulärmatrix besteht aus Proteinen und Polysacchariden, die lokal von Zellen ausgeschieden werden und ein organisiertes Netzwerk in Assoziation mit der Zelloberfläche bilden. Die Extrazellulärmatrix bestimmt nicht nur die physikalischen Eigenschaften des jeweiligen Gewebes, sondern spielt auch komplexe Rollen in der Zellregulation, wie Entwicklung und Migration. Hauptbestandteile der Extrazellulärmatrix sind Glykosaminoglykane oder Proteoglykane und Faserproteine wie Kollagene, Fibronectin und Laminin.

Ein weit verbreitetes Glykosaminoglykan in der Extrazellulärmatrix vieler Gewebe ist Hyaluronsäure (HS) (Laurent & Fraser, 1992; Rooney & Kumar, 1993). Erhöhte Konzentrationen an HS werden von soliden Tumoren und Fibroblasten des Tumorstromas produziert (Zhang et. al., 1995; Ropponen et. al., 1998).

HS wurde erstmals 1934 im Glaskörper des Auges charakterisiert (Meyer and Palmer, 1934). Zwanzig Jahre später beschrieben Weissmann und Meyer die genaue chemische Struktur von HS aus der Nabelschur (Weissmann und Meyer, 1954).

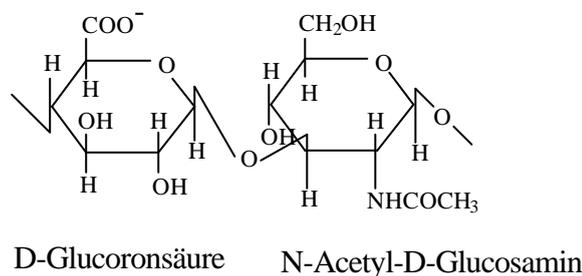


Abb. 1: Struktur von HS

HS ist ein unverzweigtes Polysaccharid bestehend aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten aus N-Acetyl-Glucosamin und Glucuronsäure (Abb. 1). Zusammen mit Chondroi-

2 Einleitung

tinsulfat, Keratansulfat, Dermatan-sulfat und Heparansulfat gehört es zur Gruppe der Glykosaminoglykane. HS unterscheidet sich jedoch von den anderen Glykosaminoglykanen: es besitzt als einziges keine Sulfatgruppe, erreicht jedoch ein wesentlich höheres Molekulargewicht ($10^5 - 10^7$) (Fraser et. al., 1997). Weiterhin findet die Synthese der HS an der Plasmamembran statt, während die anderen Glykosaminoglykane am endoplasmatischen Reticulum synthetisiert werden. HS-Synthasen, die an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert sind, addieren Monosaccharid- und Disaccharidreste an das reduzierende, zytoplasmatische Ende des Polysaccharids, während es immer weiter durch die Membran nach außen geschleust wird (Prehm, 1989; Asplund et. al., 1998).

HS kann in wässriger Lösung durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen entlang der Molekülachse eine stabile Helixstruktur bilden. Durch die helikale Struktur entstehen lange hydrophobe Abschnitte, die trotz der insgesamt negativen Ladung des Moleküls Interaktionen sowohl mit anderen HS-Ketten als auch unspezifisch mit Zellmembranen und anderen Lipidstrukturen begünstigen (Scott, 1992). Insgesamt ist HS ein hydrophiles Makromolekül und durch seine hygroskopischen und osmotischen Eigenschaften stark an den physikalischen Gegebenheiten der Matrix beteiligt (Laurent & Fraser, 1992). So war auch eine der ersten Erklärungen für die Stimulation der Migration durch HS die Bildung von Wasserkanälen in der Extrazellulärmatrix, durch die die Migration der Zellen stark beschleunigt werden könne (Tucker and Erickson, 1984; Laurent and Fraser, 1992; Rooney and Kumar, 1993).

2.1.2 Fibrin

Das entscheidende Ereignis bei der Blutgerinnung ist die Polymerisation des löslichen Proteins Fibrinogen zum unlöslichen Fibrin, die in einer proteolytischen Reaktion durch Thrombin katalysiert wird. Der Fibrinogengehalt des Plasmas beträgt etwa 2 - 4,5 g/l. Fibrinogen ist ein hexameres Molekül, welches aus drei Paaren von Polypeptidketten - $A\alpha$ (610 Aminosäuren), $B\beta$ (461 Aminosäuren) und γ (411 Aminosäuren) - besteht (Abb. 2). Die sechs Polypeptidketten sind durch insgesamt 17 Disulfidbrücken miteinander verbunden. A und B sind N-terminale Fibrinopeptide, 14 bzw. 16 Aminosäuren lang, die in der Thrombinreaktion abgespalten werden.

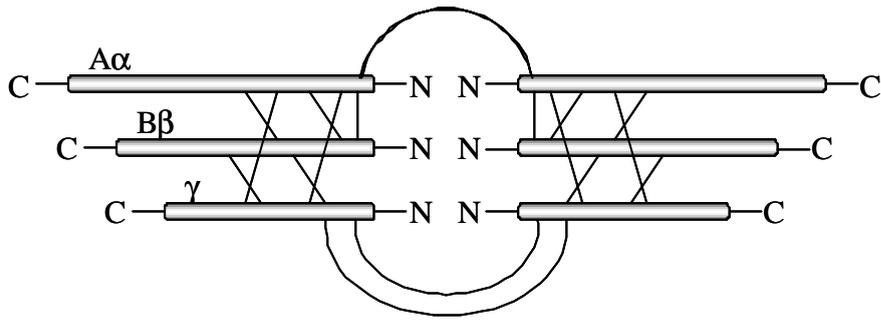
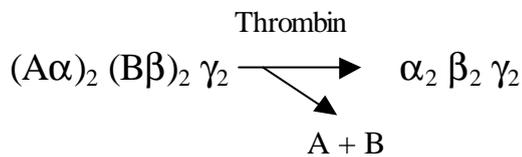


Abb. 2: Schematische Darstellung des Fibrinogens. Die Verbindungslinien zwischen den Peptidketten stellen Disulfidbrücken dar.

Die proteolytische Reaktion verläuft nach folgender Gleichung:



In der Umgebung von Tumoren kommt es durch Extravasation ebenfalls zu einer erhöhten Deposition von Fibrinogen (Dvorak et. al, 1992).

Bereits 1947 haben Ferry und Morrison gezeigt, daß die Struktur und Eigenschaften von Fibringerinseln stark durch pH, Ionenstärke, und andere Faktoren des Polymerisationsmilieus beeinflusst werden können. Gerinsel, die aus langen dicken Fibrinfasern bestehen, bilden ein stabiles großporiges Netzwerk, während eine kleinporige Struktur dünne kurze Fibrinfaserstränge besitzt (Latallo et. al., 1962; Carr et. al., 1977; Nair et.al., 1986; Blombäck et. al., 1989). Die Struktur von Fibringelen korreliert stark mit der Turbidität. Die spektrometrische Messung gilt als Nachweis für die Dicke der Fibrinfasern und der Strukturpermeabilität (Carr et. al., 1977; Nair et.al., 1986; van Gelder et. al., 1996). So sind großporige Gele eher undurchsichtig und trüb, während feine kleinporige Fibrinstrukturen klar erscheinen.

Ein weiterer Faktor, der die Struktur von Fibringerinseln modulieren kann, ist HS. Es wurde bereits gezeigt, daß HS in der Lage ist, Fibrinogen spezifisch zu binden und die Turbidität der polymerisierten Fibrinstruktur zu steigern (LeBoeuf et. al., 1986, 1987; Weigel et. al., 1988).

Es erscheint sehr wahrscheinlich, daß durch die wechselnden Bedingungen *in vivo* (i.e. die saure Umgebung von soliden Tumoren, die erhöhte Thrombin-Aktivität in inflammatorischen Regionen oder auch die lokale Konzentration von HS) die unterschiedlichsten Fibrinstrukturen auftreten können.

2 Einleitung

Nehls und Herrmann zeigten 1996, daß die Fibrinstruktur einen großen Effekt auf die Endothelzellmigration und Kapillarmorphogenese unter dreidimensionalen Bedingungen hat.

Bei Betrachtung der Tatsachen, daß Tumore erhöhte Konzentrationen an HS bilden und in einer fibrinogenreichen Matrix wachsen, erscheint es ebenso möglich, daß die erhöhte Menge an HS auch durch Modulation der Fibrinstruktur die Zellmigration und Metastasierung stimuliert.

2.1.3 HS und Zellmigration

Es ist bekannt und vielfach beschrieben, daß HS die Migration einer großen Anzahl von Zellarten, einschließlich Tumorzellen, stimuliert. Die erhöhte Produktion von HS durch Tumorzellen oder tumorassoziierte Fibroblasten wurde mit der Zellmigration und Metastasierung korreliert (Docherty et. al., 1989; Turley, 1992; Zhang et. al., 1995; Ropponen et. al., 1998). Jedoch wird diese Stimulation durch unterschiedliche Mechanismen erklärt. Eine der ersten Erklärungen schlug vor, daß HS durch seine Fähigkeit, große Mengen an Wasser zu binden, Wasserkanäle in der Extrazellulärmatrix bildet (Toole et. al., 1982).

Nach dem Nachweis von HS-Oberflächenrezeptoren wurde der Schwerpunkt der HS-Effekte auf Ligand-Rezeptor-Interaktionen verlagert (Sherman et. al., 1994). Es wurde gezeigt, daß HS spezifisch an Zelloberflächenrezeptoren bindet und durch deren Inhibition die Zellmigration und das Tumorstadium hemmt. Die beweiskräftigsten Ergebnisse zu diesem Thema wurden in zweidimensionalen *in vitro* Studien, in denen die Migration auf HS-beschichteten Oberflächen durch Antikörper gegen CD44 inhibiert werden konnte, gezeigt.

CD44, ein weit verbreitetes Glykoprotein, war der erste Zelloberflächenrezeptor für HS, der identifiziert wurde (Underhill, 1992). Er besitzt sowohl eine Transmembrandomäne als auch zwei extrazelluläre und eine zyttoplasmatische HS-bindende Region. CD44 bindet allerdings nicht ausschließlich HS, sondern auch andere Liganden wie Fibronectin (Jalkanen and Jalkanen, 1992), Kollagen I und IV (Carter and Wayner, 1988), Chondroitinsulfat (Aruffo et. al., 1990; Stamenkovic, 1991) und Fibrin (Svee et. al., 1996). Dennoch wurde dieses Rezeptor-Protein vielfach mit der HS-abhängigen Metastasierung von Tumorzellen in Verbindung gebracht (Guo et. al., 1994; Zhang et. al., 1995).

Ein weiteres HS-bindendes Protein, welches mit der Motilität vieler Zellen in Verbindung gebracht wurde und den Namen *receptor for hyaluronic acid mediated motility* (RHAMM) erhielt, wurde an der Zelloberfläche nachgewiesen (Hardwick et. al., 1992; Kornovski et. al.,

2 Einleitung

1994). RHAMM wurde vielfach als Membranrezeptor für HS akzeptiert und es wurde ebenso ein Zusammenhang zwischen RHAMM und der Migration von verschiedenen Zelltypen hergestellt (Turley et. al., 1993; Turley et. al., 1994; Savani et. al., 1995). Einige Jahre später jedoch wurde dieser Befund in Frage gestellt, weil gezeigt werden konnte, daß RHAMM ausschließlich intrazellulär auftritt (Hofmann et. al., 1998; Hofmann et. al., 1998; Assmann et. al., 1998; Turley et. al., 1998). Daraufhin wurde RHAMM in ‚*intracellular hyaluronic acid binding protein*‘ (IHABP) umbenannt.

Als dritter HS-Oberflächenrezeptor wurde das *intercellular adhesion molecule-1*‘ (ICAM-1) vorgeschlagen (McCourt et. al., 1994). Jedoch wurde diese Vermutung einige Jahre später wieder zurückgezogen durch die Erkenntnis, daß sowohl ICAM-1 als auch HS unspezifisch an Hexamethylengruppen binden, die Bindungsgrundlage der Affinitätschromatografie für den Nachweis von ICAM-1 als HS-Rezeptor waren (McCourt and Gustafson, 1997). Damit blieb CD44 als einziger Plasmamembranrezeptor für HS übrig und es stellte sich nun die Frage, inwieweit dieses Protein tatsächlich in die Migration von Zellen, insbesondere Tumorzellen involviert ist (Nehls & Hayen, 1999).

Im Widerspruch zu den anfänglichen Migrationsstudien auf HS-beschichteten Oberflächen stehen jedoch Beobachtungen, daß HS zu Antiadhäsion und Ablösung mehrerer Zelltypen führt (Tucker & Erickson, 1984; Koochekpour et. al., 1995; Delpech et. al., 1997).

Gleichzeitig mit den Untersuchungen zu den HS-Rezeptoren wurden auch Interaktionen von HS mit der Extrazellulärmatrix beschrieben. Docherty et. al. beobachteten 1989, daß HS die Kollagenstruktur modulieren kann und durch diese Veränderung offensichtlich die Migration von Fibroblasten durch ein Kollagengel erleichtert wurde. Diese Vermutung wurde durch Versuche unterstützt, die zeigten, daß HS spezifisch an Fibrinogen bindet und über unbekannte Zwischenschritte die Porosität der polymerisierten Fibrinstruktur erhöht (s. 2.1.2).

2.1.4 Intrazelluläre HS

Für das Vorhandensein von intrazellulärer HS gab es bisher wenig Beweise. Es gibt vereinzelte Publikationen, in denen zwar eine endogene HS-Färbung bzw. die intrazelluläre Bindung von HS oder HS-bindenden Proteinen beschrieben wird (Turley & Torrance, 1985; Turley et. al., 1990; Eggli & Graber, 1995), jedoch wurde diesen Entdeckungen wenig Wert beigemessen. Diesen Beobachtungen stand die wesentlich populärere Ansicht gegenüber, daß HS, welches von den Zellen internalisiert wird, auf der intrazellulären Seite der Membran inner-

2 Einleitung

halb kürzester Zeit durch das Enzym Hyaluronidase degradiert wird (McGuire et. al., 1987; McGary et. al., 1989; Fraser et. al., 1997; Menzel & Farr, 1998).

Das Zytoplasma von eukaryotischen Zellen enthält ein komplexes Netzwerk an Proteinfilamenten, das sogenannte Zytoskelett. Es handelt sich dabei um eine höchst dynamische Struktur, die aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten besteht. Diese Zytoskelettbestandteile spielen bei einer Reihe von Zellfunktionen wie Zellform und -bewegung eine Rolle (Elson, 1988; Gelfand & Bershadsky, 1991; Ingber, 1993).

Über Interaktionen des HS-Rezeptors CD44 mit zytosolischen Bestandteilen gab es bereits seit den achtziger Jahren Hinweise: so soll die zytoplasmatische Domäne des integralen Membranproteins CD44 mit dem Zytoskelett assoziiert sein und insbesondere mit den Aktinfilamenten interagieren (Lacy & Underhill, 1987; Liu et. al., 1996; Oliferenko et. al., 1999). Weiterhin fanden Turley et. al. 1990 eine intrazelluläre Kovertelung eines HS-bindenden Proteins mit Aktinfasern. Das Auftreten dieses Proteins konnte vorwiegend in schnell migrierenden Zellen nachgewiesen werden.

Erst seit 1998 gibt es neuere Erkenntnisse über das Auftreten von endogen vorhandenen HS-Rezeptoren. Wie bereits in 2.1.3 beschrieben, stellte sich heraus, daß RHAMM/ IHABP, einer der HS-Rezeptoren, ausschließlich intrazellulär auftritt (Hofmann et. al., 1998; Hofmann et. al., 1998; Assmann et. al., 1998; Turley et. al., 1998). Assmann et. al. brachten 1999 außerdem IHABP mit Bestandteilen des Zytoskeletts in Verbindung. Sie postulierten, daß auch dieser HS-bindende Rezeptor intrazellulär mit Mikrotubuli und Aktinfilamenten interagieren kann.

Nach diesen Erkenntnissen lag es nahe, daß auch endogene HS in Zellfunktionen involviert ist und entweder direkt oder indirekt über die endogen vorhandenen HS-bindenden Proteine möglicherweise auch die Zellmigration einiger Zelltypen beeinflussen kann.

2.2 Teil II: Direktionale Migration in der Tumorangiogenese

Die meisten Tumore und Metastasen entstehen als kleine avaskuläre Massen, die bei Überschreitung einer kritischen Größe die Entwicklung von neuen Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßsystemen induzieren (Hudlicka, 1991; Holash et. al., 1999). Die durch Tumorzellen verursachte Neubildung von Blutgefäßen wird als Tumorangiogenese bezeichnet. Es ist hinreichend bekannt, daß Blutgefäße durch die Versorgung mit Sauerstoff und

2 Einleitung

Nährstoffen, sowie die Entsorgung von Stoffwechselmetaboliten die Progression und Metastasierung von Tumoren fördern (Schor & Schor, 1983; Blood & Zetter, 1990; Hanahan & Folkman, 1996). Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, daß Kapillaren das Tumorwachstum nicht alleine durch die Blutversorgung stimulieren, sondern auch parakrine Signalvermittlung zwischen den Zellen selbst eine Rolle spielt (Nicosia et. al., 1986; Skobe et. al., 1997).

Es wird allgemein angenommen, daß die direktionale Migration von Kapillaren zu Tumoren durch Chemotaxis bedingt ist. Dieser Schluß beruht unter anderem auf Experimenten, denen das Cornea-Modell zugrunde lag. Mit diesem Modell konnte in der avaskulären Hornhaut von Kaninchen direktionales Wachstum von vaskularisiertem Gewebe auf implantierte Tumoren oder auch lediglich auf lokale Ablagerungen von Angiogenesefaktoren festgestellt werden (Ausprunk & Folkman, 1977). Ein wichtiger Faktor, der in der Tumorangiose bei der Chemoattraktion von Endothelzellen eine Rolle spielen soll, ist der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Pötgens et. al., 1995), der auch aufgrund seiner permeabilitätssteigernden Eigenschaften *vascular permeability factor* (VPF) genannt wird (Roberts & Palade, 1997; Esser et. al., 1998).

Die von Tumoren sezernierten Chemokine können auf unterschiedliche Weise eine gerichtete Migration von Endothelzellen auslösen. Einerseits können sie das direktionale Auswachsen von Kapillarsprossen direkt durch Chemotaxis stimulieren (Yoshida et. al., 1996). Andererseits können die Faktoren der Tumorzellen eine Gefäßleckage verursachen. Die anschließende lokale Extravasation von Fibrinogen und einer Vielzahl von anderen Plasmafaktoren kann dann zu einem Einwachsen von Kapillaren in die Richtung des Tumors führen. Eine Bestätigung dieser zweiten Hypothese findet sich in der Tatsache, daß Gefäßwachstum in soliden Tumoren häufig an Orten lokalisiert ist, an denen zuvor eine Plasmaextravasation stattgefunden hat (Skinner et. al., 1990). Fibrin alleine ist schon ausreichend, um Angiogenese zu stimulieren (Dvorak et. al., 1979; Nehls & Herrmann, 1996). Weiterhin werden während der Plasmaextravasation aber auch noch viele Wachstumsfaktoren freigesetzt, die ihrerseits wiederum das Gefäßwachstum stimulieren. Viele Neoplasmen enthalten durch einen Mangel an Thrombinaktivität ausschließlich Fibrinogen (Costantini & Zacharski, 1993), welches alleine jedoch auch in der Lage ist, eine direktionale Migration von Endothelzellen auszulösen (Dejana et. al., 1985). So könnte die gerichtete lokale Plasmaextravasation also auch eine Erklärung für die direktionale Migration von Endothelzellen auf Tumorzellen *in situ* sein.

Es ist problematisch, im lebenden Organismus zwischen direkten chemotaktischen Effekten und indirekten Effekten, z. B. Gefäßleckage, zu unterscheiden.

2 Einleitung

Bisher befassten sich die meisten Publikationen mit Untersuchungen zur directionalen Migration von Endothelzellen zu Tumorzellen. Jedoch senden offensichtlich auch Endothelzellen chemotaktische Signale aus. Auf der einen Seite sind sie in der Lage, andere Endothelzellen durch den ‚*basic fibroblast growth factor*‘ (bFGF) (Nehls et. al., 1998) oder andere Faktoren chemotaktisch anzuziehen (von Bülow, 2001). Andererseits gibt es einige Hinweise darauf, daß parakrine Signale von Endothelzellen auch einen Einfluß auf das Verhalten bzw. die Migration von Tumorzellen haben können (Rak et. al., 1996). Nicosia et. al. beschrieben bereits 1986 das Verhalten von Tumorzellen in einem Plasmagel. Sie postulierten, daß die Tumorzellen in Gegenwart von bovinen Endothelzellen wesentlich schneller in das Fibrinnetzwerk infiltrierten als in Monokulturen. Die Ursache dafür bildete die subendotheliale Matrix, die eine Anziehung auf die Tumorzellen ausübte, welche dann wiederum die endothelialen Kanäle in der Matrix zum schnelleren Wachstum entlang der Gefäßnetze nutzten.

Experimente, in denen Tumorzellen in eine dorsale Hautkammer von Mäusen implantiert wurden, ergaben weitere Hinweise auf ein mögliches chemotaktisches Migrationsverhalten von Tumorzellen durch endothelial sezernierte Faktoren. Die implantierten Tumorzellen migrierten vorzugsweise in das umgebende vaskularisierte Gewebe, und die Zugabe von Angiogeneseinhibitoren hemmte auch das Tumorwachstum (Li et. al., 2000; Vajkoczy et. al., 2000). Jedoch gaben diese Experimente keinen Aufschluß darüber, ob das gerichtete Migrationsverhalten der Tumorzellen durch Endothelzell-sezernierte Chemotaxine bedingt war oder durch die Nährstoffe, die aufgrund einer lokalen Gefäßleckage freigesetzt worden waren.

In einer vorhergehenden Arbeit (von Bülow, 2001), die sich insbesondere mit der directionalen Migration von Endothelzellen *in vitro* in einem dreidimensionalen Fibringel-Angiogenese-System befasste, gab es ebenfalls bereits deutliche Anzeichen dafür, daß eher eine chemotaktische Migration der Tumorzellen als umgekehrt eine directionale Migration der Endothelzellen auf die Tumorzellen stattfindet. Obwohl der Schwerpunkt der genannten Arbeit auf der Migration von Endothelzellen lag, erweckten die Fibringel-Experimente optisch den Anschein, als ob sich die Tumorzellen eher in Richtung der Endothelzellen bewegten als umgekehrt. Durch dieses *in vitro* -Modell wird eine gerichtete Tumorzellmigration durch lokale Gefäßleckage ausgeschlossen und es kann selektiv die Wirkung von Endothelzell-sezernierten Chemokinen untersucht werden. Die Anhaltspunkte dieser vorangehenden Arbeit (von Bülow, 2001) wurden jetzt mit Hilfe von zwei- und dreidimensionalen *in vitro*-Systemen näher untersucht.

2.3 Aufgabenstellung

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß von Faktoren der extrazellulären Matrix auf die Zellmigration zu untersuchen. Im ersten Teil der Arbeit stand Hyaluronsäure (HS) als wesentlicher Bestandteil der Extrazellulärmatrix, insbesondere im Tumorgewebe, im Mittelpunkt. Es sollte untersucht werden, welchen Einfluß HS auf die Zellmigration hat und wodurch dieser bedingt ist. Besonderer Wert wurde hier auf die Rezeptorabhängigkeit der Migration in einem dreidimensionalen Zellkultursystem gelegt.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beinhaltete die Untersuchung von Interaktionen zwischen Tumorzellen und Endothelzellen sowohl in zwei- als auch in dreidimensionalen *in vitro* - Systemen. Aus einer vorherigen Arbeit (von Bülow, 2001) konnten bereits Schlüsse auf eine gerichtete Migration der Tumorzellen auf Endothelzellen gezogen werden. Diese Erkenntnisse sollten nun weiter untersucht werden mit einem Schwerpunkt auf mögliche chemotaktische Faktoren, die von Endothelzellen sezerniert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Kulturzellen

Schweineaorten-Endothelzellen (PAEC) wurden wie unter 3.2.1.1 beschrieben aus frischen Schweineaorten präpariert.

Humane primäre Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) wurden freundlicherweise von Andrea Jahn, Anästhesie, Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

In den Experimenten wurden zwei Tumorzelllinien verwendet: Die humane Glioblastomzelllinie U-138 MG, bezogen von der Tumorbank des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg bzw. dem Cell Lines Service, Heidelberg und die humane Melanomzelllinie MV3, die von Dr. Matthias Goebeler, Dermatologie, Universität Würzburg zur Verfügung gestellt wurde.

Die humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie HMEC-1 wurde ebenfalls von Dr. Matthias Goebeler zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um eine transfizierte Zelllinie, die die kodierende Region für den Simian Virus 40 A enthält (Ades et. al., 1992).

3.1.1.1 Medien und Puffer für die Zellkultur

Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (DMEM)	PAN Systems
Phosphatpuffer w/o Ca^{2+} / Mg^{2+} (PBS)	Biochrom
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Systems
Humanes Serum	PAA Laboratories
Trypsin-EDTA	Sigma
Medium 199 (M199)	PAN Systems
Endotheliales Wachstumsmedium (EGM), bestehend aus endotheliale Basalmedium (EBM), supplementiert mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hydrocortison, 10 ng/ml endotheliale Wachstumsfaktor EGF und 5% FCS	Cell Systems
Antibiotikum und Antimycotikum (Streptavidin, Amphotericin B mit Penicillin)	Sigma
Gelatine	Serva Feinbiochemica
Collagenase	Roche Diagnostics

3.1.2 Fibringele

Fibrinogen (humanes und porcines),	Sigma
Thrombin,	Sigma
Chondroitinsulfat A,	Sigma
Cytodex-Microcarrier	Sigma
Aprotinin (Trasylo TM)	Bayer
Oregon TM Green 488 -Fibrinogen	Molecular Probes

3.1.3 Antikörper und Peptide

Die folgenden Antikörper und Peptide wurden entweder für Immunfluoreszenzen oder andere Färbungen, Inhibitionsversuche oder Immunoblots verwendet.

Bezeichnung	Typ, Herkunft	Bezogen von / Firma
Anti-human HCAM (CD44) (Hermes-1 Epitop)	monoklonal, Maus	Endogen
Anti-Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)	monoklonal, Maus	R & D Systems
Anti- β 1-Integrin	monoklonal, Maus	Coulter-Immunotech
Anti- α_v -Integrin	monoklonal, Maus	Chemicon
Adhäsionsblockierendes Peptid Gly-Arg-Gly-Asp-Ser		Dr. M. Just (Casella/ Hoechst, Frankfurt)
Kontollpeptid Ser-Asp-Gly-Arg-Gly		Dr. M. Just (s.o.)
Biotinyliertes Proteoglykan (b- PG) (bindet spezifisch an HS)		Dr. C. B. Underhill (Georgetown University, Washington, D.C.)
Streptavidin-Texas Red	Biotin-bindendes Mo- lekül	Zytomed
Streptavidin-FITC	Biotin-bindendes Mo- lekül	Zytomed
Anti-Maus TRITC	Sekundärantikörper	Sigma
Anti-Kaninchen-TRITC	Sekundärantikörper	Sigma
Anti-TSP-1	polyklonal, Kaninchen	Calbiochem
Anti-Kaninchen IgG - HRP	Sekundärantikörper	Sigma

3.1.4 Chemikalien

Stains all (1-Ethyl-2-[3-(1-Ethylnaphto-[1,2-d] Thiazolin-2-Ylidene)-2-Methyl-Propenyl] Naphto-[1,2-d] Thiazoliumbromid	Sigma,
1,4-Dioxan	Merck,
Sigmacote™	Sigma,
Sigma Fast™ 3,3'-Diaminobenzidin Set (DAB)	Sigma,
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	Sigma,
HS vom Hahnenkamm,	Sigma
Dextran (durchschnittliches Molekulargewicht 60- 90 kDa),	Sigma
Echistatin	Sigma
Fibronectin	Calbiochem
Thrombospondin (TSP)	Cell Systems
Diethylaminoethyl (DEAE)-Zellulose	Whatman
Coomassie® Brilliant Blue	Sigma
1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat (DiI)	Molecular Probes

Alle weiteren hier nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von Sigma, Merck oder Roth bezogen.

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Sterile Zellkulturflaschen,	
sterile 15 und 50 ml Zentrifugenröhrchen,	
sterile Plastikschälchen (3,5 bzw. 10 cm Durchmesser)	Greiner
Cellocate™ Deckgläser	Eppendorf
Boydenkammern (6,5 mm Polycarbonat Transwell	
Membranen mit 8 µm Porendurchmesser)	Corning Costar
Einmal-Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schüll
Zentrifugenröhrchen für die Konzentration von Proteinen (MWCO 5 + 100 kDa)	Ultrafree-Zentrifugenfilter, Millipore
Dialyseschläuche (MWCO: 10 kDa, Float-A-Lyser®: Ausschluß 100 kDa)	
Polyvinylfluorid (PVDF)- Membran	Roth Millipore

3.1.6 Geräte

Photometer	Ultrospec 2000, Pharmacia
Fluoreszenzphotometer	Perkin-Elmer
Elektrophoresekammern	Mini Protean II™, Biorad
Brutschränke	CO ₂ Water Jacketed Incubator, Forma Scientific
Feinwaagen	Scaltech SBA 31

3 Material und Methoden

Magnetrührer	GLW M32
Mikroskope	Axiovert 25, Zeiss Epifluoreszenzmikroskop Axioskop, Zeiss
konfokales Lasermikroskop	Biorad MRC 600
pH-Meter	MultiCal [®] , pH 526
Zentrifugen	Beckman L-80 Ultrazentrifuge mit SW 55 Ti und 50.2 Ti Rotoren Sorvall SuperT 21 mit ST-H750 Rotor Hettich Rotanta/ S
Sterilbänke	Biogard Hood, Bio-Flow Technik
Wasserbad	Köttermann
Spannungsgerät	Power Pac 200, Biorad
Zellcounter	Coulter [®] , Z2
Semi-Dry-Blotting Apparatur	Biometra

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

3.2.1.1 Präparation von Schweineaorten-Endothelzellen (PAEC)

Die Schweineaorten wurden frisch aus dem Schlachthof geholt und dann mit einer Pinzette und Schere von Bindegewebe und Fett befreit. Alle Arterienansätze wurden mit einem Bindfaden gut abgebunden und die Aorten dann mit Hilfe einer 20 ml Spritze mit Kanüle gründlich mit PBS durchgespült. Dann wurden die Aorten mit PBS gefüllt, an den Enden abgeklemmt und 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Das PBS wurde daraufhin durch 0,1% Collagenase ersetzt, gefolgt von einem 6-8 minütigen Verdau bei 37°C. Das Ablösen der PAEC erfolgte durch Abspritzen der Aorteninnenwand mit der Collagenase, die dann mit den darin enthaltenen PAEC in einem sterilen 50 ml Röhrchen mit 10 ml 37°C warmen DMEM mit 20% FCS und 150 Einheiten Antibiotikum und Antimycoticum pro ml Medium aufgenommen und anschließend 5 min bei 1000 upm zentrifugiert wurden.

Das daraus resultierende Zellpellet wurde in einer mit Gelatine (0,5%) beschichteten T25 Zellkulturflasche mit DMEM und 20% FCS bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

3.2.1.2 Zellpflege

Kultivierung der Zellen

Tab. 1: Zelltyp und Kultivierungsmedium

Zellart	PAEC	HUVEC	HMEC-1	MV3	U-138 MG
Medium	DMEM + 10% FCS	M199 + 20% hum. Serum	EGM + 5% FCS	DMEM + 10% FCS	DMEM + 10% FCS

Alle Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Kulturflaschen für die Endothelzellen wurden zuvor mit Gelatine beschichtet. Es erfolgte zweimal pro Woche ein Mediumwechsel, bei dem das alte Medium abgezogen, die Zellen einmal mit PBS gespült und dann 12 ml neues Medium auf die Zellen pipettiert wurde.

Passagieren der Zellen

Für das Passagieren wurden die Zellen erst einmal mit PBS gespült. Bei den PAEC folgte dann eine einminütige Inkubation mit Trypsin-EDTA, woraufhin die dann abgelösten Zellen in Medium + 10% FCS aufgenommen und bei 1000 upm abzentrifugiert wurden. Der gewünschte Anteil des Zellpellets wurde dann in 12 ml neues DMEM + 10% FCS in eine T75-Flasche überführt.

Alle anderen Zellarten wurden nach dem Spülen mit PBS lediglich 30-45 s mit Trypsin-EDTA behandelt, welches direkt nach der Inkubation wieder abgesaugt wurde. Die Zellen hatten sich nach ca. 1 weiteren min im Brutschrank abgelöst und konnten sofort ohne Zentrifugationsschritt in neuem Kulturmedium aufgenommen werden.

3.2.2 Immunfluoreszenz

Glioblastomzellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und nach Adhärenz mit 100% Methanol bei -20°C für 2 min oder mit 3% Paraformaldehyd (PFA) für 20 min fixiert. Falls eine Permeabilisierung erforderlich war, wurden die Zellen daraufhin für 10 min mit PBS + 0,1% Triton X-100 inkubiert.

3 Material und Methoden

Nach wiederholtem Waschen mit PBS wurde der erste Antikörper, verdünnt in PBS + 0,1% Rinderserumalbumin (BSA), hinzugefügt und für 60 min inkubiert. Anschließend folgten wiederum mehrere Waschschritte (5 x 1 min) mit PBS. Der 2. Antikörper wurde ebenfalls verdünnt in PBS + 0,1% BSA und für 30 min mit den Zellen inkubiert. Nach erneutem Spülen mit PBS wurden die Zellen auf den Deckgläschen mit einem Tropfen 60% Glycerin + 1,5% n-Propylgallat behandelt, um die Färbung zu konservieren und vor Austrocknung zu schützen.

3.2.2.1 Färbung von HS

Färbungen von HS wurden an permeabilisierten und nicht - permeabilisierten Glioblastomzellen durchgeführt:

Die HS-Färbungen wurden mit Hilfe von spezifischen HS-bindenden Eigenschaften bestimmter Proteoglykandomänen durchgeführt (Ripellino et. al., 1985; Riessen et. al., 1996). Es wurden in dieser Arbeit biotinylierte Proteoglykanfragmente (b-PG) verwendet, die nach der Methode von Green et. al. (1988) präpariert worden waren. Glioblastomzellen wurden unter unterschiedlichen Bedingungen auf Deckgläschen kultiviert und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur (RT) in 3% PFA fixiert. Es folgte ein mehrmaliges Waschen der fixierten Zellen in PBS mit 10 % FCS, woraufhin die Zellen für einige Experimente mittels 0,05 % Triton X-100 permeabilisiert wurden, während dieser Schritt für andere Versuche entfiel. Für den ersten Schritt der b-PG-Färbung wurden die Zellen dann für 120 min bei RT in 4 µg/ ml b-PG, gelöst in PBS/ 10 % FCS, inkubiert. Nach anschließendem Spülen in PBS wurde das gebundene b-PG mit Streptavidin-FITC oder mit anderen Färbungen, die im folgenden noch näher erläutert werden, sichtbar gemacht.

Färbung mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) bzw. 3,3'-Diaminobenzidin (DAB):

Färbelösungen:

AEC: 2 mg AEC wurden in
0,5 ml Dimethylformamid gelöst und mit
9,5 ml 0,05 M Natrium-Acetat, pH 5,0 versetzt und alles durch 0,45 µm filtriert.
10 µl einer 30 % H₂O₂ (1 µl/ ml Lösung) wurden kurz vor dem Gebrauch hinzugefügt.

DAB: Ein Tablettenset Sigma FastTM DAB wurde in 5 ml H₂O_{dest} gelöst.

Durchführung der Färbungen:

Für diese Färbemethoden wurden die Zellen vor der Inkubation mit b-PG 5 min mit 10 % H₂O₂ inkubiert, um die zellulären Peroxidasen abzusättigen.

Dann wurden die Färbungen bis zum Schritt der Streptavidin-Zugabe wie in diesem Abschnitt beschrieben durchgeführt. Jedoch wurde statt dem Streptavidin-FITC ein Streptavidin-HRP Konjugat (1:500 verdünnt) zugegeben, gefolgt von einer 30 minütigen Inkubationszeit. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS wurde den zellbedeckten Deckgläschen dann die jeweilige Färbelösung zugesetzt. Die Reaktion wurde unter dem Mikroskop verfolgt und bei ausreichender Färbung mit PBS abgestoppt. Die AEC-behandelten Zellen wiesen bei vorheriger Bindung des b-PGs eine Rotfärbung, die DAB-behandelten Zellen eine dunkelblaue bis braune Färbung auf.

3.2.3 Migrationsversuche

3.2.3.1 Zweidimensional: Tumorzellmigration in der Boydenkammer

Für diese Versuche wurde ein modifiziertes Boydenkammersystem verwendet (Boyden, 1962). Es wurden Transwelleinsätze mit einem Porendurchmesser von 8 µm verwendet. Die Unterseite der Membranen wurde für 1 h bei RT mit 10 µg/ml Fibronectin, bzw. 5 mg/ml HS, Chondroitinsulfat oder 2 mg/ml Fibrinogen in PBS beschichtet. Anschließend wurden die Kammern und Membranen mit DMEM w/o FCS gespült.

Für die Tumorzellmigrations-Studien wurden jeweils 30000 Glioblastomzellen in 100 µl DMEM w/o FCS in der oberen Kammer ausgesät. In der unteren Kammer bildeten 500 µl DMEM w/o FCS einen Druckausgleich, so daß die Medien der beiden Kammern sich nicht auf Anrieb vermischten. Es folgte eine Migrationszeit von 12 h, in denen die Zellen je nach Stimulation durch die Membran auf deren beschichtete Unterseite wanderten (Abb. 3).

Die nun auf der Unterseite adhärenen Zellen konnten durch eine Kristallviolett-Färbung nachgewiesen werden. Dafür wurden zuvor die auf der Oberseite der Membran zurückgebliebenen Zellen mit einem Wattestäbchen vorsichtig abgeschabt. Dann wurden die Filtereinsätze für 25 s in Kristallviolettlösung (1%ig in 2%igem Ethanol und durch 0,45 µm filtriert) und anschließend sofort zweimal in H₂O_{dest} gespült. Nach dem Trocknen folgte eine Elution der Farbe durch 250 µl 10%iger Essigsäure pro Filtereinsatz. Jeweils 200 µl davon wurden dann

spektrometrisch bei 595 nm in einer Mikrotiterplatte gemessen und die Werte miteinander verglichen.

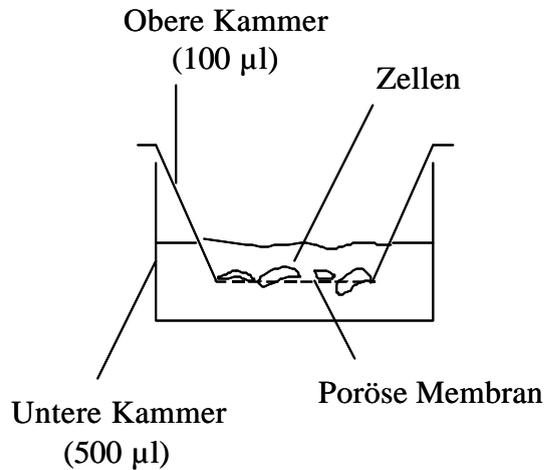


Abb. 3: Aufbau des zweidimensionalen Boydenkammerversuchs

3.2.3.2 Checkerboard-Analyse der direktionalen Tumor- bzw. Endothelzelmigration

Zur Unterscheidung von chemokinetischen und chemotaktischen Eigenschaften von Endothel- oder Tumorzellkonditionierten Medien wurden *Checkerboard*-Versuche durchgeführt. *Checkerboard*-Analysen basieren auf der schachbrettartigen Verteilung unterschiedlicher Mediumkonzentrationen in den oberen bzw. unteren Einsätzen von Boydenkammern, so daß eine bestimmte Konzentration in der oberen Kammer immer gegen alle Konzentrationen in der unteren Kammer gemessen werden kann. Auf der Basis der zweidimensionalen Boydenkammeranalysen (s. 3.2.3.1) wurden hier die Unterseiten der Membranen jedoch ausschließlich mit 10 µg/ml Fibronectin beschichtet. Die konditionierten Medien von Endothel- oder Tumorzellen wurden wie folgt produziert: konfluente T75 Zellkulturflaschen wurden zweimal mit je 10 ml PBS gespült und anschließend für 16 h bei 37°C mit je 3 ml DMEM w/o FCS inkubiert. Das anschließend durch 0,2 µm filtrierte Medium wurde dann in unterschiedlichen Konzentrationen den unteren und oberen Kammern zugesetzt. Die Migrationszeit der Endothelzellen durch die poröse Membran betrug 7,5 h, während die Tumorzellen lediglich 3 h wanderten. Die Kristallviolett-färbung erfolgte wie unter 3.2.3.1 beschrieben.

3.2.3.3 Dreidimensionales Monokultursystem für die Migration in Fibringelen

Die dreidimensionalen Fibringelversuche wurden wie bereits beschrieben durchgeführt (Nehls & Drenckhahn, 1995; Nehls & Herrmann, 1996).

Für die Migrationsversuche wurden Glioblastomzellen für 24 h mit Cytodex-3 *Microcarrier* inkubiert, in denen sich die Zellen auf der Oberfläche der *Carrier* ausbreiteten.

Humanes Fibrinogen wurde in PBS gelöst und über Nacht gegen PBS dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde dann photometrisch bei 280 nm bestimmt. Für die Fibringele wurde jeweils PBS oder Glykosaminoglykanlösung und außerdem 1000 U/ ml Aprotinin hinzugefügt, um eine Fibrinogenkonzentration von 2 mg/ml zu erreichen. 40 µl der nun mit Zellen beschichteten *Carrier* wurden der Fibrinogenlösung in 35mm Zellkulturschälchen hinzugefügt. Das Fibrinogen wurde durch Zugabe von 0,625 U/ ml Thrombin polymerisiert. Nach 30 min Polymerisationszeit wurden die Gele mit DMEM w/o FCS mit 1000 U/ml Aprotinin überschichtet, welches nach einer Äquilibrierungsphase von 60 min durch frisches Medium ersetzt wurde.

Die Fibrinstruktur der Gele wurde durch Änderung des pH-Werts des Polymerisations- und des Dialysepuffers systematisch moduliert. Direkt nach der Polymerisation wurden die Fibringele dann mit Medium äquilibriert, um physiologische pH-Werte zu erhalten. Um direkte pH- Effekte auf die Zellen auszuschließen wurden Kontrollen durchgeführt, in denen gezeigt wurde, daß die Äquilibrierung von polymerisierten pH 7,4 Gelen in azidem oder basischem Medium keine signifikanten Auswirkungen auf die Zellmigration hat. Weiterhin haben pH-Bestimmungen von homogenisierten Fibringelen gezeigt, daß der pH-Wert im Inneren der Gele durch Äquilibrierung mit entsprechenden pH-Medien bereits in weniger als 10 min erreicht wird.

HS aus dem Hahnenkamm enthält keine detektierbaren Mengen an Protein oder anderen Glykosaminoglykanen (Turley et. al., 1991). Für die Verwendung in den dreidimensionalen Migrationsstudien wurde die HS in PBS in einer Konzentration von 2,5 mg/ml gelöst und durch Autoklavieren bei 120°C für 20 Minuten sterilisiert. Außerdem wurde der pH-Wert der HS-Lösung ebenfalls vor der Applikation eingestellt. HS wurde entweder vor der Polymerisation der Fibrinogenlösung zugesetzt oder später dem Überstand von schon polymerisierten Gelen. Vergleichsweise wurden ebenso HS-Oligosaccharide verwendet.

Als nicht im Organismus vorkommendes Polysaccharid wurden zur Kontrolle außerdem verschiedene Konzentrationen an Dextran eingesetzt. Sowie für die HS-Gele wurde dann auch in

den Dextran-Gelen die Migration der Zellen mit den durchgeführten Turbiditätsmessungen der Fibringele korreliert.

Die verwendeten Antikörper wurden sowohl der Fibrinogenlösung 10 min vor Zugabe von Thrombin und somit vor der Polymerisation als auch anschließend dem Überstand der Gele zugefügt. Die RGDS-Peptide und Echistatin wurden lediglich an den Überstand nach der Polymerisation gegeben, um Interferenzen mit der Fibrinpolymerisation zu vermeiden.

Quantifizierung der Zellmigration

24 h nach der Polymerisation wurde die Migration der Zellen quantifiziert, indem die zellulären Ausläufer von den *Microcarriern* bestimmt wurden. Dabei wurde ein *Microcarrier* als ‚Migrations-positiv‘ gewertet, wenn die Glioblastomzellen mindestens 150 μm in die umgebende Fibrinmatrix gewandert waren. Insgesamt wurden 100 zufällig ausgewählte *Microcarrier* pro Gel ausgewertet und die ‚positiven‘ *Microcarrier* als Prozentanteil (MC%) ausgedrückt.

Quantifizierung der Migrationsgeschwindigkeit

Die Methode der Migrationsquantifizierung wurde direkt mit den Migrationsgeschwindigkeiten verglichen. Dafür wurden die Fibringele mit den *Microcarriern* über Deckgläschen mit mikroskopisch sichtbarem Raster, sogenannten Cellocates™, polymerisiert. Nach dem ersten Auswachsen der Zellen von den *Microcarriern* konnten so zu unterschiedlichen Zeiten identische Carrier fotografiert und später anhand der Fotoaufnahmen die Migrationsgeschwindigkeit bestimmt werden.

Vergleichend wurden die Migrationsgeschwindigkeiten auf der Oberfläche von Fibringelen gemessen, indem 500 μl Gele verschiedener Fibrinstrukturen (Variation des pH-Wertes bzw. Zugabe von HS) in 35 mm Schälchen über Cellocates™ auspolymerisiert wurden. Nach der Äquilibration der Gele in DMEM ohne FCS mit einem pH-Wert von 7,4 wurden 5×10^4 Glioblastomzellen auf der Geloberfläche ausgesät. Nach 24 h hatten sich die Zellen auf der Geloberfläche ausgebreitet. Zu diesem Zeitpunkt und noch einmal 24 h später wurden Fotos von zufällig ausgewählten aber identischen Regionen gemacht.

Die genauen Migrationsgeschwindigkeiten - sowohl auf der Oberfläche als auch in Fibringelen - wurden nun bestimmt, indem gemessen wurde, in welchem Zeitintervall sich die Zellen um wieviel μm fortbewegt haben.

3.2.3.4 Dreidimensionales Kokultursystem in Fibringelen

Dieses Angiogenese- System basiert ebenfalls auf zellbeschichteten *Microcarrier*n, die in ein Fibringel eingebettet werden. Die Herstellung der Fibringele erfolgte mit einigen Modifikationen wie unter 3.2.3.3 beschrieben. Die Fibrinogenlösung wurde für diese Versuche in PBS mit pH 7,0 hergestellt und auf eine Endkonzentration von 1 mg/ ml verdünnt. Um in den Kokulturen die verschiedenen Zellen zu unterscheiden, wurde jeweils eine Zellart mit dem Lebendfarbstoff DiI gefärbt. Dafür wurden *Microcarrier*, die konfluent mit Endothel- oder Tumorzellen bedeckt waren, für 60 min bei 37°C in 40 µg/ ml DiI in DMEM mit 10 % FCS inkubiert und anschließend mehrere Male mit PBS gewaschen. Insgesamt 40 µl gepackte *Microcarrier* (20 µl Endothel- und 20 µl Tumorzellcarrier) wurden in 2 ml Fibrinogenlösung aufgenommen, durch vorsichtiges Schwenken der Kulturschalen gleichmäßig verteilt und letztlich durch die Zugabe von 0,625 U/ ml Thrombin polymerisiert. Die fertig polymerisierten Gele wurden wie unter 3.2.3.3 beschrieben äquilibriert und die Kokulturen unter serumfreien Bedingungen kultiviert.

Kokulturen von PAEC und Tumorzellen wurden in Schweinefibrin und DMEM mit 1 mg/l Insulin, 1 mg/ l Transferrin, 1 µg/ l Selenium und 1000 U/ ml Aprotinin kultiviert. Für HU-VECs und Tumorzellen wurde humanes Fibrin verwendet und M199 mit 3 % Retinafaktor und 1000 U/ ml Aprotinin zugesetzt.

Um die direktionale von der zufälligen Migration zu unterscheiden wurden außerdem mit Zellen bedeckte *Microcarrier* in 2% Glutaraldehyd in PBS für 24 h unter ständigem Schwenken fixiert, um einer Aggregation der *Microcarrier* vorzubeugen. Zusätzlich zu den 40 µl vitaler zellbedeckter *Microcarrier* wurden dann 20 µl devitalisierter Zellcarrier in die Fibringele eingebettet.

Quantifizierung der direktionalen Migration in Fibrin

Vier bis fünf Tage nach der Polymerisation der Gele wurde die direktionale Migration der Tumorzellen zu den Endothelzellen folgendermaßen quantifiziert: für die Zufallsmigration wurde der Prozentanteil der devitalisierten Endothelzell-bedeckten *Microcarrier*, der von migrierenden DiI-markierten Tumorzellen berührt wurde, bestimmt. Es wurden lediglich *Microcarrier* gewertet, die mehr als 150 µm von den *Microcarrier*n entfernt waren, die den Ausgangspunkt der Tumorzellen darstellten. Die Zufallsmigration wurde ins Verhältnis zur direktionalen Migration gesetzt, die wiederum definiert wurde als Prozentanteil der lebenden unmarkierten Endothelzellcarrier, die von DiI-gefärbten Tumorzellen erreicht worden waren.

Auf diese Weise konnte der Anteil der direktionalen Migration von Tumor- zu Endothelzellen reproduzierbar quantifiziert werden. Diese Quantifizierungsmethode ist schematisch in Abb. 4 dargestellt.

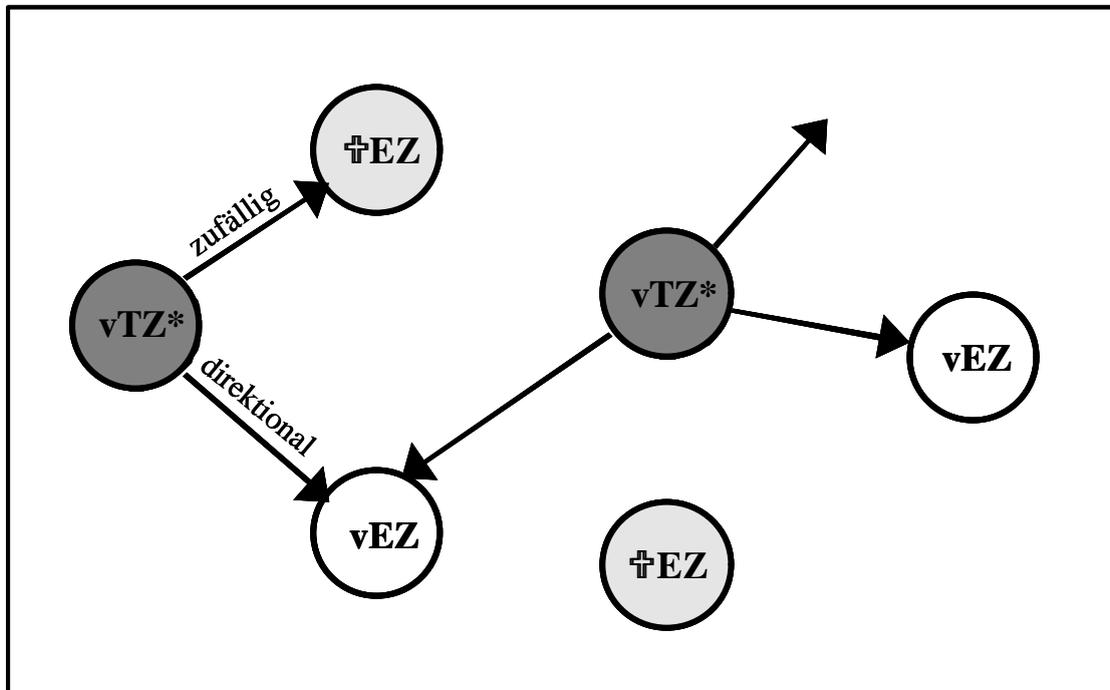


Abb. 4: Schema für die Quantifizierung dreidimensionaler gerichteter und ungerichteter Tumorzellmigration. vTZ*: vitale DiI-markierte Tumorzellcarrier; vEZ: vitale Endothelzellcarrier; †EZ: Glutaraldehydfixierte Endothelzellcarrier. Ungefärbte vEZ, die von fluoreszierenden Tumorzellen erreicht wurden, galten als ‚positiv‘ für die direktionale Migration. Im Vergleich dazu galt als zufällige Migration, wenn fluoreszierende Tumorzellen ungefärbte †EZ erreichten.

3.2.4 Spektrometrische Bestimmung der Fibrinstruktur

Die Absorption (A_{350}) von Fibringelen korreliert stark mit der Dicke der Fibrinfasern und der Permeabilität des Fibrinnetzwerks (Carr and Hermans, 1977; Ferry and Morrison, 1947).

Humanes Fibrinogen wurde nach Dialyse gegen PBS in Plastikkuvetten durch Hinzufügen von Thrombin polymerisiert. Es wurden z.T. unterschiedliche Konzentrationen HS hinzugefügt und für die Überprüfung der pH-Abhängigkeit der Fibrinstruktur wurde die Fibrinogenlösung vor der Polymerisation auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.

Die Turbiditätsmessungen erfolgten in einem Photometer bei 350 nm 30 min nach Thrombinzugabe.

3.2.5 Konfokale Lasermikroskopie

Um die unterschiedlichen Fibrinstrukturen direkt zu visualisieren, wurden fluoreszierende Fibringele mit Oregon™ Green 488 Fibrinogen hergestellt und in einem Biorad MRC 600 Lasermikroskop untersucht. Dafür wurden 100 µg Oregon™ Green in 1 ml unmarkierter humaner Fibrinogenlösung (2 mg/ ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen an HS gelöst. Die Polymerisation von je 100 µl dieser Fibrinogenlösung wurde durch Zugabe von 0,625 U Thrombin ausgelöst. Auf diese Weise wurden dünne fluoreszenzmarkierte Gele auf Objektträgern unter Deckgläschen hergestellt.

3.2.6 Bestimmung der Porengröße durch Flüssigkeitspermeation

3.2.6.1 Durchführung der Permeationsmessungen

Gele, bestehend aus 2 mg/ml Fibrin und unterschiedlichen Konzentrationen HS, wurden in offenen Polypropylen-Röhrchen hergestellt. Während der Polymerisation des jeweiligen Gels wurde das untere Ende des Röhrchens mit Parafilm™ geschlossen, um einem Auslaufen der Flüssigkeit vorzubeugen. Außerdem wurde die innere Wand der Röhrchen vor Beginn des Versuchs mit Fibrinogen beschichtet, um zu vermeiden, daß bei der Polymerisation des Gels eine Lücke zwischen der Wand des Röhrchens und dem Gel entsteht, durch das die zu permeierende Flüssigkeit sickern kann. Nach einer 60 minütigen Polymerisationszeit wurde der Parafilm entfernt und durch ein Polyesternetzwerk mit einem Porendurchmesser von 100 µm ersetzt, um das Gel während der Messung zu stabilisieren.

Anschließend wurde die Permeation von H₂O unter konstantem Druck durch das Gel gemessen. Das Volumen an H₂O, welches in einer definierten Zeit durch die Gel-Säule permeiert war, wurde gemessen und daraus die Permeabilität bzw. die Darcy-Konstante des jeweiligen Gels und der Porendurchmesser bestimmt.

3.2.6.2 Berechnung des Massen-Längenverhältnisses von Fibrinfasern und des durchschnittlichen Porendurchmessers

Die folgenden Berechnungen wurden wie beschrieben durchgeführt (Carr & Hardin, 1987; Carr & Hauge, 1990).

1. Die Permeabilität oder Darcy-Konstante (r) eines Gels:

$$(1) \quad r = Qnh / Ftp$$

Q [cm³]: Volumen, welches das Gel in der Zeit t passiert
 n [mPa s]: Viskosität der Flüssigkeit
 h [cm]: Länge der Gel-Säule
 F [cm²]: Fläche, auf die der Flüssigkeitsdruck trifft
 p [mPa]: ausgeübter Druck

2. Der durchschnittliche Faserdurchmesser (d) ergibt sich aus der Darcy-Konstante:

$$(2) \quad d^2 = kr\mathbf{f}$$

k : bekannte Konstante, = 10
 ϕ : Volumen Fraktion des Polymers; Produkt des partiellen spezifischen Volumens von Fibrinogen multipliziert mit der Fibrinogenkonzentration

3. Das Polymer Massen- Längen- Verhältnis (μ) aus der Darcy-Konstante:

$$(3) \quad \mu = M / L$$

M [g]: Fasermasse
 L [cm]: Polymer Konturlänge

⇒ Die Fasermasse ist also:

$$(4) \quad M = CV_t$$

C [g/ cm³]: Konzentration des Polymers
 V_t [cm³]: totales Volumen des Gels

⇒ Unter der Annahme, daß die Fasern stäbchenförmig sind kann die Konturlänge berechnet werden basierend auf dem Volumen eines Zylinders:

$$(5) \quad L = V_p / \mathbf{p} (d/2)^2$$

V_p [cm³]: Volumen des Polymers
 d [cm]: durchschnittlicher Faserdurchmesser

⇒ V_p ist also:

$$(6) \quad V_p = fV_t$$

⇒ Durch Ersetzen von L und M aus Gleichung (4) – (6), ergibt Gleichung (3):

$$(7) \quad \mu = Cpd^2 / 4f$$

⇒ Ersetzen von d^2 aus Gleichung (2) ergibt:

$$(8) \quad \mu = 2,5 Cpr$$

⇒ Die Einheit von Gleichung (8) [g/cm] wird durch Multiplikation mit $5,988 \times 10^{23}$ Da/g in Daltons pro cm umgewandelt.

4. Der durchschnittliche Porendurchmesser für Fibringle basiert auf Ogston's mathematischer Beschreibung eines Netzwerks, welches aus sehr langen geraden Stäbchen besteht (Ogston, 1958).

Der durchschnittliche Porenradius (R) berechnet sich aus:

$$(9) \quad R = (8nl)^{-1/2}$$

n : durchschnittliche Zahl an Faserzentren pro cm^3
 l : die Hälfte der durchschnittlichen Faserlänge

⇒ n und l sind schwierig zu messen, aber ihr Produkt nl ist gleich der Hälfte der totalen Konturlänge der Fasern in dem Volumen. Deshalb gilt:

$$(10) \quad nl = 1/2 L$$

⇒ Ersetzen aus Gleichung (3), (4) und (8) ergibt:

$$(11) \quad l = 1/r5p \quad \Rightarrow \quad R = 0,5093/r^{-1/2}$$

3.2.7 Kompaktion der Fibringle

Diese Versuche wurden nach Nair und Shats durchgeführt (Nair & Shats, 1997).

Um eine nicht-adhäsive Oberfläche der Versuchsgefäße zu schaffen, wurden zunächst 1,5 ml Zentrifugenröhrchen (Eppendorf) mit einer Silikonlösung (SigmacoteTM) beschichtet.

Die verschiedenen Fibringle wurden wie oben beschrieben angesetzt und in den Eppendorf-Gefäßen auspolymerisiert. Die Gele wurden über Nacht bei RT zur vollständigen Polymerisation stehen gelassen. Dann wurden die Gele bei 8000 g unterschiedlich lange zentrifugiert. Das Flüssigkeitsvolumen, welches durch Kompaktion bei der Zentrifugation aus der Fibrinstruktur herauseluiert wurde, konnte dann mit einer 1 ml Spritze bestimmt und als Prozentanteil des initialen Volumens des Fibringels, also des Anteils an Kompaktion, ausgedrückt werden.

3.2.8 Fluoreszenzmarkierung von HS

200 mg HS wurden über einen Zeitraum von 12-48 h durch vorsichtiges Rühren in 40 ml Formamid gelöst. Der nun vollständig gelösten HS wurde dann 50 ml Dimethylsulfoxid zusammen mit 0,1 g Natriumhydrogencarbonat, 0,1 g Dibutylzinn-Dilaurat und 0,3 g Fluoresceinisothiocyanat (FITC) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde für eine halbe Stunde im Dampfbad gerührt. Das Produkt wurde mit 50 ml Wasser verdünnt und anschließend mit insgesamt 2 l Ethanol mit ein paar Tropfen gesättigter Natriumchloridlösung gefällt. Nachdem das Präzipitat sedimentiert war, konnte der Überstand abgegossen werden. Die Fällung wurde so oft wiederholt bis das Produkt frei war von nicht gebundenem Fluorescein. Die Kontrolle erfolgte durch Dünnschichtchromatografie (Merck Kieselgel F₂₅₄) mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch. Die gereinigte FITC-HS wurde getrocknet und anschließend in einer Konzentration von 6 mg/ml in PBS bei 4° gelagert (de Belder & Wik, 1975).

3.2.9 Subzelluläre Fraktionierung für Zytosol- und Membranextrakte

Hypotoner Lysispuffer: NaCl (unterschiedliche Konzentrationen)
 10 mM HEPES
 2 mM MgCl₂
 CompleteTM Protease-Inhibitor Mix (1 Tablette/ 50 ml Puffer)
 z.T. 1% Triton X-100

3 Material und Methoden

Glioblastomzellen wurden in einer Plastikschale (\varnothing 10 cm) ausgesät und bis zur Konfluenz bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen mit einem Zellschaber in 2 ml eiskaltes PBS überführt und bei 800 g und 4°C 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann für 30 min in 250 μ l des gewünschten Lysispuffers inkubiert und noch einmal 5 min bei 800 g zentrifugiert. Das Pellet sollte nun die Zellkerne und Debris enthalten, während der Überstand die Zytoplasma- und Membranfraktion bildete. Für die spätere Analyse der Kernfraktion wurde das Pellet in neuem Lysispuffer mit zugesetztem Triton X-100 resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation des Überstandes für 45 min bei 100000 g, 4°C. Im neuen Überstand sollte sich nun lediglich das Zytoplasma, im Pellet die Membranfraktion befinden. Die Membranfraktion wurde in frischem Puffer, der mit Triton X-100 versetzt war, resuspendiert.

In den Fraktionen wurde neben der spektrometrischen Messung von HS die Lactat-Dehydrogenase bzw. die β -Galactosidase - Aktivität gemessen (Storrie & Madden, 1990).

3.2.9.1 Zytosolmarker: Lactat-Dehydrogenase

Reaktionsgemisch:

- 10 ml 0,2 M Tris/ HCl, pH 7,3
- + 360 μ l einer 6,6 mM NADH in 0,2 M Tris/HCl (pH 7,3)
- + 360 μ l einer 30 mM Natriumpyruvat in 0,2 M Tris/HCl
- + 108 μ l 10 % Triton X-100

Es wurden 180 μ l des Reaktionsgemisches mit 20 μ l der jeweiligen Probe in einer 96-Loch-Platte gemischt. Die Absorption konnte dann im Mikrotiterplattenphotometer bei 340 nm gegen das pure Reaktionsgemisch gemessen werden und die Enzymaktivität als Abnahme der Absorptionseinheiten pro min ausgedrückt werden.

3.2.9.2 Lysosomenmarker: β -Galaktosidase

Reaktionsgemisch:

1 mM 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galaktopyranosid wurde in 0,1 M Natriumacetat (pH 4,4) mit 0,125 % Triton X-100 gelöst.

Diese Stammlösung konnte bei - 20°C gelagert werden. Um das Methylumbelliferylsubstrat zu lösen und nach dem Auftauen wieder in Lösung zu bringen, war eine Ultraschallbehandlung notwendig.

Die Proben wurden mit 0,25 M Sucrose auf 0,1 ml verdünnt. Als Blindwert wurde ebenfalls 0,25 M Sucrose eingesetzt.

Durch Hinzufügen von 0,4 ml des Reaktionsgemisches wurde dann der Versuch gestartet und für 45 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Reaktion mit jeweils 1 ml 0,5 M Glycin/ 0,5 M Natriumcarbonat abgestoppt. Die Fluoreszenz konnte dann bei einer Anregungswellenlänge von 364 nm und einer Emissionswellenlänge von 448 nm gemessen werden. Die Enzymaktivität wird in relativen Fluoreszenzeinheiten dargestellt.

3.2.10 Spektrometrische Methode zur Bestimmung von HS

Diese Methode wurde adaptiert nach Homer et.al., 1993.

Färbelösung:

„Stains-all“ wurde in 0,1 mM in H_2O_{dest} : 1,4 -Dioxan (50:50, v/v) gelöst, welches schon 1 mM Essigsäure und 0,5 mM Ascorbinsäure enthielt.

Durchführung:

Die Proben wurden ausschließlich in H_2O_{dest} angesetzt.

Jeweils zu 1/10 der zu messenden Ansätze wurde 9/10 Färbelösung hinzugeben (50 µl Testlösung + 450 µl Färbung bei Messung in einer 1 ml Plastikkuvette)

Anschließend mußte zusätzlich noch einmal das gleiche Volumen (hier 500 µl) H_2O_{dest} hinzugefügt werden, da ansonsten der spezifische HS-Peak fehlte und so die HS nicht von sulfatisierten Glykosaminoglykanen unterschieden werden konnte.

Die Färbelösung alleine besaß maximale Absorptionen bei 532 und 571 nm, sulfatisierte Glykosaminoglykane besitzen eine zusätzliche spezifische Schulter von 480 bis 500 nm und können bei 480 nm gemessen werden. Der spezifische Peak von HS tritt bei 650 nm auf.

3.2.11 Aktin-Reinigung

Das für die Aktin-Reinigung (Spudich & Watt, 1971) benötigte Acetonpulver wurde aus Schweine-Filet gewonnen und freundlicherweise von Dr. E. Butt zur Verfügung gestellt.

G-Aktin-Puffer: 2 mM Tris/HCl (pH 8,0)
 0,2 mM CaCl₂
 0,2 mM ATP
 0,5 mM DTE

2,5 g Acetonpulver wurden zweimal mit G-Puffer (0°C !) versetzt und jeweils 30 min auf Eis unter gelegentlichem Rühren extrahiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation (40000 g, 30 min, 4°C) wurden die Überstände zusammen durch Glaswolle filtriert und unter Rühren mit KCl (ad 50 mM) und MgCl₂ (ad 2 mM) versetzt. Nach einer 30 minütigen Ruhephase bei RT wurde die Lösung nochmals 30 min auf Eis vorsichtig gerührt. Die vollständige Polymerisation des Aktins erfolgte dann durch weitere Zugabe von KCl ad 800 mM und anschließender 30 minütiger Inkubation auf Eis. Das polymerisierte Aktin konnte dann durch Zentrifugation bei 100000 g für 90 min bei 4°C pelletiert werden. Nach vorsichtigem Spülen des Pellets mit 2 ml G-Puffer wurden insgesamt 3 ml G-Puffer pro Gramm Acetonpulver hinzugefügt. Auf diese Weise konnte das Pellet bei 4°C über Nacht quellen, um am nächsten Tag mit einer Pasteurpipette resuspendiert und zur Depolymerisation des F-Aktins zwei Tage gegen mehrmals gewechselten G-Puffer dialysiert zu werden. Das nicht depolymerisierte Aktin wurde dann durch Zentrifugation bei 10000 g für 2 h bei 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde dann über eine mit G-Puffer äquilibrierte Sephacryl S-200 HR-Säule (1,6 x 100 cm) fraktioniert (0,2 ml/ min). Die einzelnen Fraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, Coomassie Blau gefärbt und die Aktin-enthaltenen Fraktionen vereinigt.

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei 290 nm (Gordon et.al.,1976) gegen G-Puffer bestimmt ($A_{290} [1 \text{ mg/ ml}] = 0,62$)

3.2.12 Markierung von Aktin mit N-(1-Pyren) Iodoacetamid

Bei dieser Methode wurde das G-Aktin zuerst zu F-Aktin polymerisiert, welches daraufhin fluoreszenzmarkiert und anschließend wieder depolymerisiert wurde (Kouyama & Mihashi, 1981).

Zu Beginn wurde die zu markierende Menge an Aktin bei 4°C gegen dreimal gewechselten und entgasten G-Puffer ohne DTE dialysiert, da das DTE bei der nachfolgenden Fluoreszenzmarkierung stören würde. Das dialysierte Aktin wurde dann mit Natriumazid (ad 1 mM),

3 Material und Methoden

KCl (ad 100 mM) und $MgCl_2$ (ad 1 mM) versetzt und konnte so in einer einstündigen Ruhephase bei RT zu F-Aktin polymerisieren.

Der nun folgende Teil des Versuchs wurde im abgedunkelten Raum durchgeführt. Die Stammlösung des Pyreniodoacetamids wurde möglichst hoch konzentriert (4 mg/ml) in DMSO hergestellt. Aus der Stammlösung wurde dann die Menge, die ein Molaritätenverhältnis des Pyrens zum Aktin von 2:1 ergab, vorsichtig zum Aktin getropft. Dieses wurde dann langsam für 20 h bei RT geschwenkt. Anschließend wurde das Pyren-F-Aktin fünfmal gegen je 1 l G-Puffer dialysiert, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen und eine Depolymerisation des Aktins herbeizuführen. Bei einer anschließenden Zentrifugation 1 h bei 100000 g und 4°C wurde der eventuell noch vorhandene Farbstoff und das nicht depolymerisierte F-Aktin pelletiert.

Der Prozentanteil des fluoreszenzmarkierten Aktins zum Gesamtprotein wurde durch einen photometrischen Vergleich des Pyren-Aktins und des normalen G-Aktins bei 344 nm berechnet. Der molare Absorptionskoeffizient von Pyreniodoacetamid-markiertem G-Aktin beträgt $2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 344 nm.

3.2.13 Messung der Aktinpolymerisation mit fluoreszenzmarkiertem Aktin

Die Aktinpolymerisation wurde in 1 ml Plastikkuvetten bei RT durchgeführt. Es wurden 2 μM des fluoreszenzmarkierten Aktins in G-Puffer mit KCl (ad 50 mM) und $MgCl_2$ (ad 2 mM) und z.T. unterschiedlichen Konzentrationen an HS in frischem G-Puffer versetzt. Die daraufhin einsetzende Polymerisation wurde fluorometrisch bei einer Anregungswellenlänge von 364 nm und einer Emissionswellenlänge von 448 nm verfolgt und mit der jeweiligen Kontrolle ohne Zusätze verglichen.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Denaturierende Gel-Elektrophorese nach Lämmli (1970)

Lösungen:

Trenngelpuffer:	3 M Tris/ HCl (pH 8,9)
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/ HCl (pH 6,7)
APS:	10 % Ammoniumpersulfat (w/v) in H_2O_{dest}

3 Material und Methoden

Acrylamidlösung:	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris (pH 8,9) 192 mM Glycin 0,1 % SDS
5 x Probenpuffer:	330 mM Tris/ HCl (pH 6,9) 10 % (w/v) SDS 25 % (w/v) Glycerin 50 mM DTT 0,02 % (w/v) Bromphenolblau

Präparation der Minigele:

Für die SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurden vertikale 9 x 7 cm Minigele von 1 mm Dicke verwendet.

10 % Trenngel: (Ansatz für 2 Gele)	3,325 ml Acrylamidlösung 1,25 ml Trenngelpuffer 0,1 ml 10 % SDS 5,29 ml H ₂ O _{dest} 5 µl TEMED 0,1 ml APS
--	---

Für höher- oder niedrigerprozentige Gele wurden die Acrylamid- und Wassermengen entsprechend angepaßt.

Sammelgel: (Ansatz für 2 Gele)	0,5 ml Acrylamidlösung 0,625 ml Sammelgelpuffer 50 µl 10 % SDS 3,775 ml H ₂ O _{dest} 2,5 µl TEMED 0,2 ml APS
--	---

Zuerst wurde die Trenngellösung zwischen zwei senkrechte Glasplatten, die durch *spacer* getrennt waren, gegossen und mit H₂O_{dest} überschichtet, damit eine glatte Abtrennung des Gels erfolgte. Nach der Polymerisation des Gels wurde das Wasser wieder entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Für die Bildung der Probestaschen wurde der entsprechende Kamm eingesetzt.

Nach der Polymerisation wurde der Kamm entfernt und in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Anschließend wurden die Kammern mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Proben in

3 Material und Methoden

die dafür vorgesehenen Taschen gefüllt. Die aufzutrennenden Proteinproben wurden zuvor mit 5 x Probenpuffer versetzt und ca. 5 min bei 95 °C erhitzt. Es wurde eine konstante Spannung von 70 bis 120 V angelegt und die Elektrophorese wurde beendet, wenn das Bromphenolblau des Probenpuffers vollständig durch das Gel gelaufen ist bzw. länger, je nach dem zu beobachtenden Molekulargewicht der Proteine.

3.3.2 Western Blot

Lösungen:

<u>Transferpuffer:</u>	25 mM Tris 193 mM Glycin 10 % (v/v) Methanol 0,05 % (w/v) SDS
<u>PBS-TT:</u>	PBS + 0,05 % (w/v) Tween 20 + 0,3 % (w/v) Triton X-100
<u>TBS-T:</u>	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,1 % (w/v) Tween 20
<u>Blockmedium:</u> (abhängig vom Primärantikörper)	1 % (w/v) BSA in TBST oder 3 % (w/v) Magermilch in PBS-TT
<u>Chemolumineszenz-Reaktionsgemisch:</u>	50 % (v/v) ECL (enhanced chemoluminescence)-Reagenz 1 50 % (v/v) ECL (enhancer)- Reagenz 2

Durchführung:

Um bestimmte Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung durch SDS-PAGE spezifisch zu markieren, wurden zunächst die Proteine aus den Gelen auf eine PVDF-Membran transferiert. Dafür mußte die Membran zuvor kurz mit Methanol, dann mit H₂O_{dest} befeuchtet und anschließend im Transferpuffer äquilibriert werden. Die Membran wurde dann direkt auf das Gel gelegt und beides zusammen von beiden Seiten mit je zwei Lagen in Transferpuffer eingeweichem Blottingfilterpapier umgeben. Dieser Stapel wurde so in eine Semi-Dry-

3 Material und Methoden

Blotting-Kammer gelegt, daß die PVDF-Membran auf der Seite der Anode lag. Der Transfer erfolgte für 60 - 70 Minuten bei 40 mA pro Gel.

Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen auf der PVDF-Membran durch eine Inkubation im Blockmedium bei 4°C über Nacht abgesättigt. Es folgte eine 90 minütige Inkubation bei RT mit in Blockmedium verdünntem Primärantikörper und anschließendem viermaligem Waschen (1 x 15 min, 3 x 5 min) mit PBS-TT oder TBST. Der gebundene Erstantikörper wurde nun mit einem Meerettich Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper und sich daran anschließender Chemolumineszenz-Reaktion nachgewiesen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, der ebenfalls im Blockmedium verdünnt wurde, erfolgte über einen Zeitraum von einer Stunde bei RT, woraufhin die Membran wiederum viermal mit dem jeweiligen Waschpuffer gewaschen wurde. Nach einer weiteren Minute Inkubation mit dem Chemolumineszenz-Reaktionsgemisch wurde die Membran in Folie eingeschweißt und für eine halbe bis zu mehreren Minuten auf einem Röntgenfilm exponiert.

3.3.3 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie Blau

Färbelösung: 10 % (v/v) Isopropanol
10 % (v/v) Essigsäure
0,04 % (w/v) Coomassie® Brilliant Blau

Entfärbelösung: 10 % (v/v) Isopropanol
10 % (v/v) Essigsäure

Nach einer 15 minütigen Inkubation der Proteingele in der Färbelösung wurde ungebundener Farbstoff für mindestens 2 h mit der Entfärbelösung herausgewaschen.

3.3.4 Fraktionierung von konditioniertem Medium

Für eine Annäherung an den chemotaktisch aktiven Faktor im Endothelzell-konditionierten Medium, wurde das konditionierte Medium nach verschiedenen Methoden aufgetrennt. Das so an jeweils unterschiedlichen Proteinen reduzierte Medium wurde dann - vorwiegend in *Checkerboard*-Versuchen - auf die noch vorhandene chemotaktische Aktivität getestet.

3.3.4.1 Eingrenzung des Molekulargewichts von chemotaktisch aktiven Molekülen

Mit Hilfe von Ultrafree-Zentrifugenröhrchen mit Ausschlußmembranen von 5 bzw. 100 kDa wurde das Medium zunächst folgendermaßen eingengt: jeweils 4 ml konditioniertes Medium wurden in ein Ultrafree-4-Röhrchen überführt und 30 min im ST-H750 Rotor der Sorvall Zentrifuge bei 3800 g, RT zentrifugiert. In dieser Zeit konnte das konditionierte Medium 1:40 unter Ausschluß des jeweils gewünschten Molekulargewichts aufkonzentriert werden.

Für schon vorbehandeltes konditioniertes Medium, d.h. durch andere Methoden schon stark an Proteingehalt reduziertes Medium, verkürzte sich die Zentrifugationszeit und mußte jeweils neu angepaßt werden.

Das auf diese Weise gewonnene Retentat von zentrifugiertem Endothelzell-Medium wurde mit DMEM wieder auf das ursprüngliche Volumen und somit die ursprüngliche Konzentration der höhermolekularen Proteine eingestellt und sowohl in *Checkerboard*-Analysen als auch in dreidimensionalen Fibringelversuchen getestet.

Als Vergleich wurde das jeweils gleiche konditionierte Medium in Float-A-Lysem® mit einem MWCO von 100 kDa dreimal gegen PBS dialysiert und ebenfalls deren *Checkerboard*-Verhalten untersucht.

3.3.4.2 Reduktion des pH-Wertes

Um mögliche Proteinuntereinheiten voneinander zu trennen, wurde das zu untersuchende konditionierte PAEC-Medium für 10 min auf einen pH-Wert von 2 herunterreguliert. Anschließend wurde dieses Medium in Ultrafree-4-Röhrchen wie in 3.3.4.1 beschrieben zentrifugiert, um Untereinheiten von chemotaktisch aktiven Proteinen, die kleiner als 100 kDa waren, herauszufiltrieren. Für den anschließenden Test in Boydenkammern wurde das Retentat wieder mit Medium aufgefüllt und der ursprüngliche pH-Wert eingestellt.

3.3.4.3 Hitzeinaktivierung von konditioniertem Medium

Um zu testen, ob es sich bei den chemotaktisch aktiven Molekülen im Endothelzell-konditionierten Medium um hitzelabile Proteine handelt, wurde dieses Medium für 1 h in einem Wasserbad bei 80°C inkubiert. Anschließend wurde die Chemotaxis der Tumorzellen auf das hitzeinaktivierte Medium im *Checkerboard*-Versuch untersucht.

3.3.4.4 Weitere Aufreinigung durch DEAE

Das in 3.3.4.1 gewonnene Retentat wurde weiter aufgereinigt durch die Bindung weiterer noch im Retentat vorhandener Proteine an den Anionenaustauscher Diethylaminoethyl-Zellulose (DEAE). Diese Bindung wurde im *batch*-Verfahren durchgeführt. Dafür wurden 3 g DEAE-Material viermal für je 30 min mit jeweils 10 ml PBS im Überkopfschüttler bei 4°C äquilibriert.

Das aufzutrennende konditionierte Medium wurde zweimal gegen je 2 l PBS dialysiert bis das Phenolrot des Mediums herausgewaschen war. Dann wurden 10 ml des Medium-Dialysats auf das äquilibrierte DEAE gegeben und für 1,5 h im Überkopfschüttler bei 4°C kontinuierlich durchmischt. Anschließend konnte sich das DEAE im Ruhezustand am Boden absetzen und der sich bildende Überstand wurde durch eine Membran mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm filtriert.

Um die an das DEAE gebundenen Proteine wieder herauszulüieren, wurde das DEAE-Material wiederum für jeweils 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler mit NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen (130 mM, 200 mM, 500 mM) eluiert. Ebenso wie der erste Überstand konnten die verschiedenen Eluate gesammelt und filtriert werden. Sowohl der erste Überstand als auch die drei weiteren Eluate wurden dann wiederum gegen PBS dialysiert, um die ursprünglichen Salzkonzentrationen wiederherzustellen. Anschließend wurden die Fraktionen in Ultrafree-Zentrifugenröhrchen mit einem MWCO von 100 kDa wie unter 3.3.4.1 beschrieben weiter eingengt und nach Einstellung der ursprünglichen Volumina mit DMEM konnte die noch vorhandene chemotaktische Anziehungskraft auf Tumorzellen untersucht werden.

3.3.4.5 Proteinidentifikation durch Massenspektrometrie

(Kooperation mit Dr. Katrin Marcus und Prof. H.E. Meyer, Bochum)

Die massenspektrometrischen Untersuchungen der Proteine wurden freundlicherweise von Dr. Katrin Marcus an der Ruhr Universität Bochum durchgeführt. Bei der Massenspektrometrie werden die zu untersuchenden Moleküle ionisiert und in ein Massenspektrometer, welches unter Vakuum gehalten wird, eingeschleust. Die hier verwendete Technik ist die sogenannte MALDI-MS (*matrix-assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry*), bei der die Probe in einer Matrix, die in der Wellenlänge des Lasers absorbiert, kokristallisiert ist. Das bedeutet, die Proteine werden in Kristalle von UV-absorbierenden Molekülen eingebaut.

3 Material und Methoden

Diese Moleküle laden die Proteine durch die Übertragung von Protonen positiv auf. Anschließend werden diese Kristalle im Vakuum einem UV-Laser ausgesetzt, der die UV-absorbierenden Moleküle und somit auch die Proteinionen freisetzt. Die Ionen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und passieren schließlich durch eine Öffnung eine feldfreie Vakuumzone. Es werden jeweils Signale aufgezeichnet, wenn die Teilchen einen Detektor am Ende dieser Flugröhre treffen. Da alle Ionen mit der gleichen Potentialdifferenz beschleunigt werden, ist ihre Geschwindigkeit proportional zu ihrer Masse durch ihre Ladung, d.h. kleinere Ionen erreichen den Detektor schneller als größere Ionen. Mit Hilfe von Molekülen bekannter Masse kann das Gerät zuvor kalibriert werden (Patterson, 1998).

Für eine genauere Analyse einzelner Proteine wurde zum Teil PSD (*post-source decay*) für MALDI-MS hinzugezogen. Dafür wurden fragmentierte Ionen - vorwiegend durch Spaltung der Peptidbindungen - hergestellt. Das erhaltene Ionenspektrum der Peptidfragmente konnte dann mit den jeweiligen theoretischen Aminosäuresequenzen aus den Datenbanken (SwissProt) korreliert werden.

4 Ergebnisse

TEIL I: Einfluß von HS auf die Tumorzellmigration

4.1 Charakterisierung der Glioblastomzellen

Die für diese Arbeit verwendete Glioblastomzelllinie U-138 MG wurde durch Immunfärbungen mit Antikörpern gegen CD44, ICAM-1, α_v -Integrin und β_1 -Integrin charakterisiert. Die Zellen waren positiv für CD44, ICAM-1, α_v -Integrin, β_1 -Integrin (Abb. 5). Die Antikörper gegen β_1 -Integrin zeigten sowohl eine Färbung der fokalen Kontakte als auch von *microspikes* während bei CD44 keine spezifische Markierung der fokalen Kontakte auftrat. In Übereinstimmung mit der Membran-Lokalisation von CD44 zeigte die Immunfluoreszenz mit dem spezifischen Antikörper ein klares Signal an der Zellperipherie.

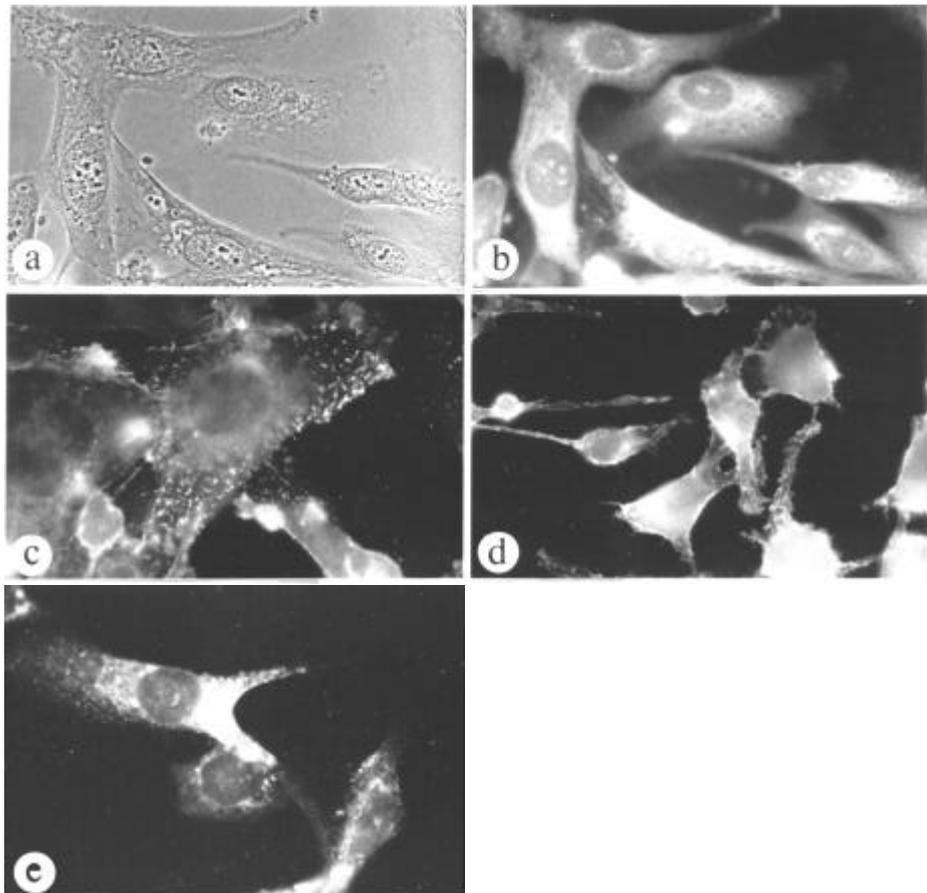


Abb. 5: Charakterisierung der Glioblastomzelllinie U138 MG. (a) Phasen-Kontrast-Aufnahme der Glioblastomzellen. (b) Korrespondierende Immunfluoreszenz von α_v -Integrin. Weitere Immunfluoreszenzen von β_1 -Integrin (c), CD44 (d) und ICAM-1 (e).

4.2 Charakterisierung der verschiedenen Fibrinstrukturen

4.2.1 Spektrometrische Bestimmung

Die Absorption A_{350} von Fibringelen ist direkt gekoppelt mit der Dicke der Fibrinfasern bzw. des Porendurchmessers. Je turbider die Gele sind desto dicker sind die Fibrinfasern und der Porendurchmesser nimmt auch entsprechend zu. Die jeweiligen Absorptionskurven in Abhängigkeit von der HS-Konzentration bzw. des pH-Wertes der Fibringele sind in Abb. 8 und Abb. 9 (s. 4.3.1 und 4.3.2) direkt gekoppelt mit der Migration von Glioblastomzellen in den entsprechenden Gelen dargestellt. In den Abbildungen kann man deutlich erkennen, daß die Absorption sowohl mit abnehmendem pH-Wert als auch mit steigender HS-Konzentration zunimmt.

4.2.2 Visualisierung durch Konfokale Lasermikroskopie

Die unterschiedlichen Fibrinstrukturen konnten direkt durch die Polymerisation von humanem Fibrinogen in Anwesenheit von fluoreszenzmarkiertem OregonTM Green Fibrinogen sichtbar gemacht werden. Durch den Einbau des fluoreszierenden Fibrinogens in die Fibrinstruktur konnten dann die unterschiedlichen Strukturen mittels konfokaler Lasermikroskopie miteinander verglichen werden. Nach der Polymerisation ohne HS-Zusatz erschienen die Fibrinfasern wesentlich dünner mit einem sehr feinporigen Netzwerk. Hingegen wiesen Gele, die in Anwesenheit von 500 µg/ml HS polymerisiert waren, ein grobmaschiges Netzwerk mit großen Poren und signifikant verdickten Fibrinfasern auf. Auch diese Beobachtungen wiesen eine direkte Korrelation mit der Migration von Glioblastomzellen in den entsprechenden Fibringelen auf (Abb. 6).

4 Ergebnisse

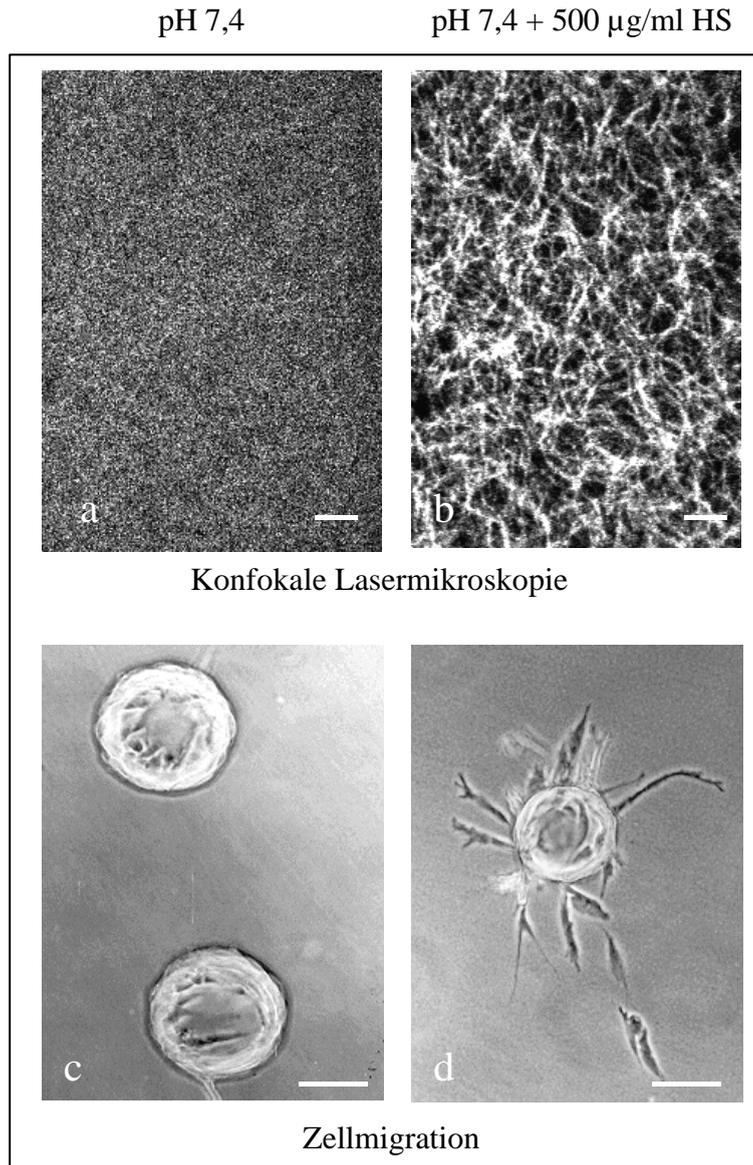


Abb. 6: a) und b): Konfokale Laser Scanning Mikroskopie, Balken: 10 μ m, c) und d): mit Glioblastomzellen bedeckte Microcarrier in Fibringele eingebettet, Balken: 100 μ m
a) und c): ohne HS im Gel, b) und d): mit 500 μ g HS/ml Gel

Eine ähnliche Beobachtung war in Fibringelen zu sehen, die bei unterschiedlichen pH-Werten polymerisiert waren. Je geringer der pH-Wert der Fibrinogenlösung war, desto großporiger und dickfaseriger erschien die Struktur des polymerisierten Fibringels, was ebenfalls dem beobachteten dreidimensionalen Migrationsverhalten der Glioblastomzellen entsprach (ohne Abb.).

4.2.3 Bestimmung der Porengröße durch Flüssigkeitspermeation

Die Porengröße der unterschiedlichen Fibringele wurde mit Hilfe der Darcy Konstante $r = Qnh / Ftp$ berechnet (Tab. 2). Die dafür nötigen Angaben der verschiedenen Parameter (s. 3.2.6.2) sind unten aufgeführt. Es wurden 2 ml Fibringele (2 mg/ ml Fibrinogen) gegossen. Die auspolymerisierten Gele wurden dann mit einer konstanten 4,5 ml Wassersäule permeiert.

- $n = 1$ mPas (Viskosität der Flüssigkeit (H₂O))
- $h = 1,6$ cm (Länge der Gelsäule)
- $F = 1,13$ cm² (Fläche auf die der Wasserdruck auftrifft)
- $t = 1$ s
- $p = 441\,000$ mPa (für 4,5 ml Wasserdruck)
- $f = 1,45 \times 10^{-3}$
- $C = 0,002$ g/ cm³ (Konzentration des Fibrinogens)
- $V_t = 2$ cm³ (gesamtes Gelvolumen)

Tab. 2: Physikalische und strukturelle Charakteristika von Fibringelen, die in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen HS polymerisiert worden sind.

HS (µg/ml)	Flußrate (cm ³ / s x 10 ³)	Darcy Konstante (r) (cm ² x 10 ⁸)	Massen-Längen- Verhältnis (Da/cm x 10 ¹³)	Ø Porendurch- messer (µm)
0	0,2	0,058	0,55	0,67
300	0,3	0,165	1,55	1,13
500	0,8	0,249	2,34	1,39
1000	1,3	0,432	4,07	1,83

Aus Tab. 2 wird der mathematisch ermittelte Zusammenhang zwischen der HS-Konzentration in einem Fibringel und der Porengröße bzw. der Faserdicke ersichtlich. Es ist eindeutig erkennbar, daß der durchschnittliche Porendurchmesser mit zunehmender HS-Konzentration stark ansteigt. Kontrollgele ohne HS-Zusatz besaßen eine durchschnittliche Porengröße von 0,67 µm während in Fibringelen mit 1000 µg/ ml HS eine Porengröße von 1,83 µm festgestellt werden konnte.

4.2.4 Kompaktion der Fibringele

Um die Stabilität der unterschiedlichen Fibringele zu untersuchen, wurde die Kollabierbarkeit der einzelnen Gele durch Zentrifugation getestet. In Abb. 7 ist der prozentuale Anteil der

4 Ergebnisse

Kompaktion verschiedener Fibringele, d.h. der Anteil des Überstandes am Gesamtvolumen, bei Bedingungen von 8000 g und 9 min dargestellt. Diese Abbildung verdeutlicht, daß sowohl steigende HS-Konzentrationen als auch sinkende pH-Werte die elastische Stabilität von Fibringelen erheblich herabsetzen.

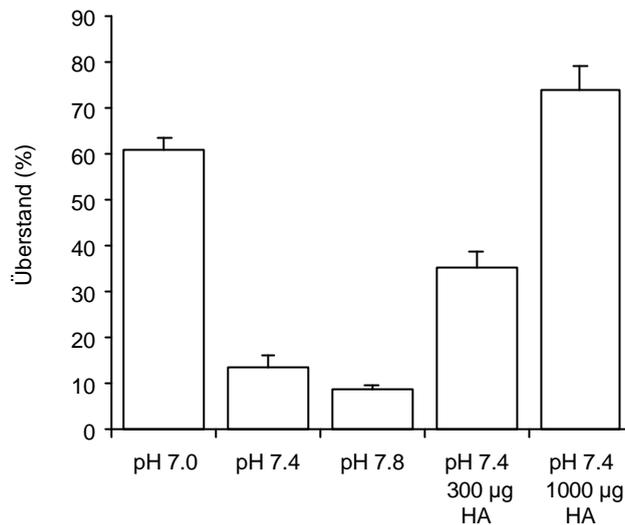


Abb. 7: Bestimmung der elastischen Stabilität von Fibringelen durch Kompaktion. Das Fibrinogen wurde bei verschiedenen pH-Werten oder HS-Konzentrationen polymerisiert. Die Gele wurden 9 min bei 8000 g zentrifugiert und das Volumen des eluierten Überstandes als Prozentanteil des initialen Gelvolumens ausgedrückt.

4.3 Der Einfluß der Fibrinstruktur auf die Migration von Glioblastomzellen

4.3.1 Modulation der Fibrinstruktur durch Variation des pH-Werts

Um direkte Effekte von HS auf die Migration von Tumorzellen auszuschließen und den eigentlichen Effekt der Fibrinstruktur zu untersuchen, wurden die Gele systematisch in Abwesenheit von HS aber bei unterschiedlichen pH-Werten polymerisiert. Glioblastomzellen wurden auf *Microcarriern* ausgesät und in die unterschiedlichen Fibrinstrukturen eingebettet. Um direkte pH-Effekte auszuschließen, wurden die Gele nach der Polymerisation zur Wiederherstellung eines physiologischen pH-Wertes gut in Medium äquilibriert und es wurden

4 Ergebnisse

die in 3.2.3.3 beschriebenen Kontrollen durchgeführt (Nehls & Herrmann, 1996). Die Zellmigration wurde wie unter 3.2.3.3 beschrieben quantifiziert.

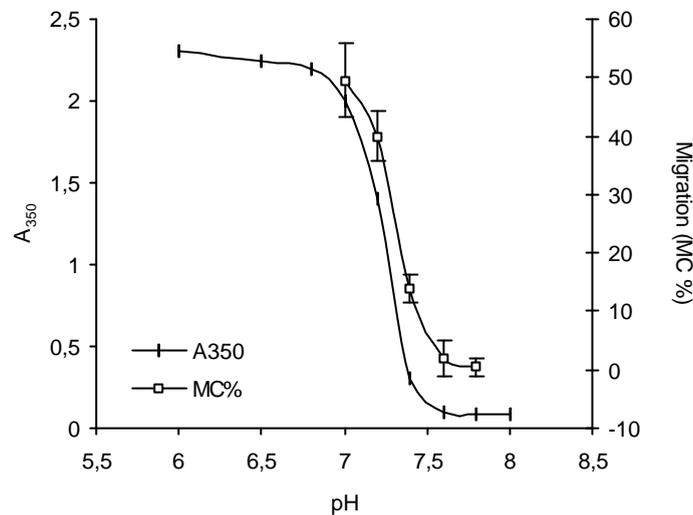


Abb. 8: Der Effekt der Fibrinstruktur auf die Migration von Glioblastomzellen. Die Fibringele wurden bei verschiedenen pH-Werten polymerisiert. Die Migration berechnete sich aus dem Prozentanteil an ‚positiven‘ Glioblastomzell-Microcarriern (MC%). Die Trübheit der Gele wurde photometrisch bei 350 nm gemessen.

In Abb. 8 ist die direkte Korrelation zwischen der optischen Dichte von Fibringelen in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Zellmigration in Abhängigkeit von den pH-modulierten Gelen dargestellt. Bei leicht sauren pH-Werten entstanden trübe poröse Gele, die die Glioblastomzellmigration stark stimuliert haben. Hingegen erschienen die Fibrinstrukturen bei pH 7,4 oder leicht basischem pH-Wert eher transparent und die Tumorzellen zeigten eine stark reduzierte Migration. Abb. 8 verdeutlicht, daß die Trübheit der Gele, als ein Marker der Faserstärke und des Porendurchmessers, eine gute Vorhersage auf die Zellmigration zuläßt. Sehr trübe Gele haben eine starke Migration von Glioblastomzellen von den *Microcarriern* in die umgebende Fibrinmatrix zur Folge während transparente Gele die Zellmigration eher inhibieren.

4.3.2 Modulation der Fibrinstruktur durch HS

HS bindet spezifisch an Fibrinogen und erhöht dadurch die optische Dichte der polymerisierten Fibrinstrukturen. Um den Zusammenhang zwischen der veränderten Fibrinstruktur durch ansteigende HS-Konzentrationen und der HS-vermittelten Migration zu verdeutlichen, ist in Abb. 9 die optische Dichte (A_{350}) der verschiedenen Fibringele mit der Glioblastomzellmigration in Abhängigkeit von der HS-Konzentration korreliert.

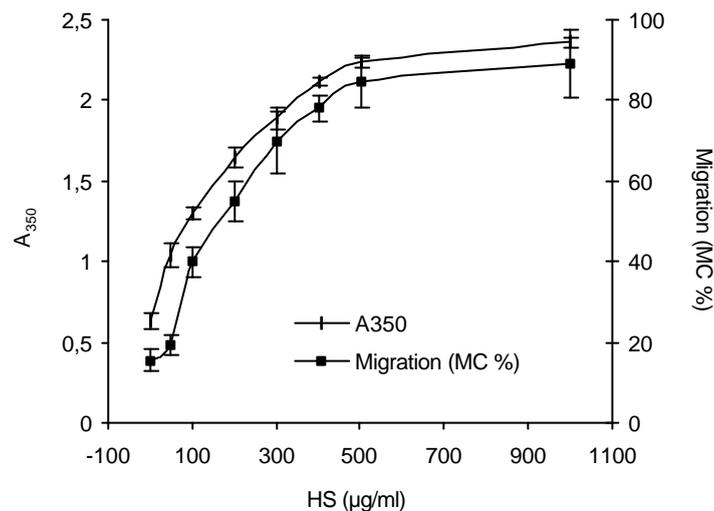


Abb. 9: Korrelation zwischen der O.D.₃₅₀ der HS-modulierten Fibrinstruktur und der Migration von Glioblastomzellen in den entsprechenden Fibringelen. Die Fibringele wurden mit unterschiedlichen HS-Konzentrationen polymerisiert. Die Migration berechnete sich aus dem Prozentanteil an ‚positiven‘ Glioblastomzell-Microcarriern (MC%). Die Trübheit der Gele wurde photometrisch bei 350 nm gemessen.

Es ist deutlich zu erkennen, daß die Stimulation der Tumorzellmigration stark mit dem HS-abhängigen Anstieg der O.D.₃₅₀ und somit der Fibrinfaserstärke und Porengröße des Fibrinnetzwerkes korrelierte. HS-Konzentrationen, die die Absorption der Fibringele nicht veränderten (1-10 µg/ml), hatten auch keinen Einfluß auf die dreidimensionale Zellmigration.

Um zu bestätigen, daß der Einfluß der HS auf die Polymerisation des Fibrinogens und die daraus resultierende Modulation der Fibrinstruktur der ausschlaggebende Faktor zur Stimulation der Zellmigration ist, wurden Gele, die in Anwesenheit von HS polymerisiert waren, mit Gelen, denen HS nach der Polymerisation zugefügt worden war, verglichen. Bei letzteren veränderte sich die Absorption bei Zugabe von HS auf die polymerisierten Gele nicht, d.h. die Fibrinstruktur selbst behielt die gleichen Eigenschaften wie ohne Zugabe von HS. Ein ver-

4 Ergebnisse

gleichendes Diagramm der Resultate (Abb.10) zeigt eine signifikante Stimulation der Migration in den mit HS polymerisierten Fibringelen. Hingegen war kein signifikant verändertes Migrationsverhalten der Zellen in den Gelen mit HS lediglich auf der Oberfläche zu erkennen. Es wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt, um auszuschließen, daß die ausbleibenden Effekte in letzteren Gelen nicht durch mangelnde Diffusion der HS in das Fibringel bedingt waren. Als erstes wurden ausgedehnte Fragmentierungen der HS durch Ultraschall vorgenommen. Sowohl diese fragmentierte HS als auch HS-Oligosaccharide hatten keinen signifikanten Effekt bei Zugabe auf schon polymerisierte Gele, während die Zugabe der fragmentierten HS vor der Polymerisation die übliche Stimulation der Migration auslöste. Weiterhin wurde die Dicke der Gele verringert, um die Diffusionsentfernungen zu verkürzen. Dies hatte auch keine Veränderung des Migrationsverhaltens zur Folge. Außerdem zeigte der bereits oben beschriebene Versuch des Vergleichs von Migration und O.D.₃₅₀ in Abhängigkeit von der HS-Konzentration, daß das Hinzufügen geringer HS-Konzentrationen (1-10 µg/ml) vor der Polymerisation weder einen Einfluß auf das Absorptionsverhalten noch auf die Zellmigration haben, so daß in der Tat von der O.D. des Fibringels auf die Migration geschlossen werden kann.

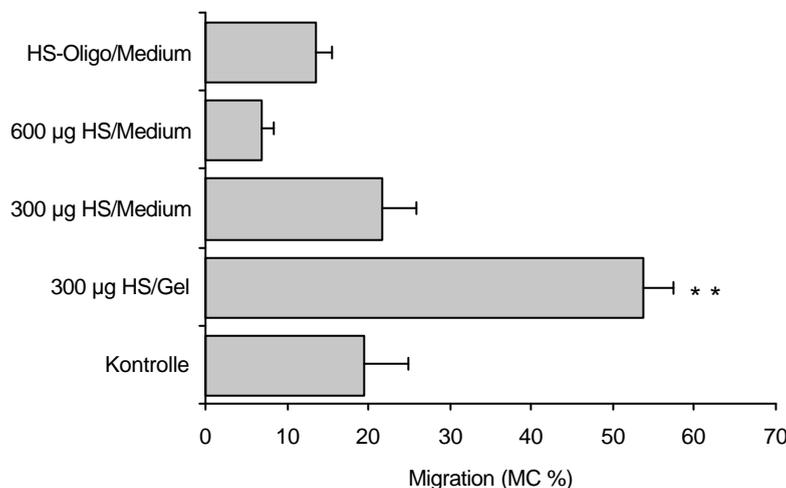


Abb.10: Stimulation der Zellmigration durch Interaktion der HS mit der Fibrinpolymerisation. HS (300 µg/ml) wurde fragmentiert und entweder vor (300 µg HS/Gel) oder nach (300 µg HS/Medium) der Polymerisation zu den Fibringelen gegeben. Vergleichend wurde ebenfalls eine höhere HS-Konzentration (600 µg HS/Medium) bzw. HS-Oligosaccharide in einer Konzentration von 50 µg/ml (HS-Oligo /Medium) an den Mediumüberstand bereits polymerisierter Gele gegeben. ** Signifikant verschieden von der Kontrolle ($P < 0,005$).

Weiterhin wurde die Diffusion der HS in die Gele überprüft, indem fluoreszenzmarkierte HS (FITC-HS) in dem Überstand über den bereits polymerisierten Gelen gelöst wurde und auf diese Weise in die Fibringele diffundieren konnte. Nach einer Inkubationszeit von 24 h (gemäß des Protokolls für die dreidimensionalen Migrationsversuche) wurde der Überstand abgesaugt und die Gele wurden gut mit PBS gespült, um Reste der FITC-HS, die nicht ins Gel diffundiert waren, zu entfernen. Anschließend wurden die Gele im Fluoreszenzmikroskop auf FITC-HS, die ins Gel diffundiert war, untersucht. Es stellte sich heraus, daß selbst die gut mit PBS gespülten Gele im Vergleich zur Kontrolle ohne FITC-HS stark fluoreszierten. Somit konnte geschlußfolgert werden, daß die Fibringele keine Diffusionsschranke für HS darstellten und dies die Ursache der mangelnden Stimulation der Glioblastozellmigration in den Gelen mit lediglich HS im Überstand war.

4.3.3 Einfluß funktionsblockierender Antikörper auf die HS-induzierte dreidimensionale Migration

In den vorhergehenden Absätzen deutete sich bereits an, daß der Einfluß der HS auf die Zellmigration kein direkter Effekt ist, sondern die Migration durch die Modulation der Fibrinstruktur beeinflusst wurde. Um diese Hypothese weiter zu bestätigen, wurden Versuche mit funktionsblockierenden Antikörpern gegen die Integrinuntereinheiten α_v und β_1 sowie gegen den HS-Rezeptor CD44 durchgeführt. Diese Tests sollten eine weitere Klärung bringen, inwieweit der HS-Effekt eventuell doch durch spezifische Antikörper gegen einen HS-Rezeptor zu inhibieren ist oder ob die beschriebene dreidimensionale HS-induzierte Migration eher von der Bindung an Integrine abhängt. Die HS-induzierte Zellmigration in Fibringelen wurde signifikant durch Antikörper gegen α_v - und β_1 -Integrine (1-10 $\mu\text{g/ml}$), das Adhäsionsblockierende Peptid Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (10 mM) und durch das Disintegrin Echistatin (250-500 nM) gehemmt. Hingegen waren Antikörper gegen (10-50 $\mu\text{g/ml}$) CD44 selbst in hohen Konzentrationen wirkungslos. Auch Antikörper gegen ICAM-1, welches bis vor kurzem auch als Rezeptor für HS angesehen wurde, konnten die durch HS verursachte migrationsstimulierende Wirkung in Fibringelen nicht aufheben (Abb.11).

4 Ergebnisse

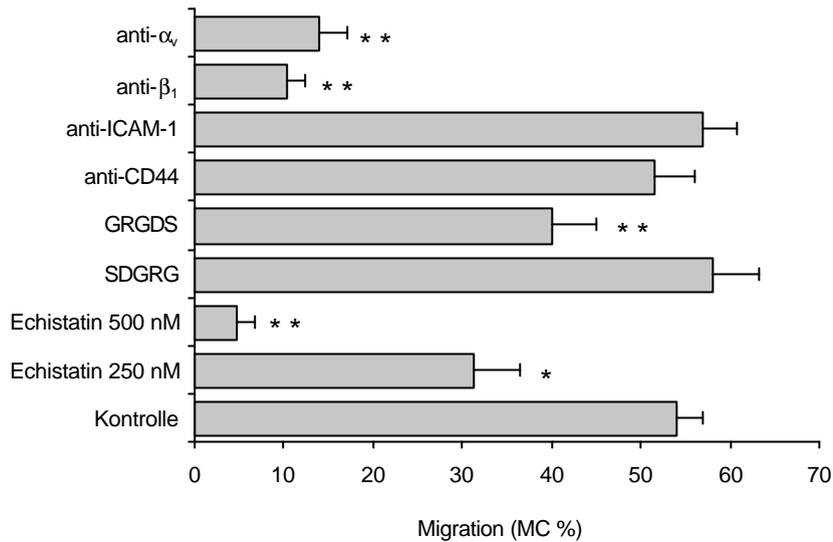


Abb.11: Wirkung verschiedener Antikörper und Peptide auf die HS-induzierte Zellmigration in Fibringelen. Die Migration wurde durch 300 $\mu\text{g/ml}$ HS, die vor der Polymerisation zur Fibrinogenlösung gegeben wurde, stimuliert (Kontrolle). GRGDS-Peptid (10 mM), Echistatin (250 und 500 nM), anti- β_1 -Integrin (10 $\mu\text{g/ml}$) und anti- α_v -Integrin (1 $\mu\text{g/ml}$) inhibierten die Migration von Glioblastomzellen signifikant. Anti-CD44 (10 $\mu\text{g/ml}$) und anti-ICAM-1 (10 $\mu\text{g/ml}$) hingegen inhibierten die Migration nicht. Die Sterne markieren die Werte, die signifikant unterschiedlich von der Kontrolle sind (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$).

4.3.4 Vergleich der zweidimensionalen Oberflächenmigration und der dreidimensionalen Migration

Die bisher erzielten Ergebnisse deuten stark darauf hin, daß die dreidimensionale Zellmigration zu einem großen Teil von der Porosität bzw. vom Porendurchmesser der umgebenden Matrix abhängt. Wenn diese Annahme zutreffen würde, könnte man daraus schließen, daß die Migration der Zellen in weniger porösen Gelen zwar gehemmt werden würde, die Zellen auf der Oberfläche der gleichen Gele jedoch normal migrieren müßten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die zufällige Migrationsgeschwindigkeit von Glioblastomzellen auf der Oberfläche von Fibringelen gemessen und mit der Migrationsgeschwindigkeit unter dreidimensionalen Bedingungen in den Gelen verglichen (Tab. 3). Die Fibringele wurden jeweils bei unterschiedlichen pH-Werten mit bzw. ohne HS polymerisiert. Bei der Oberflächenmigration traten keine signifikanten Unterschiede in der Migrationsgeschwindigkeit auf Fibringelen unterschiedlicher O.D.₃₅₀ und somit variabler Struktur auf.

4 Ergebnisse

Tab. 3: Vergleich der Migrationsgeschwindigkeiten von Glioblastomzellen auf der Oberfläche (2 D) und in (3 D) Fibringelen. Angegeben ist die Entfernung in μm , die die Zellen durchschnittlich in 24 h zurückgelegt haben.

Gelbedingungen	Migrationsgeschwindigkeit	
	2 D	3 D
pH 7,0	72,5 ($\mu\text{m}/ 24 \text{ h}$)	74,4 ($\mu\text{m}/ 24 \text{ h}$)
pH 7,8	77,3	14,8
pH 7,4 + HS (Überstand)	79,5	19,7
pH 7,4 + HS (Fibringel)	83	88,6

Poröse Fibringele wurden entweder unter sauren Bedingungen (pH 7,0) oder unter Zugabe von HS vor der Polymerisation (pH 7,4 + HS (Fibringel)) hergestellt. Kompakte Fibringele wurden entweder unter basischen Bedingungen (pH 7,8) oder in Abwesenheit von HS hergestellt. Bei letzteren wurde die HS dann an den Überstand der Fibringele gegeben (pH 7,4 + HS (Überstand)).

Die Migrationsgeschwindigkeit auf pH 7,0 Gelen betrug im Durchschnitt $72,5 \mu\text{m}/ 24 \text{ h}$ ($\pm 9,2$ St.abw.), während auf pH 7,8 Gelen die durchschnittliche Geschwindigkeit mit $77,3 \mu\text{m}/ 24 \text{ h}$ ($\pm 7,5$ St.abw.) nicht signifikant schneller war. Ähnliche Ergebnisse wurden in Gelen, die in Anwesenheit von HS polymerisiert waren, erzielt. Bei Fibringelen, die in Gegenwart von $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ HS polymerisiert worden waren, betrug die Oberflächenmigration $83,3 \mu\text{m}/ 24 \text{ h}$ ($\pm 11,3$ St.abw.). Auf Gelen, denen die HS erst nach der Polymerisation an den Überstand zugesetzt wurde, wanderten die Zellen $79,5 \mu\text{m}/ \text{h}$ ($\pm 5,7$ St.abw.), welches statistisch nicht signifikant unterschiedlich von der Oberflächenmigration auf HS-Fibringelen war. Unter dreidimensionalen Bedingungen hingegen korrelierten die Migrationsgeschwindigkeiten stark mit der Turbidität der Gele und somit mit der Porosität. Die Zellen migrierten mit $74,4 \mu\text{m}/ 24 \text{ h}$ ($\pm 4,8$ St.abw.) durch Gele, die bei pH 7,0 und mit $14,8 \mu\text{m}/ 24 \text{ h}$ ($\pm 9,2$ St.abw.) durch Gele, die bei pH 7,8 polymerisiert worden waren. Diese Resultate sind signifikant verschieden ($P < 0,001$). Mit $500 \mu\text{g}/ \text{ml}$ HS im Gel migrierten Glioblastomzellen mit einer Geschwindigkeit von $88,6 \mu\text{m}/ 24 \text{ h}$ ($\pm 13,7$ St.abw.) durch das Gel, während HS im Überstand lediglich eine Migration von $19,7 \mu\text{m}/ 24 \text{ h}$ ($\pm 2,5$ St.abw.) auslöste. Diese beiden Resultate sind signifikant verschieden voneinander ($P < 0,001$).

Diese Experimente lieferten eine weitere Bestätigung für die Hypothese, daß die Gelporosität ein sehr wichtiger Faktor bei der Zellmigration sein kann und daß HS die Migration durch die Modulation des Porendurchmessers in Fibringelen stimuliert.

Weitere Untersuchungen der Migrationsgeschwindigkeit zeigten, daß die Migration von Glioblastomzellen durch die Zugabe von anti- β_1 -Integrin signifikant gehemmt wurde, ein Effekt,

der durch anti-CD44 nicht erreicht werden konnte. Mit einer neuen Charge Glioblastomzellen wurde erneut die Migrationgeschwindigkeit in Fibringelen, die HS enthielten, bestimmt. Sie betrug $111 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ während die durchschnittliche Geschwindigkeit bei Zugabe von $1 \mu\text{g/ml}$ anti- β_1 -Integrin auf $46 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ sank, welches statistisch signifikant unterschiedlich war ($P < 0,05$). Hingegen konnte die Zellmigration nicht signifikant durch $10 \mu\text{g/ml}$ anti-CD44 inhibiert werden.

4.4 Zweidimensionale Zellmigration in Boydenkammern

Zum direkten Vergleich der Migration durch Fibrinogen mit der Migration durch HS wurden Versuche in Boydenkammern durchgeführt (Abb.12). Dafür wurden die Polycarbonatmembranen entsprechend mit Fibrinogen oder mit HS beschichtet und die Zellmigration durch diese unterschiedlich beschichteten Membranen wurde wie unter 3.2.3.1 beschrieben bestimmt. In Abb.12 ist deutlich zu erkennen, daß der Antikörper gegen CD44 unter diesen zweidimensionalen Bedingungen in der Lage war, die Zellmigration auf einer reinen HS-Matrix signifikant zu hemmen. Dieses Resultat wurde bestätigt durch vorhergehende Versuche mit dem gleichen Antikörper (Goebeler et al., 1996). Jedoch erschien HS selbst, wie in Abb.12 klar zu erkennen ist, in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen lediglich ein schwacher Stimulator der Zellmigration zu sein. Fibrinogen hingegen stimulierte die Migration von Glioblastomzellen durch die Polycarbonatmembranen sehr stark. Dieser Effekt konnte mit Antikörpern gegen β_1 -Integrin und α_v -Integrin, aber nicht mit anti-CD44 inhibiert werden. Die Migration durch HS wurde allerdings nicht ausschließlich mit anti-CD44 gehemmt, sondern es war ebenso möglich, diese HS-basierende Migration mit Antikörpern gegen β_1 -Integrin zu inhibieren. Da es zur Zeit keinen Beweis für eine HS-Bindung an Integrine gibt, ist es wahrscheinlich, daß das letztere durch einen indirekten Effekt bedingt ist. Zum Beispiel wäre eine unspezifische sterische Inhibition der Zelladhäsion an die HS-Matrix denkbar, durch die folglich auch die Migration eingeschränkt werden würde.

4 Ergebnisse

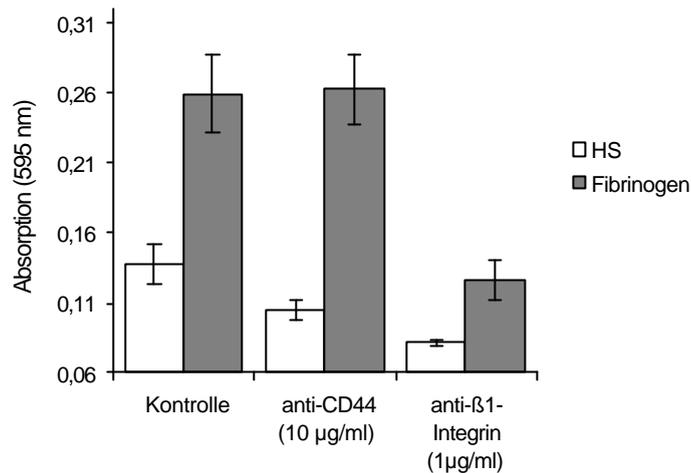


Abb.12: Zweidimensionale Zellmigration durch Fibrinogen- bzw. HS-beschichtete poröse Membranen in Boydenkammern. Hier hemmt der Antikörper gegen CD44 die HS-stimulierte Migration statistisch signifikant ($P < 0,05$), die Migration auf Fibrinogen jedoch nicht. Beschichtung der Membranen mit HS (5 mg/ml) oder Fibrinogen (2 mg/ml).

Die wesentliche Aussage, die aus diesen Boydenkammerversuchen resultierte, besteht zum einen darin, daß Fibrinogen als direkter Stimulator der Zellmigration eindeutig wirksamer ist als HS. Zweitens unterstützen die hier erzielten Daten die Annahme, daß die HS-Stimulation der dreidimensionalen Migration von Glioblastomzellen ein indirekter Effekt ist und durch die Modulation der Fibrinstruktur bedingt ist.

4.5 Modulation der Fibrinstruktur durch Dextran

Es ist bereits mehrfach publiziert, daß Dextran und andere Makromoleküle in der Lage sind, die Fibrinpolymerisation so zu beeinflussen, daß eine Fibrinstruktur mit dickeren Fasern und größeren Poren entsteht (Carr and Gabriel, 1980). Der Vergleich mit der Migration durch HS-modulierte Fibringele war insofern interessant, als Dextran ein Polysaccharid ist, welches nicht im Organismus vorkommt und für das auch keine zellulären Rezeptoren existieren. Wenn Dextran trotz dieser Tatsachen die Zellmigration alleine durch Modulation der Fibrinstruktur verändern könnte, wäre dies ein weiterer Hinweis auf die indirekte Wirkung der HS auf die Migration in Fibringelen.

Aus diesem Grund wurden ebenfalls Migrationsversuche, wie zuvor mit HS, nun mit Dextran durchgeführt. Das Polysaccharid wurde vor der Polymerisation zur Fibrinogenlösung ge-

4 Ergebnisse

ben, um später die Zellmigration in den modulierten Fibringelen mit der Absorption der entsprechenden Fibrinstrukturen zu korrelieren (Abb.13).

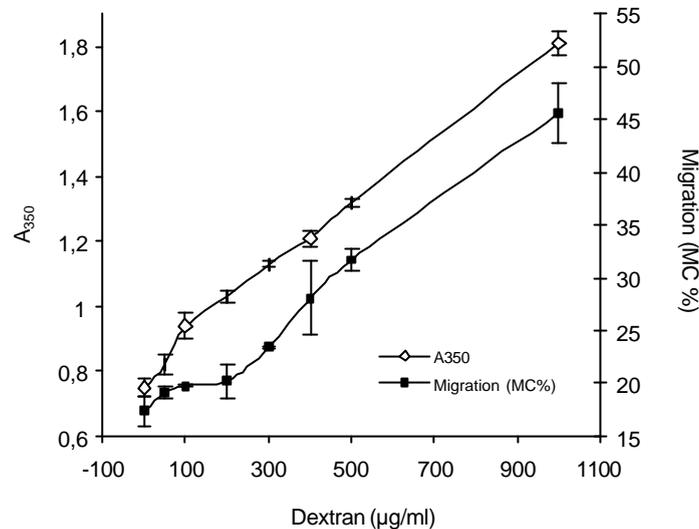


Abb.13: Der Effekt von Dextran auf die Fibrinstruktur und auf die dreidimensionale Glioblastomzellmigration. Das Dextran (1-1000µg/ml) wurde ebenso wie die zellbedeckten *Microcarrier* vor der Polymerisation der Gele zugegeben. Die Zellmigration wurde als Prozentanteil der ‚positiven‘ *Carrier* (MC%) quantifiziert und mit der O.D. (A_{350}) korreliert.

Ähnlich wie HS resultierten steigende Konzentrationen Dextran in ansteigenden A_{350} -Werten und führten parallel auch zu einer Stimulation der Zellmigration. Dieses Experiment führte zu einer weiteren Bestätigung der Hypothese, daß Makromoleküle die Zellmigration über indirekte Effekte, für die keine Rezeptorbindung notwendig ist, stimulieren können.

4.6 Bestimmung der intrazellulären HS

4.6.1 Färbung der HS unter variablen Bedingungen

Abb.14 zeigt verschiedene Färbungen der intrazellulären HS in Glioblastomzellen. Bei einer Permeabilisierung der Zellen nach der PFA-Fixierung läßt die rote AEC-Färbung deutlich erkennen, daß die endogene HS vorwiegend perinukleär am Zytoskelett und z. T. auch im Zellkern auftritt, während in der Zellperipherie und direkt an der Zellmembran kein Signal zu erkennen ist. Ohne Permeabilisierung der Zellen erfolgte nur eine schwache diffuse AEC-

4 Ergebnisse

Färbung an der Zelloberfläche, so daß daraus zu schließen ist, daß die in permeabilisierten Zellen angefarbte HS tatsächlich im Zellinneren lokalisiert ist.

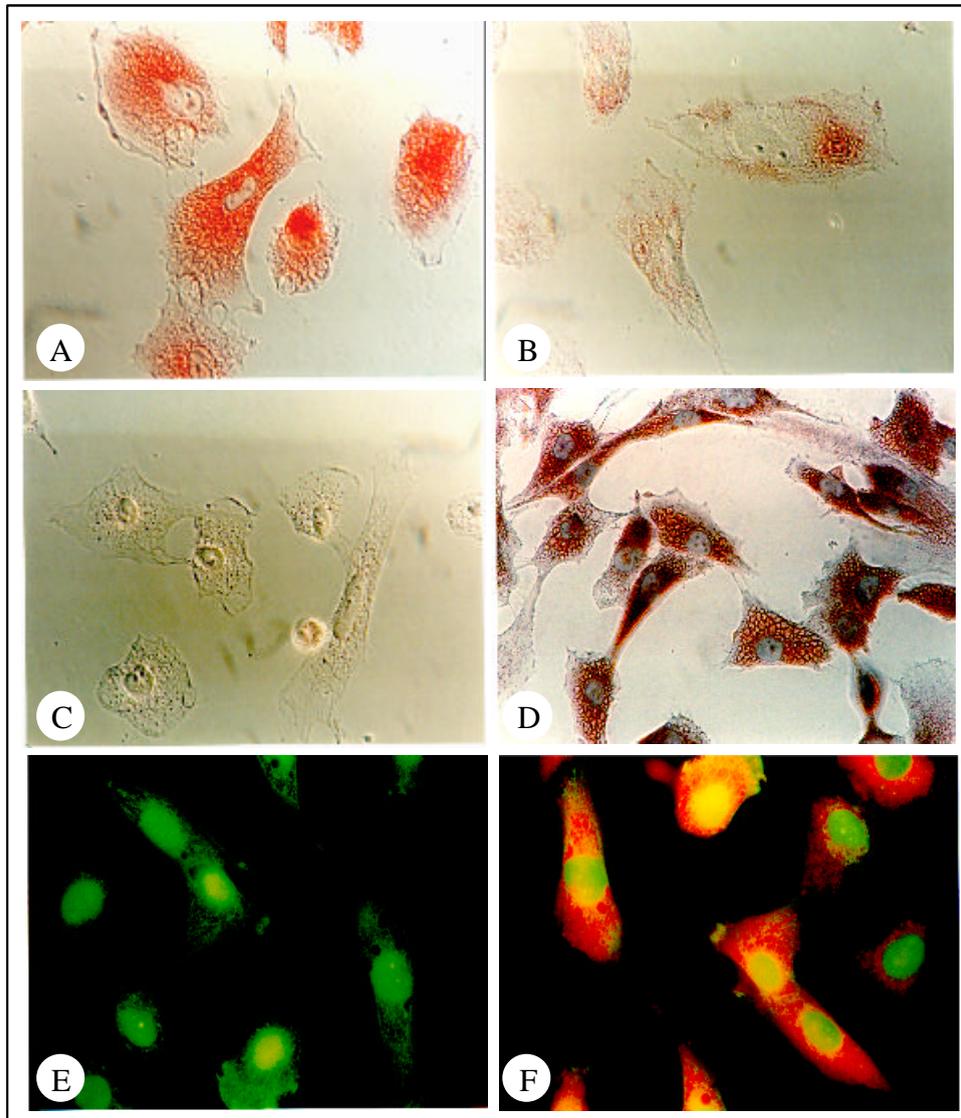


Abb.14: Histochemischer Nachweis von intra- und extrazellulärer HS durch β -PG unter Verwendung verschiedener Färbemethoden. A) AEC-Färbung von endogener HS nach PFA-Fixierung und Triton-Permeabilisierung; B) AEC-Färbung von HS nach PFA-Fixierung ohne Triton-Permeabilisierung; C) AEC-Färbung von endogener HS nach PFA-Fixierung und Triton-Permeabilisierung bei Präinkubation von β -PG mit einem Überschuß an HS; D) AEC-Färbung von endogener HS nach PFA-Fixierung und Triton-Permeabilisierung und exogen eingeschleuste HS (DAB-gefärbt); E) exogene HS-FITC in permeabilisierten Zellen; F) Texas-Red-Färbung von endogener HS nach PFA-Fixierung und Triton-Permeabilisierung und exogen eingeschleuste FITC-HS.

Um weitere eventuell vorhandene intrazelluläre Bindungsstellen für HS zu detektieren, wurde zusätzlich exogene HS mit den Zellen inkubiert. Dafür wurde entweder fluoreszenzmarkierte

4 Ergebnisse

HS (FITC-HS) verwendet oder die exogene HS wurde anschließend in den Zellen mit einer von AEC verschiedenen Färbemethode (DAB) nachgewiesen, um eventuelle Bindungsunterschiede zwischen endogen vorhandener und exogen zugeführter HS aufzuzeigen. Bei diesen Doppelfärbungen wurden besonders im Bereich des Nukleus Unterschiede sichtbar. Die exogen zugeführte HS schien neben gemeinsamen Bindungsstellen mit der endogenen HS im Zytoplasma bzw. am Zytoskelett auch gehäuft im Zellkern zu binden, da hier die blau-braune Färbung der DAB-gefärbten exogenen HS deutlich überwog. Diese Beobachtung konnte mit FITC-HS bestätigt werden. Nach der Zugabe von fluoreszenz-markierter HS auf PFA-fixierte und Triton-permeabilisierte Glioblastomzellen trat in den Zellkernen das deutlichste Signal auf.

Die spezifische Bindung von b-PG an HS wurde durch folgende Kontrollen bestätigt: Die HS-bindenden Proteoglykanfragmente b-PG wurden mit einem Überschuß an HS für 30 min präinkubiert, bevor sie auf die fixierten Zellen gegeben wurden. Der sich daran anschließende Nachweis des gebundenen b-PGs mit Streptavidin-HRP und einer AEC-Färbung verlief negativ. Eine weitere Kontrolle bestand darin, eine eventuelle unspezifische Färbung des Streptavidin-HRPs nachzuweisen, in dem der erste Schritt der b-PG-Inkubation ausgelassen und sofort mit Streptavidin inkubiert wurde. Auch hier fiel das Ergebnis negativ aus, d.h. sowohl bei Präinkubation des b-PGs mit HS als auch bei ausschließlicher Inkubation mit Streptavidin-HRP trat kein rotes AEC-Signal in den Zellen auf, so daß die durchgeführten HS-Färbungen als spezifisch angesehen werden können.

4.6.2 Spektrometrische Bestimmung und Lokalisation der intrazellulären HS

Für eine weitere Analyse der zellulären Kompartimentierung von HS wurde, wie unter 3.2.9 beschrieben, eine subzelluläre Fraktionierung von Glioblastomzellen durchgeführt. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, ob die endogene HS membrangebunden oder frei im Zytoplasma verteilt ist. Deshalb wurden die jeweiligen Fraktionen auf ihre LDH- und β -Galaktosidase-Aktivität getestet, um zu überprüfen, inwieweit Kern-, Zytosol- und Membrananteile bei der Fraktionierung wirklich voneinander getrennt wurden. Bei den Messungen zeigte sich, daß die LDH-Aktivität in der Zytosolfraktion höher war als in der Membranfrak-

4 Ergebnisse

tion, während die Bestimmung der β -Galaktosidase ein umgekehrtes Resultat lieferte (Tab. 4). Hingegen ergaben beide Enzymbestimmungen in der Kernfraktion relativ hohe Werte.

Tab. 4: Vergleich der LDH- und β -Galaktosidase-Aktivitäten mit den gemessenen HS-Werten in den verschiedenen Glioblastomzellfraktionen. Die Proben wurden für die LDH-Messungen 1:100, für die β -Galaktosidase-Messungen 1:10 verdünnt. Die Enzymaktivitäten konnten hier als Abnahme der Absorption/ min (LDH) bzw. als relative Fluoreszenzeinheiten dargestellt werden.

Zellfraktion	LDH-Aktivität (Abnahme der Absorption bei 340 nm/ min.)	β -Galaktosidase-Aktivität (rel. Fluoreszenz bei 448 nm)	HS-Bestimmung (Absorption bei 650 nm)
Kontrolle (H ₂ O _{dest})	0,0001 ± 0,0000	117 ± 11,2	0,026 ± 0,002
Zytoplasma	0,0044 ± 0,0011	194 ± 58,1	0,048 ± 0,008
Membran	0,0012 ± 0,0002	987 ± 47,2	0,088 ± 0,019
Kern	0,0045 ± 0,0002	> 1000	0,116 ± 0,016

Wie aus Tab. 4 zu entnehmen ist, traten in den Zytosol- und Membranfraktionen die zu erwartenden Unterschiede in den Enzymaktivitäten auf. Im Zytosol konnte der für diese Fraktion spezifische Marker, die LDH-Aktivität, nachgewiesen werden. Hingegen zeigte der spezifische Marker für die Membranfraktion - die β -Galaktosidase - gesteigerte Aktivität im Membrananteil. Die gesteigerte Aktivität beider Enzyme in der isolierten Kernfraktion kann durch die schonende Lyse der Zellen in dem Puffer ohne Detergenz bedingt sein. Allerdings zeigte sich bei dem Einsatz von Lysispuffer mit Triton X-100 oder eines stärker hypotonen Puffers von Beginn der Fraktionierung an ein starker Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivität auch in der Zytosolfraction (Tab. 5) bei gleichbleibender LDH-Aktivität. Es war auf diese Weise nicht möglich, die Membran eindeutig vom Zytosol zu trennen und somit später aus den spektrometrischen HS-Bestimmungen zu schließen, in welcher Fraktion sich die endogene HS befindet.

Die spektrometrischen Bestimmungen der HS in den einzelnen Fraktionen korrelierten eindeutig mit der jeweilig gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität (Tab. 4), was daraufhin deutet, daß die HS nicht frei im Zytosol vorkommt, sondern gebunden vorliegt. Dies wird auch gestützt durch die in Tab. 5 gezeigten Ergebnisse, die aus einer Zellyse mit Triton X-100-Zusatz hervorgebracht wurden. In diesen Fällen zeigte auch die Zytosolfraction sowohl höhere β -

4 Ergebnisse

Galaktosidase- als auch HS-Werte. Da die HS-Werte in der Kernfraktion am höchsten waren, könnte auch eine Bindung der HS an das Zytoskelett in Frage kommen.

Diese Hypothese wird auch gestützt von Versuchen, in denen die Glioblastomzellen vor der Lyse mit 1 µg/ ml Nocodazol, welches ein synthetischer Mikrotubuli-Inhibitor ist, inkubiert worden waren (Tab. 5). Bei der Präinkubation der Zellen mit Nocodazol, konnten in den Zytoplasmaextrakten auch bei schonender Lyse ohne Triton X-100 höhere HS-Werte gemessen werden, während die β-Galaktosidase-Werte nicht sehr stark anstiegen.

Tab. 5: Vergleich der LDH- und β-Galaktosidase-Aktivitäten mit den gemessenen HS-Werten in unterschiedlich gewonnenen Zytoplasmaextrakten von Glioblastomzellen. 1. schonende Lyse wie in Tab. 4; 2. Zellen wurden in Lysispuffer mit 1% Triton X-100 extrahiert; 3. Zellen wurden vor der Lyse mit 1µg/ml Nocodazol vorbehandelt und dann in Lysispuffer ohne Triton extrahiert; 4. Zellen wurden mit Nocodazol vorbehandelt und Lysispuffer mit Triton verwendet. Die Proben wurden für die LDH-Messungen 1:100, für die β-Galaktosidase-Messungen 1:10 verdünnt. Die Enzymaktivitäten konnten als Abnahme der Absorption/ min (LDH) bzw. als relative Fluoreszenzeinheiten dargestellt werden.

Zytoplasma- extrakte	LDH-Aktivität (Abnahme der Absorption bei 340 nm/ min.)	β-Galaktosidase-Aktivität (rel. Fluoreszenz bei 448 nm)	HS-Bestimmung (Absorption bei 650 nm)
Kontrolle (H ₂ O _{dest})	0,0003 ± 0,0000	210,9 ± 19,4	0,013 ± 0,005
1	0,0045 ± 0,0009	226,7 ± 38,0	0,028 ± 0,005
2	0,0059 ± 0,0002	> 1000	0,093 ± 0,021
3	0,0084 ± 0,0011	435,7 ± 21,6	0,099 ± 0,007
4	0,0106 ± 0,0013	> 1000	0,158 ± 0,016

Um den HS-Gehalt der Zellen quantitativ zu bestimmen, wurden mit Glioblastomzellen konfluente Ø 10 cm Schalen mit Trypsin/ EDTA abgelöst und anschließend wurde im *Zellcounter* die Zellzahl und daraus resultierend das Volumen der einzelnen Zellen bestimmt. Die ebenfalls bestimmten HS-Mengen konnten nun auf die Zellzahl bzw. das Volumen zurückgerechnet werden. Daraus ergab sich für die Glioblastomzellen eine intrazelluläre HS-Gesamtkonzentration von durchschnittlich 3 pg/ Zelle bei einem Zellvolumen von 2300 fl. Der rein zytosolische Anteil, d. h. der Anteil an HS, der durch eine schonende Lyse in der zytosolischen Zellfraktion erschien, betrug lediglich 0,5 pg/ Zelle (≅ 200 µg/ ml Zytosol).

4.7 Einfluß der endogenen HS auf die Aktinpolymerisation

Um mögliche intrazelluläre Einflüsse der HS auf die Zellmigration weiter zu untersuchen, wurden Veränderungen der Aktinpolymerisation durch Zugabe von HS analysiert. Denn aufgrund der zuvor festgestellten Tatsache, daß HS in der Lage ist, die Polymerisation von Fibrinogen zu beeinflussen, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß das Makromolekül auf eine ähnliche Weise auch mit der Aktinpolymerisation und somit mit der Zellmigration interagieren kann. Ein weiteres Motiv, diese Experimente durchzuführen, bestand in der Tatsache, daß für Makromoleküle wie Dextran oder Polyethylenglykol bereits ein polymerisationsstimulierender Einfluß auf Aktin nachgewiesen wurde, der mit einem *macro-molecular crowding*-Effekt erklärt wurde (Drenckhahn & Pollard, 1986; Lindner & Ralston, 1997).

Für die Versuche wurde Schweinemuskelaktin präpariert und die reaktive Sulfhydrylgruppe am Cys-374 des F-Aktins fluoreszenzmarkiert (s. 3.2.12). Die Polymerisation des wieder depolymerisierten G-Aktins wurde dann mit KCl und $MgCl_2$ ausgelöst und im Spektrofluorometer verfolgt.

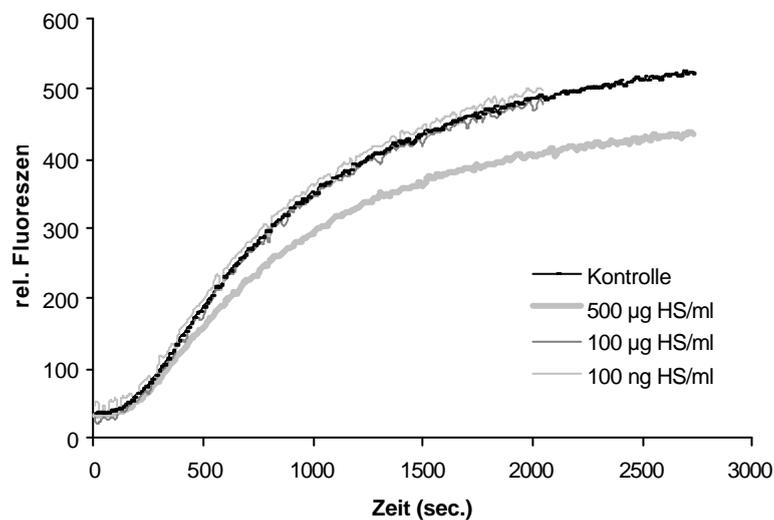


Abb.15: Zeitlicher Verlauf der Aktinpolymerisation mit und ohne HS-Zusatz. HS: 500 µg, 100 µg und 100 ng HS/ ml in GPuffer gelöst. HS ab einer Konzentration von 500 µg/ml inhibiert die Polymerisation des Aktins.

4 Ergebnisse

In Abb.15 ist der zeitliche Verlauf der Polymerisation von Aktin mit und ohne Zugabe von HS dargestellt. Die Versuche und Parallelen wurden jeweils an einem Tag durchgeführt, um Schwankungen bedingt durch das sehr empfindliche Pyren-Aktin auszuschließen. Eine signifikante Modulation der Aktinpolymerisation ist jedoch erst bei einer Konzentration von 500 μg HS/ml zu erkennen. HS wirkt in dieser Konzentration jedoch inhibierend und nicht, wie bereits von anderen Makromolekülen publiziert, stimulierend auf die Polymerisation.

TEIL II: Direktionale Migration von Tumorzellen zu Endothelzellen

4.8 Checkerboard Migrationsversuche

Um die chemotaktischen und chemokinetischen Eigenschaften von Endothelzell-konditioniertem Medium auf Tumorzellen zu testen, wurden *Checkerboard* Migrationsversuche durchgeführt. Es wurde zusätzlich zu Schweine-Endothelzell-konditioniertem Medium Medium von humanen Endothelzellen getestet, um auszuschließen, daß die Tumorzellen unterschiedlich auf die von den verschiedenen Spezies sezernierten Substanzen reagieren. In den folgenden Tabellen wird deutlich, daß das konditionierte Medium sowohl von PAEC als auch von HUVEC stark chemotaktisch auf Melanomzellen und Glioblastomzellen wirkte (Tab. 6-9). Die Migrationsrate der beiden Tumorzelllinien war am höchsten, wenn ein starker Konzentrationsgradient an konditioniertem Endothelzell-Medium von der oberen zur unteren Kammer aufgebaut wurde. Bei Ausgleichung des Konzentrationsunterschiedes zwischen den *Transwell*kammern, d.h. gleichzeitiger Zugabe von konditioniertem Medium an die obere Kammer, wurde die Migration wieder signifikant reduziert.

Tab. 6: Checkerboard-Analyse der MV3-Melanomzellmigration auf verschiedene Prozentanteile konditioniertes PAEC-Medium. In den oberen Kammern der *Transwelleinsätze* wurden 5×10^4 MV3- Zellen ausgesät und die, die nach 6 h durch die poröse Membran gewanderten Zellen wurden ausgewertet. Die Daten sind Mittelwerte von vier verschiedenen Experimenten (* $P < 0,05$).

Untere Kammer ↓	Obere Kammer		
	0%	10%	100%
0%	0,580*	0,523	0,550
10%	1,117	0,598	0,607
100%	1,091*	0,827	0,794

Es ist deutlich sichtbar, daß die Tumorzellmigration am stärksten stimuliert wird, wenn das PAEC-Medium nur in der unteren Kammer vorhanden ist. Die Migration wird inhibiert durch die Zugabe von PAEC-Medium auch an die obere Kammer. Diese Resultate deuten auf eine starke Chemotaxis von MV3-Zellen auf PAEC-Medium hin.

4 Ergebnisse

Tab. 7: Checkerboard-Analyse der MV3-Melanomzellmigration auf verschiedene Prozentanteile konditioniertes HUVEC-Medium. Die Daten sind Mittelwerte von fünf verschiedenen Experimenten (* P< 0,05).

Untere Kammer ↓	Obere Kammer		
	0%	10%	100%
0%	1,024*	0,728	0,563
10%	1,198	0,698	0,593
100%	1,345*	0,911	0,846

Die Reaktion von MV3-Zellen auf HUVEC-Medium ist ebenfalls chemotaktisch. Die Migration ist am stärksten bei Zugabe von HUVEC-Medium lediglich an die untere Kammer, während die gleichzeitige Zugabe des konditionierten Mediums an die obere Kammer die Migrationsstimulation z.T. wieder aufhebt.

Tab. 8: Checkerboard-Analyse der U138-MG Glioblastomzellmigration auf verschiedene Prozentanteile konditioniertes PAEC-Medium. Die Daten wurden aus drei voneinander unabhängigen Experimenten gewonnen (*P<0,05).

Untere Kammer ↓	Obere Kammer		
	0%	10%	100%
0%	0,501*	0,384	0,431
10%	1,060	0,660	0,526
100%	1,328*	1,026	0,645

Diese Tab. deutet auch für die Glioblastomzellen auf eine chemotaktische Anziehung des PAEC-Mediums hin, da auch hier die stärkste Migrationsstimulation bei ausschließlicher Zugabe des konditionierten Mediums an die untere Kammer festgestellt wurde.

Die Migration der Glioblastomzellen als Reaktion auf HUVEC-konditioniertes Medium wurde am stärksten bei Zugabe des Mediums lediglich an die untere Kammer stimuliert. Bei gleichzeitiger Zugabe des Mediums an die obere Kammer konnte die Migrationsstimulation wieder aufgehoben werden. Auch hier liegt somit Chemotaxis vor (Tab. 9).

4 Ergebnisse

Tab. 9: Checkerboard-Analyse der U138-MG Glioblastomzellmigration auf verschiedene Prozentanteile konditioniertes HUVEC-Medium. Die Daten entstanden in sechs verschiedenen Experimenten (*P<0,05).

Untere Kammer ↓	<u>Obere Kammer</u>		
	0%	10%	100%
0%	1,412*	1,257	1,162
10%	1,560	1,282	1,288
100%	1,603*	1,510	1,355

Im Gegensatz zu den *Checkerboard*-Versuchen mit PAEC- bzw. HUVEC-konditioniertem Medium ergaben die Ansätze mit konditioniertem Medium der humanen mikrovaskulären Endothelzelllinie HMEC-1 eine chemokinetische Attraktion sowohl der MV3- als auch der Glioblastomzellen (Tab.10-11). In beiden Fällen wurde die Migration der Tumorzellen am stärksten stimuliert, wenn gleiche Konzentrationen konditioniertes Endothelzell-Medium sowohl an die untere als auch an die obere Kammer gegeben wurden. Das bedeutet, die HMEC-1- Zellen sezernieren offensichtlich nicht den eigentlichen chemotaktischen Faktor, der sowohl von PAEC als auch von HUVEC ins extrazelluläre Millieu abgegeben wird und die Tumorzellen chemotaktisch anzieht, sondern lediglich Faktoren, die die allgemeine zufällige Migration der Tumorzellen stimulieren.

Tab.10: Checkerboard-Analyse der MV3-Melanomzellmigration auf verschiedene Prozentanteile konditioniertes HMEC-1-Medium.

Untere Kammer ↓	<u>Obere Kammer</u>		
	0%	10%	100%
0%	0,593	0,768	1,017
10%	0,683	0,744	1,003
100%	0,865	0,936	1,075

4 Ergebnisse

Es ist deutlich zu erkennen, daß die Migration als Reaktion auf HMEC-1-konditioniertes Medium am stärksten bei Zugabe des HMEC-1-Mediums sowohl an die untere als auch an die obere Kammer ist. Das bedeutet, es ist hier keine Chemotaxis sondern Chemokinese vorhanden.

Tab.11: Checkerboard-Analyse der U138-MG Glioblastomzellmigration auf verschiedene Prozentanteile konditioniertes HMEC-1-Medium.

Untere Kammer ↓	<u>Obere Kammer</u>		
	0%	10%	100%
0%	0,882	1,034	1,352
10%	1,074	1,134	1,182
100%	1,389	1,551	1,613

Es ist klar erkennbar, daß die Glioblastomzellmigration als Reaktion auf HMEC-1-konditioniertes Medium am stärksten bei Zugabe des HMEC-1-Mediums sowohl an die untere als auch an die obere Kammer ist. Das bedeutet, es ist auch hier keine Chemotaxis sondern Chemokinese vorhanden.

4.9 Direktionale Migration von Tumorzellen in Fibringelen

Für die Quantifizierung der direktionalen Migration von Tumorzellen in dreidimensionalen Fibringelen wurde der Prozentanteil der mit lebendigen ungefärbten Endothelzellen bedeckten *Microcarrier* gewertet, der nach vier bis fünf Tagen von Tumorzellen erreicht worden war. Diese Werte wurden mit der Zufallsmigration der Tumorzellen auf devitalisierte Endothelzellcarrier verglichen. Die drei verschiedenen *Microcarrier*arten, die jeweils zusammen in ein Fibringel eingebettet wurden, konnten leicht durch unterschiedliche Leuchteffekte im Fluoreszenzlicht unterschieden werden: die grüne Autofluoreszenz der Glutaraldehyd-behandelten *Carrier*, die rote DiI-Fluoreszenz der lebend gefärbten *Carrier* und die nicht fluoreszierenden *Carrier*, die als jeweiliges Ziel für die migrierenden Tumorzellen fungierten.

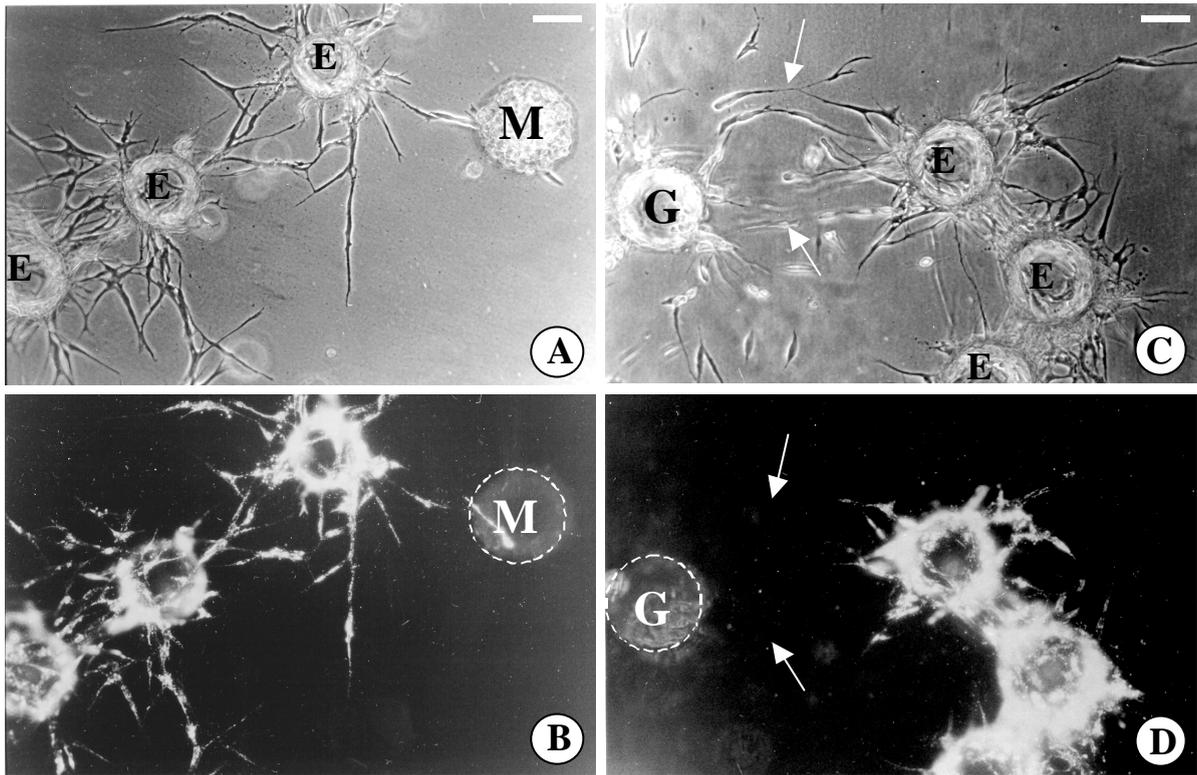


Abb.16: Repräsentative Kokultur von Tumorzellen und PAEC (DiI markiert) 5 Tage nach der Polymerisation des Fibringels. A und C zeigen Phasen-Kontrast-Aufnahmen, B und D die jeweils korrespondierenden DiI-Fluoreszenzen. Ein direktionales Wachstum der PAEC von den *Carriern* (E) zu Melanom (M)- bzw. Glioblastom (G)zellcarrier ist nicht erkennbar. Hingegen ist eine Migration von den nicht DiI-markierten Tumorzellen zu PAEC-Carriern detektierbar (Pfeile in C u. D). Balken = 100 μ m

Abb.16 zeigt zwei Beispiele von Kokulturen in Fibringelen. Es wurden jedoch hier die Endothelzellen DiI-markiert, während die Tumorzellen ungefärbt blieben. Durch diese Fluoreszenzmarkierung ist deutlich zu erkennen, daß sowohl um die Melanom- als auch um die Glioblastomzellcarrier ein Hof bleibt, in den die Endothelzellen nicht einwandern. Hingegen ist besonders anhand der Glioblastomzellen zu erkennen, daß die Tumorzellen sehr wohl in Richtung der PAEC-Carrier migrieren.

Die dreidimensionalen Kokulturversuche in Fibringelen bestätigten die *Checkerboard*-Analysen hinsichtlich des stark gerichteten Migrationsverhaltens. 30,5% der Melanomzellen kontaktierten lebende Endothelzellcarrier während lediglich 8,1% die devitalisierten Endothelzellen erreichten. Dieser signifikante Unterschied zeigt eine klare chemoattraktive Tendenz der Melanomzellen zu vitalen Schweineendothelzellen. Ebenso migrierten auch die Glioblastomzellen vorwiegend zu den vitalen Schweineendothelzellen (Abb.17 A).

4 Ergebnisse

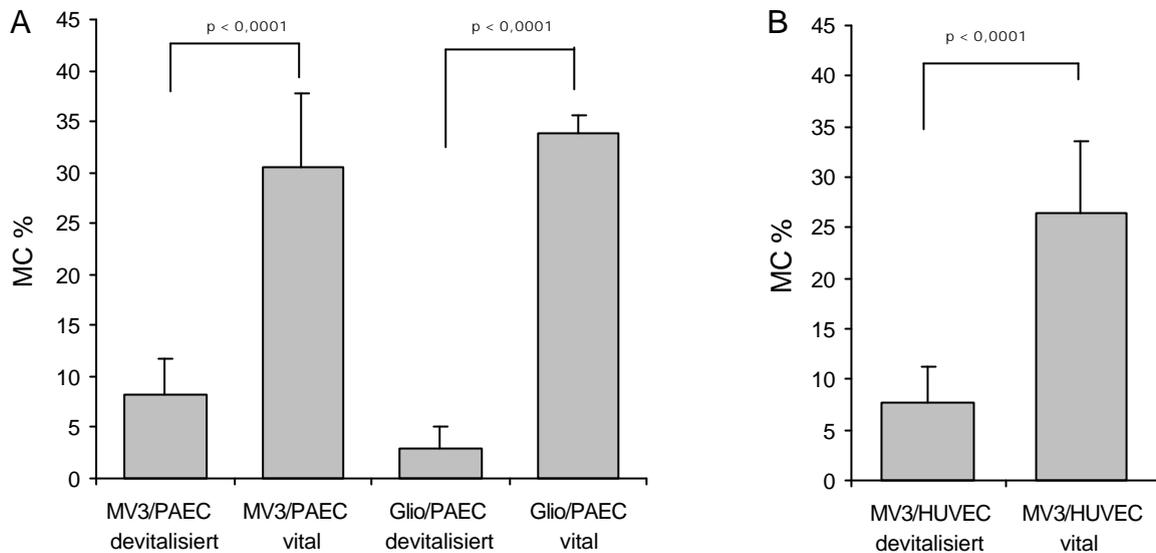


Abb.17: Quantifizierung der direktionalen Tumorzellmigration in Fibringelen. Die Säulen zeigen den Prozentanteil an *Microcarriern* (MC%) mit ungefärbten Endothelzellen, die von migrierenden Tumorzellen erreicht worden sind. Die Zufallsmigration wird durch devitalisierte Endothelzellcarrier dargestellt, während die vitalen Endothelzellcarrier zur Bestimmung der direktionalen Migration fungierten. In A ist das Migrationsverhalten von Melanom- und Glioblastomzellen auf PAEC dargestellt, B zeigt die Bestätigung dieses Verhaltens von Melanomzellen auch in Bezug auf HUVEC. Es ist in den Grafiken deutlich zu erkennen, daß von den vitalen Endothelzellen eine signifikant stärkere Anziehung auf die Tumorzellen ausgeübt wird als von den devitalisierten, so daß die direktionale Migration beider Tumorzellarten die Zufallsmigration deutlich übersteigt.

Vergleichende Experimente wurden mit HUVECs durchgeführt (Abb.17 B), um die chemotaktische Aktivität humaner Zellen auf die Migration von Tumorzellen in Fibringelen zu untersuchen. Es wurden auch hier lediglich 7,8% der devitalisierten HUVEC-Carrier von MV3-Zellen erreicht, verglichen mit 26,4% von vitalen HUVEC-Carriern.

Somit scheint die endotheliale Sekretion chemotaktisch aktiver Moleküle für Tumorzellen nicht nur ein zweidimensionales Phänomen zu sein, sondern konnte auch im dreidimensionalen Fibringelsystem nachgewiesen werden.

4.10 Auftrennung des konditionierten EZ-Mediums und Nachweis der noch vorhandenen chemotaktischen Aktivität

Das konditionierte EZ-Medium wurde mit verschiedenen Methodiken aufgearbeitet, um die chemotaktisch aktiven Moleküle weiter einzugrenzen. Die jeweils noch vorhandenen Proteine

4 Ergebnisse

wurden dann z.T. elektrophoretisch und massenspektrometrisch nachgewiesen und auf Chemotaxis untersucht.

4.10.1 Eingrenzung der Größe des chemotaktisch aktiven Moleküls

PAEC-Medium wurde in Zentrifugenröhrchen mit einem MWCO von sowohl 5 als auch 100 kDa zentrifugiert und das Retentat mit den darin angereicherten Proteinen wurde im *Checkerboard*-Versuch und auch in dreidimensionalen Fibringelen untersucht.

Weiterhin wurde konditioniertes PAEC-Medium vor der Zentrifugation auf einen pH-Wert von 2 eingestellt, um mögliche niedermolekulare chemotaktisch aktive Untereinheiten abzutrennen.

4.10.1.1 *Checkerboard*-Versuche

In den *Checkerboard*-Versuchen wurde die chemotaktische Aktivität in bestimmten Anteilen von konditioniertem PAEC-Medium auf MV3-Zellen getestet. Bei vorheriger Zentrifugation des Mediums mit einem weitgehenden Ausschluß von Proteinen, die kleiner als 5 kDa waren, ergab die *Checkerboard*-Analyse des Retentats eine eindeutige Chemotaxis auf MV3-Zellen (ohne Abb.). In Tab.12 ist das Migrationsverhalten auf PAEC-Medium unter Ausschluß von Proteinen kleiner als 100 kDa gezeigt. Auch hier befanden sich die chemotaktisch aktiven Moleküle offensichtlich noch in der hochmolekularen Fraktion des Mediums, da immer noch eine deutliche Chemotaxis vorlag. Dies wurde bestätigt durch parallele Versuche, bei denen das Medium nicht zentrifugiert, sondern mit einem Ausschluß von 100 kDa dialysiert wurde.

Tab.12: *Checkerboard*-Analyse der MV3-Melanomzellmigration auf verschiedene Prozentanteile konditioniertes PAEC-Medium nach der Zentrifugation mit einem Ausschluß von Molekülen < 100 kDa. (*P<0,05).

Untere Kammer ↓	Obere Kammer		
	0%	10%	100%
0%	0,548*	0,438	0,353
10%	0,827	0,618	0,567
100%	1,078*	0,901	0,755

4 Ergebnisse

Es ist eine deutliche Zunahme der Migration bei ansteigendem PAEC-Medium-Anteil in der unteren Kammer zu erkennen, während bei steigender Konzentration des Mediums in der oberen Kammer die Migration wieder herabgesetzt wurde.

Durch eine pH 2 -Behandlung des Mediums ließ sich das chemotaktische Verhalten der MV3-Zellen auf das fraktionierte PAEC-Medium nicht hemmen (Tab.13).

Tab.13: Checkerboard-Analyse der MV3-Melanomzellmigration auf verschiedene Prozentanteile konditioniertes PAEC-Medium nach pH 2 - Behandlung und anschließender Zentrifugation mit einem MWCO von 100 kDa. Auch hier ist ein signifikant chemotaktisches Verhalten zu erkennen (*P<0,05).

Untere Kammer ↓	Obere Kammer		
	0%	10%	100%
0%	0,383*	0,315	0,389
10%	0,611	0,379	0,524
100%	1,068*	0,845	0,645

4.10.1.2 Migrationsverhalten in Fibringelen

Als Bestätigung des zweidimensionalen Migrationsverhaltens von Melanomzellen in Bezug auf PAEC-Medium, bestehend hauptsächlich aus hochmolekularen Proteinen (MWCO 100 kDa), wurde das durch Ausschlußzentrifugation gewonnene Retentat von PAEC-Medium ebenfalls Fibringel-Kokulturen zugesetzt. Die directionale Migration der Tumorzellen (s. 3.2.3.4) wurde ausgewertet und im Vergleich zu Kontrollen ohne PAEC-Medium-Zusatz dargestellt (Abb.18).

4 Ergebnisse

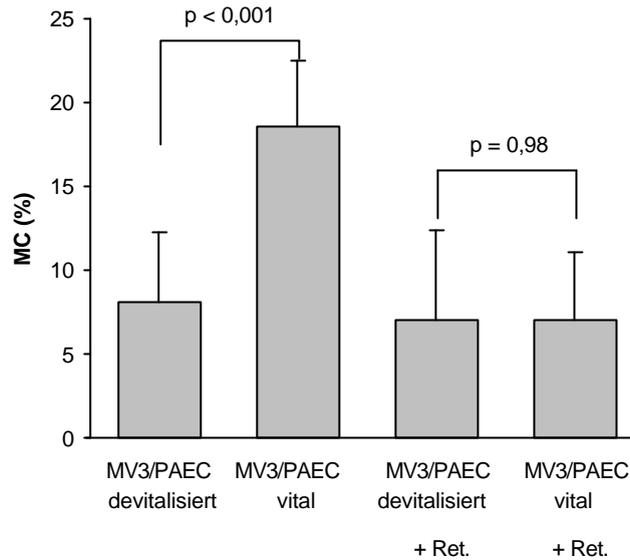


Abb.18: Quantifizierung der direktionalen Tumorzellmigration in Fibringelen. Die Säulen zeigen den Prozentanteil an *Microcarriern* (MC%) mit ungefärbten Endothelzellen, die von migrierenden Tumorzellen erreicht worden sind. Die Zufallsmigration wird durch devitalisierte Endothelzellcarrier dargestellt, während die vitalen Endothelzellcarrier zur Bestimmung der direktionalen Migration fungierten. Es ist das Migrationsverhalten von Melanomzellen auf PAEC dargestellt. Als Kontrollgele (MV3/PAEC devitalisiert bzw. vital) wurden Gele ohne Zusatz wie in Abb.17 verwendet, während anderen Gelen durch Ausschlußzentrifugation (MWCO: 100 kDa) aufkonzentriertes PAEC-Medium (+ Ret.: Retentat von 8ml PAEC-Med.) zugesetzt wurde. In den Kontrollen ist, wie bereits in Abb.17 gezeigt, deutlich zu erkennen, daß von den vitalen Endothelzellen eine signifikant stärkere Anziehung auf die Tumorzellen ausgeübt wird als von den devitalisierten. Hingegen ist bei der Zugabe von PAEC-Medium an das Fibringel keine direktionale Tumorzellmigration mehr zu erkennen. Die Melanomzellen wandern gleichstark zu den devitalisierten wie zu den vitalen Endothelzellcarrier.

Abb.18 bestätigt die Wirkung von chemotaktisch aktiven Molekülen in konditioniertem Medium von Endothelzellen. Ohne Zusatz dieses Mediums an das Fibringel (Kontrollen) kann unterschieden werden zwischen direktonaler Migration von Tumorzellen und Zufallsmigration (2. bzw. 1. Balken in Abb.18). Bei Zugabe von konzentriertem PAEC-Medium jedoch wurde die direktonale Migration der Tumorzellen aufgehoben, da der chemotaktische Gradient ausgehend von den Endothelzellcarrier durch die gleichmäßige Zugabe des chemotaktisch aktiven Mediums an das gesamte Gel ausgeglichen werden konnte.

4.10.2 Hitzebehandlung von konditioniertem PAEC-Medium

Weitere Rückschlüsse auf die Beschaffenheit der chemotaktisch aktiven Moleküle sollten durch eine Hitzebehandlung von konditioniertem PAEC-Medium gezogen werden. Dafür wurde das Medium für eine Stunde bei 80°C inkubiert, durch eine Membran (0,45 µm Poren-

4 Ergebnisse

durchmesser) filtriert und dann in *Checkerboard*-Versuchen auf noch vorhandene Chemotaxis untersucht.

Tab.14: Checkerboard-Analyse der MV3-Melanomzellmigration auf verschiedene Prozentanteile konditioniertes PAEC-Medium nach 1 h Hitzebehandlung bei 80°C. Nach einer Hitzebehandlung waren keine signifikanten Migrationsunterschiede der Tumorzellen mit steigender PAEC-Medium-Konzentration in den unteren Kammern mehr erkennbar (*P>0,05).

Untere Kammer ↓	Obere Kammer		
	0%	10%	100%
0%	0,885*	0,938	0,985
10%	0,887	0,890	1,001
100%	1,043*	1,083	1,018

Durch eine Erhöhung des PAEC-Medium-Anteils in den oberen Kammern ließ sich die Migration auch nicht mehr hemmen.

Aus Tab.14 wird ersichtlich, daß die chemotaktische Anziehungskraft des konditionierten Endothelzellmediums durch eine einstündige Hitzeeinwirkung stark verringert bzw. aufgehoben werden konnte. Eine Erklärung dafür wäre die Denaturierung von Proteinen durch Hitzeeinwirkung und ließe darauf schließen, daß es sich bei den chemotaktisch aktiven Substanzen um Proteine handeln könnte.

4.10.3 Aufreinigung durch DEAE

Durch die Bindung von Proteinen an den Anionenaustauscher DEAE sollten weitere Erkenntnisse über die chemotaktischen Moleküle des PAEC-Mediums gewonnen werden. Die Fraktionierung erfolgte wie unter 3.3.4.4 beschrieben.

4.10.3.1 Elektrophoretische Auftrennung der verschiedenen DEAE-Eluate und massenspektrometrische Untersuchungen einiger Proteinbanden

Die verschiedenen Eluate aus der DEAE-Inkubation wurden vergleichend neben PAEC-Medium, welches lediglich einer Ausschlußzentrifugation (100 kDa) unterzogen worden war, in einem 10% igen SDS-Gel aufgetragen. Die Proteinbanden wurden anschließend Coomassie gefärbt. In Abb.19 ist das gefärbte Gel dargestellt.

Mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen konnten einige der Proteinbanden im höhermolekularen Bereich näher identifiziert werden.

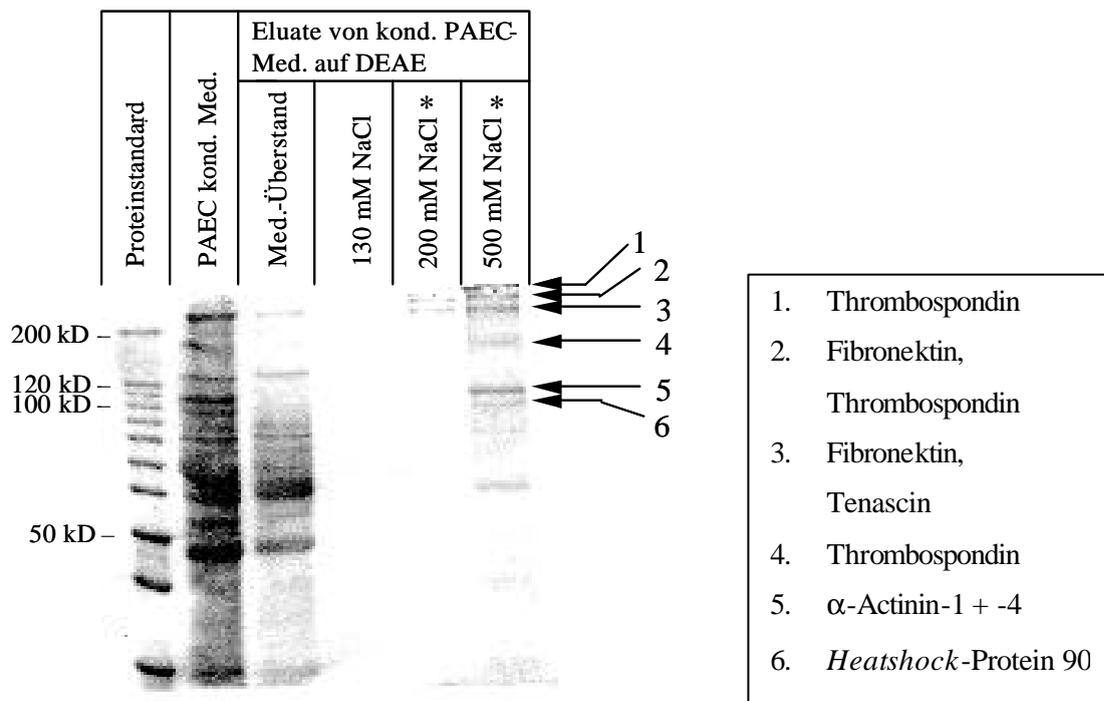


Abb.19: SDS-PAGE: 10% iges SDS-Gel. Auftrennung von Proteineluaten nach der Inkubation mit DEAE. *chemotaktisch aktive Fraktionen. Die nummerierten Pfeile bezeichnen Proteinbanden, in denen die im Textfeld aufgeführten Proteine massenspektrometrisch detektiert werden konnten.

4.10.3.2 Checkerboard-Versuche

Als Nachweis noch vorhandener chemotaktischer Aktivität in den einzelnen DEAE - Fraktionen wurden erneut Boydenkammerversuche durchgeführt. Dafür wurden wiederum MV3-Zellen verwendet und ihr Migrationsverhalten auf die DEAE-Fraktionen getestet. In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse gegenübergestellt. Zur ausschließlichen Überprüfung der Chemotaxis wurden in diesen Versuchen lediglich 0 und 100 % konditioniertes Medium jeweils in den unteren bzw. oberen Kammern eingesetzt.

Tab.15: Checkerboard-Analyse der MV3-Melanomzellmigration auf konditioniertes PAEC-Medium. Kontrolle (ohne DEAE-Inkubation) zeigt Chemotaxis (*P<0,05).

Untere Kammer ↓	Obere Kammer	
	0%	100%
0%	1,034*	0,487
100%	1,36*	0,961

Die Kontrolle in Tab.15 diene als Nachweis für das Vorhandensein der chemotaktisch aktiven Moleküle in der für diese Versuch verwendeten PAEC-Medium- Charge. Es zeigte sich, daß in der Kontrolle Chemotaxis auftrat und so konnten von der Kontrolle Rückschlüsse auf die Ergebnisse der DEAE-Eluat-Versuche gezogen werden.

Tab.16 zeigt, daß im ersten Überstand der DEAE-Inkubation keine chemotaktische Anziehungskraft auf die MV3-Zellen ausgeübt werden konnte, obwohl im SDS-Gel (Abb.19, ‚Med.-Überstand‘) in dieser Fraktion eindeutig die meisten Proteinbanden (nach der Kontrolle) sichtbar gemacht werden konnten.

Tab.16: Checkerboard-Analyse der MV3-Melanomzellmigration auf konditioniertes PAEC-Medium nach DEAE-Inkubation. Test des 1. Medium-Überstandes zeigt keine Chemotaxis (*P>0,05).

Untere Kammer ↓	Obere Kammer	
	0%	100%
0%	1,29*	1,331
100%	1,333*	1,371

4 Ergebnisse

Im zweiten Eluat (130 mM NaCl, s. Abb.19) waren weder Proteinbanden im SDS-Gel, noch der Ansatz eines chemotaktischen Verhaltens von MV3-Zellen zu erkennen (ohne Abb.). Mit 200 mM NaCl konnte eine gewisse Menge an Protein wieder aus dem DEAE herauseluiert werden, so daß sich mit Hilfe der Coomassie-Färbung zwei Banden sichtbar machen ließen, die beide oberhalb von 200 kDa lagen. Diese Banden waren jedoch sehr dünn und traten z.T. auch im 1. und 4. Eluat auf. Damit ist eventuell zu erklären, daß nach einer ersten *Checkerboard*-Analyse mit der einfachen Konzentration des Eluats keine Chemotaxis zu erkennen war (Tab.17), jedoch beim Einsatz der dreifachen Konzentration des gleichen Eluats eine gerichtete Migration der Tumorzellen auftrat (Tab.18).

Tab.17: Checkerboard-Analyse der MV3-Melanomzellmigration auf konditioniertes PAEC-Medium nach DEAE-Inkubation. Test des 3. Eluats (200 mM NaCl) in einfacher Konzentration zeigt keine Chemotaxis (*P>0,05).

Untere Kammer ↓	<u>Obere Kammer</u>	
	0%	100%
0%	1,222*	1,192
100%	1,198*	1,161

Tab.18: Checkerboard-Analyse der MV3-Melanomzellmigration auf konditioniertes PAEC-Medium nach DEAE-Inkubation. Test des 3. Eluats (200 mM NaCl) in dreifacher Konzentration zeigt Chemotaxis (*P<0,05).

Untere Kammer ↓	<u>Obere Kammer</u>	
	0%	100%
0%	0,926*	0,801
100%	1,262*	0,878

Das vierte Eluat (500 mM NaCl), in dem wieder mehrere Proteinbanden im SDS-Gel sichtbar wurden, war auch in einfacher Konzentration dazu in der Lage, eine Chemotaxis der Tumorzellen auszulösen (Tab.19).

4 Ergebnisse

Tab.19: Checkerboard-Analyse der MV3-Melanomzellmigration auf konditioniertes PAEC-Medium nach DEAE-Inkubation. Test des 4. Eluats (500 mM NaCl) in einfacher Konzentration zeigt Chemotaxis (*P<0,05).

Untere Kammer ↓	Obere Kammer	
	0%	100%
0%	1,214*	0,559
100%	1,357*	0,585

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe, insbesondere die des dritten Eluats, stützen Vermutungen vorheriger Versuche (4.10.1) bzgl. der Größe der chemotaktisch aktiven Moleküle. Denn auch die Auftrennung des dritten Eluats, welches in dreifacher Konzentration Aktivität aufwies, brachte lediglich Proteinbanden im hochmolekularen Bereich zum Vorschein.

4.10.4 Checkerboard-Versuche mit massenspektrometrisch nachgewiesenen Proteinen aus der chemotaktisch aktiven Fraktion

Es wurden weitere *Checkerboard*-Analysen durchgeführt, in denen getestet wurde, ob TSP und Fibronectin in der Lage sind, Tumorzellen chemotaktisch zu stimulieren. Tab.20 zeigt, daß TSP in einer Konzentration von 45 µg/ml (100 nM) die Migration von Tumorzellen signifikant stimulieren kann. Durch geringere TSP-Konzentrationen hingegen konnte die Migration nicht beeinflusst werden.

Tab.20: *Checkerboard*-Analyse der MV3-Melanomzellmigration auf hohe TSP-Konzentration (45 µg/ml) zeigt Chemotaxis (*P<0,05).

Untere Kammer ↓	Obere Kammer	
	0 µg TSP	45 µg TSP
0 µg TSP	0,514*	0,292
45 µg TSP	0,758*	0,523

4 Ergebnisse

Auch Fibronectin konnte in *Checkerboard*-Analysen als Chemotaxin für Tumorzellen nachgewiesen werden (Tab.21).

Tab.21: *Checkerboard*-Analyse der MV3-Melanomzellmigration auf Fibronectin (10 µg/ml) zeigt Chemotaxis (*P<0,05).

Untere Kammer ↓	Obere Kammer	
	0 µg Fibronectin	10 µg Fibronectin
0 µg Fibronectin	0,753*	0,454
10 µg Fibronectin	0,916*	0,588

Zusätzlich wurden Versuche durchgeführt, in denen TSP bzw. Fibronectin jeweils entgegengesetzt zum konditionierten Medium in den oberen oder unteren Einsatz der Boydenkammer gegeben wurde. Trotz der Fähigkeit, die Migration der Melanomzellen zu stimulieren, waren weder TSP noch Fibronectin dazu in der Lage, in diesen *Checkerboard*-Versuchen die stimulierende Wirkung von konditioniertem PAEC-Medium auf Tumorzellen signifikant aufzuheben.

In weiteren Tests wurde das ebenfalls massenspektrometrisch nachgewiesene Protein α -Aktinin (0,01 - 1 µg/ ml) in Boydenkammerversuchen eingesetzt. Ein Einfluß auf das Migrationsverhalten der Tumorzellen blieb jedoch aus.

4.10.5 Immunologischer Nachweis von TSP

Um einen Aufschluß über die Verteilung von TSP in Tumorzellen und in verschiedenen Endothelzellfraktionen zu bekommen, wurde ein *Western Blot* durchgeführt. Der polyklonale TSP-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt, während der HRP-markierte Sekundärantikörper 1: 1000 verdünnt wurde. Verglichen wurden in diesem Versuch konditionierte Medien von Melanomzellen, Glioblastomzellen, HMEC-1, HUVEC und unterschiedlich fraktionierte chemotaktisch aktive PAEC-Medien. Das Ergebnis ist in Abb.20 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß bei keiner der beiden Tumorzellarten ein TSP-

4 Ergebnisse

Signal erscheint, während in allen Endothelzellfraktionen TSP in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen werden konnte.

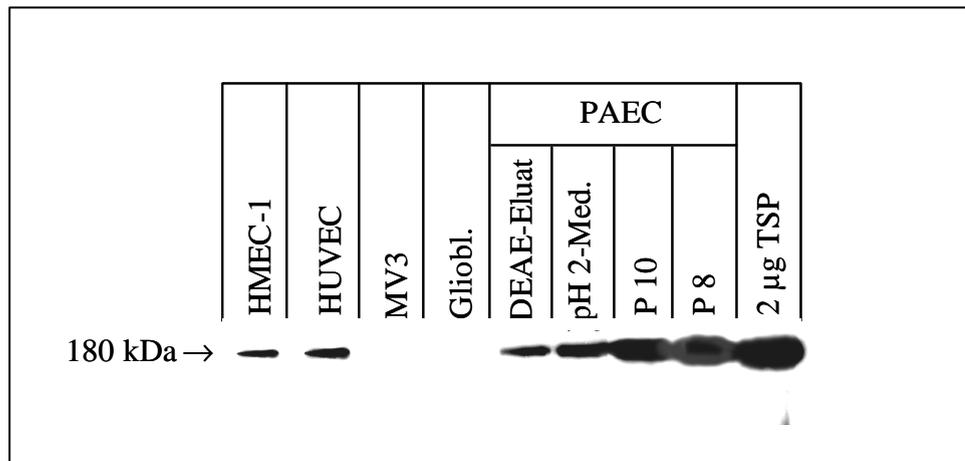


Abb.20: *Western Blot* von TSP aus einem SDS-Gel, welches neben der Positivkontrolle (TSP) zusätzlich mit konditionierten Medien von HMEC-1, HUVEC, MV3, Glioblastomzellen (Gliobl.) und verschiedenen chemotaktisch aktiven PAEC –Fraktionen beladen war. DEAE-Eluat: 500 mM NaCl Fraktion (s. Abb.19); pH2-Med.: pH2-Behandlung des Mediums; P 10 bzw. P 8: Passage 10 bzw. 8.

5 Diskussion

5.1 HS moduliert die Fibrinstruktur und stimuliert die Zellmigration

In dieser Arbeit wurden anhand von spektrometrischen Messungen, Permeabilitätsbestimmungen, Gelstabilitätsmessungen (Kompaktion) und konfokaler Lasermikroskopie die Strukturen verschiedener Fibringele untersucht. Dabei bestätigte sich die Vermutung, daß HS direkt in die Fibrinpolymerisation eingreift und eine gröbere Fibrinstruktur verursacht. Ansteigende Konzentrationen von HS während der Fibrinpolymerisation hatten auch ansteigende Porendurchmesser und dickere Fibrinfasern zur Folge. Die Kompaktionsversuche haben gezeigt, daß mit ansteigenden HS-Konzentrationen die Stabilität des gesamten Fibringels abnimmt und dieses so leichter kollabiert. Diese Ergebnisse stimmen mit der Erkenntnis überein, daß HS Fibrinogen binden kann und dadurch die Polymerisation zu Fibrin beeinflusst (LeBoeuf et. al., 1986, 1987). In inflammatorischen Prozessen, nach Verletzungen des Gewebes und während des Tumorwachstums wurde dieser HS-Fibrinogen-Bindungsfähigkeit eine Rolle in der Reorganisation der Extrazellulärmatrix zugesprochen (Weigel et. al., 1986).

Die dreidimensionalen Migrationsstudien haben gezeigt, daß Glioblastomzellen wesentlich schneller in stark porösen Fibringelen mit dicken Fibrinfasern migrieren, während feine Gele mit dünnen Fibrinfasern die Tumorzellmigration eher beeinträchtigen. Als Ursache für die Stimulation der Tumorzellmigration in großporigen Matrices gibt es unterschiedliche Erklärungsmuster. Auf der einen Seite steht die Ansicht, daß dicke Fasern zu einer erhöhten Netzwerkstabilität neigen, wodurch den Zugkräften der migrierenden Zellen mehr Widerstand entgegengesetzt werden kann, was wiederum zu einer schnelleren Migration der Zellen führen kann (Choquet et. al., 1997; Ingber & Folkman, 1989; Lauffenburger & Horwitz, 1996). Dieser Annahme widersprechen die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Kompaktionsversuche, die für eine abnehmende Stabilität der Fibringele bei Erhöhung der HS-Konzentration und somit Porosität sprechen. Jedoch ist es denkbar, daß die dicken Fasern der stark porösen Gele stabiler und besser geeignet sind, den Zugkräften von migrierenden Zellen standzuhalten. Das bedeutet, es ist möglich, daß die Stabilität des gesamten Gels (Kompaktionsversuch) nicht exakt die Stabilität der einzelnen Fibrinfasern widerspiegelt.

Als weitere Erklärungsmöglichkeit der stimulierten Zellmigration in großporigen Gelen kommt unterschiedliches *Integrinclustering* bei unterschiedlicher Fibrinfaserstärke und das daraus resultierende veränderte *outside-in-signaling* in Frage (McDonald, 1989). Diese ver-

5 Diskussion

änderten Integrinsignale könnten so durch die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden die Zellmigration erhöhen. Ein verändertes *Integrinclustering* müßte neben der dreidimensionalen Migration ebenso die Oberflächenmigration beeinflussen. Das Ergebnis der durchgeführten zweidimensionalen Migrationsversuche auf der Oberfläche von Fibringelen ergab jedoch eine von der Faserstruktur unabhängige Glioblastomzell-Migration. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise damit zu erklären, daß das *Integrinclustering* unter dreidimensionalen Bedingungen anders abläuft als in einem zweidimensionalen System. Durch die Dreidimensionalität können die Zellen rundherum mit der Matrix in Kontakt treten; sie nehmen eine andere Zellform ein als die flach geformten Zellen auf einer Oberfläche und es sind bereits Unterschiede in der Bildung fokaler Kontakte und der Struktur des Aktinzytoskeletts innerhalb einer dreidimensionalen Matrix bzw. auf deren Oberfläche festgestellt worden (Friedl & Bröcker, 2000). Dennoch ist für ein verändertes *Clustering* von Integrinen in einer dreidimensionalen Matrix u.a. eine Modulation der Struktur notwendig, wodurch wiederum die Fibrinarchitektur als Ursache für eine Migrations-Stimulation in den Vordergrund tritt.

Die Resultate der zweidimensionalen Oberflächenmigration sind jedoch ein Argument gegen die erste Hypothese, nach der die Stabilität der Fasern für die erhöhte Migration verantwortlich ist. Auch in diesem Fall müßte die Oberflächenmigration durch eine gröbere Faserstruktur stimulierbar sein, was jedoch nicht der Fall war.

Als dritter hypothetischer Mechanismus zur Erklärung der besseren Zellmigration in groben Fibringelen kann die erhöhte Permeabilität angeführt werden, die möglicherweise eine Reduktion der proteolytischen Aktivität der migrierenden Zellen erlaubt. 1992 wurde von Gabriel et. al. gezeigt, daß Fibringele mit dicken Fasern schneller durch Plasmin lysiert werden als Gele mit dünnen Fibrinfasern. Im Gegensatz dazu steht der Einfluß von HS auf die Fibrinolyse. Die Fibrinolyse wird in trüben grobporigen dickfaserigen Gelen inhibiert, wenn diese in Anwesenheit von HS polymerisiert worden sind (Scully et. al., 1995). Das würde bedeuten, daß dieser Mechanismus nicht der ausschlaggebende Punkt der Migrationsstimulation sein kann, da sich die beiden oben genannten Erkenntnisse gegeneinander aufheben würden und somit in Fibringelen mit HS keine Stimulation der Zellmigration stattfinden könnte. Ein weiterer Grund, der gegen diese Hypothese spricht, ist die Zellmigration in pH 7,0 Gelen ohne HS-Zusatz. Diese Gele sind ebenfalls grobporig mit dicken Fibrinfasern und die Migration wird beschleunigt. Sie kann allerdings nicht durch eine Erhöhung des Plasmininhibitors Aprotinin wieder reduziert werden.

Aufgrund dieser Tatsachen ist es nicht sehr wahrscheinlich, daß der HS-Effekt in Fibringelen durch eine Reduktion der erforderlichen perizellulären Proteolyseaktivität bedingt ist, sondern durch eine Veränderung der Fibrinarchitektur. Die durch die HS entstehende stark poröse und permeable Struktur bietet den Zellen eine gute Matrix für eine schnelle Zellmigration.

5.2 Differenzierung direkter und indirekter HS-Effekte

Als direkte HS-Effekte auf die Zellmigration werden hier Wirkungen bezeichnet, die aufgrund von HS-Rezeptoren verursacht wurden, während indirekte Effekte aus der Interaktion von HS mit der Fibrinpolymerisation resultieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für den Mechanismus der indirekten Migrationsstimulation durch HS, denn für eine Stimulation der Zellmigration mußte HS immer während des Polymerisationsprozesses anwesend sein. HS, die später auf die bereits polymerisierten Fibringele gegeben wurde und nachweislich auch in die Gele hineindiffundierte, hatte keinen Effekt auf die Migration. Einen weiteren Hinweis darauf, daß zelluläre Kontakte zu den Fibrinfasern eine wesentliche Rolle in der dreidimensionalen Migration spielen, ergaben sich aus der Hemmung von Integrin-Matrix-Kontakten. Diese inhibierte die HS-induzierte Migration zu einem erheblichen Anteil. Außerdem wurde gezeigt, daß die HS-verursachte Migration stark mit der Fibrinfaserstärke bzw. der Porengröße der Fibringele korreliert. Eine wichtige Erkenntnis dabei lag darin, daß sehr geringe HS-Konzentrationen ($< 10 \mu\text{g HS/ml}$ Fibrinogenlösung), die die optische Dichte von Fibringelen nicht signifikant veränderten, auch keinen Einfluß auf die Tumorzellmigration hatten.

Diese genannten Argumente sprechen gegen eine HS-Rezeptor vermittelte Stimulation der Migration, da die Migration - wie oben bereits beschrieben - auch eher durch Antikörper gegen Integrine als durch Moleküle, die gegen eine HS-Rezeptorbindung gerichtet sind, inhibiert werden konnte. Der Antikörper gegen den HS-Rezeptor CD44 war unter dreidimensionalen Bedingungen nicht effektiv, konnte aber die zweidimensionale Tumorzellmigration auf einer reinen HS-Matrix inhibieren. Dieses Resultat zeigt, daß HS zwar offensichtlich die Migration auch rezeptorabhängig beeinflussen kann, daß dieser Anteil jedoch sehr gering ist und vor allem unter dreidimensionalen Bedingungen eine untergeordnete Rolle spielt. Selbst in den zweidimensionalen Boydenkammerversuchen wurde die Zellmigration wesentlich stärker durch Fibrinogen als durch HS stimuliert.

RHAMM (IHABP) als zweiter HS-Rezeptor scheidet als potentieller Vermittler der Migrationsinduktion aus, da 1998 erkannt wurde, daß dieses Protein ausschließlich intrazellulär auftritt und somit für die extrazelluläre Bindung von HS keine Rolle spielen kann (Assmann et. al., 1998; Hofmann et. al., 1998). Ein weiteres Argument, das gegen eine Interaktion von RHAMM spricht, ist die Tatsache, daß die RHAMM-abhängige Migration bereits durch signifikant geringere HS-Konzentrationen (0,001-0,1µg/ml) induzierbar ist (Turley et. al., 1991, 1993) als sie in den hier verwendeten Fibringelsystemen eingesetzt wurden. In diesen Systemen war für eine Stimulation der Fibrinpolymerisation und der Tumorzellmigration eine Mindestkonzentration von 30 µg HS/ ml erforderlich.

5.3 Die Bedeutung von HS-modulierten Fibrin-Matrizes

HS ist in der Extrazellulärmatrix vieler Gewebe reichlich vorhanden. In humaner Haut liegt die Konzentration bei mehr als 200 µg/ ml (Laurent & Fraser, 1992), Rattenmyokard enthält 205 µg HS/ g Trockenmasse, die sich nach einem Myokardinfarkt auf über 650 µg/ g erhöht (Waldenström et. al., 1991). Diese Angaben lassen den Schluß zu, daß *in situ* ausreichende Mengen HS vorhanden sind, um zu einer modulierten Fibrinpolymerisation zu führen. Es ist bereits bekannt, daß die Reorganisation von Bindegewebe durch HS charakteristisch für inflammatorische Prozesse, Wundheilung und auch während des Tumorwachstums ist (Weigel et. al., 1986). In der Umgebung solider Tumore wird von den Tumorzellen selbst, aber auch von den tumorassoziierten Fibroblasten vermehrt HS produziert. Im Randbereich solider Tumore findet sich eine erhöhte Gefäßpermeabilität, die wiederum zu einer Plasmaextravasation und so zu perivaskulären Fibrinablagerungen führt (Dvorak et. al., 1992). Die erhöhten HS- und Fibrinkonzentrationen an einem Ort können - den Daten dieser Arbeit zufolge - dafür verantwortlich sein, daß in der Umgebung von Tumoren ein poröse Matrix mit stabilen Fibrinfasern entsteht. Das bedeutet, die Sekretion von HS kann die Matrix dahingehend beeinflussen, daß die Tumorzellmigration bzw. Metastasierung begünstigt wird. Sicherlich ist HS nicht der einzige Faktor, der die Tumormatrix modulieren kann. Erst durch das Zusammenwirken mehrerer Faktoren, die z.T. auch in die Fibrinpolymerisation eingreifen, entsteht entweder eine pro- oder antimigratorische Matrixstruktur. Als einer der Gegenspieler von HS ist z.B. Thrombospondin bekannt, welches die Fibrinpolymerisation zu einem weniger permeablen Gel unterstützt und so eine mögliche Zellmigration und Metastasierung von Tumorzellen beeinträchtigt (Bale & Mosher, 1986).

5.4 Intrazelluläre HS

Bisher wurde HS vorwiegend als eine Komponente der Extrazellulärmatrix angesehen, die sowohl in der Zellmigration (Docherty et. al., 1989; Turley, 1992; Zhang et. al., 1995; Ropponen et. al., 1998) und Proliferation (Brecht et. al., 1986; Heldin et. al., 1989; Laurent & Fraser, 1992) als auch in der Wundheilung und Tumorwachstum (Weigel et. al., 1986) eine Rolle spielt. Es gibt jedoch auch einige Hinweise auf ein intrazelluläres Vorhandensein von HS in verschiedenen Geweben (Margolis et. al., 1976; Ripellino et. al., 1988, 1989; Kan, 1990; Egli & Graber, 1995). In dieser Arbeit wurde durch spezifische Färbungen und Zellfraktionierungen mit anschließendem spektrometrischen HS-Nachweis endogen vorhandene sowie exogen zugeführte HS lokalisiert. Diese Versuche ergaben eine endogene Lokalisation von HS vorwiegend perinukleär in Vesikeln oder in der Kernfraktion gebunden. Hingegen fand sich die exogen zugeführte HS vorwiegend im Zellkern. Es ist auszuschließen, daß es sich bei der endogen nachgewiesenen HS um das Produkt von HS-Degradationsprozessen gehandelt hat. Im Fall einer Degradation wären kleine Oligosaccharide von HS zu erwarten, die ohnehin keinen spektrometrischen Nachweis ermöglicht hätten, wie er in dieser Arbeit durchgeführt wurde (Homer et. al., 1993). Kontrollversuche, in denen Hyaluronidase-behandelte und somit fragmentierte HS nicht mehr spektrometrisch nachweisbar war, bestätigten diese Vermutung.

Jedoch sind bisher lediglich HS-Synthasen bekannt, die ausschließlich in der Plasmamembran lokalisiert sind (Laurent & Fraser, 1992). Es wäre aber auch denkbar, daß zytoplasmatische Enzyme existieren, die HS produzieren oder daß es sogar HS-Synthasen an intrazellulären Membranen gibt, die für die endogene HS verantwortlich sind. Inzwischen sind bereits einige HS-bindende Proteine bekannt, die intrazellulär auftreten und somit auf mögliche intrazelluläre Funktionen von HS hinweisen. So zeigten Grammatikakis et. al. 1995, daß das Zellzyklus-Kontroll-Protein Cdc37 auch HS bindet. Eine spezifische Assoziation von HS mit der Mitose erkannten Evanko & Wight 1999. In der gleichen Zeit, in der die Ergebnisse zur intrazellulären HS-Lokalisation dieser Arbeit erbracht wurden, fanden sie eine ähnliche Verteilung von endogener und exogen zugeführter HS in 3T3-Zellen, humanen Hautfibroblasten und glatten Muskelzellen aus humanem Aortengewebe. Sie postulierten, daß HS möglicherweise in nukleoläre Funktionen involviert ist, da sie besonders in der späten Prophase und Metaphase der Mitose eine starke HS-Färbung zwischen den Chromosomen erkennen konnten. Eine mögliche Unterstützung erhielt diese Hypothese durch Kan, der intrazelluläre HS mit dem

5 Diskussion

rauen endoplasmatischen Retikulum in Verbindung brachte und einen möglichen Einfluß auf die mRNA-Prozessierung nicht ausschloß (Kan, 1990).

Ein Einfluß auf die Signaltransduktion wurde HS nach dem Fund einer intrazellulären Isoform des HS-Rezeptors RHAMM zugeschrieben, da dieser offensichtlich in den *mitogen-activated protein* (MAP-) Kinase Signalweg eingreifen konnte, indem er die *extracellular-regulated kinase* (ERK) konstitutiv aktivierte (Zhang et. al., 1998).

Eine weitere potentielle regulatorische Rolle in der Zelle kam der HS aufgrund der intrazellulären Lokalisation von IHABP (RHAMM) zu (Hofmann et. al., 1998), welches eine ähnliche Verteilung aufwies wie die HS in dieser Arbeit. Kurze Zeit später wurde eine Kollokalisierung von IHABP mit den Mikrotubuli und weitere Interaktionen mit Aktinfilamenten sowohl in der Interphase als auch in sich teilenden Zellen festgestellt (Assmann et. al., 1999). Diese Berichte gehen mit den erhaltenen Ergebnissen konform und lassen die Frage zu, ob HS selbst möglicherweise auch einen Effekt auf die Aktinpolymerisation hat, denn es wurde zuvor ja bereits festgestellt, daß HS in der Lage ist, die Fibrinpolymerisation zu beeinflussen. Polymerisations-stimulierende Einflüsse auf die Aktinpolymerisation wurden für andere Makromoleküle wie Dextran oder Polyethylenglykol nachgewiesen und mit einem *macromolecular crowding*-Effekt erklärt (Drenckhahn & Pollard, 1986; Lindner & Ralston; 1997). Dieser besagt, daß die mit Makromolekülen stark angereicherte zelluläre Umgebung die Aktinmonomere nach dem Volumenausschlußverfahren näher zusammendrängt, so die Bildung von Aktinfilamenten unterstützt und diese stabilisiert. Im Gegensatz zu den Resultaten dieser Publikationen zeigte die HS jedoch hier in geringen Konzentrationen keinen Einfluß auf die Polymerisation von Aktin und ab einer Konzentration von 500 µg/ ml zeigte sich entgegen den Erwartungen ein inhibierender Effekt. Die Ursache für diesen Effekt kann durch die negative Nettoladung der HS bedingt sein, die sich möglicherweise mit den drei positiv geladenen Aminosäureresten His-Arg-Lys, die dem für die Polymerisation wichtigen Cystein 374 des Proteins vorangehen, zusammenlagert (Bouchard et. al., 1998). Weiterhin wurde gezeigt, daß sich die HS vorwiegend gebunden entweder in Vesikeln oder sogar am Zytoskelett befand und somit nur eine Konzentration von etwa 200 µg/ ml frei im Zytoplasma vorlag, die unter der hier inhibierenden Konzentration von 500 µg HS/ ml lag.

Aus den bisherigen Berichten wird deutlich, daß das Feld der intrazellulären Funktionen der HS noch am Beginn steht und weitere Studien notwendig sind, um die Rolle(n) der intrazellulären HS aufzuklären.

5.5 Direktionale Migration von Tumorzellen zu Endothelzellen

Es wird generell angenommen, daß die Kapillarversorgung von Tumoren durch ein direktionales Migrationsverhalten von Endothelzellen zu den Tumoren geregelt wird.

Bei Untersuchungen zur Gefäßversorgung von transplantierten Tumoren zeigten Thompson et. al. 1987 jedoch, daß wachsende Tumore bereits vorhandene Gefäßsysteme invadieren, um sich auf diese Weise ihre Nährstoffversorgung zu sichern. Weiterhin wurde erkannt, daß die Kapillardichte im Zentrum von Tumoren gering ist, während das endotheliale Wachstum in der Peripherie stark zunimmt (Denekamp & Hobson, 1982; Thompson et. al. 1987; Holash et. al., 1999). Unabhängige Versuche zeigten ebenfalls eine Nährstoffversorgung von Tumoren in der frühen Wachstumsphase durch bereits existierende Gefäßsysteme und gaben keinen Hinweis darauf, daß ein gerichtetes Kapillarwachstum von der Peripherie in das Zentrum von Tumoren stattfindet (Skinner et. al. 1990).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage der Chemotaxis zwischen Endothel- und Tumorzellen mit Hilfe eines dreidimensionalen Fibrinigel-Systems analysiert. Die Anziehungskräfte der Endothelzellen waren deutlich höher als die chemotaktischen Anziehungskräfte der Tumorzellen auf die Endothelzellen (von Bülow, 2001). Seit einigen Jahren gibt es immer mehr Hinweise auf eine endotheliale Stimulation des Tumorwachstums nicht nur durch die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, sondern auch durch direkte parakrine Effekte (Nicosia et. al., 1986; Hamada et. al., 1992; Rak et. al., 1996). Die Moleküle, die für das chemotaktische Migrationsverhalten von Tumorzellen verantwortlich sind, konnten bis jetzt noch nicht identifiziert werden. Von mehreren endothelialen Faktoren ist jedoch bekannt, daß sie an der Kommunikation zwischen Endothel- und Tumorzellen beteiligt sind. Für Interleukin-6 sind Einflüsse auf die Zellstruktur, Adhäsion und Zellmotilität von Zellen einer humanen Brust-Karzinom-Zelllinie bekannt (Tamm et. al., 1994). Thromboxan A(2) stimuliert sowohl die Endothelzellmigration als auch die Entwicklung von Tumormetastasen, was mit Hilfe von Thromboxan A(2)- Inhibitoren nachgewiesen werden konnte (Nie et. al., 2000). Ein weiterer Fortschritt bezüglich der gerichteten Migration von Tumorzellen wurde durch die Reinigung der Komplementkomponente C3b aus spezifischem konditionierten Endothelzellmedium erbracht (Hamada et. al., 1993). Ein proteolytisches Fragment der Komponente C3 war für die Migrationsstimulation verantwortlich und spielte eine Rolle bei der Tumorzellinvasion und -kolonialisierung der Leber (Hamada et. al., 1993).

5.5.1 Potentielle endotheliale Chemotaxine

In dieser Arbeit konnten mit Hilfe von Ausschlußzentrifugationen, DEAE-Anionenaustauscher-Chromatografie, SDS-PAGE und Massenspektrometrie potentielle endotheliale Chemotaxine für Tumorzellen ermittelt werden. Das auffälligste Protein in den Untersuchungen war Thrombospondin (TSP), da es in mehreren Banden der Gelelektrophorese auftauchte und bereits über einen chemotaktischen Effekt von TSP berichtet wurde (Gathan et. al., 1999).

Thrombospondin

TSP ist ein homotrimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 450 kDa (Lawler, 1986). Es wird in hohen Konzentrationen von aktivierten Thrombozyten während der Homöostase freigesetzt, kann aber auch von vielen anderen Zelltypen, unter anderem von Endothel- und Tumorzellen, synthetisiert werden (Mosher et. al., 1982; Tuszynski & Nicosia, 1996). Bale & Mosher erkannten 1986, daß TSP die Fibrinpolymerisation beeinflusst, indem es ein feineres Netzwerk mit dünneren Fibrinfasern verursacht. Diese Tatsache würde gegen TSP als potentiellen Chemotaxisinduktor von Tumorzellen sprechen, denn eine solche Modulation der Fibrinstruktur hat eine Reduktion der Zellmigration zur Folge, wie bereits im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben. Das bedeutet, wenn das von den Endothelzellen sezernierte TSP diesen Effekt verursachen würde, würde die Fibrinstruktur in der näheren Umgebung dieser Zellen kleinporiger sein und eine Migration in diese Richtung eher inhibieren.

Über die Funktion von TSP gibt es verschiedene Ansichten. Es gibt viele Untersuchungen, die TSP eine antiangiogene Funktion zusprechen (Castle et. al., 1997; Bleuel et. al., 1999). Dieses antiangiogene Potential von TSP konnte mit dem im Plasma zirkulierenden *histidine-rich glycoprotein* (HRGP) durch Bindung am antiangiogenen Epitop inhibiert werden (Simantov et. al., 2001). Dardik & Lahav berichteten 1999 allerdings auch von Fibronectin- und Heparin-Bindungsstellen am TSP-Molekül, durch deren Bindung es zu einer Konformationsänderung kommt. Da auch Fibronectin in dem chemotaktisch aktiven Anteil des konditionierten Endothelzellmediums identifiziert werden konnte, wäre es durchaus denkbar, daß es zwischen diesen beiden Molekülen zu einer Interaktion mit anschließender Konformationsänderung des TSP kommen könnte und daß diese beiden Proteine zusammen möglicherweise einen Einfluß auf die Tumorzellmigration haben.

Neben den antiangiogenen und damit tumorinhibierenden Eigenschaften von TSP gibt es durchaus auch Hinweise auf mögliche chemotaktische Effekte, die durch TSP ausgelöst wer-

den. Bekannt ist, daß TSP die Chemotaxis von vaskulären glatten Muskelzellen auslöst und daß der MAP Kinase Signalweg darin involviert ist (Gahtan et. al., 1999). Es gibt jedoch auch Beobachtungen, die auf eine Rolle von TSP in der Tumorprogression hindeuten. So wurde in Versuchen durch TSP die Adhäsion, Migration und Invasion von Tumorzellen in Mäusen gefördert: In einem Rattenaortamodell war TSP sogar in der Lage, die Angiogenese zu stimulieren (Tuszynski & Nicosia, 1996).

In dem hier durchgeführten *Western Blot* konnte im Gegensatz zu oben beschriebenen Daten (Mosher et. al., 1982; Tuszynski & Nicosia, 1996) in keiner der verwendeten Tumorzelllinien TSP gefunden werden, während bei allen Endothelzellarten ein Signal auftrat. Dieser Befund bestärkte die Annahme, daß TSP möglicherweise für die Chemotaxis der Tumorzellen verantwortlich ist und wurde durch die *Checkerboard*-Analysen weiter unterstützt, in denen TSP in hohen Konzentrationen (45 µg/ ml) in der Lage war, eine Chemotaxis von Melanomzellen herbeizuführen. Jedoch konnte der durch PAEC-Medium verursachte chemotaktische Effekt auf Melanomzellen mit Hilfe von TSP oder auch Antikörpern gegen TSP nicht reduziert werden. Möglicherweise ist für die Endothelzell-bedingte Stimulation der Chemotaxis nicht TSP alleine verantwortlich, sondern es ist ein Zusammenwirken mit einem oder mehreren anderen Faktoren erforderlich. Damit ließe sich auch das TSP-Signal im *Western Blot* bei den HMEC-1-Zellen erklären. Da das konditionierte Medium dieser Zellen in den *Checkerboard*-Analysen lediglich eine Chemokinese aber keine Chemotaxis von Tumorzellen auslöste, fehlt diesen Zellen womöglich ein oder mehrere weitere interagierende Faktoren.

Fibronektin

Als weiterer potentieller Kandidat für die Stimulation der Chemotaxis von Tumorzellen konnte Fibronektin identifiziert werden. Fibronektin, ein makromolekulares Glykoprotein der Extrazellulärmatrix, ist ein Dimer bestehend aus zwei Untereinheiten, die nahe am Carboxylende durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Hynes, 1986). Bei vielen Tumorzellen spielt Fibronektin sowohl in der Zelladhäsion als auch in der Migration eine Rolle. So ist dieses Protein in gelöstem Zustand in der Lage, ein chemotaktisches Migrationsverhalten vieler Tumorzelllinien auszulösen (Klominek et. al., 1997; Geng et. al., 1998), während es substratgebunden vielfach Haptotaxis auslöst (Klominek et. al., 1997; Hayashido et. al., 1998). Die Fibronektin-bedingte Migration der Zellen hängt stark von der Anwesenheit von β 1-Integrinen und der im Fibronektin enthaltenen korrespondierenden RGD-Sequenz ab. Durch Antikörper gegen diese Integrine oder ein RGD-enthaltendes Peptid kann die Migrati-

on der Zellen zum größten Teil inhibiert werden (Brenner et. al., 2000). *Checkerboard*-analysen einiger Gliomzelllinien deuteten jedoch darauf hin, daß sich viele Zellen in Bezug auf Fibronectin überwiegend chemokinetisch und nicht chemotaktisch verhalten (Ohnishi et. al., 1997).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigten jedoch eindeutig, daß Fibronectin in gelöster Form eine Chemotaxis von Tumorzellen auslöst. Allerdings war dieses Protein alleine - ebenso wie TSP - nicht dazu in der Lage, die Wirkung des PAEC-Mediums durch den Einsatz in der jeweils entgegengesetzten Kammer in *Checkerboard*-Analysen wieder aufzuheben. Diese Ergebnisse lassen es unwahrscheinlich erscheinen, daß Fibronectin alleine die chemotaktische Reaktion der Tumorzellen hervorrufen kann. Außerdem war es zu einem gewissen Anteil bereits in den Fibrinogenlösungen und damit in den Fibringelen der dreidimensionalen Migrationsversuche enthalten. Die so bereits existierende gleichmäßige Verteilung des Proteins im gesamten Fibringel hätte eine gerichtete Migration auf eine Fibronectinquelle verhindert. Auch in den zweidimensionalen Versuchen waren die Polycarbonatmembranen bereits mit 10 µg/ml Fibronectin beschichtet. Die dadurch möglicherweise verursachte Stimulation einer Haptotaxis hatte jedoch offensichtlich keinen Einfluß auf die Endothelzell-bedingte Chemotaxis der Tumorzellen. Aufgrund dieser Feststellungen kommt Fibronectin als alleiniges Chemotaxin nicht in Frage, ist jedoch als möglicher Kofaktor denkbar.

Tenascin

Tenascin wurde ebenfalls als potentielles Chemokin im konditionierten Medium von Endothelzellen identifiziert. Es ist ein Glykoproteinkomplex, der aus sechs identischen oder ähnlichen Polypeptidketten besteht, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Es spielt eine Rolle in der Embryonalentwicklung und wird später u.a. bei Prozessen der Wundheilung, Tumorentwicklung und Metastasierung erhöht exprimiert (Jones & Jones, 2000). Tenascin wird in malignen Tumoren zusammen mit Fibronectin koexprimiert und es wurde festgestellt, daß es die Fibronectin-bedingte Migration noch weiter stimulieren konnte. Tenascin alleine war ebenfalls in der Lage, die Migration von Gliomzellen haptotaktisch zu fördern (Deryugina & Bourdon, 1996). Diese Tatsachen sprechen für eine mögliche Beteiligung von Tenascin an der Migrationsstimulation der Tumorzellen in dieser Arbeit. Jedoch wurde Tenascin in erhöhten Konzentrationen auch in migrierenden Tumorzellen selbst gefunden (Phillips et. al., 1998). In einem weiteren Fall konnte eine zytoplasmatische Tenascin-

Färbung nur in invasiven Tumorzellen in der Peripherie von Tumorzellnestern und speziell auch im Tumorstroma um die Tumoren herum gefunden werden (Yoshida et. al., 1999). Diesen Daten zufolge würde in den zwei- und dreidimensionalen Migrationsversuchen dieser Arbeit dem Tenascin-Gradienten der Endothelzellen tumorsezerniertes Tenascin gegenüberstehen, welches einer gerichteten Migration der Tumorzellen auf das Endothelzellsezernierte Tenascin entgegenwirken würde. Ein direkter Einfluß auf die Chemotaxis der Tumorzellen ist somit unwahrscheinlich. Eine Beteiligung an der Gesamtwirkung des konditionierten Endothelzellmediums jedoch ist denkbar, indem es die Zellantwort auf andere Matrixkomponenten moduliert, sowie es auch die Fibronektin-bedingte Migration beeinflussen kann (Deryugina & Bourdon, 1996).

α -Aktinin

Weiterhin konnten α -Aktinin-1 und -4 identifiziert werden. α -Aktinin ist ein Aktin-quervernetzendes Protein, welches Aktinfilamente zu parallelen Bündeln verbindet. α -Aktinin-1 befindet sich in Stressfasern und hilft bei der Verankerung der Faserenden an den fokalen Kontakten der Plasmamembran (Bretscher, 1991; Hartwig & Kwiatkowski, 1991). Hingegen wurde α -Aktinin-4 im Zytoplasma - aber nicht an fokalen Kontakten - von migrierenden Zellen gefunden (Honda et. al., 1998). Für das zytoplasmatische α -Aktinin-4 wurde eine Rolle in der Metastasierung von humanen Tumoren durch die Regulierung des Aktinzytoskeletts und die Erhöhung der Zellmotilität vorgeschlagen. Bei Inaktivierung des Aktinin-4 durch einen Transfer zum Nukleus wurde das infiltrierende Potential der Tumore stark zurückgesetzt (Honda et. al., 1998). Hinsichtlich einer intrazellulären Umorganisation des Aktinzytoskeletts mit anschließender Erhöhung der Migrationsrate und Fähigkeit zur Metastasierung kann eine Beteiligung des Aktinins in verschiedenen Tumorzellen denkbar sein (Byers et. al., 1992). Jedoch ist bisher eine extrazelluläre Anwesenheit von α -Aktinin noch nicht mit einer erhöhten Tumorzellmigration in Verbindung gebracht worden. Außerdem ist α -Aktinin sowohl in Endothel- als auch in Tumorzellen vorhanden, was eine Beteiligung an der Endothelzell-stimulierten Chemotaxis der Tumorzellen unwahrscheinlich macht.

Hitzeschock-Protein 90

Als letztes identifiziertes Protein spielt das Hitzeschock-Protein (HSP) 90 möglicherweise eine Rolle in der Chemoattraktion von Tumorzellen. Es ist in der Signaltransduktion und Regulation von Apoptose involviert und wird erhöht in verschiedenen Tumoren gefunden

5 Diskussion

(Gebhard et. al., 1999; Yano et. al., 1999; Katoh et. al., 2000; Hermisson et. al., 2000). HSP 90 wurde außer in Tumorzellen selbst auch im umliegenden Parenchym, insbesondere in den Endothelzellen, nachgewiesen (Strik et. al., 2000). Dort ist es unter anderem an der Reorganisation des Zytoskeletts zur Stimulation der Migration beteiligt (Rousseau et. al., 2000). Da HSP 90 vorwiegend in Tumorzellen selbst produziert wird, ist es eher unwahrscheinlich, daß die Endothelzellen einen HSP 90-Gradienten aufbauen können, der für eine chemotaktische Anziehung von Tumorzellen erforderlich wäre.

Insgesamt sind noch weitere Reinigungsverfahren und Migrationsstudien notwendig, um den chemotaktischen Faktor zu identifizieren. Denkbar wäre auch eine Kostimulation der directionalen Migration von Tumorzellen durch zwei oder sogar mehrere Faktoren, denn wie bereits beschrieben sind einige Proteine erst durch die Komplexbildung mit anderen Molekülen in der Lage, bestimmte Reaktionen hervorzurufen.

6 Literaturverzeichnis

- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., and Seed, B. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61, 1303-1313.
- Asplund, T., Brinck, J., Suzuki, M., Briskin, M.J., and Heldin, P. (1998). Characterization of hyaluronan synthase from a human glioma cell line. *Biochim.Biophys.Acta* 1380, 377-388.
- Assmann, V., Marshall, J.F., Fieber, C., Hofmann, M., and Hart, I.R. (1998). The human hyaluronan receptor RHAMM is expressed as an intracellular protein in breast cancer cells. *J.Cell Sci.* 111, 1685-1694.
- Assmann, V., Jenkinson, D., Marshall, J.F., and Hart, I.R. (1999). The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments. *J.Cell Sci.* 112, 3943-3954.
- Ausprunk, D.H. and Folkman, J. (1977). Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc.Res.* 14, 53-65.
- Bale, M.D. and Mosher, D.F. (1986). Effects of thrombospondin on fibrin polymerization and structure. *J.Biol.Chem.* 261, 862-868.
- Bleuel, K., Popp, S., Fusenig, N.E., Stanbridge, E.J., and Boukamp, P. (1999). Tumor suppression in human skin carcinoma cells by chromosome 15 transfer or thrombospondin-1 overexpression through halted tumor vascularization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96, 2065-2070.
- Blomback, B., Carlsson, K., Hessel, B., Liljeborg, A., Procyk, R., and Aslund, N. (1989). Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity [published erratum appears in *Biochim Biophys Acta* 1989 Nov 30;999(2):225]. *Biochim.Biophys.Acta* 997, 96-110.

6 Literaturverzeichnis

- Blood, C.H. and Zetter, B.R. (1990). Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim.Biophys.Acta* 1032, 89-118.
- Bouchard, M., Pare, C., Dutasta, J.P., Chauvet, J.P., Gicquaud, C., and Auger, M. (1998). Interaction between G-actin and various types of liposomes: A 19F, 31P, and 2H nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry* 37, 3149-3155.
- Boyden, S.V. (1962). The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J.Exp.Med.* 115, 453-466.
- Brecht, M., Mayer, U., Schlosser, E., and Prehm, P. (1986). Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis. *Biochem.J.* 239, 445-450.
- Brenner, W., Gross, S., Steinbach, F., Horn, S., Hohenfellner, R., and Thuroff, J.W. (2000). Differential inhibition of renal cancer cell invasion mediated by fibronectin, collagen IV and laminin. *Cancer Lett.* 155, 199-205.
- Bretscher, A. (1991). Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Annu.Rev.Cell Biol.* 7:337-74., 337-374.
- Byers, H.R., Etoh, T., Vink, J., Franklin, N., Gattoni-Celli, S., and Mihm, M.C.J. (1992). Actin organization and cell migration of melanoma cells relate to differential expression of integrins and actin-associated proteins. *J.Dermatol.* 19, 847-852.
- Carr, M.E. and Gabriel, D.A. (1980). The effect of dextran 70 on the structure of plasma-derived fibrin gels. *J.Lab.Clin.Med.* 96, 985-993.
- Carr, M.E.J., Shen, L.L., and Hermans, J. (1977). Mass-length ratio of fibrin fibers from gel permeation and light scattering. *Biopolymers* 16, 1-15.
- Carr, M.E.J. and Hardin, C.L. (1987). Fibrin has larger pores when formed in the presence of erythrocytes. *Am.J.Physiol.* 253, H1069-H1073
- Carr, M.E.J. and Hauge, Y. (1990). Enhancement of red cell washout from blood clots by alteration of gel pore size and red cell flexibility. *Am.J.Physiol.* 259, H1527-H1532

6 Literaturverzeichnis

- Carter, W.G. and Wayner, E.A. (1988). Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. *J.Biol.Chem.* 263, 4193-4201.
- Castle, V.P., Dixit, V.M., and Polverini, P.J. (1997). Thrombospondin-1 suppresses tumorigenesis and angiogenesis in serum- and anchorage-independent NIH 3T3 cells. *Lab.Invest.* 77, 51-61.
- Choquet, D., Felsenfeld, D.P., and Sheetz, M.P. (1997). Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell* 88, 39-48.
- Costantini, V. and Zacharski, L.R. (1993). Fibrin and cancer. *Thromb.Haemost.* 69, 406-414.
- Dardik, R. and Lahav, J. (1999). Functional changes in the conformation of thrombospondin-1 during complexation with fibronectin or heparin. *Exp.Cell Res.* 248, 407-414.
- de Belder, A.N. and Wik, K.O. (1975). Preparation and properties of fluorescein-labelled hyaluronate. *Carbohydr.Res.* 44, 251-257.
- Dejana, E., Languino, L.R., Polentarutti, N., Balconi, G., Ryckewaert, J.J., Larrieu, M.J., Donati, M.B., Mantovani, A., and Marguerie, G. (1985). Interaction between fibrinogen and cultured endothelial cells. Induction of migration and specific binding. *J.Clin.Invest.* 75, 11-18.
- Delpech, B., Girard, N., Bertrand, P., Courel, M.N., Chauzy, C., and Delpech, A. (1997). Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer. *J.Intern.Med.* 242, 41-48.
- Denekamp, J. and Hobson, B. (1982). Endothelial-cell proliferation in experimental tumours. *Br.J.Cancer* 46, 711-720.
- Deryugina, E.I. and Bourdon, M.A. (1996). Tenascin mediates human glioma cell migration and modulates cell migration on fibronectin. *J.Cell Sci.* 109, 643-652.
- Docherty, R., Forrester, J.V., Lackie, J.M., and Gregory, D.W. (1989). Glycosaminoglycans facilitate the movement of fibroblasts through three-dimensional collagen matrices. *J.Cell Sci.* 92, 263-270.

6 Literaturverzeichnis

- Drenckhahn, D. and Pollard, T.D. (1986). Elongation of actin filaments is a diffusion-limited reaction at the barbed end and is accelerated by inert macromolecules. *J.Biol.Chem.* *261*, 12754-12758.
- Dvorak, H.F., Dvorak, A.M., Manseau, E.J., Wiberg, L., and Churchill, W.H. (1979). Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs. Role of cellular immunity, myofibroblasts, microvascular damage, and infarction in line 1 tumor regression. *J.Natl.Cancer Inst.* *62*, 1459-1472.
- Dvorak, H.F., Nagy, J.A., Berse, B., Brown, L.F., Yeo, K.T., Yeo, T.K., Dvorak, A.M., van de Water, L., Sioussat, T.M., and Senger, D.R. (1992). Vascular permeability factor, fibrin, and the pathogenesis of tumor stroma formation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* *667:101-11*, 101-111.
- Eggl, P.S. and Graber, W. (1995). Association of hyaluronan with rat vascular endothelial and smooth muscle cells. *J.Histochem.Cytochem.* *43*, 689-697.
- Elson, E.L. (1988). Cellular mechanics as an indicator of cytoskeletal structure and function. *Annu.Rev.Biophys.Biophys.Chem.* *17:397-430.*, 397-430.
- Esser, S., Wolburg, K., Wolburg, H., Breier, G., Kurzchalia, T., and Risau, W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J.Cell Biol.* *140*, 947-959.
- Evanko, S.P. and Wight, T.N. (1999). Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. *J.Histochem.Cytochem.* *47*, 1331-1342.
- Ferry, J.D. and Morrison, P.R. (1947). Preparation and properties of serum and plasma proteins. VIII. The conversion of human fibrinogen to fibrin under various conditions. *J.Am.Chem.Soc.* *69*, 388-400.
- Fraser, J.R., Laurent, T.C., and Laurent, U.B. (1997). Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J.Intern.Med.* *242*, 27-33.
- Friedl, P. and Brocker, E.B. (2000). The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol.Life Sci.* *57*, 41-64.

6 Literaturverzeichnis

- Gabriel, D.A., Muga, K., and Boothroyd, E.M. (1992). The effect of fibrin structure on fibrinolysis. *J.Biol.Chem.* 267, 24259-24263.
- Gahtan, V., Wang, X.J., Willis, A.I., Tuszynski, G.P., and Sumpio, B.E. (1999). Thrombospondin-1 regulation of smooth muscle cell chemotaxis is extracellular signal-regulated protein kinases 1/2 dependent. *Surgery* 126, 203-207.
- Gebhard, B., Schutz, G., Ecker, R.C., Steiner, G.E., Rudas, M., Gnant, M., and Oehler, R (1999). MHC-class-I expression in human breast cancer correlates with nuclear localization of the 90 kDa heat-shock-protein. *Anticancer Res.* 19, 5293-5297.
- Gelfand, V.I. and Bershadsky, A.D. (1991). Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function. *Annu.Rev.Cell Biol.* 7:93-116., 93-116.
- Geng, L., Ali, S.A., Marshall, J.F., Mackay, C.L., Hart, I.R., Delcommence, M., Streuli, C.H., and Rees, R.C. (1998). Fibronectin is chemotactic for CT 26 colon carcinoma cells: sub-lines selected for increased chemotaxis to fibronectin display decreased tumorigenicity and lung colonization. *Clin.Exp.Metastasis* 16, 683-691.
- Goebeler, M., Kaufmann, D., Brocker, E.B., and Klein, C.E. (1996). Migration of highly aggressive melanoma cells on hyaluronic acid is associated with functional changes, increased turnover and shedding of CD44 receptors. *J.Cell Sci.* 109, 1957-1964.
- Gordon, D.J., Yang, Y.Z., and Korn, E.D. (1976). Polymerization of *Acanthamoeba* actin. Kinetics, thermodynamics, and co-polymerization with muscle actin. *J.Biol.Chem.* 251, 7474-7479.
- Grammatikakis, N., Grammatikakis, A., Yoneda, M., Yu, Q., Banerjee, S.D., and Toole, B.P. (1995). A novel glycosaminoglycan-binding protein is the vertebrate homologue of the cell cycle control protein, Cdc37. *J.Biol.Chem.* 270, 16198-16205.
- Green, S.J., Tarone, G., and Underhill, C.B. (1988). Distribution of hyaluronate and hyaluronate receptors in the adult lung. *J.Cell Sci.* 90, 145-156.
- Guo, Y., Ma, J., Wang, J., Che, X., Narula, J., Bigby, M., Wu, M., and Sy, M.S. (1994). Inhibition of human melanoma growth and metastasis in vivo by anti-CD44 monoclonal

6 Literaturverzeichnis

- antibody [published erratum appears in *Cancer Res* 1994 Apr 15;54(8):2284]. *Cancer Res.* 54, 1561-1565.
- Hamada, J., Cavanaugh, P.G., Lotan, O., and Nicolson, G.L. (1992). Separable growth and migration factors for large-cell lymphoma cells secreted by microvascular endothelial cells derived from target organs for metastasis. *Br.J.Cancer* 66, 349-354.
- Hamada, J., Cavanaugh, P.G., Miki, K., and Nicolson, G.L. (1993). A paracrine migration-stimulating factor for metastatic tumor cells secreted by mouse hepatic sinusoidal endothelial cells: identification as complement component C3b. *Cancer Res.* 53, 4418-4423.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.
- Hardwick, C., Hoare, K., Owens, R., Hohn, H.P., Hook, M., Moore, D., Cripps, V., Austen, L., Nance, D.M., and Turley, E.A. (1992). Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility [published erratum appears in *J Cell Biol* 1992 Aug;118(3):753]. *J.Cell Biol.* 117, 1343-1350.
- Hartwig, J.H. and Kwiatkowski, D.J. (1991). Actin-binding proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* 3, 87-97.
- Hayashido, Y., Lucas, A., Rougeot, C., Godyna, S., Argraves, W.S., and Rochefort, H. (1998). Estradiol and fibulin-1 inhibit motility of human ovarian- and breast-cancer cells induced by fibronectin. *Int.J.Cancer* 75, 654-658.
- Heldin, P., Laurent, T.C., and Heldin, C.H. (1989). Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochem.J.* 258, 919-922.
- Hermisson, M., Strik, H., Rieger, J., Dichgans, J., Meyermann, R., and Weller, M. (2000). Expression and functional activity of heat shock proteins in human glioblastoma multiforme. *Neurology* 54, 1357-1365.
- Hofmann, M., Fieber, C., Assmann, V., Gottlicher, M., Sleeman, J., Plug, R., Howells, N., von Stein, O., Ponta, H., and Herrlich, P. (1998). Identification of IHABP, a 95 kDa intracellular hyaluronate binding protein. *J.Cell Sci.* 111, 1673-1684.

6 Literaturverzeichnis

- Hofmann, M., Assmann, V., Fieber, C., Sleeman, J.P., Moll, J., Ponta, H., Hart, I.R., and Herrlich, P. (1998). Problems with RHAMM: a new link between surface adhesion and oncogenesis? [letter; comment]. *Cell* 95, 591-592.
- Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J. (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284, 1994-1998.
- Homer, K.A., Denbow, L., and Beighton, D. (1993). Spectrophotometric method for the assay of glycosaminoglycans and glycosaminoglycan-depolymerizing enzymes. *Anal.Biochem.* 214, 435-441.
- Honda, K., Yamada, T., Endo, R., Ino, Y., Gotoh, M., Tsuda, H., Yamada, Y., Chiba, H., and Hirohashi, S. (1998). Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J.Cell Biol.* 140, 1383-1393.
- Hudlicka, O. (1991). What makes blood vessels grow? *J.Physiol.* 444:1-24., 1-24.
- Hynes, R.O. (1986). Fibronectins. *Sci.Am.* 254, 42-51.
- Ingber, D.E. and Folkman, J. (1989). Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *J.Cell Biol.* 109, 317-330.
- Ingber, D.E. (1993). Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J.Cell Sci.* 104, 613-627.
- Jalkanen, S. and Jalkanen, M. (1992). Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J.Cell Biol.* 116, 817-825.
- Jones, F.S. and Jones, P.L. (2000). The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev.Dyn.* 218, 235-259.
- Kan, F.W. (1990). High-resolution localization of hyaluronic acid in the golden hamster oocyte-cumulus complex by use of a hyaluronidase-gold complex. *Anat.Rec.* 228, 370-382.

6 Literaturverzeichnis

- Katoh, M., Koninkx, J., and Schumacher, U. (2000). Heat shock protein expression in human tumours grown in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Lett.* *161*, 113-120.
- Klominek, J., Sumitran, K.S., and Hauzenberger, D. (1997). Differential motile response of human malignant mesothelioma cells to fibronectin, laminin and collagen type IV: the role of beta1 integrins. *Int.J.Cancer* *72*, 1034-1044.
- Koochekpour, S., Pilkington, G.J., and Merzak, A. (1995). Hyaluronic acid/CD44H interaction induces cell detachment and stimulates migration and invasion of human glioma cells in vitro. *Int.J.Cancer* *63*, 450-454.
- Kornovski, B.S., McCoshen, J., Kredentser, J., and Turley, E. (1994). The regulation of sperm motility by a novel hyaluronan receptor. *Fertil.Steril.* *61*, 935-940.
- Kouyama, T. and Mihashi, K. (1981). Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iidoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur.J.Biochem.* *114*, 33-38.
- Lacy, B.E. and Underhill, C.B. (1987). The hyaluronate receptor is associated with actin filaments. *J.Cell Biol.* *105*, 1395-1404.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Latallo, Z.S., Fletcher, A.P., Alkjaersig, N., and Sherry, S. (1962). Influence of pH, ionic strength, neutral ions, and thrombin on fibrin polymerization. *Am.J.Physiol.* *202*, 675-680.
- Lauffenburger, D.A. and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* *84*, 359-369.
- Laurent, T.C. and Fraser, J.R. (1992). Hyaluronan. *FASEB J.* *6*, 2397-2404.
- Lawler, J. (1986). The structural and functional properties of thrombospondin. *Blood* *67*, 1197-1209.

6 Literaturverzeichnis

- LeBoeuf, R.D., Raja, R.H., Fuller, G.M., and Weigel, P.H. (1986). Human fibrinogen specifically binds hyaluronic acid. *J.Biol.Chem.* 261, 12586-12592.
- LeBoeuf, R.D., Gregg, R.R., Weigel, P.H., and Fuller, G.M. (1987). Effects of hyaluronic acid and other glycosaminoglycans on fibrin polymer formation. *Biochemistry* 26, 6052-6057.
- Li, C.Y., Shan, S., Huang, Q., Braun, R.D., Lanzen, J., Hu, K., Lin, P., and Dewhirst, M.W. (2000). Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis: evaluation via skin window chambers in rodent models. *J.Natl.Cancer Inst.* 92, 143-147.
- Lindner, R.A. and Ralston, G.B. (1997). Macromolecular crowding: effects on actin polymerisation. *Biophys.Chem.* 66, 57-66.
- Liu, D., Zhang, D., Mori, H., and Sy, M.S. (1996). Binding of CD44 to hyaluronic acid can be induced by multiple signals and requires the CD44 cytoplasmic domain. *Cell Immunol.* 174, 73-83.
- Margolis, R.K., Crockett, C.P., Kiang, W.L., and Margolis, R.U. (1976). Glycosaminoglycans and glycoproteins associated with rat brain nuclei. *Biochim.Biophys.Acta* 451, 465-469.
- McCourt, P.A., Ek, B., Forsberg, N., and Gustafson, S. (1994). Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface receptor for hyaluronan. *J.Biol.Chem.* 269, 30081-30084.
- McCourt, P.A. and Gustafson, S. (1997). On the adsorption of hyaluronan and ICAM-1 to modified hydrophobic resins. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 29, 1179-1189.
- McDonald, J.A. (1989). Matrix regulation of cell shape and gene expression. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1, 995-999.
- McGary, C.T., Raja, R.H., and Weigel, P.H. (1989). Endocytosis of hyaluronic acid by rat liver endothelial cells. Evidence for receptor recycling. *Biochem.J.* 257, 875-884.
- McGuire, P.G., Castellot, J.J.J., and Orkin, R.W. (1987). Size-dependent hyaluronate degradation by cultured cells. *J.Cell Physiol.* 133, 267-276.

6 Literaturverzeichnis

- Menzel, E.J. and Farr, C. (1998). Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Lett.* *131*, 3-11.
- Meyer, K. and Palmer, J.W. (1934). The polysaccharide of the vitreous humor. *J.Biol.Chem.* *107*, 629-634.
- Mosher, D.F., Doyle, M.J., and Jaffe, E.A. (1982). Synthesis and secretion of thrombospondin by cultured human endothelial cells. *J.Cell Biol.* *93*, 343-348.
- Nair, C.H., Shah, G.A., and Dhall, D.P. (1986). Effect of temperature, pH and ionic strength and composition on fibrin network structure and its development. *Thromb.Res.* *42*, 809-816.
- Nair, C.H. and Shats, E.A. (1997). Compaction as a method to characterise fibrin network structure: kinetic studies and relationship to crosslinking. *Thromb.Res.* *88*, 381-387.
- Nehls, V. and Drenckhahn, D. (1995). A microcarrier-based cocultivation system for the investigation of factors and cells involved in angiogenesis in three-dimensional fibrin matrices in vitro. *Histochem.Cell Biol.* *104*, 459-466.
- Nehls, V. and Drenckhahn, D. (1995). A novel, microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis. *Microvasc.Res.* *50*, 311-322.
- Nehls, V. and Herrmann, R. (1996). The configuration of fibrin clots determines capillary morphogenesis and endothelial cell migration. *Microvasc.Res.* *51*, 347-364.
- Nehls, V., Herrmann, R., and Huhnken, M. (1998). Guided migration as a novel mechanism of capillary network remodeling is regulated by basic fibroblast growth factor. *Histochem.Cell Biol.* *109*, 319-329.
- Nehls, V. and Hayen, W. (2000). Are hyaluronan receptors involved in three-dimensional cell migration? *Histol.Histopathol.* *2000.Apr.;15(2.):629-36.* *15*, 629-636.
- Nicosia, R.F., T'chao, R., and Leighton, J. (1986). Interactions between newly formed endothelial channels and carcinoma cells in plasma clot culture. *Clin.Exp.Metastasis* *4*, 91-104.

6 Literaturverzeichnis

- Nie, D., Lamberti, M., Zacharek, A., Li, L., Szekeres, K., Tang, K., Chen, Y., and Honn, K.V. (2000). Thromboxane A(2) regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 267, 245-251.
- Ogston, A.G. (1958). The spaces in a uniform random suspension of fibers. *Trans.Faraday Soc.* 54, 1754-1757.
- Ohnishi, T., Arita, N., Hiraga, S., Taki, T., Izumoto, S., Fukushima, Y., and Hayakawa, T. (1997). Fibronectin-mediated cell migration promotes glioma cell invasion through chemokinetic activity. *Clin.Exp.Metastasis* 15, 538-546.
- Oliferenko, S., Paiha, K., Harder, T., Gerke, V., Schwarzler, C., Schwarz, H., Beug, H., Gunthert, U., and Huber, L.A. (1999). Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *J.Cell Biol.* 146, 843-854.
- Patterson, S.D. (1998). Protein identification and characterization by mass spectrometry. *Curr.Prot.Mol.Biol. Supplement* 41, 10.22.1-10.22.24
- Phillips, G.R., Krushel, L.A., and Crossin, K.L. (1998). Domains of tenascin involved in glioma migration. *J.Cell Sci.* 111, 1095-1104.
- Pötgens, A.J., Lubsen, N.H., van, A.M., Schoenmakers, J.G., Ruiter, D.J., and de, W.R. (1995). Vascular permeability factor expression influences tumor angiogenesis in human melanoma lines xenografted to nude mice. *Am.J.Pathol.* 146, 197-209.
- Prehm, P. (1989). Identification and regulation of the eukaryotic hyaluronate synthase. *Ciba.Found.Symp.* 143:21-30; *discussion* 30-40, 281-5, 21-30.
- Rak, J., Filmus, J., and Kerbel, R.S. (1996). Reciprocal paracrine interactions between tumour cells and endothelial cells: the 'angiogenesis progression' hypothesis. *Eur.J.Cancer* 32A, 2438-2450.
- Riessen, R., Wight, T.N., Pastore, C., Henley, C., and Isner, J.M. (1996). Distribution of hyaluronan during extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation* 93, 1141-1147.

6 Literaturverzeichnis

- Ripellino, J.A., Klinger, M.M., Margolis, R.U., and Margolis, R.K. (1985). The hyaluronic acid binding region as a specific probe for the localization of hyaluronic acid in tissue sections. Application to chick embryo and rat brain. *J.Histochem.Cytochem.* 33, 1060-1066.
- Ripellino, J.A., Bailo, M., Margolis, R.U., and Margolis, R.K. (1988). Light and electron microscopic studies on the localization of hyaluronic acid in developing rat cerebellum. *J.Cell Biol.* 106, 845-855.
- Ripellino, J.A., Margolis, R.U., and Margolis, R.K. (1989). Immunoelectron microscopic localization of hyaluronic acid-binding region and link protein epitopes in brain. *J.Cell Biol.* 108, 1899-1907.
- Roberts, W.G. and Palade, G.E. (1997). Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res.* 57, 765-772.
- Rooney, P. and Kumar, S. (1993). Inverse relationship between hyaluronan and collagens in development and angiogenesis. *Differentiation.* 54, 1-9.
- Ropponen, K., Tammi, M., Parkkinen, J., Eskelinen, M., Tammi, R., Lipponen, P., Agren, U., Alhava, E., and Kosma, V.M. (1998). Tumor cell-associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58, 342-347.
- Rousseau, S., Houle, F., Kotanides, H., Witte, L., Waltenberger, J., Landry, J., and Huot, J. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *J.Biol.Chem.* 275, 10661-10672.
- Savani, R.C., Wang, C., Yang, B., Zhang, S., Kinsella, M.G., Wight, T.N., Stern, R., Nance, D.M., and Turley, E.A. (1995). Migration of bovine aortic smooth muscle cells after wounding injury. The role of hyaluronan and RHAMM. *J.Clin.Invest.* 95, 1158-1168.
- Schor, A.M. and Schor, S.L. (1983). Tumour angiogenesis. *J.Pathol.* 141, 385-413.
- Scott, J.E. (1992). Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. *FASEB J.* 6, 2639-2645.

6 Literaturverzeichnis

- Scully, M.F., Kakkar, V.V., Goodwin, C.A., and O'Regan, M. (1995). Inhibition of fibrinolytic activity by hyaluronan and its alcohol ester derivatives. *Thromb.Res.* 78, 255-258.
- Sherman, L., Sleeman, J., Herrlich, P., and Ponta, H. (1994). Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr.Opin.Cell Biol.* 6, 726-733.
- Simantov, R., Febbraio, M., Crombie, R., Asch, A.S., Nachman, R.L., and Silverstein, R.L. (2001). Histidine-rich glycoprotein inhibits the antiangiogenic effect of thrombospondin-1. *J.Clin.Invest.* 107, 45-52.
- Skinner, S.A., Tutton, P.J., and O'Brien, P.E. (1990). Microvascular architecture of experimental colon tumors in the rat. *Cancer Res.* 50, 2411-2417.
- Skobe, M., Rockwell, P., Goldstein, N., Vosseler, S., and Fusenig, N.E. (1997). Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat.Med.* 3, 1222-1227.
- Spudich, J.A. and Watt, S. (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J.Biol.Chem.* 246, 4866-4871.
- Stamenkovic, I., Aruffo, A., Amiot, M., and Seed, B. (1991). The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *EMBO J.* 10, 343-348.
- Storrie, B. and Madden, E.A. (1990). Isolation of subcellular organelles. *Methods Enzymol.* 182:203-25., 203-225.
- Strik, H.M., Weller, M., Frank, B., Hermisson, M., Deininger, M.H., Dichgans, J., and Meyermann, R. (2000). Heat shock protein expression in human gliomas. *Anticancer Res.* 20, 4457-4462.
- Svee, K., White, J., Vaillant, P., Jessurun, J., Roongta, U., Krumwiede, M., Johnson, D., and Henke, C. (1996). Acute lung injury fibroblast migration and invasion of a fibrin matrix is mediated by CD44. *J.Clin.Invest.* 98, 1713-1727.

6 Literaturverzeichnis

- Tamm, I., Kikuchi, T., Cardinale, I., and Krueger, J.G. (1994). Cell-adhesion-disrupting action of interleukin 6 in human ductal breast carcinoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* *91*, 3329-3333.
- Thompson, W.D., Shiach, K.J., Fraser, R.A., McIntosh, L.C., and Simpson, J.G. (1987). Tumours acquire their vasculature by vessel incorporation, not vessel ingrowth. *J.Pathol.* *151*, 323-332.
- Toole, B.P. (1982). Developmental role of hyaluronate. *Connect.Tissue Res.* *10*, 93-100.
- Tucker, R.P. and Erickson, C.A. (1984). Morphology and behavior of quail neural crest cells in artificial three-dimensional extracellular matrices. *Dev.Biol.* *104*, 390-405.
- Turley, E.A. and Torrance, J. (1985). Localization of hyaluronate and hyaluronate-binding protein on motile and non-motile fibroblasts. *Exp.Cell Res.* *161*, 17-28.
- Turley, E.A., Brassel, P., and Moore, D. (1990). A hyaluronan-binding protein shows a partial and temporally regulated codistribution with actin on locomoting chick heart fibroblasts. *Exp.Cell Res.* *187*, 243-249.
- Turley, E.A., Austen, L., Vandeligt, K., and Clary, C. (1991). Hyaluronan and a cell-associated hyaluronan binding protein regulate the locomotion of ras-transformed cells. *J.Cell Biol.* *112*, 1041-1047.
- Turley, E.A. (1992). Hyaluronan and cell locomotion. *Cancer Metastasis Rev.* *11*, 21-30.
- Turley, E.A., Austen, L., Moore, D., and Hoare, K. (1993). Ras-transformed cells express both CD44 and RHAMM hyaluronan receptors: only RHAMM is essential for hyaluronan-promoted locomotion. *Exp.Cell Res.* *207*, 277-282.
- Turley, E.A., Hossain, M.Z., Sorokan, T., Jordan, L.M., and Nagy, J.I. (1994). Astrocyte and microglial motility in vitro is functionally dependent on the hyaluronan receptor RHAMM. *Glia* *12*, 68-80.
- Turley, E.A., Pilarski, L., and Nagy, J.I. (1998). Problems with RHAMM: a new link between surface adhesion and oncogenesis? Response to Hofmann et. al. *Cell* *95*, 591-593.

6 Literaturverzeichnis

- Tuszynski, G.P. and Nicosia, R.F. (1996). The role of thrombospondin-1 in tumor progression and angiogenesis. *Bioessays* 18, 71-76.
- Underhill, C. (1992). CD44: the hyaluronan receptor. *J.Cell Sci.* 103, 293-298.
- Vajkoczy, P., Menger, M.D., Goldbrunner, R., Ge, S., Fong, T.A., Vollmar, B., Schilling, L., Ullrich, A., Hirth, K.P., Tonn, J.C., Schmiedek, P., and Rempel, S.A. (2000). Targeting angiogenesis inhibits tumor infiltration and expression of the pro-invasive protein SPARC. *Int.J.Cancer* 87, 261-268.
- van Gelder, J.M., Nair, C.H., and Dhall, D.P. (1996). Colloid determination of fibrin network permeability. *Blood Coagul.Fibrinolysis* 7, 747-760.
- von Bülow, C. (2001). Direktionale Migration von Endothelzellen zu Tumorzellen: Untersuchung an einem dreidimensionalen Fibrin-Gel-Angiogenese-System. Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie, Universität Würzburg. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Waldenström, A., Martinussen, H.J., Gerdin, B., and Hällgren, R. (1991). Accumulation of hyaluronan and tissue edema in experimental myocardial infarction. *J.Clin.Invest.* 88, 1622-1628.
- Weigel, P.H., Fuller, G.M., and LeBoeuf, R.D. (1986). A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. *J.Theor.Biol.* 119, 219-234.
- Weigel, P.H., Frost, S.J., McGary, C.T., and LeBoeuf, R.D. (1988). The role of hyaluronic acid in inflammation and wound healing. *Int.J.Tissue React.* 10, 355-365.
- Weissmann, B. and Meyer, K. (1954). The structure of hyalubiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. *J.Am.Chem.Soc.* 76, 1753-1757.
- Yano, M., Naito, Z., Yokoyama, M., Shiraki, Y., Ishiwata, T., Inokuchi, M., and Asano, G. (1999). Expression of hsp90 and cyclin D1 in human breast cancer. *Cancer Lett.* 137, 45-51.

6 Literaturverzeichnis

- Yoshida, A., Anand-Apte, B., and Zetter, B.R. (1996). Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. *Growth Factors*. *13*, 57-64.
- Yoshida, T., Yoshimura, E., Numata, H., Sakakura, Y., and Sakakura, T. (1999). Involvement of tenascin-C in proliferation and migration of laryngeal carcinoma cells. *Virchows Arch*. *435*, 496-500.
- Zhang, L., Underhill, C.B., and Chen, L. (1995). Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior. *Cancer Res*. *55*, 428-433.
- Zhang, S., Chang, M.C., Zylka, D., Turley, S., Harrison, R., and Turley, E.A. (1998). The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase. *J.Biol.Chem*. *273*, 11342-11348.

7 Abkürzungsverzeichnis

A ₃₅₀	Absorption bei 350 nm
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
b-PG	biotinyliertes Proteoglykan
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEAE	Diethylaminoethyl
DiI	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarboyanin-Perchlorat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerythrit
EBM	<i>endothelial basal medium</i>
EGF	<i>endothelial growth factor</i>
EGM	<i>endothelial growth medium</i>
f	femto
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm; Erdbeschleunigung
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HMEC-1	<i>human microvascular endothelial cells</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HS	Hyaluronsäure
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IHABP	<i>intracellular hyaluronic acid binding protein</i>

7 Abkürzungsverzeichnis

KDa	Kilodalton
l	Liter
m	milli; Meter
μ	mikro
M	molar
M199	Medium 199
MALDI-MS	<i>matrix-assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry</i>
min	Minute
MWCO	<i>molecular weight cutoff</i>
n	nano
O.D.	optische Dichte
p	pico
PAEC	<i>porcine aortic endothelial cells</i>
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert
PSD	<i>post-source decay</i>
RHAMM	<i>receptor for hyaluronic acid mediated motility</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
St.abw.	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
U	<i>unit</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	<i>volume per volume</i>
w/o	<i>without</i>
w/v	<i>weight per volume</i>

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Wiebke Hayen
Geburtsdatum	22.12.1971 in Oldenburg
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

1978 - 1982	Grundschule Röwekamp in Oldenburg
1982 - 1984	Orientierungsstufe Auf dem Ehnern in Oldenburg
1984 - 1991	Gymnasium Cäcilien- und Marienschule in Oldenburg
Juni 1991	Abitur

Studium

Oktober 1991 - 1997	Studium der Biologie für das Diplom an der Carl von Ossietzky Universität in Oldenburg
August 1993	Vordiplom-Prüfung
Juni 1996	Diplom-Prüfung
August 1996	Beginn der Diplomarbeit in Kooperation mit der Technischen Universität Hamburg-Harburg, Abteilung Umweltschutztechnik
August 1997	Abschluß des Biologie-Studiums mit der Diplomarbeit

Weitere Fortbildung

August-September 1997	Praktikum im Labor für Umweltanalytik G & P Torsten Plaar GmbH, Oldenburg
seit Dezember 1997-	Promotion in Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Anfertigung der Dissertation im Labor von Prof. U. Walter, (Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie) unter der Betreuung von Dr. med. habil. V. Nehls
April 2000	„Renate und Hans Lettré“- Forschungspreis der Gesellschaft für Zell und Gewebezüchtung für Arbeiten zur Zellmigration und Angiogenese in einem dreidimensionalen Matrix-Zell-Kulturmodell (zusammen mit Dr. V. Nehls)

Würzburg, September 2001

Erklärung gemäß § 4 Abs. 3 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe bisher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 28.09.2001